

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710260

研究課題名(和文)ファトスタチンを基盤とした脂質生合成を制御する合成小分子の創出

研究課題名(英文)Development of synthetic small molecules that control the lipid biosynthesis

研究代表者

渡邊 瑞貴 (Watanabe, Mizuki)

京都大学・化学研究所・助教

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、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で見出された脂質の生合成経路を阻害する合成小分子ファトスタチンをもとに、各種ファトスタチン誘導体を設計・合成した。これら合成した誘導体について、脂質生合成に重要なタンパク質の働きをどの程度抑制するかを、細胞を用いたアッセイにて評価した。その結果、これまでのものよりも強力に脂質の生合成経路の活性化を阻害する合成小分子を得ることができた。さらに、その小分子の細胞内での機能を詳細に検討しているところである。

研究成果の概要(英文)：Various small molecules based on the structure of "fatostatin", which was a synthetic molecule identified by our research group that inhibits a lipid biosynthetic pathway, were designed and synthesized. The inhibitory effects of these synthesized molecules on the important protein for the lipid biosynthesis were evaluated by the cell-based reporter assay. As a result, a new small molecule that shows more potent inhibitory effects on the lipid biosynthesis pathway than previous ones was obtained. Now, its detail function in cells are investigated.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：構造活性相関 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

現代人を悩ます生活習慣病の一つ、脂質異常症は肥満など多くの疾病の起因となる。したがって、脂質代謝調節機構の制御と機能解析は、多数の疾病の予防・治療に不可欠な課題である。

脂質代謝を調節する転写因子 SREBP (sterol regulatory element-binding protein) による脂質生合成制御の詳細な機構が明らかにされてきた (Brown, M. S. et al. *Cell* 1997 他)。小胞体に存在する SREBP は、脂質レベルが低下すると小胞体からゴルジ体に輸送され、活性化される。活性化された SREBP は核に移行し、転写因子として脂質合成に関する遺伝子を発現する。

SREBP の活性化は内因性物質であるステロールによって厳密に制御されている。ステロールは SREBP のキャリアータンパク質 SCAP (SREBP cleavage-activating protein) に直接作用し、SREBP の小胞体からゴルジ体への輸送を阻害する (Brown, M. S. et al. *J. Biol. Chem.* 2011 他)。脂質生合成は種々の複雑な制御を受けることが知られており (Sato, R. et al. *J. Biol. Chem.* 2008 他)、ステロール以外の内因性物質による SREBP 活性化の調節機構の存在が予想される。しかし、その詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

当研究室は、化合物ライブラリーからヒト細胞内で脂質合成を抑制する合成小分子ファトスタチンを発見した (Choi, Y. et al. *J. Biol. Chem.* 2003)。ファトスタチンは SREBP の活性化を選択的に阻害して脂質生合成を抑制する、初めての非ステロール合成小分子である (Kamisuki, S. et al. *Chem. Biol.* 2009)。さらに我々は、ファトスタチンの SREBP 阻害活性を向上した誘導体 FGH10019 も報告した (Kamisuki, S. et al. *J. Med. Chem.* 2011)。我々はこの一連の研究の中で、ファトスタチンはステロールと同じ SCAP を直接の生体内標的とするが、ステロールとは異なる部位に作用することを示した。この結果は、ファトスタチン様に作用する、ステロール以外の内因性物質の存在の可能性を示唆する。

そこで私は、SREBP 活性化に関わる新規内因性物質の探索を目的に、新たに 280 種の脂質誘導体をスクリーニングした。その結果、SREBP の活性化を阻害する複数の脂質誘導体を得た。そのうち 2 種は内因性物質である。これら脂質誘導体と SREBP の関係はこれまで報告されていない。この 2 種の内因性脂質誘導体は SREBP 活性化を制御する新たな内因性物質の可能性のある。

また、上記スクリーニングで得た脂質誘導体には共通する化学構造があった。この知見をもとに私は、ファトスタチンのさらなる合成展開を考えた。これまでに得ているファトスタチン類の SREBP 阻害活性は、内因性阻害物質のステロールと同等かそれ以下で、未だ

十分なものではなかった。溶解度などの物性も悪く、現状では、これ以上の応用研究は厳しい。しかし、その応用を目指した十分な合成展開は未だ行われておらず、今後の研究展開次第では脂質異常症の治療薬開発に繋がると期待される。ファトスタチンは、その分子量がステロールと比べて小さく、リードライクな化合物とみなせるためだ。今回のスクリーニングで得られた化学構造情報に、今後の合成展開のヒントがある。

以上をふまえ本研究では、次の二つを目的に設定した。

(1) 上記スクリーニングで得られた 2 種の内因性脂質誘導体の SREBP に対する機能解析を行い、脂質合成に関わる新たな生体内 SREBP 活性化調節機構を明らかにする。

(2) 上記スクリーニングで得られた複数の脂質誘導体に共通する化学構造をヒントに、ファトスタチン誘導体の合成展開を行い、SREBP の活性化を強力に阻害する合成小分子を創出する。

目的 (1) において、ファトスタチン類がこれら脂質誘導体を模倣しているかどうかも追究する。目的 (2) において得られた SREBP 活性化阻害化合物は、目的 (1) の解析研究への応用を検討する。目的 (1) および (2) で得られた知見を相互に活かし、本研究を効果的に進めることで、脂質生合成を強力に抑制する合成小分子を創出する。

## 3. 研究の方法

(1) 内因性 SREBP 阻害脂質誘導体の機能解析

先のスクリーニング実験で得られた SREBP 活性化阻害能を持つ内因性脂質誘導体の詳細な機能を、分子生物学実験の手法を用いて解析した。例えば、ウェスタンブロッティングで SREBP や SCAP などのタンパク質の量的変化などを解析した。ファトスタチン類がこれらを模倣しているのかも追究した。

(2) ファトスタチン誘導体の合成展開

ファトスタチンの十分な合成展開は未だ行われていない。そこで、先の実験で得られた SREBP 活性化阻害作用のある脂質誘導体に共通する化学構造をふまえ、ファトスタチン骨格をベースにした誘導体を分子設計した。また、ファトスタチンの芳香環の不飽和環への変換や環構造の融合も計画した。不飽和環の導入により化合物の平面性を減らし、溶解度の向上を見込んだ。代謝安定性も考慮し、ノルマルプロピル鎖の変換も検討した。これら設計した誘導体を、有機化学合成の手法を用いて合成を試みた。

(3) SREBP 活性化阻害能の評価 (*in vitro*)

合成した各種誘導体の SREBP 活性化阻害能を、CHOK1 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより評価し、構造活性相関を検討した。

(4) 基本骨格の変換

ファトスタチンとは基本骨格の異なる、フ

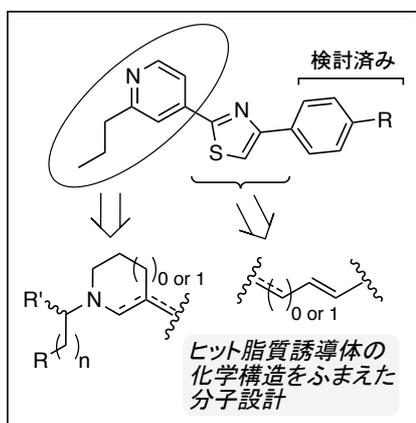
ファトスタチン様の活性を持つ合成小分子を新たに見出す。中国の Wang 教授のご協力を得て、Chinese Academy of Science の 80 万化合物から成るライブラリーを利用し、ファトスタチンおよび先の脂質誘導体それぞれについて、Tanimoto 係数を用いた化合物類似尺度を基にした構造類似性検索を行った。ファトスタチンと基本骨格を異としつつ、ファトスタチン様の作用を有することを期待して、80~95%の類似性を有した化合物を選び、それら化合物の SREBP 阻害活性を実際に評価（スクリーニング）した。SREBP の活性化を阻害するリードライクな化合物を新たに見出したら、得られた化合物の合成展開も行い、構造活性相関を検討する。

#### 4. 研究成果

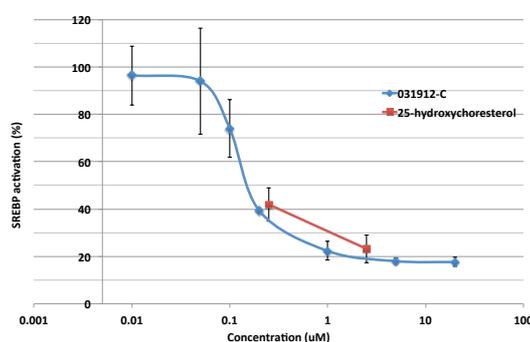
(1) 先のスクリーニング実験で得られた SREBP 活性化阻害能を持つ内因性脂質誘導体の詳細な機能を、分子生物学的な実験手法により解析した結果、その SREBP 活性化阻害のメカニズムが、既知の内因性 SREBP 活性化阻害物質であるステロール類とは異なることがわかった。具体的には、ステロール類で細胞を処理すると活性型 SREBP は消失し、前駆体 SREBP は蓄積する。一方、新たに得られた内因性 SREBP 活性化阻害脂質誘導体は、活性型と前駆体の両方の SREBP 量を減少させる。また、この新しい内因性 SREBP 活性化阻害脂質誘導体には、特有の細胞内受容体の存在が知られているのだが、この脂質誘導体による SREBP 活性化阻害は、その受容体を介さずに現れている機能であることがわかった。現在は、さらに詳細なメカニズムを解析しているところである。

(2) 有機合成化学の手法を用いて、新たなファトスタチン誘導体を合成した。ファトスタチンおよび FGH10019 を構成する芳香環のうちの一つ、2-アルキルピリジン環を不飽和環へと変換し、分子全体の平面性を減らすことで溶解度を向上させた。(下図)

また、チオイミダゾール部を異なる構造に変換した誘導体の合成も試みている。



(3) 合成した各種ファトスタチン誘導体の SREBP 活性化阻害能を評価した結果、ファトスタチンや FGH10019 よりも低濃度で SREBP の活性化を阻害する誘導体を得ることができた。その IC<sub>50</sub> 値は、内因性の阻害物質である 25-ヒドロキシコレステロールよりも小さかった。(下図) 今回得られた誘導体で処理した細胞の SREBP および SREBP 標的遺伝子の mRNA 発現量変化を測定し、SREBP 関連遺伝子群の発現が有意に抑制されていた。ウエスタンブロット法を用いて活性型 SREBP および前駆体型 SREBP のタンパク量を測定し、FGH10019 誘導体処理によって活性型 SREBP の量が減少し、前駆体型 SREBP の量が蓄積することを確認した。これらの結果は、今回新たに合成した誘導体が、FGH10019 と同様に、活性型 SREBP の生成を抑制することを示す。



(4) FGH10019 の構造を基にした、約 300 化合物から成るフォーカスライブラリーを構築・入手し、新たに SREBP 活性化阻害能についてスクリーニングを行った。その結果、FGH10019 のバックアップ化合物となりうる基本骨格を有したヒット化合物を得た。得られたヒット化合物から誘導体合成展開を行い、FGH10019 に匹敵する新たな SREBP 活性化抑制化合物を見出した。現在、さらなる合成展開を実施中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

① Makoto Tanabe, Mizuki Watanabe, Naoyuki Hoshiya, Akira Mizuno, Hayato Fukuda, Mitsuhiro Arisawa and Satoshi Shuto

“Preparation of chiral bromomethylene-cyclopropane and its use in Suzuki-Miyaura coupling: Synthesis of the arylmethyl-(Z)-cyclopropane structure core”

*The Journal of Organic Chemistry*, 2013, vol. 78, 11714-11720. 査読有り

DOI: 10.1021/jo401675z

② Mizuki Watanabe and Motonari Uesugi  
“Small-molecule inhibitors of SREBP activation - potential for new treatment of metabolic disorders”

*Med Chem Commun*, 2013, vol. 4, 1422-1433.

査読有り

DOI: 10.1039/C3MD00177F

③ Akira Mizuno, Shiho Miura, Mizuki Watanabe, Yoshihiko Ito, Shizuo Yamada, Takenao Odagami, Yuji Kogami, Mitsuhiro Arisawa, and Satoshi Shuto

“Three-dimensional structural diversity-oriented peptidomimetics based on the cyclopropylic strain”

*Organic Letters*, 2013, vol.15, 1686-1689.

査読有り

DOI: 10.1021/o1400469w

④ 渡邊瑞貴

トピックス “不活性な第一級 C-H 結合 1 つを選択的に C-OH 結合へ変える” *ファルマシア*, 2013, vol.49, 154. 査読無し

⑤ 渡邊瑞貴

注目の論文 “被曝による急性死が薬で防げる！？” *化学*, 2012, vol.67, 60-61. 査読無し

[学会発表] (計4件)

① 水野彰、渡邊瑞貴、亀田倫史、山田静雄、東田陽 博、有澤光弘、周東智

“ペプチドの多様な立体配座を模倣する配座制御型ペプチドミメティクスの創製” 日本薬学会第133年会、2013/3/27-30、横浜パシフィコ横浜

② 領田優太、渡邊瑞貴、Bilon KHAMB、白川貴詩、佐藤慎一、川添嘉徳、酒井寿郎、上杉志成

“転写因子 SREBP の活性化を阻害する内因性化合物” 日本薬学会第133年会、2013/3/27-30、横浜 パシフィコ横浜

③ 五十嵐政智、山内祥生、渡邊瑞貴、上杉志成、古川鋼一

“Crucial role of the SREBP pathway in the proliferation of human melanoma cells” 第85回日本生化学会大会、2012/12/14-16、福岡 マリンメッセ福岡

④ Mizuki Watanabe, Shinji Kamizuki, Yuta Ryoden, Motonari Uesugi

“Development of small molecules that control lipid biosynthesis” CLS-iCeMS Joint Symposium, 2012/4/20-22, 中国・北京 北京大学

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

① 名称 : Prodrugs of fluorinated mevalonates to inhibit the mevalonate

pathway of streptococcus pneumoniae

発明者 : Richard B. Silverman, Mizuki Watanabe, Soosong Kang

権利者 : Northwestern University

種類 : 特許

番号 : WO 2013130792 A2 20130906

取得年月日 : 2013/9/19

国内外の別 : 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 瑞貴 (WATANABE, Mizuki)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号 : 20507173