

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790014
 研究課題名 (和文) 核内受容体リガンド活性を介した内臓脂肪減少作用を有する新規天然化合物の探索
 研究課題名 (英文) Researches into natural compounds with reducing effect for visceral fat mediated by nuclear receptor ligand binding
 研究代表者
 黒田 明平 (KURODA MINPEI)
 東京薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：80266890

研究成果の概要：生薬・甘草 (カンゾウ: *Glycyrrhiza glabra* を基原とするもの) の EtOH 抽出物に PPAR γ リガンド活性を見出したため、同抽出物についてリガンド活性を指標とした成分検索を実施した。その結果、新規化合物 7 種を含む計 30 種のフェノール性化合物を単離し、それらの構造を NMR を中心としたスペクトル解析により決定した。単離された化合物の内、10 種の化合物が強い PPAR γ リガンド活性を示し、活性強度および含有率より glabridin が EtOH 抽出エキスのリガンド活性に大きく寄与していることが示された。また、構造活性相関として、エーテル環が開裂し、水酸基とプレニル基になることでリガンド活性が増強することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	600,000	0	600,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	150,000	2,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：メタボリックシンドローム、核内受容体、PPAR γ リガンド活性、カンゾウ、*Glycyrrhiza glabra*、フェノール性化合物、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは主に肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの重複した病態を示し、これらの病態は日本人の死亡原因の 2、3 位である脳卒中、心筋梗塞の原因とされる動脈硬化発症の基盤となるマルチプルリスクファクター症候群として重要視されている。肥満の中でも腹腔内に脂肪が蓄積する内臓脂肪型肥満は、メタボリックシンド

ロームに大きく関与し、内臓脂肪はインスリン抵抗性を惹起する TNF- α や FFA、高血圧を誘発するアンジオテンシノーゲン、血栓形成を誘導する PAI-1 などのアディポサイトカインを分泌することが報告されている。よって、内臓脂肪を減少させることにより、メタボリックシンドロームの改善が期待される。
 (2) PPAR γ 合成リガンド化合物であり、インスリン抵抗性改善を作用機序とする II 型糖尿

病治療薬であるトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンは、臨床において内臓脂肪の減少が報告されている。ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ (PPAR γ) は脂質代謝を維持する遺伝子群の発現制御を担う転写制御因子として同定された核内受容体ファミリーに属するリガンド依存性転写制御因子であり、哺乳動物では3種のサブタイプが存在する。その中でも PPAR γ は主に脂肪組織に発現している脂肪細胞の分化・成熟を制御するマスターレギュレーターである。チアゾリジンジオン誘導体の血糖値低下作用のメカニズムは PPAR γ を活性化することにより、前駆脂肪細胞から分化した正常機能を有する小型脂肪細胞を増加させ、インスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインの産生や分泌が亢進している肥大脂肪細胞をアポトーシスにより減少させることでインスリン抵抗性を改善させることが提唱されている。

(3) 天然由来の PPAR γ リガンド活性化化合物として、アラキドン酸代謝物、不飽和脂肪酸類、エイコサノイド類などが知られている。また、フラボン誘導体のアピゲニン、フラボノール誘導体のケンフェロールの PPAR γ リガンド活性が報告されている。しかしながら、申請者による最近のカンゾウ (甘草: *Glycyrrhiza uralensis* を基原とするもの) やウコン (鬱金) の PPAR γ リガンド活性物質に関する研究以外は、PPAR γ リガンド活性を指標に生薬・植物成分の検索を行った例はない。

2. 研究の目的

(1) メタボリックシンドロームの基盤となる内臓脂肪に対して減少効果を示す化合物を、薬用植物 (漢方生薬、薬用植物、食用ハーブ) に着目し、EtOH 抽出物の PPAR γ リガンド活性を評価する。

(2) PPAR γ リガンド活性を示した EtOH 抽出物については、活性を指標に活性物質の単離を試みる。得られた活性物質の化学構造を明らかにし、構造活性相関について検討する。

3. 研究の方法

(1) 植物抽出物からの PPAR γ リガンド活性物質の探索: 薬用植物 (漢方生薬、薬用植物、食用ハーブ、乾燥重量 10 g) を 95% EtOH (40 mL) で加温 (60-70°C) 抽出する。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、薬用植物の EtOH 抽出物を調製する。EtOH 抽出物について PPAR γ リガンド活性を評価し、活性が認められた薬用植物については、EtOH 抽出物を再調製する (100 g 程度)。再調製した活性を示した抽出物を、ポリスチレン系多孔質樹脂であるダイアイオン HP-20 (三菱化学社製) を充填したカラムに付し、順次溶媒の極性を下げながら溶出させる (20%MeOH、MeOH、EtOAc)。

各溶出画分の PPAR γ リガンド活性を評価し、活性が認められた場合はさらにリガンド活性を指標に、シリカゲルあるいは逆相シリカゲルを充填したカラムクロマト、分取 HPLC を繰り返すことにより、活性物質の分離・精製を行う。得られた活性物質について、NMR を中心としたスペクトル解析 (^1H - ^1H COSY、2D-TOCSY、HSQC、HSQC-TOCSY、HMBC、NOESY スペクトル) および化学的手法により、立体構造を含めた全構造を明らかにする。単離された化合物の構造とその PPAR γ リガンド活性から、構造活性相関を明らかにする。

(2) PPAR γ リガンド活性試験: CV-1 細胞 (雄性アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞) を 96 穴培養プレートに 6×10^3 cells/well になるように植え込み、37°C、5%CO $_2$ 条件下で 24 時間培養する。培地には、10% FBS (ウシ胎仔血清)、10 mL/L ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (それぞれ 5000 IU/mL、5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、GIBCO 社)、37 mg/L アスコルビン酸を含む DMEM を用いた。細胞を OPTI-MEM で洗浄した後、pM-PPAR- γ と 4 x UASg-luc をリポポリフェクトアミン・プラスを用いてトランスフェクションする。なお、pM-PPAR- γ は、哺乳類発現プラスミドである pM に酵母由来転写因子 GAL4 遺伝子 (アミノ酸はいれつ 1-147) とヒト PPAR- γ リガンド結合部位遺伝子 (アミノ酸配列 174-475) を結合したキメラタンパクの遺伝子を挿入したプラスミドであり、4 x UASg-luc はルシフェラーゼ遺伝子の上位に GAL4 の応答配列 (UASg) を 4 回組み込んだレポーター・プラスミドである。トランスフェクションの約 24 時間後、サンプルを含む培地に交換し (n=4)、24 時間培養する。ハーブ・スパイス抽出物はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したものを、無処置対照には DMSO を用い、培地に 1/1000 量添加する。細胞を Ca、Mg 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS+) で洗浄した後、ルックライトを添加し、トップカウント・マイクロプレートシンチレーション/ルミネッセンスカウンターにてルシフェラーゼの発光量を測定する。測定群と同様に、コントロール群として pM-PPAR- γ の代わりに pM を用いて測定する。各ハーブ・スパイス抽出物について、測定群及びコントロール群の発光強度の平均値 (n=4) の比 (測定群/コントロール群) を算出し、無処置対照群に対する非活性をサンプルの PPAR- γ リガンド活性とする。活性の有無 (強弱) の判断基準は、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における抽出物の発光量がトログリタゾン (TRG) 0.5 μM におけるそれよりも多い場合に 活性あり と評価する。

4. 研究成果

G. glabra の根およびストロンの 95%EtOH 抽出物が PPAR γ リガンド活性を示した。次

いで、乾燥粉末 4 kg から得た 95%EtOH 抽出物 (121 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CC) に付し、CHCl₃-MeOH (19:1, 9:1, 2:1), MeOH にて順次溶出し、4 個の画分 [G-A 画分 (85.0 g)、G-B 画分 (17.1 g)、G-C 画分 (6.2 g)、G-D 画分 (11.0 g)] に分画した。CHCl₃-MeOH (19:1) 溶出画分である G-A に一番強い PPAR- γ リガンド活性が確認されたため (Fig. 1)、同画分について順相および逆相シリカゲル CC および逆相分取 HPLC にて繰り返し分離精製を行い、化合物 1-30 を以下の収量で単離した。

化合物 1: 5.4 mg ; 化合物 2: 17.3 mg ; 化合物 3: 8.0 mg ; 化合物 4: 13.8 mg ; 化合物 5: 17.4 mg ; 化合物 6: 5.8 mg ; 化合物 7: 6.5 mg ; 化合物 8: 2.5 mg ; 化合物 9: 10.5 mg ; 化合物 10: 10.5 mg ; 化合物 11: 37.1 mg ; 化合物 12: 194 mg ; 化合物 13: 11.4 mg ; 化合物 14: 8.6 mg ; 化合物 15: 54.7 mg ; 化合物 16: 13.7 mg ; 化合物 17: 10.7 mg ; 化合物 18: 28.8 mg ; 化合物 19: 3.0 mg ; 化合物 20: 41.0 mg ; 化合物 21: 32.4 mg ; 化合物 22: 3.0 mg ; 化合物 23: 7.8 mg ; 化合物 24: 8.0 mg ; 化合物 25: 18.5 mg ; 化合物 26: 13.5 mg ; 化合物 27: 5.0 mg ; 化合物 28: 17.4 mg ; 化合物 29: 32.4 mg ; 化合物 30: 21.6 mg

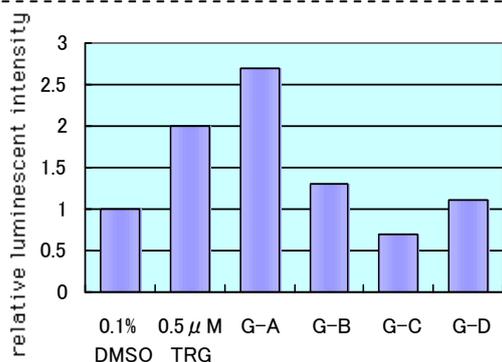


Fig. 1. PPAR γ ligand-binding activity of troglitazone (0.5 μ M TRG), and G-A, G-B, G-C and G-D fractions (5 μ g/ml).

NMRを中心としたスペクトル解析により、1、2、5、6、8-13、15-24、26、28 および 30 の構造をそれぞれ echinatin (1)、licochalcone B (2)、2',3,4'-trihydroxy-3'- γ,γ -dimethylallyl-6'',6''-dimethylpyrano[2'',3'':4,5]chalcone (5)、1-(2',4'-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-3-(4''-hydroxyphenyl)-1-propanone (6)、kanzonol Y (8)、(3R)-vestitol (9)、(3R)-2',3',7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavan (10)、kanzonol X (11)、glabridin (12)、4'-O-methylglabridin (13)、3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin (15)、hispaglabridin A (16)、hispaglabridin B (17)、glabrene (18)、kanzonol W (19)、shinpterocarpin (20)、O-methyl-

shinpterocarpin (21)、licoaogrocarpin (22)、shinflavanone (23)、xambioona (24)、glabrol (26)、8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromone-3-ol (28)、kanzonol U (30) と同定した (Fig. 2)。

マスマスペクトルおよびNMR (¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC、NOESY) NMRスペクトルを中心とした機器分析により構造決定を行ったところ、新規化合物 3、4、7、14、25、27、29の構造はそれぞれ 3,3',4,4'-tetrahydroxy-2'-methoxy-5-prenylchalcone、3',4,4'-tetrahydroxy-3,5'-diprenylchalcone、2',3,4,4', α -pentahydroxy-3',5'-diprenyl-dihydrochalcone、5'-formyl glabridin、(2R,3R)-3,4',7-trihydroxy-3'-prenylflavanone、7,8-dihydroxy-4'-methoxy-6-prenylisoflavanone、8-hydroxymethyl-8-methyl-3,4-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]-chromone-3-ol と決定された (Fig. 2)。化合物 1-8 は chalcone 誘導体およびその類縁化合物、9-17 は isoflavan 誘導体、18 は isoflavene 誘導体、19 は 3-arylcoumarin 誘導体、20-22 は pterocarpin 誘導体、23-26 は flavanone 誘導体、27 は isoflavone 誘導体、28、29 は chromone 誘導体、30 は 2-arylbenzofuran 誘導体である。化合物 3、4、7、14、25、27、29 はいずれも新規化合物である。化合物 14 のように isoflavan 骨格の B 環にアルデヒド基を有する化合物の天然からの単離報告は今回が初めてである。

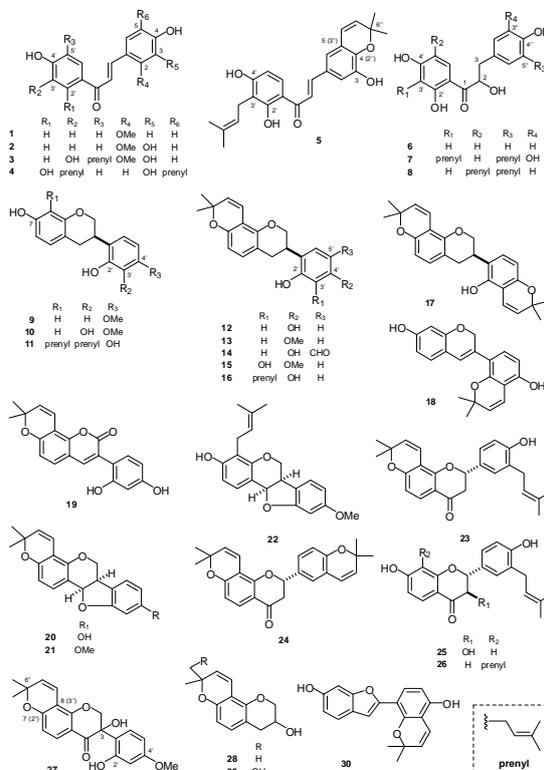


Fig. 2

単離された化合物のうち、**1**、**4**、**10-12**、**14**、**20**、**22**、**23**、**25**、**26**に強いリガンド活性が認められた (Fig. 3)。特に **12** はそのリガンド活性強度と含有率より、EtOH 抽出物のリガンド活性への大きな寄与が示された。

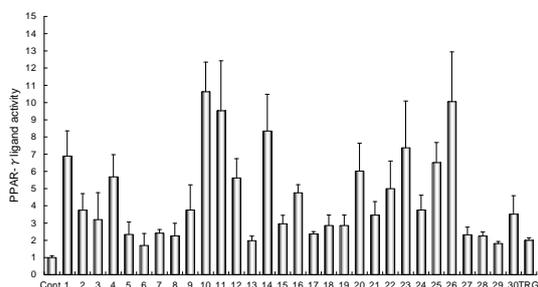


Fig. 3. PPAR- γ ligand binding activity of **1** – **30** at 10 μ g/ml

構造活性相関として構造中のエーテル環が開裂し、プレニル基と水酸基になることでリガンド活性が増強する傾向が認められた。

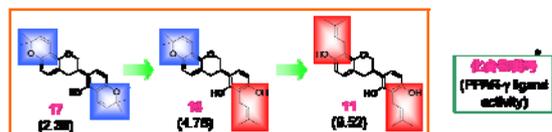


Fig. 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① 黒田明平 他 1 名、甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) からのペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ リガンド活性成分の探索と KK-A γ マウスに対する抗糖尿病活性、第 4 回甘草に関するシンポジウム、平成 20 年 6 月 28 日、大阪

② 黒田明平 他 5 名、甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 抽出物の PPAR γ リガンド活性成分の探索と抗糖尿病活性、第 49 回天然有機化合物討論会、平成 19 年 9 月 19 日、札幌

[図書] (計1件)

① 黒田明平 他 1 名、シーエムシー出版、薬用食品の開発 —薬用・有用植物の機能性食品素材への応用—、2007 年、pp. 92–102

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 明平 (KURODA MINPEI)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80266890

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：