

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350131

研究課題名(和文) インスリンシグナル活性化作用を持つ香辛料成分の探索とその抗糖尿病効果の検証

研究課題名(英文) Exploration for and evaluation of anti-diabetic spice component through activating insulin signaling

研究代表者

赤川 貢 (Akagawa, Mitsugu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・講師

研究者番号：70405356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、インスリンシグナルを活性化する香辛料成分を探索・同定し、その抗糖尿病作用を評価することである。本研究では、インスリンシグナルを負に制御しているprotein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の阻害剤を探索し、アブラナ科植物由来のイソチオシアネート類が強い阻害活性を持つことを見出した。また、phenethyl isothiocyanate (PEITC) が培養筋管細胞内のPTP1B活性を顕著に阻害することでインスリン非依存的にインスリンシグナルを活性化し、抗糖尿病作用を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for insulin signal-activating component from spices and evaluated its anti-diabetic effects. We demonstrated that isothiocyanates found in cruciferous vegetables potently inhibits protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), which negatively regulates insulin signaling. Moreover, we found that phenethyl isothiocyanate induces the ligand-independent activation of insulin signaling by inhibiting cellular PTP1B and increases glucose uptake in mouse C2C12 myotubes.

研究分野：食品機能化学

キーワード：香辛料 機能性食品 2型糖尿病 インスリン抵抗性 プロテインチロシンホスファターゼ1B

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の一つである糖尿病は世界的な増加を示しており、我が国においても予備軍を含めた患者数は2,200万人に達し、非常に深刻な社会問題となっている。2型糖尿病は全糖尿病の90%以上を占め、インスリンの感受性と分泌量の低下が病因である。インスリンがインスリン受容体に結合すると、細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化され、細胞内シグナル伝達の活性化によりグルコースの細胞内への取り込みなどの細胞応答が誘導される。チロシンリン酸化によって活性化したインスリン受容体は、プロテインチロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) による脱リン酸化によって不活性化する。すなわち、インスリン受容体は、PTP1B によって負に制御されており、両者のバランスによりインスリンの感受性が調節されている。このバランスが崩壊して PTP1B 活性が亢進すると、チロシンの脱リン酸化が亢進し、インスリン抵抗性へと至る。従って、PTP1B を阻害すると、受容体の脱リン酸化が抑制されインスリン感受性が向上するため、糖尿病が予防・改善される。また、最近では PTP1B を阻害することによってインスリン非依存的なインスリン受容体の活性化が誘導されることが報告されている。こうした知見を基に、糖尿病治療薬の新しいターゲットとして PTP1B が注目され、PTP1B 阻害剤の探索・開発が国内外において盛んに行われている。しかしながら、有効かつ安全な PTP1B 阻害剤の開発には未だ至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、インスリンシグナルを活性化する香辛料成分を探索・同定し、その抗糖尿病作用を培養細胞および動物実験レベルで実証することである。また、分子レベルでそのメカニズムを解明することで科学的根拠に基づいた機能性食品の創出を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) PTP1B を阻害しインスリンシグナルを活性化する香辛料成分の単離・同定

香辛料からリコンビナント PTP1B を阻害する成分をクロマトグラフィーによって分離し、MS および NMR 解析によってその化学構造を決定した。

(2) 香辛料成分の PTP1B 阻害機構の解析

リコンビナント PTP1B およびマウス由来培養筋管細胞 (C2C12) を使用して香辛料成分の PTP1B 阻害機構を分子間相互作用や修飾反応など分子レベルで解析した。

(3) 培養筋肉細胞を使用した香辛料成分の抗糖尿病作用の評価

培養筋管細胞を使用して香辛料成分によるグルコース輸送体の細胞膜移行をウェスタンブロットにより解析した。また、グルコース取り込みの促進作用を蛍光グルコース誘導體 (2-NBDG) を使用して評価した。

### 4. 研究成果

Phenethyl isothiocyanate (PEITC)、benzyl isothiocyanate (BITC)、phenyl isothiocyanate (PITC) および allyl isothiocyanate (AITC) をそれぞれ recombinant PTP1B と pH 7.4、37 の条件下でインキュベートし、酵素活性を測定したところ、PEITC と BITC で顕著な阻害が認められた (図1)。また、PTP1B の反応

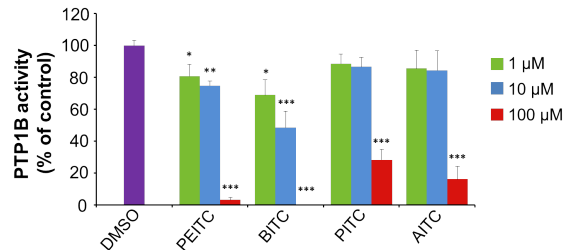


図1 ITC によるリコンビナント PTP1B 活性の阻害

性のチオール基をビオチン標識し、アビジンプロットングによって検出した結果、ITC 濃度依存的に反応性チオール基が減少することが明らかになった。さらに蛍光性の ITC である fluorescein isothiocyanate (FITC) を用い、PTP1B の反応性チオール基に付加するかどうかを検証した。その結果、FITC は優先的に PTP1B の反応性チオール基に結合することが判明した。次に、マウス由来 C2C12 筋芽細胞をインスリンの標的細胞である筋管細胞に分化させて、4種類の ITC を10分間処理し、インスリンシグナリングに与える影響をウェスタンブロットングによって評価した。その結果、PEITC が顕著にインスリン受容体 (IR) とその下流のシグナル分子 (IRS-1 および Akt) をインスリン非依存的に活性化することが明らかになった (図2)。PEITC (1-50 μM) は、投与量依存的にインスリンシグナルを活性化し、10分後から1時間後まで持続的な効果を示した。同様に、PTP1B 阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウム

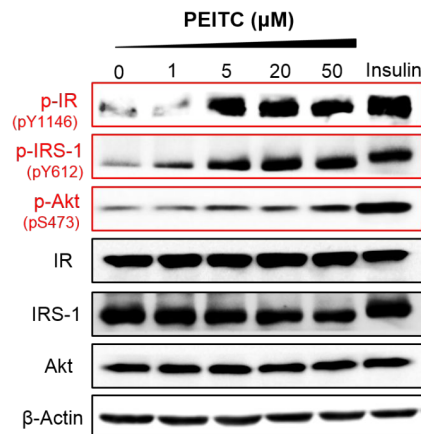


図2 PEITC によるインスリンシグナリングの活性化

(Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) で処理した場合においても 10 分後から IR とその下流のシグナリング分子の活性化が認められた。さらに PEITC 処理によって有意に C2C12 筋管細胞内の PTP1B 活性が

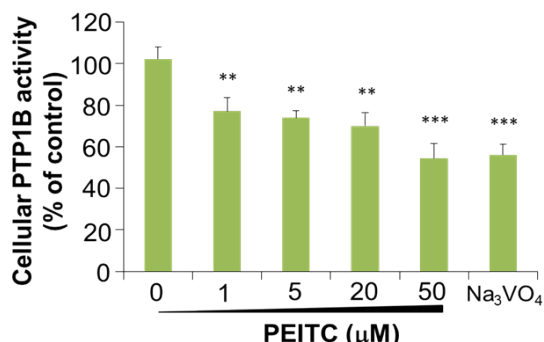


図3 PEITC による細胞内 PTP1B の阻害

阻害されることが判明した(図3)。また、PEITC 処理した筋管細胞の細胞膜画分を回収しグルコーストランスポーター (GLUT4) を検出した結果、PEITC によって GLUT4 の細胞膜への移行が誘導されることが明らかになった。そこで、PEITC が細胞内へのグルコース取り込みを促進するかどうかを蛍光グルコース誘導体である 2-NBDG を用いて評価したところ、PEITC 濃度依存的な 2-NBDG の細胞内蓄積が観察された。以上の結果から、図4に示すように PEITC は PTP1B 阻害剤として機能し、インスリンシグナリングを増強することが示唆された。本研究によって、PEITC による PTP1B の阻害を介したインスリンシグナリング活性化作用が明らかになり、2 型糖尿病を予防・改善する新たな機能性

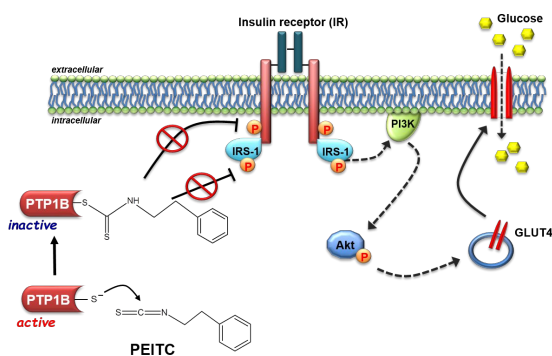


図4 推定される PEITC によるインスリンシグナリング活性化機構

食品として応用できる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Yamamoto N, Ueda-Wakagi M, Sato T, Kawasaki K, Sawada K, Kawabata K,

Akagawa M, Ashida H. Measurement of glucose uptake in cultured cells. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 査読有り, Vol. 71, No. 12, 2015, 1-26.

DOI: 10.1002/0471141755.ph1214s71

Maeda A, Kai K, Ishii M, Ishii T, Akagawa M. Safranal, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, activates insulin signaling in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 査読有り, Vol. 58, No. 6, 2014, 1177-1189.

DOI: 10.1002/mnfr.201300675.

[学会発表](計32件)

Miho Yagi, Yukiko Nakatsuji, Ayumi Maeda, Noriyuki Miyoshi, Yoshimasu Nakamura, Mitsugu Akagawa. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity in human SH-SY5Y neuronal cells. 2015 International Conference of Food Factors, 2015年11月23日, Coex (Seoul, Korea)

前田 歩海、赤川 眞、山下 陽子、芦田 均 サフラナルとピペリンは相乗的なグルコース取り込み促進効果を示すのか? 日本栄養・食糧学会 第54回近畿支部大会 2015年10月10日、神戸大学(神戸)

仲辻 友紀子、前田 歩海、三好 規之、中村 宜督、赤川 眞 イソチオシアネートによる protein tyrosine phosphatase 1B の阻害を介したインスリンシグナリング活性化作用の解明 第29回日本香辛料研究会学術講演会、2014年10月25日、札幌ガーデンパレス(札幌)

前田 歩海、甲斐 建次、石井 恵、石井 剛志、赤川 眞、芦田 均 サフラナルによる protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の阻害を介したインスリンシグナリング活性化作用の解明 日本食品科学工学会 第61回大会 中村学園大学(福岡) 2014年8月30日

前田 歩海、甲斐 建次、石井 恵、石井 剛志、赤川 眞、サフランの protein tyrosine phosphatase 1B の阻害を介した抗糖尿病作用の解明、第28回日本香辛料研究会学術講演会、2013年11月16日、三井ガーデンホテル千葉(千葉)

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

赤川 貢 (AKAGAWA Mitsugu)  
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究  
科・講師  
研究者番号：70405356

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

石井 剛志 (ISHII Takeshi)  
神戸学院大学・栄養学部・准教授  
研究者番号：50448700

柴田 貴広 (SHIBATA Takahiro)  
名古屋大学・生命農学研究科・准教授  
研究者番号：80447838

甲斐 建次 (KAI Kenji)  
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究  
科・講師  
研究者番号：40508404