

積が若干促進された。また、分化誘導4日目から化合物**2**を添加した場合は、未処理と比べてほとんど差が見られなかった。一方、十分に分化させた後に化合物**2**を処理した細胞では、未処理に比べて脂肪滴の蓄積が減少する傾向が見られた。これは、先行研究におけるGW9662及び化合物**1**の共処理時と同様の活性フェノタイプであった。現在、この活性フェノタイプが、GW9662及び化合物**1**共処理時と同じくPPAR γ 依存的な現象であるか、siRNAによるノックダウン実験により検討を行っている。

3. ま と め

GW9662及びケイヒ酸誘導体の構造を融合させた構造の化合物を合成し、PPAR γ を μ M以下の濃度で活性化する新規共有結合性アゴニスト**2**を新たに見出した。本化合物は、先行研究により見出されたGW9662及び化合物**1**の共処理

と同じく、分化後の3T3-L1脂肪細胞における脂肪蓄積を減少させる傾向を示した。今後は、本活性がPPAR γ 依存的な現象であるか検討を行うとともに、化合物**2**処理時の下流遺伝子の発現や会合する共役因子の同定を行う予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., Kawada, K., Han, J., Isoda, H., Neffati, M., Akita, T., Maejima, K., Masuda, S., Kambe, T., Mori, N., Irie, K., Nagao, M. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **440**, 204-209

レスベラトロールの蛍光標識化と細胞内動態追跡

東京農業大学 応用生物科学部
生物応用化学科 小林謙一

背 景

近年、“Neutriceutical”なアプローチが、食品の機能を考えるうえで重要であるという認識が高まりつつある。“Neutriceutical”なアプローチとは、生体内の機能維持あるいは改善を目的として、生体内で生理機能を有する化合物、そして食事を通して摂取する天然由来化合物を経口的に摂取して補給するという考え方である。これは、食品に対して、単なる栄養機能だけでなく、薬理効果に近い機能を期待するものといえる。従って、これらの食品の機能性を検討するためには、栄養学的研究視点の他に、薬理学的な観点からの研究が必要となってくる。薬理学的研究の重要なものの一つに、「薬物動態」がある。薬物動態は、薬物が生体内特に細胞内へ「どのように」取り込まれて、「どのような」挙動を示すのかを明らかにすることである。これは、薬理効果を分子レベルで明らかにするために、重要な側面の一つである。その手法の中で、近年注目集めているのが、化合物の蛍光標識化とそれを用いた細胞内動態解析法がある。これは、光学顕微鏡や電子顕微鏡の向上はもとより、各オルガネラを生細胞で観察可能な細胞内マーカーや固定技術の飛躍的な発展によって可能にしてきた。

我々は、抗癌剤であるシスプラチンを蛍光標識し、光学-電子線相関顕微観察法（CLEM法）という方法で、シスプラチンの細胞内動態を詳細に解析してきた。そこで、

このストラテジーを食品分野に応用し、機能性食品成分の細胞内動態追跡システムを構築しようと考えた。そこで、我々は、オリーブ葉ポリフェノールの代謝産物であるヒドロキシチロソール、ウコンポリフェノールであるクルクミン、大豆イソフラボンであるゲニステインの蛍光標識化と細胞内動態の解析に着手し、それに成功した。

本研究では、蛍光標識機能性食品分子の次なるターゲットとして、赤ワインに含有するポリフェノールの一種であるレスベラトロールに着目した。レスベラトロールは、長寿遺伝子産物であるSirtuinの活性化物質として注目を集めている。他にも動脈硬化や癌のリスクの低減に効果があるとされているが、レスベラトロールの効果については疑問視する報告もある。このように、レスベラトロールは有望な機能性食品分子ではあるものの、検討すべき課題の多い分子でもあることから、蛍光標識化による新たな実験系で検討を行えば、新たな展開が開けるものと考えた。そこで本研究では、レスベラトロールの機能解明の一つとして、レスベラトロールの蛍光標識化に着手し、培養細胞レベルでの細胞内動態解析を実施した。

方 法

1) 蛍光標識レスベラトロールの作製

レスベラトロールの3位の水酸基と4'位の水酸基についてそれぞれ、リンカーとしてエチレンを用いて、フルオロセインイソシアネート（以下FITC）で標識した2つの化合物を合成した。その後、HPLCとLC/MSを用いて、FITC標識クルクミンの精製度を確認した。（Fig.1）

2) 蛍光標識オリーブ葉ポリフェノールの蛍光顕微鏡を

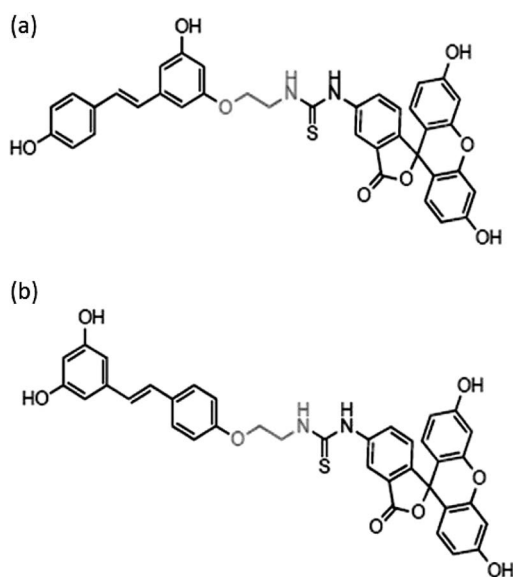


Fig. 1. FITC-レスベラトロールの化学構造
(a) 3位の水酸基にFITC標識したレスベラトロール
(b) 4'位の水酸基にFITC標識したレスベラトロール

用いた細胞内動態解析

Caco-2をFITC-HTで処理後、細胞内小器官マーカー（核マーカー（Hoechst 33342）、リソソームマーカー（Lyso-Tracker Red））と反応させ、細胞内に取り込まれたヒドロキシチロソールの細胞内局在性について検討した。

結果・考察

本研究では、レスベラトロールの3位の水酸基と4'位

の水酸基をフルオロセインイソシアネート（以下FITC）で標識した2つの化合物を合成した。（Fig. 1）

この2種類のFITC-レスベラトロールCaco-2細胞における細胞内局在性を検討した結果、両FITC-レスベラトロールを250 μ Mの濃度で処理すると、ともにCaco-2細胞に取り込まれること、核には局在せず、リソソームにおいて一部局在することが確認された。しかし、リソソームに局在していたFITC-レスベラトロールは一部にとどまっていた結果を踏まえると、他の細胞内小器官への局在も考えられるので、今後検討していく予定である。また、コントロールとしてFITCのみの細胞内局在性を検討したところ、わずかに細胞内に取り込まれたものの、顕著に減少していることが示された。従って、今回のFITC-レスベラトロールの細胞内挙動が、FITCによるものではなく、レスベラトロールに依存したものであることが示唆された。

近年、質量分析技術が飛躍的に進展し、質量顕微鏡などによる特定分子の挙動を追跡することは可能になってきたものの、「生きた」細胞のモニタリングはできない。しかし、本蛍光標識化合物は、「生きた」細胞で用いることができるというメリットがある。これらの方法を組み合わせれば、機能性食品成分の新規機能性評価法に新たな道を開けることになるであろう。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

病原細菌のIII型分泌装置阻害物質の標的タンパク質の同定

北里大学大学院感染制御科学府 特任助教 浅見行弘

背 景

サルファ薬やペニシリンの導入以来、現在に至っても化学療法剤に対して耐性を示す病原体の出現が、深刻な問題となっている。また、治療法が未だに確立されていない感染症も多く、新たな化学療法剤が望まれている。一方、近年、病原性細菌をはじめとした病原体の個々の病原性因子の役割がより詳細に解明され、病原性細菌の宿主への付着や侵入などの病原性に関わる遺伝子や、そのメカニズムが徐々に解明されてきており、これらは新規薬剤の標的として期待されている。

したがって、従来の化学療法剤のような作用を有する薬剤に加えて、病原体の病原性をコントロールできる薬剤や

宿主の免疫力を高める薬剤等を含めた抗病原性細菌薬の研究開発には意義があると考えられる。そこで、菌の「生存」ではなく「感染過程」に作用して効果を示す薬剤を開発できれば、既存の抗菌薬の持つ問題を克服することができると考えてきた。緑膿菌やO-157などに代表されるグラム陰性病原細菌の「感染過程」で働くIII型分泌機構（以下T3SS）に着目した（図1）。T3SSはグラム陰性病原細菌に高度に保存されている病原性因子宿主移行メカニズムであり、これら細菌が宿主に感染し病原性を発現する際に本機構が必須であることが近年明らかにされつつある（Kauppi, AM. *et al. Chem. Biol.*, 2003, **10**, 241-249）。

しかしながら、これまでの抗グラム陰性細菌薬の開発においては核酸合成阻害、タンパク質合成阻害、膜障害など菌の「生存」に影響して効果を示す薬剤の開発が主流であるため、耐性菌の出現が問題となり、既存の抗菌薬が持つ問題を克服することは非常に困難であった。そのため近年「感染過程」に着目した研究が開始され、これまでに、