

氏 名 やん しんめい 楊 新美

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 203 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 Structural basis for olivetolic acid formation by a polyketide
cyclase from Cannabis sativa
(アサ由来ポリケタイド閉環酵素のオリベトール酸形成に関する立
体構造基盤の確立)

論文審査委員

(主査)	教授	水口 峰之
(副査)	教授	矢倉 隆之
(副査)	教授	森田 洋行 (指導教員)

論文内容の要旨

肥満は脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義され、主に過剰なエネルギー摂取とエネルギー消費の低下により起こる。肥満人口は世界的に見ても年々増加していることに加えて、肥満は2型糖尿病、脂質異常、高血圧、心血管病等の危険因子であることが知られており、肥満の治療はこれらの合併症を予防、治療する上で重要である。肥満においては、脂肪組織のみならず他の組織においても過剰な triglyceride (TG) の蓄積が起こり、組織障害を惹起する。例えば、骨格筋や肝臓における過剰な TG の蓄積はインスリン抵抗性や非アルコール性肝炎の発症に関与し、心臓における蓄積は心筋症の発症にも関連する。従って、肥満による生活習慣病や心血管病の予防の観点から、脂肪組織のみならず異所性脂肪を減少させることは重要である。

TG 合成においては、グリセロールリン酸経路並びにモノアシルグリセロール経路の2つが主要な経路である。両経路ともに acyl-CoA から acyl 基を diacylglycerol に転移することにより TG 合成が行われる。この最終反応を触媒する酵素が acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) である。DGAT には DGAT1 及び DGAT2 の2つのアイソタイプが同定されており、いずれも様々な組織に発現することが知られている。DGAT1 は特に小腸及び脂肪組織における発現が高く、DGAT2 は肝臓及び脂肪組織における発現が高い。ヒトにおける DGAT1 の欠損例は確認されていないが、DGAT1 遺伝子の配列多型がいくつか知られている。トルコ人女性において認められた C79T 変異では、BMI、拡張期血圧、HDL cholesterol レベルとの関連性が示された。脂肪組織特異的な DGAT1 強発現マウスでは、高脂肪食負荷により顕著な体重の増加を呈した。逆に、DGAT1 欠損マウスは正常に成育し、TG 合成能にも異常は認められないが、高脂肪食負荷による体重増加について、通常食給餌下のマウスの体重と同程度まで低下が見られた。一方、DGAT2 についても若年肥満者においていくつかの遺伝子変異が報告されている。しかしながら、これらの変異と肥満の表現型について関連性は認められていない。これらの DGAT1 に関する知見より、肥満の治療として DGAT1 の活性阻害を標的とする新規肥満・2型糖尿病の開発が期待される。

1. JTT-553 の作用機序解析¹⁾

肥満の治療開発を目指し、DGAT1 阻害活性を有する低分子化合物探索を行った。その結果、新規 DGAT1 阻害剤として JTT-553 ([*trans*-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl]acetic acid monobenzenesulfonate) を創出した。そこで、JTT-553 の *in vitro* 薬理プロファイルの解析を目的として、ヒト DGAT1 活性に対する阻害作用、種差の評価としてヒト、ラット及びマウ

ス由来の小腸ミクロソームを用いた DGAT 活性に対する阻害作用を評価した。また、DGAT1 のアイソザイムである DGAT2 及び DGAT1 と高い相同性を示す ACAT1 に対する JTT-553 の作用を酵素選択性の評価として実施した。その結果、JTT-553 はヒト DGAT1 に対して強力且つ選択的な阻害作用を示した。また JTT-553 の DGAT1 阻害作用はヒト・ラット・マウス間で同等であった。

DGAT1 は特に小腸及び脂肪組織において高発現することから、生体において DGAT1 は食餌由来の TG 吸収及び脂肪組織における TG 蓄積に関与すると考えられた。加えて小腸における TG 代謝について着目すると、食餌由来の TG はリパーゼによって消化管管腔内で脂肪酸とモノアシルグリセロールに分解される。これらの基質は小腸細胞内でカイロミクロン TG に再構成されることで血中へと分泌される。消化管管腔内におけるこれらの TG 合成の基質は生理活性を有し、摂食抑制作用を示すことが知られている。小腸における DGAT1 阻害が消化管管腔内の脂肪酸及びグリセロールレベルを増加させると推察され、さらには摂食を調節する可能性が考えられた。JTT-553 の小腸における TG 吸収抑制作用の評価を目的としてラットを用いたオイル負荷試験を実施した。JTT-553 はオイル負荷後の血漿中 TG 及びカイロミクロン TG を用量増加に応じて抑制した。脂肪組織における TG 合成抑制作用については、[1-¹⁴C] oleic acid を腹腔内投与したマウスの副睾丸上脂肪組織中 TG 合成に対する作用を評価した。JTT-553 はマウス副睾丸上脂肪組織中 TG 合成を用量増加に応じて抑制した。摂食抑制作用の評価については、TG 吸収抑制に基づくことが考えられたため、高脂肪食給餌下ラットの摂食量に対する JTT-553 の用量依存的な作用の評価及び 3.1%、13%、35% (w/w) fat diet の3つの飼料を用いた飼料中脂肪含量依存性評価の2つの試験を実施した。その結果、JTT-553 は用量増加且つ飼料中脂肪含量に応じた摂食抑制作用を示した。小腸における TG 吸収抑制作用、脂肪組織における TG 合成抑制作用、摂食抑制作用の3つの作用により、JTT-553 は肥満動物の体重を低下させることが期待されたため、diet-induced obese (DIO) モデルラットに対する JTT-553 の反復投与試験を行った。JTT-553 の反復投与により DIO ラットの摂食量の低下、体重の低下が認められた。さらには摂餌量当たりの体重増加量 (摂餌効率) の低下も認められた。

2. JTT-553 の抗肥満・抗糖尿病作用²⁾

1章での検討により、JTT-553 は小腸における TG 吸収抑制作用、脂肪組織における TG 合成抑制作用、飼料中脂肪含量依存的な摂食抑制作用を有し、これらの作用機序により JTT-553 は DIO ラットモデルにおいて抗肥満作用を示すことが明らかとなった。そこで、JTT-553 の抗肥満作用が実際に糖代謝を改善しうるかについて明らかにするため、肥満・2型糖尿病モデルにおける抗糖尿病作用の評価を行った。2型糖尿病の発症においては、環境因子と遺伝因子の2つが影響することから、評価に際しては食餌性の DIO マウスと遺伝性の KK-Ay マウスの2つの肥満・2型糖尿病モデルを用いて行った。

JTT-553 の反復投与により DIO マウスの体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められ、糖負荷試験における耐糖能・インスリン抵抗性の改善が認められた。また、DIO マウス由来の摘出脂肪組織において JTT-553 の反復投与によりインスリン依存的な糖取り込み能の改善が認められた。さらに、遺伝

性の 2 型糖尿病モデルである KK-Ay マウスにおいては, JTT-553 の反復投与により体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められ, 非絶食・絶食下いずれにおいても血糖値の低下が認められた。脂肪組織においてはインスリン抵抗性の惹起に關与する TNF- α mRNA の低下及びインスリン依存的な糖取り込みを担う GLUT4 mRNA の増加が認められた。

3. 総括

DGAT1 は主に小腸及び脂肪組織に発現し, TG 合成の最終反応を触媒する酵素である。食事由来の TG は消化管管腔内でリパーゼにより脂肪酸及びモノアシルグリセロールに分解された後, 小腸細胞内で DGAT1 を介してカイロミクロン TG へ再構築される。体内へ吸収された TG は肝臓において貯蔵され, 他にも TG や脂肪酸として血液中にも存在し, 全身を循環する。脂肪組織においては循環血液より余剰な脂肪酸が取り込まれ, DGAT1 を介して TG として貯蔵される。JTT-553 は小腸及び脂肪組織における DGAT1 を強力且つ選択的に阻害し, 小腸における TG 吸収を抑制し, 脂肪組織においては TG 蓄積を抑制する作用を示す。また, JTT-553 は小腸における TG 吸収を抑制した結果, DGAT1 の基質となる脂肪酸及びグリセロールの消化管内濃度の増加を示すことが考えられる。おそらく DGAT1 の基質濃度の増加を介して, JTT-553 は飼料中脂肪含量依存的に摂食抑制作用を示す。これら小腸における TG 吸収抑制作用, 脂肪組織における TG 蓄積抑制作用, 脂肪摂取量依存的な摂食抑制作用を介して JTT-553 は脂肪重量を低下し, 体重低下作用を示す。さらには, JTT-553 は体重低下作用に基づいて脂肪組織及び全身のインスリン抵抗性・糖代謝に対する改善作用を示すことから, JTT-553 は肥満及び 2 型糖尿病の治療薬としての有用性が期待される。

[参考文献]

- 1) Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Akiyama Y., Ohta T., Kakutani M., Ohkuma Y., and Ogawa N.: Pharmacological characterization of [*trans*-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl]acetic acid monobenzenesulfonate (JTT-553), a novel acyl CoA: diacylglycerol transferase (DGAT) 1 inhibitor. *Biol Pharm Bull.* 38(2): 263-269 (2015)
- 2) Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Kobayashi A., Ohta T., Kakutani M., Imanaka T., and Ogawa N. JTT-553, a novel Acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 inhibitor, improves glucose metabolism in diet -induced obesity and genetic T2DM mice. *J Pharmacol Sci.* 129(1): 51-58 (2015)

学位論文審査の要旨

ポリケタイド閉環酵素は、医薬資源としても重要なポリケタイドの骨格多様性を生み出す大きな要因となっている酵素群である。最近になってアサ *Cannabis sativa* のカンナビノイドの生合成において、アサ由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素が生産する直鎖状テトラケタイド CoA を基質としてオリベトール酸への変換を触媒する新規ポリケタイド閉環酵素、オリベトール酸閉環酵素 (OAC) が報告された。OAC は、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素が生産する直鎖状ポリケタイド CoA を基質とする現状唯一のポリケタイド閉環酵素である。本酵素を活用することにより、新規ポリケタイドの創出が期待される。しかし、同時に本酵素は基質特異性が厳密であることが報告されている。そのため、本酵素を新規化合物の物質生産に利用するためには、様々な構造の基質を受け容れることができる酵素へと改変する、あるいは本酵素のように直鎖状ポリケタイド CoA を基質としながらも OAC とは異なった基質を用いる OAC 類似の閉環酵素を見だし、それを新規化合物の物質生産に利用することが必要となる。それにはまず、機能改変に有用な OAC の立体構造情報や新規類似酵素の探索する上で鍵となるアミノ酸情報が必要である。そこで申請者は、OAC の立体構造基盤の確立とそれに基づく OAC の触媒機構の解明を目指し、OAC の X 線結晶構造解析を実施した。本研究の内容の骨子と審査結果は下記に示すとおりである。

1. OAC の X 線結晶構造解析

大腸菌に異種発現させ高純度に精製した OAC の分子量を、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、及び動的光散乱法を用いて評価した。これらの解析により、OAC は約 12 kDa のサブユニットからなるホモダイマー酵素であることを明らかにした。一方、OAC のセレノメチオニン置換体の結晶を得ることにより、1.32 Å の分解能で OAC アポ型の X 線結晶構造を明らかにした。また、OAC とオリベトール酸との共結晶を得ることにより、1.70 Å の分解能で OAC にオリベトール酸が複合した X 線結晶構造を明らかにした。これらの立体構造の取得により、OAC がホモ 2 量体からなる dimeric $\alpha+\beta$ barrel 構造を有すること、及び、サブユニットそれぞれが活性中心キャビティを有することを明らかにした。さらに OAC とオリベトール酸との結合様式を詳細に解析することにより、OAC の活性中心キャビティは、基質のペンチル基を結合する疎水性ポケットと β ケト基結合部位からなることを明らかにした。さらに、His5、Tyr27、Tyr72、及び His78 が OAC の触媒残基として機能し、閉環反応を進行している可能性を見いだした。

2. X線結晶構造解析に基づく OAC への変異導入実験

結晶構造解析によって触媒残基の可能性が示唆された His5、Tyr27、Tyr72、及び His78 やペンチル基を結合する疎水性ポケット構成アミノ酸残基に変異を導入し、変異が酵素活性に及ぼす影響と作成した一部の変異酵素の結晶構造を精査することにより、Tyr72 と His78 に変異を導入すると酵素活性が消失する一方で、His5、Tyr27、及び疎水性ポケット構成アミノ酸残基への変異の導入は主として酵素活性を減少させることを明らかとした。これにより、Tyr72 と His78 は OAC の触媒残基として機能していることを示した。一方、His5、Tyr27、及び疎水性ポケット構成アミノ酸残基は基質の結合に重要な役割を担うことを示した。

3. OAC の提唱触媒機構

OAC は、直鎖状テトラケタイド CoA の閉環反応と、続くチオエステル開裂反応及び芳香環形成反応を触媒することによりオリベトール酸までの変換を触媒すると提唱されていた。一方、オリベトール酸と CoA-SH の部分構造である N-アセチルシステアミンとのチオエステルを合成し、これを OAC に作用させることにより、OAC が本化合物に対してチオエステラーゼ活性を示さないことを明らかにした。さらに、OAC と直鎖状テトラケタイド CoA 及びその環化産物である推定酵素反応中間体とのドッキングシミュレーションを実施することにより、OAC がチオエステラーゼ活性と芳香環形成活性を欠損する可能性を見いだした。これらの解析により、OAC の生成物は、直鎖状テトラケタイド CoA が閉環することによって生成するオリベトール酸の前駆体であることを提唱した。また、OAC の推定酵素反応機能を提唱した。一方、本解析によって得られた OAC の反応において鍵となるアミノ酸を考慮に加えた配列相同性検索により、機能未知として報告されていたストレス応答性蛋白質 AtHS1 や POP3 及び POP3 様蛋白質がオリベトール酸閉環酵素とは基質特異性が異なる植物ポリケタイド閉環酵素であることを提唱した。

以上のように、楊 新美氏は、OAC の X 線結晶構造解析を行うことにより、本酵素の触媒残基や基質特異性や生成物特異性を決めるために重要なアミノ酸残基等を明らかにした。さらに、これらの解析から OAC の生成物と触媒機構を提唱するとともに、機能未知として報告されていた AtHS1 や POP3 及び POP3 様蛋白質が OAC とは基質特異性が異なる植物ポリケタイド閉環酵素であることを提唱するに至った。これらの結果は、ポリケタイド閉環酵素の機能改変及び新規 OAC 類似酵素の探索に有用な科学的知見を与えたと言える。

主査及び副査は、論文内容と面接試験より、申請者 楊新美に、博士（薬科学）を授け

るに値するものと判定した。

1. Yang X, Matsui T, Mori T, Taura F, Noguchi H, Abe I, Morita H., Expression, purification and crystallization of a plant polyketide cyclase from *Cannabis sativa*., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **71**, 1470-1474 (2015).
2. Yang X, Matsui T, Kodama T, Mori T, Zhou X, Taura F, Noguchi H, Abe I, Morita H., Structural basis for olivetolic acid formation by a polyketide cyclase from *Cannabis sativa*., *FEBS J* **283**,1088-1106 (2016).