

転移活性を全く示さないことも明らかにした。これらのことから、GfsA は O-グリカン末端の Gal<sub>f</sub> 残基に  $\beta$ 1, 5-Gal<sub>f</sub> を 2つまで転移する酵素であることが明らかになった。また、GfsB および GfsC に関しても酵素活性を調べたところ、GfsA と同じ酵素活性を有することが明らかになった。

構造の明確な受容基質を用いたアッセイ系が構築できし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つたため、部位特異的変異導入法を用いることで、酵

素の構造改変や詳細な機能解析が行えるようになった。また、立体構造を解明することも可能となった。今後、立体構造情報やこのアッセイ系を用いることで新規な抗真菌薬となる GfsA の酵素活性阻害剤のスクリーニングを目指す予定である。最後に、本研究を遂行するにあたり、援助してくださいました公益財団法人農芸化学研究奨励会に感謝申し上げます。

## 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

京都大学大学院生命科学研究科 助教 宮前友策

### 1. 背 景

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は核内受容体スーパーファミリーの一種であり、糖や脂質代謝、炎症など細胞内の様々な応答に関与する。核内で retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上の応答配列に結合する。PPAR $\gamma$ の転写活性はリガンドにより制御されることが知られ、リガンド結合により構造変化が生じると、複数の共役因子と解離、及び会合し複合体を形成することで、標的遺伝子の転写が制御される。PPAR $\gamma$ のリガンド結合ドメイン (ligand-binding domain: LBD) には、複数のサブポケットから構成される巨大な Y 字型の結合ポケットが存在する。本ポケットに結合するリガンドの化学構造によって、立体構造の変化や、会合する共役因子に違いが生じ、下流遺伝子の発現や生理作用の表れ方が異なることが知られる。

受領者らは、天然物を探索源とした新たな PPAR $\gamma$ アゴニストの探索研究を行い、複数種の天然由来アゴニストを単離してきた<sup>1)</sup>。その過程で、バンウコン根茎に豊富に含まれるケイヒ酸誘導体 **1** に、PPAR $\gamma$ の不可逆的アンタゴニストである GW9662 共存下でのみ、顕著なアゴニスト活性を示すという、ユニークな生物活性を有することを見出した。チアゾリジンなどの従来の PPAR $\gamma$ アゴニストは、白色脂肪細胞への分化を促進することが知られるが、興味深いことに、両化合物を共処理した 3T3-L1 細胞においては、PPAR $\gamma$ 依存的な脂肪蓄積の抑制が認められた。ドッキングスタディから、両化合物は従来のアゴニストとは異なるサブポケットに結合することが示唆されたため、結合により生じ得る PPAR $\gamma$ の立体構造変化が異なることにより、従来とは異なるフェノタイプが表れたと考えられる。しかし、これらの化合物が結合した PPAR $\gamma$ に会合する転

写共役因子やその結合部位等、詳細な遺伝子発現機構は明らかではない。本研究では、特異な脂肪細胞分化を制御すると考えられる、両化合物による PPAR $\gamma$ 活性化機構を、包括的に明らかにすることを目的とした。

### 2. 方法と結果

#### 1) GW9662 及びケイヒ酸誘導体の両者を融合させたハイブリッドリガンドの合成

両化合物により誘導されると考えられる特異な PPAR $\gamma$ 活性化機構を解析するにあたり、それぞれの化合物の off-target 効果やそれらの相乗的な影響による解析結果の複雑化が懸念された。そこで、両化合物共処理時と同様の活性フェノタイプを示す单一の化合物が得られれば、複数の化合物の影響による解析結果の複雑化を緩和できると考え、両化合物を融合させた構造を有するハイブリッド型リガンドの合成に着手した。両化合物を用いたドッキングシミュレーションにより、**1** は GW9662 存在下で、H3,  $\beta$ -sheet,  $\Omega$ -loop から構成される  $\Omega$ -pocket に結合する可能性が強く示唆されている。この推定結合様式に基づき、GW9662 の芳香環のメタ位にケイヒ酸誘導体を結合させた化合物**2** (図1) をデザインし、合成した。市販の化合物を出発原料として、計 7段階の反応により化合物**2**を得た。また、GW9662 ユニットの塩素原子を水素原子に置換した化合物**3** も同時に合成した。

#### 2) 合成したハイブリッド型リガンドの活性評価

まず、合成したリガンドが Cys285 残基と共有結合を形成するか、検証した。リコンビナント PPAR $\gamma$  LBD と化

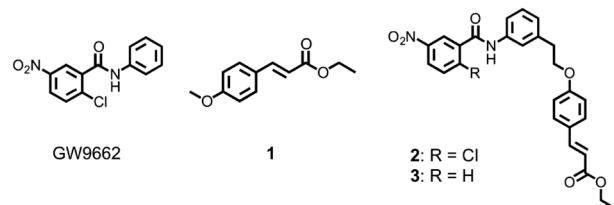


図1 GW9662, 化合物**1**, **2**, 及び**3** の構造。

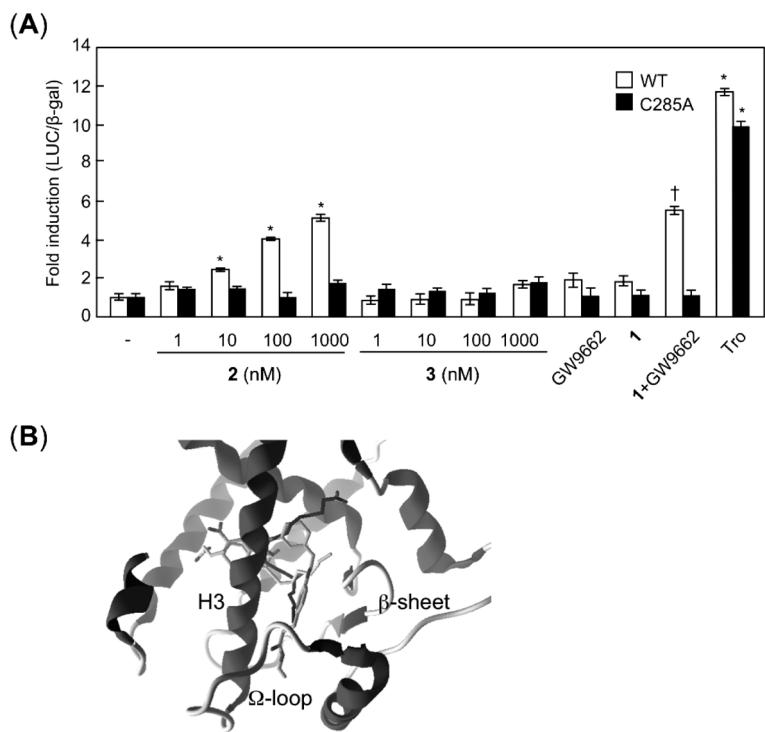


図2 (A) 化合物2及び3のPPAR $\gamma$ アゴニスト活性。GAL4-UASシステムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量した。Tro: troglitazone (positive control) \* $p<0.01$ , compared with vehicle control. † $p<0.05$ , compared with cells treated without GW9662. (B) 化合物2の推定結合部位と、報告されている共有結合性不飽和脂肪酸の結合様式の重ね合わせ図。

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 $\gamma$  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 $\gamma$ 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、 $\mu\text{M}$ 以下の低濃度でPPAR $\gamma$ 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 $\gamma$ を活性化することが示された。さらに化合物2はPPAR $\alpha$ やPPAR $\delta$ 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つたことから、サブタイプ選択的な共有結合性PPAR $\gamma$ 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 $\gamma$ の共有結合性アゴニストは、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ2) や15-oxo-eicosatetraenoic acid

(15-oxo-ETE)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-ETE結合型PPAR $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ を $\mu\text{M}$ 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 $\gamma$ 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) Ohdera, 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、“Neutraceutical”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。“Neutraceutical”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、近年注目を集めているのが、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ニンを蛍光標識し、光学-電子線相関顕微鏡法(CLEM法)という方法で、シスプラチニ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へた。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