

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16284

研究課題名(和文) 食材ポリアセチレン化合物による糖代謝改善作用の解明と標的分子の同定

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of anti-diabetic effect by polyacetylenes from the Apiaceae vegetables.

研究代表者

吉田 潤 (YOSHIDA, Jun)

岩手医科大学・教養教育センター・助教

研究者番号：20611007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はセリ科野菜などに含まれるポリアセチレン化合物ファルカリンジオールの抗糖尿病効果の検討と作用機序の解明を目的とした。糖新生を誘導した肝臓由来細胞におけるファルカリンジオールのグルコース産生抑制効果を見出した。その作用機序はインスリンシグナル伝達経路の下流のGSK-3 不活性化が関与することが示唆された。これらの結果は、抗2型糖尿病効果におけるセリ科食材の有用性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of the anti-diabetic effect of falcarindiol isolated from Apiaceae family vegetables. Falcarindiol suppressed glucose production in rat hepatoma H4 E cells. Falcarindiol also increased the level of inhibitory phosphorylation of GSK-3 in H4IIE cells. These results indicate that several Apiaceae family vegetables containing falcarindiol could be a useful food ingredient against type-2 diabetes.

研究分野：食生活学

キーワード：ポリアセチレン化合物 falcarindiol GSK-3 セリ科植物 糖新生 機能性物質 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病はインスリン抵抗性と膵島機能不全によるインスリン作用不足を要因とする高血糖状態で、糖尿病全体の 90%以上を占めている。2 型糖尿病は一度発症すると治癒することが難しく、網膜症など様々な合併症を引き起こすことから、その予防・治療法の開発は社会的要請が大きい。

近年、新たな作用機序に基づく 2 型糖尿病予防・治療剤の有効成分として、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)) を阻害する物質が注目されている。GSK-3 はインスリンシグナル伝達の下流に位置するタンパク質リン酸化酵素で、糖尿病態において過剰な活性化がみられることから、2 型糖尿病予防・治療の創薬分子標的と考えられている。GSK-3 阻害物質は、これまでに合成化合物を中心として様々な化合物が見出されてきたが、食材由来の GSK-3 阻害物質の研究はほとんど進んでいない。食材由来の GSK-3 阻害剤の研究は、2 型糖尿病予防の基礎研究と機能性食品開発の応用研究の双方において重要である。

これまでに、食材に含まれる GSK-3 阻害物質を遺伝子変異酵母株 YNS17 (*zds1 erg3 pdr1 pdr3*) の生育回復を活性の指標とする新規な薬剤スクリーニング技術を用いて探索してきた。その結果、ワサビに含まれるイソチオシアネート類と、ニンジンや山菜のウドに含まれるポリアセチレン化合物のファルカリンジオール(Fal)の GSK-3 阻害活性を見出した。抗糖尿病効果に関わる機能性を検討した結果、ラット肝臓由来細胞株 H4 E における糖新生律速酵素の遺伝子発現が Fal の作用により抑制された。また、糖尿病モデルラットにセリ抽出物を投与すると血糖値の上昇を抑制する可能性が示唆された。Fal はセリ、ニンジンやウドなどのセリ科やウコギ科の食材に含まれる GSK-3 阻害物質である。これまでの、肝細胞や糖尿病モデル動物を用いた機能性評価から、Fal を含む食材は高血糖改善効果を示す有望な天然資源であると期待できる。

## 2. 研究の目的

Fal は肝細胞や糖尿病モデル動物を用いた機能性評価から、ヒトに対する高血糖改善効果が期待できる生物活性物質である。しかし、肝臓由来細胞株における作用機構の詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究は、ファルカリンジオールの糖代謝改善作用を肝臓由来細胞を用いて明らかにすることを目的とした。また、遺伝子変異酵母株 YNS17 に生育円活性を示す各種低分子化合物の機能性評価と作用解析を行い Fal と比較した。具体的には、次の(1)~(3)を中心に糖新生抑制作用とインスリンシグナル伝達への影響を解析した。

### (1) 肝臓由来細胞株における糖新生抑制効

## 果と作用機序の解析

(2) 多細胞生物を用いた薬剤探索系における GSK-3 阻害活性の検討

(3) 遺伝子変異酵母株(*zds1 erg3 pdr1/3*) に生育回復活性を示す生物活性物質の GSK-3 阻害活性と 2 型糖尿病に関連する機能性評価

## 3. 研究の方法

(1) 肝臓由来細胞における Fal のグルコース産生抑制作用の解析

H4 E 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに播種して 2 日間培養後にデキサメタゾン(Dex) とジブチリルサイクリック AMP (Bt<sub>2</sub>cAMP) を含む無血清 DMEM 培地に交換した。そこに、Fal または各種 GSK-3 阻害剤を添加し 24 時間培養した。その後、ピルビン酸ナトリウムと乳酸ナトリウムを添加したグルコース・フェノールレッド不含培地に交換して 4 時間培養後、培地へのグルコース放出量をグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で測定した。

(2) 肝臓由来細胞における Fal の糖新生に関わるシグナル伝達経路に対する影響

H4 E 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに播種して 2 日間培養し無血清培地に交換して一晩培養した。その後、様々な濃度の Fal または各種市販の阻害剤を培地に加えて培養し、糖新生制御機構に関わるシグナル伝達の主要分子のタンパク質リン酸化レベルをウエスタンブロット法で解析した。

(3) ゼブラフィッシュ胚を用いた実験系による多細胞生物における活性評価

ゼブラフィッシュ胚を用いた薬剤探索系にて Wnt/  $\beta$ -catenin 経路活性化による「眼の形成不全」を指標として多細胞生物における GSK-3 阻害活性の検討を評価した。受精後 4.5 時間のゼブラフィッシュ胚を 96-ウェルマイクロプレートに入れ、受精後 6 時間(シールド期)に Fal または GSK-3 阻害剤 B10 を加えて 24 時間培養後、顕微鏡で眼の形成を観察した。

(4) 神経突起伸長作用を有する非メチレン中断型ジエン酸の新たな生物活性の解析

合成した非メチレン中断型ジエン酸について、Ca<sup>2+</sup>超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株(*zds1 erg3 pdr1/3*) における生育回復活性を検討した。CaCl<sub>2</sub> を加えた YPD 寒天培地プレートで YNS17 株を 28 培養し、ペーパディスク法にて生育円の大きさを測定した。また、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性を MTT アッセイにて測定した。さらに、GSK-3 阻害活性、並びに H4 E 細胞におけるグルコース産生抑制作用を検討した。

(5) ヒマシ油から得られたヒドロキシ脂肪酸リシノール酸のカルシニューリン阻害活性と GSK-3 阻害活性の解析

ヒマシ油から得られるヒドロキシ脂肪酸リシノール酸(RA)の酵素反応におけるカルシニューリン(CN)阻害活性を、カルシニューリンアッセイキットを用いたマラカイトグリーン法にて測定した。また、遺伝子変異酵母株(*zds1 erg3 fkb1*、*zds1 erg3 cph1*)における生育円活性から CN 阻害活性におけるイムノフィリン依存性を検討した。また、培養細胞における CN 阻害活性を検討するため、ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 を 96-ウェルプレートに播種して一晚培養後、被験物質存在下で、IgE+DNP-BSA(Ag)刺激による  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性を指標に脱顆粒抑制活性は測定した。さらに、糖新生抑制作用を解析するために、Dex/Bt<sub>2</sub>cAMP 処理で糖新生刺激した H4 E 細胞に RA 及び各種阻害剤 LY294002、Akt 1/2 kinase inhibitor、rapamycin、staurosporine、okadaic acid、compound C を共処理して 24 時間培養し、培地交換後 4 時間で培地中に放出されたグルコースをグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 肝臓由来細胞における Fal のグルコース産生抑制作用の解析

Dex/Bt<sub>2</sub>cAMP 溶液で糖新生を惹起した H4 E 細胞にインスリンを処理して培養すると、培地中へのグルコース放出量が溶媒対照群と比較して約 90%抑制された。同条件下で Fal を H4IE 細胞に処理して培養すると、培地中へのグルコース放出量の抑制率が溶媒対照群と比較して抑制され、濃度依存的な有意差が認められた。また、Fal と阻害形式の異なる各種 GSK-3 阻害剤のグルコース放出量の抑制率を測定した結果、Mg<sup>2+</sup>拮抗型の LiCl と ATP 拮抗型の B10 で有意に抑制された。これらの結果から、Fal はグルココルチコイドと cAMP の作用で惹起される肝細胞のグルコース産生を抑制し、その活性は酵素反応で強力な GSK-3 阻害剤である B10 と同等の濃度で作用することが示唆された。以上の結果から、Fal は試験管内での酵素反応における GSK-3 阻害活性は既存の GSK-3 阻害剤と比較して強力な阻害活性ではないが、肝臓由来細胞においては既存の GSK-3 阻害剤と同程度の作用濃度で糖新生抑制効果を示す可能性が得られた。

(2) 肝臓由来細胞における Fal の糖新生に関わるシグナル伝達経路に対する影響

H4 E 細胞にインスリンを 1 時間作用させると、Akt リン酸化、GSK-3 リン酸化、および p70S6K リン酸化の顕著な増加がみられた。同条件下で、Fal を 1 時間作用させた結果、GSK-3 リン酸化と p70S6K のリン酸化の増加

が認められたが、Akt リン酸化に顕著な増加がみられなかった。また、同様に GSK-3 阻害剤 TDZD-8 を H4 E 細胞に作用させると、GSK-3、AMPK、p70S6K のリン酸化レベルの増加が認められた。一方、AMPK 活性化剤 AICAR を H4 E 細胞に作用させると、AMPK のリン酸化に増加がみられたが、p70S6K のリン酸化に変化がみられなかった。Fal と各種阻害剤を共処理すると、Fal と mTORC1 阻害剤 rapamycin 共処理群で糖産生抑制効果が打ち消された。一方、インスリンと各種阻害剤を共処理すると、LY、Ak、Ra 共処理群においてインスリンの糖産生抑制効果が阻害された。Fal の糖産生抑制効果が PI3K 阻害剤、Akt 阻害剤との共処理で阻害されなかったことから、その標的分子は Akt より下流の分子、またはインスリンシグナル伝達経路とは独立した細胞内シグナル伝達経路の分子であることが示唆された。以上の結果から、H4 E 細胞における Fal の標的分子は GSK-3 である可能性が得られ、GSK-3 不活性化と AMPK 活性化により糖新生を抑制することが示唆された。また、これらの作用機序にはオートファジー制御にかかわる mTORC1 の活性が関わる可能性が得られた。H4 E 細胞における Fal の糖新生抑制作用は、Akt の活性化を介さない GSK-3 不活性化によることが示唆された。

(3) ゼブラフィッシュ胚を用いた実験系による多細胞生物における活性評価

多細胞生物における GSK-3 阻害活性の検討では、GSK-3 阻害剤 B10 をゼブラフィッシュ胚に作用させると「眼の形成不全」がみられた。同条件下で Fal を作用させると、低濃度では眼が形成され、高濃度では胚発生が抑制された。しかし、それぞれ活性を示さない濃度で Fal と B10 を供処理したところ「眼の形成不全」がみられた。Fal はゼブラフィッシュ胚において B10 と相乗的に Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を活性化する可能性が得られた。

(4) 神経突起伸長作用を有する非メチレン中断型ジエン酸の新たな生物活性の解析

非メチレン中断型ジエン酸の遺伝子変異酵母株 YNS17 に対する生育回復活性は、18:2 4,15 のみに僅かに生育円が認められた。また、HL60 細胞に対する細胞毒性は、リノール酸に比べていずれのジエン酸も約 5~7 倍高い細胞毒性を示した。一方、GSK-3 に対する阻害活性は、GSK-3 阻害剤の TDZD-8 に比べていずれのジエン酸も約 5~12 倍低い IC<sub>50</sub> 値を示した。さらに、H4 E 細胞におけるグルコース産生抑制効果は 18:2 4,15 のみに認められた。以上の結果から、18:2 4,15 は酵素反応における GSK-3 活性を阻害し、糖新生を誘導した H4 E 細胞におけるグルコース産生抑制作用を示すことが明らかになった。

(5) ヒマシ油から得られたヒドロキシ脂肪酸 RA の CN 阻害活性と GSK-3 阻害活性の解析

RA は遺伝子変異酵母株 (*zds1 erg3 fkb1*、*zds1 erg3 cph1*) に対して生育円活性を示し、CN をペプチド基質拮抗的に阻害した。一方、構造類縁体のオレイン酸(OA)とリシノール酸メチルエステル(RAM)は RA より弱い CN 阻害活性を示した。また、Ag 刺激した RBL-2H3 細胞において、RA は高濃度で脱顆粒を有意に抑制したが、OA と RAM は、同濃度で脱顆粒を有意に抑制しなかった。同条件下で、CN 阻害剤の FK506 と cyclosporin A は脱顆粒を有意に抑制した。以上より、RA のイムノフィリン非依存的な CN 阻害活性が示唆され、その活性にはヒドロキシ基またはカルボキシ基が重要であると考えられる。

また、糖新生を惹起した H4 E 細胞に RA を作用させるとグルコース産生が溶媒処理群と比較して有意に抑制された。同条件下で RA と各種阻害剤を共処理すると、rapamycin 共処理群で RA のグルコース産生抑制効果が顕著に阻害され、PI3K 阻害剤と Akt 阻害剤との共処理で阻害されなかった。一方、インスリンと各種阻害剤を共処理すると、LY294002、Akt 1/2 kinase inhibitor、rapamycin との共処理群においてインスリンの糖産生抑制効果が阻害された。以上より、RA の標的分子は、Akt より下流の分子、またはインスリンシグナル伝達経路とは独立した細胞内シグナル伝達経路の分子である可能性が示唆された。

#### 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5件)

Uchida T., Koshino H., Takahashi S., Shimizu E., Takahashi H., Yoshida J., Shinden H., Tsujimura M., Kofujita H., Uesugi S., Kimura K. Ca<sup>2+</sup>-signal transduction inhibitors, kujiol A and kujigamberol B, isolated from Kuji amber using a mutant yeast. *J. Nat. Prod.* 81(4), 1070-1074 (2018) (査読有)

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00922

Shiono Y., Muslihah I. N., Suzuki T., Arieftha R. N., Anwar C., Handojo Hadi Nurjanto H. H., Aboshi T., Murayama T., Tawaraya K., Koseki T., Yoshida J., Usukhbayar N., Uesugi S., Kimura K. New eremophilane and dichlororesorcinol derivatives produced by endophytes isolated from *Ficus ampelas*. *J. Antibiot.* 70(12), 1133-1137 (2017) (査読有)

DOI: 10.1038/ja.2017.125

Yoshida J., Uesugi S., Kawamura T., Kimura K., Hu D., Xia S., Toyooka N., Ohnishi M., Kawashima H. (4Z,15Z)-Octadecadienoic acid inhibits glycogen synthase kinase-3 and glucose production in H4IIE cells. *Lipids* 53(3), 295-301 (2017) (査読有)

DOI: 10.1007/s11745-017-4236-3

Shiono Y., Miyazaki N., Murayama T., Koseki T., Harizon, Katja D. G., Supratman U., Nakata J., Kakihara Y., Saeki M., Yoshida J., Uesugi S., Kimura K., GSK-3 inhibitory activities of novel dichlororesorcinol derivatives from *Cosmospora vilior* isolated from a mangrove plant. *Phytochem. Lett.* 18, 122-127 (2016) (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.09.007>

Abe T., Kobayashi M., Okawaa Y., Inui T., Yoshida J., Higashio H., Shinden H., Uesugi S., Koshino H., Kimura K., Yeast Ca<sup>2+</sup>-signal transduction inhibitors isolated from Dominican amber prevent the degranulation of RBL-2H3 cells through the inhibition of Ca<sup>2+</sup>-influx. *Fitoterapia* 113, 188-194 (2016) (査読有)

DOI: 10.1016/j.fitote.2016.07.018

##### [学会発表](計4件)

吉田潤、伊藤芳明、木村賢一、ヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid のグルコース産生抑制作用の解析、日本農芸化学会東北支部第 152 回大会、2017 年 11 月 4 日、秋田県立大学(秋田)

吉田潤、木村賢一、セリ科物植由来 GSK-3 阻害物質 falcarindiol の肝がん由来細胞における作用特性の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都)

吉田潤、大川佑介、小山卓矢、上杉祥太、木村賢一、ヒマシ油由来ヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid のカルシニューリン阻害活性、日本農芸化学会東北支部第 151 回大会、2016 年 10 月 9 日、山形大学(鶴岡)

吉田潤、上杉祥太、川村哲晃、木村賢一、Dawei Hu、Shuang Xia、豊岡尚樹、大西正男、川島英城、神経突起伸長作用を有する非メチレン中断型ジエン酸の新たな生物活性探索、日本油化学会第 55 回

年会、2016年9月8日、奈良女子大学(奈良)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 潤 (YOSHIDA, Jun)

岩手医科大学・教養教育センター・助教

研究者番号：20611007