

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 (第三報)

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農学研究科 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 the Molecular Mechanism in Overcoming Insulin Resistance by a Soybean Isoflavone, Genistein

Kazumi YAGASAKI^{*1,2}, Toshiaki SUEYASU³, Byung Geun HA², Katsuki ITO¹,
Takayuki YONEZAWA² and Hisanori KATO³

¹Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509,

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

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

ABSTRACT

To clarify the mechanisms for anti-diabetic action of genistein, its effect on glucose metabolism and signal transduction were investigated in rat L6 myotubes. DNA microarray analysis revealed that the mRNA levels of 1,134 genes were statistically different between genistein-treated and control cells. Highly up-regulated genes included *Abcb1a/Abcb1b*, *Pdk2*, and *Adipor2*; the functions of their protein products are related to excretion of drugs, production of acetyl-CoA, and activation of AMPK, respectively. Pathway analysis suggested that p53 pathway was modulated by genistein, and genistein was found to decrease the phosphorylation of p53 protein. To determine the effect of genistein on energy expenditure, lactate production, pyruvate consumption, and extracellular LDH activity were determined. While genistein did not affect LDH release in the presence of a sufficient energy source, genistein increased LDH release under the energy source-insufficient condition. Lactate production was increased by genistein, indicating increased dependency of the energy production to glycolysis. Pyruvate consumption was attenuated by genistein, suggesting that the TCA cycle was suppressed. These results suggest that genistein activates AMPK-GLUT4 pathway through the decrease of intracellular ATP by the promotion of ATP consumption and the suppression of ATP synthesis. In DNA microarray analysis of muscle tissue from *in vivo* diabetic model *db/db* mice, administration of genistein increased the

*〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

expression of *Ldhb* (lactate dehydrogenase B). Thus, genistein may improve glucose metabolism via various pathways. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 1-6, 2011.

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

メタボリックシンドロームの主要なリスクファクターの一つである糖尿病は、高齢者人口の増加や食習慣の変化などの影響も受け、その患者数は年々増加しており、対策が求められている。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抗糖尿病作用を有することを見出しており、食生活の中での糖尿病の予防や改善に有用な食品成分であると考えられる。

本研究では、このゲニステインの抗糖尿病作用の作用機序の解明を目的とし、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析を行った結果、ゲニステインはL6筋管細胞における糖取り込みを濃度依存的に促進することを明らかにしている。その作用には、リン酸化酵素であるphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), protein kinase C (PKC), mammalian target of rapamycin (mTOR) およびadenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) が関与している可能性を見出し、ゲニステインによるAMPKのリン酸化の亢進や、糖取り込みに重要なグルコース輸送体であるGLUT4の細胞膜への移行が促進されることを確認している。また、PKCやAMPKの活性化には、partitioning defective 3 homolog (PAR3) の発現低下やinterleukin 6 (IL-6) の発現上昇が関わっている可能性も報告している。さらに、ゲニステインによるたん白質の糖鎖修飾の調節が、糖取り込み促進作用に寄与している可能性も示唆されている。個体レベルの解析においては、2型糖尿病モデルマウスである*db/db*マウスにおいても、ゲニステインは血糖値上昇抑制作用を有することを示すとともに、脂肪組織中のTNF α 遺伝子発現および血清中TNF α たん白質濃度がゲニステイン投与によって低下したことから、ゲニステインはTNF α シグナルの抑制を介したインスリン抵抗性改善作用を示すことが示唆されている。

今年度は細胞レベルおよび個体レベルにおけるゲニステインの糖代謝調節作用の作用機構について、さらに解析を行った。

方 法

細胞の培養

細胞は、ラット骨格筋由来のL6筋芽細胞 (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) の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を含む塩類緩衝液に交換して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、上清を回収するとともに、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処方の20%カゼイン食群、0.1%ゲニステイン含有20%カゼイン食群に分け、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マウスも20%カゼイン食で同様に飼育した。

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法により解析した。

LDH活性、乳酸生成量、ピルビン酸消費量測定

L6筋管細胞を各種塩類緩衝溶液中で培養後の培養上清について、LDH活性、乳酸濃度およびピルビン酸濃度を、それぞれの測定キットであるLDH-細胞毒性テストワコー（和光純薬工業）、Lactate Assay Kit II (BioVison) およびPyruvate Assay Kit, EnzyChrom (BioAssay Systems) を用いて、添付の手順に従って測定し、LDH活性、乳酸生成量、ピルビン酸消費量を算出した。

結果と考察

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。前回は、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、*Ilf6*の発現上昇および*Pard3*の発現低下を見出している。今回は、同定した発現変動遺伝子の中から、変動倍率の高い遺伝子を検索した結果、*Abcb1a/Abcb1b* (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A/B) の発現が、ゲニステイン処理

により亢進することを見出した (Table 1)。*Abcb1a* および*Abcb1b*の発現上昇は、リアルタイムRT-PCR解析においても確認された (Fig. 1)。*Abcb1a/Abcb1b* はATPを消費して薬物等を細胞外へと排出するP糖たん白質であることから²⁾、この遺伝子の発現上昇はATP消費を亢進させて、細胞内AMP/ATP比を上昇させ、AMPKの活性を正に調節する可能性が示唆された。次に、マイクロアレイ解析における発現変動遺伝子の中で、2型糖尿病シグナル (Type II Diabetes Mellitus Signaling) に属する遺伝子を検索した結果、*Adipor2* (Adiponectin receptor 2) の発現上昇が認められ (Table 1)、リアルタイムRT-PCR解析においても*Adipor2*の有意な発現上昇が確認された (Fig. 1)。アディポネクチンはアディポネクチン受容体を介してAMPKを活性化することが知られていることから³⁾、*Adipor2*の発現上昇がゲニステインの作用に寄与している可能性が示唆された。一方、グルコースを原料としたATP産生に関わる経路 (Glycolysis, Krebs-TCA_Cycle, Electron_Transport_Chain) に分類される遺伝子を検索した結果、*Pdk2* (Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2) の発現が上昇することを見出した (Table 1)。この酵素は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼのセリン残基をリン酸化して活性を抑制することから、ピルビン酸からのアセチルCoA生成が抑制されることが示唆された。マイクロアレイ解析における発現変動遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) に登録されている既知のパスウェイの中で関連の高い経路を検索した結果、p53シグナル経路が見出された。そこで、p53の活性に対するゲニステインの作用を明らかにするため、p53のリン酸化についてウエスタンブロット法にて検討した。その結果、ゲニステイン処理によりp53のリン酸化の低下が認められた (Fig. 2)。p53については解糖系の酵素を直接制御したり、GLUT4の発現を抑制して糖取り込みを制限したりすることで、解糖系を抑制することが報告されており⁴⁾、ゲニステインによるp53経路の調節が糖取り込み促進作用に関与している可能性が示唆された。

Table 1. Changes of mRNA expressions in L6 myotubes microarray analysis

Gene Symbol	Gene Name	Expression
<i>Abcb1a/Abcb1b</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A/B	↑
<i>Adipor2</i>	Adiponectin receptor 2	↑
<i>Pdk2</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	↑

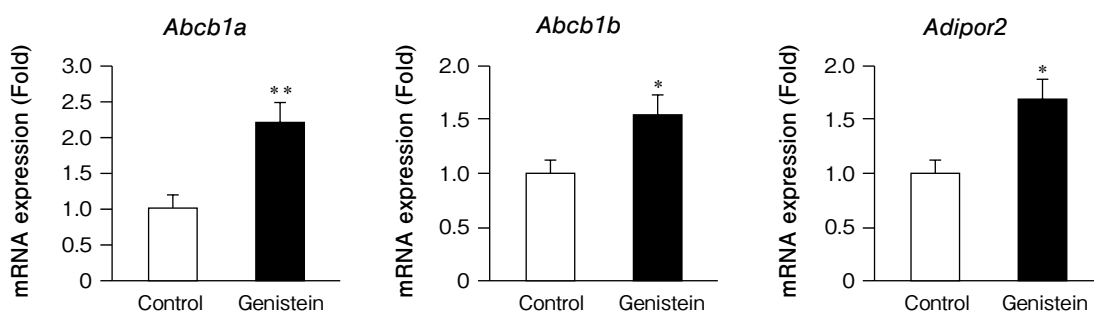


Fig. 1. Effect of genistein on mRNA expression of *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Adipor2* in L6 myotubes. L6 myotubes were cultured with or without genistein (50 μ M) for 4 hours. Relative mRNA expressions were determined by real-time RT-PCR. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 3 wells. Asterisks mean significant differences (** p <0.01, * p <0.05) evaluated by Student's *t*-test.

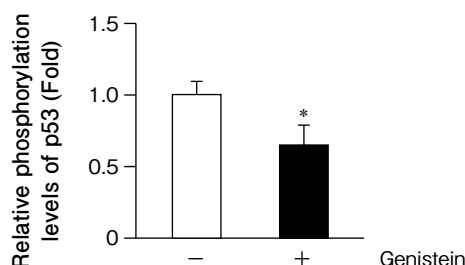


Fig. 2. Effect of genistein on the phosphorylation of p53 at Ser-15 in L6 myotubes. L6 myotubes were cultured with or without genistein (50 μ M) for 1 hour. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho p53 and anti-p53 antibodies. Relative phosphorylation levels of p53 were measured by densitometric analysis. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 3 wells. Asterisk means significant differences (* p <0.05) evaluated by Student's *t*-test.

トランスクリプトーム解析の結果から、ATPの消費や産生に関わる経路にゲニステインが影響を及ぼすことが示唆されたことから、ゲニステインが L6 筋管細胞の栄養要求性に与える影響を明らかにするため、栄養源としてグルコースを含まず、ピルビン酸を 2 mM または 0.4 mM のみ含む培地中にて 24 時間培養し、細胞の観察を行うとともに LDH 活性を測定した。その結果、2 mM のピルビン酸を含む培養液中では、細胞の形態や LDH 活性に影響は見られなかったが、4 時間で約 80% を消費する濃度である 0.4 mM のピルビン酸存在下では、ゲニステインにより細胞死が誘導され、LDH 活性の有意な上昇が認められた (Fig. 3)。このことから、ゲニステイン処理によりエネルギー消費が亢進する可能性が考えられた。そこで、エネルギー産生における解糖系への依存度の指標の一つである乳酸の生成量と、解糖系の下流にあり、電子伝達系により産生されるエネルギーの供給源になるピルビン酸の消費

量に対するゲニステインの影響について検討した。その結果、ゲニステイン処理により乳酸生成量が有意に増加した (Fig. 4A)。また、0.4 mM のピルビン酸存在下におけるピルビン酸消費量は、ゲニステイン処理によって有意に低下した (Fig. 4B)。これらのことから、ゲニステイン処理により、エネルギー産生における解糖系の寄与度が増大していることが示唆された。ゲニステインはエネルギー消費の亢進、およびミトコンドリアにおけるピルビン酸からの ATP 産生の抑制を介して細胞内 ATP 濃度の低下を引き起こし、AMP/ATP 比を高めることで AMPK を活性化し、GLUT4 の細胞膜移行を促進して糖取り込みを増大させるという機序が考えられた。なお、ゲニステインによる GLUT4 の細胞膜移行の促進作用はウエスタンブロット法により既に確認しているが、今回、Halo Tag-GLUT4 融合たん白質発現による可視化法でも確認している (data not shown)。

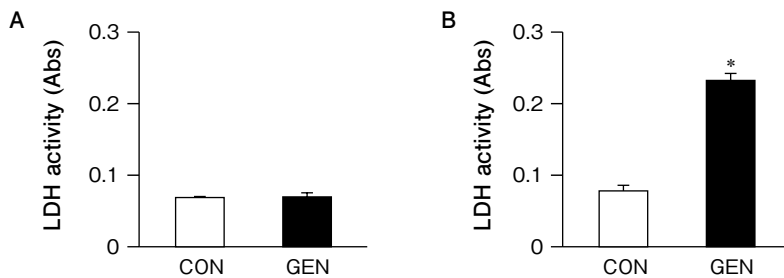


Fig. 3. Effect of genistein on LDH activity in L6 myotubes. L6 myotubes were cultured with or without genistein (50 μ M) in the presence of pyruvic acid (2 mM: A or 0.4 mM: B) for 24 hours in glucose-starved KHH buffer. LDH activity in the supernatant was measured. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 3 wells. Asterisk means significant differences (* p <0.01) evaluated by Student's t -test.

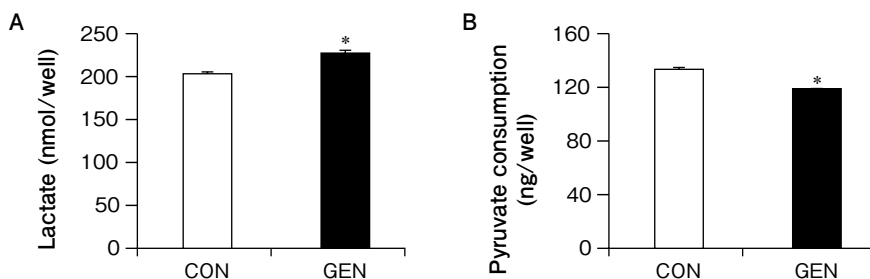


Fig. 4. Effect of genistein on lactate production and pyruvate consumption in L6 myotubes. (A) L6 myotubes were cultured with or without genistein (50 μ M) for 4 hours. The amount of lactate in the supernatant was determined. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 3 wells. (B) L6 myotubes were cultured with or without genistein (50 μ M) in the presence of pyruvic acid (0.4 mM) for 4 hours. The amount of pyruvate consumption in the supernatant was determined. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 6 wells. Asterisk means significant differences (* p <0.01) evaluated by Student's t -test.

2型糖尿病モデルである db/db マウスを用いた検討においては、ゲニステインの抗糖尿病作用を確認するとともに、ゲニステインは脂肪組織における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を見出している。筋肉組織におけるトランスクリプトーム解析により同定された発現変動遺伝子について、L6筋管細胞における解析と同様にグルコースを原料としたATP産生に関わる経路 (Glycolysis, Krebs-TCA_Cycle, Electron_Transport_Chain) に分類される遺伝子を検索した結果、ゲニステインを投与した群において*Ldhd* (Lactate dehydrogenase B) の発現が増加していることを見出した (data not shown)。LDH (乳酸デヒドロゲナーゼ) は解糖系の最終段階であるピルビン酸から乳酸への変換を触媒する酵素であることから、L6筋管細胞と同様に2型糖尿病モデルマウスの筋肉組織においてもゲニ

ステインによって解糖系の亢進が引き起こされ、糖代謝が促進されていることが示唆された。

L6筋管細胞を用いた細胞レベルおよび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によって、ゲニステインはエネルギーの産生や消費に関わる種々の遺伝子の発現を調節して、インスリン非依存的な糖取り込みに重要なAMPKシグナルを活性化させ、糖取り込みを促進すること、あるいは糖代謝を調節することが明らかとなった。

ゲニステインは抗糖尿病作用の他に、エストロゲン様作用を有することが知られ、抗骨粗鬆症作用や抗がん作用など様々な活性を持つことが多数報告されているが、本研究においては、ゲニステインの抗糖尿病作用の新たな作用機序の可能性が示された。更なる研究によって、多彩なゲニステインの作用のメカニズムの詳細が明らかになることが期待される。

要 約

ゲニステインの抗糖尿病作用の作用機序を明らかとするために、ラット由来L6筋肉細胞を用いて糖代謝および各種シグナル伝達経路に対するゲニステインの作用を解析した。DNAマイクロアレイ解析により、ゲニステイン処理でmRNA発現レベルが変動する遺伝子として 1,134 遺伝子を同定した。発現が増加した遺伝子には薬剤排泄に関わる*Abcb1a/Abcb1b*、アセチルCoA合成に関わる*Pdk2*およびAMPK活性化に関わる*Adipor2*が含まれていた。また、パスウェイ解析から、ゲニステインによりp53経路が調節されている可能性が示唆され、p53のリン酸化がゲニステイン処理によって減少することを見出した。エネルギー消費に対するゲニステインの効果を明らかにするため、乳酸生成、ピルビン酸消費および細胞外LDH活性について検討した。LDHの放出はエネルギー源が十分にある条件下ではゲニステインにより影響が見られなかったが、エネルギー源が欠乏した条件下ではゲニステインによってLDH放出が有意に亢進した。ゲニステイン処理によって乳酸生成の増大が認められたことから、エネルギー産生において解糖系への依存度が亢進していることが示唆された。また、ゲニステインはピルビン酸消費量を低下させたことから、TCA回路を抑制することが示唆された。これらの結果から、ゲニステインはATP消費の促進およびATP合成の抑制による細胞内ATPの減少を介して、AMP-GLUT4経路を活性化する可能性が示唆された。2型糖尿病モデルである*db/db*マウスの筋肉組織におけるDNAマイクロアレイ解析においては、ゲニステインの投与によって*Ldhb* (lactate dehydrogenase B) の発現が増加することが示された。このように、ゲニステインは様々な経路を通じて糖代謝を調節することが示唆された。

文 献

- 1) Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y and 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) Sarkadi B, Homolya L, Szakács G and Váradi A (2006): Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev*, **86**, 1179-1236.
- 3) Kadowaki T and Yamauchi T (2005): Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, **26**, 439-451.
- 4) Vousden KH and Ryan KM (2009): p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, **9**, 691-700.