

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15473

研究課題名（和文）サルコペニア肥満改善に向けたスルフォラファンの肝臓及び骨格筋双方向への効果の解明

研究課題名（英文）Effects of Sulforaphane on liver and skeletal muscle bidirectionally to improve sarcopenic obesity

研究代表者

小高 愛未（Kodaka, Manami）

東京農業大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：60845890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食品由来成分スルフォラファン(SFaN)が、脂質合成において中心的な役割を担っている転写因子SREBPの活性を低下させ脂質合成を抑制することを示した。SFaNは、前駆体SREBPのC末端側のポリユビキチン化を促進し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して前駆体SREBPタンパク質を分解すること、その分解にはKeap1-Nrf2経路を介さないことを明らかにした。これらの成果により、SFaNの肝臓における脂質合成の新たなメカニズムを明らかにした。一方、SFaNは筋芽細胞において、筋分化を阻害することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、抗酸化作用や抗肥満効果が知られるSFaNの、これまでの報告とは異なる、新しい作用機序が示されたことで、生活習慣病予防に関して科学的エビデンスに基づく新たな機能性食品の開発へ応用されることが期待される。また、最近、SFaNの筋萎縮抑制や筋力維持への効果がわずかに報告されてきているが、今回明らかになったSFaNの筋分化抑制効果は、サルコペニア予防へのアプローチとしての筋分化促進と筋萎縮抑制の違いに着目するきっかけとなった。今回の脂質合成抑制の解析に加えて、今後、SFaNの骨格筋への効果の解析を進めることで、サルコペニア肥満予防及び健康寿命延伸の一歩となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that sulforaphane (SFaN), a food-derived component, suppresses fatty acid synthase by decreasing the activity of the transcription factor SREBP, which plays a central role in fatty acid synthesis. We also showed that SFaN promotes polyubiquitination of the C-terminal of the SREBP precursor and degrades the SREBP precursor via the ubiquitin-proteasome system, and such SREBP degradation occurs independently of the Keap1-Nrf2 pathway. These results reveal a new mechanism of fatty acid synthesis in the liver. On the other hand, SFaN inhibited myogenic differentiation in myoblasts.

研究分野：食品生化学

キーワード：スルフォラファン SREBP 脂質合成 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

高齢社会となった現代の日本において、健康寿命を延ばすことは必須の課題である。健康寿命の延伸のためには、肥満や糖尿病などの生活習慣病にならないことが重要である。特に骨格筋は体重の約30%を占め、代謝を制御する重要な臓器の一つである。また、加齢に伴う筋量・筋力の低下は加齢性筋萎縮（サルコペニア）と呼ばれている。これを予防し筋量を維持することは体力維持による生活の質の確保だけでなく、糖尿病や腎疾患等の様々な疾病に対する耐性を持つ身体の獲得に重要である。近年、サルコペニアに肥満が合併した病態であるサルコペニア肥満が注目されている。サルコペニア肥満は単なる病態の組み合わせではなく、代謝異常や機能障害がより強く、心血管リスクも高いと考えられている(Kohara et al. 2014)。若年者でもデスクワークや自動車に頼る生活習慣などによって、筋量の割合が減少し脂肪が増加している状態に陥ることがあり、見た目ではほとんど変化がないことから「隠れ肥満」とも呼ばれ問題視されている。

スルフォラファン(SFaN)はアブラナ科野菜、特にブロッコリーに多く含まれているイソチオシアネート類の一つで、特有の官能基(-NCS)や親電子性を持つことから様々なタンパク質と結合し多彩な生理作用を及ぼす。がん予防で注目されて以降、現在では抗酸化作用(Itoh et al. 1999)や抗炎症作用(Kobayashi et al. 2016)、肝機能異常改善効果(Kikuchi et al. 2015)、うつ症状改善効果(Yao et al. 2016)など、その健康効果は多岐にわたると考えられている。これまで明らかになっている作用機序は、その親電子性が Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) に感知されることで Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) を活性化する(Itoh et al. 1999)というもののだが、本研究以前から私たちのグループはそれとは異なる、Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)を介した脂質合成抑制の作用機序を提示している。SREBP family (SREBP-1a, -1c, -2)は、脂肪酸やコレステロール合成に関わる遺伝子の発現を調節する転写因子で、脂質合成の転写調節において中心的な役割を担っている。私たちのグループでは、Huh-7 細胞への SFaN の 3 時間処理が前駆体 SREBP タンパク質を減少させること、及び前駆体 SREBP タンパク質の分解を促進することを明らかにしている。しかし、SFaN の処置時間(3 時間)を考慮すると、転写因子である Nrf2 の活性化が今回のタンパク質分解促進に関与することは考えにくく、SFaN が未だ明らかになっていない新たな標的因子に作用していると推察される。

一方、SFaN の骨格筋への効果は研究開始当初、報告がない。しかし、骨格筋の合成や維持に重要な分岐鎖アミノ酸がサプリメントとして一般に流通していることから分かるように、食品成分が骨格筋に与える効果は大きく、それと同時に未知の成分や効果の存在は否定できない。近年、食事と運動のどちらも骨格筋の維持や機能改善に大きな役割を持っていることが広く認識されるようになり、横断的な研究がさらに求められている。

## 2. 研究の目的

SFaN がサルコペニア肥満を予防・改善する可能性を検討することを目的とし、SFaN が SREBP を介して肝臓での脂質合成を抑制する作用機序を中心に解析を行った。また、SFaN は様々な臓器に効果をもたらすが、その多様性は何に起因するのか(作用する臓器によって受容体が異なる、SFaN の作用機序や結合する分子が違う等)を探るため、SFaN の新規結合分子を探索した。加えて、SFaN が骨格筋の機能を改善する効果を検討するため、まず筋分化への影響を確認した。

## 3. 研究の方法

### (1) SFaN が SREBP を介して脂質合成を低下させるメカニズムの解明

SFaN を肝がん由来細胞 Huh-7 の培養液に加えて培養して SREBP 質タンパクの分解の変化を検証する。また、SREBP の変異体タンパク質を用いて、分解に必須のドメインを同定する。さらに、Nrf2 をロックダウンした Huh-7 細胞に SFaN を加えて培養し、SREBP タンパク質の分解の変化に影響するか確認する。

### (2) SFaN の新規結合分子の同定

SFaN を結合させた化合物ビーズを作製し、Huh-7 細胞から抽出したタンパク質溶液と反応させる。ビーズに結合したタンパク質を質量分析を用いて同定する。

### (3) SFaN の骨格筋への影響の検討

マウス筋芽細胞 C2C12 を筋分化させる際に SFaN を加え、筋分化にどのような影響があるか検証する。

## 4. 研究成果

### (1) SFaN が SREBP を介して脂質合成を低下させるメカニズムの解明

SFaN はユビキチン-プロテアソーム系を介して SREBP 前駆体の分解を促進する

タンパク質分解のメカニズムとして、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の 2 種類の経路が知られている。そこで、SFaN がこれらの経路を介して SREBP を分解しているかどうかを検討するために、プロテアソーム阻害剤 MG132 とリソソーム阻害剤 NH<sub>4</sub>Cl を用いて実験を行った。Huh-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、10 $\mu$ M の MG132、または 20mM の NH<sub>4</sub>Cl を処理した。30 分後に 100 $\mu$ M の SFaN を 6 時間処理し、SREBP-1 抗体、SREBP-2 抗体を用いて Western Blotting による解析を行った。その結果、私たちのグループが以前から明らかにしていた通り、SFaN によって前駆体 SREBP-1、-2 タンパク質量が減少した。また、その減少は NH<sub>4</sub>Cl を前処理しても抑えられなかったが、MG132 により一部抑えられた。したがって、SFaN はユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP の分解を促進することが示唆された。

SREBP-1a の C 末端領域は、SFaN による SREBP-1a の分解とユビキチン化に必須である

次に、SFaN が SREBP のユビキチン化を促進するかを検討した。C 末端に 3 $\times$ Flag タグを付加した全長 SREBP-1a 発現プラスミドと、N 末端に HA タグを付加したユビキチンの発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞に 10 $\mu$ M の MG132 を 30 分間処理した後、100 $\mu$ M の SFaN を添加して 3 時間培養した。細胞からタンパク質を抽出し、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、Western Blotting による解析を行った。その結果、SFaN 非存在下では、ユビキチンを結合した SREBP-1a のシグナルはほとんど検出されなかったが、SFaN を処理したサンプルでは、ユビキチン化バンドのシグナルが増大していた。この結果より、SFaN は SREBP-1a のユビキチン化を促進することが示された。

続いて、SFaN による前駆体 SREBP-1a の分解及びユビキチン化に必須の領域を特定するため、 $\Delta$ N SREBP-1a-(479-1147)と  $\Delta$ C SREBP-1a-(2-594)の 2 種類の発現プラスミドを作成し、Huh-7 細胞にトランスフェクションした。SFaN により、 $\Delta$ N SREBP-1a タンパク質は減少し、ユビキチン化した  $\Delta$ N SREBP-1a は増加した。しかし、 $\Delta$ C SREBP-1a ではこの効果は確認できなかった。この結果から、C 末端領域が SFaN による前駆体 SREBP-1a の減少及びユビキチン化に重要であることが示唆された。さらに、前駆体 SREBP-1a の分解に重要な C 末端領域のドメインを同定するため、Huh-7 細胞に SREBP-1a-(2-594)に加えて、 $\Delta$ C SREBP-1a-(2-968)と  $\Delta$ C SREBP-1a-(2-784)の発現プラスミドをトランスフェクトし、SFaN で処理した。その結果、 $\Delta$ C SREBP-1a-(2-968)、 $\Delta$ C SREBP-1a-(2-784)は SFaN によって分解されたが、 $\Delta$ C SREBP-1a-(2-594)は分解されなかった。このことから SREBP-1a の 595-784 アミノ酸が SFaN による前駆体 SREBP-1a の分解において必須であることが示唆された。

SFaN は Keap1-Nrf2 経路非依存的に SREBP 前駆体の分解を促進する

SFaN は、Nrf2 の核内移行を誘導することで抗酸化酵素に関わる遺伝子の発現を刺激し、酸化ストレスから生体を保護することが報告されている。Nrf2 の活性化が SFaN による前駆体 SREBP の分解に関与しているかを検討するため、Huh-7 細胞に Nrf2 特異的 siRNA をトランスフェクションし、Nrf2 をノックダウンした。Nrf2 をノックダウンした Huh-7 細胞では、SFaN によって前駆体 SREBP タンパク質は減少しなかった。この結果から、Nrf2 の活性化は SFaN による前駆体 SREBP の分解には関与していないことが示された。

## ( 2 ) SFaN の新規結合分子の同定

SFaN と結合する新規分子の探索に取り組むため、まず SFaN のスルホキシド側にアルキン構造を持たせた SFaN 誘導体を有機合成にて作製した。合成した SFaN 誘導体のアルキンとアジドビーズのアジド基をクリックケミストリーにて結合させ、SFaN 誘導体ビーズを作製した。Huh-7 細胞の溶出液に SFaN 誘導体ビーズを加えて pull down し、SFaN 誘導体に結合したタンパク質を質量分析に供した。その結果、多くの結合候補分子が検出された。続いて、候補分子の発現プラスミドを作製し、SFaN 誘導体ビーズとの結合確認を行った。その中で特に結合が顕著だった分子について、変異体の作製などを通して SFaN によってその分子の機能がどのように変化するか詳細な解析を行い、現在論文として発表すべくその結果をまとめている。

## ( 3 ) SFaN の骨格筋への影響の検討

マウス筋芽細胞 C2C12 を筋分化用 medium に交換し筋分化させる際に、SFaN を 30 $\mu$ M になるように添加した。72 時間後、DMSO を加えた C2C12 は多くの筋管が形成され筋分化したのに対し、SFaN を加えたものではほとんど筋管形成がされず、筋分化が抑制されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata S, Kodaka M, Kikuchi A, Matsunaga Y, Shoji K, Kuan Y, Iwase M, Takeda K, Katsuta R, Ishigami K, Matsumoto Y, Suzuki T, Yamamoto Y, Sato R, Inoue J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Sulforaphane suppresses the activity of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) by promoting SREBP precursor degradation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 8715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12347-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小高愛未
2. 発表標題 スルフォラファンの新規結合分子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度 仙台大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manami Kodaka, Shingo Miyata, Yuki Matsunaga, Keita Takeda, Ryo Katsuta, Ken Ishigami, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto, Ryuichiro Sato, Jun Inoue
2. 発表標題 Sulforaphane promotes Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) precursor degradation and suppresses the activity of SREBP
3. 学会等名 22nd IUNS-International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------