



Title	ヒドロキシアミンの糖取り込み促進作用とその作用機構解析
Author(s)	木村, 太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11390号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11390
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55894
Type	doctoral thesis
File Information	Taro_Kimura.pdf



博士論文

ヒドロキシアミンの糖取り込み促進作用と
その作用機構解析

北海道大学大学院農学院 応用生物科学専攻

食資源科学講座 食品機能化学研究室

木村 太郎

(2014 年 3 月)

略号表

ATP	adenosine 5'-triphosphate
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA	ethylenediamine tetracetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized form
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEA	triethanolamine hydrochloride
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

目次

序論.....	4
実験項	11
結果・考察項	19
1. 最適な糖取り込みアッセイ条件の検討	20
1-1. 分化誘導条件の検討.....	21
1-2. 刺激時間の検討.....	22
1-3. 血清飢餓時間の検討.....	23
1-4. まとめ	23
2. ヒドロキシアミン関連化合物の糖取り込み促進作用の検討	25
2-1. ヒドロキシアミン関連化合物を用いた糖取り込みアッセイ.....	25
2-2. まとめ	25
3. HA の関わるシグナル経路の検討	27
3-1. L-cysteine による HA の糖取り込み促進活性の阻害の検討.....	27
3-2. Glutathione による HA の糖取り込み促進活性の阻害の検討	28
3-3. まとめ	30
4. HA の糖取り込み促進作用に関わるシグナル経路の解析.....	31
4-1. GLUT4 阻害剤を用いた糖取り込みアッセイ	33
4-2. HA の作用経路の確認	34
4-2-1. 阻害剤処理実験の条件検討	34
4-2-2. インスリン経路の阻害剤による糖取り込み促進作用の阻害効果.....	36
4-2-3. AMPK 経路の阻害剤による糖取り込み促進作用の阻害効果.....	37
4-3. インスリンシグナル経路に関わる因子の活性化の検出.....	38
4-3-1. Akt の活性化状態の検出	38
4-3-1. IRS1 の活性化状態の検出.....	39
4-4. まとめ	40

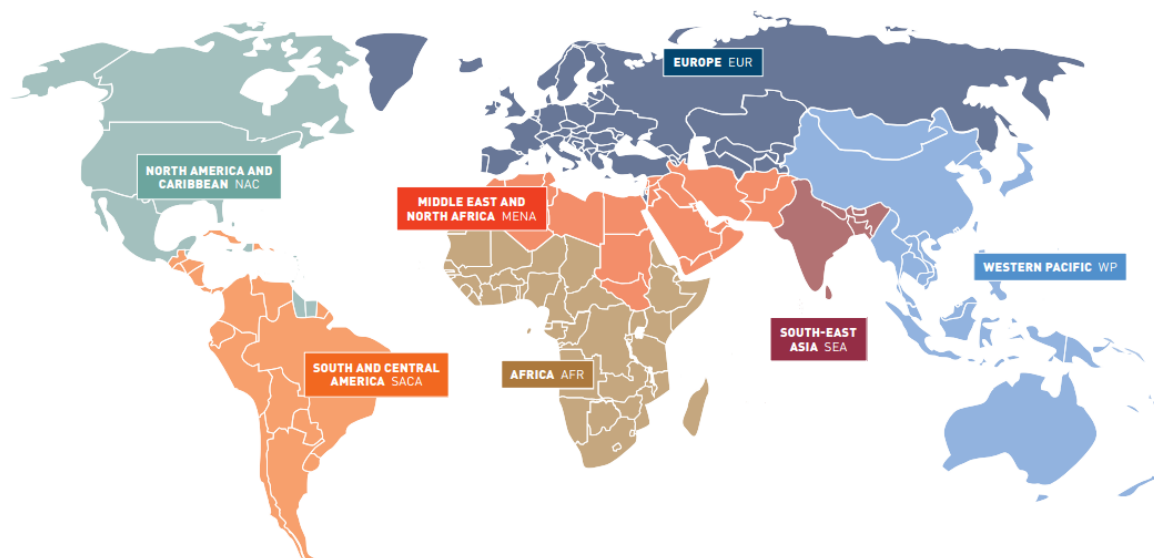
5. 考察.....	41
5-1. ヒドロキシアミンの構造と糖取り込み促進作用について	41
5-2. ヒドロキシアミンの作用機構について	42
5-3. 今後の展望	44
要約.....	45
Summary.....	46
参考文献.....	47
謝辞.....	53

序論

糖尿病は世界的に広がる疾病であり、患者数が年々増加している。¹ 世界の糖尿病有病者数は 2013 年現在で 3 億 8200 万人おり(有病率 8.3%)、治療や対策を施さなければ、2030 年までに 5 億 9200 万人に増加すると予測されている(Fig. 1)。また、2013 年の世界での糖尿病患者数の第 1 位は中国(9840 万人)、第 2 位のインド(6507 万人)、第 3 位の米国(2440 万人)をはじめ上位 7 ヶ国の順位は前年と同じだが、第 8 位にドイツ(755 万人)が新たに加わり、前年 9 位だった日本は 10 位へと後退している(Fig. 2)。その 80%は低中所得国の人で、従来存在した「豊かな先進国ほど糖尿病患者が多い」というイメージは過去のものとなっている。

このような世界規模で増加している糖尿病患者であるが、2013 年時点で日本の成人糖尿病人口も 720 万人にのぼり、2012 年の 710 万人から増加している。そしてこの増加傾向は今後も続くことが予測されており、深刻な状況であると言える。²

糖尿病はその発症機構によって、I 型糖尿病と II 型糖尿病の 2 つに分類される。I 型糖尿病は膵臓β細胞の破壊によるインスリン分泌不全が原因で起こる。その発症機構の詳細は明らかにされていないが、遺伝的な要因が強く関わっていることが示唆されており、後述する II 型糖尿病とは異なり肥満症状の有無に関わらず発症するのが特徴である。その発症時期は比較的若く、主に 10 代で発症することが多い。現在、I 型糖尿病の患者は欧州(12 万 9400 人)や北米(10 万 8600 人)で多く、2013 年に I 型糖尿病を発症した子供の数は 7 万 9,000 人以上にも上る。² I 型糖尿病の症状は、高血糖に伴うケトアシドーシスを発症することによる多飲、多尿、血圧低下、嘔吐、腹痛などがあり、治療には主にインスリン製剤が用いられている。他に、I 型糖尿病に特徴的な自己免疫疾患を抑えることにより膵臓β細胞の破壊を抑制し、インスリンの産生レベルを改善する薬剤候補 teplizumab の開発も米国で進んでいる。この薬剤は、診断されて間もない I 型糖尿病患者への新しい治療法としての応用が期待されている。³



IDF REGION	2013 MILLIONS	2035 MILLIONS	INCREASE %
Africa	19.8	41.4	109%
Middle East and North Africa	34.6	67.9	96%
South-East Asia	72.1	123	71%
South and Central America	24.1	38.5	60%
Western Pacific	138.2	201.8	46%
North America and Caribbean	36.7	50.4	37%
Europe	56.3	68.9	22%
World	381.8	591.9	55%

Fig. 1. IDF Regions and global projections of the number of people with diabetes (20-79 years), 2013 and 2035. (Source: the 6th Edition of the IDF Diabetes Atlas, 2013, p15)²

COUNTRY/ TERRITORY	2013 MILLIONS	COUNTRY/ TERRITORY	2035 MILLIONS
China	98.4	China	142.7
India	65.1	India	109.0
United States of America	24.4	United States of America	29.7
Brazil	11.9	Brazil	19.2
Russian Federation	10.9	Mexico	15.7
Mexico	8.7	Indonesia	14.1
Indonesia	8.5	Egypt	13.1
Germany	7.6	Pakistan	12.8
Egypt	7.5	Turkey	11.8
Japan	7.2	Russian Federation	11.2

Fig. 2. Top 10 countries/territories for number of people with diabetes (20-79 years), 2013 and 2035. (Source: the 6th Edition of the IDF Diabetes Atlas, 2013, p34, table 2.2)²

一方、Ⅱ型糖尿病はⅠ型とは発症機構が異なり、インスリン感受性の低下または膵臓β細胞からのインスリン分泌不全によって引き起こされる。世界の糖尿病患者の大半がⅡ型糖尿病であり、主な発症要因として過食、高脂肪食、運動不足等の生活習慣から引き起こされる肥満が考えられている。

肥満は体内でのインスリンの効果を低下させるインスリン抵抗性を誘発する。インスリン抵抗性を発症すると、血液中の糖分が細胞内に取り込まれ難くなるため高血糖状態が持続してしまう。この状態を改善するため、ヒトの体は膵臓β細胞からのインスリン分泌量を増加させ、血中インスリン濃度を高めることで糖の取り込みを促進させる。このような血中インスリン濃度が高い状態である高インスリン血症は、一定期間の間は血糖値を正常に保つために有効に作用するが、やがて膵臓β細胞の疲弊によってインスリンの分泌量が減少し、再び高血糖状態になることでⅡ型糖尿病が発症する。

このような機構により自覚症状が現れるまでの期間は個人差があるため、一概には何歳以上からとは言えないが、統計的にⅡ型糖尿病の発症時期は40歳以降の場合が多く、特に男性の場合は50歳以降、女性の場合は60歳以降で増加する傾向がある。Ⅰ型に比べて高齢で発症するⅡ型糖尿病であるが、近年の日本では生活習慣の乱れは若年にも当てはまり、高齢者のみならず若者でもⅡ型糖尿病になる傾向が見られる。その原因として、日本人は遺伝的にインスリン分泌が弱い人が多いという問題に、近年の食の欧米化にともなう過食、高脂肪食、運動不足等の生活習慣の乱れといった要因がある。

糖尿病が持つ危険性は高血糖状態が持続することが原因である。高血糖状態は、激しい喉の渇き、体のだるさ、多尿等の自覚症状のほかに、全身の血管に障害を与える。この血管障害の影響により、全身の各部位において異常が起こり、心疾患、⁴ 網膜症、⁵ 腎不全⁶ 等の合併症が引き起こされる。例えば、心臓や脳の太い血管の損傷により、心臓では狭心症と心筋梗塞、脳では脳卒中の危険性が高まる。これらの発症する確率は健常者と比較して糖尿病患者では3倍以上も高くなると報告されている。⁷ また、細い血管の損傷により、目では網膜

症が引き起こされ、症状が進行すると視界がかすむなどの自覚症状が現れる。この糖尿病性網膜症は、眼内血管新生が起こることが特徴である。眼内血管新生を担っているのは血管内皮細胞成長因子(VEGF)であるが、VEGFは白血球を誘導して網膜の血管透過性を亢進させる役目も担っている。すなわち、網膜症が悪化すると脆くなった血管から出血を起こしやすくなり、さらに症状の悪化により失明の危険性が高まる。また、網膜症と同様に細い血管の損傷により腎不全が引き起こされると考えられている。この症状において、メサンギウム基質が重要な因子であるとされている。メサンギウム細胞は腎糸球体を構成する細胞の一種であり、この細胞の周囲には基質が存在する。糖尿病性腎症において、その主な原因となるのはメサンギウム基質の増生および尿細管間質の線維化進展である。糖尿病性腎症が進行すると、浮腫、倦怠感、精神的不安定、掻痒感等の尿毒症症状が現れ、腎機能の低下や腎不全につながる。これらの糖尿病に関わる合併症の発症機構は徐々に明らかにされてきているが、まだ不明の部分も多い。

上記のように、糖尿病患者では高血糖状態が続くことにより合併症が引き起こされる可能性が高まることから、糖尿病治療においては血糖値の制御が重要となる。体内に存在する血糖値降下作用を持つ唯一のホルモンはインスリンであるが、糖尿病患者ではインスリンの分泌不全やインスリン感受性の低下によって、血中から体内に糖分が十分に取込まれない状態になっている。

インスリンは脂肪細胞や骨格筋細胞に対して作用し、細胞内への糖の取り込みを促進する作用を担っており、その作用機構も近年かなり明らかにされてきた。インスリンはインスリン受容体に作用することによってインスリン受容体をリン酸化し、そのリン酸化がきっかけとなり、下流の因子であるインスリン受容体基質 1 (IRS1) がリン酸化される。このリン酸化された IRS1 にホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) の調節サブユニットである p85 タンパク質が結合することで PI3K が活性化される。その後、細胞内でホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-三リン酸 (PIP3) の濃度が上昇し、プロテインキナーゼ B (Akt) が結

合する。PIP3 に結合した Akt はホスファチジルイノシトール依存性キナーゼ I (PK1) によりリン酸化されて活性型になる。この活性化された Akt が細胞膜を離れて種々のタンパク質を活性化する。最終的に細胞内小胞体に局在している GLUT4 が細胞膜上に移行する。この移行した GLUT4 を介して糖が細胞外から細胞内に取り込まれる。^{8,9}

これまでに血糖値の低下を促す薬剤が様々開発されてきた。インスリン製剤、 α -グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感受性改善薬、スルホニル尿素薬、ビグアナイド薬、DPP-4 阻害剤が例としてあげられる。それらの作用部位は様々で、小腸、肝臓、筋肉、脂肪組織がある。例えば、インスリン製剤は最もよく用いられる糖尿病治療薬であり、全身に作用することで血糖値降下に寄与する。また、食後の急激な血糖値の上昇を緩和する薬剤として α -グルコシダーゼ阻害薬がある。この薬剤はアカルボースやボグリボース、ミグリトールが代表例であり、小腸刷子縁膜上の α -グルコシダーゼを阻害することで単糖の生成を遅らせる。^{10,11} つまり、食後の急激な血糖値の上昇を抑えることで症状の悪化を防ぐ。また、インスリン感受性改善薬は特に脂肪組織に効果を発揮し、細胞内の転写因子である PPAR γ を活性化することによりインスリンに対する感受性を高める。チアゾリジンジオン誘導体であるトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンが代表的な例であるが、トログリタゾンはすでに重篤な肝障害の副作用のために販売が中止されている。次に、その利便性の高さからインスリン製剤とともに臨床によく用いられているスルホニル尿素薬¹²があり、その作用機構は次の通りである。スルホニル尿素薬は膵臓 β 細胞の細胞膜に存在する K_{ATP} チャンネルを閉鎖することで細胞内 K⁺の細胞外への流出を抑え、細胞膜電位の上昇による脱分極とその後の電位依存的な Ca²⁺チャンネルの開口を引き起こす。この細胞内の Ca²⁺の上昇がきっかけとなりインスリン分泌が促進されて血糖値が低下する。トルブタミド、グリクラジド、グリベンクラミドがその例としてあげられる。スルホニル尿素薬と同様に臨床の場でよく処方される薬剤であるビグアナイド薬は糖新生を抑制することにより肝臓から血中への糖放出量を減少さ

せる。この薬剤の代表例にはメトホルミンがある。¹³ 最後に、DPP-4 阻害剤は、インスリン分泌を促すホルモンとして知られるインクレチンを分解する DPP-4 の阻害によって、インスリン分泌の低下を抑制する。^{14,15} このほかに近年、腎臓からのグルコース排泄を促進する薬剤も開発されている。¹⁶

これらの薬剤は糖尿病治療に大きく貢献しているものの、副作用をとともう可能性がある。特に多い副作用が低血糖である。この症状はインスリンの分泌または作用を助長する薬剤に多く見られる。低血糖の症状が重い場合は意識を失うこともある危険な状態であるが、最近インスリンアナログ製剤であるデグレルデクがⅡ型糖尿病患者に対して低血糖の発現するリスクを低下させることが報告されている。^{17,18} 低血糖以外にも各薬剤に特徴的な副作用がいくつか存在する。例えば、スルホニル尿素薬では嫌氣的解糖系を介して乳酸が蓄積することによって、乳酸アシドーシスが引き起こされる。また、インスリン感受性改善薬の使用では心不全を起こす危険性がある。低血糖を引き起こさない α -グルコシダーゼ阻害剤でも腹部膨満、便秘、下痢などの消化器症状が起こりうる。以上のような既存の糖尿病治療薬に存在する副作用の危険と、世界的な糖尿病患者の増加という現状から、常に新たな薬剤が求められている。

骨格筋細胞は人の体において体内の約 50%を占める主要な細胞の一つであり、糖の代謝に関して、他の組織に比べて糖の消費と蓄積に大きく寄与していることが明らかにされている。¹⁹ さらに、健常者とⅡ型糖尿病患者におけるインスリンクランプ試験において、肝臓、脂肪、脳における糖代謝は両者に差はないのに対し、筋肉においてⅡ型糖尿病患者が健常者に比べ 35-40%程度も低下することが報告されている。²⁰ このように、体内で大きな体積を占め、糖尿病患者と健常者と大きく糖代謝に差がある筋肉に対する治療薬を開発することの意義は大きい。

細胞内への糖取り込み促進作用を介して骨格筋細胞での糖代謝を高める化合物のスクリーニング研究は数多く行われている。^{21,22} 例えば茶カテキンとして代表的なエピガロカテキンガレートは 1 nM という低濃度でも細胞内への糖取

り込みを増加させることが報告されている。²³ また、エピカテキンおよびカテキンの重合体からなる縮合型タンニンのうち低分子プロシアニジンを含む混合物において、糖代謝に対する有効性が報告されており、ブドウ種子由来のプロシアニジンは、ラットの骨格筋に対して AMPK を介した GLUT4 の膜移行促進によって、高フルクトース食により惹起されるインスリン抵抗性と高血糖を改善する。²⁴ これらの化合物の他に、著者の研究室においてラット骨格筋細胞由来の L6 細胞を用いた糖取り込み促進作用のスクリーニング研究によって、D-glucose と L-rhamnose から成る二糖である neohesperidose が顕著な活性を示すこと、²² および trehalose, isomaltose, gentioboise も同様の作用を持つことが見いだされている。²⁵

著者は骨格筋細胞に対して糖取り込み促進作用を示す化合物を調べる過程で、ヒドロキシアミン (HA) が活性を示すことを見出した。HA とその塩類は還元剤として一般的に用いられ、²⁶ 脂肪酸の酸化防止剤としての作用²⁷ を持つことに加え、マウスを用いた実験で HA の関連化合物に抗炎症作用や抗アレルギー作用があることが確かめられている。²⁸ さらに近年、HA が L929 繊維芽細胞に対してグルコーストランスポーター1 (GLUT1) を介して糖取り込み促進作用を発揮することも報告されている。²⁹ 本研究では HA および関連化合物について培養筋細胞への糖取り込み作用の試験を行った。また、HA についてその作用メカニズムの解析を行った。

実験項

1. 試薬および機器類

1-1. 試薬類

本研究で用いた試薬類は以下の通りである。ヒドロキシアミン塩酸塩（和光純薬工業(株)）、*Saccharomyces cerevisiae* 由来ヘキソキナーゼ（Sigma-Aldrich (株)）、*Leuconostoc mesenteroides* 由来グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDH）（和光純薬工業(株)）、*Clostridium kluyveri* 由来ジアフォラーゼ（オリエンタル酵母(株)）、その他の一般試薬は和光純薬工業(株)と Sigma-Aldrich (株)、東京化成(株)、関東化学(株)の市販品を用いた。水は超純水（Milli-Q Synthesis A10, 日本ミリポア(株)）を使用した。

また、ウエスタンブロッティングに用いる抗体としては、Rabbit monoclonal anti-insulin receptor substrate-1 (IRS1) antibody (59G8), phospho-IRS1 (Tyr1222) antibody, anti-Akt antibody, phospho-Akt (Ser473) antibody, Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody は Cell Signaling Technology の製品を、Anti-rabbit IgG-HRP は Santa Cruz technology の製品を用いた。抗体の希釈液には、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution（東洋紡(株)）を用いた。

1-2. 機器

本研究で用いた機器は以下の通りである。

マイクロプレート恒温器：MPI-100（イワキ(株)）

マイクロプレートリーダー：SYNERGY Mx（バイオテック(株)）

発光検出装置：LumiVision PRO 400EX（アイシン精機(株)）

CO₂ インキュベータ：MCO-18AC（パナソニック(株)）

クリーンベンチ：PCV (日立製作所(株))

遠心機：マイクロ冷却遠心機 3520 (久保田商事(株))

himac CS100GXL (日立製作所(株))

L8-80M Ultracentrifuge (ベックマンコールター(株))

電気泳動：パワーサプライ パワーパック HC (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株))

転写装置：トランスブロット SD セル (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株))

2. 細胞培養

2-1. 試薬

2-1-1. 血清入り DMEM 培地調製法

DMEM High Glucose 培地に対して FBS が 10%、あるいは DMEM Low Glucose 培地に対して Horse Serum (HS) 2%になるように調製し、冷蔵保存した。

2-1-2. リン酸緩衝液 (PBS) 調製法

10×D-PBS (-) 50 mL を水 450 mL に加え、オートクレーブ (121°C、15 分) によって滅菌した。4°C で冷蔵保存した。

2-1-3. トリプシン溶液の調製法

PBS 40 mL を 50 mL 遠沈管に量り、trypsin 40 mg, EDTA 4 mg を加えて溶解した。フィルター (0.20 µm) を用いてろ過滅菌したものを 4°C で冷蔵保存し

た。

2-1-4. 抗生物質ストック溶液の調製法

Streptomycin 100 mg, gentamycin 50 mg, penicillin 100,000 U を 2 mL の水に溶かした。フィルター滅菌 (0.20 μm) 後、冷凍保存した。使用時に融解して 500 μL を 500 mL の DMEM 培地に添加した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 筋細胞モデル、C2C12 細胞の培養法

マウス骨格筋由来の C2C12 細胞はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて、理研バイオリソースセンター (RIKEN BRC) から入手した。C2C12 細胞を 6 cm プレート (細胞継代用) または 12 well (western blotting 用) あるいは 48 well (糖取り込みアッセイ用) プレートで 37°C 10%CO₂ 存在下、10%FBS/DMEM 培地によって十分に培養し、セミコンフルエントに達した後に 2%HS/DMEM 培地へ交換することで分化を誘導した。その翌日および 2 日おきに 2%HS/DMEM 培地の交換を行い、7 日間または 8 日間の培養期間で分化を行った。顕微鏡下でほぼ全ての細胞が分化しているのを確認して各種試験に供した。

3. 糖取り込み促進作用の評価方法

3-1. 試薬

3-1-1. Krebs-Ringer phosphate-HEPES (KRPH) 緩衝液調製法

HEPES 4.7 g、リン酸二水素カリウム 680 mg、硫酸マグネシウム 246 mg、塩化カルシウム二水和物 146 mg、塩化ナトリウム 7.9 g、塩化カリウム 347 mg を水 1 L に溶解し、水酸化ナトリウムを用いて pH 7.4 とした。これをフィルター (0.20 μ m) 滅菌した後で冷蔵保存した(最終濃度 : 20 mM HEPES, 5 mM リン酸二水素カリウム, 1 mM 硫酸マグネシウム, 1 mM 塩化カルシウム, 136 mM 塩化ナトリウム, 4.7 mM 塩化カリウム)。

3-1-2. トリエタノールアミン (TEA) 緩衝液調製法

トリエタノールアミン (TEA) 塩酸塩 4.6 g、塩化カリウム 1.8 g、塩化マグネシウム七水和物 50 mg を水 500 mL に溶解し水酸化ナトリウムを用いて pH 8.1 とし冷蔵庫で保存した (最終濃度 : 50 mM TEA, 50 mM 塩化カリウム, 0.5 mM 塩化マグネシウム)

3-2. 実験方法

3-2-1. 糖取り込みアッセイ

アッセイは分化した C2C12 細胞を用い、インキュベーターはすべて 37°C , 10%CO₂ 条件下で行った。培地を無血清 DMEM 培地に交換し、1 時間インキュベーターすることにより血清飢餓処理を行った。目的濃度に希釈したサンプルを添加した無血清 DMEM 培地に交換した後、4 時間インキュベーターを行った。サンプルによる 4 時間刺激の後、KRPH 緩衝液で 2 回洗浄し、0.1 mM 2-deoxyglucose を含む KRPH 緩衝液で 30 分インキュベーターした。その後、再び KRPH 緩衝液で 2 回洗浄し、40 μ L の 0.1 M 水酸化ナトリウムを加えて細胞を溶解した。細胞溶解液を凍結融解し、85°C, 50 分間で乾燥した。乾燥後、40 μ L の 0.1 M 塩酸で中和した後、80 μ L の TEA 緩衝液 (pH 8.1) を加えた。

この細胞溶解液 50 μ L または 0~100 μ g/mL の 2-deoxyglucose 各 50 μ L とア

ッセイカクテル（終濃度：718 μ M ATP, 13.4 μ M NADP⁺, 25 μ M resazurin, 7.3 units/mL ヘキソキナーゼ, 19.5 units/mL G6PDH, 2.3 units/mL ジアフォラーゼ）50 μ l を 96 ウェルプレートで混合し 1 時間インキュベートした。その後、各ウェルの蛍光強度を測定した (λ_{ex} =530 nm, λ_{em} =590 nm)。

インスリン経路の阻害剤である LY294002 あるいは AMPK 経路の阻害剤である dorsomorphin を用いるアッセイの場合、上記のサンプル刺激の前に、阻害剤を作用させる場合はあらかじめ阻害剤を溶かした無血清 DMEM 培地に交換し、control や阻害剤を加えないポジティブコントロール（インスリンまたは AICAR）のみの刺激を行う場合は無血清 DMEM 培地に交換して 30 分プレインキュベートを行った。

4. リン酸化タンパク質の評価方法

4-1. 試薬

4-1-1. 3×Sample buffer の調製

SDS 0.9 g, BPB 1 mg を 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) 3.9 mL, glycerol 3.0 mL, β -mercaptoethanol 1.5 mL, 水 1.6 mL の混合液に溶解し冷蔵庫で保存した。(最終濃度：SDS 313 mM, BPB 0.14 mM, Tris-HCl 195 mM, glycerol 30%, β -mercaptoethanol 2.1 M)

4-1-2. 10×泳動 buffer (SDS-PAGE 用)の調製

Tris-HCl 30.28 g, glycine 144.13 g, SDS 10 g を水 800 mL に溶解し、6 M 塩酸で pH 8.3 に調整した後、水で 1 L に定容した。溶液は室温で保存した。(最終濃度：Tris-HCl glycine 1.92 M, glycine 4 M, SDS 34.7 mM)

4-1-3. PBS-Tween 20 (PBS-T)の調製

PBS 500 mL に Tween 20 を 500 μ L 加えた。溶液は室温で保存した。(最終濃度 : Tween 20 0.1%)

4-1-4. Cell lysis buffer の調製

終濃度が Tris-HCl pH7.5 50 mM, 塩化ナトリウム 150 mM, EDTA 2 mM, フッ化ナトリウム 4 mM, オキシバナジン (V) 酸ナトリウム 1 mM, PMSF 1 mM, TritonX-100 1.5%, ピロリン酸ナトリウム 2.5 mM になるように水に溶解した。その後、プロテアーゼ阻害剤 (complete mini, Roche Applied Science) を 10 mL あたり 1 タブレット加え溶解した。

4-2. 実験方法

4-2-1. Western blotting

測定には分化した C2C12 細胞を用い、氷上の部分以外のインキュベートは 37°C, 10%CO₂ 条件下で行った。培地を無血清 DMEM 培地に交換し、1 時間インキュベートし血清飢餓処理を行った。次に Akt とリン酸化 Akt の検出の場合は、あらかじめ 30 μ M LY294002 を含むものと含まない無血清 DMEM 培地で細胞を 30 分インキュベートし、その後 100 nM インスリンまたは 500 μ M HA を含む無血清 DMEM 培地で 1 時間インキュベートすることで刺激を行った。一方、IRS1 とリン酸化 IRS1 を検出する場合は、100 nM インスリンまたは 500 μ M HA を含む無血清 DMEM 培地で刺激を 1, 3, 15 分行った。いずれの場合も、インキュベート後、氷冷 PBS で細胞を 2 回洗浄し、cell lysis buffer を 200 μ L

加えて 5 分氷上で保存し、スクレイパーで細胞を剥がして細胞溶解液を回収した。その後、14,000 g, 10 分, 4°C で遠心分離を行った。上清を回収し、タンパク質濃度をバイオ・ラッドプロテインアッセイにより測定した。この時、スタンダードタンパク質として BSA を用いた。

タンパク質 10 µg を含む細胞溶解液を SDS-PAGE に供し、タンパク質を分離した。その後 PVDF メンブレン (GE ヘルスケア) にタンパク質の転写を行った。次に転写後のメンブレンを 0.5% BSA/PBS-T に室温で 1 時間浸した。その後、メンブレン上に一次抗体をのせて 4°C で一晩静置した (抗体希釈率; Akt 1:1000, phosphorylated Akt 1:1000, IRS1 1:1000, phosphorylated IRS1 1:3000)。一次抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡(株)) を用いた。続いて、メンブレンを PBS-T で 10 分洗浄することを 3 回繰り返した後、二次抗体をメンブレン上にのせ室温で 1 時間反応させた (抗体希釈率; リン酸化 IRS1 のみ 1:2000, その他 1:20000)。二次抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (東洋紡(株)) を用いた。その後、メンブレンを PBS-T で 10 分洗浄することを 3 回繰り返した。最後に、ECL Prime Western blotting detection reagents (GE ヘルスケア) を用いて発光検出を行った。

4-2-2. 活性化タンパク質の定量方法

画像解析ソフトとして Image J を用いた。目的のバンドを含むレーンを長方形に囲み、発光の輝度のスペクトルを表示後、一番スペクトルの低い部分の高さをバックグラウンドとみなし、それより高い部分の目的バンドのスペクトル部分の面積を定量した。目的のタンパク質について、コントロールでの[リン酸化タンパク質の発光強度] / [総タンパク質の発光強度]の比を 100%とし、コントロールの発光強度に対するサンプル刺激での比の%を算出することで、目的タンパク質の活性化上昇を定量した。

結果・考察項

1. 最適な糖取り込みアッセイ条件の検討

本研究で扱う細胞は、マウス骨格筋由来の C2C12 細胞である。骨格筋細胞は序論でも述べたように、我々の体の約 50%を占め、血糖の 8 割以上は骨格筋に取り込まれており、恒常性に重要な役目を担っていることから骨格筋由来の細胞を選択した。

また、本研究における糖取り込み促進作用とはインスリンと同様に細胞に直接働きかけ、糖の取り込みを開始させる作用と定義する。培養細胞を用いた糖取り込みの測定方法に関して、これまでに複数の評価系が開発されてきた。例えば 2-deoxyglucose (2DG) を用い、取り込まれた 2DG を酵素反応により、最終的に resazurin が変化した蛍光物質である resorufin の蛍光量を指標に測定する方法、³⁰ 蛍光分子をグルコースに結合した 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucose (2-NBDG) や放射性同位体標識した [³H]-2DG または [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxyglucose 等を用いて細胞内に取り込まれたアイソトープ量を測定する方法が存在する。³¹ これらの方法はどれも糖取り込みの量を測定するために有用であるが、放射性同位体元素を使用する方法では放射線障害防止法 (文部科学省) の厳しい施設基準を満たしていることが必要であり、2-NBDG は蛍光基を付けたことによる立体的な障害が懸念される。そこで、本研究では 2DG を細胞内に取り込ませ、resazurin を酵素反応により生成する方法を選択した。

Resazurin の蛍光量を指標にした 2DG を用いる過去の実験例では、骨格筋細胞としてラット骨格筋由来の L6 細胞を用いており、本研究のマウス骨格筋由来の C2C12 細胞とは異なる。そこで、はじめに、C2C12 細胞を用いた糖取り込みアッセイでの最適な条件を決定するため、分化誘導条件、細胞の刺激時間の検討を行った。糖取り込み促進作用物質としてはインスリンおよびそれとは異なるシグナル経路である AMPK シグナル経路の活性化物質である AICAR を用いた。AICAR は骨格筋由来の細胞株である L6 細胞や C2C12 細胞に対して有効な

AMPK の活性化剤としてよく用いられている。³² この AMPK の活性化にともない細胞内への糖取り込みが促進される。

1-1. 分化誘導条件の検討

マウスの骨格筋由来細胞 C2C12 は一般的に血清濃度の高い培地から低い培地に変えることで分化誘導が可能である。また、その時に、**tunicamycin** を作用させ小胞体ストレスを加えることで筋分化を促進する報告がある。³³ そこで、**tunicamycin** の処理の有無が分化の程度の向上に有効かどうかを確かめることとした。

血清濃度の低い培地である DMEM (+2% HS) を用いて 7 日間分化させた C2C12 細胞と、**tunicamycin** で一時間刺激して小胞体ストレスを加えたのち、DMEM (+2% HS) により 7 日間分化させた細胞を比較した。その結果、低血清濃度培地のみによる分化誘導法では細胞が分化している様子が確認できたが、**tunicamycin** を作用させた分化誘導法では分化にともなう形態変化を確認できなかった。したがって、本研究では小胞体ストレス負荷では分化誘導がみられないと判断した (Fig. 3)。

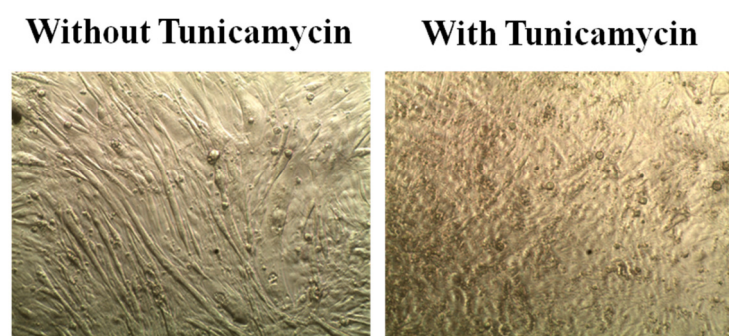


Fig. 3. Differentiation in the presence or absence of tunicamycin.

left figure : without tunicamycin

right figure : with tunicamycin

そこで、tunicamycin は用いず、通常の DMEM (+2% HS) による分化誘導処理を行うこととした。

1-2. 刺激時間の検討

次に糖取り込み促進作用を検出するためのサンプルによる刺激時間を検討した。

糖取り込み促進作用のポジティブコントロールであるインスリンで刺激を行い、その糖取り込み量から適切な刺激時間を判断することとした。その結果、1 時間刺激した場合に比べて 4 時間刺激した方が、コントロールに比べて糖取り込みが促進されることがわかった (Fig. 4)。そこで、以降の糖取り込みアッセイにおける細胞刺激時間は 4 時間で行うこととした。

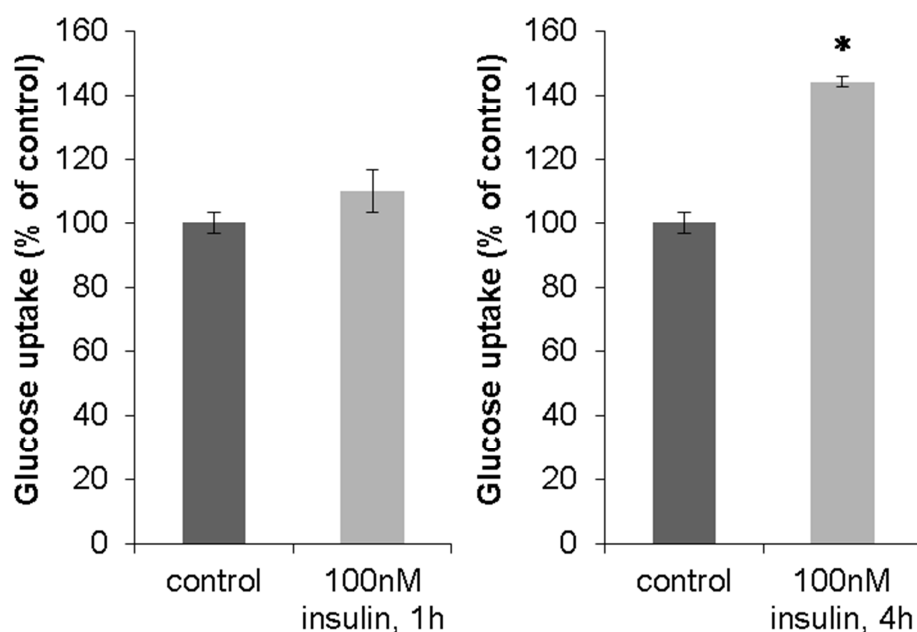


Fig. 4. Incubation time with insulin influences glucose uptake of C2C12 cells. Results are expressed as a percentage of controls in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $p < 0.05$ versus control.

1-3. 血清飢餓時間の検討

C2C12 細胞をインスリンと同じ時間 200 μ M AICAR を含む DMEM (+2% HS) で刺激したが糖取り込み促進作用が安定して検出できなかった。そこで、取り込みに影響を与える可能性のある要因を除くため、細胞周期に関わるシグナルの除去に有効な血清飢餓処理を行うこととし、その条件検討を行った。³⁴ また、AMPK 阻害剤である dorsomorphin の効果もあわせて検討した。

血清飢餓処理は分化誘導時に用いた DMEM (2% HS) 培地を血清無しの DMEM に培地交換することによって行った。これまでの糖取り込みアッセイの研究において血清飢餓処理の時間が複数試されている。^{32,35} 経時的に変化を検討したところ、血清飢餓処理時間が 3, 5, 18 時間では AICAR 刺激時の糖取り込み促進および AMPK の阻害剤である dorsomorphin による抑制量が安定しないのに対し、1 時間では糖の取り込み量が他の時間に比べて安定していた (Fig. 5)。そこで以降は血清飢餓処理時間を 1 時間にしてアッセイを行うこととした。

1-4. まとめ

糖取り込みのアッセイを行う上で活性が安定して測定できる条件を決定した。検討項目は細胞の分化促進方法、インスリンによる刺激時間、AICAR 処理前の血清飢餓処理時間の 3 つとした。C2C12 細胞の分化誘導の方法としては、単に培地を DMEM (+2% HS) に変えるだけで十分であり、その時に tunicamycin 処理を施すことはかえって分化を抑えることがわかった。また、刺激時間については 1 時間では不十分であり 4 時間で活性の十分な上昇が見られた。AMPK シグナル経路に関しては AICAR 刺激前の血清飢餓処理時間について、1, 3, 5, 18 時間のうち最も糖取り込み活性が安定していたのは 1 時間であった。

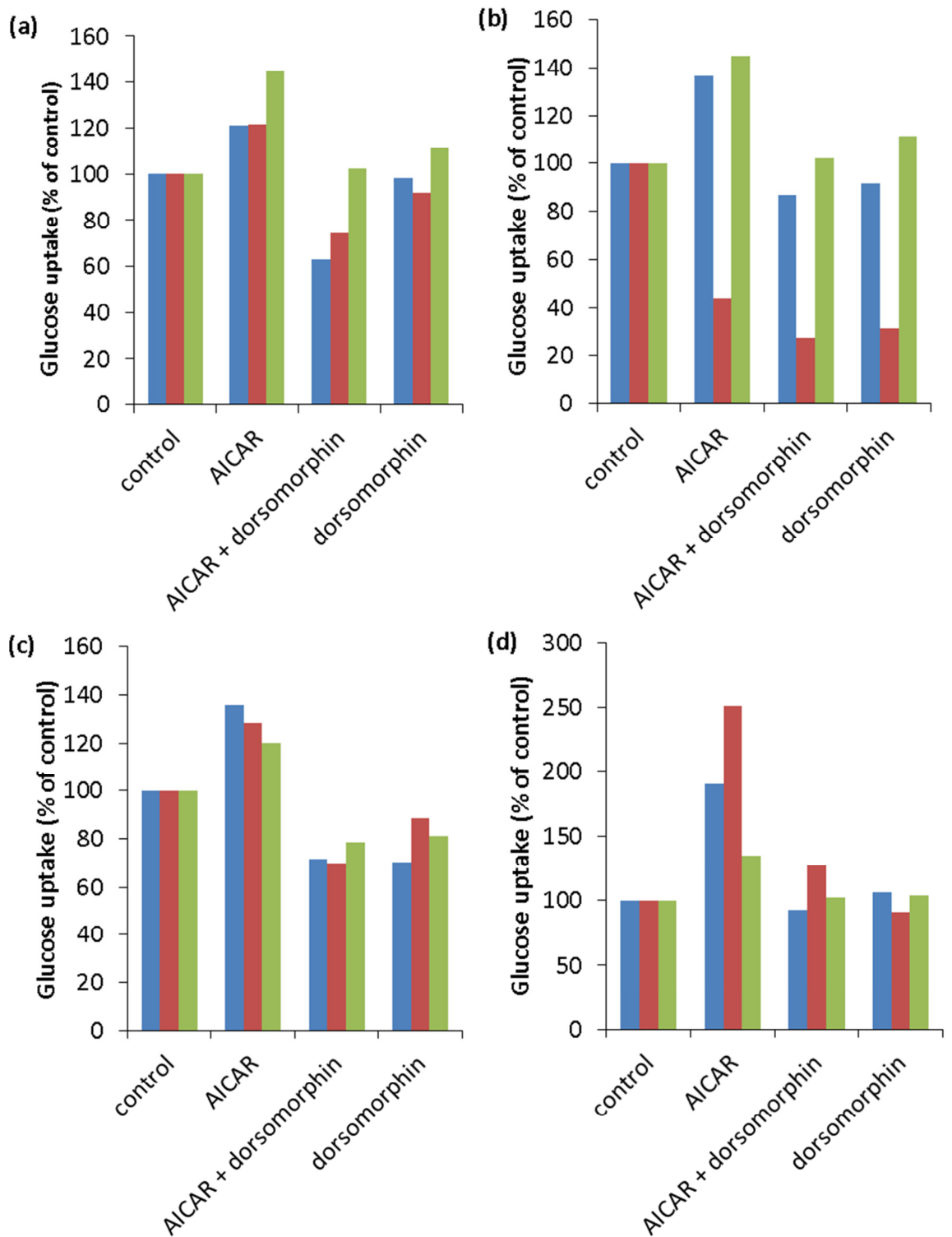


Fig. 5. Serum starvation affect glucose uptake time-dependent.

Each starvation time is (a : 1 h, b : 3 h, c : 5 h, d : 18 h). Concentrations of AMPK activator (AICAR) and AMPK inhibitor (dorsomorphin) are 200 μ M and 10 μ M. Each color bar indicates independent experiment result.

2. ヒドロキシアミン関連化合物の糖取り込み促進作用の検討

前項で C2C12 細胞を用いた糖取り込みアッセイの条件を決定したので、ヒドロキシアミンに関連する化合物をいくつか選び、その中でヒドロキシアミンよりもさらに糖取り込み促進作用の強い化合物を検索することとした。選んだ化合物は benzohydroxamic acid (BzA), *N*-methylhydroxylamine (*N*-MA), *N*-benzylhydroxylamine (*N*-BA), *O*-Benzylhydroxylamine (*O*-BA), Ammonium chloride (AC) の 5 つである。

2-1. ヒドロキシアミン関連化合物を用いた糖取り込みアッセイ

糖取り込みアッセイの結果、HA の窒素をメチル化した *N*-MA と酸素をベンジル化した *O*-BA では活性が見られなかったのに対し、酸素をベンゾイル化した BzA、窒素をベンジル化した *N*-BA、および AC ではわずかながら活性が見られた。しかし、これらはいずれも HA の活性には及ばなかった。HA は濃度依存的な活性の上昇を顕著に示すとともに、高濃度では最適濃度のインスリンよりも高い活性が見られた。(Fig. 6)。

2-2. まとめ

HA は 100 μ M ~1 mM の範囲で濃度依存的に糖取り込み促進作用を増大させることが示された。しかし、HA の構造を変えると、その活性が顕著に低下することもわかった。よって、HA の骨格を基本として糖取り込み促進作用を高めるような化合物を見出すことは困難であると予想された。また、本研究とアッセイ方法は異なるが、5 mM HA 刺激を 20 分加えることでコントロールと比べ約 4 倍の糖取り込み活性を示した報告もあることから、²⁹ 1 mM 以上の高濃度で HA 刺激を行えば、C2C12 細胞でさらに糖取り込み促進作用が上昇する可能

性も考えられる。

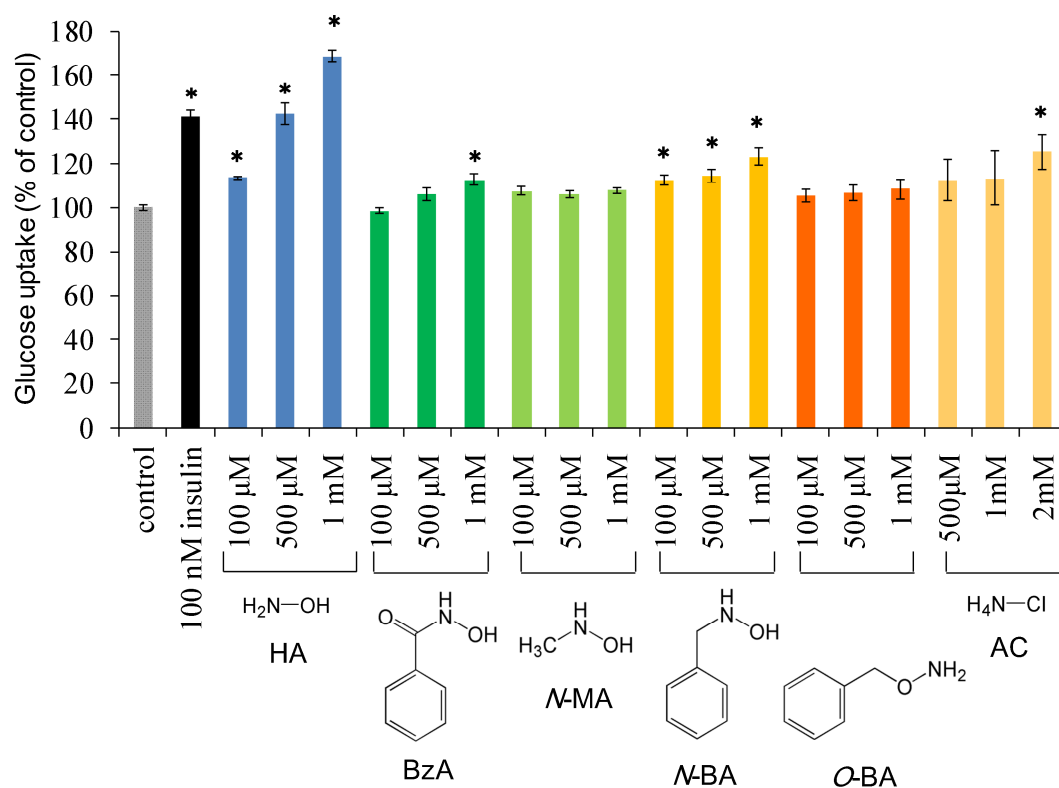


Fig. 6. Effect of selected compounds on glucose uptake by C2C12 myotubes. Structures of compounds; Hydroxylamine (HA), Benzohydroxamic acid (BzA), *N*-Methylhydroxylamine (*N*-MA), *N*-Benzylhydroxylamine (*N*-BA), *O*-Benzylhydroxylamine (*O*-BA), Ammonium chloride (AC) and glucose uptake following 4h treatment with insulin or each compound. Results are expressed as the fold change in glucose uptake normalized to control based on four independent assays performed. * $p < 0.05$ versus blank.

3. HA の関わるシグナル経路の検討

HA はマウス由来の線維芽細胞である L929 fibroblast 細胞に対して GLUT1 (glucose transporter 1)を活性化することで糖の取り込み作用を発揮し、この作用は細胞内で HA が変換された nitroxyl によって引き起こされると報告されている。³⁶ しかしながらこの例では、20 分程度の細胞刺激で糖取り込み作用が確認されているのに対し、本研究では 4 時間と比較的長時間の刺激を行って初めて糖取り込み作用が確認され、作用濃度に関しても前報 (5 mM) と比べて本研究では 500 μ M と 10 倍低い濃度で活性がみられているという違いがある。

一方、HA に関連した化合物として、ベンジルアミンとメチルアミンが糖取り込み促進作用を担う化合物として報告されている。この場合、これらのアミンは semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) や monoamine oxidase (MAO)の基質となり、酸化反応によって過酸化水素を発生する。この過酸化水素が IRS1 を活性化することにより、糖取り込み促進作用を発揮するとされている。^{37,38}

HA は本研究における骨格筋細胞を用いた系では、これまでに報告されている nitroxyl あるいは過酸化水素生成を介する系とは異なる作用経路で効果を発揮している可能性が考えられた。そこで、そのことを確認するために、nitroxyl および過酸化水素のスキャベンジャーを用いてこれらの活性酸素種の関与について検討した。

3-1. L-cysteine による HA の糖取り込み促進活性の阻害の検討

HA の糖取り込み促進作用が nitroxyl のスキャベンジャーとして働く L-cysteine^{36,39}によって阻害されるかどうかを確かめることにより、活性本体として nitroxyl が関与しているかどうかを判断することとした。その結果、L-cysteine によって HA の作用は阻害されなかった (Fig. 7)。この結果から、

骨格筋細胞に対する HA の糖取り込み促進作用には nitroxyl は関わっていないことが示唆された。

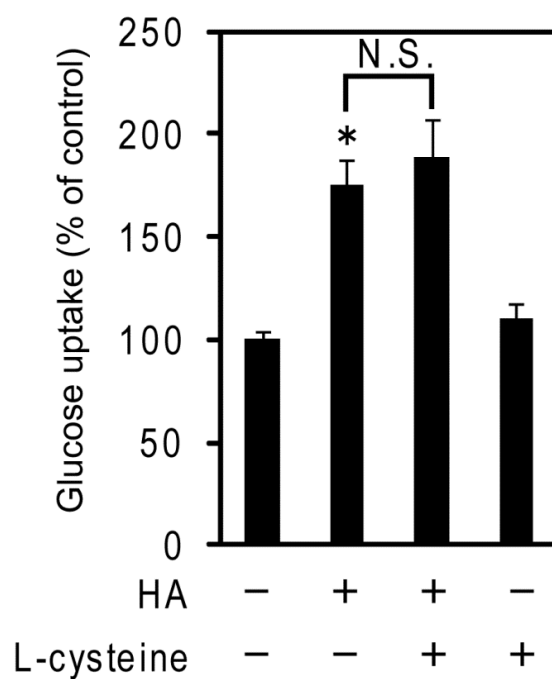


Fig. 7. Effect of L-cysteine on enhancement of glucose uptake by HA.

Differentiated C2C12 myotubes were treated with HA (500 μ M), L-cysteine (10 mM) or mixture of HA and L-cysteine for 4 h. Results are expressed as a percentage of controls in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $P < 0.05$ versus blank. N.S.: No significance.

3-2. Glutathione による HA の糖取り込み促進活性の阻害の検討

次に、過酸化水素を含む活性酸素種の捕捉剤である glutathione を加えることで、HA による糖取り込み促進が阻害されるかを確認した。その結果、HA 作用時に glutathione を添加しても HA 単独で刺激した場合と比較して糖取り込み促進作用の有意な減少が確認されなかった (Fig. 8)。

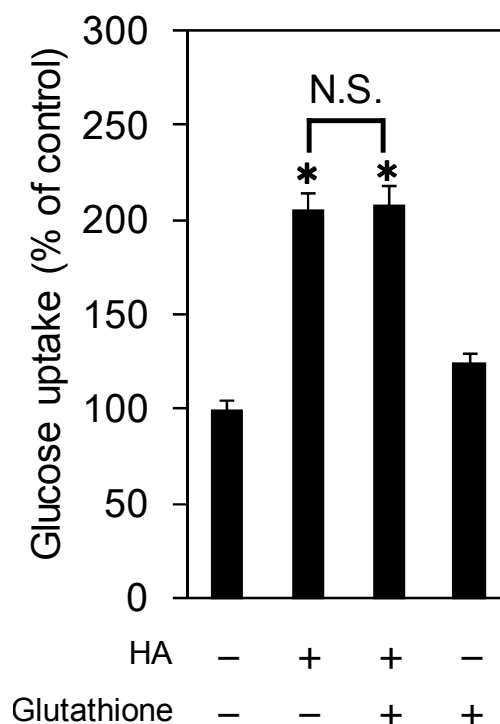


Fig. 8. Effect of glutathione on enhancement of glucose uptake by HA.

Differentiated C2C12 myotubes were treated with HA in the presence or absence of glutathione. HA 500 μ M, Glutathione 1 mM. Results are expressed as a percentage of controls in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $p < 0.05$ versus blank.

また、過酸化水素はインスリンと共存することにより相乗的に糖取り込み能が増大することが知られている。⁴⁰ しかしながら、インスリン単独で刺激した場合と、インスリンと HA の両方で刺激した場合で、糖取り込み量に有意な差は見られなかった (Fig. 9)。

これらの結果は HA の糖取り込み促進作用が過酸化水素によらないことを示唆している。つまり、これまでに糖取り込み促進作用が報告されているアミン関連化合物とは異なり、HA の作用は過酸化水素によるものではないことが示唆された。

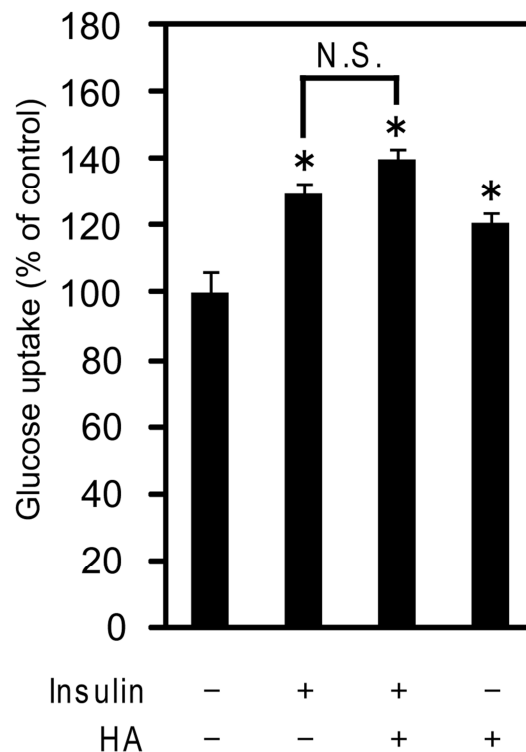


Fig. 9. Glucose uptake of C2C12 myotubes after stimulation with mixture of insulin and HA.

Differentiated C2C12 myotubes were treated with insulin, HA or mixture of insulin and HA for 4h. Results are expressed as a percentage of controls in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $p < 0.05$ versus blank. No significant difference was observed between [insulin] and [insulin + HA].

3-3. まとめ

HA が細胞内に取り込まれた後に何らかの低分子シグナル化合物を介して作用を及ぼしている可能性について検討したが、糖取り込み促進作用における HA の活性には nitroxyl や過酸化水素が関与していないことが示された。この結果を踏まえると、細胞膜表面の受容体や細胞内の因子に対して HA 自身が活性の本体として直接作用している可能性が考えられる。

4. HA の糖取り込み促進作用に関わるシグナル経路の解析

骨格筋細胞の糖取り込みを担う主要なグルコーストランスポーターは GLUT1 と GLUT4 である。⁴¹ § 3-1 において、HA の糖取り込み促進作用は GLUT1 の活性化因子として報告されている nitroxyl を介したものではないことが示されたので、GLUT1 を介した糖取り込みの可能性は低いと考えられた。そこで次にインスリン作用において活性化される GLUT4 に着目して作用機構を解析することとした。

骨格筋細胞で GLUT4 が関連する糖取り込みのシグナル経路には、インスリン受容体から始まるインスリンシグナル経路と AMPK シグナル経路がある。インスリンシグナル経路ではインスリン受容体に対してインスリンが作用することによってインスリン受容体がリン酸化され、そのシグナルが IRS1, PI3K, Akt に伝わり、細胞内の小胞体に局在している GLUT4 が細胞膜表面に移行する。この移行した GLUT4 を介して細胞外から細胞内へ糖が取り込まれる。一方、筋肉の収縮などで活性化される AMPK シグナル経路でも GLUT4 の膜移行を介して糖が取り込まれる (Fig. 10)。そこで、実際に GLUT4 が HA の糖取り込み促進作用に関与しているかを確認した後、インスリン経路、AMPK 経路の阻害剤を用いた糖取り込みアッセイを行うことで、HA がどちらの経路に関わっているかを確認することとした。

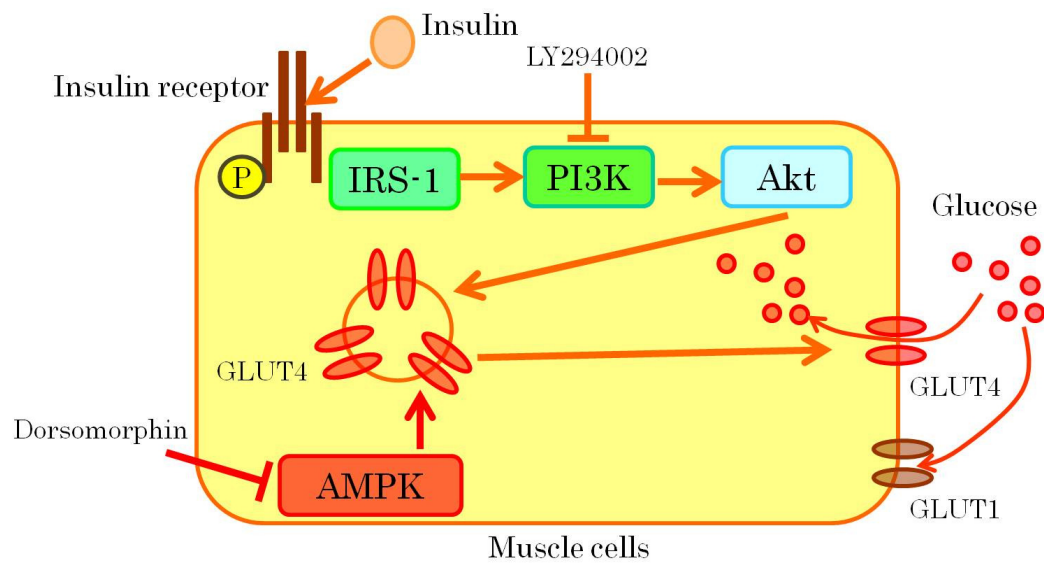


Fig. 10. Signaling pathway of glucose uptake in muscle cells.

(LY294002 : PI3K inhibitor, Dorsomorphin : AMPK inhibitor)

4-1. GLUT4 阻害剤を用いた糖取り込みアッセイ

HA の作用に GLUT4 が関わっているかどうかを確かめるために、グルコーストランスポーターを介した糖取り込みの阻害剤である cytochalasin B による活性の変化を調べた。⁴¹ Cytochalasin B 50 μ M 添加によってインスリンによる糖取り込み促進は完全に抑制された。同様に、HA による糖取り込み増大も有意に減少した (Fig. 11)。つまり、HA による糖取り込み促進作用にはインスリン作用と同様にグルコーストランスポーターが関わっていることがわかった。すでに GLUT1 が関わっている可能性は低いと考えられたため、HA は GLUT4 を介して細胞内への糖取り込み促進作用を担っていることが考えられた。

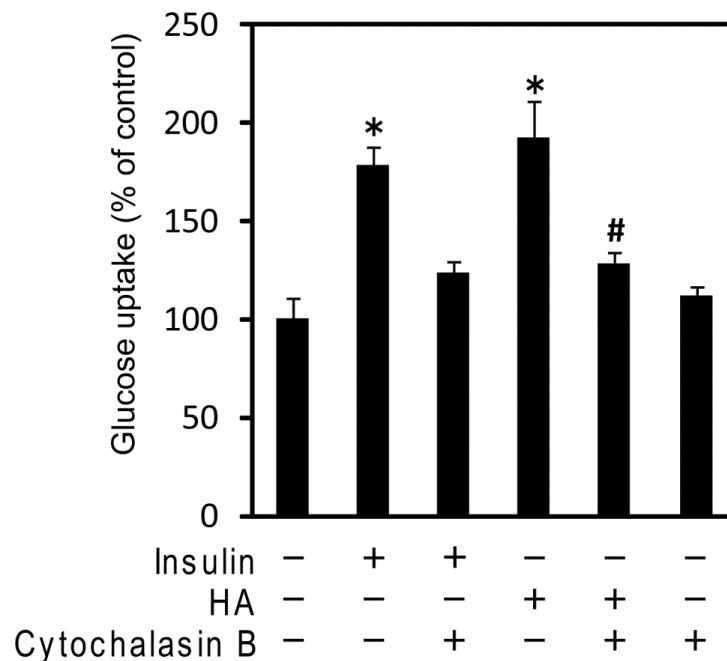


Fig. 11. Effect of HA inhibition on glucose uptake by using inhibitor of glucose transporter.

C2C12 myotubes were treated with 100 nM insulin or 500 μ M HA in the presence or absence of the 50 μ M cytochalasin B. Results are expressed as a percentage of controls in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * P < 0.05 versus blank, # P < 0.05 versus [HA].

4-2. HA の作用経路の確認

前項で HA の糖取り込み促進作用には GLUT4 が関わっていることが確かめられたので、続いて GLUT4 の活性化につながるインスリンシグナル経路および AMPK シグナル経路の阻害剤を用いることにより HA の糖取り込み促進作用が阻害されるかどうかについて検討を行うこととした。

4-2-1. 阻害剤処理実験の条件検討

実験に先立って、最適な阻害剤濃度、および阻害剤によるプレインキュベーションの有無の 2 つについて条件検討を行った。

まず、インスリンシグナル経路のポジティブコントロールとして 100 nM インスリン、阻害剤としてインスリンシグナル経路中の PI3K を阻害する LY294002 を用いた。まず、阻害剤によりあらかじめ 30 分プレインキュベーションを行った後、インスリンと LY294002 の両方で刺激を行う方法とプレインキュベーションを行わずにインスリンと LY294002 の両方で刺激を行う方法を比べた結果、阻害剤によるプレインキュベーションを行った方がインスリンのみでの活性の上昇および阻害剤添加による活性の低下が顕著に見られた。また、この場合の最適な阻害剤濃度は 30 μ M であった (Fig. 12a)。

次に、AMPK シグナル経路についても検討を行った。ポジティブコントロールとして 200 μ M AICAR、阻害剤として AMPK シグナル経路中の AMPK を阻害する dorsomorphin を用いた。インスリンシグナルの場合と同様に検討を行ったところ、プレインキュベーション有りでは阻害剤濃度は 5 μ M が適切と判断した (Fig. 12b)。

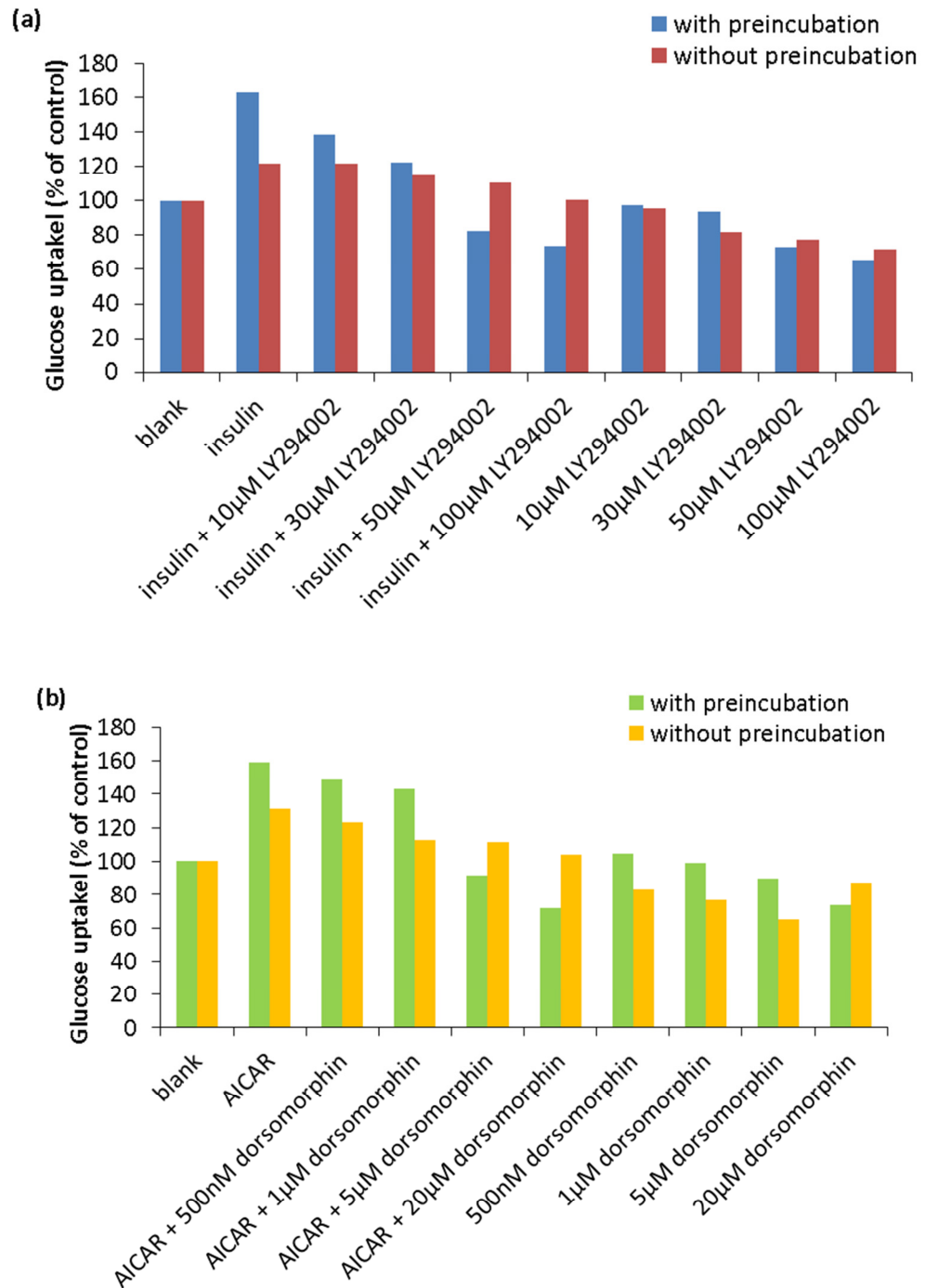


Fig. 12. Enhancement of glucose uptake effect in the presence or absence of preincubation with inhibitors (a : LY294002, b : dorsomorphin). Concentration of insulin is 100 nM, AICAR is 200 μM, HA is 500 μM.

4-2-2. インスリン経路の阻害剤による糖取り込み促進作用の阻害効果

阻害剤の添加条件が決まったので、HA の糖取り込み促進作用に関わる機構を明らかにすることとした。まず、HA がインスリンシグナル経路中の PI3K 活性化に対して作用するかどうかを確かめるために、PI3K 阻害剤 (LY294002) を糖取り込みアッセイに用いた。その結果、PI3K 阻害剤によって HA の糖取り込み促進作用が阻害されることが確かめられた (Fig. 13)。

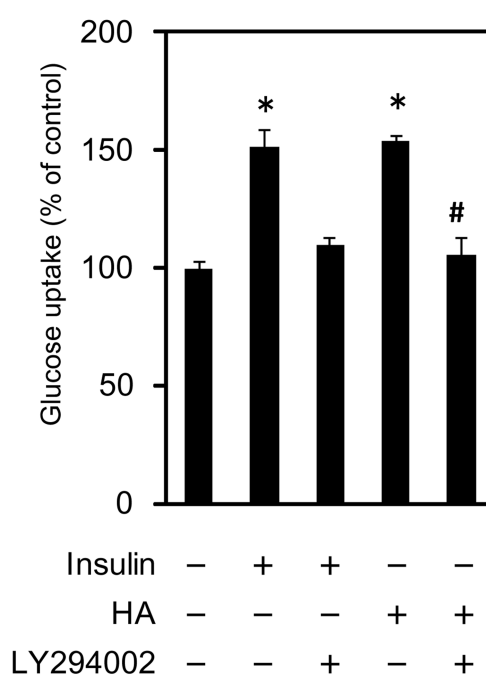


Fig. 13. Effect of HA inhibition on glucose uptake by using inhibitor of insulin signaling pathways.

C2C12 myotubes were treated for 4 h with 100 nM insulin, 500 μ M HA in the presence or absence of the cell signaling inhibitor LY294002. Result is expressed as a percentage of control in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $p < 0.05$ versus blank.

4-2-3. AMPK 経路の阻害剤による糖取り込み促進作用の阻害効果

次に、HA が AMPK シグナル経路に作用するかどうかを確かめるため、AMPK 阻害剤 (dorsomorphin) を用いて同様に糖取り込みアッセイを行ったが、AMPK 阻害剤による糖取り込み作用の減少は見られなかった (Fig. 14)。これらの結果から、HA の糖取り込み促進作用には AMPK シグナル経路ではなく、PI3K シグナル経路が関わっていることが示唆された。

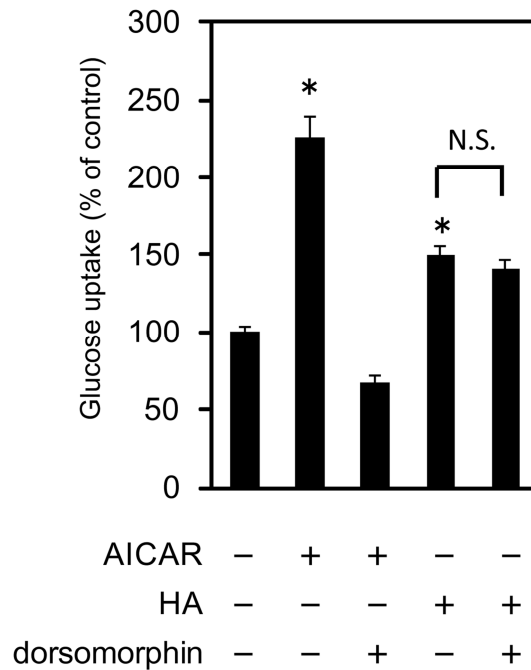


Fig. 14. Effect of HA inhibition on glucose uptake by using inhibitor of AMPK signaling pathways.

C2C12 myotubes were treated for 4 h with 200 μ M 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR; an analog of AMP that stimulates AMPK), or 500 μ M HA in the presence or absence of the cell signaling inhibitor dorsomorphin. Result is expressed as a percentage of control in glucose uptake normalized to control, as determined from four independent assays. * $p < 0.05$ versus blank.

4-3. インスリンシグナル経路に関わる因子の活性化の検出

§ 4-2-3 の結果から、HA による糖取り込み促進作用にはインスリンシグナル経路中の PI3K の活性化が関わっていることがわかった。そこで、次にインスリンシグナル経路に関わるタンパク質のリン酸化割合が上昇していることを確認することで、HA の作用機構をさらに明らかにすることとした。

標的タンパク質として、PI3K のすぐ下流でシグナルを伝達する Akt とその上流でインスリン受容体の活性化にともなってリン酸化される IRS1 を対象とした。

4-3-1. Akt の活性化状態の検出

HA の糖取り込み作用機構が PI3K の経路を介していることを確認するため、その下流の因子である Akt のリン酸化が HA によって増強するかどうかを確かめた。分化した C2C12 細胞を阻害剤の存在下または非存在下で 500 μ M の HA で刺激した結果、HA の刺激による Akt のリン酸化と、PI3K 阻害剤である LY294002 による作用の消失が確認された (Fig. 15)。この結果により、HA が PI3K の経路に関わることが再確認された。

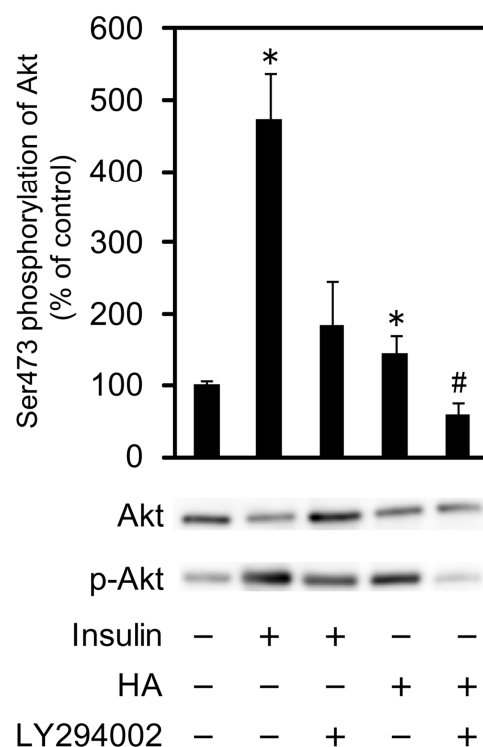


Fig. 15. HA induces phosphorylation of Akt.

C2C12 myotubes were treated with 100 nM insulin or 500 μ M HA in the presence or absence of the PI3K inhibitor LY294002. The results are representative of four independent assays.

4-3-1. IRS1 の活性化状態の検出

次に、PI3K の上流の因子として IRS1 の活性化について確かめた。Fig. 16 に示した時間 (1, 3, 15 分) で HA により刺激したところ、IRS1 は時間依存的に活性化され、3 分の刺激時間において有意な活性化が確認された。ゆえに、HA の糖取り込みに IRS1 のリン酸化が関わっていることが示唆された。

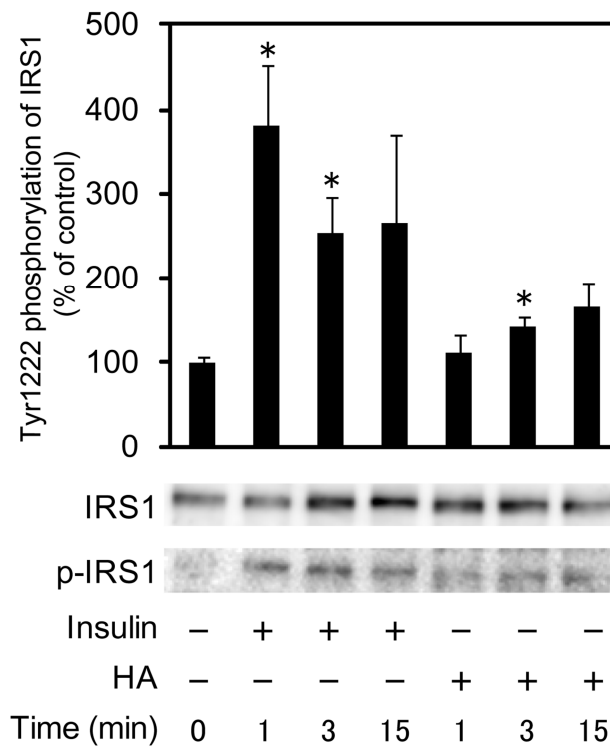


Fig. 16. HA induces phosphorylation of IRS-1.

C2C12 myotubes were treated with 100 nM insulin or 500 μ M HA for 0, 1, 3, or 15 min. The results are representative of four independent assays.

4-4. まとめ

§ 4-1 で cytochalasin B によって HA の糖取り込み促進作用が阻害されたことから、HA による糖取り込み促進作用にはグルコーストランスポーターが関わることは明らかである。また、§ 4-4 より、HA が IRS1 と Akt のリン酸化を促進することが明らかになった。以上より、HA はインスリンシグナル経路によって作用していることが明らかになった。

5. 考察

5-1. ヒドロキシアミンの構造と糖取り込み促進作用について

今回の研究で用いた HA を除くアミン関連化合物 (BzA, *N*-MA, *N*-BA, *O*-BA, AC) には糖取り込み活性がない、または非常に小さかった。このように構造的に似ているものの、その活性に大きな差がある原因の可能性として、化合物の細胞膜透過性が考えられる。アミン関連化合物の細胞膜透過性として HA による細胞膜の透過性に対する研究報告がなされている。その報告では、カエルの骨格筋細胞を用いた電位クランプ法により、HA のカチオンであるヒドロキシアンモニウムが Na⁺および Li⁺と同程度の 90%程の細胞膜透過性を持つのに対し、AC は 11%程度と低いことが報告されている。⁴² このように、HA と AC における構造的な違いはわずかであるが、膜透過性の差が大きいことが HA と AC の活性の差を高めている一つの要因である可能性がある。BzA, *N*-MA, *N*-BA, *O*-BA のようなアシルあるいはアルキル化誘導体は HA 自身より疎水性が上昇しているため、一般的には膜透過性の点で有利と考えられるが、このようなイオンチャネルによる輸送を考慮すればこれらの誘導体の活性の低さも説明可能である。

もし HA がインタクトなまま細胞内へ取り込まれて作用しているとすれば、何らかの小分子メディエーターに変換されて、それが HA の活性本体として働いている可能性が高い。しかしながら、§ 3-1 と § 3-2 により、HA がこれまでに報告のあるニトロキシルへ酸化されて作用している、あるいは酸化酵素により過酸化水素の生成を介して作用しているという可能性は否定された。これまでに、人の体内にモノアミンオキシダーゼ A (MAO-A) とモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) が存在し、MAO-A はセロトニン、エピネフリンを酸化、MAO-B はフェネチルアミンを酸化することがわかっている。細胞内の主な過酸化水素の発生源としても知られる MAO であるが、今回の結果から、HA は MAO-A と MAO-B のどちらとも反応しなかった可能性が考えられる。他の何らかのメディ

エーターを介して作用している可能性はあるものの、HA の生体内での反応やシグナル伝達解析の例が少なく、現段階で活性本体についての予測は困難である。

5-2. ヒドロキシアミンの作用機構について

HA が作用する経路については、§ 4-2 より Cytochalasin B により HA の糖取り込み促進作用が阻害され、PI3K 阻害剤の LY294002 により阻害された一方で、AMPK 阻害剤の dorsomorphin では HA の糖取り込み活性が阻害されなかった。さらに、§ 4-3 よりインスリンシグナル経路の因子である Akt と IRS1 の活性化が検出された。これらの結果から、HA が作用するのはインスリンシグナル経路であり、AMPK シグナル経路ではないことが明らかになった。

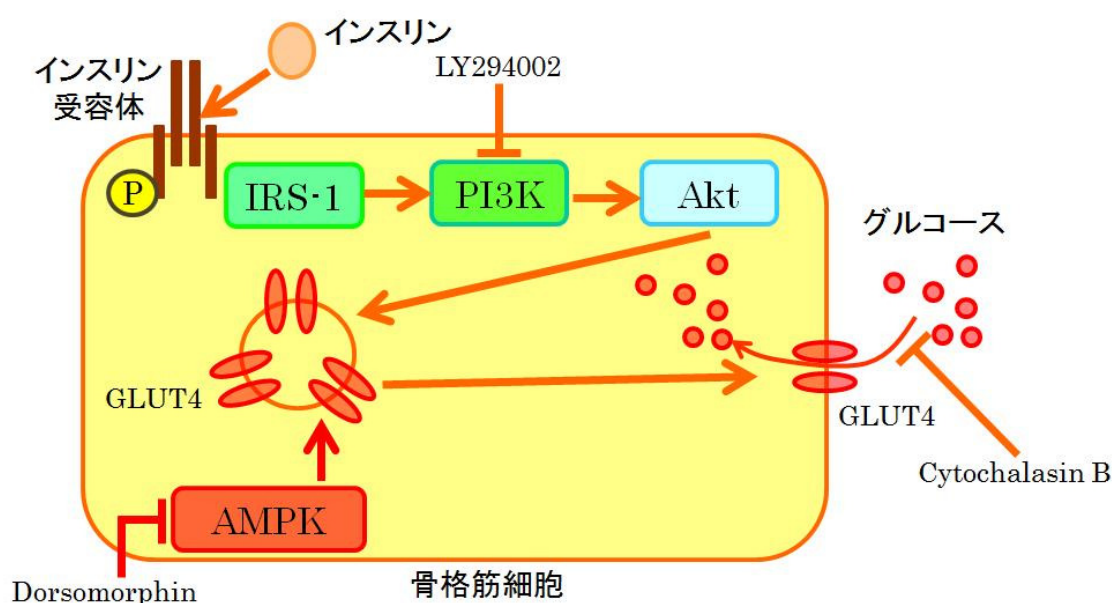


Fig. 17. Signaling pathway of glucose uptake in muscle cells.

(LY294002 : PI3K inhibitor, Dorsomorphin : AMPK inhibitor, Cytochalasin B : glucose transporter inhibitor)

インスリンシグナルが伝わる際に、IRS1 のチロシン残基のリン酸化が起こることがわかっているため、今回は IRS1 のリン酸化 Tyr1222 の検出を行った。

その経時的な変化がインスリン刺激の場合と HA では異なっていた。インスリン刺激の場合は刺激直後に IRS1 が活性化され、その後は多少減少するのに対し、HA 刺激の場合は 1 分～15 分まで経時的に IRS1 の活性が上昇する傾向が見られた。つまり、活性化される因子はインスリンと同様であるが、そのシグナル経路の活性化時間に関しては差があると言える。

続いて、Akt の活性化について、骨格筋における Akt の役割は重要であり、今回リン酸化検出の標的因子とした Akt の Ser473 がリン酸化されることで、細胞膜表面への GLUT4 移行量の増加が起こる。⁴³ さらに、Ⅱ型糖尿病患者では骨格筋細胞における Akt の活性化割合は健常者の 66%にまで低下している。⁴⁴ 今回、HA 刺激によって Akt の Ser473 の活性化が起こり、GLUT4 の細胞膜への移行が起こることによって糖取り込みの促進が起こったものと推察される。

IRS1 の上流の因子は限られているので、HA が作用する可能性としてインスリンのインスリン受容体への結合を考える。インスリンのインスリン受容体に対する結合様式については最近その詳細な機構が明らかになった。インスリンの L1 領域に存在する疎水性アミノ酸残基がインスリン受容体の α CT ラせん体に接触していると報告されている。⁴⁵ よって、HA がインスリンと同様に作用するのであれば、この α CT に結合すると考えられる。しかし、上記のように α CT には疎水性残基が結合しており、親水性の HA では異なる位置に結合する可能性もある。一方、IRS1 について、著者の知る限り IRS1 に直接作用することで活性化する化合物は存在しないので、HA の結合部位については考察が難しい。

本研究ではインスリンシグナル経路に関わる因子の活性化のみに着目したが、HA がインスリンシグナル伝達の活性化を抑制する因子と作用している可能性もある。活性化を抑制する機構がインスリンシグナルには存在する。その代表的な細胞内の因子は protein phosphatase 1B (PTP1B) である。この因子はチロシンリン酸化したインスリン受容体の脱リン酸化を促進する作用を持つことが既に報告されている。⁴⁶ すなわち、PTP1B の作用が強ければ、インスリンシグナル経路におけるインスリン受容体よりも下流の因子の活性化が抑制されて

ネガティブなフィードバックがかかることになる。このようなインスリンシグナルのネガティブなフィードバックに関わる因子について調べることによって、HA のより詳細な作用機構が明らかになると期待される。

5-3. 今後の展望

序論でも述べたように、HA は脂肪酸の酸化防止剤としての作用を持ち、HA 関連化合物には抗アレルギー作用と抗炎症作用が報告されている等、その有用性が期待できる。今回の研究では骨格筋細胞にのみ着目したが、脂肪細胞や他の組織への糖取り込み促進作用も期待できるかもしれない。一方で、毒性の指標である LD 値について、HA は 141 mg/kg であることが、ラットに対する経口投与の研究から明らかになっている。さらに、ヒトに対して眼、皮膚、気道を刺激するとの作用も報告されている。また、HA は反応過程において高温にすると爆発性を有する他、HA 自身による粘膜への刺激性により、その薬剤への応用が困難であるとも言える。しかし、ビグアナイド薬を作るために、生体に対する毒性の強いグアニジンが応用された例もあることから、HA の構造を工夫することにより糖尿病治療薬への応用が可能になるかもしれない。または、本研究における作用機構の解析により、HA の IGFR、IR または IRS1 への結合様式が明らかになれば、その作用機構を応用してこの因子に直接作用する抗糖尿病治療薬の開発につながることを期待される。ゆえに、単純な構造を持つ HA とその関連化合物は糖尿病治療における効果的な薬剤の開発に応用でき、今後の研究に期待したい。

要約

本論文では以下の 4 つのことを明らかにした。1 つ目として、マウス骨格筋由来の C2C12 細胞を用いた糖取り込みアッセイにより、HA が骨格筋細胞に対して糖取り込み促進作用を持つことを示した。また、2 つ目として、HA とその関連化合物についての糖取り込みアッセイにより、HA はその小さな分子全体が活性に重要であることを示した。3 つ目として、L-cysteine と glutathione を用いた糖取り込みアッセイにより、HA の活性は nitroxyl と過酸化水素を介さない独自の作用であることを明らかにした。最後に、PI3K の阻害剤である LY294002、AMPK の阻害剤である dorsomorphin、グルコーストランスポーターの阻害剤である cytochalasin B を用いた糖取り込みアッセイにより、HA の活性が椅子リンシグナル経路に関わることを示した。続くウェスタンブロッティング法での解析により、HA はインスリンシグナル経路内の Akt と IRS1 の活性化を介して糖取り込み促進作用を発揮することを明らかにした。

Summary

This thesis revealed four points about HA and its glucose uptake enhancement. First, by the glucose uptake assay using C2C12 cells, HA was shown to exhibit glucose uptake enhancement activity. Second, through the glucose uptake assay using HA and the derivatives, it was revealed that the whole structure of HA molecule plays an important role in its enhancement of glucose uptake. Third, the enhancement of glucose uptake by HA had no relation with nitroxyl or hydrogen peroxide, which can be mentioned from the glucose uptake assay employing L-cysteine and glutathione. And at last, based on the glucose uptake assay and western blotting analysis together with the use of LY294002 (PI3K inhibitor), dorsomorphin (AMPK inhibitor) or cytochalasin B (glucose transporter inhibitor), HA has been shown to induce its effect through the insulin signaling pathway by the activation of Akt and IRS1.

参考文献

- 1 Wong, E., Backholer, K., Gearon, E., Harding, J., Freak-Poli, R., Stevenson, C. & Peeters, A. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* (2013).
- 2 Arizmendi, A. *The 6th Edition of the IDF Diabetes Atlas*. 6th edn, (2013).
- 3 Herold, K. C., Gitelman, S. E., Ehlers, M. R., Gottlieb, P. A., Greenbaum, C. J., Hagopian, W., Boyle, K. D., Keyes-Elstein, L., Aggarwal, S., Phippard, D., Sayre, P. H., McNamara, J. & Bluestone, J. A. Teplizumab (Anti-CD3 mAb) Treatment preserves c-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes* **62**, 3766-3774 (2013).
- 4 Fox, C. S., Coady, S., Sorlie, P. D., Levy, D., Meigs, J. B., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W. F. & Savage, P. J. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA* **292**, 2495-2499 (2004).
- 5 Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C. & Holman, R. R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* **321**, 405-412 (2000).
- 6 Retnakaran, R., Cull, C. A., Thorne, K. I., Adler, A. I. & Holman, R. R. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes UK Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes* **55**, 1832-1839 (2006).
- 7 Fujishima, M., Kiyohara, Y., Kato, I., Ohmura, T., Iwamoto, H., Nakayama, K., Ohmori, S., & Yoshitake, T. Diabetes and cardiovascular disease in a prospective population survey in Japan: the Hisayama Study. *Diabetes* **45**, S14-S16 (1996).
- 8 Virkamäki, A., Ueki, K. & Kahn, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **103**, 931-943 (1999).

- 9 Rowland, A. F., Fazakerley, D. J. & James, D. E. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic* **12**, 672-681 (2011).
- 10 Matsuo, T., Odaka, H. & Ikeda, H. Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition* **55**, 314S-317S (1992).
- 11 Joubert, P., Foukaridis, G. & Bopape, M. Miglitol may have a blood glucose lowering effect unrelated to inhibition of alpha-glucosidase. *European Journal of Clinical Pharmacology* **31**, 723-724 (1987).
- 12 Müller, G., Satoh, Y. & Geisen, K. Extrapancreatic effects of sulfonylureas — a comparison between glimepiride and conventional sulfonylureas. *Diabetes Research and Clinical Practice* **28, Supplement**, S115-S137 (1995).
- 13 Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. & Moller, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 1167-1174 (2001).
- 14 Zerilli, T. & Pyon, E. Y. Sitagliptin phosphate: A DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Therapeutics* **29**, 2614-2634 (2007).
- 15 Krentz, A. J. & Bailey, C. J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* **65**, 385-411 (2005).
- 16 Kurosaki, E. & Ogasawara, H. Ipragliflozin and other sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: Preclinical and clinical data. *Pharmacology & therapeutics* **139**, 51-59 (2013).
- 17 Garber, A. J., King, A. B., Del Prato, S., Sreenan, S., Balci, M. K., Muñoz-Torres, M., Rosenstock, J., Endahl, L. A., Francisco, A. M. & Hollander, P. *et al.* Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 2 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 2): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial. *The Lancet* **379**,

- 1498-1507 (2012).
- 18 Heller, S., Buse, J., Fisher, M., Garg, S., Marre, M., Merker, L., Renard, E., Russell-Jones, D., Philotheou, A., Francisco, A. M., Pei, H. & Bode, B. Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial. *The Lancet* **379**, 1489-1497 (2012).
 - 19 Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., Arcangeli, M., Aoki, T., Sorensen, J. & Berger, M. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *Journal of Clinical Investigation* **81**, 1563 (1988).
 - 20 DeFronzo, R. A. The Triumvirate: β -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**, 667-687, doi:10.2337/diab.37.6.667 (1988).
 - 21 Martineau, L. C. Large enhancement of skeletal muscle cell glucose uptake and suppression of hepatocyte glucose-6-phosphatase activity by weak uncouplers of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1820**, 133-150 (2012).
 - 22 Yamasaki, K., Hishiki, R., Kato, E. & Kawabata, J. Screening and identification of disaccharides with insulin mimetic activity against L6 cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **76**, 841-842 (2012).
 - 23 Ueda, M., Nishiumi, S., Nagayasu, H., Fukuda, I., Yoshida, K. & Ashida, H. Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 286-290 (2008).
 - 24 Aramsri Meeprom, W. S., Sompong, W., Suwannaphet, W., Yibchok-anun, S., & Adisakwattana, S. Grape seed extract supplementation prevents high-fructose diet-induced insulin resistance in rats by improving insulin and adiponectin signalling pathways. *British Journal of Nutrition* **106**, 1173 (2011).

- 25 Yamasaki, K., Hishiki, R., Kato, E. & Kawabata, J. Study of kaempferol glycoside as an insulin mimic reveals glycogen to be the key active structure. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 17-21 (2011).
- 26 Patnaik, P. *Handbook of Inorganic Chemicals*. Vol. 28 (McGraw-Hill New York, (2003).
- 27 Trnka, J., Blaikie, F. H., Logan, A., Smith, R. A. & Murphy, M. P. Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine. *Free Radical Research* **43**, 4-12 (2008).
- 28 Kataoka, H., Horiyama, S., Yamaki, M., Oku, H., Ishiguro, K., Katagi, T., Takayama, M., Semma, M. & Ito, Y. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of hydroxylamine and related compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1436-1441 (2002).
- 29 Louters, L. L., Scripture, J. P., Kuipers, D. P., Gunnink, S. M., Kuiper, B. D., Alabi, O. D. Hydroxylamine acutely activates glucose uptake in L929 fibroblast cells. *Biochimie* **95**, 787-792 (2012).
- 30 Yamamoto, N., Sato, T., Kawasaki, K., Murosaki, S. & Yamamoto, Y. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. *Analytical Biochemistry* **351**, 139-145 (2006).
- 31 Yonemitsu, S., Nishimura, H., Shintani, M., Inoue, R., Yamamoto, Y., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., Inoue, G., Hayashi, T., & Nakao, K. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes* **50**, 1093-1101 (2001).
- 32 Williamson, D. L., Bolster, D. R., Kimball, S. R. & Jefferson, L. S. Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **291**, E80-E89 (2006).
- 33 Nakanishi, K., Dohmae, N. & Morishima, N. Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *The FASEB Journal* **21**, 2994-3003 (2007).

- 34 Moyers, J. S., Bilan, P. J., Reynet, C. & Kahn, C. R. Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23111-23116 (1996).
- 35 Cheng, Z., Pang, T., Gu, M., Gao, A. H., Xie, C. M., Li, J. Y., Nan, F. J., & Li, J. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1760**, 1682-1689 (2006).
- 36 Salie, M. J., Oram, D. S., Kuipers, D. P., Scripture, J. P., Chenge, J., MacDonald, G. J., & Louters, L. L. Nitroxyl (HNO) acutely activates the glucose uptake activity of GLUT1. *Biochimie* **94**, 864-869 (2012).
- 37 Morin, N., Lizcano, J. M., Fontana, E., Marti, L., Smih, F., Rouet, P., Prévot, D., Zorzano, A., Unzeta, M., & Carpené, C. Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates stimulate glucose transport and inhibit lipolysis in human adipocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **297**, 563-572 (2001).
- 38 Iglesias-Osma, M. C., Garcia-Barrado, M. J., Visentin, V., Pastor-Mansilla, M. F., Bour, S., Prévot, D., Valet, P., Moratinos, J., & Carpené, C. Benzylamine Exhibits insulin-like effects on glucose disposal, glucose transport, and fat cell lipolysis in rabbits and diabetic mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **309**, 1020-1028 (2004).
- 39 Irvine, J. C., Ritchie, R. H., Favaloro, J. L., Andrews, K. L., Widdop, R. E., & Kemp-Harper, B. K. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 601-608 (2008).
- 40 Musalmah, M, Rehanna, M, Wan, Z & Wan, N. Hydrogen peroxide stimulates glucose uptake in myotube cells via the insulin signaling pathway. *Sains Malaysiana* **39**, 315–320 (2010).
- 41 Ariga, M., Nedachi, T., Katagiri, H. & Kanzaki, M. Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in

- C2C12 myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 10208-10220 (2008).
- 42 Campbell, D. T. Ionic selectivity of the sodium channel of frog skeletal muscle. *The Journal of General Physiology* **67**, 295-307 (1976).
- 43 Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. & Roth, R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31372-31378 (1996).
- 44 Krook, A., Roth, R. A., Jiang, X. J., Zierath, J. R. & Wallberg-Henriksson, H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* **47**, 1281-1286 (1998).
- 45 Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K., Smith, B. J., Watson, C. J., Záková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W. & Lawrence, M. C. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* **493**, 241-245 (2013).
- 46 Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K. & Barford, D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**, 769-773 (2003).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、適切なご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学院 川端 潤 教授に深く感謝いたします。本論文の審査にあたり、副査を引き受けてくださいました同院 原 博 教授、加藤 英介 助教に深く感謝いたします。本研究の全般にわたり、熱心で適切かつ丁寧なご指導を賜りました川端 潤 教授に重ねて心より感謝申し上げます。細胞を扱う研究を行う場所を提供していただき、適切かつ丁寧なご指導を賜りました食品機能化学講座 園山 慶 准教授、研究全般にわたり熱心で細やかなご指導を賜りました加藤 英介 助教をはじめ、事務員の方々に御礼申し上げます。

学生生活を共にし、大変お世話になりました食品機能化学講座の後輩、先輩の皆さんをはじめ、多くの友人に心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、このように大変有意義で充実した学生生活を支えてくださった両親、祖父母に心から感謝いたします。

2014 年 3 月