

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16320

研究課題名(和文) 真菌由来化合物ダイナピノンAが示す中性脂質分解促進活性の作用機序解析

研究課題名(英文) The study of mechanism of action of fungal dinapinone A that enhances neutral lipid degradation in mammalian cells

研究代表者

小林 啓介 (Kobayashi, Keisuke)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80794734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真菌由来ダイナピノンA (DPA) が示す作用機序の解析を目的に、その標的分子をタンパク質と仮定し、1) 化合物の誘導体化をともなう方法(ケミカルプローブ)および2) 化合物の誘導体化をともなわない方法を用いて、DPAの結合タンパク質の探索を行なった。いずれの方法からも、候補分子を複数見出し、LC-MS/MS解析によりそのタンパク質について同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、中性脂質の分解促進活性とオートファジー促進活性という生物活性、および軸異性体の混合によりその作用が増強するという例を見ない活性発現様式をもつダイナピノンA (DPA) の標的分子を明らかとし、その作用機序を解明することを目的とした。その結果、DPAが有する構造に特異的に結合するタンパク質を複数同定することに成功した。現在も、得られた候補分子の生物活性との関連性の検証は進行中であるが、本研究の達成により、新たな細胞内脂質代謝経路の発見や反応メカニズムの提唱など学術的な意義のみならず、新たな創薬ターゲットの提案などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of action of dinapinone A (DPA), DPA binding proteins were searched with chemical labelling method and label-free methods. As a result, several candidate proteins were identified by LC-MS/MS analysis.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 中性脂質 脂肪滴 コレステリルエステル トリアシルグリセロール ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダイナピノン A (DPA) (図 1) は、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞を用いた、細胞内中性脂質 (トリグリセリド (TG) およびコレステリルエステル (CE)) 蓄積阻害剤の探索過程で、真菌培養抽出液より研究者らのグループが発見した新規化合物である¹⁾。DPA には、構造中の 8-8' 間結合が回転できないことにより生じる 2 つの軸異性体 DPA1 (*M* 体) および DPA2 (*P* 体) が存在する (図 1)。DPA1 単独では 12 μ M でも細胞内の TG および CE の蓄積を全く阻害せず、DPA2 単独では中程度の阻害活性 (それぞれの IC₅₀ 値は 0.65 μ M と 5.2 μ M) を示す。しかし驚くべきことに、DPA1 と DPA2 の 1:1 混合物 (DPA_{mix}) は最大の阻害活性を示し、軸異性体単独と比較して 12~220 倍の活性の増強を示す (表 1)。本研究開始当初までに、DPA_{mix} を用いた解析により、1) TG および CE の生合成経路に参与する酵素を阻害しないこと、2) 濃度および時間依存的に細胞に蓄積させた中性脂質の分解を促進させること、3) 2) と並行して濃度および時間依存的にオートファジーを促進させること、4) DPA1 および DPA2 単独では 2) および 3) の現象はほとんど観察されないことを、研究者はそれぞれ明らかとしてきた²⁾。しかし、DPA のように中性脂質の分解を促進するという活性発現機構を示す化合物はこれまでに報告が無いこと、また、軸異性体を混合することでその生物活性 (中性脂質の分解およびオートファジー促進) が増強するという化合物の報告例もないため、DPA の作用機序およびその標的分子に興味をもたれた。

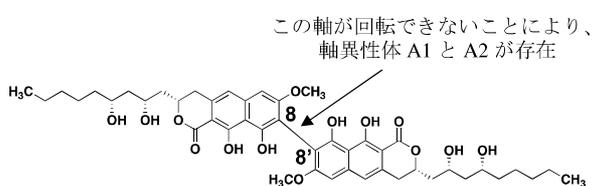


図 1 ダイナピノン A (DPA) の構造

表 1. DPA が示す中性脂質蓄積阻害活性

化合物	IC ₅₀ (μ M)		
	TG	CE	
DPA1	> 12	> 12	65 倍 増強
DPA _{mix}	0.054	0.18	
DPA2	0.65	5.2	30 倍 増強

2. 研究の目的

これまでに報告されている中性脂質代謝を制御する低分子化合物のほとんどは脂質の生合成過程を阻害するものであり、その標的分子は生合成関連酵素である。医薬品を鑑みても、コレステロール生合成を阻害するスタチン系を代表とし、既往患者の脂質代謝異常をそれ以上増悪させない予防的効果は示すが、脂質の分解を促進させるという直接的な治療効果を有する医薬品の開発には至っていない。一方、DPA は既存の脂質代謝制御剤とは全く異なる構造を有していること、またその活性は中性脂質の分解促進であるという点でこれまでの化合物とは一線を画している。また、構造が全く異なる 2 種類の化合物の併用により生物活性が増強する報告例はあるが、構造的に類似している軸異性体がこのような現象を示す報告例はこれまでに無い。したがって、DPA は全く新しい標的分子または作用機序を有していると考えられ、その説明は新たな細胞内代謝経路の発見や反応メカニズムの提唱など学術的に意義があるだけでなく、新たな創薬ターゲットや、直接的な治療効果を示す医薬品のリード化合物となることが期待された。こうした背景のもと、本研究では DPA の標的分子を明らかとし、その作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

一般的に、生物活性を示す低中分子化合物の標的分子はタンパク質であることが多いことから、本研究でも DPA の標的分子をタンパク質であると想定し、実験を進めることとした。

(1) DPA のケミカルプローブ (合成誘導体) を用いた方法

一般的にケミカルプローブの合成には構造活性相関研究に基づいた化合物の誘導体化を必要とするが、本研究ではそれを必要としない簡便な合成法³⁾を DPA に応用した。すなわち、光親和性基を結合させた樹脂に対し、DPA1 もしくは DPA2 を混合後、UV 照射することで、光親和性基と DPA がランダムに結合したケミカルプローブを合成した。その後、各プローブについて、CHO-K1 細胞より調製した細胞抽出液と反応後、電気泳動することにより、DPA プローブに特異的に検出されるバンドを探索した。

(2) DPA の誘導体化を必要としない label-free な方法

(1) のような化合物の誘導体化をとまなう手法が標的タンパク質の探索では従来選択されるが、誘導体化処理によりその構造を変化させてしまうため、目的の標的分子が得られなくなる可能性がある。また、DPA1 と DPA2 は溶液中で複合体を形成し細胞に作用している可能性も考えられた。そこで、化合物の誘導体化を必要とせず溶液状態で結合タンパク質の探索が可能、2

つの手法を用いて解析を行なった。

Cellular thermal stability assay (CETSA) 法⁴⁾：本方法は、タンパク質が化合物と結合することで、熱変性に対する感受性が変化する性質を利用したものである。細胞に化合物 (DPA_{mix}、DPA1 単独および DPA2 単独) を添加して一定時間培養することで、標的分子に化合物を結合させた。次いで、細胞を熱処理することで細胞内のタンパク質を変性させた後に、細胞からタンパク質抽出液を調製した。最終的に、電気泳動によりサンプル間のバンドパターンを比較し、コントロールと比較して、特に DPA_{mix} でバンドパターンが変動するものに注意して結合タンパク質を探索した。

Solvent-induced protein precipitation (SIP) 法⁵⁾：本方法は、タンパク質が化合物と結合することで、有機溶媒変性に対する感受性が変化する性質を利用したものである。細胞抽出液と化合物を一定時間反応させることで、標的分子に化合物を結合させた。次いで、acetone/ethanol/acetic acid (50:50:0.1) を一定の割合で添加し十分に混合することで、タンパク質を有機溶媒で変性させた。その後、遠心分離により変性を免れたタンパク質を含む上清を回収し、電気泳動によりサンプル間のバンドパターンを比較した。

(3) DPA と類似した表現型を示す微生物由来化合物の探索

DPA と類似した表現型を示す化合物が取得できれば、その化合物の構造的特徴、報告されている生物活性などから、DPA の標的分子に関するヒントを得られると考え、放線菌および真菌の培養抽出液を探索源としスクリーニングを行なった。

4. 研究成果

(1) DPA のケミカルプローブ (合成誘導体) を用いた方法

まずは中程度の活性を示す DPA2 プローブを用いて結合タンパク質の探索を行なった。その結果、コントロールプローブと比較して、DPA2 プローブに特異的に結合してきたタンパク質のバンドを 5 つ認めた。さらに、DPA2 を用いた競合実験を行い、DPA2 に高い結合親和性を有すると考えられるバンドを 2 つにまで絞り込んだ。しかし、これらバンドは DPA1 プローブにも結合が認められたため、DPA が示す生物活性に関連する直接の標的分子ではないことが示唆された。

(2) DPA の誘導体化を必要としない label-free な方法

CETSA 法：CHO-K1 細胞に対し各種 DPA で処理した際、DPA2 および DPA_{mix} により顕著に 61.2~66.4 で起こる熱変性に対して抵抗性を示すバンドを 7 つ見出した (図 2)。これらバンドについて切り出し、LC-MS/MS 解析を行うことにより、5 つの候補タンパク質が同定された。このうち、prohibitin (PHB1) は、脂肪細胞において siRNA でノックダウンすることにより、細胞内の中性脂質の貯蔵器官である脂肪滴の蓄積を減少させることが報告されており、DPA の示す表現型との関連性が考えられたことから、以下のさらなる詳細な解析を行なった。1) DPA2 および DPA_{mix} が PHB1 に熱変性抵抗性を付与していることを、PHB1 抗体を用いたウエスタンブロットングで確認した。2) 既知の PHB1 リガンド (Aftin-4 や aurilide など) が、DPA と同様の表現型を示すかを確認したが、それは認められなかった。3) siRNA により PHB1 をノックダウンした細胞が DPA と同様の表現型を示すか確認したが、それは認められなかった。4) PHB1 を過剰発現させた細胞に対する DPA_{mix} が引き起こす作用の感受性を確認したが、野生株と比較して変化は認められなかった。以上のことより、PHB1 に DPA2 (または DPA_{mix}) が結合する可能性は示唆されたが、DPA が示す表現型の直接の標的分子ではないことが考えられた。

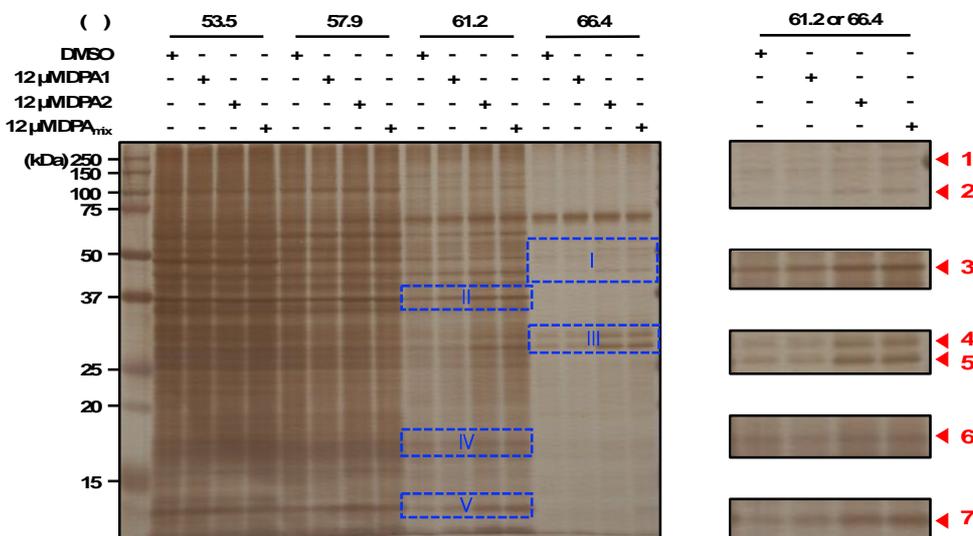


図 2. CHO-K1 細胞を用いた CETSA 法による DPA 結合タンパク質の探索

SIP 法: CHO-K1 細胞より調製した細胞抽出液に対し各種 DPA で処理した際、DPA_{mix} により、11~15% の acetone/ethanol/acetic acid (50:50:0.1) 処理で起こる有機溶媒変性に対して感受性が付与されるバンドを 2 つ見出した。これらバンドについて切り出し、LC-MS/MS 解析を行うことにより、オートファジーへの関連が報告されているものを含め、5 つの候補タンパク質を同定した。

(3) DPA と類似した表現型を示す微生物由来化合物の探索

放線菌および真菌の培養抽出液約 5,350 サンプルを対象に、細胞内中性脂質 (CE および TG) 分解促進活性物質の探索を行なった結果、放線菌の培養抽出液より、CE 分解促進活性物質として oxohygroolidin および hygroolidin を同定した。また、真菌の培養抽出液より CE 分解促進活性物質として beauveriolide 類および beauverolide 類、TG 分解促進活性物質として breferdin A を同定した。しかし、DPA のように CE と TG 両者の分解を促進する化合物は見出せなかった。

(4) おわりに

ケミカルプローブや CETSA 法を用いた探索では、幾つかの結合タンパク質を取得できたものの、DPA の作用機序と直接的に関連するようなタンパク質ではないことが示唆された。残念ながら、本研究期間内には DPA の作用機序の完全解明に至らなかったが、しかし、SIP 法により、新たな候補タンパク質を挙げることができ、今後これらの精査を進めていく。また、5,000 を超えるサンプルを新たにスクリーニングしたが、DPA と類似の表現型を示す化合物は見出すことができなかった。翻って、これは DPA の特異性を表していると言える。

< 引用文献 >

1) *J. Antibiot.* **64**, 489-494 (2011), 2) *Sci. Rep.* **8**, 12099 (2018), 3) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 3559-3362 (2005), 4) *Nat. Protoc.* **9**, 2100-2122 (2014), 5) *Anal. Chem.* **92**, 1363-1371 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nur Elyza Aiman Azizah, Kobayashi Keisuke, Amagai Ai, Ohshiro Taichi, Tomoda Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 New Terpendole Congeners, Inhibitors of Sterol O-Acyltransferase, Produced by <i>Volutella citrinella</i> BF-0440	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3079 ~ 3079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25133079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nur Elyza Aiman Azizah, Kobayashi Keisuke, Ohte Satoshi, Tomoda Hiroshi, Ohshiro Taichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Screening for microbial potentiators of neutral lipid degradation in CHO-K1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 273 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Elyza Nur, 小林啓介, 大城太一, 供田洋
2. 発表標題 真菌 <i>Volutella citrinella</i> BF-0440株が生産する新規テルペンドール類に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林啓介, 大城太一, Elyza Nur, 森田遥, 内田龍児, 供田洋
2. 発表標題 真菌 <i>Volutella citrinella</i> BF-0440株が生産する sterol O-acyltransferase阻害剤とその構造活性相関
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥畑 颯真、小林 啓介、供田 洋
2. 発表標題 中性脂質蓄積阻害活性を示す真菌由来化合物 dinapinone A の結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 啓介、奥畑 颯真、供田 洋
2. 発表標題 中性脂質の分解を促進する中分子化合物ダイナピノンAの結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 啓介、奥畑 颯真、供田 洋
2. 発表標題 細胞内中性脂質蓄積阻害活性を示す天然物ダイナピノンの標的分子の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------