

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K13264

研究課題名(和文) 内在性リガンドを模倣する新規共有結合性PPAR アゴニストの創製と作用機構解明

研究課題名(英文) Design, synthesis, and mechanism elucidation of novel covalent PPARgamma agonists that mimic the endogenous ligands

研究代表者

宮前 友策 (MIYAMAE, Yusaku)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30610240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規共有結合型PPAR リガンドの取得とその作用機構を解明することを目的として研究を行った。その結果、PPAR に共有結合を形成して、転写活性を増大させるリガンド、共有結合は形成するものの、転写活性を示さないリガンドそれぞれの合成に成功した。これらは、内在性リガンドとして知られる酸化型不飽和脂肪酸と類似した結合様式を取りうることでドッキングシミュレーションの結果から示唆された。また、RNAシーケンス解析によりこれらのリガンド処理による下流遺伝子の発現変動を網羅的に解析した結果、炎症に関わる遺伝子の変動が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内受容体PPAR は糖や脂質代謝に関わる転写因子の一種であり、リガンドの結合によりその機能が制御される。これまで、PPAR に対して共有結合を形成し、その転写活性を増大させるアゴニスト化合物は、内在性の脂肪酸代謝物を除いて報告例が少なかったが、本研究により、アゴニスト型、非アゴニスト型の共有結合型リガンドを取得することができ、またその抗炎症活性を明らかにした。これらの化合物は、内在性リガンドによるPPAR に対する働きを調べるためのツールとしてだけでなく、抗炎症物質のシーズとして期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a covalent PPARgamma agonist and identify its molecular mechanism. Using ligand-linking strategy, we successfully identified a series of PPARgamma ligands which possess the ability to form covalent bond with PPARgamma. Docking simulation suggested that these ligands might exhibit the binding mode which mimic the endogenous fatty acid metabolites. RNA sequencing analysis and some biochemical experiments revealed that the ligands show anti-inflammatory effect through the modulation of expression of inflammatory-related genes.

研究分野：ケミカルバイオロジー、生物有機化学、細胞生物学

キーワード：PPAR 共有結合型リガンド 化合物スクリーニング フラグメント分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内受容体 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)は、低分子リガンドにより活性化される転写因子であり、生体内代謝物である酸化型不飽和脂肪酸は、PPAR γ の内在性リガンドとして知られている。その内在性リガンドの一種である 4-oxo-docosahexaenoic acid (4-oxo-DHA) は、PPAR γ の Cys285 残基とマイケル付加反応を介して共有結合を形成し、PPAR γ の転写作用を活性化させる(Itoh *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008)。本現象は、細胞内の脂肪酸代謝を共有結合によって認識し、生体調節へと導く、重要な応答と考えられており (Waku *et al.*, *EMBO J.* 2010)、脂質代謝の観点から大きな注目を集めている。しかし、脂肪酸代謝物による共有結合が、実際にどのようなメカニズムで転写を活性化し、それによって細胞内でどのような現象が引き起こされているのか、未だ明らかにされていない点が数多く残されている。

一方、研究代表者らは、薬用植物の抽出物より三重結合を有する不飽和脂肪酸 6-octadecynoic acid を単離、全合成するとともに、PPAR γ 転写活性化作用を示すことを見出した (Ohtera *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013)。三重結合を有する脂肪酸の PPAR γ 転写活性化作用は報告されておらず、脂肪酸代謝と転写応答の観点から興味深い知見を与えた。さらに、PPAR γ のリガンド結合ポケットの特性に着目した新たなリガンド開発戦略である、ligand-linking strategy を考案し、新規共有結合性アゴニストの合成に成功した (Ohtera *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2015; 宮前他, *化学と生物*, 2016)。合成した化合物は、Cys285 残基への共有結合依存的に PPAR γ の活性化作用を示し、さらにドッキングスタディにより、上述した 4-oxo-DHA の結合部位をミミックするような結合様式を取り得ることが示唆された。これまで、内在性リガンドの入手性の低さが、共有結合による PPAR γ 活性化機構の研究におけるボトルネックとなっていたが、研究代表者らが見出した新奇リガンドは、グラムスケールでの供給が可能であることから、共有結合による活性化機構を明らかにするための有用な研究ツールになると考えられる。しかし、これまでに報告されている共有結合能を有する内在性リガンドは 10 種類近くの脂肪酸代謝物が知られているが、その結合様式は、化合物ごとに大きく異なることが、構造生物学的な解析から示唆されている。すなわち、共有結合による活性化機構の全容を明らかにするためには、それぞれの脂肪酸に対応する、さらなるリガンドの創出が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが考案した ligand-linking strategy を用いて新規共有結合性リガンドを創製することを目的とした。創出したリガンドの PPAR γ アゴニスト活性評価を行うとともに、その結合様式を解明し、内在性リガンドを模倣しうるか、検討を行った。さらに合成したリガンドを用いて、下流応答遺伝子の発現変動を網羅的に明らかにするとともに、関連する生物活性の有無について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングに用いた安定発現株の作成

まず、GAL4DNA 結合ドメインに PPAR γ リガンド結合ドメインを融合させたキメラタンパク質を発現するエフェクタープラスミドを構築した。本プラスミドと、UAS 配列下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続したレポータープラスミドを U2OS 細胞に遺伝子導入し、ハイグロマイシンおよび G418 処理により、両遺伝子が導入された細胞株を選別した。

(2) スクリーニングの方法

上記で樹立した安定発現株を 96-well plate に播種し、同時に、GW9662 (10 μ M)および試験化合物 (10 μ M) を処理し、24 時間後に細胞抽出液を回収した。回収した抽出液を用いて、Luciferase assay system (Promega)により、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定には Varioskan Lux (ThermoFisherScientific)を用いた。

(3) 一過的発現によるレポーターアッセイ

上記 2 種類のプラスミド遺伝子を、U2OS 細胞、もしくは HepG2 細胞に遺伝子導入し、24-well plate に播種した。一晚培養し、細胞を接着後、試験化合物を添加し、一定時間経過後、細胞抽出液を回収した。ルシフェラーゼ活性は上記と同様の方法により測定した。

(4) ドッキングシミュレーション

Molegro Virtual Docker ver. 6.0.1 を用いて行った。

(5) RNA シーケンス解析

マウス由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 を播種後、IBMX、インスリン、デキサメタゾンにより分化誘導を行った後、試験化合物を 24 時間処理した。その後、総 RNA を抽出し、RNA シーケンスを実施した (Genewiz 社に受託)。

(6) 一酸化窒素放出量の測定

マウス由来マクロファージ細胞 Raw264 細胞を 96-well plate に播種後、LPS 刺激ならびに試験化合物処理を行った。その後、Griess 試薬を用いて、培地中の一酸化窒素放出量を測定した。

(7) NF- κ B 転写活性の測定

NF- κ B 応答配列下流にルシフェラーゼをコードするプラスミド遺伝子を、ヒト由来肝がん細胞株 HepG2 に遺伝子導入した後、24-well plate に細胞を播種後、TNF- α 刺激ならびに試験化合物処理を行った。その後、Luciferase assay system (Promega)により、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定には Varioskan Lux (ThermoFisherScientific)を用いた。

4. 研究成果

(1) パートナーリガンドのスクリーニング

研究代表者らが考案したりガンド開発手法は、協調的に PPAR γ の転写活性を増大させるリガンドの組み合わせを同定した後、両者を融合させた単一の化合物を設計、合成する、2 段階からなる。新規共有結合性リガンドの取得を目的とするため、共有結合性官能基を含むリガンドとして不可逆的アンタゴニストである GW9662 を選び、GW9662 と競合しない部位に同時に結合し、PPAR γ の転写活性を協調的に活性化するパートナーリガンドとなり得る化合物のスクリーニングを行った。スクリーニングには、東京大学創薬機構から提供された、分子量 250 以下の小サイズの化合物からなる化合物ライブラリーを用いた。GAL4DNA 結合ドメインおよび PPAR γ リガンド結合ドメインからなるキメラタンパク質をコードするプラスミド遺伝子、ならびに UAS 配列下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド遺伝子を安定発現する U2OS 細胞を樹立し、スクリーニングに供した。その結果、20 種類のパートナーリガンドとなる化合物の取得に成功した。

(2) パートナーリガンドおよび GW9662 の融合化合物の設計及び合成

取得した 20 種類のパートナーリガンドは、いずれも異なる骨格を有するものであり、多様な構造の化合物が GW9662 と協調的な活性化を引き起こすことが明らかになった。そのうち、最も転写活性を増大させ、合成が容易と思われた化合物に着目し、両者の化学構造をリンカーで接続した融合化合物を設計した。合計 10 段階からなる合成ルートを立案し、合成を進めたが、反応の進行が困難な段階に行き当たった。

(3) けい皮酸エチルを部分構造に用いた融合化合物の設計及び合成

そこで、融合化合物の設計に用いるパートナーリガンドを、先行研究に置いて協調的な活性化作用を示すことを見出しているけい皮酸エチルに変更し、新たに融合化合物の設計と合成ルートの立案を行った。改訂ルートは、(1) GW9662 のアニリン骨格およびけい皮酸エチルの芳香環をエーテル基で連結した後、(2) ホーナー・ワグワース・エモンズ反応を用いて、-不飽和カルボニル構造を導入し、(3) 2-chloro-5-nitrobenzoyl 基をアミド結合による導入の 3 つのステップから成る。1 段階目の出発物質には、反応点となるハロゲン基の導入部位が異なる類縁化合物が市販で入手可能なため、けい皮酸エチルの結合部位が異なる類縁化合物を体系的に合成可能である。改訂ルートに基づき合成を行った結果、GW9662 のアニリン環のメタ位、オルト位、パラ位それぞれに接続された類縁化合物 4a, 4c, 4d の合成に成功した。4a の 2-chloro-5-nitrobenzoyl 基を 3-nitrobenzoyl 基に置換した、化合物も合成した。

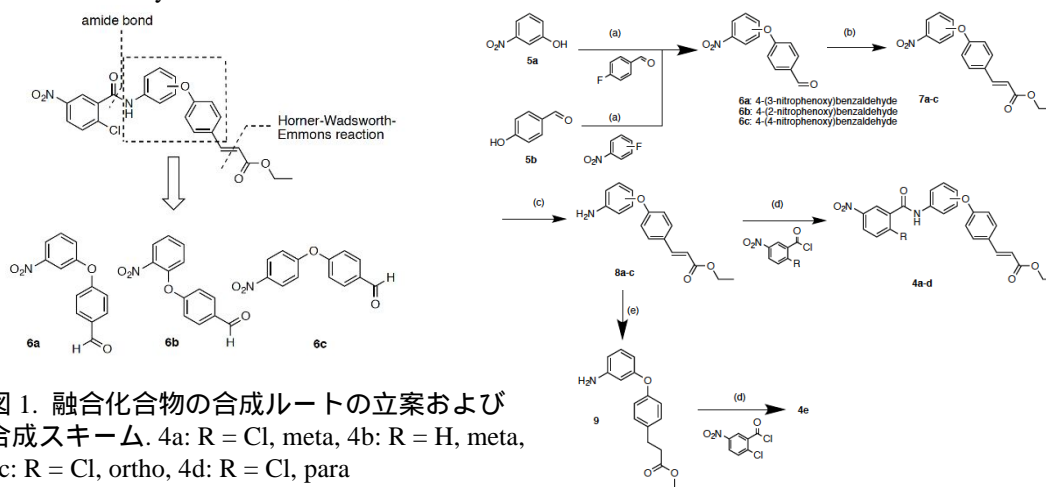


図 1. 融合化合物の合成ルートの立案および合成スキーム。4a: R = Cl, meta, 4b: R = H, meta, 4c: R = Cl, ortho, 4d: R = Cl, para

(4) 合成したリガンドの生物活性評価

合成した化合物が、PPAR γ リガンド結合ドメインに共有結合を形成するか検証するため、ローダミンマレイミドを用いた蛍光標識アッセイを行った。その結果、2-chloro-5-nitrobenzoyl 基を有する化合物 (4a, 4c, 4d) は全て、PPAR γ と共有結合を形成することが明らかになった。一方、3-nitrobenzoyl 基に置換した化合物 4b は共有結合能を示さなかった。次に、PPAR γ リガンド活性評価を行った。エフェクターおよびレポーター遺伝子プラスミドを HepG2 細胞に一過的に発現させ、PPAR γ の転写活性を測定した結果、オルト位およびメタ位にけい皮酸エチルを接続した化合物 4a および 4c はそれぞれ 5.13 および 4.11 nM の EC₅₀ 値で PPAR γ の転写活性を増大させた。一方、4b では活性が見られなかったことから、これらの化合物は共有結合依存的に転写活性を示していることが明らかになった。また、パラ位に接続した化合物 4d は、蛍光標識アッセイで共有結合能を示したにもかかわらず、転写活性は示さなかった。これらの結果から、GW9662 とけい皮酸エチルの接続部位が転写活性に重要であることが明らかになった。これらの化合物の PPAR γ における推定結合様式を解析するため、ドッキングシミュレーションを実施した。その結果、転写活性を示した化合物 4a および 4c では、けい皮酸エチルの構造ユニットがヘリックス 3、 β -シート、 Ω -ループからなる領域と相互作用しうることが示唆された一方で、転写活性を示さなかった化合物 4d は、けい皮酸エチルの構造が、結合ポケットの外に位置するような結合様式を取り得る予測結果が得られた。これらの結合様式を内在性リガンドの結合様式を比較した結果、前者では、活性型のリガンドである 15-oxo-eicosatetraenoic acid (15-oxo-EETE)と、後者では、非活性型リガンドである 8-oxo-EETE の結合様式と類似していることが明らかになり、活性型及び非活性型の内在性リガンドの結合様式を模倣する PPAR γ リガンドの取得に成功した。

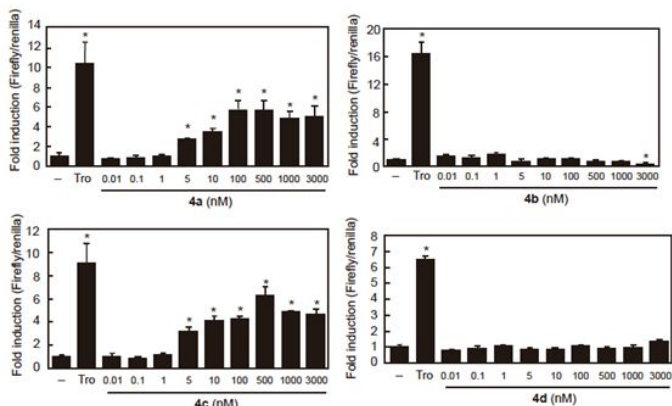


図 2. 4a, 4b, 4c, 4d の PPAR γ 転写活性測定の結果

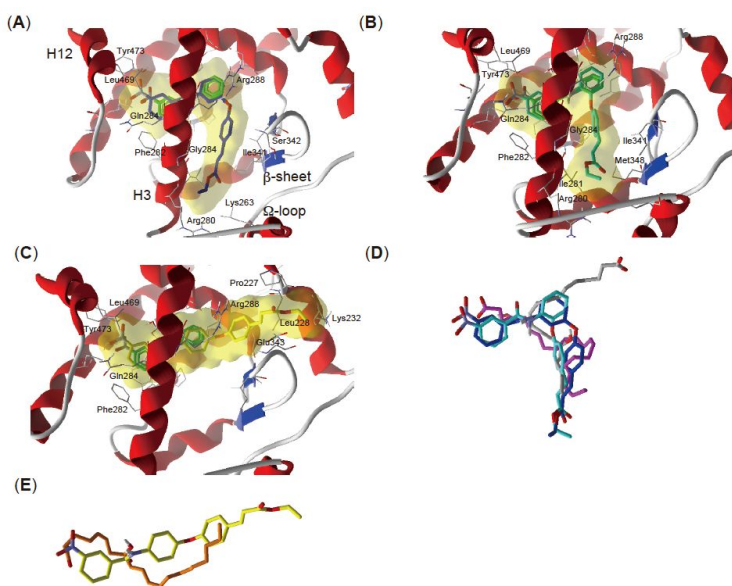


図 3. ドッキングシミュレーションの結果

4a (A, 青), 4c (B, シアン), 4d (C, 黄色)の推定結合様式. 緑色は GW9662 の結合様式を表す. (D) 4a および 4c のドッキングポーズと、15-oxo-EETE (グレー)および 4-oxo-DHA (マゼンダ)の結合様式の重ね合わせ. (E) 4d のドッキングポーズおよび 8-oxo-EETE (オレンジ)の結合様式との重ね合わせ.

(5) RNA シーケンス解析

得られた合成リガンドにより、PPAR γ 制御下にある下流遺伝子の発現変動にどのような影響が生じるか、調査を行った。分化誘導後のマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞に合成リガンドを処理し、総 RNA を回収後、RNA シーケンス解析に供した。試験化合物は、化合物 4a および 4b を用いた。その結果、4a の処理により変動した遺伝子が 120、4b の処理により変動した遺伝子が 107、両者で共通する遺伝子が 37、検出された。4a 処理により発現が減少、あるいは増加した遺伝子が、それぞれ 90、30 ずつ得られた。一方、4b 処理では、66 の遺伝子が発現減少し、41 の遺伝子が発現増加した。4a、4b の両者に共通して、炎症性サイトカインやその産生系に関わる遺伝子の発現が減少する傾向が観察された。

(6) 抗炎症活性の解析

RNA シーケンス解析により、炎症性遺伝子の発現が減少する傾向が観察された。PPAR γ は炎症性遺伝子の発現を、リガンド依存的に負に調節する機能を有するため、4a および 4b の抗炎症活性が予測された。そこで、LPS 刺激したマウス由来マクロファージ細胞において、炎症マーカーである一酸化窒素 (NO) 産生量を測定した結果、LPS 刺激により増大した NO 分泌量が、両化合物により減少した。また、NF- κ B 応答配列をルシフェラーゼ遺伝子に接続したレポータープラスミドをヒト肝がん細胞株 HepG2 に発現させ、NF- κ B による転写制御に与える影響を評価した。その結果、TNF- α 刺激により誘発された NF- κ B の転写活性が 4a および 4b の処理により抑制され、PPAR γ アンタゴニストである GW9662 の共処理により打ち消されたことから、両化合物は PPAR γ 依存的に NF- κ B の転写活性を抑制することが明らかになった。

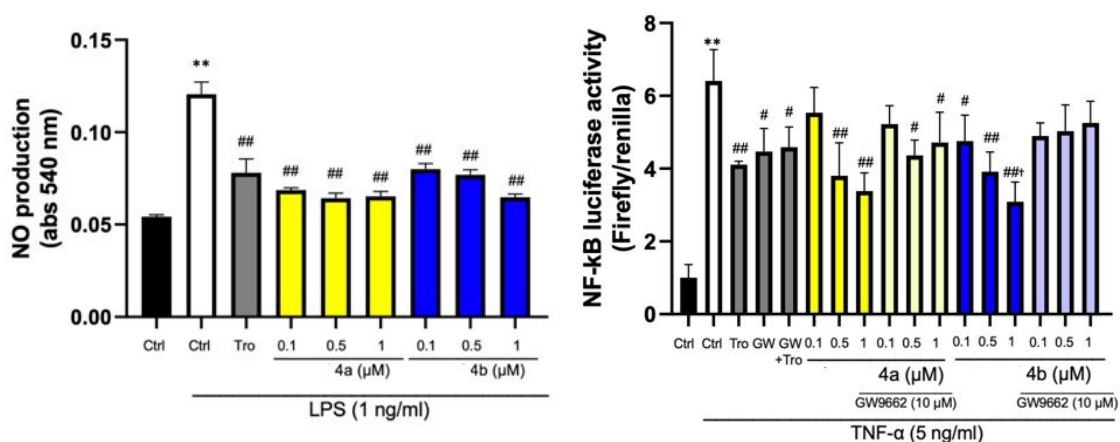


図 4. NO 産生量 (左) および NF- κ B 転写活性 (右) 測定の結果.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Utsugi, Y., Kobuchi, H., Kawamura, Y., Atito, A.S.A., Nagao, M., Isoda, H., Miyamae, Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Importance of the Proximity and Orientation of Ligand-Linkage to the Design of Cinnamate-GW9662 Hybrid Compounds as Covalent PPAR Agonists	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24102019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishino, K., Uesugi, H., Hirasawa, A., Ohtera, A., Miyamae, Y., Neffati, M., Isoda, H., Kambe, T., Masuda, S., Irie, K., Nagao, M.	4. 巻 522
2. 論文標題 Stimulation of insulin secretion by acetylenic fatty acids in insulinoma MIN6 cells through FFAR1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 68-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kurata, M., Fujiwara, N., Fujita, K., Yamanaka, Y., Seno, S., Kobayashi, Shibuya, Y., Masuda, S.H., Miyamae, Y., Takahashi, N.,	4. 巻 22
2. 論文標題 Food-Derived Compounds Apigenin and Luteolin Modulate mRNA Splicing of Introns with Weak Splice Sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 336-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.11.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurata, M.; Morimoto, M.; Kawamura, Y.; Mursi, A. I. F.; Momma, K.; Takahashi, M.; Miyamae, Y.; Kambe, T.; Nagao, M.; Narita, H.; Shibuya, Y.; Masuda, S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Inhibition of mRNA Maturation by Compounds Which Have a Flavonoid Skeleton	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11648/j.bmb.20170204.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宇津木優樹; 小淵裕菜; 河村幸雄; 永尾雅哉; 磯田博子; 宮前友策
2. 発表標題 フラグメントユニットの近接性と配向性が異なる共有結合型PPAR リガンドの合成と活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮前友策; 宇津木優樹; 大寺杏奈; 小淵裕菜; 吉田光多郎; 大前勇馬; 神戸大朋; 増田誠司; 河村幸雄; 永尾雅哉; 磯田博子
2. 発表標題 リガンド結合ポケットの特性を利用した新規共有結合性PPAR アゴニストの創製と生物活性評価
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮前 友策; 宇津木優樹; 磯田博子; Ling-Chun Chen; Thomas J. Wandless
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素の切断機構を利用した細胞内標的タンパク質発現制御法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮前 友策; 宇津木優樹; 磯田博子; Ling-Chun Chen; Thomas J. Wandless
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素の切断活性を利用した細胞内標的タンパク質発現制御法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusaku Miyamae, Anna Ohtera, Kotaro Yoshida, Kazuhiro Maejima, Toru Akita, Akira Kakizuka, Kazuhiro Irie, Seiji Masuda, Taiho Kambe, Masaya Nagao
2. 発表標題 Identification of a new type of covalent PPAR agonist using a ligand-linking strategy
3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Utsugi, Hirona Kobuchi, Yukio Kawamura, Ahmed Salahelden Aboelhand Atito, Masaya Nagao, Hiroko Isoda, Yusaku Miyamae
2. 発表標題 Biological evaluation of cinnamate-GW9662 hybrid compounds as a novel class of covalent PPAR agonist
3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇津木優樹、小淵裕菜、河村幸雄、Ahmed Salahelden Aboelhand Atito、永尾雅哉、磯田博子、宮前友策
2. 発表標題 新規共有結合性PPAR アゴニストの構造活性相関及び推定結合様式の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuma Omae, Hiroko Isoda, Yusaku Miyamae
2. 発表標題 Effect of a Covalent PPAR Agonist on Inflammatory Pathway
3. 学会等名 JAACT2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大前勇馬、磯田博子、宮前友策
2. 発表標題 共有結合型PPAR リガンドとその類縁化合物による抗炎症活性の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------