

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 (第二報)

矢ヶ崎一三^{*1,2}・末安俊明³・河 秉瑾²・伊東克晃¹・米澤貴之²・加藤久典³

¹東京農工大学大学院共生科学技術研究院 ²東京大学大学院医学系研究科

³東京大学総括プロジェクト機構

Transcriptome and Proteome Analysis of Molecular Mechanism in Overcoming Insulin Resistance by a Soybean Isoflavone, Genistein

Kazumi YAGASAKI^{1,2}, Toshiaki SUEYASU³, Byung Geun HA², Katsuki ITOU¹,
Takayuki YONEZAWA² and Hisanori KATO³

¹Institute of Symbiotic Science and Technology,

Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509

²Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033

³Organization for Interdisciplinary Research Project, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

We previously reported that the soybean isoflavone genistein shows anti-diabetic activity in type 2 diabetic model mice. To clarify the modes of action of genistein, the effects of genistein on glucose metabolism and signal transduction were investigated in rat L6 myotubes and muscle tissue of type 2 diabetic *db/db* mice. DNA microarray analysis showed that 422 genes were up-regulated and 712 genes were down-regulated by treatment with genistein in L6 myotubes cultured under normal glucose medium. The results of pathway analysis suggested that genistein activates AMPK/PKC λ -GLUT4 pathway by decreasing PARD3 expression and increasing IL-6 expression. Signal inhibitors of AMPK and O-GlcNAcase canceled genistein-induced increase of glucose consumption in L6 myotubes cultured both under both normal and high glucose media. Genistein time-dependently promoted AMPK phosphorylation and GLUT4 translocation to plasma membrane of L6 myotubes. In DNA microarray analysis of muscle tissue from *db/db* mice, up-regulation of 637 genes and down-regulation of 610 genes were induced by the administration of genistein. Genistein is indicated as changing the mRNA expressions of many TNF- α downstream genes in pathway analysis. In fact, the serum TNF- α protein level was decreased in genistein-treated *db/db* mice. These results indicated that various pathways were concerned with the anti-diabetic

*〒183-8509 府中市幸町3-5-8

action of genistein. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 23-29, 2010.

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

糖尿病はメタボリックシンドロームの主要なリスクファクターであり、日本においても食習慣の変化や高齢者人口の増加などに伴って、その患者数は増加の一途をたどっている。したがって、食生活を通じて糖尿病の予防や改善を行うことは重要な課題である。我々は大豆イソフラボンの一つであるゲニステインが抗糖尿病作用を有することを見出しており、前年度の報告においては、生体内で糖代謝に重要な役割を担っている筋肉組織のモデルとしてラット由来培養L6筋管細胞を用いて作用機構の解明を試みた。その結果、ゲニステインがL6筋管細胞の糖取り込みを促進すること、この糖取り込み促進作用に種々のたん白質リン酸化酵素が関与している可能性があること、ゲニステインの作用の一つにグルコース取り込みに重要なSolute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 (GLUT4) の膜移行促進作用があることを報告している。また、トランスクリプトーム解析によって糖代謝に重要なインスリンシグナル経路やAMPKの活性化を示唆する結果を報告している。今年度はゲニステインの糖代謝調節作用の作用機構の解析をさらに進めるとともに、以前検討したマウスとは異なる2型糖尿病モデルマウスにおけるゲニステインの作用を確認し、個体レベルにおける遺伝子発現変化を解析した。

方 法

細胞の培養

細胞は、ラット骨格筋由来のL6筋芽細胞 (ATCC) を用い、10%ウシ胎児血清を含む通常グルコース濃度 (5.5 mM) および高グルコース濃度 (25 mM) 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、グルコースおよびゲニステイン (通常グルコース濃度では50 μ M, 高グルコース濃度では30 μ M) 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¹⁾。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、定法によりRNAおよびたん白質を抽出してサンプルを調製した。

db/db 2型糖尿病モデルマウス

2型糖尿病モデルであるdb/dbマウス (5週齢) (日

本チャールズリバー) を1週間予備飼育後、AIN-93処方20%カゼイン食群 (CNT), 0.1%ゲニステイン含有20%カゼイン食群 (GEN) に分け、5週間にわたり自由摂取させた。週に一度、尾静脈採血を行い血糖値を測定した。5週間飼育後、血清および各種組織を採取し、各種組織より定法によりRNAおよびたん白質を抽出した。なお、正常マウスとしてMistyマウス (NOR) もCNTと同様に飼育した。

遺伝子発現解析

L6筋管細胞およびマウス組織RNAサンプルよりcDNAおよびcRNAを調製した。L6細胞についてはcRNA (n=3) をGeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイズ後、統計解析ソフトRを用いてRobust Multi-array Average (RMA) によるシグナルの正規化およびRank Productsによる False Discovery Rate (FDR) の算出を行い、FDR<0.05の遺伝子を発現変動遺伝子とした。マウス骨格筋については群ごとに各個体RNAを混合してcRNAを調製し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイズ後、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

L6筋管細胞およびマウス組織より抽出したたん白質溶液を用いて、各種たん白質の発現および翻訳後修飾について、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。

血清中のTNF- α 濃度は、ELISAにて測定した。

結果と考察

前回の報告においては、高グルコース濃度の培養液で分化させたL6筋管細胞におけるトランスクリプトーム解析により、insulin receptor substrate 1 (IRS-1) および 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 関連経路がゲニステインの作用に関与している可能性を示唆する結果を得ている。今回は

通常のグルコース濃度の培養液で分化させたL6筋管細胞をゲニステインで4時間処理した際のRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、ゲニステインにより発現が増加した422遺伝子および発現が減少した712遺伝子を同定した。グルコース代謝に重要な糖輸送体であるGLUT4の上流遺伝子について、IPAソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った結果、ゲニステイン処理による*Il6* (interleukin 6) の発現上昇および*Pard3* (partitioning defective 3 homolog) と*Egf* (epidermal growth factor) の発現低下を見出した (Table 1)。EGFについては筋肉で産生されるという報告はなく、また発現シグナル値も低かったことから、それ以外の2遺伝子の発現についてリアルタイムRT-PCRにて発現解析を行った。その結果、ゲニステイン処理により*Il6*の発現上昇および*Pard3*の発現低下を確認した (Fig. 1)。IL-6は、一般的には糖尿病の増悪因子であるアディポカインの一つとして知られるが、運動後に産生が亢進することや筋肉細胞においてAMPKの活性化および糖取り込み促進作用を示すことも近年報告されている²⁾。また、脂肪細胞においてはインスリン依存性糖取り込みに重要な分子の一つであるPKC λ による糖取り込み促進が、*PARD3*の発現により抑制されるという報告³⁾があることから、ゲニステインの作用にIL-6によるAMPKの活性化および*PARD3*の発現抑制によるPKC λ の活性化を介した経路が関与している可能性が示唆された。AMPKやPKC λ はGLUT4の発現や膜移行を促進して糖取り込み

を調節することが知られていることから、GLUT4遺伝子 (*Slc2a4*) の発現についても確認したところ、ゲニステイン処理により有意な発現上昇が認められた (Fig. 1)。

各種阻害剤を用いた検討からインスリン依存性の糖取り込みに重要なphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)、protein kinase C (PKC) およびmammalian target of rapamycin (mTOR) が、ゲニステインによるグルコース取り込み促進作用にも関与している可能性を前回報告している。今回は、ゲニステインの糖取り込み促進作用にAMPKが関与しているかを明らかとするため、AMPKの阻害剤であるadenine 9- β -D-arabinofuranoside (Ara A:AMPアナログ) およびCompound C (ATP競合型阻害剤) を用いて検討した結果、ゲニステインによる糖取り込み促進が、Ara AおよびCompound Cによって打ち消された (Fig. 2)。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)。このことは、ゲニステインの作用にAMPKが関与していることを強く示唆している。また、ゲニステインはエストロゲン受容体 (ER) のリガンド作用を有することがよく知られていることから、ER α アンタゴニストの効果を検討したが、2種類のアンタゴニスト (Tamoxifen およびICI 182780) はゲニステインの糖取り込み促進作用に影響しなかった (Fig. 3)。しかしながら、エストロゲン受容体にはER α およびER β があり、筋肉における糖代謝制御にはER β が優位であるとの報告⁴⁾や、ゲニステインはER α よりもER β に対する親和性が高いこ

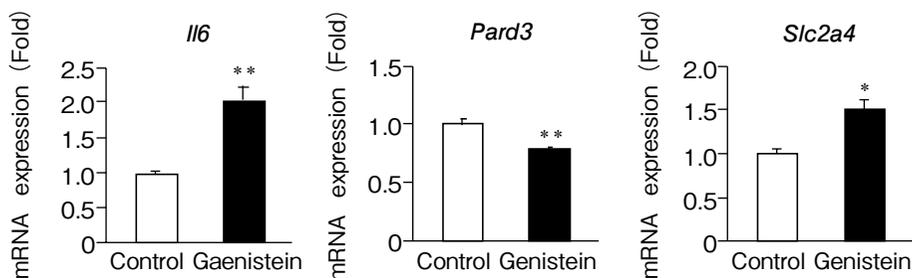


Fig. 1. Effect of genistein on mRNA expression of *Il6*, *Pard3* and *Slc2a4* in L6 myotubes cultured under normal glucose condition. Each value represents the mean \pm SEM for 3 wells. Asterisks mean significant differences (* p <0.05, ** p <0.01) by Student's *t*-test.

Table 1. Changes of expression of GLUT4 upstream genes in L6 myotubes.

Gene Symbol	Gene Name	Signal		Fold Change	FDR
		Control	Genistein		
<i>Il6</i>	interleukin 6	333	532	1.6	0.008
<i>Pard3</i>	partitioning defective 3 homolog	366	230	0.63	0.042
<i>Egf</i>	epidermal growth factor	39	24	0.62	0.036

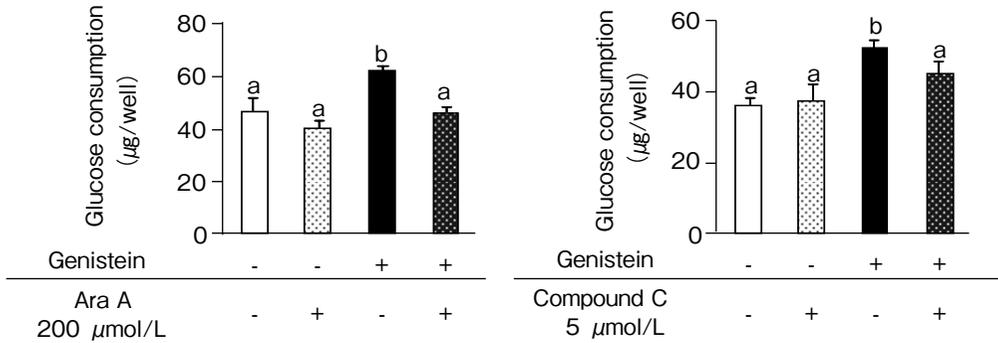


Fig. 2. Effects of AMPK inhibitors on genistein-promoted glucose consumption in L6 myotubes cultured under normal glucose condition. Each value represents the mean \pm SEM for 6 wells. Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

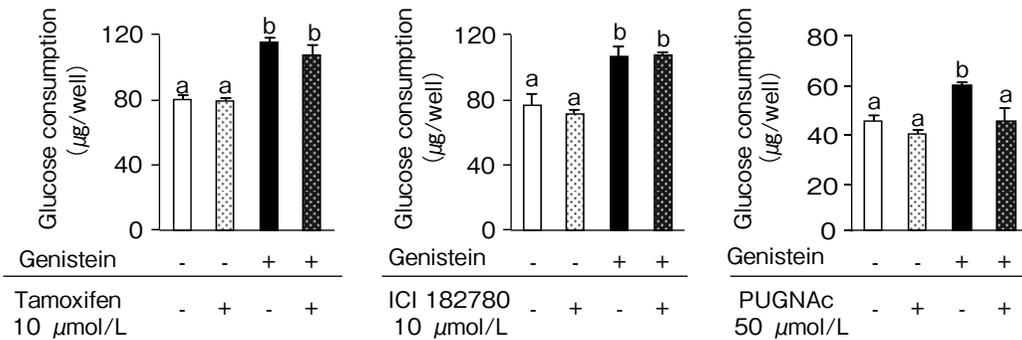


Fig. 3. Effects of ER α antagonists and OGA inhibitor on genistein-promoted glucose consumption in L6 myotubes cultured under normal glucose condition. Each value represents the mean \pm SEM for 6 wells. Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

とが知られており⁵⁾, ER β の関与についてはさらに検討する必要がある。近年の研究により, 種々のたん白質のグリコシル化(糖鎖修飾)のうち, O-N-アセチルグルコサミン化(O-GlcNAc化)が糖尿病の発症やインスリン抵抗性に関与していることが明らかになっている⁶⁾。そこで, O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase(O-GlcNAcase:OGA)の阻害剤で, O-GlcNAc化を促進するO-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate(PUGNAc)の作用を検討した。その結果, ゲニステインによる糖取り込み促進作用がPUGNAcの添加によって抑制された(Fig. 3)。このことは, ゲニステインがたん白質のO-GlcNAc化を抑制することで糖代謝を調節している可能性を示しており, 更なる研究によりたん白質のO-GlcNAc化に対するゲニステインの作用や標的となるたん白質の同

定を進めていきたい。

これまでの結果から, AMPK-GLUT4経路の活性化が, ゲニステインの作用に重要であることが示唆されていることから, AMPKのリン酸化についてウエスタンブロットにて検討したところ, 通常グルコース濃度および高グルコース濃度の培養液で分化させたL6筋管細胞のいずれにおいてもポジティブコントロールのAMPK活性化剤5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside(AICAR)と同様にゲニステインによる経時的なAMPKリン酸化の亢進が認められた(Fig. 4, 高グルコース濃度の結果は示していない)。また, グルコース取り込みに重要なGLUT4の細胞膜への移行についても, 通常グルコース濃度および高グルコース濃度の培養液で分化させたL6筋管細胞の両細胞において, ゲニステイン処理による亢進が認められ

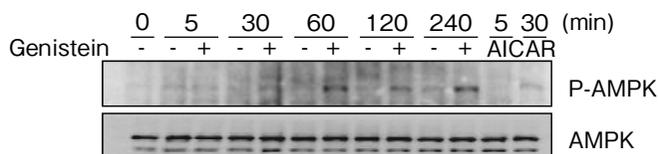


Fig. 4. Effects of genistein on the phosphorylation of AMPK in L6 myotubes cultured under normal glucose condition. L6 myotubes were cultured with genistein (50 μ M) or AICAR (1 mM) for the indicated times. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho AMPK and anti-AMPK antibodies.

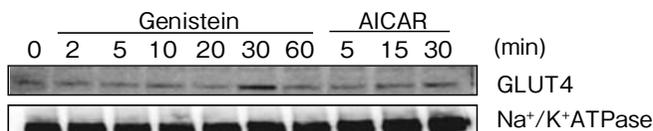


Fig. 5. Effect of genistein on GLUT4 translocation in L6 myotubes cultured under normal glucose condition. L6 myotubes were incubated with genistein (50 μ M) or AICAR (1 mM) for the indicated times and plasma membrane fractions were prepared. Protein samples were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GLUT4 antibody and anti-Na⁺/K⁺ATPase antibody.

た (Fig. 5, 高グルコース濃度の結果は示していない)。前年度および今年度の結果から、ゲニステインはインスリンシグナル経路である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の発現や膜移行を亢進させて糖取り込みを促進することが示唆されるとともに、たん白質のO-GlcNAc化の制御が関わっている可能性が示された。

以前の研究により、2型糖尿病モデルであるKK-Ayマウスにおいて、ゲニステインが血糖値上昇の抑制のほか、抗糖尿病作用を示すことを明らかにしているが、今回は別の2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスを用いて、ゲニステインの抗糖尿病作用を検証した。その結果、db/dbマウスにおいてもゲニステイン摂取(0.1%ゲニステイン含有飼料)によって、有意な血糖値上昇抑制作用が認められることを確認した (Fig. 6)。このマウスの筋肉組織におけるトランスクリプトーム解析を行った結果、ゲニステイン投与により発現が増加した637遺伝子および発現が減少した610遺伝子を同定した。インスリン抵抗性に重要な役割を果たすことが知られる、TNF- α の下流遺伝子に着目して解析した結果、発現増加遺伝子が70、発現減少遺伝子が45認められ、TNF- α の発現が変化している可能性が示唆されたことから、TNF- α の初期応答遺伝子である*Tnfaip1*の筋肉における発現を確認したところ、ゲニステイン投与により発現の低下が認められた (Fig. 7)。また、主要な産生組織の一つである脂肪組織における*Tnfa*の

発現を確認したところ、有意差はなかったもののdb/dbマウスにおいて上昇した発現が、ゲニステイン投与により減少する傾向が認められた (Fig. 7)。さらに、血清中のTNF- α 濃度を測定した結果、ゲニステイン投与によりTNF- α 濃度が有意に低下した (Fig. 8)。今後はさらに糖尿病関連因子の発現や活性について解析する必要があるが、ゲニステインはdb/dbマウスにおいて脂肪組織におけるTNF- α 産生を抑制することで、インスリン抵抗性を改善し、抗糖尿病作用を示す可能性も示唆された。

これまでの細胞レベルおよび2型糖尿病モデルマウスを用いた個体レベルにおける検討から、ゲニステインはインスリンシグナル経路や運動による血糖値調節に重要なAMPKシグナル、さらにはインスリン抵抗性に関わるTNF- α 発現など、様々な経路を調節して抗糖尿病作用を示すことが示唆された。今後は、さらに通常グルコース濃度および高グルコース濃度で培養したL6筋管細胞に対する作用の違い等も検討しつつ、遺伝子レベル、たん白質レベルでの結果を統合して、さらに詳細な作用機構の解明を目指したい。

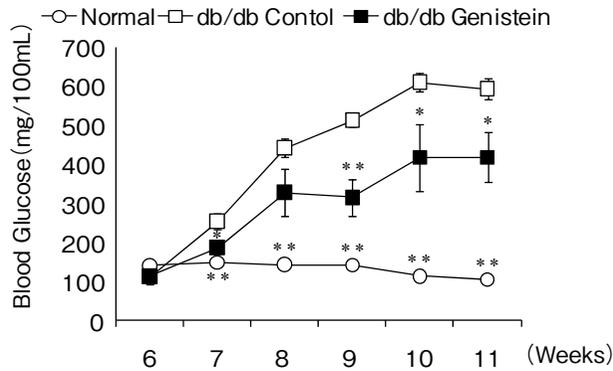


Fig. 6. Effect of genistein on fasting blood glucose levels in *db/db* mice. Mice were kept on diets during blood collection from tail vein. Each value represents the mean \pm SEM for 8 (control) or 6 (others) mice. Asterisks mean statistical significance at * p <0.05 or ** p <0.01 by Dunnet multiple comparisons test.

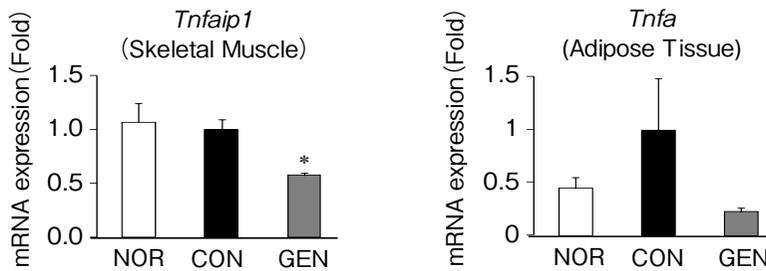


Fig. 7. Effect of genistein on mRNA expression in skeletal muscle *Tnfaip1* and adipose tissue *Tnfa* in *db/db* mice. Each value represents the mean \pm SEM. NOR: normal mice (n=6), CON: *db/db* control mice (n=8), GEN: *db/db* genistein (0.1%) mice (n=6). Asterisk means significant differences at * p <0.05 by Dunnet multiple comparisons test.

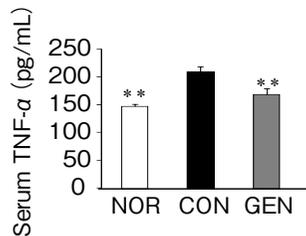


Fig. 8. Effect of genistein on serum TNF- α levels in *db/db* mice. Each value represents the mean \pm SEM. NOR: normal mice (n=6), CON: *db/db* control mice (n=8), GEN: *db/db* genistein (0.1%) mice (n=6). Asterisks mean significant differences at ** p <0.01 evaluated by Dunnet multiple comparisons test.

要 約

我々は大豆イソフラボンであるゲニステインに抗糖尿病作用があることを既に報告している。本研究では、ゲニステインの作用機構を解明するために、ラット由来L6筋骨細胞および2型糖尿病モデルである*db/db*マウス組織における糖代謝やシグナル経路に対するゲニステインの作用を検討した。通常グルコース濃度で培養したL6筋骨細胞における遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析した結果、ゲニステインによって発現が上昇する422遺伝子および発現が低下する712遺伝子を同定した。パスウェイ解析の結果より、ゲニステインはPAR3の発現低下およびIL-6発現上昇を介して、PKC λ /AMPK-GLUT4 経路を活性化する可能性が示唆された。また、AMPKおよびO-GlcNAcaseの阻害剤によりゲニステインによるグルコース取り込みの増加が打ち消されたことから、ゲニステインの作用にAMPKおよびたん白質のO-GlcNAc化の調節が関与していることが示唆された。さらに、ゲニステインは経時的にAMPKのリン酸化およびGLUT4の膜移行を促進することを確認した。*db/db*マウス骨格筋組織におけるマイクロアレイ解析結果から、ゲニステイン投与による637の発現上昇遺伝子および610の発現低下遺伝子を同定した。パスウェイ解析の結果、多数のTNF- α 下流遺伝子の発現変動が見られたことから、*db/db*マウス血清中のTNF- α たん白質濃度を測定したところ、ゲニステイン投与群では低下していることが確認された。これらの細胞レベルおよび動物個体レベルにおける結果から、ゲニステインの抗糖尿病作用には様々なシグナル経路が関わっていることが示唆された。

文 献

- 1) Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. (2009): Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model *db/db* mice. *Phytomedicine*. **16**, 437-443.
- 2) Pedersen BK. (2007) : IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans*. **35**, 1295-1297.
- 3) Kotani K, Ogawa W, Hashiramoto M, Onishi T, Ohno S, Kasuga M. (2000): Inhibition of insulin-induced glucose uptake by atypical protein kinase C isotype-specific interacting protein in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. **275**, 26390-26395.
- 4) Barros RP, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA. (2009): Participation of ER α and ER β in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **297**, E124-133.
- 5) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. **139**, 4252-4263.
- 6) Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. (2008): Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **295**, E17-28.