

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450167

研究課題名(和文) インスリン様活性を有する食品成分のスクリーニングと作用機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of an action mechanism of food constituents mimicking insulin function.

研究代表者

高木 勝広 (TAKAGI, KATSUHIRO)

松本大学・大学院 健康科学研究科・教授

研究者番号：80279562

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)：インスリンは、肝における糖新生系酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 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。したがって、PEPCK 遺伝子の発現誘導をインスリン以外の物質で抑制できれば、糖尿病および予備軍の治療や発症予防に有用であると思われる。本研究では、私どもは、ワサビの辛味成分である6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MSITC) がPEPCK 遺伝子の発現誘導を抑制することを明らかにした。さらに、6-MSITC による PEPCK 遺伝子の発現抑制メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Insulin contributes to a decrease of the blood glucose level by repressing an expression of the PEPCK gene in the liver. If food constituents can mimic the insulin action, it would be useful for care or prevention of diabetes mellitus. In this study, we showed that 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MSITC), a pungent principle in Japanese horseradish, repressed an expression of the PEPCK gene. Furthermore, we analyzed a repression mechanism of the PEPCK gene expression by 6-MSITC.

研究分野：農学

キーワード：インスリン イソチオシアネート ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ シグナル伝達経路

### 1. 研究開始当初の背景

SHARPs は、basic helix-loop-helix 型転写因子で、SHARP-1 および SHARP-2 の 2 種から構成される。私どもは、SHARPs がインスリンによって誘導され、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を明らかにした。したがって、SHARPs がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えている。

また私どもは、SHARP-2 遺伝子の発現が大豆イソフラボンのゲニステインやダイゼインの腸内細菌による代謝産物である (S)-Equol により促進されること、緑茶カテキンのエピガロカテキンガレート (EGCG) がラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞において SHARPs mRNA 量を増加させると同時に、糖新生系酵素の PEPCK mRNA 量を減少させることを報告した。

長い歴史の中で安全性が確認されている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。

本わさびに含まれる 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MSITC) がある (図 1)。

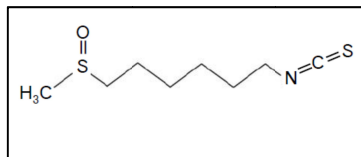


図 1 6-MSITC の化学構造式

これは、本わさび特有の香りおよび辛味成分のイソチオシアネート類の一種であり、これまでに抗菌作用をはじめ、各種癌細胞の増殖抑制や癌転移抑制作用、解毒代謝酵素誘導作用や血小板凝集抑制作用など、多様な機能性があることが報告されている。また、近年、肥満 2 型糖尿病モデル動物において、わさび粉末を 45 日間給餌したとき、血糖値およびインスリン値が対照群と比較して低い傾向を示すことが確認された。

私どもは現在までに、6-MSITC が SHARPs とは独立して、PEPCK 遺伝子の発現誘導を抑制することを認めている。そこで本研究では、6-MSITC による PEPCK 遺伝子の発現抑制メカニズムを明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、6-MSITC による PEPCK 遺伝子発現抑制メカニズムの解析を行うために以下の実験を行った。

(1) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の発現抑制の解析

(2) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子発現抑制メカニズムの解析

(3) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の転写抑制機構の解析

### 3. 研究の方法

(1) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の発現抑制の解析

ラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地に 10% ウシ胎児血清を加えたものを培養液とし、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 24 時間培養した。さらに dexamethasone 存在下で 24 時間培養後、様々な濃度・時間で 6-MSITC 処理を行った後、total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて細胞内における PEPCK mRNA の発現量を測定した。

(2) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子発現抑制メカニズムの解析

インスリンによるシグナル伝達経路に関わる各シグナル分子の阻害剤で前処理した後、6-MSITC で 4 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 法によって PEPCK mRNA の発現量を測定した。

(3) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の転写抑制機構の解析

6-MSITC による PEPCK mRNA の発現低下が転写阻害剤の actinomycin D で干渉された場合、PEPCK 遺伝子のプロモーター領域の解析を行う。

PEPCK 遺伝子の転写開始点上流 0.5 kb までのこの領域には、肝臓特異的発現とインスリン・グルカゴン・グルココルチコイドに回答するすべての領域が含まれている。この DNA 断片を挿入したルシフェラーゼリポータープラスミドを、H4IIE 細胞にトランスフェクションする。6-MSITC 存在下・非存在下でのプロモーター活性をデュアルルシフェラーゼアッセイ法にて測定し、この領域に 6-MSITC に応答性の配列が含まれているかを検討した。含まれていれば、デリーションコンストラクトを構築し、イソチオシアネート応答性配列を決定する。含まれていなければ、さらに上流を増幅して解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の発現抑制の解析

PEPCK mRNA の発現誘導は、6-MSITC により濃度依存的に抑制されること、また 10 μM 6-MSITC 処理により、4 時間と早期に抑制されることが明らかになった (図 2)。

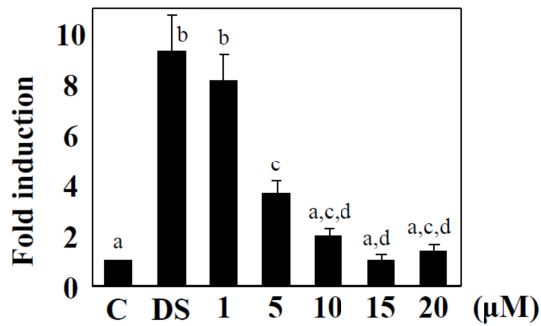


図2 6-MSITC による PEPCK mRNA の発現抑制

### (2) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子発現抑制メカニズムの解析

シグナル伝達経路を同定するために各種シグナル分子の阻害剤で処理した。その結果、protein kinase C (PKC) の阻害剤である staurosporine および novel PKC の選択的阻害剤である rottlerin、MAPK Kinase (MAPKK) の阻害剤である PD98059 および U0126、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ II の阻害剤である actinomycin D、タンパク質合成阻害剤の cycloheximide 処理によって、PEPCK mRNA の発現抑制が有意に阻害された。これらの結果より、6-MSITC による PEPCK mRNA の発現抑制は、novel PKC、および MAP Kinase 経路 を介することが示された。

次に novel PKC を活性化するホルボールエステル の phorbol-12-myristate-13-acetate で H4IIE 細胞を処理すると PEPCK mRNA の発現が抑制されたことから、6-MSITC による PEPCK mRNA の発現抑制には novel PKC が関与することが明らかとなった。

さらに、H4IIE 細胞を 6-MSITC 処理後、経時的に全細胞溶解液を調製し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、活性化型であるリン酸化 MAPKK 量は、6-MSITC 処理後 20 分で増加することが示され、これにより PEPCK mRNA の発現抑制に、MAP Kinase が関与することが明らかとなった。

### (3) 6-MSITC による PEPCK 遺伝子の転写抑制機構の解析

先の阻害剤実験で、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ II の阻害剤である actinomycin D によって有意に阻害されたことから、転写レベルで生じる可能性が示唆された。

H4IIE 細胞に prPEPCK / Luc (-467+69) をリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした後、dexamethasone 存在下の生理的条件のもと 6-MSITC 存在下・非存在下で培養した。細胞溶解後、Dual-Luciferase assay system にてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、6-MSITC は PEPCK 遺伝子のプロモーター活性を有意に低下させた。以上より、6-MSITC による PEPCK mRNA の誘導抑制は、転写レベルで生じることが明らかになった。

したがって、ワサビの辛味成分である 6-MSITC による PEPCK mRNA の発現抑制は novel PKC と MAP kinase 経路を介し、また転写レベルで生じると結論した。

### 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)

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

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 高木勝広、インスリン様活性を有する食品成分のスクリーニングと作用機構の解析. 第 9 回健康長寿長野研究会. 2015 年 6 月 27 日 松本大学 (長野県・松本市)

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. 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)

〔その他〕

ホームページ等

<http://professors.matsumoto-u.ac.jp/yamada/>

6 . 研究組織

高木 勝広 (TAKAGI. KATSUHIRO)

松本大学・大学院健康科学研究科・教授

研究者番号：8 0 2 7 9 5 6 2