

## 様式3

## 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 4年 4月 4日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 順天堂大学スポーツ健康科学部  
職 名 教授  
研究代表者 久保原 禪

下記のとおり令和3年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 20010)

1. 共同研究課題名	新規肥満・糖尿病治療薬の開発とその作用機序解析			
2. 共同研究目的	<p>近年、我々は細胞性粘菌由来の化合物 DIF-1 (右図)とその誘導体が哺乳類細胞の糖代謝を促進することを見出した。 本共同研究では、DIF-1 をリード化合物とした新規肥満・糖尿病治療薬の開発を目指すと共に、それら薬剤の作用機序を解析する。</p>			
3. 共同研究期間	令和3年 4月 1日 ~ 令和4年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 久保原 禪	スポーツ健康科学部/大学院スポーツ健康科学研究科	職名:教授 学位:理学博士 取得年月日:1991.5.23	研究の総括	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏 名	佐藤 隆史

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

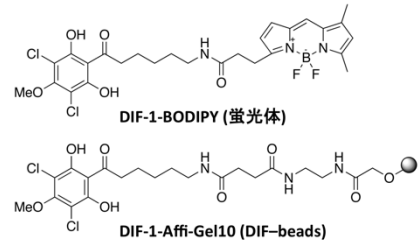
#強い活性を有するDIF-1とDIF-1(3M)を用いて以下を進める。とりわけ「DIF刺激によってGLUT1が細胞膜へ移行する仕組み」とこれまで未開拓であった「筋細胞におけるDIFの作用」を解明したい。

### ◎Western blot法、RNAi法による解析 (3T3L1細胞を利用)

Confluent状態のマウス3T3L1細胞(モデル正常細胞)を±DIFで培養し、タンパク質や核酸を回収後、シグナル伝達関連タンパク質等の発現や活性変化を、Western blot法、RNAi法等を利用して解析する。

### ◎DIF-binding proteins (DBPs)の同定と細胞内局在の解析 (3T3L1細胞を利用)

3T3L1細胞の抽出物からDIF-1-BODIPYやDIF-beads(図:合成済み)を利用してDBPsを部分精製する→サンプルをSDS-PAGEで展開後、DBP候補バンドを切り出しLC-MS/MS法でDBPsを同定する→DBPsの機能や細胞内局在の解析を進める。



### ◎筋細胞におけるDIFの糖代謝促進作用の解析 (C2C12細胞を利用)

マウス横紋筋由来C2C12細胞をin vitroで分化誘導し、筋管細胞を得る。筋管細胞を±DIFで培養後、培地中のグルコース濃度を測定することによって、糖代謝速度を計測する。この系を確立後、DIFの作用機序解析を行う。→DIFによる代謝(解糖系/TCAサイクル等)への影響を解析する(3T3L1細胞においては解析済)。

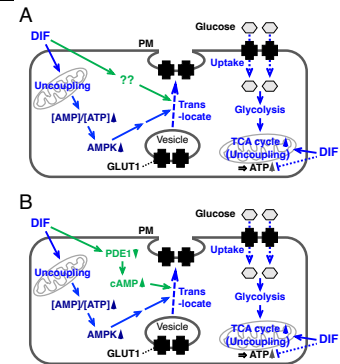
## 7. 共同研究の成果

我々はこれまでにDIF-1がミトコンドリア uncoupler として機能し、AMPK 活性化を介して、グルコース取り込みを促進することを報告してきたが、AMPK 非依存的経路が存在する可能性も示してきた(図A; Kubohara et al. 2021, IJMS)。一方、我々はDIF-1がカルモジュリン依存性 cAMP/cGMP 分解酵素(Phosphodiesterase 1: PDE1)の阻害剤であることも報告してきた(Shimizu et al. 2004, Cancer Res.)。

そこで今回我々は3T3-L1細胞を用いて、①DIF-1が細胞内cAMP濃度を上昇させること、②Forskolin (adenylyl cyclase activator)や細胞膜透過性cAMPアナログ8-bromo-cAMP (Br-cAMP)が細胞の糖取り込みを促進すること等を見出した。これらの結果は、DIF-1が少なくとも一部細胞内cAMP濃度上昇を引き起こすことで細胞のグルコース取り込みを促進している可能性を示唆している(図B)。

また、我々は、C2C12筋管細胞を用いて、③DIF-1が同細胞のグルコース取り込みを促進することを示し、現在その作用機序解析を進めている。

これまでに我々は、DIF-beadsとLS-MS/MS法を用いて、DIF-binding protein (DBP)の1つ mitochondrial malate dehydrogenaseを同定しているが、現在、④他のDBPsも同定し、解析を進めている。



8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

- ① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文  
なし
- ② この共同研究に基づくとの記載のある論文  
なし(現在、投稿準備中)
- ③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)  
なし
- ④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)  
(コロナ禍における研究の進展が遅く、共同研究に関する情報交換までは至らなかった)