

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860090

研究課題名(和文) PPAR リガンドのアロステリックリン酸化阻害機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Mechanistic Study of Allosteric Inhibition of PPARgamma Serine Phosphorylation

研究代表者

伊藤 俊将 (ITO, Toshimasa)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80536110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：PPARgammaリガンドのSer245阻害に関する機構解明を行い次の成果を得た。NMR 1H-15NHSQCを用いた滴定実験によりシフトするアミノ酸残基を見出し出した。次に点変異を作製し、リガンドからシフトするアミノ酸残基までのシグナル伝達経路を見出した。円二色性スペクトルを用いた変性実験を行い、これを支持する結果を得た。また、モデリングソフト Sybylを用いて伝搬経路を提案することができた。さらに本研究結果に基づき、パーシャルアゴニスト型oxo脂肪酸の簡便な合成法を確立した。

研究成果の概要(英文)：To understand how PPARgamma ligands inhibit Ser245 phosphorylation, we have done several experiments. 1H-15N HSQC NMR experiment showed that some residues were significantly shifted by PPARgamma ligand. A signaling pathway from ligand to the shifted residues was revealed by using PPARgamma mutants. This is supported by circular dichroism spectroscopic experiments. To integrate our results, we used modeling software Sybyl-X and we proposed the main signaling pathway and mechanism of inhibition of Ser245 phosphorylation by ligand.

Based on the mechanism, we planned to design and synthesis of partial agonist for PPARgamma. We established facile synthesis of 17-(S)HDHA then synthesized 17-oxoDHA, which showed PPARgamma partial agonistic activity, as we predicted.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PPARgamma 構造生物学 メディシナルケミストリー 高度不飽和脂肪酸

## 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 $\gamma$  は 2 型糖尿病治療薬の標的分子として知られている。リガンドによるインスリン感受性向上は PPAR $\gamma$  上のリン酸化阻害と強い相関関係が示されている。リン酸化阻害作用に特化した PPAR $\gamma$  リガンド創製に関する指針があれば新規インスリン抵抗性改善薬の開発促進されると考えられる。このため、リガンドによるリン酸化阻害作用のメカニズム解明が期待されている。

## 2. 研究の目的

核内受容体 PPAR $\gamma$  はリガンド依存性の遺伝子転写因子であり、分子生物学や医薬品開発に重要な標的分子として知られている。リガンドの一つロシグリタゾンによるインスリン抵抗性改善作用は PPAR $\gamma$  の Ser245 のリン酸化阻害によることが明らかにされた。しかし、リガンドによる結合が何故リン酸化を阻害するのかの機構について明らかにすることは容易ではない。なぜならばリン酸化部位とリガンドは 15Å 以上離れたアロステリックな位置にあるからである。申請者はメディシナルケミストリーと構造生物学を利用すれば、この謎を解くことができると考え本研究計画を立案した。

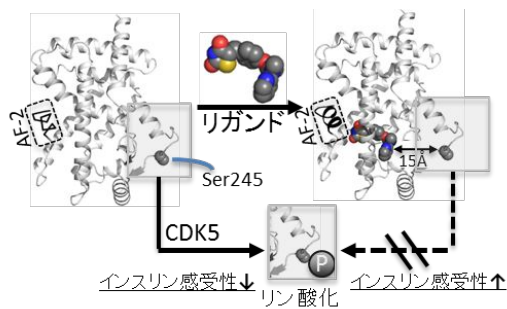


図1 リン酸化阻害とインスリン感受性

## 3. 研究の方法

(1) リガンドの用量依存的にシフトする領域を見出すため NMR  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC を用いた滴定を行った。(2) リガンドによるゆらぎの伝達を検討する目的で点変異を作製した。(3) 全体構造の安定性に関して比較するため、円二色性スペクトルを用いた変性実験検証を行った。(4) モデリングソフト Sybyl を用いて伝搬経路を検討した。(5) 本研究結果に基づき、パーシャルアゴニスト型 oxo 脂肪酸の簡便な合成法を確立

した。

## 4. 研究成果

(1) リガンドとして LT175 を選択した。理由は、Ser245 と最も離れた位置に結合するリガンドであり、アロステリック阻害効果の検討に最適と考えた。リガンドを 0.0-1.0 当量まで滴定し、各アミノ酸残基のケミカルシフト差を算出し色分けした。その結果  $\beta$ -シート付近が特にシフトしていることが判明した。

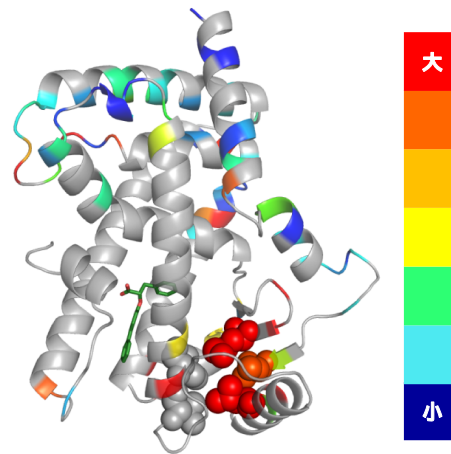


図2 ケミカルシフト差による色分け

(2) ゆらぎの伝播経路を *in silico* モデリングソフト SYBYL-X にて推定し、予想された2つのアミノ酸残基の変異体を作成した。変異体ではリガンドの添加によるシフトが観測できなかった。このことから、リガンドは複数のアミノ酸残基を経由して  $\beta$ -シートに影響を及ぼしていることが示唆された。

(3) 変異による構造の安定性を検討するため、円二色性(CD)スペクトルを用いた変性実験を行った。変性剤にはグアニジン塩酸塩を用い 0.0-6.0 M の各濃度におけるスペクトルを比較した。リガンド存在下において野生型よりも変異体は低濃度のグアニジンで変性がおこったことから、リガンドによる安定化は変異体では弱いことが示唆された。

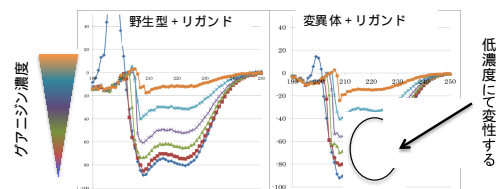
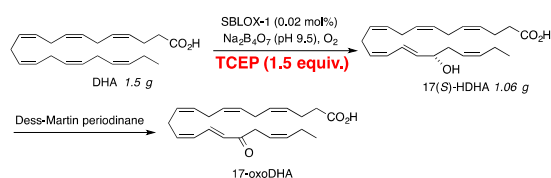


図3 CD スペクトルを用いた変性実験

(4) (1)から(3)の実験結果をモデリングソフト Sybyl-X を用い、阻害機構を検討した。リガンドは  $\beta$ -シートを安定化するため、リン酸化酵素である CDK5 が Ser245 に接近することが妨げられる。その結果 Ser245 のリン酸化がされる。以上のメカニズムを提案した。

(5) 上述の機構から、DHA を誘導体化することでパーシャルアゴニストが合成可能と考え、17-位に oxo 基をもつ 17-oxoDHA の合成を試みた。最初に DHA をリポキシゲナーゼにて 17-HDHA への位置選択的酸化を試みたが、低収率であった。途中で反応が進行しなくなることから、反応中間体である活性酸素種(ROS)が酵素タンパク質を失活させているのではないかと考え、ROS を除去する目的で酸化反応でありながら、還元剤を添加するという新たな試みを行った。その結果高収率で、17-HDHA が得られ、また、グラム単位の合成に成功した。得られた、17-HDHA を Dess-Martin Periodinane により酸化することで、17-oxoDHA に導いた。17-oxoDHA は予想したとおり、パーシャルアゴニスト活性を示した。



## 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2件)

Itoh T., Saito T., Yamamoto Y., Ishida H., Yamamoto K.

Gram scale synthesis of specialized pro-resolving mediator 17(S)-HDHA using lipoxygenase enhanced by water-soluble reducing agent TCEP. *Bioorg Med Chem. Lett.* 査読有 26 巻, 2016, pp. 343-345.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11745-011-3541-5>

Doi:10.1016/j.bmcl.2015.12.011.

Egawa D, Itoh T., Yamamoto K.

Characterization of covalent bond formation between PPAR $\gamma$  and oxo-fatty acids. *Bioconjugate Chem.*, 査読有 26 巻, 2015, pp. 690-698.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.bi>

[oconjchem.5b00021](http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00021)

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00021.

〔学会発表〕(計6件)

西方貴美奈, 伊藤俊将, 江川大地, 山本恵子, Roberta Montanari, Giorgio Pochetti, リガンドによる PPAR  $\gamma$  リン酸化阻害機構におけるヘリックス 3 と  $\beta$ シート間の相互作用に関する研究

第 58 回日本薬学会関東支部大会

2014 年 10 月 4 日, 昭和薬科大学(東京都・町田市)

西方貴美奈, 伊藤俊将, 江川大地, 粟飯島広乃, Roberta Montanari, Louise Fairall, John Schwabe, Fulvio Loiodice, Giorgio Pochetti, 山本恵子

核内受容体 PPAR $\gamma$  セリンリン酸化におけるアロステリック阻害機構解明に関する研究物構研サイエンスフェスタ 2013 (第 31 回 PF シンポジウム) 2014 年 3 月 18 日, エポカルつくば(茨城県・つくば市)

Itoh T., Saito T., Yamamoto K.

Reducing agent promotes hydroxylation of fatty acid by lipoxygenase

15th Tetrahedron Symposium

2014 年 6 月 26 日, ロンドン(イギリス)

Itoh T., Awaishima H., Egawa D., Montanari R., Loiodice F., Pochetti G., Yamamoto K.

Mechanistic Study of Allosteric Inhibition of PPAR $\gamma$  Serine Phosphorylation

EMBO Conference on Nuclear Receptors

2013 年 9 月 7 日, ソレント(イタリア)

Itoh T., Awaishima H., Egawa D., Montanari R., Loiodice F., Pochetti G., Yamamoto K.

Mechanistic Study of Allosteric Inhibition of PPAR $\gamma$  Serine Phosphorylation

14th Tetrahedron Symposium

2013年6月27日,ウィーン(オーストリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 俊将 ( ITOH, Toshimasa )  
昭和薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号 : 80536110