

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350972

研究課題名(和文) 脂質合成を制御するビタミンD3誘導体の機能解析と創薬への応用展開

研究課題名(英文) Analysis of regulation of lipid metabolism by vitamin D metabolite

研究代表者

渡邊 瑞貴 (WATANABE, Mizuki)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：20507173

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)：生体内に存在するビタミンDが、脂質合成を抑制することを発見した。生物は脂質の量を様々な方法で調節している。脂質調節の異常は、メタボリックシンドロームや癌などの疾患で頻繁に起きている。本研究では脂質合成の指令塔タンパク質であるSREBP (Sterol Regulatory Element-binding Protein)に着目した。今回の研究では、“内因性”つまり生体内に元々存在するSREBP抑制分子として、ビタミンD代謝物を新たに発見した。そのメカニズム解析を進めたところ、ビタミンDがSREBPの働きをこれまで知られていない方法で抑えていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that an endogenous vitamin D metabolite suppresses the lipid biosynthesis. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) are transcription factors that control lipid homeostasis. We screened a chemical library of endogenous molecules and identified 25-hydroxyvitamin D (25OHD) as an inhibitor of SREBP activation. Unlike sterols and other SREBP inhibitors, 25OHD impairs SREBP activation by inducing proteolytic processing and ubiquitin-mediated degradation of SCAP, thereby decreasing SREBP levels independently of the vitamin D receptor. Vitamin D supplementation has been proposed to reduce the risk of metabolic diseases, but the mechanisms are unknown. The present results suggest a previously unrecognized molecular mechanism of vitamin D-mediated lipid control that might be useful in the treatment of metabolic diseases.

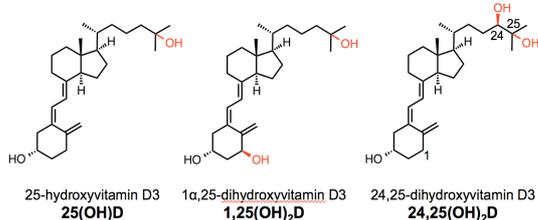
研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ビタミンD 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝の中心的調節因子である SREBP (sterol regulatory element-binding protein) は、結合タンパク質 SCAP (SREBP cleavage-activating protein) と安定な複合体を形成し、小胞体膜上に存在している。脂質やステロールレベルが低いとき、SREBP は SCAP の働きによって小胞体膜からゴルジ体へと移行し、そこでプロテアーゼによるプロセッシングを受けて活性化型となる。その後核内で転写因子として働き、脂質やステロールの生合成に関与する遺伝子を活性化しする。一方、生合成産物の一種であるコレステロールやオキシステロールは、直接 SCAP、および別の小胞体膜タンパク質 Insig に作用し、SREBP-SCAP-Insig 三者複合体の形成を促し、SCAP のゴルジ体への移行ステップを抑制する。すなわち SREBP の活性化は、ステロールによるネガティブフィードバック機構によって制御を受けている。しかし、SREBP は生体内で複雑な制御を受けているため、その全貌は明らかではなく、さまざまな疾患への関与も知られている。例えば、ガン細胞や脂質疾患などにおいては、このネガティブフィードバックによる SREBP 制御機構が正常に機能していないと考えられている。

このような背景から、SREBP の複雑な生体内制御機構の理解および制御を目的として、新規内因性 SREBP 阻害物質の探索を行った。所属研究室所有の化合物ライブラリーの中から、269 種の脂質関連低分子からなる化合物群を使ってスクリーニングを行った。その結果、下図に示すような 3 種の水酸化ビタミン D がヒットとして見つかった (下図)。これら内因性ビタミン D 類はステロールと同様に SREBP-SCAP 複合体のゴルジ体への輸送段階を阻害するものの、その作用機構はステロールと異なること、また、その作用はビタミン D 受容体を介さないことが、さらなる解析実験で示唆された。内因性ビタミン D 類と SREBP-SCAP の直接的な関係についての報告はなく、ビタミン D は SREBP 活性化を制御する新たな内因性物質の可能性があった。



2. 研究の目的

本研究では、SREBP 活性化に対する内因性ビタミン D 類の詳細な機能を解析し、脂質生合成に関わる生体内 SREBP 活性化の新たな制御機構の解明を目指した。そこで得られた知見をもとに、SREBP 活性化を阻害して脂質生合成を抑制する新たな合成小分子を創出し、将来的には、肥満など生活習慣病の予防・治療法開発に貢献することが目的である。

3. 研究の方法

スクリーニングによって発見された内因性ビタミン D がどのように SREBP を阻害しているのか、ウエスタンブロットなど一般的な分子生物学的手法などを用いて解析した。また、SREBP 活性化阻害におけるビタミン D の標的タンパク質を同定するために、合成ビタミン D 誘導体に光反応性基とビオチンを結合させた光反応性プローブを合成し、標的的同定を行った。

4. 研究成果

スクリーニングによって SREBP 活性化阻害物質として発見された内因性ビタミン D の作用メカニズムを明らかにするために、SREBP およびその結合パートナーである SCAP に着目した。その結果、ビタミン D によって、SREBP、SCAP いずれも減少していることが分かった。これは上述した内因性 SREBP 阻害分子であるステロールによるものとは異なる、新規のメカニズムである。

そこで次に SCAP に着目して詳細を解析した。その結果、ビタミン D 依存的に SCAP がポリユビキチン化されていることが確認でき、ユビキチン・プロテアソーム系によって SCAP が分解されていることが確かめられた。さらに詳細な解析を進めることで、SCAP のユビキチン化に先立って、プロテアーゼによる SCAP のプロセッシングが起きていることが明らかとなり、このプロセッシングが SCAP のユビキチン化および分解の引き金になっていると考えられた。

そこで SCAP のプロセッシングの意味を確かめるために、大まかなプロセッシングサイトの同定を行い、その情報をもとに、ビタミン D 存在下でもプロセッシングを受けないビタミン D 耐性の SCAP 変異体を作成した。その結果、期待通り、ビタミン D 耐性の変異体 SCAP 発現細胞においてのみ、SCAP の分解が止まり、さらには SREBP の活性の回復も見られ、SCAP のプロセッシングの重要性が明らかになった。

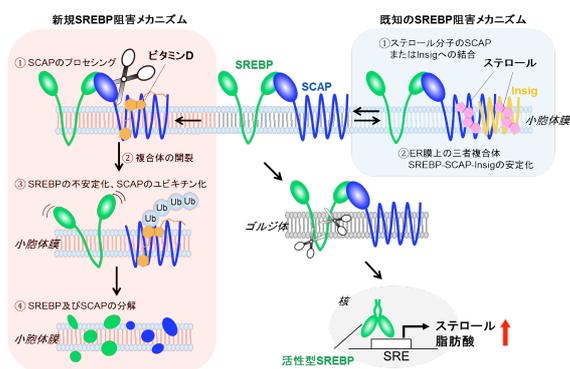
最後にビタミン D のターゲットを検討するために、ビオチンおよび光反応基をもつビタミン D プローブを作成した。細胞のライセートに対してプローブ処理を行った後、紫外線照射することでプローブと結合タンパク質とをクロスリンクさせ、アビジンビーズを用いて精製した結果、SCAP のプローブ依存的な結合が見られた。つまり、ビタミン D が SCAP に直接作用して、プロセッシングを誘発している可能性が考えられた。

以上の知見から次のような SREBP の不活性化メカニズムが明らかになった。『ビタミン D の作用により、SREBP の結合パートナーである SCAP がプロテアーゼによるプロセッシングを受け、SREBP-SCAP 複合体が壊れる。その後 SCAP はユビキチン・プロテアソーム系による分解を受け、それに伴い結合パートナーを失って不安定化した SREBP も分解する。これに

より SREBP の活性化が抑えられている。』

今回見つけた三種類の水酸化ビタミン D の中で、特に 25-hydroxyvitamin D (25OHD) が最も高い SREBP 阻害活性を示す。この 25OHD は、腎臓で Cyp27b1 による代謝を受けて 1 α , 25-dihydroxyvitamin D (1, 25(OH)₂D) に変換されることが知られている。1, 25(OH)₂D はビタミン D 受容体 (VDR) の強力なアゴニストであるため、25OHD を SREBP の活性抑制目的で用いた場合、VDR を介した作用の影響が過剰に出てしまう恐れがある。そこで現在、今後の治療薬展開やツール開発を視野に入れ、VDR 活性化能を持たずに SREBP の活性抑制のみを示す誘導体の探索を行っている。より選択性の高い SREBP 阻害分子を合成することは、脂質代謝疾患の解明、および治療に対する新たなアプローチを見出すことにつながるかと期待できる。

本研究で見出したビタミン D 類と SREBP の活性化との直接的な関係性は、これまで全く報告されていなかった。しかし、血中ビタミン D 濃度と肥満指数が逆相関することは疫学的な研究によって以前から知られていた。本研究の成果は、これまで不明であったビタミン D と脂質代謝との関係について、その分子メカニズムの一端を初めて明らかにしたものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

① Asano, L.; Watanabe, M.; Ryoden, Y.; Usuda, K.; Yamaguchi, T.; Khambu, B.; Takashima, M.; Sato, S.; Sakai, J.; Nagasawa, K.; Uesugi, M.

“Vitamin D metabolite, 25-hydroxyvitamin D, regulates lipid metabolism by inducing degradation of SREBP/SCAP”

Cell Chemical Biology, **2017**, *24*, 207-217. 査読有り

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.chembio.1.2016.12.017

② Sato, T.; Watanabe, M.; Tsuzuki, T.; Takano, S.; Murayama, T.; Sakurai, T.; Kameda, T.; Arisawa, M.; Fukuda, H.; Shuto, S.

“Design, synthesis, and identification

of 4” α -azidoethyl-cyclic ADP-carbocyclic-ribose as a highly potent analogue of cyclic ADP-ribose, a Ca²⁺-mobilizing second messenger”

Journal of Medicinal Chemistry, **2016**, *59*, 7282-7286. 査読有り

DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b00437

③ Sato, S.; Watanabe, M.; Katsuda, Y.; Murata, A.; Wang, D.O.; Uesugi, M.

“Live-cell imaging of endogenous mRNAs with a small molecule”

Angewandte Chemie International Edition, **2015**, *54*, 1855-1858. 査読有り

DOI:10.1002/anie.201410339

④ Kang, S.; Watanabe, M.; Jacobs, J.C.; Yamaguchi, M.; Dahesh, S.; Nizet, V.; Leyh, T. S.; Silverman, R.B.

“Synthesis of mevalonate- and fluorinated mevalonate prodrugs and their *in vitro* human plasma stability”

European Journal of Medicinal Chemistry, **2015**, *90*, 448-461. 査読有り

DOI:https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.040

⑤ Frisco-C., H.L.; Watanabe, M.; Okumura, N.; Kusamori, K.; Takemoto, N.; Takaya, J.; Sato, S.; Yamazoe, S.; Takakura, Y.; Kinoshita, S.; Nishikawa, M.; Koizumi, N.; Uesugi, M.

“Synthetic molecules that protect cells from anoikis and their use in cell transplantation”

Angewandte Chemie International Edition, **2014**, *53*, 11208-11213. 査読有り

DOI:10.1002/ange.201405829

〔学会発表〕 (計 10 件)

① 浅野理沙、渡邊瑞貴、領田優太、長澤和夫、上杉志成、25-ヒドロキシビタミン D による SREBP-SCAP の分解メカニズムの解明、日本薬学会第 137 年会、2017/3/25、東北大学 (宮城県仙台市)

② 浅野理沙、渡邊瑞貴、領田優太、長澤和夫、上杉志成、25-ヒドロキシビタミン D による SREBP/SCAP の分解メカニズムの解明、第 58 回天然有機化合物討論会、2016/9/15、東北大学 (宮城県仙台市)

③ 渡邊瑞貴、佐藤隆俊、加藤広太郎、福田隼、村山尚、東田陽博、周東智、細胞内 Ca²⁺ 動員情報伝達系の機構解明を目指した環状 ADP-リボース誘導体の設計と合成、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、2016/6/16、京都テルサ (京都府京都市)

④ 渡邊瑞貴、ケミカルバイオロジーによるビ

タミンD誘導体の新機能研究、日本薬学会第136年会、2016/3/27、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑤渡邊瑞貴、浅野理沙、領田優太、薄田晃佑、飯田圭介、佐藤慎一、長澤和夫、上杉志成、内因性小分子による脂質生合成抑制機構の解明、日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会、2015/6/12、東北大学（宮城県仙台市）

⑥渡邊瑞貴、ビタミンD誘導体のケミカルバイオロジー研究、第1回有機化学を基盤とした創薬研究シンポジウム、2015/5/23、定山溪ホテル（北海道札幌市）

⑦浅野理沙、渡邊瑞貴、領田優太、長澤和夫、上杉志成、内因性低分子化合物による新規脂質代謝制御メカニズムの解明、日本薬学会第135年会、2015/3/26、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

⑧渡邊瑞貴、浅野理沙、領田優太、Bilon Khamb、薄田晃佑、飯田圭介、岩田淳、佐藤慎一、長澤和夫、上杉志成、脂質生合成を抑制する内因性小分子化合物、第56回天然有機化合物討論会、2014/10/15、高知県立県民文化ホール（高知県高知市）

⑨佐藤慎一、渡邊瑞貴、勝田陽介、王丹、上杉志成、内在性 mRNA 細胞内動態の新規イメージング法の開発、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014/9/11、岡山大学（岡山県岡山市）

⑩ Heidie L. Frisco-Cabanos, Mizuki Watanabe, Naohiro Takemoto, Junichiro Takaya, Shin-ichi Sato, Sayumi Yamazoe, Kosuke Kusamori, Makiya Nishikawa, Noriko Koizumi, Motonari Uesugi、アノイキス抑制合成分子とその細胞移植への利用、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014/6/11、大阪大学（大阪府豊中市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：Vitamin D3 derivatives and pharmaceutical use thereof
発明者：渡邊瑞貴、浅野理沙、上杉志成、他
権利者：同上
種類：特許
番号：US 62/ 0296575
出願年月日：2014年12月24日
国内外の別：国外

名称：Compositions and methods for the treatment of metabolic disorders
発明者：上杉志成、渡邊瑞貴、他
権利者：同上

種類：特許
番号：US 20140303213 A1 20141009
出願年月日：2014年6月20日
国内外の別：国外

名称：Preparation of fatostatin A and derivatives and compositions thereof for the treatment of obesity
発明者：上杉志成、渡邊瑞貴、他
権利者：同上
種類：特許
番号：US 20140235646 A1 20140821
出願年月日：2014年5月5日
国内外の別：国外

○取得状況（計1件）

名称：Compositions and methods for the treatment of metabolic disorders
発明者：上杉志成、渡邊瑞貴、他
権利者：同上
種類：特許
番号：US 20160221999 A1 20160804
取得年月日：2016年09月08日
国内外の別：国外

〔その他〕

京都大学からプレスリリースされ、朝日新聞（2017/1/27, 33面）、産経新聞（2017/1/27, 28面）、京都新聞（2017/1/27, 27面）、日本経済新聞（2017/1/29, 30面）、毎日新聞（2017/1/28, 24面）に掲載、および、関西テレビ（2017/1/27, 6:06放送分）、KBS京都（2017/1/27, 11:55, 18:00放送分）で放送された。

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/170127_1.html

時事通信社 2017/1/27, 2:10 配信
<http://www.jiji.com/jc/article?k=2017012700041&g=soc>

朝日新聞デジタル 2017/1/27, 3:31 配信
<http://www.asahi.com/articles/ASK1T4VCC K1TPLBJ004.html>

産経WEST 2017/1/27, 8:49 配信
<http://www.sankei.com/west/news/170127/wst1701270026-n1.html>

日本の研究.com プレスリリース
<https://research-er.jp/articles/view/54774>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 瑞貴 (WATANABE, Mizuki)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：20507173