

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05742

研究課題名(和文) PPAR リガンドの細胞内合成を光で制御するオプトケミカルツールの開発

研究課題名(英文) Development of an optochemical tool that regulate the intracellular synthesis of PPAR γ ligand

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム増殖因子受容体(PPAR)は、糖や脂質代謝の主要制御因子である。本研究では、研究代表者が以前確立したPPAR リガンド生成法の利便性の向上を目的として、生体直交化学と光化学の手法を取り入れ、PPAR リガンドの細胞内合成とその光制御技術の構築を目指した。その結果、当初計画した官能基を付加した化合物の合成に成功したが、連結反応や細胞内合成反応の進行を確認することができなかった。一方、光により配座が変化する光反応性リガンドの合成には成功し、アゴニスト活性の光制御技術構築の今後の足がかりとなる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、薬候補化合物の化学構造を細胞内で合成すること、また薬効の発現の有無を光照射により制御するための技術を開発することを目的とした。前者の目的については達成することが出来なかったが、後者については光反応性官能基を導入した化合物の合成に成功した。今後、光照射実験により得られた化合物の配座変化や薬効発現の制御を実証することで、新たな創薬技術の一つとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) is a member of nuclear receptor superfamily, that regulates glucose and lipid metabolism. This study aimed to develop the methodology to facilitate the intracellular synthesis of PPAR ligand through the light-irradiation by combining the bio-orthogonal chemistry and optochemistry. We synthesized a series of compounds that possess the reactive functional group but could not observe the intracellular ligation. We employed the alternative approach and successfully synthesize the PPAR ligand that possess the photoreactive linker, which is expected as a new approach for light-control of PPAR agonistic activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：PPAR 核内受容体 生体直交化学 光化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド応答性の転写因子である。糖尿病や脂質代謝を始めとして、がん、炎症、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) など、様々な疾病との関連が報告されており、これらの現象が PPAR γ リガンドにより緩和される可能性が示されている。PPAR γ リガンドの代表例であるチアゾリジン誘導体 (TZD) は、かつて抗糖尿病薬として臨床使用されていたが、心不全や肝機能障害、浮腫などの重篤な副作用を引き起こすため現在処方中止となっている。

研究代表者らは、PPAR γ のリガンド結合ポケット (LBP) の特性を利用した新たなリガンド開発戦略である ligand-linking strategy を考案し、新奇共有結合型アゴニストの創製に成功した (Ohtera, A. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2015)。本法は、PPAR γ の LBP の cavity が約 1,500 Å³ と、他の受容体に比べて極めて大きいことに着目し、(1) 競合しない部位に同時に LBP に結合するリガンドペアを細胞アッセイスクリーニングにより見出し、(2) 両者を融合させた単一の化合物を設計、化学合成するという2段階からなる。このとき関連性の薄いリガンドペアを見出すことができれば、両者を融合させることにより既存の手法では発想されない新しい骨格構造を生み出せる利点がある。しかし、次の欠点がある。第一に、活性のある化合物を見出すため、リガンドペアの融合様式が異なる複数の化合物を設計、合成するなどの試行錯誤に一定の時間を要する。第二に、合成する融合化合物は2つの化合物の構造を組み合わせたものであるため、分子サイズの肥大による溶解性の低下が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが確立した ligand-linking strategy に生体直交型反応の概念と光反応性官能基を活用し、PPAR γ リガンドを細胞内で合成し、その反応を光で制御する光化学的手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

3 - 1. プラスミド

ヒト由来 PPAR γ のリガンド結合ドメインをコードする遺伝子配列を PCR により増幅し、pFN26A(BIND)hRluc-neo Flexi vector (Promega) にサブクローニングしたベクター (pGAL4DBD-PPAR γ LBD) をエフェクタープラスミドとして用いた。レポーターベクターとして、UAS 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続した pGL4.35 vector (Promega) を用いた。

3 - 2. 細胞培養

ヒト由来骨肉腫細胞 U2OS 細胞を、10% ウシ胎仔血清、100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した D-MEM 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて 37°C、5% CO₂ で培養した。

3 - 3. 安定発現株の樹立

U2OS 細胞に、HilyMax (DOJINDO) を用いて pGL4.35 をトランスフェクションし、G418 (ナカライテスク) を用いて薬剤選別を行った。選別された細胞株に、pGAL4DBD-PPAR γ LBD を遺伝子導入し、Hygromycin (ナカライテスク) により薬剤選別を行い、両プラスミド由来の遺伝子を安定発現する細胞株を樹立した。

3 - 4. PPAR γ アゴニスト活性試験

pGAL4DBD-PPAR γ LBD および pGL4.35 を安定発現する U2OS 細胞に試験化合物を添加し、24 時間培養後、1 x passive lysis buffer (Promega) を用いて細胞溶解液を調製し、Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

4 - 1. 分子設計および合成

先行研究により活性を見出された化合物は、不可逆的 PPAR γ アンタゴニストである GW9662 および植物由来けい皮酸誘導体の両者を融合した化学構造を持つ。両ユニットを細胞内で連結させることを企図し、GW9662 にアルデヒド基、けい皮酸誘導体にオキシアミン基を導入した化合物を設計した。GW9662 アルデヒド付加体 (GW-al) は、3-aminophenethyl alcohol を出発原料として 2 段階の工程で合成する手法を確立した。けい皮誘導体の芳香環にオキシアミン基を導入した化合物(OA-CAEE)は、ボロン酸で修飾された芳香環を有する化合物を用いて 1 段階で合成した。また、GW9662 とアルデヒド基の間、けい皮酸誘導体とオキシアミン基の間に、それぞれメチレンリンカーを挿入した類縁化合物(GW-m-al, OA-m-CAEE)も合成した。

4 - 2 . PPAR γ アゴニスト活性評価

エフェクターおよびレポータープラスミドを安定発現する U2OS 細胞株を用いて、合成した化合物の PPAR γ アゴニスト活性を評価した。安定発現細胞株に、試験化合物を処理し 24 時間培養後、回収した細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、GW-al および OA-CAEE の両者は、PPAR γ アゴニスト活性を相乗的に増強することが明らかになった。また、反応性官能基とリガンド部位の間にメチレンリンカーを挿入した化合物も同様の傾向が観察された。次に、培地中で 4 時間の試験化合物の前培養の有無で活性に変化が生じるか、検証した。その結果、GW-m-al および OA-m-CAEE を前培養した処理区と、前培養なしの処理区で、有意に差が見られたものの、活性強度に顕著な差は見られなかった。

4 - 3 . オキシム生成反応の検証

4 - 2 の実験結果を受け、アルデヒド基およびオキシアミン基の間で確かにオキシム生成反応が生じるか、溶液中における生成反応の有無を調べた。アセトニトリル溶媒中に、GW-al および OA-CAEE の両者を添加し、室温で培養した後に、反応液を HPLC により分離したところ、新たなピークは観察されなかった。次に、メチレンリンカーを挿入した化合物についても同様に検証した結果、生成物由来と思われるピークは得られなかった。また、反応を促進させるため、*p*-phenylenediamine (*p*-PDA)触媒添加による効果を観察したが、新たなピークの生成が見られなかった。その他、溶媒系や温度など各種反応パラメータを変更し、反応が進行する条件を探ったが、反応の検出には至らなかった。アルデヒドおよびオキシアミンを用いた細胞内連結反応は、細胞表面の糖鎖では複数の成功例が報告されているものの、細胞内での報告は Parvatkar らの研究 (Parvatkar, P. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2015) など例が少ない。Parvatkar らの研究でも、連結させる両フラグメント化合物が、受容体タンパク質内部に結合し、それを足場とすることが反応の進行に必要と論じられており、細胞内環境がオキシム生成に適していない可能性が考えられた。

4 - 4 . 生体直交反応を利用したリガンド化合物の効率的合成

4 - 3 の結果から、リガンドの細胞内合成という目的は一旦保留とし、別のアプローチに基づく光反応性化合物の開発を行った。具体的には、光照射により配座が変化する官能基を、GW9662 およびけい皮酸誘導体の間に導入した化合物を用いて、光照射による幾何異性化を利用して、活性を発現するタイミングをコントロールすることを目的とした研究に着手した。GW9662 とけい皮酸誘導体の接続の配向性が異なる化合物を設計し、GW9662 のアニリン環の 4 位に光反応性官能基を導入した化合物の合成に成功した。本化合物を PPAR γ アゴニスト活性試験に供した結果、チアゾリジン等のアゴニスト化合物に対して拮抗的に作用する傾向が観察された。今後は、本化合物への光照射実験を行い、配座が確かに変化するか、また、化合物を投与した細胞内での光照射によるアゴニスト活性発現の有無を制御可能か、検証する予定である。また、GW9662 のアニリン環の 2 位および 3 位に官能基を導入した化合物の化学合成とその機能評価も併せて実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa Tokio, Osaka Mayo, Miyamae Yusaku, Nishino Katsutoshi, Isoda Hiroko, Kawada Kiyokazu, Neffati Mohamed, Irie Kazuhiro, Nagao Masaya | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Two Types of PPAR Ligands Identified in the Extract of <i>Artemisia campestris</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry | 6. 最初と最後の頁 647 ~ 657 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/chemistry3020045 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Miyamae Yusaku | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Insights into Dynamic Mechanism of Ligand Binding to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor toward Potential Pharmacological Applications | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1195 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00263 | 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 Miyamae Yusaku, Chen Ling-chun, Utsugi Yuki, Farrants Helen, Wandless Thomas J. | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 A Method for Conditional Regulation of Protein Stability in Native or Near-Native Form | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cell Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 1573 ~ 1581.e3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.09.004 | 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 Krama Annisa, Tokura Natsu, Isoda Hiroko, Shigemori Hideyuki, Miyamae Yusaku | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Cyanidin 3-Glucoside Induces Hepatocyte Growth Factor in Normal Human Dermal Fibroblasts through the Activation of α -Adrenergic Receptor | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 22889 ~ 22895 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c02659 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮前友策 |
| 2. 発表標題 リガンド結合ポケットの特性を利用したフラグメント分子スクリーニングと核内受容体リガンドの創製 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ZHE YANG, Tomoki Takahashi, Tatsuya Yamamoto, Hiroko Isoda, Hideyuki Shigemori, Yusaku Miyamae |
| 2. 発表標題 Analysis of subcellular localization of tetrandrine that modulates autophagy-lysosome pathway |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Annisa Krama, Natsu Tokura, Hiroko Isoda, Hideyuki Shigemori, Yusaku Miyamae |
| 2. 発表標題 Effect of Cyanidin 3-Glucoside on the Production of Hepatocyte Growth Factor in Normal Human Dermal Fibroblasts |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022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、礪田博子、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拠る抗炎症活性の検証 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安彩伽、大前勇馬、有本光江、加香 孝一郎、礪田博子、深水昭吉、繁森英幸、宮前友策 |
| 2. 発表標題 生体直交型反応を示す官能基を付加した 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2021年大会 |
| 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 |
|---------|---------|
| | |