

平成 30 年度 プロジェクト研究費研究実績報告書

令和元年 5 月 13 日

代表者 志村 二三夫

研究課題名	肝細胞株におけるインスリンを凌ぐピルビン酸のグルコース代謝促進作用とその機構
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日
共同研究者	
1. 今年度の研究概要	
<p>ピルビン酸 (Pyr) はグルコース代謝の重要な中間体である。近年は機能性食品にも利用されているが、細胞外 Pyr の作用と機構には不明な点が多い。これらを背景に、我々は Pyr がインスリンを凌ぐ強さでヒト由来肝細胞株 HepG2 によるグルコースの細胞内取り込みを促進するという新知見を得ている。本研究はこれを掘り下げ、発展させて、細胞内取り込み後のグルコース代謝への作用を包括したエビデンスとし、さらにその機構の解明をめざすことを目的とした。</p> <p>本研究は、研究協力者である本学大学院博士課程学生の倉若美咲樹を指導し、研究を主導する形で次に示す通り遂行した。</p> <p>i. <u>インスリンを凌ぐ Pyr のグルコース代謝促進作用が HepG2 では明確であることの検証</u> インスリンを凌ぐ Pyr のグルコース代謝促進作用が HepG2 では明確であることを検証するため、グルコース代謝の出口部分に相当する細胞内グリコーゲン・中性脂肪・ATP 量、ミトコンドリア機能、細胞外乳酸量等へのピルビン酸の作用を検討した。また、この過程において、1つの試料について多項目の指標の定量が可能で、本学現有機器を活用でき、また経済的な高感度微量定量法を検討して取り組んだ。</p> <p>ii. <u>HepG2 におけるインスリンを凌ぐ Pyr のグルコース代謝促進作用の機構の概要を明らかにする</u> 細胞内へのグルコースの取り込み量について時系列的解析を行い、ピルビン酸のグルコース取り込み促進作用機序の解明に向けた検討を行った。</p> <p>iii. <u>Pyr のグルコース代謝促進作用が肝細胞株 HepG2 に限定されず、実験動物に敷衍できる可能性の検討</u> ラットを用いて検討する予定であったが、HepG2 細胞による知見をより強固にするため、また、研究費が申請時よりも減額となったため行わなかった。</p>	

2. 研究の成果

培養肝細胞 HepG2 において, Pyr を添加し 24 時間培養すると細胞内へのグルコースの取り込みを促進した。さらに細胞内に取り込まれたグルコースのその後の代謝について調べたところ, 乳酸変換率と細胞内グリコーゲン量の減少, 細胞内中性脂肪量とミトコンドリア機能の増大が明らかとなった。また, Pyr による細胞内グルコースの取り込みについて時系列的解析を行ったところ, Pyr 添加後 4-8 時間における取り込みが最大となった。これらの結果より, 細胞外 Pyr は培養肝細胞 HepG2 のミトコンドリアの生合成または機能を増大させ, 細胞内へのグルコースの取り込みやそれに続く中性脂肪の合成を促進させたと考えられた。また, 細胞内に存在する微量代謝産物を高感度かつ安価に測定するための測定系の検討を行い, 実際に用いて実験を行うことができた。

本研究を遂行するにあたり, 得られた成果を下記に示す。

タイトル : 培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討

著者 : 倉若 美咲樹, 佐々木 菜穂, 志村 二三夫, 山崎 優子

掲載雑誌 : 十文字学園女子大学紀要第 49 集, 83-94

年月日 : 2019 年 3 月

概要 : グルコアミラーゼによるグリコーゲンの分解で生成するグルコースを, 蛍光原基質を用いてグルコースオキシダーゼ法で検出する, グリコーゲンの高感度定量法を検討した。定量範囲は 0.1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, 細胞実験レベルの微量グリコーゲンの定量に活用できる。培養肝細胞 HepG2 のグリコーゲン量を本酵素蛍光法により定量したところ, 培地の栄養状態による細胞内グリコーゲン量の消長を鋭敏に検出することができた。

3. 研究成果の公表実績・予定 (年月日, 方法)

【公開実績】

1. 2019 年 3 月. 学術論文.

培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討. 倉若 美咲樹, 佐々木 菜穂, 志村 二三夫, 山崎 優子. 十文字学園女子大学紀要第 49 集 : 83-94. 平成 31 年 3 月.

【公開予定】

1. 2019 年 9 月. 学会発表.

日本栄養改善学会学術総会にて口頭発表予定.

2. 2019 年 9 月. 学術論文.

英文論文執筆完了 : 学術雑誌に投稿予定.