核内受容体PPAR γ のユニークな特性と新奇リガンド開発への新展開 リガンド認識機構の特質とその応用

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPAR γ) は、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である。核内でレチノイドX受容体とヘテロ二量体を形成し、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を調節する⁽¹⁾。PPAR γ へのリガンドの結合は、受容体のコンフォメーション変化を引き起こし、コファクターの解離および会合が誘導されることで、標的遺伝子の転写活性化に至る。読者の方々の中には、この分子の名前を聞くと脂肪細胞分化や糖代謝の制御因子といったキーワードを思い浮かべる方も多いのではないだろうか。実際、抗糖尿病薬であるチアゾリジン誘導体がPPAR γ のリガンドであることが明らかにされて以降、糖尿病や脂質代謝との関連について、数多くの薬理学、および遺伝学的研究がなされてきた⁽¹⁾。一方、今世紀に入り、内在性リガンドである不飽和脂肪酸、およびその代謝物の結合様式と活性化機構に関する構造生物学的研究が進み、PPAR γ はほかの受容体とは異なるユニークなリガンド認識機構を有することが明らかにされた。本稿では、関連する一連の研究を概説するとともに、その特性を新奇リガンド開発に応用した筆者らの取り組みについて紹介したい。

PPAR γ の構造は、主に、標的遺伝子上流に結合するDNA結合ドメインと、リガンドが結合するリガンド結合ドメイン (ligand-binding domain; LBD) からなる。LBDは、13個の α ヘリックス構造と、4個の β シート構造を含み、複数のサブポケットから構成されるリガンド結合ポケット (ligand-binding pocket; LBP) を有する (図1)。LBPにはさまざまな種類の化合物が結合することが知られるが、その結合部位はリガンドにより異なる。合成リガンドであるチアゾリジンは、ヘリックス12に位置するTyr473残基と水素結合を形成することで、周辺構造を安定化させるとともに、コアクチベーターの会合を誘導し、強力な転写活性を引き起こす⁽²⁾。対して、ルテオリンなどのフラボノイド類は、ヘリックス12とは相互作用せず、ヘリックス2および3の間に位置するループ構造 (Ω -ループ) に結合することが明らかにされている⁽³⁾。冒頭で触れた、内在性リガンドである不飽和脂肪酸は、これらのいずれとも異なる活性化様式を示

す。白木らは、PPAR γ の内在性リガンドとして初期に同定された15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) が、 α,β -不飽和カルボニル基によるマイケル付加反応を介して、ヘリックス3上に位置するCys285残基と共有結合を形成すること、そしてその共有結合が15d-PGJ₂によるPPAR γ 活性化に直接関与することを明らかにした⁽⁴⁾。また、森川らのグループは、X線結晶構造解析により、15d-PGJ₂による共有結合が Ω -ループ周辺のコンフォメーションをドラスティックに変化させることを明らかにし、PPAR γ の構造安定化におけるCys285残基への共有結合の役割を、構造変化を促す“スイッチ”に例えて表現している⁽⁵⁾。また、ドコサヘキサエン酸代謝物である4-oxodocosahexaenoic acid (4-oxoDHA) をはじめとする種々の不飽和脂肪酸酸化物もまた、同様の機構でCys285残基と共有結合を形成し、チアゾリジンなどの非共有結合性リガンドと比べて、PPAR γ のコンフォメーションを効率的に安定化させることが、Schwabeらのグループによる熱力学的解析により明らかにされている⁽⁶⁾。一般的に、タンパク質に共有結合する低分子化合物の多くは、受容体の機能を不活化させる阻害剤であり、リガンドによる共有結合がタンパク質の構造安定化を導くという例はあまり知られておらず、PPAR γ のリガンド認識機構のユニークさを物語っていると言える。これら一連の研究は、それまで明らかにされていなかった内在性リガンドによる活性化機構にかかわる理解を飛躍的に向上させるとともに、生体内の脂肪酸代謝物をモ

PPAR γ LBDの立体構造

LBPの模式図

図1 ■ PPAR γ LBDの立体構造、およびLBPの模式図

ニターするというPPAR γ の新たな役割が提唱されるに至っている⁷⁾。

こうした研究が行われる過程で、PPAR γ のリガンド認識にかかわるもう一つの特徴が明らかにされた。先述のとおり、PPAR γ のLBPは複数のサブポケットから構成されるY字型の構造を有するが(図1), cavity (ポケットの深さ)はサブタイプの異なるほかの受容体と比較して非常に大きい。実際、あるリガンドが結合しているPPAR γ の立体構造を眺めたとき、リガンドが結合しているにもかかわらず、まだ別のリガンドが結合しうる余地が見て取れるほどである。このことは、複数の異なる(あるいは同一の)リガンドが同時にポケットに結合することができないのではないかという可能性を想起させる。実際、森川らの研究によって、X線結晶解析により、セロトニン代謝物である5-methoxyindole-3-acetic acid (MIA)と酸化型不飽和脂肪酸である15-oxo-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid (15-oxo-ETE)が同時に結合することが示された⁸⁾。興味深いことに、これらのリガンドは、個々でも中程度から弱い活性化作用を示すが、両者を同時に加えたときに顕著に活性が増強する、すなわち“協調的に”PPAR γ を活性化する作用があることが明らかにされた。

筆者らのグループでは、このPPAR γ LBPのユニークな特性を、新規リガンドの構造設計に利用できないかと考えた。すなわち、複数のリガンドにより協調的に活性化されるのであれば、その両者を融合させた構造を設計し、単一の化合物に最適化できないか、というものである(図2)。一見、関連が見られないと思われる化合物同士の組み合わせを見だし、両者を融合させることに

より、従来とは異なる新奇な構造のリガンドを創出できるのではないか。このような発想のもと、協調的な活性化を引き起こす化合物の組み合わせのスクリーニングを行ったところ、バンウコン根茎に含まれるケイ皮酸誘導体と、不可逆的アンタゴニストとして知られているGW9662が得られた。スクリーニングの詳細は筆者らの報告を参照いただきたい⁹⁾。GW9662は、ハロゲン置換反応を介して、上述した不飽和脂肪酸と同じくCys285残基と共有結合を形成し、チアゾリジンなどのアゴニストの結合を競合的に阻害する。しかし、GW9662が結合したPPAR γ のリガンド結合ポケットの構造を精査してみると、 Ω -ループ周辺の領域、リガンドが結合するための入り口と考えられている部分に、別の小分子が結合することのできるスペースが残されていた。実際にケイ皮酸誘導体がこの部位と相互作用するような結合様式を取りうるか、ドッキングシミュレーションにより解析したところ、ヘリックス3や Ω -ループの残基と相互作用することを示唆する結果を得た。この結合様式を基に、両者の構造を融合させた構造を設計し、計7段階の工程による合成を行い、PPAR γ の転写活性を μ M以下の低濃度(EC₅₀値13nM)で中程度に活性化するリガンドを得ることに成功した。また本リガンドによるPPAR γ 活性化作用にはCys285残基への共有結合が必須であることが、非共有結合性類縁化合物、および変異体を用いた解析から明らかになった。さらに、上述した内在性脂肪酸との結合様式をドッキングにより比較したところ、合成リガンドはこれらの脂肪酸の結合様式を一部ミミックするものの、より Ω -ループ周辺に相互作用しうることが

協調的な活性化を示す
化合物の**組合せ**を同定

両者を連結させた
単一の化合物を設計、合成

GW9662

ケイ皮酸誘導体

合成された
新規共有結合性リガンド

図2 ■ LBPの特性を利用した新規リガンドの構造設計、および見いだしたリガンドの構造

示唆され、新しいタイプの共有結合性リガンドであることが示された。共有結合性リガンドは、先に紹介した内在性脂肪酸を除くと、森川らの例⁽¹⁰⁾などごく僅かしか報告されておらず、筆者らのアプローチの有用性を示している。

本稿では、リガンドによる活性化機構に焦点を当てたが、それ以外にも、白色脂肪細胞の褐色化において、PR domain containing 16 (PRDM16) の安定化に寄与するなど、PPAR γ の新たな機能が明らかにされつつある⁽¹¹⁾。PPAR γ に限らず、一見、解析され尽くされたと思われる分子でも、見方を変えることによって思わぬ発見や新たな展開が見いだされるかもしれない。

- 1) P. Tontonoz & B. M. Spiegelman: *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 289 (2008).
- 2) R. T. Nolte, G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass & M. V. Milburn: *Nature*, **395**, 137 (1998).
- 3) A. C. Puhl, A. Bernardes, R. L. Silveira, J. Yuan, J. L. Campos, D. M. Saidenberg, M. S. Palma, A. Cvorov, S. D. Ayers, P. Webb *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **81**, 788 (2012).
- 4) T. Shiraki, N. Kamiya, S. Shiki, T. S. Kodama, A. Kakizuka & H. Jingami: *J. Biol. Chem.*, **280**, 14145 (2005).
- 5) T. Waku, T. Shiraki, T. Oyama & K. Morikawa: *FEBS Lett.*, **583**, 320 (2009).
- 6) T. Itoh, L. Fairall, K. Amin, Y. Inaba, A. Szanto, B. L. Balint, L. Nagy, K. Yamamoto & J. W. Schwabe: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 924 (2008).
- 7) 白木琢磨, 神谷成敏, 陣上久人: 蛋白質核酸酵素, **50**, 1660 (2005).
- 8) T. Waku, T. Shiraki, T. Oyama, K. Maebara, R. Nakamori & K. Morikawa: *EMBO J.*, **29**, 3395 (2010).
- 9) A. Ohtera, Y. Miyamae, K. Yoshida, K. Maejima, T. Aki-ta, A. Kakizuka, K. Irie, S. Masuda, T. Kambe & M. Nagao: *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2794 (2015).
- 10) T. Waku, T. Shiraki, T. Oyama, Y. Fujimoto, K. Maebara, N. Kamiya, H. Jingami & K. Morikawa: *J. Mol. Biol.*, **385**,

188 (2009).

- 11) H. Ohno, K. Shinoda, B. M. Spiegelman & S. Kajimura: *Cell Metab.*, **15**, 395 (2012).

(宮前友策^{*1}, 永尾雅哉^{*2}, ^{*1}筑波大学生命環境系, ^{*2}京都大学大学院生命科学研究科)

プロフィール

宮前 友策 (Yusaku MIYAMAE)

＜略歴＞2006年筑波大学第二学群生物資源学類卒業／2011年同大学大学院生命環境科学研究科博士後期課程生命産業科学専攻修了／同年京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻助教／2015年スタンフォード大学医学部Visiting Assistant Professor／2016年筑波大学生命環境系准教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞特異な生物活性を有する低分子リガンドの探索と作用機構の解明＜趣味＞ドライブ、息子と遊ぶこと

永尾 雅哉 (Masaya NAGAO)

＜略歴＞1982年京都大学農学部食品工学科卒業／1987年同大学大学院農学研究科食品工学専攻博士後期課程修了、同大学農学博士／同年雪印乳業株式会社入社／1991年京都大学農学部食品工学科助手／1997年同大学大学院農学研究科応用生命科学専攻助教教授／1999年同大学生命科学研究科統合生命科学専攻助教教授／2001年同教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞有用な生物活性を有する化合物の探索とその作用機構の解明。「犬も歩けば棒に当たる」をモットーに、研究を進めることで見いだした化合物に着目し、面白いことができればと考えている＜趣味＞野球、テニスをする

Copyright © 2016 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.791