

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790116

研究課題名（和文）PPAR γ と脂肪酸の相互作用解析研究課題名（英文）Analysis of PPAR γ -fatty acids interaction

研究代表者

伊藤 俊将 (ITO TOSHIMASA)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80536110

研究成果の概要（和文）：PPAR γ と脂肪酸の相互作用の検討を行う目的で、有機合成、タンパク質の結晶化、X-線結晶構造解析、タンパク質 NMR、*in silico* 解析の実験を実施した。これらの実験から次の研究成果が得られた。(1) 極長鎖不飽和脂肪酸とその酸化体の合成に成功した。(2) 得られた oxo-脂肪酸と PPAR γ の共結晶化に成功した。(3) ESI 質量分析器を用いて各種 oxo-脂肪酸の PPAR γ への共役付加反応に関する検討を行った。その結果反応性は共役二重結合の位置依存的であることがわかった。(4) NMR 実験によりパーシャルアゴニストの 4-oxoDHA のシフトはフルアゴニストと比較してヘリックス 12 は中程度のシフトであることがわかった。(5) これらの実験結果を *in silico* ソフト SYBYL にて検証した。

研究成果の概要（英文）：To understand interaction of PPAR γ and fatty acids, We applied several techniques, including organic synthesis, X-ray crystallization, crystallographic analysis, protein NMR spectroscopy and *in silico* analysis. The results of those experiments will follow. (1) We synthesized very-long-chain polyunsaturated fatty acids and oxidized those derivatives. (2) We obtained co-crystal of PPAR γ and synthesized fatty acids and solved those structures, which indicates both 5-oxoTrHA and 6-oxoTHA afforded 1,6-conjugate adducts. On the other hand, 6-oxoTHA makes extra cavity in PPAR γ ligand binding pocket. (3) ESI experiment indicates that reactivity of conjugate addition depends on positioning of conjugated double bond. (4) NMR experiment revealed that partial agonist 4-oxoDHA moderately shifted residues on helix12 compare to shift of a full agonist. (5) Those results were verified using modeling software SYBYL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

ロシグリタゾンにより活性化される PPAR γ は2型糖尿病治療薬の標的分子として知られている。また、リピッドセンサーとしてエネルギー代謝を制御する遺伝子転写因子の一つである。PPAR γ は *in vitro* では PGJ₂ や 9-HODE 等様々な脂肪酸により活性化されるが、生体内ではどのような脂肪酸により、どの程度活性化されているのか、統一的な見解はない。近年 PPAR γ のシステインが oxo-型の脂肪酸に共役付加することで、PPAR γ が活性化することが明らかになった。oxo-型脂肪酸は種類が多くどのような脂肪酸が PPAR γ を効果的に制御できるのかわかれば生活習慣等予防や新規治療薬開発のための一つの指針になると考えられる。

2. 研究の目的

PPAR γ と脂肪酸の相互作用を多角的に検討することで、脂肪酸の構造と PPAR γ 活性化能の強弱に関する構造活性相関、脂肪酸の共役付加の反応性、脂肪酸と PPAR γ の結合様式を明らかにし、食習慣、新薬の設計に関する指針となる情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

構造生物学的手法を基軸とし多様な実験手法により、上記目的を明らかにした。有機合成を行い、得られた各脂肪酸の遺伝子転写活性化能を比較した。脂肪酸の共役付加の反応性を明らかにするため、PPAR γ と脂肪酸の競合実験を行った。X-線結晶構造解析および NMR 実験を行った。

4. 研究成果

(1) 極長鎖不飽和脂肪酸トリコサヘキサエン酸 (TrHA) およびテトラコサヘキサエン酸 (THA) とその酸化体 5-oxoTrHA と 6-oxoTHA の合成に成功した。これは遺伝子転写アッセイで PPAR γ の活性化能を有することがわかった。

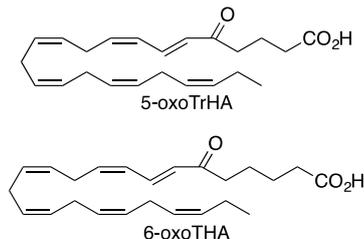


図1 合成に成功した oxo 型脂肪酸

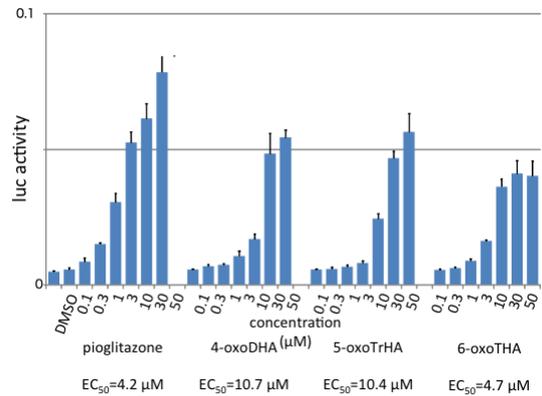


図2 oxo 型脂肪酸の遺伝子転写活性

(2) 得られた oxo-脂肪酸と PPAR γ の共結晶化に成功した。共有結合様式は 1,6 付加であった。脂肪酸のテール部位はよく重なっていたが、カルボン酸周囲の配座は異なっていた。特に 6-oxoTHA との共結晶構造では、リガンド結合キャビティを押し広げていることがわかった。

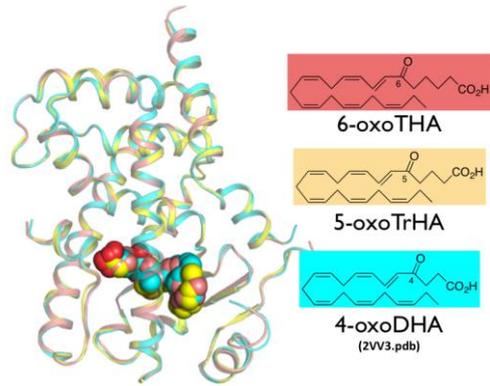


図3 PPAR γ 共結晶構造の重ねあわせ

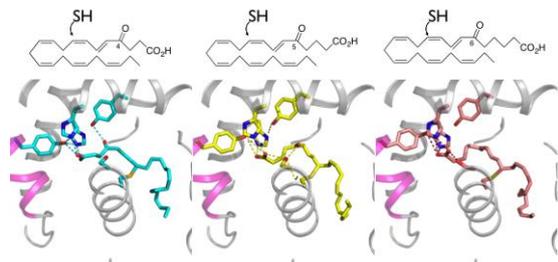


図4 脂肪酸の水素結合と共有結合様式

(3) ESI 質量分析器を用いて各種 oxo-脂肪酸の PPAR γ への共役付加反応に関する検討を行った。各ピークの面積比によりどちらの反応性が高いかがわかる。その結果反応性は共

役二重結合の位置依存的であることがわかった。

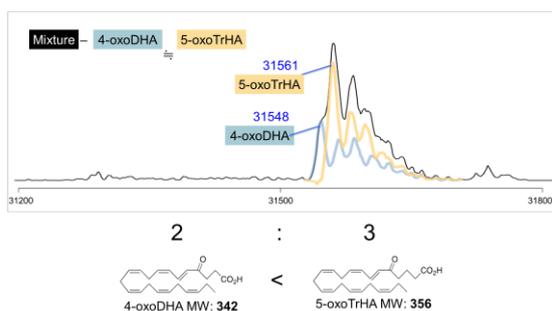


図 5 ESI 質量分析を用いた競合実験

(4)合成フルアゴニスト、パーシャルアゴニストの 4-oxoDHA 合成パーシャルアゴニストが結合した PPAR γ のケミカルシフトをアポ型とそれぞれ比較した。その結果シフトはフルアゴニストと比較してヘリックス 12 は中程度のシフトであることがわかった。

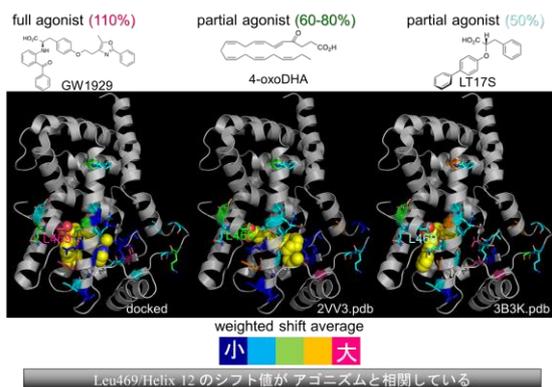


図 6 NMR のケミカルシフト差によるヘリックス 12 におよぼす各種リガンドの影響

(5)これらの実験結果を *in silico* ソフト SYBYL にて検証した。その結果共有結合にはカルボニルの位置ではなく二重結合の位置が重要であること。また、カルボン酸からの炭素鎖長も PPAR γ の Cys-285 に接近するために 4 つ以上ある方がよいことが分かった。以上の条件を満たす、酸化型脂肪酸がよく PPAR γ と結合しやすいということが示唆された。本研究成果は新規共有結合型の合成 PPAR γ リガンドの創製や食習慣への一つ指針となると考えられる。

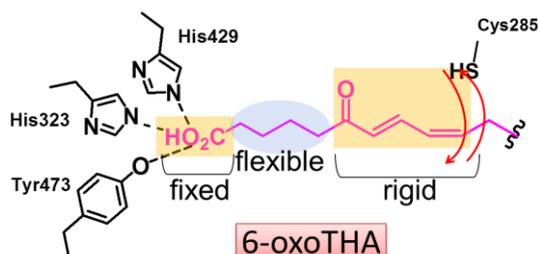
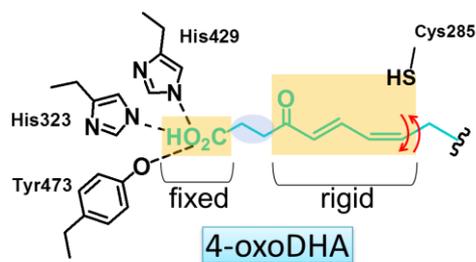


図 7 oxo-脂肪酸の反応性と炭素鎖長

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 1 件)

- ① Itoh T, Tomiyasu A, Yamamoto K., Efficient Synthesis of the Very-Long-Chain n-3 Fatty Acids, Tetracosahexaenoic acid (C24:6n-3) and Tricosahexaenoic acid (C23:6n-3), *Lipids*, 査読有, 46 巻, 2011, pp.391-397 <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-011-3541-5>

[学会発表] (計 8 件)

- ① 伊藤俊将, 富安亜矢子, 山口拓也, 山本恵子, 高度不飽和長鎖脂肪酸の簡便な合成法の確立, 日本ビタミン学会, 2011年6月12日, 岩手県盛岡市, いわて県民情報交流センター
- ② 伊藤俊将, 吉本暢子, 山本恵子, 3つのオキソ型脂肪酸の PPAR γ への結合様式の比較, 日本薬学会第131年会, 2011年3月5日, 要旨集上にて発表
- ③ 江川大地, 伊藤俊将, 山口拓也, 吉本暢子, 山本 恵子, PPAR γ とオキソ脂肪酸の共有結合形成反応と結合様式, 日本薬学会関東支部会, 2011年10月8日, 東邦大学(千葉)
- ④ 伊藤俊将, 江川大地, 吉本暢子, 山本恵子, PPAR γ と oxo 型脂肪酸の共役付加反応, 第22回 日本レチノイド研究会, 2011年11月11日, 日本大学(東京)
- ⑤ Toshimasa Itoh, Nobuko, Yoshimoto, Keiko Yamamoto, Covalent Binding Mode in Complex of PPAR γ and Oxo-Fatty Acids, AIMECS11: 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011年12月2日, 京王プラザホテル(東京)

- ⑥伊藤 俊将、山口 拓也、吉本 暢子、江川 大地、山本 恵子、PPAR γ に共有結合する α -アミノ酸誘導体の設計と構造活性相関、日本薬学会 第 132 回 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学 (北海道)
- ⑦伊藤俊将、坂上拓也、山本善範、山本恵子、DHA生合成中間体の合成、ビタミン学会 第64回大会、2012年6月23日、長良川国際会議場 (岐阜市)
- ⑧伊藤俊将、粟飯島広乃、江川大地、山本恵子、リガンドによるPPAR γ Ser245リン酸化阻害機構の研究、2013年3月29日、パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 俊将 (ITO TOSHIMASA)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 80536110