

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01817

研究課題名(和文) ウアバゲニンのLXRを標的とした内在性血圧調節因子としての機能解明

研究課題名(英文) Analysis for Biofunction of Ouabagenin as Endogenous Regulator of Blood Pressure Targeting LXR

研究代表者

田村 理 (TAMURA, Satoru)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30362619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：強心配糖体ウアバインのアグリコンであるウアバゲニンは、単なる生合成前駆体であると考えられてきた。しかしながら、本研究によってウアバゲニンが肝X受容体(LXR)のリガンドとして機能することを明らかにした。また、ウアバゲニンは既存のLXRリガンドが引き起こす脂肪肝誘導を起こさないにもかかわらず、他のLXRリガンドと同様に腎臓での上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の発現を抑制することが明らかとなった。ウアバゲニンは副作用の少ない降圧利尿薬として有望な開発候補であり、LXR機能解明のツールとしても期待できる。内因性因子としてのウアバインとの関係性解明にはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Ouabagenin, an aglycone of cardiotoxic steroidal glycoside Ouabain, has been thought to be a non-bioactive precursor for biosynthesis of ouabain. In our study, ouabagenin was revealed to show ligandable activity for liver X receptor (LXR). In addition, ouabagenin was disclosed to down-regulate the expression level of epithelial sodium channel (ENaC) on the cells of collecting duct whereas not to lead hepatic steatosis which was normally induced by typical LXR ligands. Thus, ouabagenin is a one of the promising medical seeds as antihypertensive diuretic and useful chemical tool for exploration for LXR. Further investigation is necessary for analysis of the relationship between ouabagenin and ouabain as endogenous factors.

研究分野：天然物化学、有機化学、ケミカルバイオロジー

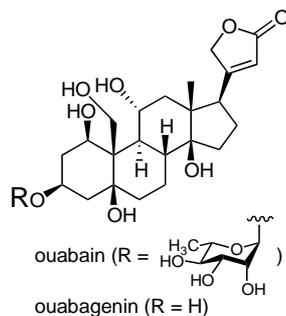
キーワード：ウアバゲニン 肝X受容体 生理活性 生体分子 上皮性ナトリウムチャンネル 集合尿細管細胞 アグリコン

1. 研究開始当初の背景

ウアバインは、キョウチクトウ科植物由来の強心配糖体として古くから知られており、鬱血性心不全などの治療薬として用いられてきた。その作用機序は、心筋細胞での Na/K-ATPase を阻害することで Ca イオンの流入を促すことにあると考えられてきた。また、Na/K-ATPase との親和性獲得には、3 位水酸基上のラムノースが重要であることが X 線結晶構造解析より示唆されている。ところが、長らく植物由来成分と考えられてきたウアバインが、近年、動物の体内からも微量成分として検出され、血圧調節に関与する生体内リガンドである可能性が指摘されており、培養動物細胞からの産生も確認されている。血圧調節機構についてさらに詳細な解析が行われた結果、血管平滑筋の収縮とともに、腎尿細管上皮細胞の Na/K-ATPase の機能を亢進して、Na イオンの吸収を促進させることが指摘されている。生体は、血中 Na 濃度を一定に維持するように体液量を調節しており、体内への Na 吸収亢進は体液量の増加、すなわち血圧上昇を促す。心臓と腎臓では発現している Na/K-ATPase のサブタイプが異なっていることが、ウアバインに対する機能阻害あるいは亢進といった応答の違いとして現れている。

一方、ウアバインのアグリコンであるウアバゲニンについては、ウアバインと比較して Na/K-ATPase に対する親和性が著しく低下していること以外、その生理活性を含めてほとんど研究されてこなかった。しかしながら、ウアバゲニンは、分子内に 6 個もの水酸基が結合したステロイド骨格を有する、いわゆるオキシステロール類に分類できる。オキシステロール類には様々な生理活性が最近次々と明らかになってきており、ウアバゲニンにも何らかの生理作用が存在することが推察されたため、その機能解明に着手した。

一般的にステロイド類は、主に核内受容体へと結合し転写因子としてその機能を発揮するため、まず、デュアルレポーターアッセイシステムを用いてウアバゲニンに反応する核内受容体をスクリーニングした。その結果、肝 X 受容体(LXR)に対するリガンド様作用が認められ、その強度は既存の合成リガンドとほぼ同等であった。一般的に LXR は、主に肝臓においてコレステロールや脂肪酸、グルコースの代謝および恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられているが、近年、LXR を発現しているマウス腎集合尿管由来細胞に対して LXR リガンドを作用させたところ、上皮性 Na チャネル(ENaC)の発



現抑制されたことが報告された。腎尿細管上皮細胞は、原尿と血管を隔てる形で位置しており、血管側に発現している Na/K-ATPase によって細胞内から血管へと能動的に Na イオンを輸送し、その結果生じる細胞内の Na 濃度低下に呼応して原尿側に発現している ENaC が開口し、原尿から Na イオンを再吸収する。すなわち、LXR リガンドによる ENaC の発現量低下は Na イオンの取り込みを抑え、利尿効果や血圧上昇の抑制に繋がることを意味しており、報告された論文内でも Na イオンの透過量減少が確認されている。

先に述べたように、ウアバゲニンは、LXR のリガンドとして作用したことから、ウアバゲニンにも血圧上昇抑制作用を示すことが推察された。これは、配糖体であるウアバインの血圧上昇を促す効果と正反対の作用を示すものであり、これが真実であれば、糖部の脱着によってリガンドを変化させることで血圧調節を行っている非常にユニークなシステムが存在する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ウアバイン-ウアバゲニンの関係性を解明することを大きな目標とし、そのために、まず、ウアバゲニンの生物活性およびその標的分子を明らかにすることを目的とする。

既に、ウアバゲニンが LXR に対するリガンドとして機能することをレポーターアッセイによって見出していることから、目的の 1 つはウアバゲニンと LXR の直接的な結合を証明することにある。また、一般的な LXR リガンドが示すと報告されている生物活性について、ウアバゲニンが同様の作用を示すかを検証する。ウアバゲニンの示す生物活性を明確にしたのち、内因性リガンドとしてのウアバインとの関係性について明らかにする。

3. 研究の方法

まず、ウアバゲニンと LXR の直接的な結合を証明する方法として、表面プラズモン共鳴法(SPR)、等温滴定型カロリメトリー(ITC)などを検討する。SPR では、LXR あるいは LXR のリガンド結合ドメイン(LXR-LBD)をセンサーチップに固定化し、ウアバゲニンをアナライトとして流す。また、結合確認後にフリーの LXR あるいは LXR-LBD を流すことで、競合的に解離させる。これら両者の結果から、ウアバゲニンが既知リガンドと同じ結合ポケットに結合すること、およびその解離定数を算出する。ただし SPR はチップへの固定化に制約があるため、上手くいかないことも予想される。そのため、ITC での検討も同時に進める。温度、添加速度、添加順などの条件を種々検討する。これら両方法で良い結果が得られない場合に、³H ラベル化したウアバゲニンをを用いた検討を行う。また、蛍光偏向の変化を検出する方法も試す。

LXR リガンドが示す生物活性として、脂質関連遺伝子の発現亢進および脂肪肝誘導がまず挙げられる。これについては、肝臓由来細胞に対する関連遺伝子の発現量変化を追跡するとともに、実験動物を用いて実際に脂肪肝誘導が起こるかどうかを検証する。一方、近年報告された腎集合尿管細胞に対する ENaC の発現抑制については、腎臓由来細胞に対してサンプルを処理した際に、ENaC を構成する3つのサブユニットをコードする mRNA 発現量の変化について検証する。さらに、LXR をサブタイプ選択的にノックダウンした条件下での ENaC 発現量変化についても検討し、ENaC 抑制活性がどちらのサブタイプの LXR によって支配されているかを確かめる。

ウアバインとウアバゲニンの関係性については、ウアバインの産生が報告されている PC12 細胞を利用する。ウアバインを産生している条件下でウアバゲニンからウアバインへの変化を司るラムノシル化酵素の発現を明らかにする。

4. 研究成果

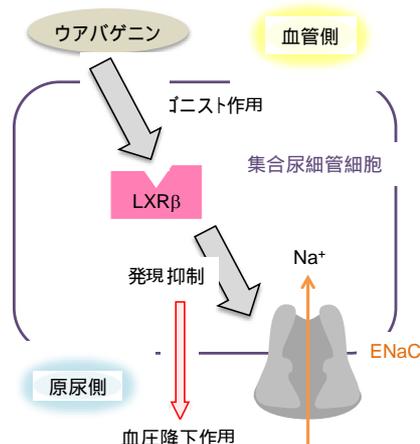
ウアバゲニンと LXR の直接的な結合について、まず、市販の LXR をセンサーチップに固定化して SPR の検討を行った。しかしながら、既存 LXR リガンドである T0901317 でさえ、明確な結合を示すセンサーグラムは得られなかった。市販の full-length LXR と比較して、自らリコンビナントタンパクとして調製する必要がある LXR-LBD は、純度等に問題が生じる可能性が高いため、センサーチップへ固定化しても full length より応答が出にくいと考え、SPR への適応は断念した。次に、ITC による検討を行った。先と同様に full-length LXR あるいは調製した LXR-LBD に対してリガンドを添加して、あるいはリガンド溶液に LXR を添加して検討を行ったが、明確な結合を示す等温滴定曲線は得られなかった。この時点で、LXR とそのリガンドは結合したときの熱量変化が小さいか、解離定数が大きいため結合する効率が低く、速やかに離脱している可能性が考えられた。そこで、結合の瞬間を感度良く捉えるために、³H ラベル化したウアバゲニンを用いる検討をおこなった。³H ラベル化されたウアバインは市販されているため、そこから酵素反応によってラムノースを切断し、簡易カラムによって ³H ラベル化ウアバゲニンを調製した。また、検討に際して結合していないタンパクを分離する操作を減らす目的で、シンチレート剤を含有するビーズを用いた。LXR、³H ラベル化ウアバゲニン、シンチレート剤含有ビーズの比率を種々検討したが、LXR とウアバゲニンの明確な結合は見出せなかった。最後の方法として蛍光偏光の変化を追跡する方法を検討した。既知の蛍光を示す LXR リガンドを合成し、LXR-LBD と混合したところ、蛍光偏光の上昇が認められた。ここへ、T0901317

あるいはウアバゲニンをさらに添加したところ、蛍光偏光の減少が認められた。すなわち、ウアバゲニンが競合的に LXR へと結合したことが示された。LXR には2種のサブタイプ と が存在するが、ウアバゲニンの結合はこの両者に確認され、レポーターアッセイの結果と一致するものであった。さらに、報告されている LXR の X 線結晶構造解析を利用したドッキングシミュレーションを検討したところ、T0901317 と同じポケットに収まること、安定化エネルギーが既知 LXR リガンドとほぼ同等であることが算出された。さらに、他種の核内受容体で同様の計算を行ったが、ウアバゲニンは上手くポケットにははまらず、安定化エネルギーも低いものとなった。以上より、ウアバゲニンは LXR に選択的なりガンドであることが示された。

次に、生物活性について評価した。肝臓由来細胞に対して T0901317 を作用させたところ、*abca1*、*srebp1c*、*fas* といった脂質代謝関連遺伝子の発現上昇が確認されたが、ウアバゲニンを作用させてもそのような効果はなかった。オキシステロール類は肝臓で分解されるという報告があるため、ウアバゲニンが分解されて活性を発現しない可能性が考えられた。そこで、腎臓由来細胞でも同様の検討を行ったが、やはりウアバゲニンは活性を示さず、T0901317 は上記遺伝子群の発現を上昇させた。この作用の違いが、実際の脂肪肝誘導にどのような影響を与えるかをマウスを用いた動物実験で検証した。マウス腹腔内に 10 mg/kg の投与量で5日間連続投与したところ、T0901317 投与群では有意な肝肥大と肝トリグリセリド貯留量増加が認められたが、ウアバゲニン投与群ではコントロール群と有意差はなく、むしろ若干の低下が認められた。これらの結果より、ウアバゲニンは、LXR のリガンドとして機能しながら脂肪肝を誘導しない希有なりガンドであることが示された。

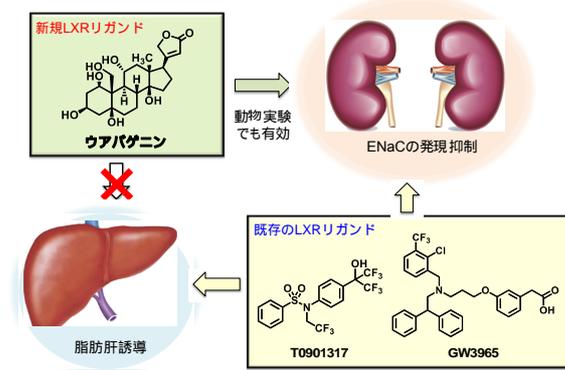
一方、近年報告された、腎集合尿管細胞に対する ENaC 発現抑制については、ENaC が 、 の3種類のサブユニットから構成されており、そのいずれかが欠損しても ENaC の機能が大幅に低減するとされていることから、このサブユニットをそれぞれコードする mRNA 量を定量的 PCR 法で評価した。その結果、ウアバゲニンあるいは T0901317 を 1 μM の濃度で処理したところ、 および サブユニットの発現を有意に抑制した。以前の報告では、ENaC の抑制作用が LXR を経由していることが実験的には証明されていなかったため、本研究ではこの点も明らかにするための検討をおこなった。先述したように LXR には2種のサブタイプが存在しており、分布臓器やその役割も異なっている、そこで siRNA によって効率的かつサブタイプ選択的にノックダウンする方法を確立し、その条件下で LXR リガンドを作用させた。LXR をノックダウンした条件下では、非ノックダウ

ン条件と同様に ENaC の発現抑制が確認された一方で、LXR ノックダウン条件ではLXRリガンドのENaC発現抑制効果が消失した。さらに、LXR ノックダウン、LXR 過剰発現の条件下でもLXRリガンドのENaC抑制効果は回復しなかったことから、ウアバゲニンをはじめLXRリガンドのENaC発現抑制活性はLXR のみに依存していることを明らかにした。また、ウアバゲニンの ENaC 発現抑制効果は、マウスを用いた動物実験でも証明された。



LXR リガンドは、種々の疾病に関与していることが示唆されているが、in vivo で用いると脂肪肝を誘導してしまう致命的な欠点があり、これが LXR の機能解明の大きな障害となっていた。しかしながら、本研究課題で見出したウアバゲニンは、脂肪肝を誘導する事なく ENaC の発現を抑制する効果を示した。腎臓での ENaC 発現抑制は降圧利尿作用に繋がることからウアバゲニンは副作用の少ない医薬リードとしての開発および LXR の機能解明に繋がるツール分子として重要な役割を担うと考えられる。

そこで、ウアバゲニンの生物活性についてさらに検討した。まず、マウス腎臓由来細胞に対して、既存の LXR リガンドである T0901317 や GW3965 がそれぞれ IC₅₀ 値 12 μM、3.2 μM の細胞毒性を示したのに対して、ウアバゲニンは 0.1 mM の濃度でも生育阻害を示さなかった。また、GW3965 は、G1 アレストを引き起こすことが報告されているが、ウアバゲニンを同濃度で処理しても細胞周期に



ほとんど影響を与えることはなかった。これらの結果を踏まえると、ウアバゲニンは既存の LXR リガンドと比較して副作用を引き起こしにくく、医薬リードへの開発が非常に有望であることが判明した。

最後に、ウアバゲニンとウアバインの関係性について検討する目的で、動物細胞のウアバイン産生能について検証した。文献に記載された通り、ラット副腎由来 PC12 細胞に対してプロゲステロンを添加した場合にのみ、ウアバインを産生していることを LC-MS によって確認した。しかしながら、ウアバゲニンについては検出できなかったことから、比較的速やかにウアバゲニンからウアバインへと変換されているものと推察した。この PC12 細胞からラムノシル化酵素の単離については引き続き検討を行っている。

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7件)

田村 理、岡田麻衣子、上田 実、強心配糖体ウアバインのアグリコン「ウアバゲニン」の新規生理活性. *化学と生物* **56**, 184-189 (2018). 査読有. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.184

Tamura, S.; Okada, M.; Kato, S.; Shinoda, Y.; Shioda, N.; Fukunaga, K.; Ui-Tei, K.; *Ueda, M. Ouabagenin is a naturally occurring LXR ligand without causing hepatic steatosis as a side effect. *Sci. Rep.* **8**, 2305 (2018) 査読有. DOI: 10.1038/s41598-018-20663-z

*Tamura, S.; Sato, K.; *Kawano, T. N-Alkylation using sodium triacetoxyborohydride with carboxylic acids as alkyl sources. *Chem. Pharm. Bull.* **66**, 101-103 (2018). 査読有. DOI: 10.1248/cpb.c1-00716

Inagaki, S.; Sato, A.; Sato, H.; Tamura, S.; *Kawano, T. Synthesis of 2-substituted 4,5-dihydro-4-oxo-3-furancarboxylates using acylative intramolecular cyclization of sulfonium salts. *Tetrahedron Lett.* **58**, 4872-4875 (2017). 査読有. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.11.035

*Tsujihara, T.; Zhou, D.-Y.; Suzuki, T.; Tamura, S.; *Kawano, T. Helically chiral 1-sulfur-functionalized [6]helicene: synthesis, optical resolution, and functionalization. *Org. Lett.* **19**, 3311-3314 (2017) 査読有. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01470

Inagaki, S.; Nakazato, M.; Fukuda, N.; Tamura, S.; *Kawano, T. Synthesis of 4-halo-3(2H)-furanones using intramolecular cyclization of sulfonium salts. *J. Org. Chem.* **82**, 5583-5589 (2017). 査読有. DOI: 10.1021/acs.joc.7b00399

Shinohara, N.; Sunagawa, N.; Tamura, S.; Yokoyama, R.; Ueda, M.; Igarashi, K.; *Nishitani, K. The plant cell-wall enzyme AtXTH3 catalyses

covalent cross-linking between cellulose and cello-oligosaccharide. *Sci. Rep.* 7, 46099 (2017).
査読有. DOI: 10.1038/srep46099

(4)研究協力者
()

〔学会発表〕(計 15 件)

米澤 正、中村朱里、田村 理、川崎 靖、杉山晶規、名取泰博、核内受容体 LXR 新規アゴニストの作用と可能性、日本薬学会第 138 年会、2018/3/27

田村 理、Trial for Searching Drug-Seeds from Natural Resources (依頼講演)、平成 29 年度化学系学協会東北大会、2017/9/16

大石 悠、田村 理、阿部哲郎、岡田麻衣子、上田 実、Analysis of Target Protein and Biological Function of Ouabagenin、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25

田村 理、岡田 麻衣子、篠田 康晴、塩田 倫史、福永 浩司、大石 悠、上田 実、脂肪肝を誘導しない新奇な LXR リガンドとして機能するウアバゲニン、日本薬学会第 136 年会、2016/3/27

Tamura, S.; Oishi, H.; Abe, T.; Okada, M.; Ueda, M.: Elucidation for bioactivity of ouabagenin, a presumed endogenous ligand for nuclear receptor: PacifiChem2015: 2015/12/17

田村 理、大石 悠、阿部 哲郎、岡田 麻衣子、上田 実、核内受容体内在性リガンドとしてのウアバゲニンの機能解析、日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会、2015/6/11

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/moc/180202published/>

<http://www.sci.tohoku.ac.jp/news/20180202-9504.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 理 (TAMURA, Satoru)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30362619

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：