

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18701

研究課題名(和文)メチルキサンチン誘導体の抗肥満効果の検証と高機能化

研究課題名(英文)Effect of methylxanthin derivatives on obesity

研究代表者

三谷 壘一(Mitani, Takakazu)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：40773304

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):テオブロミンはカカオ豆由来のメチルキサンチン化合物である。テオブロミンを摂取させたマウスにおいて脂肪重量の増加が抑制され、脂質形成に關与する遺伝子の発現が抑制された。3T3-L1細胞を用いた実験から、テオブロミンはアデノシン受容体1(AR1)に結合すること、ユビキチンプロテアソーム系によるC/EBP $\beta$ の分解を誘導することを見出した。さらにテオブロミンによるC/EBP $\beta$ の分解誘導にはC/EBP $\beta$ のSUMO化が關与した。以上の結果から、テオブロミンはAR1を介してC/EBP $\beta$ のSUMO化と分解を誘導することで、脂質形成を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文):Theobromine is a methylxanthine derived from cacao beans. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanisms of the anti-adipogenic effect of theobromine. Theobromine administration attenuated gains in adipose tissue weights in mice. In addition, theobromine suppressed expression of adipogenic-associated genes in mouse adipose tissue. we found that theobromine selectively interacts with adenosine receptor A1 (AR1) and induced degradation of C/EBP $\beta$  protein by the ubiquitin-proteasome pathway. Furthermore, theobromine increased sumoylation of C/EBP $\beta$ . These results indicate that theobromine suppresses adipocyte differentiation and induced C/EBP $\beta$  degradation by increasing its sumoylation, and suggest that the inhibition of AR1 signaling is important for theobromine-induced C/EBP $\beta$  degradation.

研究分野：農学

キーワード：テオブロミン 脂肪細胞 アデノシン受容体 機能性食品成分

1. 研究開始当初の背景

飽食の時代となった日本を含む先進国では、過剰な栄養供給と運動不足から、体内に過剰な脂肪を溜め込み病態化した肥満症人口が増加している問題がある。肥満症の予防について機能性食品成分を用いた研究が広く行なわれており、特に植物由来のポリフェノールによる抑制効果が報告されている。しかし、ポリフェノールは体内への吸収性に乏しく、また消化管で抱合代謝を受け易いというデメリットが存在する。そこで、消化管で抱合化を受けにくい植物由来の非ポリフェノール化合物であるメチルキサンチン誘導体に着目し、脂肪細胞の肥大化を抑制する分子機構を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 脂肪細胞の肥大化を抑制する分子機構の解明

研究代表者は、カカオ豆中のメチルキサンチン誘導体(テオプロミン: 3,7-ジメチルキサンチン)【図1】が脂肪細胞の肥大化を抑制すること、そして、テオプロミンが分化初期の鍵因子である C/EBPβ のタンパク質レベルを減少することを見出している。テオプロミンは、非ポリフェノール化合物であり、生体内で抱合代謝反応を受けないことから、培養細胞での脂肪細胞の肥大化に対する抑制効果は、動物個体レベルにも有効であることが期待できる。しかし、その詳細な分子機構は未だ不明である。また、肥満症の予防に対する食品成分の効果の研究は国際的に進んでいるものの、脂肪細胞における食品成分の標的分子の同定は遅延している。そこで、培養細胞を用いて脂肪細胞におけるテオプロミンの標的分子を同定することで、テオプロミンによる C/EBPβ のタンパク質レベル減少の詳細な分子機構を明らかにする。さらに、動物個体においても、培養細胞と同じ分子機構でテオプロミンが脂肪細胞の肥大化を抑制するのかを検討する。

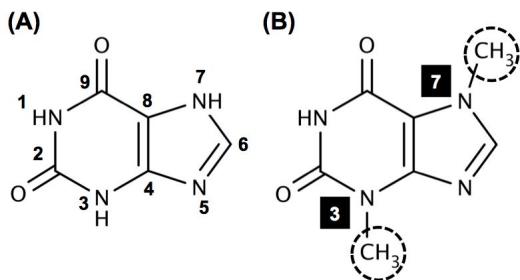


図1. キサンチン(A)とテオプロミン(B)の構造

(2) 化学修飾による高機能化メチルキサンチン誘導体の創製

テオプロミンを含む各種メチルキサンチン誘導体を用いて構造活性相関を解析することで、脂肪細胞の肥大化を抑制するテオプロミンの活性部位を同定する。さらに、その解析結果を発展させ、活性部位以外の部位に水溶性の高い糖鎖を修飾することで水溶性、安定性を向上させたメチルキサンチン誘導体

の創製に展開する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の肥大化を抑制する分子機構の解明

タンパク質分解経路の決定: 予備実験で見出しているテオプロミンによる C/EBPβ のタンパク質レベルの減少の分子機構を解明する。テオプロミンは C/EBPβ の mRNA レベルには影響を示していないので、C/EBPβ のタンパク質の分解に着目して解析する。方法としてタンパク質分解(プロテアソーム、オートファジーなど)の阻害剤を使用してタンパク質分解経路を検討し、その上流のシグナル伝達系を明らかにする。

翻訳後修飾の検討: C/EBPβ は様々な翻訳後修飾を受けることで、転写活性化や分解が惹起される。そこで、テオプロミンによる C/EBPβ の翻訳後修飾の変化を解析する。方法として免疫沈降法や、C/EBPβ の組換え体を用いてプルダウン法により C/EBPβ を単離し、質量分析器により翻訳後修飾の変化を解析する。さらに、C/EBPβ の組換え変異体を作製することで、テオプロミンによって惹起される翻訳後修飾部位を同定する。

標的分子の同定: 脂肪細胞でのテオプロミンの標的分子を探索する。方法として、アフィニティ担体を結合させたテオプロミンと 3T3-L1 細胞の抽出物とを混合し、結合タンパク質を単離する。その後、質量分析器で同定する。計画どおりに進まない場合の対応として、テオプロミンと同じメチルキサンチン誘導体であるテオフィリン及びカフェインの標的分子であるアデノシン受容体(AR)がテオプロミンと結合するのかを検証する。

ノックダウン動物での効果の検証: 同定した標的分子(もしくは AR)を脂肪組織(精巣上体周辺脂肪)特異的にノックダウンさせた雄性マウスを作製する【図2】。ノックダウンマウスにテオプロミンを摂取させ、テオプロミンによる脂肪蓄積抑制効果が解除されるのかを検証する。

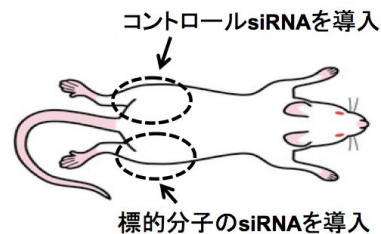


図2. ノックダウンマウスの作製図

左右の精巣上体周辺脂肪に siRNA を導入し、一過的に標的分子をノックダウンする。左右を比較することで一過性で標的分子の作用を検討できる。

(2) 化学修飾による高付加価値を持つメチルキサンチン化合物の創製

活性部位の同定: テオプロミンは、キサンチン骨格の 3、7 位がメチル化した構造を持つ。脂肪細胞の肥大化抑制に対するテオプロミンの活性部位を同定する為に、メチル基の結合箇所が異なるメチルキサンチン誘導体

を用いて、脂肪細胞の肥大化に対する効果を、テオプロミンを指標として比較する。

化学修飾による高機能化：操作で見出したメチルキサンチン化合物に化学修飾を施すことで効果が変化するかを解析する。

#### 4. 研究成果

(1)マウス線維芽細胞株(3T3-L1)をテオプロミンの存在下で脂肪細胞へと分化させた結果、脂肪細胞への分化初期に働く転写因子である C/EBPβ の分解を亢進した。プルダウンアッセイの結果から、テオプロミンは細胞膜受容体であるアデノシン受容体 1 (AR1) と相互作用することが示され、AR1 をノックダウンすることで、テオプロミンによる脂肪滴蓄積の減少と C/EBPβ の分解亢進は解除された。C/EBPβ は SUMO 化されることでユビキチンプロテアソーム系による分解が誘導される。テオプロミンは C/EBPβ の SUMO 化を誘導し、AR1 をノックダウンすることでテオプロミンによる SUMO 化の亢進は解除された。雄性 ICR マウスにテオプロミンを 1 週間経口投与したところ、対照群と比較してテオプロミン投与群では体重と生殖腺周辺脂肪重量の増加が抑制された。さらに、雄性 ICR マウスの生殖腺周辺脂肪組織の AR1 をノックダウンした状態でテオプロミンを摂取させた結果、テオプロミンによる脂肪重量の低減効果は解除された。以上の結果をまとめるとテオプロミンは AR1 を介して C/EBPβ の SUMO 化を亢進することでタンパク質の分解を誘導することが示され、それが脂質形成の抑制に繋がっていると考えられる【図 3】。この結果は、テオプロミンが肥満を抑制する化合物であるという発見だけでなく、メチルキサンチン化合物が肥満を抑制することに繋がる基礎的な情報である。メチルキサンチン化合物は様々な薬剤のシード化合物であることから、今後この情報を基に抗肥満薬剤の開発という分野への波及が見込まれる。また、AR1 が脂質形成に重要であるという結果から、AR1 を標的分子とした肥満予防戦略への展開が考えられ非常に食品分野内外にインパクトのある成果であると言える。

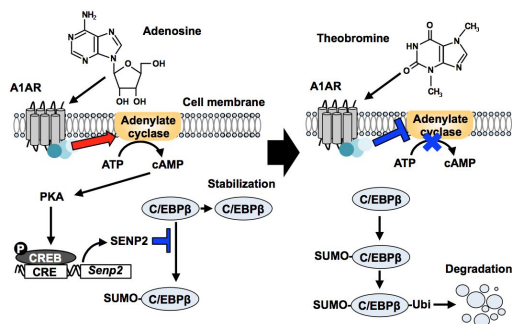


図3. テオプロミンによる脂質形成の抑制メカニズム  
左がテオプロミン非存在での脂質形成に関する経路  
右がテオプロミン存在下での脂質形成に関する経路

(2)自然界に存在するメチルキサンチン化合物であるカフェイン、テオフィリン、テオ

ロミンで脂質蓄積に及ぼす影響を比較したところ、テオフィリンはテオプロミンよりも低濃度で脂質蓄積を抑制した。一方、脂質蓄積の抑制効果に関するカフェインの効果は、テオプロミンと比較して非常に弱いことが示された。テオプロミンのアミノ基にカルボン酸を結合することを試みたが、収率及び安定性が低かった。そこで、テオフィリンのアミノ基にカルボン酸を結合することを試みた。その結果、テオフィリンの7位のアミノ基にカルボン酸を結合した(テオフィリン7-カルボン酸とする【図4】)ことで水溶媒への溶解性が向上しつつ、テオフィリンと同等の脂質蓄積抑制効果が得られた。また、テオフィリンとテオフィリン7-カルボン酸は、脂肪細胞においてグルココルチコイド受容体と相互作用することが示された。さらに、脂質蓄積の抑制だけでなく、脂肪細胞由来のサイトカインである IL-6 の産生を抑制することが示された。以上の結果から、テオプロミンよりも強い脂質蓄積抑制効果を持つテオフィリンを見出し、カルボン酸を付加することで水溶性を高めるといった高機能化化合物を得た。

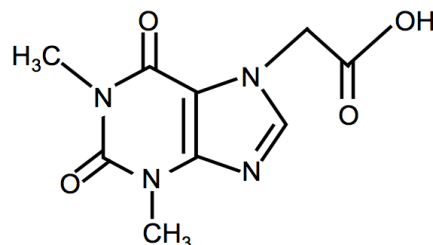


図4. テオフィリン7-カルボン酸の構造

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mitani T, Takaya T, Harada N, Katayama S, Yamaji R, Nakamura S, Ashida H. (Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes), *Arch Biochem Biophys*, 646 巻, 98-106, 2018, 査読有

DOI: 10.1016/j.abb.2018.04.001.

Mitani T, Watanabe S, Yoshioka Y, Katayama S, Nakamura S, Ashida H. (Theobromine suppresses adipogenesis through enhancement of CCAAT-enhancer-binding protein β degradation by adenosine receptor A1), *Biochim Biophys Acta*, 1864 巻, 2438-2448, 2017, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.09.017

〔学会発表〕(計5件)

三谷 壘二、片山茂、中村宗一郎(テオフィリンはグルココルチコイド刺激による脂肪細胞からの IL-6 の産生を抑制する), *ConBio2017*, 2017.

Takakazu Mitani, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura (Theophylline decreases interleukin-6 production through inhibition of glucocorticoid receptor signaling in 3T3-L1 cells), *ISNFF2017*,

2017.

三谷 壘一, 片山茂, 中村宗一郎, 芦田均( テオプロミンはアデノシン受容体 A1 を介して脂肪の蓄積を抑制する ), 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会, 2017.

三谷 壘一, 片山茂, 中村宗一郎 ( テオフィリンによるグルココルチコイド受容体を介した IL-6 の発現抑制作用 ), 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017

三谷 壘一, 片山茂, 中村宗一郎 ( 食品由来メチルキサンチン類による炎症性アディポカインの産生抑制機構の解明 ), 日本食品化学学会第 22 回総会, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

三谷 壘一 ( MITANI, Takakazu )

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究・助教 ( 特定雇用 )

研究者番号 : 40773304