

氏名・(本籍)	がも かえ 蒲生 佳奈恵 (岡山県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	乙第理33号
学位授与の日付	平成28年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	天然資源に含まれるPPARsアゴニスト探索および 生体内代謝物活性評価に関する研究
論文審査委員	主査 教授 松浦 信康 副査 教授 野崎 浩 教授 大平 進 教授 池田 正五 教授 中村 元直 教授 伊東 秀之 (岡山県立大学大学院保健福祉学研究科)

論文内容の要旨

申請者氏名 蒲生 佳奈恵

論文題目

天然資源に含まれる PPARs アゴニスト探索および生体内代謝物活性評価に関する研究

【背景・目的】

食生活の西洋化によって脂質異常症、肥満、糖尿病等の生活習慣病が問題となっている。そこでペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPARs)に着目した。PPARsは、糖や脂質の恒常性維持や生体内のエネルギー調節に重要な役割を果たしている。

第一部では、Reporter gene assay 法を用いて様々な食品・植物抽出エキスからスクリーニングを行い *Garcinia mangostana* 果皮抽出エキスに PPAR δ アゴニスト活性を見出した。さらに *G. mangostana* 果皮抽出エキスに含まれる活性本体の構造を明らかにした。また活性化合物の遺伝子レベルでの活性、PPARs アゴニスト選択性及びキサントン骨格を有する化合物における PPARs 構造活性相関の検討を行った。

ここでアゴニスト活性化合物を予防医学の観点から「食品資源」として利用しようとした場合、化合物等は一般的に代謝を受けることが知られている。これまで食品代謝物の PPARs アゴニスト活性に関する報告はない。

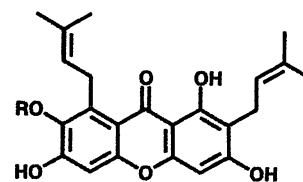
第二部では、食品成分の生理活性と代謝との関連性を明らかにする一環で、PPAR γ アゴニスト活性を有するヘスペリジンに着目した。ヘスペリジンの主代謝産物 hesperetin-3'-O- β -D-glucuronide (H3'-OG) 及び hesperetin-7-O- β -D-glucuronide (H7-OG)の PPAR γ アゴニスト活性の遺伝子レベル、タンパク質レベルでの検討を行った。また既存の PPAR γ アゴニストとヘスペリジン代謝物の結合部位の検討を行った。

【実験・結果】

G. mangostana 果皮に含まれる PPAR α 及び PPAR δ アゴニスト活性本体の探索

本研究では *G. mangostana* 果皮抽出エキスに含まれる PPARs アゴニスト活性本体の探索を行った。

PPARs 活性化能を有する天然資源を探索する方法として、reporter gene assay 法を用いた結果、*G. mangostana* 果皮抽出エキスに PPAR α 及び PPAR δ アゴニスト活性を見いだした。*G. mangostana* は、フトギリソウ科フクギ属に属し、果皮主成分として α 及び γ -マンゴスチンが報告されている (Fig. 1)。In vitro において、抗酸化活性等が報告されているものの、PPARs アゴニスト活性に関する報告はない。果皮抽出エキスについて単離・精製を行った結果、 α 及び γ -マンゴスチンを単離した。そこで α 及び γ -マンゴスチンの



	R	含有率
α -mangostin :	CH ₃	70-85%
γ -mangostin :	H	10-15%

Figure 1. α -および γ -mangostinsの化学構造

PPAR α 及び PPAR δ アゴニスト活性を評価した。 α -マンゴスチンは、2.5 μ M で PPAR α アゴニストである WY14643 50 μ M の約 15%のアゴニスト活性を示した。 γ -マンゴスチンは、2.5 μ M で WY14643 の約 75%、PPAR δ アゴニストである GW0742 0.1 nM の約 40%のアゴニスト活性を示した。 α 及び γ -マンゴス

チンの構造の違いは7位がメトキシ基もしくはヒドロキシ基である。この構造の差がサブタイプ選択的活性発現に重要であることが示唆された。

次に、遺伝子レベルにおいて α -マンゴスチンによるPPAR α アゴニスト活性に基づく脂質代謝関連遺伝子発現調節活性を評価する目的で、RT-PCR法を用いて脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。 α -マンゴスチンは、脂質代謝関連遺伝子(ACS, EcH)の転写を活性化させることが示された。また γ -マンゴスチンは、脂質代謝関連遺伝子(ACS及びCPT1A)及びエネルギー消費調節関連遺伝子(UCP-3)の転写を活性化させることが示された。

従って、 α -マンゴスチンはPPAR α アゴニストであり、 γ -マンゴスチンはPPAR α/δ デュアルアゴニストであることを明らかにした。

これらの結果から α 及び γ -マンゴスチンを含む*G. mangostana*果皮抽出エキスには、PPAR δ および α アゴニスト活性により肥満および高脂血症予防もしくは治療活性が期待される。

ヘスペレチングルクロナイドのPPAR γ アゴニスト活性

α 及び γ -マンゴスチン等のポリフェノール類は生体内で代謝を受けることが知られているものの、代謝物に関する生理活性は、ほとんど存在しない。代謝産物の生物活性を明らかにすることも重要であると考え、まず主代謝産物がすでに明らかとなっている柑橘類主成分であるヘスペリジンを用いて検討を行った。

ヒトにおいてヘスペリジンは経口摂取後、腸内細菌によりルチノースが加水分解され、ヘスペレチンとなり、さらに肝臓でグルクロン酸抱合を受けた後、87%がヘスペレチングルクロン酸抱合体として血中循環している (Fig. 2, 3)。これまでにヘスペリジン及びヘスペレチンのPPAR γ アゴニスト活性について報告は存在する。しかし、その主代謝産物であるヘスペレチングルクロナイドのPPAR γ アゴニスト活性の報告はない。それ故、ヘスペリジン代謝物のPPAR γ に対する作用を検討する必要があると考えた。

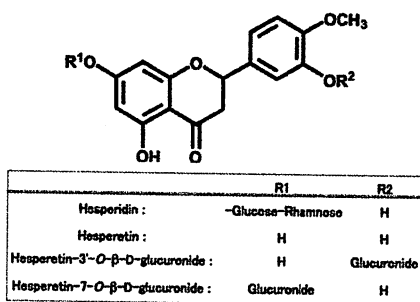


Figure 2. ヘスペレチン類の化学構造

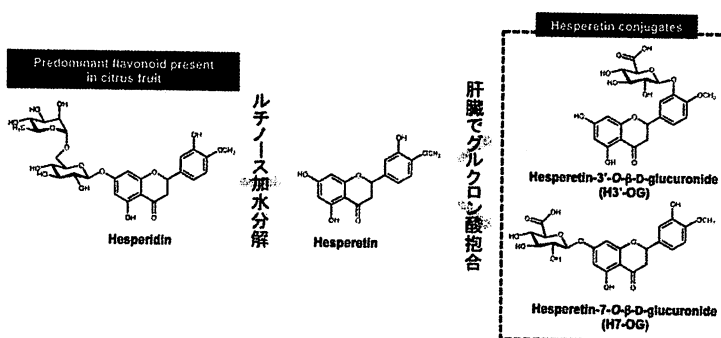


Figure 3. ヘスペリジンの代謝経路

H3'-OG 及び H7'-OG の合成及びPPAR γ アゴニスト活性

ヘスペレチングルクロナイドは、ヘスペレチン3'位水酸基がグルクロン酸抱合された代謝物(H3'-OG)、7位水酸基がグルクロン酸抱合された代謝物(H7'-OG)である。これらを既報に従い合成した結果、H3'-OGを34%、H7'-OGを5%で得た。

各ヘスペレチングルクロナイドのPPAR γ 転写活性を評価した結果、H3'-OG及びH7'-OG 250 μ Mにおいて、ともにトログリタゾン 10 μ Mの65%及び75%のアゴニスト活性を示すことが明らかとなった (Fig. 4)。

次に H3'-OG 及び H7-OG の 3T3-L1 細胞に対する影響を検討する目的で脂肪細胞への分化誘導を行った。その結果, 低濃度インスリン ($2.8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) 添加時, H3'-OG 及び H7-OG $10 \mu\text{M}$ の濃度において, いずれの代謝物にも脂肪細胞への分化誘導促進活性が認められた。従って, H3'-OG 及び H7-OG は, 脂肪細胞への分化誘導促進活性を有することが示唆された (Fig. 5)。またヘスペレチングルクロナイドにおける PPAR γ アゴニスト活性濃度と前駆脂肪細胞分化誘導促進活性濃度が大きく異なることから, PPAR γ 以外に新たな標的因子が存在することを示唆した。

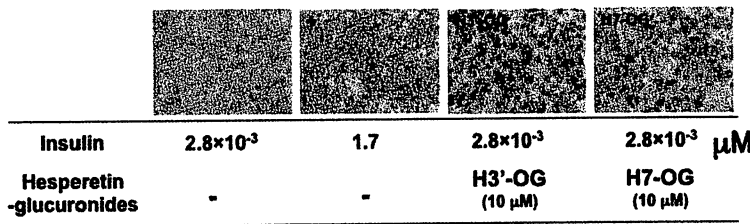


Figure 5. 脂肪細胞への分化誘導の影響

また PPAR γ 関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討する目的で RT-PCR 法で検討を行った。その結果, H3'-OG (25 μM) 及び H7-OG (25 μM) 処理により, アディポネクチン, C/EBP α 及び PPAR γ これらの mRNA 発現をいずれも増加させた。従って, ヘスペレチングルクロナイドによる脂肪細胞分化誘導関連遺伝子の転写活性促進が示された (Fig. 6)。

さらにヘスペレチングルクロナイドによる PPAR γ 発現量に対する影響について検討する目的で, ウェスタンブロット法で検討を行った。

その結果, 低濃度インスリン時, H3'-OG (100 μM) 及び H7-OG (100 μM) の濃度において, PPAR γ 発現量の増加が認められた。この結果は, ヘスペレチングルクロナイドが PPAR γ アゴニスト活性に基づき, PPAR γ 発現量が増加したことを示した。

H3'-OG 及び H7-OG の PPAR γ に対する結合部位の解析

ヘスペレチングルクロナイドの PPAR γ 転写活性化機構を明らかにする目的で検討した結果, ともに最大活性を示す濃度である トログリタゾン (10 μM) と H7-OG (250 μM) を共存させた場合, 転写活性化作用の相乗的活性増強が認められた。この結果は, ヘスペレチングルクロナイドはグリタゾン類とは異なる転写活性化機構を有することを示唆した。

次に PPAR γ アゴニストであるチアゾリジンジオン類との結合活性を比較検討する目的で, TR-FRET 法を用いて H3'-OG 及び H7-OG の PPAR γ 結合能を検討した。その結果, ピオグリタゾンは, 競合に基づく蛍光の減弱が確認されるのに対し, H3'-OG 及び H7-OG には競合作用が認められず, 蛍光は一定であった。この結果は, ヘスペレチングルクロナイドの結合部位は既存のチアゾリジンジオン類の結合部位とは異なる部位に結合している可能性を示した (Fig. 7)。

さらに分子レベルでの解析を行う為, 点 9 種の点変異 PPAR γ について PPAR γ アゴニストの転写活性

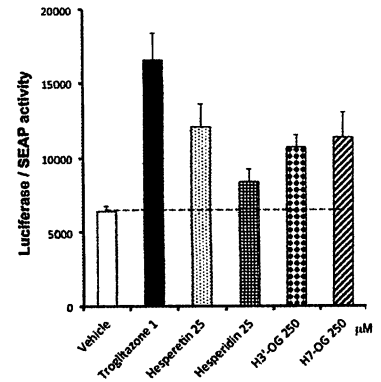


Figure 4. PPAR γ アゴニスト活性

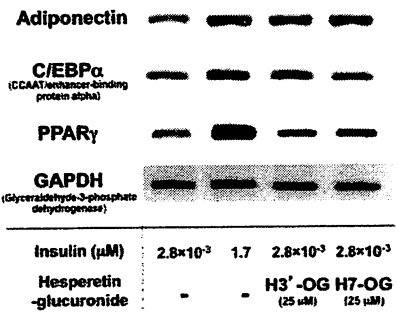
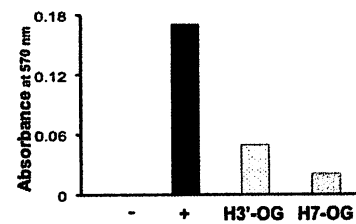


Figure 6. PPAR γ 標的遺伝子の影響

を評価した結果、466番目のヒスチジンはコファクター結合に関する部位であり、ヘスペレチングルクロナイドには影響を及ぼした。ヘスペレチングルクロナイドには、重要部位であり結合活性に関連するアミノ酸であることが推察された。

従って、ヘスペレチングルクロナイドは、既存のグリタゾン類とは異なる機構で活性化する可能性が示唆された。

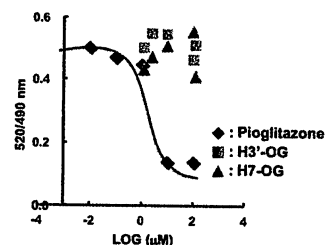


Figure 7. PPAR γ に対する競合作用

【結論】

天然資源に含まれる PPARs アゴニスト探索及び生体内代謝産物活性評価に関する研究を行った。その結果、以下に示す知見を得た。

G. mangostana 果皮抽出エキスにおける PPARs アゴニスト探索

- α -マンゴスチン：PPAR α アゴニスト
- γ -マンゴスチン：PPAR α / δ デュアルアゴニスト
- ヘスペリジン代謝物の PPAR γ に対する作用の解明
- ヘスペレチングルクロナイド：PPAR γ アゴニスト

α -及び γ -マンゴスチンは、既存の PPAR α 及び δ アゴニストとは化学構造が異なる。従って予防医学、さらには脂質異常症治療薬及び抗肥満薬開発においても新たなリード化合物になり得る可能性を示唆した。またヘスペリジンの生体内における PPAR γ アゴニスト活性本体としてのヘスペレチングルクロナイドを明らかにした。従って食品代謝物の活性評価の重要性を示した。

発表論文：

1) γ -Mangostin from *Garcinia Mangostana* Pericarps Is a Dual Agonist That Activates Both PPAR α and PPAR δ

Nobuyasu MATSUURA, Kanae GAMO, Hiroyuki MIYACHI, Munekazu IINUMA, Teruo KAWATA, Nobuyuki TAKAHASHI, Yukihiro AKAO and Hideki TOSA

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2013, 77(12), 2430-2435.

2) Hesperetin Glucuronides Induce Adipocyte Differentiation via Activation and Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ

Kanae GAMO, Hiroyuki MIYACHI, Kayoko NAKAMURA, Nobuyasu MATSUURA

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2014, 78(6), 1052-1059.

3) Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) Transactivation by Hesperetin Glucuronides Is Distinct from That by a Thiazolidine-2,4-dione Agent.

Kanae GAMO, Takuma SHIRAKI, Nobuyasu MATSUURA, Hiroyuki MIYACHI

Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2014, 62(5), 491-493.

4) Molecular dynamics study-guided identification of cyclic amine structures as novel hydrophobic tail components of hPPAR γ agonists.

Tanaka Y[†], Gamo K[†], Oyama T, Ohashi M, Waki M, Matsuno K, Matsuura N, Tokiwa H, Miyachi H., Bioorg.

Med. Chem. Lett., 24(16) 4001-4005.

審査結果の要旨

本論文は、天然資源に含まれる PPARs アゴニスト探索および生体内代謝産物活性評価に関する研究成果をまとめたものである。緒論及び全2部から構成されており、第1部が「*Garcinia mangostana* 果皮抽出エキスにおける PPARs アゴニスト活性」、第2部が「食品代謝物における PPAR γ アゴニスト活性」である。

緒論では、食生活の西洋化によって脂質異常症、肥満、糖尿病等の生活習慣病が問題となっていることを説明し、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPARs)が解決の糸口になることを述べている。PPARs は、糖や脂質の恒常性維持や生体内のエネルギー調節に重要な役割を果たしていることが述べられており、その上で、本論である第1部及び第2部の概要を記述している。

第1部では、Reporter gene assay 法を用いて様々な食品・植物抽出エキスからスクリーニングを行い *Garcinia mangostana* 果皮抽出エキスに PPAR δ アゴニスト活性を見出すことに成功している。さらに *G. mangostana* 果皮抽出エキスに含まれる活性本体の構造を各種機器スペクトルデータから、 α 及び γ -マンゴスチンであることを明らかにしている。また活性化化合物の遺伝子レベルでの活性、PPARs アゴニスト選択性及びキサントン骨格を有する化合物における PPARs 構造活性相関についても検討している。さらに γ -マンゴスチンは PPAR α/δ デュアルアゴニストであることを明らかにしている。キサントン骨格を有する化合物において、PPAR α/δ デュアルアゴニストに関する報告はなく、今回が初めての例である。

第2部では、食品成分の生理活性と代謝との関連性を明らかにする一環で、PPAR γ アゴニスト活性を有するヘスペリジンに着目している。生体内から精製が困難とされるヘスペリジンの主代謝産物 hesperetin-3'-O- β -D-glucuronide (H3'-OG)及び hesperetin-7-O- β -D-glucuronide (H7-OG)の有機化学的合成を行い、PPAR γ アゴニスト活性の遺伝子レベル、タンパク質レベルでの検討を行うことに成功している。また既存の PPAR γ アゴニストとヘスペリジン代謝物の結合部位の検討を行っている。このように、食品成分の生体内代謝産物の核内受容体への影響を詳細に検討、報告した例はなく、今回が初めての例である。

これらの点を全て整理した上で、順序立てて学位論文を執筆し、公聴会において発表を行い、質問に対する受け答えを適切に行うことができた。

また英語による学会発表や英文誌への論文発表を行った。よって、審査の結果、論文提出者 蒲生 佳奈恵は博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認める。