

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

2016

岡山理科大学大学院

蒲生 佳奈恵

目次

略語表

緒論	1
第一部 <i>G. mangostana</i> 果皮抽出エキスにおける PPARs アゴニスト活性	
第一章 核内受容体 PPAR δ 活性化資源の探索	
第一節 緒言	3
第二節 植物及び食品抽出液による PPAR δ アゴニスト活性	7
第三節 <i>Garcinia mangostana</i> 果皮抽出エキスに含まれる PPAR δ 活性化物質の探索	
第一項 <i>G. mangostana</i> 果皮抽出エキスの予備分画	11
第二項 <i>G. mangostana</i> 果皮抽出エキスの活性化化合物の構造	13
第三項 γ -Mangostin によるエネルギー消費調節関連遺伝子発現に対する影響	17
第四節 γ -Mangostin および α -Mangostin における PPARs アゴニスト活性	
第一項 γ -Mangostin の PPARs アゴニスト活性に対する選択性	19
第二項 γ -Mangostin による脂質代謝遺伝子発現に対する影響	23
第三項 キサントン誘導体における PPAR α および δ アゴニスト活性	25
第四項 α -Mangostin における PPAR α アゴニスト活性	28
第五節 小括	31
第二部 食品代謝物における PPAR γ アゴニスト活性	
第一章 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	
第一節 緒言	32
第二節 ヘスペリジンおよびヘスペレチンにおける PPAR γ アゴニスト活性	34
第三節 H3'-OG および H7-OG における PPAR γ アゴニスト活性	
第一項 H3'-OG および H7-OG の合成	36

第二項	合成 H3'-OG および H7-OG における PPAR γ アゴニスト 活性	37
第三項	H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞への分化に対する 影響	38
第四項	H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞分化誘導関連遺伝子 発現に対する影響	40
第五項	H3'-OG および H7-OG による PPAR γ タンパク質発現に 対する影響	42
第二章	ヘスペレチングルクロナイドにおける PPAR γ 転写活性化機構 の解析	
第一節	緒言	43
第二節	H3'-OG および H7-OG における PPAR γ 結合部位	
第一項	H3'-OG および H7-OG とチアゾリジンジオン類の共存下に よる相乗的 PPAR γ アゴニスト活性	44
第二項	H3'-OG および H7-OG とチアゾリジンジオン類の結合部位 の相違	45
第三項	点変異 PPAR γ を用いた転写活性化機構の比較	47
第三節	小括	51
総括		52
実験の部		55
参考文献		70
使用機器		72
謝辞		73

略語表

9-HODE : 9-hydroxyoctadecadienoic acid
13-HODE : 13-hydroxyoctadecadienoic acid
15d-PGJ₂ : 15-deoxy-D^{12,14}-prostaglandin J₂
ACS : Acetyl-CoA synthetase
AKR1B10 : Aldo-keto Reductase Family 1, Member B10
Amp : Ampicillin
AMPK : AMP-activated protein kinase
BMI : Body mass index
cDNA : Complementary DNA
C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CPT1A : Carnitine palmitoyl transferase
DNA : Deoxyribonucleic acid
DMSO : Dimethylsulfoxide
EcH : Enoyl-CoA hydratase
EtOAc : Ethyl acetate
EtBr : Ethidium bromide
FBS : Fetal bovine serum
FFA : Free fatty acids
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H3'-OG : Hesperetin-3'-O- β -D-glucuronide
H7-OG : Hesperetin-7-O- β -D-glucuronide
HDL : High Density Lipoprotein
HPLC : High performance liquid chromatography
IC₅₀ : Half maximal (50%) inhibitory concentration
LBD : Ligand binding domain
LB medium (or plate) : Lysogeny Broth medium (or plate)
Luc : Luciferase
NMR : Nuclear magnetic resonance
MUP : 4-Methylumbelliferone phosphate
QOL : Quality of life

P38MAPK : p38 Mitogen-activated protein kinase
PBS : Phosphate-buffered saline
PPARs : Peroxisome proliferator-activated receptors
RNA : Ribonucleic acid
RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction
RXR : Retinoid X receptor
SEAP : Secreted alkaline phosphatase
TAE buffer : Tris-acetate EDTA buffer
Tb : Terbium
TFA : Trifluoroacetic acid
TG : Triglyceride
TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha
TR-FRET : Time-resolved fluorescence resonance energy transfer
UDP : Uridine 5'-diphosphate
UCP-3 : Uncoupling protein-3
WHO : World Health Organization
WT : Wild type

緒論

疾病の予防対策を推進する目的で、1996年に厚生省(現 厚生労働省)は、生活習慣病(Life-style related diseases)という新たな概念を導入した。これまでの「成人病」対策としての二次予防(疾病の早期発見・早期治療)に加え、生活習慣の改善としての一次予防(健康増進・発病予防)対策の推進を目的としている。生活習慣病の定義は、「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が、その発症・進行に関与する症候群」とされている。生活習慣病が注目される理由として、日本人の三大死因である悪性新生物・心疾患・脳血管疾患はいずれも生活習慣が関連しているためである。悪性新生物・心疾患・脳血管疾患は、偏った食生活、睡眠不足、運動不足、喫煙及びストレス等の積み重ねが原因となっている。悪性新生物について、Wynderらは、アメリカ合衆国における発癌寄与率を推計し、環境因子が約80%を占めており、そのうち食物の占める割合が最も大きく、男性では40%以上、女性では60%以上に達すると報告している¹⁾。

また、心疾患及び脳血管疾患は、動脈硬化が要因となっていると言われ、特に内臓脂肪型肥満に糖尿病、高脂血症、脂質異常症など複数の生活習慣病を合併している状態を「メタボリックシンドローム」といい、この状態は動脈硬化が亢進する。2006年の厚生労働省によると、我が国の40~74歳では、メタボリックシンドローム患者数が約960万人、その予備群が980万人と推定されている。本疾病を回避するためには、その病態および成因を分子レベルで解明することは重要であるが、本疾病発症が生活習慣病、すなわち過栄養、運動不足等の先進国住民に認められる生活習慣に依存していることから、食生活の改善等、予防方法開発・検討についても同時に進めなければならない。

ほとんどの生活習慣病は症状のないまま進行するため、自覚症状が現れる頃には、すでに完治が難しい状態に陥ることもある。従って、健康を維持する・増進する「予防」が重要となってくる。

このような観点から本研究では、生活習慣病治療および予防における「食」に着目し、天然植物資源より生活習慣病治療効果を有する物質を探索することを計画した。

第一部では、生活習慣病治療薬開発で重点が置かれる疾病特異的分子標的を制御する化合物の開発から、ステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、核

内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ に着目した。PPAR δ アゴニスト活性を有する物質には、抗肥満作用が期待されている。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オトギリソウ科フクギ属に属する *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検索を行い、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 アゴニスト選択性およ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 *G. mangostana* 果皮主成分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、ポリフェノール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、様々な生物学的機能が報告されているフラボノイドであり、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) および 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。

第一部 *G. mangostana* 果皮抽出エキスにおける PPARs アゴニスト活性

第一章 核内受容体 PPAR δ 活性化資源の探索

第一節 緒言

肥満患者は世界的に 1980 年代頃から増加傾向にあり、WHO (世界保健機構) によると 2014 年における過体重(BMI*(Table 1) 25 以上)は 19 億人と報告している²⁾。我が国においても、肥満は増加傾向にあり大きな社会問題となっている。肥満は、高脂血症、糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の原因として、脂質代謝および糖代謝等の調節異常により引き起こされる。これら原因疾患の治療薬は、数多く臨床にて用いられているものの、副作用等が生じ、必ずしも満足するものではない。

生活習慣病治療薬開発は、疾病特異的分子標的を制御する化合物の開発に重点が置かれるようになってきた。そこで我々は、ステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)s に着目した。PPARs は、 β 酸化、コレステロール酸化等、脂肪分解に関与した細胞内小器官であるペルオキシソームを増殖させる作用を介するタンパクとして 1990 年に齧歯類から同定された³⁾。働きとして retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の応答配列に結合し、糖・脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節している。また、脂肪酸結合蛋白の発現を転写レベルで調節し、脂肪酸の種々の組織への取り込みを亢進させる。さらに、その脂肪酸はそれらの代謝産物とともに、それぞれの 3 種類の PPARs の内因性 ligand となり PPARs 活性を調節する^{4,5)}。

PPARs は、 α 、 δ および γ の 3 種類のアイソフォームが存在している。PPAR α は、肝臓、心筋、消化管粘膜、褐色脂肪細胞等に発現し⁶⁾、フィブラート系薬剤(ベザフィブラート、フェノフィブラートなど)によって高脂血症治療の標的とされ⁷⁾、PPAR γ は、脂肪組織、筋肉等に発現し、チアゾリジンジオン系(pioglitazone など)薬剤によってインスリン抵抗性疾病治療が臨床において実施されている⁸⁾。PPAR δ については、合成アゴニストは存在するものの⁹⁾生物学的機能解明が遅れているため薬剤開発が進んでいない(Table 2, Figure 1)。

しかしながら、近年 PPAR δ に関する多くの報告がなされている^{10,11)}。

PPAR δ を脂肪細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスにおいて、ワイルドタイプ(WT)マウスに比べて体重増加が抑制され、高脂肪食や過食によ

る肥満に対して抵抗性となった。このトランスジェニックマウスでは、白色脂肪組織重量が減少し、脂肪細胞のサイズの縮小、血清トリグリセライド値および遊離脂肪酸値の低下が認められた。このトランスジェニックマウスの脂肪組織では、**uncoupling protein (熱産性)**と脂肪酸酸化酵素群、ホルモン感受性リパーゼ(トリグリセライドの水解)の発現の増加が認められた¹²⁾。

またグラクソ・スミスクライン社は 1992 年に PPAR δ 選択的アゴニストである GW501516 を開発した。ヒトによる PPAR δ アゴニスト臨床試験の研究から、非肥満型男性に投与した試験では、10mg の GW501516 を 2 週間投与した(n=9)群はプラセボ群(n=6)に比べて血清トリグリセライド(TG)値に低下傾向が認められた。脂肪負荷試験では、負荷後の血清 TG 値は GW501516 群において有意に抑制された。また HDL コレステロール値は、プラセボ群に比べて GW501516 群は有意に上昇した¹³⁾。

ヒト骨格筋初代培養細胞および前駆脂肪細胞(3T3-L1)において、PPAR δ 活性化はグルコース取込み能を高めた。さらに、ヒト骨格筋細胞では、インスリン依存的経路においてグルコース取込み能を増大させ AMPK および p38MAPK のリン酸化に関与していることが明らかにされた¹⁴⁾。

これらの報告から、PPAR δ アゴニスト活性を有する物質には、抗肥満作用が期待されている。そこで、我々は PPAR δ 活性化物質に着目した。

前述の通り、肥満を始めとする生活習慣病は発症する以前の長期にわたる食生活等が原因であることから、それらを改善しない限り疾病発症を抑制することは困難である。すなわち予防が重要であり、疾病発症後にしか処方されない医薬品開発のみでは、**Quality of Life (QOL)**に対する貢献度は低い。そこで肥満予防方法として、PPAR δ アゴニスト活性を有する食品を積極的に摂取することが有効であると考えた。すなわち食経験のある世界中の天然資源より PPAR δ アゴニスト活性を見だし、活性本体の *in vitro*、*in vivo* における PPAR δ アゴニスト活性に基づく抗肥満活性を明らかにすることで、予防医学ベースで抗肥満効果を有する天然資源を利用することが可能になり生活習慣病発症を抑制することが可能となると考えた。

本研究では、新規肥満予防および治療薬の開発を目的として、植物及び食品抽出液に含まれる、PPAR δ アゴニストの探索を行うこととした。

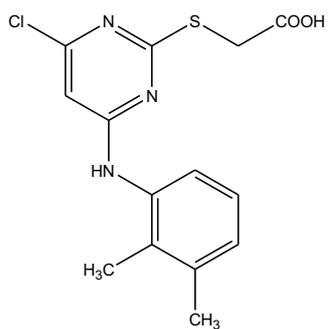
* BMI : 1994 年に WHO で定められた肥満判定の国際基準
 $\text{体重(kg)} \div \text{身長(m)} \times \text{身長(m)}$

Table 1 肥満度の判定基準(日本肥満学会)

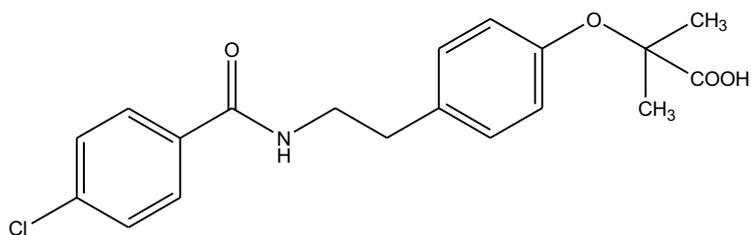
BMI	判定
<18.5	低体重
$18.5 \leq \text{BMI} < 25.0$	普通体重
$25.0 \leq \text{BMI} < 30.0$	肥満(1度)
$30.0 \leq \text{BMI} < 35.0$	肥満(2度)
$35.0 \leq \text{BMI} < 40.0$	肥満(3度)
$40.0 \leq \text{BMI}$	肥満(4度)

Table 2 PPARs と疾病および治療薬

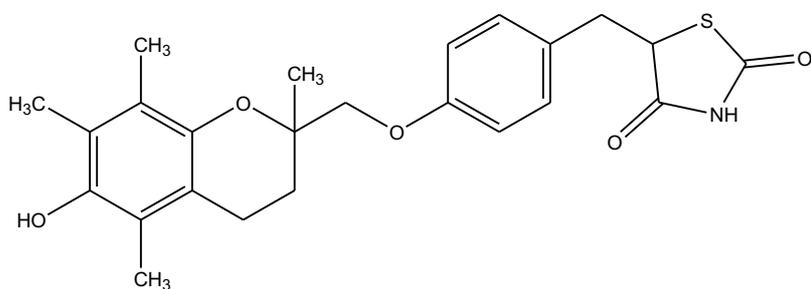
PPARs	発現組織	アゴニスト	疾病
α	肝、心筋	WY14643, フィブレート系薬剤:ベザフィブレート	高脂血症
γ	脂肪、筋肉	Troglitazone, チアゾリジンジオン系薬剤:Pioglitazone	インスリン抵抗性
δ	ほぼ普遍的	GW0742, GW501516	肥満



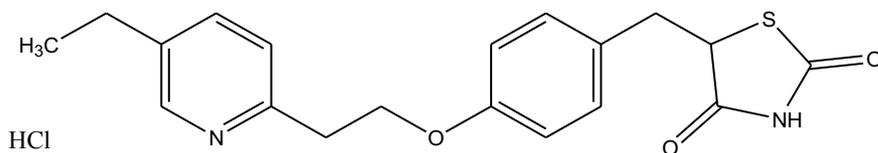
WY14643



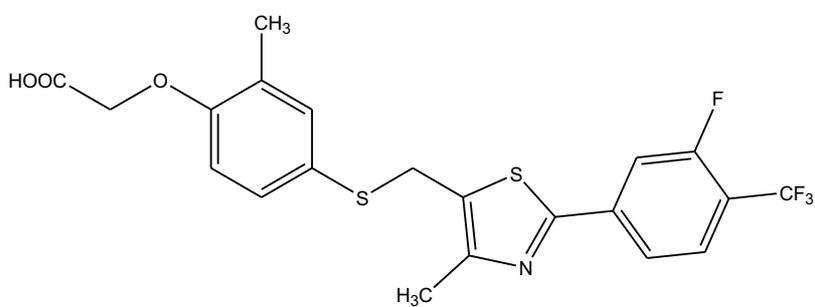
ベザフィブラート



トログリタゾン



ピオグリタゾン



GW0742

Figure 1 既存 PPARs アゴニスト

第二節 植物及び食品抽出液による PPAR δ アゴニスト活性

PPAR δ 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。reporter gene assay 法は、創薬、分子生物学、生化学などに広く利用されている。PPAR δ -Gal4 融合タンパク質発現プラスミドおよび Gal4-binding cis element の下流に luciferase 構造遺伝子を有するレポータープラスミドをアフリカミドリザル腎細胞である COS-1 細胞に co-transfection した。そこに、さまざまな天然資源抽出エキスを添加した。luciferase 発現量に基づき発光量を測定し、PPAR δ 活性化能を定量的に評価した。

本研究では約 1000 検体の植物、食品抽出液について、PPAR δ アゴニスト活性評価を行った。その結果、*Garcinia mangostana* 果皮抽出エキス 10, 5 および 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において濃度依存的 PPAR δ アゴニスト活性が認められた。10, 5 および 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においては、既存の PPAR δ アゴニストである GW0742 0.1 nM の約 36, 27 および 11%の活性が認められた(Figure 2)。

G. mangostana は、オトギリソウ科フクギ属に属し、東南アジア諸国の熱帯雨林を中心に生育する植物である。果実全体は直径 2.5~7.5 cm である。そのうち果皮は、0.6~1.0 cm の厚さであり紫色素が含まれている。果肉部分は白色であり、食用部は全体の約 25%である¹⁵⁾。マンゴスチンの果皮、葉および樹皮は何千年もの間、民間伝承薬物として使用されており、果皮は下痢¹⁶⁾、湿疹、膀胱炎、掻痒症、便秘および虫歯の治療に用いられている(Figure 3)。葉は、原住民が茶として飲用し、樹皮濃縮物は尿生殖器痛、口腔症として使用している。主成分としてキサントン骨格を有する α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, garcinone B, garcinone E が報告されている。含有率は、 α -mangostin が約 75~85%。 γ -mangostin が約 5~15%である(Figure 4)¹⁷⁾。

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

* $p < 0.05$ vs Vehicle, ** $p < 0.01$ vs Vehicle.

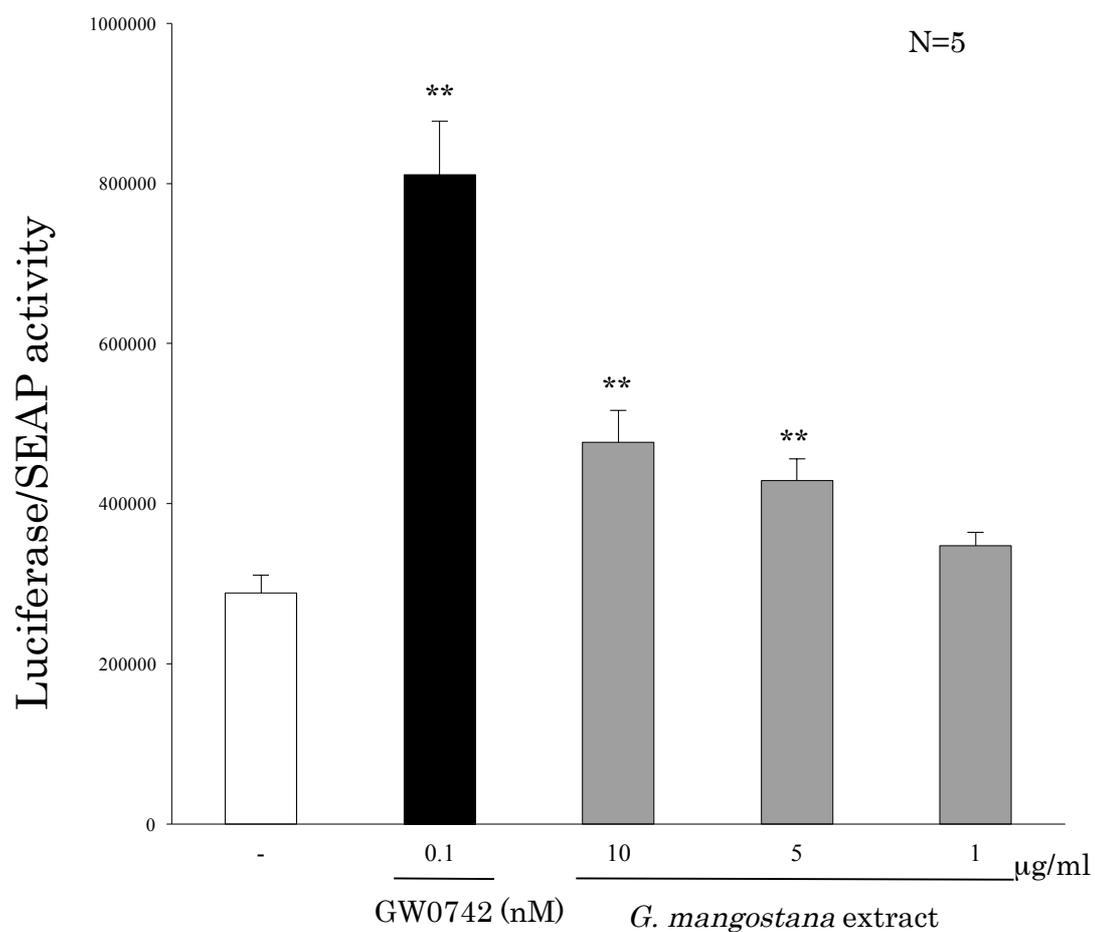


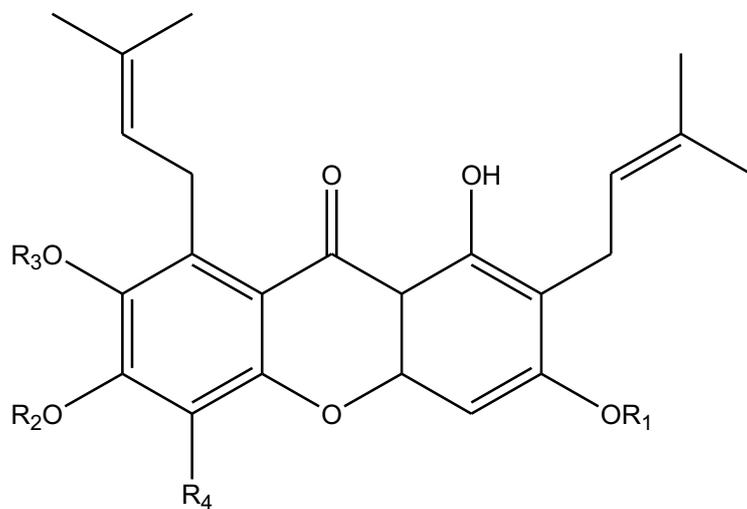
Figure 2 *G. mangostana* 果皮抽出エキスの PPAR δ アゴニスト活性



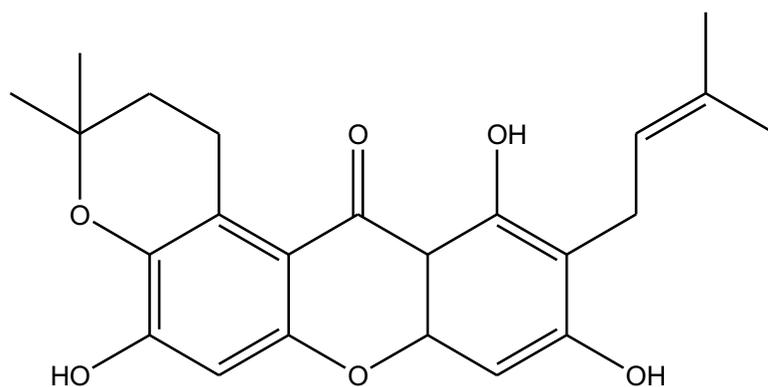
Figure 3 *Garcinia mangostana* L. (マンゴスチン果皮)

フトギリソウ科 フクギ属

(写真提供: 岐阜薬科大学 飯沼宗和教授)



	R1	R2	R3	R4
α -mangostin :	H	H	CH ₃	H
β -mangostin :	CH ₃	H	CH ₃	H
γ -mangostin :	H	H	H	H
garcinone E	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H



garcinone E

Figure 4 α , β および γ -mangostin, garcinone E および garcinone B の化学構造

肥満症やメタボリックシンドロームに対する有効成分はいくつか見出されている。京都大学の河田らは、その有効成分は作用により大別している。まず、茶葉ポリフェノールなどが糖や脂質の消化管からの吸収を抑制する作用、次に調理油に使われる花王の「エコナクッキングオイル」のジアシルグリセロールや日清オイリオの「ヘルシーリセッタ」の中鎖脂肪酸等が脂質を肝臓で速やかに分解する作用、さらに、トウガラシの辛味成分であるカプサイシン等の熱産生亢進作用、そして、内臓脂肪蓄積抑制作用などを介して肥満状態の改善を図るもので、各種ポリフェノールをはじめ、抗酸化作用を持つ物質等による肥満状態の質的改善作用などである¹⁸⁾。

G. mangostana 果皮成分として報告されているキサントン骨格を有する化合物(α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, garcinone B, garcinone E)はいずれもポリフェノールであることから、肥満状態の質的改善を介した作用であることを示唆した。

第三節 *Garcinia mangostana* 果皮抽出エキスに含まれる PPAR δ 活性化物質の探索

第一項 *G. mangostana* 果皮抽出エキスの予備分画

G. mangostana 果皮抽出エキスは株式会社フィールド アンド デバイスより分譲頂いた。

G. mangostana 果皮抽出エキスにおいて、PPAR δ アゴニスト活性が認められた。そこで、その活性化物質の探索を行った。*G. mangostana* 果皮抽出エキス 1 mg に pH3, 7 および 10 に調整した H₂O 300 μ L をそれぞれ加えて懸濁し、CHCl₃ 300 μ L にて 2 回分配を行った。H₂O 分配層を Ethyl acetate (EtOAc) 300 μ L にて 2 回分配し、さらにその H₂O 分配層を水飽和 *n*-BuOH 300 μ L にて 2 回分配を行った。それぞれの分配層を減圧下濃縮し、100 μ L の DMSO に溶解し、PPAR δ アゴニスト活性評価を行った。

pH3, 7 および 10 のそれぞれの条件下において、*G. mangostana* 抽出エキスを CHCl₃, EtOAc 及び *n*-BuOH にて順次分配を行い、各画分の活性評価を行った結果、pH3, 7 および 10 全ての CHCl₃ 可溶画分に高い活性が認められた(Figure 5, 6)。

すなわち、活性化物質本体は脂溶性化合物であると示唆された。

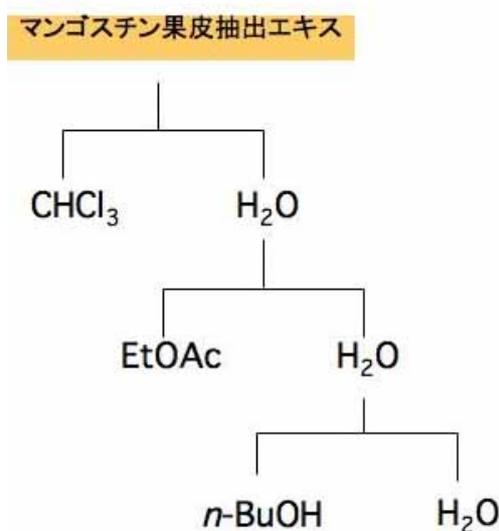


Figure 5 *G. mangostana* 果皮抽出エキスの分離

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

* $p < 0.05$ vs Vehicle, ** $p < 0.01$ vs Vehicle.

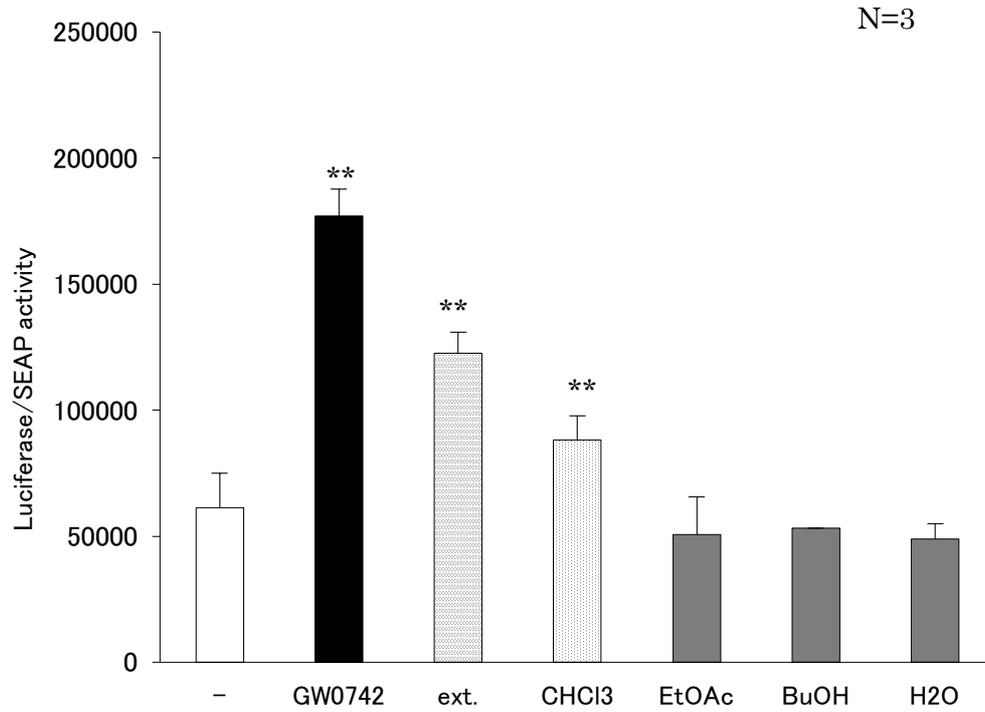


Figure 6 pH7 可溶性画分における *G. mangostana* 果皮抽出エキス PPAR δ アゴニスト活性

第二項 *G. mangostana* 果皮抽出エキスの活性化化合物の構造

G. mangostana 果皮抽出エキスをクロロホルムに溶解し、水で2回抽出した。合わせた抽出液を、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc/*n*-hexane)を用いて精製し、PPAR δ アゴニスト活性化化合物を単離した。

^1H および ^{13}C -NMR スペクトルにより構造を α -mangostin および γ -mangostin と同定した。これらのスペクトルにおいて、ひとつのメキシ基、2つのイソプレニル基が確認され、下記に示す文献値との比較を行い α -mangostin と同定致した(Figure 7)¹⁹⁾。 γ -Mangostin においては、 α -mangostin に認められたメキシ基に帰属するシグナルは観察されず、それ以外のスペクトルはほぼ同じであり、下記に示す文献値との比較から構造を同定した(Figure 8)¹⁹⁾。

G. mangostana 果皮に含まれる主成分は、キサントン骨格を有する化合物である7位がメキシ基である α -mangostin 85%、ヒドロキシ基である γ -mangostin 15%の含有量であることが報告されている。

α -mangostin は、ヒト白血球細胞である HL60 の細胞増殖に対するアポトーシス誘導作用による増殖抑制²⁰⁾、ラットにおける1,2-ジメチルヒドラジンで誘発される大腸の発ガン抑制²¹⁾、乳腺癌モデルマウスにおいて腫瘍増殖およびリンパ節転移の抑制²²⁾など多くの生理活性が報告されている。

また γ -mangostin は、悪性神経膠芽腫の抗増殖活性²³⁾、アルドケト還元酵素(AKR1B10)阻害による抗癌活性²⁴⁾などの報告がある。

そこで、 α および γ -mangostin における PPAR δ アゴニスト活性を reporter gene assay により評価した結果、コントロール物質がある GW0742 (0.1 nM) に対して α -mangostin は 2.5 μM の濃度で 1%、 γ -mangostin は 2.5 μM の濃度で 28%の活性を示した(Figure 9)。化合物単独の活性では、 γ -mangostin のアゴニスト活性が高いものの、果皮内含有量においては、 α -mangostin は 85%、 γ -mangostin は 15%と α -mangostin が圧倒的に多く存在していることから α 及び γ -mangostins が活性物質の本体であることを明らかにした。

α および γ -mangostins は、これまでに報告のない PPAR δ アゴニスト活性を有する化合物として見出した。

$^1\text{H-NMR}$

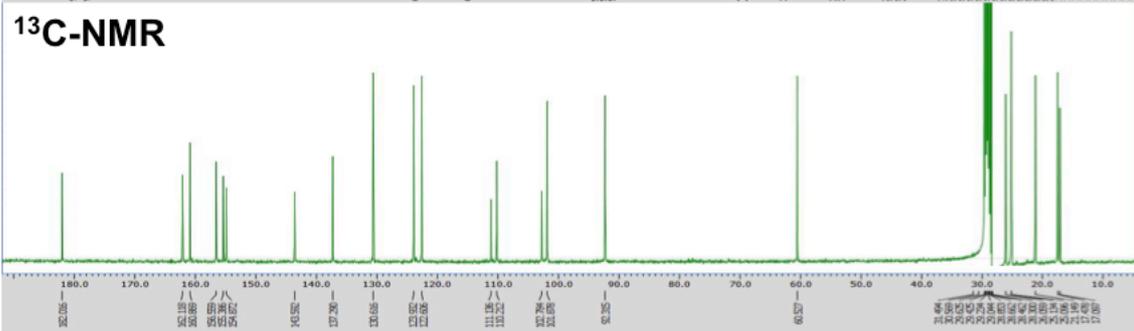
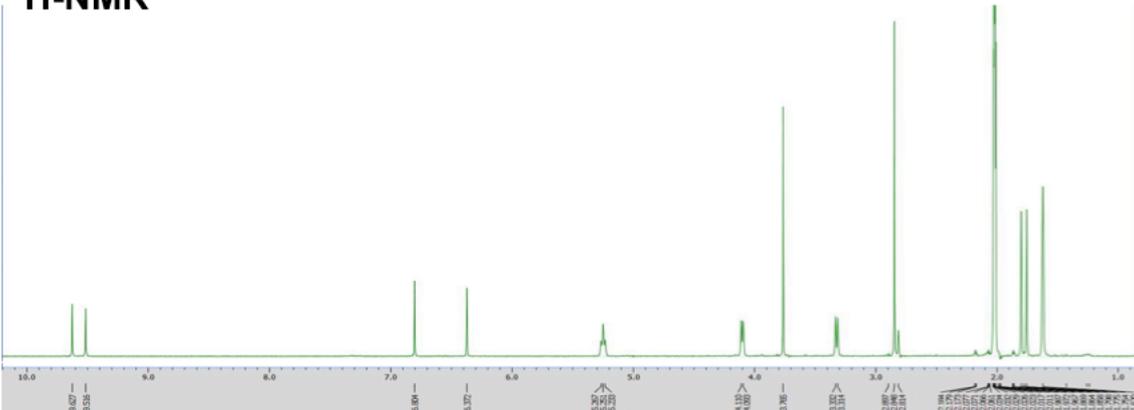


Figure 7 α -mangostin の ^1H および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

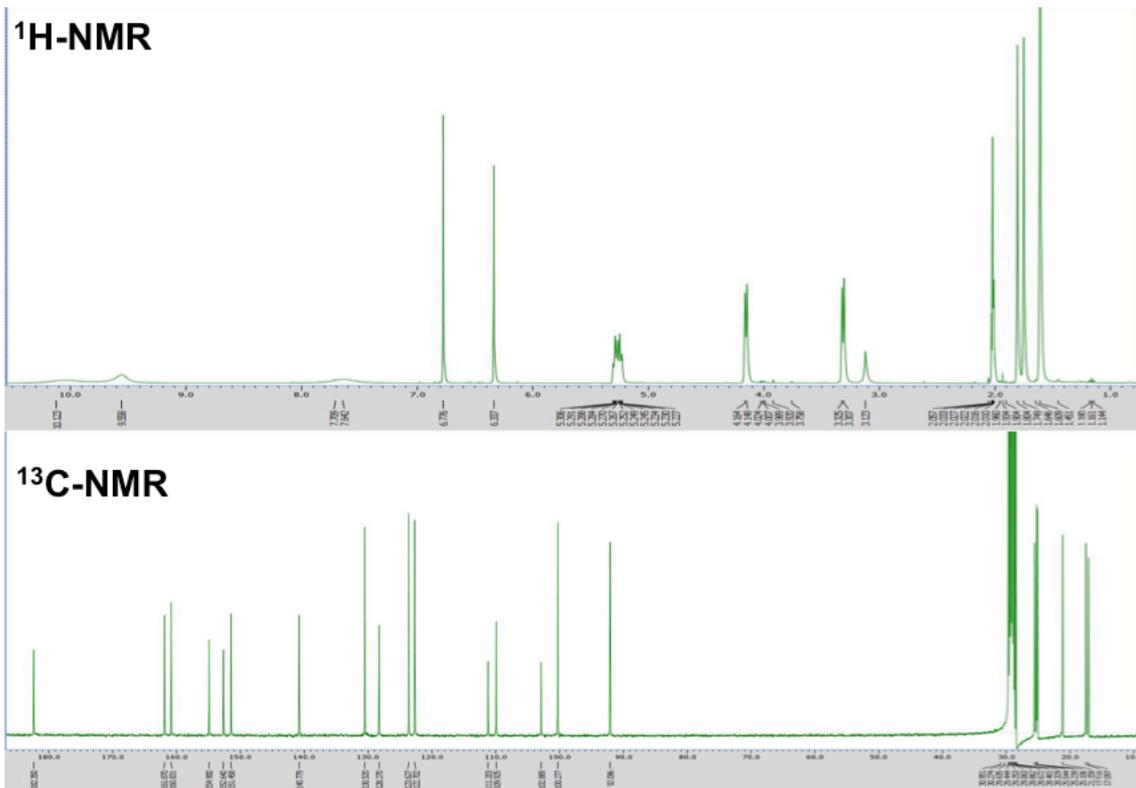


Figure 8 γ -mangostin の ^1H および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

** $p < 0.01$ vs Vehicle.

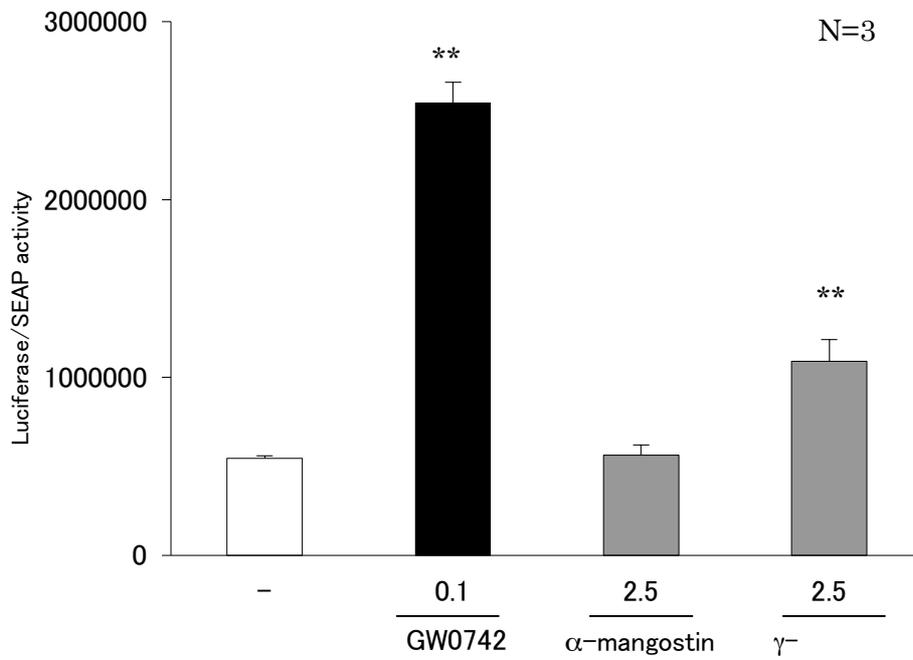
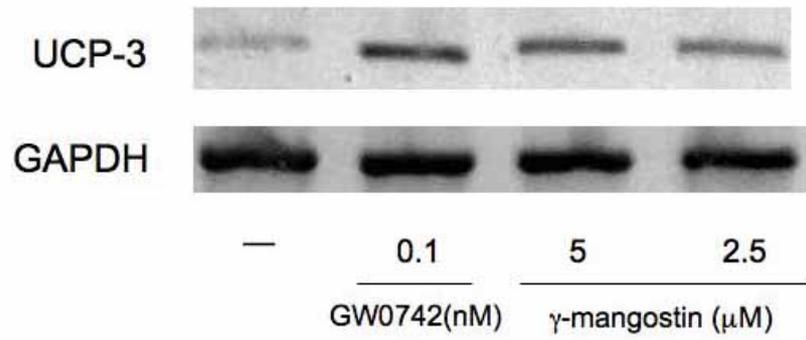


Figure 9 αおよびγ-mangostins の PPARδアゴニスト活性

第三項 γ -Mangostin によるエネルギー消費調節関連遺伝子発現に対する影響

遺伝子レベルにおいて γ -mangostinによるPPAR δ アゴニスト活性に基づくエネルギー消費調節関連遺伝子発現調節活性を評価する目的で、分化誘導後L6細胞に試料を添加し、エネルギー消費調節関連遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。ラット骨格筋由来L6細胞分化誘導後、 γ -mangostinもしくは既知アゴニストであるGW0742を培養液中に添加し、48h.後、RNAを抽出した。総RNAよりRT-PCR法を用いてエネルギー消費調節関連遺伝子であるuncoupling protein(UCP)-3について検討を行った。その結果、 γ -mangostin処理によりpositive controlであるGW0742と同程度、あるいはそれ以上のUCP-3遺伝子の発現上昇が観察された。すなわち、 γ -mangostinが細胞内のPPAR δ アゴニストとして作用し、エネルギー消費調節関連遺伝子の転写が活性化されたと考えられた(Figure 10)。



UCP-3 (Uncoupling protein-3)

GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Figure 10 γ -mangostin による UCP-3 遺伝子発現への影響

第四節 γ -Mangostin および α -Mangostin における PPARs アゴニスト活性

第一項 γ -Mangostin の PPARs アゴニスト活性に対する選択性

医薬品を創製する上において、薬剤の標的因子に対する選択性は極めて重要である。通常の薬剤では極めて高い選択性が、求められるが PPARs については副作用抑制の観点からデュアルアゴニストの開発が望まれている。

そこで PPAR δ アゴニスト活性の最も高い γ -mangostin について PPARs アゴニスト活性選択性の検討を行った。

その結果、 γ -mangostin 2.5 μ M の濃度において PPAR δ だけでなく PPAR α に対してもアゴニスト活性を有することを明らかにした。よって γ -mangostin は PPAR α および δ に対するデュアルアゴニストであることを明らかにした (Figure 11, 12)。

PPARs の選択性を検討するため以下のものを用いた。

形質転換 plasmid : pPPAR α -Gal4、pPPAR γ -Gal4

PPAR α アゴニスト : WY14643 (Cayman chemical 社)

PPAR γ アゴニスト : Troglitazone (三共株式会社)

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

** $p < 0.01$ vs Vehicle.

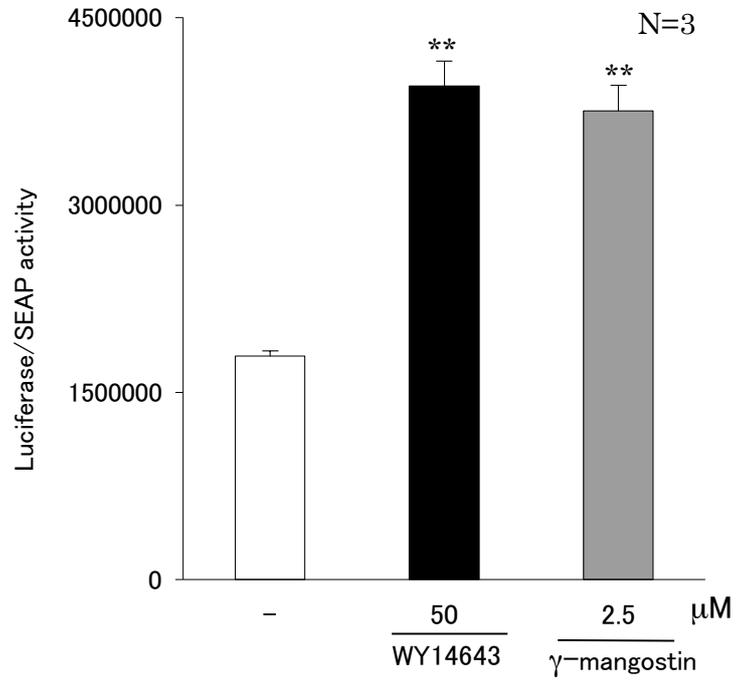


Figure 11 γ -mangostin における PPAR α アゴニスト活性選択性

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

** $p < 0.01$ vs Vehicle.

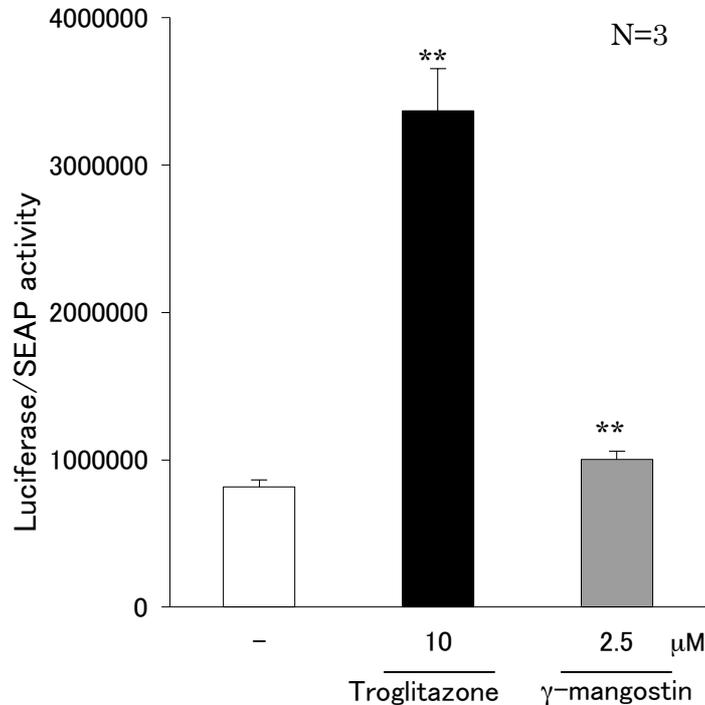


Figure 12 γ -mangostin における PPAR γ アゴニスト活性選択性

PPARs アゴニスト活性に対する選択性について、いくつかの報告がある。アレグリタザール(aleglitazar : F. Hoffmann-La Roche 社)は、PPAR α/γ デュアルアゴニストとして、II 型糖尿病患者における高血糖および脂質異常症の改善に有効であることが報告されている^{25,26}。

PPAR γ アゴニストである rosiglitazone, pioglitazone 等は、糖尿病患者に臨床で使用されている。心疾患系合併症に効果を有するものの、心血管イベントの抑制効果は証明されていない。PPAR α アゴニストは、フィブレート系薬剤によって血糖コントロールがされている。血糖コントロールの強化により心血管イベントの発症が抑制される。従って、糖尿病患者の脂質異常症の有病率を考えると、PPAR α/γ デュアルアゴニストの開発は重要である。なお、アレグリタザールは第三相試験において腎臓障害、心不全が認められたため、開発中止となっている(Figure 13)。

機能性食品としても PPAR α/γ デュアルアゴニストについては、はっさく果実

由来成分であるオーラプテン(10 mg/日)などが報告される。

このように PPAR デュアルアゴニストは、医薬品および予防食品としての可能性があることから、 γ -mangostin の PPAR α および δ に対するデュアルアゴニストであることは付加価値となりうる。

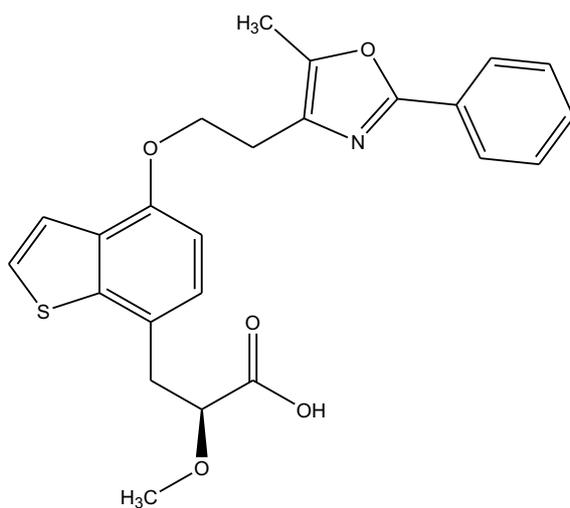
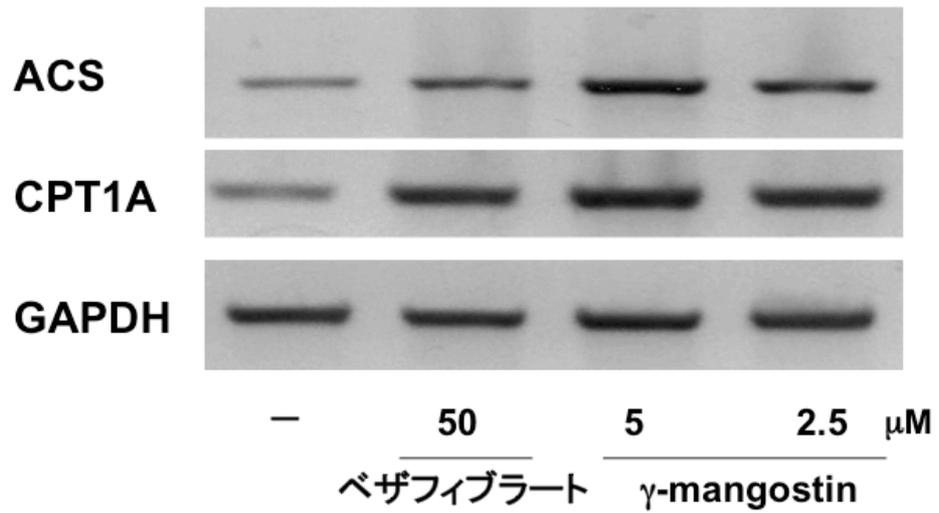


Figure 13 アレグリタザールの化学構造

第二項 γ -Mangostin による脂質代謝遺伝子発現に対する影響

遺伝子レベルにおいて γ -mangostin 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、PPAR α 発現遺伝子を形質転換した細胞に試料を添加し、RT-PCR 法によって脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、ヒト肝臓由来 HepG2 細胞に PPAR α 発現 plasmid を導入後、 γ -mangostin もしくは既知アゴニストであるベザフィブラートを培養液中に添加し、48h.後、RNA を抽出した。総 RNA より RT-PCR 法を用いて脂質代謝関連遺伝子である ACS、及び CPT1A について検討を行った。その結果、いずれの脂質代謝関連遺伝子においても positive control であるベザフィブラートと同程度、あるいはそれ以上の遺伝子発現上昇が観察された。すなわち γ -mangostin が PPAR α のアゴニストとして作用し、脂質代謝関連遺伝子の転写が活性化されたと考えられた(Figure 14)。

これらの結果から γ -mangostin を含む *G. mangostana* 果皮抽出エキスには、含有主成分である γ -mangostin の 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。



ACS (Acetyl-CoA synthetase)

CPT1A (Carnitine palmitoyl transferase 1A)

GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Figure 14 γ -mangostin による ACS および CPT1A 遺伝子発現への影響

第三項 キサントン誘導体における PPAR α および δ アゴニスト活性

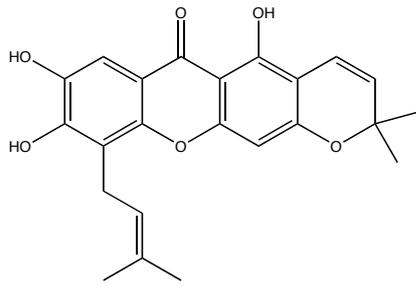
より比活性の高い化合物を創製する目的で様々なキサントン骨格を有する化合物の活性評価を行い、どのような置換基が PPAR α および δ アゴニスト活性を発現する上で、重要であるか構造活性相関について検討を行った。

G. mangostana 果皮から単離された化合物および類似構造を持つ化合物の活性評価を行った。 α および γ -mangostins は岐阜薬科大学 飯沼宗和教授より分譲頂いた。

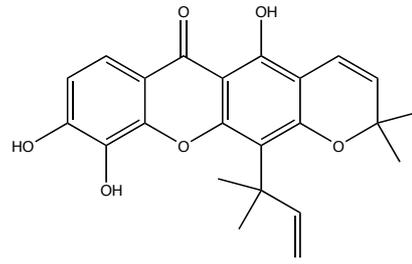
α -Mangostin、 γ -mangostin、caloxanthone A、macluraxanthone、subelliptenone A、12 β -hydroxy-des-D-garcigenin および harunganol B 以上 7 種類の化合物について PPAR α および δ アゴニスト活性を評価した(Figure 15)。その結果、PPAR δ について、 γ -mangostin に最も高い活性が認められ caloxanthone A、macluraxanthone および 12 β -hydroxy-des-D-garcigenin については、 γ -mangostin の約 50%程度の活性が認められた(Figure 16)。

また PPAR α については、 γ -mangostin に最も高い活性が認められ caloxanthone A、 γ -mangostin の約 80%程度の活性が認められた(Figure 17)。

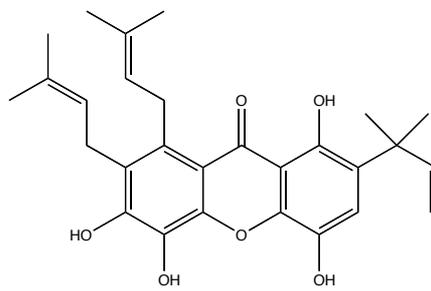
ここで、これら化合物間における構造活性相関を検討したが、特徴は認められなかった。しかしながら、 α および γ -mangostins の PPAR δ アゴニスト活性の差は非常に大きく、2.5 μ M の濃度においては γ -mangostin においてのみアゴニスト活性が認められた。これら化合物における化学構造の違いは、7位が、メトキシル基 (α -mangostin) もしくは水酸基 (γ -mangostin) であることから、7位にメトキシル基を有することがより活性を高めることが示唆された。



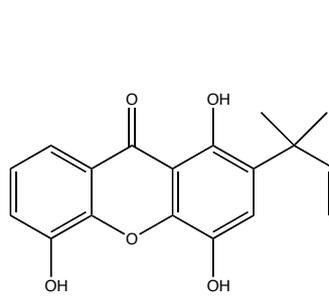
Caloxanthone



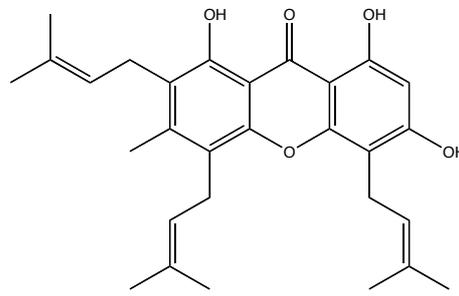
Macluraxanthone



Subelliptenone



12B-hydroxy-des-D-garcigenin



Harunganol B

Figure 15 キサントン誘導体の化学構造

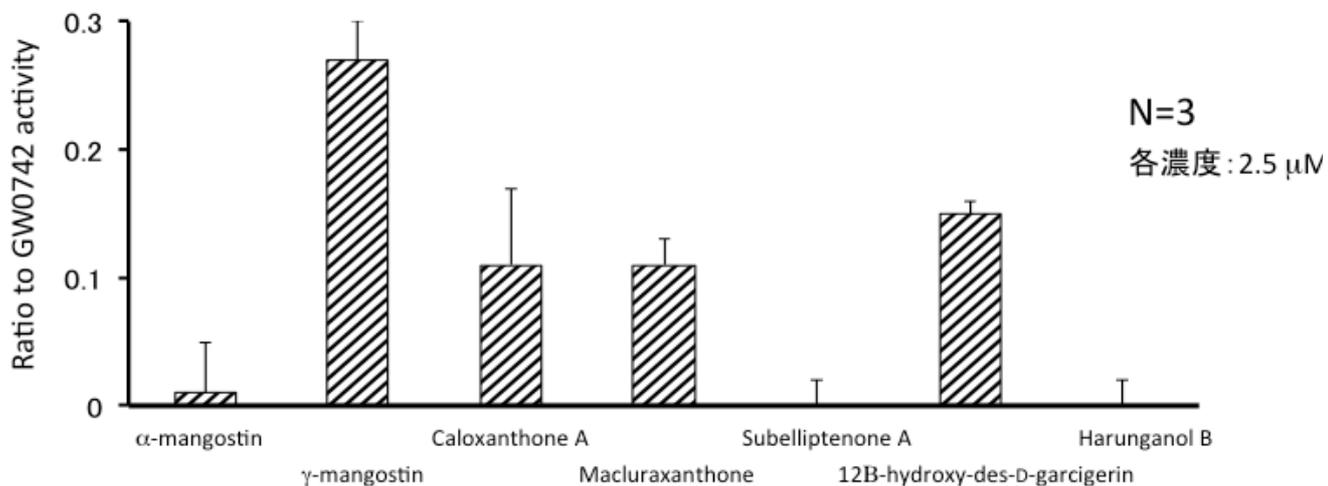


Figure 16 キサントン誘導体における PPAR δ アゴニスト構造活性相関

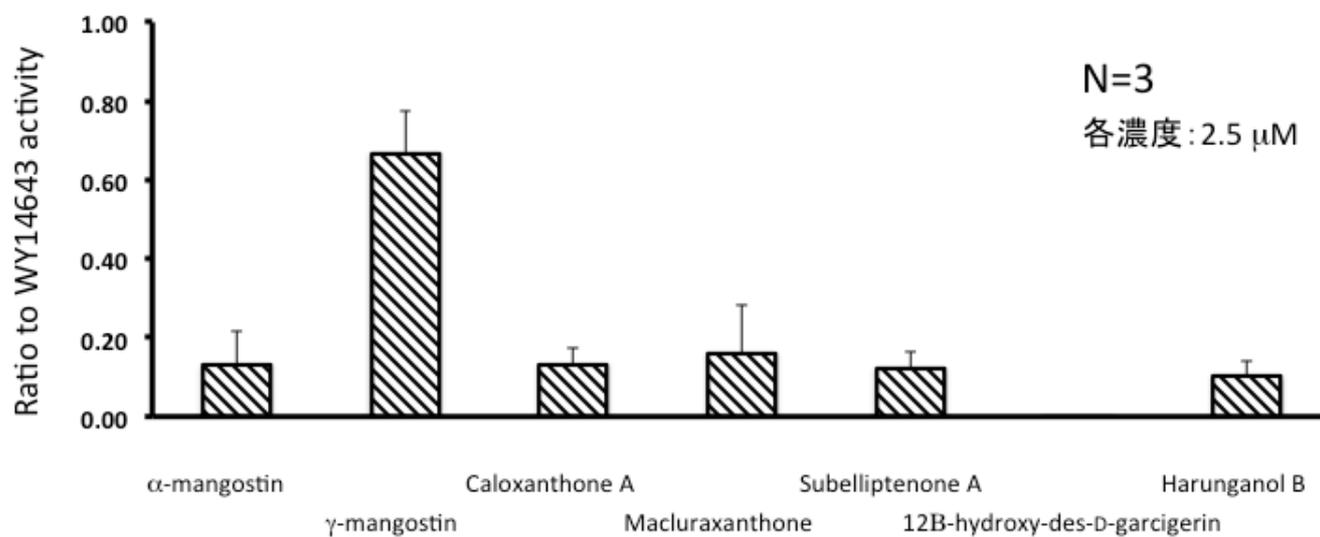


Figure 17 キサントン誘導体における PPAR α アゴニスト構造活性相関

第四項 α -Mangostin における PPAR α アゴニスト活性

γ -Mangostin に PPAR α アゴニスト活性が認められたことから、抽出エキスおよび α -mangostin にも PPAR α アゴニスト活性の存在が示唆された。

抽出エキスおよび α -mangostin における PPAR α アゴニスト活性を評価した結果、抽出エキス 5 μ g/ml の濃度において、コントロール物質である WY14643 の 23%の活性が認められた。

また α -mangostin 2.5 μ M においては約 15%のアゴニスト活性が認められた (Figure 18)。

そこで、 γ -mangostin と同様に、 α -mangostin について HepG2 細胞における脂質代謝関連遺伝子である ACS および EcH の発現調節活性について検討を行った。

その結果、 α -mangostin においても、ベザフィブラートと同等またはそれ以上の発現量の増加が認められた (Figure 19)。

従って、 α -mangostin は細胞内 PPAR α アゴニストとして作用し、脂質代謝関連遺伝子の転写活性を促進させることを示した。

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

** $p < 0.01$ vs Vehicle.

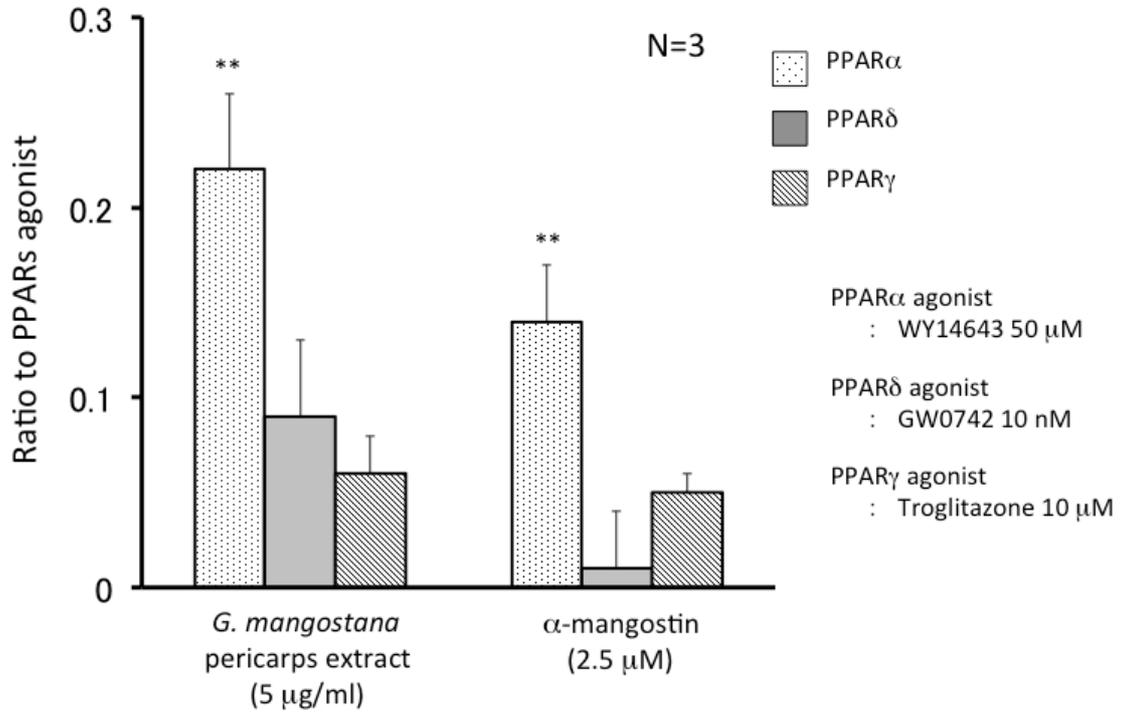
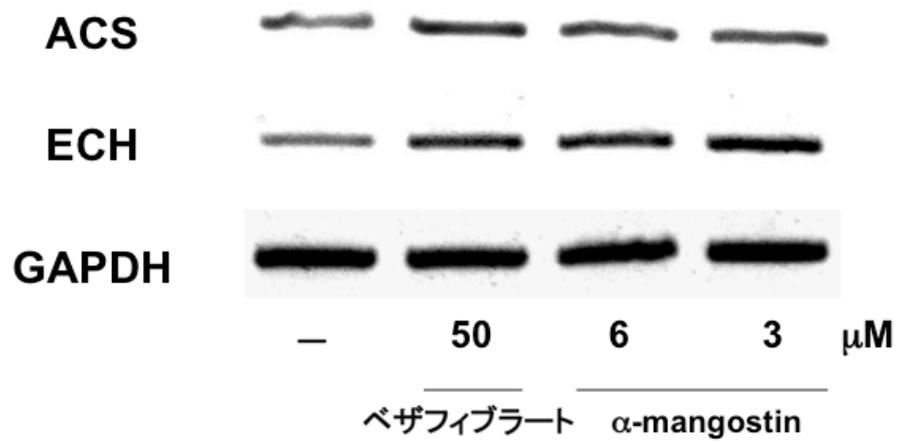


Figure 18 α -mangostin の PPARs アゴニスト活性選択性



ACS (Acetyl-CoA synthetase)
ECH (Enoyl-CoA hydratase)
GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Figure 19 α-mangostin による ACS および ECH 遺伝子発現への影響

第五節 小括

約 1000 検体の天然資源より *G. mangostana* 果皮抽出エキスに PPAR δ アゴニスト活性を見いだした。活性本体を明らかとする目的で α -mangostin および γ -mangostin の 2 化合物を単離した。

γ -mangostin は PPAR δ だけでなく PPAR α アゴニスト活性を有するデュアルアゴニストであること、 α -mangostin は PPAR α アゴニストであることを示した。従って、*G. mangostana* 果皮抽出エキスは脂質異常症および肥満の予防に対する有効性を示唆した。

第二部 食品代謝物における PPAR γ アゴニスト活性

第一章 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

第一節 緒言

第一部では、*G. mangostana* 果皮から単離された化合物 α および γ -mangostins に PPAR α および δ アゴニスト活性を見出したものの食品成分は一般的に代謝を受けることが知られている。ヒトおよびマウスにおいて α および γ -mangostin は、グルクロン酸抱合もしくは硫酸抱合を受ける可能性を示唆しているものの、MSを用いた構造推定であり、その代謝物の単離には至っていない^{27,28)}。

そこで、食品成分の生理活性の代謝との関連性を明らかにする一環で、すでに代謝が明らかとなっている、柑橘類の主成分であるヘスペリジンの代謝物に注目した。ヘスペリジン(hesperetin-7-*O*-rutinoside)は、ヘスペレチン(4'-methoxy-3',5,7-trihydroxyflavanone)に、配糖体として β -ルチノース(6-*O*- α -L-rhamnosyl-D- β -glucose)が結合したフラボノイドであり、多くの生理活性を有することが報告されている。生体内に吸収されたフラボノイドは、肝臓中で catechol *O*-methyltransferase, UDP-glucuronosyltransferase, phenol sulfotransferase により、メチル化体、グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体に代謝され血中を循環する。フラボノイドの生理活性研究は多く報告されているものの、食品成分そのものを *in vitro* において評価している場合が多い。しかし、フラボノイドの代謝物の多くは抱合体である。このように食品成分の生理活性の代謝と関連性は多く報告されていない。

ここで、オレンジには 100 g あたり 31-43 mg のヘスペリジンが含まれている²⁹⁾。ヒトにおいて 444 mg/L ヘスペリジンを含むオレンジジュースを経口摂取した場合、血中循環している代謝物は 87%がグルクロン酸抱合体として存在することが報告されている³⁰⁾。すなわち、ヘスペリジンは経口摂取後、腸内細菌が有する β -glucosidase によりルチノースが加水分解された後、アグリコンであるヘスペレチンとなり、ヘスペレチンは肝臓でグルクロン酸抱合を受ける(Figure 20)。

これまでの研究において、ヘスペリジンおよびヘスペレチンには、PPAR γ アゴニスト活性を示すことが報告されている³¹⁾。しかしながら、その代謝物であるヘスペレチングルクロナイドに関する報告はない。すなわち、柑橘類を経口摂取した際の PPAR γ アゴニスト活性本体はヘスペリジン代謝物である可能性が考

えられた。従って、本研究では、ヘスペリジンの機能解明を目的とし、ヘスペリジングルコナイドの作用について検討を行うこととした。

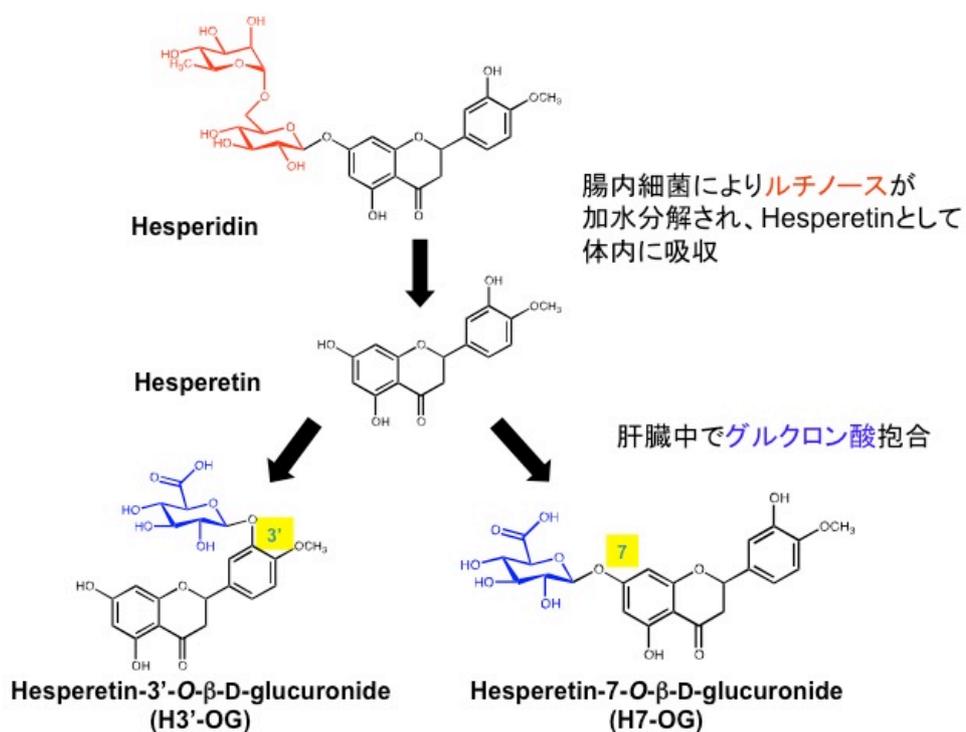


Figure 20 ヘスペリジンの代謝経路

第二節 ヘスペリジンおよびヘスペレチンにおける PPAR γ アゴニスト活性

柑橘類であるオレンジやレモンの主成分であるヘスペリジンは、フラボノイド化合物であり生理活性として毛細血管抵抗性増強³²⁾、抗酸化作用³³⁾および血中コレステロールの低下³⁴⁻³⁶⁾などの生活習慣病予防効果を示すことが報告されている。

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、ヘスペレチンとして体内に吸収される。

さらに肝臓において 3'位もしくは 7 位がグルクロン酸抱合される。血中では、ヘスペリジンが代謝され、約 87%がヘスペレチングルクロナイドとして存在する³⁰⁾。すなわち、ヒトにおいて代謝物であるヘスペレチングルクロナイドに PPAR γ アゴニスト活性を明らかにすることは重要である。

配糖体であるヘスペリジンおよびアグリコンであるヘスペレチンは *in vitro* において、いずれも PPAR γ アゴニスト活性を示すことが報告されている³¹⁾。

そこで、本実験系においてもヘスペリジンおよびヘスペレチンが PPAR γ アゴニスト活性を有するか確認した。

COS-1細胞を用いてヘスペリジンおよびヘスペレチンについて PPAR γ アゴニスト活性評価を行った結果、ヘスペリジンおよびヘスペレチン 12.5 および 25 μ M の濃度において濃度依存的 PPAR γ アゴニスト活性が認められた。ヘスペレチンおよびヘスペリジン 25 μ M において既存の PPAR γ アゴニストである troglitazone 10 μ M の約 85 および 30%のアゴニスト活性が認められた(Figure 21)。本実験系においてもヘスペレチンおよびヘスペリジンの PPAR γ アゴニスト活性が確認され、ヘスペレチンはヘスペリジンより高活性なアゴニストであった。

ヘスペリジンは、血中でヘスペレチングルクロナイドとして存在している。しかし、ヘスペリジンの代謝物に関する PPAR γ アゴニスト活性の報告は現在のところない。

従って、ヘスペレチングルクロナイドの PPAR γ に対する作用について検討する目的でヘスペリジン代謝物であるヘスペレチングルクロナイドの合成を行った。

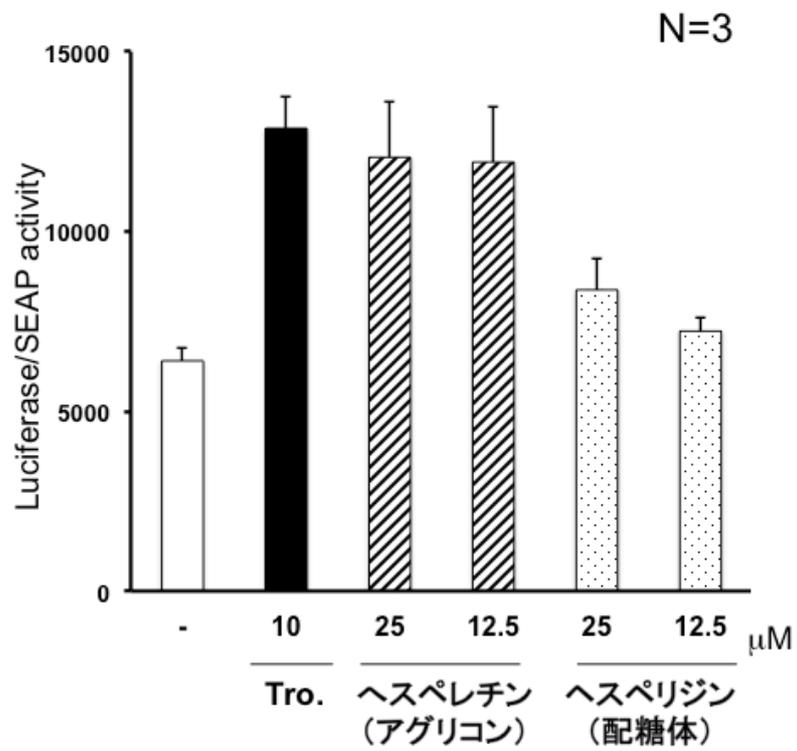


Figure 21 ヘスペリジンおよびヘスペレチンにおける PPAR γ アゴニスト活性

第三節 H3'-OG および H7-OG における PPAR γ アゴニスト活性

第一項 H3'-OG および H7-OG の合成

標準試料として、農業・食品産業技術総合研究機構（茨城県つくば市）より分譲されたラット血清由来ヘスペレチングルクロナイドを用いた。

主なヘスペレチングルクロナイドは2種存在する^{37, 39}。ヘスペレチングルクロナイドを大量に得る目的で3'位および7位グルクロン酸抱合された Hesperetin-3'-O- β -D-glucuronide (Figure 22) および Hesperetin-7-O- β -D-glucuronide (Figure 23)の合成を行った。

H3'-OG 合成³⁸および H7-OG 合成³⁹は、既報に従い行った。いずれの収率もほぼ既報通り得ることができた (H3'-OG を 34%、H7-OG を 20%)。

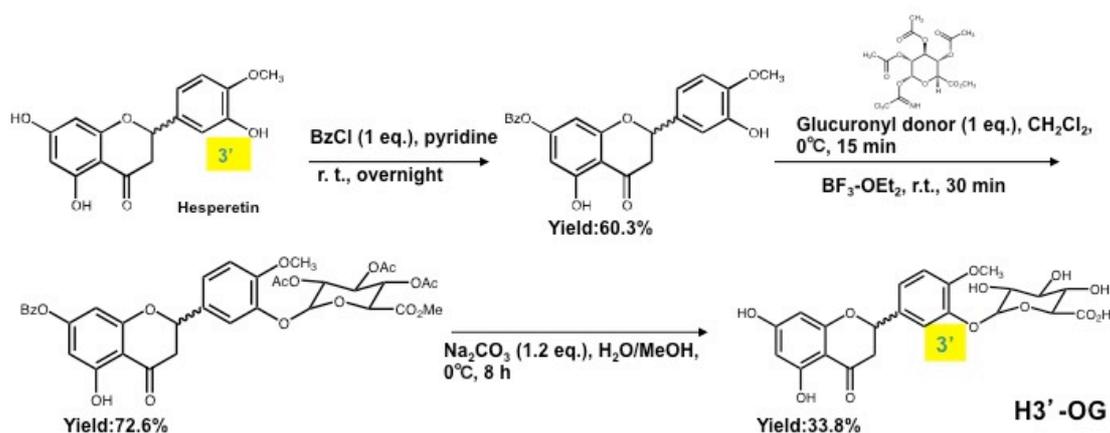


Figure 22 Hesperetin-3'-O- β -D-glucuronide の合成経路

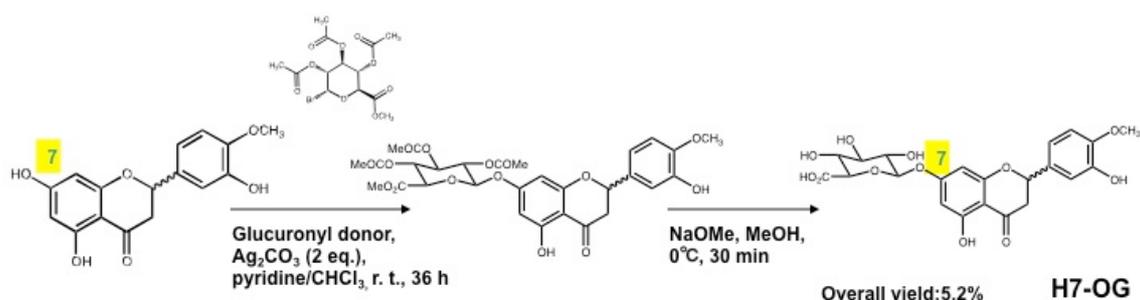


Figure 23 Hesperetin-7-O- β -D-glucuronide の合成経路

第二項 合成 H3'-OG および H7-OG における PPAR γ アゴニスト活性

合成した H3'-OG および H7-OG について、天然由来のヘスペレチングルクロナイドと比較する目的で、reporter gene assay 法を用いて PPAR γ アゴニスト活性を検討した。ラット血清より単離されたヘスペレチングルクロナイドは、H3'-OG および H7-OG 混合物である。この混合物が 500 μ M の濃度で PPAR γ アゴニスト活性を示したことから H3'-OG および H7-OG のいずれかが PPAR γ アゴニスト活性の本体であると推測された。

合成した H3'-OG 500 μ M もしくは H7-OG 500 μ M の濃度においては、troglitazone 1 μ M の約 29%もしくは 53%の活性が認められた。従って、合成物 H3'-OG および H7-OG いずれにおいてもラット血清より得られたヘスペレチングルクロナイドと同等の PPAR γ アゴニスト活性が認められた (Figure 24)。

H3'-OG および H7-OG いずれにも PPAR γ アゴニスト活性が認められ、これらの結果からヘスペレチングルクロナイドは、PPAR γ アゴニスト活性を示すことが本研究で初めて明らかにした。

(Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test)

** $p < 0.01$ vs Vehicle.

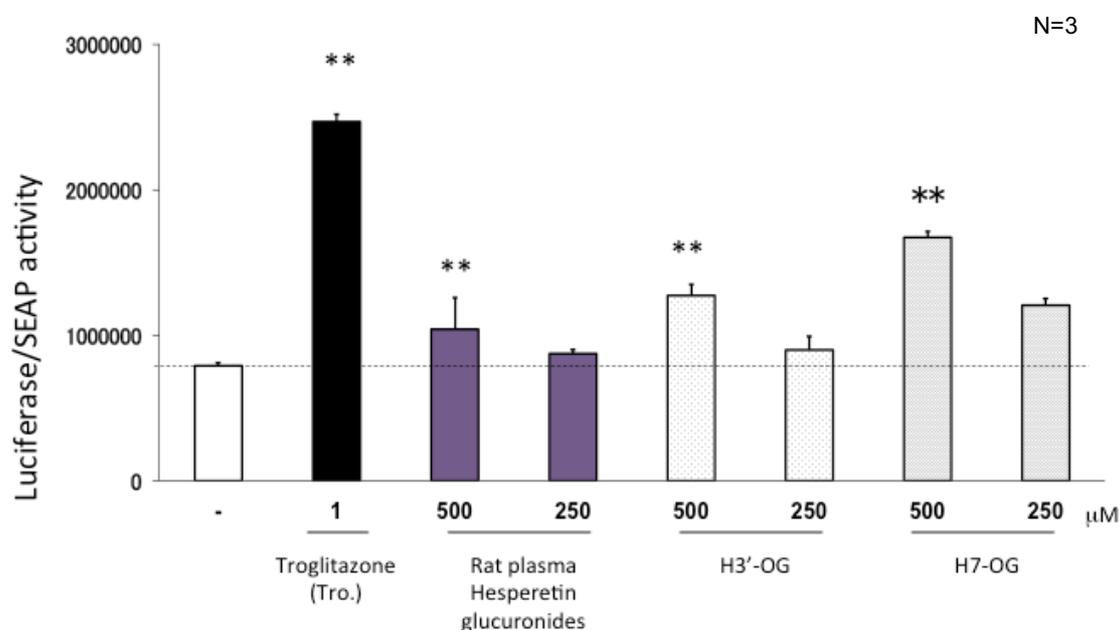


Figure 24 天然由来ヘスペレチングルクロナイドおよび合成ヘスペレチングルクロナイドの PPAR γ アゴニスト活性の比較

第三項 H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞への分化に対する影響

PPAR γ アゴニストは前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化させることが報告されている。

そこでH3'-OGおよびH7-OGにおける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結果、低濃度の $2.8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ インスリン添加時、H3'-OGおよびH7-OG $10 \mu\text{M}$ の濃度において、いずれの代謝物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およびH7-OGはPPAR γ アゴニスト活性に基づき、脂肪細胞への分化誘導促進活性を示すことが示唆された (Figure. 25, 26)。

肥満患者は脂肪細胞の肥大が認められ、TNF- α 、レジスチン、FFA(遊離脂肪酸)等が過剰増加しインスリン抵抗性惹起が起こる。チアゾリジン系薬剤はPPAR γ を介し小型脂肪細胞を分化させインスリン抵抗性を改善する。従って、H3'-OGおよびH7-OGは脂肪細胞の肥大化を抑制しチアゾリジン系薬剤と同様に生活習慣病を予防することが示唆された⁴⁰⁾。

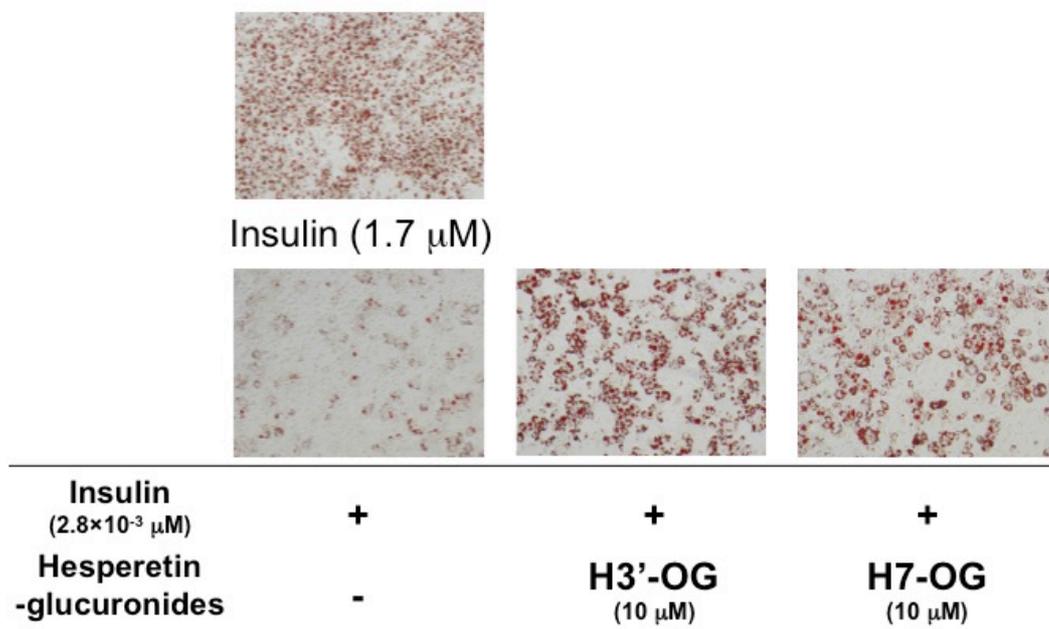


Figure 25 H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞への分化誘導

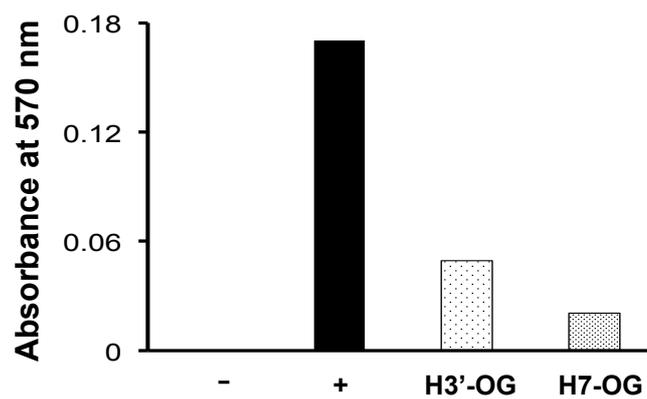


Figure 26 H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞分化における脂肪粒の定量

第四項 H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞分化誘導関連遺伝子発現に対する影響

PPAR γ ターゲット遺伝子の発現に及ぼす影響を検討する目的で 3T3-L1 細胞を用いて、RT-PCR 法を用いて検討を行った結果、低濃度インスリン時、脂肪細胞に特異的に発現する adiponectin、脂肪細胞分化の制御をする転写因子である C/EBP α ●CCAAT/enhancer-binding protein alpha●および PPAR γ ⁴¹⁾、これらの mRNA 発現を H3'-OG および H7-OG 25 μ M の濃度において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(H3'-OG および H7-OG)による脂肪細胞分化誘導関連遺伝子の転写活性促進が明らかとなった (Figure 27, 28)。

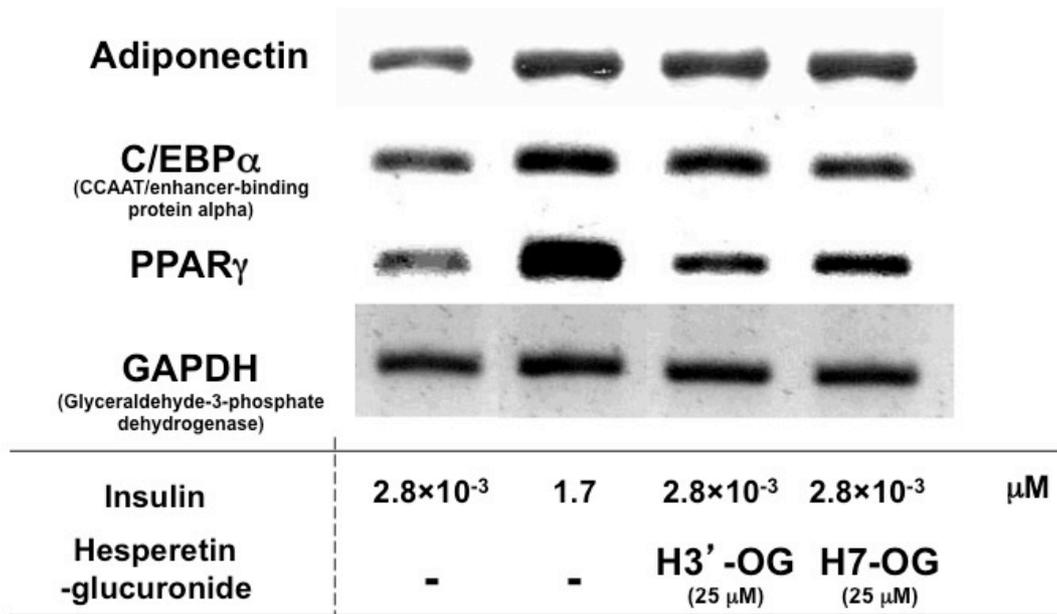


Figure 27 H3'-OG および H7-OG による Adiponectin および C/EBPα 遺伝子発現への影響

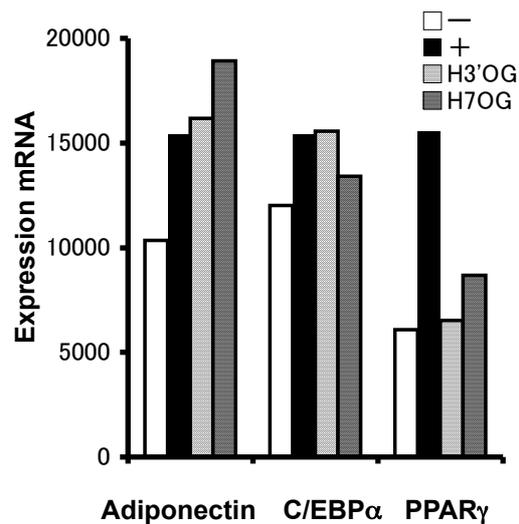


Figure 28 H3'-OG および H7-OG による脂肪細胞誘導関連遺伝子の転写促進活性

第五項 H3'-OG および H7-OG による PPAR γ タンパク質発現に対する影響

PPAR γ のタンパク質発現量に及ぼす影響を検討する目的で 3T3-L1 細胞を用いて、ウエスタンブロット法で検討を行った結果、H3'-OG および H7-OG 100 μ M の濃度においていずれにおいても、PPAR γ の発現量は増加した。従って、H3'-OG および H7-OG はタンパク質レベルにおいても PPAR γ の発現量を増加させることが明らかとなった(Figure 29)。

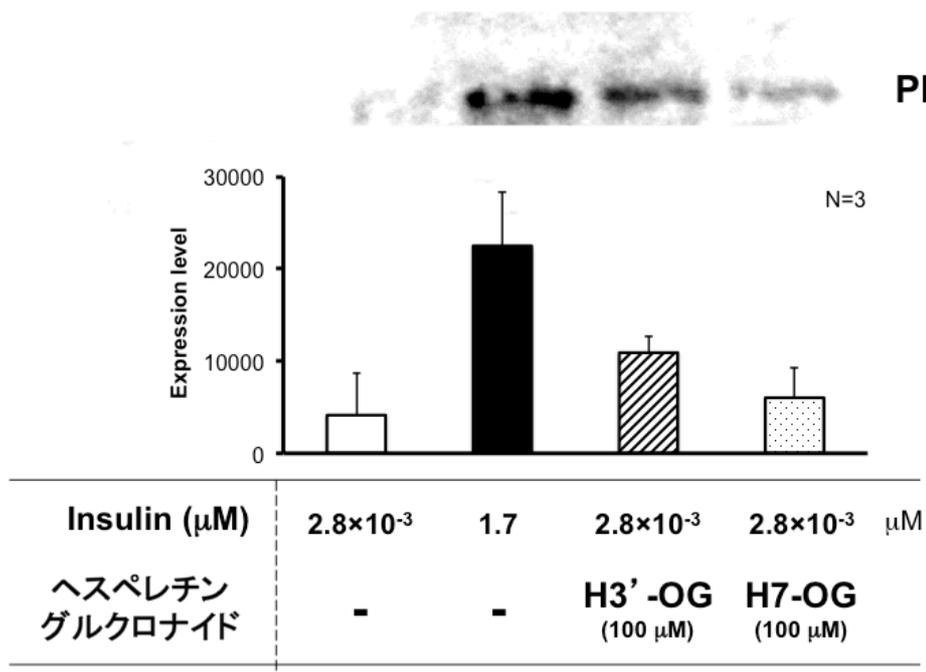


Figure 29 H3'-OG および H7-OG による PPAR γ 発現量

第二章 ヘスペレチングルクロナイドにおける PPAR γ 転写活性化機構の解析

第一節 緒言

II型糖尿病治療薬であるチアゾリジンジオン類が、核内受容体 PPAR γ アゴニストであることが判明したのち⁴²⁾、競合的に結合する内因性リガンドが探索された。その結果、酸化 LDL 由来物質である 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE)および 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)、アラキドン酸由来物質である 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂)など様々な内因性リガンドが報告された⁴³⁻⁴⁷⁾。白木、和久、Liらは、アミノ酸残基に変異を導入した PPAR γ を作製し、内因性リガンドを用いた受容体活性化機構の解析を行っている。これにより結合様式および立体構造について明らかにしており⁴⁸⁾、新たな新規合成リガンドの同定につながっている^{49, 50)}。従って、新規アゴニストであるヘスペレチングルクロナイドの PPAR γ 転写活性化機構および結合様式を検討することは重要であると考えた。

第二節 H3'-OG および H7-OG における PPAR γ 結合部位

第一項 H3'-OG および H7-OG とチアゾリジンジオン類の共存下による相乗的 PPAR γ アゴニスト活性

ヘスペリジン代謝物による PPAR γ 転写活性化機構の分子レベルでの解析の一環として、既存 PPAR γ アゴニストとして臨床使用されているチアゾリジンジオン類との活性化機構の比較検討を行った。troglitazone とヘスペレチングルクロナイドの PPAR γ 結合部位の差異を明らかにする目的で reporter gene assay 法を用いて検討した結果、最大活性濃度 troglitazone 10 μ M と H7-OG 250 μ M 共添加細胞に関しては、troglitazone の最大活性を超える発光を示し、相乗的活性増強が認められた。また troglitazone と H3'-OG 共添加細胞に関しては、troglitazone の最大活性と同程度の活性を示した (Figure 30)。

すなわち、H7-OG は、troglitazone とは異なる機構、もしくは異なる結合部位に結合することにより、PPAR γ アゴニスト活性を発現していることが示唆された。

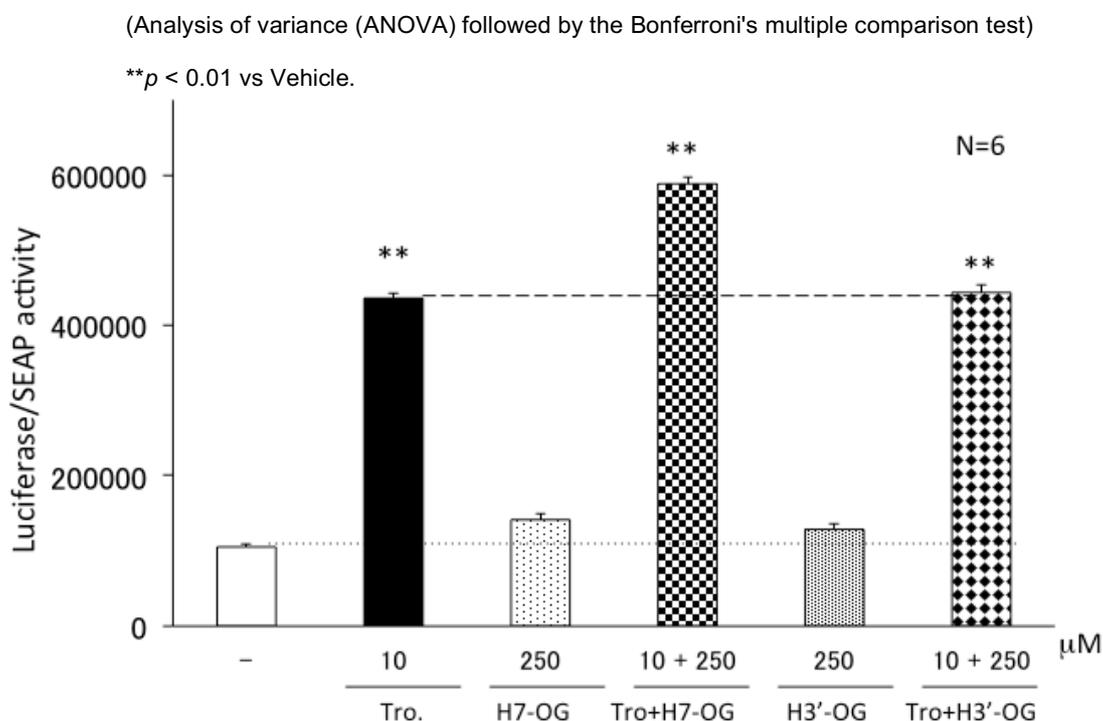


Figure 30 H3'-OG および H7-OG と troglitazone における相乗的アゴニスト活性

第二項 H3'-OG および H7-OG とチアゾリジンジオン類の結合部位の相違

ヘスペレチングルクロナイドと既存 PPAR γ アゴニストのチアゾリジンジオン類との結合活性を検討する目的で、TR-FRET(時間分解蛍光共鳴エネルギー転移)法を用いて H3'-OG および H7-OG の結合能を検討した(Figure 31)。

TR-FRET 法とは、時間分解蛍光(Time-Resolved Fluorescence)と蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence Resonance Energy Transfer)とを組み合わせタンパク質同士の相互作用を確認できる。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)をタグとして連結させた PPAR γ にフルオレセイン標識したアゴニストが結合すると、テルビウム(Tb)標識抗 GST 抗体のテルビウムとフルオレセインとの距離(10 nm 以下)が近いと、エネルギー転移が起こり、蛍光が観察される。ここでフルオレセイン標識したアゴニストと競合するアゴニストを添加すると、テルビウム(Tb)標識抗 GST 抗体のテルビウムとフルオレセインとの距離が遠くなり、エネルギー転移が起こる量が少なくなり、蛍光の減弱が観察される。

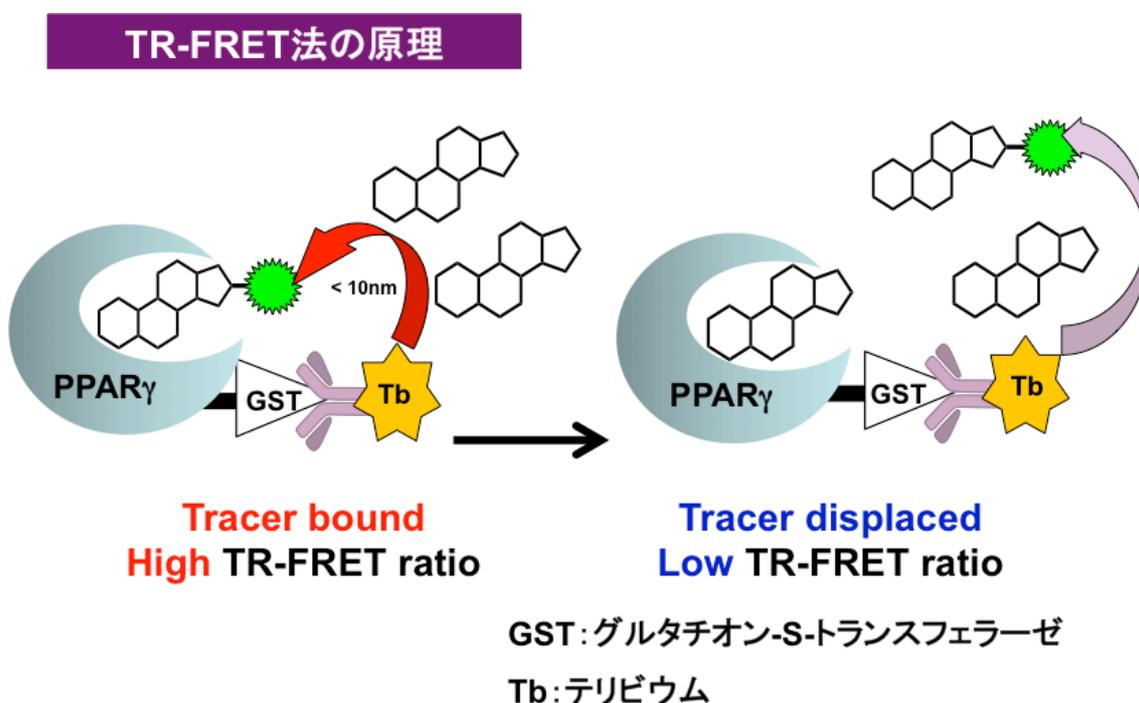


Figure 31 TR-FRET の原理

TR-FRET 法を用いて、ヘスペレチングルクロナイドと既存 PPAR γ アゴニストのチアゾリジンジオン類との結合活性を検討した結果、既存の PPAR γ アゴニストである pioglitazone は、50%阻害濃度(IC₅₀ 値) 2.3 μ M、阻害定数(Ki 値) 0.8 μ M であり、競合することで蛍光の減弱が示された。しかしながら、H3'-OG および H7-OG には競合作用が認められず、蛍光は一定であった。すなわち、本研究において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とは異なる部位に結合することが示された (Figure. 32)。

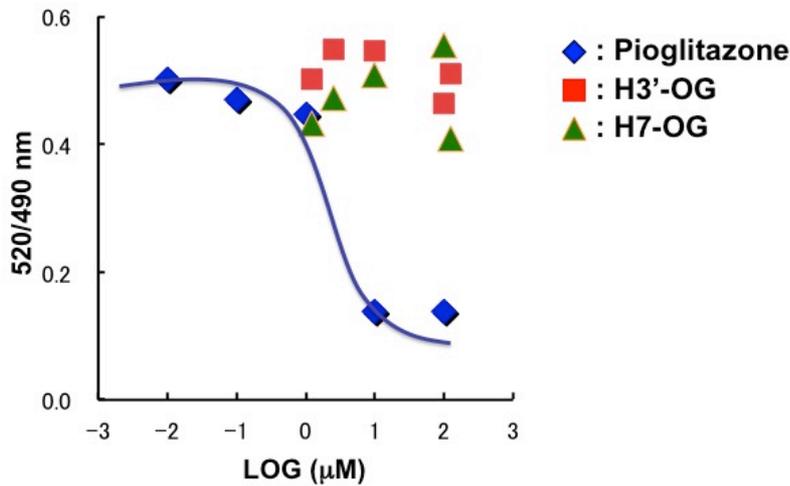


Figure 32 TR-FRET 法を用いた H3'-OG および H7-OG における PPAR γ 結合活性

第三項 点変異 PPAR γ を用いた転写活性化機構の比較

次に、分子レベルでの解析の一環として、点変異 PPAR γ を用いた転写活性化機構の比較検討を行った。点変異は、リガンド結合部位に関わる変異体(R288, F363)、コファクター結合に関わる変異体(K301, H466)、ドメイン安定性に関わる変異体(K265, P269, F287, E291, M329)約 10 数種類のプラスミドを調整した。9 種の点変異 PPAR γ について PPAR γ アゴニストの転写活性を評価した結果、ヘスペレチングルクロナイドは、K265A、P269A、F363A、R288H および E291A のプラスミドに troglitazone と同様の活性を認めた。一方、F287A は、troglitazone では活性を認めなかったものの、ヘスペレチングルクロナイドでは、PPAR γ アゴニスト活性を認めた。H466A は、troglitazone のみに PPAR γ アゴニスト活性を認めた。各点変異 PPAR γ で PPAR γ アゴニストにより活性の差異が認められた。よって、K301、M329、H466 は PPAR γ アゴニスト活性において重要なアミノ酸残基であると考えられる。

また、ヘルペレチン 4'位のメトキシル基がヒドロキシル基となったルテオリン(luteolin)については、すでにルテオリン-PPAR γ LBD 複合体として X 線構造解析が行われている⁵¹⁾。(Figure 33)

このことから、フラバノン骨格を有するヘスペレチングルクロナイドについてもルテオリンと類似した結合が推測される。したがって、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ことを示唆した。

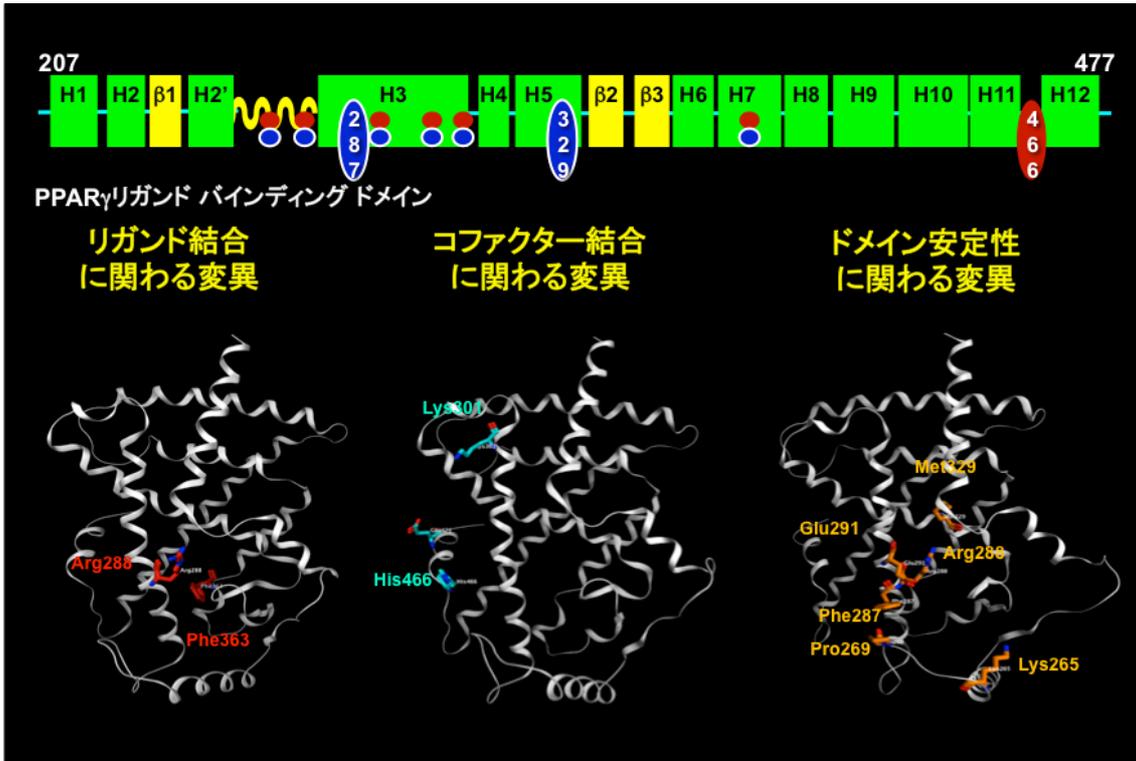


Figure 33 点変異 PPAR γ を用いた転写活性化機構

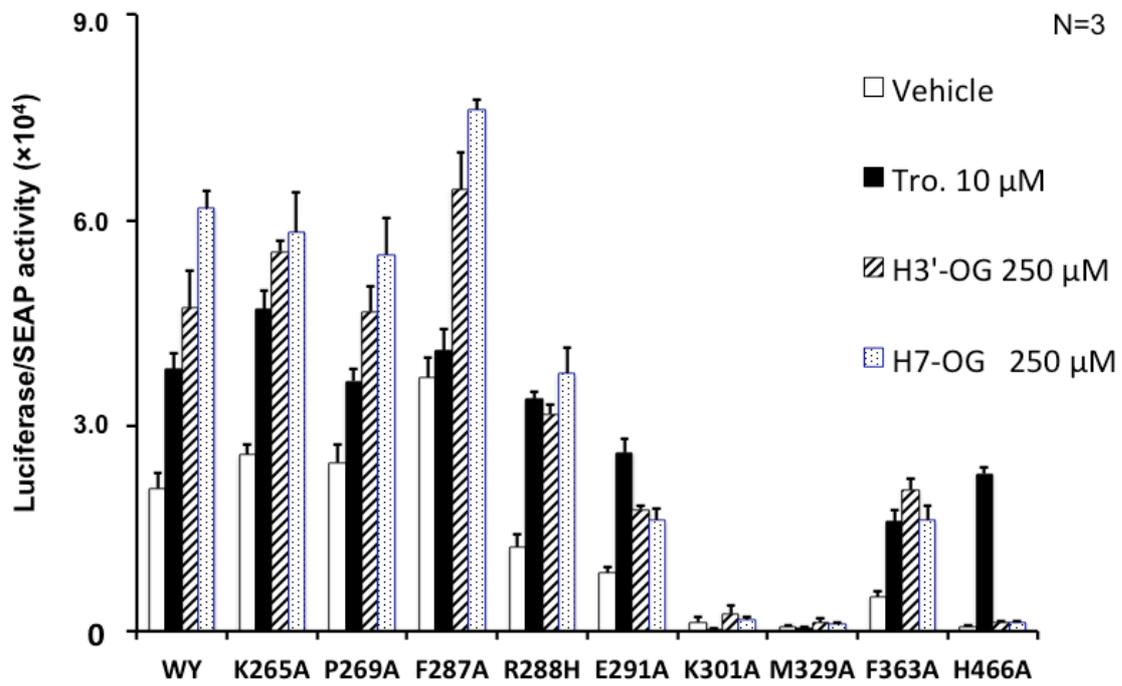
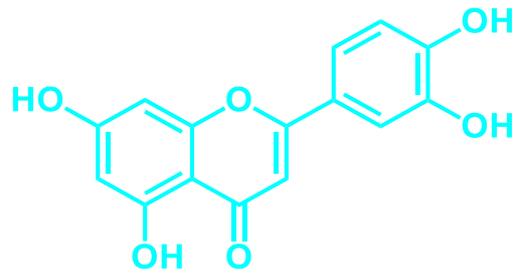


Figure 34 点変異 PPAR γ を用いたヘスペレチングルクロナイドによる転写活性



ルテオリンの化学構造

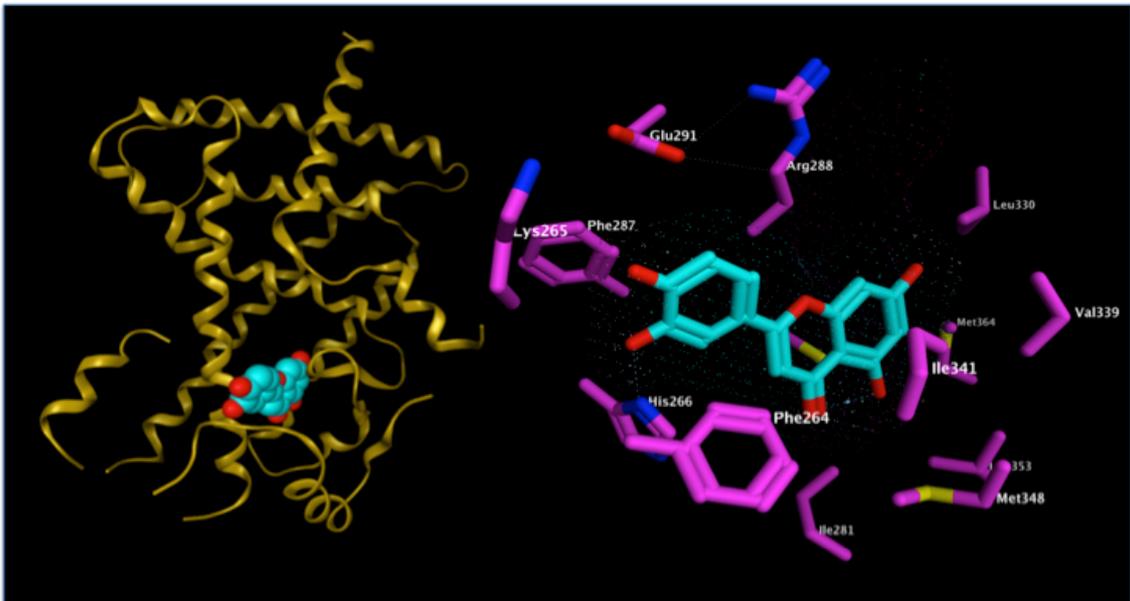


Figure 35 PPAR γ LBD のルテオリンが相互作用するアミノ酸側鎖

第三節 小括

柑橘類の主成分ヘスペリジンの作用機序解明を目的としてヘスペリジン代謝物における **PPAR γ** アゴニスト活性の検討を行った。本研究において初めてヘスペリジン代謝物であるヘスペレチングルクロナイドが **PPAR γ** アゴニスト活性を示すことを明らかにした。

このヘスペレチングルクロナイドは脂肪細胞への分化誘導促進活性、**PPAR γ** ターゲット遺伝子の転写促進活性、**PPAR γ** 発現増強活性を示した。

さらにヘスペレチングルクロナイドは既存のチアゾリジンジオン類化合物の結合部位とは異なる可能性が示された。このことから、食品代謝物に関する活性評価の重要性を再度示した。

総括

核内受容体 PPAR δ 活性化物質の探索に関する研究において、新規肥満予防および治療薬の開発を目的として、PPAR δ に着目し、植物および食品抽出液に含まれるアゴニストの探索を行なった。

まず植物及び食品抽出エキス約 1000 検体について PPAR δ アゴニスト活性評価を行った。その結果、*G. mangostana* 果皮抽出エキスに、PPAR δ アゴニスト活性を有することを見いだした。いずれも濃度依存的アゴニスト活性が認められた。また、いずれの植物も抗肥満活性に関する報告がないことから、新規抗肥満薬となり得る化合物の存在を示唆した。

活性物質の探索を行った結果、*G. mangostana* 果皮抽出エキスにおいて、活性物質としてキサントン化合物である α および γ -mangostins を同定した。これら化合物のアゴニスト活性を比較すると、 γ -mangostinの方が高いものの、果皮含有量においては、 α -mangostin が圧倒的に高いことから α -mangostin が果皮抽出エキスの活性に大きく寄与していることを明らかにした。より比活性の高い化合物を創製するためにも今後、さらなるキサントン誘導体について構造活性相関の検討を行う必要がある。

また γ -mangostin の有する PPARs アゴニスト活性の特徴は、PPAR δ だけでなくサブタイプである PPAR α にもアゴニスト活性を示すデュアルアゴニストであることを明らかにした。本化合物は、PPAR δ および α アゴニスト活性に基づくエネルギー消費調節関連遺伝子発現促進活性および脂質代謝関連遺伝子発現促進活性をも有することを見い出した。すなわち、これらの結果より γ -mangostin を含む *G. mangostana* 果皮抽出エキスには、含有主成分である γ -mangostin の PPAR α および δ アゴニスト活性により高脂血症および抗肥満予防もしくは治療薬としての可能性が期待される。

G. mangostana 果皮抽出エキスは現在、抗癌活性を有する食品としてサプリメント提供され市場に流通している。本研究では、それに加えて、生活習慣病予防および治療活性というエビデンスを付与することができた。

PPAR δ アゴニストは、肥満と糖脂質代謝を総合的に改善し、メタボリックシンドロームの治療薬として有望であることから、臨床薬剤開発が望まれている。しかしながら、動物モデルにおいて、PPAR δ の過剰な発現は十二指腸癌を引き起こす可能性があることが報告され⁵²⁾、またその一方、PPAR δ は大腸ポリ

ープの形成を抑制すると報告されている⁵³⁾。このことから薬効と毒性について詳細に検討してゆく必要があり、慎重な薬剤開発が今後の課題である。

しかし、生活習慣病は毎日の生活で改善できることであるから、まずライフスタイルの中で生活習慣病を引き起こさないことが何よりも重要である。

これら化合物は天然物から単離したため、既存である GW0742 (PPAR δ アゴニスト)と化学構造が全く異なる。すなわち本研究にて得られた天然資源(α および γ -mangostins)は、予防医学および抗肥満治療薬開発において、PPAR δ アゴニスト開発におけるリード化合物になり得る可能性がある。

さらに、本研究では食品代謝物にも注目する一環として代謝物がすでに明らかとなっており、生理活性化物としても報告の多い、ヘスペリジンについて検討した。

本研究において、報告されているようにフラボノイドであるヘスペリジンおよびアグリコンであるヘスペレチンに PPAR γ アゴニスト活性を有することを再度、確認した。さらにヘスペレチングルクロナイドに PPAR γ アゴニスト活性が認められることを初めて明らかにした。次に、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化誘導を行い H3'-OG および H7-OG は PPAR γ アゴニスト活性に基づき、脂肪細胞への分化誘導促進活性を発現すると考えられた。さらに脂肪細胞分化誘導関連遺伝子である adiponectin, C/EBP α , PPAR γ の mRNA 発現増強を明らかにした。このことから H3'-OG および H7-OG は PPAR γ アゴニストとして作用し、脂肪細胞分化誘導関連遺伝子の転写が活性化されたと考えられた。これらの結果から、H3'-OG および H7-OG の PPAR γ アゴニスト活性により糖尿病予防活性が期待される。また、柑橘類を摂取した際の有効成分はヘスペリジンであるが、実際に PPAR γ を活性化させている活性本体は、代謝物であるヘスペレチングルクロナイドも寄与していることが示唆された。

ヘスペリジンは難水溶性であることが知られているため体内吸収率が低い。その改善法として、酵素反応によってブドウ糖を結合させることにより糖転移ヘスペリジンが開発された。これは、ヘスペリジンの水溶性を 10 万倍にも向上させ、体内吸収率も 3 倍向上した。糖転移ヘスペリジンの代謝物もグルクロン酸抱合体であることが報告された⁵⁴⁾。また、グリコ健康科学研究所は、ヘスペレチンを微粒子化し乳化剤および安定化材でヘスペレチンの周りに膜をつくることで水溶液中に分散することを可能とした分散ヘスペレチン (ナノヘスペレチン) を開発した。分散ヘスペレチンは、速やかな吸収性および吸収量の増加

を示した。いずれもすでに商品は市場に出回っている。

本研究の PPAR γ アゴニスト活性は、これらサプリメントの新たな付加価値となり得る可能性がある。

また糖尿病治療薬である既存のチアゾリジンジオン類との結合活性を比較では、H7-OG と troglitazone 共存下においてはアゴニスト活性が増強し、H7-OG は troglitazone と異なる部位に結合していることが示唆された。ヘスペレチンと同様にフラボノイドであるルテオリン (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-chromenone)においてヒト PPAR γ リガンド結合ドメインの X線構造解析がされており、リガンド結合ポケット中に結合していることが報告されている⁵⁵⁾。グルクロン酸が3'もしくは7位に結合しているヘスペレチングルクロナイドと PPAR γ の相互作用の推測になると考えられた。

生活習慣病は、ライフスタイルの影響を非常に受けることから予防がもっとも重要である。身近な食材で生活習慣予防を行うことは QOL (Quality of Life) の点からも、またみかん産業の応用にも有効活用の可能性があると考えられる。本研究における代謝物の活性は、再度、食品代謝物の重要性を示唆するものである。

実験の部

第一部 *G. mangostana* 果皮抽出エキスにおける PPARs アゴニスト活性

第一章 核内受容体 PPAR δ 活性化資源の探索

試薬

使用した試薬は、特に記載のない限り特級試薬を用いた。

細胞の培養

アフリカミドリザル腎由来(COS-1)細胞は、理化学研究所開発銀行、ヒト肝癌由来(HepG2)細胞およびラット骨格筋由来筋芽(L6)細胞は、(財)ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、マウス前駆脂肪細胞(3T3-L1)細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源銀行より分譲されたものを用いた。

細胞の培養は、セラムチューブ(Corning 社)中の懸濁液(10% dimethylsulfoxide を含む培地中、液体窒素気層下にて保存)を溶解し、10 mL のセラムチューブ 1000 rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去し、2 mL の培地を用いて細胞を分散し 15 mL の培地を入れた 100 mm 培養シャーレ(Corning 社)に移し、37°C, 5% CO₂ 存在下にて一晚培養した。Bacteria 等の混入がないことを確認し、培地交換および継代培養を行った。

継代培養は、100 mm 培養シャーレの培地を除去し、PBS(-)で洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収した。1000 rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去し、培地を加えて細胞を分散後、COS-1 細胞および HepG2 細胞は、その 1/10 を、L6 細胞は、1/30、3T3-L1 細胞は、1/15 を 15 mL の培地を入れた 100 mm 培養シャーレに播き、37°C, 5% CO₂ 存在下にて培養した。COS-1 細胞、L6 細胞および 3T3-L1 細胞はこれを 3 日おきに、HepG2 細胞は 4 日おきに継代培養を行った。

培地：ダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM, ニッスイ②)(日水製薬株式会社)9.5 g を 1.0 L の超純水に溶解し、オートクレーブ(121°C, 20min.)滅菌した。室温に戻した後、ろ過滅菌した 10% 牛胎児血清(Fetal Bovine Serum(FBS) : PAA 社 Lot. A70107-0340)、ろ過滅菌した 0.06% L-グルタミン(ナカライテスク)、0.2% NaHCO₃ を加えた。FBS は、37°C の水浴で溶解し、56°C, 30min.熱処理することにより非動化した。非動化後は 50 mL ずつ分注し使用直前まで -20°C 保存した。

Phosphate-buffered saline(PBS)(-) : NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g を超純水 1.0 L で溶解した。これをオートクレーブ(121°C, 20min.)滅菌した。

トリプシン溶液 : Trypsin(GIBCO) 0.5 g, EDTA · 3Na 0.2 g を PBS(-)で 1.0 L にし、4°Cで 16 時間攪拌した。そして、完全に溶解したことを確認した後、ろ過滅菌を行った。

G. mangostana 果皮抽出エキスの活性化化合物の構造同定

G. mangostana 果皮抽出エキスをクロロホルムに溶解し、水で 2 回抽出した。合わせた抽出液を、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc/*n*-hexane)を用いて精製した。

¹H および ¹³C-NMR スペクトルにより構造を同定した。

α-Mangostin; yellow powder; ¹H-NMR (acetone-d₆, 500 MHz) δ: 1.643, 1.639 (3H each, s, H-14 and H-15), 1.77 (3H, s, H-20), 1.82 (3H, s, H-19), 3.34 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, H-11), 3.78 (3H, s, OCH₃), 4.12 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-16), 5.27 (2H, m, H-12 and H-17), 6.38 (1H, s, H-4), 6.80 (1H, s, H-5), 9.52, 9.63 (1H each, brs, C-3-OH and C-6-OH), 13.77 (1H, s, C1-OH). ¹³C-NMR (acetone-d₆, 500 MHz) δ: 17.1 (C-19), 17.5 (C-14), 21.1(C-16), 25.1 (C-15 and C-20), 28.4 (C-11), 60.5 (-OCH₃), 92.3 (C-4), 101.9 (C-5), 102.8 (C-9a), 110.2 (C-2), 111.1 (C-8a), 122.6 (C-17), 123.9 (C-12), 130.6 (C-13 and C-18), 137.3 (C-8), 143.6 (C-7), 154.9 (C-3), 155.4 (C-6), 156.6 (C-10a), 160.9 (C-1), 162.1 (C-4a), 182.0 (C-9).

γ-Mangostin; yellow powder; ¹H-NMR (acetone-d₆, 500 MHz) δ: 1.61 (6H, s, H-14 and H-15), 1.75 (3H, s, H-20), 1.80 (3H, s, H-19), 3.32 (2H, d, *J*=7.2Hz, H-11), 4.18 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-16), 5.27 (2H, m, H-12 and H-17), 6.34 (1 H, s, H-4), 6.78 (1H, s, H-5), 7.60, 9.45, 9.80 (1 H each, brs, C-3-OH, C-6-OH and C-7-OH), 13.91 (1 H, s, C-1-OH). ¹³C NMR (acetone-d₆, 500 MHz) δ: 17.0 (C-19), 17.5 (C-14), 21.2 (C-16), 25.2 (C-15 and C-20), 25.5 (C-11), 92.1 (C-4), 100.3 (C-5), 102.9 (C-9a), 109.9 (C-2), 111.2 (C-8a), 122.7 (C-17), 123.6 (C-12), 128.3 (C-8), 130.5 (C-13 and C-18), 140.8 (C-7), 151.5 (C-10a), 152.6 (C-6), 154.9 (C-3), 160.8 (C-1), 161.9 (C-4a), 182.4 (C-9).

Plasmid の精製

1. Plasmid 精製用大腸菌の培養

(1)大腸菌の形質転換

大腸菌 competent cell (Wako 社 NIPPON GENE) 100 μ L を氷上で融解し、4°C の plasmid 溶液を 10 ng 程度添加して穏やかに攪拌した。42°C, 20sec. の heat shock を行った後、穏やかに攪拌して、適量を LB plate (Ampicillin(Amp) 100 μ g/mL 含有) に均一に塗布し、37°C にて 16h. 培養した。

(2)大腸菌の培養

形質転換して plate に培養した大腸菌のシングルコロニーを掻き取り、LB medium (Amp 100 mg/mL 含有) 3 mL 中で 37°C にて 8h. 震盪培養した。さらに、plasmid の調製用として LB medium (Amp 100 mg/mL 含有) 50 mL 中で 37°C にて 16h. 震盪培養した。その後、保存用として 50% glycerol 溶液に等量入れ、液体窒素気層下に保存した。

2. 大腸菌からの plasmid の精製

Plasmid の精製には HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を使用した。培養した大腸菌液を遠心用 50 mL tube に移して、6000 x g, 4°C, 15min. 遠心分離後、上清を除去し、Buffer P1 を 6 mL 添加して沈殿物が完全に浮遊するまでピペッティングにより攪拌した。Buffer P2 を 6 mL 添加し、穏やかに攪拌した後、25°C, 5min. 放置して溶菌させた。4°C の Buffer P3 を 6 mL 添加して穏やかに攪拌した後、直ちに QIAfilter Midi Cartridge に移し、25°C, 10min. 放置した。その間、HiSpeed Midi Tip に Buffer QBT を 4 mL 加え、イオン交換樹脂の平衡化を行った。10min. 後、QIAfilter Midi Cartridge の溶解物を HiSpeed Midi Tip に入れ、樹脂に吸着させた。Buffer QC を 20 mL 加えて樹脂を洗浄した後、Buffer QF を 5 mL 加えて DNA を溶出させ、溶出液を 15 mL tube に集めた。この溶出液に Isopropanol を 3.5 mL 添加し、穏やかに攪拌した後、25°C, 5min. 放置して DNA を沈殿させた。その後、QIAprecipitator Midi Modules を取り付けした 20 mL のシリンジに移し、DNA を吸着させた。同じシリンジに 70% EtOH を 2 mL 添加して DNA を洗浄した後、空気を通して EtOH を完全に揮発させた。DNA が吸着したままの QIAprecipitator Midi Modules を新しい 5 mL のシリンジに付け替えて、Buffer TE を 1 mL 加え、1.5 mL tube に DNA を溶出した。溶出液をシリンジに戻してもう一度 QIAprecipitator Midi Modules に通し、DNA の回収率を高めた。最後に、DNA 溶液を TE buffer で 1/20 濃度に

希釈し、260 nm における吸光度を測定することにより DNA 濃度を決定した。

LB medium(Amp 100 µg/mL 含有): bacto tryptone 2 g, bacto yeast extract 1 g, NaCl 2 g を超純水 200 mL に溶解し、オートクレーブ(121°C, 20min.)滅菌した。室温に戻した後、100 mg/mL の Amp を 200 µL 加えた。

LB plate(Amp 100 µg/mL 含有) : LB medium に 1.5% BACTO-AGAR(DIFCO)を加えてオートクレーブ(121°C, 20min.)滅菌した。65°C程度まで冷めた後、100 mg/mL の Amp を 100 µg/mL となるよう加えて微生物培養用 plate に 15 mL 程度入れ、水平なところに放置して固化させた。

TE buffer : 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)を超純水にて調製後、高圧蒸気滅菌を行った。

Reporter gene assay 法

1. COS-1 細胞の形質転換

COS-1 細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去し、2 mL の培地で細胞を分散して 60 mm 培養シャーレ(Corning 社)に 5×10^5 cells/well の密度で播いた後、37°C, 5% CO₂ 存在下にて 24h.培養した。形質転換には Effectene Transfection Reagent(QIAGEN 社)を使用した。1.5 mL tube に Buffer EC 150 µL, pPPARs-Gal4 0.25 µg, pGal4-Luc 1 µg, pSEAP-control vector 1 µg 最後に Enhancer 18 µL を加え、vortex で 1sec.攪拌した。25°C, 2min.放置した後、Effectene 25 µL 加え、vortex で 10sec.攪拌し 25°C, 5min.放置した。この間に、60 mm 培養シャーレの培地を除去し、4 mL 新鮮培地に交換をした。その後、1.5 mL tube に培地 1 mL を加え、2 回のピペッティング後、60 mm 培養シャーレに全量を滴下し、37°C, 5% CO₂ 存在下にて 16h.培養した。

2. COS-1 細胞への被検試料添加

形質転換した細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去し、8.5 mL の培地に懸濁して 96 multi well white plate (NUNC)に 0.8×10^4 cells/well (125 µL/well)の密度で播き、37°C, 5% CO₂ 存在下にて 1~2h.培養した。その後、被検試料を 1.25 µL/well 添加し、穏やかに攪拌して 37°C, 5% CO₂ 存在下にて 24h.培養した。

3. Luciferase 活性測定

被検試料添加から 24h.後、培地を 25 µL/well 回収し、新たな 96 multi well

white plate に移した。その後、残りの 100 μ L/well に、37°Cにて融解した luciferase 活性測定用溶液を 100 μ L/well 添加し、暗所にて 35min.反応させた後、発光強度を測定した。

4. Secreted alkaline phosphatase (SEAP)活性の測定

回収した培地に、1 x Dillution Buffer 25 μ L/well を添加し、セロハンテープで蓋をした後、穏やかに攪拌し、65°C, 30min. incubate した。その後、4°Cにて 5min.冷却し、Assay Buffer 90 μ L/well を添加して穏やかに攪拌した。25°C, 5min.放置し、MUP solution 10 μ L/well を添加して穏やかに攪拌した。暗所にて 25°C, 60min.反応させた後、4-methylumbelliferone に基づく蛍光強度 (Ex = 360nm, Em = 460nm)を測定した。

Luciferase 活性測定用溶液 : 60 mM Tricine-NaOH (pH7.8), 16 mM (CH₃COO)₂Mg, 0.4 mM EDTA, 0.1% Surfact-Amps X-100 (Thermo), 0.5 mM D-Luciferin potassium salt (ナカライテスク), 1.5 mM Adenosine 5'-triphosphate (SIGMA), 0.5 mM Coenzyme A (SIGMA), 0.1 mM β -Mercaptoethanol を超純水で調製し、10 mL 程度ずつ分注して使用直前まで -20°Cに保存した。

1 x Dillution Buffer : 使用直前に 5 x Dillution Buffer を、H₂O を用いて希釈した。5 x Dillution Buffer は、NaCl 4.38 g, Tris 2.42 g を 90 mL の超純水で溶解した後、12N HCl を加えて pH7.2 に調整し、使用直前まで 4°Cに保存した。

Assay buffer : L-homoarginine 塩酸塩 (C₇H₁₆N₄O₂-HCl) 0.9 g, MgCl₂ 0.04 g を超純水 158 mL に溶解し、diethanolamine 42 mL を加えた。12N HCl を加えて pH9.8 に調整し、使用直前まで 4°Cに保存した。

MUP solution : 1 x Dillution Buffer 2.7 μ L/well, Assay Buffer 7 μ L/well, 10 x MUP 0.3 μ L/well を使用直前に混合した。10 x MUP は、4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) 2.56 mg を 1 x Dillution Buffer 1000 μ L で溶解し、使用直前まで -20°Cにて保存した。

RT-PCR 法

1-(1). L6 細胞の分化誘導

L6 細胞を 10%FBS 含有 D-MEM 培地を用いて 30 mm シャーレに 3 \times 10⁵ cells/dish の密度で培養した。細胞定着後、2%FBS 含有培地に交換し、48h.インキュベートすることにより分化誘導を行なった。目視において L6 細胞の形態

変化を確認した。

1-(2). L6 細胞への被検試料添加

L6 細胞分化後、0.1%FBS 含有培地を 3 ml 入れて培地交換をした。その後、DMSO、GW0742 もしくは、被検試料を必要量添加し、穏やかに攪拌して 37°C, 5% CO₂ 存在下にて 48h.培養した。

2-(1). HepG2 細胞へのプラスミド導入

HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去し、2 mL の培地で細胞を分散して 30mm 培養シャーレ(Corning 社)に 2 x 10⁵ cells/well の密度で播いた後、37°C, 5% CO₂ 存在下にて 24h.培養を行った。

プラスミド導入には Effectene Transfection Reagent (QIAGEN 社)を使用した。1.5 mL tube に Buffer EC 100 µL, pPPAR α 0.4 µg 最後に Enhancer 3.2 µL を入れ、vortex で 1sec.攪拌した。25°C, 2min.放置した後、Effectene 10 µL 加え、vortex で 10sec.攪拌して 25°C, 5min.放置した。この間に、30 mm 培養シャーレの培地を除去し、新しく培地を 1.6 mL 入れて培地交換をした。5min.後、1.5 ml tube に培地を 600 µl 加え、2 回、ピペッティングにより懸濁して 30mm 培養シャーレに全量を滴下し、37°C, 5% CO₂ 存在下にて 24h.培養を行った。

2-(2). HepG2 細胞への被検試料添加

30mm 培養シャーレの培地を除去し、新しく培地を 3 ml 入れて培地交換をした。その後、DMSO、ベザフィブラート (ベンザトール SR 錠 キッセイ薬品工業) もしくは、被検試料を必要量添加し、穏やかに攪拌して 37°C, 5% CO₂ 存在下にて 48h.培養した。

3. RNA の精製

48h.後、被試料添加細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min.遠心分離後、上清を除去して RNA を精製した。RNA の精製には RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN 社), QIAshredder(50)(QIAGEN 社)を使用した。回収した細胞に Buffer RLT (1% β -mercaptoethanol(分子生物学用, Wako)を添加した) 350 µL を加えて細胞を溶解し、全量を QIAshredder Mini Column にのせて 15000rpm, 23°C, 2min.遠心操作後、溶出液に 70% EtOH 350 µL を加えた。ピペッティングにより懸濁後、全量を RNeasy Mini Column にのせて 15000rpm, 23°C, 15sec.遠心操作を行い、RNA を silica-membrane に吸着させた。その後、RNeasy Mini Column を洗浄するために、Buffer RW1 700 µL を加えて

15000rpm, 23°C, 15sec.遠心、Buffer RPE(EtOH 44 µL 添加した) 500 µL を加えて 15000rpm, 23°C, 15sec.遠心、再び Buffer RPE 500 µl を加えて 15000rpm, 23°C, 2min.遠心操作を行った。残った EtOH を完全に除去するために 15000rpm, 23°C, 1min.遠心操作を行い、DNase, RNase – free water 40 µL を加えて 15000rpm, 23°C, 1min.遠心操作を行うことにより、1.5 mL tube に RNA を溶出させた。高濃度の RNA 精製のため、再度 RNeasy Mini Column に通し、RNA の回収率を高めた。また、RNA 溶液を DNase, RNase – free water で 1/50 の濃度に希釈し、260nm における吸光度を測定することにより RNA 濃度を測定した。

4. Complementary(c)DNA の測定

1.5 mL tube に、RNA 4 µg と DNase, RNase – free water を加えて 10 µL としたものを 65°C, 15min.インキュベーションすることにより変性させた。その間に cDNA 作製用溶液を調製した。1.5 mL tube に、5 x First Strand Buffer (invitrogen) 4 µL, DTT (0.1M, invitrogen) 2 µL, dNTP Mix (10 mM, invitrogen) 1 µL, DNase, RNase – free water 1.67 µL, Random Primers (3 mg/µL, invitrogen) 0.2 µL, Ribonuclease inhibitor (40 units/uL, Toyobo) 0.125 µL, M-MLV Reverse Transcriptase (200 u/ µL, invitrogen) 1 µL を入れて穏やかに攪拌した。15min.後、氷冷(1min.)し、cDNA 作製用溶液を 10 µL 添加して穏やかに攪拌し、37°C, 60min.反応させた。

5. Polymerase chain reaction (PCR)

1.5 mL tube に 10 x PCR Reaction Buffer(-MgCl₂) (invitrogen) 2.5 µL, MgCl₂ (50 mM, invitrogen) 0.75 µL, dNTP Mix 0.5 µL, sense primer (20 µM) 0.5 µL, antisense primer (20 µM) 0.5 µL, Taq DNA Polymerase Recombinant (5 unit/µL, invitrogen) 0.125 µL, 超純水 19.25 µL を入れて穏やかに攪拌し、PCR 反応溶液を調製した。0.2 mL PCR tube に、PCR 反応溶液 24 µL, cDNA 溶液 1 µL を入れ、穏やかに攪拌して PCR 反応(94°C, 1min. – (94°C, 40sec. – 57°C, 40sec. – 72°C, 1min.) x 28cycle)を行った。その後、ゲルローディングバッファーを 5 µL 添加し、アガロースゲル電気泳動を行うことによって遺伝子発現量を測定した。アガロースゲル電気泳動には 2.5% アガロースゲル(1 µg/mL ethidium bromide (EtBr)含有)と Tris-acetate, EDTA(TAE) buffer を使用した。

10 mM dNTP Mix: 100 mM dNTP Set PCR Grade(invitrogen)を使用した。
100 mM dATP Solution 10 µL, 100 mM dTTP Solution 10 µL, 100 mM dCTP

Solution 10 μ L, 100 mM dGTP Solution 10 μ L を DNase, RNase – free water 60 μ L で調製した。

エネルギー消費調節関連遺伝子⁵⁶⁾ :

Sense primer : 100 μ M Uncoupling protein (UCP)-3-F, 100 μ M human(h) GAPDH-F をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

Antisense primer : 100 μ M UCP-3-R, 100 μ M human(h)-GAPDH-R をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

UCP-3 : 5'-AAT TGG CCT CTA CGA CTC TGT C-3' and 5'-TCA GCT GCT CGT AGG TTA CAAA-3'

GAPDH : 5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GG-3' and 5'-CTT ACT CCT TGG AGG CCA T-3' (Operon 社)

脂質代謝関連遺伝子⁵⁷⁾ :

Sense primer : 100 μ M Acyl-CoA synthase(ACS)-F, 100 μ M carnitine palmitoyl-transferase (CPT) 1A-F, 100 μ M h-GAPDH-F をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

Antisense primer : 100 μ M ACS-R, 100 μ M CPT 1A-R, 100 μ M h-GAPDH-R をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

ACS : 5'-AGC AGA GCT TCG CAG CGG C-3' and 5'-CTG CTG TTT TCG CTG GGT CC-3'

CPT1A : 5'-AAT CAT CAA GAA ATG TCG CAC GA-3' and 5'-AGG CAG AAC AGC GTC AGC ATC G-3'

GAPDH : 5'-TCA TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG-3' and 5'-GAG CTT GAC AAA GTG GTC GTT GA-3' (Operon 社)

ゲルローディングバッファー : 0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 1 mM EDTA, 30 % glycerol を超純水で調製した。

TAE buffer : 0.04 M Tris, 0.04 M 氷酢酸, 0.001 M EDTA(pH8.0) を超純水で調製した。

One STEP Marker 11 (pUC19/Msp I) (日本ジーン)

2.5% アガロースゲル(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide(EtBr)含有) : Agarose-LE, Classic Type(電気泳動用特製試薬, ナカライテスク) 0.9 g に TAE buffer 30 mL を加え、加熱して Agarose を完全に溶解した後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr を加えて攪拌した。その後、ゲル成型トレイに流し込み、固まるまで放置した。

第二部 食品代謝物における PPAR γ アゴニスト活性

第一章 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

ヘスペレチングルクロナイド合成法

ヘスペレチングルクロナイドである H7-OG は、Matsumoto H., *et al* 2004³⁹⁾、H3'-OG は、Dangles O., *et al* 2010³⁸⁾を参考に合成した。

H3'-OG の合成方法

7-O-Benzoylhesperetin:

ヘスペレチン(1 equiv)をピリジン(15 mL)に溶解し氷上で攪拌した。そこにベンゾイルクロライド (2.15 mL, 18.5 mmol)を滴下し加え、室温にて overnight 攪拌した。反応液を酢酸エチル 300 mL で希釈し、水 200 mL および 2 M HCl 100 mL で抽出した。さらに 2 M HCl 100 mL で 2 回抽出した。合わせた抽出液を飽和炭酸水素ナトリウム 100 mL で洗浄した。さらに抽出液を飽和食塩水 100 mL で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc/*n*-hexane)を用いて精製し、7-O-Benzoylhesperetin を収率 90%で得た。

¹H NMR (CD₃OD), δ 8.20 (2H, d, $J = 7.2$, H2Bz, H6Bz), 7.70 (1H, t, $J = 7.2$, H4Bz), 7.55 (2H, t, $J = 7.2$, H3Bz, H5Bz), 6.93-6.92 (3H, m, H2', H5', H6'), 6.46 (1H, d, $J = 2.1$, H6), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$, H8), 5.49 (1H, dd, $J = 12.7, 3.0$, H2), 3.87 (3H, s, OMe), 3.07 (1H, dd, $J = 12.7, 17.0$, H3a), 2.82 (1H, dd, $J = 3.0, 17.0$, H3b)

7-O-Benzoylhesperetin 3'-O- [Methyl

(2'',3'',4''-tri-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl uronate]:

N₂ 雰囲気下 7-O-Benzoylhesperetin (0.5 g, 1.3 mmol)を 4 Å molecular sieves を含む無水 CH₂Cl₂ (15 mL)に溶解し、glucuronyl donor (methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-1-O-(trichloroacetimidoyl)- α -D-glucuronate) (0.45 g, 1 equiv) を加え、ice-water 中で 15 分間攪拌した。その後 BF₃ · Et₂O (170 μ L, 1 equiv)を加え、室温にて 30 分間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、Celite でろ過後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマト

グラフィー(cHex/ EtOAc; 6:4)を用いて精製し 7-*O*-Benzoylhesperetin 3'-*O*-[Methyl (2'', 3'', 4'')-tri-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl uronate]を収率 50%で得た。

^1H NMR (CDCl_3), δ 11.89 (s) plus 11.88 (s) (1H, C5- OH), 8.18 (2H, d, $J = 7.3$, H2Bz, H6Bz), 7.67 (1H, t, $J = 7.3$, H4Bz), 7.53 (2H, t, $J = 7.3$, H3Bz, H5Bz), 7.28 (1H, br s, H20), 7.19 (dd, $J = 8.5$, 2.3) plus 7.18 (dd, $J = 8.5$, 2.3) (1H, H6'), 6.96 (d, $J = 8.5$) plus 6.95 (d, $J = 8.5$) (1H, H5'), 6.44-6.43 (2H, m, H6, H8) 5.51-5.20 (4H, m, H40'', H2'', H3'', H2), 5.10 (d, $J = 6.5$) plus 5.08 (d, $J = 6.5$) (1H, H1''), 4.15 (d, $J = 9.2$) plus 4.12 (d, $J = 9.2$) (1H, H5''), 3.87 (3H, s, OMe hesperetin), 3.74 (3H, s, OMe GlcU), 3.07 (1H, dd, $J = 12.6$, 17.0, H3a), 2.82 (1H, dd, $J = 2.9$, 17.0, H3b), 2.1 (3H, s, Ac), 2.06 (3H, s, Ac), 2.04 (s) plus 2.01 (s) (3H, Ac)

Hesperetin 3'-*O*- β -D-Glucuronide :

N_2 雰囲気下 7-*O*-Benzoylhesperetin 3'-*O*-[Methyl (2'', 3'', 4'')-tri-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranosyl uronate] (0.85 mmol)を MeOH (30 mL) に溶解し 0.5 M Na_2CO_3 水溶液(13 mL)を加え、0°Cでゆっくり攪拌した。反応液を室温で攪拌しながら、1時間ごとに高速液体クロマトグラフィーにより 280 nm で観察した。約 5 時間後に、Hesperetin 3'-*O*- β -D-Glucuronide が単一の化合物として、高速液体クロマトグラフィーで 60%程度観察された。得られた反応液を、Dowex 50WX4-50 ion-exchange resin (H^+ form) を加え、pH を約 6 に調整した。樹脂をろ過した後、50°C減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、Hesperetin 3'-*O*- β -D-Glucuronide を総収率 30%で得た。

^1H NMR (D_2O), δ 7.30 (d, $J = 8.4$) plus 7.28 (d, $J = 8.4$) (1H, H6'), 7.23 (1H, br s, H2'), 7.19 (d, $J = 8.4$) plus 7.16 (d, $J = 8.4$) (1H, H5'), 6.02 (1H, br s, H6 or H8), 6.00 (1H, br s, H6 or H8), [5.55 (1H, dd, $J = 3.1$, 12.0) plus 5.47 (dd, $J = 3.1$, 12.0)] (1H, H2), 4.7 (br d, $J = 5.5$, partly masked by the water peak), 3.78 (3H, s, OMe), 3.88 (d, $J = 9.8$) plus 3.83 (d, $J = 9.8$) (1H, H5''), 3.48-3.23 (3H, m, H2'', H3'', H4''), 3.27 (dd, $J = 12.0$, 17.0) plus 3.19 (dd, $J = 12.0$, 17.0) (1H, H3a), 2.85 (dd, $J = 3.1$, 17.0) plus 2.84 (dd, $J = 3.1$, 17.0) (1H, H3b); ^{13}C NMR (D_2O), δ 200.48 (C4), 167.08, 164.16 (C5, C7, C9, C6''), 146.59 (C3', C4'),

131.93 (C1'), 123.22 (C6'), 117.08 (C2'), 114.38 (C5'), 103.63 (C10), 101.72 (C1''), 97.92, 97.00 (C6, C8), 80.34 (C2), 76.67, 76.56, 73.78, 72.76 (C2'', C3'', C4'', C5''), 57.20 (OCH₃), 42.86 (C3)

H7-OG の合成方法

アルゴン雰囲気下 Hesperetin (0.3 mmol) を無水 CH₃Cl/ピリジン(1:1) (5 mL) に溶解し Acetobromo- α -D-glucuronic acid methyl ester (0.70 mmol)、silver carbonate (Ag₂CO₃) (0.70 mmol) および molecular sieves 4Å (metal aluminosilicates having many pores, which absorb H₂O) を加え、0°C でゆっくり攪拌した。室温および暗所下で反応液を 36 時間攪拌した。反応液をろ過後、酢酸エチル(30 mL) を加え希釈し、10% クエン酸溶液で抽出した。さらに飽和食塩水で洗浄した。その後、無水 Na₂SO₄ で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー 150 mm × 30 mm i.d., 63-210 μ m, neutral silica gel 60N (関東化学) (CH₃Cl/MeOH : 40:1) を用いて溶出した。その後、減圧下で溶媒を留去した。得られた濃縮物に無水 MeOH を加え希釈し、28% sodium methoxide (NaOCH₃) の MeOH (150 μ L) 溶液を加え、30 分間 0°C で攪拌した。さらに蒸留水 300 μ L を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を Amberlite IR-120 (H⁺) resin (ICN Biochemicals Inc., USA) を用いて中和し、樹脂をろ過した後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/MeOH/H₂O : 80:15:10) を用いて溶出し、減圧下に溶媒を留去した。さらに high-performance liquid chromatographer (HPLC) (Gilson Inc., Madison, USA) を用いて精製し、Hesperetin 7-O- β -D-Glucuronide を得、NMR を用いて構造を同定した。

分析条件

検出器 : UV 波長 280 nm

カラム : C18 reverse-phase column, 250 mm × 10 mm i.d., 5 μ m, Mightysil RP-18 (関東化学).

移動相 A : 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 溶液 / acetonitrile (7:3)

流速 : 毎分 1 mL

分析時間 : 30 分間

^1H NMR (D_2O), δ 6.83-6.77 (3H, m, H5', H6', H2'), 6.07 (1H, br s, H8), 6.03 (1H, br s, H6), 5.04 (1H, br d, $J = 14.8$, H2), 4.80 (1H, d, $J = 7.5$, H1''), 3.70 (3H, s, OMe), 3.59-3.34 (4H, m, H2'', H3'', H4'', H5''), 2.83 (1H, br t (dd), $J = 16.0, 14.8$, H3a), 2.54 (1H, br d, $J = 16.0$, H3b); ^{13}C NMR (D_2O), δ 199.31 (C4), 165.78, 165.62, 164.22, 163.62 (C5, C7, C9, C6''), 146.35 (C3' or C4'), 144.07 (C3' or C4'), 132.37 (C1'), 120.21 (C6'), 114.94 (C2' or C5'), 113.50 (C2' or C5'), 105.17 (C10), 100.11 (C1''), 98.46, 97.17 (C6, C8), 80.24 (C2), 76.52, 76.36, 73.59, 72.51 (C2'', C3'', C4'', C5''), 57.18 (OCH_3 hesperetin), 43.59 (C3)

脂肪細胞への分化誘導活性評価

(1)脂肪細胞分化誘導法

マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を 100 mm 培養シャーレに 116×10^4 cells/Dish の密度で播いた後、 37°C , 5% CO_2 存在下にて 3 days 培養した。その後、デキサメタゾン(最終濃度 $20 \text{ } \mu\text{M}$)、イソブチルメチルキサンチン($10 \text{ } \mu\text{M}$) およびインスリン(1.7 もしくは $2.8 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{M}$)をそれぞれ添加した。48 h.後、培地を交換し、試料およびインスリンを再度添加した。その後、3 日間隔で培地交換、試料およびインスリンの添加を行い 14 日間培養した。なお試料は dimethylsulfoxide (DMSO)が最終濃度 0.1%を超えないようにした。

(2)脂肪粒染色 (Oil Red O 染色法)

脂肪細胞への分化誘導後の 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、PBS(-)を用いて 2 回洗浄した後、10%中性緩衝ホルマリン液を加え、30 分間静置し細胞固定した。その後、PBS(-)を用いて 1 回洗浄し Oil Red O 染色液 (Oil Red O 60%イソプロパノール飽和溶液) を加えて 90 分間静置した。その後 PBS(-)を用いて 3 回洗浄し、光学顕微鏡下にて観察を行った。

RT-PCR 法

第二部 第一章 (1)脂肪細胞分化誘導法の記載方法を用いて細胞培養及び試料の添加を行った。さらに、第一部 第一章 3. RNA の精製、4. Complementary(c)DNA の測定 及び 5. Polymerase chain reaction (PCR)の記載方法を用いて脂肪細胞分化誘導関連遺伝子を測定した。

脂肪細胞分化誘導関連遺伝子：

Sense primer：100 μ M adiponectin-F, 100 μ M C/EBP α -F, 100 μ M PPAR γ -F, 100 μ M h-GAPDH-F をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

Antisense primer：100 μ M adiponectin-R, 100 μ M C/EBP α -R, 100 μ M PPAR γ -R, 100 μ M h-GAPDH-R をそれぞれ超純水にて希釈し、20 μ M とした。

Adiponectin : 5'-GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC-3' and
5'-GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT-3'

C/EBP α : 5'-AGCAACGAGTACCGGGTACG-3' and
5'-TGTTTGGCTTTATCTCGGCTC-3'

PPAR γ : 5'-CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA-3' and
5'-GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAATAAG-3'

h-GAPDH : 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' and
5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'

第二章 ヘスペレチングルクロナイドにおける PPAR γ 転写活性化機構の解析

ヘスペレチングルクロナイドおよび troglitazone の結合部位評価

Reporter gene assay 法を用いることで競合させ結合を評価した。

TR-FRET (Time-resolved fluorescence resonance energy transfer)法

LanthaScreen™ TR-FRET (時間分解蛍光共鳴エネルギー転移) PPAR γ Competitive Binding Assay (Invitrogen, Cat. No. 4894) を用いて行った。

参考文献

1. Wynder *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, (1977) **58**, 825-833.
2. World Health Organization: Obesity and overweight, Fact sheet N° 311, 2015.
3. Issemam I., Green S., *Nature*, (1990) **347**, 645-650.
4. 医学のあゆみ **220** 1 (2007)
5. 田中十志也, 日本薬理学雑誌(*Folia Pharmacologica Japonaca*), (2006) **128**, 225-230.
6. Lemberger T. *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* (1996) **804**, 231-251.
7. Miyachi H. *et al.*, *IDrugs*, (2004), **7**, 746-754.
8. Miller AR., Etgen GJ., *Expert Opin. Investig. Drugs*, (2003) **12**, 1489-1500.
9. Oliver WR. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2001) **98**, 5306-5311.
10. *Adiposcience* 脂肪細胞からメタボリックシンドロームまで (2010) **7**.
11. Tanaka T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2003) **100**, 15924-15929.
12. Wang YX *et al.*, *Cell*, (2003) **133**, 159-170.
13. Sprecher DL *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc*, (2007) **27**, 359-365.
14. David Kitz Krämer *et al.*, *Diabetes*, (2005) **54**, 1157-1163.
15. Y. Akao *et al.*, *Int J Mol Sci.* (2008) **9**(3) 355-370.
16. Iinuma M., Tosa H. *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, (1996) **48**, 861-865.
17. Ee GC *et al.*, *Natural product research*, (2006) **20**, 1067-1073.
18. 河田照雄 生活習慣病予防における食品機能学 一般社団法人全国発酵乳
乳酸菌飲料協会 はっ酵乳、乳酸菌飲料公正取引協議会
19. Lih-Geeng Chen *et al.*, *Food and Chemical Toxicology*, (2008) **46**, 688-693.
20. Matsumoto K. *et al.*, *J. Nat. Prod.* (2003) **66**(8) 1124-1127.
21. Nabandith V. *et al.*, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* (2004) **5**(4) 433-8.
22. Shibata M. *et al.*, *BMC Medicine.* (2011) **9**:69.
23. Chang HF *et al.*, *Molecules.* (2010) **15**(12) 8953-66.
24. Soda M. *et al.*, *Biol. Pharm Bull.* (2012) **35**(11) 2075-2080.
25. Lecka-Czernik B. *et al.*, *IDrugs* (2010) **13**(11) 793-801.
26. Cavender MA. *et al.*, *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* (2010) **10**(4) 209-216.
27. Ramaiya A. *et al.*, *Curr. Drug Targets.* (2012) **14** 1698-704.

28. Chitchumroonchokchai C. *et al.*, *J. Nutr.* (2012) 142(4) 675-80.
29. C. Manach *et al.*, *American J. of Clinical Nutrition*, (2004) **79**, 727-747.
30. C. Manach *et al.*, *European J. of Clinical Nutrition*, (2003) **57**, 235-242.
31. K. Sekiya *et al.*, *Functional Food*, (2007) **1**, 62-67.
32. Galati E.M. *et al.*, *IL Farmaco*, (1996) **51**, 219-221.
33. Garg A. *et al.*, *Phytother Res.*, (2001) **15**, 655-669.
34. Monforte M. T. *et al.*, *IL Farmaco*, (1995) **50**, 595-599.
35. Bok S. H. *et al.*, *J. Nutr.*, (1999) **129**, 1182-1185.
36. Borradaile N. M. *et al.*, *Lipids.*, (1999) **34**, 591-598.
37. Brett, G. M., *British Journal of Nutrition* (2009) **101**, 664-675.
38. O. Dangles *et al.*, *J. of Agric. and Food Chem.*, (2010) **58**, 8437-8443.
39. H. Matsumoto *et al.*, *J. of Agric. and Food Chem.*, (2004) **52**, 6653-6659.
40. G. S. Hotamisligil *et al.*, *J Clin Invest.* (1995) 95(5) 2409–2415.
41. Lefterova M. I. *et al.*, *Genes Dev.*, (2008) 22 2941-2952.
42. Lehmann J. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, (1995) 270, 12953-12956.
43. Foman B. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997) 94, 4312-4317.
44. Krey G. *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, (1997) 11, 779-791.
45. Foman B. M. *et al.*, *Cell*, (1996) 83, 803-812.
46. Kliewer S. A. *et al.*, *Cell*, (1996) 83, 813-819.
47. Lagy L. *et al.*, *Cell*, (1998) 93, 229-240.
48. Yong Li *et al.*, *Nature Structural & Molecular Biology*, (2008) 15 865-867.
49. Waku T. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, (2009) 385, 188-199.
50. 白木琢磨ら 生化学 (2013) 第 85 卷 749-761.
51. Puhl A. C. *et al.* *Mol. Pharmacol.*, (2012) **81**, 788-799.
52. Gupta RA., *et al.*, *Nat. Med.*, (2004) **10**, 245-247.
53. Harman FS., *et al.*, *Nat. Med.*, (2004) **10**, 481-483.
54. M. Yamada *et al.*, *Biosci. Biotechnol Biochem.*, (2006) **70**, 1386-1394.
55. Puhl AC *et al.*, *Molecular Pharmacology*, (2012) **81**, 788-799.
56. Costello A., Gray S., Donnelly R., *Diabetes, Obesity and Metabolism*, (2003) **5**, 136-138.
57. Takahashi N., Kawada T., *et al.*, *FEBS letters*, (2002) **514**, 315-322.

使用機器

- ・ 可変式反復分注器: MODEL 8100 SYRINGE DYSPENSER (NIC HIRYO)
- ・ マイクロピペッター: BENCH Mate (NICHIRYO)
- ・ 攪拌器: VORTEX-GENIE2 (scientific industries)
- ・ 冷却遠心機: himac CF 15D2 (HITACHI)
- ・ 高圧蒸気滅菌器: HIGH-PRESSUR STEAM STERILIZER BS-325 (TOMY)
- ・ マイクロプレートリーダー : infinite M1000 (TECAN)
- ・ エバポレーター: Rotavapor R- II (BUCHI), NVC-2000 (EYELA)
- ・ HPLC: GILSON, detector: C-R6A CFROMATOPAC (SHIMADZU)
- ・ Column: Mightysil RP-C18, 3.0 i.d.×250nm (関東化学)
- ・ 分光光度計 : U-630 (日本分光)
- ・ 核磁気共鳴 (NMR): RAMBDA 500(JEOL)、Delta V5 400MHz (JEOL)
- ・ トランスイルミネーター : BTS-20 (UVi Limited)
- ・ トランスイルミネーター用カメラ : EDAS 290 (KODAK)
- ・ Bio Shaker : M.BR-024 (TAITEC)
- ・ Thermal cycler : C1000 (BIO-RAD)
- ・ CO₂ incubator : MCO-175, MCO-18AIC (UV)
- ・ CLEAN BENTH : MCV-710ATS (SANYO)
- ・ Biological safety cabinet : class II typeA MHE-130AJ (SANYO)
- ・ 倒立顕微鏡 : IX71 (OLYMPUS)
- ・ スターラー : Mag-Mixer MD300 (TAMATO)
- ・ アイスボックス : e-Ice Bucket EIB (TAITEC)
- ・ Mineralight lamp : UVGL-58 (フナコシ)
- ・ Stirrer Hotplate : (CORNING)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、お世話を頂いた皆様方に心より感謝申し上げます。

岡山理科大学教授 松浦 信康博士には、本研究の遂行、並びに本論文の執筆にあたり、終始、御指導、御鞭撻を賜りました。また、研究に対する姿勢、考え方、さらに精神面においても、御助言、励ましを頂きました。心より感謝申し上げます。

岡山大学教授 宮地 弘幸博士には、本研究を遂行するにあたり、日々の研究だけでなく、研究に対する考え方など多くのご指導を頂き、深く感謝いたします。

また、貴重な化合物である α および γ -mangostins を始めとするキサントン誘導体を御提供して頂きました岐阜薬科大学教授 飯沼 宗和博士、株式会社フィールド アンド デバイス代表取締役 土佐 秀樹博士に深く感謝致します。

ヘスペレチングルクロナイドの構造決定の際、多くのご指導とご支援を頂き、本論文作成にあたり審査委員としても多くのご助言を頂きました岡山県立大学教授 伊東 秀之博士に心からお礼申し上げます。

点変異 PPAR γ を用いた転写活性化機構の解明実験の際、貴重なプラスミドのご提供、さらに実験の指導をして頂きました近畿大学准教授 白木 琢磨博士に深く感謝いたします。

岡山大学教授 佐々木 健二博士、岡山大学 座間味 義人博士には、博士課程への進学及び研究のご指導して頂き感謝いたします。岡山大学准教授 松野 研司博士、岡山大学 脇 稔博士には、日々の研究のご指導を頂き深く感謝いたします。

本論文の作成、予備審査会では、多くのご助言を頂きました岡山理科大学 野崎 浩教授、池田 正五教授、大平 進教授、中村 元直教授に深く感謝いたします。

最後に、岡山理科大学 食品薬学研究室の皆様、岡山大学 有機医薬品開発学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。