

# PPAR $\gamma$ /17-oxoDHA および PPAR $\alpha$ /17-oxoDHA の共結晶構造 Crystal structures of PPAR $\gamma$ /17-oxoDHA and PPAR $\alpha$ /17-oxoDHA

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

Toshimasa Itoh, Daichi Egawa, 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

近年、ドコサヘキサエン酸 (DHA) をはじめとする高度不飽和脂肪酸の酸化体が炎症に寄与することが明らかになってきた。17-HDHA は Specialized pro-resolving mediator の一つであり、母乳にも多く含まれていることが示されている。

一方我々は、DHA の酸化体の一つである 4-oxoDHA (図 1) が 2 型糖尿病治療薬の標的分子である PPAR $\gamma$  と共有結合を形成し、*in vivo* で血糖値改善作用を示したことを報告している。図 1 に示す 17-oxoDHA は 17-HDHA からさらに酸化が進んだ 4-oxoDHA の異性体である。

我々は、リピッドセンサーの役割を果たしている、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PPAR $\delta$  の各サブタイプに着目し 17-oxoDHA に活性化能があるかどうか検討を行った。

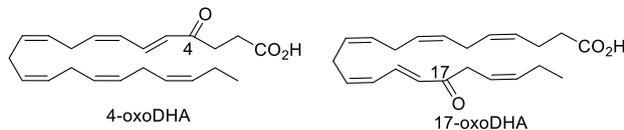


図 1. 4-oxoDHA と 17-oxoDHA の構造

## 2 実験

PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PPAR $\delta$  の各サブタイプに対し、4-oxoDHA と 17-oxoDHA の遺伝子転写活性化能を比較した。共有結合の形成は、ESI 質量分析にて行った。PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  と 17-oxoDHA の共結晶化にそれぞれ成功した。得られた共結晶の回折データは高エネルギー加速器研究機構にて収集した。

## 3 結果および考察

PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PPAR $\delta$  に対する遺伝子転写活性化能を評価したところ、4-oxoDHA は PPAR $\gamma$  のみ活性化したが、17-oxoDHA は、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  を活性化した。すなわち、17-oxoDHA は PPAR $\alpha/\gamma$  デュアルアゴニストであることが判明した。また、PPAR $\gamma$  の活性化能は中程度であることから 17-oxoDHA は PPAR $\gamma$  のパーシャルアゴニストであることが示された。

次に共有結合の形成について ESI 質量分析を用いて検討した。その結果、17-oxoDHA は PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  と共有結合することが明らかになった。

PPAR $\alpha$  には 2 つの Cys 残基がリガンド結合キャビティに存在する。そのため結合部位を同定する目的で、変異体 C275S および C276S を作成した。その結果、C276S では反応は 20 分で完結したものの C275S では、1 時間経過したところで共有結合の形成は 50% 弱にとどまった。

以上のことから PPAR $\alpha$  の結合部位は C275 であることが明らかになった。

次に PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  と 17-oxoDHA の共結晶化を試みた。PPAR $\gamma$ /17-oxoDHA の共結晶化は既知の条件で得られたが、PPAR $\alpha$ /17-oxoDHA の結晶化は既知の条件では得られなかった。そこで、安定化を図るため、コアクチベータペプチド (SRC1-2) を固相合成法により合成し、結晶化に用いた。その結果、PPAR $\alpha$ /17-oxoDHA/SRC1-2 の三者複合体の結晶を得ることができた。

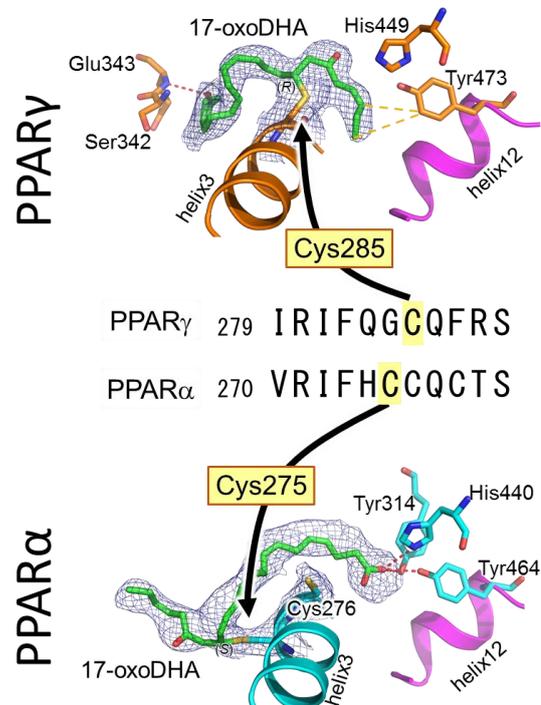


図 2 17-oxoDHA/PPAR $\gamma$  と

17-oxoDHA/PPAR $\alpha$  の共結晶構造

回折データを NW12A にて収集し、構造解析を行った。その結果、PPAR $\gamma$  では 17-oxoDHA が 4-

oxoDHA と同様に Cys285 と共有結合を形成していた。一方 PPAR $\alpha$  では PPAR $\gamma$  の結合部位の隣に位置する保存されていない Cys275 が 17-oxoDHA と共有結合を形成していた(図 2)。

本結合様式により遺伝子転写活性化能を次のように説明することができる。

核内受容体の遺伝子転写活性化はリガンド結合による helix12 の安定化により開始される。PPAR $\gamma$  は helix12 の Tyr473 がリガンドと水素結合により安定化されることで、強く活性化される。しかし、17-oxoDHA は水素結合可能なカルボン酸が反対方向を向いているため水素結合を形成できず、helix12 が十分安定化されない。従って 17-oxoDHA は、PPAR $\gamma$  のパーシャルアゴニスト活性を示したと考えられる。

一方、PPAR $\alpha$  では helix12 と水素結合を形成していた。これは 17-oxoDHA の共有結合部位が Cys275 であるためと考えられる。従って helix12 の強い活性化に反映されたものと考察される。

#### 4 まとめ

副作用の少ない 2 型糖尿病治療薬開発の方向性として、2つの PPAR 作動薬が提案されている。一つは PPAR $\gamma$  のパーシャルアゴニストであり、もう一つは PPAR $\alpha/\gamma$  デュアルアゴニストである。17-oxoDHA はその 2 つを満たすだけでなく、効果の持続が期待される共有結合型である。また、17-oxoDHA は PPAR $\alpha$  と共有結合が確認された初めてのアゴニストである。さらに、我々は PPAR $\alpha$  と脂肪酸の初めての共結晶構造の解析に成功した。

#### 謝辞

X-線回折強度データ測定において、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] D. Egawa *et al.*, *ACS Chem. Biol.* in press DOI: : 10.1021/acscchembio.6b00338.

#### 成果

1. 日本薬学会 134 年会優秀発表賞 (江川大地、口頭発表)

\* yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp