

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18900

研究課題名(和文) 微生物資源を用いた中性脂質生成制御からの創薬へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to drug discovery of microbial inhibitors of lipid metabolism

研究代表者

大城 太一 (Ohshiro, Taichi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30458765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内での中性脂質(コレステリルエステル(CE)とトリグリセリド(TG))の蓄積は、脂肪肝や肥満を惹起することから、その予防・治療法が求められている。本研究では、1) 中性脂質CEとTGを生成させる細胞評価系を用いて、微生物資源を対象にその生成阻害剤を探索し、2) 既に申請者の研究グループが発見してきたCE生成に関するステロールO-アシル転移酵素2(SOAT2)阻害剤が脂肪肝発症動物モデルにおいて有効であるかどうかを検証し、3) 項目1)で発見した新しい微生物由来の機能分子の構造を明らかにし(4種8成分を発見)、その標的分子の解明を行なった。

研究成果の概要(英文)：In this study, 1) screening for microbial inhibitors of lipid metabolism (neutral lipids; cholesteryl ester (CE) and triglyceride (TG)), 2) in vivo test of pyripyropene A derivative, highly SOAT2 selective inhibitor, using a mouse model of fatty liver diseases (NAFLD/NASH) and 3) search for the mode of action of new microbial inhibitors of lipid metabolism (from 1)) and beauveriolide III, SOAT1-selective inhibitor in intact cells, using biochemistry techniques were investigated.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 脂質代謝 動脈硬化 脂肪肝 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

生活習慣と深く関与した脂質異常症では、スタチン系医薬品が第一選択薬として、広く使われてきた。しかし、本研究で焦点をあてる脂肪肝や肥満には、スタチンはまったく治療効果がない。現在、脂肪肝の治療方法は運動療法と食事療法が主であり、FXR (frenosoid X receptor) を標的分子としたオベチコール酸の臨床試験 (フェーズ II 終了) が進められているのみである。一方、肥満に対しては、日本ではマジンドールが臨床で使われているが、中枢系に作用することから、依存性などの副作用の問題を抱えている。このように、脂肪肝の進展や肥満を制御する低分子化合物の創薬研究はまだ未熟である。また、Dr. Rudel (Wake Forest Univ., USA) らは、脂肪肝は肝臓でのトリグリセリド (TG) 蓄積だけでなく、コレステリルエステル (CE) の蓄積も深く関与していることを示唆している (Alger HM et al, *J Biol Chem*, 285, 14267 (2010))。このことから、中性脂質 (CE や TG) の生成を制御する観点から脂肪肝や肥満の予防治療薬の開拓やその創薬標的分子の解明は重要な研究課題である。

2. 研究の目的

生体内での中性脂質 (CE と TG) の蓄積は、脂肪肝や肥満を惹起することから、その予防・治療法が求められている。本研究では、1) 中性脂質 CE と TG を生成させる細胞評価系を用いて、微生物資源を対象にその生成阻害剤を探索すること、2) 既に申請者の研究グループが発見してきた CE 生成に関与するステロール *O*-アシル転移酵素 (SOAT) 阻害剤が脂肪肝や肥満発症動物モデルにおいて有効であるかどうかを検証すること、3) 項目 1) で発見した新しい微生物由来の機能分子の構造や標的分子を解明することを目的とする。本研究により、脂肪肝や肥満の予防・治療につながる新しい標的酵素やリード化合物を提供したい。

3. 研究の方法

本研究では、微生物資源から、CHO 細胞内の CE や TG 生成を観察する細胞評価系を用いて、その生成を制御する機能分子を検索した。また、脂肪肝や肥満の標的分子として期待される SOAT2 を制御する機能分子 (PPPA と PRD など) については、疾患モデル動物を用いて、脂肪肝や肥満に対する薬理効果を解析することで、標的分子としての有用性の証明を試みた。さらに、本研究期間内に得られた新しい機能分子や申請者の研究グループが所有する機能分子 (BVIII など) については、その作用メカニズム解析を進め、その標的分子を特定した。

1) 微生物資源からの機能分子の探索研究

スクリーニングサンプルは、申請者の研究グループが分離、培養した微生物資源ライブラリーを用いた (年間、2,000 から 3,000 サンプルが供給された)。すでに、申請者が確立した細胞評価系を用いて、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸か

ら合成させた細胞内の CE と TG の変動を定量し、その生成阻害剤を探索した。また、SOAT アイソザイムに焦点をあてた target-based assay システムを用いた探索研究も進め、SOAT2 選択的阻害するような機能分子を探索した。選択された培養液は、LC-MS などを用いて既知化合物が含まれている可能性を調査し、申請者の研究グループが行なっている他のアッセイ評価系の結果と比較することで、効率よく新しい機能分子を探索した。

選択されたサンプルは、三角フラスコあるいはジャーファーメンター等を用いた大量培養を行ない、この培養液から、抽出操作 (溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィー (液々分配、吸着カラム、イオン交換、順相、逆相)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などを駆使し、機能分子を単離精製した。単離した機能分子は、各種分析機器 (質量分析、赤外吸収スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル NMR など) の測定及び解析を行ない、立体構造含めた化学構造を明らかにするとともに、その新規性を化合物検索システムにより調査した。

2) 疾患モデル動物を用いた中性脂質生成制御分子の *in vivo* 試験

我々の研究グループが発見したピリピロペン A (PPPA) は、唯一の SOAT2 高選択的阻害剤であり、PPPA やその半合成誘導体 (PRD125 など) が動脈硬化発症モデルマウスや遺伝性脂肪肝疾患ウォルマン病モデルマウスにおいて、有用性を証明してきた (Ohshiro T et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 31, 1108 (2011)、Ohshiro T et al, *J Pharmacol Exp Ther.*, 355, 299 (2015)、Lopez AM et al, *J Pharmacol Exp Ther.*, 355, 159 (2015))。その過程で、脂質低下作用や抗動脈硬化作用だけでなく、脂肪肝に対する効果も確認できた。そこで、脂肪肝/脂肪肝発症モデルマウスを用いて、SOAT2 選択的阻害剤の有用性を評価した。

3) 中性脂質生成制御分子の作用メカニズム解析

項目 1) で得られた制御分子については、定法に従い、酵素レベル SOAT1 と SOAT2 に対する評価を行った (Ohshiro T. et al, *J Antibiot.*, 60, 43 (2007))。

また、細胞レベルでは SOAT1 を選択的に阻害するが、酵素レベルでは SOAT1 と SOAT2 の両方を阻害するという興味深い表現型を示すボーベリオライド III (BVIII) について、生化学的手法を用いて SOAT アイソザイムに対する影響を検討した。

4. 研究成果

1) 微生物資源からの機能分子の探索研究

放線菌や真菌などの微生物や海洋生物などの生物資源、さらに合成誘導体ライブラリーを用いて、CHO 細胞内の CE と TG 生成に対する影響を、約 6,000 サンプル評価した。

本研究期間で単離精製した化合物 (図 1) と

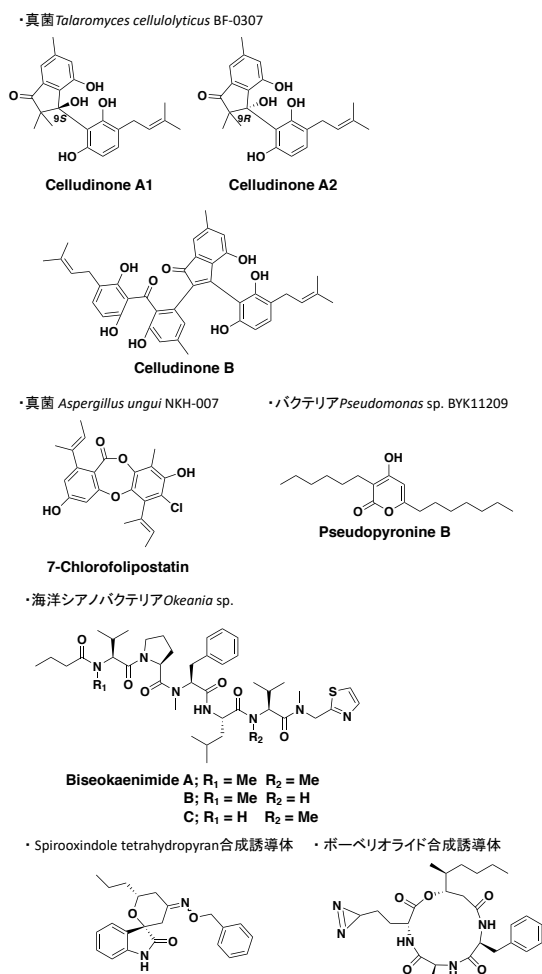


図1 本研究で発見・報告した化合物の構造

その生物活性 (表 1) を示した。すなわち、土壌真菌 *Talaromyces cellulolyticus* BF-0307 から新規化合物 celludinone 類 [産業財産権 1]、海洋由来真菌 *Aspergillus ungui* NKH-007 から新規化合物 7-Chlorofolipastatin [発表論文 6]、海洋シアノバクテリア *Okeania* sp. から新規化合物 biseokaeniamide 類 [発表論文 2]、バクテリア *Pseudomonas* sp. BYK11209 から既知化合物 pseudopyronine B (新規生物活性) [発表論文 3]、spirooxindole tetrahydropyran 合成誘導体 [発表論文 4]、ポーベリオリイド合成誘

表1 本研究期間で発見・報告した化合物の生物活性

Compound	IC ₅₀ for CE synthesis		SI ^{1, 2)}
	SOAT1-CHO cells	SOAT2-CHO cells	
Celludinone A1	8.8	4.8	+ 0.26
Celludinone A2	15	6.1	+ 0.49
Celludinone C	2.8	0.15	+ 1.27
7-Chlorofolipostatin	3.2	4.5	- 0.15
Pseudopyronine B	20	3.7	+0.73
Biseokaenimide A	1.8	1.3	+ 0.14
Biseokaenimide B	6.9	2.5	+ 0.44
Biseokaenimide C	>12	9.6	> + 0.10
Spirooxindole tetrahydropyran 合成誘導体	16	1.5	+1.04
ポーベリオリイド合成誘導体	0.98	>20	<- 1.31

1) SI (selectivity index) = log (IC₅₀ for SOAT1)/(IC₅₀ for SOAT2)

2) +1.0 ≤ SI means SOAT2-selective inhibition, -1.0 < SI < +1.0 means dual-type inhibition and SI ≤ -1.0 means SOAT1-selective inhibition.

導体 [発表論文 5] を発見した (図 1)。

いずれの化合物も毒性を示すことなく (>20 μM)、動物細胞 (SOAT1 もしくは SOAT2 を選択発現させた CHO 細胞やマウス腹腔マクロファージなど) の CE 生成を選択的に阻害した (表 1)。

2) 疾患モデル動物を用いた中性脂質生成制御分子の *in vivo* 試験

脂肪肝発症モデル動物として、ストレプトゾトシン (STZ) と高脂肪食を組み合わせたモデルマウスと高脂肪食を長期暴露 (8 週間) したモデルマウスで検討した。現在、解析を進めている。

3) 中性脂質生成制御分子の作用メカニズム解析

3-1) 本研究期間で発見・報告した中性脂質生成制御分子の作用メカニズム解析

本研究期間で発見・報告した化合物のうち、SOAT1 と SOAT2 の両方を阻害した制御分子について、酵素レベルで SOAT1 と SOAT2 による CE 生成を阻害するかどうかを評価した。その結果、いずれの化合物も SOAT1 と SOAT2 の両方を阻害し、その強さは細胞レベルと同程度であった。

3-2) ポーベリオリイドに関する研究

まず、インタクト細胞を用いた SOAT アイソザイム阻害活性について検討した。すなわち、SOAT1-CHO および SOAT2-CHO 細胞における、¹⁴C]oleic acid からの [¹⁴C]CE の生成に対して、BVIII は SOAT1-CHO 細胞の CE 生成を IC₅₀ 値 0.90 μM で阻害したが、SOAT2-CHO 細胞の CE 生成に対しては 20 μM でも 35% 程度の阻害しか示さなかった。このように、インタクトな細胞では、BVIII は SOAT1 に選択的な阻害活性を示した。

つづいて、SOAT1-CHO および SOAT2-CHO 細胞を超音波で 10 分間処理し、得られた細胞破砕液からミクロソーム画分を調製した。そのミクロソーム画分を酵素源とし、基質として [¹⁴C]oleoyl-CoA を用いて [¹⁴C]CE を生成させたところ ([¹⁴C]oleic acid からは生成しない)、BVIII は SOAT1-CHO 細胞由来のミクロソームからの CE 生成を IC₅₀ 値 1.3 μM で、SOAT2-CHO 細胞の由来のミクロソームからの CE 生成を IC₅₀ 値 6.6 μM で阻害した (図 2)。SOAT1 への選択性が失われた理由として、ER 膜の高次構造の変化を考えた。SOAT アイソザイムは両者とも ER の膜タンパク質であるため、ER 膜の崩壊にともなって SOAT 膜トポロジーも変化し、活性中心に違いが出てくるのではないかと考えた。そこで、ER へのダメージをおさえる目的で、SOAT1-CHO および SOAT2-CHO 細胞を超音波で 3 分または 5 分処理することで得たミクロソーム画分を酵素源とし、基質として [¹⁴C]oleoyl-CoA を用いて [¹⁴C]CE の生成を評価した。その結果、超音波処理時間が 3 分の場合、BVIII は SOAT1-CHO 細胞由来のミクロソームからの CE 生成を IC₅₀ 値 2.7 μM で阻害したが、SOAT2-CHO 細胞の由来のミクロソームから

の CE 生成を 50 μM でも 40% 程度しか阻害しなかった (図 2)。さらに、超音波処理時間が 5 分の場合、BVIII は SOAT1-CHO 細胞由来のミクロソームからの CE 生成を IC_{50} 値 1.2 μM で、SOAT2-CHO 細胞の由来のミクロソームからの CE 生成を IC_{50} 値 31 μM で阻害した (図 2)。このように、細胞の超音波処理時間に応じて SOAT1 への選択性が失われていくという結果が得られた。

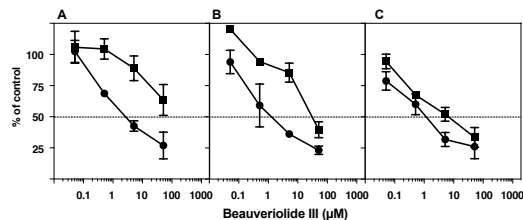


図3 細胞破碎条件によるBVIIIのSOATアイソザイム阻害選択性の変化
A; 3 min, B; 5 min, C; 10 min (●; SOAT1, ■; SOAT2)

細胞レベルと酵素レベルで SOAT アイソザイムに対する選択性が変化したので、セミインタクト細胞を作製し、SOAT アイソザイムに対する影響を評価した。SOAT1-CHO および SOAT2-CHO 細胞を digitonin または saponin で処理してセミインタクト細胞を調製した。インタクト細胞と異なり、セミインタクト細胞は、細胞膜の透過性が向上しているため [^{14}C]oleoyl-CoA から [^{14}C]CE を生成する。細胞膜のみに透過性を与える digitonin で作製した場合、BVIII はセミインタクトな SOAT1-CHO 細胞における CE 生成を IC_{50} 値 5.0 μM で阻害したのに対し、セミインタクトな SOAT2-CHO 細胞の CE 生成に対しては 90 μM を作用させても 40% 程度しか阻害しなかった (図 4)。一方で、細胞膜だけでなく ER などの細胞内小器官の膜にも透過性を与える saponin で作製した場合、BVIII はセミインタクトな SOAT1-CHO 細胞における CE 生成を IC_{50} 値 1.8 μM で阻害し、セミインタクトな SOAT2-CHO 細胞における CE 生成を IC_{50} 値 5.9 μM で阻害した (図 4)。

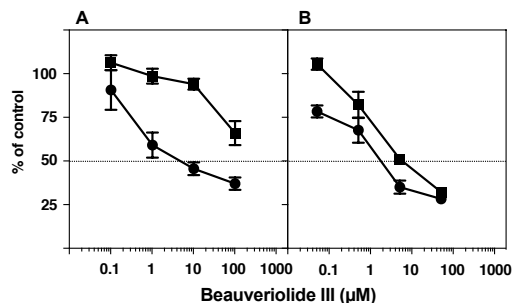


図4 セミインタクト細胞におけるBVIIIのSOATアイソザイム阻害活性
A; ジギトニン処理細胞, B; サポニン処理細胞 (●; SOAT1, ■; SOAT2)

最終的に、インタクトな ER (小胞体膜) を精製し (スクロースを用いた密度勾配遠心法)、その画分を用いて SOAT アイソザイムに対する影響を評価した。インタクトな ER 画分に基質として [^{14}C]oleoyl-CoA を加え、[^{14}C]CE を生成させたところ、BVIII は SOAT1-CHO

細胞由来の ER 画分の CE 生成を IC_{50} 値 0.54 μM で阻害したのに対し、SOAT2-CHO 細胞由来の ER 画分の CE 生成は IC_{50} 値 70 μM 程度しか阻害しなかった (図 5)。

我々は、細胞レベルと酵素レベル

で BVIII の SOAT アイソザイムの阻害選択性が大きく変化した理由として、SOAT の膜トポロジーに着目した。SOAT1 および SOAT2 ともに ER 膜貫通タンパク質であり、その立体構造は完全には明らかとなっていないが、SOAT1 の活性中心は ER の細胞質側に、SOAT2 の活性中心は ER の内膜側に存在すると推定されている (Joyce C. W. *et al. Mol. Biol. Cell* 11, 3675 (2000))。そこで、BVIII が示す SOAT アイソザイム阻害の選択性に、この活性中心の配向性の違いが関与しているのではないかと考えた。すなわち、BVIII が SOAT 阻害活性を惹起する活性中心は、SOAT1 においては ER の細胞質側にあるのに対し、SOAT2 においては ER の内膜側にあるのではないかと推定した。細胞を破碎する際、細胞に過度のダメージが加わると ER の断片化や、膜反転が起こるとされている (Molecular Biology of the Cell 5th edition (ed. Alberts B. *et al.*) (Newton Press) 726 (2010))。したがって、BVIII は、インタクトな SOAT2-CHO 細胞では ER 内膜側の結合部位に結合できず阻害活性を示さなかったのに対し、酵素レベルでは SOAT2 の膜トポロジーが変化することにより阻害活性を示したのではないかと考えた。さらに、この仮説は、セミインタクト細胞の実験からも支持され、BVIII による SOAT 阻害活性を惹起する活性中心は、SOAT1 では ER の細胞質側に、SOAT2 では ER の内膜側に存在している可能性が強く示唆された (図 6)。

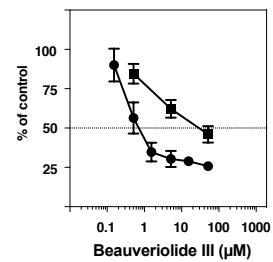


図5 精製ER画分を用いたBVIIIのSOATアイソザイム阻害活性 (超音波処理 3 min)
(●; SOAT1, ■; SOAT2)

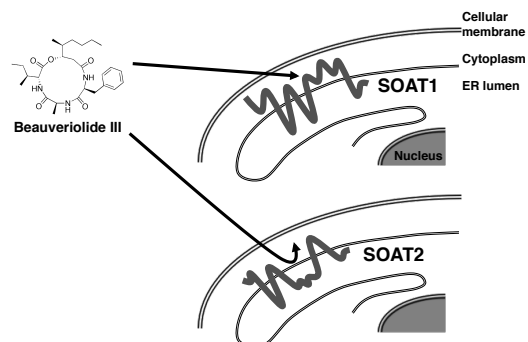


図6 BVIII の推定 SOAT アイソザイム阻害機構様式

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件) 全て査読あり

- 1) Ohshiro T, Kobayashi K, Ohba M, Matsuda D, Rudel LL, Takahashi T, Doi T, Tomoda H. Selective inhibition of sterol *O*-acyltransferase 1 isozyme by beauveriolide III in intact cells. *Sci Rep.*, 7, 4163 (2017)
- 2) Iwasaki A, Tadenuma T, Sumimoto S, Ohshiro T, Ozaki K, Kobayashi K, Teruya T, Tomoda H, Suenaga K. Biseokeaniamides A, B, and C, Sterol *O*-Acyltransferase Inhibitors from an *Okeania* sp. Marine Cyanobacterium. *J Nat Prod.*, 80, 1161-1166 (2017)
- 3) Suzuki A, Fukuda T, Kobayashi K, Ohshiro T, Tomoda H. Pseudopyronine B, an inhibitor of sterol *O*-acyltransferase, produced by *Pseudomonas* sp. BYK11209. *J Antibiot.*, 70, 96-97 (2017)
- 4) Kobayashi K, Ohshiro T, Tomoda H, Yin F, Cui HL, Chouthaiwale PV, Tanaka F. Discovery of SOAT2 inhibitors from synthetic small molecules. *Bioorg Med Chem Lett.*, 26, 5899-5901 (2016)
- 5) Masuda Y, Aoyama K, Yoshida M, Kobayashi K, Ohshiro T, Tomoda H, Doi T. Design, synthesis, and biological evaluation of beauveriolide analogues bearing photoreactive amino acids. *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 754-765 (2016)
- 6) Uchida R, Nakajyo K, Kobayashi K, Ohshiro T, Terahara T, Imada C, Tomoda H. 7-Chlorofolipastatin, an inhibitor of sterol *O*-acyltransferase, produced by marine-derived *Aspergillus ungui* NKH-007. *J Antibiot.*, 69, 647-651 (2016)

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 大城太一、大多和正樹、長光亨、Lawrence L. Rudel、供田洋「ピリピロペン誘導体の抗動脈硬化作用 (II)」日本薬学会 138 年会 (金沢) (2018.3.26)
- 2) 関怜子、大城太一、供田洋「真菌由来新規 SOAT 阻害剤 celludinone A の立体化学に関する研究」日本薬学会 138 年会 (金沢) (2018.3.26)
- 3) 大城太一、「位置選択的モナピノン二量体化酵素 MCE の基質特異性に関する研究」ConBio2017 (神戸)(2017.12.8)
- 4) Taichi Ohshiro, Masaki Ohtawa, Tohru Nagamitsu, Hiroaki Yagyu, Lawrence L. Rudel, Shun Ishibashi, Hiroshi Tomoda 「PRD125, a highly potent SOAT2 inhibitor, attenuates both atherosclerosis and fatty liver progression in cholesterol diet-fed rabbits」AHA Scientific Session 2017 (Anaheim, CA, USA)(2017.11.12)
- 5) 大城太一、供田洋「脂肪性肝疾患 (NAFLD/NASH) 治療薬の開発」イノベー

ションジャパン 2017 (東京)(2017.8.31)

- 6) 大城太一、大多和正樹、長光亨、Lawrence L. Rudel、石橋俊、供田洋「SOAT2 選択的阻害剤は脂肪性肝疾患に有効か?」第 59 回日本脂質生化学会 (京都) (2017.6.16)
- 7) 大城太一、伊牟田聡、土黒一郎、高橋孝志、土井隆行、石橋俊、供田洋「ボーベリオライド誘導体の抗動脈硬化作用」日本薬学会 137 年会 (仙台) (2017.3.26)
- 8) 関怜子、大城太一、福田隆志、内田龍児、供田洋「土壌由来真菌が生産する新規 SOAT2 選択的阻害剤に関する研究」日本薬学会 137 年会 (仙台) (2017.3.27)
- 9) Taichi Ohshiro, Masaki Ohtawa, Tohru Nagamitsu, Hiroaki Yagyu, Lawrence L. Rudel, Shun Ishibashi, Hiroshi Tomoda 「PRD125, a highly SOAT2-selective inhibitor, attenuates not only atherosclerosis but also fatty liver progression in cholesterol-fed rabbits.」第 48 回日本動脈硬化学会 (東京)(2016.7.14)
- 10) 大城太一、大多和正樹、長光亨、石橋俊、Lawrence L. Rudel、供田洋「SOAT2 選択的阻害剤ピリピロペン誘導体の抗動脈硬化作用」第 58 回日本脂質生化学会 (京都) (2016.6.9)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:ステロール *O*-アシルトランスフェラーゼ 2(SOAT2)阻害活性を有する新規化合物及びその製造方法

発明者: 供田洋、福田隆志、大城太一

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 2017-005260

出願年月日: 2017 年 1 月 16 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/wei_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 太一 (OHSHIRO Taichi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 30458765