

論文の内容の要旨

ラノステロール合成酵素阻害活性を持つ 菌類代謝産物の探索研究

坂野 勇一

【序】

高脂血症は、動脈硬化性疾患に至らしめる危険因子であり、生活習慣病の一つとして認識されている。その治療には HMG-CoA 還元酵素阻害剤によるコレステロール生合成の抑制が広くとられている。しかし、同酵素はコレステロール生合成経路の上流に位置しているため、その阻害によって、生合成的に前駆体を共有するドリコール、ユビキノン、プレニル化蛋白質等の生理的に必須なイソプレノイド類の生合成も同時に抑制してしまうことから、長期投与による副作用が危惧されている。そこで、コレステロール生合成により選択的な標的酵素として、スクアレン合成酵素、スクアレンエポキシダーゼ、ラノステロール合成酵素に対する阻害剤の開発が待望されている。本研究では、標的酵素としてステロイド骨格形成直前に位置するラノステロール合成酵素に着目した (Fig. 1)。尚、同酵素に対する阻害剤は天然物としては報告されておらず、新たなタイプの高脂血

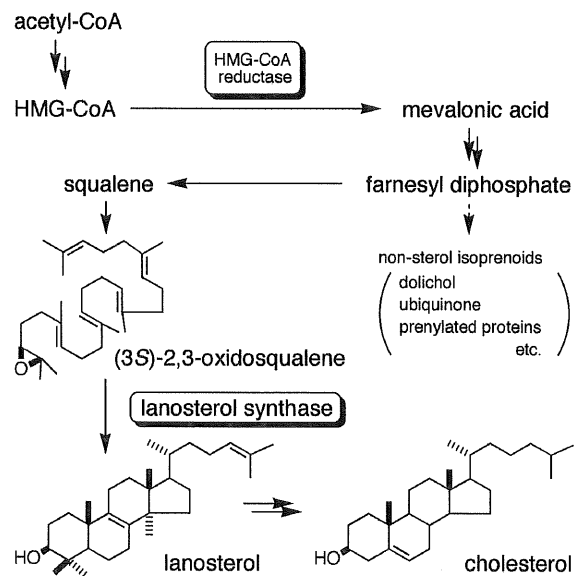


Fig. 1 Biosynthetic pathway of cholesterol

症治療薬の開発を視野に据え、菌類を対象に同阻害物質のスクリーニング、単離・構造解析を行った。

【実験及び結果】

(1) ヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性の一次スクリーニング

当研究室でクローニングされたヒト由来ラノステロール合成酵素 cDNA をラノステロール合成酵素欠損酵母 GIL77 株で発現させた。その無細胞抽出液と [¹⁴C] オキシドスクアレンを、0.1 M カリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で反応させたところ、ラノステロール変換活性が検出された。またその活性は既知の阻害剤 lauryldimethylamine N-oxide (LDAO) によって阻害され、IC₅₀ は 0.84 μM であった。

上記 *in vitro* アッセイ系により、放線菌 1,031 株、糸状菌 280 株 (合計 1,311 株) の培養液のエタノール抽出物につき、同酵素阻害活性の一次スクリーニングを行ったところ、放線菌 4 株、糸状菌 1 株に強い阻害活性が検出された。それらの株由来のものにつき、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画、活性測定したところ、放線菌 K98-5285, K99-5041 株、糸状菌 FKI-0929 株由来のものにおいて、順相及び逆相 TLC 上の単スポットに阻害活性が濃縮されることが判明した。これら 3 株を候補株として、以下、活性物質の単離・構造解析を進めた。

(2) 放線菌由来新規ラノステロール合成酵素阻害活性物質

まず、放線菌 K98-5285 株を 20 L スケールで 27°C、6 日間攪拌培養し、その全培養液を酢酸エチルで抽出することにより粗抽出物を 11.2 g 得た。その一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、CHCl₃ / MeOH (19 / 1) で展開した順相 TLC 上 R_f ~ 0.4 の単スポットを含有する活性フラクション I を得た。

上記フラクション I を LC-APCIMS 分析 (TSKgel ODS-80T_M) したところ、10 本のピークが検出され (Fig. 2)、それらはいずれも UV 235 nm に吸収極大を示した。また、それらのマススペクトルから、分子量は、保持時間の短い方から順に 317、317、331、331、345、345、359、359、373、373 と考えられ、14 マスユニットの差があることが判明し、フラクション I には 2 種の異性体からなる同族体が 5 組存在しているものと推定し、保持時間の短い方のピークから順に A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1、E2 と命名した (Fig. 2)。

上記フラクション I につき、RP-(HP)LC (Lobar column → TSKgel ODS-80T_M) による精製を丹念に繰り返し、ピーク B1、C1、C2、D1 を分離した。それらの IC₅₀ はそれぞれ 1.6, 3.1, 8.5, 5.8 μg/mL と、ほぼ同等であった。それらの NMR を測定したところ、δ_H 5.35, 2.01 ppm、δ_C 129.9, 27.2 ppm に積分値が小数で表されるシグナルが観測され、この段階ではまだ混合物と考えられた。

そこで、活性フラクション I の LC-APCIMS のデータをより詳細に解析した。上記 10 本のピーク (A1 ~ E2) のマススペクトルにおいて分子イオンの他に 26 マスユニット分

だけ小さいシグナルが観測された。更に、ピーク C1, C2 のマスペクトルにおいて観測されたイオンピーク m/z 320 及び 346 におけるマスキロマトグラムを注意深く観察すると、各々のピーク頂点が保持時間として 0.1 分程度ずれていることが認められ (Fig. 2)、他のピークにおいても同様のマスキロマトグラムの時間差が観測された。この事実は、上記 10 本のピーク (A1 ~ E2) はそれぞれ、単一成分から成るのではなく、分子量が 26 マスユニット異なる 2 種の化合物から成っていることを示しており、同フラクションは 20 種の同族体を含んでいることになる。以下、ピーク C1, C2 に含まれる、分子量 319 に相当する化合物を C1x, C2x、分子量 345 に相当する化合物を C1y, C2y と命名した (Fig. 2)。

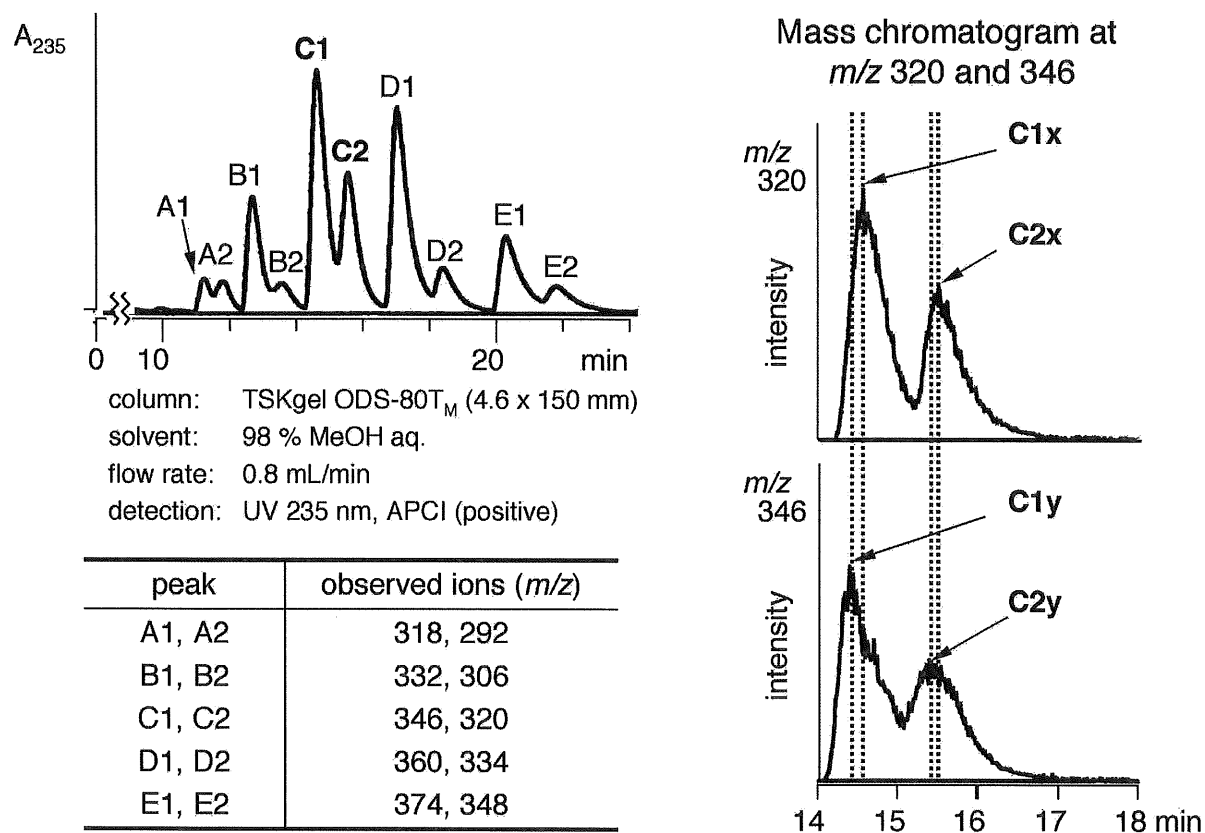


Fig. 2 LC-APCIMS analysis of Fr. I from an Actinomycete strain K98-5285

一方、放線菌 K99-5041 株を 20 L スケールで 27°C、6 日間攪拌培養し、その全培養液を酢酸エチルで抽出することにより粗抽出物を 15.7 g 得た。そのうちの 5.5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、 CHCl_3 / MeOH (19 / 1) で展開した順相 TLC 上 $R_f \sim 0.4$ の単一スポットを含有する活性フラクションを得た。同フラクションを LC-APCIMS 分析したところ、驚いたことにさきに述べた K98-5285 株由来のフラクション I とほぼ同一のパターンが観測された。同フラクション (以下、フラクション I' と称する) より同様にピーク C1, C2 を分離精製し、同様に NMR を測定したところ、上記の

積分値が小数で表されるシグナルが観測され、その強度はフラクション I 由来のものよりも弱かった。これらのことから、化合物の分離精製にはフラクション I' のほうがより適していると判断した。HPLC のカラムを TSKgel ODS-120T に替えることにより精製し、フラクション I' 由来のロット C1 より C1x, C1y を 3.5 mg, 0.6 mg、同ロット C2 より C2x, C2y を 2.3 mg, 0.5 mg それぞれ単離した。それらの IC₅₀ はそれぞれ 15, 33, 18, 41 μM と、ほぼ同等であった。

単離した化合物のそれぞれにつき、各種スペクトルデータに基づき構造解析を行った。その結果、化合物 C1x, C2x はいずれも (3E)-methylidene-2-methyl-1-pyrroline を基本骨格とする新規化合物で、それぞれ (3E)-isohexadecylmethylidene-2-methyl-1-pyrroline、(3E)-hexadecylmethylidene-2-methyl-1-pyrroline であると決定した。また、化合物 C1y, C2y は、それぞれ化合物 C1x, C2x の側鎖の途中に二重結合が 1 個 (C₂H₂ = 26 マスユニット) 挿入された化合物で、その幾何的配置は、隣接メチレンの δ_c の値 (27.2 ppm) から、cis と決定し、更にその位置は、EIMS のフラグメンテーションパターンを解析することにより、11', 12' 位の間であると推定された (Fig. 3)。

また、フラクション I 及び I' に含まれる残り 16 種の同族体の化学構造については、NMR, LC-APCIMS での検討結果から、それら C 系列の化合物に対して側鎖の炭素数が異なるものと推定している。

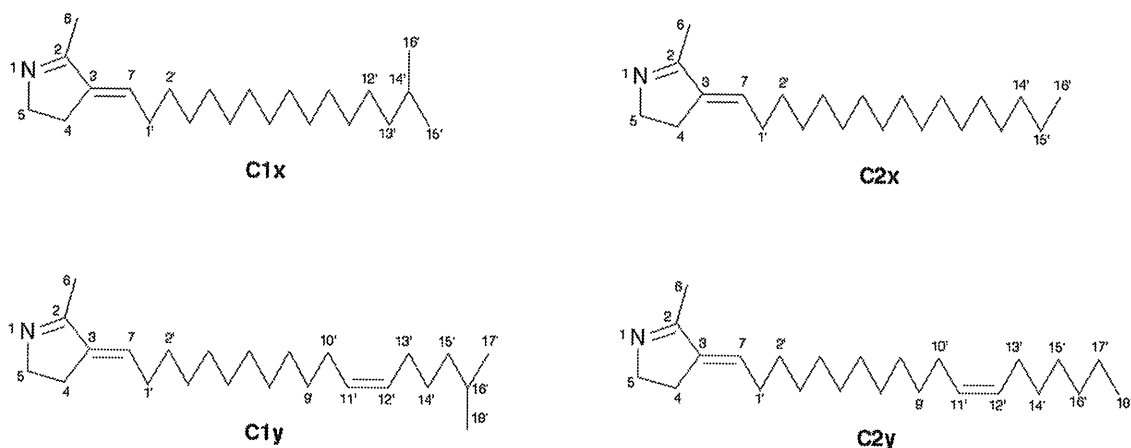


Fig. 3 Isolated compounds from an Actinomycete strain K99-5041

(3) 糸状菌由来新規ラノステロール合成酵素阻害活性物質

糸状菌 FKI-0929 株を 3.24 L スケールで 27°C、14 日間静置培養し、その全培養塊を 50 % エタノール、続いてクロロホルムで抽出することにより粗抽出物を 8.9 g 得た。そのうちの 4.0 g を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、CHCl₃ / MeOH / AcOH (60 / 10 / 1) で展開した順相 TLC 上 R_f ~ 0.3 の単一スポットを含有する活性フラクション II を得た。

上記フラクション II を LC-APCIMS 分析したところ、ピークが 2 本検出され、それらのマススペクトルから、分子量はいずれも 293 であった。それらの化合物 (以下、保

持時間の短い方から II-1, II-2 と称する) を、RP-(HP)LC によりそれぞれ 1.5, 2.9 mg 単離した。それらの IC₅₀ はそれぞれ 10, 6.0 μM とほぼ同等であった。

それらの化合物につき、各種スペクトルデータに基づき構造解析を行った。その結果、いずれも α, β-不飽和ケトンをもつ直鎖状の側鎖がヘテロ環状骨格に結合した、不斉点を 3 箇所 (2, 4, 5 位) 有する新規同一平面構造 4,5-epoxy-2-(4'-oxoundec-(5'E)-enyl)-heptamethylenamine (以下、EHMA-1, EHMA-2 と称する) を与えることが判明した。両化合物の環状骨格部分における NMR スペクトルが互いに異なっていることから、両化合物はジアステレオマーの関係にあるものと考えられた。それぞれにつき結合定数及び NOE を解析したところ、化合物 II-1 (EHMA-1) については (2R, 4R, 5R) あるいは (2S, 4S, 5S)、化合物 II-2 (EHMA-2) については (2R, 4S, 5R) あるいは (2S, 4R, 5S) の絶対配置であると推定した。

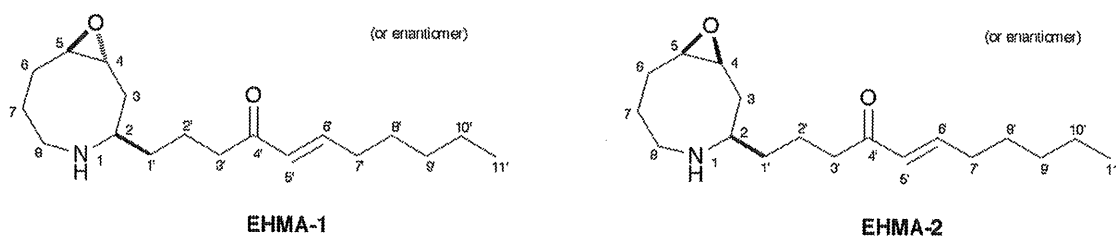


Fig. 4 Isolated compounds from a fungal strain FKI-0929

【まとめ】

はじめに、ヒト由来ラノステロール合成酵素をラノステロール合成酵素欠損酵母 GIL77 株で発現させ、その無細胞抽出液と [¹⁴C] オキシドスクアレンを用いた *in vitro* アッセイ系を確立し、放線菌及び糸状菌を対象に阻害活性のスクリーニングを行った。

そして、得られた活性株のうち、放線菌 K99-5041 株よりラノステロール合成酵素阻害物質として、(3E)-methylidene-2-methyl-1-pyrroline 骨格をもつ 4 種の新規化合物 C1x, C2x, C1y, C2y を単離・構造解析し、それらの同族体の化学構造を推定した。また、糸状菌 FKI-0929 株より同阻害物質として、4,5-epoxyheptamethylenamine 骨格をもつ互いにジアステレオマーの関係にある 2 種の新規化合物 EHMA-1, EHMA-2 を単離・構造解析した。それらの化合物は、ラノステロール合成酵素阻害活性を持つ天然物として初めての例である。

また、細胞レベルでのコレステロール生合成阻害活性は、化合物個々については未検討であるが、放線菌 K99-5041 株由来の活性フラクション I' につき、Chang 肝細胞において用量依存的な阻害が確認され、ED₅₀ は 51 μg/mL であった。

今回、単離・構造解析した天然由来の化合物には、薬剤開発のためのリード化合物としてのみならず、オキシドスクアレン閉環酵素の反応機構研究用のプローブとしての応用も期待される。