

# 大豆イソフラボンによるインスリン抵抗性の克服とトランスクリプトーム およびプロテオーム解析による機構解明 (第一報)

矢ヶ崎一三\*<sup>1,2</sup>・末安俊明<sup>3</sup>・河 秉瑾<sup>2</sup>・長岡真聡<sup>1</sup>・米澤貴之<sup>2</sup>・加藤久典<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学大学院共生科学技術研究院 <sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科

<sup>3</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科

## Transcriptome and Proteome Analyses of the Molecular Mechanism of a Soybean Isoflavone, Genistein, in Overcoming Insulin Resistance

Kazumi YAGASAKI<sup>1,2</sup>, Toshiaki SUEYASU<sup>3</sup>, Byung Geun HA<sup>2</sup>, Masato NAGAOKA<sup>1</sup>,  
Takayuki YONEZAWA<sup>2</sup> and Hisanori KATO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Symbiotic Science and Technology,

Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

<sup>2</sup>Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033

<sup>3</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

### ABSTRACT

In a previous study, we found a soybean isoflavone genistein suppresses the increase in the serum glucose level in type 2 diabetic model mice. To clarify the mode of action of genistein, the effect of genistein on glucose metabolism was investigated using rat L6 myotubes as a model of muscle tissue. Genistein dose-dependently promoted glucose consumption in the absence of insulin in L6 myotubes cultured under normal and high glucose mediums. It is suggested that by the results of examination using kinase inhibitors PI3-K, PKC and mTOR are involved in the effect of genistein from the results of examination using various kinase inhibitors. DNA microarray analysis revealed that 410 genes were up-regulated and 782 genes were down-regulated by the treatment with genistein. The result of pathway analysis shows possibility of relation between the genistein's effects and signaling pathways of AMPK and IRS-1. Furthermore, we found that genistein increased GLUT4 translocation into the plasma membrane and AMPK phosphorylation. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 22-26, 2009.

Key words : diabetes, genistein, muscle cells, glucose uptake, microarray

\*〒183-8509 府中市幸町3-5-8

近年注目を集めているメタボリックシンドロームの主要な危険因子である糖尿病は、その患者数が年々増加しており、平成19年の調査結果によると糖尿病が強く疑われる人が約890万人、糖尿病の可能性を否定できない人は約1,620万人で、予備軍を含めた患者数は2,210万人と推定され、国民の成人の約2割にも上る<sup>1)</sup>。そのため、食生活を通して糖尿病の予防や改善することが強く求められている。大豆イソフラボンにはエストロゲン様作用を有し、閉経後の更年期症状や骨粗鬆症の予防効果などが知られているほか、糖代謝に関しては閉経後女性にゲニステインを摂取させたところ、インスリン抵抗性および空腹時血糖が低下したとの報告がある<sup>2)</sup>。また、我々も先の研究によりゲニステインが2型糖尿病モデルマウスの血糖値上昇を抑制することを見出している。しかしながら、その作用機構についての解析は進んでいない。そこで本研究では、生体内で最大の組織で糖代謝に主要な役割を果たしている筋肉組織のモデルとしてラット由来培養L6筋管細胞を用い、糖代謝におけるゲニステインの作用とその作用機構の解析を行った。

## 方 法

### 細胞の培養

細胞は、ラット骨格筋由来のL6筋芽細胞を用い、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で11日間培養し、L6筋管細胞へ分化させた。その後、塩類緩衝溶液で2時間培養し細胞を洗浄後、グルコースおよびサンプルを含む塩類緩衝溶液に交換して4時間培養した。培養

前後の溶液のグルコース濃度の差からL6筋管細胞のグルコース取り込み量を算出した。また、同様にL6筋管細胞にサンプル処理をして各時間培養後、RNAおよびたん白質を抽出してサンプルを調製した。

### 遺伝子発現解析

50  $\mu$ Mのゲニステインで4時間処理後のRNAサンプルよりcDNA、cRNAを調製し、Affymetrix社のGeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrayをハイブリダイズ後、GeneChip Operating System (GCOS) を用いてシグナルを解析した。発現変動の見られた遺伝子については、Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。また、各種遺伝子の発現についてリアルタイムRT-PCRにて解析した。

### たん白質発現解析

50  $\mu$ Mのゲニステインで各時間処理後の各種たん白質の発現、および翻訳後修飾については、特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

## 結果と考察

通常のグルコース濃度 (5.5 mM) の培養液で分化させたL6筋管細胞、および、インスリン抵抗性が充進していると考えられる高グルコース濃度 (25 mM) の培養液で分化させたL6筋管細胞における、グルコース消費に対するゲニステインの作用を検討した。その結果、両細胞間で用量反応性に多少の違いは見られるものの、濃度依存的なグルコース消費促進作用が認められた (Fig. 1)。本結果に基づき以降の実験では通常

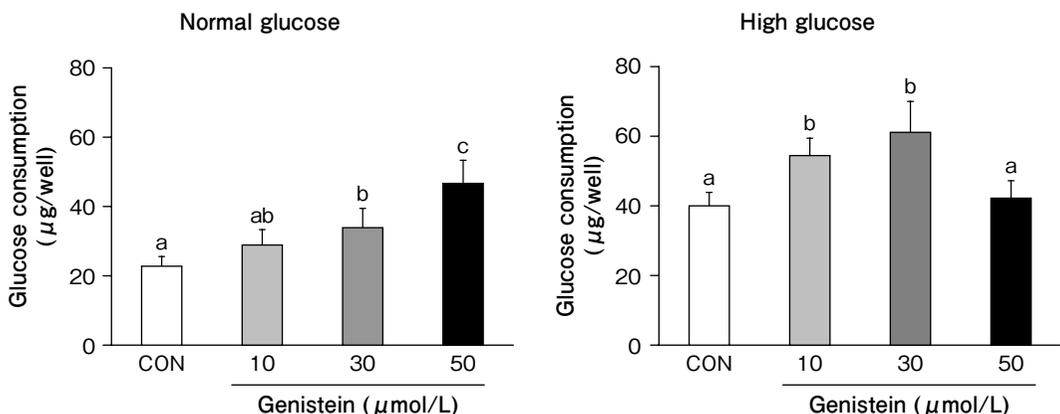


Fig. 1. Effect of genistein on glucose consumption in L6 myotubes under normal and high glucose conditions. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 wells. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

グルコース濃度条件では50  $\mu$ M, 高グルコース濃度条件においては30  $\mu$ Mのゲニステインで細胞処理を行った。

グルコースの取り込みに重要な糖輸送体である GLUT4の膜移行や活性を調節することが報告されている各種リン酸化酵素<sup>3)</sup> について, ゲニステインのグルコース取り込み促進作用に関与しているかどうかを

明らかにするために, 特異的な阻害剤を用いて検討した。その結果, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) 阻害剤のLY294002, protein kinase C (PKC) 阻害剤のG66983およびmammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤のラパマイシンが, 通常グルコース濃度条件においてゲニステインにより亢進したグルコース取り込みを抑制することを見出した (Fig. 2)。

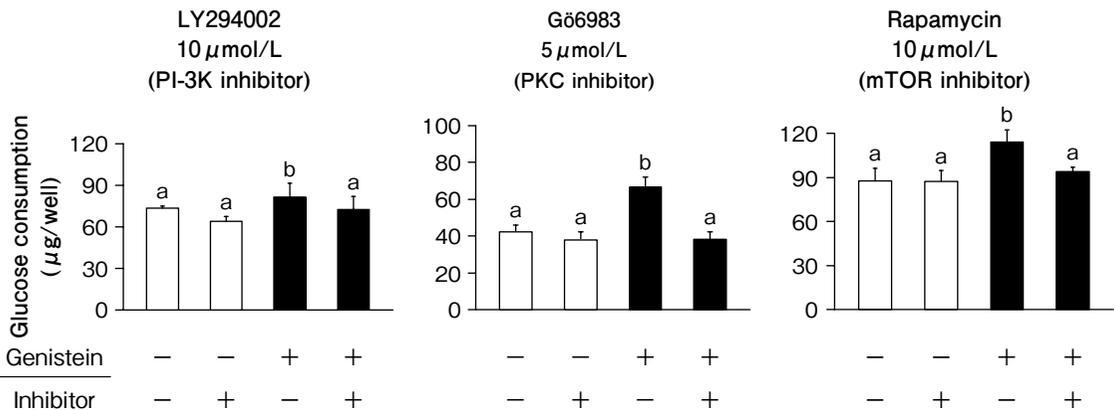


Fig. 2. Effects of kinase inhibitors on genistein-promoted glucose consumption in L6 myotubes under normal glucose condition. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 wells. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

Table 1. Changes of gene expressions with genistein treatment

Gene Symbol	Gene Name	Judgment	Fold Change
<b>AMPK-Related Genes</b>			
<i>Stat3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	Increase	1.34
<i>Scd</i>	stearoyl-Coenzyme A desaturase	Increase	1.26
<i>Socs3</i>	suppressor of cytokine signal ing 3	Increase	1.21
<i>Adipor1</i>	adiponectin receptor 1	Increase	1.06
<i>Lepr</i>	leptin receptor	Absent	-
<i>Edn1</i>	endothel in 1	Decrease	0.74
<i>Cntf</i>	ciliary neurotrophic factor	Decrease	0.74
<i>Ptpn11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	Decrease	0.65
<b>IRS-1-Related Genes</b>			
<i>Egr1</i>	early growth response 1	Increase	1.4
<i>Rab4a</i>	RAB4A, member RAS oncogene fami ly	Increase	1.33
<i>Socs3</i>	suppressor of cytokine signal ing 3	Increase	1.21
<i>Cntf</i>	ciliary neurotrophic factor	Decrease	0.74
<i>Edn1</i>	endothel in 1	Decrease	0.74
<i>Ptpn11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	Decrease	0.65
<i>Il6</i>	interleukin 6	Decrease	0.57
<i>Il15</i>	interleukin 15	Decrease	0.42
<b>GLUT4-Related Genes</b>			
<i>Slc2a4</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Not Change	1.38
<i>Vamp2</i>	vesicle-associated membrane protein 2	Not Change	1.01
<i>Vamp7</i>	vesicle-associated membrane protein 7	Increase	1.32

また、高グルコース濃度条件においても同様の作用が認められた (data not shown). このことから、ゲニステインによるグルコース取り込み促進作用にPI3-K、PKCおよびmTORが関与していることが示唆された。

ゲニステインの遺伝子発現レベルに対する影響を網羅的に解析するために、ゲニステイン処理4時間後のRNAサンプルについて、Affymetrix社のGeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて検討した。その結果、対照と比較してゲニステインにより発現が増加した遺伝子が410、低下した遺伝子が782個同定された。グルコース代謝に関連が深いと考えられる経路について、IPAソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った結果、insulin receptor substrate 1 (IRS-1) および 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 関連遺伝子において、ゲニステイン処理により多数発現の変動が認められた (Table 1) (重複遺伝子あり)。さらに詳細な検討が必要であるが、これらの経路がゲニステインの作用に関与している可能性が示唆された。

グルコース取り込みに重要なGLUT4の膜への移行について検討した結果、ゲニステイン処理2分後の非常に早い時間と、60分後に膜への移行の亢進が認められた (Fig. 3)。2相性の反応を示したことから、ゲニステインは少なくとも2つの異なる経路を介して、GLUT4の膜移行を促進する可能性が示唆された。アディポネクチンなどの様々な因子や運動などによるグルコース取り込みに関わるAMPKの活性化について、リン酸化を指標に検討した結果、ゲニステイン1時間処理においてリン酸化の亢進が認められた (Fig. 4)。

本研究の結果から、ゲニステインはインスリンと同様にIRS-1/PI3-KからPKCやAktを活性化する経路と、運動などにより促進されるAMPKを活性化する経路を介して、GLUT4の発現や膜への移行を促進することで糖取り込みを促進している可能性が示唆された。現在、マイクロアレイで発現変動が見られた遺伝子について、さらに詳細に解析を進めるとともに、たん白質レベルにおけるゲニステインの作用を明らかにするために、リン酸化やO結合型N-アセチルグルコサミン化などの翻訳後修飾に着目してその作用解析を開

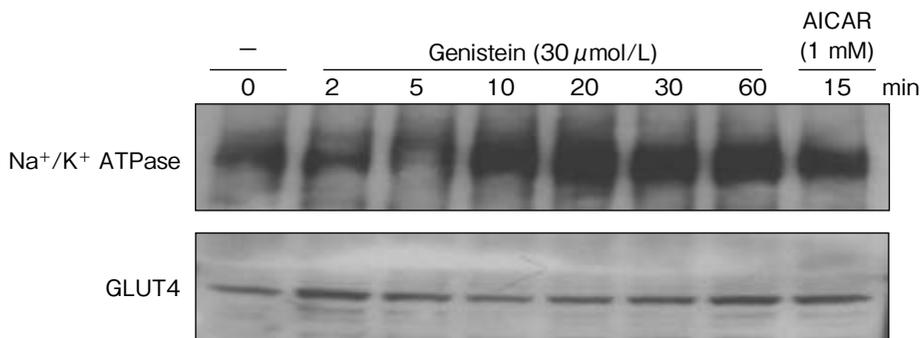


Fig. 3. Effect of genistein on GLUT4 translocation in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated for the indicated times and plasma membrane fractions were prepared. Protein samples were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GLUT4 antibody and anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase antibody.

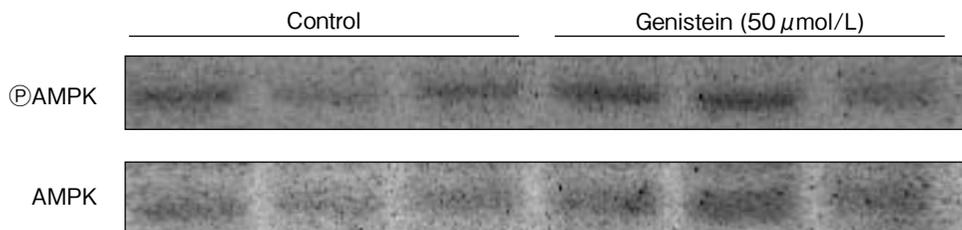


Fig. 4. Effect of genistein on AMPK phosphorylation. L6 myotubes were cultured with or without genistein for 60 min. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho AMPK and anti-AMPK antibodies.

始している。これらの遺伝子レベルおよびたん白質レベルにおけるゲニステインの詳細な作用解析によって、作用機構が明確になることが期待される。

## 要 約

我々はこれまでの研究により、大豆イソフラボンの一つであるゲニステインが2型糖尿病モデルマウスの血糖値上昇を抑制することを見いだしている。本研究では、その作用機序の解明のために、筋肉組織のモデルとしてラット由来L6筋管細胞を用いて、グルコース代謝に対するゲニステインの作用について解析した。通常濃度および高グルコース濃度で培養したL6筋管細胞にゲニステインを4時間作用させることにより、インスリン非存在下で濃度依存的にグルコースの取り込みが亢進することを確認した。各種阻害剤を用いた検討により、ゲニステインの作用にPI3-K、PKCおよびmTORが関与していることが示唆された。マイクロアレイ解析によって、ゲニステイン処理により発現が上昇した遺伝子が410、発現が減少した遺伝子が782同定された。パスウェイ解析の結果、AMPKやIRS-1経路関連遺伝子のいくつかに発現変動が認められたことから、これらの経路がゲニステインによって調節されることが示唆された。さらに、グルコース取り込みに重要なGLUT4の膜移行およびAMPKのリン酸化がゲニステイン処理により亢進することを見出した。

## 文 献

- 1) 厚生労働省 平成19年 国民健康・栄養調査結果の概要について <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/12/h1225-5.html>
- 2) Atteritano M, Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Mazzaferro S, D'Anna R, Cannata ML, Gaudio A, Frisina A, Frisina N, Corrado F, Cancellieri F, Lubrano C, Bonaiuto M, Adamo EB and Squadrito F (2008): Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* **92**, 3068-3075.
- 3) Huang S and Czech MP (2007): The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* **5**, 237-252.