

Pterosin B, ingredient in *Pteridium aquilinum* ,
regulates hepatic gluconeogenesis via
SIK3-dependent and independent mechanisms. [論
文要旨及び審査の要旨]

著者	Itoh Yumi
year	2017-03-21
その他のタイトル	ワラビPterosin Bの塩誘導性キナーゼ3依存性・非依存性肝糖新生制御メカニズムの解明に関する研究
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416乙第493号
URL	http://hdl.handle.net/10112/11305

[37]

氏名	伊東 祐美
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	博第 493 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Pterosin B, ingredient in <i>Pteridium aquilinum</i> , regulates hepatic gluconeogenesis via SIK3-dependent and independent mechanisms.
論文審査委員	主査教授 河原 秀久 副査教授 長岡 康夫 副査教授 吉田 宗弘

論文内容の要旨

近年、食生活の欧米化により糖尿病患者数は増加の一途を辿っており、その対策が急務となっている。糖尿病は心疾患や脳血管障害に繋がる恐れがあり、食習慣の改善で解決されない場合は、薬剤による血糖値のコントロールが必要となる。糖尿病に対する薬剤の選択肢は幅広いが、根本治療は達成できておらず、新たな作用機序に基づく血糖値制御因子の探索とその制御法の開発が望まれる。

肝臓における糖新生は、空腹時に糖を合成することで血糖値を高める役割があり、血糖値上昇要因の一つである。一方で、糖尿病患者では糖新生が恒常的に亢進しており、糖新生を阻害する薬剤は血糖値を低下させる。糖新生はグルカゴン-cyclic AMP (cAMP) シグナルにより制御されており、様々な酵素とその遺伝子の発現に関与する転写調節因子が関与する。それに関連する転写調節因子の代表として、cAMP-response element-binding protein (CREB) やその共役因子(CREB regulated transcription coactivator 2, CRTC2)が挙げられる。

塩誘導性キナーゼ (Salt Inducible Kinase, SIK) は CREB-CRTC2 を抑制するため、SIK の活性化剤が糖尿病に有効であると予想される。SIK には 3 つのアイソフォームがあり、これまでに、マウス肝臓の SIK1 タンパク質を欠損させると、血糖値が上昇することが明らかにされている。さらに SIK2 も糖代謝において抑制的に機能していることが報告されている。しかしながら、SIK3 の糖代謝における役割は未だ明らかにされていない。本研究では、SIK3 シグナル阻害剤を同定し、その阻害剤の SIK3 依存的・非依存的な肝糖新生制御メカニズムの解明を行った。

第 1 章：SIK3 遺伝子破壊マウスにおける SIK3 の糖新生における役割

SIK3 遺伝子破壊マウス (SIK3-KO マウス) を用いて、SIK3 の糖代謝への影響を検

討した。SIK3-KO マウスは痩せ型であり、極度な低血糖を示すことが明らかとなった。しかしながら、SIK3-KO マウスの肝臓における糖新生関連遺伝子の発現は有意に上昇していた。SIK3-KO マウスは痩せ型を示しているため、体内のエネルギー不足（空腹状態）により二次的に糖新生が亢進している可能性が示唆された。そこで、二次的影響を除外した条件下で SIK3 の糖新生における役割を確認するため、SIK3 による CRTC2 の遺伝子発現の抑制を阻害する化合物（SIK3 シグナル阻害剤）の探索・同定を行った。SIK3 シグナル阻害剤は、遺伝子の活性を発光強度として観測することが出来るレポーターアッセイシステムを利用して探索・同定した。その結果、ワラビ成分である Pterosin B が SIK3 シグナル阻害活性を示すことを判明し、その阻害によって糖新生関連酵素の遺伝子発現を上昇させることを示した。すなわち、肝臓では SIK3 シグナルを阻害すると血糖値上昇に繋がると示唆された。

第2章：SIK3 シグナル阻害剤 Pterosin B を用いた SIK3 依存的な肝糖新生制御メカニズムの解明

第1章において同定した SIK3 シグナル阻害剤 Pterosin B を用いて、SIK3 依存的な糖新生制御メカニズムの解明を行った。Pterosin B が SIK3 の直接阻害剤では無かったことから、Pterosin B の作用部位としての SIK3 の上流因子を探索した。その結果、Pterosin B はグリコーゲンの分解を刺激するキナーゼ Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma2 (PHKG2) の SIK3 への結合性を上昇させ、SIK3 抑制ドメインのリン酸化を亢進させることで SIK3 シグナルを阻害することが示唆された。以上の結果から、Pterosin B は PHKG2 を介して SIK3 を阻害し、肝臓における糖新生を亢進させることが示され、SIK3 が肝糖新生において重要な役割を果たすことが示唆された。

第3章：Pterosin B の SIK3 非依存的な肝糖新生制御メカニズムの解明

第2章において、Pterosin B は SIK3 を介して肝糖新生を亢進させることが示された。しかしながら、Pterosin B の類似体である Pterosin A は血糖値低下作用を有することが報告されている。そこで、生体レベルにおける Pterosin B の血糖値への影響を検討するため、糖尿病モデルマウスに Pterosin B を混餌した飼料を与えたところ、コントロール飼料群に比べて血糖値が低下しており、SIK3 阻害による糖新生亢進とは矛盾する結果となった。そこで、Pterosin B の糖新生における新たな役割の解明を行うことにした。単離したマウス初代肝細胞を用いて、糖新生を亢進させるホルスコリン（Forskolin, Fsk）存在下におけるグルコース産生実験を行った結果、Fsk により活性化した糖新生は、Pterosin B により抑制されることが示された。さらに、マウス肝臓由来の培養細胞を用いて、Fsk 依存的な糖新生関連遺伝子の発現亢進時における Pterosin B の影響を検討したところ、Pterosin B は糖新生の最終ステップ酵素 glucose-6-phosphatase (G6Pc) の発現を抑制することが示された。これは、*G6pc* のプロモーターにおける Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-steroid receptor coactivator 2 (ROR α -SRC2) 複合体の結合阻害に起因していることがレポーターアッセイにより明らかとなった。さらに、Pterosin B はミトコンドリア呼吸鎖の Coenzyme Q の酸化還元サイクルに異常をきたし、細胞内の ATP レベルを低下させることを示唆した。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害剤 Antimycin A も

Pterodin B と同様に、ROR α -SRC2 複合体を阻害して *G6pc* の遺伝子発現を抑制することが明らかとなり、ROR α -SRC2 複合体はミトコンドリア呼吸鎖の Coenzyme Q の酸化還元サイクル異常を感知して *G6pc* の発現を調節している可能性が示唆された。以上の結果から、Pterodin B は *G6pc* への ROR α -SRC2 複合体の結合を阻害して、糖新生の最終ステップ *G6Pc* の発現を抑制することで血糖値を低下させると結論した。

論文審査結果の要旨

近年、日本国内においても糖尿病疾患患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病の根本治療は達成できておらず、薬剤の新たな作用機序に基づく血糖値制御因子の探索とその制御法の開発が期待されてきた。論文提出者は、今回、空腹時の血糖値上昇要因の一つである肝臓における糖新生に着目し、塩誘導性キナーゼのアイソマーである SIK3 の遺伝子破壊マウスの糖新生関連酵素が上昇していることを見出した。SIK3 と糖新生との役割を証明するために、SIK3 シグナル阻害剤の探索を行った。ワラビのあく抜き時に出る汁に含まれている Pterodin B が同シグナル阻害剤であることを見出した。Pterodin B 添加によって、糖新生関連酵素が上昇した。この知見は、糖尿病予防薬の開発に新たな探索ターゲットとなる。さらにこの阻害は、SIK3 に直接的な阻害ではなく、その上流因子であるグリコーゲンの分解を刺激するキナーゼ Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma2 (PHKG2) の SIK3 の結合性を上昇し、SIK3 抑制ドメインのリン酸化を亢進させることで SIK3 シグナルを阻害することを見出した。この知見も新たな薬剤探索のターゲットになると考えられる。さらに糖尿病マウスを用いた実験において、Pterodin B は *G6pc* への ROR α -SRC2 複合体の結合を阻害して、糖新生の最終ステップ *G6Pc* の発現を抑制することで血糖値を低下させていることも明らかにした。今回の研究の知見は、新たな糖尿病予防のための薬剤の開発に道を開くものと期待される。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。