

生物物理学的手法による PPAR とオキソ脂肪酸及び ビタミン D 受容体とコアクチベーターペプチドの相互作用解析

医薬分子化学研究室 江川 大地

緒言

核内受容体はステロイドやビタミン等のリガンドやコアクチベーターなどと複合体を形成し転写を制御する受容体であり、創薬における重要な研究ターゲットである。そのため、核内受容体と多種多様な生体分子が構成する転写機構を解明することは創薬研究の発展に重要である。本研究では、X 線結晶構造解析、質量分析および表面プラズモン共鳴等の生物物理学的手法を用いて、核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) とオキソ脂肪酸およびビタミン D 受容体 (VDR) とコアクチベーターペプチドの相互作用の一端を解明し、核内受容体を標的とした創薬研究に貢献することを目的とした。

第一章 PPAR γ とオキソ脂肪酸の共有結合に関する研究

4-オキソドコサヘキサエン酸 (4-oxoDHA)、5-オキソトリコサヘキサエン酸 (5-oxoTrHA) および 6-オキソテトラコサヘキサエン酸 (6-oxoTHA) を含む種々のオキソ脂肪酸と PPAR γ -LBD の相互作用を検討した (Fig. 1)。まず、PPAR γ -LBD/5-oxoTrHA 複合体と PPAR γ -LBD/6-oxoTHA 複合体の X 線結晶構造解析を行った結果、いずれのオキソ脂肪酸も PPAR γ -LBD の Cys285 と共有結合することが明らかになった。次に、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を用いて、PPAR γ -LBD と二種のオキソ脂肪酸を競合させることにより共有結合の反応性を比較した (Fig. 2)。その結果、オキソ脂肪酸の反応性には、カルボン酸と共役付加部位の距離および全炭素数が重要であることが示唆された。以上の結果からオキソ脂肪酸の構造と PPAR γ -LBD に対する共有結合の反応性に相関があることが明らかになった。本研究における ESI-MS を用いた反応性の比較は、structure-REactivity relationship study として他の標的タンパク質にも適用可能である。

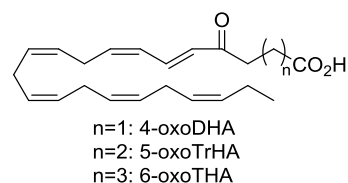


Fig. 1. 実験に用いたオキソ脂肪酸

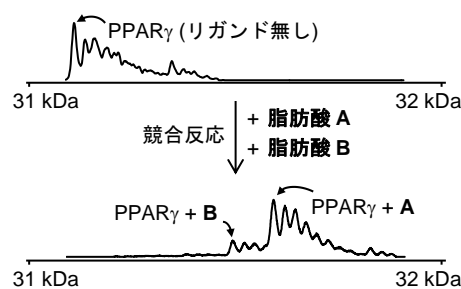


Fig. 2. ESI-MS による共有結合試験

第二章 17-oxoDHA と PPAR α および γ の結合様式の解明

17(S)-ヒドロキシドコサヘキサエン酸は炎症収束作用を有することが知られている。著者は、その酸化代謝物である 17-オキソドコサヘキサエン酸 (17-oxoDHA) (Fig 3) に着目し、PPAR α 、 γ および δ を介した転写活性を評価した。その結果、17oxoDHA は PPAR α と γ を共に活性化するデュアルアゴニストであることが判明した。また、ESI-MS を用いて PPAR α -LBD と PPAR γ -LBD に対する共有結合性を検討した結果、PPAR α および γ に共有結合することが明らかになった。変異体実験を

行い PPAR α -LBD における共有結合部位を検討した結果、Cys275 であることが示唆された。さらに、PPAR α -LBD/17-oxoDHA 複合体の X 線結晶構造解析を行った結果、17-oxoDHA は Cys275 と共有結合を形成し、活性化に重要なヘリックス 12 と相互作用していることが明らかになった (Fig 4)。

以上の結果から、17-oxoDHA は、PPAR リガンドとして既存の分類に属さない α と γ の共有結合型デュアルアゴニストであることが明らかになった。

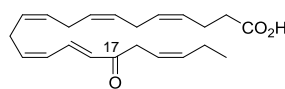


Fig. 3. 17-oxoDHA の構造

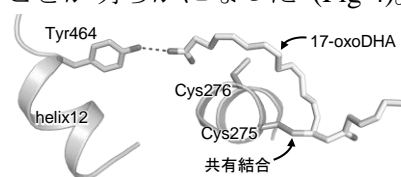


Fig. 4. PPAR α と 17-oxoDHA の結合様式

第三章 ビタミン D 受容体とコアクチベーターペプチドの結合親和性および相互作用様式の解明

VDR-LBD とコアクチベーターペプチドの相互作用について検討した。VDR は種々のコアクチベーターと相互作用するにもかかわらず、VDR-LBD の結晶構造解析には従来 DRIP205 ペプチドが用いられてきた。そのため、他のコアクチベーターペプチドの親和性や結合様式は未解明であった。著者は、DRIP205 ペプチドと SRC ペプチドを合成し、アゴニスト共存下における VDR-LBD への結合親和性を測定した。その結果、二種のコアクチベーターペプチドの親和性は大きく異なることが判明した。

結論

本研究は、従来研究が困難であったリガンドの共有結合における反応性の評価法を提案するとともに、共有結合型医薬品の設計に関する有益な知見を与える。さらに、コアクチベーターの種類により親和性が大きく異なるという知見は、核内受容体に対するコアクチベーターのリクルート制御を指向した医薬品やペプチドミミック型医薬品の創製研究へ貢献できる。

本研究の誌上発表

Egawa, D.; Itoh, T.; Yamamoto, K. Characterization of Covalent Bond Formation between PPAR γ and Oxo-Fatty Acids. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (4), 690–698.