

ノダフジ (*Wisteria floribunda*) 種子に含まれる抗糖尿病因子の探索井上 朋世¹⁾, 菊永 竜太郎¹⁾, 山田 敬博¹⁾, 太田 伸二^{1,2)}, 河内 浩行¹⁾(¹⁾長浜バイオ大バイオサイエンス学部*, ²⁾広島大学大学院生物圏科学研究科**)Investigation for antidiabetic agonist from *Wisteria floribunda* seeds.Tomoyo INOUE¹⁾, Ryutaro KIKUNAGA¹⁾, Yoshihiro YAMADA¹⁾, Shinji OHTA¹⁾²⁾, and Hiroyuki KAWACHI¹⁾¹⁾Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology,²⁾Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

Summary

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a ligand-dependent transcription factor that directly activates the expression of adipocyte-specific genes. PPAR γ is mainly distributed in adipose tissues, and regulates lipid and glucose metabolism. Thiazolidinediones (TZDs), as synthetic PPAR γ ligands and antidiabetic drugs, are able to stimulate adipogenesis and enhance insulin sensitivity by stimulating the transcriptional activity of PPAR γ . Through screening for natural PPAR γ activator in various plant seeds using the PPAR γ luciferase reporter assay, the methanol extracts of *Wisteria floribunda* seeds activated PPAR γ . To identify the active compound that activated PPAR γ , the methanol extracts of *Wisteria floribunda* seeds was partitioned between hexane, ethyl acetate and H₂O soluble fractions. Among these, treatment with the ethyl acetate extracts of *Wisteria floribunda* seeds enhanced a marker of adipocyte differentiation such as triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. These results suggest that *Wisteria floribunda* seeds possess PPAR γ activators. The ethyl acetate soluble fraction of *Wisteria floribunda* seeds was further separated by silica gel and ODS column chromatography. Based on NMR, ESI-MS, and luciferase reporter assay, we confirmed that blumenol A, wistin, and isomucronuratol were identified as PPAR γ activators in *Wisteria floribunda* seeds.

ヒトは、近年において肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧といった動脈硬化のリスクファクターが一個人に集積するメタボリックシンドロームを呈する患者が急増している。ヒトの肥満は多くの生活習慣病の発症基盤と考えられ、エネルギーの過剰摂取やライフスタイルの乱れがちな環境を生じやすい経済的先進国、さらには急速な経済発展を遂げている諸国において、これらメタボリックシンドロームと総称される疾患に対する治療薬の開発は非常にホットな分野である。

それらの疾患に対する治療薬のターゲットのひとつとして、リガンド依存性の核内転写因子である PPAR γ が存在する。この PPAR γ は主に脂肪組織で発現し脂肪細胞の機能維持に関与する転写因子であり、そのリガンドであるチアゾリジン系薬剤は抗糖尿病薬として用いられている。PPAR γ は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして働くリガンド依存性の核内転写因子であり、同じく核内受容体型転写因子である RXR とヘテロダイマーを形成して、認識配列である PPRE に結合する。PPAR/RXR ヘテ

ロダイマーに PPAR もしくは RXR のアゴニストが結合すると、コリプレッサーの解離と CBP などのコアクチベーターの会合が起こり、転写活性化能を有するようになる^{1,2)}。

これまで高感度リガンドアッセイ系を用いた PPAR γ リガンドスクリーニングでは食品由来成分であるいくつかのイソプレノイドが PPAR γ を活性化させることが明らかとなっている。PPAR γ のリガンド結合部位は他の核内受容体に比べ親水性アミノ酸に富み高いリガンド多様性を示すことが知られており、イソプレノイドの他にも様々な活性化因子が報告されている。ホップの苦味成分であるイソフムロンは PPAR γ 活性化作用を有するアゴニストであり、2 型糖尿病患者を対象としたヒト試験においてもその有用性が明らかにされている³⁾。また、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンは、抗炎症作用を有しているが、ヒト由来腸上皮細胞 HT-29 で PPAR γ を活性化させること⁴⁾、そして肥満状態の脂肪組織での炎症を抑制し肥満状態の改善に有効であることが示唆されている⁵⁾。さらに、辛味成分であるクルクミン、ピペリンでも類似の作用を有

*所在地：滋賀県長浜市田村町1266 (〒526-0829) TEL : +81-749-64-8177 FAX : +81-749-64-8177

**所在地：東広島市鏡山1-7-1 (〒739-8521) TEL : +81-82-424-6537 FAX : +81-82-424-0758

することが示されている⁶⁾。また、赤唐辛子発酵産物であるコチュジャンは脂肪細胞でPPAR γ を制御し、抗糖尿病作用を示す⁷⁾。

そこで本研究では様々な植物種子をターゲットにしPPAR γ 活性化因子の探索を、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討した。

実験方法

1. PPAR γ 活性化因子の探索

1) 添加試料の調製

採取したノダフジ、サイカチ、ザクロ、シナサワグルミ、ハナズオウ、ネムの種子を粉碎し、メタノールを加え抽出した。1週間抽出後、抽出液をろ過、濃縮し、DMSOに再懸濁後、4℃で保存した。ノダフジ種子のメタノール抽出物については、ヘキサンとメタノールを用いて分配し、ヘキサン可溶性画分とメタノール可溶性画分を得た。このメタノール可溶性画分を濃縮し、酢酸エチルと水を用いて分配し、酢酸エチル可溶性画分と水可溶性画分を得た。この酢酸エチル可溶性画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶媒条件メタノール-クロロホルム；メタノール：0→100%）およびODSカラムクロマトグラフィー（溶媒条件メタノール-H₂O；メタノール：30→100%）により分画精製した。

2) レポーターアッセイ

COS-7細胞を100 mm dishに 5×10^4 個/mLの密度で播種し、37℃・5% CO₂環境下でインキュベーター内において10%ウシ胎児血清（FBS）を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）で24時間培養後、pM-PPAR γ 、p4×UASg-tk-luc、およびpCMV β -galをトランスフェクトした。5時間後トリプシン処理により細胞を回収し、 5×10^4 個/mLの密度になるように96 well dishに再び播種しそこに種子抽出物を添加した。37℃・5% CO₂環境下で24時間インキュベート後、市販のキットSteady-Glo Luciferase Assay System（Promega）に従い、ルミノメーターによりホタルルシフェラーゼ活性を定量した。さらに、96 wellプレートに2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを含む β -ガラクトシダーゼ反応基質液に細胞抽出液を加え37℃にて2時間反応後、マイクロプレートリーダーで活性値を測定した。添加試料のPPAR γ 活性化能はControlに対する割合（%）で評価した。

3) PPAR γ 活性化因子の同定

活性化因子の化学構造は、¹Hおよび¹³C-核磁気共鳴（NMR）およびエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）により同定した。なお、NMRの測定の際、CDCl₃、CD₃OD、D₂Oを重水素化溶媒として用いた。

2. 脂肪細胞分化に及ぼす影響

1) 細胞培養

マウス3T3-L1脂肪前駆細胞を 1×10^4 個/mLの密度で12 well dishに播種し、37℃・5% CO₂環境下のインキュベーター内において10% FBSを含むDMEMで培養を行った。コンフルエント2日後、0.25 μ M デキサメタゾン（DEX）、0.5mM メチル-3-イソブチルキサンチン（MIX）、10 μ g/mL インスリンを加えた分化誘導培地に交換し、2日間培養を続けた。その後5 μ g/mL インスリンを加えた10% FBS含有DMEMでさらに6日間培養を行った。試料はDMSOに溶かし、それぞれ10 μ g/mLの濃度で分化誘導時から8日間添加した。分化誘導8日後、0.1M トリス-EDTAを用いて細胞抽出後、トリグリセライド E-テストワコーを用いTG濃度を測定し、タンパク質量で補正した。

2) 統計処理

各試料とコントロール（培地中濃度0.1%のDMSO溶剤）との差の比較はt検定を用いた。また、全ての検定はP<0.05で有意とした。

結果と考察

COS-7細胞に、様々な植物の種子（ノダフジ、サイカチ、ザクロ、シナサワグルミ、ハナズオウ、ネム）の抽出物を添加し、Luciferase Reporter Assay Systemを用いて、PPAR γ に対する活性化能を評価した（Fig. 1）。

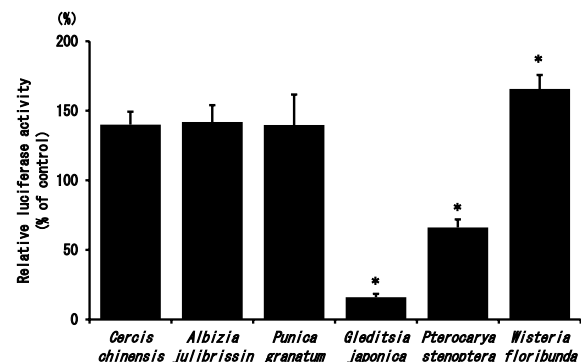


Fig. 1 Effect of plant seeds on activation of PPAR γ by luciferase ligand assays.

pM-hPPAR γ , p4xUASg-tk-luc and pRL-CMV were transfected into COS-7 cells, and 5 h after transfection, the cells were treated with various plant seed extracts (10 μ g/mL) for 24 h. The activity of a vehicle control was set at 100% and the relative luciferase activities were presented as fold induction to that of the vehicle control. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. *P<0.05 vs. vehicle control.

ルシフェラーゼアッセイはPPAR γ リガンド結合ドメインとGAL4DNA結合ドメインからなるキメラ蛋白質を合成するプラスミドpM-PPAR γ 、GAL4応答配列を持ち、pM-PPAR γ が合成する蛋白質により発現を制御されるようにデザインされたlucレポーター遺伝子プラスミドp4×UASg-tk-lucおよびトランスフェクション時における効率

を標準化する内部標準プラスミド pCMV β -gal を COS-7 細胞にトランスフェクションし、生成したウミホタル由来のルシフェラーゼ活性を測定することでリガンド候補試料の PPAR γ に対する活性化能を評価するアッセイシステムである。 β -ガラクトシダーゼは細胞内でリガンドに影響されず発現量が一定であるため、この変動にトランスフェクション時における効率の違いが反映され、データ処理の段階で標準化することによりリガンドの正確な評価を行える。その結果、サイカチ種子抽出物のように細胞毒性を示すものがある中、コントロールと比較し、ノダフジ種子抽出物にのみコントロールと比較し約 1.6 倍の有意な活性上昇が見られることが分かり (Fig. 1), ノダフジ種子のメタノール抽出物に含まれる PPAR γ 活性化物質を探索することにした。

ノダフジ種子メタノール抽出物を濃縮した後、ヘキサンとメタノールを加えて分配しヘキサン可溶性画分およびメタノール可溶性画分を得た。メタノール可溶性画分は濃縮した後、酢酸エチルと水を用いて分配し、酢酸エチル可溶性画分と水可溶性画分を得た。得られた各画分について、先ほどと同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、酢酸エチル可溶性画分に PPAR アゴニスト活性が見られた (Fig. 2)。

次に、PPAR アゴニスト活性の見られた酢酸エチル可溶性画分について、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化に及ぼす影響を検討した。3T3-L1 脂肪前駆細胞を分化誘導処理した後、酢酸エチル可溶性画分を濃度 10 μ g/mL となるように添加して 8 日間培養した。細胞を回収後、分化の指標である細胞内トリグリセリド濃度を測定したところ、コントロール区と比較し有意な上昇が見られた (Fig. 3)。以上の結果から、ノダフジ種子酢酸エチル可溶性画分は PPAR γ の活性化因子として働き、脂肪細胞分化を促進させたものと考えられた。

この酢酸エチル可溶性画分について、PPAR γ 活性化作

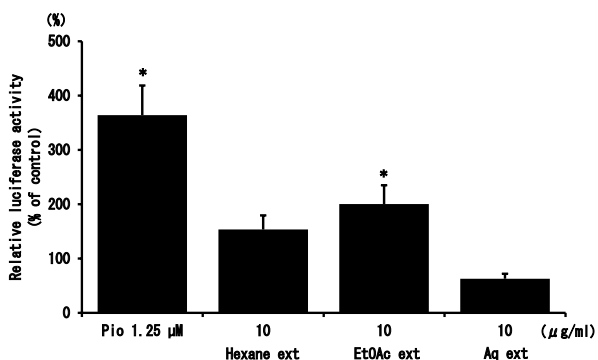


Fig. 2 Effect of partitioned fractions of the methanol extract of *Wisteria floribunda* seeds on activation of PPAR γ by luciferase ligand assays.

The methanol extract of *Wisteria floribunda* seeds was partitioned between hexane, ethyl acetate and H₂O soluble fractions. The activity of a vehicle control was set at 100% and the relative luciferase activities were presented as fold induction to that of the vehicle control. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. *P<0.05 vs. vehicle control. Pio: Pioglitazone, as positive control.

用を指標に、シリカゲルカラムクロマトや ODS カラムクロマトにより分画を行った。得られた各画分について ¹H および ¹³C-NMR および ESI-MS 分析を行った結果、ノルセスキテルペノイドである Blumenol A [(+)ESI-MS m/z 247 [M + Na]⁺; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは文献値⁸⁾と一致], イソフラボン配糖体である Ononin [(+)ESI-MS m/z 431 [M + H]⁺; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは文献値⁹⁾と一致], Wistin [(+)ESI-MS m/z 461 [M + H]⁺; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは, Ononin のものと類似しており Ononin の A 環にメトキシ基 (δ_H 3.95, δ_C 56.8) が 1 個結合した Wistin¹⁰⁾ と同定], イソフラバンである Sativan [(+)ESI-MS m/z 309 [M + Na]⁺; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは文献値¹¹⁾と一致], Isomucronuratol [(-)ESI-MS m/z 301 [M - H]⁻; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは, Vestitol のものと類似しており Vestitol の B 環にメトキシ基 (δ_H 3.78, δ_C 61.0) が 1 個結合した Isomucronuratol¹²⁾ と同定], Vestitol [(-)ESI-MS m/z 271 [M - H]⁻; ¹H および ¹³C NMR (CD₃OD) データは文献値¹¹⁾と一致] が同定された (Fig. 4)。これ

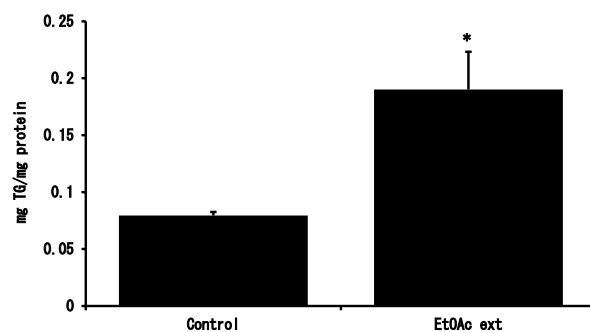


Fig. 3 Effect of the ethyl acetate soluble fraction of *Wisteria floribunda* seeds on differentiation of 3T3-L1 cells.

Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day0) were treated with or without the ethyl acetate soluble fraction of *Wisteria floribunda* seeds for 8 days. Intracellular triglyceride concentration assays were performed on differentiated adipocytes (day 8). The bars represent mean values \pm SD for 4 well. *P<0.05 vs. cultures treated without the EtOAc soluble fraction of *Wisteria floribunda* seeds.

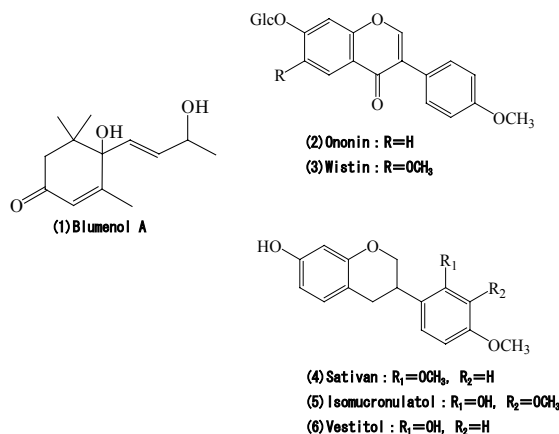


Fig. 4 The chemical structures of Blumenol A (1), Ononin (2), Wistin (3), Sativan (4), Isomucronulatol (5), and Vestitol (6) isolated from the EtOAc soluble fraction of *Wisteria floribunda* seeds.

らの純度は、TLC および HPLC 分析において、それぞれシングルスポットおよびシングルピークを示したことにより確認した。

これら単離された化合物について、再びルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Blumenol A, Wistin, Isomucronuratol について有意な活性上昇が見られた (Fig. 5)。

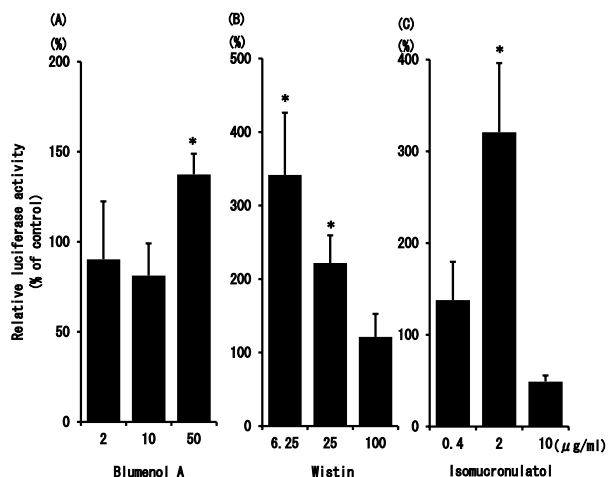


Fig. 5 Effect of Blumenol A (A), Wistin (B), and Isomucronuratol (C) on activation of PPAR γ by luciferase ligand assays.

The activity of a vehicle control was set at 100% and the relative luciferase activities were presented as fold induction to that of the vehicle control. 0.1% DMSO was the vehicle control. The bars represent mean values \pm SD for 4 well. * $P < 0.05$ vs. vehicle control.

今回 PPAR γ の転写活性化能を示すことがわかった Blumenol A はノルセスキテルペノイドである。これまでに、ウコンから抽出されたセスキテルペノイド類である ar-turmerone が PPAR γ を活性化させるという報告¹³⁾があるが、ノルセスキテルペノイドの PPAR アゴニスト活性についての報告はない。この Blumenol A は、今回検討した濃度範囲では細胞死は観察されなかった。これに対し、フラボノイド類は高濃度添加すると細胞死を招く場合が多く、アゴニスト活性が認められる濃度範囲が比較的狭かった。今回、Isomucronuratol を高濃度添加した 10 μ g/mL 添加区では細胞毒性を示した (Fig. 5C)。

マメ科植物である甘草はフラボノイド類の含有量が多く、このフラボノイド類が PPAR γ を活性化させるという報告¹⁴⁾がある。その中でもイソフラバン骨格を持つ化合物である glyasperin D が PPAR γ を活性化させるという報告¹⁵⁾がある。今回単離した 3 種のイソフラバンの中では、Isomucronuratol にしか PPAR γ の活性がみられなかった。Isomucronuratol は B 環にヒドロキシル基が 1 個、メトキシ基が 2 個結合しており、ヒドロキシル基やメトキシ基の数の違いで活性が変化するという結果になった。構造の違いで活性に変化があることが調べられた例¹⁶⁾もあり、ヒドロキシル基やメトキシ基の数は、活性に大きく関与しているものと考えられる。この構造の違いで活性に変化が見られることを考慮すると、イソフラボン配糖体である Wistin,

Ononin に関して、Wistin は Ononin と比べメトキシ基が増えたことにより疎水性が増し、作用しやすくなったのではないかと考えられる。これまでにイソフラボン配糖体の PPAR アゴニスト活性についての報告はない。

結論として、本試験ではレポーターアッセイの結果、調べた植物種子のうち、マメ科フジ属のノダフジ種子のメタノール抽出物中に PPAR γ 転写活性化能が見られた。このメタノール抽出物を、ヘキサン、酢酸エチルおよび水の各可溶性画分に分配し活性試験を行ったところ、酢酸エチル可溶性画分に強い活性が見られた。この画分を 3T3-L1 脂肪前駆細胞に添加すると、分化の指標であるトリグリセリド濃度が有意に上昇し、この酢酸エチル可溶性画分中に PPAR γ の活性化因子が含まれていることを強く示唆する結果となった。さらに、この画分についてシリカゲルや ODS カラムクロマトにより分画精製を行った。その結果、ノルセスキテルペノイドである Blumenol A, イソフラボン配糖体 Wistin やイソフラボン Isomucronuratol が得られ、これらは単独でも PPAR γ 活性化能を示すことが明らかになった。

参考文献

- 1) Rosen ED, Spiegelman BM (2001) PPAR γ . A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276: 37731-37734.
- 2) Michalik L, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr. Opin. J.* 10: 564-570.
- 3) Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S, Kondo K (2004) Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor α and γ and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 279: 33456-33462.
- 4) Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R (2004) Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in HT-29 human colon cancer cells. *J. Med. Food* 7: 267-273.
- 5) Kang JH, Kim CS, Han IS, Kawada T, Yu R (2007) Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. *FEBS Lett.* 581: 4389-4396.
- 6) Woo HM, Kang JH, Kawada T, Yoo H, Sung MK, Yu R (2007) Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity

- by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life Sci.* 80: 926-931.
- 7) Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY(2006) Antiobesity effect of Kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J Med. Food* 9: 15-21.
 - 8) Kuang H, Yang B, Xia Y, Feng W (2008) Chemical Constituents from the Flower of *Datura metel* L. *Arch. Pharm. Res.* 31 : 1094-1097.
 - 9) Park JA, Kim HJ, Jin C, Lee K-T, Lee YS (2003) A New Pterocarpan, (-)-Maackiain Sulfate, from the Roots of *Sophora subprostrata*. *Arch. Pharm. Res.* 26 : 1009-1013.
 - 10) Shibata S, Nakahara M, Aimi N (1963) The constituents of Japanese and Chinese crude drugs. IX. Paeoniflorin. A glucoside of Chinese peony roots. *Chem. Pharm. Bull.* 11 : 379-391.
 - 11) Takashima Y, Kaneko Y, Kobayashi Y (2010) Synthetic access to optically active isoflavans by using allylic substitution. *Tetrahedron* 66 : 197-207.
 - 12) Ingham J L (1977) An isoflavan phytoalexin from leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* 16 : 1457-1458.
 - 13) Kuroda M, Mimaki Y, Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Tsukagawa M, Takahashi K, Kawada T, Nakagawa K, Kitahara M (2005) Hypoglycemic Effects of Turmeric (*Curcuma longa* L. Rhizomes) on Genetically Diabetic KK-Ay Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28 : 937-939.
 - 14) Kuroda M, Mimaki Y, Honda S, Tanaka H, Yokota S, Mae T (2010) Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and their PPAR- γ ligand-binding activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 : 962-970.
 - 15) Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Takahashi K, Kawada T, Nakagawa K, Kitahara M (2003) Phenolics with PPAR- γ ligand-Binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A^y mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 : 4267-4272.
 - 16) 吉川雅之監修 (2007) 薬用食品の開発 —薬用・有用植物の機能性食品素材の応用— シーエムシー出版