

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23659038

研究課題名（和文）蛍光プローブによる計測系とモデル化による脂肪酸受容体制御機構の解明と創薬への応用

研究課題名（英文）Elucidation of physiological role of the fatty acid receptor by computer simulation and the fluorescent probe detection system

研究代表者

平澤 明 (HIRASAWA AKIRA)

京都大学 大学院薬学研究科 准教授

研究者番号：70242633

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、G タンパク質共役型受容体型(GPCR)脂肪酸受容体分子のモデリングとそれを用いた受容体選択的化合物の創出、数理モデルを用いた受容体機能の個体レベルでの解明を目標とした。結合エネルギーの計算により、受容体選択性を有する化合物を探索できるシステムを構築し、高い選択性を有する新規化合物を見出した。また蛍光プローブを用いた結合実験系での検証にも成功した。さらに網羅的発現解析の結果から、GPR120 が食餌性の肥満に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The free fatty acid GPR40 receptor and GPR120 are GPCRs whose endogenous ligands are medium- and long-chain FFAs, and they are important in regulating insulin and GLP-1 secretion respectively.

To clarify the mechanism of diet-induced obesity caused by GPR120 defect, we performed physiological, expression profile and lipidomics analysis and developed a mathematical model. We succeeded to find the compound with the highest predicted selectivity for GPR40 receptors from this structure-activity relationship analysis.

Furthermore, we analyzed in more detail physiology GPR120 with a fluorescent probe in order to detect a direct interaction of the receptor. We revealed that the lipid sensor GPR120 is involved in obesity in both mice and humans.

A large contribution to drug development using this study results is expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

脂肪酸受容体、GPR40、GPR120、蛍光プローブ、肥満、シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

申請者は従来から、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) について、受容体とリガンドの相互作用、情報伝達系、さらには受容体タンパク質の可視化解析等、継続的に研究を進めてきた。ハイスループット解析技術等も組み合わせ、ゲノム上では GPCR として同

定されているガリガンド未知のいわゆるオーファン GPCR のリガンド探索を行い、GPR120 が遊離脂肪酸をリガンドとすることを発見、腸管および脂肪組織での生理的な機能についても解明した (*Nature Med.*2005)。ほぼ同時期に、国内外の製薬企業により一群の脂肪酸受容体が見出され、

GPR120 を含め、GPCR の脂肪酸受容体ファミリーという新しいコンセプトを確立し、糖尿病、肥満などをターゲットとする創薬研究が活発に進められつつあった。申請者は、GPR120 について、生理機能の解明および創薬応用までを視野に入れた研究を継続して進めており、そのためのツールとして特異的プローブ、GPR120 ノックアウト・トランスジェニックマウスの作成等を系統的に進めており、本申請ではこれまでの蓄積を最大限利用しつつ、より本質的な脂肪酸受容体を介する制御メカニズムを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

申請者らが、リガンド探索に成功した GPR120 を含む G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 脂肪酸受容体は、糖尿病、肥満などの疾患の創薬ターゲットとして活発に研究が進められつつあり、特異性を有する化合物は創薬応用研究上重要な意義を持つ。申請者は、GPR120 に関して、(1) 受容体とリガンドとの相互作用のレベル、(2) 細胞状態での受容体とリガンドに加えて二量体化を含めた他のタンパク質との相互作用のレベル、で数理モデル化を行い、申請者が確立してきている蛍光プローブを用いた実験データと比較、検証する。さらにモデル化の成果を、個体レベルに拡張し、(3) すでに申請者が確立している遺伝子改変動物と、(1) の系で得られつつある特異的な化合物を用い、*in vivo* でのモデルの検証すなわち、GPR120 の生理機能の解明を試みる。上記、3 つの段階でのモデル化とその実験的な検証の過程を通じて、GPR120 の生理機能の解明を行うと共に、遺伝子機能解析手法として一般化しうる新たなモデル化手法自体の確立を目指す。脂肪酸受容体の詳細な生理機能の解明と特異的な化合物の発見は、これをターゲットとした医薬品開発への大きな貢献も期待される。

3. 研究の方法

脂肪酸受容体 GPR120 について、*in silico* (コンピュータ上)でのモデル化手法と、申請者が確立してきた蛍光検出技術を中心とする *in vitro* の実験系を組み合わせることで、従来の手法では解明が困難な現象をモデル化により理解する。

(1) 受容体の活性化状態構造のテンプレートとしてウシロドプシンの構造を用い、GPR40 のホモロジーモデルを作成した。化合物の構造は、PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA)にて記述し、化合物と GPR40 のモデルとのドッキングの計算は、Molegro Virtual Docker software (Molegro ApS, Aarhus,

Denmark)を用いた。リガンドの結合部位は同ソフトウェアの Molegro cavity detection algorithm により、GPCR と化合物の間の相互作用エネルギーとして水素結合のエネルギーを指標として用いた。各化合物の実際の活性としては、GPR40 発現細胞に対する ERK の活性化を指標とした。

(2) 体重調節の *in vivo* モデルや脂肪細胞径の分布のモデル、受容体と脂肪酸リガンドの相互作用についてのモデル等を参考にし、想定される GPR120 の機能を加えることにより、数理モデルを作成した。

リガンド・受容体間の相互作用解析、リガンド・受容体・相互作用タンパクの関係のモデル化を通じた解明を行うことで、個体レベルでの現象を申請者が既に確立している脂肪酸受容体選択的化合物と遺伝子改変動物を組み合わせ用い、個体レベルでの現象をモデル化して理解することを試みる。

4. 研究成果

(1) 各種脂肪酸および脂肪酸類縁体、新規合成化合物計 47 種類を ERK の活性化を測定すると共に、ドッキングシミュレーションにより水素結合エネルギーを計算した。ERK の活性化の計測値と水素結合エネルギーの間の相関を検討したところ、高い相関があることが明らかとなった(図 1)。

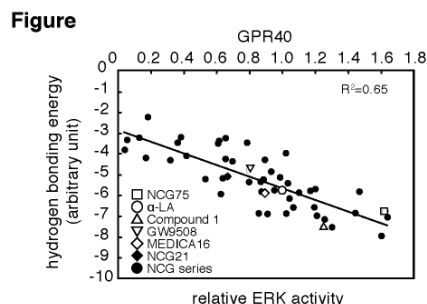
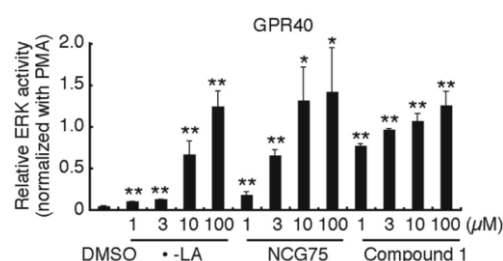


図 1

Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 活性と Docking simulation の相関

実際に ERK 活性を実験により測定したところ、天然の脂肪酸の中では α リノレン酸が、新規に合成した化合物の中では NCG75 が最も高い活性を有していた。図 2 より、NCG75 が GPR40 に選択的に活性化していることが分かる。



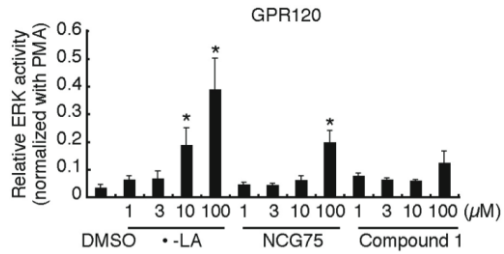


図 2

T-REx GPR40 Flp-in GPR120 細胞を用いた ERK 活性

また、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用の大きさを評価したところ、NCG75 はこちらも GPR120 に比べ GPR40 に強く作用していることが明らかになった (図 3)。

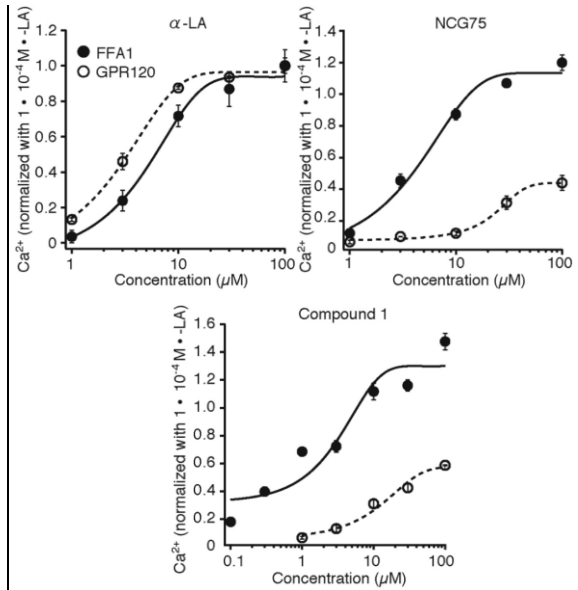


図 3

T-REx GPR40 Flp-in GPR120 細胞を用いた $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用

(2) 申請者らは、脂肪細胞の分化増殖促進と、脂肪における栄養センサーとしての2つの役割を仮定することで、数理モデルを作成した。数理モデルの結果は、若齢での栄養状態と摂取脂肪酸の成分が、最終的な体重及び脂肪蓄積状態に影響することを示しており、これはマウスでの実験結果でも裏付けられつつある。このことから、GPR120 が脂肪酸のセンサーとして関与していることを強く示唆している。(図 4、図 5)

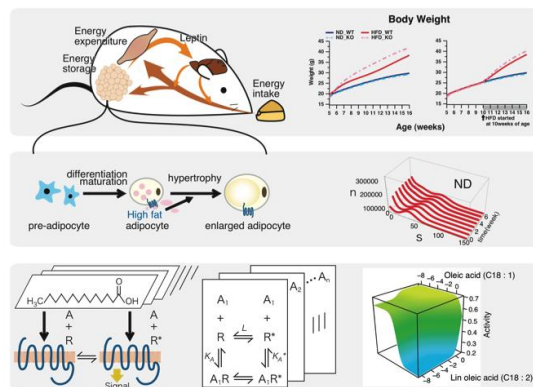


図 4 数理モデル概念図

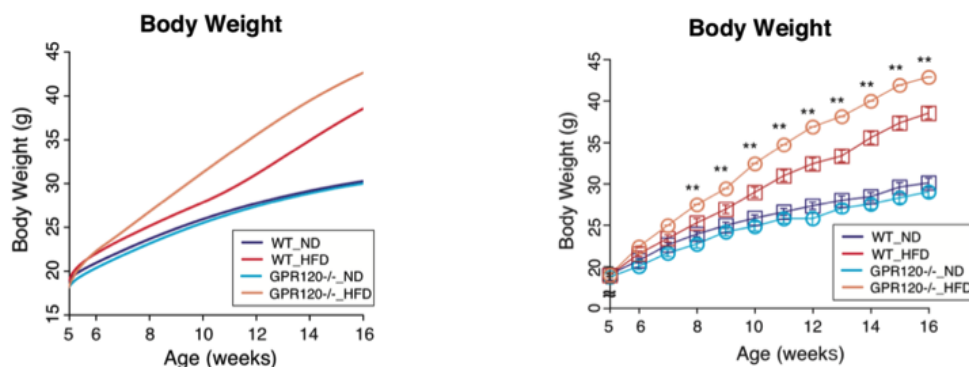


図5 数理モデルによるマウスの体重推移と実測値

GPR40 は中鎖遊離脂肪酸をリガンドとすることが知られている GPCR であり、それぞれ膵臓や腸管で脂肪酸を受容することにより糖尿病等の病態に寄与することが報告され、注目されている。しかしながら、多数の研究がなされてきたにも関わらず、脂肪酸以外のこれらの受容体に対するリガンドに関してはこれまでわずかしか知られていなかった。今回、ドッキングシミュレーションのアルゴリズム確立と精度向上を進め、後半ではそれを用いた *in silico* の活性予測と、実際の活性測定を行い、GPR40 特異的化合物の一つとして NCG75 を見出すことができた。

また、GPR120は、腸におけるGLP-1分泌よりも脂肪組織における栄養センサーとして重要な役割を果たしていることが示されているが、今回確立した数理モデルにより、センサーであるGPR120を中心として、従来の栄養学的手法では解明できなかった脂肪酸成分の作用を、個体レベルで包括的に理解することを可能にした。

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 8 件)

1. Hara T, Hirasawa A, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G. [Physiological functions of fatty acid receptors and their therapeutic potential]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. **140**: 275-279, 2012. 査読有
2. Hou Z, Nakanishi I, Kinoshita T, Takei Y, Yasue M, Misu R, Suzuki Y, Nakamura S, Kure T, Ohno H, Murata K, Kitaura K, Hirasawa A, Tsujimoto G, Oishi S, Fujii N. Structure-Based

Design of Novel Potent Protein Kinase CK2 (CK2) Inhibitors with Phenyl-azole Scaffolds. *J Med Chem*. **55**: 2899-2903, 2012. 査読有

3. Hou Z, Oishi S, Suzuki Y, Kure T, Nakanishi I, Hirasawa A, Tsujimoto G, Ohno H, Fujii N. Diversity-oriented synthesis of pyrazolo[4,3-b]indoles by gold-catalysed three-component annulation: application to the development of a new class of CK2 inhibitors.

Org Biomol Chem. **11**: 3288-3296, 2013. 査読有

4. Inoue D, Kimura I, Wakabayashi M, Tsumoto H, Ozawa K, Hara T, Takei Y, Hirasawa A, Ishihama Y, Tsujimoto G. Short-chain fatty acid receptor GPR41-mediated activation of sympathetic neurons involves synapsin 2b phosphorylation. *FEBS Lett*. **586**: 1547-1554, 2012. 査読有

5. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Med Chem*. **4**: 837-844, 2012. 査読有

6. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Yano Y, Matsuzaki K, Navenot J M, Peiper S C, Fujii N. Paradoxical Downregulation of CXCR2 Chemokine Receptor 4 Induced by Polyphemusin II-derived Antagonists. *Bioconjug Chem*. 2012. 査読有

7. Suzuki Y, Oishi S, Takei Y, Yasue M, Misu R, Naoe S, Hou Z, Kure T, Nakanishi I, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Fujii N. Design and synthesis of a novel class of CK2 inhibitors: application of copper- and gold-catalysed cascade reactions for fused nitrogen heterocycles. *Org Biomol Chem.* **10**: 4907-4915, 2012. 査読有

8. Takeuchi M, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Hirano T, Suzuki T, Miyata N, Awaji T, Ishiguro M, Tsujimoto G. FFA1-selective agonistic activity based on docking simulation using FFA1 and GPR120 homology models. *Br J Pharmacol.* **168**: 1570-1583, 2013. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 平澤明

脂肪酸センサーGPR120 は食事性肥満の原因遺伝子である
第 85 回日本生化学会大会
福岡県
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
2012 年 12 月 15 日

2. 平澤明

長鎖脂肪酸受容体 GPR120 の生理機能の解明と創薬応用
第 85 回日本内分泌学会学術総会招待講演
愛知県
名古屋国際会議場
2012 年 4 月 19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平澤 明 (Hirasawa Akira)
京都大学大学院薬学研究科准教授
研究者番号 : 70242633

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

劉 寧 (Liu Ning)
京都大学大学院薬学研究科研究員
研究者番号 : 70464196

飯田 桂子 (Iida Keiko)
京都大学大学院薬学研究科教務補佐
研究者番号 : 00422999

淡路 健雄 (Awaji Takeo)
埼玉医科大学医学部講師
研究者番号 : 60297546