

# PPAR $\gamma$ と脂肪酸の共有結合形成に関する研究

## Study of PPAR $\gamma$ in Covalent Bond Formation with Fatty Acids

江川大地、伊藤俊将、山本恵子\*

昭和薬科大学 医薬分子化学研究室, 〒194-8543 町田市東玉川学園 3-3165

Daichi Egawa, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto

Laboratory of Drug Design and Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, 3-3165

Higashi-Tamagawagakuen, Machida, 194-8543, Japan

### 1 はじめに

核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は 2 型糖尿病治療薬であるピオグリタゾンの標的分子として知られている。当研究室では 4-オキソドコサヘキサエン酸 (4-oxoDHA) が PPAR $\gamma$  を活性化すること、また PPAR $\gamma$  と共有結合を形成することを報告した[1]。4-oxoDHA 以外に PPAR $\gamma$  を活性化するオキソ脂肪酸としては 5-oxoEPA、13-oxoODE、15d-PGJ<sub>2</sub> などが知られているが、PPAR $\gamma$  とこれらオキソ脂肪酸との反応性に関する研究は進んでいない。どのような脂肪酸が PPAR $\gamma$  と共有結合しやすいか検討するため、そこで、種々の脂肪酸を用いて PPAR $\gamma$  との共有結合形成反応に関して研究した (図 1)。

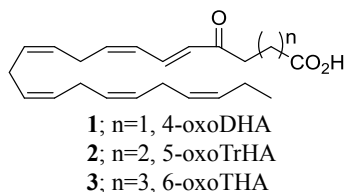


図 1 : オキソ脂肪酸

### 2 実験

3 種のオキソ脂肪酸 (4-oxoDHA、5-oxoTrHA、6-oxoTHA) を対象にした PPAR $\gamma$ /脂肪酸の結晶構造解析及びルシフェラーゼアッセイを行った。大腸菌で発現させた PPAR $\gamma$ -リガンド結合ドメイン (PPAR $\gamma$ -LBD) を精製し、Hanging drop 法を用いて、5-oxoTrHA と 6-oxoTHA の共結晶化を試みたところ良好な結晶を得たので、高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折データを取得した。さらに、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を用いて、PPAR $\gamma$ -LBD と種々の脂肪酸の共有結合を競合させることにより反応性を比較した。

### 3 結果および考察

デュアルルシフェラーゼアッセイの結果、これらのオキソ脂肪酸は濃度依存的に PPAR $\gamma$  を活性化するパーシャルアゴニストであることが明らかとなった (図 2)。

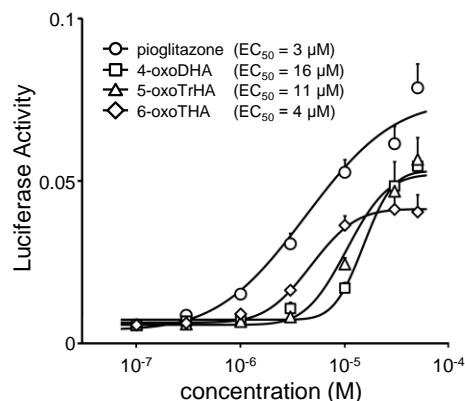


図 2 : オキソ脂肪酸の遺伝子転写活性

X 線結晶構造解析の結果、PPAR $\gamma$ /5-oxoTrHA 複合体は 2.3 Å、PPAR $\gamma$ /6-oxoTHA 複合体は 2.4 Å で構造情報を得ることができた。解析の結果、いずれの結晶も活性型構造である分子 A と非活性型構造である分子 B から構成される、PPAR $\gamma$ -LBD ホモダイマーであることが明らかとなった (図 3 A-D)。また、5-oxoTrHA と 6-oxoTHA はいずれも PPAR $\gamma$  の Cys285 と共有結合を形成していたが、分子 A と分子 B で異なる結合様式を取っていた。いずれのオキソ脂肪酸も分子 A では、PPAR $\gamma$  の転写活性化に重要である helix 12 と水素結合を形成するアゴニストフォームで helix 3 と垂直に結合していたが (図 3 E, G)、分子 B では他のパーシャルアゴニストで報告されている [2]、helix 12 と相互作用せず helix 3 と平行して結合するパーシャルアゴニストフォームで結合していた (図 3 F, H)。

5-oxoTrHA と 6-oxoTHA は、分子 A との結合様式であるアゴニストフォームと分子 B との結合様式であるパーシャルアゴニストフォームが平衡で存在することにより、パーシャルアゴニスト活性を示すことが示唆された。

さらに、4-oxoDHA、5-oxoTrHA、6-oxoTHA に加え、5-oxoEPA、6-oxoOTE、9-oxoODE、13-oxoODE などを含めた種々のオキソ脂肪酸を用いて、ESI-MS による競合実験により比較した結果、6-oxoTHA が上記の脂肪酸で最も共有結合の反応性が高いことが示された。オキソ脂肪酸の反応性はそれぞれ異なり、

共有結合反応部位が Cys285 から共役付加を受ける適切な位置をとることが、反応性に重要であることが示唆された。すなわち、6-oxoDHA が最も反応性が高くなったのは、カルボン酸から反応部位である共役ジエノンまでの距離や共役ジエノン周囲の柔軟性などが最適であるからと考えられる。

以上の知見をもとにサブタイプへの展開を行った結果、サブタイプ間で共有結合しやすい脂肪酸が異なることが明らかになった。

#### 4 まとめ

5-oxoTrHA と 6-oxoTHA は PPAR $\gamma$  のパーシャルアゴニストであり、その活性はアゴニストフォームとパーシャルアゴニストの平衡により生じていることが示唆された。さらに、6-oxoTHA は PPAR $\gamma$  との共有結合の反応性が高く、それは反応部位が適切な位置を取れることに要因があると示唆された。本研究により、これまでほとんど比較されてこなかった PPAR $\gamma$  とオキソ脂肪酸の反応性を比較・評価することができた。[3]

#### 謝辞

X線回折強度データ測定においては、PF スタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

#### 参考文献

- [1] T. Itoh *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* **15**(9), 924 (2008)
- [2] Bruning, J. B. *et al.*, *Structure* **15**, 1258 (2007)
- [3] D. Egawa *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **26**(4), 690 (2015).

#### 成果

1 日本薬学会第 134 年会優秀発表賞 (口頭発表)

[\\*yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp](mailto:yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp)

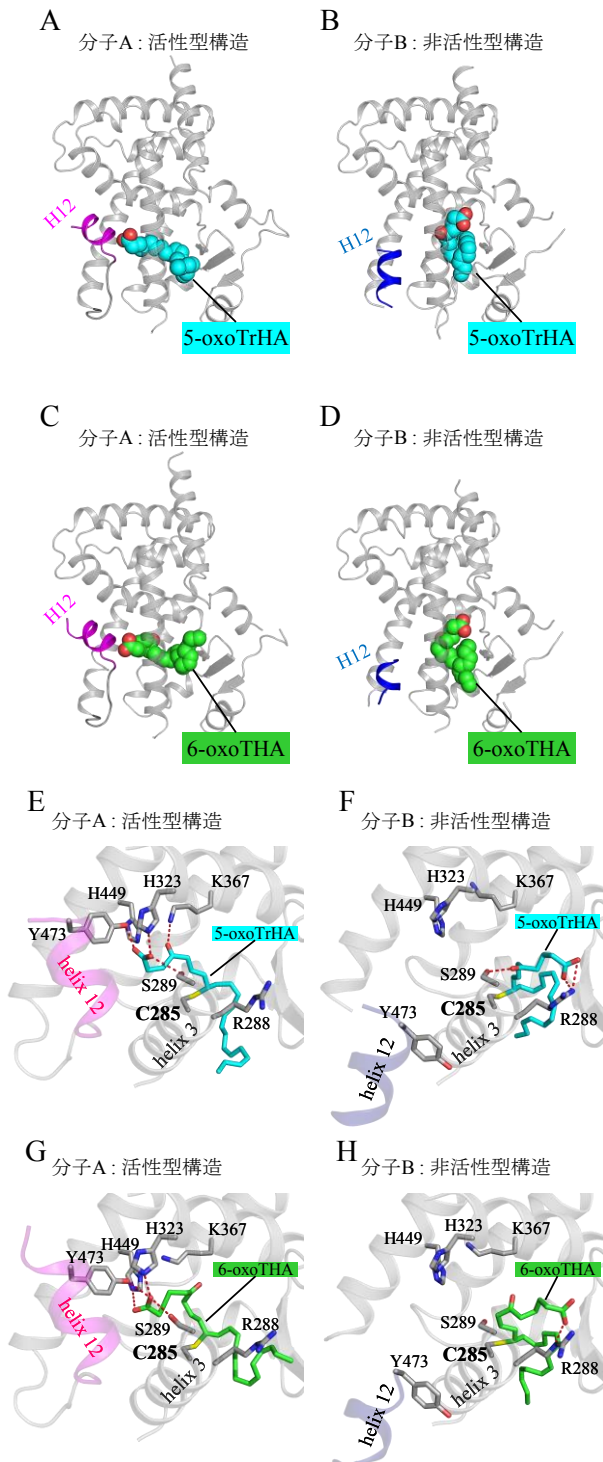


図 3 : PPAR $\gamma$ /5-oxoTrHA 複合体と PPAR $\gamma$ /6-oxoTHA 複合体の結晶構造