

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16359

研究課題名(和文) 内在性アミノ酸によるPPAR 脂質代謝制御核内受容体の機能制御機構の構造学的理解

研究課題名(英文) Structural mechanism for PPARalpha regulation by endogenous amino acids

研究代表者

鎌田 祥太郎 (Kamata, Shotaro)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10823932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体PPAR は脂質代謝を制御しており、脂肪酸をリガンドとして空腹時に脂肪酸のベータ酸化や脂質輸送に関わる遺伝子を誘導する。本研究では内在性アミノ酸がどのようにPPAR を阻害するのかX線結晶構造解析を用いて明らかにすることを目的とした。PPAR の脱脂やCorepressorであるNCoRペプチドの添加など様々な条件を検討したが、結晶ができたとしても目的分子の結合を確認できなかった。しかしながら、本研究で培った結晶化技術により、NCoRペプチドを結合した非活性化型構造や、高脂血症治療薬のフィブラート系薬を含む34種の新規リガンド複合体構造を高分解能で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりPPARaの強弱様々なリガンドの結晶化法を確立した。これにより取得の難しかったPPARaリガンド複合体構造を高分解能で容易に得られるようになった。また、フィブラート系薬でも近年認可されたPemafibrateとそれ以外ではPPARa活性と結合部位と異なっており、今回得られた構造と治療効果や副作用に関連があるか今後確認する必要がある。現在、PPARはNASHの治療ターゲットとして注目されており、PPARa/gデュアルアゴニストのSaroglitazarについては両方の複合体構造を取得した。これらの結果はNASHを始めとする新たなPPAR治療薬の創出に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The nuclear receptor PPARa regulates lipid metabolism and induces genes involved in fatty acid beta-oxidation and lipid transport. In this study, we aimed to clarify how endogenous amino acids inhibit PPARa by X-ray crystallography. We examined various conditions, such as delipidating of PPARa and adding a corepressor peptide could not confirm the binding of the target molecule even if crystals were formed. This study established the method for crystallization of various strong and weak PPARa ligands. These techniques have made it possible to obtain PPARa ligand complex structures with high resolution easily. In addition, the PPARa activity and binding sites are different between pemafibrate and other fibrates. PPARs are currently attracting attention as a therapeutic target for NASH, and we obtained both complex structures with saroglitazar, a PPARa/g dual agonist. These results will contribute to developing new PPAR therapeutics for NASH and other diseases.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 PPAR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha は脂質代謝を調節する核内受容体であり、内在性の脂肪酸をリガンドとして活性化する。その結果、脂肪酸のβ酸化や脂質輸送に関わる遺伝子を転写させる。フィブラート系薬は PPARαのアゴニストであり、血中トリグリセリドを低下させる高脂血症の治療薬として長く利用されている。我々のこれまでの研究から内在性アミノ酸が PPARαを阻害することを見出していたが、その阻害メカニズムは不明であった。PPARαの阻害は脂質代謝異常を引き起こす可能性があり、生体内でこの阻害が起こるかも含め明らかにすることは病態にも関連する可能性があり重要である。

### 2. 研究の目的

内在性アミノ酸がどのように PPARαを阻害するか、その阻害メカニズムを明らかにするために、X線結晶構造解析を用いてその結合部位を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### ・ PPARα-ligand-binding domain (LBD)タンパク質の精製

全長の PPARαは不安定なため、PPARα-LBD を用いた。目的タンパク質を大腸菌で大量発現し、His-tag 精製を行なった後、His-tag を切断してイオン交換とゲル濾過カラムによる精製を行った。PPARγ-LBD も同様に精製を行った。

#### ・ PPARα-LBD タンパク質の脱脂

His-tag 精製後に有機溶媒による脱脂とグアニジンによるタンパク質の溶解、透析法や希釈法と行ったリフォールディングの条件をそれぞれ検討した。

#### ・ PPARα-LBD と目的リガンドの複合体結晶の作成

非活性化型である可能性を考慮し、Corepressor である NCoR2 ペプチドを添加することとした。まずスクリーニングロボットによる結晶化条件の探索を行った。そこで得られた条件を元により大きな結晶が得られる条件を検討した。得られた結晶は放射光施設にて測定を行った。

#### ・ 脱脂 PPARα-LBD と目的リガンドの複合体結晶の作成

まずスクリーニングロボットによる結晶化条件の探索を行った。そこで得られた条件を元により大きな結晶が得られる条件を検討した。

### 4. 研究成果

#### ・ PPARα-LBD と目的リガンドの複合体結晶の作成

まずスクリーニングロボットによる結晶化条件の探索を行った。1,000 種類程度の沈澱剤条件を 4 と 20 のそれぞれの条件下で試し、その結果、いくつか似たような条件で小さい結晶を得た。この大きさでは X 線を当てるには小さすぎたため、得られた条件を元により大きな結晶が得られる条件を検討した。その結果、より大きな結晶を得て、分解能 3 程度のデータを得ることができた。しかし、目的リガンドの結合は確認できなかった。問題点として、低分解能であり低分子の電子密度が判別しにくいことと、PPARα-LBD には大腸菌由来の脂肪酸が結合していることが分かっており、これらの解決を目指すこととした。

#### ・ PPARα-LBD タンパク質の脱脂

まず有機溶媒による脱脂を検討した結果、エタノールで最も脱脂率が高いという結果を得た。沈殿したタンパク質はグアニジン溶液に溶解し、リフォールディングの条件を検討した。その結果、透析法ではタンパク質の多くが沈殿した一方で、希釈法では沈殿は少なかった。こうして、元々タンパク質の 80% 程度に結合していた内在性脂肪酸が 20% 以下まで減少した PPARα-LBD を得た(図 1A)。こ

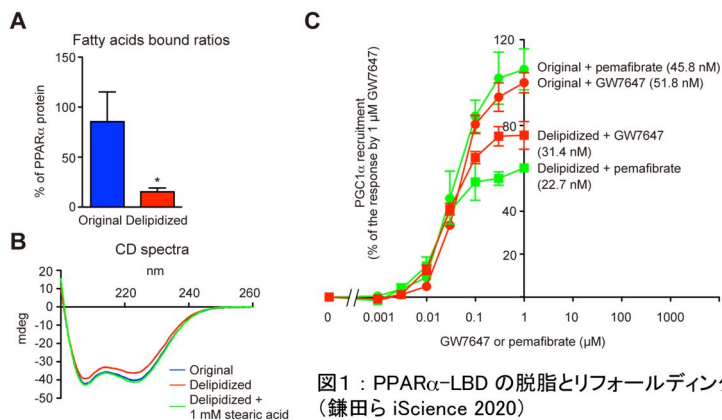


図1: PPARα-LBD の脱脂とリフォールディング (鎌田ら iScience 2020)

うして得たタンパク質が適切にリフォールディングされているか確認するため、タンパク質の二次構造を反映したスペクトルを得ることができる circular dichroism (CD) スペクトルを測定した。その結果、脱脂前とほぼ同じ CD スペクトルであることと Stearic acid を添加することにより全く同じ CD スペクトルが得られることを確認した(図 1B)。次に脱脂前と同じく Coactivator 結合能測定アッセイが可能か確認し、同様の結果が得られた(図 1C)。さらに、アゴニストである GW7647 を添加して結晶を作成した結果、PPAR $\alpha$ -LBD の構造も同じであることを確認した。

・脱脂 PPAR $\alpha$ -LBD と目的リガンドの複合体結晶の作成

得られた脱脂タンパク質を元に脱脂前と同様に Corepressor である NCoR2 ペプチドを添加して結晶化を行なった。しかし、目的リガンドの結合は確認できなかった。結晶化条件や結晶の凍結条件についてもより広範囲に試したが分解能も改善しなかった。

・PPAR $\alpha$ -LBD と様々なアゴニストの複合体結晶の作成

PPAR $\alpha$ の研究を進める中で PPAR $\alpha$ の結晶構造数は PPAR の他のサブタイプと比べ少なく、高脂血症の治療薬として使われているフィブラート系薬との複合体も未だ得られていないことが分かった。我々は脱脂前の PPAR $\alpha$ -LBD を用いて Pemaifibrate などの PPAR $\alpha$ 活性の高いアゴニストの結晶を得ていた。また、リガンドを添加しなくとも内在性脂肪酸が結合した複合体構造を高分解能で得て、これを元にリガンドを浸して置換させる Soaking 法で容易に高分解能リガンド複合体を得ることに成功していた。しかし、この方法では Bezafibrate や Fenofibric acid (Fenofibrate の活性代謝体)などの弱アゴニストとの複合体構造は得られていなかった。そこで、本研究で確立した脱脂 PPAR $\alpha$ -LBD を用いて複合体結晶を作成したところ、Fenofibric acid や Ciprofibrate との複合体構造を得たほか、Palmitic acid、Stearic acid、Oleic acid、Arachidonic acid、Eicosapentaenoic acid (EPA)との複合体を高分解能で得た(図 2)。

しかし、この方法でも Bezafibrate と Clofibrac acid の複合体結晶は得られず、Coactivator である SRC1 ペプチドを添加することで Clofibrac acid 複合体結晶を、さらにその結晶に Soaking 法を適用することで、Bezafibrate 複合体結晶を得ることができた(図 2)。これらの結果は iScience 誌に発表したほか、その画期的 PPAR $\alpha$ -LBD 結晶作成法を STAR Protocols 誌に発表した。

・PPAR $\gamma$ -LBD との複合体結晶の作成

PPAR $\gamma$ でも内在性アミノ酸による阻害が見られたこと、PPAR $\gamma$ でもいくつか非活性化型の報告があることから、PPAR $\gamma$ で内在性アミノ酸との複合体結晶を得ることを目指した。その結果、PPAR $\gamma$ -LBD と NCoR ペプチドとの複合体構造は得ることができたが、内在性アミノ酸との結晶は未だ得られていない。

PPAR $\gamma$ についても PPAR $\alpha/\gamma$ デュアルアゴニストである Saroglitazar との複合体結晶を作成し、既に PPAR $\alpha$ -LBD との複合体は我々が報告していたことから比較して Biol Pharm Bull 誌に報告した。Saroglitazar は現在非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の治験が行われており注目されている。

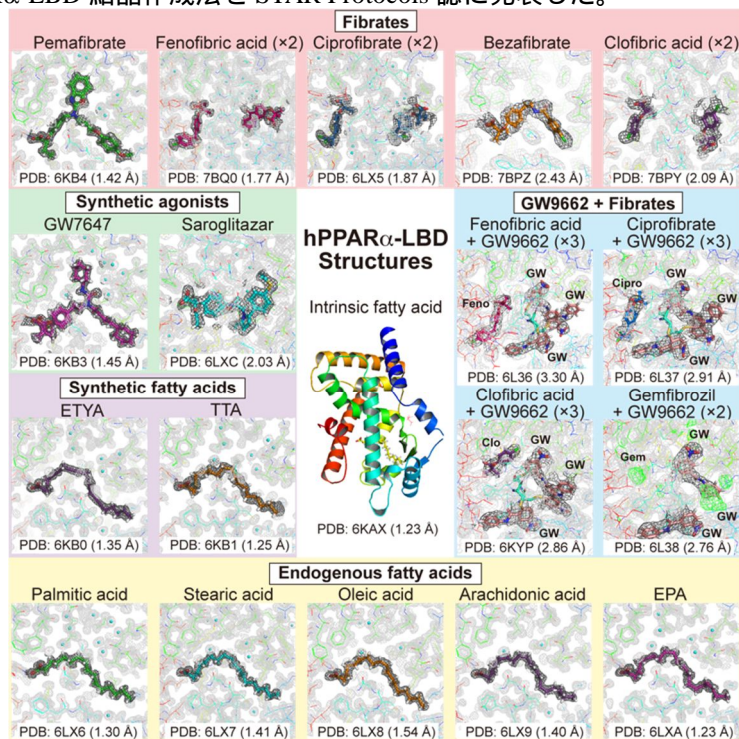


図2：ヒト PPAR $\alpha$ -LBD と各種リガンド結晶構造 (鎌田ら iScience 2020)

このように当初の目的であった PPAR $\alpha$ -LBD と内在性アミノ酸との複合体構造を明らかにすることはできなかった。しかし、本研究で確立した PPAR $\alpha$ -LBD の脱脂を始めとする様々な結晶化方法は PPAR $\alpha$ -LBD と様々なアゴニストの複合体構造を明らかにすることに貢献した。これらの結果は、NASH を始めとする新たな PPAR 治療薬の創出に貢献するものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oyama Takuji, Kamata Shotaro, Ishii Isao, Miyachi Hiroyuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Crystal Structures of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Ligand-Binding Domain in Complexes with a Series of Phenylpropanoic Acid Derivatives Generated by a Ligand-Exchange Soaking Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00220	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 -
1. 著者名 Honda Akihiro, Kamata Shotaro, Satta Chihiro, Machida Yui, Uchii Kie, Terasawa Kazuki, Nemoto Ayane, Oyama Takuji, Ishii Isao	4. 巻 44
2. 論文標題 Structural Basis for Anti-non-alcoholic Fatty Liver Disease and Diabetic Dyslipidemia Drug Saroglitazar as a PPAR / Dual Agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1210 ~ 1219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00232	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 -
1. 著者名 Kamata Shotaro, Ishii Isao	4. 巻 141
2. 論文標題 PPAR -Ligand Binding Modes Revealed by X-ray Crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1267 ~ 1274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.21-00138	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 -
1. 著者名 Kamata Shotaro, Oyama Takuji, Saito Kenta, Honda Akihiro, Yamamoto Yume, Suda Keisuke, Ishikawa Ryo, Itoh Toshimasa, Watanabe Yasuo, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Suematsu Makoto, Ishii Isao	4. 巻 23
2. 論文標題 PPAR Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101727 ~ 101727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101727	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 Kamata Shotaro, Oyama Takuji, Ishii Isao	4. 巻 2
2. 論文標題 Preparation of co-crystals of human PPAR -LBD and ligand for high-resolution X-ray crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100364 ~ 100364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100364	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鎌田 祥太郎, 本多 彰宏, 町田優衣, 内井希恵, 椎山結 増田莉紗, 垣生有希, 柏木野花, 大山 拓次, 石井 功
2. 発表標題 X線結晶構造解析による3種フィブラート系薬のPPAR / / リガンド結合部位それぞれへの結合様式の比較
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鎌田 祥太郎, 大山 拓次, 齊藤健太, 本多 彰宏, 山本 ゆめ, 須田 圭介, 石川 諒, 石井 功
2. 発表標題 X線結晶構造解析により得られたPPAR リガンド結合部位と内在性脂肪酸及びフィブラート系薬の複合体構造
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 彰宏, 颯田 千尋, 町田 優衣, 内井 希恵, 寺沢 和樹, 根本 彩音, 鎌田 祥太郎, 大山 拓次, 石井 功
2. 発表標題 NAFLD治験薬かつ糖尿病性脂質異常症治療薬SaroglitazarのPPAR / dual アゴニストとしての構造基盤
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町田 優衣, 内井 希恵, 増田 莉紗, 椎山 結, 本多 彰宏, 鎌田 祥太郎, 石井 功
2. 発表標題 NASH治験薬Lanifibranor - ヒトPPAR 複合体結晶のX線構造解析
3. 学会等名 2021年度生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 諒, 本多彰宏, 鎌田祥太郎, 石井功
2. 発表標題 核内受容体PPAR alphaのCD測定法による熱安定性評価
3. 学会等名 第5回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019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
---------	---------