

博士学位論文

題目

細胞内中性脂質代謝を制御する天然化合物の探索
および作用機序解析

北里大学大学院薬学研究科 薬学専攻
薬物治療学 I (微生物薬品化学)

小林 啓介

略語

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

ACS: acyl CoA synthetase

ADP: adenosine diphosphate

AMPK: adenosine monophosphate activated protein kinase

ATGL: adipose triacylglycerol lipase

ATP: adenosine triphosphate

BafA1: bafilomycin A1

BafC1: bafilomycin C1

BafL: bafilomycin L

BSA: bovine serum albumin

CD: circular dichroism

CE: cholesteryl ester

CETP: cholesteryl ester transfer protein

CHO: Chinese hamster ovary

CoA: coenzyme A

COSY: correlation spectroscopy

DGAT: diacylglycerol acyltransferase

DMSO: dimethyl sulfoxide

DPA: dinapinone A

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ER: endoplasmic reticulum

ESI: electrospray ionization

EtOAc: ethyl acetate

EtOH: ethanol

FAB: fast atom bombardment

FBS: fetal bovine serum

FKBP: FK502-binding protein

HDL: high density lipoprotein

HMBC: heteronuclear multiple bond correlation
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HMQC: heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC: high performance liquid chromatography
HRP: horseradish peroxidase
HSL: hormone-sensitive lipase
IC₅₀: a drug concentration requiring 50% inhibition of biological activity
LDL: low density lipoprotein
LPDS: lipoprotein-deficient serum
MeOH: methanol
mTOR: mammalian target of rapamycin
MTT: methyl thiazolyl tetrazolium
MS: mass spectrometry
NMR: nuclear magnetic resonance
NOE: nuclear overhauser effect
NPC1L1: Niemann-Pick C1 like 1
ODS: octa decyl silyl
p70S6K: 70-kDa ribosomal protein S6 kinase
p-p70S6K: phosphor p70S6K
PBS: phosphate buffer saline
PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PCV: packed cell volume
PE: phosphatidylethanolamine
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PL: phospholipid
PS: phosphatidylserine
P/S: penicillin/streptomycin
PVDF: polyvinylidene difluoride
ROESY: rotating overhauser enhancement and exchange spectroscopy
rpm: rotation per minute
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SOAT: sterol *O*-acyltransferase

sp.: species

TFA: trifluoroacetic acid

TG: triacylglycerol

TLC: thin layer chromatography

TMED: N, N, N, N-tetramethylethylenediamine

Tris: 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

TSC2: tuberous sclerosis protein 2

Tween 20: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

UFLC: ultra fast liquid chromatography

UV: ultra violet

目次

略語

I. 序論	1
II. 本論の部	8
第 1 章 微生物資源からの細胞内中性脂質蓄積阻害物質の探索	9
1-1. スクリーニング方法	9
1-2. スクリーニング結果	9
1-3. 精製候補サンプルの検討結果	10
1-4. 考察	10
第 2 章 海洋由来放線菌 <i>Streptomyces</i> sp. OPMA00072 株の生産する細胞内 コレステリルエステル蓄積阻害物質 bafilomycin L に関する研究	13
2-1. <i>Streptomyces</i> sp. OPMA00072 株の培養および bafilomycin 類の単離精製	14
2-1-1. Bafilomycin 類生産菌の培養	
2-1-2. Bafilomycin 類の単離精製	
2-2. Bafilomycin 類の物理化学的性状および化学構造	17
2-2-1. Bafilomycin 類の物理化学的性状	
2-2-2. Bafilomycin L の構造解析	
2-2-3. 小括	
2-3. Bafilomycin L の細胞内中性脂質蓄積阻害活性および作用機序解析	27
2-3-1. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性	
2-3-2. ミクロソーム画分を用いた SOAT 阻害活性	
2-3-3. CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性	
2-3-4. マクロファージ内中性脂質蓄積阻害活性	
2-3-5. 細胞内酸性化の抑制活性	
2-3-6. <i>In vitro</i> V-ATPase 阻害活性	
2-3-7. 変異酵母を用いた V-ATPase 結合部位の推定	
2-3-8. 小括	

2-4. 考察	37
Supplemental figure	39
第 3 章 海洋由来放線菌 <i>Nocardiosis sp. KM2-16</i> 株の生産する SOAT2 阻害物質ジケトピペラジン化合物に関する研究	45
3-1. <i>Nocardiosis sp. KM2-16</i> 株の培養およびジケトピペラジン化合物の 単離精製	46
3-2. ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状および化学構造	48
3-2-1. ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状	
3-2-2. 化合物 A の構造解析	
3-2-3. 小括	
3-3. ジケトピペラジン化合物の細胞内中性脂質蓄積阻害活性 および SOAT 阻害活性	56
3-3-1. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性	
3-3-2. ミクロソーム画分を用いた SOAT 阻害活性	
3-3-3. 小括	
3-4. 考察	58
Supplemental figure	60
第 4 章 真菌 <i>Talaromyces pinophilus</i> FKI-3864 株が生産する 中性脂質蓄積阻害物質 dinapinone A の作用機序解析	67
4-1. TG 生合成経路中の酵素に対する阻害活性	70
4-1-1. GPAT および AGPAT に対する阻害活性	
4-1-2. PAP に対する阻害活性	
4-1-3. DGAT に対する阻害活性	
4-2. 中性脂質分解促進活性	72
4-3. Lipolysis の影響	73
4-4. オートファジー経路への影響	74
4-4-1. LC3 タンパク質の定量	
4-4-2. オートファジー促進活性	
4-4-2-1. オートファジーフラックスアッセイ	
4-4-2-2. p62 タンパク質の定量	

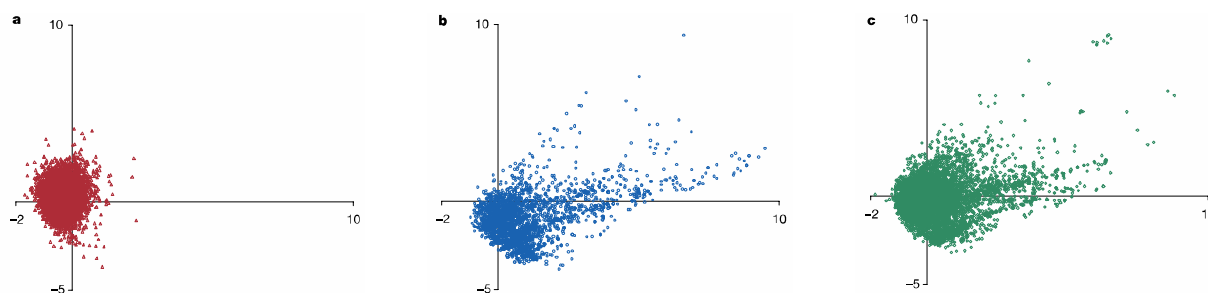
4-4-3. mTOR 経路への影響	80
4-5. 考察	82
III. 総括	85
IV. 実験の部	90
V. 謝辞	119
VI. 参考文献	122

I. 序論

植物、動物、微生物などの生物が代謝によって作る有機化合物は天然化合物もしくは天然物と呼ばれ、大きく 2 つに分類される。1 つは、一次代謝産物といい、生物が生存に必要な物質やエネルギーを獲得するために生産する、糖類、脂質、タンパク質、核酸などのことを指す。一方、生物共通の生命現象に直接関与しない物質のことを二次代謝産物といい、今日までに医薬品の重要な探索源とされてきた^{1,2)}。

1920 年代以前、医薬品として利用されてきた天然物、もしくは医薬品開発の元となった天然物は生薬や植物から得られたものがほとんどであったが、1928 年に Fleming が真菌 *Penicillium notatum* から抗細菌薬である penicillin を発見したのに続き、Waksman は 1943 年に放線菌より抗細菌薬である streptomycin を発見した。Streptomycin は、当時深刻な社会問題であった結核感染症に有効な治療薬であったため、微生物の二次代謝産物が医薬品の探索源として注目を浴びるようになった³⁾。1940 年代から 1970 年代までは、抗生物質の黄金期と呼ばれるほど抗微生物活性が着目されてきたが、1970 年代以降、探索研究の標的は感染症から、がんや生活習慣病など幅広い範疇の生物活性にまでおよんだ。実際に、真菌 *Aspergillus terreus* からの lovastatin⁴⁾ などの脂質異常症治療薬や、真菌 *Tolypocladium inflatum* からの免疫抑制剤 cyclosporine⁵⁾、放線菌 *Streptomyces avermitilis* からの抗寄生虫薬 avermectin⁶⁾ など、多様な構造と生物活性を有する化合物が発見され、微生物の二次代謝産物は創薬資源として大きく貢献してきた。実際に、現在の医薬品の総売上上の約 60% は天然物もしくは天然物をリード化合物としたものであり、その中でも約 30% を微生物代謝産物あるいはその誘導体が占めていることから⁷⁾、微生物の二次代謝産物は今なお重要な創薬資源であると考えられる。

それにもかかわらず、現代では医薬品開発のための資源として、天然物を対象とした医薬品開発は縮小傾向にあり、コンビナトリアルケミストリーの手法による合成化合物や、抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬品に取って代わってきているのが現状である。しかし、2003 年に Feher らが、合成化合物、天然化合物、実際に医薬品になっている化合物について、これら化合物の分子量、分子内不斉炭素の数、芳香環・複素環の数といった構造の多様性などを多変量解析し、二次元スポットした結果から、合成化合物と比較した天然物の有用性を示している (Figure 1)⁸⁾。合成化合物はスポットが狭い空間に固まっている一方で、天然物と医薬品はそのスポットが広い空間に広がっている。すなわち、合成化合物は特性の類似した化合物群を示すのに対し、天然物と医薬品は構造的に多様性に富んだ化合物群であることが示された。この天然物が示す多様性により「ケミカルバイオロジー」研究が発展してきた。



Fisher M. & Schmidt J. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 218-227 (2003)

Figure 1 Comparison of the properties of different classes of molecule.
a; combinatorial chemistry, b; natural products, c; drugs.

ケミカルバイオロジーとは、1991年に Schreiber らによって提唱された、多様な低分子化合物を用いて生体分子の機能を制御し、生命現象を解明する学問である⁹⁾。低分子化合物の標的分子が疾患に関連している分子である場合、疾患治療薬の新たな標的の提唱につながり、さらにその化合物自身が分子標的治療薬のリード化合物となりうることから、ケミカルバイオロジーは創薬研究において重要な手法として認識されてきた。その一例として FK506 が挙げられる。FK506 は、放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* の二次代謝産物中より T 細胞増殖を抑制する化合物として発見され、T 細胞の活性化に必須なインターロイキン 2 の産生を抑制していた^{10,11)}。その作用機序は、イムノフィリン FKBP (FK506-binding protein) 12 と結合することにより Ca^{2+} 依存的ホスファターゼであるカルシニューリンと結合しその機能を抑制することが明らかとなった⁹⁾。この研究により、FK506 は免疫抑制剤 Prograf[®] として現在臨床で用いられているだけでなく、T 細胞の活性化に関わる新しい生体内シグナルの解明につながった。著者らの研究グループでも、真菌より発見した celurenin が脂肪酸合成酵素を阻害すること¹²⁾、放線菌より発見した triacsin 類が アシル CoA 合成酵素 (ACS) を阻害すること¹³⁾などを見出し、これらの化合物は広く生化学試薬として用いられ、様々な生命現象を理解する上で役立ってきた。このように、生物活性を示す天然物を探索し、その作用機序を解明することは、新たな生体内分子の同定やその機能の解明、新たな生体内シグナルの発見に繋がる可能性を秘めているといえる。これらのことから、著者は天然物に対して非常に魅力を感じ、天然物、特に微生物の二次代謝産物からの生物活性物質の探索とそのメカニズムの解明を研究テーマとした。生物活性としては、細胞内の中性脂質の蓄積の阻害に着目した。

Figure 2 に 2014 年度の我が国における死亡別死因割合のグラフを示した¹⁴⁾。その中で第

2 位は心疾患、および第 4 位は脳血管疾患であり、その両者を合わせるとその割合は約 25% にも達する。この割合は第 1 位のがんにも匹敵することから、これらの疾患の予防治療は非常に重要であるといえる。心脳血管疾患の発症の大部分にはアテローム性動脈硬化症が関与しており、加齢や家族歴、喫煙習慣、高血圧、肥満など様々な原因が挙げられるが、中でも脂質異常症が主たる要因と考えられている。脂質異常症とは中性脂質であるコレステリルエステル (CE) およびトリアシルグリセロール (TG) が生体内に過剰に蓄積した状態のことである¹⁵⁾。

動脈硬化症では CE の蓄積が主原因となるが¹⁶⁻¹⁹⁾、その治療薬として現在我が国のみならず欧米諸国でも広く用いられているのが 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤のスタチン系薬剤である^{20, 21)}。しかし問題点として、重篤な副作用である横紋筋融解症がある点、さらに、実際には 30~40% しか動脈硬化性疾患の発症を抑制していないという報告もあり²²⁾、全ての患者に対して有効であるわけではない。そこで一般的には作用機序の異なる別の薬剤との併用が行われる。血中コレステロール低下作用を目的としたものには、胆汁酸の吸収阻害をする cholestyramine²³⁾ などのイオン交換樹脂製剤、小腸細胞の刷子縁膜に存在する NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1) を阻害することで小腸からのコレステロール吸収を抑制する ezetimibe²⁴⁾ などがある。しかし、作用機序の異なる ezetimibe とスタチン系化合物との併用効果には期待が寄せられていたが、simvastatin 単独投与時に比べ、simvastatin と ezetimibe の併用時には血中低比重リポタンパ

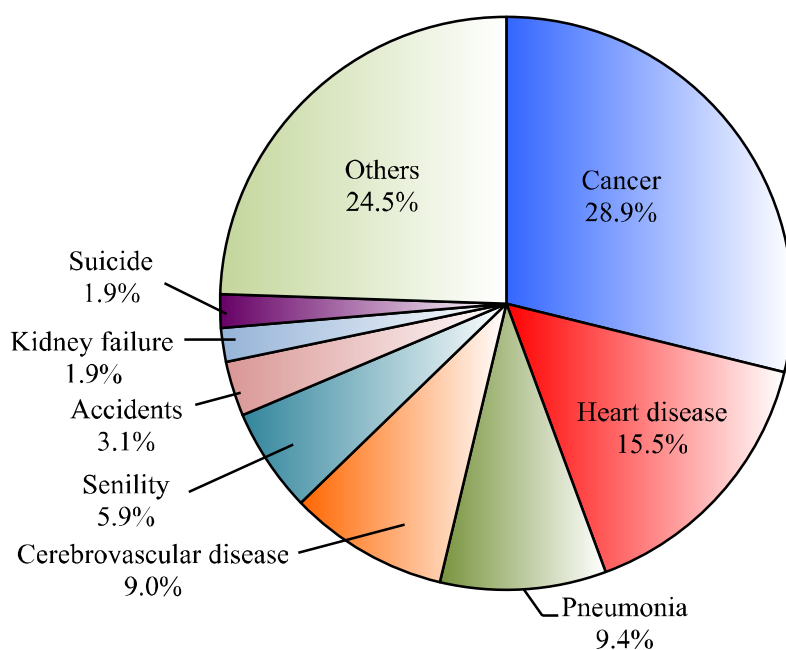


Figure 2 Cause of death in Japan (2014).

ク質 (LDL) 値が低下はするものの、頸動脈内膜の肥厚に有意差は認められなかったことが明らかとなった^{25,26)}。最近では、高比重リポタンパク質 (HDL) の増加を目的としたコレステリルエステル転送タンパク (CETP) 阻害剤²⁷⁾や、LDL 受容体の分解を妨げ LDL の異化促進を目的とした PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 阻害剤²⁸⁾の開発も行われているが、CETP 阻害剤は臨床試験で副作用が見出されたことや有意差が見られなかったこと²⁹⁾、PCSK9 阻害剤は抗体医薬品であり高価であることなどから、既存の医薬品だけでは動脈硬化性疾患の予防治療に十分とはいえない。

また、肥満はエネルギー貯蔵分子である TG が脂肪細胞に過剰に蓄積されることによって起こる病態である³⁰⁾。肥満の進展は、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高血圧といった慢性疾患を引き起こし、最終的には動脈硬化性疾患へとつながっていくことから³¹⁾、抗肥満薬の開発も求められている。現在日本で唯一承認されている抗肥満薬に中枢性食欲抑制剤の mazindol³²⁾がある。これは中枢性に働くことで食欲を低減し食事摂取量を減少させることでエネルギーの吸収を抑制する作用をもつ³²⁾。しかし、中枢性食欲抑制剤では口渇、便秘、幻聴、幻視や依存性などの副作用が生じるという問題がある³²⁾。その他の中枢性の抗肥満薬として、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害の sibtramine³³⁾や、カンナビノイド受容体拮抗薬の limonabant³⁴⁾が開発されたが、いずれも副作用の発現により開発が中止された^{35,36)}。また、腓リパーゼ阻害剤である orlistat³⁷⁾は世界中で比較的使用されている薬剤であるが、脂溶性ビタミンの欠乏、下痢などの副作用もあり、我が国では製造承認がなされていない。このように、抗肥満薬はその開発が進んでいないだけでなく、TG の代謝に直接的に影響をおよぼすような化合物はほとんどないのが現状である。

こうした背景のもと、著者らの研究グループは長年、様々な評価系を用いて、微生物の二次代謝産物からの中性脂質の生成・蓄積を制御する低分子化合物の探索を行ってきた。細胞レベルでは、動脈硬化初期病巣を模倣した、マクロファージの脂肪滴形成による泡沫化の阻害を指標にした評価系によって、真菌の培養液より中性脂質 (CE もしくは TG) 蓄積阻害活性を示す新規化合物 beauveriolide III³⁸⁾、phenochalasin A³⁹⁾、isobisvertinol⁴⁰⁾、sependole⁴¹⁾などを発見した (Figure 3)。特に beauveriolide III は、動脈硬化発症モデルマウスに対しての *in vivo* での有効性が示され⁴²⁾、コンビナトリアルケミストリーにより約 300 種の誘導体が合成される⁴³⁾など、動脈硬化予防治療のリード化合物となる可能性が示されている。また、酵素レベルでは、ラット肝ミクロソームを用いた評価系によって、TG 合成酵素である ジアシルグリセロールアシル転移酵素 (DGAT) の阻害剤として roselipine 類⁴⁴⁾や amidepsine

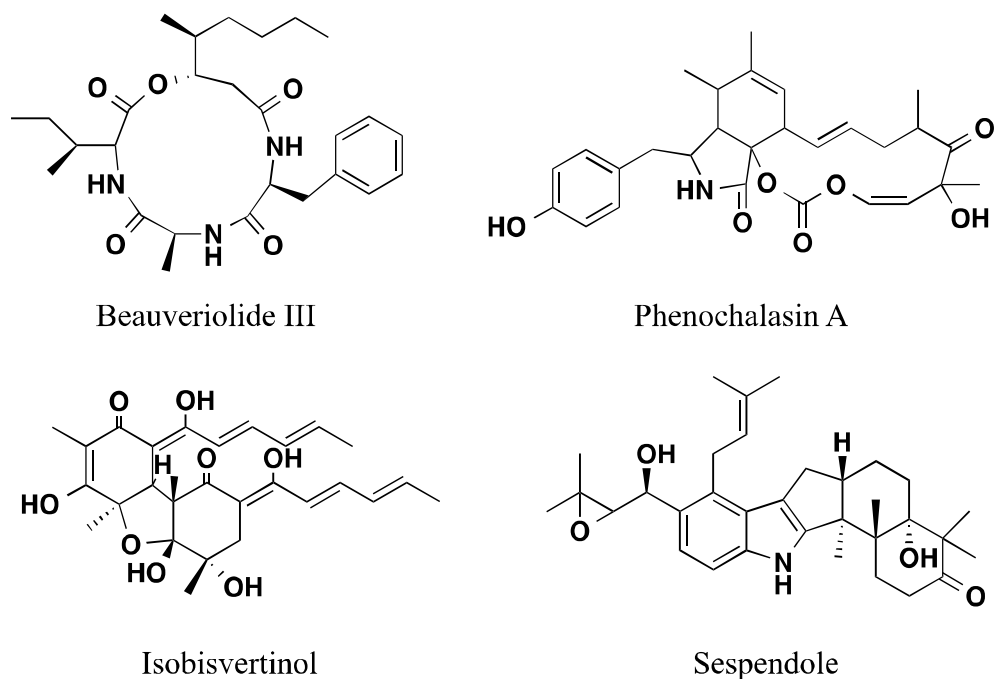


Figure 3 Representative inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages.

類⁴⁵⁾が、CE 合成酵素であるステロール *O*-アシル転移酵素 (SOAT) の阻害剤として pyripyropene 類⁴⁶⁾などが見出された (Figure 4)。特に SOAT は、ポストスタチンとしての動脈硬化予防治療の有望な標的分子として考えられてきた酵素であり、1980 年代から多くの製薬企業が SOAT 阻害剤の開発を行ってきた⁴⁷⁾。しかし、これらの合成 SOAT 阻害剤は副作用の問題⁴⁸⁾などにより、その開発が中止され、未だ実用化には至っていない。そのような中、近年の分子生物学的な研究の発展により、SOAT には SOAT1 と SOAT2 の 2 つのアイソザイムが存在することが明らかとなった⁴⁹⁻⁵²⁾。SOAT1 と SOAT2 は生体内における局在が異なり、SOAT1 はマクロファージ、副腎髄質、尿細管、神経などほぼ全身の組織および細胞に発現しているのに対して、SOAT2 は小腸と肝臓に特異的な発現が認められた⁵¹⁾。すなわち、SOAT1 は全身性にコレステロールの恒常性を維持する役割があるのに対し、SOAT2 は食餌性のコレステロール吸収に関与していることが示され^{53, 54)}、SOAT2 により生成する CE と動脈硬化発症との相関が明らかとなってきた⁵⁵⁻⁵⁸⁾。またノックアウトマウスの実験から、SOAT2 のノックアウトにより動脈硬化抑制効果が認められたのに対し⁵⁹⁾、SOAT1 のノックアウトではドライアイなどの副作用や⁶⁰⁾、動脈硬化病巣を逆に悪化させたという結果^{61, 62)}も報告されている。これらのことより、動脈硬化疾患の予防治療には SOAT2 の選択的な阻害が重要であることが示唆されている。

この考えのもと、著者らの研究グループは、アフリカミドリザルの SOAT1 および

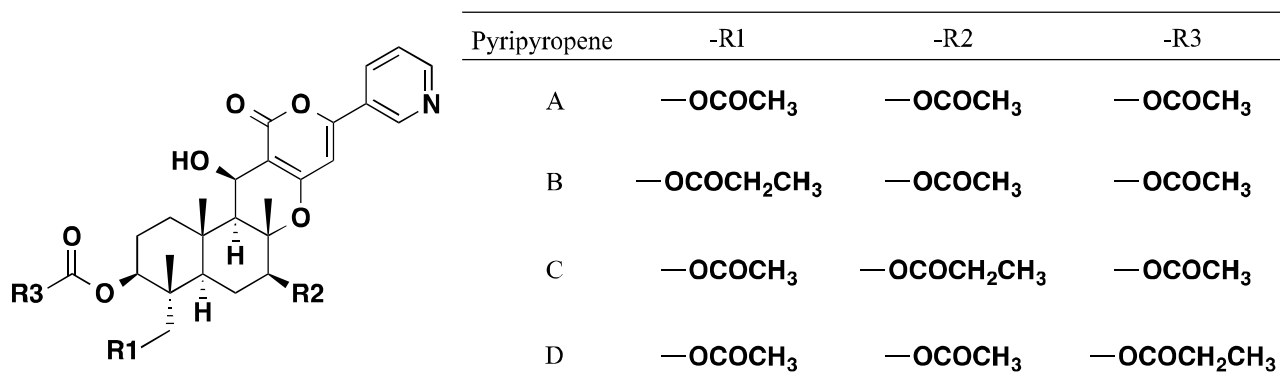


Figure 4 Structures of pyripyropenes.

SOAT2 をそれぞれ選択的に発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞⁶³⁾を用いた、細胞レベルでの SOAT アイソザイムに対する選択性を識別できる評価系を構築した。この評価系を用いて、前述した pyripyropene A (Figure 4) が SOAT2 に対して 1,000 倍以上の高選択性を有することが明らかとなり⁶⁴⁾、動脈硬化発症モデルマウスにおいても、コレステロール低下作用と動脈硬化の進展抑制作用をもつことが示されている⁶⁵⁾。本評価系は、細胞レベルで SOAT2 を介した CE の生成だけでなく、一連の TG 代謝も評価できる点の特徴である。これまでに CE および TG の蓄積阻害物質である dinapinone A⁶⁶⁾、CE 蓄積阻害物質である verticilide 類⁶⁷⁾、TG 蓄積阻害物質である isochaetochromin 類⁶⁸⁾などが発見されており、本評価系は有用である。そこで著者も、本評価系を用いて、天然物、特に微生物の二次代謝産物中より、細胞内の中性脂質の蓄積を制御する物質の探索を行い、活性物質の作用機序の解析を行うことを研究テーマとした。

本論文の第 1 章では、SOAT2-CHO 細胞を用いて、微生物資源からの CE、TG 蓄積阻害活性物質の探索とその結果について述べる。第 2 章では CE 蓄積阻害活性を示した放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株から発見した bafilomycin 類の単離精製、新規化合物 bafilomycin L の構造解析、およびその作用機序解析について述べる。第 3 章では、CE 蓄積阻害活性を示した放線菌 *Nocardioopsis* sp. KM2-16 株から発見したジケトピペラジン化合物の単離精製、構造解析、および作用機序解析について述べる。第 4 章では、中性脂質蓄積阻害活性を示す dinapinone A の作用機序解析について述べる。

II. 本論

第 1 章

微生物資源からの細胞内中性脂質蓄積阻害物質の探索

生体内に蓄積される中性脂質としてコレステリルエステル (CE) とトリアシルグリセロール (TG) が挙げられる。それらは生体内で重要な役割を果たしているが、過剰な蓄積は様々な疾患を引き起こす。例えば CE のマクロファージへの過剰な蓄積は動脈硬化症を促進することが知られており¹⁶⁻¹⁹⁾、脂肪細胞への TG の過剰な蓄積は肥満の原因となると考えられている³⁰⁾。我々のグループでは CE 蓄積阻害の標的分子としてステロール *O*-アシル転移酵素 (SOAT) 2 に着目し、SOAT2 を選択的に発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた評価系を構築した^{63, 64)}。本評価系では、細胞レベルで SOAT2 を介した CE 生成だけでなく、TG の生成も同時に検出することができる。これまでに TG 蓄積阻害物質である dinapinone A⁶⁶⁾ (第 4 章参照)、CE 蓄積阻害物質である verticilide 類⁶⁷⁾、TG 蓄積阻害物質である isochaetochromin 類⁶⁸⁾などを発見し、多様な生物活性を示していることから、本評価系は有用である。本章では、本評価系を用いた微生物資源からの細胞内の中性脂質蓄積阻害物質のスクリーニング結果について述べる。

1-1. スクリーニング方法

定法⁶⁴⁾にしたがい、アフリカミドリザルの SOAT2 を選択的に発現させた CHO 細胞 (SOAT2-CHO 細胞) に [¹⁴C]oleic acid と微生物培養液サンプルを添加して 6 時間培養した。その後、細胞内の全脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離後、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG および [¹⁴C]リン脂質 (PL) の放射活性を測定した。ここで、PL は細胞膜の主要な構成成分であることから、細胞毒性の指標として用いた。選択基準は、1) CE 蓄積阻害は SOAT2-CHO 細胞内の CE 蓄積をコントロールと比べ 70% 以上阻害していること、2) TG 蓄積阻害は SOAT2-CHO 細胞内の TG 蓄積をコントロールと比べ 40% 以上阻害していること、3) 顕微鏡下において細胞に形態学的異常が認められず、PL の著しい低下が認められないものと定めた。

1-2. スクリーニング結果

当研究室で保有している放線菌と真菌、および東京海洋大学より供給された放線菌を用い

Table 1-1 Result of screening for neutral lipid accumulation inhibitors from microorganisms.

Origin	Sample number	CE	TG
Actinomycetes	4,749	153	27
Fungus	749	2	0
Total	5,498	155	27

て作製された培養液、秋田県立大学、OP-BIO ファクトリー株式会社より供給された放線菌培養液および培養抽出物の計 5,498 サンプルを評価した。その結果、CE 蓄積阻害活性として放線菌培養液より 153 サンプルおよび真菌培養液より 2 サンプルを得た。また TG 蓄積阻害サンプルは、放線菌培養液より 27 サンプルが得られ、真菌培養液からは得られなかった (Table 1-1)。

1-3. 精製候補サンプルの検討結果

1-2. で示した精製候補サンプルのうち、阻害活性の強さを指標とし、CE 蓄積阻害活性を示した 30 サンプル、TG 蓄積阻害活性を示した 15 サンプルについて、少量培養を行い活性の再現性の確認をした。その結果、11 サンプルに活性の再現が得られ、活性物質を単離精製および同定した (Table 1-2、Figure 1-1)。CE 蓄積阻害活性物質として、放線菌より、OPMA00072 株から bafilomycin C1⁶⁹⁾ および新規化合物 bafilomycin L⁷⁰⁾ (第 2 章参照) を得た。OPMA40113 株からは 17-*O*-demethyl geldanamycin⁷¹⁾ を得た。OPMA90034 株からは bafilomycin B1⁶⁹⁾ を得た。OPMA90341 株からは staurosporine⁷²⁾ を得た。OPMA90349 株および KM2-12 株からは dinactin⁷³⁾ を得た。KM2-16 株からはジケトピペラジン化合物として天然新規化合物である化合物 A⁷⁴⁾ および amaumine⁷⁵⁾ (第 3 章参照) を得た⁷⁶⁾。また真菌からは、BF-0131 株より新規化合物 clonoamide⁷⁷⁾、BF-0142 株より新規化合物 helvamide⁷⁸⁾ をそれぞれ得た。また TG 蓄積阻害活性物質として、放線菌 KM2-8 株および OAT28 E10 株より triacsin C⁷⁹⁾ を得た。

1-4. 考察

SOAT2-CHO 細胞を用いて微生物培養液 5,498 サンプルを対象にスクリーニングを行った結果、11 個の中性脂質蓄積阻害物質を単離および同定した。17-*O*-demethyl geldanamycin

の類縁体である geldanamycin⁷¹⁾ は heat-shock protein 90 (Hsp90) の阻害剤として⁸⁰⁾、staurosporine はプロテインキナーゼ C をはじめとした種々のキナーゼ阻害剤として⁸¹⁾それぞれ抗がん作用を示すことが報告されている。Dinactin については、イオノフォア活性⁸²⁾などが報告されている。Triacsin C についてはアシル CoA 合成酵素 (ACS) の阻害作用が報告されている⁸³⁾。ACS が抑制されることで、添加した [¹⁴C]oleic acid から [¹⁴C]oleoyl-CoA への変換が阻害されることにより、TG の蓄積が減少したと考えられる。新規化合物 clonoamide については、その CE 蓄積阻害活性の作用点を CE 合成酵素である SOAT と決定した⁷⁷⁾。新規化合物 helvamide の作用点については現在解析中である。

新規化合物 bafilomycin L を含む bafilomycin 類の作用機序解析については第 2 章で詳細に述べる。また KM2-16 株より得られたジケトピペラジン化合物については第 3 章で詳細に述べる。

Table 1-2 Inhibitors of neutral lipid accumulation.

Strain number	Origin	Activity	Active compound	Ref
OPMA00072	Actinomycetes	CE	Bafilomycins C1 and L	69, 70
OPMA40113	Actinomycetes	CE	17-O-demethyl geldanamycin	71
OPMA90034	Actinomycetes	CE	Bafilomycin B1	69
OPMA90341	Actinomycetes	CE	Staurosporine	72, 81
OPMA90349	Actinomycetes	CE	Dinactin	73, 82
KM2-8	Actinomycetes	TG	Triacsin C	78, 83
KM2-12	Actinomycetes	CE	Dinactin	73, 82
KM2-16	Actinomycetes	CE	Diketopiperazines	74-76
OAT28 E10	Actinomycetes	TG	Triacsin C	78, 83
BF-0131	Fungus	CE	Clonoamide	77
BF-0142	Fungus	CE	Helvamide	78

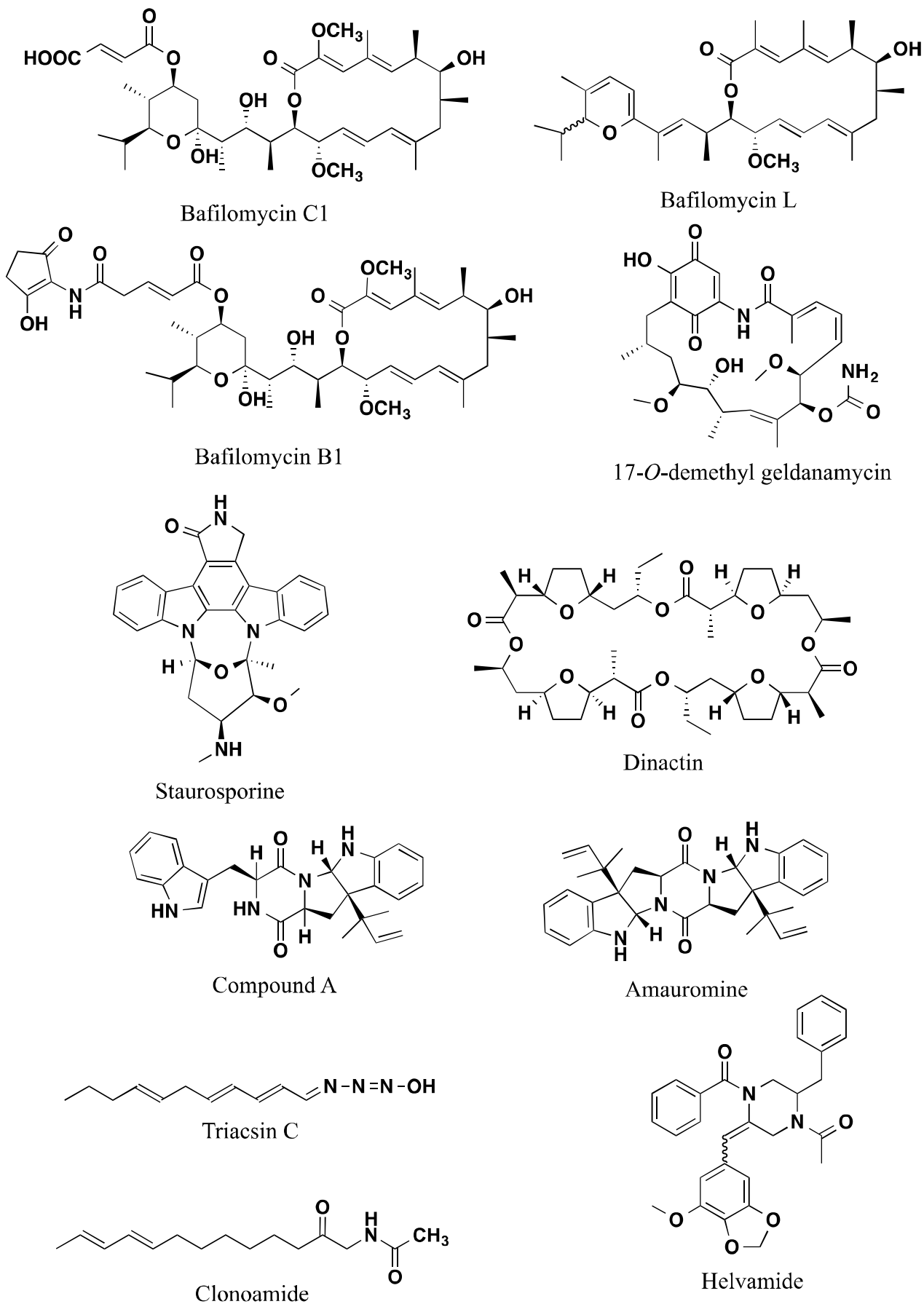


Fig 1-1 Structures of inhibitors of neutral lipid accumulation discovered in this screening.

第 2 章

海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の生産する 細胞内コレステリルエステル蓄積阻害物質 **bafilomycin L** に関する研究

海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株が 2 種の細胞内コレステリルエステル (CE) 蓄積阻害物質を生産していることを見出し、既知化合物 bafilomycin C1 (BafC1)⁶⁹⁾ および新規化合物 bafilomycin L (BafL) と決定した (Figure 2-1)。Bafilomycin 類は 16 員環マクロライド骨格を持つことが特徴であり、本研究以前に既に bafilomycin K まで報告されていたことから、本研究で発見した新規化合物を BafL と命名した。本章では、bafilomycin 類生産菌の培養および bafilomycin 類の単離精製、bafilomycin 類の物理化学的性状およびその化学構造、bafilomycin 類の細胞内における中性脂質蓄積に対する影響およびその作用機序の解析について述べる。

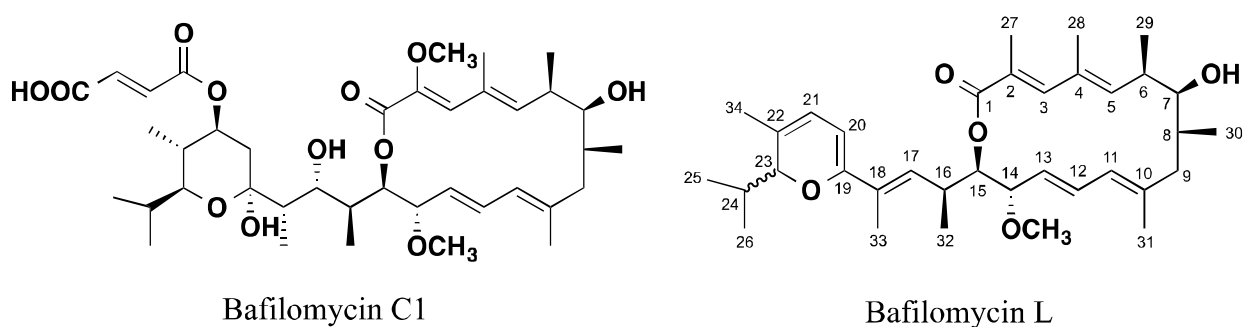


Figure 2-1 Structures of bafilomycins C1 and L.

2-1. *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の培養および bafilomycin 類の単離精製

2-1-1. Bafilomycin 類生産菌の培養

Bafilomycin 類の培養は、種培養と生産培養と 2 段階の培養法で行った。培養における生産菌の菌体量、培養液の pH、BafL の生産量の経時変化を Figure 2-2 に示した。菌体量 (PCV) は 3 日目からその増加が確認され、9 日目では 1 mL/2 mL と測定された。pH は、7 日目まで培養開始時と同じ pH 7.6 前後で推移し、9 日目には pH 8.1 と測定された。BafL は培養開始 5 日目からその生産が確認され、7 日目にその生産は最大 (5.3 $\mu\text{g/mL}$) となり、9 日目には 5.1 $\mu\text{g/mL}$ と測定された。

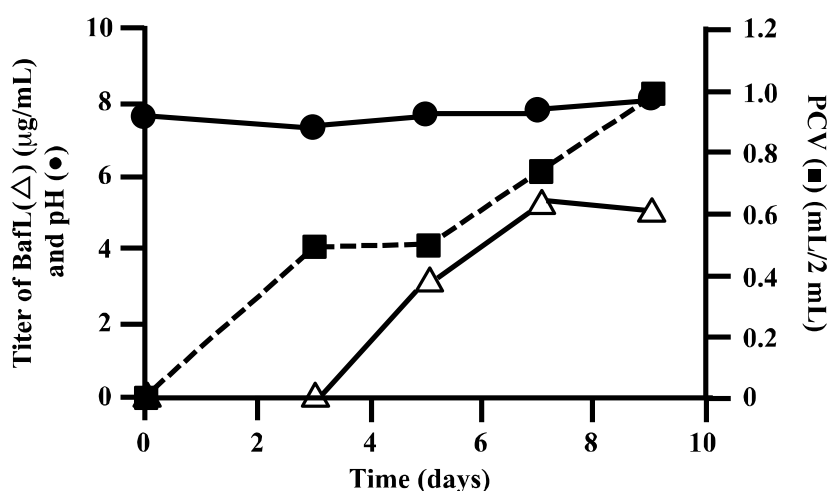
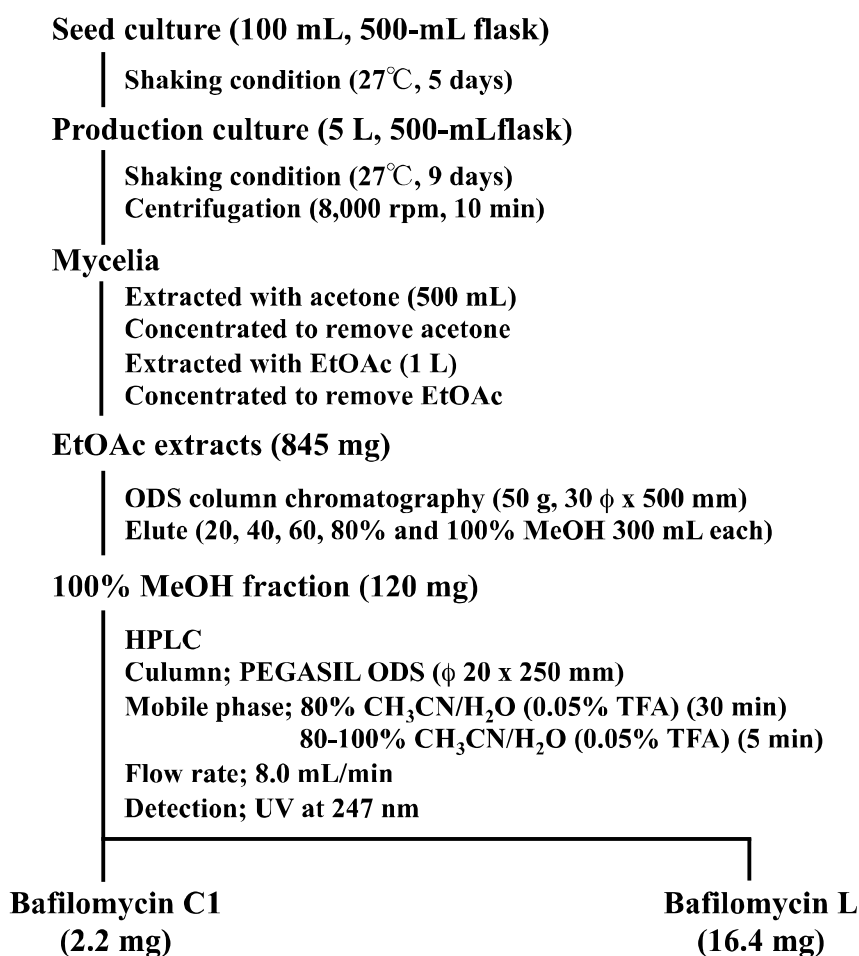


Figure 2-2 A time course of BafL production by *Streptomyces* sp. OPMA00072.

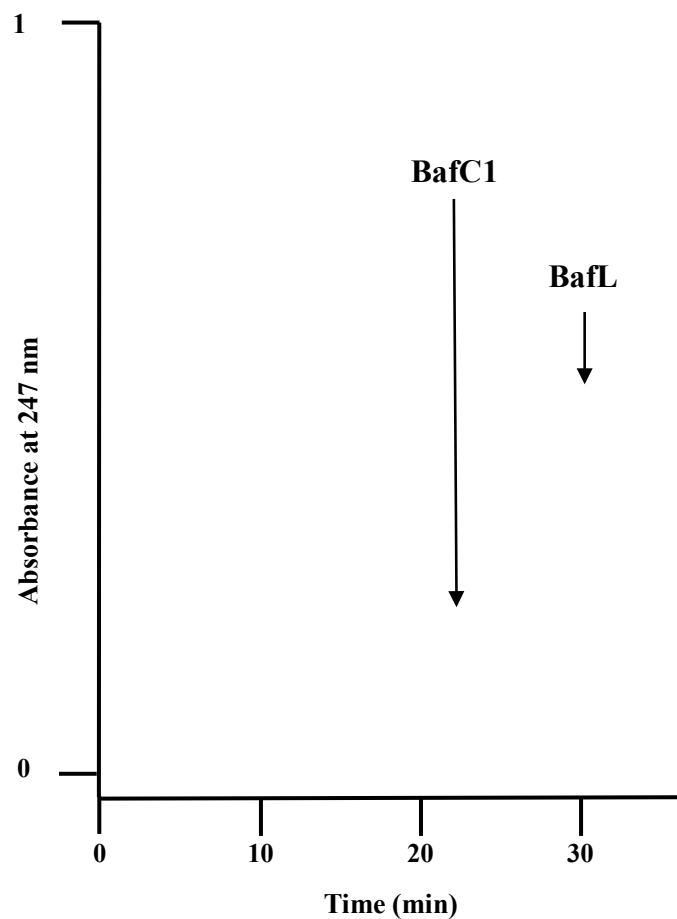
2-1-2. Bafilomycin 類の単離精製

Bafilomycin 類の単離精製の流れを Scheme 2-1 に示した。生産培養 9 日目の培養液 5 L を遠心処理 (8,000 rpm、10 分間) により上清と菌体に分離した。得られた菌体にアセトン 500 mL を加え約 1 時間超音波処理を行った後、吸引濾過を行い、菌体アセトン抽出液を取得した。得られた抽出液はロータリーエバポレーターでアセトンを留去後、水層画分に対し 500 mL の EtOAc を用いて 2 回抽出を行った。得られた EtOAc 抽出液 1 L は Na_2SO_4 を用いて残存した水分を吸着させた後、濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮することで暗緑色粗物質 845 mg を得た。続いてその粗物質を 20% MeOH 水溶液に懸濁し、ODS カラムクロマトグラフィー (50 g) に供した。溶出は 20、40、60、80 および 100% MeOH 水溶液を各 300 mL ずつ用いて段階溶出させた。CHO 細胞に対する中性脂質蓄積阻害活性を認めた 100% MeOH 溶出画分に対し、ロータリーエバポレーターを用

いて減圧濃縮することで黄色粗物質 (120 mg) を得た。得られた粗物質は CH₃CN (1.2 mL) に溶解させ、50 μL ずつ 24 回に分けて HPLC (移動相; 80% CH₃CN/H₂O (0.05% TFA) 30 min、80-100% CH₃CN/H₂O (0.05% TFA) 5 min liner gradient、流速; 8.0 mL/min、検出波長; 247 nm) に注入し各化合物を分離した (Figure 2-3)。この HPLC 分取条件により、保持時間 22 分および 31 分のピークをそれぞれ回収し、ロータリーエバポレーターにて CH₃CN を減圧濃縮後、凍結乾燥処理により、それぞれ黄色粉末である BafC1 (2.2 mg) および BafL (16.4 mg) を取得した。



Scheme 2-1 Isolation procedures of bafilomycins



HPLC condition
 Column; PEGASIL ODS (20 ϕ x 250 mm)
 Mobile phase; 80% CH₃CN/H₂O (0.05% TFA) 30 min
 80-100% CH₃CN/H₂O (0.05% TFA) 5 min liner gradient
 Flow rate; 8.0 mL/min
 Detection; UV at 247 nm

Figure 2-3 A chromatographic profile of isolation of bafilomycins C1 and L by preparative HPLC

2-2. Bafilomycin 類の物理化学的性質および化学構造

本研究により発見した bafilomycin 類のうち、BafC1 は、高分解能 MS スペクトルによる分子式、および特徴的な UV スペクトルより SciFinder を用いて同定した⁶⁹⁾。BafL は各種 NMR を中心としたスペクトル解析によりその相対立体構造を決定した。

2-2-1. Bafilomycin 類の物理化学的性状

本研究で取得した bafilomycin 類の物理化学的性状を Table 2-1 にまとめた。新規化合物 BafL は黄色粉末として単離した。また、高分解能 FAB-MS スペクトル解析により分子量を 552 およびその分子式を $C_{35}H_{52}O_5$ と決定した (Figure 2-4)。UV スペクトルは 214、245 および 280 nm に特徴的な極大吸収を示し、BafC1 の UV スペクトルと類似していた (Figure 2-5)。IR スペクトルでは 3427 cm^{-1} に水酸基、 1700 cm^{-1} にカルボニル基の吸収が観察された (Figure 2-6)。

Table 2-1 Physico-chemical properties of BafC1 and BafL.

	Bafilomycin C1	Bafilomycin L
Appearance	Pale yellow powder	Yellow powder
$[\alpha]_D^{28.7}$ ($c = 0.1, \text{MeOH}$)	N. T.*	- 11.7°
Molecular weight	720	552
Molecular formula	$C_{39}H_{60}O_{12}$	$C_{35}H_{52}O_5$
HR-FAB-MS (m/z)		
Calcd	743.3982 (M+Na) ⁺	553.3893 (M+H) ⁺
Found	743.3986 (M+Na) ⁺	553.3899 (M+H) ⁺
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ)	213, 225, 247, 287	214 (4.11), 245 (4.26), 280 sh (3.97)
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1})	N. T.	3427, 2964, 2926, 1700

* Not tested

553.3899 [M+H]⁺

Figure 2-4 FAB-MS spectrum of BafL.

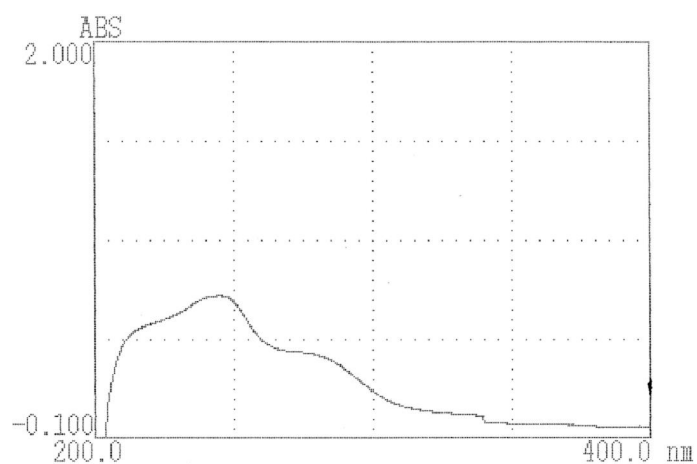


Figure 2-5 UV spectrum of BafL (in MeOH).

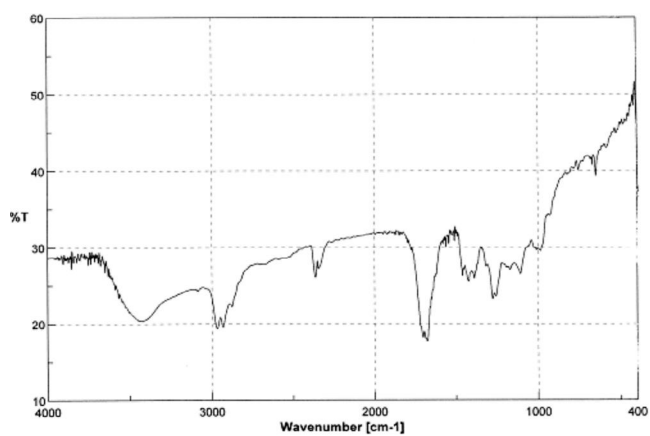


Figure 2-6 IR spectrum of BafL (KBr).

2-2-2. Bafilomycin L の構造解析

BafL の分子式は、高分解能 FAB-MS スペクトル測定 (m/z ; 計算値 553.3893, 実測値 553.3899 for $C_{35}H_{53}O_5$) より、 $C_{35}H_{52}O_5$ と決定した (Figure 2-4)。BafL の平面構造は、各種 NMR の解析を中心に行った。DMSO- d_6 溶液中で測定した ^{13}C NMR スペクトル (Supplemental figure 2-1) では 35 本の分離したシグナルを確認した。これらは 1 つのメトキシ炭素を含む 11 個の sp^3 メチル、1 つの sp^3 メチレン、8 つの sp^3 メチン、8 つの sp^2 メチン、1 つのカルボニル炭素を含む 7 つの 4 級炭素に分類した。DMSO- d_6 溶液中で測定した 1H NMR スペクトル (Supplemental figure 2-2) では、メトキシ基を 1 つ含む 11 個のメチルのシグナルを観察した。HMQC スペクトル (Supplemental figure 2-3) からは、水素の付加した炭素を全て対応させた (Table 2-2)。

1H - 1H COSY スペクトル解析 (Supplemental figure 2-4) からは、4 つの部分構造を明らかにした (Figure 2-12)。すなわち、6-H (δ 2.40) から 5-H (δ 6.02)、29- H_3 (δ 0.94)、7-H (δ 3.24) への相関、および 8-H (δ 1.68) から 7-H、30- H_3 (δ 0.91)、9- H_2 (δ 1.73, 2.32) への相関が観察されたことから部分構造 I を明らかとした。12-H (δ 6.31) から 11-H (δ 5.84)、13-H (δ 5.34) への相関、14-H (δ 3.70) から 13-H、15-H (δ 4.75) への相関、および 16-H (δ 2.80) から 15-H、17-H (δ 5.92)、32- H_3 (δ 0.88) への相関が観察されたことから部分構造 II を明らかとした。20-H (δ 5.29) から 21-H (δ 5.74) への相関が観察されたことから部分構造 III を明らかとした。24-H (δ 1.98) から 23-H (δ 4.31)、25- H_3 (δ 0.93)、26- H_3 (δ 0.87) への相関が観察されたことから部分構造 IV を明らかとした。

さらに、HMBC スペクトルより観察された 2J あるいは 3J の ^{13}C - 1H 遠隔カップリングの解析 (Supplemental figure 2-5) では次の構造を明らかとした。すなわち、1) 27- H_3 (δ 1.94) から C-1 (δ 168.1)、C-2 (δ 120.6)、C-3 (δ 145.9) への相関、28- H_3 (δ 1.87) から C-3、C-4 (δ 131.7)、C-5 (δ 145.7) への相関、29- H_3 から C-5、C-6 (δ 38.4)、C-7 (δ 78.4) への相関、30- H_3 から C-7、C-8 (δ 37.4)、C-9 (δ 41.6) への相関、31- H_3 (δ 1.56) からの C-9、C-10 (δ 140.5)、C-11 (δ 124.1) への相関、14-OCH $_3$ (δ 3.10) からの C-14 (δ 82.0) への相関、15-H から C-1 への相関、および 32- H_3 から C-15 (δ 77.2)、C-16 (δ 34.4)、C-17 (δ 128.1) への相関が観察されたことから部分構造 I および II を含む構造 (Part a) を明らかとした。2) 33- H_3 (δ 1.73) から C-18 (δ 127.6)、C-19 (δ 150.0) への相関、20-H から C-19、C-21 (δ 118.5)、C-22 (δ 128.5) への相関、34- H_3 (δ 1.73) から C-21、C-22、C-23 (δ 82.8) への相関、および 23-H から C-19、C-21、C-24 (δ 29.9)、C-25 (δ 18.7)、C-26 (δ 16.8)、C-34 (δ 20.0) への相関が観察されたこと

から部分構造 III および IV を含む構造 (Part b) を明らかとした。3) 17-H から C-19 への相関および 33-H₃ から C-17、C-18、C-19 への相関が観察されたことから、部分構造 a および b は 18 位炭素を介して結合していること、また 33 位のメチル炭素は 18 位炭素に結合しているということを明らかとした。4) 推定分子式 (C₃₅H₅₂O₅)、IR スペクトル解析結果 (3427 cm⁻¹ の吸収)、7 位炭素のケミカルシフト値 (δ 78.4) より、7 位炭素への水酸基の結合を明らかとした。1)~4) により BafL の平面構造を Figure 2-7 (a) のように決定した。

さらに BafL の立体化学を明らかにするために結合定数および ROESY 解析 (Supplemental figure 2-6) を行った。11-H (11.4 Hz)、12-H (11.4, 15.1 Hz)、13-H (5.3, 15.1 Hz) の結合定数値より 10 位炭素および 11 位炭素間の立体化学を *E* 配座、12 位炭素および 13 位炭素間の立体化学を *E* 配座と決定した。また、3-H から 5-H との間、6-H から 7-H、8-H、28-H₃ との間、7-H から 29-H₃ との間、8-H から 11-H との間、9-H から 30-H₃ との間、14-H から 14-OCH₃、15-H との間および 15-H から 32-H₃ への中で NOE の相関が観察されたことから (Figure 2-7 (b))、BafL の相対立体化学を 2*E*、4*E*、6*R*^{*}、7*S*^{*}、8*S*^{*}、14*S*^{*}、15*R*^{*}、16*S*^{*} と決定した。しかし、23 位炭素の立体化学については決定には至らなかった。以上のことより、BafL の立体構造を Figure 2-1 のように決定した。

Table 2-2 ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of BafL.

Bafilomycin L			
<i>Position</i>	δ_C (ppm) ^a	δ_H (ppm) ^b	<i>HMBC</i>
1	168.1	-	-
2	120.6	-	-
3	145.9	7.24 s	C-1, 2, 5, 27, 28
4	131.7	-	-
5	145.7	6.02 d (<i>J</i> = 8.8 Hz)	C-3, 6, 7, 29
6	38.4	2.40 m	C-4, 29
7	78.4	3.24 br	C-5, 29, 30
8	37.4	1.68 m	-
9	41.6	1.73 *, 2.32 dd (<i>J</i> = 10.6, 14.0 Hz)	C-7, 8, 10, 11, 31
10	140.5	-	-
11	124.1	5.84 d (<i>J</i> = 11.4 Hz)	C-9, 12, 13, 31
12	130.0	6.31 dd (<i>J</i> = 11.4, 15.1 Hz)	C-10
13	123.8	5.34 dd (<i>J</i> = 5.3, 15.1 Hz)	C-11, 14
14	82.0	3.7 br dd	C-12, 14-OCH ₃
15	77.2	4.75 dd (<i>J</i> = 3.0, 9.0 Hz)	C-1, 13, 14, 16, 32
16	34.4	2.80 m	C-15, 18, 32
17	128.1	5.92 d (<i>J</i> = 9.8 Hz)	C-15, 16, 19, 32, 33
18	127.6	-	-
19	150.0	-	-
20	98.8	5.29 d (<i>J</i> = 6.0 Hz)	C-19, 21, 22
21	118.5	5.74 dd (<i>J</i> = 1.5, 5.0 Hz)	C-19, 20, 23, 34
22	128.5	-	-
23	82.8	4.31 d (<i>J</i> = 5.5 Hz)	C-19, 21, 24, 25, 26, 34
24	29.9	1.98 m	C-23, 25, 26
25	18.7	0.93 d (<i>J</i> = 6.7 Hz)	C-23, 24, 26
26	16.8	0.87 d (<i>J</i> = 6.5 Hz)	C-23, 24, 25
27	13.1	1.94 s	C-1, 2, 3, 4
28	14.4	1.87 s	C-3, 4, 5
29	19.1	0.94 d (<i>J</i> = 7.5 Hz)	C-5, 6, 7
30	24.0	0.91 *	C-7, 8, 9
31	17.3	1.56 s	C-9, 10, 11
32	17.1	0.88 d (<i>J</i> = 6.7 Hz)	C-15, 16, 17
33	12.4	1.73 *	C-17, 18, 19, 20
34	20.0	1.73 *	C-21, 22, 23
14-OCH ₃	55.6	3.10 s	C-14

* Signals are overlapping.

^a Chemical shifts are shown with reference to DMSO-*d*₆ as δ 2.49.^b Chemical shifts are shown with reference to DMSO-*d*₆ as δ 39.7.

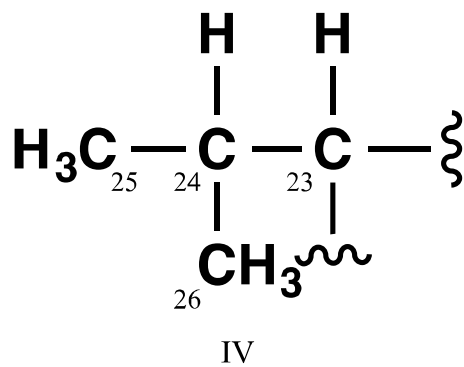
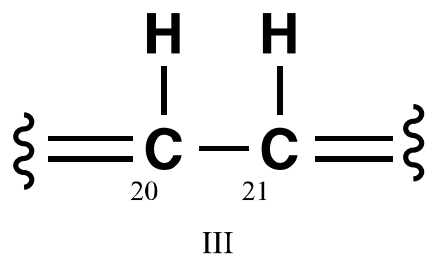
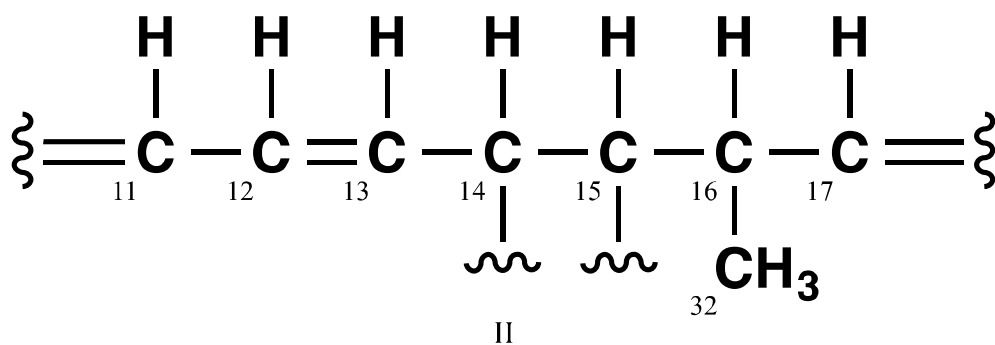
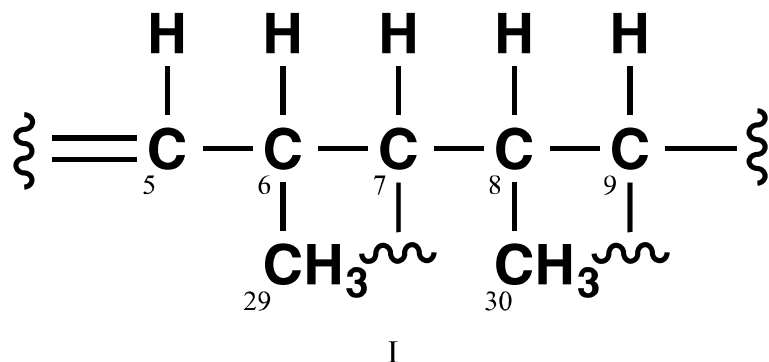


Figure 2-7 Partial structures I to IV of BafL.

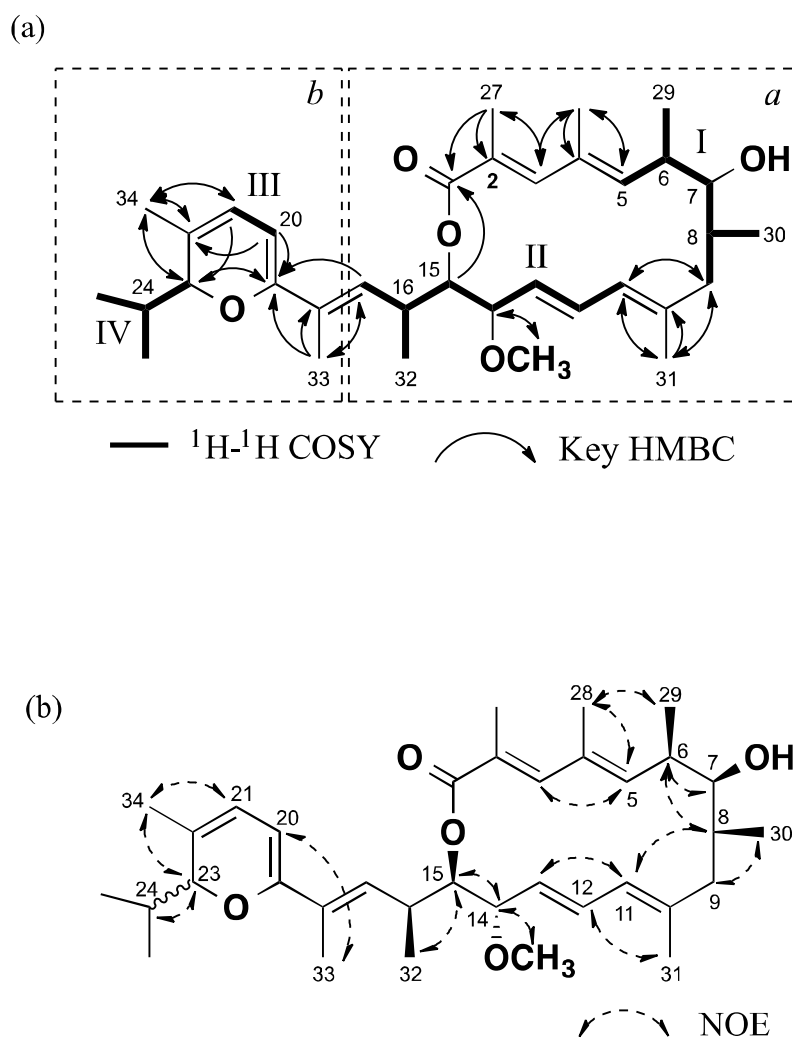


Figure 2-8 Structures elucidation of BafL.

(a) Key correlations in ^1H - ^1H COSY and HMBC spectra.

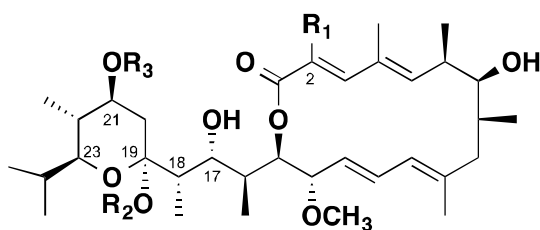
(b) ROESY experiments.

2-2-3. 小括

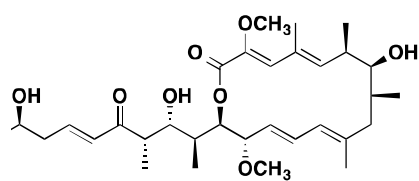
本節では、BafL の相対立体を含めた構造を各種スペクトル解析より決定した。

BafL の物理化学的性状は、黄色粉末であり、分子量 552、分子式 $C_{35}H_{52}O_5$ を示した。また UV スペクトルでは 214、245 および 280 nm に特徴的な極大吸収を示し、IR スペクトルでは 3427 、 1700 cm^{-1} にそれぞれ水酸基、カルボニル基に由来する特徴的な吸収が観察された。BafL の平面構造は、各種 NMR スペクトルおよびその分子式から考えて、16 員環マクロライドに α -ピラン環が結合した化合物であることを明らかとした。さらに立体化学を明らかにするために結合定数および ROESY 解析を行ったところ、BafL の相対立体構造を $2E$ 、 $6E$ 、 $10E$ 、 $12E$ 、 $6R^*$ 、 $7S^*$ 、 $8S^*$ 、 $14S^*$ 、 $15R^*$ 、 $16S^*$ と決定した。Bafilomycin 類の立体化学については、Baker らによる X 線結晶構造解析と NMR を用いた bafilomycin A1 (BafA1) の絶対立体配置の決定⁸⁴⁾、それに続く O'Shea らによる bafilomycin B1、C1 および D の絶対立体配置の決定⁸⁵⁾が報告されているが、本研究で得られた結果はこれらと良い一致を示した。

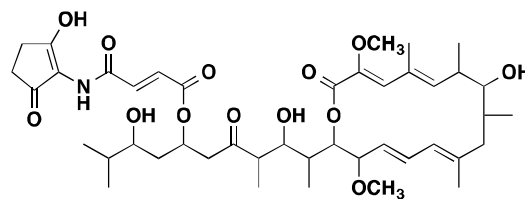
これまでに bafilomycin 類としては bafilomycin A1 ~ K までの 14 種類が報告されている^{69, 86-88)} (Figure 2-9)。構造的な違いとして 2 位の炭素、19 位の水酸基、21 位の水酸基に対する置換基の違いがある。2 位の炭素にはメトキシ基が結合しているものがほとんどであり、メチル基であるものは bafilomycin J および K の 2 化合物である。19 位の水酸基がメトキシ基である化合物は bafilomycin A2、B2、C2 の 3 化合物である。また 21 位の水酸基は最も反応性が高く、様々な側鎖の導入により、bafilomycin 類の構造の多様性がもたらされている。また bafilomycin 類は 16 員環マクロライドに加えテトラヒドロピラン環を有している。この環構造が失われたものとして bafilomycin D および E の 2 化合物がある。また、bafilomycin I はジヒドロピラン環を有しており、17 位の炭素の水酸基が失われている点で他の bafilomycin とは異なる特徴を有している。さらに bafilomycin 類と類似した 16 員環マクロライド構造を有する化合物として micromonospolide 類^{89, 90)}、JBIR-100⁹¹⁾、hygrolidin⁹²⁾、hygrobafilomycin⁹³⁾、makinolide 類^{94, 95)}が報告されている (Figure 2-10)。Bafilomycin 類と同様、2 位の炭素、21 位の水酸基に対する置換基の違いに加え、テトラヒドロピラン環の有無、23 位の炭素の側鎖に構造的な違いを有している。本研究で見出した新規化合物 BafL は、2 位の炭素にメトキシ基を有している点、17 位の炭素の水酸基が失われている点、さらに特徴的なことに α -ピラン環を有している点で他の bafilomycin 類とは異なった構造を有しており、非常に新奇な化合物であった。



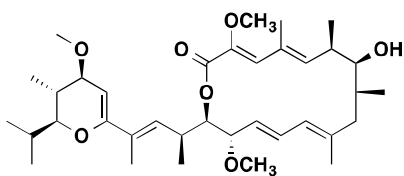
Bafilomycin	R ₁	R ₂	R ₃
A1	OCH ₃	H	H
A2	OCH ₃	CH ₃	H
B1	OCH ₃	H	
B2	OCH ₃	CH ₃	
C1	OCH ₃	H	
C2	OCH ₃	CH ₃	
F	OCH ₃	H	
G	OCH ₃	H	CH ₃
H	OCH ₃	CH ₃	CH ₃
J	CH ₃	H	CH ₃
K	CH ₃	H	H



Bafilomycin D



Bafilomycin E



Bafilomycin I

Figure 2-9 Structures of bafilomycins.

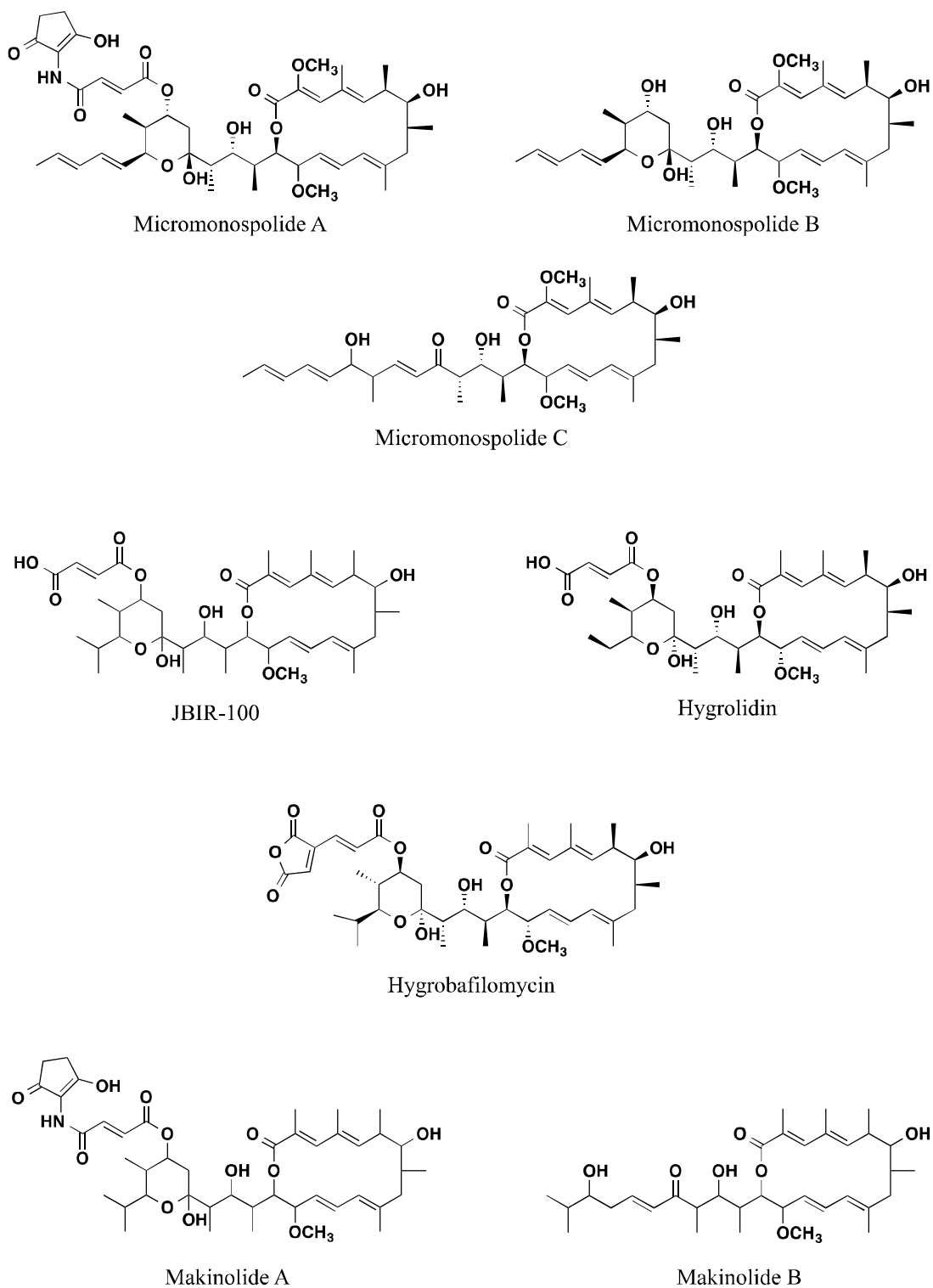


Figure 2-10 Structures of bafilomycin-like 16-membered macrolides.

2-3. BafL の細胞内中性脂質蓄積阻害活性および作用機序解析

2-3-1. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性

細胞として、スクリーニングで用いた SOAT2-CHO 細胞に加えて、そのアイソザイムである SOAT1 を選択的に発現させた CHO 細胞 (SOAT1-CHO 細胞)⁶³⁾を用いて、定法⁶⁴⁾にしたがい、BafL と BafC1 の中性脂質蓄積への影響を評価した。すなわち、48 穴プレートに培養した各細胞に化合物とともに [¹⁴C]oleic acid を取り込ませ、6 時間後に総脂質を回収し、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG を定量した。スクリーニングで用いた SOAT2-CHO 細胞では、BafL および BafC1 とも細胞内の CE の蓄積を選択的に阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 1.3 nM、1.1 nM であった (Table 2-3)。一方で、SOAT1-CHO 細胞においても、両化合物とも CE の蓄積を選択的に阻害し、その IC₅₀ 値は SOAT2-CHO 細胞の IC₅₀ 値と同程度であった (Table 2-3)。また、両化合物ともに本実験で用いた濃度においては細胞に形態異常は観察されなかった。

Table 2-3 Effect of bafilomycins on the cellular neutral lipid accumulation in SOAT-CHO cells.

Bafilomycin	SOAT1-CHO			SOAT2-CHO		
	IC ₅₀ (nM)		Selectivity index TG/CE	IC ₅₀ (nM)		Selectivity index TG/CE
	CE	TG		CE	TG	
L	1.5	> 175	> 117	1.3	> 175	> 135
C1	1.8	> 135	> 75	1.1	> 135	> 123

2-3-2. ミクロソーム画分を用いた SOAT 阻害活性

BafL および BafC1 は、SOAT1-CHO 細胞および SOAT2-CHO 細胞の CE 蓄積を選択的に阻害していることから、CE 生成の最終段階に参与する SOAT に対する影響を酵素レベルで評価した。定法⁹⁶⁾に従い、SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞からミクロソーム画分を調製し、基質として [¹⁴C]oleoyl-CoA を用いて生成した [¹⁴C]CE を定量した。その結果、BafL (900 nM) および BafC1 (700 nM) は酵素レベルでの SOAT1 および SOAT2 による CE 生成を阻害しなかった。

2-3-3. CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性

さらに詳細な作用機序解析を行うために、一般的に使われている野生株の CHO-K1 細胞を用いて中性脂質蓄積に対する影響を評価した。また bafilomycin 類で代表的な BafA1⁶⁹⁾も同時に評価した。

定法⁶⁴⁾にしたがい、BafL、BafA1 および BafC1 の CHO-K1 細胞内における中性脂質蓄積への影響を評価した。すなわち、48 穴プレートに培養した CHO-K1 細胞に化合物と共に [¹⁴C]oleic acid を取り込ませ、6 時間後に総脂質を回収し、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG を定量した。いずれの bafilomycin も中性脂質のうち CE の蓄積を選択的に阻害し、その IC₅₀ 値は nM レベルであった (Table 2-4)。

Table 2-4 Effect of bafilomycins on the cellular neutral lipid accumulation in CHO-K1 cells.

Bafilomycin	IC ₅₀ (nM)		Selectivity index TG/CE
	CE	TG	
L	0.83	> 17.5	> 21
A1	1.30	13.6	11
C1	0.40	> 13.5	> 34

2-3-4. マクロファージ内中性脂質蓄積阻害活性

CHO 細胞と比較して、CE 代謝経路研究がよく行われているマクロファージを用いて BafL、BafA1 および BafC1 の中性脂質蓄積への影響を評価した。定法⁹⁷⁾にしたがい、マウスの腹腔内より単離した初代培養マクロファージに化合物とともに [¹⁴C]oleic acid および リポソームを取り込ませ、14 時間後に総脂質を回収し、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG を定量した。いずれの bafilomycin も、中性脂質のうち CE の蓄積を選択的に阻害し、その IC₅₀ 値は CHO 細胞の IC₅₀ 値と同程度であった (Table 2-5)。

Table 2-5 Effect of bafilomycins on the cellular neutral lipid accumulation in macrophages.

Bafilomycin	IC ₅₀ (nM)		Selectivity index TG/CE
	CE	TG	
L	6.1	> 16.9	> 2.8
A1	3.5	> 15.0	> 4.3
C1	4.6	> 16.0	> 3.5

CE および TG は細胞内小器官である脂肪滴内として細胞内に蓄積する。そこで BafL の CE 蓄積阻害活性による脂肪滴形成に対する影響を形態学的に観察した。定法⁹⁷⁾にしたがい、マウスの腹腔内より単離した初代培養マクロファージをスライドチャンバーに培養し、BafL とともにリポソームを取り込ませ 14 時間培養することで細胞内に脂肪滴を形成させ

た。細胞を固定後、oil red O で脂肪滴を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内脂肪滴を検出した。Figure 2-11 に示すように、BafL 非処理細胞 (0 nM) においては oil red O により赤色に染色された脂肪滴が細胞内に多数観察された。一方、BafL 処理細胞においては、濃度依存的に細胞内の脂肪滴の数および大きさが減少し、17 nM の濃度で処理した作用させた際には脂肪滴はほぼ観察されなかった。これは先ほどの [¹⁴C]oleic acid を用いた実験における CE の減少とよい一致を示した。また、170 nM の濃度で処理しても形態異常は観察されず、形態学的に細胞毒性は認められなかった。

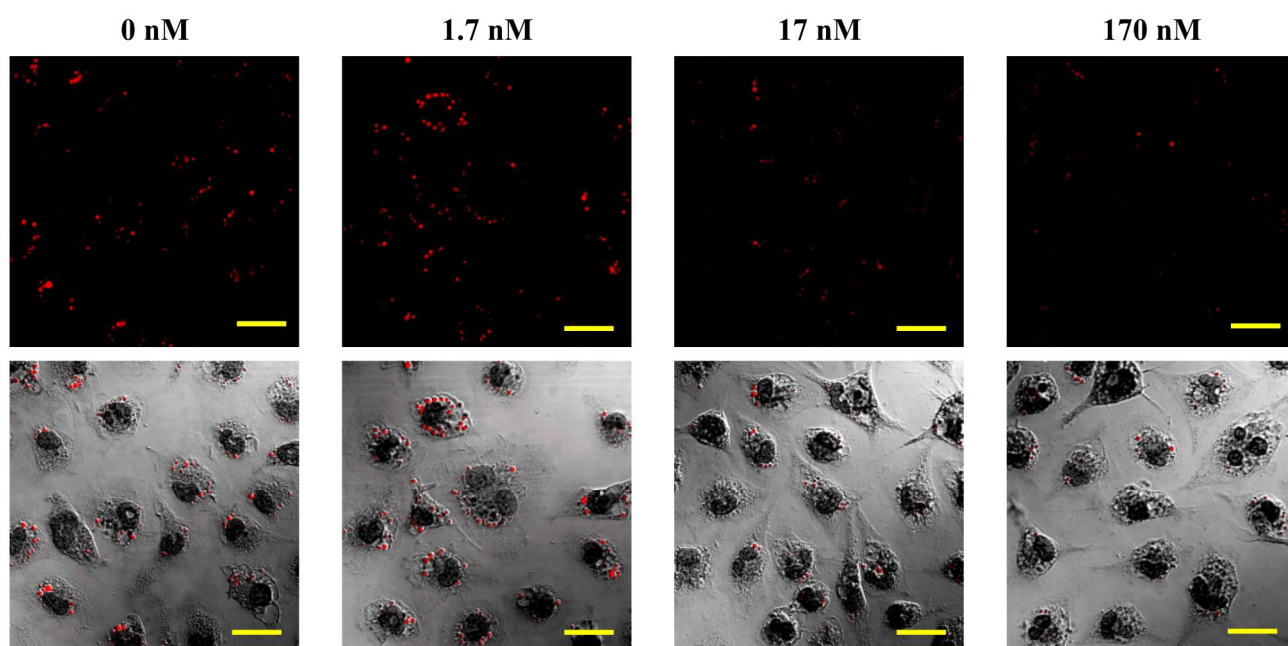


Figure 2-11 Inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages by BafL. Bars; 20 μ m.

マクロファージがリポソーム/LDL を取り込んでから脂肪滴の主成分の一つである CE の生成をするまでには幾つかのステップが報告されている⁹⁸⁾ (Figure 2-12)。主に、エンドサイトーシスによるリポソーム/LDL の取り込み、リソソーム内における加水分解とそれに伴うリポソーム/LDL からのコレステロールの遊離、遊離したコレステロールの小胞体 (ER) への輸送、ER 膜上に存在する SOAT によるエステル化を経て CE は生成する。Bafilomycin に関して、1992 年に Naganuma らは、J774 マクロファージ細胞において、bafilomycin B1 が酸化 LDL からの CE 生成阻害活性を示すことを報告している⁹⁹⁾。また、1993 年に Furuchi らは、マウス腹腔内マクロファージにおいて BafA1 がリポソームからの CE 生成阻害活性を示すこと、そしてコレステロールが細胞内に蓄積していることを報告している¹⁰⁰⁾。その機序として、BafA1 が示す特異的な液胞型 ATPase (V-ATPase) 阻害活性¹⁰¹⁾の影響が考えられている。V-ATPase はリソソームの膜上にも存在し、細胞質から内腔へプロトンを送ることでリソソーム内の pH の恒常性維持に寄与している。V-ATPase の阻害によって、リソソーム内の酸性化の抑制が生じ、リソソーム内の加水分解酵素の機能が阻害される。これにより、リポソーム/LDL の加水分解に伴うコレステロールの遊離が抑制され、コレステロール代謝が停止することで、CE の生成が阻害されることが考えられる。そこで、BafL の V-ATPase への影響を次に調べた。

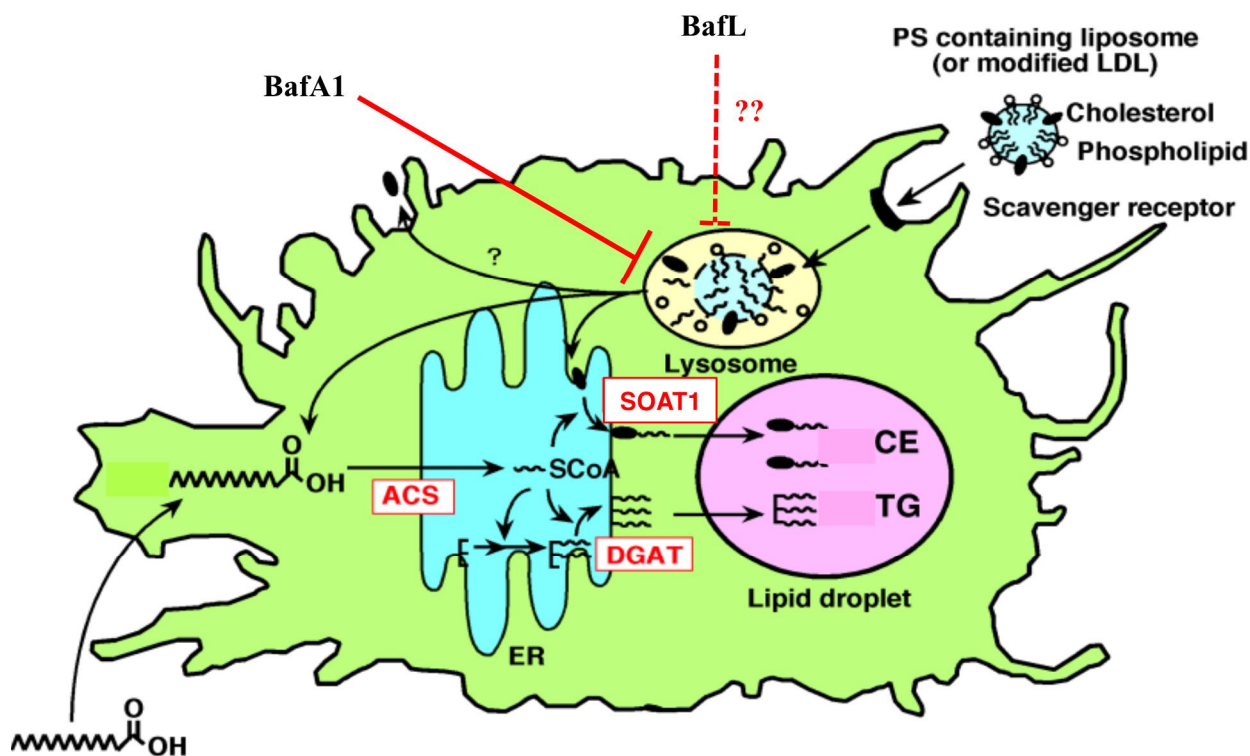


Figure 2-12 Potential target of BafA1 in cholesterol metabolism in macrophages.

2-3-5. 細胞内酸性化の抑制活性

細胞内に存在する酸性小器官は V-ATPase の働きにより酸性が維持されている。そこで酸性条件にて蛍光を発する acridine orange を用いた蛍光染色により、BafL による影響を形態学的に観察した。本実験は筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎准教授の御協力をいただいて実施した。Acridine orange は細胞内小器官内膜透過可能な塩基性の色素であり、酸性条件下で赤色の蛍光を発する。この蛍光色素は、酸性環境下のオルガネラに取り込まれプロトン化を受けることにより、オルガネラ内から細胞質へ移行できなくなることから、リソソームやエンドソームなどの酸性小器官の染色に利用することができる。

定法¹⁰²⁾にしたがい、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞に対して、BafA1 および BafL を添加し 2 時間培養した後に、5 μ M の acridine orange を加え 15 分間培養し、蛍光顕微鏡を用いて酸性小器官を観察した。Figure 2-13 に示すように、化合物非添加 (0 nM) の場合では赤色の蛍光が多数観察された。これに対し BafA1 処理細胞では濃度依存的に赤色の蛍光の消失が観察された。一方で BafL 処理細胞も BafA1 と同様に濃度依存的に赤色の蛍光の消失が観察され、30 nM を作用させるとほぼ完全に消光した。このことから BafL も BafA1 と同様に細胞内小器官の酸性化に影響をおよぼしていることが示唆された。

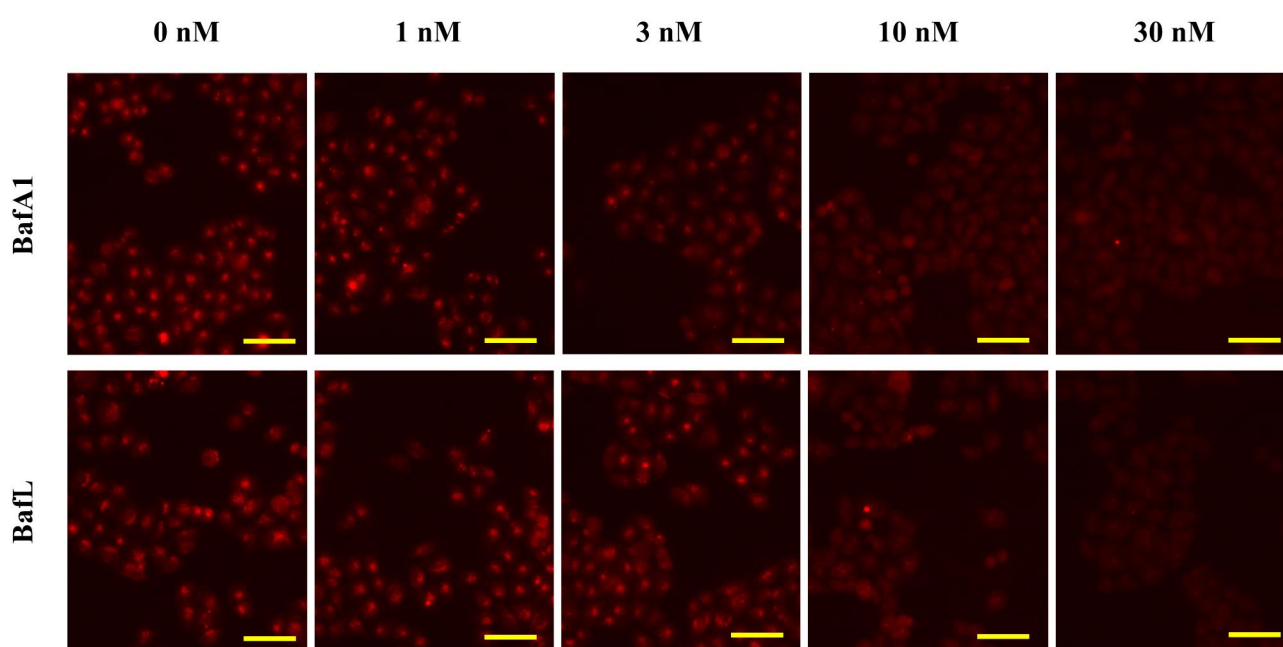


Figure 2-13 Effects of BafA1 and BafL on cellular acidification. Bars; 50 μ m.

2-3-6. *In vitro* V-ATPase 阻害活性

続いて、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞膜画分を用いて、V-ATPase 阻害活性を評価した。V-ATPase は ATP の加水分解エネルギーを駆動力として機能していることから、V-ATPase の阻害活性は ATP が ADP に分解される際に生じる無機リン酸を定量することで測定できる。本実験も筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎准教授の御協力をいただいて実施した。定法¹⁰²⁾にしたがい、酵母の液胞膜画分は、培養した酵母の細胞壁を zymolyase で溶解させた後、遠心分離および Ficoll を用いた密度勾配遠心法により調製した。この液胞膜画分溶液とサンプルを混合した後に、ATP を加え 37°C で 20 分間反応させた。その後、HClO₄ 溶液を加え反応を停止させ、malachite green および NaMoO₄ を添加した。Malachite green は Mo 存在下において、無機リン酸と緑色の複合体を形成することから、650 nm の吸光度を測定することで無機リン酸の定量を行い、V-ATPase 活性を測定した。

Figure 2-14 に示すように、BafA1 は濃度依存的に V-ATPase 活性を阻害し、その IC₅₀ 値は 2.5 nM と算出された。一方、BafL も BafA1 と同様に濃度依存的に V-ATPase 活性を阻害し、その IC₅₀ 値は 5.3 nM であった。これらの結果より BafL は BafA1 と同様に V-ATPase の機能を直接阻害することが示唆された。またその阻害活性は、CHO 細胞およびマクロファージ内における CE 蓄積阻害活性、および HeLa 細胞における acridine orange を用いた酸性化抑制活性と良い一致を示した。

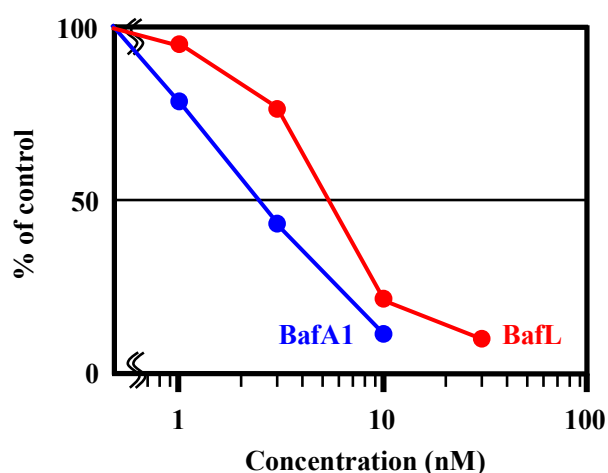
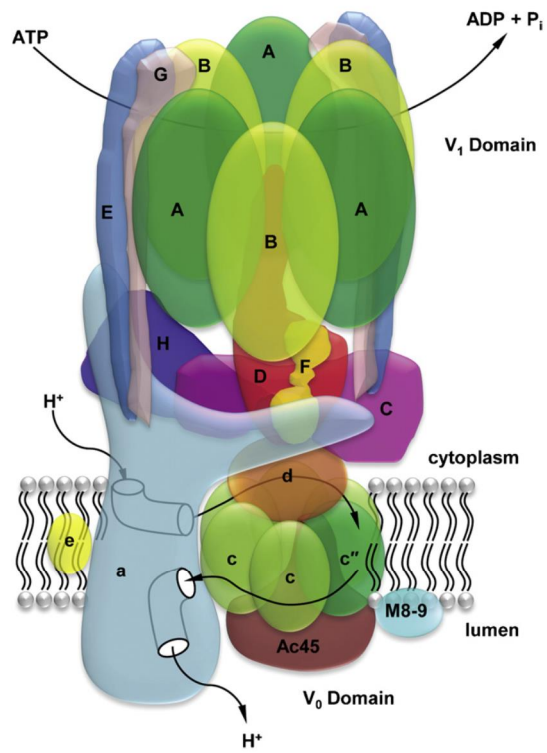


Figure 2-14 Inhibition of V-ATPase activity of the membrane isolated from *S. cerevisiae*.

2-3-7. 変異酵母を用いた V-ATPase 結合部位の推定

V-ATPase の立体構造は、透過型電子顕微鏡や X 線結晶構造解析などにより、酵母 *S. cerevisiae* やアカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の V-ATPase が報告されている¹⁰³⁻¹⁰⁶。その V-ATPase の構造モデルを Figure 2-15¹⁰⁶ および Table 2-6¹⁰⁷ に示す。酵母の V-ATPase は少なくとも 14 種類のサブユニットからなる複合体で、ATP の加水分解触媒として働く V₁ ドメインと、プロトンの輸送機能をもつ膜貫通 V₀ ドメインの 2 つに大別される。V₁ ドメインはサブユニット A、B、C、D、E、F、G、H から構成され、サブユニット A および B の 3 つが交互に並んで 6 量体を形成し、ATP の加水分解を行っている。また V₀ ドメインはサブユニット a、c、c α 、c β 、d、e から構成されている。このうちサブユニット c (*VMA3*)、c β (*VMA11*)、c α (*VMA16*) が 6 つ集まって 6 量体としてプロテオリピドリングと呼ばれる環構造を形成し、プロトン輸送機能を担っている。明確には明らかとなっていないが、サブユニットの量比は c : c β : c α = 3~4 : 1 : 2~1 であると考えられている^{108,109}。

Bafilomycin の V-ATPase への結合部位については、1990 年に Hanada らによるウシのクロマフィン顆粒由来の V-ATPase を用いた実験により報告された¹¹⁰。その実験では、BafA1 により阻害されていた V-ATPase のプロトン輸送活性が、V₀ ドメインを加えることにより賦活することを示し、この結果より BafA1 は V₀ ドメインに結合することが示唆された。Osteresch らは、BafA1 の 21 位の炭素に光親和性標識を導入した標識体 D-bafilomycin A1 を用いて、タバコスズメガ *Manduca sexta* の中腸より精製した V-ATPase のサブユニット c およびサブユニット a が標識されることを報告している¹¹¹。また Bowman らは、*N. crassa*、*S. cerevisiae* の BafA1 耐性株を取得し、BafA1 が V-ATPase の c サブユニットに作用することだけでなく、変異が生じていたアミノ酸から結合に関与するアミノ酸を明らかにした¹¹²⁻¹¹⁴。その結果、結合に重要な 9 つの残基として 32 番のスレオニン残基 (T32)、39 番および 54 番のイソロイシン残基 (I39、I54)、55 番目のバリン残基 (V55)、130 番目のメチオニン残基 (M130)、132 番および 140 番のロイシン残基 (L132、L140)、136 番目のフェニルアラニン残基 (F136)、143 番目のチロシン残基 (Y143) が同定された。これらのことより、bafilomycin の V-ATPase への結合部位は V₀ ドメイン中の c サブユニットであると考えられている。



Qin A. *et al. Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1422-1435 (2012)

Figure 2-15 Schematic structural model of the V-ATPase.

Table 2-6 Subunit composition of the V-ATPase.

Nishi T. & Forgac M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103 (2002)

本研究で発見した新規化合物 BafL は α -ピラン環を有しているなどこれまでに報告されている bafilomycin 類とは異なった特徴的な構造を有している。そこで、BafA1 を対照として、BafL の V-ATPase への結合部位の推定を行うこととした。本実験も筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎准教授の御協力をいただいて実施した。定法¹⁰²⁾にしたがい、野生株の *S. cerevisiae* (*VM43*)、および V-ATPase の c サブユニットの 32 番のスレオニン残基をイソロイシンに変異させた BafA1 耐性株 (*vma3-T32I*) を液体培地で培養し、吸光度を測定することで菌数を調整した。これら菌液を 5 倍の希釈倍率で段階希釈を行い、各株の希釈液を調整した。それら希釈液を DMSO、BafA1 または BafL を含む固形培地上にそれぞれスポットし、30°C で 3 日間培養した後、その生育状況を判定した。

Figure 2-16 に示すように、ネガティブコントロールである DMSO 含有培地においては、野生株 (*VM43*) および変異株 (*vma3-T32I*) とともに希釈された菌数に応じて類似した生育パターンを示した。BafA1 含有培地においては、野生株 (*VM43*) に関してはコントロールと比較して菌の生育が阻害されたが、変異株 (*vma3-T32I*) に関しては DMSO 含有培地同様に菌の生育が観察された。また、BafL 含有培地においては、BafA1 と同様に、野生株 (*VM43*) はその生育が阻害されたのに対し、変異株 (*vma3-T32I*) は生育阻害に対して耐性を示した。これらのことから、BafL も BafA1 と同様の結合部位に結合し、V-ATPase 阻害活性を有するということが示唆された。

Dilution ratio ($\times 10^4$)	DMSO			300 nM BafA1			300 nM BafL		
	3.0	0.60	0.12	3.0	0.60	0.12	3.0	0.60	0.12
<i>VM43</i>									
<i>vma3-T32I</i>									

Figure 2-16 Effect of BafA1 and BafL on growth of wild-type and *vma3-T32I* mutant *S. cerevisiae*.

2-3-8. 小括

本節では、*Streptomyces* sp. OPMA00072 株より単離した BafL の哺乳類細胞における中性脂質蓄積阻害活性を調べた。まず CHO 細胞に対する影響を [¹⁴C]oleic acid を用いて調べたところ、BafL は TG の蓄積にはほとんど影響を与えず、CE の蓄積を選択的にそして強力に阻害した (IC₅₀ = 0.83 nM)。また、BafA1 および BafC1 も同様の傾向を示し、CE 蓄積阻害の IC₅₀ 値はそれぞれ 1.3 nM および 0.40 nM であった。次いで、マウス腹腔内由来マクロファージを用いて各化合物の中性脂質への影響を調べた。 [¹⁴C]oleic acid を用いた評価において、BafL は CE 蓄積を選択的に阻害しその IC₅₀ 値は 6.1 nM であった。また BafA1 および BafC1 も同様に CE 蓄積を選択的に阻害し IC₅₀ 値はそれぞれ 3.5 nM および 4.6 nM であった。さらに BafL のマクロファージ内脂肪滴形成に対する影響を調べたところ、BafL の濃度依存的に脂肪滴の減少が観察され、CE の蓄積阻害活性とよい一致を示した。BafA1 がマクロファージ内において CE 生成阻害活性を示すことは報告されていたが¹⁰⁰⁾、BafL および BafC1 も同様の活性を示すことは初めての知見であった。さらに、これら化合物が CHO 細胞においても CE 蓄積阻害活性を示すことを初めて明らかとした。

次に、BafL が示す CE 蓄積阻害活性の作用機序の解析を行った。BafA1 はリソソームの V-ATPase 活性を阻害することで CE 生成阻害活性を示すと考えられている¹⁰⁰⁾。そこで、BafL の V-ATPase への影響を調べた。Acridine orange を用いた形態学的な観察により、BafA1 と同様 BafL は細胞内小器官の酸性化の抑制を示すことが明らかとなった。次に、酵母より調製した液胞膜画分を用いて V-ATPase 活性を測定したところ、BafL は BafA1 と同様に濃度依存的に V-ATPase 阻害活性を示した (IC₅₀; BafA1 2.5 nM、BafL 5.3 nM)。さらに、V-ATPase の c サブユニットに変異を有する酵母が BafA1 と同様に BafL に対しても耐性を示した。以上のことより BafL は、BafA1 と同様の V-ATPase 結合部位に作用することで直接的に V-ATPase を阻害し、リソソームの機能に影響を与えることでコレステロール代謝を阻害し、結果として CE 生成を阻害することを明らかとした。

2-4. 考察

第 2 章では、細胞内中性脂質蓄積阻害活性を示した *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の培養および活性化合物の単離精製 (2-1)、活性化合物の物理化学的性状および化学構造 (2-2)、細胞内中性脂質蓄積阻害活性とその作用機序の解析 (2-3) について述べた。

2-1 では、*Streptomyces* sp. OPMA00072 株の培養液中より、ODS クロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いて中性脂質蓄積阻害活性物質を精製した結果、既知化合物 BafC1 および新規化合物である BafL を発見したことを示した。2-2 では、新規化合物 BafL の立体化学を含めた相対立体構造を決定した。各種 NMR スペクトルの解析から、BafL はこれまで報告されている bafilomycin 類と類似した 16 員環マクロライド構造を持つが、 α -ピラン環を有する bafilomycin 系化合物として初めての報告となった。2-3 では、BafL が CHO 細胞およびマクロファージにおいて CE の蓄積を選択的に阻害すること、およびその作用点がりソソームの V-ATPase であることを明らかとした。

V-ATPase はリソソームなどの内膜系だけでなく、破骨細胞やがん細胞など特定の細胞に多く発現していることが明らかとなってきた。破骨細胞において V-ATPase は骨吸収窩と呼ばれる空間を酸性化することで、コラーゲンの分解および骨成分であるヒドロキシアパタイトの溶解に関与しており、新しいタイプの骨粗鬆症治療のターゲットとして期待されている¹¹⁵⁾。また、がん細胞において V-ATPase は、薬剤耐性、アポトーシス抵抗性、増殖や転移に関連することが示唆されており、がん化学療法の新しい分子標的としても注目されている¹¹⁵⁾。このような背景から、V-ATPase に対する化合物の構造活性相関研究が広く行われてきた。Bafilomycin 類の V-ATPase 阻害活性に関しては、Gagliardi らのニワトリの破骨細胞およびウシのクロマフィン顆粒を用いた、BafA1 の合成誘導体の V-ATPase 阻害活性研究をはじめとして、これまでに天然物や天然物より合成した誘導体を用いた構造活性相関研究が行われてきた^{116, 117)}。16 員環マクロライド骨格については、ジエン構造を一部還元すると活性が約 2,000 倍低下し、全て還元すると失われ、ラクトン環の開環により活性が数百倍低下することが示された。また 7 位の水酸基の酸化により活性が約 30 倍低下することから、bafilomycin 類が有する特徴的なマクロライド骨格については全体が活性発現に必須であると考えられる。一方テトラヒドロピラン環に関しては、環構造が失われた bafilomycin D (Figure 2-17) では活性が約 10 倍低下し、テトラヒドロピラン環を形成する 20 位炭素から 23 位炭素を有していない化合物は顕著な阻害活性を示さないことが明らかとなった。また 21 位の水酸基を修飾もしくは酸化しても活性は変化しない。さらに 23 位炭素にエチル基

を有する 24-demethyl bafilomycin やペンタジエニル基を有する micromonosporide は BafA1 と同様の阻害活性を示すことが明らかとなっている^{90,118)}。これらのことから、テトラヒドロピラン環の存在は活性発現に重要ではあるが、ある程度の官能基変換は許容されるということが考えられる。しかし、構造活性相関研究は、全合成もしくは天然物からの誘導が可能な構造に限られているのが現状である。そこで、本研究における BafA1 に対する BafL の比活性 (PR (potency ratio); IC_{50} BafA1/ IC_{50} BafL) をそれぞれ求めた。1) CHO 細胞における CE 蓄積阻害活性は PR 値 1.57、2) マクロファージにおける CE 蓄積阻害活性は PR 値 0.57、3) *S. cerevisiae* より調製した液胞膜画分を用いた V-ATPase に対する阻害活性は PR 値 0.47 とそれぞれ算出された。これらの結果より、テトラヒドロピラン環から α -ピラン環への変換、および 2 位の炭素のメトキシ基からメチル基への変換は V-ATPase 阻害活性にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。この新しい知見は bafilomycin と V-ATPase との間の相互作用に関する研究に応用されることが期待される。

Supplimental figure 2-1 ^{13}C NMR spectrum of BafL in $\text{DMSO-}d_6$ (150 MHz).

Supplemental figure 2-2 ^1H NMR spectrum of BafL in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

Supplemental figure 2-3 HMQC spectrum of BafL in DMSO- d_6

Supplemental figure 2-4 ^1H - ^1H COSY spectrum of BafL in $\text{DMSO-}d_6$.

Supplemental figure 2-5 HMBC spectrum of BafL in DMSO- d_6 .

Supplemental figure 2-6 ROESY spectrum of BafL in DMSO- d_6 .

第 3 章

海洋由来放線菌 *Nocardiosis* sp. KM2-16 株の生産する SOAT2 阻害物質ジケトピペラジン化合物に関する研究

海洋由来放線菌 *Nocardiosis* sp. KM2-16 株が SOAT2-CHO 細胞内のコレステリルエステル (CE) 蓄積阻害物質を生産していることを見出し、その培養液より 2 つのジケトピペラジン化合物を得た。1 つは天然新規化合物である化合物 A⁷⁴⁾ であり、もう 1 つは既知化合物である amauromine⁷⁵⁾ と決定した (Figure 3-1)。本章では、ジケトピペラジン化合物生産菌の培養およびそれら化合物の単離精製、ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状およびその化学構造、ジケトピペラジン化合物の細胞内における中性脂質蓄積に対する影響およびその作用機序の解析について述べる。

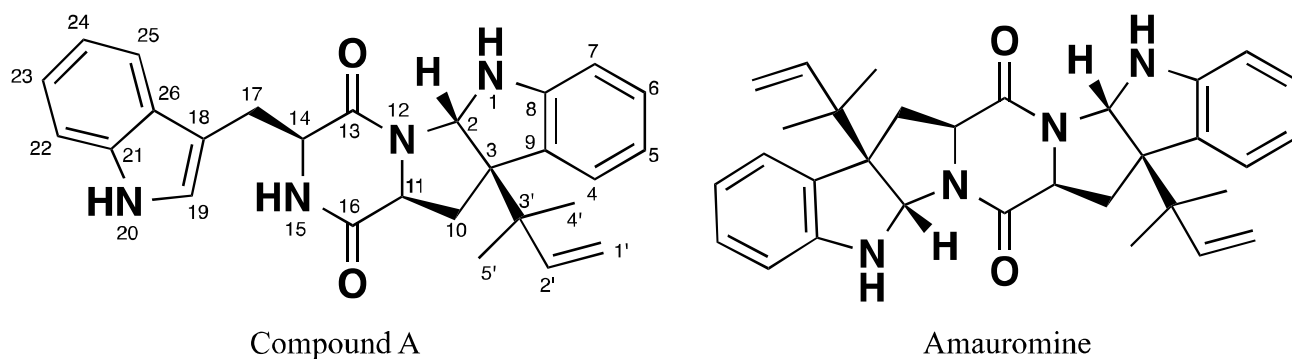
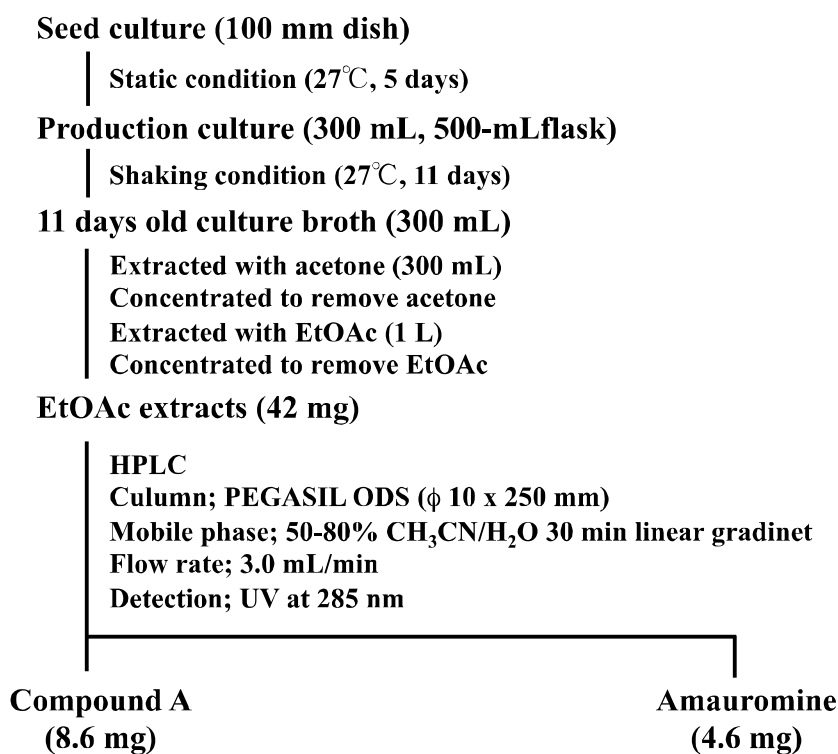


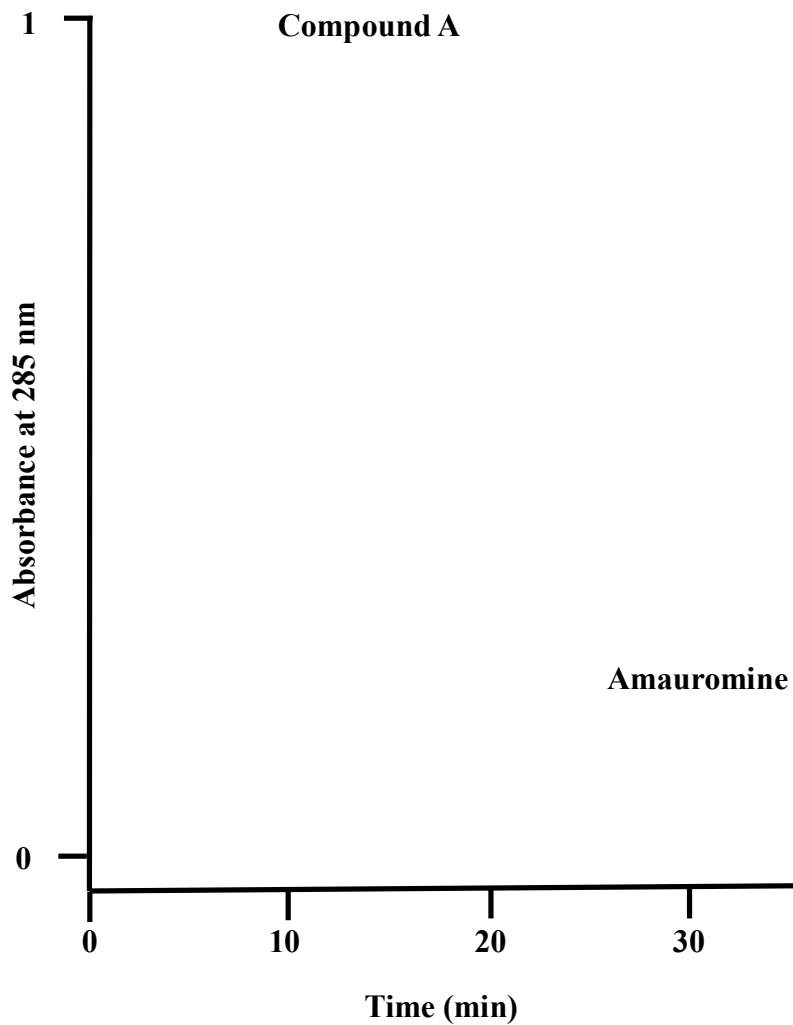
Figure 3-1 Structures of compound A and amauromine.

3-1. *Nocardiosis* sp. KM2-16 株の培養およびジケトピペラジン化合物の単離精製

ジケトピペラジン化合物の単離精製の流れを Scheme 3-1 に示した。保存用寒天培地で培養した生産菌を一白金耳とり、天然海水含有の生産培地に植菌し 27°C で 11 日間振盪培養を行った。生産培養 11 日目の培養液 300 mL に等量のアセトンを加え約 1 時間超音波処理を行った後、吸引濾過を行い、アセトン抽出液を取得した。得られた抽出液はロータリーエバポレーターでアセトンを留去後、水層画分に対し 500 mL の EtOAc を用いて 2 回抽出を行った。得られた EtOAc 抽出液 1 L は、Na₂SO₄ を用いて残存した水分を吸着させた後、濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮することで EtOAc 抽出物として 42 mg を得た。続いてその粗物質を MeOH (500 μL) に溶解させ、50 μL ずつ 10 回に分けて HPLC (移動相; 50-80% CH₃CN/H₂O 30 min liner gradient、流速; 3.0 mL/min、検出波長; 285 nm) に注入し各化合物を分離した (Figure 3-3)。この HPLC 分取条件により、保持時間 14 分および 29 分のピークをそれぞれ回収し、ロータリーエバポレーターにて減圧濃縮することで、それぞれ無色の固体である化合物 A (8.6 mg) および amauromine (4.6 mg) を取得した。



Scheme 3-1 Isolation procedures of diketopiperazines.



HPLC condition
Column; PEGASIL ODS (10 ϕ x 250 mm)
Mobile phase; 50-80% CH₃CN/H₂O 30 min liner gradient
Flow rate; 3.0 mL/min
Detection; UV at 285 nm

Figure 3-2 A chromatographic profile of isolation of compound A and amauromine by preparative HPLC.

3-2. ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状および化学構造

本研究により発見したジケトピペラジン化合物のうち、amauromine は、高分解能 MS スペクトルによる分子式、および特徴的な UV スペクトルより SciFinder を用いて同定した⁷⁵⁾。化合物 A は各種 NMR を中心としたスペクトル解析によりその絶対立体構造を決定した。

3-2-1. ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状

本研究で取得したジケトピペラジン化合物の物理化学的性状を Table 3-1 にまとめた。天然新規化合物である化合物 A は無色の固体として単離した。また、高分解能 ESI-MS スペクトル解析により分子量を 440 およびその分子式を $C_{27}H_{28}N_4O_2$ と決定した (Figure 3-3)。UV スペクトルは 210、219、244、282 および 290 nm に特徴的な極大吸収を示した (Figure 3-4)。IR スペクトルでは 3276 cm^{-1} にアミノ基、 1664 cm^{-1} にカルボニル基の吸収が観察された (Figure 3-5)。

Table 3-1 Physico-chemical properties of compound A and amauromine.

	Compound A	Amauromine
Appearance	Colorless solid	Colorless solid
$[\alpha]_D^{24.1}$ ($c = 0.1$, MeOH)	- 182.9°	- 558.7°
Molecular weight	440	508
Molecular formula	$C_{27}H_{28}N_4O_2$	$C_{32}H_{36}N_4O_2$
HR-ESI-MS (m/z)		
Calcd	463.2110 (M + Na) ⁺	509.2917 (M + H) ⁺
Found	463.2107 (M + Na) ⁺	509.2913 (M + H) ⁺
UV $\overset{\text{MeOH}}{\text{max}}$ nm (log ϵ)	213 (3.0), 219 (3.0), 244 (2.3) 282 (2.2), 290 (2.2)	208 (3.1), 244 (2.5), 300 (2.1)
IR $\overset{\text{KBr}}{\text{max}}$ (cm^{-1})	3276, 2970, 1664, 1451, 1317	3386, 2972, 1661, 1462, 1423
CD (MeOH) λ nm (Mol. CD)	220 (3.7), 245 (-5.6) 272 (-1.7), 300 (-2.8)	220 (-0.37), 244 (-4.8) 266 (-0.17), 301 (-1.0)

463.2107 [M + Na]⁺

Figure 3-3 ESI-MS spectrum of compound A.

Figure 3-4 UV spectrum of compound A (in MeOH).

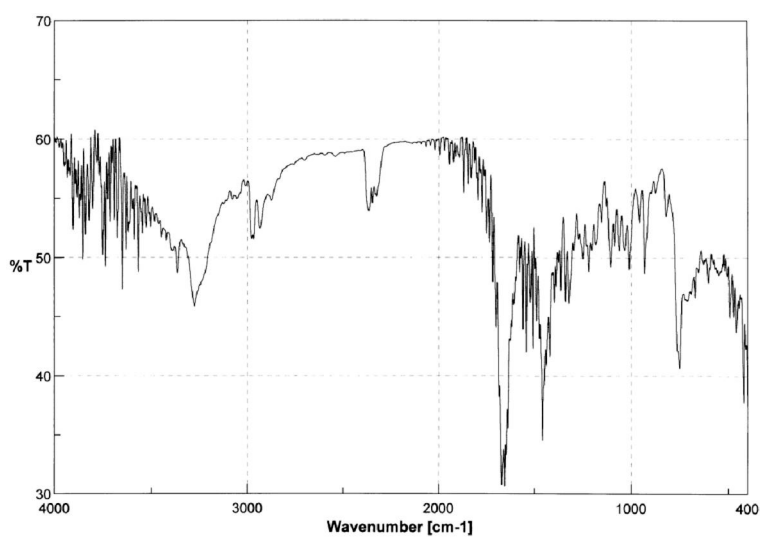


Figure 3-5 IR spectrum of compound A (in KBr).

3-2-2. 化合物 A の構造解析

化合物 A の分子式は、高分解能 ESI-MS スペクトル測定 (m/z ; 計算値 463.2110, 実測値 463.2107 for $C_{27}H_{28}N_4O_2Na$) より、 $C_{27}H_{28}N_4O_2$ と決定した (Figure 3-3)。化合物 A の平面構造は、各種 NMR の解析を中心に行った。 $CDCl_3$ 溶液中で測定した ^{13}C NMR スペクトル (Supplemental figure 3-1) では 27 本の分離したシグナルを確認した。これらは 2 つのメチル、2 つの sp^3 メチレン、3 つの sp^3 メチン、1 つの sp^2 メチレン、10 個の sp^2 メチン、2 つのカルボニル炭素を含む 9 つの 4 級炭素に分類した。 $CDCl_3$ 溶液中で測定した 1H NMR スペクトル (Supplemental figure 3-2) では、2 つのメチルやアミンのシグナルを観察した。HMQC スペクトル (Supplemental figure 3-3) からは、水素の付加した炭素を全て対応させた (Table 3-2)。

1H - 1H COSY スペクトル分析 (Supplemental figure 3-4) からは、7 つの部分構造を明らかにした (Figure 3-6)。すなわち、1-NH (δ 5.06) から 2-H (δ 5.55) への相関が観察されたことから部分構造 I を明らかとした。5-H (δ 6.76) から 4-H (δ 7.14)、6-H (δ 7.11) への相関、および 7-H (δ 6.61) から 6-H への相関が観察されたことから部分構造 II を明らかとした。10- H_2 (δ 2.42, 2.51) から 11-H (δ 3.91) への相関が観察されたことから部分構造 III を明らかとした。14-H (δ 4.30) から 17-H (δ 3.74) への相関が観察されたことから部分構造 IV を明らかとした。19-H (δ 7.08) から 20-NH (δ 8.19) への相関が観察されたことから部分構造 V を明らかとした。23-H (δ 7.22) から 22-H (δ 7.38)、24-H (δ 7.12) への相関、および 25-H (δ 7.55) から 24-H への相関が観察されたことから部分構造 VI を明らかとした。1 ϕ - H_2 (δ 5.08, 5.12) から 2 ϕ -H (δ 5.97) への相関が観察されたことから部分構造 VII を明らかとした。

さらに、HMBC スペクトルより観察された 2J あるいは 3J の ^{13}C - 1H 遠隔カップリングの解析 (Supplemental figure 3-5) では次の構造を明らかとした。すなわち、1) 1-NH から C-3 (δ 61.6)、C-9 (δ 128.9) への相関、2-H から C-8 (δ 149.9)、C-9、C-11 (δ 59.0)、C-13 (δ 166.0) への相関、4-H から C-3、C-8 への相関、5-H から C-9 への相関、6-H から C-8 への相関、7-H から C-9 への相関、10- H_2 から C-3、C-9、C-16 (δ 168.8) への相関、11-H から C-10 (δ 36.0)、C-16 への相関、14-H から C-13 への相関、および 15-NH (δ 5.69) から C-11、C-13、C-14 (δ 54.6)、C-16、C-17 (δ 27.0) への相関が観察されたことから、部分構造 I、II、III および IV を含む、インドリン環とジケトピペラジン環を有する構造 (Part a) を明らかとした。2) 19-H から C-18 (δ 109.7)、C-21 (δ 136.6)、C-26 (δ 126.6) への相関、20-NH から C-18、C-21、C-26 への相関、23-H から C-21 への相関、24-H から C-26 への相関、および 25-H から

C-18、C-21、C-26 への相関が観察されたことから、部分構造 V および VI を含むインドール環 (Part b) の存在を明らかとした。3) 1 ϕ -H₂ から C-3 ϕ (δ 40.8) への相関、2 ϕ -H から C-3、C-4 ϕ (δ 22.8)、C-5 ϕ (δ 22.4) への相関、4 ϕ -H₃ (δ 1.01) から C-2 ϕ (δ 143.5)、C-3 ϕ 、C-5 ϕ への相関、および 5 ϕ -H₃ (δ 1.11) から C-2 ϕ 、C-3 ϕ 、C-4 ϕ への相関が観察されたことから、部分構造 VII を含むプレニル基 (Part c) の存在を明らかとした。4) 17-H₂ (δ 2.97, 3.74) から C-19 (δ 123.2)、C-26 への相関、19-H から C-17 (δ 27.0) への相関が観察されたことから、部分構造 a および b は 17 位炭素と 18 位炭素間で結合していることを明らかとした。5) 2-H、10-H₂ から C-3 ϕ への相関、および 2 ϕ -H、4 ϕ -H₃、5 ϕ -H₃ から C-3 への相関が観察されたことから、部分構造 a および c は 3 位炭素と 3 ϕ 位炭素間で結合していることを明らかとした。1) ~ 4) により化合物 A の平面構造を Figure 3-7 (a) のように決定した。

次に、化合物 A の 2 位、3 位、11 位および 14 位の炭素の相対立体化学を明らかにするために ROESY 解析 (Supplemental figure 3-6) を行った。2-H から 4 ϕ -H₃ および 5 ϕ -H₃ との間で NOE の相関が観察されたことから、2 位および 3 位の炭素の相対立体化学を 2*S**、3*R**と決定した。11-H から 14-H との間で NOE の相関が観察されたことから、11 位および 14 位の炭素の相対立体化学を 11*S**、14*R**と決定した (Figure 3-7 (b))。

化合物 A の絶対立体化学は、すでに絶対立体化学が明らかとなっている amauromine との CD スペクトル (Table 3-1、Supplemental figure 3-7) の比較により行った。化合物 A は 272 nm および 220 nm に正のコットン効果を、300 nm および 248 nm に負のコットン効果をそれぞれ示した。一方で、amauromine は 222 nm および 266 nm に正のコットン効果を、301 nm および 244 nm に負のコットン効果を示し、化合物 A の CD スペクトルパターンと良い一致を示した。したがって、化合物 A の絶対立体化学を、amauromine と同様に、2*S*、3*R*、11*S*、14*R* と決定した。以上のことより、化合物 A の立体構造を Figure 3-1 のように決定した。

Table 3-2 ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of compound A.

Compound A			
<i>Position</i>	δ_C (ppm) ^a	δ_H (ppm) ^b , multi, <i>J</i> in Hz	<i>HMBC</i>
1	-	5.06, sd, 1.0	C-3, 9
2	77.7	5.55, s	C-8, 9, 11, 13, 3'
3	61.6	-	-
4	125.1	7.14 ^c	C-3, 6, 8
5	118.9	6.76, td, 7.5, 0.8	C-4, 7, 9
6	128.9	7.11 ^c	C-4, 8
7	109.2	6.61, d, 7.5	C-5, 9
8	149.9	-	-
9	128.9	-	-
10	36.0	2.42, t, 12.0	C-2, 3, 9, 11, 16, 3'
		2.51, dd, 12.5, 6.0	
11	59.0	3.91, dd, 11.5, 6.0	C-10, 16
12	-	-	-
13	166.0	-	-
14	54.6	4.3, d, 10.5	C-13, 17, 18
15	-	5.69, s	C-11, 13, 14, 16, 17
16	168.9	-	-
17	27.0	2.97, dd, 10.8, 11.0	C-13, 14, 18, 19, 26
		3.74, dd, 4.0	
18	109.7	-	-
19	123.2	7.08, sd, 2.0	C-17, 18, 21, 26
20	-	8.19, s	C-18, 19, 21, 26
21	136.6	-	-
22	115.5	7.38, d, 8.5	C-23, 24, 26
23	122.9	7.22, td, 7.5, 1.0	C-22, 24, 25
24	120.1	7.12 ^c	C-22, 23, 26
25	118.4	7.55, d, 8.0	C-21, 23, 26
26	126.6	-	-
1'	114.5	5.08, dd, 13.5, 1.2	C-2', 3'
		5.12, dd, 10.5, 1.0	
2'	143.5	5.97, dd, 18.0, 10.5	C-3, 1', 3', 4', 5'
3'	40.8	-	-
4'	22.8	1.01, s	C-3, 1', 2', 3', 5'
5'	22.4	1.11, s	C-3, 1', 2', 3', 4'

^a Chemical shifts are shown with reference to CDCl₃ as δ 77.0

^b Chemical shifts are shown with reference to CDCl₃ as δ 7.26

^c Signals are overlapping

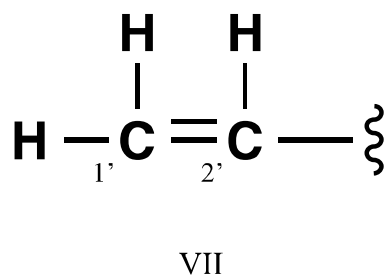
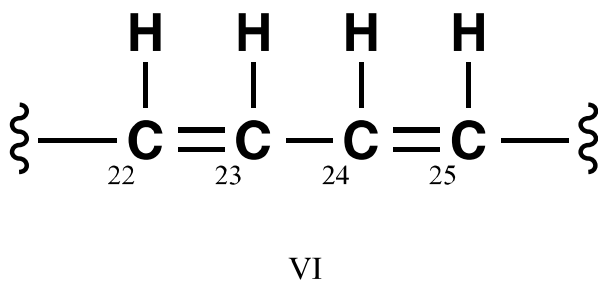
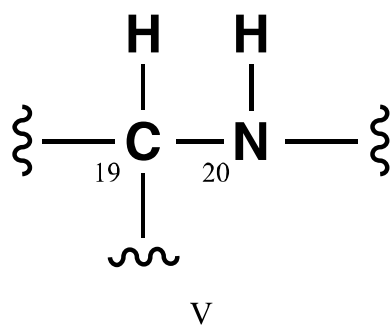
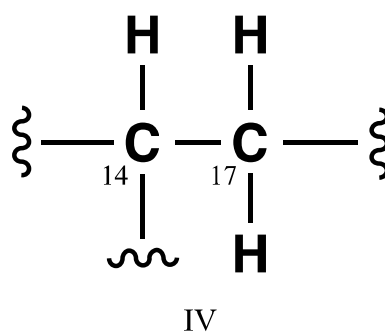
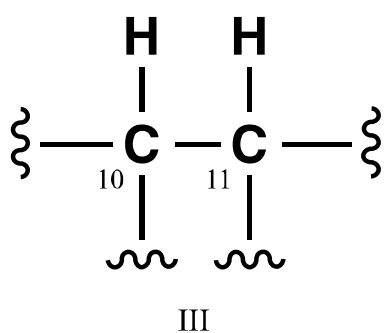
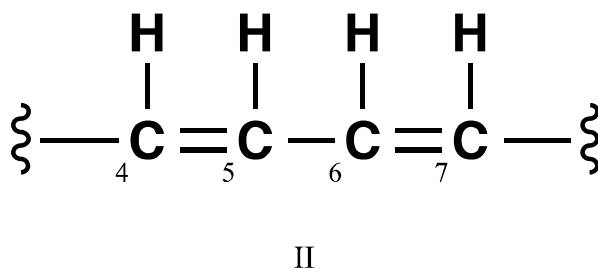
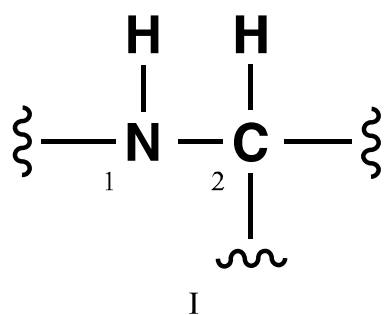


Figure 3-6 Partial structures I to VII of compound A.

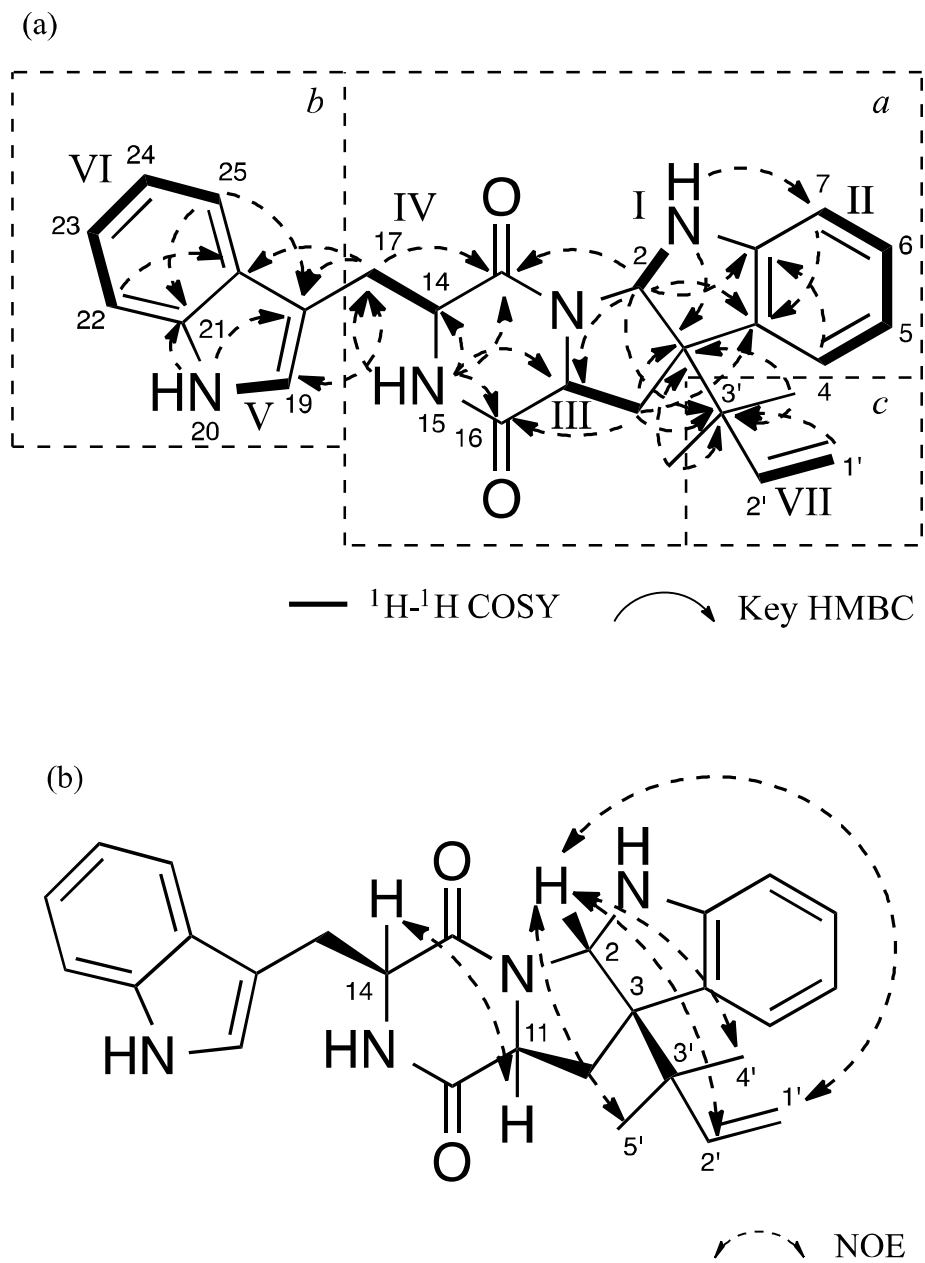
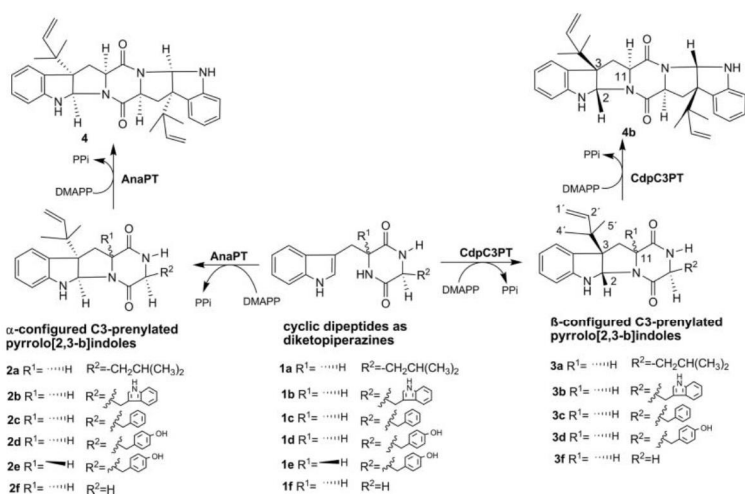


Figure 3-7 Structure elucidation of compound A.
 (a) Key correlations in ^1H - ^1H COSY and HMBC spectra. (b) ROESY experiments.

3-2-3. 小括

本節では、化合物 A の絶対立体を含めた構造を各種スペクトル解析より決定した。化合物 A の物理化学的性状は、無色固体であり、分子量 440、分子式 $C_{27}H_{28}N_4O_2$ を示した。また UV スペクトルでは 210、219、244、282 および 290 nm に特徴的な極大吸収を示し、IR スペクトルでは 3276 、 1664 cm^{-1} にそれぞれアミノ基、カルボニル基に由来する吸収が観察された。化合物 A の平面構造は、各種 NMR スペクトルおよびその分子式から、インドリン環とジケトピペラジン環が 5 員環を介して結合している特徴的な環構造に、プレニル基とインドール環がそれぞれ結合している構造であることを明らかとした。さらに立体化学を明らかにするために ROESY 解析を行ったところ、化合物 A の相対立体構造を $2S^*$ 、 $3R^*$ 、 $11S^*$ 、 $14R^*$ と決定した。絶対立体化学は、すでに絶対立体が明らかとなっている amauromine¹¹⁹⁾ との CD スペクトルを比較することにより、化合物 A の絶対立体構造を $2S$ 、 $3R$ 、 $11S$ 、 $14R$ と決定した。化合物 A については、Yin らにより、リコンビナントに発現させた酵素を用いた *in vitro* での合成が報告されている (Scheme 3-2、3b が化合物 A に相当)⁷⁴⁾。すなわち、真菌 *Neosartorya fischeri* 由来のプレニル基転移酵素 (cyclic dipeptide C3-prenyltransferase; CdpC3PT) 遺伝子を *Escherichia coli* に導入し過剰発現させ、酵素を精製した後に、L-トリプトファン 2 分子からなる環状ペプチド (Scheme 3-2、1b) を反応させることで 3b を合成した。3b と化合物 A は、各種 NMR スペクトル値の比較によりそれぞれの値が良い一致を示したことから、同一の化合物であることが明らかとなった。これまでに化合物 A の物理化学的性状は調べられていなかったが、本研究によってその詳細を明らかとしたと共に、天然物として化合物 A が生産されていることを初めて明らかとした。



Yin W. B. *et al. Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133-1141 (2010)

Scheme 3-2 Synthesis of C3-prenylated indoline alkaloid-containing diketopiperazines by using recombinant prenyltransferases.

3-3. ジケトピペラジン化合物の細胞内中性脂質蓄積阻害活性および SOAT 阻害活性

3-3-1. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積阻害活性

細胞として、スクリーニングで用いた SOAT2-CHO 細胞に加えて、そのアイズザイムである SOAT1 を選択的に発現させた CHO 細胞 (SOAT1-CHO 細胞)⁶³⁾を用いて、定法⁶⁴⁾にしたがい、化合物 A と amaumomine の中性脂質蓄積への影響を評価した。すなわち、48 穴プレートに培養した各細胞に化合物と共に [¹⁴C]oleic acid を取り込ませ、6 時間後に総脂質を回収し、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG を定量した。化合物 A は、SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞内の CE 蓄積に対して 22 μM まで阻害活性を示さなかった (Table 3-3)。それに対して amaumomine は、SOAT2-CHO 細胞における CE 蓄積を IC₅₀ 値 0.45 μM で阻害し、SOAT1-CHO 細胞における CE 蓄積は 28 μM まで阻害せず、SOAT1 に対する SOAT2 への阻害活性の選択性 (Selective index (SI)) 値は 62 以上であった (Table 3-3)。また両化合物ともに、TG の蓄積に対しては阻害活性を示さなかった。細胞毒性については、CHO-K1 細胞を用いて MTT 法¹²⁰⁾で評価したところ、化合物 A は 22 μM、amaumomine は 28 μM まで毒性は示さなかった (Table 3-3)。また形態学的にも異常は認められなかった。

3-3-2. ミクロソーム画分を用いた SOAT 阻害活性

Amaumomine は、SOAT2-CHO 細胞における CE 蓄積を選択的に阻害していたことから、酵素レベルで SOAT に対する影響をさらに評価した。定法⁹⁶⁾に従い、SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞からミクロソーム画分を調製し、基質として [¹⁴C]oleoyl-CoA を用いて、生成した [¹⁴C]CE を定量した。その結果、amaumomine は SOAT1 を 22 μM、SOAT2 を 1.2 μM で阻害し、その SI 値は 18 と算出された (Table 3-3)。また、化合物 A の酵素レベルでの SOAT2 阻害活性は非常に弱いものであった (Table 3-3)。

Table 3-3 Effect of diketopiperazines on CE synthesis in cell-based and enzyme-based assays.

Sample	Cell-based		SI ^{*1}	Enzyme-based			Cytotoxicity ^{*2}
	IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μM)		SI	
	SOAT1	SOAT2		SOAT1	SOAT2		IC ₅₀ (μM)
Compound A	> 22	> 22	1	> 57	21	>2.7	>22
Amaumomine	> 28	0.45	>62	22	1.2	18	>28

*1SI (Selective index) = IC₅₀ for SOAT1/IC₅₀ for SOAT2.

*2Cytotoxicity of the compounds to CHO-K1 cells was measured by the MTT assay.

3-3-3. 小括

本節では、*Nocardiosis* sp. KM2-16 株より単離した化合物 A と *amauromine* の細胞内中性脂質蓄積に対する影響を SOAT-CHO 細胞を用いて調べた。その結果、化合物 A は細胞レベルでは蓄積阻害活性を示さず、一方で、*amauromine* は SOAT2-CHO 細胞選択的に CE の蓄積を阻害した。次にその作用機序を調べたところ、化合物 A は SOAT2 を弱いながらも阻害し、*amauromine* は細胞レベルと同様に SOAT2 を選択的に阻害した。化合物 A が酵素レベルでのみ CE 蓄積阻害活性を示した理由としては、化合物の細胞膜の透過性が原因の 1 つとして考えられる。

ジケトピペラジン化合物に関しては、これまでに幅広い生物活性が報告されている¹²¹⁾。化合物 A についてはこれまでに生物活性は調べられていなかったが、酵素レベルでの SOAT2 への阻害活性を初めて明らかにした。また *amauromine* については、これまでにラット摘出大動脈に対する血管拡張作用⁷⁵⁾や、カンナビノイド CB1 受容体拮抗作用¹²²⁾が報告されているが、酵素 SOAT2 へ選択的な阻害を示すことにより、細胞内の CE 生成を阻害するという生物活性を本研究で初めて明らかとした。

3-4. 考察

第 3 章では、SOAT2-CHO 細胞において CE 蓄積阻害活性を示した *Nocardiosis* sp. KM2-16 株の培養および活性化合物の単離精製 (3-1)、化合物 A の物理化学的性状および化学構造 (3-2)、活性化合物の SOAT 阻害活性 (3-3) について述べた。

3-1 では、*Nocardiosis* sp. KM2-16 株の培養液中より、溶媒抽出および逆相 HPLC を用いて CE 蓄積阻害活性物質を精製した結果、化合物 A および *amauromine* を単離したことを示した。3-2 では、化合物 A の物理化学的性状の解析、および立体化学を含めた絶対立体構造の解明を行った。化合物 A はこれまでにリコンビナントに発現させた酵素を用いた *in vitro* での酵素反応に依る合成は報告されていたが、天然物として初めてその生産を確認した。化合物 A および *amauromine* は、インドリン環がジケトピペラジン環に 5 員環を介して結合し、かつ 3 位の炭素にプレニル基を有するという特徴的な構造を有している。このような構造を有する代表的な天然物由来のジケトピペラジン化合物として、*gypsetin*¹²³⁾、*roquefortine* 類¹²⁴⁾、*regulosuvine A*¹²⁵⁾、*verrucofortine*¹²⁶⁾、*epiamauromine*¹²⁷⁾、*novoamauromine*¹²⁸⁾ などがある (Figure 3-8)。これら化合物は、いずれも真菌である *Amauroascus* 属、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属が生産菌として報告されている。しかし本研究においては、化合物 A および *amauromine* を放線菌に分類される *Nocardiosis* 属から見出しており、真菌以外からの生産を確認した初めての報告例となった。今後、真菌と放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子研究などに本菌株が応用されることが期待される。

3-3 では、化合物 A と *amauromine* の SOAT への影響を調べた。SOAT は長年、動脈硬化の予防治療の有望な標的分子として注目されており、特に 2 つのアイソザイムのうち SOAT2 に対する選択性が重要であるということが明らかとなってきた⁵³⁻⁵⁹⁾。これまでに SOAT を標的とした阻害剤が多数報告されてきたが、その多くは SOAT アイソザイム非選択的 ($1/100 \leq SI \leq 10$)、もしくは SOAT1 選択的 ($SI < 1/100$) であり、SOAT2 選択的 ($10 < SI$) である化合物は *pyripyropene* 類をはじめとしてわずかである¹²⁹⁾。本研究において、化合物 A が細胞レベルでは活性を示さなかったが、酵素レベルで SOAT2 を阻害することを見出した。しかし、その SI 値は 2.7 以上であり、SOAT2 への選択性についてはさらに濃度を上げた検討が必要であると考えられる。一方で、*amauromine* は細胞レベルで SI 値として 62 以上、酵素レベルで SI 値として 18 を示し SOAT2 に対して選択性を有することが示された。脂質代謝にその作用を示すジケトピペラジン化合物としては、*gypsetin*¹²³⁾ がある (Figure 3-8)。Gypsetin は、ラットの肝ミクロソーム画分を用いた評価において SOAT 活

性を 18 μM で阻害すること、また J774 マクロファージ細胞内の CE の生成を 0.65 μM で阻害することが報告されている。SOAT アイソザイムに関する研究から、マクロファージには主に SOAT1 が⁵¹⁾、肝臓には主に SOAT2 が選択的に発現していることが明らかとなっており⁵¹⁾、これらのことから gypsetin は SOAT1 に選択的であると考えられるが、未だその選択性ははっきりと示されていない。しかし本研究を通して、gypsetin と構造を類する amauromine の SOAT2 への選択性を示した。Amauromine と gypsetin の構造を比較すると、2 位の炭素がそれぞれ水素から水酸基に置換している点、また、一方の 2 位および 3 位の炭素の立体化学が異なっている点が違いとしてあげられる。このことから、SOAT の阻害活性には対称的な 6、5、5、6 員環構造が重要であり、アイソザイムの選択性についてはその側鎖の置換基やその立体が重要である可能性が考えられる。今後 epiamauromine や novoamauromine の SOAT への影響を調べることで、構造活性相関が明らかになることが期待される。本研究により、これまで選択的な阻害剤の数が限られていた SOAT2 に対する新しい創薬の方向性を示すことができたといえる。

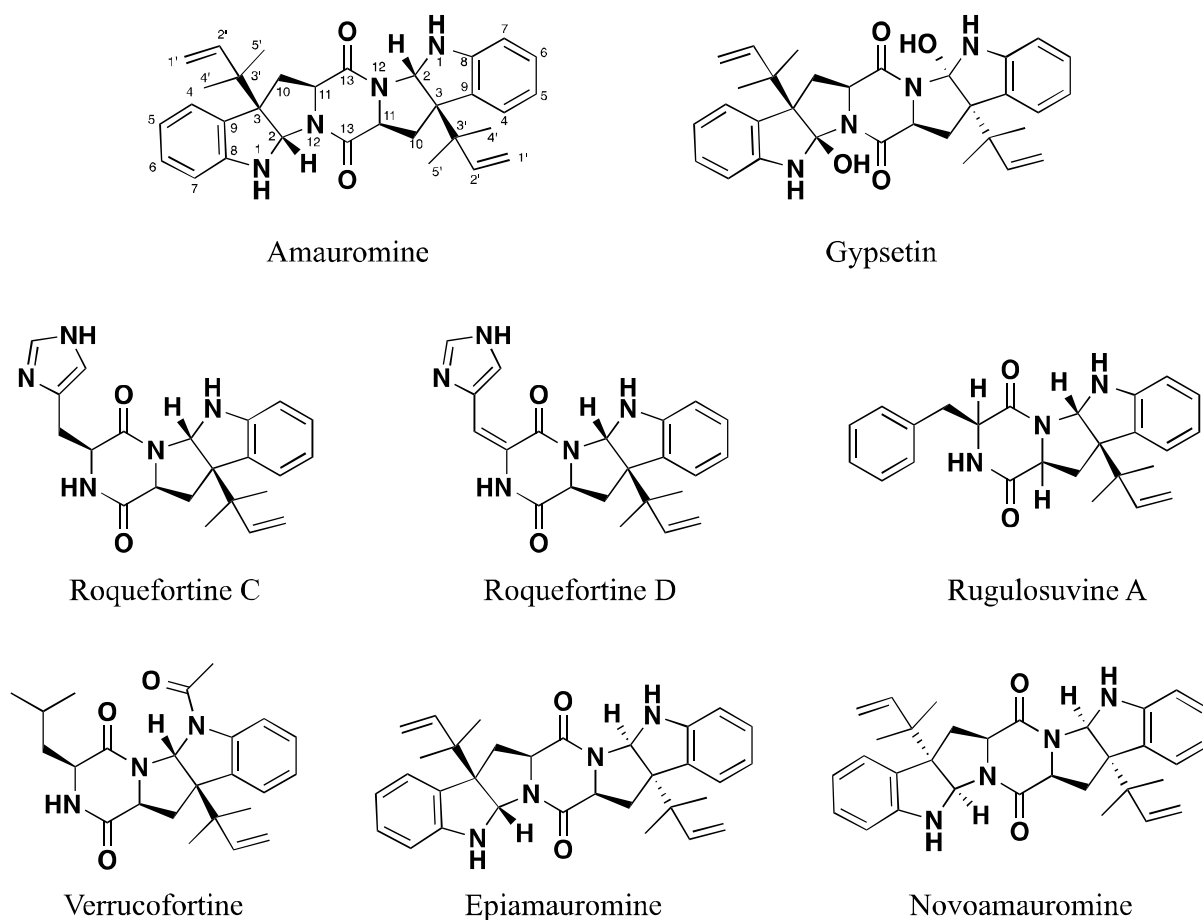


Figure 3-8 The structures of diketopiperazines having indoline alkaloid at position C-3 prenylated.

Supplemental figure 3-1 ^{13}C NMR spectrum of compound A in CDCl_3 .

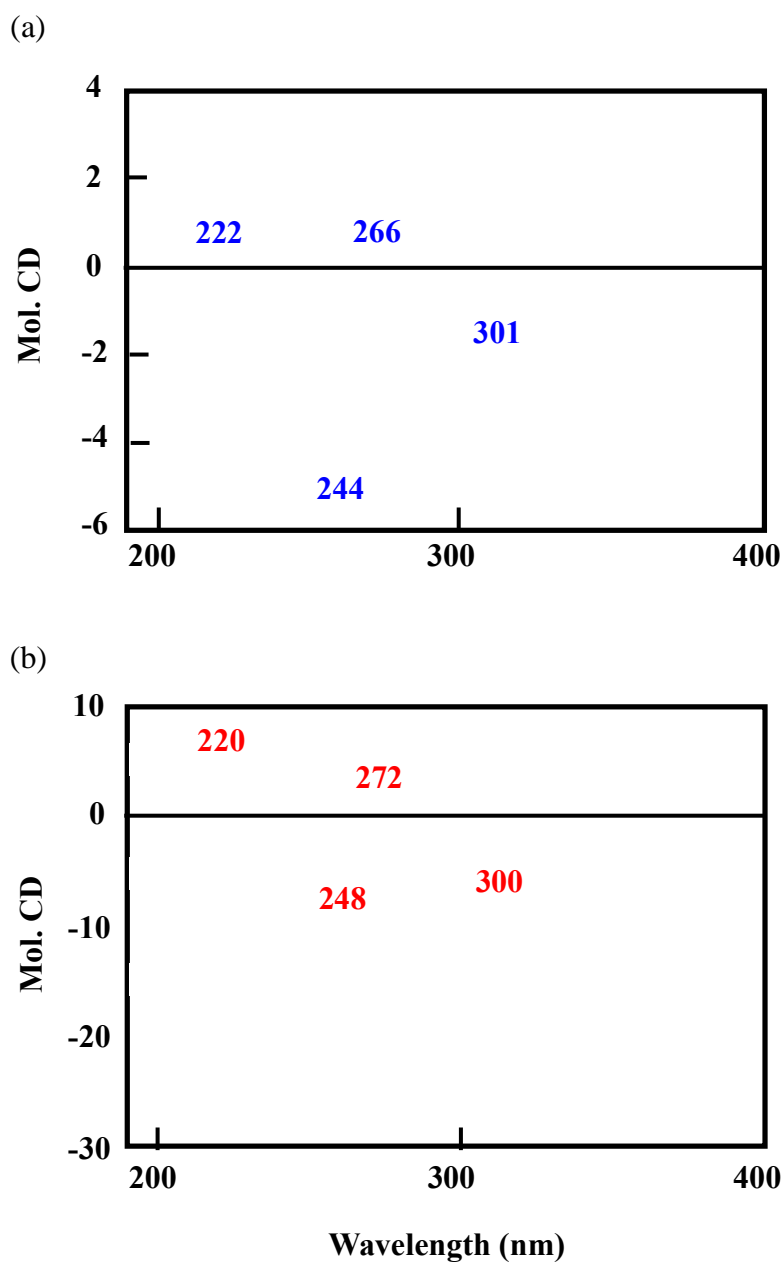
Supplemental figure 3-2 ¹H NMR spectrum of compound A in CDCl₃.

Supplemental figure 3-3 HMQC spectrum of compound A in CDCl₃.

Supplemental figure 3-4 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound A in CDCl_3 .

Supplemental figure 3-5 HMBC spectrum of compound A in CDCl₃.

Supplemental figure 3-6 ROESY spectrum of compound A in CDCl₃.

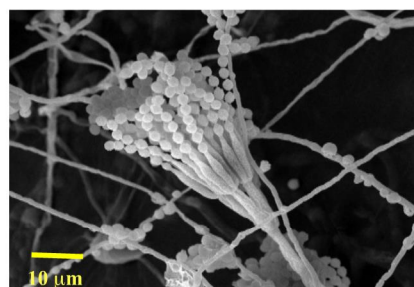


Supplemental figure 3-7 CD spectrum of amaumine (a) and compound A (b).

第 4 章

真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株が生産する 中性脂質蓄積阻害活性物質 **dinapinone A** の作用機序解析

本章では、当研究室で中性脂質蓄積阻害物質として発見された **dinapinone A (DPA)**⁶⁶⁾ の作用機序の解析について述べる。DPA は、2008 年に、第 1 章で述べた SOAT2-CHO 細胞を用いた脂質代謝阻害剤のスクリーニングによって見出された化合物であり、真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株が生産する monapinone A¹³⁰⁾ が二量体化した、ビアリル型ジヒドロナフトピラノン骨格を持つ化合物である (Figure 4-1)。DPA は CHO-K1 細胞において、TG 蓄積を IC₅₀ 値 0.097 μM で、CE 蓄積を IC₅₀ 値 0.31 μM でそれぞれ阻害した (Table 4-1)。DPA は、逆相系 C18 ODS カラムを用いた精製では単一のピークであったため、発見当初は単一の化合物であると考えられていたが、逆相系の C30 カラムを用いたところ、2 本のピークに分離した。それぞれについて分析したところ、DPA は 2 種類の軸異性体 **dinapinone A1 (DPA1)** と **dinapinone A2 (DPA2)** が 1 : 1 ~ 2 : 3 の比率で含まれている混合物であることが明らかとなった (Figure 4-2)。それぞれの化合物の中性脂質蓄積阻害活性を評価すると、DPA1 単独では TG および CE の蓄積に対して 12 μM まで活性を示さず、DPA2 単独では TG 蓄積を IC₅₀ 値 0.65 μM で、CE 蓄積を IC₅₀ 値 5.2 μM でそれぞれ阻害したが、発見当初の混合状態と比べるとその活性は減弱した (Table 4-1)。しかし、興味深いことに、DPA1 および DPA2 を様々な比率で再度混合したものを評価した結果、活性の回復が認められ、その中でも DPA1 と DPA2 の両者を 1 : 1 の比率で混合したもの (DPA1:1) に最も強い活性増強が認められた (Table 4-1)。このように、軸異性体の関係にあ



Talaromyces pinophilus FKI-3864

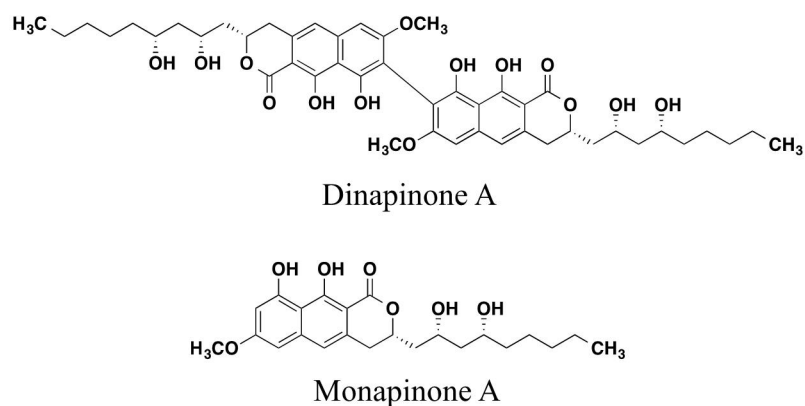


Figure 4-1 Producing fungus and structures of dinapinone A and monapinone A.

る化合物を混合することで生物活性が増強するという現象はこれまでに報告例がなく、その作用機序の解明には非常に興味を持たれた。また、DPA の特徴として、細胞レベルで TG に対して強力な蓄積阻害活性を示すということが挙げられる。著者らのグループにより発見された TG 生成・蓄積阻害活性物質は、酵素レベルの評価による生合成酵素の阻害がほとんどであり、細胞レベルで TG の蓄積を阻害するその生物活性は興味深い。また、これまでに行われた研究により、DPA は CHO-K1 細胞以外にもその活性を示すことが明らかとなっている¹³¹⁾。ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞に対し DPA1:1 を作用させたところ、いずれの細胞においても DPA1:1 は TG の蓄積を濃度依存的に阻害した (Figure 4-3)。一方、CE についても、CHO-K1 細胞および HeLa S3 細胞において、濃度依存的な阻害活性が認められた (Figure 4-3)。一方で、HepG2 細胞では CE 蓄積の阻害活性は認められなかったが、これは HepG2 細胞では元来 CE 生成能が低いため、差が現れなかったと考えられる。以上のことより、DPA の作用機序解析は、DPA の効果がよく表れている CHO-K1 細胞を用いて進めていくこととした。

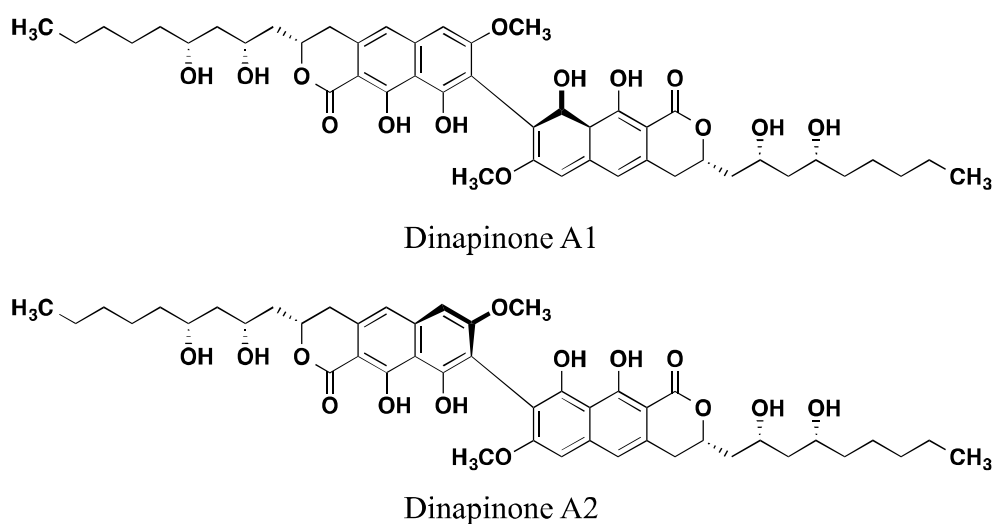


Figure 4-2 Structures of dinapinone A1 and A2.

Table 4-1 Inhibitory activity of neutral lipids accumulation by a mixture of DPA1 and DPA2.

Dinapinone	IC ₅₀ (μM)		
	TG	CE	PL
A (natural)	0.097	0.31	> 12
A1	> 12	> 12	> 12
A2	0.65	5.2	> 12
A1:1	0.054	0.18	> 12

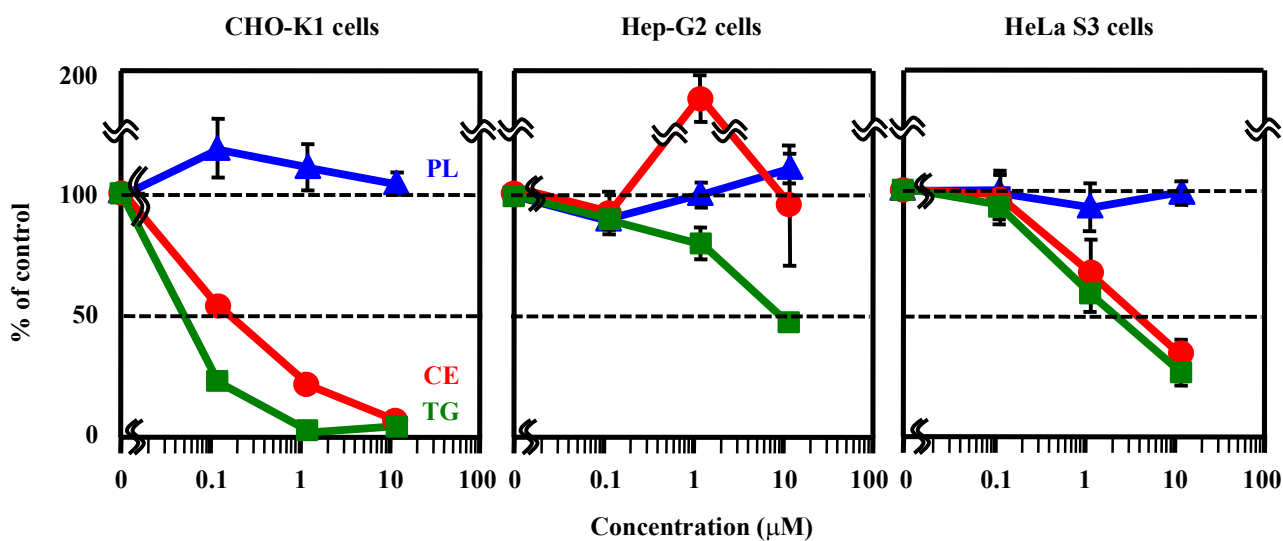


Figure 4-3 Effect of DPA1:1 on TG, CE and PL accumulation in CHO-K1, HepG2 and HeLa S3 cells.¹⁶¹⁾

4-1. TG 生合成経路中の酵素に対する阻害活性

細胞内における中性脂質の蓄積阻害には、次の 2 つの可能性が考えられる。すなわち、1) 添加した [¹⁴C]oleic acid から [¹⁴C]TG、[¹⁴C]CE への生合成経路の阻害、2) いったん生成した [¹⁴C]TG、[¹⁴C]CE の分解の促進、の 2 つである。DPA は TG および CE の両者の蓄積を阻害するが、TG の方に対してより強い阻害活性を示す。そこで、まず TG の方に着目し、TG の生合成経路に対する DPA の影響を調べた。生体内において TG はグリセロール-3-リン酸 (G3P) 経路あるいはモノアシルグリセロール経路の 2 つの経路 (Figure 4-4) によって合成されるが¹³²⁾、モノアシルグリセロール経路は主に小腸における脂質の吸収に関与していることから^{133,134)}、CHO-K1 細胞内においては G3P 経路が TG の主要な生合成経路であると考えられる。そこで、G3P 経路の各酵素、グリセロール-3-リン酸アシル転移酵素 (GPAT)、アシルグリセロール-3-リン酸アシル転移酵素 (AGPAT)、ホスファチジン酸加水分解酵素 (PAP)、ジアシルグリセロールアシル転移酵素 (DGAT) に対する DPA の阻害活性をそれぞれ評価した。化合物サンプルとしては、細胞レベルで一番強い活性を示した DPA1:1 を評価に用いた。

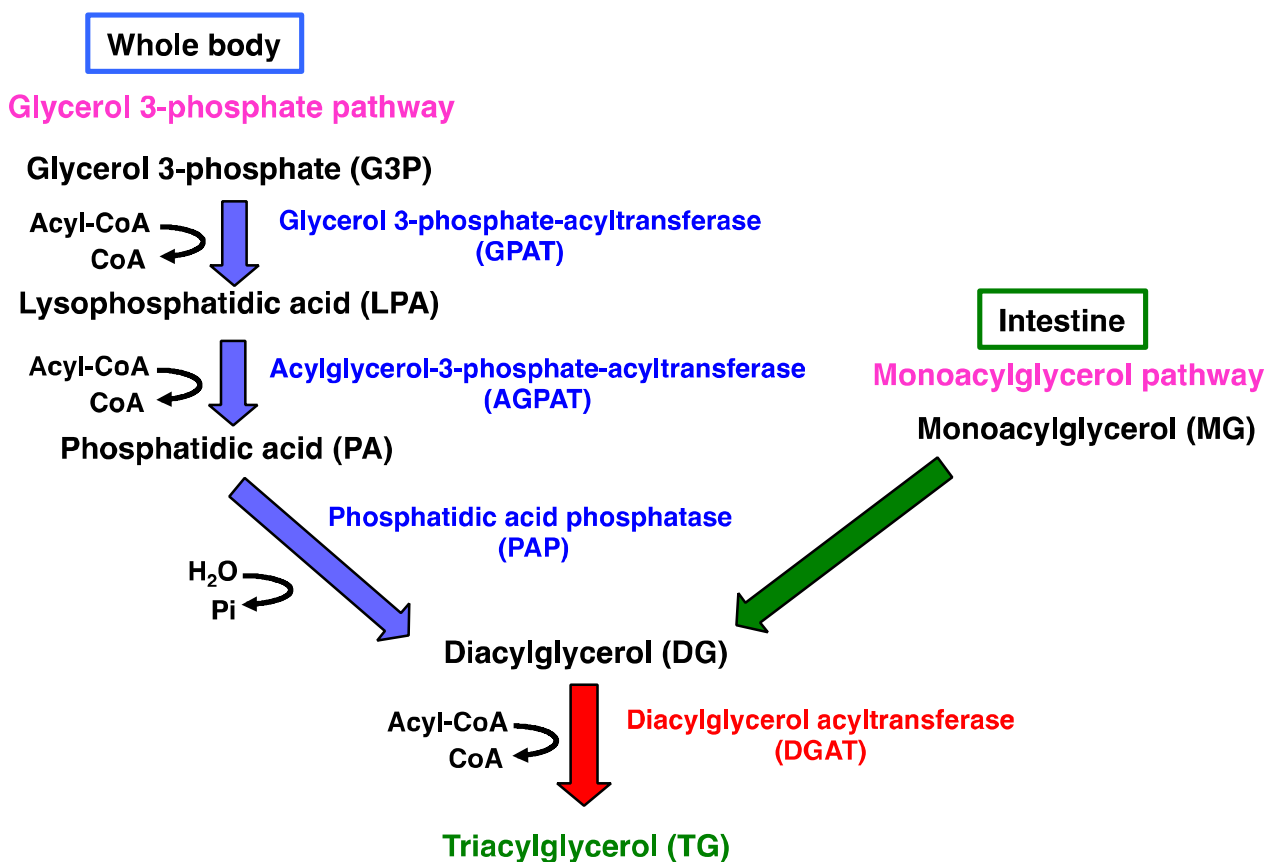


Figure 4-4 Biosynthesis pathways of triacylglycerol.

4-1-1. GPAT および AGPAT に対する阻害活性

まず、G3P にアシル基を転移させ、LPA の生成を触媒する酵素である GPAT、および LPA にさらにアシル基を転移させて PA の生成を触媒する酵素である AGPAT に対する阻害活性を評価した。CHO-K1 細胞より調製したミクロソーム画分を酵素源とし、 $[^{14}\text{C}]\text{G3P}$ を添加し、 25°C で 20 分間反応後、生成した $[^{14}\text{C}]\text{LPA}$ および $[^{14}\text{C}]\text{PA}$ を測定した¹³⁵⁾。結果、DPA1:1 を $12\ \mu\text{M}$ 作用させても、コントロールと比較して GPAT および AGPAT への顕著な阻害活性は見られなかった (Figure 4-5)。

4-2-2. PAP に対する阻害活性

次に、PA の加水分解反応により、DG 生成を触媒する酵素である PAP に対する阻害活性を評価した。CHO-K1 細胞より調製したミクロソームに $[^{14}\text{C}]\text{PA}$ を添加し、 30°C で 20 分間反応後、生成した $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ を測定した¹³⁶⁾。結果、DPA1:1 を $12\ \mu\text{M}$ 作用させても、コントロールと比較して PAP への顕著な阻害活性は見られなかった (Figure 4-5)。

4-2-3. DGAT に対する阻害活性

最後に DG にアシル基を転移させる DGAT に対する阻害活性を評価した。CHO-K1 細胞より調製したミクロソームに $[^{14}\text{C}]\text{palmitoyl-CoA}$ を添加し、 23°C で 15 分間反応後、生成した $[^{14}\text{C}]\text{TG}$ を測定した⁴⁵⁾。結果、DPA1:1 を $12\ \mu\text{M}$ 作用させても、コントロールと比較して DGAT への顕著な阻害活性は見られなかった (Figure 4-5)。

以上のことより、DPA の標的分子は G3P 経路上のいずれの酵素でもないことが示唆された。

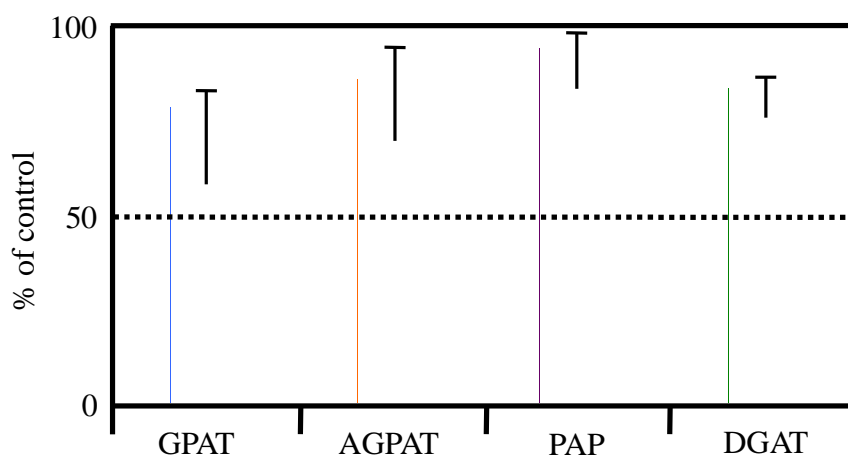


Figure 4-5 Inhibitory activity of DPA1:1 ($12\ \mu\text{M}$) on G3P pathway enzymes.

4-2. 中性脂質分解促進活性

4-1. の結果より、DPA は TG や CE 生合成経路の阻害剤ではないと考えられた。そこで、蓄積した TG や CE の分解を促進する可能性を考え、検討を行った。CHO-K1 細胞を [¹⁴C]oleic acid 存在下で 24 時間培養することで [¹⁴C]中性脂質を蓄積させた。その後、培地交換により [¹⁴C]oleic acid を除去し外部からの供給を絶つと共に、DPA1:1 を含有した新しい培地で培養し、経時的に細胞内および細胞外の総脂質を抽出し定量することで、細胞内に既に蓄積した [¹⁴C]中性脂質の分解に対する影響を評価した。このとき、[¹⁴C]oleic acid を添加してから 24 時間後の培地交換の時点をも 0 時間目とした。

0 時間目の細胞内の [¹⁴C]中性脂質蓄積量を 100% とした際、コントロールと比較して、DPA1:1 を 1.2 μM 以上作用させることにより、細胞内の [¹⁴C]TG および [¹⁴C]CE の時間依存的な減少が見られた (Figure 4-6 (a))。さらに、DPA1:1 を 12 μM 処理した際の細胞内および細胞外の総脂質を経時的に定量した。その結果、細胞内の [¹⁴C]TG および [¹⁴C]CE の時間依存的な減少が確認され、それに伴って、細胞外に [¹⁴C]oleic acid が分解量依存的に放出されていることが明らかとなった (Figure 4-6 (b))。以上のことから、DPA は中性脂質の分解を促進している可能性が示唆された。

細胞内で、TG および CE は脂肪滴に蓄積する。したがって、脂肪滴の分解が促進することにより、その両者の蓄積が阻害されることが考えられる。脂肪滴の分解経路としては、lipolysis とオートファジーの 2 つがこれまでに報告されている。そこで、これらの経路に対する影響を次に調べた。

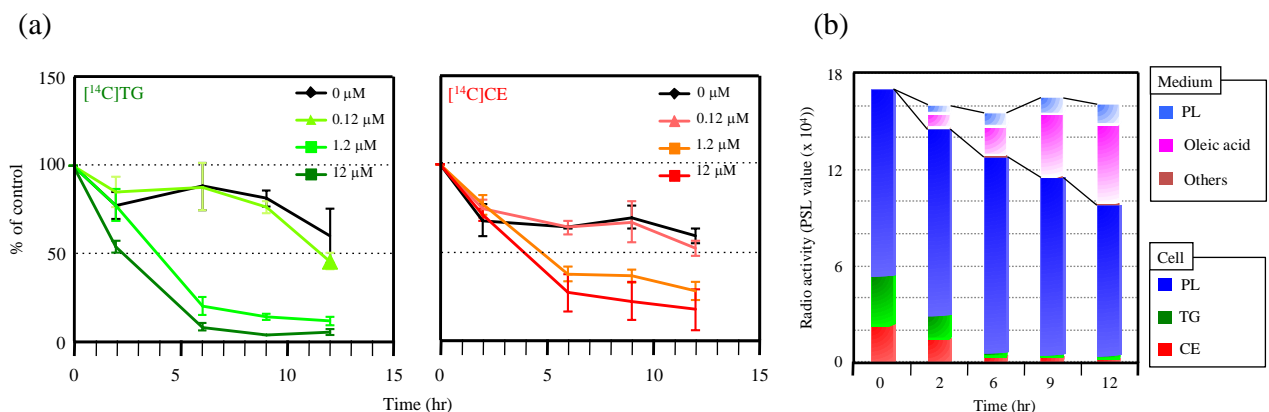


Figure 4-6 Promotion of neutral lipids degradation in CHO-K1 cells by DPA1:1.

(a) Time course of changes on cellular [¹⁴C]TG and [¹⁴C]CE accumulation.

(b) Intracellular and extracellular [¹⁴C]lipid profiling on DPA1:1 (12 μM) 6 hr treated cells.

4-3. Lipolysis への影響

生体レベルで、lipolysis は飢餓状態や運動時などエネルギーが必要な状況に働き、脂肪細胞内の脂肪滴構成成分である TG を分解し、生じた脂肪酸をミトコンドリアで酸化することで大量の ATP を獲得するという役割をもつ¹³⁷⁾。細胞レベルでの lipolysis の簡単な流れを Figure 4-7 に示した。通常時は脂肪滴膜に存在するタンパク質であるペリリピンが非リン酸化状態では、TG の脂肪酸トリグリセリドリパーゼ (ATGL) は活性化されず、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) もペリリピンにより脂肪滴への接触を妨げられている^{138, 139)}。しかし、空腹時や運動時には、 β 受容体に対するカテコールアミンの刺激によってプロテインキナーゼ A が活性化され、ペリリピンがリン酸化を受け、ATGL や HSL が活性化することにより TG が分解する^{137, 140)}。そこで、DPA がこの lipolysis 経路に影響を与えている可能性を考え、CHO-K1 細胞内において lipolysis が働いているのかどうかをまず調べた。

48 穴プレートに培養した CHO-K1 細胞に、 β 作動薬である isoproterenol¹⁴¹⁾ と共に [¹⁴C]oleic acid を取り込ませ、6 時間後に総脂質を回収し、蓄積した [¹⁴C]CE、[¹⁴C]TG を定量した。脂肪細胞の lipolysis 惹起に対して isoproterenol は一般的に 10 μ M で使用されているが、その 4 倍量である 40 μ M を用いても isoproterenol は CHO-K1 細胞内における TG および CE の蓄積を阻害しなかった。したがって、DPA の作用点は lipolysis 経路上にはない、もしくは CHO-K1 細胞はこの経路を有さないことが示唆された。

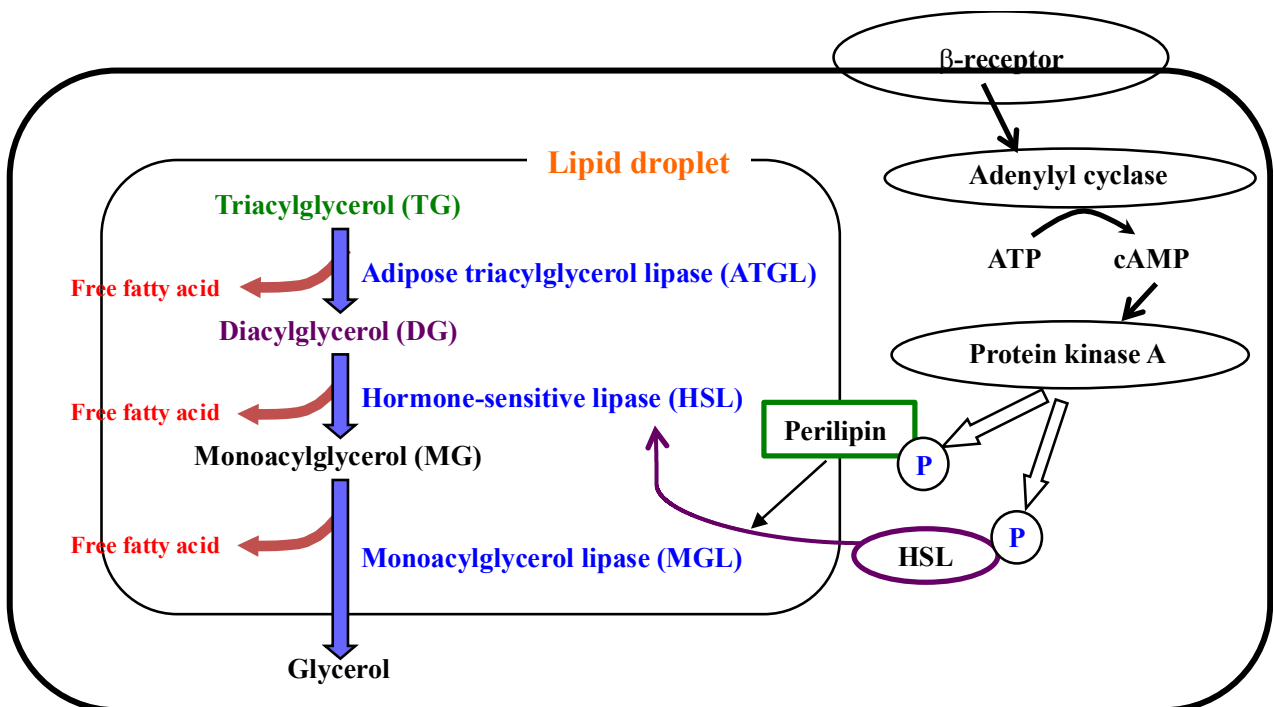


Figure 4-7 Mechanism of lipolysis.

4-4. オートファジー経路への影響

オートファジー (autophagy) とは、ギリシャ語で「自己」を表す **auto** と、「食べる」を表す **phagy** に由来する、細胞内自己分解システムのことである¹⁴²⁾。オートファジーでは、細胞が栄養飢餓や低酸素状態に陥ったときに、細胞生存のために自身の細胞内タンパク質や細胞内小器官を分解し、必要なエネルギーが産生される。さらにオートファジーは恒常的に細胞内の不良タンパク質の分解や再利用を行うだけでなく、細胞内に侵入した微生物の排除などの役割を担っている¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾。オートファジーの発現様式について **Figure 4-8** に示した。ファゴフォアとも呼ばれる隔離膜が細胞質に生じ、細胞内小器官や、異常タンパク質、病原体などの分解する対象物を取り囲んでオートファゴソームを形成する。次にオートファゴソームとリソソームが融合し、オートリソソームが形成され、オートファゴソーム内の内容物はリソソームの加水分解酵素群の働きによって分解・消化される。この分解を受ける対象物として、脂肪滴も報告されており、オートファジーによる脂肪滴の分解のことをリポファジー (**lipophagy**) ともいう¹⁴⁶⁾。したがって、オートファジーが促進することにより、脂肪滴の分解が進み、細胞内の中性脂質量は減少することが考えられる。

オートファジーのマーカータンパク質としては **LC3** がよく用いられる。**LC3** は、通常細胞質可溶性タンパク質として **LC3-I** の形で存在するが、**LC3-I** の **C** 末端側にホスファチジルエタノールアミン (**PE**) が共有結合した **LC3-II** はオートファゴソームに局在するようになり、この **LC3-II** 量はオートファゴソーム量を反映する¹⁴⁷⁾。したがって、**LC3-II** 量を生化学的に定量することで、オートファジー経路への影響を調べることができる。

(水島 昇・吉森 保 編、オートファジー、化学同人 (2012) より)

Figure 4-8 Mechanism of autophagy.

4-4-1. LC3 タンパク質の定量

DPA のオートファジー経路への影響を LC3 タンパク質を指標として調べた。化合物として、軸異性体である DPA1、DPA2 をそれぞれ単独、またその両者の混合である DPA1:1 を CHO-K1 細胞に添加し、6 時間培養後、細胞ライセートを調製し、ウエスタンブロッティングにて LC3 タンパク質を定量した。Figure 4-9 に示すように、DPA1:1 の処理により、濃度依存的な LC3-II 量の増加が確認され、12 μM および 1.2 μM を作用させたときにコントロールと比べてそれぞれ約 5.6 倍、5.1 倍の増加を示した。一方で、DPA1 単独の処理では、12 μM を作用させても LC3-II の顕著な増加は確認されなかった。また、DPA2 単独の処理では、濃度依存的な LC3-II 量の増加が確認され、12 μM を作用させたときにコントロールと比べて LC3-II の約 2 倍の増加を示したが、DPA1:1 と比較するとその増加はわずかであった。

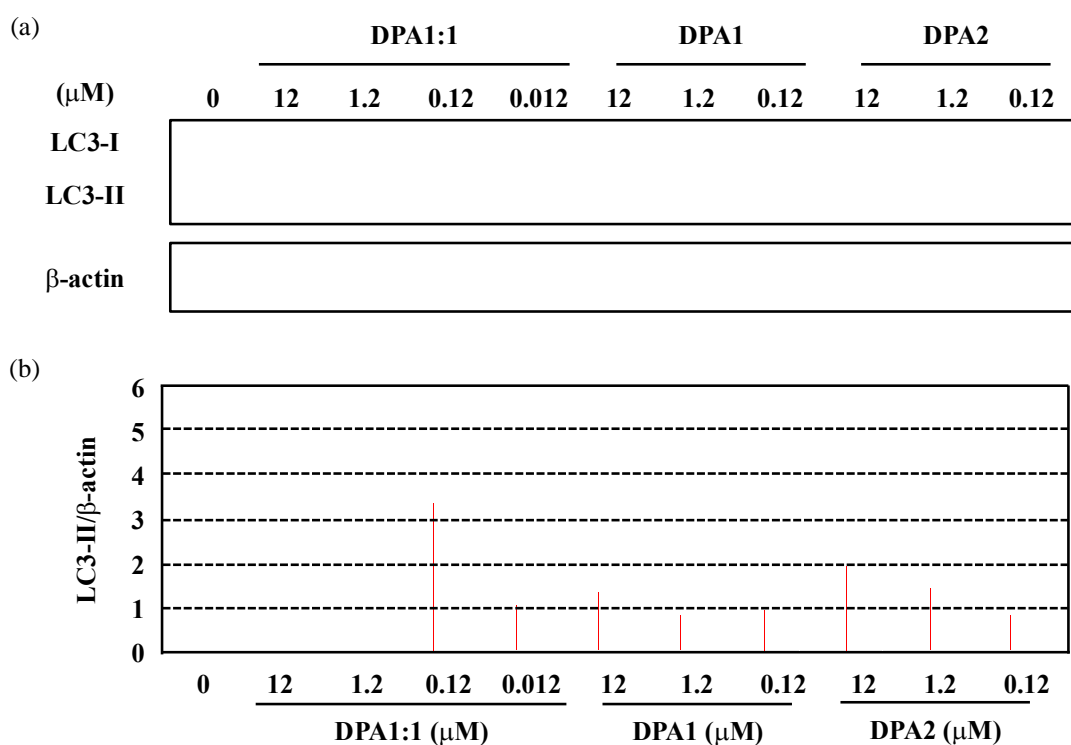


Figure 4-9 LC3-II induction of DPA-treated cells.

(a) The immunoblotting of LC3-I/LC3-II and β -actin.

(b) Quantitative analysis of immunoblotting of LC3-II controlled by β -actin.

次に、LC3-II 量の変化を経時的に測定した。化合物として DPA1:1 12 μ M を CHO-K1 細胞に添加し、0、2、4、6、8 時間培養後の細胞からそれぞれライセートを調製して、ウェスタンブロッティングにて LC3 タンパク質を定量した。Figure 4-10 に示すように、DPA1:1 で処理して 4 時間後から LC3-II の増加が確認され、その増加量はコントロールと比較して、4 時間後で約 6.5 倍、6 時間後で約 5 倍、8 時間後で約 4.4 倍であった。

以上のことから、DPA1:1 処理によって、LC3-II 量の増加が確認され、オートファジー経路に影響をおよぼしていることが明らかとなった。

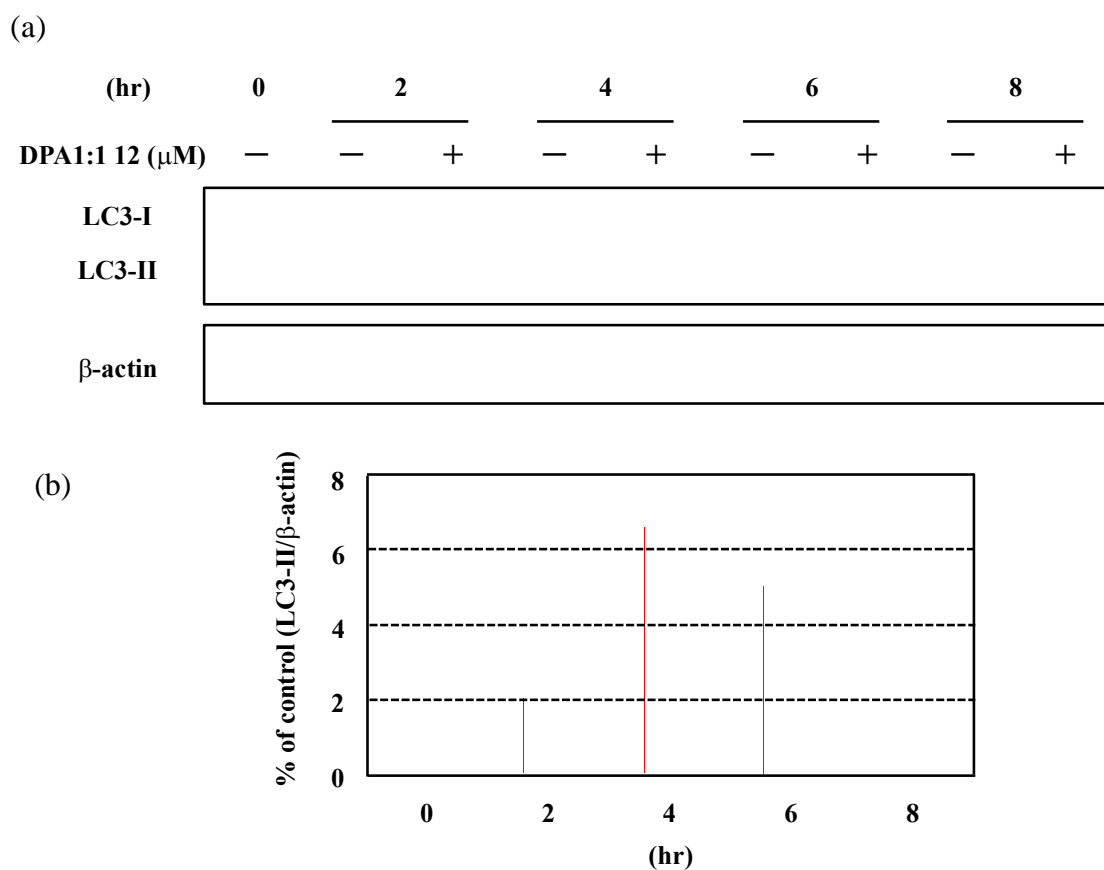


Figure 4-10 Time-dependent LC3-II induction of DPA1:1-treated cells.

(a) The immunoblotting of LC3-II/LC3-I and β -actin.

(b) Quantitative analysis of immunoblotting of LC3-II controlled by β -actin.

4-4-2. オートファジー促進活性

LC3-II 量の増加には 2 つの可能性がある。すなわち、1) オートファジー経路が促進することにより、オートファゴソーム量が増え、それに伴いオートファゴソームに結合する LC3-II 量が増加する場合。2) オートファゴソームとリソソームの融合が阻害される場合や、リソソームの酵素活性が阻害されるなどにより、オートファゴソームの分解が阻害され、恒常的に分解されるはずの LC3-II が分解されない場合である。特に、リソソーム機能の阻害剤である bafilomycin A1 (BafA1)^{148, 149)} や chloroquine¹⁵⁰⁾、リソソームプロテアーゼの阻害剤である pepstatin A¹⁵¹⁾ などでのこの現象は確認される¹⁵²⁾。そこで、DPA1:1 による LC3-II 量の増加が、オートファジー経路の促進もしくは阻害どちらによるのかを 2 つの方法で確認した。

4-4-2-1. オートファジーフラックスアッセイ

Figure 4-11 にフラックスアッセイの原理を示した¹⁵³⁾。フラックスアッセイとは化合物単独処理のときの LC3-II の増加量と、リソソーム機能阻害剤と化合物を併用したときの LC3-II の増加量を比較する方法である。すなわち、化合物がオートファジーの促進剤である場合、化合物の作用によりオートファゴソームが誘導され、LC3-II 量は増加する。さらに、リソソーム機能阻害剤によりオートファゴソームの恒常的な分解が阻害されるため、化合物単独のときと比べて、化合物とリソソーム機能阻害剤を併用したときの LC3-II の増加量の方が多くなる。一方で、化合物がオートファジーの阻害剤であった場合、リソソーム機能阻害剤と併用したときも、細胞内の分解されないオートファゴソームの量は変わらないため、化合物単独のときと比較し、リソソーム機能阻害剤を併用したときの LC3-II の増加量は変わらない。この原理に基づき、DPA のオートファジーへの影響をさらに調べた。

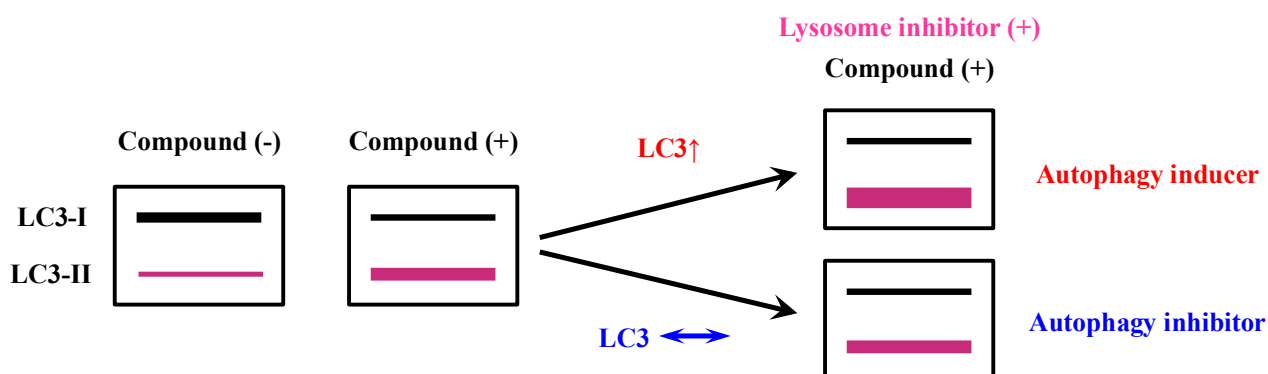


Figure 4-11 The principle of autophagy flux assay.

化合物として DPA1:1 の 12 μM と 1.2 μM 、リソソーム機能阻害剤として BafA1 16 nM を用いた。化合物をそれぞれ単独、または DPA1:1 と BafA1 を併用して CHO-K1 細胞に添加し、6 時間後の細胞からライセートを調製して、ウエスタンブロッティングにて LC3 タンパク質を定量した。Figure 4-12 に示すように、DPA1:1 を単独で処理した際の LC3-II 量の増加量はコントロールと比べて約 6 倍、BafA1 を単独で処理した際の LC3-II 量の増加量はコントロールと比べて約 9.3 倍であった。一方で、DPA1:1 と BafA1 を併用した際には LC3-II 量の増加量はコントロールと比べて約 13 倍であり、それぞれ単独で作用させたときの LC3-II 量より増加していた。以上のことより、DPA1:1 による LC3-II 量の増加はオートファジーの促進作用によることが示唆された。

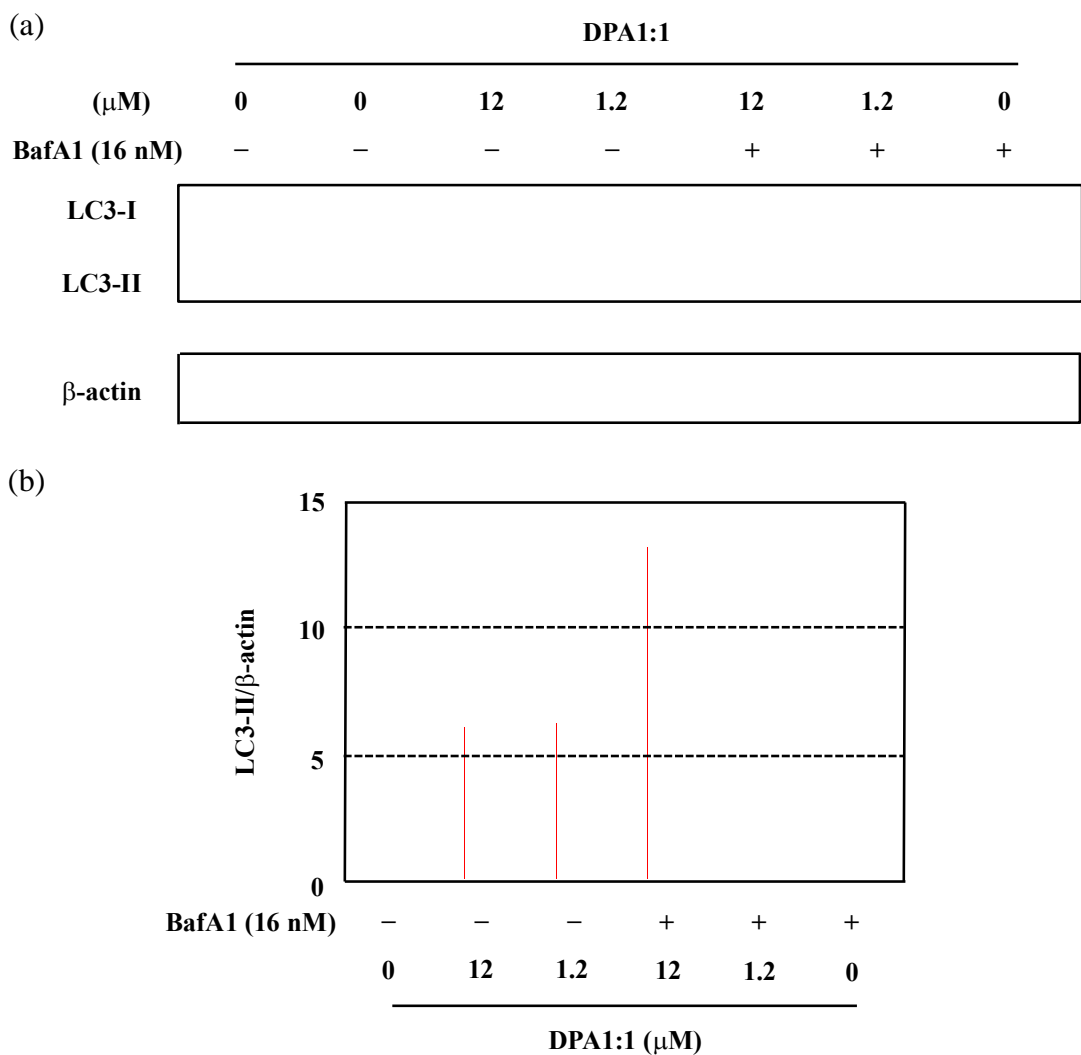


Figure 4-12 Autophagy flux assay in DPA1:1-treated cells.
 (a) The immunoblotting of LC3-II/LC3-I and β -actin.
 (b) Quantitative analysis of immunoblotting of LC3-II controlled by β -actin.

4-4-2-2. p62 タンパク質の定量

オートファジー活性のマーカータンパク質として p62/SQSTM1 タンパク質がある^{154, 155)}。p62 タンパク質はオートファゴソームに選択的に取り込まれて分解される基質として考えられている¹⁵⁶⁾。すなわち、化合物がオートファジーの促進剤である場合、細胞内 p62 量はコントロールと比べて減少し、オートファジーの阻害剤である場合は増加することが考えられる。そこで、DPA を CHO-K1 細胞に添加し、6 時間培養後の細胞からライセートを調製して、ウエスタンブロッティングにて p62 タンパク質を定量した。Figure 4-13 に示すように、DPA1:1 で細胞を処理したときに、化合物の濃度依存的に p62 量の減少が確認され、12 μM を作用させたときにコントロールと比べて約 56% 減少していた。一方で、DPA1 および DPA2 単独の処理では p62 量に影響は見られなかった。以上のことより、DPA1:1 による LC3-II 量の増加はオートファジーの促進作用によることが示唆された。

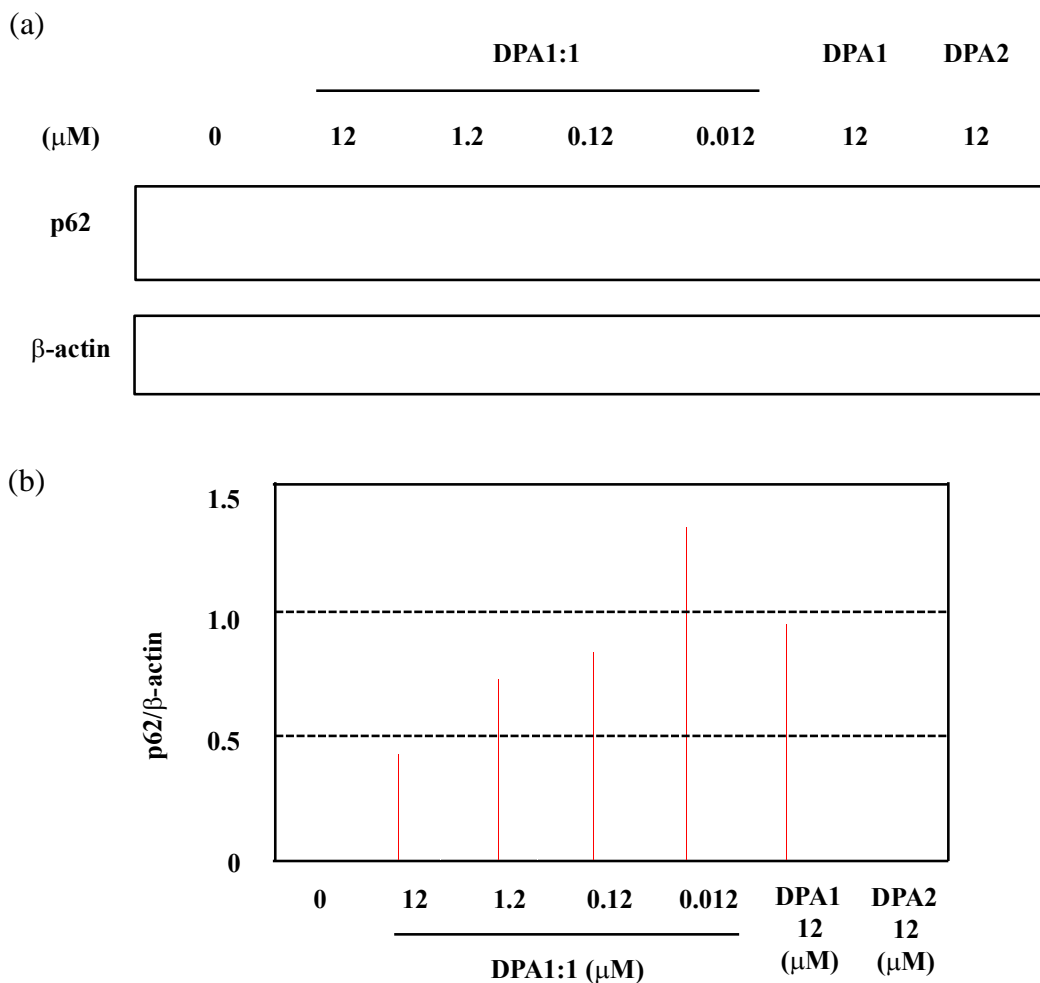


Figure 4-13 Increase of p62 degradation in DPA1:1-treated cells.

(a) The immunoblotting of p62 and β -actin.

(b) Quantitative analysis of immunoblotting of p62 controlled by β -actin.

4-3. mTOR への影響

オートファジー経路は、mTOR (mammalian target of rapamycin)¹⁵⁷⁾ の活性化により負に制御されている^{158, 159)} (Figure 4-14)。すなわち、mTOR の活性化を阻害することにより、オートファジーは促進することが考えられる。Rapamycin¹⁶⁰⁾ は mTOR を阻害することにより、オートファジーを促進することが報告されている¹⁶¹⁾。また、mTOR 経路の上流には、ホスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼ (PI3K)-Akt 経路が存在する。インスリンなどの成長因子の刺激により、PI3K-Akt 経路が活性化すると、TSC2 (tuberous sclerosis protein 2) をリン酸化することでその活性を抑制する¹⁶²⁾。TSC2 は、mTOR と会合することで mTOR を活性化する Rheb タンパク質を負に制御している¹⁶³⁾。また、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、TSC2 を正に制御することで mTOR を負に制御している¹⁵⁹⁾。すなわち、DPA はこれらの経路のいずれかに影響をおよぼすことでオートファジーを促進している可能性が考えられる。



Rapamycin

Ding W. X. *et al. Exp. Biol. Med.* **236**, 546 (2011)

Figure 4-14 mTOR pathway in relation to autophagy.

mTOR は、オートファジー経路を抑制するだけでなく、70-kDa リボソームタンパク質 S6 キナーゼ (p70S6K) や真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (4E-BP1) をリン酸化する働きをもつ¹⁶⁴⁾。したがって、これら下流のタンパク質のリン酸化を検出することで、mTOR 活性について調べることができる。そこで、リン酸化 p70S6K (p-p70S6K) を検出することで、DPA の mTOR 経路への影響を調べた。DPA1:1 または rapamycin を CHO-K1 細胞に添加し、6 時間培養後の細胞からライセートを調製して、ウェスタンブロッティングにて p-p70S6K を検出した。Figure 4-15 に示すように、rapamycin を作用させた際には p70S6K のリン酸化の阻害が見られたのに対し、DPA1:1 を 12 μ M を作用させても p70S6K のリン酸化は阻害されなかった。このことから、DPA は mTOR を直接阻害せず、またその上流の経路の因子に対して影響をおよぼしているわけではないことが示唆された。

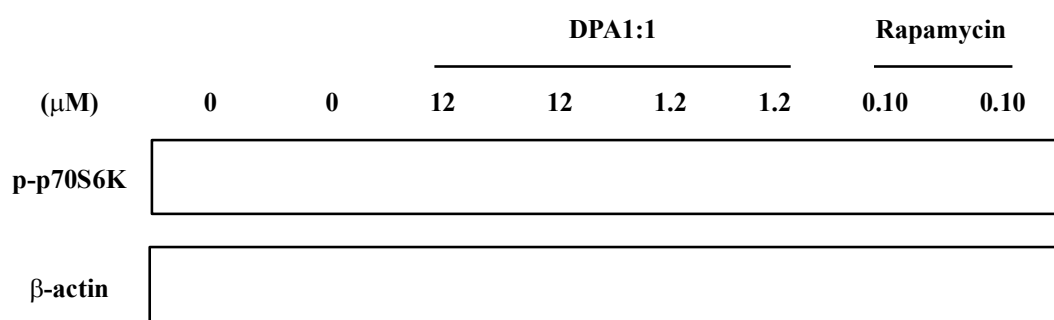


Figure 4-15 The immunoblotting of p-p70S6K.

4-5. 考察

第 4 章では、真菌由来 dinapinone A (DPA) の中性脂質蓄積阻害活性の作用機序解析について述べた。これまでの研究で、DPA には軸異性体の関係である DPA1 と DPA2 が存在し、この両者を 1:1 の比で混合した際 (DPA1:1) に最も蓄積活性が増強すること、そして TG と CE の両者を強力に阻害することが明らかとなっている。

まず生合成過程の阻害の可能性を検討した。より蓄積阻害活性が強かった TG の生合成経路に存在する各酵素への DPA1:1 の影響を調べたが、それらへの阻害活性は見られなかった (Figure 4-4)。他の可能性として、① [^{14}C]oleic acid の細胞内への取り込みの阻害、② acyl-CoA synthetase (ACS) による [^{14}C]oleic acid の [^{14}C]acyl-CoA への変換の阻害によって [^{14}C]TG、[^{14}C]CE 両者の生成が阻害されることが考えられる。しかし、DPA 処理により [^{14}C]TG および [^{14}C]CE の蓄積は阻害される一方で、[^{14}C]リン脂質 (PL) の生成は阻害されていないことから (Table 4-1)、① および ② も DPA の作用点ではないと考えられる。

次に、蓄積した中性脂質の分解を促進する可能性を検討した。DPA1:1 の処理により、濃度および時間依存的な細胞内 [^{14}C]TG、[^{14}C]CE の分解が確認され、それに伴う [^{14}C]oleic acid の培地中への放出が確認された (Figure 4-6)。細胞内で TG および CE は脂肪滴に蓄積するが、脂肪滴の分解が促進することにより、その両者の蓄積が阻害されることが考えられる。そこで次に、脂肪滴分解経路として知られている lipolysis¹³⁷⁾ とオートファジー¹⁴⁶⁾ への影響を検討した。脂肪細胞における lipolysis 経路の最上流に作用し、脂肪滴の分解を促進する化合物である isoproterenol¹⁴¹⁾ を用いて、CHO-K1 細胞に対するその影響を調べたが、TG および CE の蓄積阻害活性は示さなかった。したがって、DPA の作用点は lipolysis 経路上に関与しない、もしくは CHO-K1 細胞はこの経路を有さないことが示唆された。次にオートファジーへの影響を検討した。オートファジーのマーカータンパク質として LC3 を検出したところ、DPA1:1 の処理により LC3-II 量の顕著な増加が確認され (Figure 4-9)、これは DPA の中性脂質蓄積阻害活性の強さと相関した (Table 4-1)。また、その LC3-II の増加は、DPA1:1 で処理して 4 時間目以降から確認され (Figure 4-10)、これは細胞内中性脂質の分解が明確に確認され出した時間と相関した (Figure 4-6)。以上のことより、DPA の作用点にオートファジー経路が関係していることが強く示唆された。さらに、オートファジーフラックスアッセイ (Figure 4-12)、および細胞内 p62 タンパク質の定量 (Figure 4-13) により、DPA はオートファジーを促進している可能性が示された。

Figure 4-16 にオートファジーシグナル経路を示した。LC3 はオートファジー経路の下流

Figure 4-16 Autophagy pathway.

に位置し、その上流では mTOR がオートファジーを負に制御している^{158, 159)}。したがって、mTOR、もしくはその上流を阻害することによってオートファジーは促進することが考えられる。そこで、mTOR によるリン酸化基質である p70S6K のリン酸化レベルを検出したが、DPA1:1 はそのリン酸化を阻害しなかった (Figure 4-15)。以上のことより、DPA の作用点は、オートファジー経路の mTOR より下流、もしくは mTOR 経路以外に存在することが示唆された。mTOR より下流については、オートファゴソームの形成に関与する Beclin-1¹⁶⁵⁾ や Atg5¹⁶⁶⁾ を検出することで、DPA の作用点をさらに推測することができると考えられる。また、DPA の中性脂質蓄積阻害活性とオートファジーが直接的に関係しているのか、すなわち、オートファジーにより脂肪滴が分解されている (リポファジー) のかどうかについての検討が必要である。これは、LC3 タンパク質、リソソーム、脂肪滴をそれぞれ蛍光免疫染色や蛍光染色することで、その細胞内局在を調べることにより推測することができると考えられる。オートファジーは、1990 年代以降研究が発展した分野ではあるが、いまだ未解明の部分が多い。DPA のオートファジーへの影響をさらに明らかにすることで、新たな細胞内シグナル経路の解明に繋がることが期待される。

また、DPA は、軸異性体の関係である DPA1 と DPA2 が存在し、DPA1:1 の際に最も蓄積活性が増強する特徴も有する。これまでに、このような活性を示す化合物の報告例はなく

非常に興味深い。Figure 4-17 に、現在推定している DPA の活性発現機構を示した。すなわち、1 つの可能性として、DPA は、DPA1 間、DPA2 間および DPA1 と DPA2 間で、水酸基を介した水素結合などによりそれぞれ分子間で相互作用することである種のコンフォメーションを形成し、この各コンフォメーションと、標的分子の結合部位との親和性の差が、活性発現の差として表れていることが考えられる。この可能性を検討する 1 つの方法として、DPA1、DPA2 および DPA1:1 の NMR による測定があげられる。 ^1H NMR および ^{13}C NMR の測定による各水酸基に関するケミカルシフト値の変化、また ROESY 測定による NOE 相関の変化を解析することで、各分子間での相互作用を検出することができるのではないかと考えている。

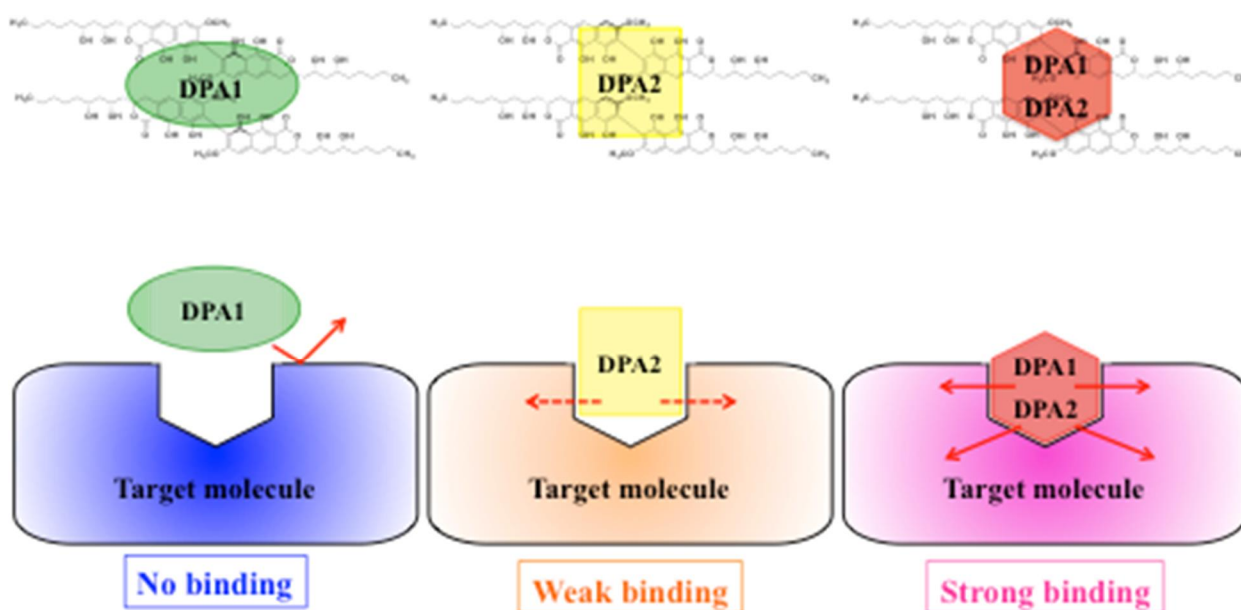


Figure 4-17 The putative action mechanism of DPA to target molecule.

III. 総括

現在、脂質異常症に起因する心疾患や脳血管疾患は死亡原因の上位を占めている。脂質異常症は中性脂質であるコレステリルエステル (CE) およびトリアシルグリセロール (TG) の生体内への過剰な蓄積が原因となり、その予防治療薬の開発は重要な研究課題である。CE 蓄積の予防治療薬として、現在 HMG-CoA 還元酵素を特異的に阻害するスタチン系医薬品が広く臨床で用いられているが、実際には 30~40% しか発症抑制効果が得られていないことが明らかとなってきた²²⁾。また、TG の蓄積を阻害する化合物は、動脈硬化症へとつながる肥満の予防治療薬として期待されているが³¹⁾、その数は少なく、TG 蓄積を阻害する医薬品は実用化には至っていない。したがって、生体内の中性脂質量を制御する化合物の発見、およびその作用機序を解明することは、新たな創薬リード化合物の提供および新たな創薬ターゲットの発見につながる可能性から非常に重要である。このような背景のもと、著者らの研究グループは、脂質異常症予防治療の有望な標的分子として、ステロール *O*-アシル転移酵素 (SOAT) に着目してきた。SOAT には SOAT1 と SOAT2 の 2 つのアイソザイムが存在し⁴⁹⁻⁵²⁾、脂質異常症の予防治療には SOAT2 の選択的な阻害が重要であることが示唆されている⁵³⁻⁵⁸⁾。そこで、著者らの研究グループはアフリカミドリザルの SOAT1 および SOAT2 をそれぞれ選択的に発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (SOAT1-CHO 細胞と SOAT2-CHO 細胞)⁶³⁾を用いた評価系を構築した。本評価系は細胞レベルでの SOAT アイソザイムに対する選択性を識別できる点、および一連の TG 代謝も評価できる点で有用である。

本研究では、SOAT2-CHO 細胞を用いて微生物資源からの細胞内中性脂質蓄積阻害活性物質の探索を行い、得られた活性物質について、構造解析および作用機序の解析を行った。また、すでに本評価系により単離されていた dinapinone A (DPA)⁶⁶⁾ の作用機序解析を行い、以下の結果を得た。

1. 微生物資源からの細胞内中性脂質蓄積阻害活性物質の探索

放線菌および真菌の培養液 5,498 サンプルを探索した結果、活性化合物として 11 化合物を単離精製および同定した。

2. 海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の生産する細胞内コレステリルエステル蓄積阻害物質 bafilomycin L に関する研究

探索研究により選択された海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の培養液中よ

り活性成分として bafilomycin C1⁶⁹⁾、および bafilomycin L (BafL) を単離した。各種機器分析の結果、BafL は 16 員環マクロライド構造と、 α -ピラン環を有する新規化合物であることを明らかとした。BafL の中性脂質蓄積阻害活性を評価した結果、CHO 細胞に対しては IC₅₀ 値 0.83 nM、マクロファージに対しては IC₅₀ 値 6.1 nM で CE の蓄積を選択的かつ強力に阻害していることを明らかとした。その作用機序を解析したところ、BafL は細胞内小器官の酸性化に影響をおよぼしており、その作用点は液胞型 ATPase (V-ATPase) を直接的に阻害すること、またその結合部位は bafilomycin A1 と同様であることを明らかとした。このように、BafL が細胞内酸性小器官 (とくにリソソーム) の V-ATPase を阻害し、コレステロール代謝に影響を与えることで CE の生成を阻害することを明らかとした。

V-ATPase の阻害は、脂質代謝調節だけでなく、骨粗鬆症やがん治療の新しい分子標的として考えられており、製薬企業においても、bafilomycin をアナログとした創薬研究が展開されている。BafL が創薬のリード化合物となること、また V-ATPase 阻害に対する構造活性相関の知見が創薬研究に応用され、臨床においても本研究が貢献することが期待される。

3. 海洋由来放線菌 *Nocardiosis* sp. KM2-16 株の生産する SOAT2 阻害物質ジケトピペラジン化合物に関する研究

探索研究により選択された海洋由来放線菌 *Nocardiosis* sp. KM2-16 株の培養液中より活性成分として化合物 A⁷⁴⁾、および amaumine⁷⁵⁾ を単離した。化合物 A はこれまでに酵素反応による *in vitro* での合成は報告されていたが⁷⁴⁾、天然物として初めてその生産を確認した。また、化合物 A および amaumine のように、インドリン環とジケトピペラジン環が 5 員環を介して結合し、かつ 3 位の炭素にプレニル基をもつ特徴的な構造を有するジケトピペラジン化合物は、これまでに真菌でのみその生産が報告されていたが、放線菌からの生産を初めて確認した。得られたジケトピペラジン化合物の中性脂質蓄積阻害活性を評価した結果、化合物 A が酵素レベルで SOAT2 を 21 μ M で阻害することを明らかとした。また、amaumine が細胞レベル (IC₅₀ 値; 0.45 μ M) および酵素レベル (IC₅₀ 値; 1.2 μ M) で SOAT2 を選択的に阻害することを明らかとした。

これまでに数多くの SOAT 阻害剤が開発されてきたが、それらは SOAT1 選択的もしくは両アイソザイムを同程度阻害することから実用化に至っておらず、SOAT2 を高選択的に阻害する化合物は pyripyropene 類のみであった¹²⁹⁾。しかし、本研究により、amaumine が細胞レベルで SOAT1 と比較して SOAT2 に対し 60 倍以上の選択的阻害活性を有するこ

とを示した。Amauromine は pyripyropene 類と構造的にも異なることから、今後、誘導体の合成、*in vivo* 評価などを通して、これまで選択的な阻害剤の数が限られていた SOAT2 に対する新しい創薬の方向性を示し、臨床においても本研究が貢献することが期待される。

4. 真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株が生産する中性脂質蓄積阻害活性物 **dinapinone A** の作用機序解析

Dinapinone A (DPA) は TG および CE 両者の蓄積阻害活性を有すること、そしてその活性が、軸異性体である **dinapinone A1** および **A2** を等量混合 (DPA1:1) した際に最も増強するという興味深い特徴を持ち、作用機序解析を行った。まずより阻害活性が強い TG に着目し、TG の生合成経路中の各酵素への DPA1:1 の影響を調べたが、阻害活性は示さなかった。次に、中性脂質の分解に対する影響を調べたところ、DPA1:1 は濃度および時間依存的に細胞内の TG および CE を減少させており、脂質の分解を促進している可能性を見出した。さらに脂質分解経路への影響を調べたところ、DPA1:1 はオートファジーを促進していることを見出し、その作用が mTOR 非依存的である可能性を明らかとした。

現在臨床において、CE に関しては、コレステロールの生合成を阻害するスタチン系や、コレステロールの吸収を抑制する ezetimibe がよく用いられている。また、TG に関しては、中枢性の食欲抑制剤が使用されているが、TG の代謝を直接的に制御する化合物は上市すらされていないのが現状である。しかし本研究により、DPA が細胞レベルで中性脂質の分解促進という活性を有していることを明らかとし、肥満など、進行した脂質異常症治療薬のリード化合物となる可能性を示すことができた。今後、さらなる作用機構の解析、*in vivo* 評価などを通し、DPA が創薬研究の発展へと寄与することが期待される。

本研究を通し、天然物、とくに微生物資源より細胞内中性脂質代謝を制御する様々な化合物を発見し、その作用機序を明らかにした (Figure 1)。今後、これらの成果をあしがかりに、脂質異常症の予防治療につながる標的分子の発見や創薬への発展へと繋がっていくことを期待する。

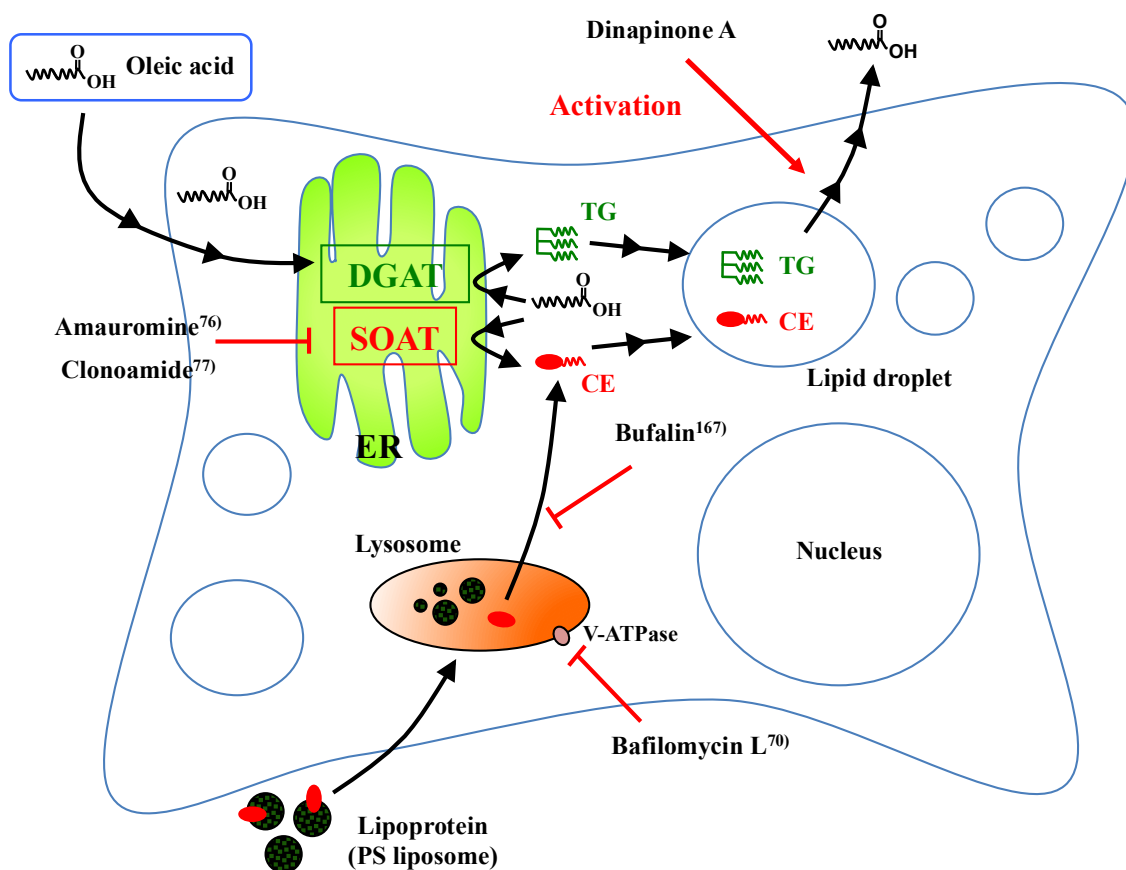


Figure 1 Targets of natural regulators of cellular lipid metabolism in mammalian cell.

IV. 実験の部

第 1 章

微生物資源からの細胞内中性脂質蓄積阻害活性物質の探索

I. 試薬

CH₃Cl (1 級)、MeOH (1 級)、EtOH (特級)、diethyl ether (特級) はナカライテスク株式会社より購入した。

CH₃COOH (特級)、hexane (特級)、KCl (特級)、HCl (特級) は関東化学株式会社より購入した。

NaCl (特級)、Na₂HPO₄ (特級)、KH₂PO₄ (特級) EDTA・4Na (特級)、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) (生化学用)、sodium dodecyl sulfate (SDS) (生化学用) は和光純薬工業株式会社より購入した。

Penicillin (10,000 units/mL) / streptomycin (10,000 mg/mL) (P/S) 溶液、2.5% trypsin 溶液、MEM vitamin solution、G418 sulfate (geneticin) は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。

HAM's F12 培地は Sigma-Aldrich 社より購入した。

Fetal bovine serum (FBS) は Hyclone 社より購入し、56°C、30 分の条件で加熱処理 (非働化) したものを使用した。

放射標識化合物 [1-¹⁴C]Oleic acid (9.25 MBq/2.5 mL, 1.85 GBq/mmol) は PerkinElmer 社より購入し、PBS (-) で 10 倍希釈したものを実験に用いた。

II. 実験材料

100 mm シャーレ、50 mL 遠心管、48 穴プレートは Corning 社より購入した。

TLC プレート (GF254、厚さ 0.5 mm) は MERCK 社より購入した。

0.20 μm シリンジフィルターは Sartorius 社より購入した。

III. 使用機器

冷却遠心機として久保田商事株式会社の KUBOTA 2700 を使用した。

マイクロ冷却遠心機として TOMY 社の AX-511 を使用した。

遠心エバポレーターとして EYELA 社の CVE-200D を使用した。

イメージアナライザーとして GE Healthcare 社の FLA-7000 を使用した。

IV. 実験試薬の調製

1. Transfect 培地の調製

HAM's F12 培地 500 mL に非働化済の FBS 55 mL、P/S 溶液 6.25 mL、geneticin (50 mg/mL となるように milli Q 水に溶解し、0.20 μ m シリンジフィルターで濾過滅菌したもの) 3.75 mL、MEM vitamin solution 5.0 mL を無菌的に添加したものを使用した。

2. PBS (-) 溶液の調製

NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄ 1.15 g、KCl 0.20 g および KH₂PO₄ 0.20 g を milli Q 水で全量が 1.0 L になるように溶解し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものを使用した。

3. 0.0625% trypsin/EDTA・4Na 溶液の調製

2.5% trypsin 溶液 2.5 mL、4.0% EDTA・4Na 溶液 0.5 mL を PBS (-) で全量が 100 mL になるように無菌的に添加したものを使用した。

4. 1.0 M Tris/HCl (pH 7.5) 溶液の調製

Tris 121.14 g を milli Q 水に溶解させ、HCl を用いて pH 7.5 に調整し、milli Q 水で全量が 1.0 L になるようにメスアップ後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものを使用した。

5. 0.10% SDS-Tris 溶液の調製

SDS 0.10 g、1.0 M Tris/HCl (pH 7.5) 溶液 1.0 mL を milli Q 水で全量が 1.0 L になるように溶解させたものを使用した。

V. 実験方法

1. スクリーニングサンプル

スクリーニングサンプルは、1) 当研究室で作製している放線菌および真菌の培養抽出液 (50% EtOH 溶液)、2) 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 今田 千秋 教授より提供していただいた放線菌株を培養した培養抽出液 (50% EtOH 溶液)、3) 秋田県立大学生物資源科学部応用生物学科 小島 郁夫 教授より提供していただいた放線菌培養液 (50% EtOH 溶液)、4) OP-BIO ファクトリー株式会社より提供された放線菌培養液抽出物を用いた。OP-BIO ファクトリー株式会社より提供された放線菌培養液抽出物については、50% EtOH 溶液 100

μL に各抽出物を溶解させたものをスクリーニングサンプルとして用いた。

2. 細胞および細胞培養

アフリカミドリザル由来の SOAT2 を選択的に発現させた CHO 細胞 (SOAT2-CHO 細胞と略す) は Wake Forest 大学の Rudel 教授らにより分与していただいたものを用いた⁶³⁾。

100 mm シャーレに Transfect 培地 10 mL を用いて 3 日間培養した細胞を PBS (-) 10 mL で洗浄し、0.0625% trypsin/EDTA \cdot 4Na 溶液を 1 mL 添加して全体に馴染ませ、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、5 分間静置して細胞を剥離した。新たに Transfect 培地 9 mL を加え、50 mL 遠心管に細胞を回収し、KUBOTA 2700 にて 1,000 rpm、4°C の条件で 5 分間遠心した。上清を除去し、新たに Transfect 培地 10 mL を加え懸濁後、細胞数を測定し、培地で 5.0×10^5 cells/mL に調整した。この細胞懸濁液を 48 穴プレートに 250 μL ずつ播種し、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、12 時間以上培養後、実験に使用した。

3. SOAT2-CHO 細胞内中性脂質蓄積量の測定⁶⁴⁾

細胞数 5.0×10^5 cells/mL に調整した SOAT2-CHO 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり 250 μL (1.25×10^5 cells) 播き 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、スクリーニングサンプル 5.0 μL と [¹⁴C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) 5.0 μL を添加した後、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、6 時間培養した。培養後、培地上清を除去し、細胞を PBS (-) 250 μL で 2 回洗浄した。これに 0.10% SDS-Tris 溶液 125 μL を加えて 10 分間静置することで細胞を溶解させた。そこに 150 μL の milli Q 水を加えて懸濁し、そのうち 200 μL を 10 mL 試験管に分注したのち、Bligh & Dyer 法¹⁶⁸⁾にて全脂質を抽出した。すなわち、CHCl₃: MeOH = 2 : 1 (2.0% CH₃COOH) 溶液、milli Q 水、CHCl₃ を順に 1.2 mL ずつ加え、ボルテックスにて混和後、AX-511 にて 1,000 rpm で 5 分間遠心し、水層と CHCl₃ 層を分離した。アスピレーターで水層を除去し、残った CHCl₃ 抽出液を遠心エバポレーターで減圧濃縮して脂質画分を得た。100 μL の CHCl₃: MeOH = 2 : 1 溶液に再溶解後、全量を TLC に供し、hexane : diethylether : CH₃COOH = 70 : 30 : 1 の展開溶媒で各脂質を分離した。その後、FLA-7000 を用いて TG (Rf 値: 0.55)、CE (Rf 値: 0.66) および PL (Rf 値: 0.05) のスポットの放射活性を測定した。ここで、5.0 μL の 50% EtOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、5.0 μL のスクリーニングサンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。

第 2 章

海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の生産する 細胞内コレステリルエステル蓄積阻害物質 **bafilomycin L** に関する研究

I. 試薬

CH₃CN (1 級および特級)、CH₃Cl (特級)、acetone (1 級)、MeOH (特級)、2-propanol (特級) はナカライテスク株式会社より購入した。

H₃PO₄ (特級)、NaHCO₃ (特級)、NaBr (特級) は関東化学株式会社より購入した。

MgSO₄ · 7H₂O (1 級)、soluble starch (1 級)、NZ amine type A、glucose (1 級および特級)、sucrose (特級)、DMSO (特級)、動物細胞培養用汎用培地 GIT、hematoxilin 溶液は和光純薬工業株式会社より購入した。

L-glutamine (200 mM in 0.9% saline) 溶液、DMSO-*d*₆ 溶媒、ProLong Antifade Kit は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。

Bafilomycin A1、gentian violet、glacial acetic acid、phosphatidylcholine、phosphatidylserine、dicetylphosphate、cholesterol、BSA、BSA (fatty acid free)、TFA は Sigma-Aldrich 社より購入した。

Yeast extract は Becton Dickinson 社より購入した。

Agar は SSK セールス株式会社より購入した。

ダイゴ人工海水、polypeptone は日本製薬株式会社より購入した。

カツオエキスは極東製薬工業株式会社より購入した。

HANKS 液「ニッスイ」粉末 (組織培養用、炭酸水素ナトリウム・フェノールレッド不含)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 「ニッスイ」粉末 (組織培養用、炭酸水素ナトリウム・L-グルタミン不含) は日水製薬株式会社より購入した。

昆布茶は玉露園食品工業株式会社より購入した。

Complete, Mini in EASYPack は Roche 社より購入した。

Bio-Rad protein assay dye reagent は Bio-Rad 社より購入した。

Oil red O 粉末は MERCK 社より購入した。

放射標識化合物 [1-¹⁴C]oleoyl CoA (1.85 MBq/1.0 mL, 1.85 GBq/mmol) は PerkinElmer 社より購入した。

第 1 章の実験の部と共通の試薬については、第 1 章で記載したものを使用した。

II. 実験材料

96 穴プレートは Corning 社より購入した。

マイクロチューブは Thermo Fisher Scientific 社より購入した。

25 G 針および 20 mL シリンジはテルモ株式会社より購入した。

23 G 針付きの 5 mL シリンジはニプロ株式会社より購入した。

スライドチャンバー (8 well, glass) およびカバーガラス (24 x 25 mm、厚さ 0.12~0.17 mm) は松浪硝子工業株式会社より購入した。

超遠心用のチューブには Beckman Coulter 社の OptiSeal、日立工機株式会社の 40PA チューブを使用した。

第 1 章の実験の部と共通の実験材料については、第 1 章で記載したものを使用した。

III. 使用機器

振盪培養器として高崎科学器械株式会社の TXY-25R-3FS を使用した。

冷却遠心機として株式会社コクサンの H-700R を使用した。

高速冷却遠心機として日立工機株式会社の himac CR21F、およびそのローターとして RPR-9-2 を使用した。

卓上超遠心機として Beckman Coulter 社の Optima Ultracentrifuge、およびそのローターとして TLA110 を使用した。

テーブルトップマイクロ冷却遠心機として久保田商事株式会社の KUBOTA 3500 を使用した。

冷却超遠心機として日立工機株式会社の SCP70H2、およびそのローターとして RP-65T を使用した。

ホモジナイザーとして KINEMATICA 社の PX-SR 50 E を使用した。

超音波装置としてヤマト科学社のブランソン卓上超音波洗浄器 5510 を使用した。

恒温水槽としてタイテック株式会社の PERSONAL-11 を使用した。

ボルテックスミキサーとして IKA 社の VORTEX genius 3 を使用した

pH センサーとして堀場製作所株式会社の LAQUA twin S010 を使用した。

ペリスタポンプとしてアトー株式会社の AC-2110 を使用した。

共焦点レーザー顕微鏡として Carl Zeiss 社の LSM510 META を使用した。

吸光度の測定機器として Bio Tek 社の Power Wave x340 を使用した。

NMR スペクトルの測定には Agilent Technologies 社の NMR system 400 MHz spectrometer および INOVA 600 MHz spectrometer を使用した。

質量分析には日本電子社の JMS-700 Mstation を使用した。

比旋光度の測定には日本分光社の DIP-1000 を使用した。

UV スペクトルの測定には Agilent Technologies 社の 8453 UV-visible spectrophotometer を使用した。

IR スペクトルの測定には堀場製作所株式会社の FT-710 を使用した。

超高速液体クロマトグラフィー (UFLC) には、以下に示す島津製作所株式会社の各ユニットを使用した。ポンプとして LC-20AD、オートサンプラーとして SIL-20AC HT、UV 検出器として SPD-M20A、カラムオーブンとして CTO-20AC、カラムとして Shim pack XR-ODS (2.0 ϕ x 75 mm) を使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) には、以下に示すセンシユ科学株式会社の各ユニットを使用した。ポンプとして SSC-3461、UV 検出器として SS-5410、レコーダーとして SS-250F、カラムとして PEGASIL ODS (20 ϕ x 250 mm) を使用した。

第 1 章の実験の部と共通の使用機器については、第 1 章で記載したものを使用した。

IV. 実験試薬の調製

1. Transfect 培地の調製

第 1 章 IV. 1 にしたがって調製したものを使用した。

2. PBS (-) 溶液の調製

第 1 章 IV. 2 にしたがって調製したものを使用した。

3. 0.0625% trypsin/EDTA \cdot 4Na 溶液の調製

第 1 章 IV. 3 にしたがって調製したものを使用した。

4. 0.10% SDS-Tris 溶液の調製

第 1 章 IV. 5 にしたがって調製したものを使用した。

5. 化合物サンプル溶液の調製

Bafilomycin L および C1 は生産菌を培養し、単離精製したものをを用いた。Bafilomycin A1 は試薬として購入したものをを用いた。化合物はそれぞれ CH_3CN もしくは DMSO に溶解させたものを使用した。

6. Buffer A の調製

Sucrose 17.12 g、KCl 1.87 g、 KH_2PO_4 2.72 g、EDTA・4Na 6.78 g を milli Q 水で溶解させ、全量を 500 mL とし、 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものを使用した (Fin. 100 mM sucrose、50 mM KCl、40 mM KH_2PO_4 、30 mM EDTA)。

7. Buffer B の調製

Buffer A 10 mL に対して、プロテアーゼ阻害剤として Complete, Mini in EASYPack を 1 錠加えて溶解させたものを使用した。

8. HAM 培地の調整

HAM's F12 培地 500 mL に非働化済の FBS 55 mL、P/S 溶液 6.25 mL を無菌的に添加したものを使用した。

9. HANKS buffer の調整

HANKS 粉末 9.8 g を Milli Q 水にて溶解し、 NaHCO_3 で pH 7.3~7.6 に調整した。その後 milli Q 水で 1 L にメスアップし、 $0.20\ \mu\text{m}$ シリンジフィルターを用いて濾過滅菌を行なったものを使用した。

10. Türk solution の調整

Gentian violet 2.0 g、glacial acetic acid 2.0 g を milli Q 水 200 mL に溶解させ、その溶解液をさらに 100 倍希釈したものを使用した。

11. MEM 溶液の調整

DMEM 粉末 4.75 g を milli Q 水で溶解し、全量を 500 mL とし、 121°C で 15 分間

高圧蒸気滅菌したものを使用した。

12. 7.5% NaHCO₃ 溶液の調整

NaHCO₃ 37.5 g を milli Q 水で溶解し、全量を 500 mL として、0.20 μm シリンジフィルターを用いて濾過滅菌したものを使用した。

13. Lipoprotein-deficient serum (LPDS) の調整⁹⁷⁾

FBS (30 mg protein/mL) 100 mL に NaBr 29.5 g を溶解させ、それを超遠心用チューブ (40PA チューブ) に分注し、SCP70H2 にて 4°C、160,000 g で 45 時間超遠心を行った。遠心後、チューブ上層にみられるリポタンパク質層を取らずに、下層の茶色の層をペリスタポンプを用いて回収した。回収液に対して、P/S 溶液を 15 mL 添加した PBS (-) 5 L 中で 6 回透析 (1 回目: 5-6 時間、2-5 回目: 12 時間おきに交換、6 回目: 18-24 時間) を行った。透析後、0.20 μm シリンジフィルターを用いて濾過滅菌を行った。これを Bradford 法 (第 2 章 V-3-1-3. 参照) にしたがってタンパク定量を行い、LPDS-DMEM を調製するために添加する LPDS の濃度を算出した。

14. リポソームの調整⁹⁷⁾

Phosphatidylcholine (1.0 mM)、phosphatidylserine (1.0 mM)、dicetylphosphate (0.20 mM) および cholesterol (1.5 mM) の CHCl₃ 溶液を中試験管に取り、ロータリーエバポレータで乾固して lipid film を作成した。これに、無菌的に調製した 0.30 M glucose 1 mL を加え、超音波処理とボルテックスミキサーによる攪拌を繰り返し、真珠色に白濁したものをリポソーム溶液とした。

15. Oil red O 染色液の調整

Oil red O 粉末 1.0 g を 2-propanol 100 mL に溶解させ、一昼夜攪拌して飽和溶液を作成した。この飽和溶液 18 mL と milli Q 水 12 mL を混合し、0.20 μm シリンジフィルターにて濾過後の濾液を染色液として実験に使用した。

V. 実験方法

1. *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の培養および bafilomycin 類の単離精製

1-1. 菌株

OP-BIO ファクトリー株式会社により沖縄県の比謝川の河口より単離された OPMA00072 株を使用した。本株は、16S rDNA の解析により、BLAST 検索によって放線菌である *Streptomyces* 属であると同定された。

1-2. 培地および培養方法

保存用の寒天培地には、HT 培地 (soluble starch 1.0%、NZ amin type A 0.20%、yeast extract 0.10%、カツオエキス 0.10%、agar 1.5%、pH 無調整) を用いた。種培地としては GPY 培地 (1.0% glucose、0.40% polypeptone、0.40% yeast extract、0.050% MgSO₄·7H₂O、0.10% K₂HPO₄、pH 無調整) を用いた。培養は種培地 100 mL を含む 500-mL 容三角フラスコに *Streptomyces* sp. OPMA00072 株の寒天培地から一白金耳植菌し、27°C で 7 日間振盪培養を行い、種培養液を得た。次に、生産培地である KOS 培地 (2.0% glucose、2.0% 昆布茶、0.90% ダイゴ人工海水、pH 7.6) 100 mL を含む 500-mL 容三角フラスコに前述の種培地 1.0 mL を植菌し、27°C で 9 日間振盪培養を行った。生産培養は三角フラスコ 50 本分 (5 L) を行った。

1-3. 培養経時変化の測定方法

培養液 2 mL を経時的に採取し、H-700R にて 3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、沈殿物の体積 (mL) を測定しこれを菌体量 (Packed Cell Volume (PCV)) とした。また得られた上清の pH を pH センサーを用い測定した。

また BafL 生産量の経時変化も測定した。前述の培養液 2 mL に等量の EtOH を加え、1 時間超音波処理を行った。得られた抽出液 1 mL をマイクロチューブに回収し、KUBOTA 3500 にて 10,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を 0.20 μm シリンジフィルターを用いてフィルター濾過を行った。得られた濾液 200 μL を用いて UFLC で解析を行った (移動相; 5-95% CH₃CN/H₂O-0.1% H₃PO₄ (7 min liner gradient)、流速; 0.55 mL/min、検出波長; 210 nm、カラム温度; 50°C、注入量; 1 μL)。BafL の生産量は、BafL 1 μg の UFLC 解析より得られたピーク面積と比較することにより算出した。

2. Bafilomycin 類の物理化学的性状および化学構造

比旋光度は、温度 28.7°C の条件下、MeOH 溶液を用い、1.0 mg/mL の濃度で測定した。

UV 吸収は、MeOH 溶液を用い、0.020 mg/mL の濃度で測定した。

IR は窓板材として KBr を用いた薄膜法により測定した。

NMR の測定には DMSO- d_6 (^1H ; 2.49 ppm、 ^{13}C ; 39.7 ppm) を内部標準として用い、化学シフトは δ (ppm) で表し、カップリングパターンは以下の略語で表した。s: singlet、d: doublet、dd : doublet doublet、br: broad、m: multiplet。

3. BafL の細胞内中性脂質蓄積阻害活性および作用機序解析

3-1. SOAT-CHO 細胞を用いた細胞内中性脂質蓄積阻害活性の測定

3-1-1. 細胞および細胞培養

アフリカミドリザル由来の SOAT1 および SOAT2 を選択的に発現させた CHO 細胞 (それぞれ SOAT1-CHO 細胞および SOAT2-CHO 細胞と略す) は Wake Forest 大学の Rudel 教授らにより分与していただいたものを用いた⁶³⁾。

細胞培養は第 1 章 V.2 と同様の方法で行い、実験に使用した。

3-1-2. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積量の測定⁶⁴⁾

細胞 5.0×10^5 cells/mL に調整した SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり $250 \mu\text{L}$ (1.25×10^5 cells) 播種し 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、化合物サンプル (BafL および BafC1) (CH_3CN 溶液) $2.5 \mu\text{L}$ と [^{14}C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) $5.0 \mu\text{L}$ を添加した後、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C 、6 時間培養した。以降の操作は、第 1 章 V.3 と同様の方法で総脂質を抽出し定量した。 $2.5 \mu\text{L}$ の CH_3CN を加えて反応した時の放射活性を A とし、 $2.5 \mu\text{L}$ の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。また、% of control が 50% を示した試料濃度を IC_{50} 値とした。

3-1-3. タンパク定量法

Bradford 法¹⁶⁹⁾にしたがって、Bio Rad protein assay dye reagent を用いて 96 穴プレートを用いて定量した。すなわち、数段階に希釈した試料を $10 \mu\text{L}$ 入れ、milli Q 水で 5 倍に希釈した Bio Rad protein assay dye reagent を $190 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 15 分間攪拌した後、595 nm の波長で吸光度を測定した。BSA 溶液を標準液として検量線を作成し、得られた吸光度からタンパク量を定量した。

3-1-4. SOAT-CHO 細胞からのミクロソーム画分の調製

SOAT 活性測定の酵素源としてのミクロソームは、Field らの方法⁹⁶⁾にしたがって調製した。3 日間 100 mm dish 内で培養した SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞を PBS (-) で洗浄し、0.0625% trypsin/EDTA・4Na 溶液を 1 mL 添加して全体に馴染ませ、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C で、5 分間静置して細胞を剥離させ、Transfect 培地用いて 50 mL プラスチックチューブに細胞を回収した。遠心後、上清を除去し、Buffer B を含む緩衝液 3 mL を用いて細胞を懸濁させ、その懸濁液をポッター型テフロンホモジナイザーにより、氷冷下、1,000 rpm で 10 回ホモジナイズした。これを超遠心用チューブ (OptiSeal) に移し、卓上超遠心機を用いて、4°C、100,000 g の条件で 1 時間遠心分離を行った。その沈殿物を 5 mg protein/mL のタンパク量となるように Buffer A で懸濁し、実験に使用した。

3-1-5. SOAT 活性の測定

SOAT 活性の測定は、Field らの方法⁹⁶⁾を一部改変して行った。すなわち、10 mL の試験管に、1 アッセイあたり BSA (fatty acid free) 500 µg、ミクロソーム画分 (SOAT1-CHO 細胞由来の場合は 100 µg タンパク質量、SOAT2-CHO 細胞由来の場合は 20 µg タンパク質量) と (BafL および BafC1) (CH₃CN 溶液) を 10 µL 加え、最後に全量が 198 µL になるように Buffer A を加えた。この酵素溶液を、恒温水槽を用いて 37°C で 5 分間プレインキュベーション後、[¹⁴C]oleoyl-CoA 基質溶液 2.0 µL (2.0 µM, 3.7 kBq) を加えて酵素反応を開始させた。37°C で 5 分間酵素反応後、CHCl₃: MeOH = 1 : 2 溶液を加えて酵素反応を停止させ、Bligh & Dyer 法¹⁶⁸⁾により総脂質を回収した。以降の操作は、第 1 章 V.3 と同様の方法で総脂質を定量し、生成した CE (Rf 値: 0.66) のスポットの放射活性を測定し、SOAT1 あるいは SOAT2 活性とした。また、10 µL の CH₃CN を加えて反応した時の放射活性を A とし、10 µL の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。

なお、上述したように、ミクロソーム量は、1 アッセイあたり SOAT1-CHO 細胞由来では 100 µg、SOAT2-CHO 細胞由来では 20 µg のタンパク質量を用いることにより、ほぼ同程度の CE 生成活性を示した。

3-2. CHO-K1 細胞を用いた細胞内中性脂質蓄積量の測定

3-2-1. 細胞および細胞培養

チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1 細胞) は国立感染症研究所花田 賢太郎 博士より分与して頂いたものを使用した。

Transfect 培地の代わりに HAM 培地を用いて、第 1 章 V.2 と同様の方法で CHO-K1 細胞を培養し実験に使用した。

3-2-2. CHO-K1 細胞内中性脂質蓄積量の測定⁶⁴⁾

細胞数 5.0×10^5 cells/mL に調整した CHO-K1 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり 250 μ L (1.25×10^5 cells) 播き 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、化合物サンプル (BafL、BafA1 および BafC1) (CH_3CN 溶液) 2.5 μ L と [^{14}C]oleic acid (0.20 mM, 1.85 kBq) 5.0 μ L を添加した後、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、6 時間培養した。以降の操作は、第 1 章 V.3 と同様の方法で総脂質を抽出し定量した。2.5 μ L の CH_3CN を加えて反応した時の放射活性を A とし、2.5 μ L の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。また、% of control が 50% を示した試料濃度を IC_{50} 値とした。

3-3. マウス腹腔内マクロファージを用いた細胞内中性脂質蓄積量の測定

3-3-1. 実験動物

マクロファージを採取するために用いたマウスは、ICR マウス (female、SPF、日本 SLC 株式会社) のリタイア (約 6 カ月令以上) したものを購入し、実験に使用するまで普通食を与えた。本実験は北里大学動物実験委員会の承認を受け、北里大学動物実験指針を遵守し行った。

3-3-2. マウス腹腔マクロファージの調整及び培養⁹⁷⁾

マウスの首を切断し、失血安楽死させ、25 G 針付の 20 mL シリンジを用いてマウスの腹腔内に HANKS buffer を 5 mL/匹注入した。マウスの腹部を 100 回マッサージした後、氷冷した 23 G 針付の 5 mL シリンジで腹腔内浸出細胞液を回収した。氷冷した 50 mL プラスチックチューブに腹腔内浸出細胞液を集め、KUBOTA 2700 にて 4°C、1,000 rpm の条件で遠心後、上清を除き、GIT 培地 5 mL に懸濁した。Türk solution にて細胞数を測定後、培地で 2.0×10^6 cells/mL の細胞数に調整した。この細胞懸濁液を 48 穴プレートおよびスライドチャンバーに 250 μ L ずつ播種し、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、12 時

間以上培養後、実験に使用した。

3-3-3. マウス腹腔マクロファージ内中性脂質蓄積量の測定⁹⁷⁾

48 穴プレート上に、マクロファージを 1 well あたり GIT 培地 250 μL 中に 5.0×10^5 cells の濃度で播種し、12 時間培養した。その後、PBS (-) にて 3 回洗浄し、LPDS-DMEM 培地 250 μL に交換後、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、2 時間以上培養した。そこに、化合物サンプル (BafL、BafA1 および BafC1) (CH_3CN 溶液) を 2.5 μL 添加後、リポソーム溶液 10 μL と [^{14}C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) 5.0 μL を添加し、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、14 時間培養した。以降の操作は、第 1 章 V. 3 と同様の方法で総脂質を抽出し定量した。2.5 μL の CH_3CN を加えて反応した時の放射活性を A とし、2.5 μL の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。また、% of control が 50% を示した試料濃度を IC_{50} 値とした。

3-3-4. マクロファージ内脂肪滴染色方法⁹⁷⁾

スライドチャンバー上に、マクロファージを 1 well あたり GIT 培地 250 μL 中に 5.0×10^5 cells の濃度で播種し、12 時間培養した。その後、PBS (-) にて 3 回洗浄し、LPDS-DMEM 培地 250 μL に交換後、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、2 時間以上培養した。そこに、BafL (CH_3CN 溶液) を 2.5 μL 添加後、リポソーム溶液 10 μL を加え、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、14 時間培養した。培養後、培養上清を除去し、PBS (-) で 3 回洗浄した。これを、3.7% formaldehyde 溶液で室温、20 分間処理し細胞を固定した。固定後、PBS (-) で 3 回洗浄し、oil red O 染色液を室温、15 分間処理し脂肪滴を染色した。さらに 60% 2-propanol で 1 回洗浄し、PBS (-) で 3 回洗浄した。そして、hematoxylin 溶液を室温、5 分間処理し核を染色した。その後、PBS (-) で 3 回洗浄し、ProLong Antifade Kit を用いてマウント後、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内脂肪滴を観察・撮影した。

3-4. V-ATPase 阻害活性の測定

本実験は筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎准教授の御協力をいただいて筑波大学にて実施された。

3-4-1. 細胞内酸性化の測定¹⁰²⁾

カバースリップ上に播種した HeLa 細胞に対し、化合物サンプル (BafL および BafA1) (DMSO 溶液) を添加後、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、2 時間培養した。培養後、培養上清を除去し、5 μM の acridine orange で 15 分間染色した後に、蛍光顕微鏡にて細胞内酸性化を観察した。

3-4-2. *In vitro* V-ATPase 活性の測定¹⁰²⁾

3-4-2-1. 酵母液胞膜画分の調整

酵母 *Sacchalomyces cerevisiae* BY4741 株を 1 白金耳とり、50 mL の YPD 培地 (polypepton 2.0%、glucose 2.0%、yeast extract 1.0%、adenin 0.040%、agar 2.0%) に植菌し 30°C、12 時間培養した。得られた培養液は、全量を 1 L の YPD 培地に植菌し、室温で 9 時間さらに培養した。その後、4°C、5,000 rpm で 5 分間遠心分離し上清を除去した。得られた菌体は、滅菌水 40 mL を用いて 4 回洗浄を行った後、菌体に 1 mM の DTT を含む solution A (1 M sorbitol、10 mM Tris・HCl (pH 7.0)) を 40 mL 加え、室温で 5 分間静置した。遠心分離にて上清を除去後、菌体に 40 mg の Zymolyase 20T を含む solution A を 40 mL 加え、37°C で 1 時間静置し、細胞壁を溶解させた。遠心分離にて上清を除いた後、菌体を solution A で 3 回洗浄し、12% Ficoll を含む solution A を 15 mL 加え、氷上で 10 回ホモジナイズした。得られた菌体懸濁液を超遠心チューブに移し、その上に solution B (8% Ficoll、10 mM Tris・HCl (pH 7.0)) を重層し、0°C、18,000 rpm で 1 時間超遠心を行った。遠心後、上層の白濁した画分を新しい超遠心チューブに回収し、その上に solution B を重層して再度、0°C、18,000 rpm で 1 時間超遠心を行った。遠心後、上層の白濁した画分を回収し、氷上で穏やかに 5 回ホモジナイズしたものを酵母液胞膜画分として実験に使用した。

3-4-2-2. V-ATPase 活性の測定¹⁰²⁾

Reaction mixture (5 mM MgCl₂、10 mM NH₄Cl、5 mM NaN₃、Na₃VO₄、液胞膜画分 5 μg) に化合物サンプル (BafL および BafA1) (DMSO 溶液) を 0.10% (v/v) となるよう混合後、25 mM Mes-Tris (pH 6.9) を用いて全量を 135 μL とし、氷上で 10 分間静置した。次いで 50 mM Na₂ATP を 15 μL 添加し、37°C で 20 分間酵素反応を行った。酵素反応は、0.6 M perchloric acid を 150 μL 加えた後、氷上に静置することで停止させた。ここに malachite green buffer (0.030% malachite green oxalate、0.20% NaMoO₄、0.050% Triton X-100、0.7 M HCl) を 300 μL 混合し、室温で 40 分間静置した後、650 nm の吸光度を測定した。

3-4-3. 変異酵母を用いた V-ATPase 結合部位の推定¹⁰²⁾

Kazami らにより作製された V-ATPase の c サブユニット変異酵母を実験に使用した。野生型の *VMA3* 遺伝子 (SKY080; *MATa his3 ura3 leu2 trp1 ade2 can1 pdr1::hisG pdr3::hisG yrs1::HIS3 yrr1::TRP1 vma3::natNT2, lue2-pRS305-VMA3*) をもつ酵母 (*VMA3*)、および変異型の *VMA3* 遺伝子 (ATU430; *MATa his3 ura3 leu2 trp1 ade2 can1 pdr1::hisG pdr3::hisG yrs1::HIS3 yrr1::TRP1 vma3::natNT2, leu2-pRS305-vma3-T32I*) をもつ酵母 (*vma-T32I*) をそれぞれ YPDA 培地 (1.0% yeast extract、2.0% polypeptone、2.0% glucose、0.20% adenine) に植菌し、30°C で培養した。得られた培養液は、600 nm の吸光度を測定することにより菌数を数え、滅菌水を用いて 1×10^7 cells/mL の濃度に調整した。調整した菌液は、滅菌水を用いて 5 倍ずつの段階希釈を行い、それぞれの希釈液 3.0 μ L を化合物サンプル (BafL および BafA1) を含有する YPDA 培地にスポットし、30°C で 3 日間培養後の生育状況を観察した。

第 3 章

海洋由来放線菌 *Nocardiosis sp.* KM2-16 株の生産する SOAT2 蓄積阻害物質ジケトピペラジン化合物に関する研究

I. 試薬

CaCO₃ (1 級)、KBr (特級)、N, N-dimethylformamide (DMF) は関東化学株式会社より購入した。

Fe₂(SO₄)₃ · nH₂O は和光純薬工業株式会社より購入した。

CDCl₃ は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。

3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT) は Sigma-Aldrich 社より購入した。

Yeast extract は Becton Dickinson 社より購入した。

天然海水は Deep Ocean 社より購入した。

第 1 章、第 2 章の実験の部と共通の試薬については、それぞれの章で記載したものを使用した。

II. 実験材料

第 1 章、第 2 章の実験の部と共通の実験材料については、それぞれの章で記載したものを使用した。

III. 使用機器

CD スペクトルの測定には日本分光の J-720 を使用した。

第 1 章、第 2 章の実験の部と共通の使用機器については、それぞれの章で記載したものを使用した。

IV. 実験試薬の調製

1. Transfect 培地の調製

第 1 章 IV. 1 にしたがって調製したものを使用した。

2. PBS (-) 溶液の調製

第 1 章 IV. 2 にしたがって調製したものをを使用した。

3. 0.0625% trypsin/EDTA・4Na 溶液の調製

第 1 章 IV. 3 にしたがって調製したものをを使用した。

4. 0.10% SDS-Tris 溶液の調製

第 1 章 IV. 5 にしたがって調製したものをを使用した。

5. 化合物サンプル溶液の調製

化合物 A および amaumine は生産菌を培養し、単離精製したものをを用いた。化合物はそれぞれ MeOH に溶解させたものを使用した。

6. Buffer A の調製

第 2 章 IV. 6 にしたがって調製したものをを使用した。

7. Buffer B の調製

第 2 章 IV. 7 にしたがって調製したものをを使用した。

8. HAM 培地の調整

第 2 章 IV. 8 にしたがって調製したものをを使用した。

V. 実験方法

1. *Nocardiopsis* sp. KM2-16 株の培養およびジケトピペラジン化合物の単離精製

1-1. 菌株

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 今田 千秋 教授らにより、沖縄県西表島の海底堆積物より単離された KM2-16 株を使用した。本株は 16S rRNA の解析により、BLAST 検索によって放線菌である *Nocardiopsis* 属であると同定された。

1-2. 培地および培養方法

保存用の寒天培地には、Waksman 寒天培地 (glucose 1.0%、peptone 0.5%、カツオエキス 0.10%、NaCl 0.3%、agar 2.0%、pH 7.0) を用いた。次に、生産培地である M1 培地 (1.0% starch、0.40% yeast extract、0.20% peptone、0.10% CaCO₃、0.010% KBr、0.0040% Fe₂(SO₄) · nH₂O、天然海水) を含む 500-mL 容三角フラスコに前述の寒天培地から一白金耳植菌し、27°C で 11 日間振盪培養を行った。生産培養は三角フラスコ 3 本分 (300 mL) を行った。

2. ジケトピペラジン化合物の物理化学的性状および化学構造

比旋光度は、温度 24.1°C の条件下、MeOH 溶液を用い、1.0 mg/mL の濃度で測定した。

UV 吸収は、MeOH 溶液を用い、0.020 mg/mL の濃度で測定した。

IR は窓板材として KBr を用いた薄膜法により測定した。

CD スペクトルは、MeOH 溶液を用い、各サンプル 1.0 mg/mL の濃度で測定した。

NMR の測定には CDCl₃ (¹H; 7.26 ppm、¹³C; 77.0 ppm) を内部標準として用い、化学シフトは δ (ppm) で表し、カップリングパターンは以下の略語で表した。s: singlet、d: doublet、t: triplet、sd: singlet doublet、dd : doublet doublet、td: triplet doublet、br: broad、m: multiplet。

3. ジケトピペラジン化合物の細胞内中性脂質蓄積阻害活性および SOAT 阻害活性

3-1. SOAT-CHO 細胞を用いた細胞内中性脂質蓄積阻害活性の測定

3-1-1. 細胞および細胞培養

第 2 章 V. 3-1-1 と同様の方法で行い、実験に使用した。

3-1-2. SOAT-CHO 細胞内中性脂質蓄積量の測定⁶⁴⁾

細胞 5.0 x 10⁵ cells/mL に調整した SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり 250 μL (1.25 x 10⁵ cells) 播き 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、化合物サンプル (化合物 A および amauromine) (MeOH 溶液) 2.5 μL と [¹⁴C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) 5.0 μL を添加した後、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、6 時間培養した。以降の操作は、第 2 章 V. 3-1-2 と同様の方法で行った。2.5 μL の MeOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、2.5 μL の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。また、% of control が 50% を示した試料濃度を IC₅₀ 値とした。

3-1-3. SOAT 活性の測定

第 2 章 V.3-1-5 と同様の方法で行った。5 μL の MeOH 溶液を加えて反応した時の放射活性を A とし、5 μL の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。また、% of control が 50% を示した試料濃度を IC_{50} 値とした。

3-2. 細胞毒性試験

3-2-1. 細胞および細胞培養

CHO-K1 細胞を用いて、第 2 章 V.3-2-1 にしたがって行った。

3-2-2. MTT 法による細胞毒性試験¹²⁰⁾

CHO-K1 細胞を HAM 培地で細胞数 5.0×10^5 cells/mL に調製し、96 穴プレートで 1 well あたり 125 μL (6.25×10^4 cells) 播種し、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、化合物サンプル (MeOH 溶液) を 1.25 μL 加え 3 時間培養後、PBS (-) で 5.5 mg/mL に調整した MTT 溶液を 10 μL 加えてさらに 3 時間培養を行った。培養後、MTT 細胞溶解液 (40% DMF/2% CH_3COOH /20% SDS/0.03 M HCl) を 100 μL 加え、室温で 30 分振盪し細胞を溶解させた後、550 nm の吸光度を測定した。ここで、培地のみ well の吸光度を A、各成分を含む well の吸光度を B、MeOH を含む well の吸光度を C とした場合に、% of viability = $(B-A)/(C-A) \times 100$ として計算した。

第 4 章

真菌 *Taralomyces phinophilus* FKI-3864 株が生産する 中性脂質蓄積阻害活性物質 **dinapinone A** の作用機序解析

I. 試薬

Nonidet P-40 (NP-40) はナカライテスク株式会社より購入した。

Benzene (特級) は関東化学株式会社より購入した。

2-Mercapto ethanol、diisopropyl fluorophosphate (特級)、maleic acid (特級)、isoproterenol (生化学用)、ammonium persulfate、N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)、polyoxyethylene (20) sorbitan moolaurate (Tween 20、分子生物学用) は和光純薬工業株式会社より購入した。

Glycerol-3-phosphate、1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol、palmitoyl-CoA、triton X-100、rapamycin は Sigma-Aldrich 社より購入した。

Skim milk は Becton Dickinson 社より購入した。

2x Laemmli Sample Buffer、acrylamide (電気泳動用)、N,N'-methylene-bis-acrylamide (電気泳動用)、Precision Plus Protein™ Standards Dual Color は Bio-Rad 社より購入した。

ECL™ Western Blotting Analysis System (ECL Kit と略す) は GE Healthcare 社より購入した。

Palmitoyl-CoA [palmitoyl-1-¹⁴C]- (1.85 MBq/2.5 mL, 2.22 GBq/mmol) は Moravek Biochemicals 社より購入した。

Phosphatidic acid, L- α -dioleoyl-[oleoyl-1-¹⁴C]- (1.85 MBq/mL, 2.04 GBq/mmol) および glycerol-3-PO₄, disodium salt, L-[¹⁴C(U)]- (3.7 MBq/mL, 5.55 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals 社より購入した。

第 1 章、第 2 章、第 3 章の実験の部と共通の試薬については、それぞれの章で記載したものを使用した。

II. 実験材料

6 穴プレートは Corning 社より購入した。

Polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンは MERCK 社より購入した。

第 1 章、第 2 章、第 3 章の実験の部と共通の実験材料については、それぞれの章で記

載したものを使用した。

III. 使用機器

電気泳動装置として BIO CRAFT 社の BE-220 を使用した。

タンク式ブロットイング装置として BIO CRAFT 社の MODEL BE-350 を使用した。

通電装置として BIO CRAFT 社の BP-T5 を使用した。

イメージアナライザーとして GE Healthcare 社の LAS-4000mini を使用した。

第 1 章、第 2 章、第 3 章の実験の部と共通の使用機器については、それぞれの章で記載したものを使用した。

IV. 実験試薬の調製

1. HAM 培地の調整

第 2 章 IV. 8 にしたがって調製したものを使用した。

2. PBS (-) 溶液の調製

第 1 章 IV. 2 にしたがって調製したものを使用した。

3. 0.0625% trypsin/EDTA・4Na 溶液の調製

第 1 章 IV. 3 にしたがって調製したものを使用した。

4. 0.10% SDS-Tris 溶液の調製

第 1 章 IV. 5 にしたがって調製したものを使用した。

5. 化合物サンプル溶液の調製

Dinapinone A1 (DPA1) および A2 (DPA2) は生産菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株を培養し、すでに確立された方法で単離精製したものをを用いた⁶⁶⁾。Isoproterenol、bafilomycin A1 (BafA1)、rapamycin はそれぞれ試薬として購入したものを使用した。BafA1 は CH₃CN に、それ以外の化合物は MeOH に溶解させたものを使用した。また、DPA1 および DPA2 の溶解液を等量ずつ混合したサンプルを DPA1:1 とし、実験に使用した。

6. Buffer A の調製

第 2 章 IV.6 にしたがって調製したものを使用した。

7. Buffer B の調製

第 2 章 IV.7 にしたがって調製したものを使用した。

8. Buffer C の調整

NaCl 8.766 g、BSA 2 mg、1 M Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL を milli Q 水で全量が 1 L になるように溶解し、0.20 μm シリンジフィルターで濾過滅菌したものを使用した (Fin. 150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、2.0 mg/mL BSA)。

9. Buffer D の調製

NaCl 8.766 g、1 M Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL を milli Q 水で全量が 1 L になるように溶解し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものを使用した (Fin. 150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl)。

10. Lysis buffer の調製

1 M Tris-HCl (pH 7.2) 5 mL、NaCl 1.4625 g、NP-40 0.1 mL、0.5 M EDTA 0.4 mL、glycerol 10 mL を milli Q 水で全量が 100 mL になるように溶解し、0.20 μm シリンジフィルターで濾過滅菌したものを使用した (Fin: 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)、250 mM NaCl、0.1% (v/v) NP-40、2 mM EDTA、10% (v/v) glycerol)。

11. Sample buffer の調製

2x Laemmli Sample Buffer 950 μL に、2-mercapto ethanol を 50 μL 加えたものを実験に使用した。

12. 泳動 buffer の調製

Tris 30.3 g、glycin 144.1 g、SDS 10 g を milli Q 水に溶解し、全量を 1 L としたものを 10 x 泳動 buffer ストック溶液として、室温で保存した。本ストック溶液を用時 milli Q 水にて 10 倍希釈して調製 (Fin: 25 mM Tris、192 mM glycine、0.10% SDS) したものを実験に使用した。

13. Transfer buffer の調製

Tris 30.3 g、glycin 142.6 g を milli Q 水に溶解し、全量を 1 L としたものを 10 x Transfer buffer ストック溶液として、室温で保存した。本ストック溶液を用時、20% MeOH 溶液となるように milli Q 水にて 10 倍希釈して調製 (Fin: 25 mM Tris、190 mM glycine、20% MeOH) したものを実験に使用した。

14. TBS-T の調製

1 M Tris-HCl (pH 7.4) 200 mL、NaCl 58.5 g、Tween 20 10 mL を milli Q 水に溶解し、全量を 1 L としたものを 10 x TBS-T ストック溶液として、室温で保存した。本ストック溶液を用時 milli Q 水にて 10 倍希釈して調製 (Fin: 20 mM Tris、100 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween 20) したものを実験に使用した。

15. Blocking buffer の調製

Skim milk 10 g を TBS-T に溶解し、全量を 200 mL としたものを実験に使用した。

V. 抗体

1. 一次抗体

Anti-LC3 (rabbit polyclonal) は医学生物学研究所株式会社より購入し、Blocking buffer で 1000 倍希釈して実験に使用した。

Anti-p62 (rabbit polyclonal) は医学生物学研究所株式会社より購入し、Blocking buffer で 500 倍希釈して実験に使用した。

Anti- β -actin (rabbit polyclonal) は医学生物学研究所株式会社より購入し、Blocking buffer で 10000 倍希釈して実験に使用した。

Anti-p-p70S6K (rabbit polyclonal) は Cell Signaling Technology 社より購入し、Blocking buffer で 1000 倍希釈して実験に使用した。

2. 二次抗体

Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase (HRP) linked whole antibody は GE Healthcare 社より購入し、Blocking buffer で 1000 倍希釈して実験に使用した。

VI. 実験方法

1. 細胞および細胞培養

CHO-K1 細胞を用いて、第 2 章 V.3-2-1 にしたがって行った。

2. TG 生合成経路中の酵素に対する阻害活性の測定

2-1. CHO-K1 細胞からのミクロソーム画分の調製⁹⁶⁾

3 日間 100 mm dish 内で培養した CHO-K1 細胞を PBS (-) で洗浄し、0.0625% trypsin/EDTA・4Na 溶液を 1 mL 添加して全体に馴染ませ、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C で、5 分間静置して細胞を剥離させ、HAM 培地用いて 50 mL プラスチックチューブに細胞を回収した。遠心後、上清を除去し、Buffer B を含む緩衝液 3 mL を用いて細胞を懸濁させ、その懸濁液をポッター型テフロンホモジナイザーにより、氷冷下、1,000 rpm で 10 回ホモジナイズした。これを超遠心用チューブ (OptiSeal) に移し、卓上超遠心機を用いて、4°C、100,000 g の条件で 1 時間遠心分離を行った。その沈殿物を 5 mg protein/mL のタンパク量となるように Buffer A で懸濁し、実験に使用した。

2-2. GPAT および AGPAT 活性の測定

Yet らの方法¹³⁵⁾を一部改変して行った。すなわち、10 mL の試験管に、1 アッセイあたり 1 M Tris-HCl (pH 7.4) 15 μ L、100 mM MgCl₂ 8 μ L、10 mg/mL BSA 20 μ L、1.5 mM glycerol-3-phosphate 20 μ L、280 mM palmitoyl-CoA 20 μ L、milli Q 水 109 μ L、[¹⁴C]glycerol-3-phosphate 1 μ L と化合物サンプル (DPA1:1) (MeOH 溶液) 10 μ L を添加した。ここにミクロソーム画分 5 μ L (25 μ g タンパク質量) を加え酵素反応を開始させた。恒温水層を用いて 25°C で 20 分間酵素反応後、CHCl₃:MeOH = 1:2 溶液を加えて酵素反応を停止させ、Bligh & Dyer 法¹⁶⁸⁾により反応液中の全脂質を抽出した。以降の操作は、第 1 章 V.3 と同様の方法で総脂質を定量した。ただし、TLC は CHCl₃:MeOH:CH₃COOH:H₂O = 65:25:4:2 の展開溶媒で分離し、ホスファチジン酸 (PA) (Rf 値: 0.39) およびリゾホスファチジン酸 (LPA) (Rf 値: 0.11) のスポットの放射活性を測定し、GPAT あるいは AGPAT 活性とした。また、10 μ L の MeOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、10 μ L の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。

2-3. PAP 活性の測定

Morlock らの方法¹³⁶⁾を一部改変して行った。すなわち、10 mL の試験管に、1 アッセイ

当たり 1 M Tris-maleate (pH 7.0) 5 μ L、10% Triton X-100 12.4 μ L、1 M 2-mercapto ethanol 1 μ L、1 M MgCl₂ 0.2 μ L、10 mg/mL BSA 2 μ L、milli Q 水 18.4 μ L、[¹⁴C]phosphatidic acid 1 μ L と化合物サンプル (DPA1:1) (MeOH 溶液) 10 μ L を添加した。ここにミクロソーム画分 50 μ L (250 μ g タンパク質量) を加え酵素反応を開始させた。恒温水層を用いて 30°C で 20 分間酵素反応後、CHCl₃: MeOH = 1 : 2 溶液を加えて酵素反応を停止させ、Bligh & Dyer 法¹⁶⁸⁾により反応液中の全脂質を抽出した。以降の操作は、第 1 章 V. 3 と同様の方法で総脂質を定量した。ただし、TLC は diethyl ether : benzene : EtOH : CH₃COOH = 40 : 50 : 2 : 0.2 の展開溶媒で分離し、ジアシルグリセロール (DG) (Rf 値: 0.68) のスポットの放射活性を測定し、PAP 活性とした。また、10 μ L の MeOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、10 μ L の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。

2-4. DGAT 活性の測定⁴⁵⁾

10 mL の試験管に、1 アッセイ当たり 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 35 μ L、1 M MgCl₂ 1.6 μ L、10 mg/mL BSA 20 μ L、1 M diisopropyl fluorophosphates 0.5 μ L、1.5 mM 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol 20 μ L、milli Q 水 82.5 μ L、280 mM palmitoyl-CoA 20 μ L、[1-¹⁴C]palmitoyl-CoA 0.4 μ L と化合物サンプル (DPA1:1) (MeOH 溶液) 10 μ L を添加した。ここにミクロソーム画分 10 μ L (50 μ g タンパク質量) を加え酵素反応を開始させた。恒温水層を用いて 23°C で 15 分間酵素反応後、1.2 mL の CHCl₃: MeOH = 1 : 2 溶液を加えて酵素反応を停止させ、Bligh & Dyer 法¹⁶⁸⁾により反応液中の全脂質を抽出した。以降の操作は、第 1 章 V. 3 と同様の方法で総脂質を定量した。また、10 μ L の MeOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、10 μ L の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = B/A x 100 を算出した。

3. 細胞内中性脂質分解促進活性の測定

細胞数 5.0 x 10⁵ cells/mL に調整した CHO-K1 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり 250 μ L (1.25 x 10⁵ cells) 播種し 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、[¹⁴C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) 5.0 μ L を添加し、5.0% CO₂ インキュベーター内にて 37°C、24 時間培養し、細胞内に [¹⁴C]脂質を蓄積させた。培養後、培養上清を除去し、細胞を Buffer C 250 μ L で 2 回洗浄後、Buffer D で 250 μ L で 2 回洗浄し、細胞外からの [¹⁴C]oleic acid の供給を絶った。新しく HAM 培地 250 μ L を入れ、化合物サンプル (DPA1:1) (MeOH 溶液) 2.5 μ L を加えて、さらに 2、6、9、12 時間培養した。各時

間について、培養上清、および細胞内から、第 1 章 V. 3 と同様の方法で総脂質を抽出し定量した。この際、TG (Rf 値: 0.55)、CE (Rf 値: 0.66)、PL (Rf 値: 0.05) に加えて、oleic acid (Rf 値: 0.30) のスポットの放射活性を測定した。細胞内中性脂質残量については、培地交換直前の細胞内の放射活性を A とし、培地交換して培養した後の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。また細胞内および培養上清の総脂質量については、各スポットの放射活性を直接比較した。

4. Lipolysis 活性の測定

細胞数 5.0×10^5 cells/mL に調整した CHO-K1 細胞を 48 穴プレートで 1 well あたり 250 μ L (1.25×10^5 cells) 播き 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。その後、化合物サンプル (isoproterenol) (CH_3CN 溶液) 2.5 μ L と [^{14}C]oleic acid (0.20 mM、1.85 kBq) 5.0 μ L を添加した後、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C、6 時間培養した。以降の操作は、第 1 章 V. 3 と同様の方法で総脂質を抽出し定量した。2.5 μ L の MeOH を加えて反応した時の放射活性を A とし、2.5 μ L の化合物サンプルを加えた時の放射活性を B とし、% of control = $B/A \times 100$ を算出した。

5. オートファジー経路への影響の測定

5-1. サンプルの調製

細胞数 5.0×10^5 cells/mL に調整した CHO-K1 細胞を 6 穴プレートで 1 well あたり 2 mL (1.0×10^6 cells) 播種し 12 時間以上培養することにより、80-90% コンフルエントとした。化合物サンプル 20 μ L を添加して一定時間培養した。培養後、PBS (-) で洗浄し、0.0625% trypsin/EDTA \cdot 4Na 溶液を 200 μ L 添加して全体に馴染ませ、5.0% CO_2 インキュベーター内にて 37°C で、5 分間静置して細胞を剥離させた。HAM 培地を用いてマイクロチューブに細胞を回収後、KUBOTA3500 を用いて 4°C、500 g の条件で 10 分間遠心し、遠心後の上清を除去した。細胞を PBS (-) で洗浄し、再度遠心分離を行った。遠心後、上清を除去し、Lysis buffer 30 μ L を用いて細胞を懸濁させ、氷上で 30 分間静置した。その後、5 秒間超音波処理を行い、KUBOTA3500 を用いて 4°C、12,000 g の条件で 10 分間遠心した。得られた上清に、等量の Sample buffer を添加し、100°C で 5 分間煮沸後、KUBOTA3500 を用いて 4°C、10,000 g の条件で 5 分間遠心した上清をサンプルとした。

5-2. SDS-PAGE

5-2-1. ゲルの作製

SDS-PAGE には 10% アクリルアミドゲルもしくは 15% アクリルアミドゲルを用いた。10% アクリルアミドゲルの分離ゲルは以下のように調製した。すなわち、分離ゲル buffer stock (3.0 M Tris-HCl, pH 8.8) 1.25 mL に acrylamide-bisacryl amide (acrylamide 30%, bisacrylamide 0.8%) 3.333 mL、10% SDS 0.1 mL、1.5% ammonium persulfate 500 L および milli Q 水 4.817 mL を加えてよく混合した。この分離ゲル溶液に TEMED 10 L を加え、あらかじめ組み立てておいた泳動用ガラス板 (8×10 cm) に流し込み、milli Q 水を重層して完全に固まるまで室温に放置した。また、15% アクリルアミドゲルの分離ゲルは以下のように調製した。すなわち、分離ゲル buffer stock (3.0 M Tris-HCl, pH 8.8) 1.25 mL に acrylamide-bisacryl amide (acrylamide 30%, bisacrylamide 0.8%) 5.0 mL、10% SDS 0.1 mL、1.5% ammonium persulfate 500 L および milli Q 水 3.15 mL を加えてよく混合した。この分離ゲル溶液に TEMED 10 L を加え、あらかじめ組み立てておいた泳動用ガラス板 (8×10 cm) に流し込み、milli Q 水を重層して完全に固まるまで放置した。濃縮ゲル buffer stock (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) 1.25 mL に acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8) 0.625 mL、10% SDS 0.05 mL、1.5% ammonium persulfate 0.25 mL および milli Q 水 2.825 mL をよく加えて混合した。この濃縮ゲル溶液に TEMED 10 L を加え、重層した milli Q 水を取り除いた分離ゲルの上に流し込み、サンプルコームを差し込んで濃縮ゲルが固まるまで室温に放置した。なお、完成したゲルは使用の直前まで乾燥・凍結しない形で冷蔵保存した。

5-2-2. サンプルの電気泳動

5-1. で調製したサンプルを 20 μ L/lane アプライし、泳動 buffer を用いて、ゲル 1 枚あたり 15 mA で泳動先端がゲルの最下部手前 5 mm に達するまで電気泳動を行った。分子量マーカーは Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color を 5 L/lane で用いた。

5-3. ウェスタンブロッティング

5-2-2. の泳動終了後のゲルは、タンク式ブロッティング装置と Transfer buffer を用いて、氷冷下、400 mA で 1 時間通電させ、PVDF 膜にタンパク質を転写させた。転写が完了した後、メンブレンを Blocking buffer で室温、1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。反応後、TBS-T を用いて、5 分間で 3 回メンブレンを洗浄

した。続いて、HRP 標識された二次抗体を室温、1 時間反応させた。反応後、TBS-T を用いて、10 分間で 3 回メンブレンを洗浄した。化学発光の検出には ECL kit を用い、検出は LAS4000 mini を用いて行った。

V. 謝辞

貴重な御指導、御鞭撻を賜わり、本論文だけでなく、投稿論文の作成、国内および国際学

会での学会発表にあたり直接の熱意ある御指導、御鞭撻を賜りました北里大学薬学部微生物薬品製造学教室教授 供田 洋 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、北里大学薬学部微生物薬品製造学教室で研究する機会を与えてくださいました、北里大学薬学部薬物治療学 I 教室 矢後 和夫 前教授、同 厚田 幸一郎 教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、V-ATPase に関する評価を行っていただきました筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎 准教授、菌株の提供および菌学研究をしていただきました東京海洋大学海洋科学技術研究科 今田 千秋 教授、同 寺原 猛 助教、秋田県立大学生物資源科学部応用生物学科 小島 郁夫 教授、OP-BIO ファクトリー株式会社 金本 昭彦 代表取締役、同 栗原 裕子 研究員、北里生命科学研究所 増間 碌郎 博士、同 野中 健一研究員、SOAT1- および SOAT2-CHO 細胞を分与して頂いた Wake Forest 大学 (USA) 教授 Lawrence L. Rudel 博士、CHO-K1 細胞を分与していただいた国立感染症研究所 花田 賢太郎 博士に心より御礼申し上げます。

NMR スペクトルの測定を行っていただきました北里大学薬学部化学系共有機器室 佐藤 倫子様、マスペクトルの測定を行っていただきました同 長井 賢一郎 博士に深く感謝致します。

また、本研究を行うにあたり、数々の有益な助言、ならびに御指導を頂きました北里大学薬学部微生物薬品製造学教室助教 福田 隆志 博士、同 特任助教 大城 太一 博士、同 特任助教 松田 大介 博士 (現 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) に心より御礼申し上げます。

研究室での生活の中で、数々の御協力及び激励を頂きました北里大学薬学部微生物薬品製造学教室准教授 猪腰 淳嗣 博士、同 講師 内田 龍児 博士、同 助教 小山 信裕 博士、同 講座研究員 安原 義 博士、同 秘書 萩森 裕子 様に深く感謝致します。また、本研究を行うにあたり、御協力を頂きました北里大学大学院薬学研究科修士課程 2 年 古川 茶勲様、同 修士課程 1 年 鈴木 あいか様、北里大学薬学部生命創薬科学科 4 年 関 怜子様 に深く感謝致します。

最後に、研究室での生活を共にし、数々の助言、援助をして下さいました北里大学薬学部微生物薬品製造学教室の大学院生、卒業研究生の皆様、私の研生活を経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝致します。

なお本研究の一部は、平成 27 年度日本学術振興会特別研究員 (DC2) の助成のもと行っ

たものであり、深く感謝致します。

平成 28 年 2 月 10 日

小林 啓介

VI. 参考文献

- 1) 海老塚豊ら、天然物化学、南江堂 (2007).
- 2) 奥田拓男ら、最新天然物化学、廣川書店 (2007).
- 3) 上野芳夫ら、微生物薬品化学、南江堂 (2007).
- 4) Alberts A. W. *et al.* Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77**, 3957-3961 (1980).
- 5) Dreyfuss M. *et al.* Cyclosporin A and C. New metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**, 125-133 (1976).
- 6) Burg R. W. *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **15**, 361-367 (1979).
- 7) Newman D. J. & Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477 (2007).
- 8) Feher M. & Schmidt J. M. Property Distributions: Differences between Drug, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 218-227 (2003).
- 9) Liu J. *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815 (1991).
- 10) Kino T. *et al.* FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* **40**, 1249-1255 (1987).
- 11) Kino T. *et al.* FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J. Antibiot.* **40**, 1256-1265 (1987).
- 12) Tomoda H. *et al.* Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase and cerulenin resistance in a cerulenin-producing fungus. *Seikagaku* **57**, 190-201 (1985).
- 13) Tomoda H. *et al.* Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. *Biochim. Biophys. Acta.* **17**, 595-598 (1987).
- 14) 厚生労働省 平成 26 年度人口動態統計
- 15) Grundy S. M. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc. Med.* doi: 10.1016/j.tcm.2015.10.004. (2015).
- 16) Witztum J. L. & Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1785-1792 (1991).

- 17) Steinberg D. & Lewis A., Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95**, 1062-1071 (1997).
- 18) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993)
- 19) Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes, *Circulation* **91**, 2844-2850 (1995).
- 20) Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **19**, 117-125 (2005).
- 21) Ginter E. & Simko V. Statins: the drugs for the 21st century? *Bratisl. Lek. Listy.* **110**, 664-668 (2009)
- 22) Libby P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225-1228 (2005).
- 23) Van Itallie T. B. *et al.* The treatment of pruritus and hypercholesteremia of primary biliary cirrhosis with cholestyramine. *N. Engl. J. Med.* **7**, 469-474 (1961).
- 24) Altmann S. W. *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, **303**, 1201-1204 (2004).
- 25) Kastelein J. J. *et al.* Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1431-1443 (2008).
- 26) Kastelein J. J. & Bots M. L. Statin therapy with ezetimibe or niacin in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* **26**, 2180-2183 (2009).
- 27) Bochem A. E. *et al.* The promise of cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition in the treatment of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 3143-3149 (2013).
- 28) Giugliano R. P. & Sabatine M. S. Are PCSK9 inhibitors the next breakthrough in the cardiovascular field? *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 2638-2651 (2015).
- 29) Keene D. *et al.* Effect of cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomized controlled trials including 117,411 patients. *British Medical Journal* **349**, g4379 (2014).
- 30) van de Woestijne A. P. *et al.* Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management. *Obes. Rev.* **12**, 829-840 (2011).
- 31) 佐藤隆一郎、今川正良、生活習慣病の分子生物学、三共出版 (2007).
- 32) Engstrom R. G. *et al.* Effects of 5-hydroxy-5-(4'-chlorophenyl)-2,3-

- dihydro-5H-imidazo[2,1-a]isoindole (mazindol, SaH 42-548) on the metabolism of brain norepinephrine. *Arch. International. Pharmacodynamie Therap.* **214**, 308-321 (1975).
- 33) Bray G. A. *et al.* A double-blind randomized placebo-controlled trial of sibutramine. *Obes. Res.* **4**, 263-270 (1996).
- 34) Rinaldi-Carmona M. *et al.* SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **350**, 240-244 (1994).
- 35) European Medicines Agency. European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorizations for sibutramine. *Press release* on 21 January 2010 (2010).
- 36) European Medicines Agency. The European Medicines Agency recommends suspension of the marketing authorizations of Acomplia. *Press release* on 23 October 2008 (2008).
- 37) Davidson M. H. *et al.* Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA* **281**, 235-242 (1999).
- 38) Namatame I. *et al.* Beauveriolides, specific inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Beauveria* sp. FO-6979. *J. Antibiot.* **52**, 1-6 (1999).
- 39) Tomoda H. *et al.* Phenohalasin, inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Phomopsis* sp. FT-0211. *J. Antibiot.* **52**, 851-856 (1999).
- 40) Koyama N. *et al.* Fungal isobisvertinol, a new inhibitor of lipid droplet accumulation in mouse macrophages. *Org. Lett.* **9**, 425-528 (2007).
- 41) Uchida R. *et al.* Suspendole, a new inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages, produced by *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25. *J. Antibiot.* **59**, 93-97 (2006).
- 42) Namatame I. *et al.* Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 737-743 (2004).
- 43) Tomoda H. & Doi T. Discovery and combinatorial synthesis fungal metabolites beauveriolides, novel antiatherosclerotic agents. *Acc. Chem. Res.* **41**, 32-39 (2008).
- 44) Tomoda H. *et al.* Roselipins, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase, produced by *Gliocladium roseum* KF-1040. *J. Antibiot.* **52**, 689-694 (1999).
- 45) Tomoda H. *et al.* Amidepsines, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Humicola* sp. FO-2942. I. Production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **48**, 937-941 (1995).
- 46) Omura S. *et al.* Pyripyropenes, highly potent inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase

- produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **46**, 1168-1169 (1993).
- 47) Alegret M. *et al.* Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerotic agents. *Methods. Find. Clin. Pharmacol.* **26**, 563-586 (2004).
- 48) Reindel J. F. *et al.* Toxicologic effects of a novel acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor in cynomolgus monkeys. *Toxicol, Pathol.* **22**, 510-518 (1994).
- 49) Chang C. C. *et al.* Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 20747-20755 (1993).
- 50) Anderson R. A. *et al.* Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J. Biol. Chem.* **273**, 26747-26754 (1998).
- 51) Cases S. *et al.* ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 26755-26764 (1998).
- 52) Oelkers P. *et al.* Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J. Biol. Chem.* **273**, 26765-26771 (1998).
- 53) Rudel L. L. *et al.* Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 121-127 (2001).
- 54) Chang T. Y. *et al.* Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 289-296 (2001).
- 55) Campos H. *et al.* Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipidemic men with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1043-1048 (1995).
- 56) Sherrard B. *et al.* LDL particle size in subjects with previously unsuspected coronary heart disease: Relationship with other cardiovascular risk markers. *Atherosclerosis* **126**, 277-287 (1996).
- 57) Hulthe J. *et al.* LDL particle size in relation to intima-media thickness and plaque occurrence in the carotid and femoral arteries in patients with hypercholesterolaemia. *J. Intern. Med.* **248**, 42-52 (2000).
- 58) Campos H. *et al.* Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *JAMA* **286**, 1468-1474 (2001).
- 59) Willner E. L. *et al.* Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1262-1267

- (2003).
- 60) Yagyu H. *et al.* Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J. Biol. Chem.* **275**, 21324-21330 (2000).
- 61) Accad M. *et al.* Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J. Clin. Invest.* **105**, 711-719 (2000).
- 62) Fazio S. *et al.* Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J. Clin. Invest.* **107**, 163-171 (2001)
- 63) Lada A. T. *et al.* Identification of ACAT1- and ACAT2-specific inhibitors using a novel, cell-based fluorescence assay: individual ACAT uniqueness. *J. Lipid Res.* **45**, 378-386 (2004).
- 64) Ohshiro T. *et al.* Selectivity of microbial acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitors toward isozymes. *J. Antibiot.* **60**, 43-51 (2007).
- 65) Ohshiro T. *et al.* Pyripyropene A, an acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2-selective inhibitor, attenuates hypercholesterolemia and atherosclerosis in murine models of hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1108-1115 (2011).
- 66) Ohte S. *et al.* Dinapinones, novel inhibitor of triacylglycerol synthesis in mammalian cells, produced by *Penicillium pinophilum* FKI-3864. *J. Antibiot.* **64**, 489-494 (2011).
- 67) Ohshiro T. *et al.* New verticilides, inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase, produced by *Verticillium* sp. FKI-2679. *J. Antibiot.* **65**, 255-262 (2012).
- 68) Ugaki N. *et al.* New isochaetochromin, an inhibitor of triacylglycerol synthesis in mammalian cells, produced by *Penicillium* sp. FKI-4942: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **65**, 15-19 (2012).
- 69) Warner G. *et al.* Metabolic products of macroorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiot.* **37**, 110-117 (1984).
- 70) Kobayashi K. *et al.* Bafilomycin L, a new inhibitor of cholesteryl ester synthesis in mammalian cells, produced by marine-derived *Streptomyces* sp. OPMA00072. *J. Antibiot.* **68**, 126-132 (2015).
- 71) Sasaki K. *et al.* Geldanamycin. I. Structure assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 7591-7593

- (1970).
- 72) Omura S. *et al.* A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot.* **30**, 275-282 (1977).
- 73) Beck J. *et al.* Metabolic products of actinomycetes. XXXV. Constitution of the macrotetrolides, monactin, dinactin, and trinaactin. *Helvetica. Chimica. Acta.* **45**, 620-630 (1962).
- 74) Yin W. B. *et al.* Reconstruction of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying an alpha-configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133-1141 (2010).
- 75) Takase S. *et al.* Amauromine, a new vasodilator. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **37**, 1320-1323 (1984).
- 76) Kobayashi K. *et al.* Diketopiperazines, inhibitors of sterol O-acyltransferase, produced by a marine-derived *Nocardioopsis* sp. KM2-16. *J. Antibiot.* **68**, 638-641 (2015).
- 77) Kobayashi K. *et al.* Clonoamide, a new inhibitor of sterol O-acyltransferase, produced by *Clonostachys* sp. BF-0131. *J. Antibiot.* **68**, 615-619 (2015).
- 78) 平成 27 年度 北里大学大学院薬学研究科 古川 茶勲 修士論文.
- 79) Omura S. *et al.* Triacsins, new inhibitors of acyl-CoA synthetase produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **39**, 1211-1218 (1986).
- 80) Whitesell L. *et al.* Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transgormation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8324-8328 (1994).
- 81) Gani O. A. & Engh R. A. Protein kinase inhibition of clinically important staurosporine analogues. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 489-498 (2010).
- 82) Asher I. M. *et al.* Ion complexation in nonactin, monactin, and dinaactin: a Raman spectroscopic study. *Biopolymers* **16**, 157-185 (1977).
- 83) Tomoda H. *et al.* Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. *Biochim. Biophys. Acta.* **921**, 595-598 (1987).
- 84) Baker G. H. *et al.* A conformational study of bafilomycin A1 by X-ray crystallography and NMR techniques. *Tetrahedron Lett.* **28**, 5565-5568 (1987).
- 85) O'Shea M. G. *et al.* Absolute configurations of macrolide antibiotics of the bafilomycin and leucanicidin groups. *J. Antibiot.* **50**, 1073-1077 (1997).

- 86) Kretschmer A. *et al.* The structures of novel insecticidal macrolides bafilomycins D and E, and oxohygroolidin. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2509-2511 (1985).
- 87) Carr G. *et al.* Bafilomycins produced in culture by *Streptomyces* spp. isolated from marine habitats are potent inhibitors autophagy. *J. Nat. Prod.* **73**, 422-427 (2010).
- 88) Zhang D. J. *et al.* Bafilomycin K, a new antifungal macrolide from *Streptomyces flavotricini* Y12-26. *J. Antibiot.* **64**, 391-393 (2011).
- 89) Ohta E. *et al.* Micromonospolide A, a new macrolide from *Micromonospora* sp. *Tetrahydron Lett.* **42**, 4179-4181 (2001).
- 90) Ohta E. *et al.* Micromonospolides A-C, new macrolides from *Micromonospora* sp. *Tetrahydron* **57**, 8463-8467 (2001).
- 91) Ueda J. *et al.* A new 16-membered tetraene macrolide JBIR-100 from a newly identified *Streptomyces* species. *J. Antibiot.* **63**, 627-629 (2010).
- 92) Seto H. *et al.* The isolation and structures of hygrolidin amide and defumarylhygroolidin. *J. Antibiot.* **37**, 610-613 (1984).
- 93) Tchize Ndejoung Ble S. *et al.* Hygrobafilomycin, a cytotoxic and antifungal macrolide bearing a unique monoalkylmaleic anhydride moiety, from *Streptomyces varsoviensis*. *J. Antibiot.* **63**, 359-363 (2010).
- 94) Kodani S. *et al.* Isolation and structural determination of a new macrolide, makinolide, from the newly isolated *Streptomyces* sp. MK-30. *J. Antibiot.* **65**, 331-334 (2012).
- 95) Hidaki M. *et al.* Isolation and structural determination of makinolide B from *Streptomyces* sp. MK-19. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1964-1966 (2013).
- 96) Field F. J. *et al.* Regulation of rabbit intestinal acyl coenzyme A-cholesterol acyltransferase *in vivo* and *in vitro*. *Gastroenterology* **83**, 873-880 (1982).
- 97) Namatame I. *et al.* Complete inhibition of mouse macrophage-derived foam cell formation by triacsin C. *J. Biochem.* **125**, 319-327 (1999).
- 98) Brown M. S. & Goldstein J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 223-261 (1983).
- 99) Naganuma S. *et al.* Inhibition of the accumulation of lipid droplets in macrophage J774 by bafilomycin B1 and destruxin E. *Biochim. Biophys. Acta.* **1126**, 41-48 (1992).
- 100) Furuchi, T., Aikawa, K., Arai, H. & Inoue, K. Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of

- vacuolar-type H(+)-ATPase, blocks lysosomal cholesterol trafficking in macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**, 27345-27348 (1993).
- 101) Bowman E. J. et al. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7972-7976 (1988).
- 102) Kazami S. et al. Iejimalides show anti-osteoclast activity via V-ATPase inhibition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1364-1370 (2006).
- 103) Forgac M. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J. Biol. Chem.* **274**, 12951-12954 (1999).
- 104) Yao G. et al. Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 821-827 (2007).
- 105) Muench S. P. et al. Structural divergence of the rotary ATPases. *Q. Rev. Biophys.* **44**, 311-356 (2011).
- 106) Qin A. et al. V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1422-1435 (2012).
- 107) Nishi T. & Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases: nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103 (2002).
- 108) Powell B. et al. Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* **275**, 23654-23660 (2000).
- 109) Gibson L. C. et al. Evidence that there are two copies of subunit c in V₀ complexes in the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. J.* **366**, 911-919 (2002).
- 110) Hanada H. et al. Kinetic studies of chromaffin granule H⁺-ATPase and effects of bafilomycin A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 873-878 (1990).
- 111) Qsteresch C. et al. The binding site of the V-ATPase inhibitor apicularen is in the vicinity of those for bafilomycin and archazolid. *J. Biol. Chem.* **287**, 31866-31876 (2012).
- 112) Bowman B. J. & Bowman E. J. Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J. Biol. Chem.* **277**, 3965-3972 (2002).
- 113) Bowman E. J. et al. The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 33131-33138 (2004).

- 114) Bowman B. J. *et al.* A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **281**, 31885-31893 (2006).
- 115) Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917-929 (2007).
- 116) Gagliardi S. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of bafilomycin A1 derivatives as inhibitors of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Med. Chem.* **41**, 1883-1893 (1998).
- 117) Gagliardi S. *et al.* Chemistry and structure activity relationships of bafilomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H⁺-ATPase. *Curr. Med. Chem.* **6**, 1197-1212 (1999).
- 118) Li J. *et al.* Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. *J. Antibiot.* **63**, 595-599 (2010).
- 119) Takase S. *et al.* Structure of amauromine, a new hypotensive vasodilator produced by *Amauroscus* sp. *Tetrahedron* **41**, 3037-3048 (1985).
- 120) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **16**, 55-63 (1983).
- 121) Huang R. *et al.* Diketopiperazines from marine organisms. *Chem. Biodivers.* **7**, 2809-2829 (2010).
- 122) Elsebai M. F. *et al.* Identification of a potent and selective cannabinoid CB1 receptor antagonist from *Auxarthron reticulatum*. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 86-869 (2011).
- 123) Shinohara C. *et al.* Gypsetin, a new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Nannizzia gypsea* var. *incurvata* IFO9228. I. Fermentation, isolation, physic-chemical properties and biological activity. *J. Antibiot.* **47**, 163-167 (1994).
- 124) Ali H. *et al.* A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS One.* **8**, e65328 (2013).
- 125) Kozlovsky A. G. *et al.* Regulosuvines A and B \hat{o} diketopiperazine alkaloids from *Penicillium rugulosum* and *Penicillium piscarium* fungi. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **37**, 292-296 (2001).
- 126) Hodge R. P. *et al.* Verrucofortine, a major metabolite of *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, the fungus that produces the mycotoxin verrucosidin. *J. Nat. Prod.* **51**, 66-73 (1988).
- 127) de Guzman F. S. *et al.* New diketopiperazine metabolites from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus*. *J. Nat. Prod.* **55**, 931-939 (1992).
- 128) Ishikawa K. *et al.* Novoamauromine and ent-cycloechinulin: two new diketopiperazine

- derivatives from *Aspergillus novofumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 717-719 (2010).
- 129) Ohshiro T. & Tomoda H. Isoform-specific inhibitors of ACATs: recent advances and promising developments. *Future Med. Chem.* **3**, 2039-2061 (2011).
- 130) Kawamoto K. *et al.* Production of monapinones by fermentation of the dinapinone-producing fungus *Penicillium pinophilum* FKI-3864 in a seawater-containing medium. *J. Antibiot.* **64**, 503-508 (2011).
- 131) 平成 22 年度 北里大学大学院薬学研究科 宇垣 成裕 修士論文
- 132) Coleman R. A. & Lee D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* **43**, 134-176 (2004).
- 133) Kayden H. J. *et al.* The monoglyceride pathway of fat absorption in man. *J. Clin. Invest.* **46**, 1695-1703 (1967).
- 134) Mattson F. H. & Volpenhein R. A. The digestion and absorption of triglycerides. *J. Biol. Chem.* **239**, 277262777 (1964).
- 135) Yet S. F. *et al.* Expression and identification of p90 as the murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochemistry* **32**, 9486-9491 (1993).
- 136) Morlock K. R. *et al.* Regulation of phosphatidate phosphatase activity by inositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170**, 3561-3566 (1988).
- 137) Carey G. B. Mechanisms regulation adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **441**, 157-170 (1998).
- 138) Brasaemle D. L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* **48**, 2547-2559 (2007)
- 139) Martinez-Botas J. *et al.* Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat. Genet.* **26**, 474-479 (2000).
- 140) Zimmermann R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386 (2004).
- 141) Xu X. *et al.* Postreceptor events involved in the up-regulation of beta-adrenergic receptor mediated lipolysis by testosterone in rat white adipocytes. *Endocrinology* **132**, 1651-1657 (1993)
- 142) Klionsky D. J. Autophagy revisited: conversation with Christian de Duve. *Autophagy* **4**, 740-743 (2008).
- 143) Onodera J. & Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and

- protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31582-31586 (2005).
- 144) Narendra D. *et al.* Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. cell Biol.* **183**, 795-803 (2008).
- 145) Deretic V. Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 252-262 (2010).
- 146) Singh R. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**, 1131-1135 (2009).
- 147) Kabeya Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **18**, 5720-5728 (2000).
- 148) Oda K. *et al.* Bafilomycin A1 inhibits the targeting of lysosomal acid hydrolases in cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 369-377 (1991).
- 149) Yoshimori T. *et al.* Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17707-17712 (1991).
- 150) Poole B. *et al.* The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta. Biol. Med. Ger.* **36**, 1777-1788 (1977).
- 151) Umezawa H. *et al.* Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J. Antibiot.* **23**, 259-262 (1970).
- 152) Ni H. M. *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **7**, 188-204 (2011).
- 153) Mizushima N. & Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545 (2007).
- 154) Bjorkly G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol.* **171**, 603-614 (2005).
- 155) Komatsu M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149-1163 (2007).
- 156) Noda N. N. *et al.* Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1379-1385 (2010).
- 157) Sabers C. J. *et al.* Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 815-822 (1995).
- 158) Diaz-Troya S. *et al.* The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851-865 (2008).

- 159) Sengupta S. *et al.* Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **40**, 310-322 (2010).
- 160) Vezina C. *et al.* Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* **28**, 721-726 (1975).
- 161) Biommaart E. F. *et al.* Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 2320-2326 (1995).
- 162) Inoki K. *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 648-657 (2002).
- 163) Sancak Y. *et al.* Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303 (2010).
- 164) Burnett P. E. *et al.* RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1432-1437 (1998).
- 165) Kihara A. *et al.* Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* **2**, 330-335 (2001).
- 166) Suzuki K. *et al.* The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**, 5971-5981 (2001).
- 167) Kobayashi K. *et al.* The mechanism of action of bufalin in inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 364-369 (2013).
- 168) Bligh E. G. & Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
- 169) Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).