

構造の明確な受容基質を用いたアッセイ系が構築できたことおよび大腸菌を用いた組換え体を調製することが可能となったため、部位特異的変異導入法を用いることで、酵

特異な脂肪細胞分化を誘導する核内受容体リガンドの遺伝子発現機構解析

— 10 —

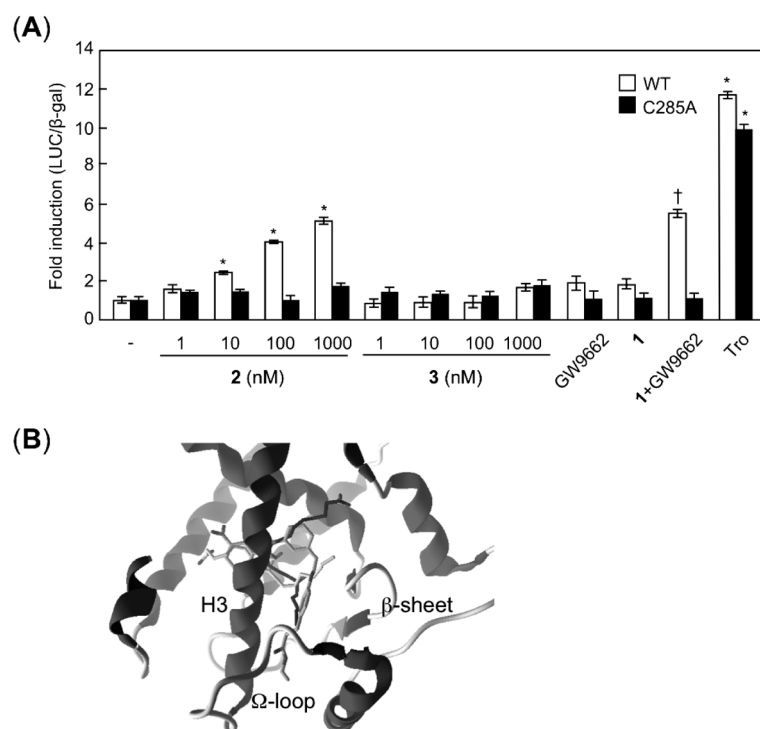


図2 (A) 化合物2及び3のPPAR γ アゴニスト活性. GAL4-UAS システムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量した. Tro: troglitazone (positive control) * $p < 0.01$, compared with vehicle control. † $p < 0.05$, compared with cells treated without GW9662. (B) 化合物2の推定結合部位と、報告されている共有結合性不飽和脂肪酸の結合様式の重ね合わせ図.

化合物2及び3を *in vitro* で反応させた後、トリプシン処理して得られたペプチド断片混合物をESI-MS/MS解析にかけたところ、MSフラグメンテーション解析により、Cys285残基とGln286残基の間に化合物2の付加体の分子量が検出された。一方、化合物3では付加体の分子量は検出されなかった。これらの結果から、化合物2はPPAR γ LBDのCys285残基と共有結合を形成することが明らかになった。次に合成したリガンドがPPAR γ の活性化作用を有するか、GAL4-UASシステムを用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより検討を行った。その結果、化合物2は濃度依存的に、 μ M以下の低濃度でPPAR γ の転写活性を中程度、増大させた一方で、化合物3では一切活性化作用を示さなかった(図2A)。また、Cys285残基をアラニン置換した変異体レポータープラスミドでは、化合物2の活性化作用が消失した。これらの結果から、化合物2はCys285残基への共有結合を介してPPAR γ を活性化することが示された。さらに化合物2はPPAR α やPPAR δ といった他のサブタイプに対しては活性化作用を示さなかったことから、サブタイプ選択的な共有結合性PPAR γ アゴニストであることが明らかになった。

3) ハイブリッド型リガンドの推定結合様式の解析

PPAR γ の共有結合性アゴニストは、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ2) や15-oxo-eicosatetraenoic acid

(15-oxo-EETE) など内在性不飽和脂肪酸及びその代謝物が報告されているが、合成アゴニストはほとんど知られていない。そこで、Molegro Virtual Dockerを用いたドッキングシミュレーションにより化合物2の推定結合様式の解析を行い、既知内在性共有結合性アゴニストの結合様式との比較を行った。化合物2を15-oxo-EETE結合型PPAR γ の結晶構造(PDB code: 2ZK4)にドッキングさせたところ、化合物2の推定結合部位が、内在性脂肪酸の結合部位と部分的に一致した(図2B)。一方で、化合物2はhelix 3の周囲を覆うような位置に結合し、脂肪酸類と比較して Ω -loopや β -sheetを構成する残基に、より直接的に相互作用することが推定された。

4) マウス由来3T3-L1細胞における脂肪蓄積に与える影響

次に、マウス由来3T3-L1細胞における脂肪蓄積に与える影響を検討した。分化前の3T3-L1前駆脂肪細胞を3-isobutyl-1-methylxanthine, デキサメタゾン, インスリンにより分化誘導し、10日間培養後の細胞における脂肪滴の蓄積の有無をOil Red O染色により観察した。試験化合物は、分化開始時、分化誘導4日目、十分に分化させた後の3つのタイミングで処理し、それぞれの時期で脂肪蓄積にどのような影響が見られるか検討した。その結果、分化開始時に化合物2を処理すると、未処理に比べ、脂肪滴の蓄

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