

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成26年 4月16日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 東北大学
 職 名 教授
 研究代表者 大島吉輝
 勤務先所在地 〒980-8578
 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
 電話番号 022-795-6822
 ファックス番号 022-795-6821
 E-メール oshima@mail.pharm.tohoku.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 11018)

1. 共同研究課題名	細胞性粘菌由来の低分子物質 DIF の薬理作用の解析と新規代謝制御剤の開発			
2. 共同研究目的	我々は、細胞性粘菌由来の化合物 DIF-1 とその誘導体が、複数の薬理作用を有することを明らかにしてきた。本共同研究により、それら薬理作用の機構解析を進めると共に、DIF をリード化合物とした薬剤の開発を目指す。			
3. 共同研究期間	平成 25年 4月 1日 ~ 平成 26年 3月 31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 大島 吉輝	61	大学院薬学研究科	教授	研究の総括
(分担研究者) 菊地 晴久	38	大学院薬学研究科	准教授	DIF 誘導体の化学合成
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	遺伝子情報		氏 名 久保原 禪

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

①各種 DIF 誘導体の化学合成(大島、菊地)

DIF の側鎖を変えた各種 DIF 誘導体(DIFs)を合成する。また、蛍光発色体を結合した DIF 誘導体も合成する。

②各種 DIF 誘導体の薬理作用の解析と作用機構の解析(久保原、大島)

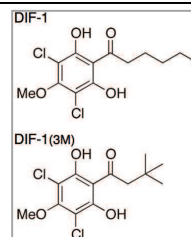
DIFs の糖代謝促進作用(3T3L1 細胞)と IL-2 制御作用(Jurkat 細胞)を解析する in vitro assay 系はすでに確立している。それら assay 系を利用して、DIFs の作用解析と作用機序の解析を進める(蛍光 DIF 誘導体、Western blot 法や RNAi 法などを駆使)。

③新規薬剤の開発(大島、菊地、久保原)

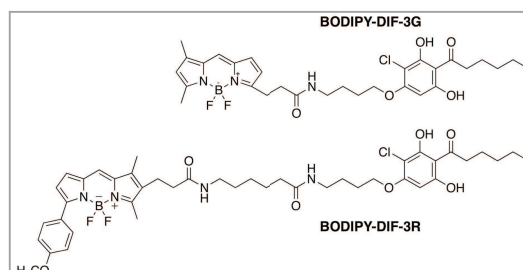
上記の検討を繰り返しながら、より有効な DIF 誘導体をデザイン・合成し、DIF をリード化合物とした新規な肥満/糖尿病治療薬あるいはまた免疫制御剤の開発を目指す(in vivo 検討へと繋げる)。

7. 共同研究の成果

1) DIF-1 と DIF-1(3M)(右図)は、in vitro で confluent 状態のマウス 3T3L1 細胞などの糖代謝を促進する DIF 誘導体であり、肥満/糖尿病治療薬のリード化合物として期待されている。これまでの成果・知見から DIF の作用機序は「DIF→→エネルギー産生阻害→ATP 減少→AMP kinase 活性化→→糖取り込み促進」の可能性があった。今回、我々は、RNAi 法を利用して、AMP kinase 発現を減じてても、DIF による糖代謝促進活性は完全には阻害されないことを確認した(AMP kinase 阻害剤を利用した同様の成果は、前年度報告済み)。すなわち、DIF による糖代謝促進作用は、AMP kinase 系を介さない経路であることが示唆された。また、DIF 処理後の細胞内の代謝状態をメタボローム解析法によって検討した。



2) DIF 誘導体は様々な薬理作用を有する化合物だがそれらターゲットタンパク質や作用機序の詳細については不明の点が多い。それらを解明するための1手法として、我々は、蛍光発色体(BODIPY) を結合した DIF 誘導体(BODIPY-DIF-3G: 緑色蛍光体)を合成し、BODIPY-DIF-3G の生物活性と細胞内局在を検討し、BODIPY-DIF-3G が主にミトコンドリアに局在することや、DIF 様因子がミトコンドリアの酸素消費を促進すること等を報告してきた。今回新たに BODIPY-DIF-3R(赤色蛍光体)を合成し、DIF の細胞内局在と作用機序の解析をさらに進めた。解析の結果、①BODIPY-DIF-3G は、ヒト HeLa 細胞およびマウス骨肉腫 LM8 細胞の増殖を抑制するが、BODIPY-DIF-3R は細胞増殖に影響しないこと、②BODIPY-DIF-3G は、confluent 状態の 3T3L1 細胞の糖代謝を促進するが、BODIPY-DIF-3R は糖代謝にあまり影響しないこと、さらに、③BODIPY-DIF-3R も BODIPY-DIF-3G 同様に添加後速やかに細胞膜系に浸透し、主にミトコンドリアに局在するのだが、BODIPY-DIF-3G はミトコンドリアの膨潤を誘導するが、BODIPY-DIF-3R はミトコンドリアの形状に影響しないこと、④BODIPY-DIF-3G はマウス肝臓細胞から単離したミトコンドリアの酸素消費を促進するが、BODIPY-DIF-3R はミトコンドリアの酸素消費には影響しないこと、等を見出した。これらの結果から、生物活性を有する DIF 誘導体は、ミトコンドリアの活性に影響することによって少なくとも一部その作用を発揮していることが示唆された。



8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

(学会発表)

1) 久保原禪、菊地晴久、松尾祐介、大島吉輝、本間好「生物活性の無い DIF-3 蛍光体の特性」日本細胞性粘菌学会第3回例会 2013年10月13日 京都

(論文発表)

1) Kubohara Y, Kikuchi H, Matsuo Y, Oshima Y, & Homma Y. Mitochondria are the target organelle of differentiation-inducing factor-3, an anti-tumor agent isolated from *Dictyostelium discoideum*. **PLoS ONE** 8(8), e72118. (2013).

2) Kubohara Y, Kikuchi H, Matsuo Y, Oshima Y, & Homma Y. Properties of a non-bioactive fluorescent derivative of differentiation-inducing factor-3, an anti-tumor agent found in *Dictyostelium discoideum*. **Biology Open** 3, 289-296. (2014).