

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 10 日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501002

研究課題名(和文) インスリン誘導性転写因子遺伝子 SHARP family の誘導は血糖低下に関わるか

研究課題名(英文) Does the insulin-inducible transcription factor SHARP gene family involve in down-regulation of the blood glucose level?

研究代表者

山田 一哉 (YAMADA, KAZUYA)

松本大学・健康科学研究科・教授

研究者番号：20263238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：SHARP-2 はインスリン誘導性転写抑制因子であり、肝臓で糖新生系酵素遺伝子の転写を抑制することにより血糖低下に寄与している。

本研究では、ファミリー遺伝子である SHARP-1 遺伝子もインスリンによる血糖低下に寄与することを明らかにした。また、インスリンによる両 SHARP 遺伝子の発現誘導や血糖降下剤 AICAR による SHARP-2 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路を明らかにした。さらに、インスリン非依存的にこれらの遺伝子の発現誘導を行う食品成分として、大豆イソフラボン腸内細菌代謝産物 (S)-Equol や緑茶カテキンを同定するとともに、そのシグナル伝達経路を解明した。

研究成果の概要(英文)：SHARP-2, an insulin-inducible transcriptional repressor, involves in the down-regulation of the blood glucose level by repressing the transcription of the gluconeogenic enzyme gene.

In this study, we showed that SHARP-1, another SHARP family gene, also contributed the down-regulation of the blood glucose level by insulin. We then showed signal transduction pathways mediating the induction of expression of both the SHARP-1 and the SHARP-2 genes by insulin or the SHARP-2 gene by AICAR. Furthermore, we identified both an isoflavone-metabolite (S)-Equol and a green tea catechin as food constituents mimicking the insulin action and analyzed the signal transduction pathways.

研究分野：Molecular biology

キーワード：SHARP 遺伝子 インスリン 糖尿病 血糖低下 シグナル伝達 食品成分

1. 研究開始当初の背景

SHARP ファミリーは、basic helix-loop-helix 型転写抑制因子であり、SHARP-1 および SHARP-2 の 2 つのアイソフォームが存在する。私どもは、血糖降下ホルモンであるインスリンにより肝臓で SHARP-2 遺伝子の発現が誘導され、糖新生系酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子の転写を抑制することにより血糖降下に至ることを明らかにしている。

脂肪組織から分泌されるアディポネクチンは、肝臓で 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化することにより、PEPCK 遺伝子やグルコース-6-ホスファターゼ遺伝子の転写を抑制して血糖低下に至ると報告されている。また、AMPK の活性化剤である

5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribofuranoside (AICAR) を糖尿病マウスに皮下投与することにより、血糖値が正常化することが報告されている。このことは、インスリン以外の低分子物質により血糖低下を誘導できることを示している。したがって、例えば食品成分によりインスリンと同様のシグナル伝達経路で血糖低下を誘導することができれば、予備軍を含めると約 2,060 万人といわれている糖尿病患者の予防や治療に寄与できる可能性がある。

また、最近、腸内細菌叢の作用により産生された物質が体内に吸収され、健康や疾病発症に大きな影響を及ぼすことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) インスリンによる SHARP-1 および SHARP-2 遺伝子 (SHARPs 遺伝子) の発現誘導にはどのようなシグナル伝達経路が関与しているか

(2) AICAR により SHARP-2 遺伝子の発現は誘導されるかどうか、また、そのシグナル伝達経路にはどのような分子が関与しているか

(3) 食品成分のうち、大豆イソフラボンの daidzein の腸内細菌による代謝産物である (S)-Equol や緑茶カテキンの (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が、SHARP-2 遺伝子の発現を誘導するかどうか、またそのメカニズムにはどのような分子が関与しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インスリンによる SHARPs 遺伝子発現の制御機構の解析

インスリン応答性ラット肝癌細胞株である H4IIE 細胞を、様々な濃度・時間でインスリン処理を行った。また、インスリン作用に関与することが報告されている各種シグ

ナル伝達分子の阻害剤の前処理やドミナントネガティブ変異型分子を発現させた後に、インスリンで 2 時間処理を行った。これらの細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて、SHARPs mRNA の発現量を測定した。

(2) AICAR による SHARP-2 遺伝子発現の制御機構の解析

H4IIE 細胞を、様々な濃度・時間で AICAR 処理を行った。また、各種シグナル伝達分子の阻害剤の前処理やドミナントネガティブ変異型分子を発現させた後に、AICAR で 2 時間処理を行った。これらの細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて、SHARP-2 mRNA の発現量を測定した。

(3) (S)-Equol や EGCG による SHARP-2 遺伝子発現の制御機構の解析

H4IIE 細胞を、様々な濃度・時間で (S)-Equol や EGCG 処理を行った。また、各種シグナル伝達分子の阻害剤の前処理やドミナントネガティブ変異型分子を発現させた後に、(S)-Equol や EGCG で 2 時間処理を行った。これらの細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて、SHARP-2 mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) インスリンによる SHARPs 遺伝子発現の制御機構の解析

H4IIE 細胞をインスリン処理したところ、SHARP-1 mRNA は、インスリン濃度依存的に誘導され、100 nM でピークに達した。また、2 時間と非常に早期に一過的に誘導された。つぎに、シグナル伝達経路を同定するために各種酵素の阻害剤で処理した。Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) 経路の阻害剤である LY294002 と wortmannin, protein kinase C (PKC) の阻害剤である staurosporin、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害剤である actinomycin D、タンパク質合成阻害剤の cycloheximide により SHARP-1 mRNA の誘導は強く阻害された。また、Rac1 inhibitor や JNK inhibitor II (Jun N-terminal kinase の阻害剤) により部分的に阻害された。さらに、aPKC lambda および Rac1 のアデノウィルスドミナントネガティブ変異体を感染させたところ、インスリンによる SHARP-1 mRNA の誘導は、有意に阻害された。したがって、インスリンによる SHARP-1 遺伝子の発現誘導は、PI3-K - aPKC lambda 経路を介していること、PI3-K からその一部が Rac1・JNK という経路を介していることが示された。さらに、SHARP-1 の標的遺伝子を解析するために、SHARP-1 を強発現した条件下で、各酵素遺伝子のプロモーター活性を比較した。その結果、SHARP-1 は PEPCK 遺伝子のプロモ-

ター活性を特異的に低下させた。以上の結果をまとめて、英文学術雑誌として報告した (Horm. Metab. Res. **46**, 397-403 (2014))。

また、インスリンによる SHARP-2 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路を解析したところ、インスリンによる SHARP-2 mRNA の誘導には、PI3-K/PKC 経路と PI3-K/mTOR 経路が関与していることが示唆された。また、この誘導には新規タンパク質の合成を必要とし、SHARP-2 遺伝子の転写レベルで生じることを明らかにした。

(2) AICAR による SHARP-2 遺伝子発現の制御機構の解析

H4IIE 細胞における SHARP-2 mRNA の発現が、AICAR 濃度依存的に増大すること、ならびに、0.25 mM での処理後 2 時間でピークとなることを見いだされた。次に、各種阻害剤やウエスタンブロット解析により、AICAR による SHARP-2 mRNA の誘導は、従来から言われている AMPK 依存的経路ではなく、AMPK 非依存的な経路で調節されており、それが PI3-K/aPKC lambda 経路であること、この誘導は少なくとも部分的には SHARP-2 遺伝子の転写レベルで生じること、誘導には新規タンパク質の合成を必要としないことが明らかになった。

(3) (S)-Equol や EGCG による SHARP-2 遺伝子発現の制御機構の解析

Daidzein の腸内細菌代謝産物である (S)-Equol は、H4IIE 細胞での SHARP-2 遺伝子の発現を PI3-K や PKC 経路を介して誘導した。ウエスタンブロット解析から、(S)-Equol は aPKC lambda と classical PKC alpha の両方を活性化することが明らかになった。さらに、(S)-Equol による誘導は、新規タンパク質の合成を必要とし、SHARP-2 遺伝子の転写レベルで生じることが示唆された。実際、SHARP-2 遺伝子の -4687 から -4133 間の塩基配列が転写促進に関与していた。したがって、(S)-Equol は、PI3-K 経路と PKC 経路を介して SHARP-2 遺伝子の転写を促進すると結論した。以上の結果をまとめて、英文学術雑誌として報告した (Arch. Biochem. Biophys. **525**, 32-39 (2012))

EGCG による SHARP-2 遺伝子の発現誘導は、PI3-K と RNA polymerase II の阻害剤により抑制された。次に、EGCG とインスリン作用を干渉する転写因子 NF-kB との生物学的関係について検討したところ、NF-kB の細胞質や核での発現レベルは、EGCG により急速に抑制されることが明らかになった。また、NF-kB と EGCG による SHARP-2 遺伝子の転写活性化のメカニズムを検討したところ、NF-kB p65 タンパク質の過剰発現により、SHARP-2 遺伝子のプロモーター活性が低下することが明らかになった。したがって、EGCG は PI3-K 経

路と NF-kB のタンパク質分解を介して SHARP-2 遺伝子の発現を誘導すると結論した。以上の結果をまとめて、英文学術雑誌として報告した (J. Agric. Food Chem. **60**, 9850-9855 (2012))。

これらの結果と周辺領域の研究をまとめて総説として刊行した (New Food Industry; **57 (1)**: 7-18 (2015); **56 (3)**: 57-65 (2014); **54 (10)**: 37-45 (2012))。

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)

1. 高木勝広、浅野公介、羽石歩美、山田一哉: ホルモンと食品成分による時計遺伝子 SHARPs の発現調節機構 (2015) *New Food Industry* **57 (1)**: 7-18 URL: <http://www.newfoodindustry.com/information/cn11/cn31/pg394.html> 査読なし

2. Takagi, K., Asano, K., Haneishi, A., Ono, M., Komatsu, Y., Yamamoto, T., Tanaka, T., Ueno, H., Ogawa, W., Tomita, K., Noguchi, T., and Yamada, K.: Insulin stimulates the expression of the *SHARP-1* gene via multiple signaling pathways. (2014) *Horm. Metab. Res.* **46**, 397-403 doi: 10.1055/s-0033-1363981. 査読有

3. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉: 腸内細菌代謝産物によるインスリン誘導性遺伝子の発現制御 (2014) *New Food Industry* **56 (3)**: 57-65 URL: <http://www.newfoodindustry.com/information/cn11/cn25/pg348.html> 査読なし

4. 浅野公介、高木勝広、羽石歩美、山田一哉: 緑茶カテキンによるインスリン誘導性転写遺伝子の発現制御 (2012) *New Food Industry* **54 (10)**: 37-45 URL: <http://www.newfoodindustry.com/information/cn11/cn23/pg306.html> 査読なし

5. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., Nakamura, and Yamada, K.: Analysis of mechanisms of induction of an insulin-inducible transcription factor SHARP-2 gene by (-)-epigallocatechin-3-gallate. (2012) *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9850-9855 doi: 10.1021/jf302607j. 査読有

6. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., Yamamoto, T., Tanaka, T., Nakamura, S., Noguchi, T., and Yamada, K.: Analysis of regulatory mechanisms of an insulin-inducible *SHARP-2* gene by

(S)-Equol. (2012) *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 32-39 doi: 10.1016/j.abb.2012.05.026.
査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 塚田晃子、浅野公介、山田一哉：インスリン誘導性転写因子遺伝子と SIRT ファミリーの発現相関．第87回日本生化学会大会．2014年10月17日 国立京都国際会館（京都府・京都市）
2. 金井由起子、高木勝広、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-1 遺伝子の発現誘導機構の解析．第 87 回日本生化学会大会．2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館（京都府・京都市）
3. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉：ZHX3 遺伝子との相互作用タンパク質のスクリーニングと同定．第 87 回日本生化学会大会．2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館（京都府・京都市）
4. 浅野公介、小松佳子、山田一哉：AICAR によるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の発現調節機構の解析．第8回健康長寿長野研究会．2014年6月7日 松本大学（長野県・松本市）
5. 高木勝広、浅野公介、羽石歩美、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-1 遺伝子の発現誘導機構の解析．第 8 回健康長寿長野研究会．2014 年 6 月 7 日 松本大学（長野県・松本市）
6. 高木勝広、浅野公介、羽石歩美、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-1 遺伝子の発現誘導機構の解析．第 86 回日本生化学会大会．2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
7. 小松佳子、山田一哉：AICAR によるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の発現調節機構の解析．第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
8. 小野萌、山田一哉：フルクトースによるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の発現調節．第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
9. 羽石歩美、山田一哉：食品成分による遺伝子発現メカニズム．第 7 回健康長寿長野研究会（招待講演）．2013 年 6 月 30 日 信州大学農学部（長野県・南箕輪村）
10. 山田一哉：インスリンと栄養素による糖代謝関連遺伝子の発現調節の研究について．

2012 リリーブラッシュアップセミナー「糖尿病臨床と研究の最前線」(招待講演)．2012 年 12 月 21 日 愛媛大学大学院医学系研究科（愛媛県・東温市）

11. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の (S)-Equol による発現制御機構の解析．第 85 回日本生化学会大会．2012 年 12 月 16 日 マリンメッセ福岡（福岡県・福岡市）
12. 浅野公介、高木勝広、羽石歩美、山田一哉：カテキンによる SHARP-1 遺伝子の発現誘導機構の解析．第 85 回日本生化学会大会．2012 年 12 月 16 日 マリンメッセ福岡（福岡県・福岡市）
13. 浅間雅、田島陽一、山田一哉：STBD1 と相互作用するタンパク質のスクリーニングと特定．第 85 回日本生化学会大会．2012 年 12 月 16 日 マリンメッセ福岡（福岡県・福岡市）
14. 山田一哉：インスリン誘導性転写因子遺伝子の食品による発現制御機構．朝日生命成人病研究所 第 140 回内分泌セミナー（招待講演）．2012 年 07 月 07 日 ノボノルディスクファーマ本社（東京都・千代田区）
15. 山田一哉：食品成分による糖尿病関連遺伝子の発現制御メカニズム．日本農芸化学会中部支部第 164 例会（招待講演）．2012 年 06 月 30 日 信州大学農学部（長野県・南箕輪村）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.matsumoto-u.ac.jp/matsumoto_u/teacher_hp/yamada/index.html

6．研究組織

山田 一哉 (YAMADA KAZUYA)

松本大学・大学院健康科学研究科・教授

研究者番号：20263238