

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750391

研究課題名(和文) 特異な構造と高い極性を有した植物由来抗糖尿病成分の糖取り込み促進機構解析

研究課題名(英文) Study on glucose uptake enhancement activity of plant derived compounds with unique and high polar structure

研究代表者

加藤 英介 (KATO, Eisuke)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40466446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は慢性的な高血糖症状を呈する生活習慣病であり、世界的な問題として取り上げられているため、治療法の開発は急務である。ところが糖尿病治療薬は病態維持を主眼としているため糖尿病を完治する医薬品は存在しない。本研究では糖尿病を治療できる可能性のある生物活性物質として筋細胞の糖取り込み促進物質の探索、機能解析を行った。その結果、糖取り込み促進活性物質として報告されているネオヘスペリドースの作用機構を明らかとした。また、新たな活性物質としてヒゲナミン配糖体、ヒドロキシアミン、不飽和脂肪酸、ピペリンなど各種同定した。さらにヒゲナミン配糖体とヒドロキシアミンの作用機構に関しても明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus is a disease that shows high blood glucose level. The disease is currently considered a worldwide problem and development of a method for treatment is highly required task. However, current medicines are developed on a intense to control blood glucose and prevent complications and thus, they are not suitable for completely curing the disease. In this study, bioactive compound that enhance the glucose uptake of muscle cells are studied as a candidate for diabetes mellitus curing compound. The function of the glucose uptake enhancer neohesperidose was revealed and several new glucose uptake enhancers including higenamine glucoside, hydroxylamine, unsaturated fatty acids, piperine were discovered. Also, the function of higenamine glucoside, hydroxylamine are revealed from inhibitor co-incubation experiment.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：糖尿病 糖取り込み促進物質 骨格筋 アドレナリン ピペリン 不飽和脂肪酸

1 . 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性的な高血糖症状を呈する生活習慣病である。糖尿病発症の主な原因はホルモンであるインスリンにあり、膵細胞によるインスリン分泌能力の低下、もしくは筋・脂肪細胞のインスリン感受性の低下などである。これらインスリンシグナル系が疲弊して機能が低下することで、血流から細胞内への糖の取り込みに不具合が生じ、高血糖状態が持続することになる。

ここ数十年で世界的な問題として取り上げられるようになった糖尿病は、2012 年時点で 3 億人を超える患者がおり (WHO 統計より)、世界でも最も患者数の多い病気の一つである。そのため、特にインスリンと関連シグナル経路をターゲットとした抗糖尿病薬の開発、糖尿病病態の解析が積極的に行われてきた。その結果、継続した薬物療法により糖尿病患者も健常人と同等の生活を送ることが可能となった。しかし、これらの薬は病態維持による合併症の阻止を目的としており、完治を目的とはしていない。つまり、糖尿病は一度患者になると一生病気と付き合い合っていく必要がある病気であり、“糖尿病の完治” は依然として大きな課題として存在している。

2 . 研究の目的

糖尿病を完治するための方法は運動療法にヒントが示されている。運動療法では、骨格筋の AMPK (AMP activated protein kinase) を活性化させて細胞内への糖取り込みを促進し、血糖値を低下させる (Koh et al., PNAS 2010, 107, 15541-15546)。しかも軽度の糖尿病であれば完治することが知られている。重要な点は、このような糖取り込みを促進させる機構は、インスリンとは独立したシグナル経路であることである。つまり、糖尿病患者の疲弊したインスリンシグナル経路ではなく、他の糖取り込み促進系を活性化させることで、糖尿病は完治へと繋がられるのである。

そこで本研究ではインスリンシグナル系以外の糖取り込み促進系を有する二糖ネオヘスペリドースの作用機構を解析するとともに、各種天然素材のスクリーニングから見つけてきた糖取り込み促進活性を示す植物の高極性成分の同定及び機能解析を行い、糖尿病の完治への活用を目的とした。

3 . 研究の方法

糖取り込み促進活性のモデル系としては筋モデル細胞株である L6 細胞を用いた。二糖ネオヘスペリドースの作用機構を解析には分子生物学的手法を用いた関連経路タンパク質の解析、ケミカルバイオロジーの手法による分子プローブの合成と作用タンパク質の直接同定を組み合わせを行った。

また天然素材のスクリーニングと活性成分の同定は、L6 細胞を用いた活性評価と各種

カラムクロマトグラフィーによる分画操作を用いた。精製された化合物は、核磁気共鳴分光法 (NMR)、質量分析法 (MS) を用いてその構造を解析した。市販品もしくは有機合成により同一の化合物を調製して試験することで、その活性を確認した。また分子生物学的手法を用いた関連経路タンパク質の解析を行い、その活性に関連する経路についても検討した。

4 . 研究成果

(1) ネオヘスペリドースの作用機構解析

筋細胞の糖取り込み過程に関わるシグナル経路タンパク質 PI3K と AMPK の阻害剤を用いた阻害試験を行った結果、ネオヘスペリドースの活性には両者が関係していることが分かった。またウェスタンブロッティングによりグルコーストランスポーター (GLUT) 1, 4 の関与を検討した結果、サンプル処理による GLUT 1, 4 の量には変化がないことが分かった。そのため、GLUT4 の膜移行過程が関与していることが分かり、阻害剤を用いた結果を支持するものとなった。

作用タンパク質の同定のために、ネオヘスペリドースを基盤とした蛍光プローブの合成を行った。各種のメチル化体を合成することで修飾可能な部位を見出し、それをもとに蛍光基としてフルオレセインを結合させることで蛍光プローブの合成を達成した。しかしながら、構造的に大きなフルオレセインを結合させた結果、活性が大きく低下してしまったため、さらなる検討が必要であることが分かった。

(2) 糖取り込み促進活性を示す植物の高極性成分の同定及び機能解析

レンシンからの探索と機能解析

レンシンはハス実の芯を乾燥させた漢方素材の一つである。スクリーニングからレンシンに強い糖取り込み促進活性が見出されたため、各種クロマトグラフィー手法を用いて活性成分を単離した。NMR, MS を用いて解析した結果、活性物質はヒゲナミン配糖体であることを明らかとした。ヒゲナミン配糖体の糖取り込み促進活性は新たな機能性である。さらに糖取り込み過程に関わるタンパク質の阻害剤を用いた機能解析の結果、ヒゲナミン配糖体は $\beta 2$ アドレナリン受容体を經由してその活性を示す事を明らかとした。

ヒゲナミン配糖体の構造活性相関研究のため、ラセミ体ではあるがアグリコン部分であるヒゲナミン及び、各種メチル化体を合成した。その結果、ヒゲナミンの構造が活性には重要であることが分かった。さらに $\beta 2$ アドレナリン受容体の生体内リガンドと活性を比較した結果、ヒゲナミンはドーパミンよりも強力で、アドレナリン、ノルアドレナリンと同等の活性を示す事を明らかとした (図 1)。

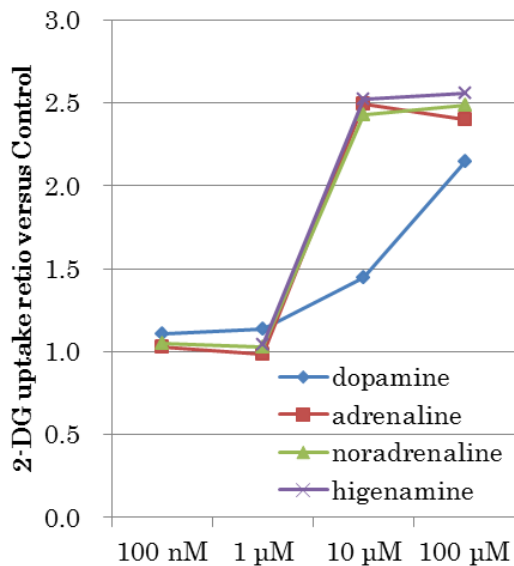


図 1. ヒゲナミン及び $\beta 2$ アドレナリン受容体リガンドの糖取り込み促進活性

カキドオシからの探索

カキドオシはレンセンソウとも呼ばれ健康茶として飲用されている。カキドオシを抽出し、各種カラムクロマトグラフィーにより生成した結果、構造未知の糖取り込み促進性を示す高極性化合物が単離された。阻害剤を用いた試験から、この化合物は AMPK を介して活性を示す事を明らかとした。また構造解析の途中で、ヒドロキシアミンに筋細胞の糖取り込み促進活性があることも見出した。

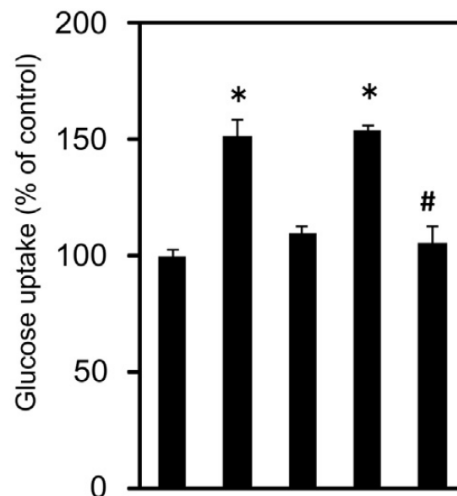
ヒドロキシアミンの糖取り込み機能解析

ヒドロキシアミンは無機化合物であり、非常に単純な構造を有する。このように単純な化合物がインスリンと同じ作用である糖取り込み促進活性を筋細胞に示す事は初の発見である。

阻害剤やウェスタンブロッティングを用いた作用機構解析の結果、ヒドロキシアミンは IRS-1 のリン酸化を介してインスリンと同じ機構により糖取り込みを促進していることが分かった(図 2)。インスリン受容体の関与やどのようにしてインスリン受容体基質 1 (IRS-1) のリン酸化を誘導しているのかはわかっていないが、既知の糖取り込み促進活性物質とは異なる構造であることから新たな薬剤開発などの基礎となることが期待され、非常に興味深い結果である。

その他の植物からの探索

上記以外の植物としてマカ、コショウより糖取り込み促進活性物質として、各種不飽和脂肪酸、ペペリンを見出すことが出来た。これらの作用機構についてはまだわかっていないが、どちらも食品として利用される植物であることから、機能性食品素材として糖尿病予防に活用が期待できる。



Insulin	HA	LY294002
-	-	-
+	-	-
+	-	+
-	+	-
-	+	+

図 2. ヒドロキシアミン (HA) の糖取り込み促進活性と PI3K 阻害剤 LY294002 による阻害

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Eisuke Kato, Yosuke Inagaki, Jun Kawabata, Higenamine 4'-O- β -D-glucoside in the lotus plumule induces glucose uptake of L6 cells through $\beta 2$ -adrenergic receptor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 23 巻, 2015, 3317-3321.

DOI:10.1016/j.bmc.2015.04.054

Taro Kimura, Eisuke Kato, Tsukasa Machikawa, Shunsuke Kimura, Shinji Katayama, Jun Kawabata, Hydroxylamine enhances glucose uptake in C2C12 skeletal muscle cells through the activation of insulin receptor substrate 1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 445 巻, 2014, 6-9.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.039

北海道大学学術成果コレクション HUSCAP にて著者原稿を公開

<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/54788>

〔学会発表〕(計 13 件)

町川 司, 加藤 英介, 川端 潤, コショウ (*Piper nigrum*) からの骨格筋への糖取り込み促進物質の探索, 公益社団法人 日本農芸化学会北海道支部第二回講演会, 2015 年 11 月 14 日, 北海道大学, 札幌キャンパス (北海道札幌市)

Eisuke Kato, Shunsuke Kimura, Takayuki Iihoshi, Yosuke Inagaki, Jun

Kawabata, Glucose Uptake Enhancement Activity of Higenamine Glucoside Isolated from the Lotus Plumule, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, 2015年8月30日~2015年9月2日, 徳島文理大学, 徳島キャンパス(徳島県徳島市)

木村 駿介, 加藤 英介, 川端 潤, 骨格筋細胞への糖取り込みを促進するヒゲナミンの構造活性相関研究, 公益社団法人 日本農芸化学会北海道支部第一回講演会, 2015年8月8日~2015年8月9日, とかちプラザ(北海道帯広市)

木村 駿介, 加藤 英介, 川端 潤, ヒゲナミン配糖体の骨格筋糖取り込み促進活性に関する構造活性相関研究, 公益社団法人 日本農芸化学会 2015年度岡山大会, 2015年3月26日~2015年3月29日, 岡山大学, 津島キャンパス(岡山県岡山市)

片山 紳司, 加藤 英介, 川端 潤, マカ (*Lepidium meyenii*) に含有される脂肪酸とその糖取り込み促進活性, 公益社団法人 日本農芸化学会 2015年度岡山大会, 2015年3月26日~2015年3月29日, 岡山大学, 津島キャンパス(岡山県岡山市)

Lucy Lahrita, Eisuke Kato, Jun Kawabata, In vitro screening on 3T3-L1 adipocytes reveals Eurycoma longifolia Jack and Piper nigrum L. as dual active Indonesian medicinal plants for anti-diabetes and anti-obesity, 公益社団法人 日本農芸化学会 2015年度岡山大会, 2015年3月26日~2015年3月29日, 岡山大学, 津島キャンパス(岡山県岡山市)

片山 紳司, 加藤 英介, 川端 潤, マカ (*Lepidium meyenii*) に含有される糖取り込み促進物質の探索, 公益社団法人 日本農芸化学会 北海道・東北合同支部大会, 2014年9月23日, 北海道大学, 札幌キャンパス(北海道札幌市)

Eisuke Kato, Taro Kimura, Jun Kawabata, Glucose Uptake Enhancer Isolated from the Germ of *Nelumbo Nucifera* and Its Mechanism of Action, The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference, 2014年9月2日~2014年9月6日, 名古屋大学, 東山キャンパス(愛知県名古屋市)

加藤 英介, 木村 太郎, 稲垣 洋介, 藤田 裕之, 川端 潤, 蓮芯に含まれる筋細胞の糖取り込み促進活性成分の探索, 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年03月27日~2014年03月30日, 明治大学, 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

木村 太郎, 加藤 英介, 町川 司, 木村 駿

介, 片山 紳司, 川端 潤, ヒドロキシアミンの骨格筋細胞に対する糖取り込み促進作用とその作用機構解析, 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年03月27日~2014年03月30日, 明治大学, 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

町川 司, 加藤 英介, 川端 潤, レモンガラスからのインスリン様活性物質探索, 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年03月27日~2014年03月30日, 明治大学, 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

片山 紳司, 町川 司, 加藤 英介, 川端 潤, マカ由来のインスリン様活性物質の探索, 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年03月27日~2014年03月30日, 明治大学, 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

木村 太郎, 加藤 英介, 町川 司, 木村 駿介, 片山 紳司, 川端 潤, ヒドロキシアミンの糖取り込み促進作用とその作用機構解析, 平成25年度公益社団法人 日本農芸化学会北海道支部講演会, 2013年11月29日~2013年11月30日, 北海道大学, 札幌キャンパス(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 英介 (KATO, Eisuke)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号: 40466446