

杉山産業化学研究所 2021 年度研究助成成果報告書

「ミリスチン酸摂取による 2 型糖尿病リスク低減」

千葉大学大学院理学研究院化学研究部門 坂根郁夫

【緒言】

最近興味あることに、diacylglycerol kinase (DGK) [参考文献 1] の δ アイソザイムが 2 型糖尿病の増悪化の鍵酵素 (2 型糖尿病でその量が約半分に減少) であることが分かった [参考文献 2]。そして、最近、骨格筋細胞中での DGK δ 量を増加させる食品成分としてミリスチン酸 (MA (14:0), 0.1 mM 程度) を発見し [参考文献 3, 4]、更に、2 型糖尿病モデルマウス (Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY) マウス = 通常飼料でも血糖値が大幅に上昇) でも、MA 摂取がインスリン抵抗性を改善して他に類を見ない程強力に血糖値を下げ、且つ、体脂肪の蓄積を抑えることを見出した [参考文献 5]。一方、近縁のパルミチン酸 (16:0) やラウリン酸 (12:0) を含む他の脂肪酸ではそのような効果は認められなかった [参考文献 3, 4, 5]。

しかし、以前の実験は長期間 (20 週間) の MA 投与 (300 mg/kg, 一日おき) での血糖値の低下を観察していた [参考文献 5]。また、MA は遊離脂肪酸の形態での投与のみでトリアシルグリセロールの形態での実験は行っていない [参考文献 5]。そこで、本研究は、MA 投与期間を短くしても効果があるのか否か、また、トリアシルグリセロールの形態でも効果があるのか否かを調べた。加えて、糖を取り込む最大の臓器である骨格筋の細胞の量と密接に関連する β -チューブリン (マイクロチューブル) の量への MA の効果も検討した。更に、MA の特別性を担保する「脂肪酸 (MA) 特異的、細胞 (筋管細胞) 特異的、蛋白質 (DGK δ) 特異的安定化効果の発現 [参考文献 6] の分子機構」を明らかにすることを試みた。

【結果・考察】

(1) MA 投与の期間と形態の検討

以前の実験系 [参考文献 5] では、NSY マウス 4 週齢から MA を投与した。今回は血糖値が上昇し始める 16 週齢から投与を開始した。また、トリアシルグリセロールの形態での効果も検討した。

遊離脂肪酸の形態の MA の投与後 8 週間での効果を調べたところ、ブドウ糖負荷試験 (GTT) でコントロール (脂肪酸添加無し) に比べ、有意な血糖値低下効果が観察された。トリアシルグリセロールの形態でも (投与後 8 週間)、遊離脂肪酸の形態と同様の結果が得られた (論文発表はまだなのでデータ示さず)。以上から、MA の効果が比較的短期間 (8 週間) で現れること、また、MA が所謂油 (トリアシルグリセロール) の形態でも効果があることが分かり、ヒト介入試験に向けて良好な結果が得られた。

(2) MA の筋管細胞における β -チューブリン量への効果

(A) 細胞レベルでの解析： β -チューブリンは骨格筋細胞の体積当たり to 一定量存在していることや、エクササイズ (骨格筋量増大) によって増量することから、骨格筋細胞の量と密接に関連するが知られている。そこで、C2C12 筋管細胞における MA 投与 (0.1

mM, 分化開始後48時間処理)によるβ-チューブリン量の変化を調べたところ、約17%増加することが明らかになった(図1)[参考文献7]. β-アクチン(マイクロフィラメント)の量は変化しなかった

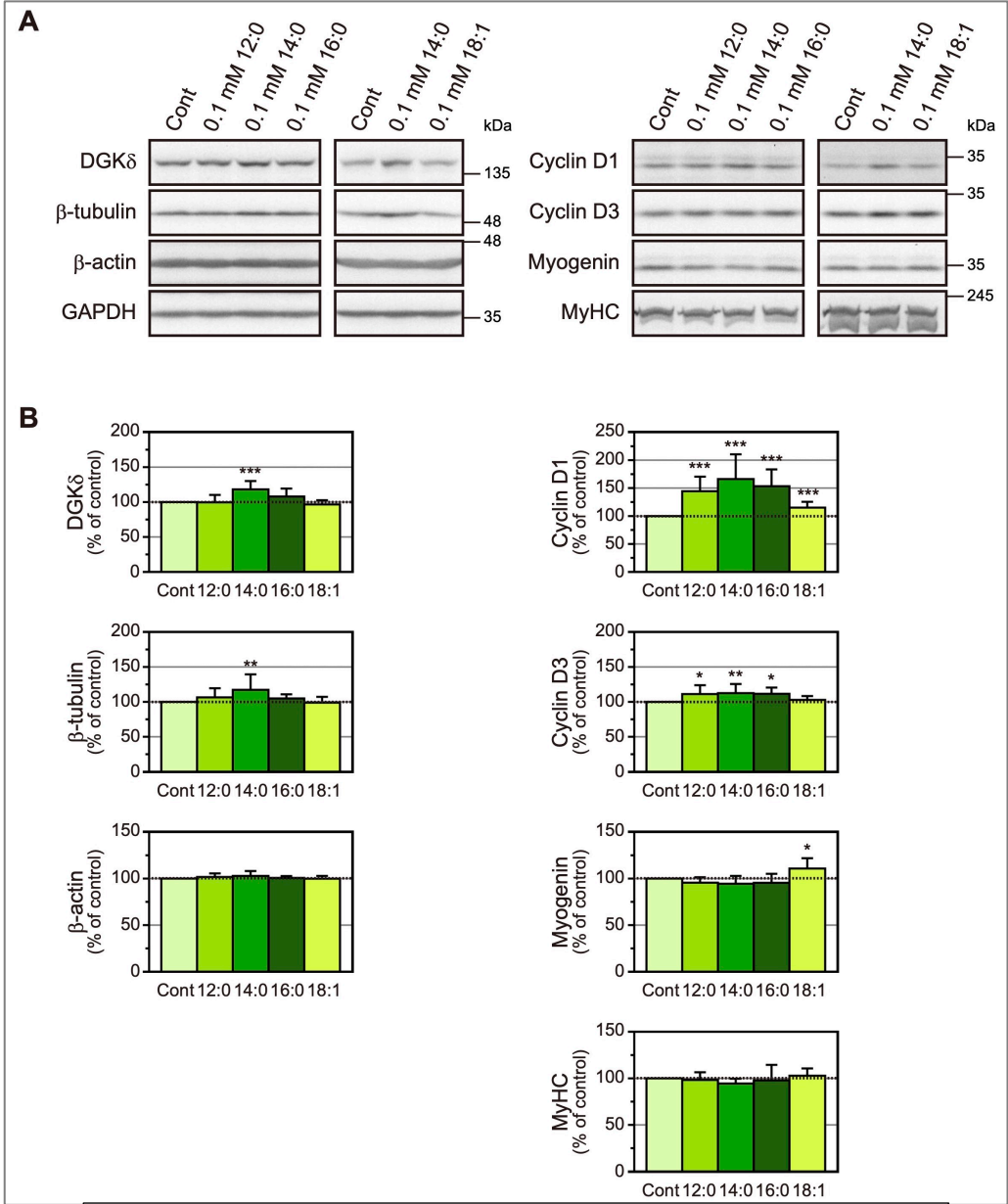


図1. 様々な脂肪酸のC2C12細胞のβ-チューブリン量等への影響

(図1). 一方,

他の脂肪酸(パルミチン酸, ラウリン酸, オレイン酸(18:1))ではそのような効果は観察されなかった(図1). また, siRNAを用いた実験から, MAによるβ-チューブリン量増加は, DGKδを介していることが強く示唆された[参考文献7]. 従って, MAは, β-チューブリン量の増加を介して骨格筋量の増加をもたらす可能性がある. 以上を論文化した[参考文献7].

(B) 個体レベルでの解析: 以上の様に, MAのβ-チューブリン量への細胞レベルでの結果は良好であったが, 個体レベルでも効果があるかは不明である. 現在, マウスモデル(骨格筋量が減少する老化モデルマウス: SAMP8)を使って, MA投与の骨格筋量への効果を検討中である.

(3) MAの脂肪酸特異的, 細胞特異的, 蛋白質特異的効果発現の分子機構の解析 (トランスクリプトーム・インタラクトーム解析)

マイクロアレイ解析 (トランスクリプトーム解析) を行った. コントロール (脂肪酸添加無しやパルミチン酸添加細胞) と比較して, MA添加細胞で幾つかのmRNA量が変動 (増大又は減少) していることが明らかになった. 即ち, 2倍以上増加したmRNAが13個, 1/2以下に減少したmRNAが5個同定された (論文発表はまだなのでデータ示さず). 今後, どのような情報伝達系が動いているかを, KEGG等のパスウェイデータベースを利用して検討する予定である.

インタラクトーム解析を行った. DGK δ との相互作用がMAで増強される蛋白質を免疫沈降法, 及び, ゲル電気泳動後の銀染色によって検出した. その様な蛋白質を含むゲル断片を切り出し質量分析を行い蛋白質を同定した. その結果, 蛋白質の安定化やユビキチン-プロテアソーム系に關与する蛋白質や糖代謝・脂質代謝に關与する蛋白質を中心に複数個同定された (論文発表はまだなのでデータ示さず). その内の6種の蛋白質をクローン化し, その性質 (DGK δ との相互作用, MAによる変動, 蛋白質の安定化, 糖代謝・脂質代謝の変動等) を現在解析中である.

【参考文献】

1. Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S. and Kanoh, H. Diacylglycerol kinases: Why so many of them? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 793–806 (2007)
2. Chibalin, A. V., Leng, Y., Vieira, E., Krook, A., Björnholm, M., Long, Y-C., Kotova, O., Zhong, Z., Sakane, F., Steiler, T., Nylén, C., Wang, J., Laakso, M., Topham, M. K., Gilbert, M., Wallberg-Henriksson, H. and Zierath, J. R. Down-regulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*, **132**, 375–386 (2008)
3. Sakiyama, S., Usuki, T., Sakai, H. and Sakane, F. Regulation of diacylglycerol kinase δ expression in C2C12 skeletal muscle cells by free fatty acids. *Lipids*, **49**, 633–640 (2014)
4. Wada, Y., Sakiyama, S., Sakai, H. and Sakane, F. Myristic acid enhances diacylglycerol kinase δ -dependent glucose uptake in myotubes. *Lipids*, **51**, 897–903 (2016)
5. Takato, T., Iwata, K., Murakami, C., Wada, Y. and Sakane, F. Chronic administration of myristic acid improves hyperglycaemia in the Nagoya-Shibata-Yasuda mouse model of congenital type 2 diabetes. *Diabetologia*, **60**, 2076–2083 (2017)
6. Iwata, K., Sakai, H., Takahashi, D. and Sakane, F. Myristic acid specifically stabilizes diacylglycerol kinase δ protein in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1864**, 1031–1038 (2019)
7. Sakai, H., Matsumoto, K., Urano, T. and Sakane, F. Myristic acid selectively augments β -tubulin levels in C2C12 myotubes via diacylglycerol kinase δ . *FEBS Open Bio*, **12**, 1788–1796 (2022)