HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ケルセチン高含有タマネギから単離同定したピネリン酸による核内受容体PPARα/γ活性化に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	土居, 幹生
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14385号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81165
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Doi_Mikio_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）　　氏名 土 居 幹 生

学 位 論 文 題 名

ケルセチン高含有タマネギから単離同定したピネリン酸による
核内受容体 PPARα/γ 活性化に関する研究

ケルセチンはタマネギに含まれるフラボノールの 1 種であり、抗酸化作用と抗炎症作用を有することが知られている。ケルセチンとその配糖体は、核内受容体である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) のリガンドとして機能することが知られている。PPAR は、核内受容体の1種であり、脂質およびグルコースの代謝に関連する遺伝子の発現を調節する転写因子として作用する。リガンドが結合し PPAR が活性化されると、活性化された PPAR は DNA 上にある PPAR 応答配列 (PPRE) を認識、同じ核内受容体の 1 種である Retinoic acid receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成することで mRNA の転写を促し、様々な遺伝子の発現を変動させる。PPAR は α、δ、γ の 3 つのアイソフォームがあることが知られている。ルシフェラーゼリガンドアッセイによる PPAR の活性化の評価では、ケルセチンは PPARα を活性化することが知られている。PPARα の活性化は、肥満の糖尿病患者の脂肪酸代謝を高め、脂質の蓄積を減らす効果がある。一方でケルセチンとその配糖体は、ほとんど PPARγ を活性化しないことが知られている。

本研究ではケルセチン高含有タマネギの水抽出液について、ルシフェラーゼリガンドアッセイで PPAR の活性化を評価したところ、PPARα と PPARγ で高い活性を示した。そこでケルセチンとその配糖体化合物以外の PPARγ を活性化するリガンドが含まれていると考え、PPARγ の活性を指標としてケルセチン高含有タマネギの水抽出液から PPARγ を活性化するリガンドを単離同定することを目的とした。

1. タマネギ抽出物による PPAR（α, δ および γ） 活性化の評価

タマネギ水抽出物が核内受容体 PPAR（α、δ および γ）を活性化するか評価するために、ルシフェラーゼリガンドアッセイを行った。その結果、 タマネギ水抽出物は、PPARα および PPARγ を活性化しその活性は濃度依存的に上昇した。一方で PPARδ は活性化しなかった。この結果から、タマネギ水抽出物には PPARγ を活性化する生理活性化合物が含まれると考えた。

2. PPARγ を活性化する化合物の単離と構造決定

タマネギ水抽出物に含まれる PPARγ を活性化する化合物を単離するために、カラムクロマトグラフィーによる化合物の分離精製を行った。生重量 13 kg のタマネギをスライスし、大型凍結乾燥機で凍結乾燥した。得られた凍結乾燥サンプル (1.2 kg) を超純水 (8 L) に浸漬し、4°C で 3 日間静置による抽出を行った。水溶液はガーゼろ過し、得られたろ液をブフナー漏斗でろ過した。ろ液の水抽出物を C18-COSMOSIL カラムクロマトグラフィーに供し超純水で洗浄した。C18-COSMOSIL カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し濃縮後、残留物 （47.0 g） をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-ブタノール/水酸化アンモニウム (4:1) で溶出した。溶出液を濃縮後、残留物 (3.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-ブタノール/水酸化アンモニウム (5:1) で溶出した。得られた合計 84 の画分を 10 の画分に統合し、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPARγ の活性化を評価した。画分 1、画分 4、画分 5、および 画分 6 で、PPARγ の高い活性を確認した。画分 5 (414 mg) に含まれる化合物のプレパラティブ TLC による

単離精製を進めた。展開溶媒クロロフォルム/メタノール/アンモニア水 (10:1:0.1) を使用し、リンモリブデン酸による呈色を指標にシリカゲル (R_f = 0.30) を収集し、化合物 **1** (60 mg) を白色固体として得た。化合物**1**の HRESIMS 分析の結果、*m/z* 353 に$[M+Na]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分子式は$C_{18}H_{34}O_5$であると決定した。化合物 **1** の化学構造を決定するために ^{1}H-NMR 及び ^{13}C-NMR による観測を実施し、COSY、HMQC、HMBC 及び NOESY による二次元 NMR による相関を確認した。化合物**1**の平面構造を(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10enoic acid と推定した。推定の平面構造を有する化合物の報告は、アンモニウム塩としての解析であった。そこで、化合物 **1** のアンモニウム塩を調製し比較したところ報告のピネリン酸のアンモニウム塩と^{1}H、^{13}C-NMR データの良い一致を確認した。(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10enoic acid アンモニウム塩の立体異性体の絶対配置と ^{1}H-NMR スペクトルパターンの関係から、化合物**1**のアンモニウム塩が (9*S*,12*S*,13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid (ピネリン酸) のデータと良く一致すること、また化合物 **1** の比旋光度値（$[\alpha]^{25}_D$ -8.8（c 1.0, MeOH））が、報告されたピネリン酸のデータと一致することから、化合物 **1** の構造は、その絶対配置を含めてピネリン酸として同定した。

3. ピネリン酸による PPARγ 及び PPARα 活性化の評価

前述のように、活性化分画の主成分としてピネリン酸を単離精製したが、ピネリン酸が核内受容体 PPARs のリガンドとして機能し活性化するという報告はなく、PPAR 活性化に関しては未検定であった。そこでルシフェラーゼリガンドアッセイにより、ピネリン酸が核内受容体 PPAR を活性化するか否かを評価した。その結果、ピネリン酸は PPARγ を活性化すること、また濃度依存的に高い活性化を示し 1000μM で非常に高い活性化を示した。次にピネリン酸による PPARα の活性化を評価した。その結果、ピネリン酸は PPARα を活性化すること、また濃度依存的に高い活性化を示し 1000μM で非常に高い活性化を示した。

4. 総合考察

ピネリン酸の生物活性に関する研究は、ワクチンの免疫作用を高める免疫賦活化作用（アジュバント作用）について詳細な研究がなされている。しかし、ピネリン酸がどの様にアジュバント活性を誘導するのかについては不明である。本研究結果から、ピネリン酸で報告されている生物活性は PPARγ の活性化によるものではないかと推測できる。

以上より、本研究では、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPARγ 活性化を指標としたカラムクロマトグラフィーにより、ケルセチン高含有のタマネギ水抽出画分からピネリン酸を単離同定し、ピネリン酸が PPARα 及び PPARγ を活性化することを初めて明らかにした。本結果は trihydroxyoctadecenoic acid metabolite of linoleic acid (TriHOME) が PPARα 及び PPARγ を活性化することを初めて示したものである。