

博士論文

放線菌由来脂肪細胞分化阻害物質の探索とその作用メカニズムに関する研究

(Study on inhibitors of adipocyte differentiation from actinomycetes and their modes of action)

2016年3月

立命館大学大学院理工学研究科
総合理工学専攻博士課程後期課程

松尾 洋孝

立命館大学審査博士論文

放線菌由来脂肪細胞分化阻害物質の探索とその
作用メカニズムに関する研究

(Study on inhibitors of adipocyte differentiation from
actinomycetes and their modes of action)

2016年3月

March 2016

立命館大学大学院理工学研究科

総合理工学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Integrated Science and Engineering

Graduate School of Science and Engineering

Ritsumeikan University

松尾 洋孝

MATSUO Hirotaka

研究指導教員：今村 信孝 教授

Supervisor : Professor IMAMURA Nobutaka

目次

第1章 緒言	6
第2章 脂肪細胞分化阻害物質の探索とその活性に関する研究	13
第1節 序文	13
第2節 実験方法	16
第1項 測定機器等	16
第2項 活性候補株の選定	16
第3項 活性候補株の同定	17
第4項 3T3-L1細胞を用いた活性、及び毒性の測定	19
4.1. 3T3-L1細胞の培養と分化誘導	19
4.2. XTT法による細胞生存率の算出	20
4.3. Oil Red O染色による脂肪蓄積率の算出	20
第5項 TK08330株の培養と活性物質の単離、構造決定	21
5.1. 08330-Aの単離	21
5.2. 08330-Aの構造解析	22
第6項 MC10130株の培養と活性物質の単離、構造決定	23
6.1. 10130-Aの単離	24
6.2. 10130-Aの構造解析	24
第3節 結果	24
第1項 活性候補株の選定	24
第2項 TK08330株が生産する脂肪蓄積阻害物質	26

2.1.	活性物質生産菌の同定	26
2.2.	脂肪蓄積阻害物質の精製	27
2.3.	活性物質 08330-A の構造解析と同定	29
2.4.	Borrelidin の脂肪蓄積阻害活性	35
第 3 項	MC10130 株が生産する脂肪蓄積阻害物質	37
3.1.	活性物質生産菌の同定	37
3.2.	脂肪蓄積阻害物質の精製	37
3.3.	活性物質 10130-A の構造解析と同定	40
3.4.	Cineromycin B の脂肪蓄積阻害活性	47
第 3 節	考察	49
第 3 章	脂肪蓄積阻害物質の作用機序に関する研究	50
第 1 節	序文	50
第 2 節	実験方法	51
第 1 項	測定機器等	51
第 2 項	cDNA の作製とリアルタイム PCR	51
第 3 項	Western blot による β -actin、PPAR γ タンパクの検出	54
第 4 項	siRNA 導入実験	55
第 5 項	統計処理	56
第 3 節	結果	57
第 1 項	Borrelidin の脂肪蓄積阻害活性の作用機序	57
1.1.	脂肪細胞に特有の遺伝子発現への影響	57
1.2.	脂肪細胞分化のマスターレギュレーターへの影響	58

1.3.	Borrelidin のマスターレギュレーター調節因子への影響 (1)	59
1.4.	Borrelidin のマスターレギュレーター調節因子への影響 (2)	60
1.5.	Borrelidin の PPAR γ 、及び脂肪蓄積抑制作用への siRNA の影響	64
第 2 項	Cineromycin B の脂肪蓄積阻害活性の作用機序	68
2.1	脂肪細胞に特有の遺伝子発現への影響	68
2.2.	脂肪細胞分化のマスターレギュレーターへの影響	69
2.3.	Cineromycin B のマスターレギュレーター調節因子への 影響 (1)	70
2.4.	Cineromycin B のマスターレギュレーター調節因子への 影響 (2)	70
2.5.	Cineromycin B の PPAR γ 、及び脂肪蓄積抑制作用への siRNA の影響	73
第 4 節	考察	76
第 4 章	総括	82
・	略語	84
・	選定株 16SrDNA 配列	86
・	化合物のデータ	89
・	参考文献	97
・	謝辞	105

第1章 緒言

我が国における死因別死亡率のトップは悪性新生物（死亡率 280: 人口 10 万人対）であるが、次いで虚血性疾患（心疾患 + 脳血管疾患: 約 260）が追随している（Fig. 1）。虚血性疾患のリスクファクターとして動脈硬化症や脂質異常症、糖尿病などが挙げられるが、肥満者ではこれらのリスクがさらに高まる。したがって、肥満を予防・改善することにより、上記疾患のリスクを低減することができる。肥満を改善するには、生活習慣の見直し、定期的な運動を行うなど、非薬物的な方法が重要であるが、それらの効果が不十分な高度肥満症患者などでは、薬物的治療が行われている。

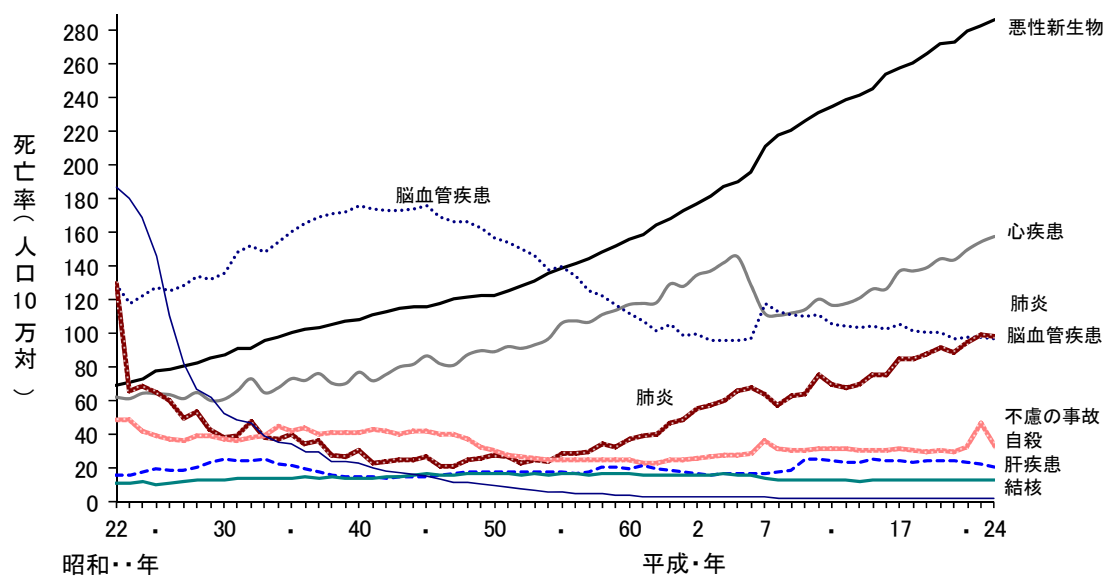


Fig. 1 主な死因別にみた死亡率の年次推移（厚生労働省、2014年）

国内で唯一認可されている抗肥満薬として mazindol (一般名: サノレックス) がある。Mazindol は、神経終末におけるモノアミンの再吸収抑制を介した機序^{1,2)}、摂食調節中枢への直接作用³⁾により食欲を抑制し、その結果、肥満を改善するものと考えられている。しかし、心臓や腎臓、膵臓に障害のある人、高血圧症、脳血管障害などの疾患を煩っている患者では禁忌とされており、投与できる患者が限られている。また、mazindol の薬理作用は覚醒剤である amphetamine と類似しており、依存性を生ずる可能性が問題視されており、投与可能な最長期間は 3 ヶ月と短い。したがって、より優れた新たな抗肥満薬の開発が強く望まれている。

肥満の直接的な原因は、脂肪細胞数の増加や細胞内への過剰な脂肪蓄積である⁴⁾。そのため、脂肪細胞に関する様々な研究が活発に行われてきた。以前、抗肥満薬のターゲットとして、アドレナリン β_3 受容体が注目された。発見当初からしばらくは、脂肪組織に多く分布することや、脂肪細胞の熱産生に関与するとの報告から、アドレナリン β_3 受容体アゴニストは、肥満や糖尿病の新たな治療薬になると期待された^{5,6)}。しかし、臨床試験が行われた結果、いずれも有効性は認められなかった。

脂肪細胞内への脂肪蓄積は、脂肪前駆細胞が脂肪細胞へと分化することで始まり、その後、脂肪を蓄積する。つまり、脂肪細胞への分化や、その後の脂肪蓄積を抑制できれば、肥満を予防・改善できる可能性があると考えられている。そこで、脂肪細胞の分化阻害、あるいは脂肪蓄積抑制をターゲットとした活性化化合物の探索が行われてきた。

脂肪前駆細胞の分化メカニズムに関する研究も活発に行われており、これま

でに様々な知見が得られている。脂肪細胞分化の研究ではモデルとしてマウス由来 3T3-L1 細胞が頻用されている。Fig. 2 には、ここで必要な分化メカニズムをまとめた模式図を示した。3T3-L1 細胞を分化誘導剤の 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、dexamethasone (DEX)、insulin で脂肪細胞へと分化させるとき、各誘導剤の影響は以下のように考えられている。IBMX と DEX により CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) β と C/EBP δ の発現が促進される。また、insulin はグルコースの取り込みを促進する。C/EBP β と C/EBP δ の発現上昇により、分化のマスターレギュレーターである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ と C/EBP α の発現が上昇し、細胞内に脂肪を蓄積する^{7,8)}。C/EBP β と C/EBP δ のダブル欠損マウス由来線維芽細胞を用いた脂肪細胞への分化誘導実験では、PPAR γ と C/EBP α の発現がまったく認められず、脂肪細胞へと分化しないことが報告されている⁸⁾。これは、C/EBP β と C/EBP δ が PPAR γ や C/EBP α の上流にあることを示している。PPAR γ を欠損させたマウスから得られた細胞では、脂肪細胞への分化はまったく見られなかったという報告の一方^{9,10)}、C/EBP α 欠損細胞でも脂肪細胞への分化は認められないが、その細胞に PPAR γ を強制発現させると脂肪蓄積が認められたという報告がある^{11,12)}。これらの結果から、マスターレギュレーターの中でも、PPAR γ が分化の中心的役割を担っていると考えられており、C/EBP α はその発現を維持する働きを担っていると考えられている¹³⁾。

脂肪細胞の分化には PPAR γ の発現が最も重要であることが示されて以降、分化を制御する因子として C/EBP family 以外にも Tob2、Krüppel-like factor (KLF) family、GATA-binding protein (GATA) family などが報告された。Tob2

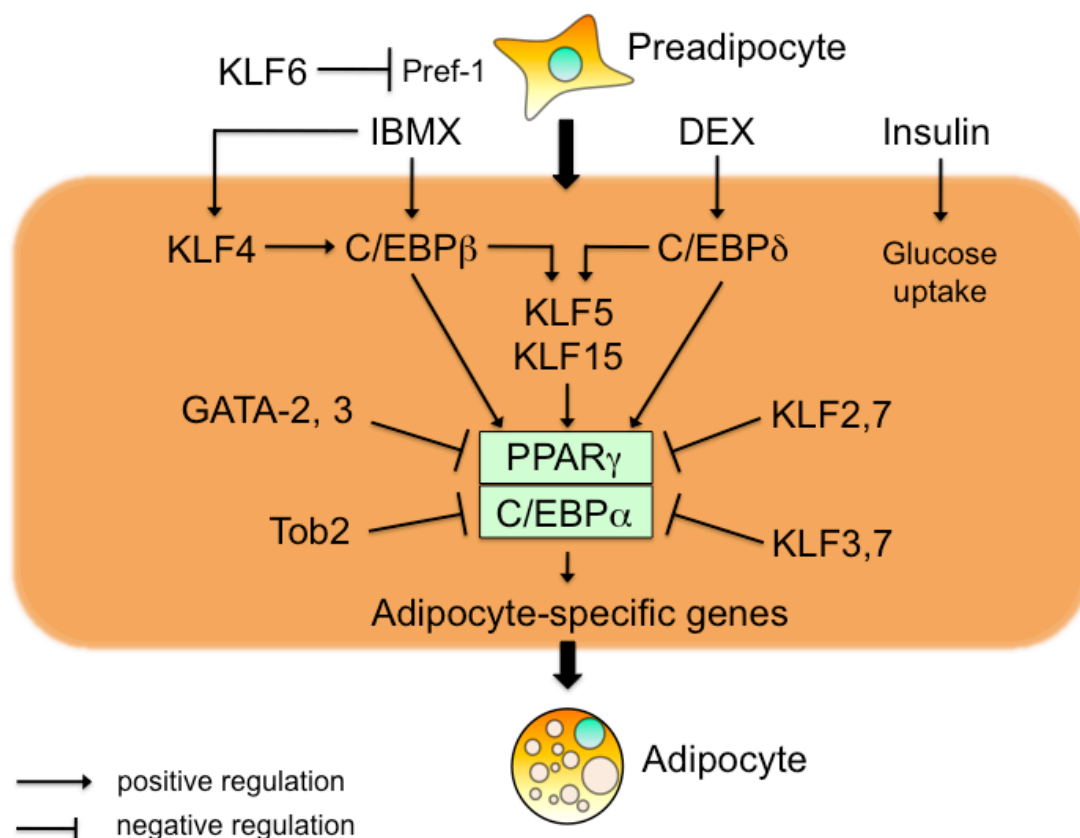


Fig. 2 3T3-L1 細胞の分化メカニズム模式図

は当初、細胞周期の調節に関わる因子である **Tob/BTG family** のメンバーとして発見された¹⁴⁾。その後、肥満マウスの白色脂肪細胞でその mRNA、タンパクの発現が減少していることが見いだされ、**Tob2** ノックアウトマウスでは白色脂肪細胞量が増加することが明らかになっている。また、3T3-L1 細胞に **Tob2** を過剰発現させて分化誘導を行うと、**C/EBPα** の作用を阻害することにより **PPARγ** の活性を減少させることから、分化のネガティブレギュレーターとして作用することが報告されている¹⁵⁾。**KLF family** は、ジンクフィンガー型転写因子であり、現在までのところ 17 種類が発見されている。このファミリーは、様々な細胞の発生・分化や幹細胞機能の制御において重要な役割を担っていることだ

けでなく、様々な疾患においても重要な機能を有していることが報告されている。脂肪細胞でもその機能解析が行われており、7種類が脂肪細胞分化に関わっていると報告されている。KLF2、KLF3、KLF7は3T3-L1細胞において、分化誘導前の細胞に高発現していること、分化誘導後にはその発現は減少することが明らかになっている。また、KLF2、KLF3、KLF7をそれぞれ3T3-L1細胞に過剰発現させた場合、脂肪細胞への分化は阻害されることから、これらは分化のネガティブレギュレーターとして作用していると考えられている。その作用機序としては、KLF2、KLF3がそれぞれPPAR γ 、C/EBP α のプロモーターに結合し、その活性を阻害することが知られている^{16,17)}。KLF7は、過剰発現させるとPPAR γ 、C/EBP α の発現が減少することは明らかになっているが、詳しい作用機序は不明である¹⁸⁾。一方、KLF4、KLF5、KLF6、KLF15は3T3-L1細胞において、分化誘導後にその発現が上昇することが明らかになっており、これらのノックダウン細胞では、脂肪細胞への分化が阻害されることから、分化のポジティブレギュレーターとして作用していると考えられている。KLF4はIBMXによっても誘導され、C/EBP β の発現を促進させると報告されている¹⁹⁾。KLF5、KLF15はC/EBP β 、C/EBP δ の下流でPPAR γ 、C/EBP α の発現を上昇させることにより分化を促進し、KLF6は脂肪前駆細胞に発現している分化抑制性因子のpref-1を抑制することにより分化を促進することが報告されている²⁰⁻²²⁾。GATA familyは、様々な細胞の分化、成長、生存を制御しており、ヒトやマウスでは6種類が確認されている。このうち、GATA-2、GATA-3がマウスの脂肪前駆細胞に高発現していることが見いだされ、その機能解析が行われている。3T3-L1細胞ではGATA-2、GATA-3は前駆細胞状態で高発現してお

り、分化誘導後 2 日目までにその発現は減少する。GATA-2 あるいは GATA-3 を 3T3-F442A 細胞 (3T3-L1 細胞のサブクローナルライン) に強制発現させて分化誘導を行うと、分化が阻害されるため、GATA-2 と GATA-3 は分化のネガティブレギュレーターとして働いていることが明らかになっている²³⁾。この作用は、PPAR γ プロモーターの GATA 結合サイトに GATA-2 や GATA-3 が結合することにより、その転写活性が抑制されることによるものと報告されている²³⁾。さらに、GATA-3 をノックアウトした ES 細胞の分化能が野生株よりも亢進したことから、GATA-3 は脂肪前駆細胞で分化のゲートキーパーとして作用していることが明らかになっており、GATA-2 も同様の作用を有していると考えられている²³⁾。これらレギュレーター単独の機能や作用箇所は明らかになっているが、ファミリー内外での影響力の違いは明らかになっていない。このように、3T3-L1 細胞は肥満研究や脂肪細胞分化の研究で広く使用されているにも関わらず、その分化についてはまだ完全には理解されていない。また、分化阻害物質として報告されているものは、生薬由来、あるいは植物由来の成分ばかりであり、微生物からの報告はほとんどない。

このような背景から筆者は、植物とは異なる二次代謝経路を有する微生物、特に放線菌を探索源として、3T3-L1 細胞の分化阻害作用を示す化合物を得ることができれば、これまでに報告のないユニークな阻害物質が得られる可能性があると考えた。さらに、その作用機序を解明することにより、脂肪細胞分化メカニズムの解明に役立つツールの開発、あるいは抗肥満薬のリード化合物の開発に貢献できると考えた。そこで本研究では、3T3-L1 細胞の分化誘導アッセイ系を用いて、脂肪蓄積阻害作用を分化阻害の指標とし、放線菌の二次代謝産物

から分化阻害物質を見いだすこと、さらに、その作用機序の解明を目的とした。

本論として第二章では、TK08330 株、及び MC10130 株より得た脂肪細胞分化阻害物質の単離、及び活性を、第三章ではその作用機序の研究について詳述する。

第四章では総括として、本研究の成果と、今後の展望についてまとめた。

第2章 脂肪細胞分化阻害物質の探索とその活性に関する研究

第1節 序文

微生物からの有用物質探索は、1929年にフレミングが糸状菌から penicillin を発見したことを皮切りに、抗生物質である streptomycin や vancomycin、2型糖尿病の治療薬である acarbose (α -グルコシダーゼ阻害薬)、脂質異常症の治療薬であるプラバスタチンの前駆体である mevastatin (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) など、今日の人間社会には欠かせない天然物化合物が数多く発見されてきた。微生物と一口に言っても様々な種類が存在しているが、生理活性物質を生産しているのはほとんどが放線菌、あるいは糸状菌であると言われている。Table 1 は、新規化合物生産菌の分布を示すもので、1947年から1997年の50年間に *Journal of Antibiotics* に掲載された新規化合物について、その活性と生産微生物の種類をまとめたものである²⁴⁾。新規生理活性化合物の生産菌数としては放線菌が69.4% (2,980/4,294株) と圧倒的に多く、次いで糸状菌が19.1% (822/4,294株) を占めている。微生物から単離された生理活性物質の数では²⁴⁾、微生物由来の生理活性物質のうち、約45% (10,100/22,500個) が放線菌によって生産されていることが分かる (Table 2)。したがって、微生物を探索源とする生理活性物質の探索では、放線菌を中心に行えば、活性物質が得られる確率は高いと考えられる。

Table. 1 新規生理活性物質が示す生理活性とその生産菌の株数

活性	放線菌	糸状菌	その他	合計
抗菌、抗寄生虫、抗ウイルス	1,177	109	246	1,532
抗真菌	277	160	91	528
抗腫瘍	801	116	72	989
各種生物活性	410	344	52	806
その他	315	93	31	439
合計	2,980	822	492	4,294

Table. 2 微生物に由来する生理活性物質数

生産菌	抗生物質	その他活性	計
放線菌	8,700	1,400	10,100 (44.9%)
糸状菌	4,900	3,700	8,600 (38.2%)
その他微生物	2,900	900	3,800
計	16,500	6,000	22,500

脂肪細胞分化の研究では、前述のようにマウス由来 3T3-L1 細胞が頻用されている。3T3-L1 細胞は、IBMX、DEX、insulin を含む培地で培養することにより、効率良く脂肪細胞へと分化し、細胞内に脂肪を蓄積 (Fig. 3) させることができる²⁵⁾。この特徴を利用して、分化阻害作用を有する天然化合物の探索が行われており、これまでに生薬や植物から様々な阻害物質が単離されてきた。例えば、生薬オウバク、オウレンなどに含まれる berberine (Fig. 4) は、3T3-L1 細胞において脂肪細胞への分化を阻害することや²⁶⁾、berberine を KK-Ay マウスに経口投与することにより、抗肥満作用を示すことが明らかになっている²⁷⁾。また、ワカメなどに含まれる fucoxanthin (Fig. 4) も、3T3-L1 細胞においては

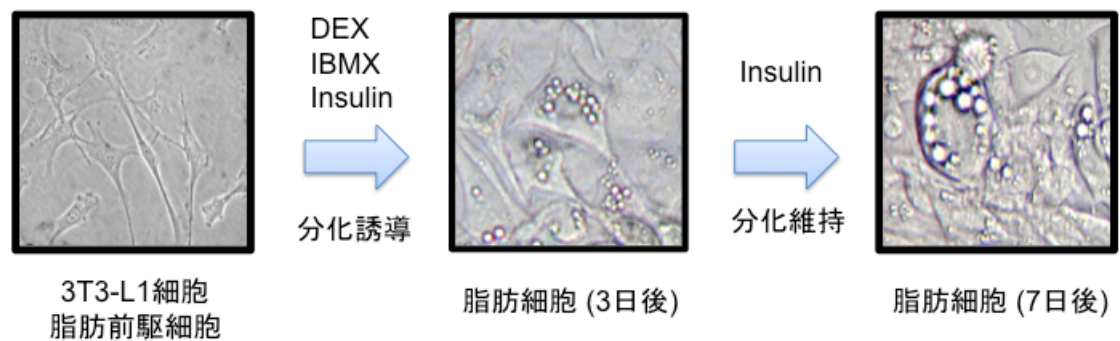


Fig. 3 3T3-L1 細胞の分化と脂肪蓄積の様子

分化阻害作用を示し²⁸⁾、KK-Ay マウスに経口投与することにより、抗肥満作用を示すことが報告されている²⁹⁾。このように、3T3-L1 細胞の分化阻害作用を示す化合物が、*in vivo*においても抗肥満作用を示すことが明らかとなり、脂肪細胞の分化阻害作用と抗肥満作用には相関性があることが示唆されている。そこで筆者は、3T3-L1 細胞の分化阻害物質を放線菌代謝産物から得ることで、これまでとは異なったユニークな抗肥満作用を示す化合物が期待できると考え、研究に着手した。

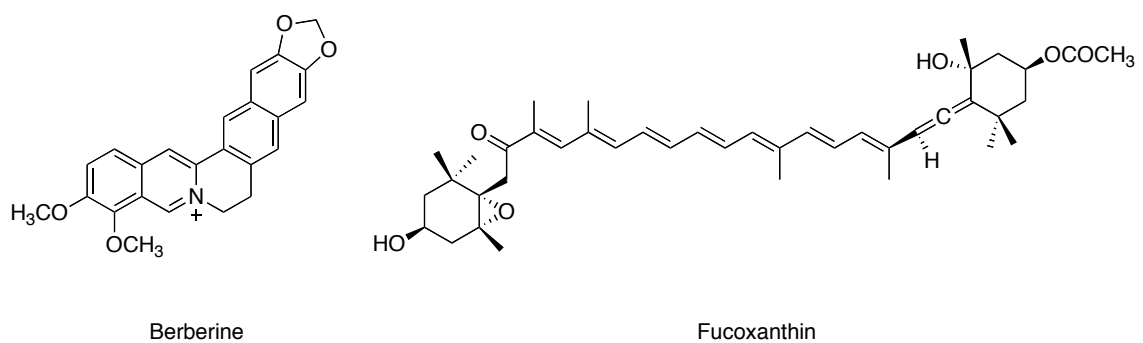


Fig. 4 Berberine と fucoxanthin の構造

第 2 節 実験方法

第 1 項 測定機器等

特に記載がない限り、測定機器等は以下のものを使用した。

- ・ NMR: JMN-ECA-600 NMR spectrometer (日本電子株式会社)
- ・ 分析用 HPLC、及び検出器: GL-7410 HPLC pump、GL-7452 PDA detector (ジーエルサイエンス株式会社)
- ・ 分取用 HPLC、及び検出器: L-6200 HPLC pump、L-4200 UV detector (日立ハイテクフィールドイニング).
- ・ LC-ESI-MS: 1200 シリーズ HPLC system、API-3200 LC/MS/MS システム (Applied Biosystems)
- ・ HR-TOF-MS: MICROMASS Q-ToF PREMIER (Waters)
- ・ 旋光計: POLAX-2L (アタゴ株式会社)
- ・ TLC: Silica gel 60 F254 アルミプレート (Merck)
- ・ 吸光光度計: SH-1000 Lab microplate reader (コロナ電気株式会社).

第 2 項 活性候補株の選定

立命館大学薬学部微生物化学研究室では以前、放線菌由来の 3T3-L1 細胞分化

阻害物質の探索が行われ、活性を示した株のうち、活性物質が未解明のまま残された株が 10 株あった（近藤義幸、修士論文、2011 年度）。その中から活性物質の精製を行うために、再培養と活性の再現性を確認した。対象となった 10 株を、坂口フラスコ中の starch casein (SC) 培地 100 mL にそれぞれ植菌し、30°C、200 rpm で振とう培養した。7 日後、それぞれの培養ろ液を ethyl acetate (EtOAc) 100 mL で 3 回分配抽出し、減圧乾固して重量を求めた。これらの抽出物を 3 mL の methanol (MeOH) に溶解し、500 μ L を別容器に移して減圧乾固したのち、dimethylsulfoxide (DMSO、ナカライテスク株式会社) 20 μ L に溶解した。そこに phosphate buffered saline (PBS、和光純薬株式会社) 980 μ L を加えたものをサンプル溶液とした。この溶液を最終 DMSO 濃度が 0.3% になるように細胞用培地で希釈し（以降、DMSO 0.3% サンプルと呼ぶ）、脂肪蓄積阻害活性試験に用いた。

第 3 項 活性候補株の同定

活性候補株として選定した TK08330、及び MC10130 株の 16S rDNA を増幅するために設計したプライマーの配列を Table 3 に示した。プライマーの合成は北海道システムサイエンス社に依頼した。Table 4 に示した反応液を調製し、TK08330、及び MC10130 株のゲノム DNA 溶液 1 μ L を鋳型とし Table 5 に示す条件で PCR 反応を行った。反応後、tris acetate-ethylenediamine tetraacetic acid (TAE) 緩衝液 (1 M Tris、126 mM CH₃COONa、32 mM EDTA) 中で polymerase chain reaction (PCR) 反応液を 1.0% アガロースゲルで電気泳動

し、GelRed (Biotium、USA) を加えた TAE 緩衝液中で 30 分間染色し、バンドの有無を確認した。PCR 産物の精製は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System キット (Promega) を用いて行った。回収した PCR 産物は T-vector である pMD20 に TA クローニング法で連結後、大腸菌 XL1-blue MRF⁺ に導入し、PCR 産物が挿入されたプラスミドを回収した。塩基配列の決定は、秋田県立大学に解析を依頼した。

Table 3. PCR に用いたプライマー

16S 27F primer	Forward 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'
16S 1492R primer	Reverse 5' - TACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3'

Table 4. PCR 反応溶液の組成

2× qPCR mix	12.5 μL
10 μM Forward primer	1.0 μL
10 μM Reverse primer	1.0 μL
Distilled water	9.5 μL
Template	1.0 μL
Total	25 μL

Table 5. PCR 反応条件

1. 95°C	2 min
2. 95°C	10 sec
3. 55°C	30 sec
4. 72°C	1 min 30 sec
5. 72°C	5 min
2-4	30 cycles

第4項 3T3-L1細胞を用いた活性、及び毒性の測定

4.1. 3T3-L1細胞の培養と分化誘導

特に記載がない限り、3T3-L1細胞の培養は dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培地 (和光純薬工業株式会社) + 10% fetal bovine serum (FBS、Gibco、USA) + 100 IU/mL penicillin/100 mg/mL streptomycin (和光純薬工業株式会社) を用いて、37°C、5% CO₂で行った。脂肪細胞への分化誘導は以下の通りに行った。10 cm ディッシュで継代培養した 3T3-L1 細胞にトリプシン (和光純薬工業株式会社) を 1 mL 加え、37°C、5% CO₂ で 1 分間インキュベートした。剥離した 3T3-L1 細胞を 96 ウェルプレートに 3.0×10⁴ cells/well になるように播種し、コンフルエントに達した 2 日後、分化誘導培地の最終濃度で 0.5 mM IBMX (和光純薬株式会社)、0.25 μM DEX (和光純薬株式会社)、1.7 μM insulin (和光純薬株式会社) を含む DMEM 培地に置換した (day 0)。3 日間培養後、分化維持培地の 1.7 μM insulin を含む DMEM 培地に置換した (day 3)。さらに 2 日間培養後、新鮮な分化維持培地に交換し (day 5)、さらに 2 日間培養した。再現性の確認に際しては、サンプルを添加した分化誘導培地、及び分化維持培地で目的濃度に希釈調製して用いた。その他の被検サンプルを供する際は、DMSO に溶解後、分化誘導培地、及び分化維持培地で目的濃度まで希釈して用いた。その際、培地に占める DMSO 濃度は、アッセイに影響のないことが分かっている 0.3% 以内になるよう調製した。また、コントロールには DMSO を用い、最終濃度が 0.3% になるよう分化誘導培地、及び分化維持培地で希釈

して用いた。

4.2. XTT 法による細胞生存率の算出

2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT, Sigma-Aldrich) 試薬をDMEM培地に溶解して、1 mg/mLの溶液を(以降、XTT溶液と呼ぶ)、1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-methoxy PMS, Sigma-Aldrich) をPBSに溶解して0.42 mg/mL の溶液をそれぞれ調製した(以降、1-methoxy PMS溶液と呼ぶ)。XTT 溶液と1-methoxy PMS溶液を50:1の割合で混合したものを、分化誘導を行ってから7日後、各ウェルに50 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂で2時間インキュベートし、細胞生存率を求めるため生成したホルマザン色素の吸光度 (450 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。各被検サンプルで処理した細胞の細胞生存率は、コントロールとして0.3% DMSOで処理した細胞の吸光度を100%としたときの百分率で示した。

4.3. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の算出

分化誘導から7日後に (day 7)、脂肪滴量を Oil Red O 染色により以下に示す方法で定量した。Oil Red O (Sigma Aldrich) 溶液はあらかじめ、0.6% になるようにイソプロパノールに溶解後、60°C のインキュベーターで一晩放置して調製した。各ウェルから DMEM 培地を除去し、100 μ L の PBS で1回洗浄した後、100 μ L の 10% ホルマリン (和光純薬株式会社) を各ウェルに加え、20 分間室

温で固定した。ホルマリンを除去し、100 μ L の PBS で 3 回洗浄後、風乾させた。Oil Red O 溶液と精製水を 3:2 で混合し、フィルターろ過したものを各ウェルに 50 μ L 添加し、15 分間室温で脂肪滴を染色した。染色後、Oil Red O 溶液を除去してから 100 μ L の PBS、60% イソプロパノール溶液でそれぞれ 3 回洗浄後、顕微鏡観察したのち、写真撮影した。その後、イソプロパノール (4% NP-40 含有) で Oil Red O を溶出させ、マイクロプレートリーダーで 520 nm における吸光度を測定した。各被検サンプルで処理した細胞の脂肪蓄積率は、コントロールとして 0.3% DMSO で処理した細胞の吸光度を 100%としたときの百分率で示した。

第 5 項 TK08330 株の培養と活性物質の単離、構造決定

5.1. 08330-A の単離

前培養として、TK08330 株を坂口フラスコに入った SC 培地 100 mL に植菌し、3 日間 30°C、200 rpm で振とう培養した。培養後、SC 培地 10 L の入ったタンクに前培養液を全量入れ、30°C で攪拌・通気培養した。7 日後、ろ液を 10 L の EtOAc で 3 回抽出 (計 30 L) し、減圧乾固した (66.6 mg)。MeOH で 10 mg/mL になるように調製した後、分取 high performance liquid chromatography (HPLC) に 200 μ L を供し 5 分おきに Table 6 で示した HPLC 条件で分取し、フラクション 1~12 を得た。得られた各フラクションの活性を確認した所、フラクション 10 に活性が認められた。そこで、フラクション 10

の精製度合いを確認するため、以下に示す方法で TLC 分析を行った。フラクション 10 を減圧乾固した後、100 μL の MeOH で溶解し、1 μL を thin layer chromatography (TLC) にスポットした。chloroform (CHCl_3):MeOH=15:1 で展開して風乾後、ultra violet (UV) 254 nm でスポットを確認し、アニスアルデヒドを散布して加熱した。その結果、フラクション 10 は単一の化合物であることが確認されたため、Table 6 の HPLC 条件でフラクション 10 に該当する部分のみを分取し、活性物質 08330-A を 6.6 mg 得た。

Table 6. 08330-A 分取時の HPLC 条件

Column:	Cosmosil 5C ₁₈ -AR- II (10 mm×250 mm)
Mobile phase:	MeCN/H ₂ O (10%→100% MeCN: 0-60 min)
Flow rate:	2.0 mL/min
Detection:	UV 220 nm

5.2. 08330-A の構造解析

TLC 分析は、以下の通り行った。08330-A を 10 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、1 μL を TLC にスポットした。CHCl₃:MeOH=15:1 で展開して風乾後、UV 254 nm でスポットを確認し、ドラーゲンドルフ試薬、ブロモクレゾールグリーン試薬、ニンヒドリン試薬 (散布後、加熱) で呈色した。比旋光度は、08330-A を 1.1 mg/mL になるよう ethanol (EtOH) で溶解し、10 cm のセルを用いて測定した (測定時温度: 27 °C)。LC/MS、及び high-resolution

time-of-flight mass spectrometry (HR-TOF-MS) は、08330-A を 1.0 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、測定した。¹H、¹³C-NMR、及び各種二次元 nuclear magnetic resonance (NMR) の測定は、0.5% pyridine-*d*₅ を含む (chloroform-*d*) CDCl₃ 中に行った。その後、文献値と比較するため、¹H、¹³C-NMR を CDCl₃ 中で測定した。

第 6 項 MC10130 株の培養と活性物質の単離、構造決定

6.1. 10130-A の単離

前培養として、MC10130 株を坂口フラスコに入った SC 培地 100 mL に植菌し、3 日間 30°C、200 rpm で振とう培養した。培養後、SC 培地 10 L の入ったタンクに前培養液を全量入れ、30°C で攪拌・通気培養した。7 日後、ろ液を 10 L の EtOAc で 3 回抽出 (計 30 L) し、減圧乾固した (305.8 mg)。この EtOAc 抽出物を全量シリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 2 cm、長さ 15 cm) に供し、CHCl₃/MeOH = 40/1→20/1→10/1→8/2→0/1 の条件でそれぞれ 150 mL で溶出し、TLC で確認後、5 つのフラクションにまとめた。これらのフラクションの活性を確認し、フラクション 2、3、4 に同程度の活性が認められた。この中で最も量が多かったフラクション 3 について分取 HPLC を用いて Table 7 に示した HPLC 条件で分取し、活性化合物 10130-A (18.5 mg) を得た。

Table 7. Cineromycin B 分取時の HPLC 条件

Column:	Cosmosil 5C ₁₈ -AR- II (10 mm×250 mm)
Mobile phase:	MeCN/H ₂ O = 50/50 isocratic
Flow rate:	2.0 mL/min
Detection:	UV 220 nm

6.2. 10130-A の構造解析

TLC 分析は、以下の通り行った。10130-A を 10 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、1 μ L を TLC にスポットした。CHCl₃:MeOH=20:1 で展開して風乾後、UV 254 nm でスポットを確認し、ドラージェンドルフ試薬、ブロモクレゾールグリーン試薬、ニンヒドリン試薬（散布後、加熱）で呈色した。比旋光度は、10130-A を 4.6 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、10 cm のセルを用いて測定した（測定時温度: 27°C）。LC/MS、及び HR-TOF-MS は、10130-A を 1.0 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、測定した。¹H、¹³C-NMR、及び各種二次元 NMR の測定は、methanol-*d*₄ 中に行った。その後、文献値と比較するため、¹H、¹³C-NMR を CDCl₃ 中で測定した。

第 3 節 結果

第 1 項 活性候補株の選定

微生物化学研究室保有の放線菌抽出物ライブラリーから脂肪蓄積阻害物質を

求めたスクリーニングは、前任者である近藤氏の先行研究によってすでに行われている。スクリーニングは、3T3-L1 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、分化誘導培地への交換時 (day 0) と分化維持培地への交換時 (day 3、5) に放線菌抽出物の DMSO 0.3% サンプルを添加し、分化誘導から 7 日目に Oil Red O により脂肪滴を染色して脂肪蓄積の有無を観察することで行われた。この方法により、1536 株中 11 株の培養濾液 EtOAc 抽出物に脂肪蓄積阻害活性が見いだされた (近藤義幸、修士論文、2011 年度)。このうち、1 株から前任者が活性物質として chartreusin を単離・同定している。そこで、残りの 10 株について活性の再現性の確認を行った結果を Table 8 に示した。各放線菌の培養はそれぞれ坂口フラスコ (SC 培地 100 mL) 1 本で行った。7 日間の培養後、ろ液を同量の EtOAc で 3 回抽出し、EtOAc を減圧留去したのち DMSO に溶解してアッセイに用いた。サンプルの毒性で弱った細胞でも脂肪滴の蓄積が減少することから、再現性の有無、及び活性の強さを選定評価の基準とした。再現性評価時のサンプル濃度は、前任者が行ったスクリーニング時の培養液量と同じ量の溶媒に溶かしたものを等倍として考える培養液換算とし、希釈倍率が大きいほど活性が強い。濃度は 0.5 倍希釈～16 倍希釈の段階希釈で評価した。その結果、MC09030 株は再現性が確認できたものの、培養ろ液 EtOAc 抽出物の HPLC-photodiode array (PDA)、LC-MS 分析により chartreusin を生産していることが示唆されたため、候補株から除外した。活性が最も強かった TK08330 株を第一候補とし、次いで、培養ろ液 EtOAc 抽出物量の多かった MC10130 株を第二候補として選定した。

Table 8. 再現性確認の結果

候補株	再現性の有無	活性範囲	EtOAc抽出物量 (mg/100mL)
MC08726	○	等倍	1.1
MC08734	○	等倍	2.6
MC09030	○ (chartreusin)	等倍	6.0
MC09113	○	等倍～2倍希釈	1.5
MC09209	×	—	—
MC10130	○	等倍～2倍希釈	9.9
TK08307	○	2倍濃縮	5.5
TK08317	×	—	—
TK08320	×	—	—
TK08330	○	等倍～4倍希釈	8.9

第 2 項 TK08330 株が生産する脂肪蓄積阻害物質

2.1. 活性物質生産菌の同定

TK08330 株は静岡大学農学部の徳山真治准教授より提供された放線菌である。TK08330 株のゲノム DNA を抽出し、16S rDNA を増幅し、増幅産物を精製後、秋田県立大学に塩基配列の解析を依頼し、1,490 bp (GenBank Accession No. AB973399) の配列を得た。この配列をもとに BLAST 検索した結果、99%以上の相同性をもつもの (100 種類以上) すべてが *Streptomyces* 属であったことから TK08330 株は *Streptomyces* 属であると同定した。

2.2. 脂肪蓄積阻害物質の精製

TK08330 株を SC 培地で攪拌通気培養 (タンク: 10 L) し、得られたろ液を等量の EtOAc で 3 回抽出 (計 30 L) し、EtOAc 抽出物 66.6 mg を得た。この EtOAc 抽出物の脂肪蓄積阻害活性を Table 9 に示した。活性が認められたため、まず始めに、おおよその活性画分を探るため、EtOAc 抽出物を分取 HPLC で 5 分刻み (分取時間: 0~60 分) で 12 個のフラクションに分画 (Fig. 5) して活性の有無を確認した。その結果、Fr. 10 (45~50 分) に活性が認められたため、Fr. 10 を TLC で分析したところ、1 つの化合物であることが示唆された (Fig. 6)。そこで、残りの抽出物について同様の HPLC 条件でフラクション 10 に該当する部分のみ分取し、活性物質 (08330-A と仮称) を 6.6 mg 得た。

Table 9. TK08330 培養液 EtOAc 抽出物の活性 (顕微鏡観察*1)

0.8 $\mu\text{g/mL}$	1.6 $\mu\text{g/mL}$	3.2 $\mu\text{g/mL}$	6.3 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$
Δ	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	細胞毒性	細胞毒性

*1 細胞毒性: 細胞が剥離したもの、 \bigcirc : 脂肪滴がほぼ認められないもの、 Δ : やや脂肪滴が認められるもの

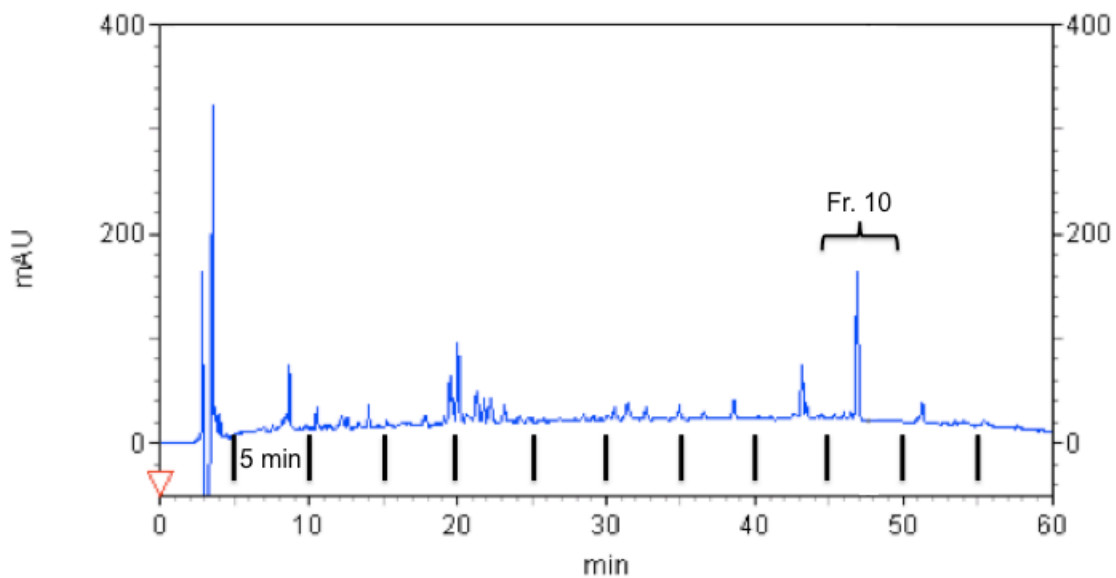


Fig. 5 TK08330 培養液 EtOAc 抽出物の HPLC クロマトグラム
 HPLC 条件: Column: 5C₁₈-AR-II (4.6 mm × 250 mm)、Mobile phase: MeCN/H₂O (10%→100% MeCN, 60 min)、Flow rate: 1.0 mL/min、Detection: UV 220 nm。図中の太線のように分画した。



Fig. 6 Fr. 10 の TLC 分析結果
 CHCl₃:MeOH=15:1 で展開後、UV 254 nm でスポット (図中右片括弧) を確認後、アニスアルデヒドで加熱。

2.3. 活性物質 08330-A の構造解析と同定

08330-A は白色無定形物質として得られ、 $[\alpha]_D^{27}$ は -50° ($c = 0.11$, EtOH) であった。LC-ESI-MS 分析により擬分子イオンピーク $[M-H]^-$ が m/z 488 に観測されたことから、分子量は 489、HR-TOF-MS の結果、観測値 m/z 512.2979 $[M+Na]^+$ (Calcd. for $C_{28}H_{43}NO_6Na$: 512.2988 $[M+Na]^+$) から分子式を、後述する ^{13}C -NMR の結果も合わせて、 $C_{28}H_{43}NO_6$ と決定した。TLC 分析では、ドラーゲンドルフ試薬、ニンヒドリン試薬による呈色は見られなかったが、カルボン酸の検出で用いられるブロモクレゾールグリーン試薬で黄色に呈色したことから、カルボン酸を有することが示唆された (Fig. 7)。続いて 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、 1H - 1H correlation spectroscopy (COSY)、distortionless enhanced by polarization transfer (DEPT)、heteronuclear multiple quantum coherence

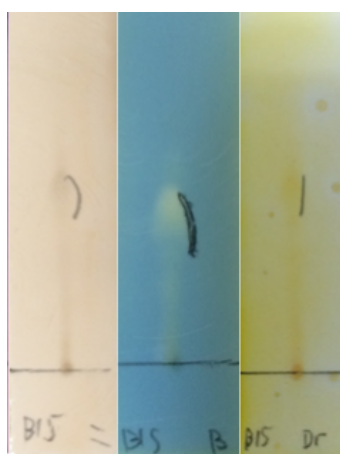


Fig. 7 08330-A の各種呈色試薬による TLC 分析

左からニンヒドリン試薬、ブロモクレゾールグリーン試薬、ドラーゲンドルフ試薬。CHCl₃:MeOH=15:1 で展開後、UV 254 nm でスポット (図中右片括弧) を確認後呈色。

(HMQC)、heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) スペクトルの解析を行った。 $^1\text{H-NMR}$ からは、0.67 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)、0.78 (d, $J=6.2$ Hz, 3H)、0.83 (d, $J=6.2$ Hz, 3H)、1.05 ppm (d, $J=6.2$ Hz, 3H) にメチルが 4 つ、3.83 (br d, $J=9.6$ Hz, 1H)、4.12 (d, $J=9.6$ Hz, 1H)、4.98 ppm (dt, $J=11.0, 3.5$ Hz, 1H) に酸素原子に隣接しているメチンが 3 つ、6.37 ppm (dd, $J=14.5, 11.6$ Hz, 1H) にトランス型オレフィンの存在が示唆された (Fig. 8)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT の解析結果より、炭素数は 28 であること、14.9、17.1、18.1、20.1 ppm のシグナルから 4 つのメチル基の存在、69.6、72.8、76.5 ppm のシグナルから酸素原子に隣接した 3 つのメチン炭素の存在、25.3、29.7、31.2、35.9、37.4、39.3、43.1、47.8 ppm に 8 つのメチレン炭素の存在が確認された (Fig. 9、10)。また、172.5 及び 178.9 ppm のシグナルからカルボキシル基を 2 つ有することが示唆され、TLC の呈色反応から、1 つはカルボン酸に由来するものと推測した。続いて、 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY、HMBC 関連の解析を行った結果、Fig. 11 に示した部分構造を推定した。この部分構造と分子式を基に SciFinder で類似構造を検索したところ、borrelidin が合致した。そこで、borrelidin の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ の文献値³⁰⁾ (CDCl_3) と比較した結果、08330-A の $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) のケミカルシフト値が良く一致した (Table 10)。また、borrelidin の $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ は -26.7° ($c=0.10$, EtOH) であり³¹⁾、08330-A では -50° ($c=0.11$, EtOH) であることから、立体構造も同一と判断し、08330-A を borrelidin (Fig. 12) と同定した。

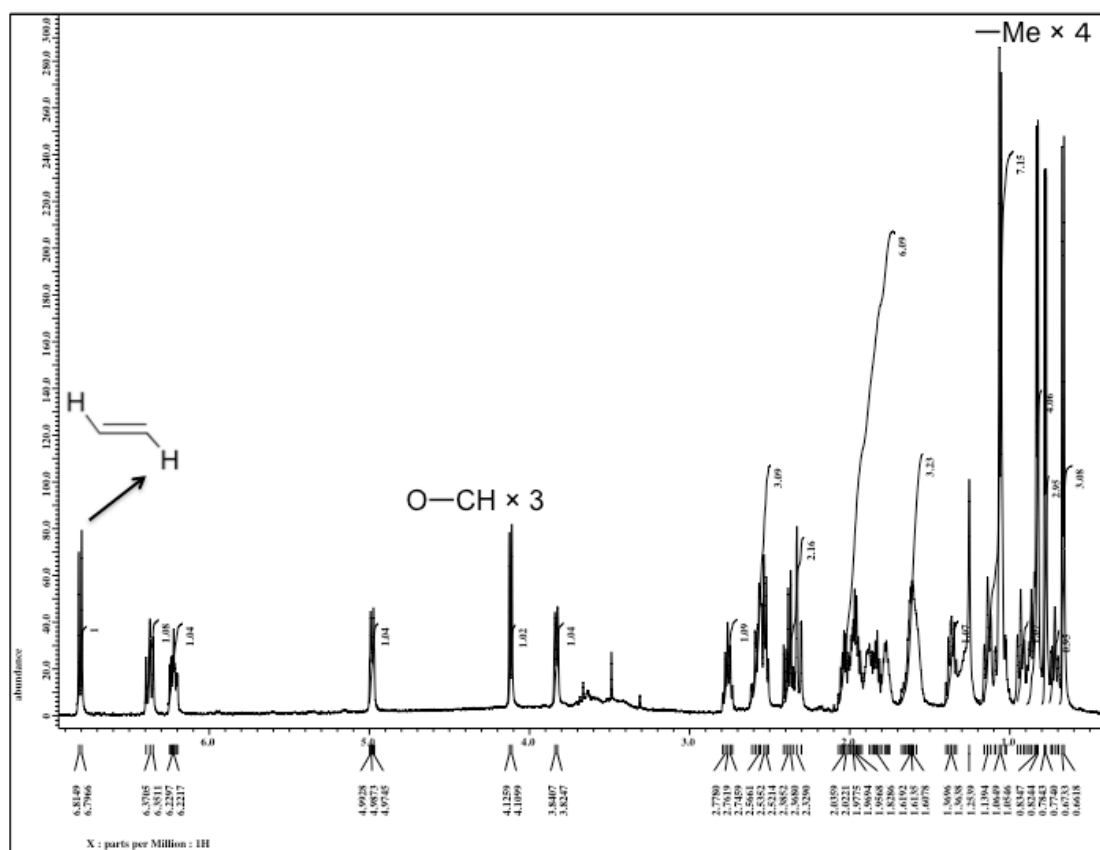


Fig. 8 08330-A の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (600 MHz、 $\text{CDCl}_3+0.5\%$ pyridine- d_5)

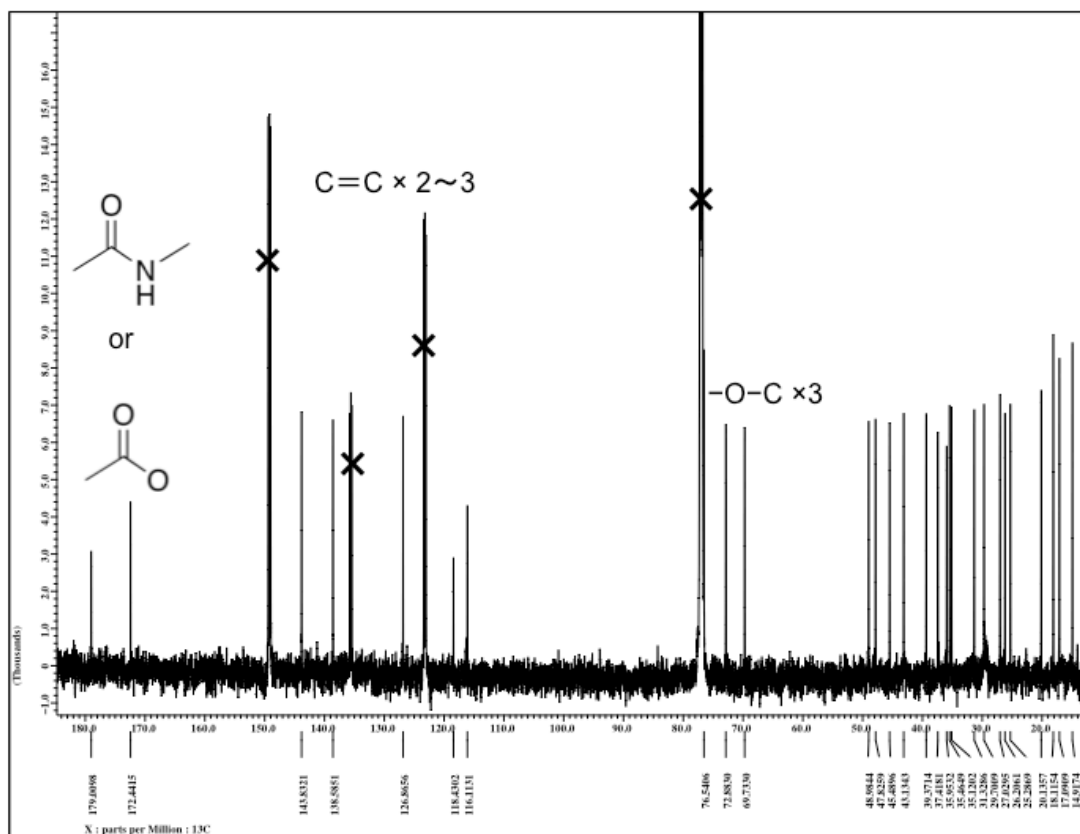


Fig. 9 08330-A の ^{13}C -NMR スペクトル (150 MHz, $\text{CDCl}_3 + 0.5\%$ pyridine- d_5)
 ×印は重溶媒由来のピーク。

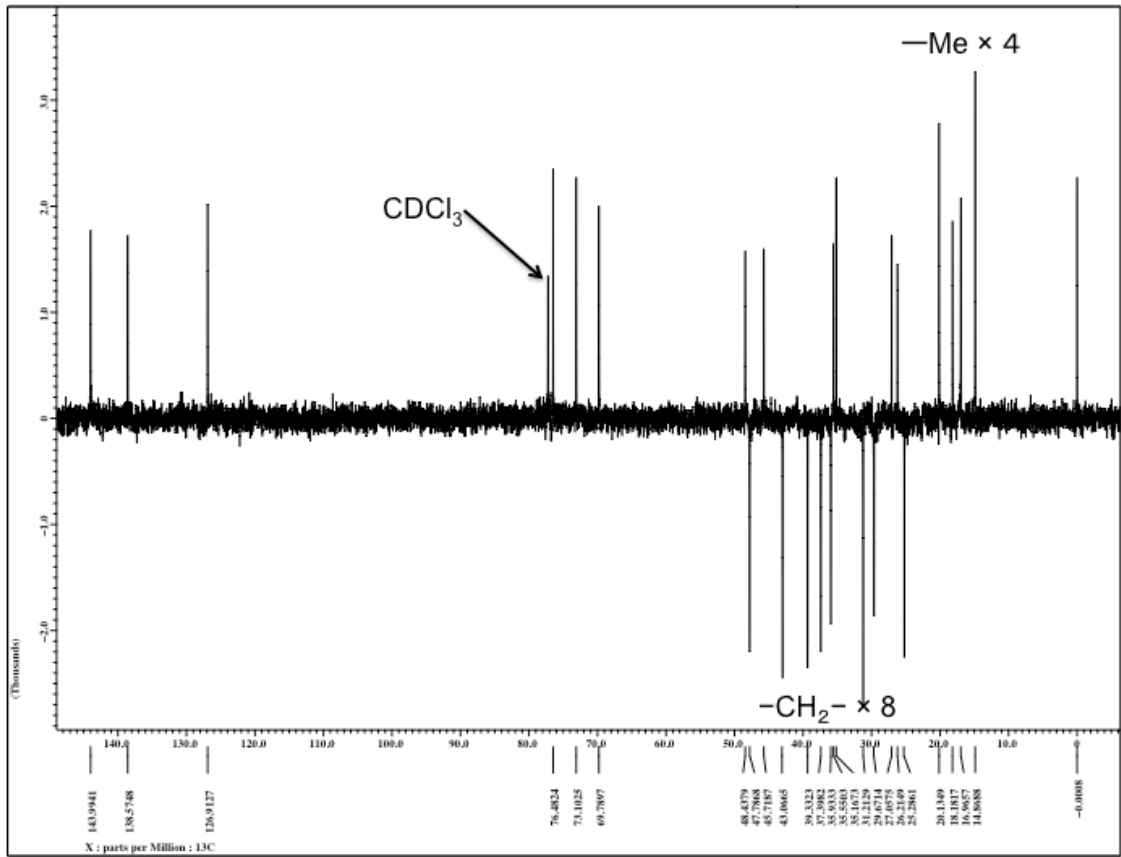


Fig. 10 08330-A の DEPT スペクトル (150 MHz、 $CDCl_3+0.5\%$ pyridine- d_5)

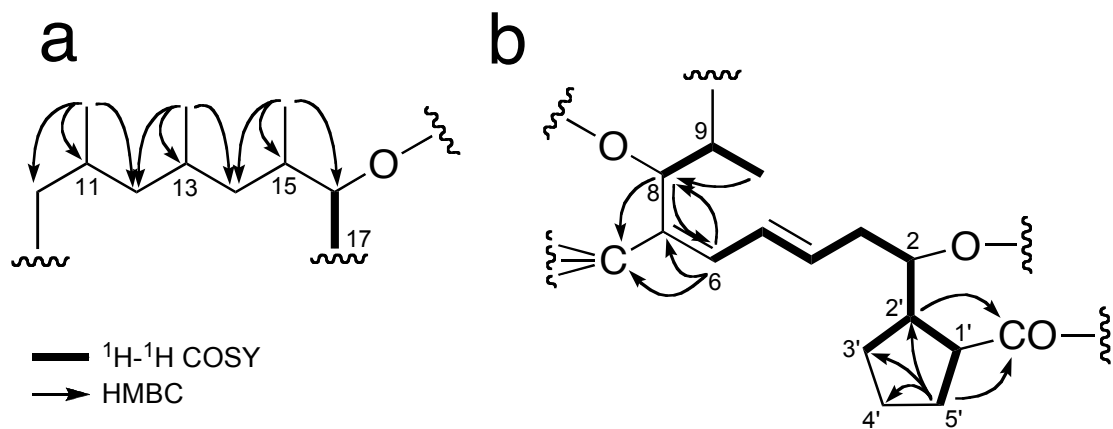


Fig. 11 08330-A の $^1H-^1H$ COSY、HMBC 相関の解析結果による推定部分構造 a、b

Table 10. Borrelidin の文献値との比較

Position	文献値 (in CDCl ₃)	08330-A (in CDCl ₃)	08330-A (in CDCl ₃ + 0.5% pyridine-d ₅)
		δ _H , ppm (mult, J in Hz)	
2	4.98 (dt, 10.7, 3.2, 1H)	4.97 (dt, 11.0, 3.4, 1H)	4.98 (dt, 11.0, 3.5, 1H)
3	2.57 (m, 1H), 2.60 (m, 1H)	2.57 (m, 1H), 2.60 (m, 1H)	2.56 (m, 2H)
4	6.21 (m, 1H)	6.21 (m, 1H)	6.20 (m, 1H)
5	6.39 (dd, 14.5, 11.2, 1H)	6.39 (dd, 14.4, 11.7, 1H)	6.37 (dd, 14.5, 11.0, 1H)
6	6.83 (d, 11.2, 1H)	6.83 (d, 11.7, 1H)	6.81 (d, 11.0)
7	—	—	—
8	4.12 (d, 9.6, 1H)	4.11 (d, 9.7, 1H)	4.12 (d, 9.6, 1H)
9	1.88 (m, 1H)	1.88 (m, 1H)	1.88 (m, 1H)
10	0.73 (m, 1H), 1.05 (m, 1H)	0.73 (m, 1H)	0.72 (ddd, 12.5, 12.5, 2.7, 1H), 1.05 (overlap, 1H)
11	1.63 (m, 1H)	1.63 (m, 1H)	1.62 (m, 1H)
12	0.98 (m, 1H), 1.11 (m, 1H)	0.98 (m, 1H), 1.12 (m, 1H)	0.93 (t, 11.7, 1H), 1.07 (m, 1H)
13	1.58 (m, 1H)	1.58 (m, 1H)	1.57 (m, 1H)
14	0.94 (m, 1H), 1.22 (m, 1H)	0.94 (m, 1H), 1.22 (m, 1H)	0.85 (m, 1H), 1.14 (t, 12.4, 1H)
15	1.68 (m, 1H)	1.66 (m, 1H)	1.62 (m, 1H)
16	3.87 (br d, 9.7, 1H)	3.87 (br d, 10.3, 1H)	3.83 (br d, 9.6, 1H)
17	2.32 (d, 15.8, 1H), 2.41 (dd, 15.8, 9.9, 1H)	2.32 (m, 1H), 2.44 (dd, 17.2, 10.3, 1H)	2.31 (d, 16.4, 1H), 2.38 (dd, 16.4, 10.3, 1H)
18	—	—	—
1'	2.49 (m, 1H)	2.49 (m, 1H)	2.52 (m, 1H)
2'	2.71 (m, 1H)	2.71 (m, 1H)	2.76 (m, 1H)
3'	1.38 (m, 1H), 1.98 (m, 1H)	1.37 (m, 1H), 1.98 (m, 1H)	1.37 (m, 1H), 1.99 (m, 1H)
4'	1.82 (m, 2H)	1.82 (m, 2H)	1.77 (m, 1H), 1.85 (m, 1H)
5'	1.92 (m, 1H), 2.03 (m, 1H)	1.91 (m, 1H), 2.03 (m, 1H)	1.94 (m, 1H), 2.04 (m, 1H)
9-Me	1.05 (d, 6.2, 3H)	1.05 (d, 6.9, 3H)	1.05 (d, 6.2, 3H)
11-Me	0.84 (d, 6.2, 3H)	0.85 (d, 6.2, 3H)	0.83 (d, 6.2, 3H)
13-Me	0.80 (d, 6.2, 3H)	0.80 (d, 6.3, 3H)	0.78 (d, 6.2, 3H)
15-Me	0.83 (d, 6.9, 3H)	0.84 (d, 6.9, 3H)	0.66 (d, 6.9, 3H)

Position	δ _C ppm		
2	77.2	76.5	76.5
3	35.9	35.9	35.9
4	138.5	138.6	138.5
5	127.0	126.9	126.9
6	144.0	144.0	143.8
7	115.9	115.9	116.9
8	73.1	73.1	72.8
9	35.2	35.2	35.1
10	37.4	37.4	37.4
11	26.2	26.2	26.1
12	47.8	47.8	47.9
13	27.1	27.1	27.1
14	43.0	43.0	43.1
15	35.6	35.6	35.5
16	69.8	69.8	69.6
17	39.3	39.3	39.3
18	172.2	172.2	172.5
1'	48.5	48.4	48.9
2'	45.8	45.7	45.4
3'	29.7	29.6	29.7
4'	25.2	25.2	25.3
5'	31.2	31.2	31.2
COOH	180.6	179.4	178.9
CN	118.2	118.3	118.5
9-Me	14.9	14.9	14.9
11-Me	20.1	20.1	20.0
13-Me	18.2	18.2	18.2
15-Me	16.9	17.0	17.1

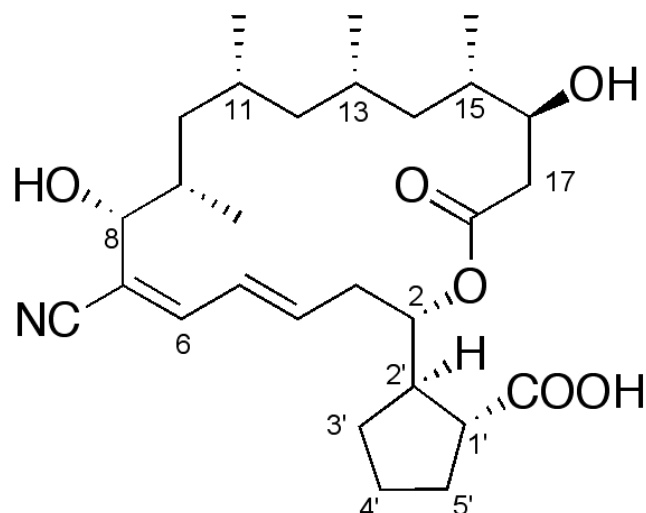
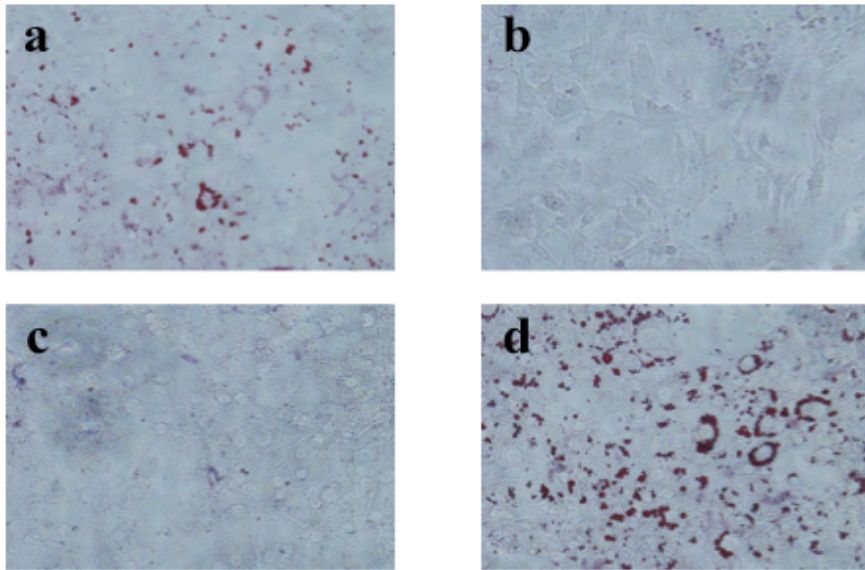


Fig. 12 08330-A (borrelidin) の構造

2.4. Borrelidin の脂肪蓄積阻害活性

Borrelidin は DMSO に溶解後、最終濃度が $0.063\sim 1.0\ \mu\text{M}$ になるよう分化誘導剤 (DEX、IBMX、insulin) を含む DMEM 培地で希釈し、細胞に添加した。Borrelidin で処理した細胞では、濃度依存的に脂肪蓄積を阻害していた (Fig. 13A)。Borrelidin $1.0\ \mu\text{M}$ では、脂肪蓄積をコントロールに比べ約 80% 阻害した (Fig. 13B、bar)。また、borrelidin の濃度の対数を取って half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) を算出したところ、 $0.19\ \mu\text{M}$ であった。XTT アッセイの結果、今回用いた濃度範囲では 90% 以上の細胞生存率を示した (Fig. 13B、line)。

A



B

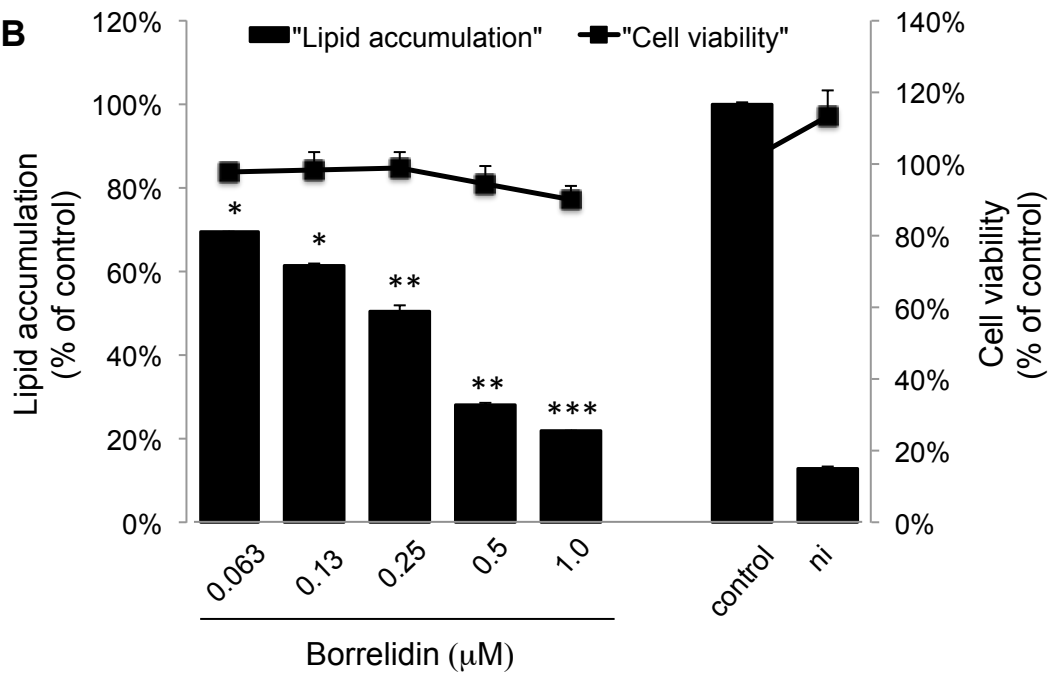


Fig. 13 Borrelidin で 7 日間処理した時の脂肪蓄積率と細胞生存率

(A) Borrelidin (1.0 μM) 処理後 7 日目の細胞の様子、a: 0.5 μM borrelidin 処理、b: 1.0 μM borrelidin 処理、c: non-induced cells (ni)、d: induced cells (control)

(B) Borrelidin 処理後 7 日目の脂肪蓄積率 (bar) と細胞生存率 (line)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ versus control

第3項 MC10130株が生産する脂肪蓄積阻害物質

3.1. 活性物質生産菌の同定

MC10130株は滋賀県草津市の土壌から採取された放線菌である。MC10130株のゲノムDNAを抽出し、16S rDNAを増幅した。増幅産物を精製後、秋田県立大学に塩基配列の解析を依頼し、1,478 bp (GenBank Accession No. AB968639)の配列を得た。この配列をもとにBLAST検索した結果、*Streptomyces cinerochromogenes* (GenBank Accession No. AY999745)、*S. coelestis* (GenBank Accession No. AY999761)と100%の相同性を示した。Bergey's manualによると、*S. cinerochromogenes*と99%以上の相同性を示すものは存在しないこと、*S. coelestis*は、*S. humiferus*、*S. violaceolatus*と100%の相同性を示すことが報告されている³²⁾。したがって、MC10130株は*S. cinerochromogenes*と同定した。

3.2. 脂肪蓄積阻害物質の精製

MC10130株をSC培地で攪拌通気培養後(タンク: 10 L)、得られた濾液を等量のEtOAcで3回抽出し、EtOAc抽出物305.8 mgを得た。このEtOAc抽出物に活性が確認できたことから、EtOAc抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃/MeOH = 40/1→0/1 gradient)を用いて5つのフラクションに分画した(Fig. 14)。これらフラクションの活性を測定した結果、フラクション

2、3、4にそれぞれ同程度の活性が認められた。この中で、最も量が多く、TLC分析 (Fig. 15) で比較的スポット数が少なかったフラクション 3 について、一部を分取 HPLC で Fig. 16 に示した通り、メジャーピークの前後、及びメジャーピークの 3 つに分画した。これら画分の活性を測定した結果、メジャーピークに活性が認められた。そこで、残りも同様の条件でメジャーピークのみ分取し、活性物質 18.5 mg (10130-A と仮称) を得た。

MC10130 EtOAc crude 305.8 mg

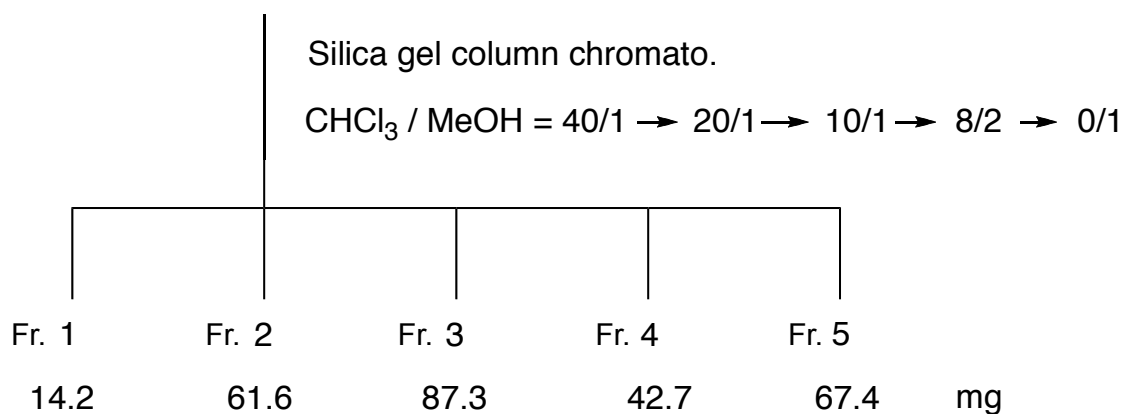


Fig. 14 MC10130 培養液 EtOAc 抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画スキーム

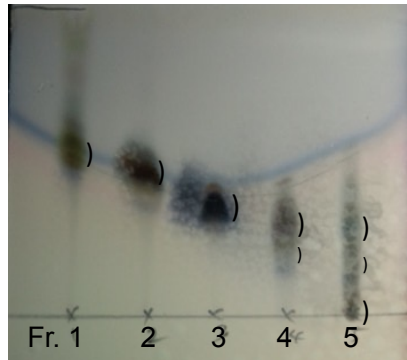


Fig. 15 分画後の各フラクションの TLC 結果
 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 20:1$ で展開し、UV 254 nm 照射でスポット (図中右片括弧) を確認後、アニスアルデヒドで加熱。

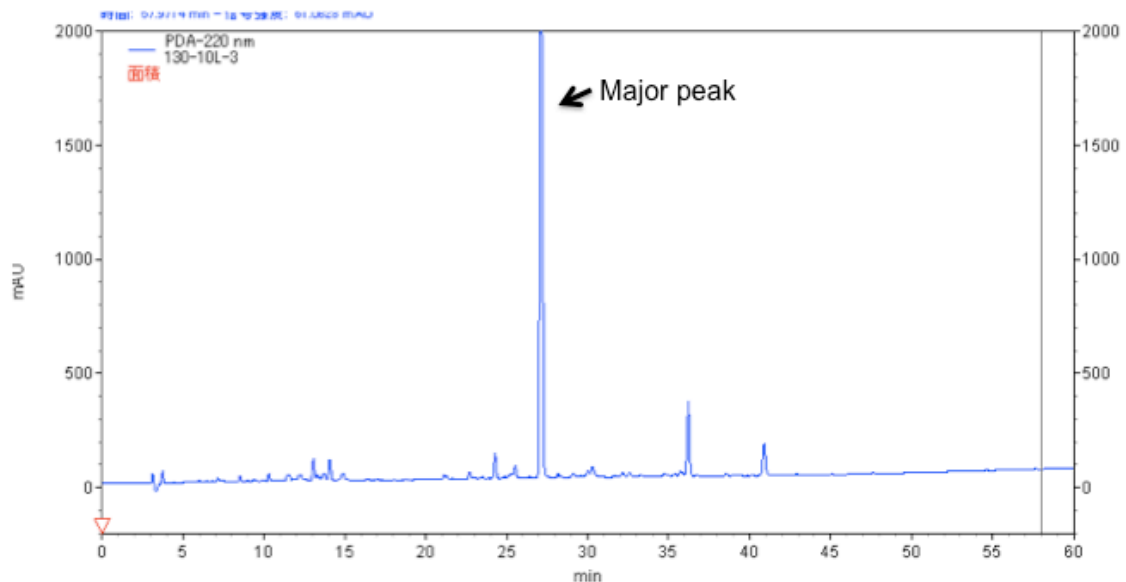


Fig. 16 Fr. 3 の HPLC クロマトグラム
 HPLC 条件: Column: $5\text{C}_{18}\text{-AR-II}$ (4.6 mm \times 250 mm)、Mobile phase: $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (10% \rightarrow 100% MeCN , 60 min)、Flow rate: 1.0 mL/min、Detection: UV 220 nm

3.3. 活性物質 10130-A の構造解析と同定

10130-A は無色無定形物質として得られ、 $[\alpha]_D^{27}$ は -120° (c 0.46, MeOH) であった。LC-ESI-MS 分析により擬分子イオンピーク $[M-H]^-$ が m/z 293 に観測されたことから、分子量は 294、HR-TOF-MS の結果、観測値 m/z 317.1721 $[M+Na]^+$ (Calcd. for $C_{17}H_{26}O_4Na$: 317.1729 $[M+Na]^+$) から分子式を、後述する ^{13}C -NMR の結果も合わせて、 $C_{17}H_{26}O_4$ と決定した。TLC 分析では、ドラージェンドルフ試薬、ニンヒドリン試薬、ブロモクレゾールグリーン試薬による呈色は見られなかった (Fig. 17)。続いて 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、 1H - 1H COSY、DEPT、HMQC、HMBC スペクトルの解析を行った。 1H -NMR では、0.91 (d, J = 6.9

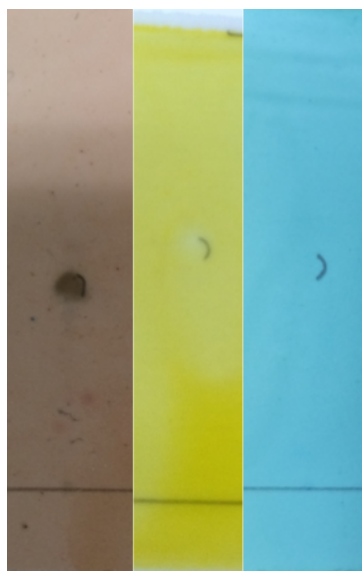


Fig. 17 10130-A の各種呈色試薬による TLC 検出結果

左からニンヒドリン試薬、ドラージェンドルフ試薬、ブロモクレゾールグリーン試薬。 $CHCl_3:MeOH=20:1$ で展開後、UV 254 nm でスポット (図中右片括弧) を確認後呈色。

Hz, 3H)、1.22 (d, $J=6.0$ Hz, 3H)、1.50 (s, 3H)、1.70 ppm (s, 3H) に4つのメチルシグナルが、4.51 (d, $J=4.8$ Hz, 1H)、4.54 ppm (m, 1H) に酸素原子に隣接する2つのメチンシグナル、5.79 (d, $J=15.1$ Hz, 1H) と 7.03 ppm (d, $J=15.1$ Hz, 1H)から、トランス型オレフィン、及びその他の2~3つのオレフィンプロトンの存在が観察された (Fig. 18)。 ^{13}C -NMR、DEPT、HMQC の解析により、炭素数は17であること、14.9、16.1、18.3、27.1 ppm のシグナルから4つのメチル基の存在、75.5、76.8 ppm のシグナルから酸素原子に結合した2つのメチンの存在が支持され、25.9、35.5 ppm に2つのメチレンシグナルが確認された (Fig. 19、20)。また、115.3、129.5、134.8、136.1、139.5、158.3 ppm に6つのオレフィン炭素が観察され、168.3 ppm のシグナルからカルボキシル基の存在が示唆された。 ^1H - ^1H COSY、HMBC 相関の解析結果、部分構造 a、b を Fig. 21 に示す通りに推定した。この部分構造、及び分子式を基に SciFinder で検索した結果、cineromycin B と合致した。文献に記載されている cineromycin B の NMR データは CDCl_3 中で測定されていたため、10130-A を CDCl_3 中で再測定した。その結果、cineromycin B の文献値³³⁾ と 10130-A の ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR データが良く一致した (Table 11)。また、同文献内の cineromycin B の $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ は -127° ($c=1.0$, MeOH) であり、10130-A のそれは -120° ($c=0.46$, MeOH) であることから、立体構造も同一と判断し、10130-A を cineromycin B (Fig. 22) と同定した。

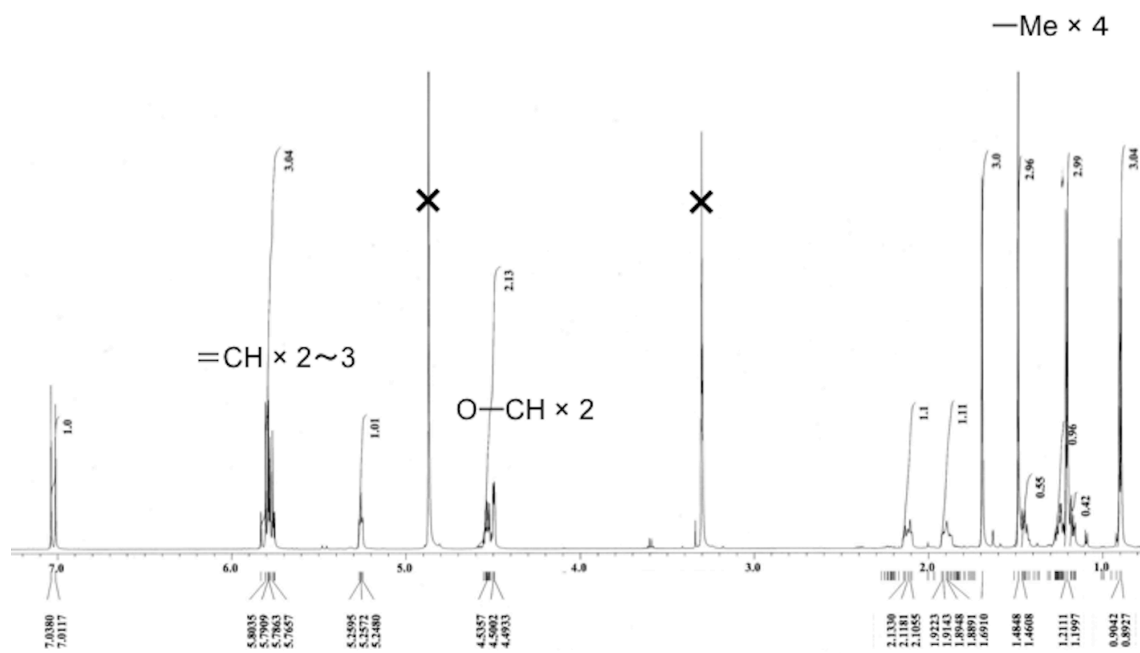


Fig. 18 10130-A の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (600 MHz、methanol- d_4)、×印は重溶媒由来のピーク

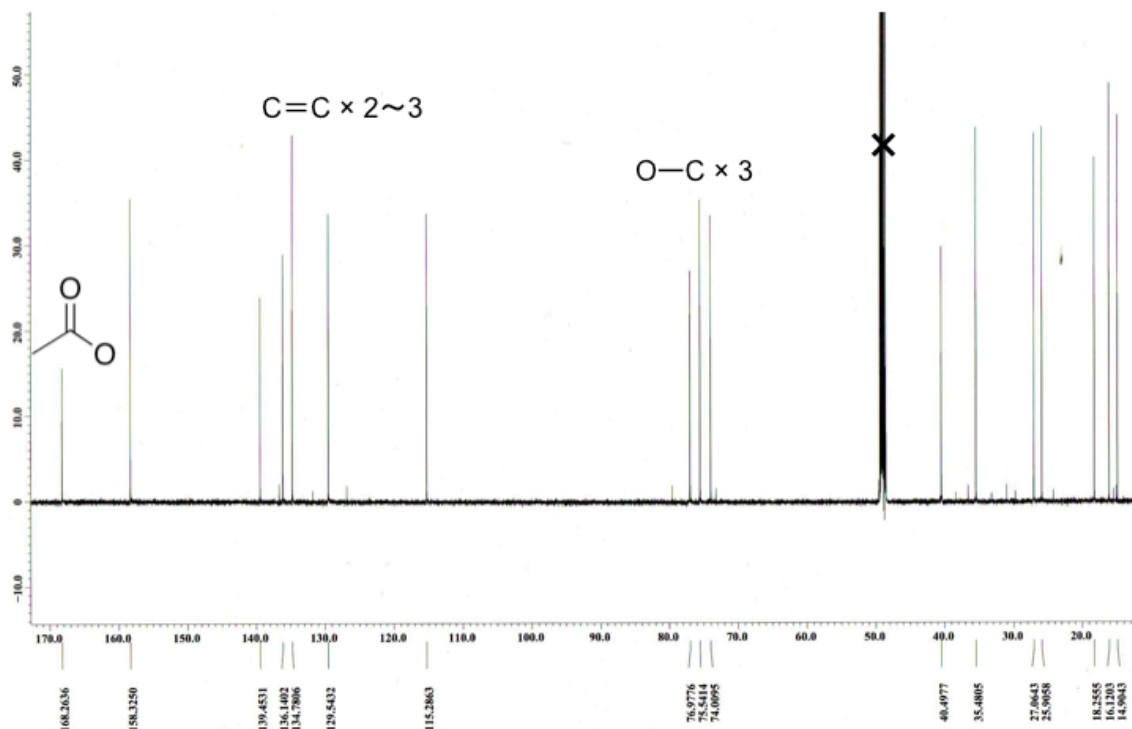


Fig. 19 10130-A の ^{13}C -NMR スペクトル (150 MHz、methanol- d_4)、 \times 印は重溶媒由来のピーク

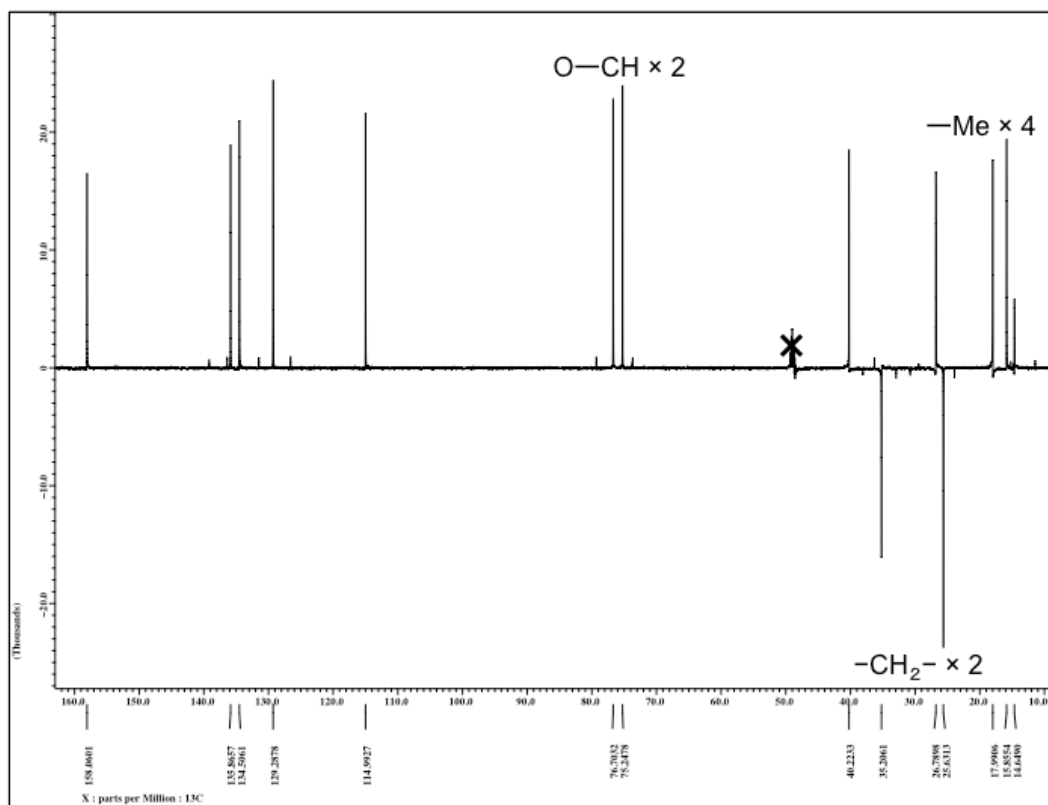


Fig. 20 10130-A の DEPT スペクトル (150 MHz、methanol- d_4)、×印は重溶媒由来のピーク

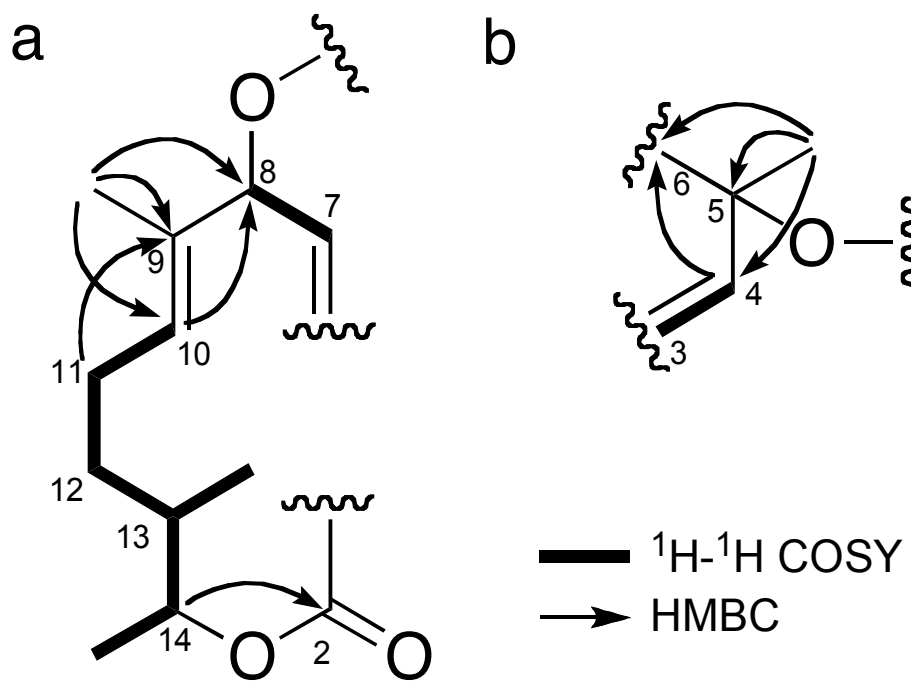


Fig. 21 10130-A の ^1H - ^1H COSY、HMBC 相関の解析結果による部分構造 a、b

Table 11. Cineromycin B の文献値との比較

Position	文献値 (in CDCl ₃)	10130-A (in CDCl ₃)	10130-A (in methanol- <i>d</i> ₄)
	δ _H ppm (mult, J in Hz)		
2	—	—	—
3	5.86 (d, 16.0, 1H)	5.85 (d, 16.0, 1H)	5.79 (d, 15.1, 1H)
4	6.91 (d, 16.0, 1H)	6.91 (d, 16.0, 1H)	7.03 (d, 15.1, 1H)
5	—	—	—
6	5.85 (d, 16.0, 1H)	5.85 (d, 16.0, 1H)	5.81 (m, 1H)
7	5.71 (dd, 16.0, 5.0, 1H)	5.71 (dd, 16.0, 5.5, 1H)	5.80 (m, 1H)
8	4.53 (d, 5.0, 1H)	4.53 (br s, 1H)	4.51 (d, 4.8, 1H)
9	—	—	—
10	5.21 (br.m, 1H)	5.20 (t like, 5.5, 1H)	5.27 (t like, 6.2, 1H)
11	1.84 (br.m, 1H), 2.10 (br.m, 1H)	1.84 (m, 1H), 2.09 (m, 1H)	1.92 (m, 1H), 2.13 (m, 1H)
12	1.17 (m, 1H), 1.22 (m, 1H)	1.18 (m, 1H), 1.23 (m, 1H)	1.19 (m, 1H), 1.25 (m, 1H)
13	1.40 (br. q, 6.0, 1H)	1.39 (m, 1H)	1.47 (m, 1H)
14	4.56 (d, 7.0, 1H)	4.57 (dd, 8.6, 6.2, 1H)	4.54 (m, 1H)
5-Me	1.53 (s, 3H)	1.53 (s, 3H)	1.50 (s, 3H)
9-Me	1.71 (s, 3H)	1.71 (s, 3H)	1.70 (s, 3H)
13-Me	0.88 (d, 6.0, 3H)	0.88 (d, 6.6, 3H)	0.91 (d, 6.9, 3H)
14-Me	1.21 (d, 7.0, 3H)	1.21 (d, 6.2, 3H)	1.22 (d, 6.0, 3H)

Position	δ _C ppm		
2	166.3	166.2	168.3
3	115.0	114.9	115.3
4	155.5	155.4	158.3
5	73.4	73.4	74.0
6	135.3	135.3	136.1
7	133.6	133.5	134.8
8	74.5	74.5	75.5
9	137.9	137.9	139.5
10	129.4	129.5	129.5
11	25.0	25.0	25.9
12	34.3	34.2	35.5
13	39.5	39.5	40.5
14	75.6	75.5	76.8
5-Me	27.0	27.0	27.1
9-Me	15.0	15.0	14.9
13-Me	16.1	16.1	16.1
14-Me	18.1	18.2	18.3

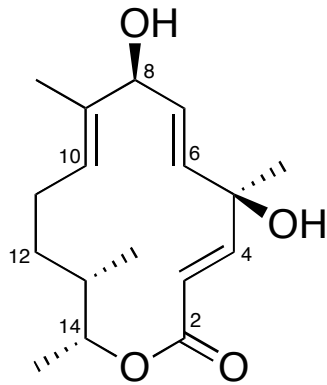
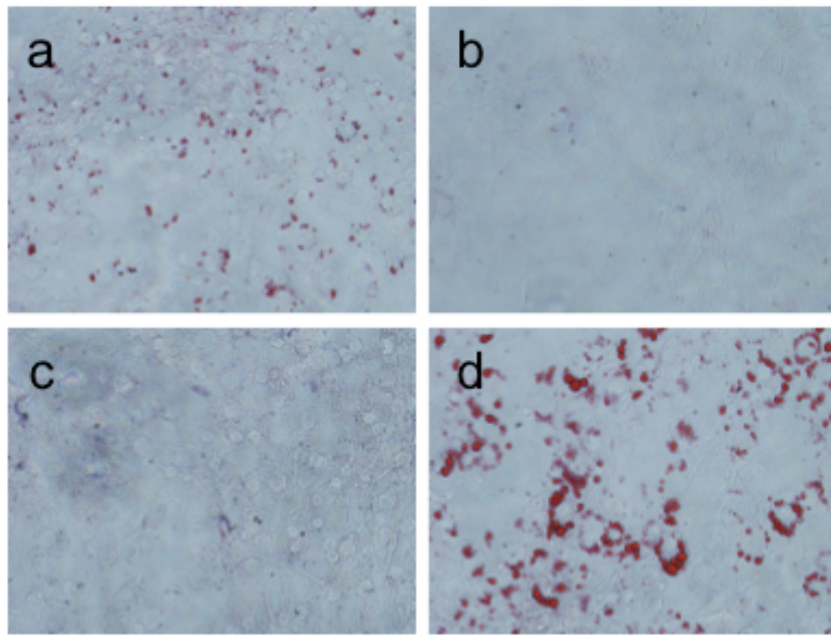


Fig. 22 10130-A (cineromycin B) の構造

3.4. Cineromycin B の脂肪蓄積阻害活性

Cineromycin B は DMSO に溶解後、最終濃度が 6.3~50 $\mu\text{g/mL}$ になるよう分化誘導剤 (DEX、IBMX、Insulin) を含む DMEM 培地で希釈し、細胞に添加した。Fig. 23 に示した通り、cineromycin B で処理した細胞では、濃度依存的に脂肪蓄積を阻害した。Cineromycin B 50 $\mu\text{g/mL}$ で処理した細胞では、約 80% 脂肪蓄積を阻害した (Fig. 23B、bar)。また、cineromycin B の濃度の対数を取って IC_{50} を算出したところ、15.8 $\mu\text{g/mL}$ だった。さらに、XTT アッセイにより cineromycin B で処理した時の細胞生存率を検討した結果、今回用いた濃度範囲では 100% 近い細胞生存率を示し (Fig. 23B、line)、毒性の影響は全くないと判断した。

A



B

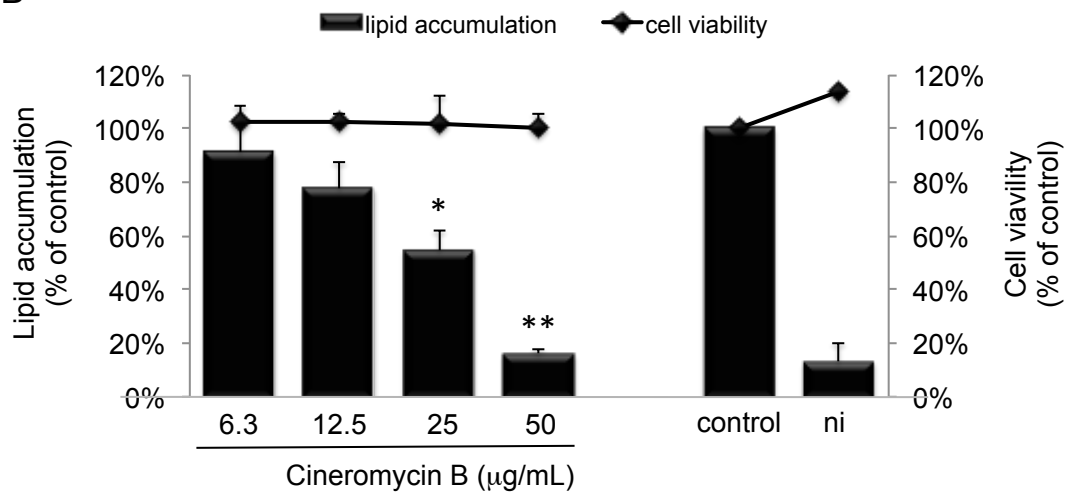


Fig. 23 Cineromycin B で 7 日間処理した時の脂肪蓄積率と細胞生存率
 (A) Cineromycin B 処理後 7 日目の細胞の様子。a: 25 µg/mL cineromycin B 処理時、b: 50 µg/mL cineromycin B 処理時、c: non-induced cells (ni)、d: induced cells (control). (B) Cineromycin B 処理後 7 日目の脂肪蓄積率 (bar) と細胞生存率 (line)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ versus control

第3節 考察

本研究で、*Streptomyces* 属放線菌培養液より、脂肪蓄積阻害活性を指標に活性物質の精製を行い、08330-A、及び 10130-A を得た。08330-A は、各種機器分析による構造解析の結果、18 員環マクロライドの borrelidin、10130-A は 14 員環マクロライドの cineromycin B と同定した。Borrelidin は 1949 年に Berger らにより、ライム病の原因細菌ボレリアに対する抗菌物質として初めて単離された化合物で³⁴⁾、その後、抗マラリア、抗血管新生、抗真菌活性などが見いだされた³⁵⁻³⁷⁾。また、threonyl-tRNA の阻害剤として予てより知られていたが³⁸⁾、近年その強さは世界一であることが報告され、再び注目を浴びた化合物でもある³⁹⁾。Cineromycin B は 1966 年に Miyari らにより初めて単離された化合物で、*Staphylococcus aureus* に抗菌活性を示し、マウスにおける half-maximal lethal dose (LD₅₀) は 300 mg/kg と報告されている⁴⁰⁾。これらの化合物が脂肪蓄積阻害活性を示すことはこれまでに報告はなく、新しい知見である。いずれの化合物もマクロライド系の既知化合物ではあったが、borrelidin はこれまでの分化阻害剤と比べて強力に脂肪蓄積を阻害していることや (IC₅₀ = 約 0.19 μM)、マクロライド系化合物の分化阻害作用の報告はこれまでにないため、その作用機序に興味を持たれた。次章では、その詳細な検討を行ったので報告する。

第3章 脂肪蓄積阻害物質の作用機序に関する研究

第1節 序文

3T3-L1 細胞の分化は、マスターレギュレーターである PPAR γ や C/EBP α が制御していることはすでに良く知られている。マスターレギュレーターを調節する因子は、Tob2、C/EBP、GATA、KLF family などがこれまでに報告されているが、ごく最近でも PPAR γ を介した新たな分化調節因子の報告がなされている。例えば、fat mass and obesity associated (*FTO*) gene は、2007 年に BMI (body mass index) 値や肥満と関連がある遺伝子として発見された⁴¹⁾。その後、*FTO* の機能解析が 3T3-L1 細胞で行われ、PPAR γ を介して分化を調節していることが明らかになった⁴²⁾。このように、3T3-L1 細胞の分化に関与する因子が未だ報告され続けており、マスターレギュレーターの制御因子についてはまだ完全には理解されていないのが現状である。

Borrelidin は、これまでに報告されている分化阻害剤 (berberine: IC₅₀ = 約 2.0 μ M、fucoxanthin: IC₅₀ = over 25 μ M) に比べて活性が強いことが前章の実験により明らかになった。このことから筆者は、borrelidin はすでに報告されている分化阻害剤とは作用機序が異なるのではないかと推測し、borrelidin の作用機序を解明することにより、新たな知見が得られると考えた。また、これまでに、マクロライド系化合物が脂肪蓄積阻害作用を示すという報告はなく、活性は弱いながらも、cineromycin B の作用機序についても興味を持たれたため、その検討を行った。

第2節 実験方法

第1項 測定機器等

特に記載がない限り、測定機器等は以下のものを使用した。

- ・ リアルタイム PCR: Chromo4 (バイオラッドラボラトリーズ株式会社)
- ・ 電気泳動層: ミニプロテイン tetra セルシステム (バイオラッドラボラトリーズ株式会社)
- ・ ルミノイメージアナライザー: ImageQuant LAS 4000mini (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)

第2項 cDNA の作製とリアルタイム PCR

3T3-L1 細胞を 8.0×10^5 cells/well の濃度で 6 ウェルプレートに播種し、分化誘導剤とともに borrelidin (1.0 μ M)、cineromycin B (50 μ g/mL) で処理後、適切な時間 (0.5、2.0、6.0、12 h、あるいは day 1、day 3、day 5) まで培養した。培養後、各ウェルに RiboZol (AMRESCO、USA) を 1 mL 加え、セルスクレーパーで良く攪拌し、1.5 mL エッペンチューブに移した。これに 200 μ L の CHCl_3 を加え 15 秒間激しく混和して室温で 2~3 分放置したのち 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を 400 μ L 別容器に回収し、12,000 rpm で 15 分間遠心分

離した。400 μL のイソプロパノールを加え 15 秒間激しく混和し、室温で 5～10 分放置したのち 12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、total RNA を沈殿させて上清を除去した。70% EtOH を 1 mL 加えタッピングし、7,500 rpm で 15 分間遠心分離し上清を除去した。RNA ペレットを 5 分間風乾させ、20 μL の滅菌水に溶解した。そのうち 5 μL を TAE 緩衝液 95 μL と混合し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で total RNA 濃度を測定した。残りの 15 μL を、5 $\mu\text{g}/12.5 \mu\text{L}$ になるように滅菌水で調製し、ReverTraAce kit (東洋紡株式会社) を用いて Table 12、13 に示した組成、条件で逆転写反応を行い、cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として 1.0 μg 用い、 β -actin、lipoprotein lipase (LPL)、fatty acid binding protein 4 (FABP4)、glucose transporter 4 (GLUT4)、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11 β 1)、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、GATA-2、GATA-3、KLF2、KLF3、KLF4、KLF5、KLF6、KLF7、KLF15 の mRNA 発現量について qKOD real-time PCR kit を用いて Table 14、15 に示す組成、条件でリアルタイム PCR により解析した。使用したプライマーは Table 16 に示した。それぞれの発現量は内部標準の β -actin の発現量で補正し、分化誘導前の 3T3-L1 細胞の発現量との比で表した ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法)。各実験は $n = 3$ で行った。

Table 12. 逆転写反応液の組成

5 \times Buffer	4.0 μL
10 mM dNTPs	2.0 μL
Oligo(dT) ₁₂₋₂₀	0.5 μL
ReverTra Ace	1.0 μL
Template	12.5 μL
Total	20 μL

Table 13. 逆転写反応の条件

1. 70°C	5 min
2. 4°C	5 min
3. 42°C	60 min
4. 99°C	5 min

Table 14. リアルタイム PCR 反応液の組成

2× qPCR mix	12.5 μL
10 μM Forward primer	1.0 μL
10 μM Reverse primer	1.0 μL
Distilled water	9.5 μL
Template	1.0 μL
Total	25 μL

Table 15. リアルタイム PCR の反応条件

1. 98°C	2 min
2. 98°C	10 sec
3. 60°C	10 sec
4. 68°C	45 sec
2-4	40 cycles

Table 16. リアルタイム PCR に用いたプライマー配列

Gene	Forward	Reverse
β -actin ⁴³⁾	tca ccc aca ctg tgc cca tct ac	gag tac ttg cgc tca gga gga gc
PPAR γ	cat ggt tga cac aga gat gcc	ctt ggc gaa cag ctg aga gg
C/EBP α	tgg ccc cgt gag aaa aat gaa g	ata gac gtg cac act gcc att g
C/EBP β ⁴⁴⁾	ggg gtt gtt gat gtt ttt gg	cga aac gga aaa ggt tct ca
C/EBP δ ⁴⁴⁾	acg acg aga gcg cca tc	tcg ccg tcg ccc cag tc
HSD11 β 1 ⁴³⁾	aat ctc tgg gat aat taa cgc	gct tac aga agt atc agg ca
LPL ⁴³⁾	aat ctg ggc tat gag atc aac a	tct ctc cgg ctt tca ctc g
GLUT4 ⁴³⁾	tgg tca ata cgg tct tca cgt	gga ccc ata gca tcc gca ac
FABP4 ⁴³⁾	gat ttg gtc acc atc cgg tca	agt cac gcc ttt cat aac aca
GATA-2 ⁴⁵⁾	tgc aac aca cca ccc gat acc	caa ttt gca caa cag gtg ccc
GATA-3 ⁴⁵⁾	tct cac tct cga ggc agc atg	ggg acc atc tcg ccg cca cag
KLF2 ⁴³⁾	ggg ccc cgc aac cgg ttc cc	gcc gca tcc ttc cca gtt gca at
KLF3 ⁴³⁾	ccg ccc att aag aag tac tcg	tgt aga cct tat tgc acc cat
KLF4 ⁴³⁾	gcc ctc aaa gtt tgt gcg aat	atc gcc ggt gcc ttg aca ac
KLF5	tgc ttc caa act ggc gat tca c	tgc ggt tta aag gat ggc aga g
KLF6 ⁴³⁾	gag gaa ctt tca ccc acg ac	caa aac gcc act cac aac c
KLF7 ⁴³⁾	cca tcg ctg tac gtt taa cgg	tct ctt cat atg gag cgc aag
KLF15 ⁴³⁾	ggc cag aag ttt ccc aag aac cc	gta cgg ctt cac acc cga gt

第3項 Western blot による β -actin、PPAR γ タンパクの検出

3T3-L1 細胞を 1.8×10^6 cells/dish の濃度で ϕ 6 cm ディッシュに播種し、分化誘導剤とともに borrelidin (1.0 μ M)、cineromycin B (50 μ g/mL) で処理後、7 日目に以下に示す方法で総タンパクを回収した。ディッシュから培地を除去し、PBS で 2 回洗浄後、1 \times Laemmli buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、10% glycerol、0.00125% bromophenol blue] を 200 μ L 加えて可溶化し、1.5 mL

マイクロチューブに移した。氷冷下、細胞の可溶化とサンプル粘度を低下させるため、10 秒間×10 回の超音波破碎処理を行った。総タンパク量は BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて、吸光度 (520 nm) を測定することにより算出した。2-メルカプトエタノールを最終濃度が 5% (v/v) になるように加え、95°Cで 5 分間煮沸した。10 µg の総タンパクを含むサンプルを e-PAGEL (アトー株式会社) にて電気泳動後、ミニトランスブロットセル (BIO-RAD) で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 Hybond-P (GE ヘルスケア) へ 15 V、1 時間の条件で転写した。転写後の PVDF 膜はブロックエース (DS ファーマバイオメディカル株式会社) でブロッキングし、一次抗体である抗 β -actin 抗体、抗 PPAR γ 抗体 (santa cruz、USA) と一晩反応させた。二次抗体として Anti-mouse IgG (H+L)-HRP (株式会社医学生物学研究所) を 1 時間反応させた。検出は Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア) で行い、ルミノイメージアナライザー (Las 4000mini) で写真撮影した。各実験は $n = 3$ で行った。

第 4 項 siRNA 導入実験

3T3-L1 細胞を 1.5×10^5 cells/well の濃度で 6 ウェルプレートに播種し、培地には DMEM 培地 + 10% FBS (penicillin/streptomycin free) を用いた。また、short interfering (siRNA) と導入試薬の調製は以下の方法で行った。20 µM の control siRNA、KLF2 siRNA、KLF3 siRNA、KLF7 siRNA、GATA-3 siRNA

(タカラバイオ株式会社) を 12.5 μL と、Lipofectamine 2000 (ライフテクノロジーズ株式会社) を 5 μL 、それぞれ別々の Opti-MEM (ライフテクノロジーズ株式会社) 250 μL に添加し、良くピペッティングした (以降、siRNA 溶液、及び Lipofectamine 2000 溶液と呼ぶ)。15 分室温で放置した後、siRNA 溶液と Lipofectamine 2000 溶液を混合し、良くピペッティングした (以降、混合溶液と呼ぶ)。再度 15 分室温で放置した後、1 ウェル当たり 500 μL の混合溶液を添加した。37°C、5% CO_2 で 3 日間インキュベート後、各 siRNA が対象とする因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認した。また、siRNA を導入後、分化誘導剤とともに borrelidin (1.0 μM)、cineromycin B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で処理し、3 日目における PPAR γ の発現量を確認した。siRNA の脂肪蓄積への影響は、siRNA 導入後、分化誘導剤とともに borrelidin (1.0 μM)、cineromycin B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で処理し、7 日目における脂肪蓄積量を Oil Red O 染色により定量した。各実験は $n = 3$ で行った。

第 5 項 統計処理

各実験データの結果は、全て平均値 \pm 標準誤差で表示した。検定は SPSS software (ver. 12.0J for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて analysis of variance (ANOVA) により行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

第 3 節 結果

第 1 項 **Borrelidin** の脂肪蓄積阻害活性の作用機序

1.1. 脂肪細胞に特有の遺伝子発現への影響

Borrelidin は脂肪蓄積を阻害するので、3T3-L1 細胞の分化、あるいは分化後の脂質生成過程を阻害していると考えられた。そこで、分化後の脂肪細胞で高発現することが報告されている **FABP4**、**LPL**、**HSD11 β 1**、**GLUT4** の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、コントロールでは、分化誘導後 3 日目以降でこれらの発現が上昇しているのに対し、**borrelidin** を添加した細胞では、ほとんどこれらの発現は認められなかった (**Fig. 24**)。したがって、**borrelidin** は分化自体を阻害していると考えられた。

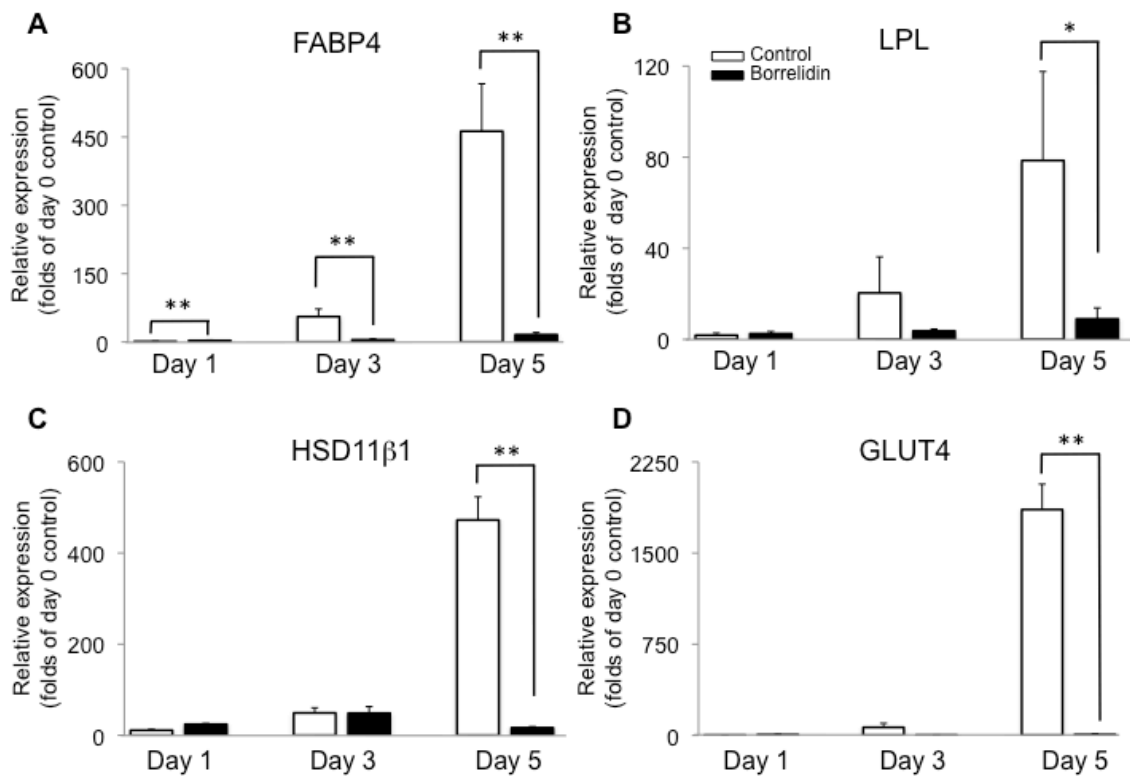


Fig. 24 Borrelidin (1.0 μ M) 処理細胞の (A) FABP4、(B) LPL、(C) HSD11 β 1、(D) GLUT4 の mRNA 発現量、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

1.2 脂肪細胞分化のマスターレギュレーターへの影響

3T3-L1 細胞では、脂肪細胞への分化は PPAR γ と C/EBP α がマスターレギュレーターとして制御しており、前述したように PPAR γ の発現なしには脂肪細胞へと分化しないことが分かっている。Borrelidin が 3T3-L1 細胞の分化を阻害することが示唆されたので、分化のマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α の発現量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、これらの mRNA の発現は、コントロールでは時間依存的に上昇した。一方、borrelidin を添加した細胞では、day 1 において PPAR γ 、C/EBP α の mRNA の発現は有意に上昇し

た (Fig. 25A、B)。しかしながら、day 3、及び day 5 においては有意な減少が確認された。また、ウェスタンブロットによる PPAR γ のタンパク発現を確認した結果、分化誘導後 7 日目においてもその発現は認められなかった (Fig. 25C、lane 3)。したがって、borrelidin は分化自体を阻害することが明らかになった。

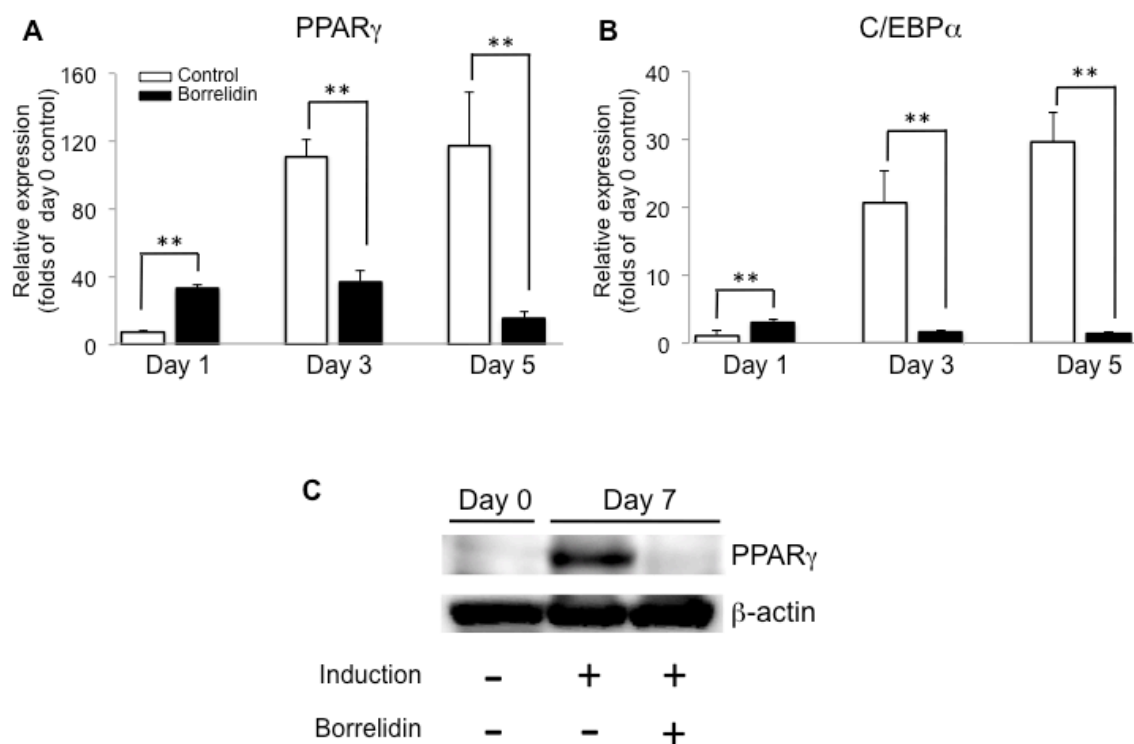


Fig. 25 Borrelidin (1.0 μ M) 処理細胞の脂肪細胞分化マスターレギュレーターの発現量。(A) PPAR γ mRNA 発現量、(B) C/EBP α mRNA 発現量、(C) PPAR γ タンパク発現、** $p < 0.01$

1.3. Borrelidin のマスターレギュレーター調節因子への影響 (1)

マスターレギュレーター mRNA 発現は、分化誘導後 2 日目あたりで上昇し始めると報告されている⁴⁶⁾。したがって、分化誘導から 2 日目までの間に

borrelidin がマスターレギュレーターの調節因子に作用して分化を阻害しているのではないかと推測した。今回用いた 3T3-L1 細胞の分化誘導システムでは、まず始めに、分化誘導剤として加えた IBMX、DEX がそれぞれ C/EBP β 、C/EBP δ の発現を促進させ、分化を誘導する。そこで、まず、分化の初期段階における C/EBP β 、C/EBP δ の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、コントロールでは C/EBP β や C/EBP δ の mRNA 発現は分化誘導後、時間と共に上昇していくのに対し、borrelidin で処理した細胞では、分化誘導から 12 時間後で、C/EBP δ の mRNA 発現量がコントロールに比べ約 50% 減少していた (Fig. 26B)。なお、borrelidin で処理した細胞では、両因子とも 12 時間後以降にコントロールとの大きな差は見られなかった。

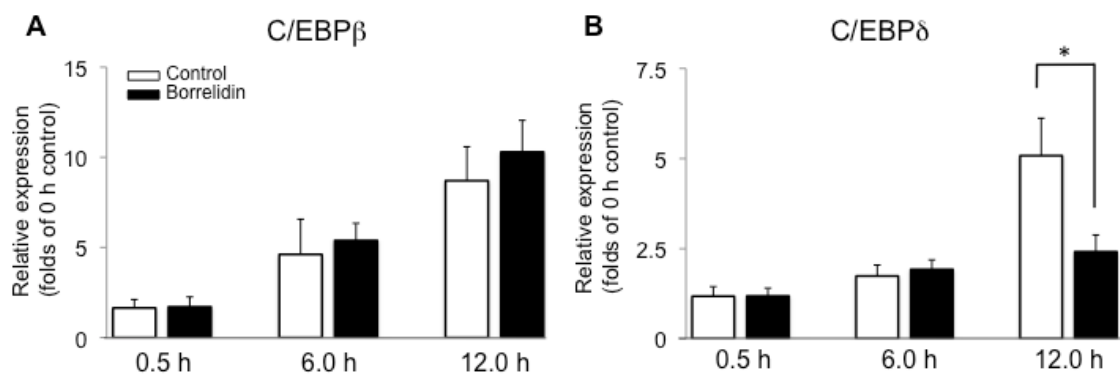


Fig. 26 Borrelidin (1.0 μ M) 処理細胞の (A) C/EBP β 、(B) C/EBP δ の mRNA 発現量、* $p < 0.05$

1.4. Borrelidin のマスターレギュレーター調節因子への影響 (2)

C/EBP δ の実験結果から、borrelidin はマスターレギュレーターの他の調節因

子への影響が示唆されたため、分化の初期段階でマスターレギュレーターを調節すると報告されている Tob2、GATA family、KLF family について mRNA 発現を確認した。mRNA の抽出は、より短時間での影響をみるため、それぞれ分化誘導から 0.5、2.0、6.0、12.0 時間後に行った。半定量 PCR による予試験で、GATA family の一部、及び KLF family の mRNA 発現が分化誘導後 6.0、12.0 時間で borrelidin により影響を受けていることが観察されたため、リアルタイム PCR を用いてそれらの発現量を詳細に解析した。まず始めに、分化のネガティブレギュレーターに対する影響について述べる。GATA-2 では、borrelidin による影響はみられなかった (Fig. 27A)。一方、GATA-3 は borrelidin 処理により、分化誘導から 6.0、12.0 時間後において発現量が有意に上昇した (Fig. 27B)。KLF2、3、7 は、コントロールでは分化誘導後にその発現量は減少する傾向があるが、borrelidin 処理により、分化誘導後 6.0、12.0 時間で KLF3 と KLF7 の発現が有意に上昇した (Fig. 28B、C)。次に、分化のポジティブレギュレーターである KLF4、5、6、15 への影響について述べる。KLF5 では、borrelidin

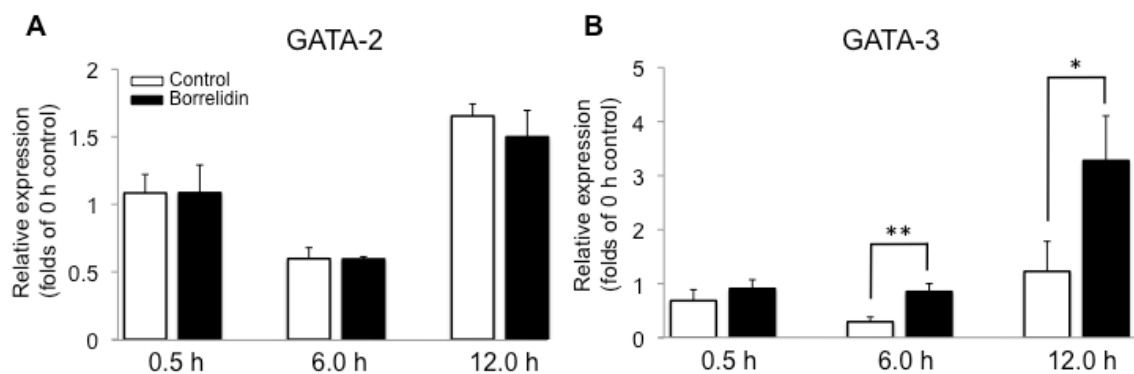


Fig. 27 Borrelidin (1.0 μ M) 処理細胞の (A) GATA-2、(B) GATA-3 の mRNA 発現量、* $p < 0.05$

の影響はなかったが (Fig. 28E)、KLF4、15 では、分化誘導から 6.0、12.0 時間後で (Fig. 28D、G)、KLF6 では 12.0 時間後でその発現に有意な上昇が認められた (Fig. 28F)。

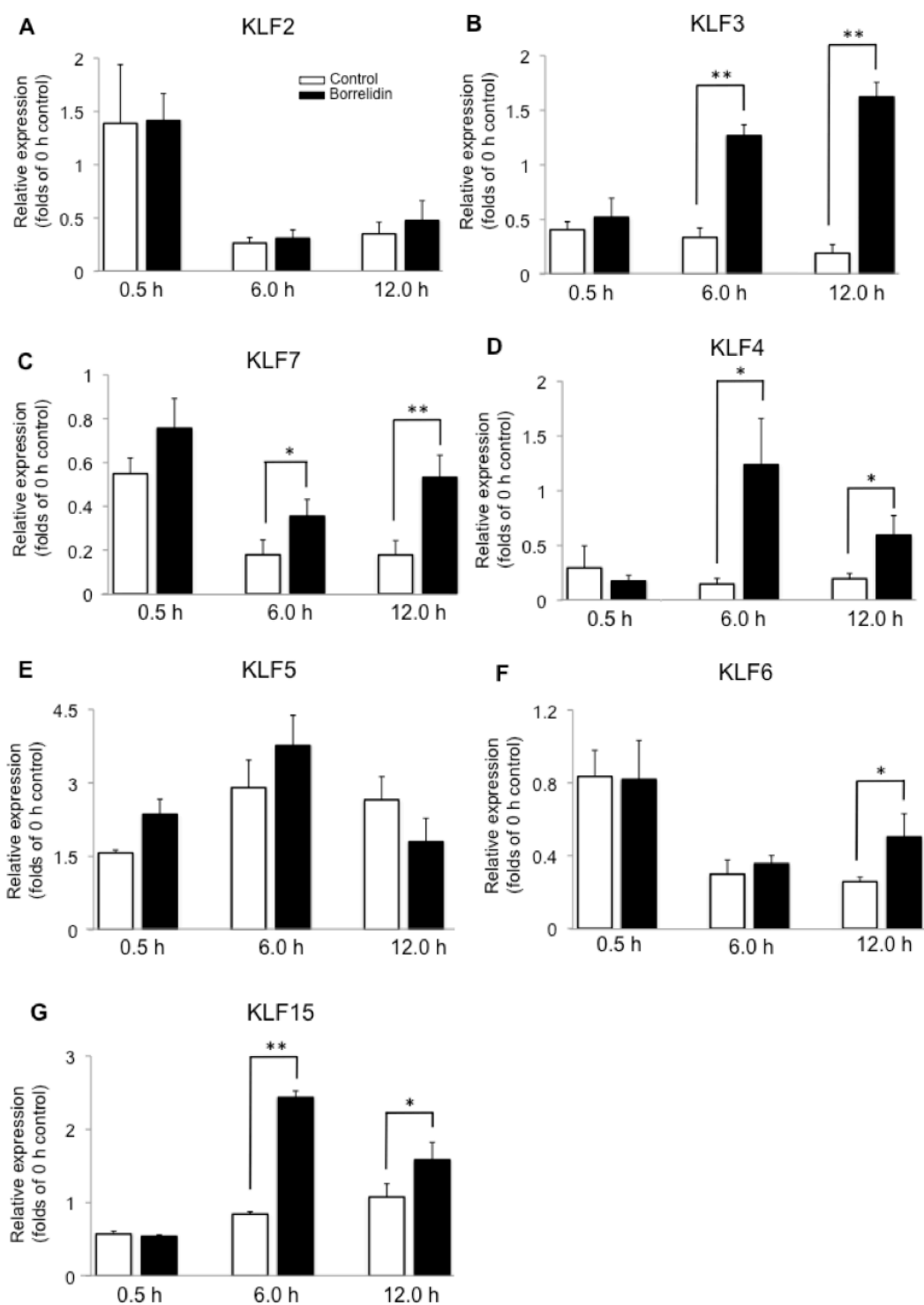


Fig. 28 Borrelidin (1.0 μ M) 処理細胞の各 KLF の mRNA 発現量

ネガティブレギュレーター: (A) KLF2、(B) KLF3、(C) KLF7、ポジティブレギュレーター: (D) KLF4、(E) KLF5、(F) KLF6、(G) KLF15、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

1.5. Borrelidin の PPAR γ 、及び脂肪蓄積阻害作用に対する siRNA の影響

Borrelidin 処理により発現が上昇したネガティブレギュレーター GATA-3、KLF3、KLF7 のいずれが、borrelidin の分化抑制作用に関与しているのかを検討するため siRNA 導入実験を行った。それぞれ GATA-3、KLF3、KLF7 siRNA で 3 日間処理した後、各 mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した結果を Fig. 29 に示した。KLF3 と KLF7 の両 siRNA を一緒に導入した細胞では、コントロールに比べ、その発現がほとんど抑制されていることが確認できた。

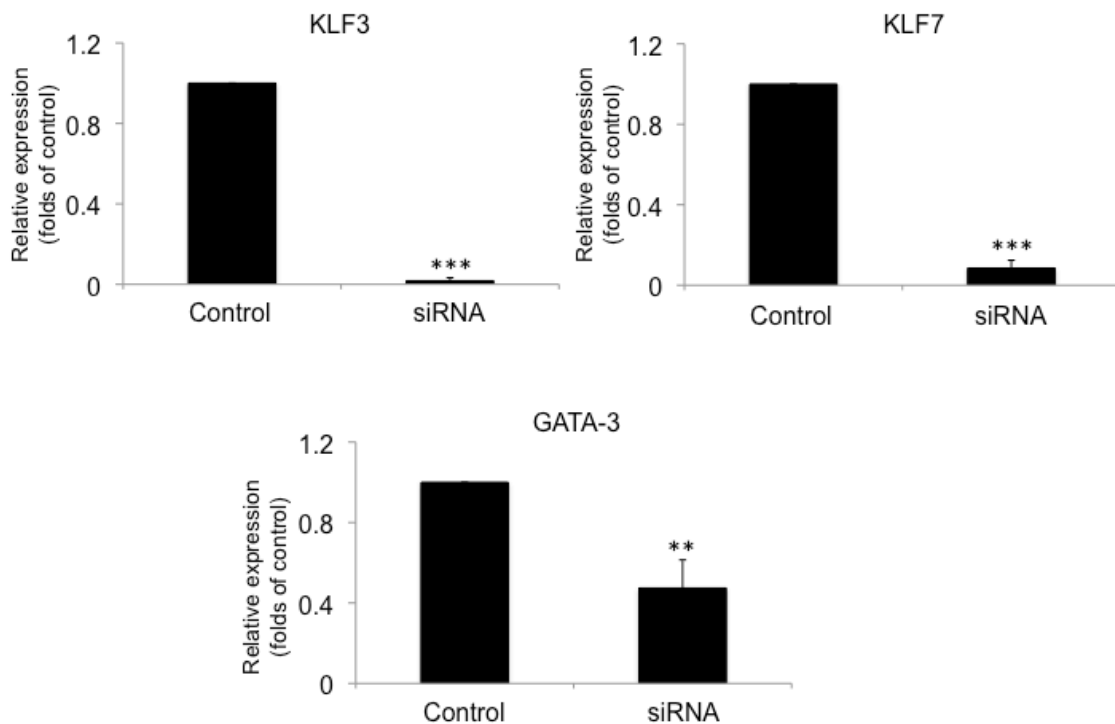


Fig. 29 KLF3、KLF7、GATA-3 siRNA 導入後 3 日目の KLF3、KLF7、GATA-3 mRNA 発現量、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

一方、GATA-3 siRNA を導入した細胞では、その発現の抑制率は約 60% 程度であった。次に、各 siRNA を導入した細胞を分化誘導し、3 日間培養したときの PPAR γ の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した。まず始めに、各 siRNA のみを導入した細胞の結果について述べる。GATA-3 siRNA を導入した細胞では、コントロールに比べ発現量が有意 (group c) に上昇した (Fig. 30A、GATA-3 siRNA +、Borrelidin -)。一方、KLF3 と KLF7 siRNA では、KLF3、7 の mRNA 発現はほとんど抑制されているにもかかわらず、コントロール siRNA と同等 (group b) の PPAR γ 発現量であった (Fig. 30A、KLF3 and KLF7 siRNA +、Borrelidin -)。GATA-3 siRNA による GATA-3 mRNA 発現の抑制率は約 60% 程度であったが、PPAR γ の発現量は KLF3、7 siRNA を導入した細胞よりも有意に上昇した。つまり、ゲートキーパーとしての影響力は、KLF3、7 よりも GATA-3 の方が強いと考えられた。次に、各 siRNA を導入した細胞を、borrelidin で処理した結果について述べる。コントロール siRNA を導入した細胞 (group a) では、borrelidin により PPAR γ の発現は有意に抑制された (Fig. 30A、control siRNA +、borrelidin +)。これは、siRNA の導入が borrelidin の分化抑制作用に影響しないことを示している。KLF3 と KLF7 siRNA を導入した細胞でも、PPAR γ の発現 (group a) は、コントロール siRNA のみを導入した細胞と比べ、有意に抑制された (Fig. 30A、KLF3 and KLF7 siRNA +、borrelidin +)。それに対し、GATA-3 siRNA を導入した細胞では、PPAR γ の発現量はコントロール siRNA のみを導入した細胞と有意差 (group b) は認められなかった (Fig. 30A、GATA-3 siRNA +、borrelidin +)。つまり、GATA-3 siRNA によって、borrelidin の PPAR γ 抑制作用がほぼ完全に阻害されたことか

ら、borrelidin の PPAR γ 抑制作用は、GATA-3 を介していることが明らかとなった。さらに、GATA-3 siRNA を導入した細胞を分化誘導し、borrelidin で処理したときの脂肪蓄積量を定量した。コントロール siRNA を導入した細胞 (group a) では、borrelidin で有意に脂肪の蓄積が阻害された (Fig. 30B、control siRNA +、Borrelidin +)。一方、GATA-3 siRNA を導入した細胞 (group b) では、borrelidin による脂肪蓄積阻害効果はわずかではあるが、有意に阻害された (Fig. 30B、GATA-3 siRNA +、borrelidin +)。この結果からも、borrelidin の分化抑制作用は GATA-3 を介していることが明らかとなった。

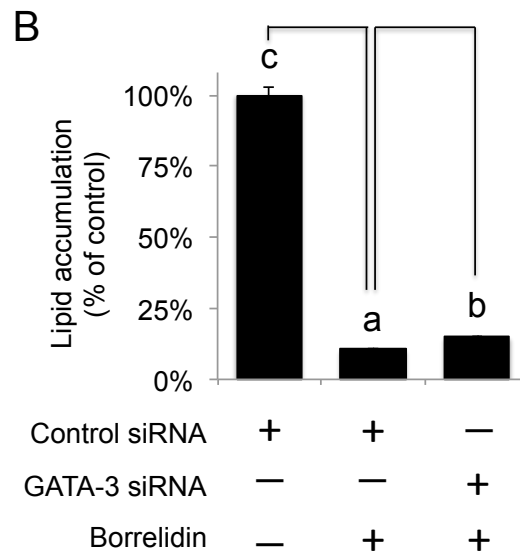
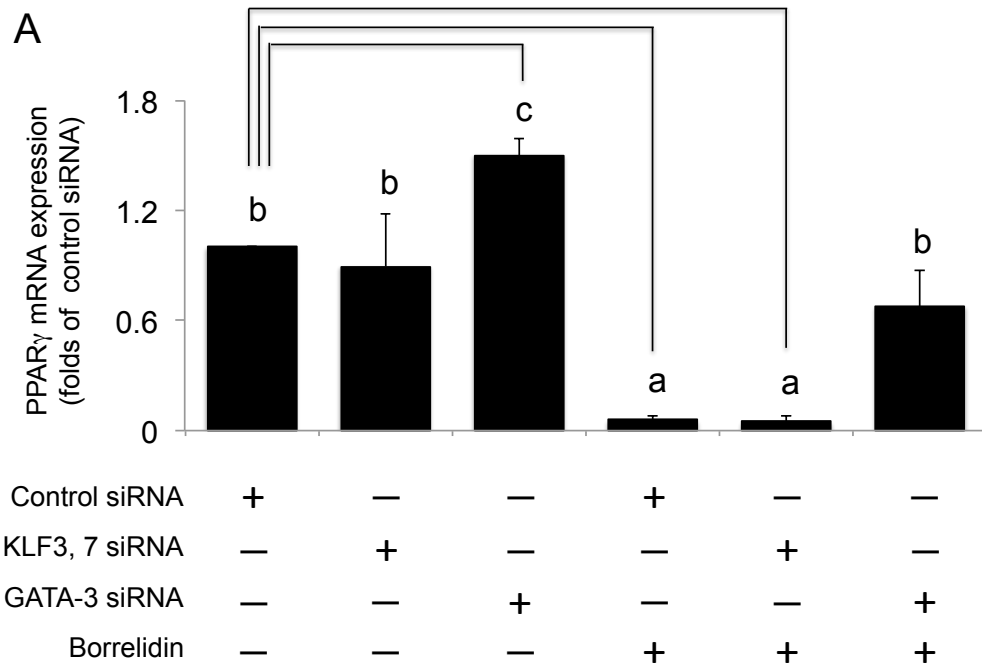


Fig. 30 各種 siRNA による PPAR γ 発現量と脂肪蓄積量に対する影響
 (A) 各種 siRNA の導入後、borrelidin (1.0 μ M) で処理した細胞における分化誘導後 3 日目の PPAR γ 発現量、(B) 各種 siRNA の導入後、borrelidin (1.0 μ M) で処理した細胞における分化誘導後 7 日目の脂肪蓄積量 (Oil Red O 染色による算出)。ANOVA により a、b、c の 3 つの異なったグループに分けられた (Tukey's test、 $p < 0.05$)。

第 2 項 Cineromycin B の脂肪蓄積阻害活性の作用機序

2.1. 脂肪細胞に特有の遺伝子発現への影響

Cineromycin B も borrelidin と同様に脂肪蓄積を阻害するので、分化、あるいは分化後の脂質生成過程を阻害していると考えられた。そこで、まず FABP4、LPL、HSD11 β 1、GLUT4 の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、cineromycin B を添加した細胞ではこれらの発現がほとんど認められなかった (Fig. 31)。したがって、cineromycin B は分化自体を阻害していると考えられた。

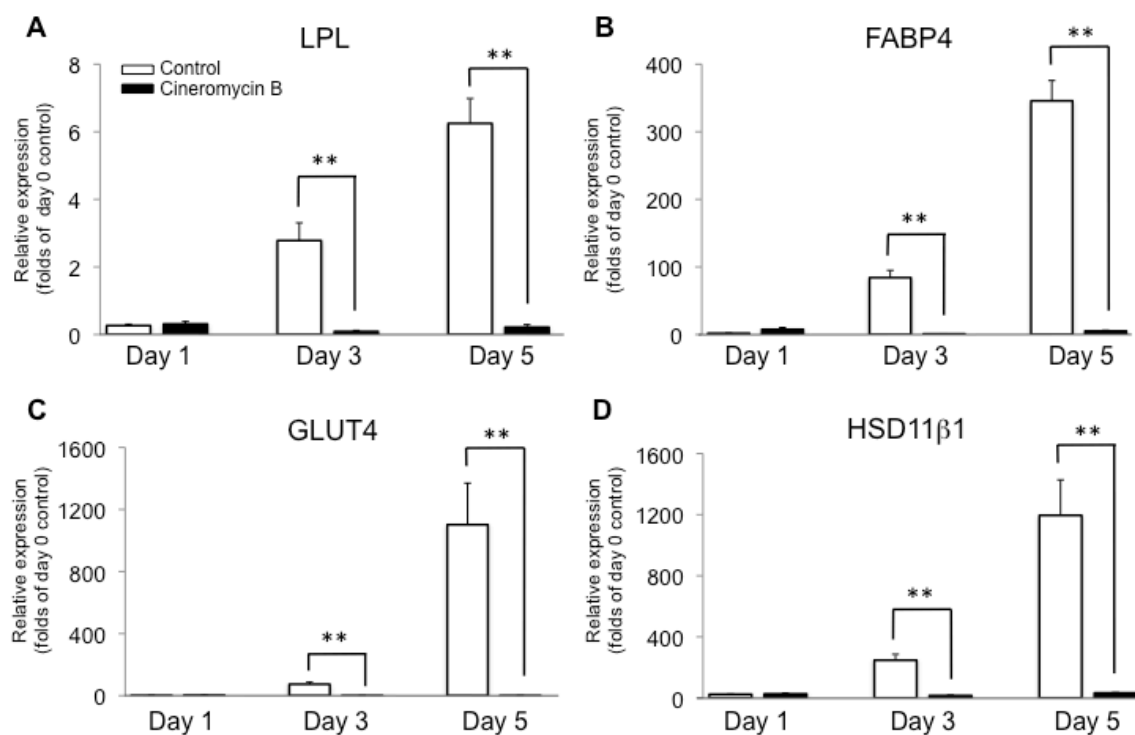


Fig. 31 Cineromycin B (50 μ g/mL) 処理細胞の (A) LPL、(B) FABP4、(C) GLUT4、(D) HSD11 β 1 の mRNA 発現量、** $p < 0.01$

2.2. 脂肪細胞分化のマスターレギュレーターへの影響

Cineromycin B は 3T3-L1 細胞の分化を阻害することが示唆されたので、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、PPAR γ 、C/EBP α ともに cineromycin B で処理した細胞では発現が減少していた (Fig. 32A、B)。また、ウェスタンブロットによる PPAR γ のタンパク発現を確認した結果、分化誘導後 7 日目においてもその発現は認められなかった (Fig. 32C、lane 3)。したがって、cineromycin B は分化自体を阻害することが明らかになった。

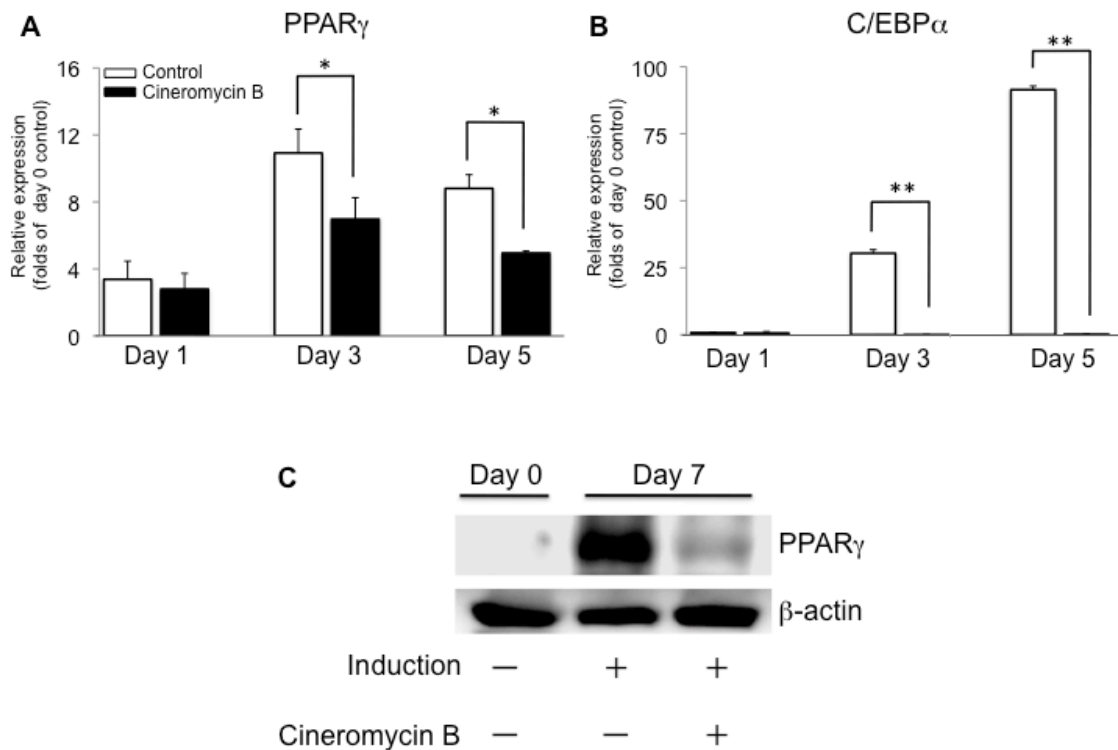


Fig. 32 Cineromycin B (50 μ g/mL) 処理細胞の脂肪細胞分化マスターレギュレーターの発現量。(A) PPAR γ mRNA 発現量、(B) C/EBP α mRNA 発現量、(C) PPAR γ タンパク発現、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

2.3. Cineromycin B のマスターレギュレーター調節因子への影響 (1)

Cineromycin B もまた、borrelidin と同様、分化自体を阻害することが示された。そこで、分化の初期段階における C/EBP β 、C/EBP δ の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、cineromycin B で処理した細胞では C/EBP β や C/EBP δ の mRNA 発現にコントロールとの差は認められなかった (Fig. 33A、B)。なお、分化誘導から 6 時間後以降も差は見られなかった。

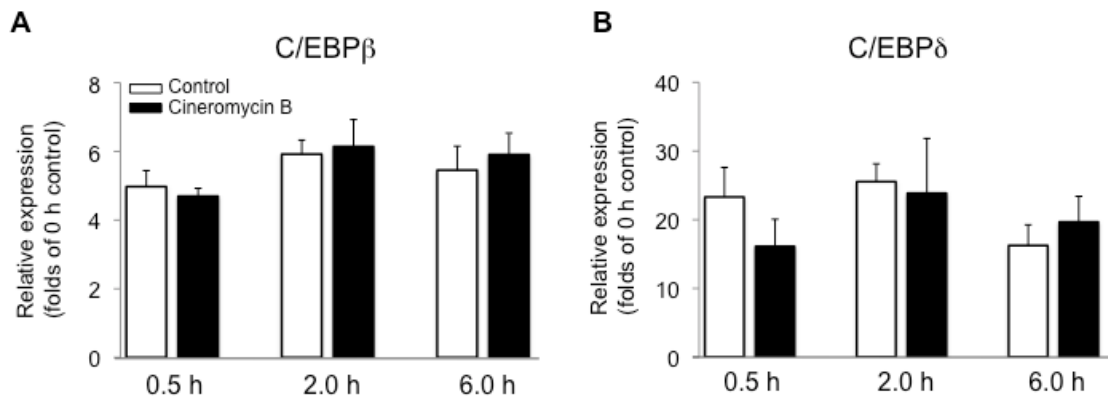


Fig. 33 Cineromycin B (50 μ g/mL) 処理細胞の (A) C/EBP β 、(B) C/EBP δ の mRNA 発現量

2.4. Cineromycin B のマスターレギュレーター調節因子への影響 (2)

予試験として、Tob2、GATA family、KLF family についてその mRNA 発現を半定量 PCR で確認した。mRNA の抽出は、それぞれ分化誘導から 0.5、2.0、6.0、12.0 時間後に行った。その結果、GATA family、及び KLF family の mRNA 発現が分化誘導後から 6.0 時間までの間で cineromycin B によって影響を受け

ていることが観察されたため、リアルタイム PCR を用いてそれらの発現量を詳細に解析した。まず始めに、分化のネガティブレギュレーターに対する影響について述べる。Cineromycin B 処理により、GATA-2 では分化誘導から 2.0、6.0 時間後にその発現量が有意に上昇したが、GATA-3 では有意差は認められなかった (Fig. 34A、B)。一方、KLF family では興味深い結果が得られた。KLF2、3 は、分化誘導から 0.5 時間後というかなり早い段階で有意な上昇が認められ (Fig. 35A、B)、KLF7 では分化誘導から 2.0、6.0 時間後にその発現量が有意に上昇した (Fig. 35C)。次に、分化のポジティブレギュレーターの結果について述べる。Cineromycin B 処理により、KLF4、5、15 では分化誘導から 2.0、6.0 時間後にその発現量はコントロールに比べ減少し (Fig. 35D、E、G)、KLF6 では 6.0 時間後にその発現量は減少した (Fig. 35F)。

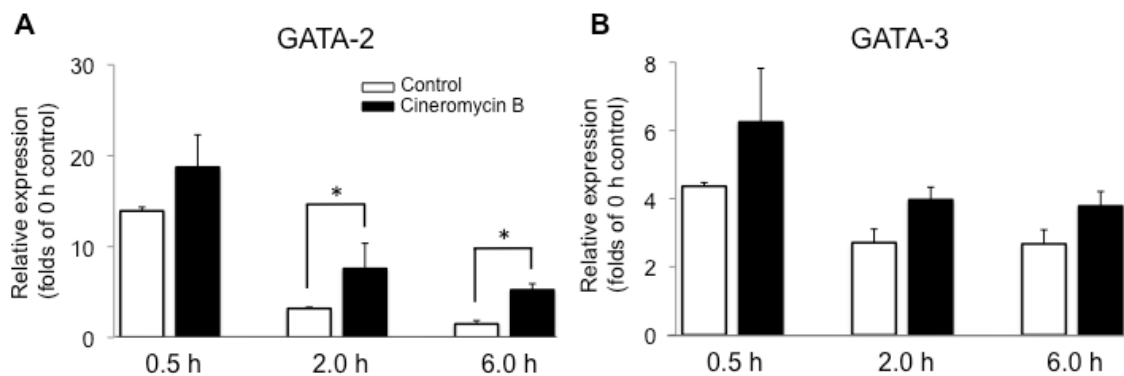


Fig. 34 Cineromycin B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理細胞の (A) GATA-2、(B) GATA-3 の mRNA 発現量、* $p < 0.05$

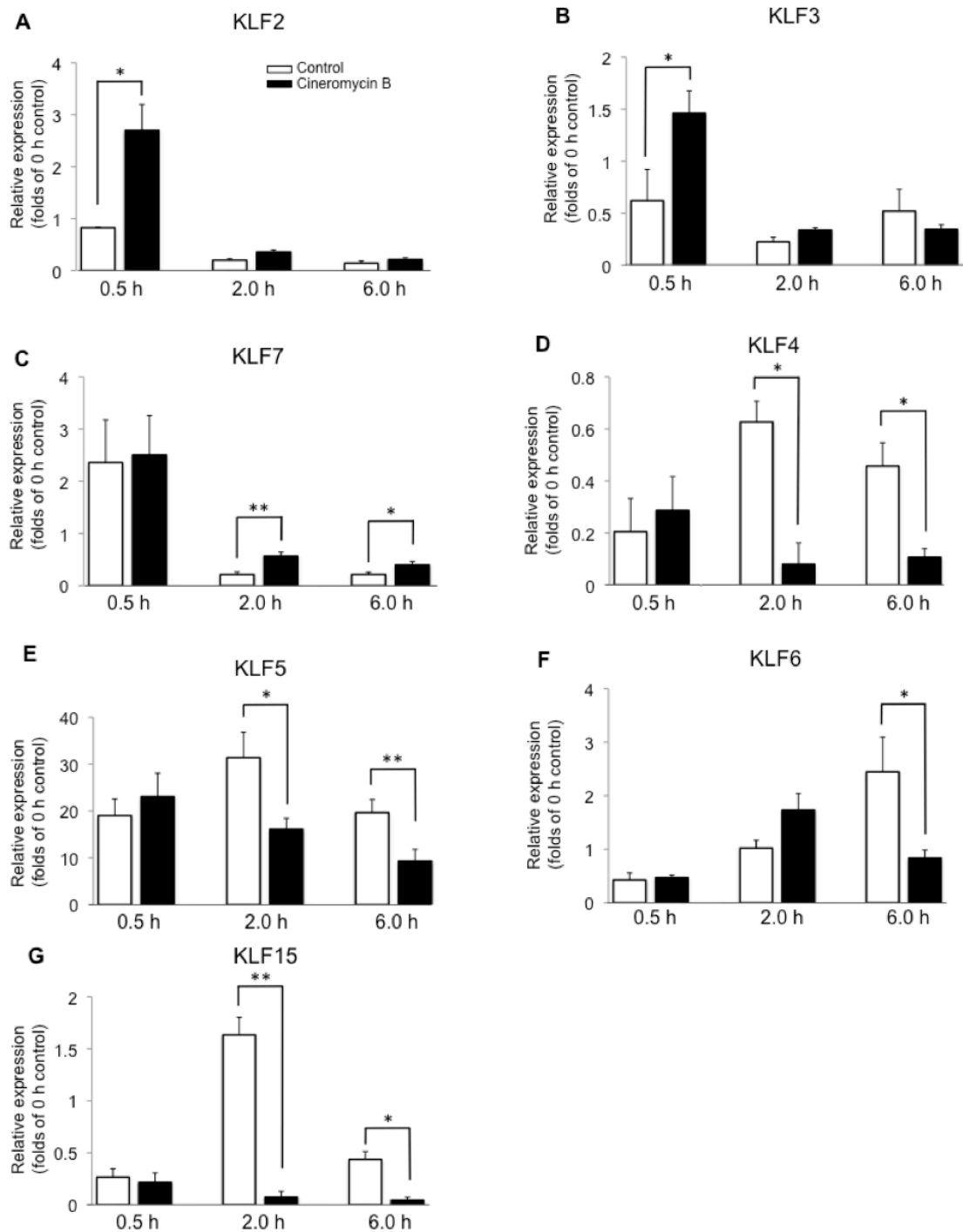


Fig. 35 Cineromycin B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理細胞の各 KLF の発現量
 ネガティブレギュレーター: (A) KLF2、(B) KLF3、(C) KLF7、ポジティブレギュレーター: (D) KLF4、(E) KLF5、(F) KLF6、(G) KLF15、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

2.5. Cineromycin B の PPAR γ 、及び脂肪蓄積阻害作用に対する siRNA の影響

今回検討した中で最も早い時間で動きがあった KLF2、3 の mRNA 発現上昇が cineromycin B の分化阻害作用の原因と考え、siRNA 導入実験を行った。KLF2、3 の siRNA を一緒に導入した後の KLF2、3 の mRNA 発現量の変化を Fig. 36 に示した。KLF2、3 の siRNA を一緒に導入 (以降、KLF2+3 siRNA と示す) した細胞では、コントロールに比べ KLF2 mRNA の発現量は約 50% 程度、KLF3 mRNA の発現はほぼ完全に抑制された。次に、各 siRNA を導入した細胞を分化誘導し、3 日間培養したときの PPAR γ mRNA の発現量をリアルタイム PCR で解析した。KLF2+3 siRNA を導入した細胞では、コントロール siRNA のみを導入した細胞と有意差 (group a) はなかった (Fig. 37A、KLF2、3 siRNA +、cineromycin B -)。これは、KLF2、3 siRNA の導入が、分化に影響ないことを示している。次に、各 siRNA を導入した細胞を cineromycin B で

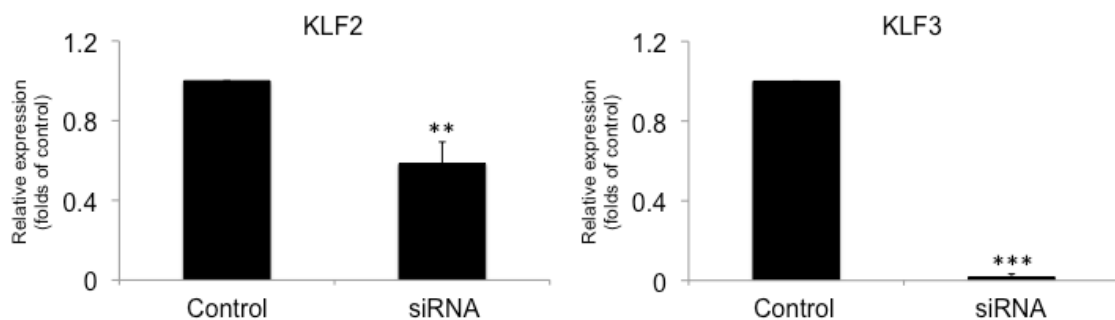


Fig. 36 KLF2、KLF3 siRNA 導入後 3 日目の KLF2、KLF3 mRNA 発現量、
** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

処理したときの PPAR γ mRNAの発現量について述べる。コントロール siRNA を導入した細胞を、cineromycin B で処理すると、PPAR γ mRNA の発現量は有意に (group b) 抑制された (Fig. 37A、control siRNA +、cineromycin B +)。これは、siRNA の導入が、cineromycin B の分化抑制作用に影響しないことを示している。KLF2+3 siRNA を導入した細胞を、cineromycin B で処理したときの PPAR γ mRNA の発現量は、cineromycin B 処理なしと有意差 (group a) はなかった (Fig. 37A、KLF2 and KLF3 siRNA +、cineromycin B +)。また、KLF2 あるいは KLF3 siRNA をそれぞれ単独で導入した際も同様の結果が得られた (Fig. 37A、KLF2 or KLF3 siRNA +、cineromycin B +)。したがって、cineromycin B による PPAR γ 発現抑制効果は、本化合物による KLF2、3 の mRNA 発現促進を介したものと考えられる。次に、KLF2+3 siRNA を導入した細胞の脂肪蓄積に対する影響について検討した。コントロール siRNA を導入した細胞では、cineromycin B は有意 (group a) に脂肪の蓄積を阻害したが (Fig. 37B、control siRNA +、cineromycin B +)、この脂肪蓄積阻害効果は、KLF2+3 siRNA を導入した細胞では、完全ではないものの、有意 (group b) に減弱された (Fig. 37B、KLF2、3 siRNA +、cineromycin B +)。これらの結果より、cineromycin B は主に KLF2、KLF3 を介して、3T3-L1 細胞の分化を阻害することが明らかになった。

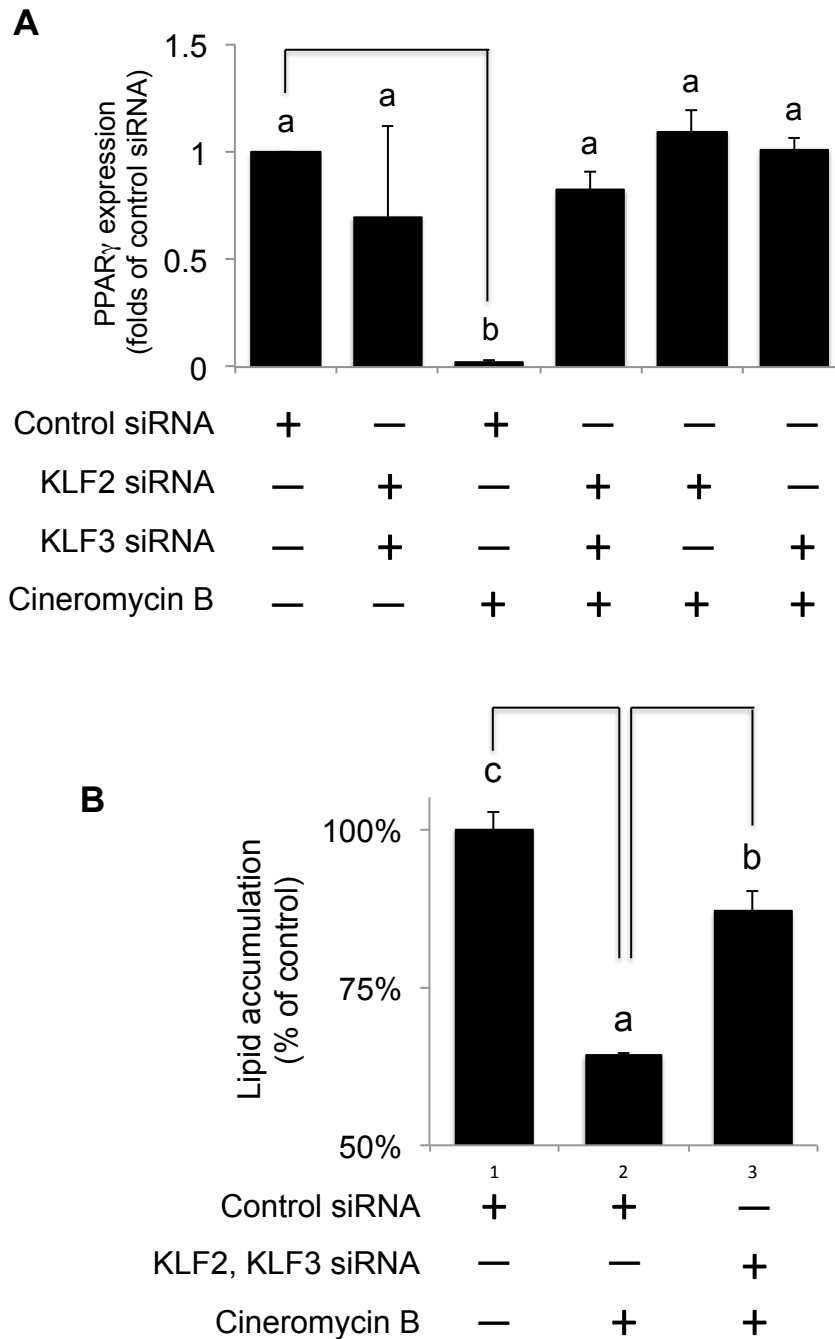


Fig. 37 KLF siRNA による PPAR γ 発現量と脂肪蓄積量に対する影響
 (A) 各種 siRNA の導入後、cineromycin B (50 μ g/mL) で処理した細胞における分化誘導後 3 日目の PPAR γ 発現量、(B) 各種 siRNA の導入後、cineromycin B (50 μ g/mL) で処理した細胞における分化誘導後 7 日目の脂肪蓄積量 (Oil Red O 染色による算出)。ANOVA により a、b、c の 3 つの異なったグループに分けられた (Tukey's test、 $p < 0.05$)。

第4節 考察

Borrelidin は、脂肪蓄積阻害作用を示したため、脂肪細胞への分化、あるいは分化後の脂質生成過程を阻害していると考えられた。そこで、脂肪細胞のマーカー遺伝子である FABP4⁴⁷⁾、LPL⁴⁸⁾、HSD11 β 1⁴⁹⁾、GLUT4⁵⁰⁾ の発現をリアルタイム PCR で解析した結果、borrelidin を添加した細胞ではこれらの発現がほとんど認められなかった。Borrelidin は 3T3-L1 細胞の分化を阻害していることが示唆されたため、分化のマスターレギュレーターである PPAR γ 、C/EBP α の発現を解析した。Borrelidin で処理した細胞では、PPAR γ 、C/EBP α の mRNA 発現は day 1 でコントロールよりも上昇したが、day 3、day 5 では抑制されていた。このことから、borrelidin は 3T3-L1 細胞の分化を阻害することが明らかになった。なお、day 1 における PPAR γ 、C/EBP α の mRNA 発現上昇は後に考察する。Borrelidin の作用機序を検討するため、マスターレギュレーターの発現を調節する因子への影響を検討した。Fig. 38 に、borrelidin によって影響を受けた因子の変動をまとめたものを示した。Borrelidin 処理により、マスターレギュレーターの発現が抑制され、その上流に位置している C/EBP β 、C/EBP δ のうち、C/EBP δ のみ、50%程度発現量が減少していた。しかしながら、C/EBP β 、C/EBP δ のダブルノックダウンマウス由来の脂肪前駆細胞では、脂肪細胞への分化が全く認められないが、どちらか一方のノックダウンでは分化は軽度にしか障害されないという報告がある。⁸⁾ この結果を踏まえると、borrelidin の分化阻害作用には、他の調節因子が関与していることが推測された。

予試験で、GATA、KLF family の mRNA 発現が borrelidin により影響を受

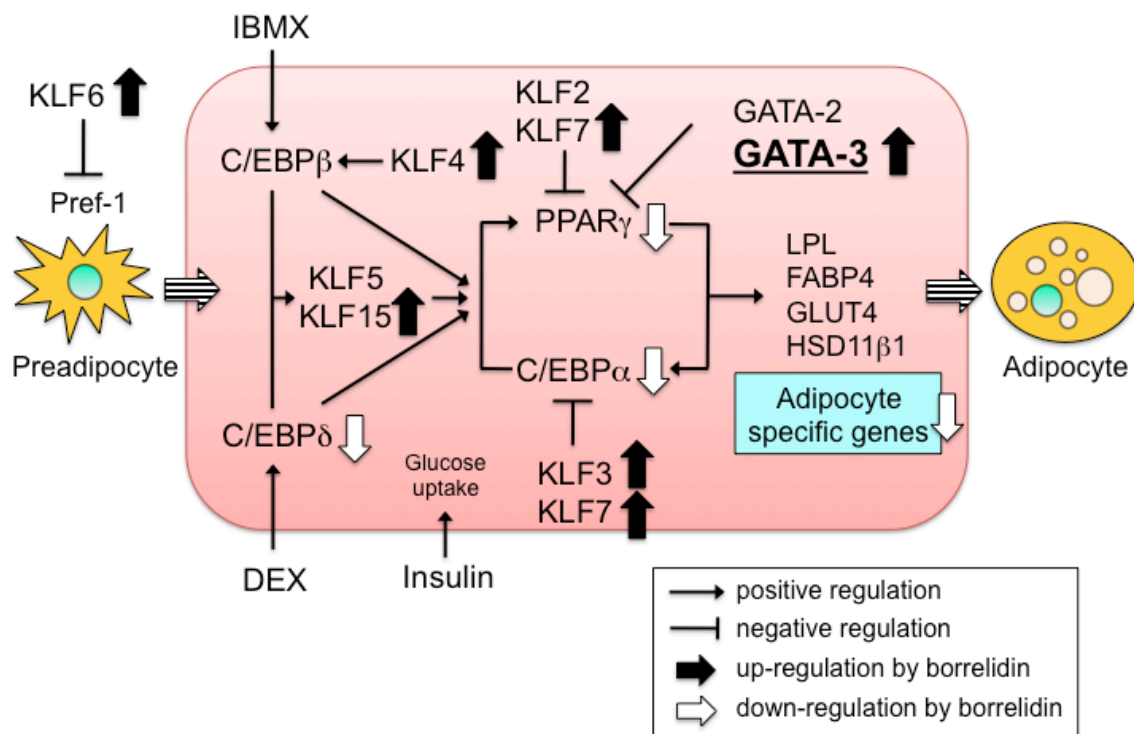


Fig. 38 3T3-L1 細胞における borrelidin により影響を受けた因子

けていることが観察されたことから、リアルタイム PCR を用いてその詳細な解析を行った。その結果、分化のポジティブレギュレーター (KLF4、KLF6、KLF15) とネガティブレギュレーター (GATA-3、KLF3、KLF7) がともに分化誘導から 6.0 時間以降で上昇していた。最終的に分化は抑制されているので、ネガティブレギュレーターがポジティブレギュレーターよりも優位に働いていることが推測された。

siRNA の導入による KLF3 と KLF7 の mRNA 発現は、ほぼ完全に抑制されたのに対し、GATA-3 では約 60% 程度の抑制率であった。KLF3、KLF7 siRNA 導入細胞の PPAR γ の mRNA 発現量は、コントロール siRNA と有意差は見られなかった。一方、GATA-3 siRNA を導入した細胞では、有意に発現が上昇して

いた。このことから、ゲートキーパーとしての役割は、KLF3 や KLF7 よりも GATA-3 の方が重要であることが示唆された。siRNA の導入実験により、今回検討したネガティブレギュレーターの中では、GATA-3 が最も borrelidin の脂肪細胞分化阻害作用に関わっていることが明らかになった。しかしながら、GATA-3 siRNA による borrelidin 処理時の PPAR γ 発現抑制効果は完全に減弱されたのに対し、脂肪蓄積阻害効果はわずかながら減弱された程度であった。つまり、borrelidin の脂肪細胞分化阻害作用は、部分的には GATA-3 が関与しているが、主要な作用は他の因子によるものと考えられた。これらの結果は、これまでに明らかになってこなかった GATA family と KLF family の関係性を解明する糸口になるかもしれない。なお、Fig. 25A、B で示した day 1 における PPAR γ と C/EBP α の発現上昇は、borrelidin によるポジティブレギュレーターの発現上昇によることが強く示唆される。このことは、ポジティブレギュレーターはネガティブレギュレーターよりも作用発現が早く、即効性がある可能性を示唆している。

GATA-3 を介する脂肪細胞分化阻害作用を示す化合物としてこれまでに、berberine や salvianolic acid B が報告されている^{45,51)}。Berberine は、生薬オウバクやオウレンに含まれるイソキノリンアルカロイドで、salvianolic acid B は生薬タンジンに含まれるポリフェノールである。Berberine と salvianolic acid B の経口投与はそれぞれ、KK-Ay マウス、高脂肪食 (HFD) マウスにおいて体重減少作用を有することが報告されている^{52,51)}。Berberine の 3T3-L1 細胞における分化阻害活性の IC₅₀ はおよそ 2.0 μ M で⁴⁵⁾、salvianolic acid B の IC₅₀ は 100 μ M 以上である⁵¹⁾。それに対し、borrelidin の IC₅₀ は 0.19 μ M であり、

脂肪細胞分化阻害作用が berberine や salvianolic acid B よりも非常に強い。したがって、borrelidin は berberine や salvianolic acid B よりも抗肥満薬として有用なシード化合物と考えられる。Borrelidin の作用機序の詳細を解明するには、さらなる検討が必要である。

Cineromycin B もまた、borrelidin と同様に脂肪細胞への分化を阻害していると考えられた。そこで、脂肪細胞のマーカー遺伝子である FABP4、LPL、HSD11 β 1、GLUT4 の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、cineromycin B で処理した細胞ではこれらの発現がほとんど認められなかった。また、PPAR γ 、C/EBP α の mRNA 発現も抑制されていたことから、cineromycin B は脂肪細胞への分化を阻害していることが明らかになった。しかしながら、それらの上流に位置する C/EBP β 、C/EBP δ の mRNA 発現には変化がなかったため、他の調節因子の関与が示唆された。

Fig. 39 に、cineromycin B によって影響を受けた因子の変動をまとめたものを示した。予試験の結果、GATA、KLF family の mRNA 発現が cineromycin B により影響を受けていることが観察された。そこで、リアルタイム PCR を用いてその詳細な解析を行ったところ、ネガティブレギュレーターである KLF2 と KLF3 が分化誘導から 0.5 時間で最も早く cineromycin B による影響を受けた。このことから、KLF2 と KLF3 が cineromycin B の脂肪細胞分化阻害作用の主な原因因子ではないかと推測し、siRNA 導入実験を行った。その結果は、cineromycin B は主に KLF2 と KLF3 を介して脂肪細胞の分化を阻害すること

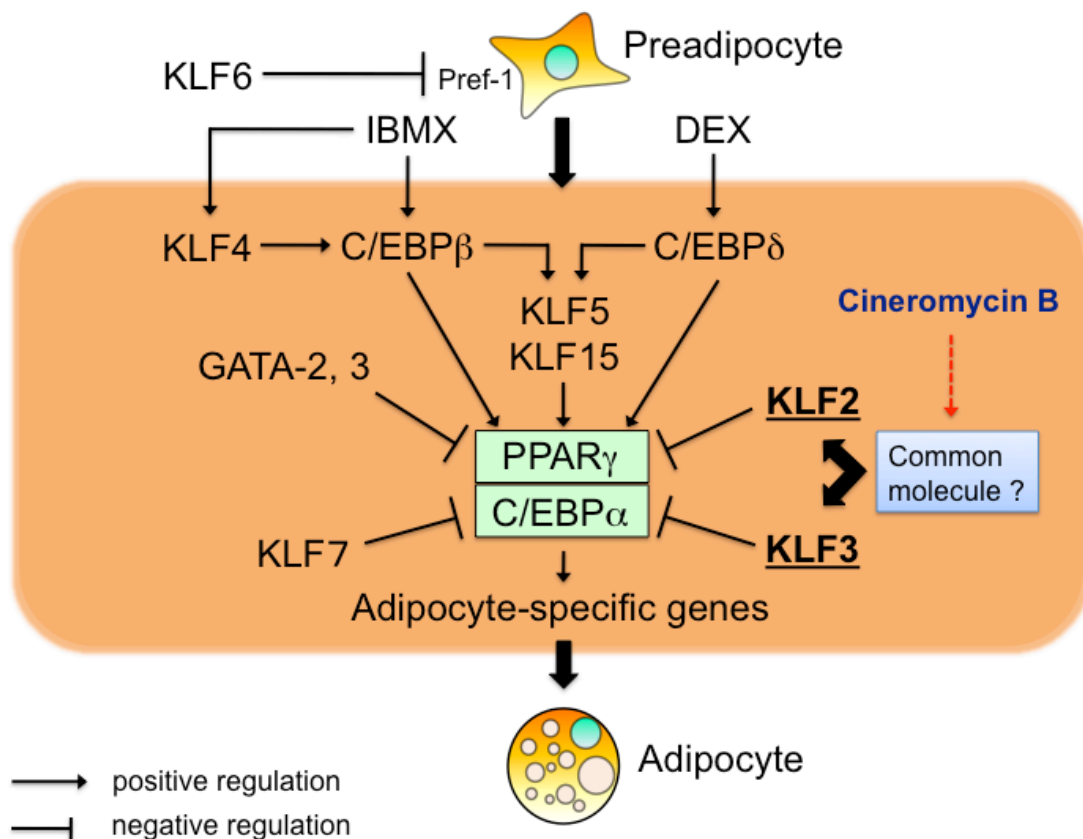


Fig. 39 3T3-L1 細胞における cineromycin B により影響を受けた因子

を強く示唆するものであった。しかしながら、cineromycin B の PPAR γ 、及び脂肪蓄積阻害効果に対する siRNA 導入実験の結果から、cineromycin B の分化阻害作用には他の因子も関わっていることが示唆された。KLF2 と KLF3 は、脂肪細胞の分化において、類似の機能を有すると報告されている⁵³⁾。今回、cineromycin B によって、同時に KLF2 と KLF3 の mRNA 発現が上昇した。この結果は、KLF2 と KLF3 の上流に cineromycin B のターゲット因子が存在する可能性を示唆していると考えられる。なお、cineromycin B 処理細胞のポジティブレギュレーター (KLF4、KLF5、KLF6、KLF15) の発現減少は、かなり早い段階で cineromycin B により分化が阻害されたため、これらの発現は上昇し

なかったのではないかと推測された。

これまでに、**KLF2** を介する脂肪細胞分化阻害作用を示す化合物として、**platycodin D** や **baicalin** が報告されている^{54,55})。Platycodin D は生薬キキョウに含まれるサポニンで、baicalin は生薬オウゴンに含まれるフラボノイドである。これらの化合物は分化誘導から 2 日目以降で **KLF2** の mRNA 発現を上昇させることにより分化を阻害することが報告されている。しかし、今回 cineromycin B による **KLF2** と **KLF3** の発現上昇は、分化誘導後 0.5 時間というかなり早い段階で観察された。**KLF2** や **KLF3** の mRNA 発現上昇がこれほど早く分化抑制効果を示すという報告は今までにない。したがって、本研究では、3T3-L1 細胞の分化過程において、**KLF2** や **KLF3** が分化の初期段階においても、ネガティブレギュレーターとして重要な役割を担っているという初めての知見である。

第4章 総括

肥満症の予防や治療の基本的な方法は、軽度であれば食事・運動療法である程度対応することは可能である。重度な肥満症患者には、食事・運動療法だけでなく、薬物治療を併用する必要がある。しかしながら、現在の肥満症に対する薬物は1種類 (*mazindol*) しかなく、依存症の懸念や、投与可能期間の上限が設けてあるなどの問題点があるため、新しい抗肥満薬の開発が望まれている。このような背景から筆者は、3T3-L1細胞を用いた脂肪細胞分化阻害物質が抗肥満作用を有することに着目し、その活性物質の探索を行った。また、これまで本アッセイ系では探索源としてほとんど活用されていなかった放線菌の二次代謝産物に注目することで、依存性などの問題がなく、これまでとは異なる阻害物質が得られるのではないかと考え、研究に着手した。

本研究では、活性物質として *borrelidin* と *cineromyin B* を放線菌培養液から単離し、構造は各種分析機器により同定した。これらの化合物は既知化合物であったが、これまでに脂肪細胞分化阻害活性に関する報告はなく、活性も強かったため、その作用メカニズムの解明を試みた。その結果、*borrelidin* の脂肪細胞分化阻害作用は、部分的には *GATA-3* が関与しているが、主な作用は他の転写因子によるものと考えられた。*Cineromycin B* では、分化誘導から0.5時間後というかなり早い段階での *KLF2*、*3* の mRNA 発現上昇が主な要因であることを明らかにした。*GATA-3* や *KLF2*、*3* は、脂肪前駆細胞に高発現しており、分化誘導とともにその発現は減少することはすでに知られているが、分化の初期段階における *GATA-3* や *KLF2*、*3* の分化抑制能は今までに知られていなか

った。今回の結果から、これらの因子が分化の初期段階でも重要な役割を果たすことが明らかになった。

本研究の結果から、3T3-L1 細胞ではゲートキーパーとしての役割は **KLF3**、7 よりも **GATA3** の方が重要であることが示唆された。したがって、**GATA 3** を標的とする分化阻害剤の探索を行えば、活性の強い化合物が得られる可能性が高いと考えられる。また、ポジティブレギュレーターの方が、ネガティブレギュレーターよりも作用発現が早いことも示唆された。この結果は、これまでに明らかになってこなかったポジティブレギュレーターとネガティブレギュレーターの間連性を解明する糸口になるかもしれない。

今後、**GATA family** と **KLF family** の間連性が解明され、**borrelidin** と **cineromycin B** が抗肥満薬のシード化合物や、脂肪細胞分化メカニズムの解明ツールとして活用されるとともに、放線菌代謝産物からさらなる脂肪細胞分化阻害物質の探索を期待したい。

• 略語

ANOVA: analysis of variance

$[\alpha]_D$: optical rotation

BLAST: basic local alignment search tool

CH₃COONa: sodium acetate

C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins

COSY : correlation spectroscopy

CDCl₃: chloroform-*d*

CHCl₃ : chloroform

DMSO: dimethylsulfoxide

DEPT: distortionless enhanced by polarization transfer

DEX: dexamethasone

DMEM : dulbecco's modified eagle medium

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

EtOH: ethanol

ESIMS : electro spray ionization mass spectrometry

EtOAc : ethyl acetate

FABP4: fatty acid binding protein 4

FBS: fetal bovine serum

GLUT4: glucose transporter 4

GATA: GATA binding protein

HMBC : heteronuclear multiple bond coherence

HPLC : high performance liquid chromatography

Hz: hertz

HRTOF-MS: high-resolution time-of-flight mass spectrometry

HMBC: heteronuclear multiple bond correlation

HMG-CoA: hydroxymethylglutaryl-CoA reductase

HSD11b1: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

¹H-¹H COSY: correlation spectroscopy

HMQC : heteronuclear multiple quantum coherence

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration

J : coupling constant

KLF: krüppel-like factors
LD₅₀: half-maximal lethal dose
LPL: lipoprotein lipase
Me: methyl
MeOH: methanol
MeCN: acetonitrile
MS: mass spectrometry
m/z: mass-to-charge ratio
1-methoxy PMS: 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate
NMR: nuclear magnetic resonance
NOESY: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
ODS: octadesylsilane
OMe: methoxy
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
PBS: phosphate buffered saline
PDA: photodiode array
PVDF: polyvinylidene difluoride
PCR: polymerase chain reaction
SDS: sodium dodecyl sulfate
siRNA: small interfering RNA
TLC: thin layer chromatography
TAE: tris acetate-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)
Tob2: transducer of ERBB2, 2
UV: ultra violet
XTT : 2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide

- ・ 選定株 16S rDNA 配列

① TK08330

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACA
TGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGG
TGAGTAACACGTGGGCAATCTGTCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTT
CGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG
GGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAG
GGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCCGTTGTGAAA
GCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGT
TCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGT
TGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGC
GGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCT
TGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGT
GTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCC
CTTGTGGTGTCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGG
AAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGC
ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGG
AGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC

GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC
TGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC
GTA

② MC10130

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACA
TGCAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG
GAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGCCTCCAAGGCATCTTGGAGGT
TGGAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGA
GGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCA
GGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAA
AGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAG
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
TATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACG
TTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG
TGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGC
CCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAG
GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTG

CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGCGAGGTG
GAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT
CGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA
AAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAG
CTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGC
CGTA

- ・ 化合物のデータ

08330-A に関する各種分析機器データ

Mass	Calc.Mass	mDa	PPM	Formula
512.2979	512.2988	-0.9	-1.8	C28 H43 N O6 Na
	512.2836	14.3	27.9	C24 H43 N O9 Na
	512.3199	-22.0	-42.9	C25 H47 N O8 Na
	512.2624	35.5	69.3	C27 H39 N O7 Na

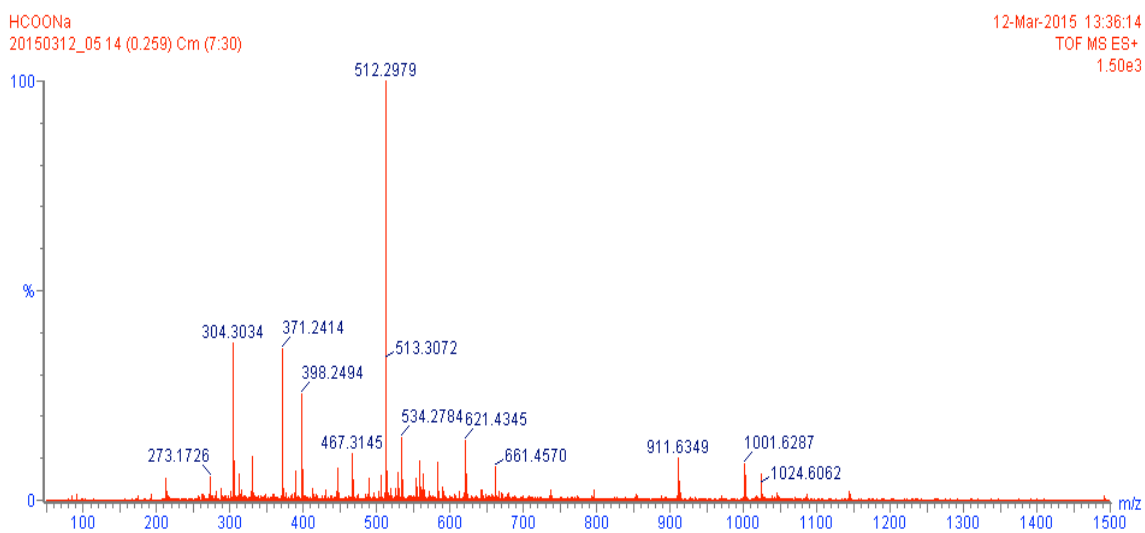


Fig. 40 08330-A (borrelidin) の HR-TOF-MS 結果による推定分子式

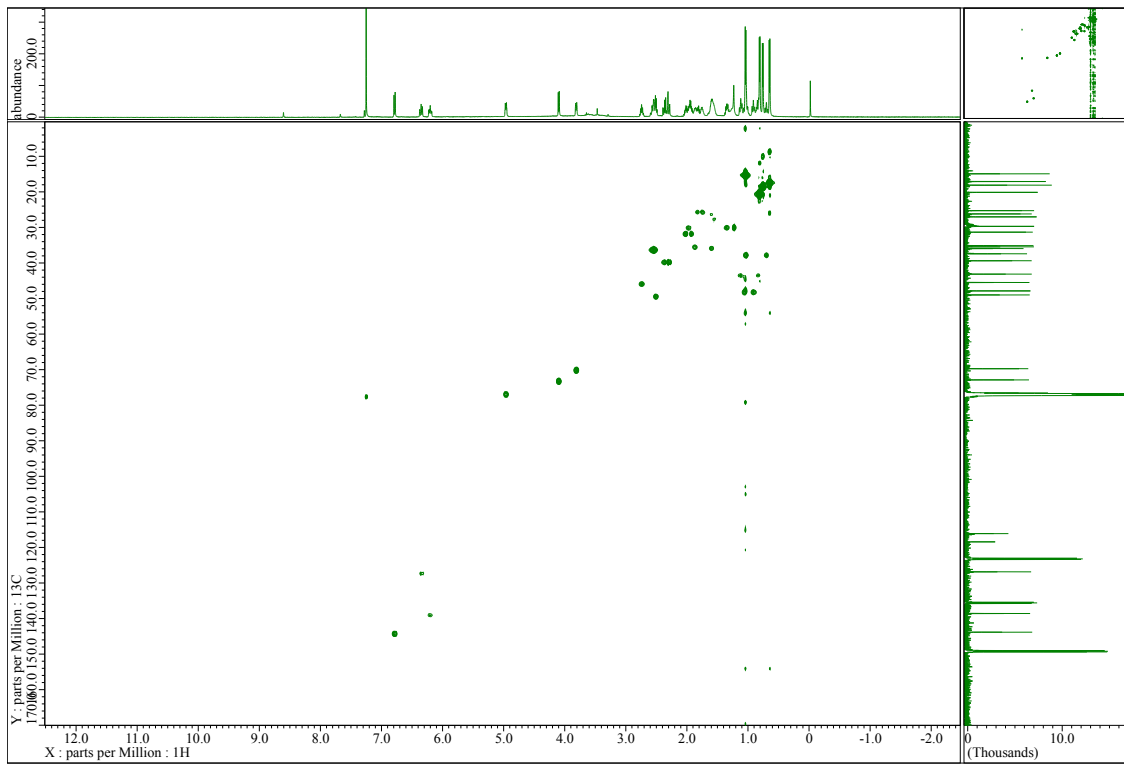


Fig. 41 08330-A の HMQC スペクトル ($\text{CDCl}_3+0.5\%$ pyridine- d_5)

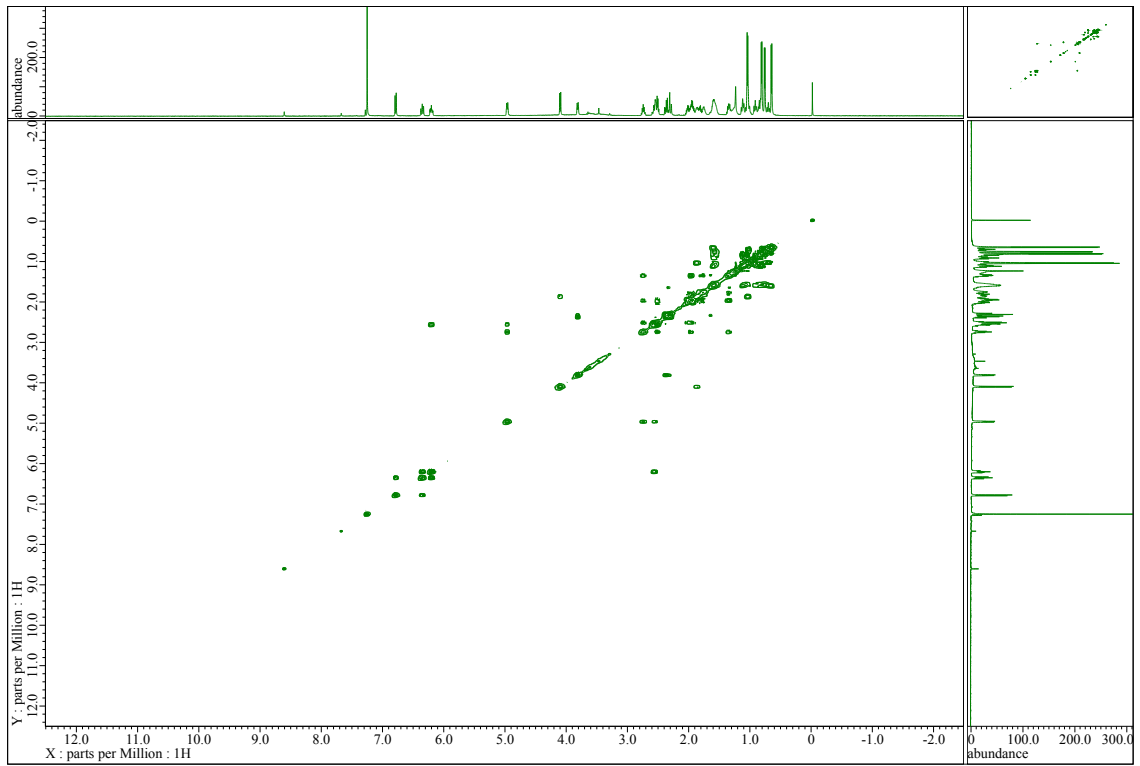


Fig. 42 08330-A の ^1H - ^1H COSY スペクトル ($\text{CDCl}_3+0.5\%$ pyridine- d_5)

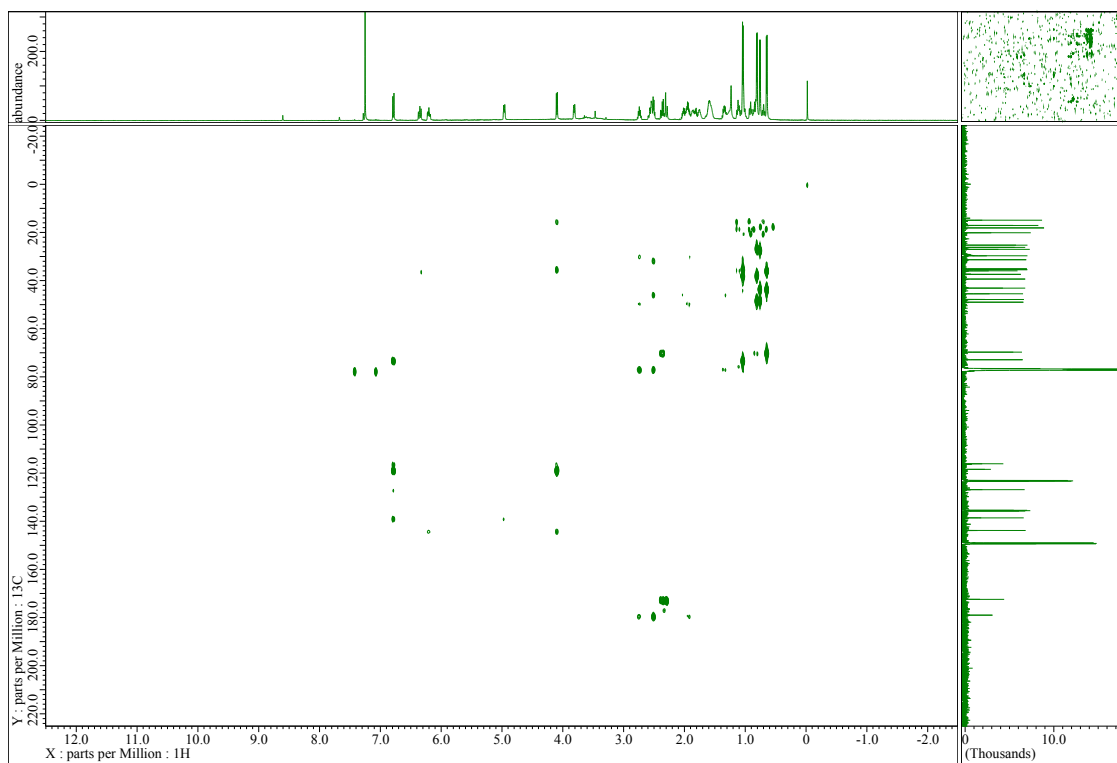


Fig. 43 08330-A の HMBC スペクトル ($\text{CDCl}_3+0.5\%$ pyridine- d_5)

10130-A に関する各種分析機器データ

Mass	Calc.Mass	mDa	PPM	Formula
317.1721	317.1729	-0.8	-2.5	C17 H26 O4 Na
	317.1576	14.5	45.7	C13 H26 O7 Na
	317.1881	-16.0	-50.4	C21 H26 O Na
	317.1517	20.4	64.3	C20 H22 O2 Na

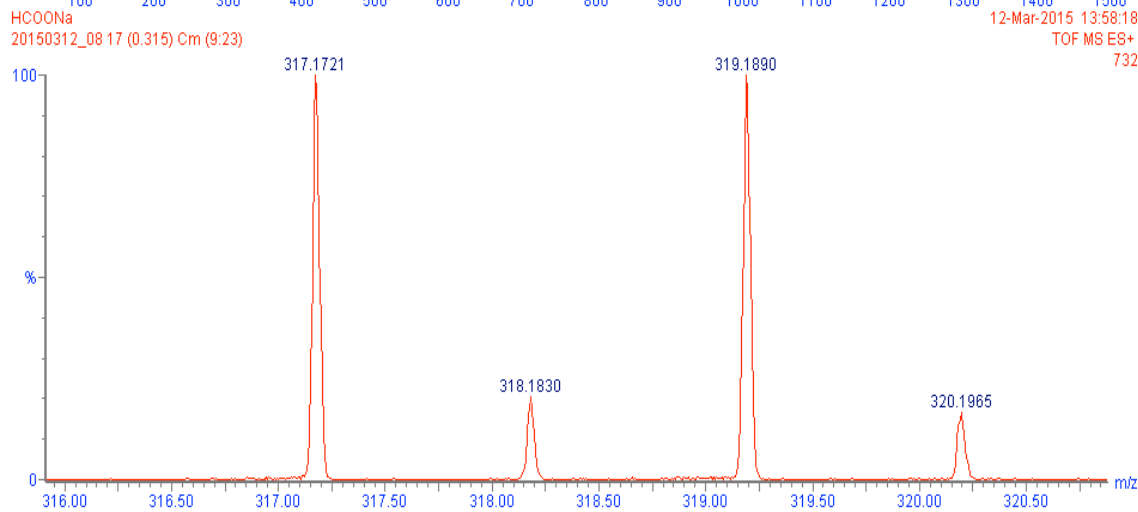
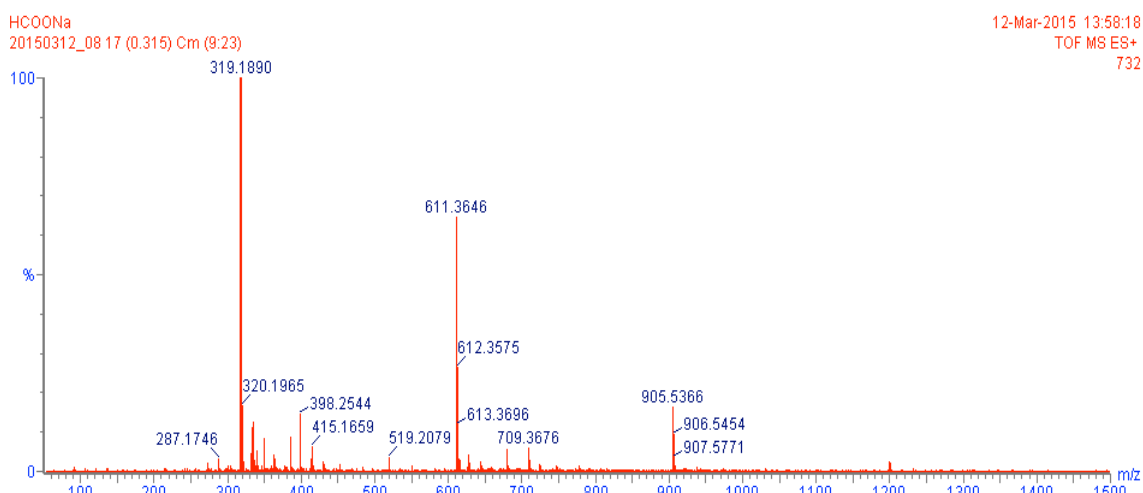


Fig. 44 10130-A の HR-TOF-MS 結果による推定分子式

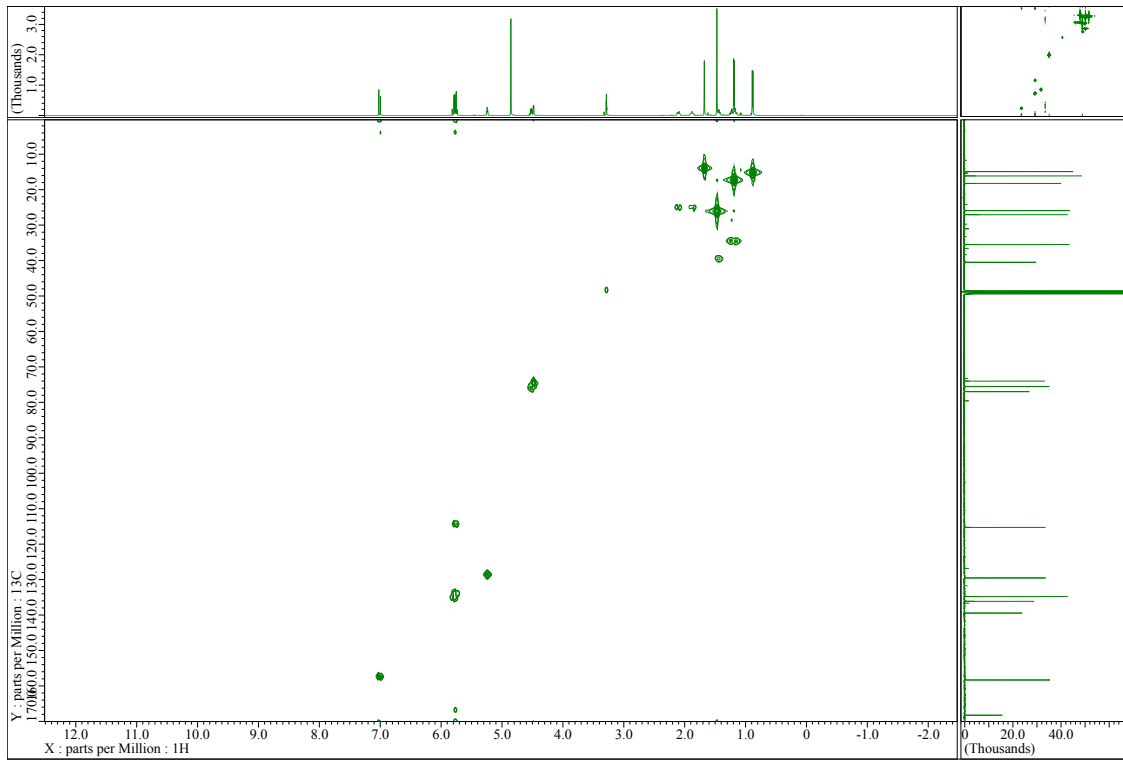


Fig. 45 10130-A の HMQC スペクトル (methanol- d_4)

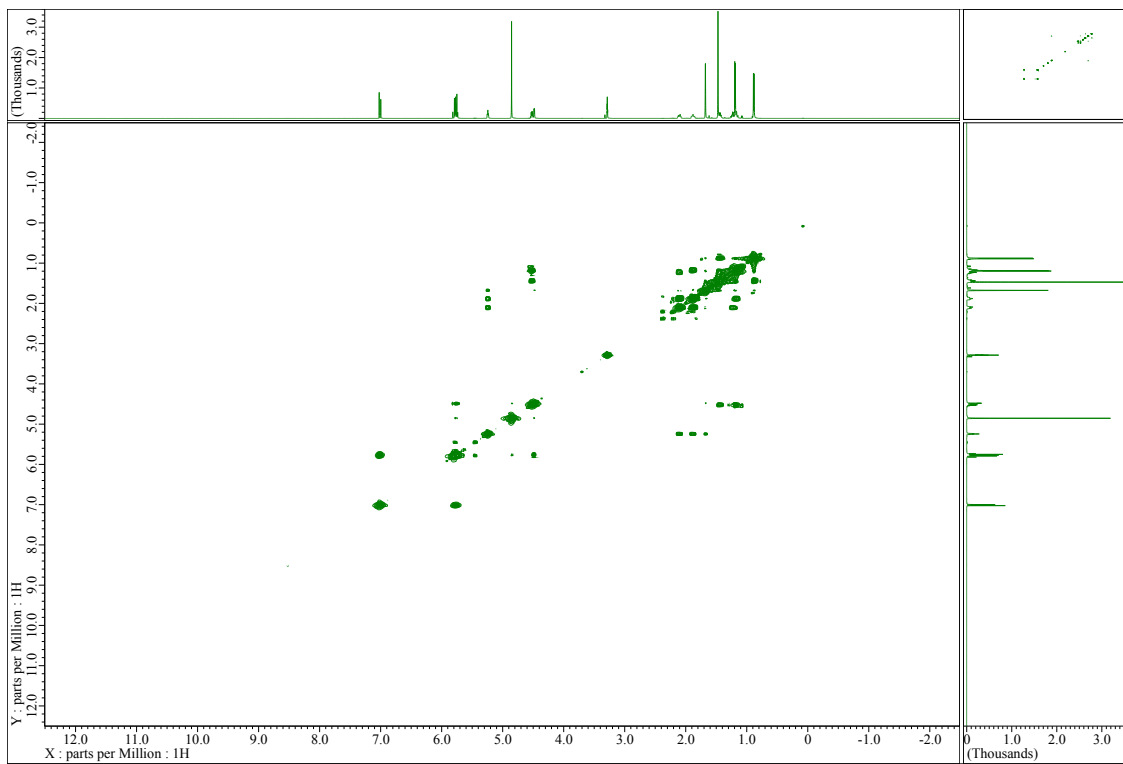


Fig. 46 10130-A の ^1H - ^1H COSY スペクトル (methanol- d_4)

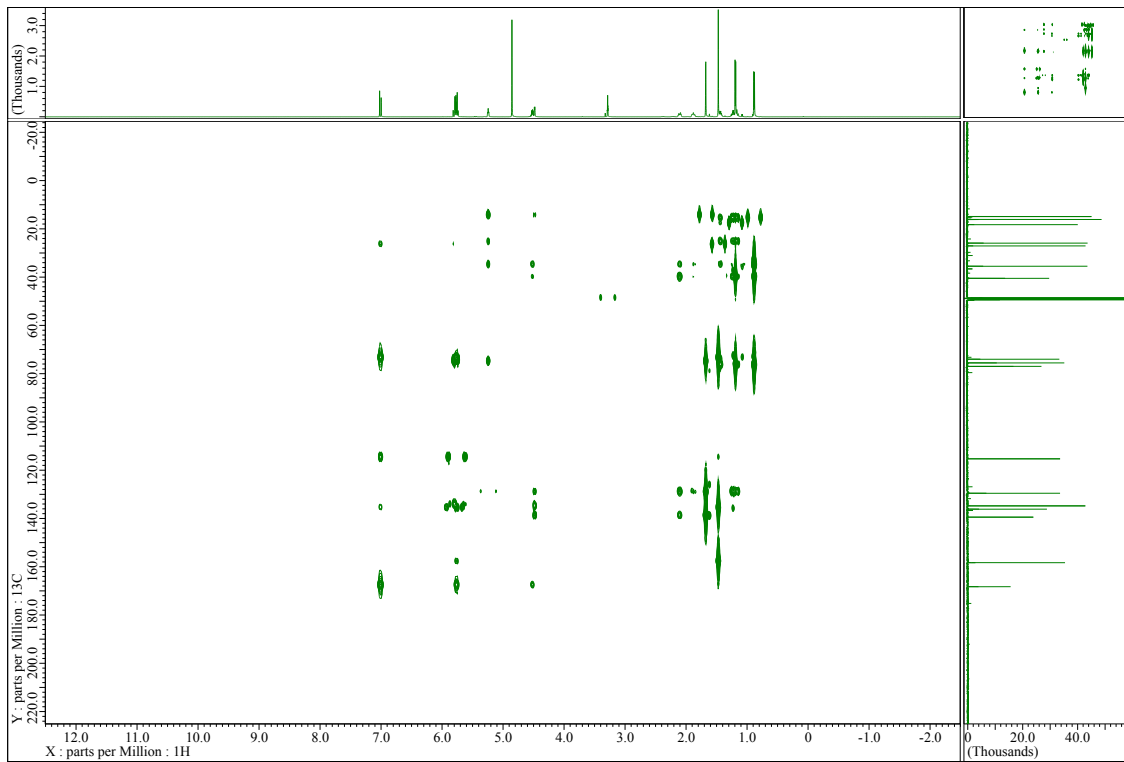


Fig. 47 10130-A の HMBC スペクトル (methanol- d_4)

・参考文献

- 1) Minami T., Oomura Y., Sugimori M., Hynes M. Direct action of mazindol on guinea-pig ventromedial hypothalamic neurons: Intracellular studies in slice preparation. *Brain Res. Bull.* **15**, 29–31 (1985).
- 2) Sikdar S. K., Oomura Y., Inokuchi A. Effects of mazindol on rat lateral hypothalamic neurons. *Brain Res. Bull.* **15**, 33–38 (1985).
- 3) Engstrom R. G., Kelly L. A., Gogerty J. H. The effects of 5-hydroxy-5 (4'-chlorophenyl)-2, 3-dihydro-5*H*-imidazo (2, 1-a) isoindole (mazindol, SaH 42-548) on the metabolism of brain norepinephrine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **214**, 308–321 (1975).
- 4) Spalding K. L., Arner E., Westermark P. O., Bernard S., Buchholz B. A., Bergmann O. Blomqvist L., Hoffstedt J., Naslund E., Britton T., Concha H., Hassan M., Ryden M., Frisen J., Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
- 5) Grujic D., Susulic V. S., Harper M. E., Himms H. J., Cunningham B. A., Corkey B. E., Lowell B. B. β 3-Adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate β 3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake: A Study using transgenic and gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* **272**, 17686–17693 (1997).
- 6) Arch J. R. S., Ainsworth A. T., Cawthorne M. A., Piercy V., Sennitt M. V., Thody V. E., Wilson C., Wilson S. Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* **309**, 163–165 (1984).
- 7) Rosen E. D., MacDougald O. A., Adipocyte differentiation from the inside out, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 885–896 (2006).
- 8) Tanaka T., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. Defective adipocyte

differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J.*, **16**, 7432–7443 (1997).

9) Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Tamemoto H., Yamauchi T., Komeda K., *et al.* PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* **4**, 597–609 (1999).

10) Rosen E. D., Sarraf P., Troy A. E., Bradwin G., Moore K., Milstone D. S., Spiegelman B. M., Mortensen R. M. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* **4**, 611–617 (1999).

11) Wang N., Finegold M. J., Bradley A., Ou C. N., Abdelsayed S. V., Wilde M. D., Taylor L. R., Wilson D. R., Darlington G. J. Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. *Science* **269**, 1108–1118 (1995).

12) Wu Z., Rosen E. D., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy A. E., McKeon C., Darlington G. J., Spiegelman B. M. Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**, 151–158 (1999).

13) Rosen E.D., Hsu C. H., Wang X., Sakai S., Freeman M.W., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway, *Genes Dev.* **16**, 22–26 (2002).

14) Ikematsu N., Yoshida Y., Kawamura-Tsuzuku J., Ohsugi M., Onda M., Hirai M., Fujimoto J., Yamamoto T. Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **18**, 7432–7441 (2000).

15) Takahashi A., Morita M., Yokoyama K., Suzuki T., Yamamoto T. Tob2 Inhibits Peroxisome proliferator-activated receptor 2 expression by

sequestering Smads and C/EBP during adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 5067–5077 (2012).

16) Banerjee S. S., Feinberg M. W., Watanabe M., Gray S., Haspel R. L., Denking D. J., Kawahara R., Hauner H., Jain M. K. The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 2581–2584 (2003).

17) Sue N., Jack B. H. A., Eaton S. A., Pearson R. C. M., Funnell A. P. W., Turner J. Czolij R., Denyer G., Bao S., Molero-Navajas J. C., Perkins A., Fujiwara Y., Orkin S. H., Bell-Anderson K., Crossley M. Targeted disruption of the basic Krüppel-like factor gene (*Klf3*) reveals a role in adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3967–3978 (2008).

18) Kawamura Y., Tanaka Y., Kawamori R., Maeda S. Overexpression of Krüppel-like factor 7 regulates adipocytokine gene expressions in human adipocytes and inhibits glucose-induced insulin secretion in pancreatic-cell line. *Mol. Endocrinol.* **20**, 844–856 (2006).

19) Birsoy K., Chen Z., Friedman J. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.* **7**, 339–347 (2008).

20) Oishi Y., Manabe I., Tobe K., Tsushima K., Shindo T., Fujiu K., Nishimura G., Maemura K., Yamauchi T., Kubota N., Suzuki R., Kitamura T., Akira S., Kadowaki T., Nagai R. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation *Cell Metab.* **1**, 27–39 (2005).

21) Li D., Yea S., Li S., Chen Z., Narla G., Banck M., Laborda J., Tan S., Friedman J. M., Friedman S. L., Walsh M. J. Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J. Biol. Chem.* **280**, 26941–26952 (2005).

22) Mori T., Sakaue H., Iguchi H., Gomi H., Okada Y., Takashima Y.,

Nakamura K., Nakamura T., Yamauchi T., Kubota N., Kadowaki T., Matsuki Y., Ogawa W., Hiramatsu R., Kasuga M., Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis, *J. Biol. Chem.* **280**, 12867–12875 (2005).

23) Tong Q., Dalgin G., Xu H., Ting C. N., Leiden J. M., Hotamisligil G. S., Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**, 134–138 (2000).

24) 八木澤守正 「微生物対代謝産物探索研究の動向」 バイオサイエンスとインダストリー、p 89–94、バイオインダストリー協会出版 (2000).

25) Rubin C. S., Hirsch A., Fung C., Rosen O. M. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7570–7578 (1978).

26) Huang C., Zhang Y., Gong A., Sheng X., Li A., Zhang W., Qin Y., Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR γ pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 571–578 (2006).

27) Lee Y. S., Kim W. S., Kim K. H., Yoon M. J., Cho H. J., Shen Y., Ye J. M., Lee C. H., Oh W. K., Kim C. T., Behrens C. H., Gosby A., Kraegen E. W., James D. E., Kim J. B. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states, *Diabetes*, **55**, 2256–2264 (2006).

28) Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Akahashi N., Kawada T., Miyashita K. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 147–152 (2006).

29) Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Funayama K., Miyashita K.

Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 392–397 (2005).

30) Liu C. X., Zhang J., Wang X. J., Qian P. T., Wang J. D., Gao Y. M., Yan Y. J., Zhang S. Z., Xu P. F., Li W. B., Xiang W. S. Antifungal activity of borrelidin produced by a streptomyces strain isolated from soybean. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 1251–1257 (2012).

31) Maehr H., Evans R. H. Identity of borrelidin with treponemycin. *J. Antibiot.* **40**, 1455–1456 (1987).

32) Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Suzuki K., Ludwig W., Whitman W. B. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Whitman W. B., Parte A. C. (Eds.), Springer: New York, 2012; Vol. 5, pp 1446–1767.

33) Terekhova L. P., Galatenko O. A., Kulyaeva V. V., Malkina N. D., Boikova Y. V., Katrukha G. S., Shashkov A. S., Gerbst A. G., Nifantiev N. E. Isolation, NMR spectroscopy, and conformational analysis of the antibiotic INA 2770 (cineromycin B) produced by *Streptomyces* strain. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **56**, 815–818 (2007).

34) Berger J., Jampolsky L. M., Goldberg M. W. Borrelidin, an antibiotic borrelia activity and penicillin with anti-enhancement properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **22**, 476–478 (1949).

35) Ishiyama A., Iwatsuki M., Namatame M., Nishihara-Tsukashima A., Sunazuka T., Takahashi Y., Omura S., Otoguro K. Borrelidin, a potent antimalarial: stage-specific inhibition profile of synchronized cultures of *Plasmodium falciparum*. *J. Antibiot.* **64**, 381–384 (2011).

36) Olano C., Wilkinson B., Sánchez C., Moss S. J., Sheridan R., Math V.,

Weston A. J., Braña A. F., Martin C. J., Oliynyk M., Méndez C., Leadlay P. F., Salas J. A. Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: Cluster analysis and assignment of functions. *Chemistry & Biology* **11**, 87–97 (2004).

37) Gao Y. M., Wang X. J., Zhang J., Li M., Liu C. X., An J., Jiang L., Xiang W. S. Borrelidin, a potent antifungal agent: Insight into the antifungal mechanism against *Phytophthora sojae*. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9874–9881 (2012).

38) Nass G., Poralla K. Genetics of borrelidin resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and properties of their threonyl-tRNA-synthetase. *Mol. Gen. Genet.* **147**, 39–43 (1976).

39) Fang P., Yu X., Jeong S. J., Mirando A., Chen K., Chen X., Kim S., Francklyn C. S., Guo M. Structural basis for full-spectrum inhibition of translational functions on a tRNA synthetase. *Nature Commun.* **6**, 6402 (2015).

40) Miyairi N., Takashima M., Shimizu K., Sakai H. Cineromycins A and B. *J. Antibiot. Ser. A* **19**, 56–62 (1966).

41) Frayling T. M., Timpson N. J., Weedon M. N., Zeggini E., Freathy R. M., Lindgren C. M., Perry J. R., Elliott K. S., Lango H., Rayner N. W., Shields B., Harries L. W., Barrett J. C., Ellard S., Groves C. J., Knight B., Patch A. M., Ness A. R., Ebrahim S., Lawlor D. A., Ring S. M., Ben-Shlomo Y., Jarvelin M. R., Sovio U., Bennett A. J., Melzer D., Ferrucci L., Loos R. J., Barroso I., Wareham N. J., Karpe F., Owen K. R., Cardon L. R., Walker M., Hitman G. A., Palmer C. N., Doney A. S., Morris A. D., Smith G. D., Hattersley A. T., McCarthy M. I. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* **316**, 889–894 (2007).

- 42) Zhang M., Zhang Y., Ma J., Guo F., Cao Q., Zhang Y., Zhou B., Chai J., Zhao W., Zhao R. The demethylase activity of FTO (fat mass and obesity associated protein) is required for preadipocyte differentiation. *PLoS One* **10**, e0133788.
- 43) Piow W.C., Kaneda T., Hadi A.H.A., Morita H. Ceramicine B, a limonoid with anti-lipid droplets accumulation activity from *Chisocheton ceramicus*. *J. Nat. Med.* **68**, 22–30 (2014).
- 44) Lu K., Han M., Ting H.L., Liu Z., Zhang D. Scutellarin from *Scutellaria baicalensis* suppresses adipogenesis by upregulating PPAR α in 3T3-L1 cells. *J. Nat. Prod.* **76**, 672–678 (2013).
- 45) Hua Y., Davies G. E. Berberine increases expression of GATA-2 and GATA-3 during inhibition of adipocyte differentiation. *Phytomedicine* **16**, 864–873 (2009).
- 46) Ntambi J. M., Kim Y. C. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* **130**, 3122S–3126S (2000).
- 47) Prinsen C. F., Bruijn D. R., Merckx G. F., Veerkamp J. H. Assignment of the human adipocyte fatty acid-binding protein gene (FABP4) to chromosome 8q21 using somatic cell hybrid and fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Genomics* **40**, 207–209 (1997).
- 48) Mead J. R., Irvine S. A., Ramji D. P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* **80**, 753–769 (2002).
- 49) Seckl J. R., Walker B. R. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1—A tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* **142**, 1371–1376 (2001).
- 50) James D. E., Brown R., Navarro J., Pilch P. F. Insulin-regulatable

tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**, 183–185 (1988).

51) Wang P., Xu S., Li W., Wanga F., Yang Z., Jiang L., Wang Q., Huang M., Zhou P. Salvianolic acid B inhibited PPAR γ expression and attenuated weight gain in mice with high-fat diet-induced obesity, *Cell. Physiol. Biochem.* **34**, 288–298 (2014).

52) Lee Y. S., Kim W. S., Kim K. H., Yoon M. J., Cho H. J., Shen Y., Ye J. M., Lee C. H., Oh W. K., Kim C. T., Behrens C. H., Gosby A., Kraegen E. W., James D. E., Kim J. B. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* **55**, 2256–2264 (2006).

53) Wu Z., Wang S. Role of Kruppel-like transcription factors in adipogenesis. *Developmental Biology* **373**, 235–243 (2013).

54) Lee H., Kang R., Kim Y. S., Chung S. I., Yoon Y. Platycodin D inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells by modulating Kruppel-like factor 2 and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Phytother. Res.* **24**, 161–167 (2010).

55) Lee H., Kang R., Hahn Y., Yang Y., Kim S. S., Cho S. H., Chung S. I., Yoon Y. Antiobesity effect of baicalin involves the modulations of proadipogenic and antiadipogenic regulators of the adipogenesis pathway. *Phytother. Res.* **23**, 1615–1623 (2009).

・謝辞

本研究を遂行するうえにおいて終始御懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、立命館大学薬学部微生物化学研究室・今村信孝教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました立命館大学生命科学部笠原賢洋教授、西澤幹雄教授に深謝致します。

本研究を進めるにあたり御懇切なるご助言を賜りました立命館大学薬学部・鈴木健二教授、川崎崇助教、波多野亮助教、立命館大学生命科学部・吉開会美（元）助教に厚く御礼申し上げます。また、高分解能 TOF-MS を測定して頂いた立命館大学薬学部・田中謙教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始暖かく見守って頂きました立命館大学薬学部・池谷幸信特別任用教授に深謝いたします。最後になりましたが、本研究遂行にあたりご協力頂きました立命館大学薬学部微生物化学研究室の皆様、遠く離れていても、あたたかく応援してくれた両親、妻 佑果に心から感謝します。