

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590081

研究課題名(和文)細胞膜ATP合成酵素を介した新規脂質代謝調節機構の解明と新規抗肥満薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel anti-obesity agents targeting cell-surface F1F0-ATP synthase

研究代表者

新垣 尚捷 (ARAKAKI, Naokatu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60151148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞膜F1F0-ATP合成酵素を介した新規脂質代謝調節機構を解明しこれまでにない新しい抗肥満薬の開発を目指したものである。これまでに、本酵素が細胞外においてATP合成活性を有すること、および合成された細胞外ATPが脂質代謝の調節に関わっていることを明らかにした。さらに、細胞膜非透過性のF1F0-ATP合成酵素阻害剤(BGL-piceatannol(BGL-P))を創製し、BGL-Pが肥満マウスモデルにおいて内臓脂肪量を有意に減少させることを示した。

研究成果の概要(英文)：Cell-surface F1F0-ATP synthase plays a role on intracellular triacylglycerol (TG) accumulation in adipocytes. Here we show that cell-surface F1F0-ATP synthase on adipocytes is functional in extracellular ATP production and that the extracellular ATP produced contributes, at least in part, to the cell-surface F1F0-ATP synthase-mediated intracellular triacylglycerol (TG) accumulation in adipocytes through P2Y1 receptor. We synthesized water-soluble resveratrol and piceatannol which are F1F0-ATP synthase inhibitors) and found that these compounds significantly lowered abdominal visceral adipose tissue in diet-induced obese mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：F1F0-ATP合成酵素 脂肪細胞 細胞内中性脂肪 抗肥満薬

### 1. 研究開始当初の背景

F1Fo-ATP 合成酵素は、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化において ATP 合成を触媒する酵素であり、マルチサブユニットである F1 (触媒部位) と Fo (膜貫通部位) の 2 つのサブユニットから構成される超高分子複合体である。従来、F1Fo-ATP 合成酵素はミトコンドリアの内膜に局在すると考えられていたが、最近の研究で本酵素が「細胞膜にも存在する」という驚くべき研究成果が相次いで報告された (Moser *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2811-2816, 1999, Moser *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6656-6661, 2001, Arakaki *et al.*, Mol. Cancer Res., 1, 931-939, 2003)。本酵素の膜局在化機構に関しては不明であるが、細胞膜 F1Fo-ATP 合成酵素の生理的役割に関しては、1999 年の Science 誌に「A surprising partner for angiostatin」として紹介されて以来、血管新生や代謝調節における役割が報告されている。

### 2. 研究の目的

細胞膜 F1Fo-ATP 合成酵素が細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることは明らかであるにもかかわらず、本酵素を介したシグナル伝達機構は全く不明である。応募者はこれまでに、本酵素が血管新生や脂質代謝調節に重要な役割を果たしていることを報告している。本研究はこれまでの成果を踏まえて、本酵素を介するシグナル伝達機構を解明し、癌や生活習慣病の改善および治療薬開発に向けた基盤形成を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 3T3-L1 脂肪細胞の細胞膜における

ATP 受容体の発現解析。

分化した 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、細胞内及び細胞外 ATP 量を測定し、脂肪細胞が細胞外で ATP を合成できるかどうかを検証する。さらに脂肪細胞において発現する ATP 受容体の分子種を RT-PCR 法で解析し、次いで、P2X

および P2Y 受容体の特異的阻害剤を用いて、脂肪蓄積に関わる ATP 受容体を検証する。

(2) 共同研究者の根本が確立した分岐型オリゴグリセロール (Branched Oligoglycerol: BGL) 連結修飾法を用いて、ミトコンドリアの ATP 合成酵素には影響を与えず、細胞膜 F1Fo ATP 合成酵素のみを阻害する膜不透過性の新規水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤を創製する。

(3) 水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤の肥満モデルマウスに対する抗肥満効果を検証し、細胞膜 F1Fo ATP 合成酵素の生理的役割を検証する。

### 4. 研究成果

(1) 脂肪細胞の細胞膜 F1Fo ATP 合成酵素は細胞外 ATP 合成活性を有する

細胞膜 F1Fo ATP 合成酵素を介した中性脂肪の蓄積に関する細胞外 ATP の役割を明らかにするため、まず培養成熟脂肪細胞の細胞内と細胞外の ATP 量を測定した。その結果、成熟脂肪細胞は前駆脂肪細胞 (pre) に比べ細胞外において有意に高い ATP 合成活性を示した (図 1)。この ATP 合成活性は F1Fo ATP 合成酵素の 及び サブユニットに対する抗体 (それぞれ V $\alpha$ 、V $\beta$ ) によりほぼ完全に阻害されたことより、この細胞外 ATP 合成は細胞膜 F1Fo ATP 合成酵素によるものと結論づけられた。

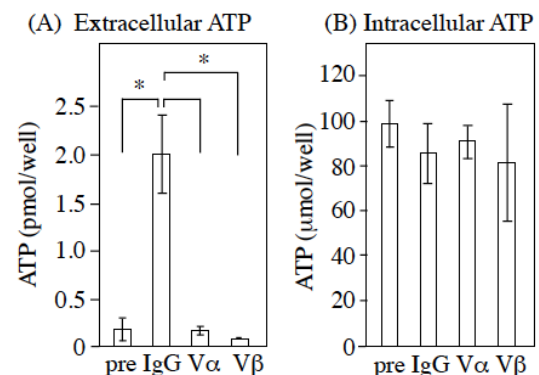


図 1. 成熟脂肪細胞における細胞内および細胞外 ATP 合成活性

(2) 細胞外 ATP は P2Y<sub>1</sub> プリン受容体を介して中性脂肪の蓄積を促進する

培養成熟脂肪細胞において細胞外 ATP は中性脂肪の蓄積に関与していることはすでに明らかになっている (Schödel *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 763-773, 2004)。さらに、脂肪細胞においては P2X 受容体として P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> が、P2Y 受容体として P2Y<sub>1</sub> が主に発現していることが明らかになっている。そこで、P2X に対する阻害剤として NF279 を、P2Y<sub>1</sub> に対する阻害剤として MRS2500 を使って、細胞外 ATP による中性脂肪蓄積に関与する受容体を解析した (NF279 の P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 19nM, 770nM, 1.62 μM であり、MRS2500 の P2Y<sub>1</sub> に対する IC<sub>50</sub> は、0.95nM である) (図 2)。図 2 の結果から、細胞外 ATP は P2Y<sub>1</sub> を介して中性脂肪蓄積に関与していることが示唆された。

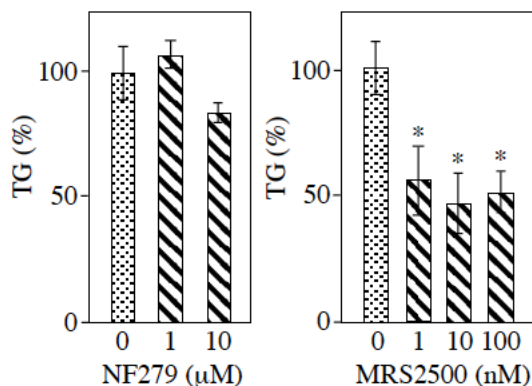


図 2. 中性脂肪蓄積に対する NF279 と MRS2500 の影響

(3) 分岐型オリゴグリセロール (Branched Oligoglycerol: BGL) 連結修飾法を用いた膜不透過性の新規水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤の創製

根本らの方法に従い、GL 化水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤を合成した。本研究では、強い F1Fo ATP 合成酵素阻害作用を有する Resveratrol と Piceatannol の BGL 化体を合成した (図 3)。

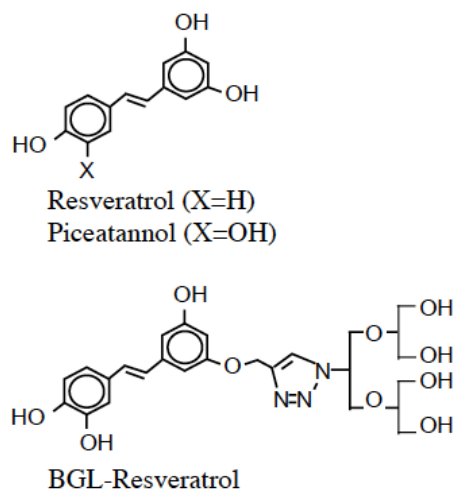


図 3. BGL 化水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤

(4) BGL 化水溶性 F1Fo ATP 合成酵素阻害剤による中性脂肪蓄積阻害

図 4 に示すように、BGL 化 Piceatannol (P-BGL) は親分子である Piceatannol (P) と同程度の中性脂肪蓄積阻害活性を有していた。BGL 化 Resveratrol は親分子より少し弱い中性脂肪蓄積阻害活性を有していた (結果は示していない)。

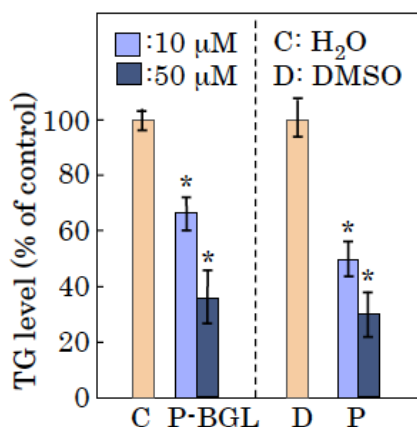


図 4. BGL 化 Piceatannol (P-BGL) の中性脂肪蓄積阻害活性

(5) BGL 化 Piceatannol (P-BGL) による中抗肥満効果

P-BGL を大量合成し、肥満マウスに対する抗肥満効果を検証した (図 5)。マウスは正常食 (SD) あるいは高脂肪食 (HD) で飼育し、P-BGL (3mg/kg) を含む水を自由摂取させ、1

週間後の体重及び内臓脂肪量を測定した。図5に示すように、P-BGLは肥満マウスおよびコントロールマウスに対し、体重及び内臓脂肪量を低下させることが示唆された。しかしながら、解析数の不足により有意差検定はできなかった。濃度効果及びタイムコースを含めて再度実験を行いP-BGLの抗肥満効果を検証する予定である。

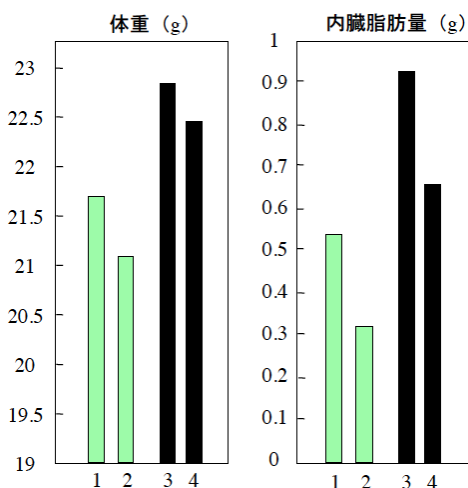


図5. 肥満マウスに対する P-BGL の影響

1. 正常食、2. 正常食+ P-BGL、3. 高脂肪食、
4. 高脂肪食+ P-BGL

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kita T, Arakaki N. Contribution of extracellular ATP on the cell-surface F1F0-ATP synthase-mediated intracellular triacylglycerol accumulation. *Biomed. Res.*, 査読あり、Vol. 36, 2015, 115-120, doi: 10.2220/biomedres.36.115.

Arakaki N, Yamashita A, Niimi S, Yamazaki I. Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics.

*Biomed. Res.*, 査読あり、Vol. 34, 2013, 161-166.

Nemoto H, Katagiri A, Kamiya M, Kawamura T, Matsushita T, Matsumura K, Itou T, Hattori H, Tamaki M, Ishizawa K, Miyamoto L, Abe S, Tsuchiya K. Synthesis of paclitaxel-BGL conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読あり、Vol. 20, 2012, 5559-5567, doi: 10.1016/j.bmc.2012.07.031.

Nemoto H, Katagiri A, Kamiya M, Matsushita T, Hattori H, Matsumura K, Itou T, Kawamura T, Kita T, Nishida H, Arakaki N. Synthesis and evaluation of water-soluble resveratrol and piceatannol via BGLation. *Bioorg Med Chem Lett.* 査読あり、Vol. 22, 2012, 5051-5054, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.06.019.

〔学会発表〕(計 7 件)

新垣尚捷、細胞膜 F1F0-ATP 合成酵素を標的とする抗肥満薬の開発  
平成 26 年度上期 D S A N J 疾患別商談会、2014 年 8 月 28 日、大阪産業創造館(大阪府、大阪市)

宮本 理人、渡邊 勝志、田岡 千秋、土橋 有希、松下 剛史、石澤 啓介、阿部 真治、根本 尚夫、土屋 浩一郎、分岐鎖オリゴグリセロール修飾による疎水性化合物の物性、薬物動態および薬効の改善、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27~30 日、熊本大学(熊本県、熊本市)

新垣 尚捷、新規細胞膜 ATP 合成酵素阻害剤(水溶性ポリフェノール)の構造と作用、第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11~12 日、東京国際フォーラム(東京都、千代田区)

新田 和馬, 寺田 賢治, 新垣 尚捷、顕微鏡画像中におけるミトコンドリアの状態判別、ビジョン技術の実利用ワークショップ 2012, 2012 年 12 月 6～7 日、パシフィコ横浜アネックス・ホール(神奈川県、横浜市)

新垣尚捷、細胞膜 ATP 合成のシグナル伝達とミトコンドリアの融合・分裂の制御、奥羽大学薬学部主催講演会、2012 年 11 月 15～17 日、奥羽大学薬学部(福島県、郡山市)

駒田 致和, 新垣 尚捷, 山崎 哲男、ミトコンドリア由来のROSシグナルは骨芽細胞の分化を誘導する, 第51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2012年11月11日、島根県民会館・サンラポーむらくも(島根県、松江市)

新垣尚捷、細胞膜 ATP 合成の脂質代謝における役割とミトコンドリアの融合・分裂の制御、国立医薬品食品衛生試験所主催講演会、2012 年 11 月 8～10 日、国立医薬品食品衛生試験所(東京都、世田谷区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新垣 尚捷 (ARAKAKI, Naokatu)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：6 0 1 5 1 1 4 8

### (2) 研究分担者

山崎 哲男 (YAMAZAKI, Tetsuo)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：9 0 3 3 0 2 0 8

### (3) 研究分担者

根本 尚夫 (NEMOTO, Hisao)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：3 0 2 0 8 2 9 3