

マウス脂肪細胞と線虫に対するファイトケミカル類の生理作用解析

小幡 恵里 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ファイトケミカルは植物中に存在する天然の化学物質で、その多くは抗酸化作用を通じて肥満・糖尿病の改善や予防などの多様な生理効果をもつことが知られている。近年、様々なファイトケミカルが、健康機能食品、サプリメント、医薬品などの形で生活習慣病の予防・改善や老化防止などの目的で利用されつつある。しかしながら、膨大な数存在するファイトケミカルの中で、現在効果が解明されているものはごく一部にすぎず、さらなる探究が求められている。

一方、FoxO は進化的に保存された転写因子で、細胞周期、DNA 修復、糖代謝、抗酸化ストレスなど様々な生理機能に関与することが知られている。近年、一部のファイトケミカルが FoxO を活性化し、様々な生理活性機能や寿命の延長をもたらすことが明らかになっている。

本研究では、モデル生物である線虫 (*C. elegans*) を用いて、7つの植物粗抽出物の中から、Daf-16 (FoxO のホモログ) を活性化するものを選別し、生理作用と機能成分の同定およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。

また、一部のファイトケミカルは、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化の抑制および脂肪細胞における脂肪分解の促進を誘導し、肥満抑制効果をもつことが知られている。そこで、線虫の系で選択された植物機能成分について、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて生理作用や作用機序の解析を行うことを目的とした。

【方法】

1. 線虫を用いた実験

(1) Daf-16 の活性化を指標とした 7つの植物粗抽出物の選別
同調処理後 72 時間培養した TJ356 (*daf-16::gfp* トランスジェニック線虫株) を 7 種類の各植物粗抽出液を含む S-basal 中で 5 時間培養した。Daf-16 転写因子の核への局在を観察することにより、Daf-16 の活性化の程度を調べた。

(2) マンゴスチン粗抽出物および α -mangostin を用いた生理作用の解析

(1) で選別された植物粗抽出物 (マンゴスチン粗抽出物) と、マンゴスチンの主成分である α -mangostin を用い、体長、成長速度、脂肪蓄積の測定を行った。同調処理した野生型 L1 幼虫を、マンゴスチン粗抽出物および α -mangostin を塗布した培地に播種し、一定時間後に固定して観察を行った。

2. マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた実験

(1) MTT assay

α -mangostin が細胞生存率に与える影響を調べるために、ミトコンドリア内脱水素酵素活性を指標にした MTT assay を行った。

(2) Oil-red-O 染色

α -mangostin 投与による脂肪蓄積量の変化を調べるために、Oil-red-O 染色を行った。DMI 法により分化誘導した細胞に α -mangostin を時期別 (分化誘導開始 0-2/2-4/4-6/0-7 日目)、

濃度別 (0, 6, 12, 18 μ M) に投与した。分化誘導開始 7 日目に脂肪滴を Oil-red-O で染色して観察・定量した。

(3) Cell count

3T3-L1 細胞において分化誘導開始 0-2 日目に起こる 2 度の細胞増殖 (clonal expansion) に対する α -mangostin の影響を調べるため、分化誘導開始 0, 24, 48 時間後に細胞数を計測した。

(4) qRT-PCR

α -mangostin の脂肪細胞分化に対する影響を調べるために、qRT-PCR 法により脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を調べた。

(5) Glucose uptake, Glycerol release assay

α -mangostin の成熟脂肪細胞に対する影響を調べるため、分化誘導開始 10 日目の脂肪細胞に α -mangostin を投与し、Glucose の取り込み、Glycerol の放出の変化を調べた。

【結果】

- (1) 用いた植物粗抽出液の中で、マンゴスチン粗抽出物が Daf-16 転写因子の核への局在を最も強く誘導した。
- (2) マンゴスチン粗抽出物と α -mangostin は、播種後 66 時間後の線虫の体長を減少させた。また、Nile-Red 染色法による脂肪蓄積の観察では、安定した結果が得られなかった。
- (1) 分化後の成熟脂肪細胞に対して、 α -mangostin は細胞生存率に影響を与えなかった。未分化の 3T3-L1 細胞においては、 α -mangostin は 12 μ M 以下の濃度では細胞生存率に影響を与えないが、18 μ M 以上の濃度では細胞傷害性を示した。
- (2) 0-2, 0-7 日目に α -mangostin を投与した細胞は、コントロールと比較して脂肪滴の大きさが小さく、脂肪蓄積量が減少した。一方、それ以外の時期に投与した細胞では脂肪滴の大きさや脂肪蓄積量に変化はなかった。
- (3) α -mangostin 12 μ M を投与した細胞では、コントロールと比較して分化誘導後の細胞増殖が抑制された。
- (4)・(5) の実験は、現在進行中である。

【考察と今後の予定】

マンゴスチン粗抽出物が Daf-16 の活性化を促進したことから、マンゴスチン粗抽出物が様々な生理活性機能をもつことが示唆された。また、Daf-16 の活性化は線虫の成長を遅延させることが知られていることから、マンゴスチン粗抽出物と α -mangostin を投与した線虫で見られた体長の減少は Daf-16 の活性化と関連しているかもしれない。

さらに、脂肪細胞に関して、 α -mangostin は特に分化誘導後初期に作用し脂肪蓄積を抑制することが分かった。また、 α -mangostin は分化誘導後初期の clonal expansion も抑制した。このことから、 α -mangostin は脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を抑制することが示唆される。今後は、複数の脂肪細胞分化関連遺伝子の発現の変化を調べることにより、脂肪細胞分化に対する α -mangostin の作用機序を明らかにする予定である。