

信州大学審査学位論文

エピガロカテキンガレートによる
インスリン誘導性転写因子遺伝子の発現調節

平成24年9月

浅野 公介

要旨

緑茶ポリフェノールであるカテキンには、(-)-epigallocatechin-3-gallete (EGCG)、(-)-epicatechin-3-gallete、(-)-epigallocatechin、(-)-epicatechin の 4 種類が存在する。これらのうち EGCG は最も生理活性が高く、*in vivo* および *in vitro* において、発ガン抑制、コラーゲン誘導関節炎、酸化ストレス誘導性神経変性病、肥満、そして 2 型糖尿病といった病態を改善する作用を有することが明らかにされている。

ラット enhancer of split- and hairy-related protein (SHARP) -1 および SHARP-2 は、basic helix-loop-helix 型転写因子であり、互いにホモおよびヘテロ 2 量体を形成し E box 配列に結合して標的遺伝子の転写を抑制する。現在までに、ラット肝においてインスリンが phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) 経路を介して SHARP-2 遺伝子の転写を促進すること、SHARP-2 を高発現することにより、糖新生系酵素遺伝子の phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 遺伝子の発現を低下させることが明らかにされている。したがって、SHARP-2 がインスリンによる血糖低下に関わる遺伝子である可能性が示されている。また、ラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞を EGCG 処理することにより、インスリンと同様の時間経過で SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することが報告されている。これに対して、SHARP-1 については、特に肝臓では、その遺伝子の発現調節メカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。しかし、最近、SHARP-1 mRNA もインスリンで誘導されることが明らかにされた。そこで、EGCG のようにインスリン以外の生理活性物質で SHARP-1 遺伝子の発現調節ができれば、血糖調節が可能となり、インスリン抵抗性・糖尿病などの病態の予防や改善に応用できる可能性が考えられる。

そこで本研究では、EGCG が SHARP-1 遺伝子の発現を誘導するかどうかを検討するとともに、そのメカニズムを解析することを目的とした。

初めに、インスリンと同様、EGCG でも SHARP-1 mRNA の発現が制御されているかを検討した。様々な濃度・時間で EGCG 処理した H4IIE 細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用い SHARP-1 mRNA の発現量を測定した。その結果、SHARP-1 mRNA 量は、EGCG により早期にかつ一過性に増加した。

次に、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導にどの細胞内シグナル伝達

経路が関与するかを検討した。H4IIE 細胞を、シグナル伝達酵素であるプロテインキナーゼやプロテインフォスファターゼに対する各種阻害剤で処理した。その結果、EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は、PI 3-K を阻害する LY294002、および protein kinase C (PKC) を阻害する staurosporine で部分的に抑制された。aPKC λ は、肝臓では PI 3-K の下流因子の一つと報告されている。そこでアデノウイルス感染系を用い、ドミナントネガティブ変異型 aPKC λ を過剰発現したところ、EGCG による SHARP-1 mRNA の増加が抑制された。さらにウエスタンブロット解析により、EGCG 処理により aPKC λ のリン酸化が早期にかつ一過性に増加することが判明した。

EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導は、PI 3-K や PKC の阻害剤、またドミナントネガティブ変異型 aPKC λ の感染では完全には阻害されなかったため、他のシグナル伝達経路の関与が示唆された。AMP-activated protein kinase (AMPK) の阻害剤である compound-C、もしくは転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の阻害剤である BAY11-7082 で処理したところ、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導が部分的に抑制された。さらに、これらの阻害は相加的効果であった。次に、AMPK の活性化剤である AICAR で H4IIE 細胞を処理したところ、SHARP-1 mRNA の発現量は濃度依存的に増加し、その経時的変化は EGCG 処理と同様であった。さらに LY294002、compound-C、および BAY11-7082 の 3 種で同時に処理した場合、その発現誘導は完全に阻害された。

次に、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導が転写レベル、もしくは転写後レベルで調節されているかを、RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D を用い検討した。その結果、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導は、部分的に抑制された。そこで、EGCG がラット SHARP-1 遺伝子のプロモーター活性を増加するかどうかについて、-1501 から -1 の領域を用いてルシフェラーゼリポーターアッセイを行ったが、検討した領域は EGCG 処理に応答しなかった。さらに、活性化型 NF- κ B p65 サブユニットがラット SHARP-1 遺伝子のプロモーター活性を刺激するかどうかを検討したところ、同領域には NF- κ B で正に応答する領域は存在しなかった。

以上の結果から、EGCG は、PI 3-K/aPKC λ 、AMPK、および NF- κ B の 3 つのシグナル伝達経路を介し、転写および転写後レベルの両方で、SHARP-1 遺伝子の発現を誘導すること、SHARP-1 遺伝子の -1501 から -1 の領域には、EGCG および NF- κ B に応答する転写調節領域は存在しないと結論づけた。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 材料および方法	6
2.1. 材料	6
2.2. 細胞および細胞培養	7
2.3. total RNA の調製およびリアルタイム PCR 解析	8
2.4. ウェスタンブロット解析	9
2.5. プラスミドの作製	10
2.6. DNA の一過的トランスフェクション およびルシフェラーゼリポーターアッセイ	11
2.7. 統計解析	12
3. 結果	13
3.1. EGCG による <i>SHARP-1</i> 遺伝子の発現誘導解析	13
3.2. EGCG による <i>SHARP-1</i> 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル 伝達経路の同定 (1) ~phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)/ atypical PKC	

lambda (αPKCλ) の関与～	15
3.3. EGCG による <i>SHARP-1</i> 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル 伝達経路の同定 (2) ～AMP-activated protein kinase (AMPK) および nuclear factor-kappa B (NF-κB) の関与～	21
3.4. EGCG による転写レベルでの <i>SHARP-1</i> mRNA の誘導	26
3.5. NF-κB による転写レベルでの <i>SHARP-1</i> mRNA の誘導	30
4. 考察	33
5. 文献	40
6. 謝辞	48

1. 序論

生活習慣病の発症には遺伝的な素因と環境要因が関与している。環境要因には食生活や運動習慣等が含まれる。これらのうち食生活の面では、高エネルギー食の過剰摂取による肥満からインスリン抵抗性が引き起こされ、さらに糖尿病・動脈硬化症などの生活習慣病の発症が惹起されるといわれている。この肥満や糖尿病発症をコントロールする鍵となるホルモンがインスリンである。

食品成分には様々な生理活性をもつものが知られている。近年、話題になっているものにポリフェノール類がある。これらは、一般に抗酸化活性を示すが、それ以外にも、健康長寿に関わる様々な活性を示すことが知られている。特に、赤ブドウの種皮に含まれるレスベラトロールは、フランス人が飽和脂肪酸を多量に摂取しているにも関わらず心血管疾患の発症率が低いという、いわゆるフレッチパラドックスを説明するものとして注目されている (1)。レスベラトロールは他の多くの種においても寿命延長活性を示すことが報告されている (2-4)。また、緑茶ポリフェノールであるカテキンも様々な生理活性を有することが知られている (5-7)。緑茶カテキンには、(-)-epigallocatechin-3-gallete (EGCG)、(-)-epicatechin-3-gallete、(-)-epigallocatechin、(-)-epicatechin の 4 種類が存在する

(5-7)。これらのうち EGCG (図1) は最も生理活性が高く、*in vivo* や *in vitro* において、発ガンの抑制や、コラーゲン誘導関節炎、酸化ストレス誘導性神経変性病、肥満、そして 2 型糖尿病といった病態を改善する活性を有することが知られている (5-7)。実際、EGCG は、*in vivo* および *in vitro* において、糖新生系酵素遺伝子の発現を抑制することが報告されている (7-9)。

一方、basic helix-loop-helix (bHLH) 型タンパク質は、細胞増殖、分化、代謝、ならびに発癌など様々な生命現象において重要な役割を果たしている (10)。ロイシンジッパーモチーフの有無にかかわらず、bHLH 型転写因子は、E box 配列 (5'-CANNTG-3') に結合して、遺伝子の転写を調節することが知られている (10)。

ラット enhancer of split- and hairy-related protein (SHARP) ファミリーは、SHARP-1 (SHARP1/ BHLHB3/ DEC2/ BHLHE 41 とも表記される) 、および SHARP-2 (SHARP2/ BHLHB2/ Eip1/ Stra13/ DEC1/ Clast5/ BHLHE 40 とも表記される) の 2 つの bHLH 型転写因子から構成されている (11)。これらのタンパク質は互いにホモ 2 量体およびヘテロ 2 量体を形成し、核に局在する転写抑制因子として機能する (11)。SHARP-1 および SHARP-2 遺伝子は普遍的に発現

しているが、その発現は、様々な刺激により、かつ細胞タイプ特異的に制御されている (12-14)。Yamada らは、肝臓の SHARP-2 mRNA 量が、正常ラットへの高炭水化物食の投与や糖尿病ラットへのインスリン投与により増加することを報告した (15)。また、SHARP-2 の過剰発現により糖新生系酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) mRNA 量が低下すること、および SHARP-2 発現ベクターのコトランスフェクションにより PEPCK 遺伝子のプロモーター活性が特異的に抑制されることも明らかにした (16)。したがって、SHARP-2 がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えられる。

EGCG がラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞において SHARP-2 mRNA 量を増加させると同時に、糖新生系酵素の PEPCK mRNA 量を減少させることが報告されている (16)。したがって、インスリン以外の生理活性物質により、SHARP-2 などのインスリン誘導性遺伝子の発現が誘導できれば、血糖調節が可能となり、インスリン抵抗性・糖尿病などの病態の予防や改善に至る可能性が考えられる。

一方、SHARP-2 に比して、SHARP-1 については、過剰発現により、筋肉や脂肪細胞への分化抑制が生ずることがそれぞれ報告されているが、他の組織、特に肝臓では、SHARP-1 遺伝子の発現調節メカニズムについてはほとんど明らかにされていない (17,18)。また、ごく最近、インスリンが H4IIE 細胞で SHARP-2 と同様に、SHARP-1 mRNA を誘導することが明らかとなった (高木ら、未発表)。この事実は、SHARP-1 もまた、血糖値調節に関わる重要な転写因子の一つであることを示唆している。

そこで本研究では、インスリンと同様、EGCG でも SHARP-1 mRNA が誘導されるのか、そしてどのようなシグナル伝達経路が関与するのか、さらにどのようなメカニズムで SHARP-1 mRNA の誘導が行われているのか、について検討した。

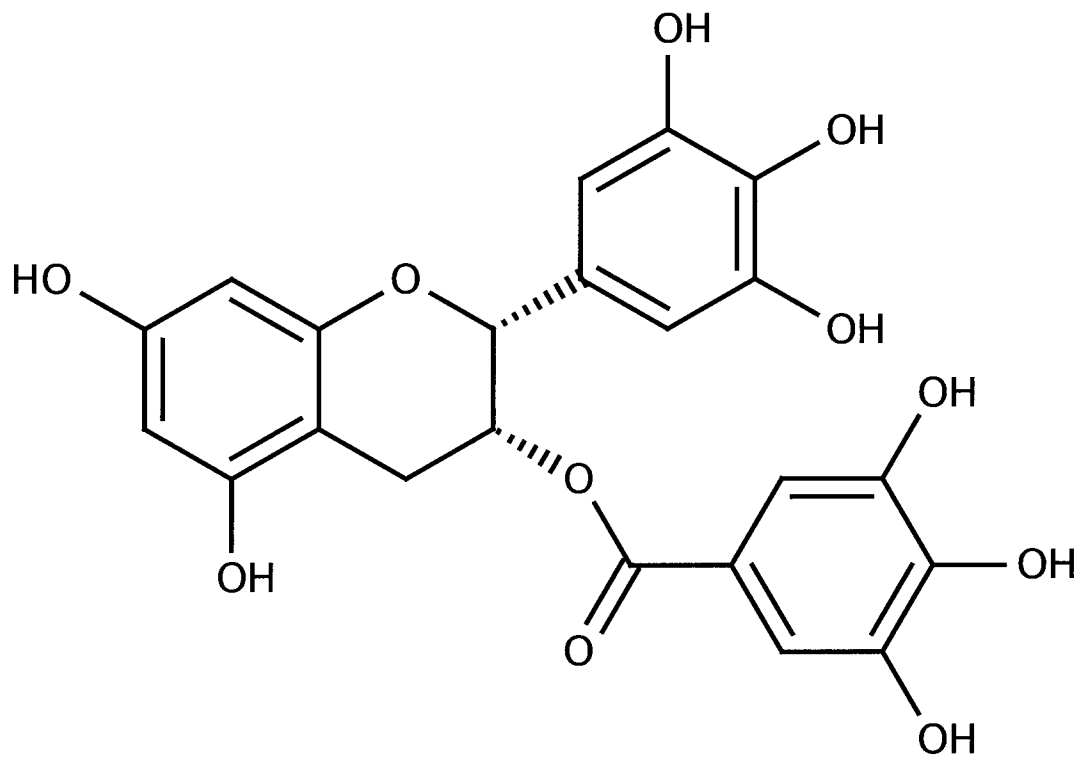


図 1. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の化学構造式

2. 材料および方法

2.1. 材料

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、EGCG、および LY294002 は Sigma Chemical Co. (Saint Louis, U.S.A.) から購入した。Staurosporine、rapamycin、JNK inhibitor II、PD98059、okadaic acid、wortmannin、5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR)、compound-C、BAY11-7082、および actinomycin D は、Merck chemicals (Darmstadt, Germany) から購入した。Adeno-X rapid titer kit は、Clontech (Palo Alto, U.S.A.) から購入した。TRIzol reagent は、Invitrogen (Groningen, the Netherlands) から購入した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit は Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan) から購入した。FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)、GC-RICH PCR System、および GenoPure Plasmid Maxi kit は Roche Diagnostics (Indianapolis, U.S.A.) から購入した。Bio-Rad Protein Assay は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, U.S.A.) から購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は、MILLIPORE (Bedford, U.S.A.) から購入した。マウス抗ラット aPKC λ 抗体 (610207) およびウサギ抗ラット p-aPKC ζ/λ (Thr 410/403) 抗体 (#9378) は、それぞれ BD Biosciences (San Jose,

U.S.A.) および Cell Signaling Technology (Danvers, U.S.A.) から購入した。ウサギ抗マウス IgG horseradish peroxidase 標識抗体およびヤギ抗ウサギ IgG horseradish peroxidase 標識抗体は、それぞれ WAKO (Osaka, Japan) および BIOSOURCE (Camarillo, U.S.A.) から購入した。Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System は、GE Healthcare (Buckinghamshire, U.K.) から購入した。Bio Max MS Film は、KODAC (Rochester, U.S.A.) から購入した。Rat ゲノム DNA は、Clontech (Palo Alto, U.S.A.) から購入した。pGL4.11、pGL4.13、pRL-CMV プラスミド、および Dual Luciferase Reporter Assay System は、Promega (Madison, U.S.A.) から購入した。pSG5 プラスミドは Stratagene (California, U.S.A.) から購入した。

2.2. 細胞および細胞培養

ラット肝癌細胞株である H4IIE 細胞は、米国 Vanderbilt 大学の Daryl K. Granner 博士からご提供頂いた。細胞は、牛胎児血清、および抗生物質を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて、37°C、5% CO₂ 下で培養した。1×10⁶ 個の細胞を径 6 cm dish で培養した。24 時間後、無血清 DMEM で洗浄

および交換し、さらに 24 時間培養した。そして無血清 DMEM で交換した 2 時間後、細胞を EGCG もしくは AICAR で様々な時間、濃度で処理した。シグナル伝達経路を解析するために、EGCG 処理 15 分前に培地に様々な阻害剤を添加した。50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002、0.1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine、0.1 $\mu\text{mol/L}$ rapamycin、10 $\mu\text{mol/L}$ JNK inhibitor II、25 $\mu\text{mol/L}$ PD98059、10 nmol/L okadaic acid、0.2 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin、10 $\mu\text{mol/L}$ compound-C、5 $\mu\text{mol/L}$ BAY11-7082、および 0.8 $\mu\text{mol/L}$ actinomycin D を阻害剤として用いた。アデノウイルス Ad-GFP および Ad-dn-aPKC λ は、大阪大学医学部の宮崎純一博士、および神戸大学医学部の小川渉博士からそれぞれご提供頂いた (19,20)。アデノウイルスは超遠心分離法により精製後、リン酸緩衝生理食塩水に対して透析を行った (21)。アデノウイルスの力価測定には、Adeno-X rapid titer kit を使用した。各アデノウイルスは、50 multiplicity of infection (m. o. i.) で感染させ、さらに 24 時間培養した。

2.3. Total RNA の調製およびリアルタイム PCR 解析

Total RNA は、TRIzol reagent を用いて様々な処理を行った細胞から調製した。cDNA は、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用い、1 μg の total RNA から合成

した。方法は、メーカーの推奨プロトコールに従った。SHARP-1 および ribosomal protein 36B4 (36B4) mRNA は、ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems JAPAN, Co. Ltd.) にて、cDNA、プライマー、FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) を用いたリアルタイム PCR 解析で定量した。SHARP-1 のプライマー配列は、5'-AGGAATCCCTCATTTGCAAGAG-3' および 5'-CAAGCTCCTTTTGGGTTTACACA-3' であり、36B4 のプライマー配列は、5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3' および 5'-GGATCTGCTGCATCTGCTTG-3' であった。SHARP-1 mRNA の発現量は、36B4 mRNA の発現量で補正した。

2.4. ウェスタンブロット解析

H4IIE 細胞を 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG で様々な時間処理した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、回収した。次に、細胞を、62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10 % glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, 2.5 % SDS 溶液で溶解した。タンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay により測定した。全細胞溶解液 (200 μg /レーン) を 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法にて分離

し、PVDF 膜に転写した。マウス抗ラット aPKC λ 抗体 (610207) もしくはウサギ抗ラット p-aPKC ζ/λ (Thr 410/403) 抗体 (#9378) を一次抗体として用いた。ウサギ抗マウス IgG horseradish peroxidase 標識抗体、およびヤギ抗ウサギ IgG horseradish peroxidase 標識抗体をそれぞれ二次抗体として用いた。目的のタンパク質は、Amersham ECL Plus Western Blotting System および Bio Max MS Film を用いて可視化した。

2.5. プラスミドの作製

ラットゲノム DNA を鋳型として用いた。まず、ラット *SHARP-1* 遺伝子転写開始点上流に相当する、PCR プライマー 5'-CCGGGCTAGCTAGTTGCCTGCTGTAAAACAAG-3'、および 5'-CCGGAAGCTTTATTGAAAGTGTGAAGCAGTTG-3' を合成した。次に、GC-RICH PCR System およびプライマーを用いて、メーカーの推奨プロトコールに従い PCR を行った。PCR 産物を *NheI* および *HindIII* で消化後、その約 1.5-kb の断片を pGL4.11 の *NheI/HindIII* サイトにサブクローンし、pGL4.11-SHARP-1/Luc を作製した。

ptk/Luc プラスミドは、松本大学大学院の山田一哉博士からご提供頂いた
(22,23)。pSG5-p65 は、米国 UCSF の Jen-Chywan Wang 博士からご提供頂いた。

NF- κ B の結合配列を含むヌクレオチドのセンス鎖

5'-CTAGAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGCAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

と、アンチセンス鎖

5'-CTAGGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACTGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

をそれぞれアニーリングし、さらに 5' 末端をリン酸化した後、ptk/Luc の *Nhe*I
サイトに挿入し、p(κ B)₆-tk/Luc を作製した。

すべての挿入断片のヌクレオチド配列については、DNA sequencer 310 Genetic
Analyzer (Applied Biosystems) を用い確認した。

2.6. DNA の一過的トランスフェクションおよびルシフェラーゼリポーターア

ッセイ

トランスフェクションに用いるすべてのプラスミドは、GenoPure Plasmid Maxi
kit により精製した。H4IIE 細胞へのトランスフェクションには、リン酸カルシ
ウム法を用いた (24)。EGCG のプロモーター活性に対する影響を調べるため、

細胞に 10 μg のリポータープラスミドおよび 0.5 μg phRL-CMV をコトランスフェクションした。また、NF- κ B がラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に影響を与えるかを調べるため、細胞に 8 μg のリポータープラスミド、2 μg のエフェクタープラスミド、および 0.5 μg の phRL-CMV をコトランスフェクションした。いずれの場合においても、トランスフェクション 4 時間後、トランスフェクション効率を上げるために、細胞を 20 % dimethylsulfoxide に 4 分間供し、さらに無血清培地で 16 時間培養した。そして、その細胞を用い、Dual Luciferase Reporter Assay System にてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を解析した。両ルシフェラーゼ活性は、Berthold Lumat model LB 9507 (Wildbad, Germany) により測定した。ホタルルシフェラーゼ活性（相対的蛍光強度）は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性により補正した。

2.7. 統計解析

すべての実験は 4 回行い、データは平均値および標準誤差で表した。データは、一元配置の分散分析 (ANOVA)、次いでフィッシャーの制限付き LSD 多重比較検定により解析した。

3. 結果

3.1. EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導解析

EGCG が *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に与える影響について検討した。高分化型肝癌細胞株であるラット H4IIE 細胞を、様々な濃度の EGCG で 2 時間処理した。

その結果、*SHARP-1* mRNA 量は EGCG 濃度依存的に増加し、検討した条件では 50 $\mu\text{mol/L}$ でプラトーに達した。EGCG 非存在下に比して、最大で約 11 倍の mRNA の誘導が認められた (図 2A)。

次に、図 2A で直線性のある濃度領域であった 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG で、*SHARP-1* mRNA 量の経時的変化を検討した。その結果、*SHARP-1* mRNA 量は 2 時間で最大ピークに達し、それ以後は次第に減少していった (図 2B)。これは *SHARP-2* と同様の傾向であった (16)。

これらの結果より、EGCG は *SHARP-1* mRNA レベルを早期にかつ一過性に増加させることが示された。

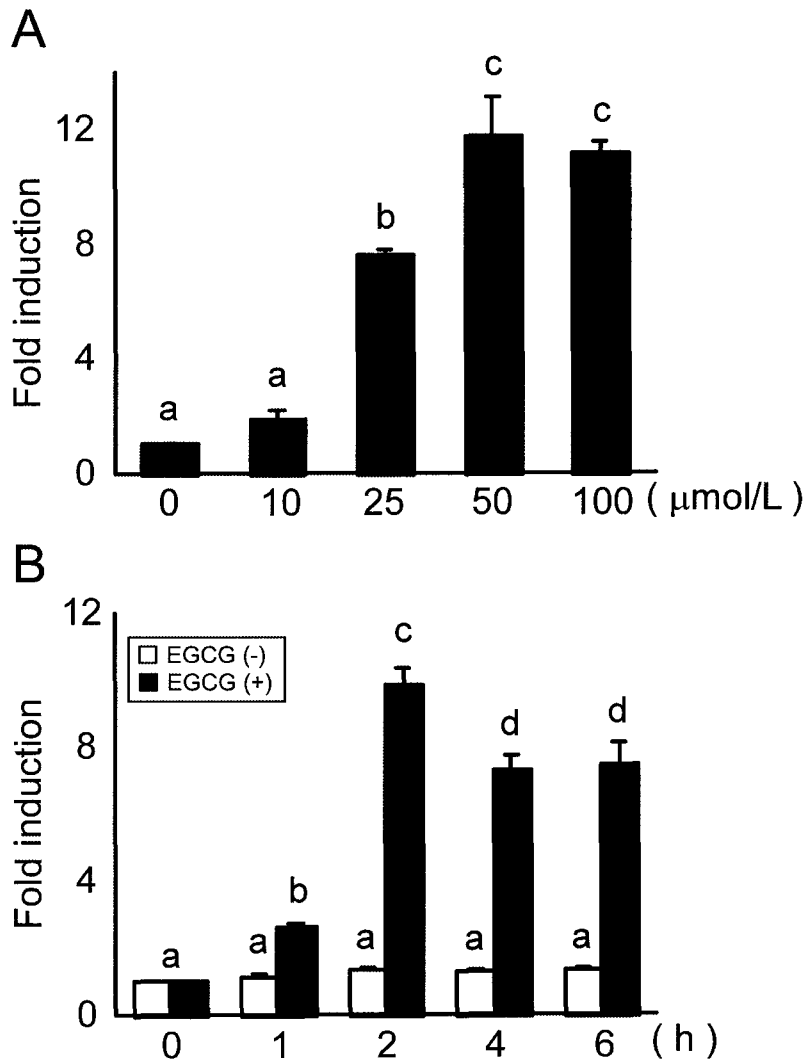


図 2. EGCG の SHARP-1 mRNA の発現への影響

Total RNA は、様々な濃度・時間下の H4IIE 細胞から調製された。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。EGCG 非存在下の相対値を 1 とした。(A) H4IIE 細胞をグラフ下部に示した濃度で 2 時間処理した。棒グラフにある ^{a,b,c} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.01$) があることを示している。(B) EGCG による SHARP-1 mRNA 量の経時的変化。細胞は、25 μmol/L EGCG の存在下(■)、または非存在下(□)、グラフ下部に示した様々な時間で培養された。棒グラフにある ^{a,b,c,d} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

3.2. EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の同

定 (1) ~phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)/ atypical PKC lambda (aPKC λ)の関

与~

次に、EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導にどのような細胞内シグナル伝達経路が関与するかを検討した。H4IIE 細胞を、各種のシグナル伝達酵素であるプロテインキナーゼやプロテインフォスファターゼに対する阻害剤で処理した。その結果、EGCG による *SHARP-1* mRNA 量の増加は、PI 3-K を阻害する LY294002 により 36%にまで、protein kinase C (PKC) を阻害する staurosporine により 18%にまで有意に抑制された (図 3)。

また、PI 3-K の別の阻害剤である wortmannin でも、EGCG による *SHARP-1* mRNA の誘導は抑制された (データ未発表)。これらに対して、p70S6 kinase を阻害する rapamycin、Jun N-terminal kinase (JNK) を阻害する JNK inhibitor II、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を阻害する PD98059、protein phosphatase を阻害する okadaic acid では、阻害効果は認められなかった (図 3)。これらの結果から、EGCG による *SHARP-1* mRNA 量の増加は、PI 3-K や PKC シグナル伝達経路を介することが示された。

PKC ファミリーには多くのアイソフォームが存在する (25)。次に、PKC のどのアイソフォームが EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加に関与するのかについて検討した。既に、肝臓において PI 3-K の下流に aPKC λ が位置していることが報告されている (26)。まず、以下の 2 種類のアデノウイルスを準備した。一つはドミナントネガティブ変異型 aPKC λ を発現する Ad-dn-aPKC λ 、他方は green fluorescence protein (GFP) を発現する Ad-GFP である (20)。ドミナントネガティブ変異型 aPKC λ および GFP の発現は、ウェスタンブロット解析および蛍光顕微鏡観察でそれぞれ確認した (データ未発表)。H4IIE 細胞に Ad-dn-aPKC λ を感染させたところ、EGCG による SHARP-1 mRNA の増加が 33%にまで抑制された (図 4)。これは PI 3-K の阻害剤である LY294002 処理時と同程度であった (図 3 および 4)。これに対して、Ad-GFP を細胞に感染させた場合には、SHARP-1 mRNA 量は全く変化しなかった。これらの結果から、aPKC λ が EGCG によるラット *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に重要な役割を果たしていることが示された。

aPKC λ は、スレオニン残基がリン酸化されることにより活性化される (27)。次に、H4IIE 細胞内の aPKC λ が EGCG によって実際に活性化されるかどうか

を検討した。EGCG で処理した全細胞溶解液を用い、抗リン酸化 aPKC λ 抗体、および抗 aPKC λ 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、活性型すなわちリン酸化型 aPKC λ は EGCG 処理 5 分後で増加し、30 分までに速やかに減少した (図 5)。これに対して、この間の全 aPKC λ 量に変化は認められなかった (図 5)。これらの結果から、EGCG は非常に早期に、かつ一過性に aPKC λ を活性化することが示された。

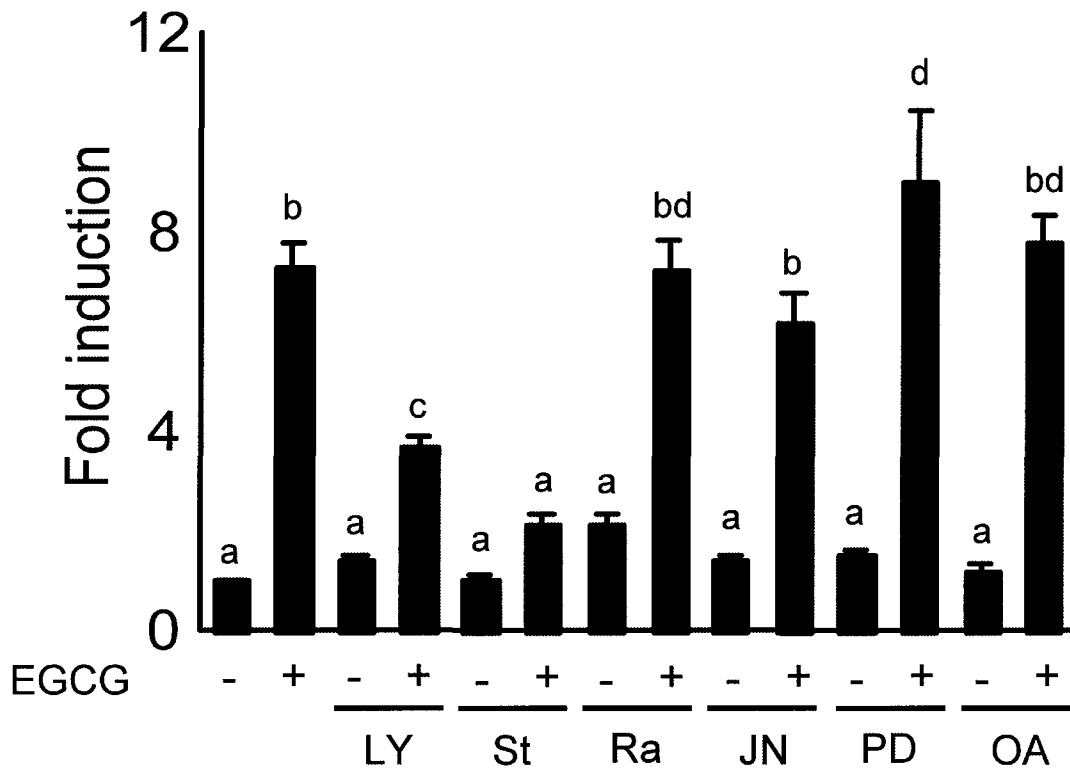


図3. EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導に対する阻害剤の影響 (1)

H4IIE 細胞を 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 存在下 (+)、または非存在下 (-)で 2 時間培養した。EGCG 添加 15 分前に様々な阻害剤が培地に加えられた。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は少なくとも 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。EGCG 非存在下の相対値を 1 とした。グラフ下部に示したように 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 (LY)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine (St)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ rapamycin (Ra)、10 $\mu\text{mol/L}$ JNK inhibitor II (JN)、25 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 (PD)、10 nmol/L okadaic acid (OA) が阻害剤として用いられた。棒グラフにある ^{a,b,c,d} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

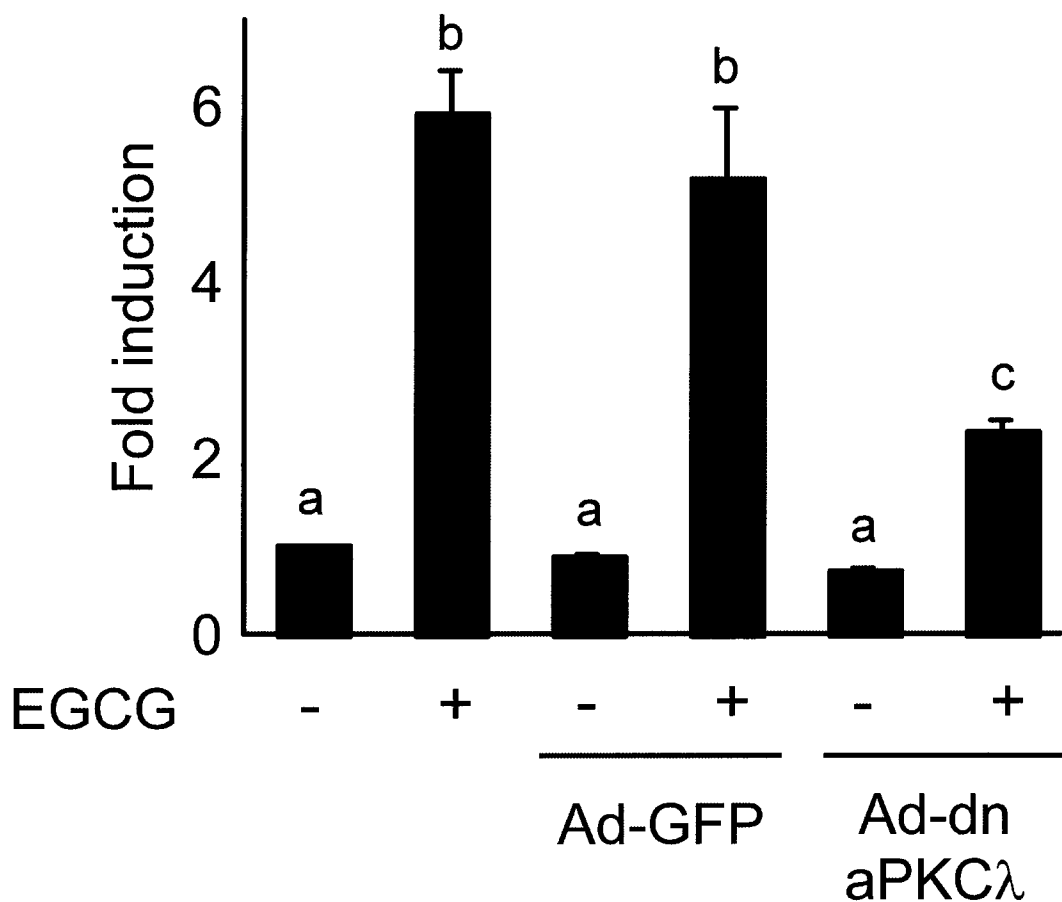


図 4. EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導に対する
ドミナントネガティブ変異型 aPKCλ の影響

SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。各実験は少なくとも 3 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。Ad-GFP および Ad-dn-aPKCλ は、それぞれ GFP、およびドミナントネガティブ変異型 aPKCλ を発現するアデノウイルスを表している。各アデノウイルスは m. o. i. = 50 で、H4IIE 細胞に感染させ、その後 24 時間培養した。グラフ下部に示したように、さらにそれぞれの感染細胞を、25 μmol/L EGCG 存在下(+)、または非存在下(-) で培養した。棒グラフにある ^{a,b,c} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.01$) があることを示している。

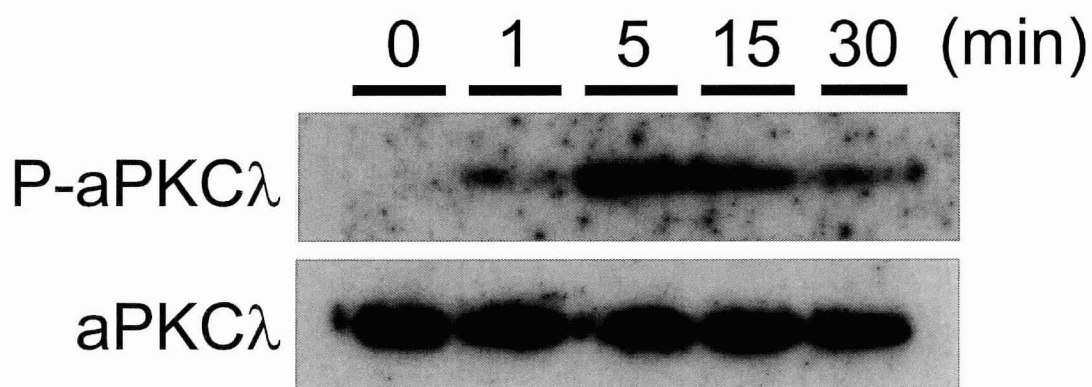


図 5. EGCG による aPKCλ の活性化

図に示された時間、25 μmol/L EGCG で処理した H4IIE 細胞から全細胞溶解液を調製した。全細胞溶解液 (200 μg/レーン) を 10% SDS-PAGE ゲルにて分離、PVDF 膜に転写し、それをウエスタンブロット解析に用いた。ウサギ抗ラット p-aPKCζ/λ (Thr 410/403) 抗体 (400 倍希釈) (上図) もしくはマウス抗ラット aPKCλ 抗体 (400 倍希釈) (下図) を一次抗体として用いた。ヤギ抗ウサギ IgG horseradish peroxidase 標識抗体を (20,000 倍希釈) (上図) もしくはウサギ抗マウス IgG horseradish peroxidase 標識抗体 (20,000 倍希釈) (下図) をそれぞれ二次抗体として用いた。

3.3. EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の同

定 (2) ～AMP-activated protein kinase (AMPK) および nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の関与～

PI 3-K や PKC の阻害剤、およびアデノウイルスを介したドミナントネガティブ変異型 α PKC λ の感染実験では、*SHARP-1* mRNA の誘導が完全に阻害されなかったため、次に他のシグナル伝達経路の関与について検討した。そこで、血糖低下やインスリン作用に関与することが知られている AMPK や NF- κ B に注目し、AMPK の阻害剤である compound-C および NF- κ B の阻害剤である BAY11-7082 を用いて実験を行った。その結果、EGCG による *SHARP-1* mRNA 量の増加は compound-C で 66%にまで、BAY11-7082 で 70%にまで、さらに両者の組み合わせで 41%にまで有意に抑制された (図 6)。これらの結果より、*SHARP-1* mRNA の誘導に、AMPK シグナル伝達経路および NF- κ B シグナル伝達経路が相加的に関わることが示唆された。

次に、EGCG による *SHARP-1* mRNA の誘導に AMPK が実際に関与しているのかを確認するために、AMPK の活性化剤 AICAR を用いて実験を行った。H4IIE 細胞を様々な濃度の AICAR で、2 時間処理した。その結果、*SHARP-1*

mRNA 量は AICAR 濃度依存的に増加した (図 7A)。その mRNA 量は AICAR 非存在下と比べ、最大 2.2 倍の増加を示した (図 7A)。さらに 0.25 mmol/L AICAR による経時的変化を検討したところ、SHARP-1 mRNA 量は段階的に増加し、2 時間で最大に達し、その後減少した (図 7B)。これは EGCG 処理時と同様の経時的変化であった (図 2B)。これらの結果から、AMPK は EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達物質であることが示された。

さらに、H4IIE 細胞を LY294002、compound-C、および BAY11-7082 の 3 つの組み合わせで処理した。その結果、EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は完全に抑制された (図 8)。

これらの結果から、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導には、これら 3 つの経路が必要かつ十分であることが示された。

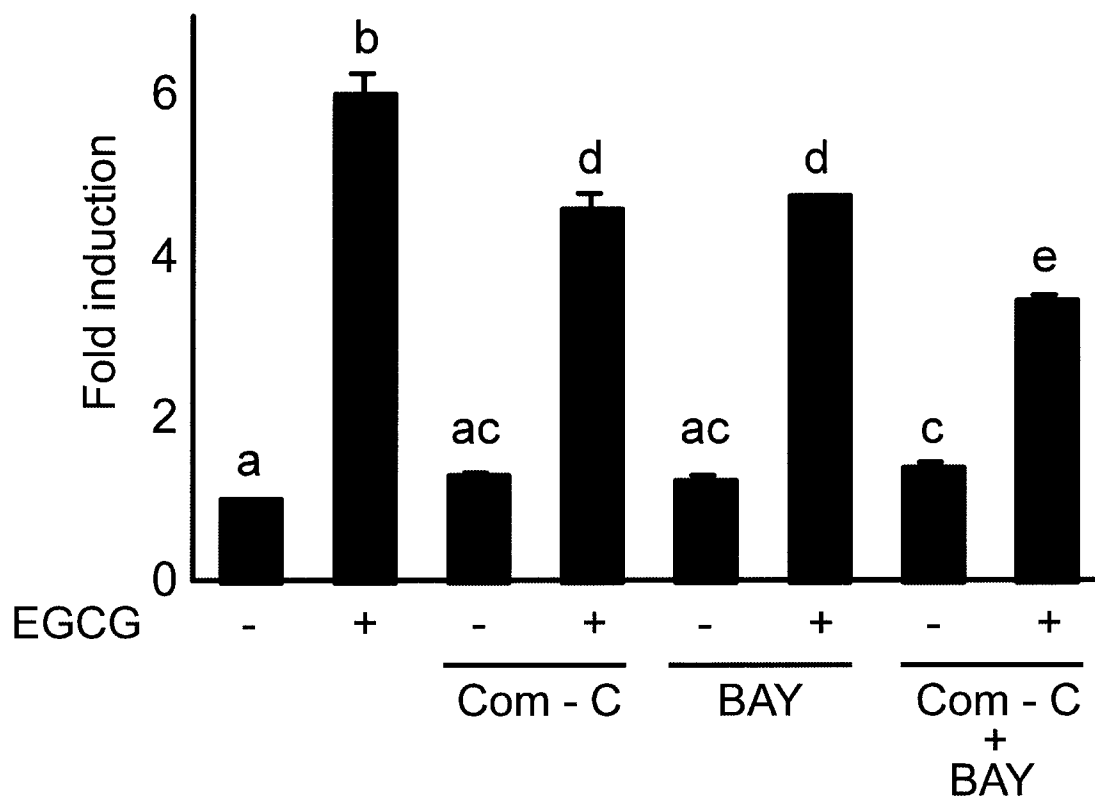


図 6. EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導に対する阻害剤の影響 (2)

H4IIE 細胞を 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 存在下(+),または非存在下(-)で 2 時間培養した。EGCG 添加 15 分前に様々な阻害剤が培地に加えられた。グラフ下部に示したように 10 $\mu\text{mol/L}$ compound-C (Com-C)、5 $\mu\text{mol/L}$ BAY11-7082 (BAY)、および両者の組合せ Com-C + BAY が阻害剤として用いられた。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。EGCG 非存在下の相対値を 1 とした。棒グラフにある ^{a,b,c,d,e} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

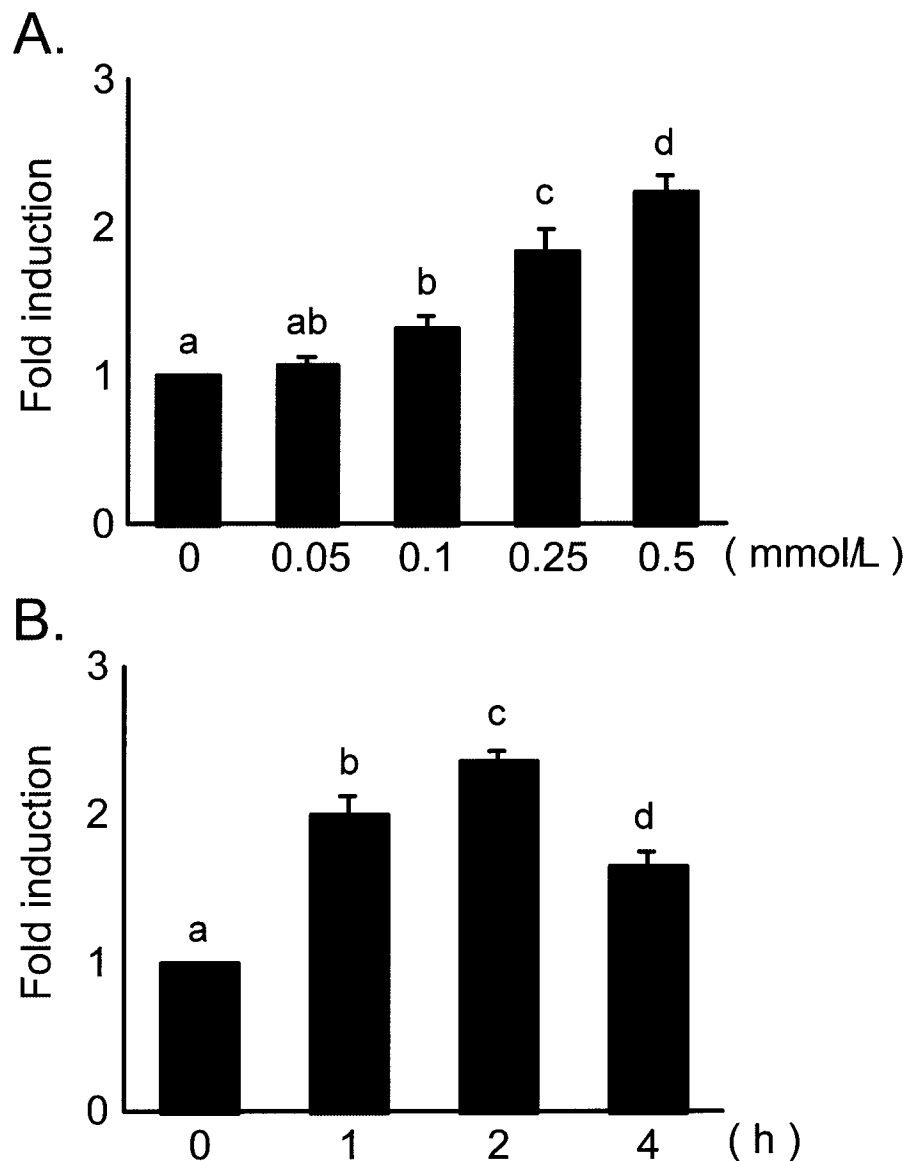


図 7. SHARP-1 mRNA 量への AICAR の影響

Total RNA は、様々な濃度・時間、AICAR で処理された H4IIE 細胞から調製された。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。AICAR 非存在下の相対値を 1 とした。棒グラフにある ^{a,b,c,d} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。(A) H4IIE 細胞をグラフ下部に示す AICAR の濃度で 2 時間処理した。(B) AICAR により誘導される SHARP-1 mRNA 量の経時的変化を示す。細胞を、グラフ下部に示す様々な時間にて 0.25 mmol/L AICAR 存在下または非存在下で培養した。

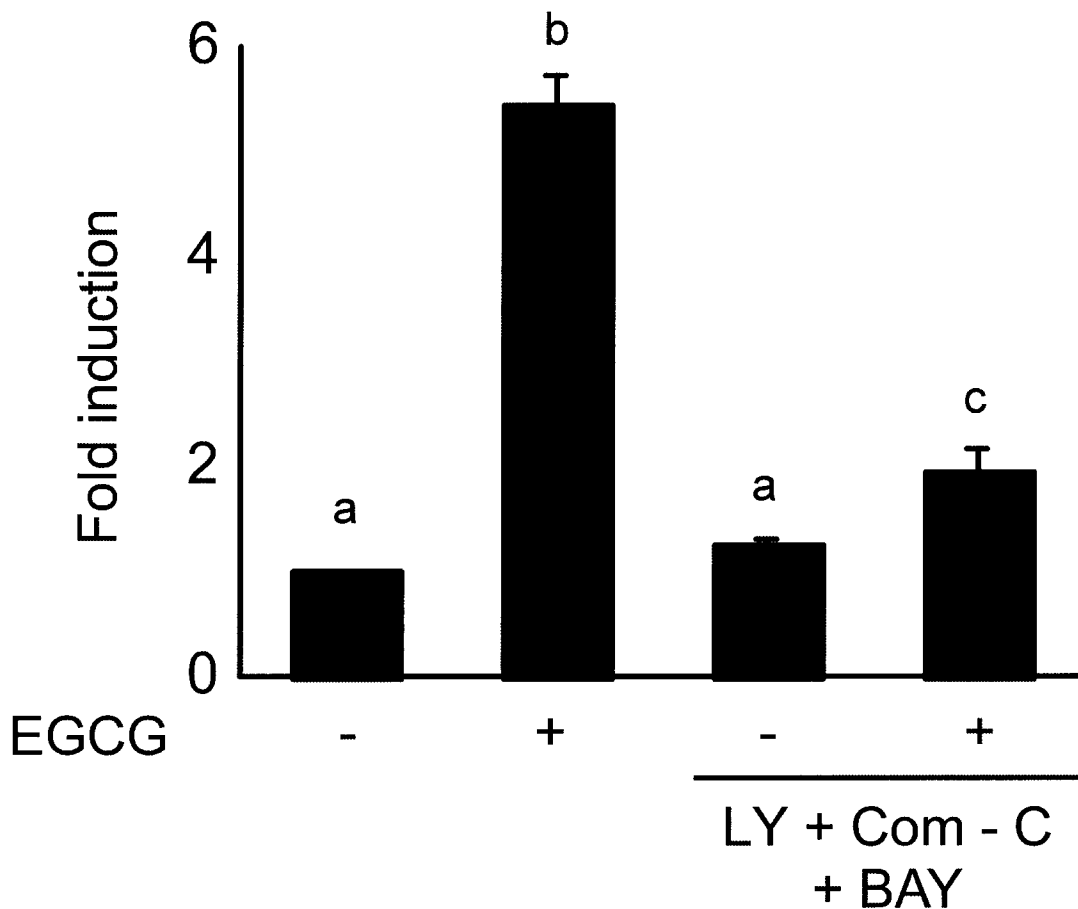


図 8. EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導に関するシグナル伝達経路の同定

H4IIE 細胞を 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 存在下 (+)、または非存在下 (-) で 2 時間培養した。グラフ下部に示す 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002、10 $\mu\text{mol/L}$ compound-C、および 5 $\mu\text{mol/L}$ BAY11-7082 の 3 つの組合せ LY + Com-C + BAY が阻害剤として用いられた。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。EGCG 非存在下の相対値を 1 とした。棒グラフにある ^{a,b,c} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

3.4. EGCG による転写レベルでの SHARP-1 mRNA の誘導

EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導が転写レベル、もしくは転写後レベルで調節されているかどうかを、RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D を用いて検討した。その結果、EGCG による SHARP-1 mRNA 量の増加は、部分的に抑制された (図 9)。この結果から、EGCG は転写および転写後レベルの両方でラット *SHARP-1* 遺伝子に作用することが示唆された。

次に、EGCG が *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に影響を与えるかどうかを検討するため、*SHARP-1* 遺伝子の -1501 から -1 の領域を有するルシフェラーゼリポータープラスミド pGL4.11-SHARP-1 を作製した。このプラスミド、もしくは SV40 ウイルスのエンハンサー／プロモーター領域を有するリポータープラスミド pGL4.13 を H4IIE 細胞にトランスフェクション後、EGCG 存在下、または非存在下で培養し、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行った。

その結果、いずれのプラスミドをトランスフェクションした細胞でも EGCG によるルシフェラーゼ活性には変化が見られなかった。したがって *SHARP-1* 遺伝子の -1501 から -1 の領域には、EGCG に応答する転写調節領域は存在しな

いことが示された (図 10)。

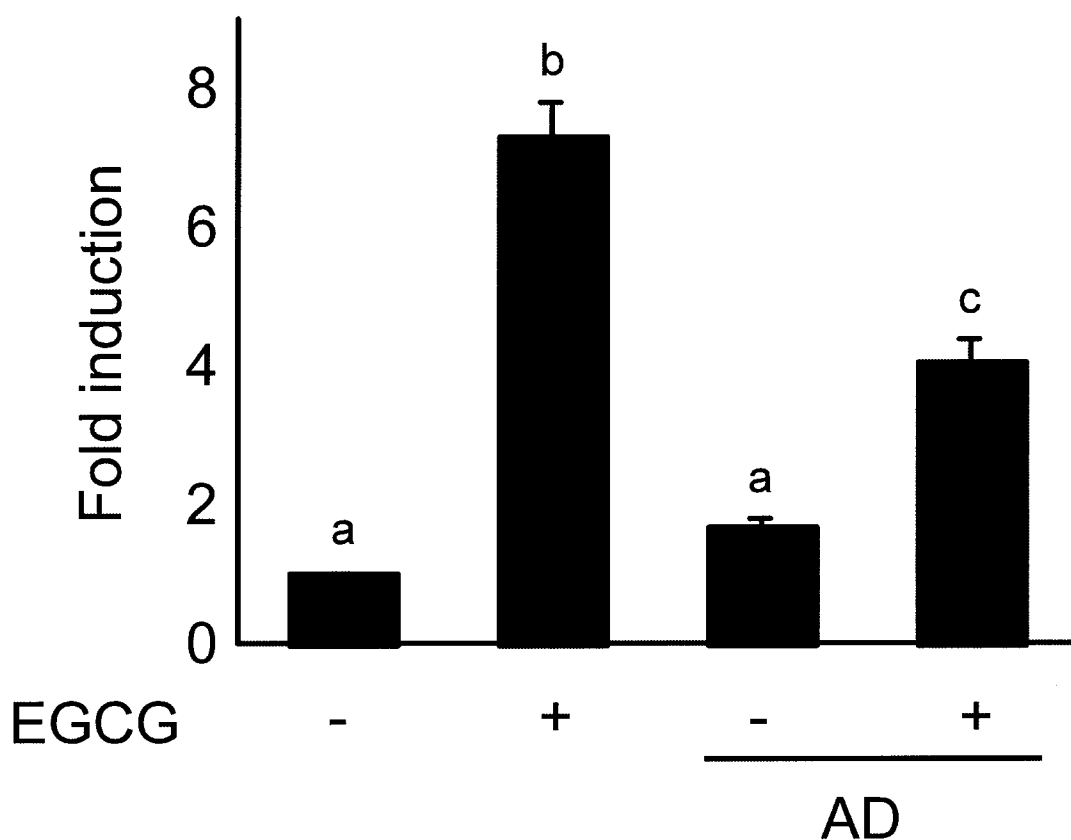


図9. EGCG による SHARP-1 mRNA 誘導への actinomycine D の効果

H4IIE 細胞を 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 存在下 (+)、または非存在下(-)で 2 時間培養した。Actinomycin D (AD; 終濃度 0.8 $\mu\text{mol/L}$) は、EGCG 処理 15 分前に培地に添加された。SHARP-1 および 36B4 mRNA 量は逆転写反応後リアルタイム PCR により測定された。実験は少なくとも 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ SHARP-1 と 36B4 mRNA 量の相対値の平均値と標準誤差を示している。EGCG 非存在下の相対値を 1 とした。棒グラフにある ^{a,b,c} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

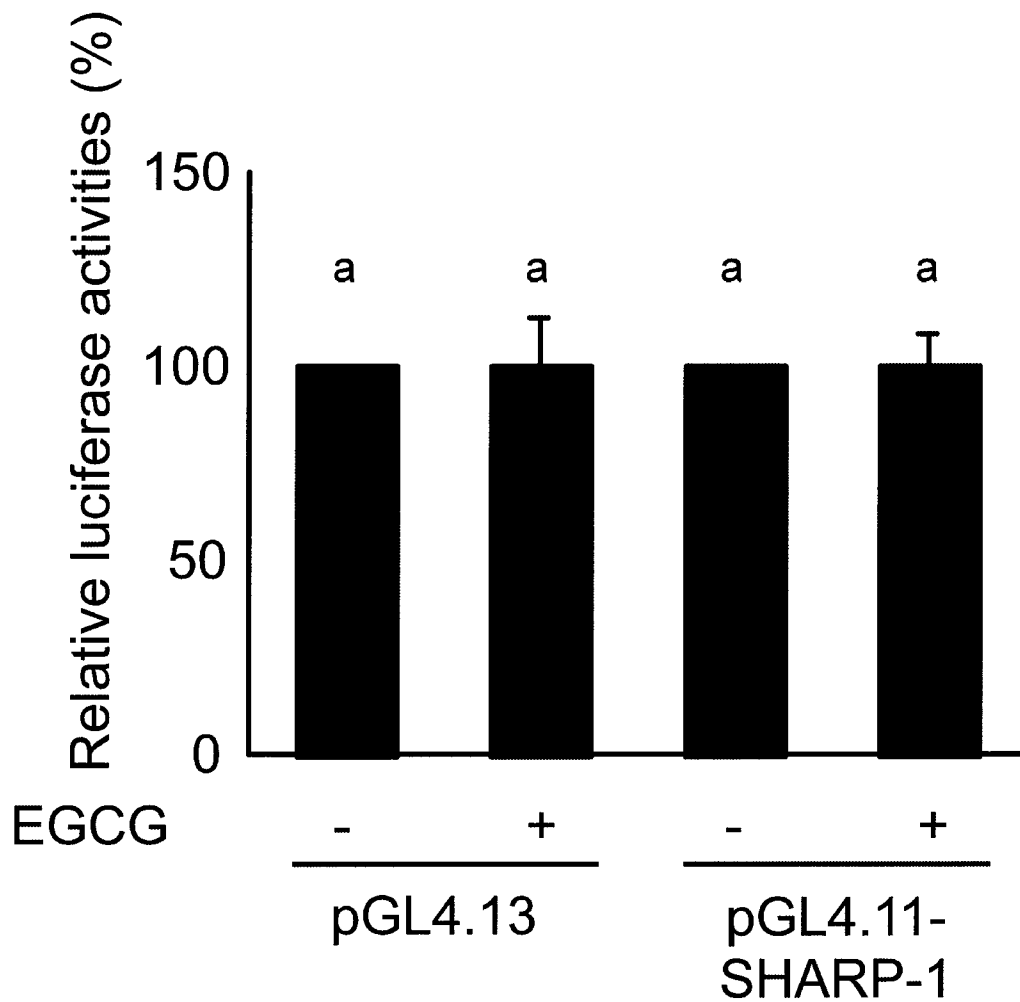


図 10. ラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に対する EGCG の効果

pGL4.13 もしくは pGL4.11-SHARP-1 プラスミドをリポータープラスミドとして使用した。グラフ下部に示すルシフェラーゼリポータープラスミド 10 μg と phRL-CMV 0.5 μg を、リン酸カルシウム法を用いて H4IIE 細胞へ一過的にコトランスフェクションした。トランスフェクションから 16 時間後、細胞は、25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 存在下 (+)、または非存在下 (-)で 2 時間培養された。EGCG 非存在下 (-)での各リポータープラスミドのプロモーター活性をそれぞれ 100 と設定した。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ平均値と標準誤差を示している。棒グラフにある ^a は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

3.5. NF- κ B による転写レベルでの SHARP-1 mRNA の誘導

NF- κ B シグナル伝達経路の阻害剤である BAY11-7082 処理により EGCG による SHARP-1 mRNA の発現誘導が部分的に抑制された (図 6)。また、EGCG による SHARP-1 mRNA の発現誘導が転写レベルで生じている可能性も示唆された (図 9)。NF- κ B は転写因子であるため、NF- κ B が *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性を上昇させるかどうかを検討した。NF- κ B は 3 量体として細胞質に局在している。刺激が入ることにより I- κ B がリン酸化されると 3 量体から解離し分解される (28)。残りの p65/p50 ヘテロ 2 量体は核内へ移行して遺伝子発現を制御する (28)。そこで、転写活性化を行う p65 サブユニットを高発現させた場合の *SHARP-1* 遺伝子プロモーターに対する影響を検討した。

pGL4.11-SHARP-1 あるいはチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターの上流に NF- κ B の結合配列を 6 コピー有する p(κ B)₆-tk/Luc リポータープラスミドを constitutively active form NF- κ B p65 を発現するプラスミド pSG5-p65 や親ベクター pSG5 とともに H4IIE 細胞にコトランスフェクションして、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行った。

p(κ B)₆-tk/Luc リポータープラスミドからのプロモーター活性は p65 の存在

に依存してプロモーター活性の上昇を認めた (図 11)。これに対して pGL4.11-SHARP-1 からのプロモーター活性は低下こそすれ上昇しなかった (図 11)。したがって、*SHARP-1* 遺伝子の -1501 から -1 の領域には、少なくとも NF- κ B により正に応答する転写調節領域は存在しないことが示された。

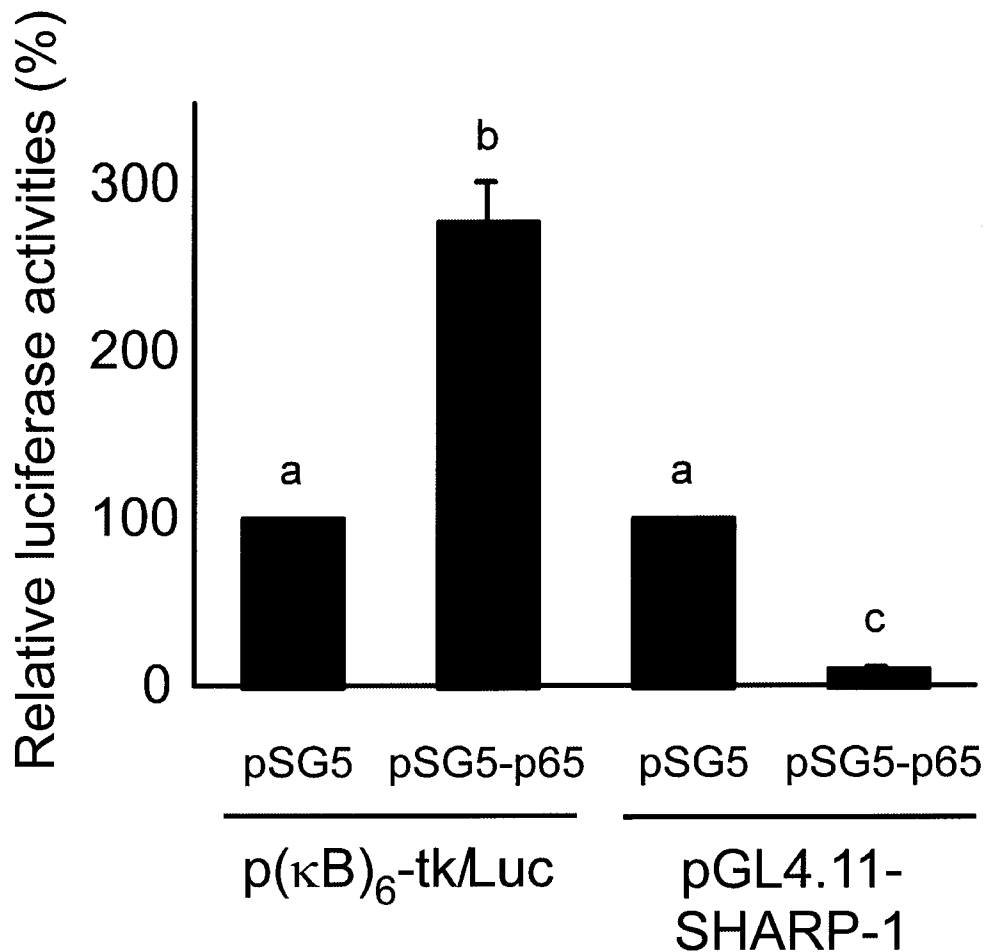


図 11. ラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性に対する NF- κ B p65 の影響

p(kB)₆-tk/Luc もしくは pGL4.11-SHARP-1 プラスミドをリポータープラスミドとして、pSG5 もしくは pSG5-p65 プラスミドをエフェクタープラスミドとして使用した。グラフ下部に示すルシフェラーゼリポータープラスミド 8 μ g、エフェクタープラスミド 2 μ g、および phRL-CMV 0.5 μ g を、リン酸カルシウム法を用いて H4IIE 細胞へ一過的にコトランスフェクションした。トランスフェクションから 16 時間後、細胞を回収した。pSG5 をトランスフェクションしたときの各リポータープラスミドのプロモーター活性をそれぞれ 100 と設定した。実験は 4 回行い、棒グラフとエラーバーは、それぞれ平均値と標準誤差を示している。棒グラフにある ^{a,b,c} は、2 つの平均値間で共通の文字がない場合、その間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示している。

4. 考察

本研究では、はじめに、インスリンと同様、H4IIE 細胞において SHARP-1 mRNA の発現が EGCG によって制御されているかどうかを検討した。その結果、SHARP-1 mRNA 量は EGCG によってインスリンと同様、早期に増加した (図 2)。以前に H4IIE 細胞において、EGCG が SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することが報告されている (16)。したがって、EGCG は SHARP-1 および SHARP-2 mRNA 量の両方を増加させることができる。また、25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG において、両 mRNA の発現量は 2 時間で最大レベルに達したが、そのレベルは SHARP-1 の方が SHARP-2 に比べ高かった (16) (図 2B)。

H4IIE 細胞において、EGCG は *PEPCK* および *glucose-6-phosphatase* 遺伝子の発現を抑制することが報告されている (8)。また、SHARP-2 の過剰発現により、内在性の *PEPCK* mRNA 量の低下と *PEPCK* 遺伝子のプロモーター活性が低下することも報告されている (16)。SHARP-1 と SHARP-2 は互いにヘテロダイマーを形成することから、EGCG 処理した H4IIE 細胞ではそのヘテロダイマー形成が高まると考えられる (29)。これらのデータは、SHARP-2 だけでなく SHARP-1 も *PEPCK* 遺伝子の発現を抑制し、血糖値を低下させることを示唆す

る。したがって、EGCG のような SHARP-1 mRNA 量を増加させる低分子化合物は、インスリン抵抗性や糖尿病といった代謝疾患の改善に利用できる可能性があるといえる。

EGCG による *SHARP-1* 遺伝子の発現は PI 3-K および PKC を介して誘導された (図 3)。H4IIE 細胞において EGCG は PI 3-K を介して *PEPCK* 遺伝子の発現を抑制することが報告されている (8)。したがって、本結果は彼らの観察と一致している。次に、ドミナントネガティブ変異型 aPKC λ を過剰発現すると、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導が抑制された (図 4)。加えて、EGCG 処理により aPKC λ の活性化、すなわちリン酸化が、早期にかつ一過性に増加した (図 5)。これらの結果は、aPKC λ が EGCG により誘導される *SHARP-1* 遺伝子の発現に必須であることを示している。なお、ドミナントネガティブ変異型 aPKC λ による SHARP-1 mRNA 量の抑制レベルは、LY294002 処理による抑制レベルと一致していた (図 3 および 4)。さらに、aPKC λ は肝臓では PI 3-K の下流因子の一つと報告されていることより、EGCG は PI 3-K/aPKC λ シグナル伝達経路を介して SHARP-1 mRNA を誘導すると結論づけた (26)。これは、EGCG による遺伝子発現制御について aPKC λ の関与を示した最初の報告であ

る。

EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導は、PI 3-K や PKC の阻害剤、またドミナントネガティブ変異型 α PKC λ の感染では完全には阻害されなかったため、他のシグナル伝達経路の存在が示唆された。compound-C もしくは BAY11-7082 で処理したところ、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導が部分的に抑制された (図 6)。さらに、compound-C および BAY11-7082 の両方で処理した場合、相加的効果が見られた (図 6)。このことは、AMPK および NF- κ B シグナル伝達経路が、この EGCG による誘導に独立して関わっていることを示唆した。さらに、AMPK の活性化剤である AICAR 処理では、SHARP-1 mRNA 量は濃度依存的に増加し、その経時的変化は EGCG 処理時と同様であった (図 2 および 7)。ゆえに、AMPK は、EGCG による SHARP-1 mRNA の誘導に関わっていると結論した。AMPK は、代謝ストレスを検知するタンパクキナーゼであり、代謝経路で律速酵素を直接リン酸化し、また遺伝子発現を調節することでエネルギー需給を制御している (30)。一方、EGCG は AMPK の活性化を介して、肝臓の糖新生系酵素である PEPCK や *glucose-6-phosphatase* 遺伝子の発現を抑制することが報告されている (9)。したがって AMPK の活性化による

SHARP-1 mRNA 量の増加は、肝臓の糖新生系酵素の遺伝子発現において重要な役割を果たしていると考えられる。

さらに、LY294002、compound-C、および BAY11-7082 の 3 種の阻害剤で同時に処理した場合、EGCG による SHARP-1 mRNA の発現誘導は完全に阻害された (図8)。したがって、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導には、PI 3-K/aPKC λ 、AMPK、および NF- κ B の 3 つのシグナル伝達経路が必要かつ十分であると結論づけた。

NF- κ B シグナル伝達経路が EGCG による SHARP-1 mRNA の発現誘導に関与したが、これは、EGCG による遺伝子発現誘導において NF- κ B が関わる初めての報告である。NF- κ B は多面的な因子であり、発生過程、先天免疫のような生体防御システム、および細胞生存率などを制御している (31)。また、NF- κ B は、PI 3-K/Akt シグナル伝達経路の下流標的因子としても知られている (31)。実際、insulin-like growth factor I は、PI 3-K を介した NF- κ B シグナル伝達により、神経保護を高める (32)。驚くべきことに、aPKC λ は、interleukin-1 で処理された細胞において、NF- κ B の活性化にも関わるということが報告されている (33)。したがって、これらの結果は、EGCG により誘導された SHARP-1 の遺伝子発

現において、PI 3-K か α PKC λ の一方、もしくは両方が NF- κ B の上流調節因子である可能性を示唆するものである。

EGCG はラット *SHARP-1* 遺伝子を転写および転写後のレベルで作用することが示唆された (図9)。次に、EGCG がラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性を増加するかどうかについてルシフェラーゼリポーターアッセイを用いて検討した。ラット *SHARP-1* 遺伝子の -1 から -1501 の領域には、基礎的発現調節や低酸素による発現調節に必須な転写調節領域が含まれている (34)。しかし、この領域は EGCG 処理では応答しなかった (図10)。さらに、活性化型 NF- κ B p65 サブユニットがラット *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター活性を刺激するかどうかを検討したが、同じ領域には、NF- κ B で少なくとも正に応答する領域は存在しなかった (図11)。一方で、ヒト *SHARP-1* 遺伝子のプロモーター領域に NF- κ B の結合領域が存在する可能性が報告されている(35)。したがって、NF- κ B 応答領域は、今回調べたラット *SHARP-1* 遺伝子の領域以外に存在すると考えられた。

EGCG は、いくつかのヒト腫瘍細胞において、増殖抑制およびアポトーシスを引き起こすことが報告されている (5)。最近、Tachibana らは、EGCG の抗が

ん作用を仲介する細胞表面 EGCG 受容体として 67-kDa laminin receptor (67LR) を同定した (36)。したがって、図 12 に示したように、EGCG は、67 LR に結合した後、PI 3-K/ aPKC λ 、AMPK、および NF- κ B シグナル伝達経路を刺激し、ラット *SHARP-1* 遺伝子の転写を促進するとともに、SHARP-1 mRNA の安定化のレベルでも作用すると結論する。

以上より、本研究では、緑茶カテキンである EGCG がインスリン誘導性転写因子である *SHARP-1* 遺伝子を誘導したことから、EGCG がインスリンシグナル伝達経路を刺激できる低分子化合物であることを明らかにした。したがって、EGCG 摂取により、最終的に、血糖調節が可能となり、インスリン抵抗性・糖尿病などの病態の予防や改善に応用できることが多いに期待できる。

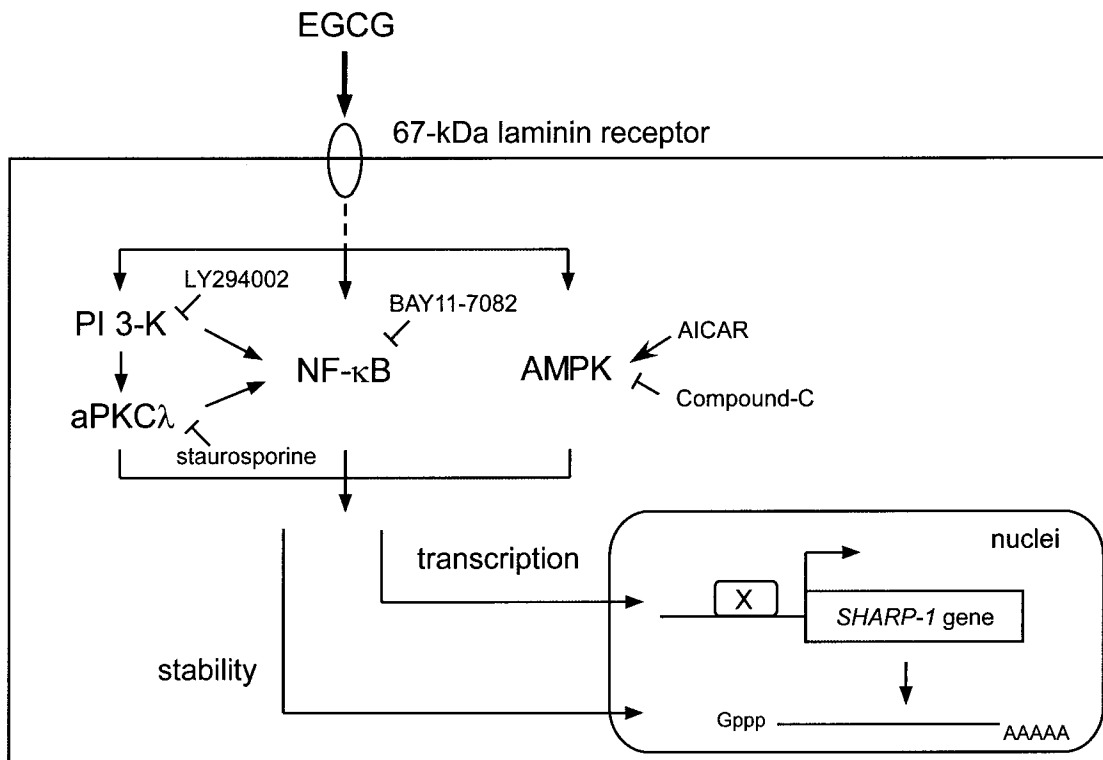


図12. EGCG によるラット *SHARP-1* 遺伝子の発現調節機構の模式図

5. 文献

1. Renaud, S., and de Lorgeril, M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. (1992) *Lancet* **339**, 1523-1526
2. Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., and Sinclair, D. A.: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. (2003) *Nature* **425**, 191-196
3. Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., and Sinclair, D.: Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. (2004) *Nature* **430**, 686-689
4. Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poesala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., and Sinclair, D. A.: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. (2006) *Nature* **444**,

337-342

5. Shankar, S., Ganapathy, S., and Srivastava, R. K.: Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer. (2007) *Front. Biosci.* **12**, 4881-4899
6. Moon, H. S., Lee, H. G., Choi, Y. J., Kim, T. G., and Cho, C. S.: Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. (2007) *Chem. Biol. Interact.* **167**, 85-98
7. Wolfram, S.: Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. (2007) *J. Am. Coll. Nutr.* **26**, 373S-388S
8. Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M., and Granner, D. K.: Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34933-34940
9. Collins, Q. F., Liu, H. Y., Pi, J., Liu, Z., Quon, M. J., and Cao, W.: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 30143-30149

10. Massari, M. E., and Murre, C.: Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429-440
11. Yamada, K., and Miyamoto, K.: Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. (2005) *Front. Biosci.* **10**, 3151-3171
12. Shen, M., Kawamoto, T., Yan, W., Nakamasu, K., Tamagami, M., Kayano, Y., Noshiro, M., and Kato, Y.: Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **236**, 294-298
13. Rossner, M. J., Dorr, J., Gass, P., Schwab, M. H., and Nave, K.-A.: SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. (1997) *Mol. Cell. Neurosci.* **10**, 460-475
14. Fujimoto, K., Shen, M., Noshiro, M., Matsubara, K., Shingu, S., Honda, K., Yoshida, E., Suardita, K., Matsuda, Y., and Kato, Y.: Molecular cloning and characterization of DEC2, a new member of basic helix-loop-helix proteins. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 164-171

15. Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Noguchi, T., and Miyamoto, K.: Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30719-30724
16. Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., and Miyamoto, K.: SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 1509-1514
17. Azmi, S., Ozog, A., and Taneja, R.: Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 52643-52652
18. Gulbagci, N. T., Li, L., Ling, B., Gopinadhan, S., Walsh, M., Rossner, M., Nave, K. A., and Taneja, R.: SHARP1/DEC2 inhibits adipogenic differentiation by regulating the activity of C/EBP. (2009) *EMBO Rep.* **10**, 79-86
19. Tashiro, F., Niwa, H., and Miyazaki, J.: Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. (1999) *Hum. Gene Ther.* **10**, 1845-1852
20. Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y.,

- Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S., and Kasuga, M.: Requirement of atypical protein kinase Clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6971-6982
21. Kanegae, Y., Makimura, M., and Saito, I.: A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. (1994) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **47**, 157-166
22. Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K.: The rat *enhancer of split- and hairy-related protein-2* gene: hepatic expression, genomic structure, and promoter analysis. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, 81-90
23. Yamada, K., Mizutani, T., Shou, Z., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Inazu, T., and Miyamoto, K.: Cloning and functional expression of an E box-binding protein from rat granulosa cells. (2001) *Biol. Reprod.* **64**, 1315-1319
24. Yamada, K., Duong, D. T., Wang, J.-C., Scott, D. K., and Granner, D. K.:

- CCAAT/Enhancer-binding protein- β is an accessory factor for the glucocorticoid response from the cAMP response element in the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5880-5887
25. Jiang, G., and Zhang, B. B.: PI 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. (2002) *Front. Biosci.* **7**, 903-907
26. Matsumoto, M., Ogawa, W., Akimoto, K., Inoue, H., Miyake, K., Furukawa, K., Hayashi, Y., Iguchi, H., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Shimano, H., Yamada, N., Ohno, S., Kasuga, M., and Noda, T.: PKC λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**, 935-944
27. Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C.: Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 1394-1403
28. Chen, L. F., and Greene, W. C.: Shaping the nuclear action of NF- κ B.

- (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 392-401
29. Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Honda, K. K., Honma, S., Honma, K., and Kato, Y.: Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 4409-4419
30. Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I. G., Iseli, T., Michell, B. J., and Witters, L. A.: AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 162-168
31. Salminen, A., and Kaarniranta, K.: Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. (2010) *Cell. Signal.* **22**, 573-577
32. Heck, S., Lezoualc'h, F., Engert, S., and Behl, C.: Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9828-9835
33. Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H., and Moscat, J.: The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6

- pathway. (2000) *Embo. J.* **19**, 1576-1586
34. Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H., and Kato, Y.: Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47014-47021
35. Liu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Morohashi, S., Akasaka, H., Kondo, J., Wu, Y., Noshiro, M., Kato, Y., and Kijima, H.: Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. (2010) *Genes Cells* **15**, 315-325
36. Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K.: A receptor for green tea polyphenol EGCG. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 380-381

6. 謝辞

松本大学大学院健康科学研究科教授山田一哉先生には、本研究を遂行するにあたりご指導およびご助言を賜りましたうえに、さらに仕事や生活面においても叱咤激励して頂いたこと、衷心より感謝の意を表します。

本研究においてご指導を賜りました信州大学大学院総合工学系研究科教授中村宗一郎先生、ならびに信州大学農学部応用生命科学科助教片山茂先生には厚く御礼申し上げます。さらに様々なご支援を頂きました信州大学農学部食品化学研究室の皆様には感謝申し上げます。

GFP 発現するアデノウイルスをご提供頂きました大阪大学医学部宮崎純一先生、ならびにドミナントネガティブ変異型 aPKC λ を発現するアデノウイルスをご提供頂きました神戸大学医学部小川渉先生には厚く御礼申し上げます。またアデノウイルスの調製をして頂きました、大阪大谷大学薬学部分子生物学講座助教山本太一先生、同講座准教授田中高志先生、ならびに同講座教授野口民夫先生に厚く御礼申し上げます。

松本大学人間健康学部健康栄養学科准教授高木勝広先生、ならびに同学科助手羽石歩美先生には、日々の実験のご協力ならびに有益なご助言を頂いたこと

感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、すばらしい研究環境をつくって頂いた松本大学分子生物学研究室の皆様へ深く感謝致します。

最後に、社会人学生として仕事と研究のどちらにも全力で取り組むことができたのは、妻裕子をはじめとした家族の生活面での温かな支援があったからこそだと思います。家族に心より感謝致します。