

博士学位論文要旨

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

研究背景と目的

平成 26 年度の我が国における死因別死亡数の第 2 位が心疾患、そして第 4 位が脳血管疾患であり、これら疾患の主要因と考えられているのが脂質異常症である。脂質異常症には主に中性脂質であるコレステリルエステル (CE) やトリアシルグリセロール (TG) の細胞内への蓄積が関与する。CE は主にマクロファージ (Mφ) 内に脂肪滴として蓄積し、細胞の泡沫化に伴う動脈硬化病変の形成、およびその進展に伴う心筋梗塞や脳梗塞といった重篤な疾患を引き起こす。また TG の蓄積は肥満の原因となり、糖尿病、高血圧といったメタボリックシンドロームの発端となる。したがって、CE や TG の細胞内蓄積を阻害することは生活習慣病の予防治療につながり、そうした化合物の探索およびその作用機序の解析の解析により、新たな創薬シーズの提供および創薬ターゲットの発見につながることを期待される。このような背景のもと申請者は、主に微生物資源を対象として、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞内の CE および TG 量を指標とした評価系により細胞内中性脂質蓄積阻害剤の探索および作用機序解析を行った。本研究では、1) CE 蓄積阻害剤である新規化合物 bafilomycin L、2) CE 蓄積阻害剤であるジケトピペラジン化合物、3) TG 蓄積阻害剤である dinapione A の作用機序の解明を目的とした。

1. 放線菌由来 bafilomycin L (BafL) の発見およびその作用機序解析¹⁾

1-1. BafL の単離精製

OP BIO 社より提供された放線菌株 *Streptomyces* sp. OPMA00072 株を、昆布茶を主成分とした海水含有培地で 9 日間振盪培養し培養液 5 L を取得した。得られた培養液を遠心分離後、菌体をアセトンおよび酢酸エチルを用いた溶媒抽出、ODS クロマトグラフィー、最終的に ODS カラムによる HPLC を用いた精製を行い、化合物 **1** および **2** をそれぞれ 2.2 mg および 16.4 mg 取得した。化合物 **1** は各種機器分析および検索ソフトを用いた解析から bafilomycin C1 (bafC1)²⁾ (Fig. 1) と同定した。しかし、化合物 **2** については該当するものがなく新規化合物であると考えられた。

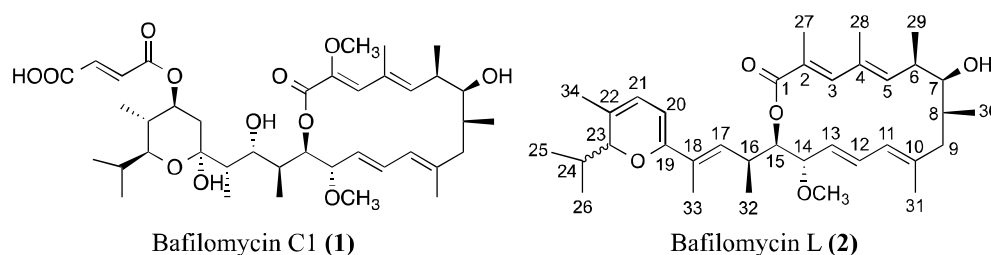


Fig 1. The structures of bafilomycin C1 (BafC1) (**1**) and bafilomycin L (BafL) (**2**).

化合物 **2** は高分解能 FAB-MS スペクトル解析より分子式 $C_{35}H_{52}O_5$ を示し、UV スペクトルでは 245 および 280 nm に特徴的な極大吸収を示した。化合物 **2** の平面構造は各種 2 次元 NMR の解析により決定した。Fig. 2a で示すように、太線で示した 1H - 1H COSY の解析より 4 つの部分構造が、および矢印で示した 1H - ^{13}C HMBC スペクトルの解析により I および II の 2 つの部分構造を推定した。さらに詳細な 1H - ^{13}C HMBC の解析により、33 位のメチルプロトンからの 17、18、19 位炭素への相関が観察され、部分構造 I および II は 18 位炭素を介して結合していることを明らかとし、**2** の平面構造を決定した。さらに立体化学については ROESY 解析により NOE の相関を確認することで **2** の相対立体構造を決定した (Fig. 2b)。化合物 **2** は新規な構造ではあるが、16 員環マクロライド bafilomycin 類と類似した構造を有していたことから、bafilomycin L (BafL) (Fig. 1) と命名した。これまでに報告されている bafilomycin 類の中で 19 位にピラン環を有する報告例はなく、新奇な構造であった。

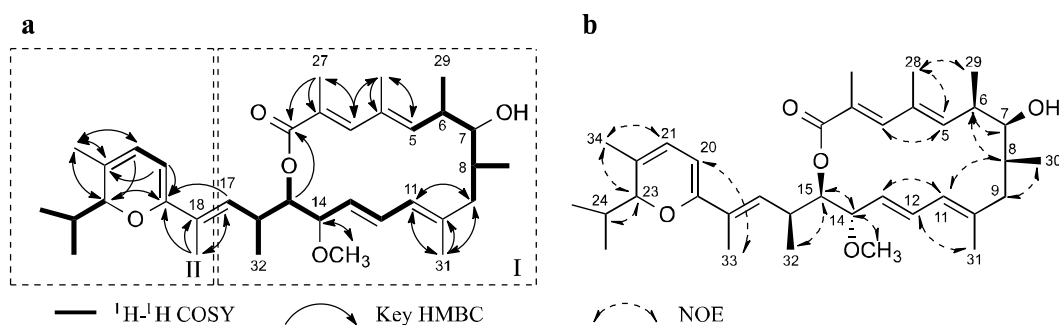


Fig 2. Structural elucidation of BafL. (a) Key correlations in 1H - 1H COSY and 1H - ^{13}C HMBC spectra. (b) ROESY experiments.

1-2. 細胞内中性脂質蓄積阻害活性

定法³⁾に従い、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞に、化合物存在下 [^{14}C]oleic acid (1.85 kBq) を添加し、37°C、5% CO_2 条件下 6 時間培養して細胞内に脂質を蓄積させた。Bligh & Dyer 法⁴⁾で総脂質を回収し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で各脂質を分離した。蓄積した [^{14}C]CE および [^{14}C]TG の放射活性を定量し、その蓄積量を算出した。結果、BafL は CHO 細胞内の CE 蓄積を選択的かつ強力に阻害し、その IC_{50} 値は 0.83 nM と算出された。

次いで定法⁵⁾に従い、マウス腹腔内マクロファージ (M ϕ) の初代培養法により、BafL の作用を確認した。M ϕ を変性 LDL の代わりにホスファチジルセリン (PS) 含有リポソームと培養することにより、CE と TG からなる脂肪滴を蓄積させた。脂肪滴特異的な染色剤である oil red O を用いた形態学的な観察により、BafL の濃度依存的に赤い点で観察される脂肪滴の減少を確認した (Fig. 3)。また、170 nM を作用させても細胞に形態学的な異常は確認されなかった。さらに生化学的

な解析として、リポソームと同時に [^{14}C]oleic acid を添加することにより [^{14}C]CE および [^{14}C]TG を定量した。その結果、BafL は M ϕ 内の CE の生成を選択的かつ強力に阻害しており、その IC₅₀ 値は 6.1 nM と測定され、Fig. 3 に示す脂肪滴の減少は CE 蓄積の減少によるものであることを明らかとした。

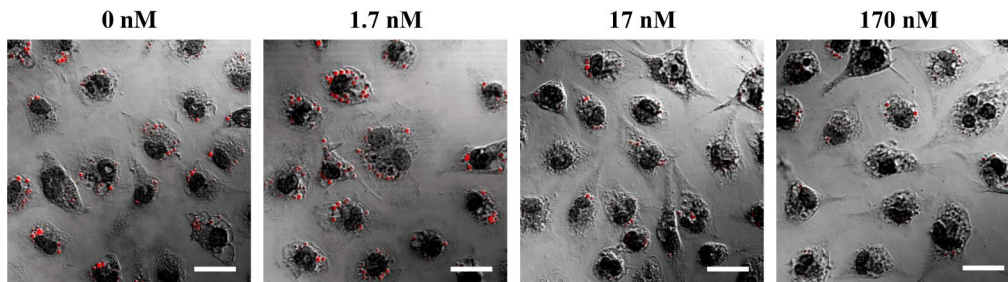


Fig 3. Inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages by BafL. Bars: 20 μm .

1-3. BafL の V-ATPase 阻害活性

Bafilomycin 類は液胞型 ATPase (V-ATPase) を強力に阻害することが知られている。そこで BafL の V-ATPase への影響を調べた。細胞内の酸性部位を染める acridine orange を用いて BafL 処理細胞を染色したところ、対照として用いた bafilomycin A1 (BafA1) と同様に濃度依存的な消光が観察され、BafL が V-ATPase に影響を与えている可能性が示唆された。そこで Bowmann らが報告している酵母を用いた V-ATPase 結合部位の解析手法⁷⁾により BafL の影響を調べた。BafA1 に対して野生型酵母は感受性を示し、一方で V-ATPase の V₀ ドメイン中の c サブユニット (*VMA3* コード) に変異が入った酵母 (*vma3-T32I*) は BafA1 に対して耐性を示す。この変異酵母を用いた希釈検定法により BafL の評価を行った。Fig. 4 に示すように、野生株酵母 (*VMA3*) に BafA1 を作用させると菌数の希釈に伴いその生育の阻害が確認される一方で、V-ATPase に変異をもつ酵母 (*vma3-T32I*) は BafA1 による生育阻害に対して抵抗性を示した。BafL も BafA1 と同様に、変異酵母においてその感受性が低下したことから、V-ATPase に対し BafL も BafA1 と同様の結合部位に作用することが示唆された。

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>VMA3</i>									
<i>vma3-T32I</i>									

Fig 4. Effect of BafL and BafA1 on growth of wild-type and *vma3-T32I* mutant *S. cerevisiae*.

Mφ 内における CE の生成は、変性したリポタンパク質 (本実験では PS 含有リポソーム) が受容体によって取り込まれた後に、リソソームにおける加水分解によって生じた遊離コレステロールに由来する。リソソームの加水分解にはこのオルガネラの pH を酸性に保つために V-ATPase が働いている。BafL を含め bafilomycin 類は V-ATPase の機能を阻害しリソソーム内の pH を上昇させ、リソソーム内の加水分解酵素が機能できなくなることにより細胞内コレステロール代謝が障害を受け、結果として CE の生成が阻害されたと考えられる。

2.放線菌由来 diketopiperazine 化合物の作用機序解析⁸⁾

2-1.Diketopiperazine 化合物の単離精製

東京海洋大学より提供された放線菌株 *Nocardiosis* sp. KM2-16 株を、スターチを主成分とした海水含有培地で 11 日間振盪培養し培養液 300 mL を取得した。得られた培養液は、アセトンおよび酢酸エチルによる溶媒抽出、さらに ODS カラムを用いた HPLC による精製を行い、化合物 **3** および **4** をそれぞれ 8.6 mg および 4.6 mg 取得した。化合物 **4** については各種機器分析および検索ソフトを用いた解析から amauromine⁹⁾ (Fig. 5) と同定した。

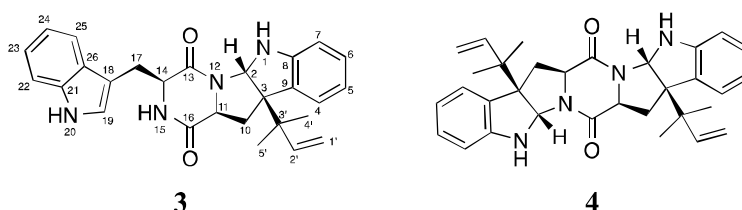


Fig 5. Structures of **3** and amauromine (**4**).

化合物 **3** は高分解能 ESI-MS スペクトル解析より分子式 $C_{27}H_{28}N_4O_2$ を示し、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た。化合物の平面構造は各種 2 次元 NMR の解析により決定した。Fig. 6a で示すように、太線で示した 1H - 1H COSY の解析より 7 つの部分構造が、矢印で示した 1H - ^{13}C HMBC スペクトルの解析により I、II および III の 3 つの部分構造を推定した。さらに詳細な 1H - ^{13}C HMBC の解析により 17 位のメチレンプロトンからの 18、19 および 26 位炭素への相関が観察され、部分構造 I および II は 17、18 位炭素間で結合していることを明らかとした。また、3 ϕ および 4 ϕ 位のメチルプロトンから 3 位の炭素への相関が観察されたことから、部分構造 I および III は 3、3 ϕ 位炭素間で結合していることを明らかとし、**3** の平面構造を決定した。さらに立体化学については ROESY 解析により NOE の相関を確認することで **3** の相対立体構造を決定した (Fig. 6b)。絶対立体構造については、既に絶対立体が報告されている amauromine の CD スペクトルデータの正負のコットンパ

ターン¹⁰⁾との比較によりよい一致を示したため、**3**の絶対立体を **amauromine** と同様に 2*S*、3*R*、11*S* および 14*R* と決定した。化合物 **3** は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たが¹¹⁾、天然物としてはこれが初めての発見となった。また **3** や **4** のように、indoline と diketopiperazine が 5 員環で繋がりがつ prenyl 基を有する化合物は、これまでに真菌由来では報告があるものの放線菌由来としては今回が初めての発見であった。

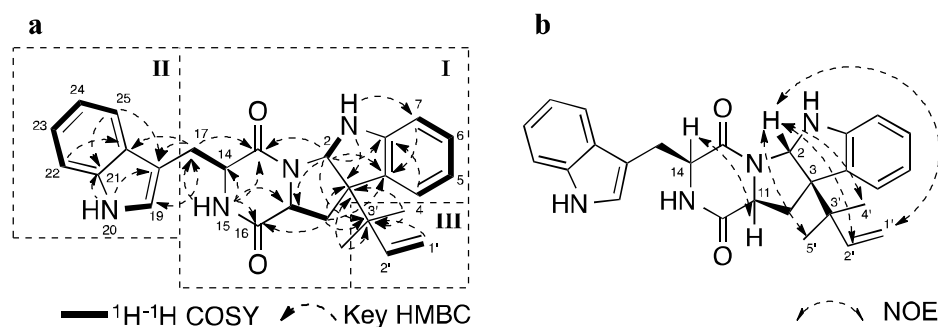


Fig 6. Structural elucidation of **3**. (a) Key correlations in ¹H-¹H COSY and ¹H-¹³C HMBC spectra. (b) ROESY experiments.

2-2. 化合物 **3** および **4** の SOAT 阻害活性

細胞内において CE は、小胞体膜上に存在する sterol *O*-acyltransferase (SOAT) によりコレステロールの 3 位の水酸基がアシル化され生成する。SOAT には 2 つのアイソザイムが存在するが、脂質異常症に対する予防・治療として肝臓と小腸に特異的に発現する SOAT2 を選択的に阻害することが重要であると考えられている¹²⁾。アフリカミドリザル由来の SOAT1 および SOAT2 遺伝子を選択的に発現させた CHO 細胞 (それぞれ SOAT1-CHO および SOAT2-CHO 細胞と略す、Wake Forest 大学の Rudel 教授より分与) を用い、定法³⁾に従い、細胞レベルで SOAT 阻害活性を評価した (Table 1)。化合物 **4** は SOAT1-CHO 細胞において 28 μM まで CE 生成阻害活性を示さなかったが、SOAT2-CHO 細胞の CE 生成を IC₅₀ 値 0.45 μM で阻害した。さらに定法⁵⁾に従い、両細胞より調製したマイクロソーム画分を酵素源とし SOAT 阻害活性を評価したところ、**4** は酵素レベルにおいても SOAT2 を IC₅₀ 値 1.2 μM で阻害した (Table 1)。一方で、**3** は酵素レベルにおいて SOAT2 を IC₅₀ 値 21 μM で阻害したもののその活性は弱く、**4** との比較により SOAT2 阻害には 6、5、5、6 員環構造の対称性が重要であることが考えられた。これまで SOAT2 高選択的阻害剤として唯一 pyripyropene 類¹³⁾が知られていたが、本研究により **4** も SOAT2 選択的であることが示された。この発見により SOAT2 を標的とする創薬の新しい方向性を示すことができたと考えられる。

Table 1. Effects of **3** and **4** on SOAT isozymes in cell-based and enzyme-based assays.

Compound	Cell-based			Enzyme-based		
	IC ₅₀ (μM)		SI*1	IC ₅₀ (μM)		SI
	SOAT1	SOAT2		SOAT1	SOAT2	
3	> 22	> 22	1	> 57	21	> 2.7
4	> 28	0.45	> 62	22	1.2	18

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

3. 真菌由来 dinapinone A (DPA) の作用機序解析

Dinapinone A (DPA)^{14, 15} は、北里生命科学研究所より提供された真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株の培養液中より発見された化合物である。DPA は当初単一の化合物だと考えられていたが、2つの軸異性体である dinapinone A1 (DPA1) (**5**) および A2 (DPA2) (**6**) の混合物であることが明らかにされている (Fig. 7)。DPA は細胞内 TG 蓄積阻害に対して、DPA1 単独では活性を示さず、DPA2 は IC₅₀ 値 0.65 μM で TG 蓄積を阻害するが、2つの軸異性体を等量で混合した際 (DPA1:1 と略す) に TG 蓄積に対し IC₅₀ 値 0.054 μM と活性が増強する特徴を有している。このような特異な阻害機構を示す DPA の作用機序を解明することは、新たな中性脂質代謝メカニズムの提唱に繋がる可能性を期待し研究を進めた。

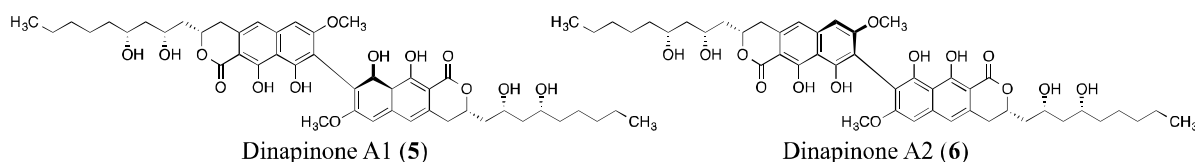


Fig 7. The structures of dinapinone A1 (DPA1) (**5**) and A2 (DPA2) (**6**).

3-1. TG 生合成経路に対する阻害活性

TG 生合成経路に対する DPA1:1 の影響を酵素レベルで検討した。TG 生合成経路として知られているグリセロール3リン酸経路 (Fig. 8) 上の4つの酵素 (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)、ホスファチジン酸ホスファターゼ (PAP)、ジアシルグリセロールアシル転移酵素 (DGAT)) に対する DPA1:1 の影響を CHO-K1 細胞から調整したミクロソーム画分を酵素源として評価した。しかし、DPA1:1 を 12 μM まで作用させたところ、

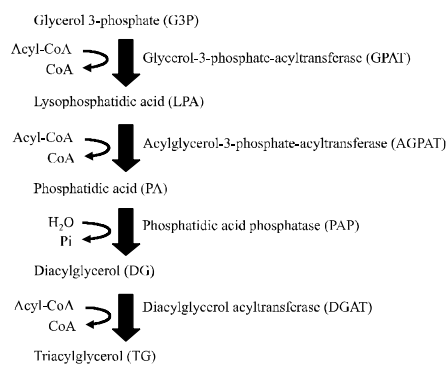


Fig 8. Glycerol 3-phosphate pathway on TG synthesis

各酵素に対する阻害活性は細胞レベルでの TG 蓄積阻害活性と比べ著しく弱いものであった。この結果より、DPA1:1 は TG の生合成経路に対しては影響をおよぼしていないことが示唆された。

3-2. 細胞内中性脂質分解促進活性

次に DPA は細胞内に蓄積した TG の分解を促進しているのではないかと考え検討を行った。CHO 細胞に対し [¹⁴C]oleic acid を添加し 24 時間培養することで細胞内に [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 存在下で培養し、細胞内に既に蓄積した [¹⁴C]中性脂質分解に対する影響を評価した。結果、培養後 2 時間目までは DPA1:1 の有無にかかわらず細胞内 TG、および CE 量はコントロールと同様の一定量の減少を示した。しかし、コントロールでは 2 時間目以降 TG および CE の分解は横ばいになったのに対し、DPA1:1 を添加した場合は 2 時間目以降もさらに細胞内 TG および CE 量の減少が観察された。このことから、DPA は細胞内中性脂質の分解を促進している可能性が示唆された。

3-3. 脂質分解経路への影響

TG および CE は細胞内において脂肪滴として存在するが、脂肪滴の分解経路として ①lipolysis および ②autophagy (lipophagy) が報告されている。①はカテコールアミンにより惹起されることが知られている。そこで、細胞に β 作動薬である isoproterenol を作用させたが DPA と同じ表現型は示さなかった。そこで②の可能性を考え、autophagy マーカーである LC3 タンパク質をウエスタンブロッティングで検出したところ、DPA1:1 は LC3-II 量を増加させていたことから autophagy 経路に関係していることが示唆された。

総括

本研究で申請者は天然化合物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 (Fig. 9)。今後これらの成果を足がかりに、脂質異常症の予防・治療に繋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。

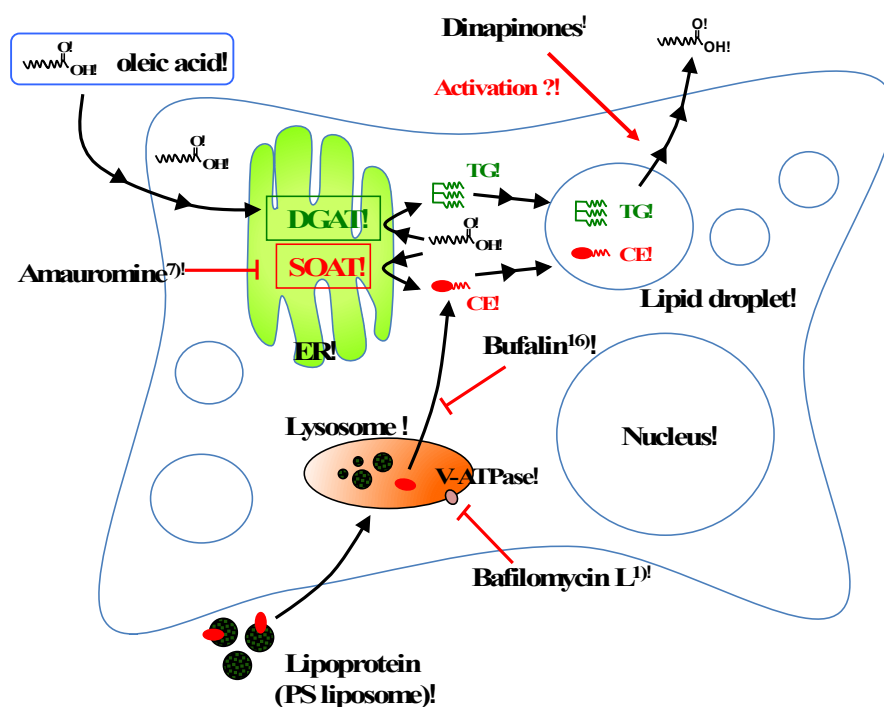


Fig 9. Targets of natural regulators of cellular lipid metabolism in mammalian cells.

謝辞

本研究にご協力くださいました筑波大学生命科学研究科 臼井 健郎 准教授、菌株を提供してくださいました東京海洋大学、OP BIO 社および北里生命科学研究所の方々、化合物の物理化学データを測定してくださいました北里大学薬学部化学系共有機器室 佐藤 倫子様、同 長井 賢一郎 博士に厚く御礼申し上げます。また本研究の一部は日本学術振興会特別研究員 DC2 として研究奨励金をいただき行いました。

文献

- 1) Kobayashi K. *et al. J. Antibiot.* **68**, 126-132 (2015).
- 2) Warner G. *et al. J. Antibiot.* **37**, 110-117 (1984).
- 3) Ohshiro T. *et al. J. Antibiot.* **60**, 43-51 (2007).
- 4) Bligh E. G. & Dyer W. J. *Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
- 5) Namatame I. *et al. J. Biochem.* **125**, 319-327 (1999).
- 6) Bowman E. J. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7972-7976 (1988).
- 7) Bowman E. J. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 33131-33138 (2004).
- 8) Kobayashi K. *et al. J. Antibiot.* **68**, 638-641 (2015).
- 9) Takase S. *et al. J. Antibiot.* **37**, 1320-1323 (1984).
- 10) Takase S. *et al. Tetrahedron* **41**, 3037-3048 (1985).
- 11) Yin W. B. *et al. Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133-1141 (2010).
- 12) Tomoda H. & Omura H. *Pharmacol. Ther.* **116**, 375-389 (2007).
- 13) Ohshiro T. *et al. J. Antibiot.* **61**, 503-508 (2008).
- 14) Ohte S. *et al. J. Antibiot.* **64**, 489-494 (2011).
- 15) Uchida R. *et al. J. Antibiot.* **65**, 419-425 (2012).
- 16) Kobayashi K. *et al. Biol. Pharm. Bull.* **36**, 364-369 (2013).