

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：34507

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15780

研究課題名(和文)食品因子による筋肉の肥大を介した新規高血糖予防効果の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel preventive effect of food factors on hyperglycemia via muscle hypertrophy

研究代表者

吉岡 泰淳(Yoshioka, Yasukiyo)

甲南女子大学・医療栄養学部・助教

研究者番号：80801513

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 筋肉におけるタンパク質の合成促進と糖の取り込み促進の関連性に着目し、新規な高血糖予防効果を検証した。緑豆タンパク質の代謝物より得られたペプチドにマウス筋管C2C12細胞におけるタンパク質合成の促進効果を見出した。また、ラット筋管L6細胞において、糖の取り込みを促進させた。この作用機序は、インスリン様経路、AMPK経路ならびにJak2/Stat3経路の活性化を介していることが観察された。緑豆ペプチドの分子プローブを調製し、標的分子の探索を行ったところ、レプチンレセプターが同定された。これらのことから、緑豆ペプチドはレプチンレセプターを標的とし、高血糖予防に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では、食の欧米化やライフスタイルの変化により、生活習慣病の罹患者および予備軍が増加し、この解消が急務である。その中でも、高血糖および糖尿病に対する抑制効果に関する研究は世界中で行われている。本研究では、骨格筋における肥大と糖取り込みに着目し、高血糖予防効果の標的としてレプチンレセプターを見出した。この成果は、新たな機能的食品因子の発見だけでなく、既存の機能的食品因子と共作用させることで、相加的な効果が期待できる。

研究成果の概要(英文): We examined a novel anti-hyperglycemic effect focusing on the relationship between the promotion of protein synthesis and glucose uptake in muscle. It was found that the peptides obtained from the metabolite of mung bean protein promoted protein synthesis in C2C12 myotubes and glucose uptake in L6 myotubes. This mechanism of mung bean peptides on glucose uptake was mediated by activation of insulin-like pathway, AMPK pathway and Jak2/Stat3 pathway. Molecular probes of mung bean peptides were prepared to search target molecules in myotubes. Leptin receptor was identified as a candidate molecule. From these results, it was suggested that targeting the leptin receptor and finding a food factor showing a leptin-like action contributes to the prevention of hyperglycemia.

研究分野：食品機能学

キーワード：緑豆ペプチド 糖取り込み促進 筋肥大促進

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2000年代に入ると、食環境やライフスタイルの変化により、生活習慣病の罹患者および予備軍が増加した。近年では、健康への意識の高まりとともにその推移は横ばいとなっているが、生活習慣病を予防する食品因子の探索研究は継続して盛んに行われている。特に、高血糖および糖尿病に対する抑制効果に関する研究は世界中で行われている。血糖値の調節は、恒常性維持に重要である。高血糖時には、膵臓からインスリンが分泌され、筋肉などの末端組織へのグルコースの取り込みを促進させることで調節されている。食品因子による筋肉へのグルコース取り込みの促進は、インスリン様シグナル (IRS-1/Akt/AS160) および運動様作用 AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化によって誘導されるものが多く報告されている。骨格筋は、ヒトのタンパク質の 50~70% を保持する組織で、姿勢のほじや運動に必須なだけでなく、食事による栄養を筋線維タンパク質として貯蔵し、飢餓の時に分解によってこれを供給する系の一翼を担っている。すなわち、骨格筋の肥大と萎縮のバランスは、ホルモン、栄養物質、サイトカイン、物理的な刺激などによって制御されている。食品因子による筋肉の肥大は、Akt/mTOR/p70S6K シグナルなどが多く報告されている。また、筋萎縮の抑制については、ユビキチンリガーゼの発現抑制およびオートファジーの抑制が報告されている。骨格筋における食品因子による機能性研究は、マスターレギュレーター の活性化を観察していることが多く、それぞれの食品因子の標的分子を同定している研究は少ない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、筋肉へのグルコース取り込みを促進する食品因子および筋肉を肥大させる効果を持つ食品因子を探索し、その標的分子を同定・解析し、新たな高血糖予防としての新規分子ターゲットを見出すことである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 緑豆由来活性ペプチドの精製・単離

緑豆に含まれるタンパク質をペプシン、トリプシンならびにキモトリプシンにより加水分解し、緑豆消化物を得た。緑豆消化物は、限外ろ過 (3K) に供して、緑豆消化物低分子画分を得た。さらに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーならびに陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供することで、粗分けを行い、L6 筋幹細胞を用いた糖取り込み促進活性を指標に、活性画分を HPLC に供し、緑豆由来活性ペプチドを精製・単離した。活性ペプチドのアミノ酸配列の決定は、CE-TOF-MS を用いた。得られたペプチドをペプシン、キモトリプシンならびにトリプシンで再消化した。

#### (2) 糖取り込み促進および筋肥大促進に与える影響

糖取り込み促進活性の評価をするため、ラット線維芽細胞 L6 を筋幹細胞に分化させて試験に用いた。L6 筋幹細胞に活性ペプチドを処理し、その後、2-deoxyglucose を細胞に取り込ませた。取り込ませた 2-deoxyglucose は、酵素サイクリング法により測定した。作用機序は、筋幹細胞は、糖を取り込む際にグルコース輸送体 4 型 (GLUT4) が原形質膜上に局在を変え、原形質膜を分画し、GLUT4 の発現を検討した。また、細胞全画分において、insulin 経路および AMPK 経路についてウェスタンブロットティング法にて検討した。さらに、ペプチドトランスポーターの阻害剤を前処理することで、活性ペプチドの細胞内への取り込みおよび糖取り込み活性を検討した。

筋肥大促進活性を評価するため、マウス線維芽細胞 C2C12 細胞を筋幹細胞に分化させて試験に用いた。C2C12 筋幹細胞に活性ペプチドを処理し、細胞の直径を測定することで筋肥大促進活性を評価した。また、ピューロマイシンを前処理後、緑豆由来活性ペプチドを処理し、ピューロマイシンラベル化タンパク質の量を評価することで、タンパク質合成に与える影響を検討した。筋肥大促進機序を解明するため、Akt/mTOR/p70S6K の活性化について検討した。

#### (3) 緑豆ペプチドの筋管細胞内標的分子の探索

活性のある緑豆ペプチドのアミノ基とカルボキシル基を有するビーズとを結合させ、緑豆ペプチドプローブを調製した。調製したプローブを細胞溶解液に処理し、免疫沈降した。得られたサンプルを SDS-PAGE および等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元電気泳動に供し、CBB 染色および銀染色をすることで標的分子を可視化し、質量分析によりタンパク質の同定を試みた。また、ウェスタンブロットティング法により標的分子を可視化・同定した。さらに、細胞溶解液に緑豆ペプチドを前処理後、緑豆ペプチドプローブを処理することで、標的分子との結合が緑豆ペプチド由来であることを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 緑豆由来活性ペプチドの同定

筋幹細胞 L6 への糖取り込み促進活性を指標に、緑豆消化物に含まれる活性ペプチドの精製・単

離を行った。6種のペプチドを単離しアミノ酸配列を決定した。そのうちの3種に糖取り込み促進活性が認められ、それぞれをペプチドA、B、Cとした。ペプチドBおよびCは、ペプシン、トリプシンならびにキモトリプシンにより切断される配列を含んでいることから、再消化試験を行った。HPLCを用いて、酵素処理の前後でのペプチド量の変化を検討したところ、ペプチドBおよびCは、ペプシン、トリプシンならびにキモトリプシンによる切断を受けないことが観察された。

#### (2) 緑豆由来活性ペプチドの糖取り込み促進活性機序

ペプチドA、B、Cの糖取り込み促進活性機序を解明するため、細胞内への取り込みをペプチドトランスポーターに着目し検討した。ペプチドAはヒスチジンを含むトリペプチドであり、ヒスチジン前処理により糖取り込み促進活性はキャンセルされた。このことから、ペプチドAはPHT1を介して細胞内に取り込まれ、活性発現していることが示唆された。カチオン性ペプチドの輸送体であるCAT1について検討するため、その阻害剤であるアルギニンを前処理し、糖取り込み促進活性を検討した結果、3種のペプチドの活性に変化は見られなかった。ペプチドBおよびCは、11個のアミノ酸からなるペプチドであることから、細胞内には取り込まれず、細胞膜上のレセプターを介して糖取り込み促進活性を発現していることが示唆された。また、細胞内シグナルを検討するため、GLUT4の細胞膜移行、インスリン経路、AMPK経路ならびにJAK2/STAT3経路の活性化について検討した。ペプチドA、B、Cの処理は、インスリン経路のPI3K、aPKC、Aktのリン酸化、CaMKK2およびAMPKのリン酸化、さらにJAK2およびSTAT3のリン酸化を促進させることでGLUT4の細胞膜移行を誘導することが観察された。複数の経路のリン酸化が観察されたことから、阻害剤を用いてそれぞれの経路の活性化と糖取り込みの関連性について検討した。PI3Kの阻害剤であるLY294002を前処理した細胞においては、ペプチドA、B、Cの糖取り込み促進活性は減少傾向を示した。また、AMPKの阻害剤であるCompound Cを処理した細胞においても減少傾向を示し、JAK2の阻害剤であるAG490を処理した細胞においても減少傾向を示した。これらの阻害剤を用いた実験の結果から、ペプチドA、B、Cは、複数の標的をもち、それぞれを活性化させることで糖取り込み促進活性を発現している可能性が示唆された。

#### (3) 緑豆由来活性ペプチドの筋肥大促進活性機序

単離された6種のペプチドについて、C2C12筋幹細胞を用いた筋肥大に与える影響とその作用機序を検討した。ペプチドA、B、Cの処理は、C2C12筋幹細胞径を大きくすることが観察された。また、ピューロマイシン処理細胞において、ペプチドA、B、Cを処理するとピューロマイシンラベル化タンパク質が増加した。さらに、筋肥大促進活性機序の検討のため、mTORおよびp70 S6Kのリン酸化を検討した。その結果、ペプチドA、B、Cは、mTORおよびp70 S6Kのリン酸化を促進することが観察された。これらのことから、ペプチドA、B、Cは、mTORおよびp70 S6Kのリン酸化を介してタンパク質合成を促進させ、筋幹細胞を肥大化させたことが示唆された。

#### (4) 緑豆由来活性ペプチドの標的分子の探索

緑豆由来活性ペプチドが、L6筋幹細胞において糖取り込みを促進させ、C2C12筋幹細胞において筋肥大を促進させることが明らかになったことから、筋幹細胞における標的分子の探索を行った。まず、緑豆ペプチドのアミノ基を介して磁気ビーズを結合させ、ケミカルプローブを調製した。緑豆ペプチドプローブを用いて筋幹細胞溶解液から結合分子を精製し、SDS-PAGEおよび2次元電気泳動で分離し、CBB染色および銀染色を行い、質量分析によるタンパク質の同定を試みたが、同定には至らなかった。そのため、ウェスタンブロットング法で、複数の受容体の検出を試みた。その結果、結合分子画分にレプチンレセプターが検出された。また、緑豆ペプチドプローブとレプチンレセプターの結合は、緑豆ペプチドの前処理によりキャンセルされた。このことから、緑豆ペプチドはレプチンレセプターを標的とすることが示唆された。

これらの結果から、緑豆ペプチドは、筋幹細胞のレプチンレセプターに結合することで糖取り込みを促進させることが強く示唆された。また、緑豆ペプチドは、骨格筋を肥大させることも示唆された。本研究の成果より、レプチンレセプターは、骨格筋における新たな高血糖予防効果の分子標的候補である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshioka Yasukiyo, Samukawa Yumi, Yamashita Yoko, Ashida Hitoshi  | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>4-Hydroxyderricin and xanthoangelol isolated from Angelica keiskei prevent dexamethasone-induced muscle loss                         | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Food & Function   | 6. 最初と最後の頁<br>5498 ~ 5512 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d0fo00720j  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Yoshioka Yasukiyo, Inoue Masako, Yoshioka Hiroko, Kitakaze Tomoya, Furuyashiki Takashi, Abe Naoki, Ashida Hitoshi                     | 4. 巻<br>67                |
| 2. 論文標題<br>Enzymatically synthesized glycogen inhibited degranulation and inflammatory responses through stimulation of intestine               | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>67 ~ 73     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3164/jcfn.20-33  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Yoshioka Yasukiyo, Kitakaze Tomoya, Mitani Takakazu, Furuyashiki Takashi, Ashida Hitoshi  | 4. 巻<br>67                |
| 2. 論文標題<br>Enzymatically synthesized glycogen prevents ultraviolet B-induced cell damage in normal human epidermal keratinocytes                | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>36 ~ 42     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3164/jcfn.20-44  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Kitakaze Tomoya, Yoshioka Yasukiyo, Furuyashiki Takashi, Ashida Hitoshi   | 4. 巻<br>67                |
| 2. 論文標題<br>Enzymatically synthesized glycogen protects inflammation induced by urban particulate matter in normal human epidermal keratinocytes | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>29 ~ 35     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3164/jcfn.20-43  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kitakaze Tomoya, Yuan Sihao, Inoue Masako, Yoshioka Yasukiyo, Yamashita Yoko, Ashida Hitoshi   | 4. 巻<br>686                   |
| 2. 論文標題<br>6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate protects acetaldehyde-caused cytotoxicity through the induction of aldehyde dehydrogenase in hepatocytes | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Archives of Biochemistry and Biophysics  | 6. 最初と最後の頁<br>108329 ~ 108329 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.abb.2020.108329  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Jiang Hao, Yoshioka Yasukiyo, Yuan Sihao, Horiuchi Yuko, Yamashita Yoko, Croft Kevin D., Ashida Hitoshi       | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>Enzymatically modified isoquercitrin promotes energy metabolism through activating AMPK in male C57BL/6 mice | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Food & Function   | 6. 最初と最後の頁<br>5188 ~ 5202 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/c9fo01008d  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yasukiyo Yoshioka, Masako Inoue, Takashi Furuyashiki, Hitoshi Ashida                        |
| 2. 発表標題<br>Enzymatically synthesized glycogen inhibits allergic responses in basophilic and mast cells |
| 3. 学会等名<br>The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasukiyo Yoshioka, Tomoya Kitakaze, Takakazu Mitani, Takashi Furuyashiki, Hitoshi Ashida       |
| 2. 発表標題<br>Enzymatically synthesized glycogen prevents UVB damage in normal human epidermal keratinocytes |
| 3. 学会等名<br>The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasukiyo Yoshioka, Xiu Li, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida                                      |
| 2. 発表標題<br>Black soybean seed coat polyphenols prevent AAPH-induced oxidative DNA damage in hepatic cells |
| 3. 学会等名<br>The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)                              |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yasukiyo Yoshioka, Yusuke Kubota, Yumi Samukawa, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida |
| 2. 発表標題<br>Glabridin inhibits dexamethasone-induced muscle atrophy                         |
| 3. 学会等名<br>The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)               |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|