

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008年度～2009年度

課題番号：20810028

研究課題名(和文) 天然由来マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤の標的分子の解析

研究課題名(英文) Study on the action mechanism of inhibition of natural origin on lipid droplet formation in macrophages.

研究代表者

松田 大介 (Matsuda Daisuke)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：20458764

研究成果の概要(和文)：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤として真菌の培養液中より発見した beaveriolide の標的分子について詳細に解析した。その結果、本化合物の標的分子が ACAT1 (コレステロールアシル転移酵素 1) であることは疑いのないものと示すことができた。さらに、2 種類のアイズザイム (ACAT1 と ACAT2) のうち、ACAT1 を選択的に阻害するには小胞体膜の維持が重要であることが示唆された。他に類のない珍しい作用様式であることから、新しいタイプのプローブとして期待される。

研究成果の概要(英文)：

The action mechanism of fungal beaveriolide on lipid droplet formation in macrophages was studied. Biochemical study revealed that beaveriolide inhibited acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mouse macrophages. Furthermore, the compound selectively inhibited ACAT1 isozyme in intact cells, while it inhibited both ACAT1 and ACAT2 isozymes in microsomes. Cell biological study suggested that this discrepancy between intact cells and microsome might be due to the different membrane topology of the active sites between the two isozymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー、動脈硬化症、脂質代謝、天然由来阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

高脂血症や動脈硬化症は心筋梗塞や脳卒中など死に直結する疾患へと発展するリスクが高く、以前よりこの過程を経た死は死因

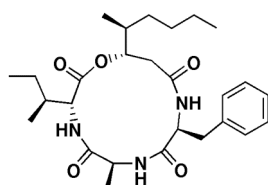
の上位を占め、毎年世界中で 1700 万人が心血管疾患で死亡している。当時、動脈硬化症の予防治療薬としてはコレステロール生合成の律速酵素の 1 つである HMG-CoA

(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) 還元酵素を特異的に阻害しコレステロールを低下させるスタチン系医薬品が主に用いられており、研究開始当初では、世界の医薬品売上高のトップ 10 にスタチン系医薬品は 3 製品も入っていた。しかし、現実には 30~40% しか発症抑制効果が得られず、治療を受けていた患者の半数が心血管疾患等を抑制していないことが明らかになってきていた (Libby P, *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225-1228 (2005))。その理由として動脈硬化の発症は複雑で複合的であることがあげられ、患者個々の病態や病因に合わせた治療が必要であると考えられる。以上のことから、スタチン系医薬品とは異なる新しい作用機序を有する医薬品の開発が急務であった。しかし、スタチン系医薬品に代わる医薬品の開発はほとんど進んでいなかった。

動脈硬化初期病巣において、変性した低密度リポ蛋白質 (LDL) をマクロファージが取り込み、細胞内に主にコレステリルエステル (CE) 及びトリグリセリド (TG) で構成された脂肪滴を大量に蓄積することが知られている。動脈硬化症はこの過程を経て進展していくと考えられていることから、それを阻害する化合物は医薬品の新たな候補として期待されている。

## 2. 研究の目的

西川らは、変性 LDL の代わりに、容易に調製できる酸性リン脂質を含有したリポソームをマウス腹腔マクロファージとともに培養することによりマクロファージ内に脂肪滴を形成させることを報告した (Nishikawa et al., *J Biol Chem.*, **265**, 5226 (1990))。この過程は変性 LDL の場合と同様にスカベンジャーレセプターを介した代謝経路で進行する。我々は、この評価系を基本とし、マイクロプレートを用い、脂肪滴を直接染色し顕微鏡で観察する評価系と放射標識脂肪酸を同時に添加し脂肪滴成分である中性脂質 (CE と TG) を定量する生化学的な評価系を構築し、微生物資源を中心に、その阻害剤を探索してきた。その過程において、3つのアミノ酸と1つのβヒドロキシ酸で構成されるシクロデプシペプチド beauveriolide III が *Beauveria* sp. FO-6979 株より発見された。本化合物は、マウスレベルで動脈硬化の進展を抑制することを既に証明しており (Namatame et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 737 (2004))、新たな動脈硬化予防治療薬のリード化合物として注目されている。生化学的解析から、作用点は小胞体



Beauveriolide III

膜に局在する acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) と報告してきた。ACATには2種類のアイソザイム (ACAT1 と ACAT2) が存在し、生体内における機能や局在が異なることから、阻害剤のその選択性を調べることは重要である。Beauveriolide IIIは細胞レベルと酵素レベルで阻害の選択性が一致しないという疑問点があり、本研究ではその理由を検討した。また、新たな候補分子の提供を目的とし、天然資源を対象としたマクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤の探索と作用機序の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害活性の測定

脱血死させたマウス腹腔から採取した初代培養マクロファージにホスファチジルセリンを含むリポソームを添加することで脂肪滴を蓄積させた。①その培養液に $^{14}\text{C}$ オレイン酸を加えておくことで放射標識させた脂肪滴の主成分であるコレステリルエステルとトリアシルグリセロールの放射線量を測定し、阻害活性を算出した。②脂肪滴を oil red O で染色後、顕微鏡で観察して形態学的に評価した。また、リソソームからのコレステロール輸送を阻害する pregnenolone と $^{14}\text{C}$ コレステロールを含むリポソームを用いることで、コレステロールの輸送に対する影響を調べた。

### (2) ACAT1、ACAT2 阻害活性の測定

ACAT1 及び ACAT2 発現細胞 (ACAT を欠損させた Chinese hamster ovary 細胞に、各々アフリカミドリザル ACAT1 遺伝子及び ACAT2 遺伝子を安定導入した細胞、各々 ACAT1-CHO、ACAT2-CHO と略) は、Prof. Rudel (Wake Forest Univ. USA) より入手した。これらの細胞に蛍光基質 (NBD-cholesterol) または  $^{14}\text{C}$ 基質 ( $^{14}\text{C}$ オレイン酸) を取り込ませ、生じたコレステリルエステル (CE) 量を定量し、ACAT1 及び ACAT2 の活性を測定した。また各細胞のミクロソーム画分を用いて、 $^{14}\text{C}$ 基質 ( $[1-^{14}\text{C}]$ oleoyl-CoA) により酵素レベルでの ACAT1 と ACAT2 の活性も測定した。

### (3) セミンタクト細胞を用いた脂肪滴蓄積阻害活性の測定

ACAT1-CHO、ACAT2-CHO 細胞をジギトニンで処理することでセミンタクト細胞を調製し、その確認はトリパンブルー排除法により行った。 $[1-^{14}\text{C}]$ oleoyl-CoA を基質として取り込ませ、生じたコレステリルエステル (CE) 量を定量し、ACAT1 及び ACAT2 の活性を測定した。

#### (4) 結合タンパク質の解析

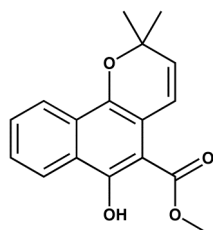
共同研究者に調製していただいたビオチン標識体に細胞のライセートを反応させ、アビジンビーズを用いて結合タンパク質を回収した。SDS-PAGE で分離後、LC-MS/MS あるいは Western blotting 法で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 以前に、我々が真菌の培養液中より発見した beaveriolide について解析を進めた。本化合物の標的は ACAT (小胞体膜に局在) であると予想していたが、細胞を用いた解析 (小胞体膜が正常に維持) とマイクロソームを酵素源とした解析 (小胞体膜の配向性は無制御) では阻害活性と両アイソザイムに対する選択性が異なっていた (細胞での評価は ACAT1 選択的、マイクロソームでは両アイソザイムを同程度阻害)。そこで、膜の配向性が重要であると仮説をたて、それを維持させたセミインタクト細胞を調製して評価を行った。その結果、細胞を用いた評価と同様に ACAT1 に選択性を示した。以上の結果から、本化合物の選択的阻害活性には小胞体膜の維持が重要であることが示唆された。さらに解析を進めるにあたり、得られた構造活性相関を考慮してビオチンを付加した誘導体を共同研究者に調製して頂いた。まず、ACAT1 または ACAT2 を選択的に発現させた細胞のマイクロソームを用いて酵素アッセイを行ったところ、天然の beaveriolide と同様に ACAT1 に対して ACAT2 より強い阻害活性を示したことから、本誘導体はツールとして活用できると考えられる。そこで、ビオチン標識したビーズを用いて結合タンパク質をつりあげ Western blotting 法で解析した。その結果、期待した通り本誘導体は ACAT1 に親和性高く結合していることが明らかとなった。以上の結果から、beaveriolide の標的が ACAT であることは疑いのないものと理解している。

(2) マクロファージ内脂肪滴蓄を阻害する化合物を、微生物資源、食品や生薬成分などの天然物資源から探索した。

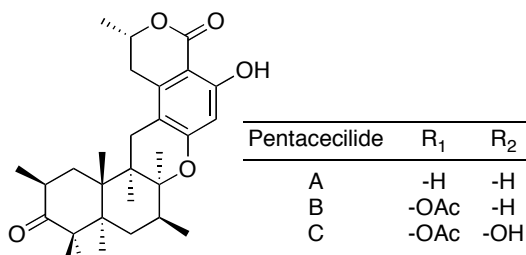
① アカネ科の *Rubia cordifolia* に含まれる成分である rubimaillin に目的の活性を見いだした。さらに、その標的が ACAT であることを明らかにした。本植物は、利尿や解熱作用を有する薬草として中国で使用されており、今後、動脈硬化予防作用のある機能性食品としての活用が期待できる。さらに、本化合物は angular 型に結合した芳香



Rubimaillin

環を基本骨格とする。過去の我々の報告 (Sakai et al., *J Antibiot.*, **61**, 568 (2008)) と相関性よく、2種の ACAT アイソザイム (ACAT1, ACAT2) のうち ACAT2 に対して ACAT1 よりも強い阻害活性を示した。ACAT2 に選択的に阻害活性を示す化合物は現在のところ pyripyropene A 以外にはあまり報告されていないことから、本発見は非常に興味深いものである。

② 真菌 *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1 株より新規 pentacecilide 類を発見した。コレステロール代謝に対する影響や酵素阻害活性等を調べた結果、本化合物も ACAT を阻害していることを明らかにした。現在までに報告されている中で最も優れた ACAT2 選択的阻害剤である pyripyropene A と類似したテルペン類であることから、さらに詳細に構造活性相関を研究することにより、pyripyropene 類の創薬研究に応用できると期待される。



③ ACAT はマクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤の重要な標的と考えられることから、その阻害剤を探索した結果、真菌 *Verticillium* sp. FKI-2679 株より新規 verticilide 類を発見した。本化合物は beaveriolide 類と同様に環状デブシペプチドであるが、beaveriolide とは逆に ACAT2 に対して ACAT1 よりも強い阻害活性を示した。Beaveriolide 類は、構成アミノ酸を置換することで ACAT1 と ACAT2 に対する選択性を変化させることが可能であることから、verticilide 類と比較しながら、環状デブシペプチド類の構造活性相関をさらに詳細に解析できると考えられる。それらの成果をふまえて誘導体研究を進展させることにより、beaveriolide からの創薬研究が大きく進展すると期待される。

#### 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 8 件)

1. H. Yamazaki, N. Ugaki, D. Matsuda and H. Tomoda: Absolute stereochemistry of pentacecilides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced

- by *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1. *J. Antibiot.* (in press)
2. 松田大介、供田洋：脂質異常症治療薬、*医薬ジャーナル新薬展望*, **46 S-1**, 477-480 (2010)
  3. D. Matsuda, T. Ohshiro, M. Ohba, W. Jiang, B. Hong, S. Si and H. Tomoda: The molecular target of rubimaillin in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1317-1320 (2009)
  4. S. Hosoda, D. Matsuda, H. Tomoda, M. Hashimoto, H. Aoyama, and Y. Hashimoto: Application of a 3,3-diphenylpentane skeleton as a multi-template for creation of HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4228-4231 (2009)
  5. H. Yamazaki, K. Kobayashi, D. Matsuda, K. Nonaka, R. Masuma, S. Omura and H. Tomoda: Pentacecicides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **62**, 195-200 (2009)
  6. T. Ohshiro, D. Matsuda, K. Nagai, T. Doi, T. Sunazuka, T. Takahashi, L.L. Rudel, S. Omura and H. Tomoda: The Selectivity of beauveriolide derivatives in inhibition toward the two isozymes of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Chem. Pharm. Bull.* **57**, 377-381 (2009)
  7. S. Hosoda, D. Matsuda, H. Tomoda, and Y. Hashimoto. Diphenylpentane skeleton as a multi-template for steroid skeleton-recognizing receptors/enzymes. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 572-580 (2009)
  8. 松田大介、大城太一、供田洋：スタチンを超える薬物療法の可能性, *内科*, **103**, 137-140 (2009)
- [学会発表] (計 25 件)
1. 大多和正樹、福永恵子、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義弘、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、日本薬学会第 130 年回年会 (2010) (岡山)
  2. 供田洋、猪腰淳嗣、内田龍児、小山信裕、松田大介：生活習慣病や感染症の治療に有効な標的分子に対する評価系の構築と天然資源および化合物ライブラリーの構築、第 26 回白金シンポジウム (2009) (東京)
  3. 松田大介、金子真弓、横田紗弥香、矢守隆夫、供田洋：ピクニジオンによるトポイソメラーゼ II の阻害はブレオマイシンにより引き起こされる G2 期修復機構を解除する、第 32 回日本分子生物学会年会 (2009) (横浜)
  4. 大多和正樹、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義弘、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、第 28 回メディスナルケミストリーシンポジウム (2009) (東京)
  5. T. Ohshiro, D. Matsuda, K. Sakai, C. Degirolamo, H. Yagyu, L.L. Rudel, S. Omura, S. Ishibahi, H. Tomoda: Pyripyropene A, a selective inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2, attenuate hypercholesterolemia and atherosclerosis in atherogenic mice. 11<sup>th</sup> International Conference on the Chemistry of Antibiotics and Other Bioactive Compounds. (2009) (San Sebastian, Spain)
  6. D. Matsuda, M. Kaneko, S. Yokota, H. Tomoda: The inhibition mechanism of bleomycin-induced G2 arrest by pycnidione. The 25<sup>th</sup> Naito Conference. (2009) (Sapporo)
  7. T. Ohshiro, K. Sakai, D. Matsuda, M. Ohtawa, T. Nagamitsu, H. Yagyu, L.L. Rudel, S. Omura, S. Ishibashi, H. Tomoda: Pyripyropene A, a selective inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2, attenuates hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. 第 41 年日本動脈硬化学会総会・学術集会(2009) (下関)
  8. 大場未央、松田大介、大城太一、土井隆行、高橋孝志、大村智、供田洋：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤 beauveriolide III の作用様式の解析、第 22 回バイオサイエンスフォーラム(2009) (東京)
  9. 川本恭佑、猪腰淳嗣、高木陽一、松田大介、松濱万貴、大村智、供田洋：天然由来 DGAT 阻害剤のアイソザイム選択性に関する研究、日本薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)
  10. 金子真弓、松田大介、大多和正樹、内田龍児、長光亨、針谷義弘、大村智、供田洋：DNA 傷害性シグナル伝達を阻害する pycnidione の作用機構に関する研究、日本

薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)

11. 山崎寛之、小林翔、松田大介、野中健一、増間碌朗、大村智、供田洋：真菌 FKI-3765-1 株が生産する新規マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害物質の研究、日本薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)
12. 大場未央、松田大介、大城太一、土井隆行、高橋孝志、大村智、供田洋：真菌由来 beauverolide III の ACAT1 選択的阻害活性に関する研究、日本薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)
13. 大多和正樹、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義弘、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、日本薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)
14. 坂井謙斗、大城太一、松田大介、野牛宏晃、Lawrence Rudel、大村智、石橋俊、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤ピリピロペン A の抗動脈硬化作用、日本薬学会第 129 年回年会(2009) (京都)
15. 松田大介、大城太一、土井隆行、大場未央、高橋孝志、大村智、供田洋：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤 beauverolide の標的分子の解析、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008) (神戸)
16. 金子真弓、松田大介、内田龍児、大村智、供田洋：G2 期修復機構阻害物質 pycnidione 作用機序の解析、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008) (神戸)
17. 細田信之介、松田大介、供田洋、橋本祐一：ステロイド代替骨格であるジフェニルペンタン誘導体の創製：核内受容体リガンドと HMG-CoA 還元酵素阻害剤、第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2008) (大阪)
18. 大多和正樹、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義宏、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2008) (大阪)
19. 松田大介、小林翔、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害活性を示すツルリンドウ由来成分の作用機序の解析、第 21 回バイオサイエンスフォーラム (2008) (相模原)

20. R. Uchida, S. Ohte, D. Matsuda, K. Nonaka, R. Masuma, S. Omura and H. Tomoda: Dinapinones, novel inhibitors of triacylglycerol synthesis in CHO-K1 cells produced by *Penicillium pinophilum* FKI-3864. SIM Annual Meeting and Exhibition (2998) (San Diego, USA)
21. 川本恭佑、猪腰淳嗣、高木陽一、大手聡、松田大介、松濱万貴、供田洋：天然由来 DGAT 阻害剤のアイソザイム選択性、第 21 回バイオサイエンスフォーラム (2008) (相模原)
22. 松田大介、小林翔、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋：キサントン誘導体による脂肪滴蓄積阻害活性は acetyl-CoA carboxylase の阻害によるのだろうか？、第 50 回日本薬脂質生化学会 (2008) (徳島)
23. 猪腰淳嗣、高木陽一、大手聡、松田大介、川本恭佑、松濱万貴、供田洋：天然由来 DGAT 阻害剤のアイソザイム選択性、第 50 回日本薬脂質生化学会 (2008) (徳島)
24. D. Matsuda, S. Ohte, T. Ohshiro, W. Jiang, L. L. Rudel, B. Hong, S. Si and H. Tomoda: Suppression of lipid droplet accumulation in mouse peritoneal macrophages by piperine. The 4<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules (Kinugawa, Tochigi, Japan) (2008)
25. S. Ohte, R. Uchida, D. Matsuda, K. Nonaka, R. Masuma, S. Omura and H. Tomoda: Dinapinones, novel inhibitor of triacylglycerol synthesis in CHO-K1 cells produced by *Penicillium pinophilum* FKI-3864. The 4<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules (Kinugawa, Tochigi, Japan) (2008)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松田 大介 (Matsuda Daisuke)  
北里大学・薬学部・助教  
研究者番号：20458764

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし