

平成 21 年 3 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18380075	
研究課題名 (和文)	カレアラクトン A による前駆脂肪細胞分化誘導阻害機構の解明
研究課題名 (英文)	Inhibitory mechanism of adipocyte differentiation by calealactone A
研究代表者	松浦 信康 (MATSUURA NOBUYASU) 岡山理科大学・理学部・准教授 研究者番号：60281250

研究成果の概要：

カレアラクトン A は、前駆脂肪細胞 3T3-L1 における脂肪細胞への分化誘導を阻害する。その細胞内における標的因子を明らかにする目的で、1) 標的因子探索ツール (フォトアフィニティーマトリックスを利用) の合成、2) 3T3-L1 細胞分化誘導過程における標的因子発現フェイズの探索、3) 細胞内における標的因子の探索について実施した。その結果、標的因子と推定されるタンパク質を検出するまでに至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質、脂肪細胞、分化、阻害物質

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病である肥満や糖尿病の原因となるインスリン抵抗性には、脂肪細胞の分化が極めて大きな役割を果たしている。すなわち、脂肪細胞の分化を正もしくは負に制御する化合物は、上述疾病治療薬となる可能性を有すると同時に、脂肪細胞分化誘導機構解明に重要な役割を果たすことが期待される。

また Calealactone A とは、申請者らが発見した *Calea urticifolia* [キク科植物：エルサルバドル原産 (お茶として飲

用)] に含まれる sesquiterpenoide 化合物である。さらに申請者は、本化合物が 1.3 μM の濃度において、前駆脂肪細胞 (3T3-L1) のインスリン刺激に基づく脂肪細胞への分化誘導を完全に阻害すること明らかにした。

すなわち本化合物は、分化誘導因子に作用していることが予想されることから、本化合物をツールとして、分化誘導必須因子を検索することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大きく分けて次に二つに分けられる。

(1) Calcilactone A が作用する脂肪細胞への分化誘導制御因子を明らかにすることを計画した。具体的には、3T3-L1 細胞が脂肪細胞へ分化する2週間程度にわたる過程において、ステージ特異的に発現する極めて多くの因子の中から、calcilactone A に直接結合する因子を探索する。

(2) 検出された標的因子への部位特異的変異の導入等による、calcilactone A との直接結合証明を行う。

また上述の結果をもとに、標的因子を細胞内強制発現することにより、標的因子の脂肪細胞分化誘導機構における役割りを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 阻害活性発現ステージの特定

3T3-L1 細胞における脂肪細胞への分化誘導は、1) 培養シャーレ中での接触阻止 (2-3日)、2) dexamethazone (DEX)、isobutylmethylxanthine (IBMX) による前処理 (2日)、3) インスリンによる刺激 (9日: 3日間おきの培地交換) の約2週間に渡る行程により、細胞内に脂肪粒を蓄積し脂肪細胞へと分化させた。この間、ステージ特異的遺伝子発現調節が行われ、さまざまな分化誘導に関わる因子が発現・消失することが知られている (Fig.1)。

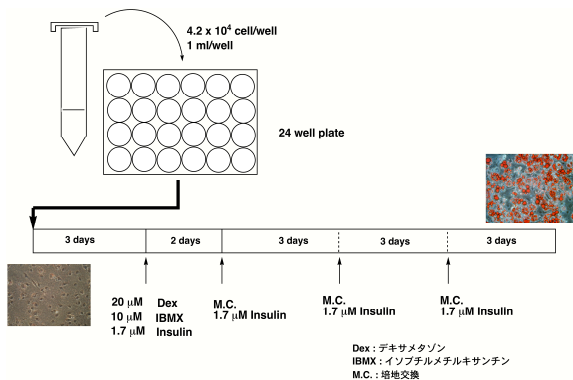


Figure 1. 3T3-L1 分化誘導方法

そこで calcilactone A の標的因子がどのステージに発現しているかを明らかにする目的で、各処理ステージにおいてのみ calcilactone A を培地に投与し、細胞内への脂肪粒蓄積を指標に脂肪細胞への分化誘導阻害活性を評価した。これにより calcilactone A 標的因子発現ステージを明らかにすることを試みた。

まず、Fig. 1 に示す5つの期間ごとに calcilactone を培養液に添加し、分化誘導を行った。その後、¹⁴C-acetic acid 取り込

み活性を指標に、分化誘導阻害活性を評価した。

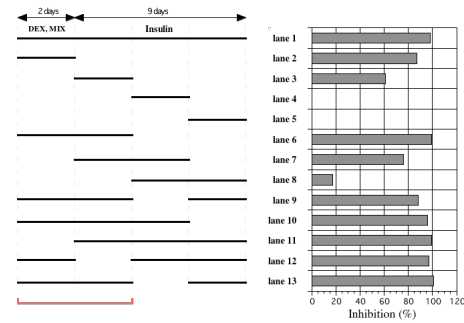


Figure 2. 期間特異的分化誘導阻害活性 1

その結果、Fig. 2 に示したように、DEX、IBMX にて分化誘導刺激を行った2日間および、インスリンを添加した直後の2日間に calcilactone A が存在した場合にのみ、阻害活性の発現が認められた。

そこでさらに詳細に阻害活性発現ステージの特定を行うため、上述5日間を1日ごとに区切り、1日ごとに calcilactone を培養液に添加し、分化誘導を行った。その後、¹⁴C-acetic acid 取り込み活性を指標に、分化誘導阻害活性を評価した。

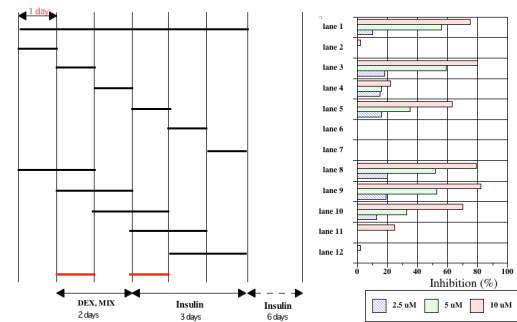


Figure 3. 期間特異的分化誘導阻害活性 2

その結果、calcilactone A の添加により分化誘導阻害活性が認められた期間は、DEX および IBMX を添加した直後の1日および、培地を交換し、インスリンを添加した直後の1日間の2カ所のみであった。

すなわち calcilactone A による脂肪細胞への分化誘導阻害活性発現に際して、関与している因子の発現は、この2日間に発現し、それらが calcilactone A と作用することにより、脂肪細胞への分化誘導が阻害されることを明らかにした。

(2) 阻害活性発現機構の解明

前述の結果から (Figure 3) において、インスリン刺激時に calcilactone A が存在する

ことにより、分化誘導を阻害することが明らかとなったことから、calealactone A 標的因子の一つとして、インスリン刺激に伴う数分間に活性化が認められる細胞内シグナル伝達因子が考えられた。

そこで[U-¹⁴C]-2-deoxyglucose を用いて、インスリン刺激に伴う、グルコース取り込み活性に対する calealactone A の影響を検討した (Fig. 4)。

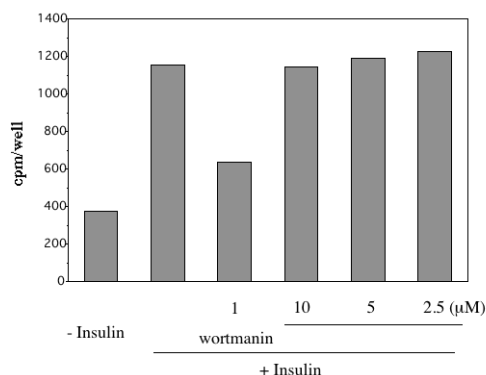


Figure 4. インスリン刺激に伴うグルコース取り込み活性に対する calealactone A の影響

その結果、calealactone A は、インスリン刺激に伴う、グルコース取り込み活性には影響を与えないことを明らかにした。すなわち、calealactone A の標的因子は、インスリン刺激により数分にて活性が認められる細胞内シグナル伝達系の因子ではないと考えられた。

(3) Photoaffinity linker-coated(PALC) sepharose beads の調製

上述までの結果から、calealactone A の標的因子を通常の生化学的もしくは分子生物学的方法論によって解明することは、きわめて困難であることが明らかとなった。

ここで生理活性低分子プローブに対する標的因子解明法としては、低分子プローブを何らかの方法によりラベル化し、細胞抽出液内における標的因子との結合を利用し、標的因子を可視化、それに引き続く解析が挙げられる。標的因子ラベル化法としては、1) 放射性同位体標識、2) 低分子プローブ内活性官能基への蛍光標識、3) 低分子プローブ内活性官能基への linker を介した sepharose beads への結合等が挙げられる。しかし、いずれの方法も、研究環境および非活性官能基の同定等、大きな課題を有している。

そこで、低分子プローブに対して活性官能基の有無にかかわらず、非選択的に光反応することが報告されている、ジアジリン

誘導体を用いた photoaffinity linker を calealactone A の標的因子単離のツールとして利用することを計画し調製した。具体的には、2,2'-(ethylenedioxy)dis(ethylamine)の NH₂ の保護、trifluoromethyl-diazirine benzoic acid との脱水縮合、Boc 基の脱保護により、photoaffinity linker を得た。その後、Activated CH sepharose 4B beads とのカップリング反応により、PALC sepharose beads の合成を完了した (Fig.5)。

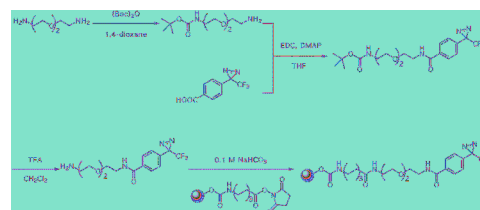


Figure 5. PALC sepharose beads の合成

ここで調製した PALC sepharose beads を標的因子解明のツールとして用いるには、PALC sepharose beads に低分子化合物が固定化されることを確認する必要がある。そこで、調製した PALC sepharose beads と蛍光色素である rhodamine B とを固相条件下にて光反応を行い、rhodamine B を PALC sepharose beads に固定した。Beads 洗浄後、蛍光顕微鏡下において、rhodamine B に基づく蛍光が認められたことから、UV 照射により、calealactone A を PALC sepharose beads に固定することが可能であることを確認した (Fig. 6)。

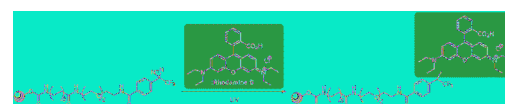
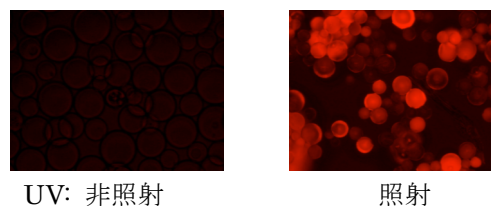
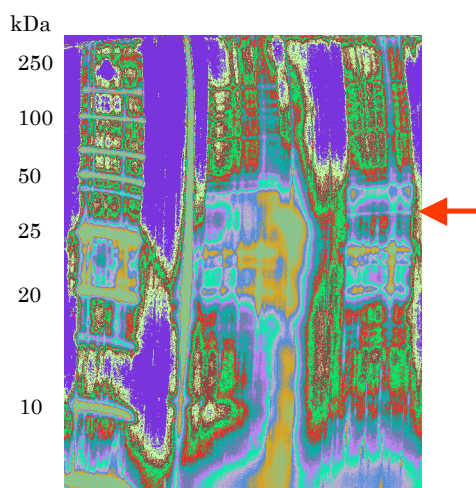


Figure 6. PALC sepharose beads への rhodamine B 固定化

(4) 標的因子の探索および検出

1 x 10⁸ cells の 3T3-L1 細胞について分化誘導を行い、calealactone A 標的因子発現期間 (DEX, IBMX 添加 1 日後) において細胞を回収した。回収した細胞を超音波破砕により細胞抽出液を調製し、calealactone A を固相化した PALC sepharose beads を添加し、4°C

にて incubate した。回収した calealactone A 固相化 PALC sepharose beads を洗浄後、SDS-sample buffer にて結合タンパク質を遊離し、SDS-PAGE 後、銀染色により結合タンパク質を可視化した (Fig. 7)。



Calealactone - +

Figure 7. Calealactone A 結合タンパク質の検出

その結果、28kDa に calealactone A 特異的結合タンパク質が検出された。

4. 研究成果

(1) 阻害活性発現ステージの特定
様々な報告において、3T3-L1 細胞における脂肪細胞への重要分化誘導因子の一つは、核内受容体 PPAR (peroxisome proliferators activated receptor) γ であることが報告されている。PPAR γ は、分化誘導期間において、最終期に発現し分化誘導活性を促進することが知られている。しかしながら calealactone A は、分化誘導の比較的早い時期に発現するタンパク質に作用することにより、脂肪細胞への分化誘導阻害活性を発現していることを明らかにした。このような物質は、これまで報告例がなく、新たな抗肥満薬におけるリード化合物となりうる可能性を秘めている。また本化合物の標的因子は、2種類(以上)であることも明らかにした。これらを明らかにすることにより、抗肥満薬開発における新たな標的因子を明らかにすることが可能であることを明らかにした。

(2) Photoaffinity linker-coated sepharose beads への calealactone A の固相化と標的因子の探索および検出

長田らは、PALC sepharose beads の有用性を示したが、実際に未知なる標的因子を有する化合物に対する細胞内標的因子を明らかに成功していない。申請者は、再現性、条件検討に非常に時間を有してしまったため、非常に残念ながら期間内に標的因子のタンパク質を同定(解明)するにはいたらなかったが、後2年程度のうちには、PALC sepharose beads の有用性を証明することが可能なところまでに至った。

本研究を成功させることにより、今後の新規薬剤における細胞内標的因子検出方法に大きな影響を及ぼすと確信している。

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 松浦信康、山田昌司、鈴木啓仁
Calealactone による抗肥満活性
日本肥満学会

2006年10月27, 28日

兵庫

② 松浦信康、山田昌司、鈴木啓仁
Calealactone による前駆脂肪細胞分化誘導
阻害活性機構の解明
日本農芸化学会

2007年3月24-26日

神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松浦 信康 (MATSUURA NOBUYASU)
岡山理科大学・理学部・准教授
研究者番号: 60281250

(2) 研究分担者および研究協力者
なし