

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710187

研究課題名 (和文) リガンドの共有結合に伴う核内受容体活性化キネティクスの解析

研究課題名 (英文) Kinetic analyses of nuclear receptor activation

研究代表者 白木 琢磨 (Takuma Shiraki)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 10311747

## 研究成果の概要：

本研究では、核内受容体PPAR $\gamma$ が内在性のリガンドと共有結合することにより活性化する過程について、リガンド側のスペクトルの変化と受容体側の構造変化のキネティクスを解明することを目標とした。申請書においては同時測定を目指すことも構想していたが、本研究ではリガンドと受容体の変化を別々に測定した。キネティクス測定に加えて、活性化過程の各状態の立体構造を解析することに成功した。

リガンド側のスペクトル変化のキネティクス解析から、リガンドは一旦受容体と非共有結合中間体を形成した後、共有結合状態に至ることが明らかとなった。非共有結合中間体はダイナミックな状態であるため、通常のリガンドを用いた場合安定にとらえることはできない。そこで、非共有結合中間体でとどまる新規リガンドを検索し、蛍光標識脂肪酸がこの状態でとどまることを明らかにした。蛍光タンパク質と融合した核内受容体とこの蛍光標識脂肪酸との間の結合依存的起る蛍光共鳴エネルギー移動を利用し、非共有結合中間体に至る結合キネティクスを測定することに成功した。

受容体がりガンドのない状態から非共有結合中間体、共有結合複合体へと至る過程でどのような構造変化をするかを知るために、この3状態の結晶構造を解析した。その結果、非共有結合中間体では受容体のヘリックス2と3の間にあるオメガグループが構造変化し、その後共有結合に伴ってヘリックス3にあるフェニルアラニンの側鎖がフリップすることがわかった。オメガグループにトリプトファンを導入しリガンド結合に伴う構造変化をスペクトル解析により確認した。またフェニルアラニンが内在性リガンドによる活性化に必須であることを確認した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構

核内受容体

## 1. 研究開始当初の背景

核内受容体は、ヒトにおいて48種類の

遺伝子からなるファミリーを形成している。しかし、多くの核内受容体はリガンドが未同定なため、オーファン核内受容体と呼ばれている。最近になりいくつかのオーファン受容体について内在性リガンド候補化合物が見つかってきており、今後もリガンド同定が加速すると予想される。

核内受容体の中でもPPAR $\gamma$ は糖尿病や肥満といった生活習慣病との関連が深く、重要な創薬ターゲットとして世界中の製薬会社が注目し、構造解析が進んだ。しかしPPAR $\gamma$ の結晶構造は多く報告されているものの、すべて合成リガンドとの複合体であり、内在性リガンドの結合様式は不明である。申請者は、15デオキシプロスタグランジンJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)に含まれる $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンがPPAR $\gamma$ のリガンド結合ポケットにあるシステインとマイケル付加することを発見した。他の核内受容体では、リガンドにより活性化されると最もC末にあるヘリックス12が大きく構造変化する事が報告されている。しかし、報告されているPPAR $\gamma$ の結晶構造を重ね合わせてみると、リガンドの有無により大きな構造変化が観察されない。リガンドの種類によってもあまり大きく構造は変化していないようである。本研究はこの事実を出発点として発想されている。つまり、PPAR $\gamma$ の活性化はこれまで信じられていたようにヘリックス12の構造変化ではなく、これまで気づかれていなかった新しい機構によるのではなからうか？

## 2. 研究の目的

生活習慣病関連疾患である2型糖尿病の治療薬であるチアゾリジン化合物(BRL49653)がPPAR $\gamma$ のリガンドであることが明らかになり、以後、製薬会社を中心としてリガンド開発と受容体の立体構造解析が行われた。一方、15d-PGJ<sub>2</sub>が内在性のリガンドとして同定されてから、これまでにいくつかの脂肪酸代謝物がPPAR $\gamma$ を活性化することが報告されている。しかし、PPAR $\gamma$ による内在性リガンドの認識機構に関しては全く不明なままであり、いったいどのようにしてPPAR $\gamma$ は多様な脂肪酸リガンドに対して特異的に応答できるのかについては説明が不可能であった。これまで、リガンドと受容体の関係は「鍵と鍵穴」として考えられてきた。この考え方は薬剤の親和性を説明するモデルとしては非常に適切であったといえる。しかし、PPAR $\gamma$ のリガンドに関しては親和性と活性は必ずしも相関しないことから、別の説明が必要であった。内在性リガンドが共有結合するシステイン残基を変異したPPAR $\gamma$  (□□□□□では、15d-PGJ<sub>2</sub>を含むすべ

ての内在性リガンドによる活性化が起きなくなる。当初は内在性リガンドの親和性が低いため、不可逆的結合による活性化されたPPAR $\gamma$ が蓄積することが活性化に必要なのではないかと考えた。しかし、その後の実験により、リガンド結合に伴う受容体側の構造変化をトリプシン分解に対する抵抗性で検討したところ、システイン残基を変異したPPAR $\gamma$  □□□□□に対しても15d-PGJ<sub>2</sub>は結合している事が明らかとなった。つまり、共有結合は内在性リガンドの不可逆的結合のためでなく、PPAR $\gamma$ の活性化を直接誘起するのに必要である。

これらの実験を土台として、本研究では共有結合に伴う活性化のメカニズムを解明するために、活性化キネティクスを詳細に解析する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では核内受容体の活性化に伴う構造変化を分光学的に検出する。ストップフローを用いることでリガンド側のスペクトル変化と受容体側の構造変化を同時に検出することができる。

核内受容体の構造変化と活性化の対応を明らかにするために、異なるリガンドの引き起こす構造変化と活性の関係を明らかにする。申請者はこれまでに核内受容体に共有結合する新規の合成リガンドを複数同定することに成功している(出願特許2006-117239)。これらのリガンドはよく似た化学構造を持ち、結合活性は似ているにもかかわらず、核内受容体の活性化能力に大きな違いがある。そこで、これらのリガンドを用いることで、活性化と構造変化の対応を解析することが可能である。

PPAR $\gamma$ のリガンド結合ドメインにはトリプトファンが存在しない。任意の部位にトリプトファンを導入した変異体を作成することで、導入部位の構造変化をトリプトファンの蛍光スペクトルにより測定することが出来る。トリプトファンスキミングをすることにより、リガンドに応答する数種のトリプトファン導入変異体を同定する。上記のストップフロー高速分光装置を蛍光スペクトル測定に対応できるように改良し、トリプトファン変異体をサンプルとして、受容体の構造変化キネティクスを測定する。

受容体の活性化に伴うコアクティベーターの結合キネティクスを解析する。リガンドの共有結合、受容体の構造変化による活性化、コアクティベーターの結合の3つの柱で核内受容体活性化機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

活性化における共有結合の意味を探るために、新しく開発したストップフロー装置を用いた吸収スペクトル測定し、新たに開発したSPECTRAC法により15d-PGJ<sub>2</sub>がPPAR<sub>γ</sub>に結合するキネティクスを検討した。その結果、リガンドは速やかに(一秒)PPAR<sub>γ</sub>のリガンド結合ポケットに入り、共有結合していない中間複合体を形成した後、ゆっくりと(一数十秒)共有結合反応が起こることを見いだした。共有結合の起こらないシステイン変異体においては中間複合体の形成が観察されるが、活性化は全く起こらないことから、共有結合反応が受容体活性化の実体であることがわかった。この研究により申請者はリガンドのポケットへの進入(dock)と共有結合反応(lock)の2ステップからなる「dock & lockメカニズム」を提唱した。

15d-PGJ<sub>2</sub>の有無、共有結合の有無によりPPAR<sub>γ</sub>がどのような構造変化をするのかを明らかにするために立体構造解析を行った。非共有結合中間体の構造は共有結合するシステインを変異した受容体と15d-PGJ<sub>2</sub>との複合体、および共有結合しない脂肪酸リガンドと野生型の受容体の2種類について解析した。リガンドがリガンド結合ポケットに結合し非共有結合中間体を形成するだけで、オメガグループと呼ばれるヘリックス2'とヘリックス3'の間のループに構造変化が引き起こされる。しかし、この非共有結合中間体の形成過程で見られた構造変化では受容体は活性化されない。活性化の本体である共有結合の前後の立体構造を比較すると、共有結合するシステイン(C285)周辺のアミノ酸側鎖で形成されている結合ネットワークに変化が観察された。特に顕著に構造変化するF287をアラニンに置換した変異体は、15d-PGJ<sub>2</sub>と共有結合するにもかかわらず活性化が起こらないことが確認された。また、リガンドの結合に伴い構造変化の見られたオメガグループのアミノ酸をトリプトファンスキヤニングした結果、リガンド添加に反応する部位を同定することに成功した。オメガグループのトリプトファン変異体はリガンドに対する共有結合活性は保持されていることから、オメガグループの構造変化は共有結合とは関係ないと推測される。

α, β-不飽和ケトンを持つ様々な脂肪酸代謝物がPPAR<sub>γ</sub>リガンドになりうるが、その活性の強さはPPAR<sub>γ</sub>に対する親和性とは異なる機構で規定されていることが以前の研究で予想されていた。リポキシゲナーゼを介して作られるアラキドン酸代謝物は、リポキシゲナーゼの種類により様々な位置にα, β-不飽和ケトンを持つoxoETE代謝物になる。これらのoxoETEはいずれもPPAR<sub>γ</sub>

に共有結合するが、その活性の強さはα, β-不飽和ケトンの位置により異なる。活性の強い15-oxoETEと活性の弱い8-oxoETEの結合したPPAR<sub>γ</sub>の立体構造を比較した結果、いずれの場合も共有結合依存性のF287の構造変化は観察されたが、オメガグループの構造が異なっていることがわかった。つまり、2段階の活性化過程で観察された受容体の構造変化は、非共有結合中間体へ至る過程(dock)で変化するオメガグループの構造が活性の強さを規定し、その後の共有結合反応(lock)によるF287の構造変化により活性のスイッチが入るというモデルにたとえることができる。このモデルに従えば、多様な脂肪酸リガンドに特異的に応答できる理由だけでなく、親和性と活性が必ずしも相関しない理由が説明可能である。本研究により2段階の活性化機構「dock & lock」メカニズムの構造基盤を明らかにしたことで、「鍵と鍵穴」に代わるリガンドと受容体のイメージを得ることができた。

次に内在性リガンドの活性化機構をまねることにより、これまでのPPAR<sub>γ</sub>作用薬とは異なった作用機構を持つアゴニストを提示できるのではないかと考え、PPAR<sub>γ</sub>に共有結合することにより活性化する新しいアゴニストを検索することを試みた。約300万の化合物ライブラリーから共有結合に必要な化学構造情報を基に約600の候補化合物を選択し、*in silico*においてドッキングシミュレーションを行った。ドッキングのスコアおよびドッキングした複合体立体構造を基に35種の候補化合物を選択した後、実際に細胞を用いた活性測定により13種の新規アゴニストを同定することに成功した。これらの新規アゴニストは内在性リガンドと同様PPAR<sub>γ</sub>のシステインに共有結合することが確認された。新しい活性化機構に基づき新規アゴニストが同定できることから、PPAR<sub>γ</sub>は共有結合を積極的に利用し内在性リガンドに反応していることが想像される。

以上の研究から、PPAR<sub>γ</sub>はリガンドと共有結合するという機構により、生体内に無数に存在する脂肪酸代謝物の中から親電子性リガンドに特異的に反応していると考えられるに至った。そもそもPPAR<sub>γ</sub>は核内受容体ファミリーの中でも特にリガンド結合ポケットが大きいことが特徴であった。ポケットに結合する化合物がリガンドであるというだけでは、PPAR<sub>γ</sub>はあまりにも多くの生体分子に反応してしまうことになる。PPAR<sub>γ</sub>は、親電子性の化学構造を持つ代謝物を見分けるために共有結合による活性化という機構を利用していると考えられる。

## 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)

- 1) Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Morikawa, K., Atomic structure of mutant PPAR $\gamma$  LBD complexed with 15d-PGJ<sub>2</sub>: novel modulation mechanism of PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  function by covalently bound ligands. *FEBS Lett.*, **853**, 320-324, 2009
- 2) \*Waku, T., \*Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maehara, K., Kamiya, N., Jingami, H., Morikawa, K., Structural insight into PPAR $\gamma$  activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.*, **388**, 188-199, 2009 (\*First two authors equally contributed this work.)

[学会発表] (計7件)

- 1) Takuma Shiraki, Kosuke Morikawa: Activation mechanism of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids JST International Symposium "Molecular mechanism of environmental response to food and oxygen III", February 10, 2009, Sendai
- 2) 白木 琢磨、和久剛、森川 耿右: 内在性リガンドによる核内受容体PPAR $\gamma$ の活性化機構の解明と創薬への応用、転写情報DECODE・冬のワークショップ 2009、平成21年1月19日、越後湯沢
- 3) 白木 琢磨、和久 剛、森川 耿右: 脂肪酸リガンドによる核内受容体PPAR $\gamma$ の活性化キネティクス、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年大会合同大会 (BMB2008) 2008年12月9日、神戸ポートアイランド
- 4) 和久 剛、白木 琢磨、森川 耿右: 核内受容体PPAR $\gamma$ に対する新規内在性脂肪酸リガンドの同定と受容体活性化機構第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年大会合同大会 (BMB2008) 2008年12月9日、神戸ポートアイランド
- 5) 塩生 くらら、和久 剛、大山 拓次、白木 琢磨、白井 剛、森川 耿右: リガンドの共通部分構造を認識する脂質シグナル系タンパク質部位の探索第46回日本生物物理学会年会 2008年12月3日~12月5日、福岡国際会議場
- 6) 白木 琢磨: PPAR $\gamma$  activating process through covalent modification by endogenous fatty acids, *Lipid Peroxidation* 2008, 2008年10月16日、軽井沢
- 7) 塩生 くらら、和久 剛、大山 拓次、白木 琢磨、白井 剛、森川 耿右: リガンドの共通部分構造を認識する脂質シグナル系タンパク質部位の探索第8回日本蛋白質科学会年会 2008年6月10日~6月12

日、タワーホール船堀

[図書] (計2件)

- 1) \*白木 琢磨「親電子性リガンドセンサーとしてのPPAR $\gamma$ 」実験医学増刊号「活性酸素シグナル酸化ストレス最前線」2009年9月発行予定
- 2) \*白木 琢磨「核内受容体PPAR $\gamma$ の機能と内在性リガンドによる活性調節」生化学 **79**: 960-964 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- 1) PCT 国際出願

名称: 核内受容体に結合するリガンド

発明者: 白木 琢磨

出願人: 国立大学法人大阪大学

番号: PCT/JP2007/056780

出願日: 2007年3月29日

国外

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木 琢磨 (Takuma Shiraki)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 10311747

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし