

リガンド結合ポケットの特徴を利用した
新規共有結合性PPAR γ アゴニストの創製

大寺 杏奈

目次

要旨	2
略語表.....	4
序論	6
第一章	
GW9662と協調的にPPAR γ を活性化するパートナーリガンドの同定および結合様式の推定	
1-1 材料および方法	14
1-2 結果および考察	18
第二章	
GW9662と化合物1の推定結合様式に基づいたハイブリッドリガンドの構造設計と合成	
2-1 材料および方法	38
2-2 結果および考察	45
第三章 合成したハイブリッドリガンドのPPAR γ アゴニスト活性の評価と推定結合様式の解析	
3-1 材料および方法	50
3-2 結果および考察	53
まとめ.....	69
文献	71
謝辞	77

[要旨]

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) γ は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である。糖や脂質代謝等の様々な生理機能を有し、糖尿病を始めとする各種疾病との関連が指摘されている。PPAR γ フルアゴニストであるチアゾリジン誘導体は、糖尿病治療の臨床で使用されていたが、浮腫や腫瘍形成などの副作用が指摘されていることから、既存の化合物とは異なる新規な骨格構造を有する PPAR γ アゴニストが求められている。一方、PPAR γ のリガンドが結合するポケット (LBP) は複数のサブポケットから構成される Y 字型の空洞を有しており、その深さは他の核内受容体と比較して大きいことが知られる。近年、この Y 字型の空洞に、二つのリガンドが同時に結合することで、協調的に PPAR γ の活性化を引き起こすことが明らかにされた。本研究ではこの特徴に着目し、協調的な活性化を引き起こす二つのリガンドの組み合わせを同定したのち、両者の構造を融合させた単一の化合物を設計、合成するという方法論を立案した。本法を用いて、これまで PPAR γ と関連付けられてこなかった、化学構造の組み合わせを見出すことができれば、両者を融合させた構造の化合物を作成することで既知のものとは異なる新奇な化学構造を有する化合物の創出が期待できると考えた。

本研究では新規リガンド作成にあたり、PPAR γ アンタゴニストである GW9662 に着目した。GW9662 は PPAR γ のリガンド結合ドメイン (LBD) の Cys285 残基と、求核置換反応を介して共有結合を形成し、アゴニストの結合を競合的に阻害する。しかしそれ自体が PPAR γ を不活化するものではない。そこで、GW9662 と競合せず異なる部位に同時に結合し、協調的に PPAR γ を活性化するパートナーとなる化合物を同定した後、両者の構造を融合させたハイブリッドリガンドを設計、合成することとした。一般的に共有結合性薬剤は、その受容体構造を不安定化する場合が多いが、受容体構造を安定化させアゴニスト作用を示す化合物の創製を目指す試みは新規性がある。また、PPAR γ LBD の Cys285 残基に共有結合を形成しアゴニスト作用を示すオレイン酸誘導体が、糖尿病モデルマウスにおいて、チアゾリジン誘導体で懸念されている副作用を伴わずに血糖値降下作用を示すことが報告されていることから、新たな創薬シードの創出につながることを期待できると考えた。

種々の植物抽出液サンプルを探索源とし、PPAR γ リガンド依存的な転写活性化を評価するルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて GW9662 と協調的に PPAR γ の転写活性を増大させるパートナーリガンドのスクリーニングを行った結果、バンウコン (*Kaempferia galanga* L.) 根茎のメタノール抽出物が見出された。種々のクロマトグラフィーおよび各種スペクトル法により、その活性成分は、(E)-ethyl

3-(4-methoxyphenyl)acrylate (4-メトキシけい皮酸エチル) と同定された。さらに Molegro Virtual Docker を用いたドッキングシミュレーションにより、GW9662 結合時の PPAR γ LBP における 4-メトキシけい皮酸エチルの推定結合部位を明らかにした。得られた推定結合様式をもとに両化合物を融合させた構造の化合物を設計し、計 7 段階の反応により合成した。合成されたハイブリッドリガンドは、Cys285 残基への共有結合修飾を介して、 μM 以下の濃度で、PPAR γ をサブタイプ選択的に活性化した。ハイブリッドリガンドの推定結合様式をドッキングシミュレーションにより解析したところ、本化合物は PPAR γ LBD のヘリックス 3 の軸周辺に巻きつくような結合様式を取り得ることが示唆された。本推定結合様式は、内因性リガンドの一種である 15-oxo-eicosatetraenoic acid の結合様式を部分的に模倣する一方で、よりヘリックス 3 および Ω ループの周辺領域を安定化する可能性が考えられた。このことから、ハイブリッドリガンドは既存の共有結合性リガンドと一部異なる結合様式を取り得る新しいタイプの共有結合性アゴニストと示唆された。

以上より、本研究では PPAR γ の LBP の特殊性に着目した、新規リガンド開発のための新たな方法論を考案し、新奇共有結合性アゴニストの創製に成功した。創製された新奇アゴニストは、PPAR γ アンタゴニストとして知られる GW9662 のアニリン部位に疎水性構造を付加した化学構造を有し、これまでに報告されているアゴニストの骨格構造と大きく異なる。このことは、本手法が、創薬における重要な課題である候補化合物の化学構造の多様化に貢献し得ることを示唆している。今後は、今回創出された化合物の薬理活性評価を行うと共に、GW9662 とは異なるリード構造化合物等を用いることにより手法の一般性を検証していく必要がある。

略語

Ala	Alanine
Arg	Arginine
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
Cys	Cysteine
DBD	deoxyribonucleic acid binding domain
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
Dex	Dexamethasone
DHA	Docosahexaenoic acid
DMAP	N,N-dimethyl-4-aminopyridine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERR	Estrogen related receptor
FBDD	Fragment-based drug design
FBS	Fetal bovine serum
Gly	Glycine
His	Histidine
HR-ESI-MS	High resolution electrospray ionisation mass spectrometry
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
Ile	Isoleucine
LBD	Ligand binding domain
LBP	Ligand binding pocket
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole
MVD	Molegro Virtual Docker
NMR	Nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE	PPAR response element
PRDM16	PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16
RXR	retinoid X receptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Serine
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine)
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilane
TR-FRET	Time-resolved fluorescence resonance energy transfer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TZD	Thiazolidinedione
UAS	upstream activation sequence
15-oxo-ETE	15-oxo-5,8,11,13-(Z,Z,Z,E)-eicosatetraenoic acid
15d-PGJ ₂	15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2

[序論]

PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である (1)。PPAR の構造は A~F 領域から成っており、C 領域に DNA binding domain、E 領域に ligand binding domain を有し (Figure 0A)、内因性の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸などの低分子リガンドによって活性化される (2)。PPAR は RXR とヘテロ二量体として機能し、標的遺伝子プロモーター内に存在する PPRE 配列を認識・結合し、転写を制御する。リガンドの結合していない状態ではコリプレッサー複合体が結合しており、標的遺伝子の転写が抑制されている。一方、リガンドが結合することによって構造が変化し、コリプレッサー複合体が解離した後、コアクチベータ複合体が結合し、標的遺伝子の転写が促進される (3, Figure 0B)。

PPAR には異なった構造と機能を持つ PPAR α 、PPAR β/δ 、PPAR γ の三つのサブタイプが同定されている。そのうち、PPAR γ は、脂肪形成、グルコース代謝、マクロファージの機能に重要な役割を果たす (4-6)。さらに近年では、PPAR γ が標的遺伝子の転写調節を行うだけでなく、他の転写因子の安定化と分解についても重要な役割を果たすことが見出されている (7)。具体的には、アゴニストが結合した PPAR γ はユビキチン-プロテアソーム経路を介して、転写因子である PRDM16 の分解を抑制し、安定化する。この PPAR γ による PRDM16 の安定化は、白色脂肪組織内において褐色脂肪細胞へ分化誘導を引き起こし、エネルギー代謝を亢進させることが示された。これは、PPAR γ が白色脂肪細胞における脂肪蓄積を亢進するという過去の知見と異なるものであるが、この機能もアゴニスト依存的に調節されていると考えられている。このように PPAR γ アゴニストは、糖代謝および脂肪形成から脂質代謝まで、広く代謝に関する生理機能を制御することが示唆されている。

PPAR γ アゴニストによって調節される疾患として 2 型糖尿病・アテローム性動脈硬化・肥満が報告されている (8-10)。実際に PPAR γ の合成アゴニストであるピオグリタゾンやロシグリタゾン等のチアゾリジン誘導体は 2 型糖尿病の治療薬として、欧米や日本で承認された。しかしながら、これらの合成 PPAR γ アゴニストは、体重増加、浮腫、心不全等の副作用が報告されており (11, 12)、2 型糖尿病治療において、トログリタゾンは肝障害、ロシグリタゾンは心筋梗塞のリスクがそれぞれ指摘され、国内外で市場撤去、あるいは使用が制限される結果となった。そのため、多くの研究者がチアゾリジン誘導体に代わる、副作用の少ない新規 PPAR γ リガンド創製を目指し (13)、食品成分や、植物抽出物由来のアゴニストを同定している。これまでに、香辛料等に含まれるゲラニオール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオールなどのイソプレノイドアルコール (14)、ビールの苦み成分であるイソフムロン類 (15)、ローズマリーやセージに含

まれるカルノシン酸、カルノソールなどのフェノール系ジテルペン (16)、アピゲニン、クリシンなどのフラボノイド (17)、シアニジン (18) や甘草酢酸エチル抽出物に含まれるイソフラボン類 (19) などが PPAR γ アゴニストであることが報告されている (Figure 0C)。他にも Sauer らは、甘草 (*Glycyrrhiza foetida*) の食用根とマメ科植物 (*Amorpha fruticosa*) から PPAR γ アゴニストである amorfrutin を見出し、X線結晶構造解析で PPAR γ LBD における結合様式を特定するとともに、動物モデルを用いた実験によって、*in vivo* における amorfrutin の抗糖尿病効果を明らかにした (20)。

以上のように、PPAR γ アゴニストの生物学的および疾病治療の候補薬剤開発における重要性を考慮して、PPAR γ アゴニストの探索研究が進められているが、現在までに同定されている植物抽出物由来の PPAR γ アゴニストは Figure 0C に示されるように不飽和アルコール、もしくは芳香環にイソプレニル基を部分構造に有する構造が多く、化学構造の多様性に乏しい。また合成アゴニストでは、GQ-16 のようにチアゾリジン誘導体の構造に似たアゴニストなどが発見され (Figure 0D)、様々なリガンドが報告されているものの、臨床応用まで進行している化合物は多くない。そこで、より有効な化合物を見出すために、PPAR γ アゴニストの構造にさらなる化学的多様性を生み出すための新しいアプローチが求められている。

一方、PPAR γ のリガンドが結合するポケット (LBP) はヘリックス 3、 Ω ループおよび β シートの間領域 (Ω -pocket) を出入り口として、AF-2 領域 (AF2-pocket) まで広がる複数のサブポケットから構成される Y 字型の空洞を有している (Figure 0E)。その深さは約 1300 Å³ と他の核内受容体と比較して大きいことが知られる (6,21,22)。近年、この Y 字型の空洞に、二つのリガンドが同時に結合することで、協調的に PPAR γ の活性化を引き起こすことが明らかにされた。例えば、セロトニンと脂肪酸代謝物は AF-2 pocket と Ω -pocket にそれぞれ結合し、協調的に PPAR γ の転写活性を増加することが知られている (23)。本研究ではこの特徴に着目し、協調的な活性化を引き起こす二つのリガンドの組み合わせを同定したのち、両者の構造を融合させた単一の化合物を設計、合成するという方法論を立案した。本法を用いて、これまで PPAR γ と関連付けられてこなかった、化学構造の組み合わせを見出すことができれば、両者を融合させた構造の化合物を作成することで既知のものとは異なる新奇な化学構造を有する化合物の創出が期待できると考えた。

本研究では、上記の手法を用いた新規リガンド作成にあたり、PPAR γ のアンタゴニストである GW9662 (Figure 0F) に着目した。GW9662 は、その構造中に含まれる 5-クロロ-2-ニトロベンゼン基と、PPAR γ の Cys285 残基のチオール基の間で生じる求核置換反応を介して PPAR γ と共有結合を形成し、通常、他のアゴニストの結合を不可逆的

に競合阻害する (Figure 0G)。しかしながら、GW9662 はそれ自身で弱いアゴニスト活性を示し、リガンドが結合していない状態の受容体の活性化 (構成的受容体活性) を減弱させない、所謂インバースアゴニスト活性を持たないことが知られている (24)。そこで、GW9662 と競合しない部位に同時に結合し、協調的な活性化を導くパートナーとなる化合物を同定した後、両者の構造を融合させたハイブリッドリガンドを設計・合成することとした (Figure 0H)。

本研究で創出されるハイブリッドリガンドは GW9662 の化学構造を部分的に有するため、PPAR γ に対して共有結合を形成し、転写活性を制御する共有結合性 PPAR γ アゴニストとなることが予想される。共有結合を形成する PPAR γ アゴニストは、内因性リガンド以外にほとんど知られていない。内因性リガンドとして初期に同定された 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) はマイケル付加を介して Cys285 残基と共有結合し、共有結合依存的に転写の活性化を誘導する (25)。さらに、その他の内因性リガンドである 4-oxo-docosahexaenoic acid (4-oxo-DHA) もマイケル付加を介して、PPAR γ LBD 内の Cys285 残基と共有結合し、PPAR γ LBD の効率的な立体構造安定化を導き、転写の活性化を増大させることが報告されている (26)。一般的な共有結合性薬剤の多くは受容体タンパク質の活性を不活化する阻害剤であることを考慮すると、共有結合によって受容体構造を安定化させ、アゴニスト作用を示す化合物の創製を目指す試みは新規性があると考えられる。

また、生体内代謝物である酸化型不飽和脂肪酸 4-oxo-DHA が、不飽和脂肪酸と異なり、Cys285 残基との共有結合能を有し、PPAR γ を活性化する点から、細胞内の酸化型不飽和脂肪酸は共有結合によって認識される可能性が考えられる。つまり、本現象は生体調節ならびに細胞の恒常性維持へと導く、重要な応答と考えられており (23)、脂質代謝の観点から着目されている。しかし共有結合による PPAR γ タンパク質立体構造の変化の解析は進んでいる一方で、会合するコファクターや、応答する下流遺伝子、下流でどのような生体応答が調節されているのか等、共有結合による PPAR γ 活性化機構の解明は進んでいない。共有結合性アゴニストは、その希少性だけでなく、明らかにされてこなかった PPAR γ の新たな役割を解明する有用な研究ツールにもなりうる。

加えて、共有結合性の PPAR γ アゴニストは、チアゾリジン誘導体と異なる新しいタイプの抗糖尿病薬の創薬リードとして期待されている。Schopfer らはオレイン酸代謝物であるニトロ脂肪酸が PPAR γ LBD の Cys285 残基の共有結合性の調節を介して、PPAR γ を活性化および2型糖尿病と肥満のモデルである ob/ob マウスへの投与でインスリンとグルコースレベルを減少させることを明らかにした (27)。さらにチアゾリジン誘導体で懸念されている体重増加などの副作用も伴わないことから共有結合性の

PPAR γ アゴニストは抗糖尿病創薬の観点から興味深いターゲットとして考えられている。以上のことから、生物学のみならず、創薬の観点からも共有結合性の PPAR γ アゴニストは有望な研究対象と考えられる。

以上の研究背景に基づき、本研究では、LBP の特性に着目したアプローチにより、新規共有結合性 PPAR γ アゴニストの創製を目指し、以下の研究を行った。

第一章では、生物学的手法を用いて PPAR γ に対して GW9662 と協調的に活性化するパートナーリガンドを同定し、PPAR γ LBP における両者の結合様式を推定した。生体情報応答学分野卒業生の吉田光多郎氏の先行研究により、GW9662 と協調的に PPAR γ を活性化する低分子化合物として、*Kaempferia galanga* L. (*K. galanga* L.) 由来の化合物が同定されている (47)。吉田氏は、*K. galanga* L.のメタノール抽出物の弱い PPAR γ アゴニスト活性、および GW9662 共存下でその活性が増強することを見出した。レポーターアッセイ系における PPAR γ アゴニスト活性を指標に分離・精製を行い、2種の化合物を単離し、各種スペクトル法により、各々 (*E*)ethyl-3-(4-methoxyphenyl)acrylate (4-メトキシけい皮酸エチル) および (*E*)ethyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate (3,4-ジメトキシけい皮酸エチル) と同定している。本研究では、*K. galanga* L.抽出物を含む複数の植物抽出液を探索源として広くスクリーニングを行い、GW9662 と協調的な活性化を示すパートナーリガンドとなる化合物の探索を行うとともに、PPAR γ LBP における両化合物の結合様式を推定した。

第二章では、その推定結合様式を模倣する両者の構造を融合させた化合物を設計、合成した。第三章では合成した化合物の Cys285 残基に対する共有結合能と、共有結合依存的な PPAR γ の転写活性を検証した。さらに、ドッキングシミュレーションを用いて、推定結合様式の解析を行い、既存の共有結合性アゴニストである、内因性の酸化型不飽和脂肪酸の結合様式との比較を行った。

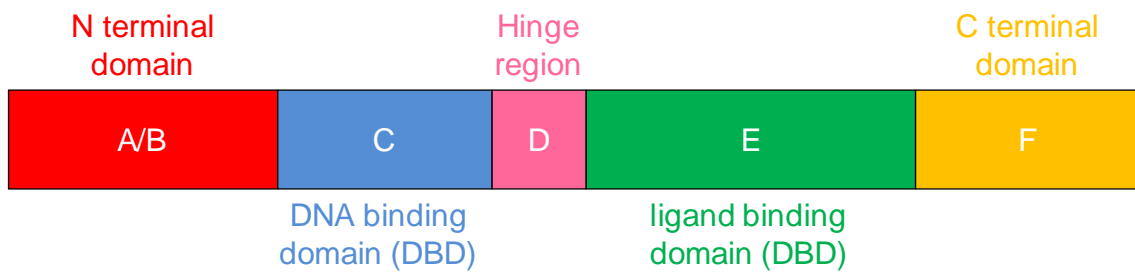


Figure 0A. PPAR の領域構造 (模式図)

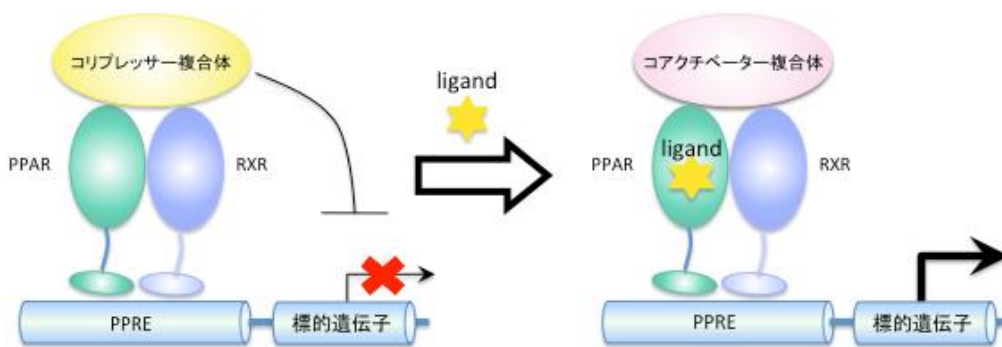


Figure 0B. PPAR による転写制御メカニズム

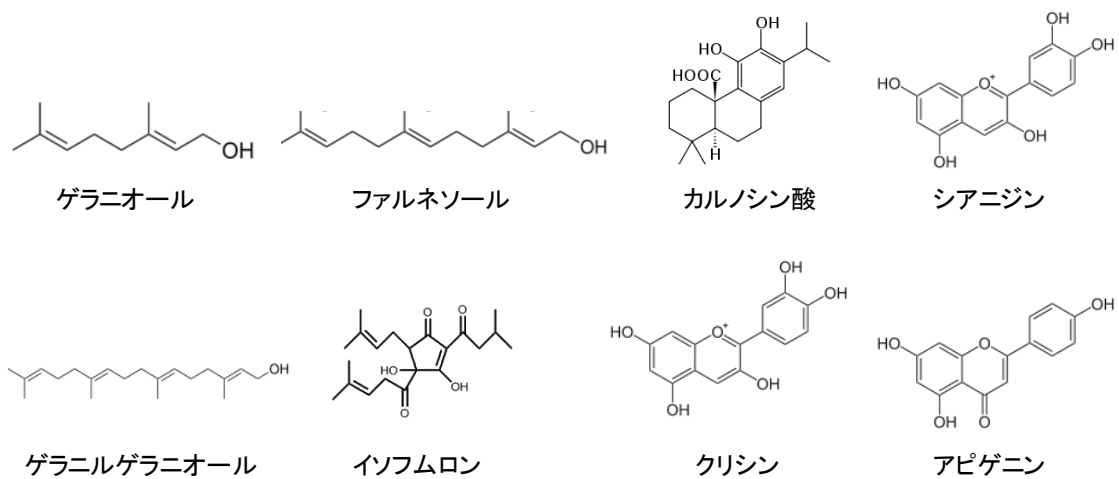
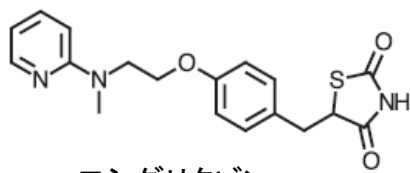
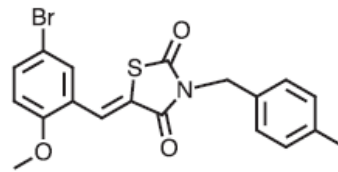


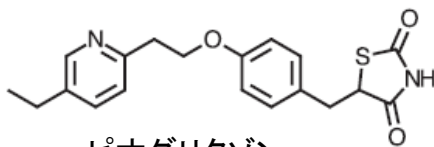
Figure 0C. 食品および植物由来の PPAR γ アゴニストの構造式



ロシグリタゾン



GQ-16



ピオグリタゾン

Figure 0D. 合成アゴニストの構造式

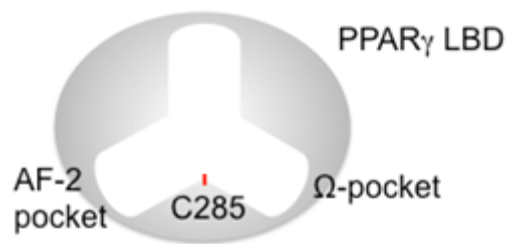


Figure 0E. PPAR γ LBD における PPAR γ LBP の模式図

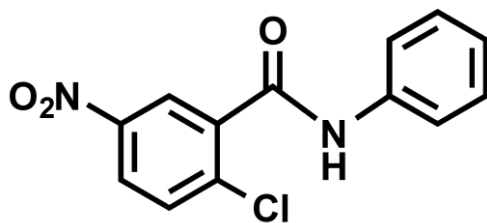


Figure 0F. GW9662 の構造式

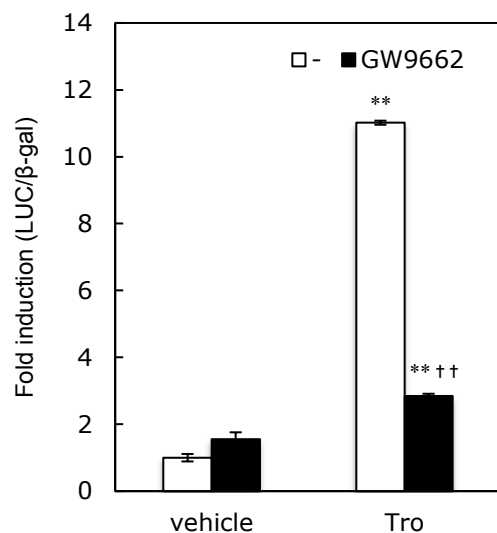


Figure 0G. PPAR γ アンタゴニスト GW9662 によるトログリタゾンの活性阻害

GW9662 とトログリタゾン (Tro) を 6 時間添加したところ、トログリタゾン (10 μ M) の PPAR γ 転写活性が GW9662 (10 μ M) によって阻害された。PPAR γ の転写活性はルシフェラーゼレポーターアッセイによって測定した。レポーターアッセイは HepG2 細胞を用いて pGal4 DBD-humanPPAR γ LBD、pUAS-tk-Luc、pact- β Gal プラスミドをトランスフェクションし、一過性で発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクション効率の補正のため、ルシフェラーゼ活性を β -ガラクトシダーゼ活性で標準化した。vehicle として DMSO を用いて、終濃度 0.1 %とした。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有差; ** $p < 0.01$ 。GW9662 処理群との有差; †† $p < 0.01$ 。

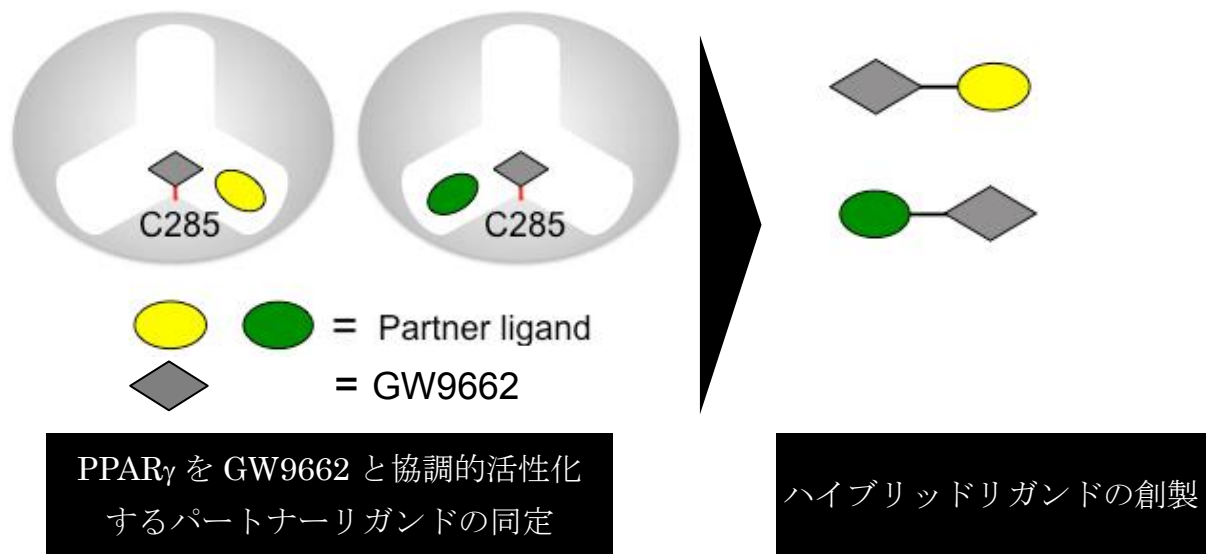


Figure 0H. 本研究で提案する新規リガンド開発のためのアプローチ

共有結合性リガンドである GW9662 と競合しない部位に同時に結合し、協調的な活性化を導くパートナーリガンドとなる化合物を同定、両者の構造を融合させたハイブリッドリガンドを設計・合成することにより、新規共有結合性アゴニストを創出するアプローチ方法

第一章

「GW9662 と協調的に PPAR γ を活性化するパートナーリガンドの同定および結合様式の推定」

本章では、PPAR γ に対するアゴニスト活性を生物学的手法によって評価し、GW9662 と協調的に活性化するパートナーリガンドを同定した。また GW9662 とパートナーリガンドの PPAR γ に対する結合様式の推定も行った。

[1-1 材料および方法]

スクリーニングに用いた植物抽出液

日本新薬株式会社 当時食品研究所 (現、山科植物資料館)の秋田徹博士より提供していただいた 105 種の植物抽出液 (メタノール抽出物、30 mg/ml で DMSO に溶解) をスクリーニングに用いた (Table 1)。

化合物 1 および 2

Kaemferia galanga L.からの化合物 1 および 2 は生体情報応答学分野卒業生である吉田光多郎氏が単離・同定した化合物を用いた (47)。

HepG2細胞の培養

ヒト肝星細胞株 HepG2 (RCB1886, RIKEN BRC) は、10% fetal bovine serum (FBS, biowest)、1% penicillin-streptomycin (penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 μ g/mL, Gibco)を添加した高グルコース、グルタミン、フェノールレッド、およびピルビン酸ナトリウムを含有する Dullbecco's modified eagle medium (DMEM, Wako) にて 37 $^{\circ}$ C、5 % CO $_2$ で培養した。増殖状態を確認しながら、ディッシュ内 80 %コンフルエントの状態のときに以下の手順で継代を行った。Ca $^{2+}$ 、Mg $^{2+}$ を含まない PBS (-) で細胞表面を洗浄し、2.5 g/l Trypsin / 1 mM EDTA (Nacalai Tesque) を添加して細胞をディッシュから剥離した。培地を添加して、剥離反応を停止すると共に細胞を懸濁させた後、懸濁した細胞溶液を再度ディッシュに播種した。継代数はおよそ 15 代まで使用した。

プラスミドの調製

pSG424 (28, 29) の GAL4 DNA binding domain (DBD) (1-147) に *Bam*HI および *Sa*I 部位で、mouse 由来 PPAR γ LBD を組み込み、pSG424-mPPAR γ LBD を構築した。

レポータープラスミドとして GAL4 DBD の応答配列である 2 copy の 17mer

upstream sequence (UAS)と thymidine kinase gene promoter (tk-promoter) を luciferase c DNA の上流に有する pUAS-tk-luc (28, 30) を用いた。トランスフェクション効率の標準化に *pactβ-gal* (28) を用いた。

pCMX-GAL4-hPPAR γ 、pCMX-GAL4-hRXR α 、pCMX-GAL4 は京都大学大学院生命科学研究所 垣塚彰博士より供与いただいた。pCMX-GAL4-hPPAR γ LBD の Cys285 残基を Ala および Ser に置換した pCMX-GAL4-hPPAR γ LBD C285A 変異体および pCMX-GAL4-hPPAR γ LBD C285S 変異体は KOD plus Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて作製した。DNA シーケンス解析を FASMAC に依頼し、上記の変異が入っていることを確認した。

各プラスミドの調製にあたり、大腸菌 DH5 α (TOYOBO) を用いて形質転換させた。pSG424-mPPAR γ LBD、pUAS-tk-luc、*pactβ-gal*、pCMX は全て Ampicillin 耐性遺伝子を有するため、セクションには Ampicillin を 50 μ g/ml の濃度で添加して用いた。形質転換後、LB 培地を用いて 37°C で培養した。培養液を 7000 x g で 10 分遠心分離し、菌体を回収した後、NucleoBond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL) を用いてアルカリ-SDS 法でプラスミドを精製した。

ルシフェラーゼアッセイによる PPAR γ 協調的活性化評価

HepG2 を 60 mm ディッシュに 1.8×10^6 cells /dish の濃度で播種し、一晚培養した。下記のいずれかのプラスミド (pSG424-mPPAR γ LBD、pCMX-GAL4-hPPAR γ 、pCMX-GAL4-hRXR α 、pCMX-GAL4、または pCMX-GAL4-hPPAR γ LBD C285A (S)) 4 μ g、pUAS-tk-luc 4 μ g、*pactβ-gal* 1 μ g を Hily Max (同仁)を用いて添付のマニュアルに従って同時にトランスフェクションした。10 時間培養後、 2.0×10^5 cells /dish の濃度で 24 well プレートに播種し、一晚培養した。トランスフェクションしてから 24 時間後に試料を添加し、その後 6 時間培養した。細胞を PBS で洗浄し、Passive lysis Buffer (Promega) を 0.1 ml 滴下し、室温で 15 分間震盪し、細胞溶液を試料溶液とした。

ルシフェラーゼアッセイは Luciferase Assay System (Promega) を用いて Lumat³ LB9508 (Berthold) により測定した。 β -ガラクトシダーゼアッセイは以下の方法で行った。試料溶液を 20 μ l と 2X バッファー (0.4 M NaPi (pH7.5)、0.2 M 2-メルカプトエタノール、40 mM KCl、4 mM MgSO₄) 100 μ L、MilliQ 水 80 μ L を 96 穴プレートのウェル内で混合し、37°C で 2 時間インキュベートした後、595 nm の吸光度を測定した。

PPAR γ リガンド活性のポジティブコントロールとして用いた PPAR γ アゴニストのトログリタゾン、Wako より購入し、DMSO に 10 mM の濃度になるよう溶解し、試

料添加時に培養培地で希釈して用いた。

PPAR γ アンタゴニスト GW9662 を Cayman Chemical Company より購入し、DMSO に 10 mM の濃度になるよう溶解し、試料添加時に 培養培地で希釈して用いた。

hPPAR γ 組換え体タンパク質の発現および精製

山梨大学 大山拓次博士より、以下の方法によって発現、精製した hPPAR γ LBD の組み換えタンパク質を供与頂いた。発現ベクターとして pET28a-hPPAR γ LBD を使用し、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換した大腸菌に、イソプロピル β -D-チオガラクトシド (IPTG) を加えてタンパク質発現を誘導した後、回収し、精製を行った。精製と His タグの切断は、菌体破碎、ポリエチレンジアミン処理、硫酸沈殿、ニッケルキレートカラムグラフィーによる粗精製を行った後、トロンビン処理により、His タグを切断した。さらにベンザミジンカラムで残存したトロンビンを除去、ニッケルキレートカラムグラフィーで His タグが切断されていないタンパク質を除去した後、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。精製した組換え体タンパク質は、20 μ M (20 mM Tris-HCL pH8.0、100 mM NaCl、2 mM EDTA pH 8.0、1 mM TCEP pH8.0、10% Glycerol) となるように調製し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

ローダミンマレイミドアッセイ

20 μ M hPPAR γ 組換え体タンパク質をバッファー (20 mM Tris pH8.0、100 mM NaCl、2 mM EDTA pH 8.0、1 mM TCEP pH8.0) で 2 μ M となるよう希釈した。この 2 μ M hPPAR γ 組換え体タンパク質 18 μ L に、各サンプル 10 x 溶液を 2 μ L 添加し、30 分室温で静置した。その溶液に 10 % SDS 1 μ L、10 mM ローダミンマレイミド 2.5 μ L を加え、30 分室温で静置した。その後、還元剤を含有した 6 倍濃縮の試料緩衝液 (Nacalai Tesque) を加え、55 $^{\circ}$ Cで 30 分間熱変性させ、SDS-PAGE 用の試料とした。SDS-PAGE 用の試料 10 μ L を 10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて、20 mA 一定で 1 時間電気泳動し、LAS-1000 plus Image Analyzer (Fujifilm)を用いて蛍光を検出した。分子量マーカーには WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (Wako) を用いた。

Molegro Virtual Docker を用いた結合様式の推定

Molegro Virtual Docker ver.6.0.1 (Molegro Aps) を用いて、ソフトウェアのマニュアルに従い、化合物の PPAR γ リガンド結合ポケット (LBP) に対する結合部位を推定した。化合物 1、4-メトキシけい皮酸、ルテオリンと GW9662 の結合解析にあたって、

GW9662 が結合した human PPAR γ LBD (PDB code: 3B0R) の結晶構造を用いた。ソフトウェア上で、結晶構造中の GW9662 をコファクターに変換し、GW9662 が結合した PPAR γ LBD に化合物 **1**、4-メトキシけい皮酸、ルテオリンをリガンドとしてドッキングさせ、推定結合様式の解析を行った。

なおドッキングシミュレーションで用いたリガンドの構造式は Marvin Sketch 5.11.5 を用いて作成した。またリガンドの結合部位および結合ポケットの容量は Molegro 社の cavity detection algorithm に従って算出した。

統計解析

全てのデータは平均値を示し、エラーバーで標準偏差を表した。t 検定により、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差ありとした。

[1-2 結果および考察]

パートナーリガンドのスクリーニング

GW9662 と協調的に PPAR γ を活性化するパートナーリガンドを探索するために、日本新薬株式会社からご供与いただいた植物抽出液サンプル 105 種を用いてスクリーニングを行った。植物抽出液サンプルに含まれる天然化合物やその類縁体は、植物体内で生合成され、化学多様性に富む低分子天然化合物を非常に多く含む。よって植物抽出物などの天然物抽出物は「構造の多様性を有した化合物のプール」とみなすことができ、これらの天然化合物を用いることによってスクリーニングの探索規模を縮小することが可能になると考えた。実際に、天然物抽出物をスクリーニング源として用いたリガンドやフラグメントの探索は行われており、主にマスマスペクトロメトリーを用いた生物物理学的な手法が採用されている (31, 32)。

PPAR γ 転写活性化能は以下のように HepG2 細胞を用いた活性試験のもと、定量的に測定した。pCMX-GAL4-hPPAR γ プラスミドを用いて GAL4 の DNA 結合ドメインと PPAR γ のリガンド結合ドメインのキメラタンパク質を、GAL4 標的配列の UAS ドメインを上流に持つルシフェラーゼレポータープラスミド UAS-tk-Luc を用いてルシフェラーゼを発現させた。アゴニストを加えた場合のルシフェラーゼ発現量を、PPAR γ 転写活性化能として相対定量化した (28)。このアッセイ系において、トログリタゾンは vehicle の 10 倍程度活性を示した。その合成アンタゴニストである GW9662 によってトログリタゾンの活性が阻害されていることから、本研究で用いたレポーターアッセイ系が正常に機能していると判断した (Figure 0G)。

植物抽出液サンプルを用いたスクリーニングにおいては、抽出液サンプルと GW9662 共処理時の PPAR γ アゴニスト活性値を、抽出液単独処理時の PPAR γ アゴニスト活性値で除した値 (増強比率) を指標に判別を行った。スクリーニングに用いた 105 種類の植物抽出物のうち、10 種類のサンプルにおいて、単独処理時に比べて GW9662 共処理時にアゴニスト活性が 2 倍以上増強することが見出された。そのうち、SampleID 4138 の食用植物バンウコン (*Kaempferia galanga* L.) 根茎のメタノール抽出物が、最も高い増強比率を示した (Table 1)。

序論で記載したように、生体情報応答学分野卒業生の吉田光多郎氏の先行研究により、*K. galanga* L. のメタノール抽出物の弱い PPAR γ アゴニスト活性および GW9662 共存下でその活性が増強することが見出されている (47)。また吉田氏により *K. galanga* L. のメタノール抽出物より酢酸エチル層および水層への分画が行われた。さらに種々のクロマトグラフィーを用いて酢酸エチル層の分離および精製が行われ、GW9662 と協調的に PPAR γ を活性化する化合物として、(*E*)ethyl-3-(4-methoxyphenyl)acrylate (4-メ

トキシけい皮酸エチル；化合物 **1**）および(*E*)ethyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate (3,4-ジメトキシけい皮酸エチル；化合物 **2**) が同定されている (Figure 1A)。本研究では、まず、吉田氏によって、メタノール抽出物を酢酸エチルおよび水を用いて分画することで得られた酢酸エチル層および水層の活性を確認したところ、酢酸エチル層に GW9662 との協調的な活性化を示す作用のあることを再確認した (Figure 1B)。さらに吉田氏によって精製された化合物 **1** および **2** を用いて、レポーターアッセイを行ったところ、両化合物とも、GW9662 共存下で濃度依存的に協調的な活性化を示すパートナーリガンドであることが明らかとなった (Figure 1C)。また化合物 **1** の協調的活性化は GW9662 の濃度に対しても依存したため (Figure 1D)、以後の実験では活性試験において最大反応を示す GW9662 10 μ M、化合物 **1** 100 μ M を最適濃度とみなして用いた。化合物 **1** と GW9662 は、ヒトまたはマウス由来の PPAR γ レポーターアッセイにおいて、生物種に関わらず同様の協調的活性化を示した。一方で、PPAR γ と核内で二量体を形成する RXR α や、レポーターアッセイで使用している Gal4 タンパク質単体にはアゴニスト活性を示さなかった (Figure 1E)。これらの結果からレポーターアッセイにおける化合物 **1** と GW9662 の共処理による協調的な活性は PPAR γ を介していることが明らかとなった。

Table1. 植物抽出液サンプル 105 種の GW9662 との PPAR γ 協調的活性

植物抽出液サンプル 105 種類の GW9662 との協調的な PPAR γ 活性化をレポーターアッセイにより評価した。各サンプルは 30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で用いた。vehicle として DMSO を用いて (終濃度 0.1 %)、vehicle を 1 とした時の相対値を表した。GW9662 と共処理の有無別に各サンプルの PPAR γ 転写活性を示した。

Sample ID として日本新薬株式会社より提供いただいた植物抽出液の ID を使用した。

sample ID	relative activity		ratio GW9662+/-	sample ID	relative activity		ratio GW9662+/-
	GW9662(-)	GW9662(+)			GW9662(-)	GW9662(+)	
vehicle	1.0	1.8	1.8	3899	1.3	1.6	1.3
Tro	14.9	2.1	0.1	970	1.3	1.6	1.3
4138	1.8	5.6	3.2	4211	1.8	2.3	1.3
1420	1.7	4.4	2.6	1251	1.5	1.9	1.3
3978	1.0	2.2	2.2	885	1.5	1.9	1.3
2500	1.6	3.5	2.2	227	2.7	3.3	1.2
1380	1.8	3.7	2.1	1832	4.6	5.6	1.2
1663	1.1	2.3	2.0	260	1.4	1.7	1.2
750	0.9	1.9	2.0	1958	0.8	0.9	1.2
1950	1.2	2.4	2.0	3766	2.0	2.5	1.2
2017	1.1	2.1	2.0	4039	1.1	1.4	1.2
799	1.3	2.6	2.0	14	2.7	3.2	1.2
1034	1.6	3.1	1.9	1708	3.9	4.5	1.2
408	1.4	2.7	1.9	3422	1.3	1.5	1.2
1526	1.0	1.8	1.9	2599	1.3	1.5	1.2
3225	1.3	2.5	1.8	2670	1.4	1.6	1.1
871	1.4	2.5	1.8	754	1.3	1.5	1.1
3353	1.5	2.6	1.7	2668	1.0	1.0	1.1
3204	1.5	2.6	1.7	3796	1.3	1.4	1.1
2780	1.0	1.7	1.7	1120	1.1	1.2	1.1
2454	1.0	1.6	1.7	2710	1.2	1.3	1.1
2278	1.3	2.3	1.7	984	1.3	1.4	1.1
2763	1.4	2.5	1.7	4215	1.3	1.4	1.1
777	1.3	2.3	1.7	1736	1.9	2.0	1.1
1585	1.3	2.1	1.7	1657	1.4	1.4	1.0
83	1.2	2.0	1.7	833	1.0	1.0	1.0
877	1.5	2.5	1.7	3504	1.8	1.7	1.0
339	1.6	2.6	1.6	3381	4.5	4.5	1.0
1208	1.3	2.1	1.6	4147	1.2	1.3	1.0
1440	0.9	1.5	1.6	4216	0.9	1.0	1.0
871	1.5	2.5	1.6	2394	1.5	1.5	1.0
312	0.8	1.2	1.6	1753	3.3	3.5	1.0
2509	1.4	2.2	1.6	1519	1.9	2.0	1.0
2469	1.7	2.7	1.5	3381	5.6	5.3	1.0
3	1.2	1.8	1.5	1529	2.2	2.2	1.0
1181	1.6	2.5	1.5	3872	2.1	2.1	1.0
2259	0.3	0.4	1.5	2294	1.6	1.6	1.0
1773	1.6	2.4	1.5	4207	3.0	2.9	1.0
1385	4.0	5.9	1.5	3545	2.0	1.9	1.0
1734	0.9	1.3	1.4	61	1.6	1.5	0.9
1388	4.8	6.9	1.4	2158	1.8	1.5	0.9
2593	1.4	2.0	1.4	4214	2.1	2.0	0.9
3099	1.4	2.0	1.4	1582	0.9	0.8	0.9
2229	1.7	2.4	1.4	627	2.0	1.7	0.9
3546	1.3	1.7	1.4	3622	1.7	1.4	0.8
1743	0.9	1.2	1.4	143	1.5	1.2	0.8
1385	5.5	7.4	1.4	13	2.4	1.9	0.8
2710	1.5	2.0	1.4	3129	2.2	1.7	0.8
511	1.3	1.9	1.4	399	2.6	1.8	0.7
2781	1.9	2.6	1.4	2493	1.6	1.1	0.7
356	1.1	1.5	1.4	238	3.2	2.2	0.7
2943	1.7	2.3	1.4	238	2.6	1.5	0.6
3890	0.9	1.2	1.3	2672	3.8	1.8	0.5
1708	4.3	5.7	1.3				

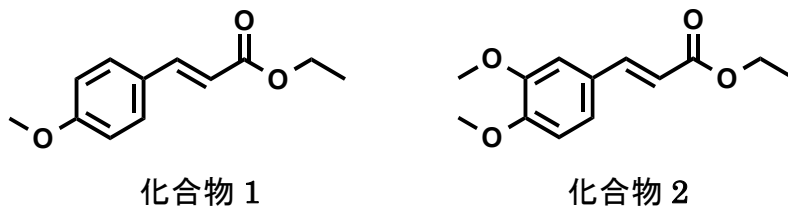


Figure 1A. 化合物 1、化合物 2 の構造式

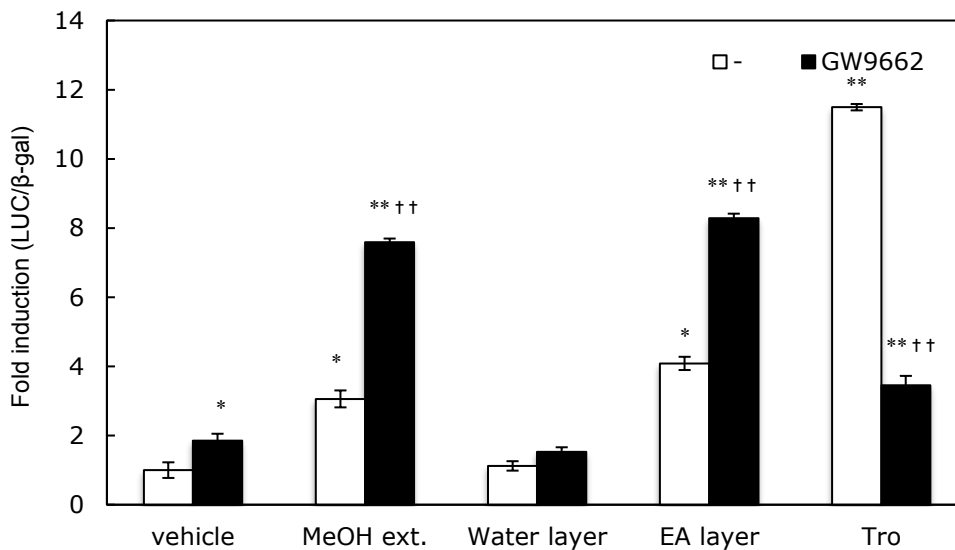


Figure 1B. バンウコン根茎のメタノール抽出物 (MeOH ext.)、酢酸エチル層 (EA layer)、水層 (Water layer) の GW9662 との PPAR γ 協調的活性化

バンウコン (*Kaempferia galanga* L.) 根茎のメタノール抽出物、酢酸エチル層、水層と GW9662 との PPAR γ 協調的活性化をレポーターアッセイにより検証した。メタノール抽出物を酢酸エチルおよび水を用いて分画した結果、得られた抽出物をそれぞれ酢酸エチル層および水層とした。各サンプル 30 μ g/ml、トログリタゾン (Tro) 10 μ M、GW9662 10 μ M の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662 処理群との有意差; †† p < 0.01。

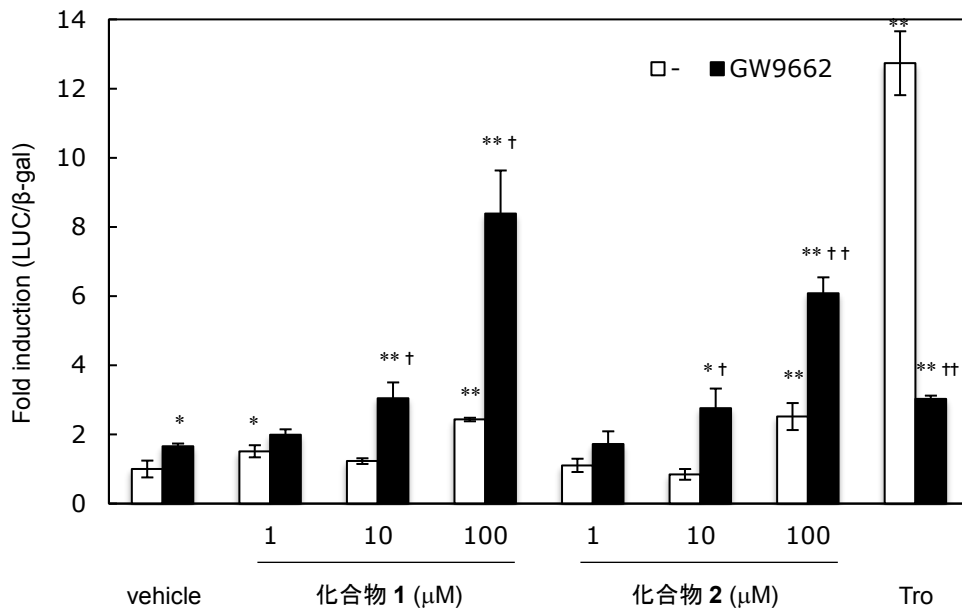


Figure 1C. 化合物 1 および化合物 2 の GW9662 との PPAR γ 協調的活性化

化合物 1 および化合物 2 の PPAR γ 協調的活性化をレポーターアッセイにより検証した。化合物 1 および化合物 2 とともに濃度依存的に GW9662 との協調的活性化を示した。トログリタゾン (Tro) 10 μ M、GW9662 10 μ M、化合物 1 および 2 (1、10、100 μ M) の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662 処理群との有意差; † p < 0.05 †† p < 0.01。

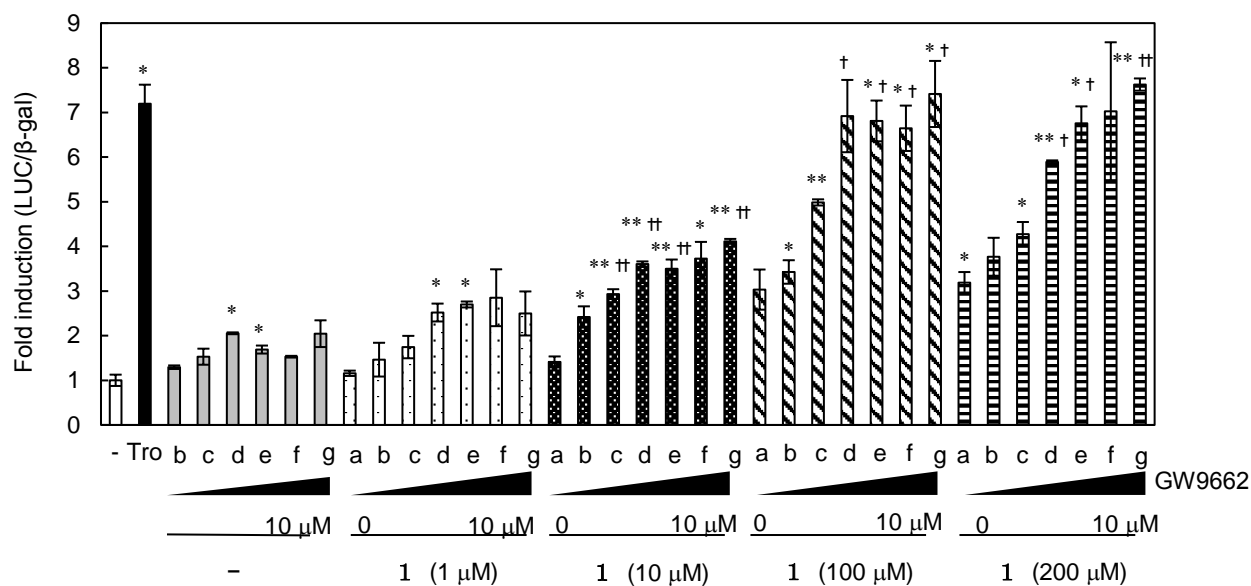


Figure 1D. PPAR γ 協調的活性化作用における GW9662 および化合物 **1** の用量応答性

GW9662に対する化合物**1**のPPAR γ 協調的活性をレポーターアッセイにより検証した。化合物**1** と GW9662ともに濃度依存的に協調的活性化を示した。vehicleはDMSOを終濃度0.1%、ポジティブコントロールはトログリタゾン (Tro) を10 μ Mの濃度で用いた。サンプルとして、化合物**1**を0、1、10、100、200 μ M、GW9662を0、0.1、1、10、100 nM、1、10 μ M の濃度で用いた。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicleとの有意差; * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662 処理群との有意差; † p < 0.05, †† p < 0.01。

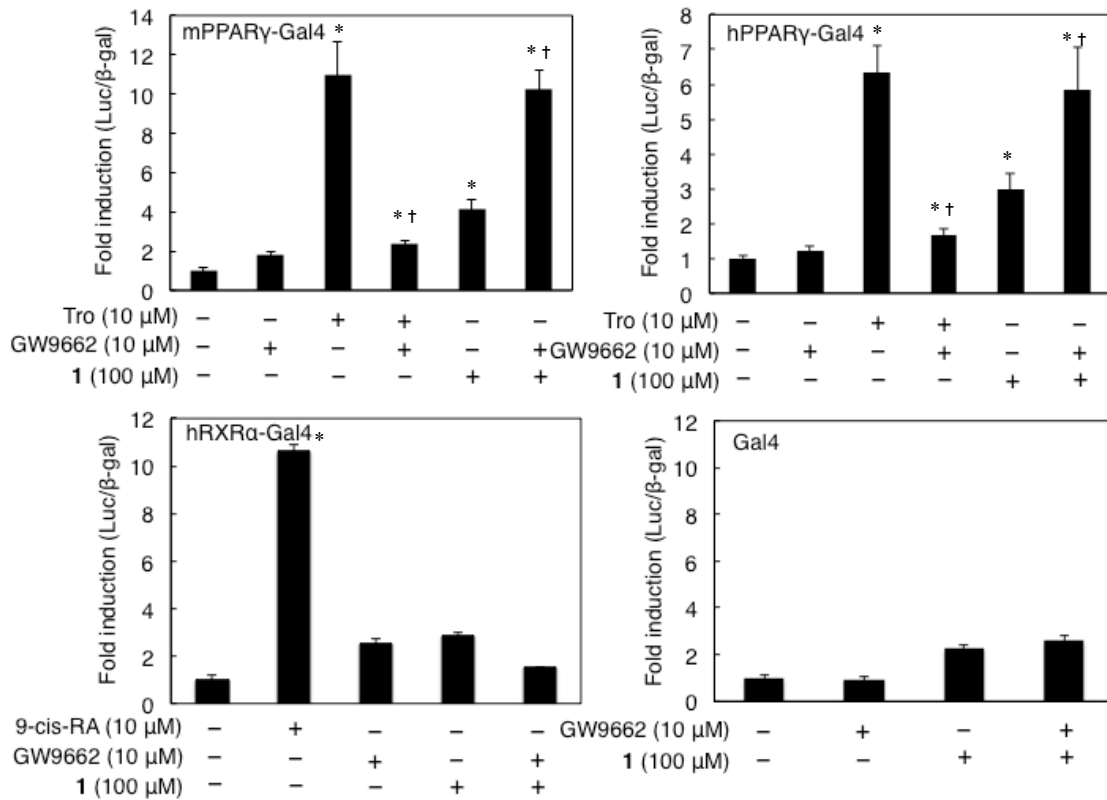


Figure 1E. 化合物 **1** と GW9662 のマウス由来・ヒト由来 PPAR γ および RXR α /Gal4 における協調的活性化の有無

化合物 **1** と GW9662 のマウス由来 PPAR γ (mPPAR γ)、ヒト由来 PPAR γ (hPPAR γ)、RXR α 、Gal4 単独それぞれに対する協調的活性化をレポーターアッセイにより検証した。化合物 **1** と GW9662 は mPPAR γ および hPPAR γ のみ協調的活性化を示した。ポジティブコントロールとして PPAR γ 合成アゴニストである トログリタゾン 10 μ M、RXR α のアゴニストである 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA) 10 μ M と、サンプルとして化合物 **1** 100 μ M と GW9662 10 μ M 単独処理および共処理を用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有義差; * p < 0.05。GW9662 処理群との有義差; † p < 0.05。

化合物1および GW9662 の協調的活性化における Cys285 残基への共有結合の重要性

次に化合物 1 および GW9662 の協調的活性化が PPAR γ の Cys285 残基への共有結合に由来して生じている現象か検討した。まず、GW9662 が化合物 1 存在下においても Cys285 残基に対して共有結合し得るかをローダミンマレイミドアッセイによって検証した。ローダミンマレイミドはチオール基 (SH 基) から求核攻撃を受けやすいマレイミド基を持つ低分子蛍光標識試薬である。SH 基を有する PPAR γ LBD とローダミンマレイミドを反応させると共有結合し、蛍光が検出される。一方で、SH 基が他の化合物と共有結合している場合は、ローダミンマレイミドが結合できず、蛍光が検出されない。また PPAR γ LBD は Cys285 残基を 1 つしか含まないことから、Cys285 残基特異的な共有結合の有無を評価できる (25)。Figure 1F に示したように、GW9662 単独ではローダミンマレイミドによって蛍光標識された PPAR γ LBD のバンドが減少した。一方で、化合物 1 と GW9662 共処理下においても、ローダミンマレイミドによって蛍光標識された PPAR γ LBD のバンドの減少が確認できた。また GW9662 の類縁体で、ニトロクロロベンゼンのクロロ基を除いた類縁体 (化合物 3) とクロロ基をメチル基に置換した類縁体 (化合物 4) (Figure 1G) を GW9662 の代わりとして用いたところ、バンドの減少は確認されなかった。これらの結果から GW9662 が化合物 1 存在下においても Cys285 残基に対して共有結合し得ること、ならびに Cys285 残基へ共有結合には GW9662 のクロロ基が必要であることが示された。

次に、Cys285 残基への共有結合が協調的活性化に不可欠であるか検証した。検証にあたって、PPAR γ LBD の Cys 残基を Ala 残基に置換した変異体 (C285A) とセリン残基に置換した変異体 (C285S) を用いたレポーターアッセイを行った。いずれの変異体も PPAR γ アゴニストのトログリタゾンへの応答に変化はなかったが、GW9662 のトログリタゾンに対するアンタゴニスト活性は著しく抑制されていた (Figure 1H)。この結果から C285A、C285S といった Cys 残基が置換された変異体ではトログリタゾンのようなアゴニストの特性には変化を及ぼさず、GW9662 のアンタゴニスト活性にのみ影響をもたらすことが明らかとなった。またこれらの PPAR γ LBD の変異体を用いたレポーターアッセイでは、化合物 1 と GW9662 を共処理した場合のアゴニスト活性が、化合物 1 のみのアゴニスト活性と同等であった (Figure 1H)。また GW9662 の類縁体で、Cys 残基への共有結合に必要なクロロ基を持たない化合物 3 と、クロロ基をメチル基に置換した化合物 4 を用いた場合、化合物 1 との協調的活性化は見られなかった (Figure 1I)。これらの結果から、化合物 1 および GW9662 の協調的活性化において、Cys285 残基への共有結合が重要であることが強く示唆された。

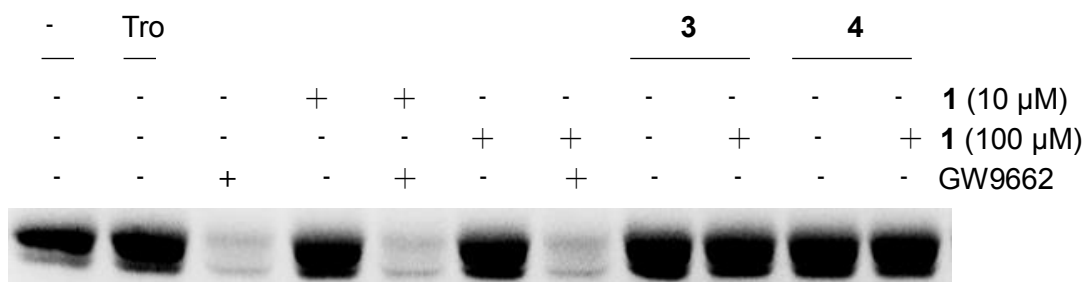


Figure 1F. GW9662 の化合物 **1** 共処理下における PPAR γ LBD との共有結合能

共有結合していない Cys 残基を検出できるローダミンマレイミドアッセイを用いて、PPAR γ LBD に対して GW9662 が共有結合するか検証した。サンプルとして化合物 **1** (10、100 μ M)、および GW9662 (10 μ M)、化合物 **3** (10 μ M)、および **4** (10 μ M) を PPAR γ LBD 組換え体タンパク質と反応させ、SDS-PAGE で分離後、LAS-1000 plus Image Analyzer (Fujifilm) を用いて蛍光を検出した。GW9662 を加えた場合、蛍光標識された PPAR γ LBD のバンドが減少していることから GW9662 と PPAR γ LBD の共有結合が示された。また化合物 **1** との共処理下においても GW9662 は PPAR γ LBD と共有結合していることが示された。

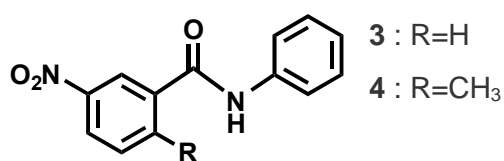


Figure 1G. 化合物 **3**、および **4** の構造式

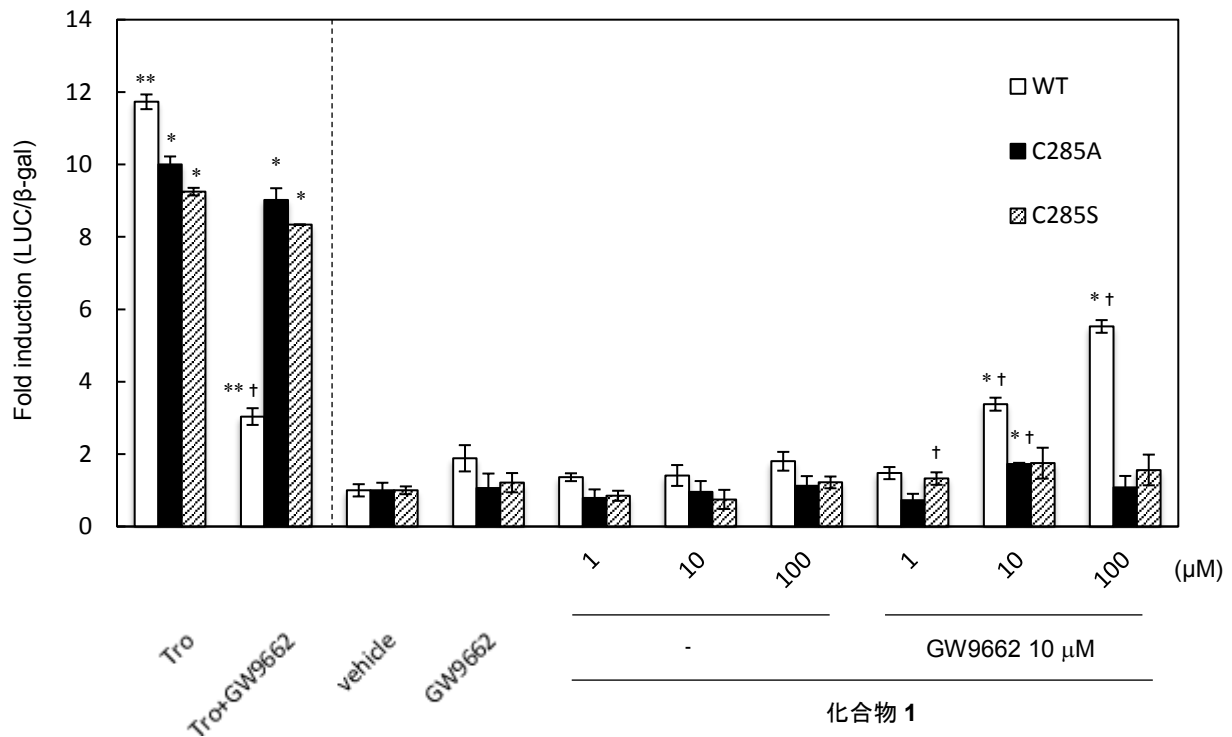


Figure 1H. 化合物 1 と GW9662 の PPAR γ 野生型/変異型における協調的活性化

GW9662 と PPAR γ の共有結合が、協調的活性に重要なレポーターアッセイにより検証した。レポーターアッセイには pGal4 DBD-humanPPAR γ LBD の野生型 (WT)、C285A 変異型 (C285A)、C285S (C285S) 変異型プラスミドを用いた。GW9662 と共有結合する Cys285 残基に変異のある C285A、C285S では GW9662 のトログリタゾンに対するアンタゴニスト活性が示されなかった。化合物 1 と GW9662 は野生型において協調的活性化を示した一方で、C285A、C285S いずれに対しても協調的活性化を示さなかった。トログリタゾン (Tro) 10 μ M、GW9662 10 μ M、化合物 1 (1、10、100 μ M) の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662 処理群との有意差; † p < 0.05。

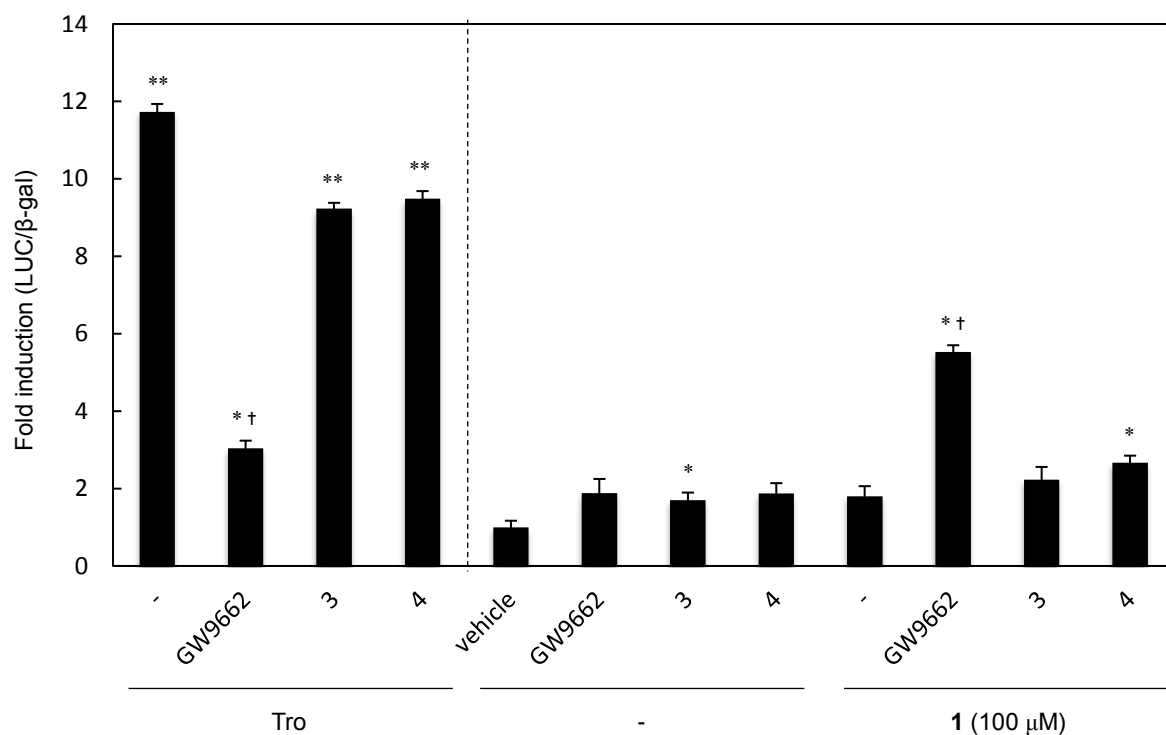


Figure 1I. 化合物 1 と GW9662 類縁体の PPAR γ 協調的活性化

GW9662 と PPAR γ の共有結合が、協調的活性に重要な GW9662 の類縁体を用いたレポーターアッセイにより検証した。サンプルとして GW9662 (10 μ M)、共有結合能が欠失した GW9662 類縁体の化合物 3 (10 μ M) および 4 (10 μ M)、化合物 1 (100 μ M)を用いた。化合物 3 および 4 はトログリタゾンに対するアンタゴニスト活性を示さなかった。化合物 1 と GW9662 は協調的活性化を示した一方で、化合物 3 および 4 は化合物 1 と協調的活性化を示さなかった。トログリタゾン (Tro) は 10 μ M の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662 処理群との有意差; † p < 0.05。

化合物 1 および GW9662 共処理時の PPAR γ リガンド結合ポケットに対する結合様式推定

GW9662 とパートナーリガンドをもとにしたハイブリッドリガンドの創製を行うために、化合物 1 および GW9662 共処理時の PPAR γ LBD 内のリガンド結合ポケット (LBP) における結合様式の推定を試みた。PPAR γ LBD は 13 個の α ヘリックス構造と 1 つの 4 本鎖 β シート構造から形成される。LBP は、AF-2 領域のリガンドの出入り口と考えられているヘリックス 3、 Ω ループおよび β シートの間の領域に存在する (33, 34)。チアゾリジン誘導体などのフルアゴニストはこの出入口からポケットに入り、U 字型のコンフォメーションを取りながら LBP に結合する。チアゾリジン誘導体は、結合時において中央のベンゼン環で Cys285 残基を覆いながら、ヘリックス 3 の背面に位置する。チアゾリジン誘導体の頭部基はヘリックス 12 付近まで入り、Tyr473 残基と水素結合することが報告されている (protein data bank, PDB code 2PRG) (6) (Figure 1J)。GW9662 は Cys285 残基と共有結合し、チアゾリジン誘導体の AF-2 ポケットへの進入を競合阻害する。一方で、入り口に位置するヘリックス 3 の Ω ループと β シートに影響は及ぼさないため、GW9662 が結合した状態でも Ω ループと β シート付近に、別の低分子化合物が結合できるスペースが見られる (Figure 1K)。実際に Molegro Virtual Docker 6.0.1 (MVD) を用いて推定したところ、GW9662 が結合した場合のポケットの空き容量は約 150 Å³ と推定された (Figure 1L)。以上より、GW9662 が結合した PPAR γ LBD のポケットの空洞に化合物 1 のような低分子が結合できるのではないかと推測した。この仮説を検証するため、化合物 1 を GW9662 と同時に処理するのではなく GW9662 のみを単独で加えて 1 時間経過した後化合物 1 を加えてレポーターアッセイを行ったところ、同時処理時と同等のアゴニスト活性を示した (Figure 1M)。この結果から、化合物 1 は GW9662 が結合した PPAR γ LBD のポケットの空洞に結合し、GW9662 とともに PPAR γ を協調的活性化している可能性が示唆された。また Puhl らによって近年、天然由来フラボノイドであるルテオリンと PPAR γ との X 線結晶構造解析が行われ、ルテオリンがヘリックス 3 と Ω ループ近傍に結合し、構造を安定化させることが報告されている (35)。この結合部位は GW9662 が結合した PPAR γ LBD のポケットの空洞に位置しており (Figure 1N 左図)、ルテオリンもまた化合物 1 と同様に GW9662 と協調的活性化を許すのではないかと推測された。推測通りにルテオリンは濃度依存的に GW9662 とともに PPAR γ 依存性転写を活性化した (Figure 1O)。この結果より、協調的活性化は GW9662 が結合した PPAR γ LBD のポケットの空洞に低分子化合物が結合することで生じると示唆された。

さらにルテオリンと化合物 1 が、GW9662 が結合した状態の PPAR γ LBD の空きポケットに結合し得るか、MVD を用いたドッキングシミュレーションによって検証した。

MVD を用いたドッキングシミュレーションは、化合物とタンパク質 1 対 1 対応のシミュレーションソフトであるため、ヒト PPAR γ LBD に GW9662 が結合した状態の結晶構造を RCSB Protein Data Bank より引用し (PDB code: 3B0R)、GW9662 をリガンドからタンパク質の一部とみなされるコファクターに変換後、この GW9662 が結合した状態の PPAR γ LBD (ヒト PPAR γ - GW9662 複合体) に対する化合物のドッキングシミュレーションを行った。Puhl らによる X 線結晶構造解析では、ルテオリンはヘリックス 3、 Ω ループ、 β シートのいくつかの残基と相互作用することで、近傍の領域の構造安定化することが挙げられている (35) (PDB code 3SZ1) (Figure 1N 右図)。本研究のドッキングシミュレーション結果から、ルテオリンは GW9662 存在下でも上記と類似した結合様式を取り得ることが推測された (Figure 1P)。シミュレーションではルテオリンが GW9662 結合型の PPAR γ LBD においてヘリックス 3 の Ile281、Gly284、Arg288 残基と、 β シート内では Ser342、Ile341 残基と相互作用することが示唆された (Figure 1P)。これらの残基とルテオリンの相互作用は前述の論文でも同様の報告がされていたため、ルテオリンは GW9662 の有無に関わらず、これらの残基と相互作用すると考えられた。以上の結果は、ルテオリンが GW9662 の結合した PPAR γ LBD の空きポケットに結合するという仮説を裏付けている。次に、化合物 1 の GW9662 結合型の PPAR γ LBD への結合様式を検証し、ルテオリンの結合様式と比較した。その結果、GW9662 存在下で化合物 1 はルテオリンと同様にヘリックス 3、 Ω ループ、 β シートの近傍に結合することが推測された (Figure 1Q)。また GW9662 結合型の PPAR γ LBD において、ヘリックス 3、 Ω ループ、 β シート上の Ile281、Gly284、Arg288、Ile341、Ser342 などのいくつかのアミノ残基と相互作用することが示された (Figure 1Q)。これらの結果は、化合物 1 がルテオリンと類似した結合様式で、空きポケットに結合し、GW9662 と協調的に PPAR γ を活性化することを示唆している。

一方で、化合物 1 が持つエステル基は細胞内エステラーゼによって加水分解されるため、化合物 1 が細胞内で修飾を受けずに PPAR γ LBD に結合しているかは、依然として不明確であった (36)。そこで PPAR γ の協調的活性化は化合物 1 ではなく、化合物 1 の加水分解生成物である 4-メトキシけい皮酸 (Figure 1R) によって引き起こされている可能性があると考えた。その仮説に基づき、4-メトキシけい皮酸に対して GW9662 共存下における PPAR γ とのドッキングシミュレーションを行った結果、4-メトキシけい皮酸は化合物 1 の結合様式とほぼ一致した (Figure 1S)。しかしながら、レポーターアッセイを実施したところ、4-メトキシけい皮酸は化合物 1 よりも弱い協調的活性化を示した (Figure 1T)。この結果は、4-メトキシけい皮酸では親水性が増加し細胞膜透過性が低下およびアミノ酸残基との相互作用が困難となったことに起因すると考え

られる。

化合物 **1** の結合様式を明らかにするためには、さらなる薬物動態学的アプローチをすることが必要と考えられるが、以上の検証結果により、化合物 **1** はエステル基が加水分解された場合でも GW9662 が結合した PPAR γ LBD のヘリックス 3、 Ω -ループ、 β -シート構造から成る空洞に入り、前述のアミノ残基と相互作用する可能性が示された。

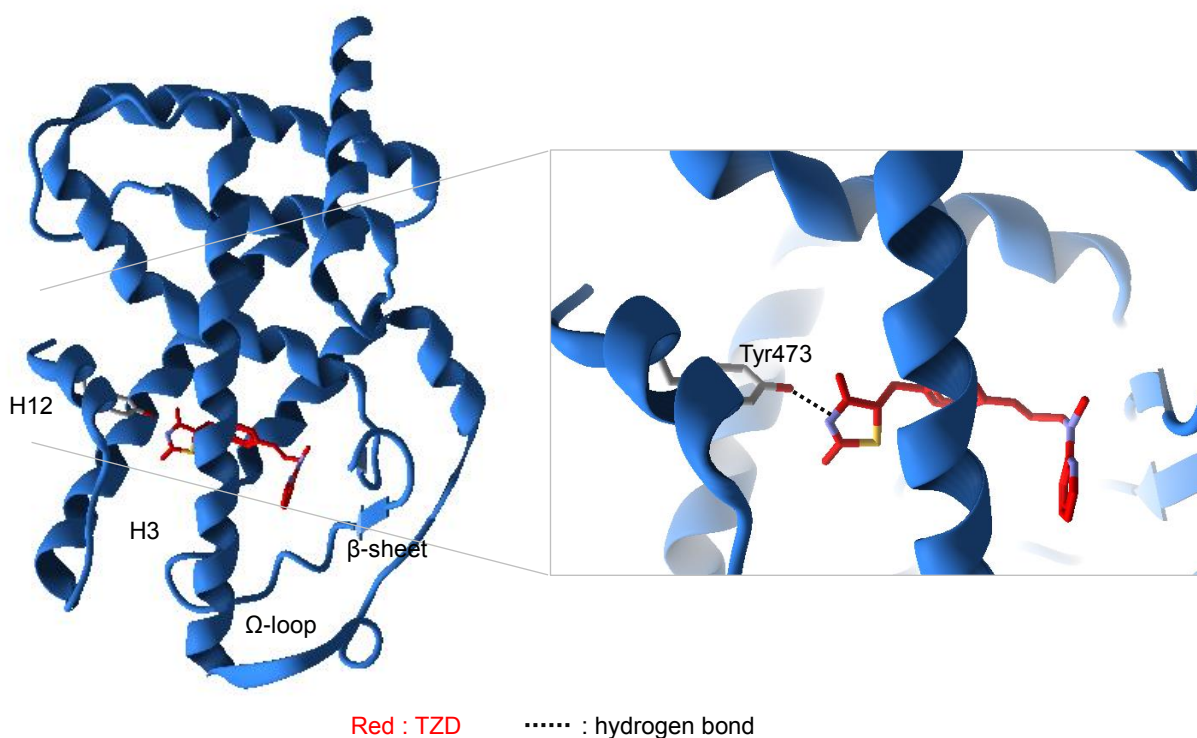


Figure 1J. PPAR γ LBD とチアゾリジン誘導体の結合様式

PPAR γ LBD とチアゾリジン誘導体 (TZD) であるロシグリタゾンの結合様式 (PDBcode 2PRG) を示した。左図に示すようにロシグリタゾンはヘリックス 3 の後部の Cys285 残基近くにベンゼン環を中心として U 字型の結合様式をとる。右図に示すように TZD の末端のベンゼン環はヘリックス 12 付近まで伸び、Tyr473 残基と水素結合することが知られている。

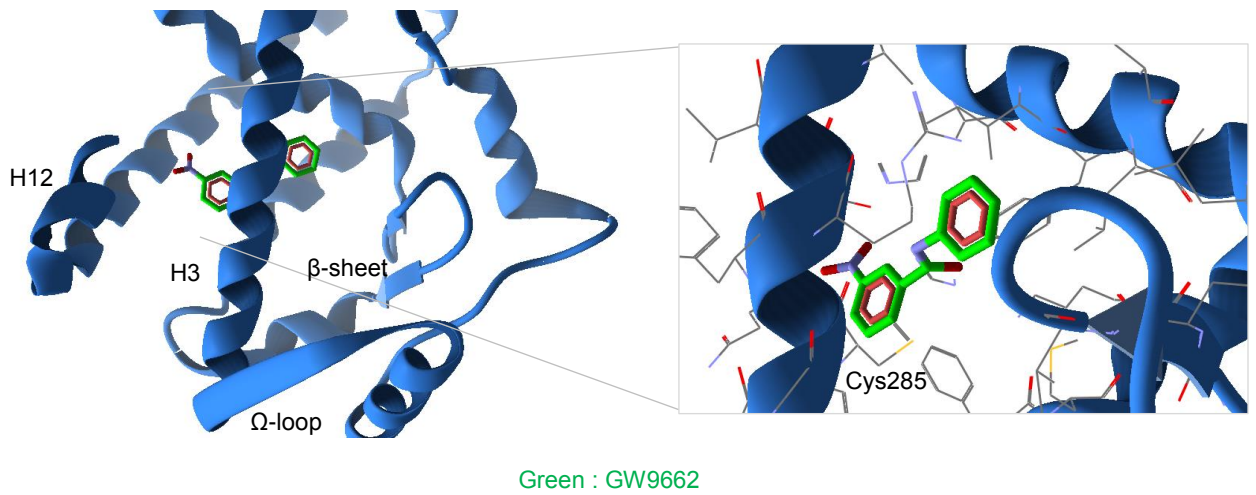


Figure 1K. PPAR γ LBD における GW9662 の結合様式

PPAR γ LBD と GW9662 の結合様式 (PDB code 3B0R) を示した。右図に示すように GW9662 は PPAR γ LBD の Cys285 残基と共有結合を形成する。

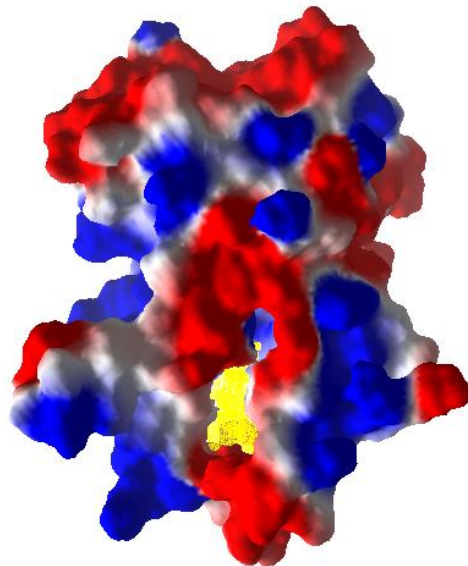


Figure 1L. GW9662 結合型 PPAR γ LBD の Ω ループ周辺に見られる空洞

Molegro cavity detection algorithm によって GW9662 が結合した場合の Ω ループ周辺の空洞の体積を検証し、黄色で示した。空洞の体積は約 150 \AA^3 と示された。

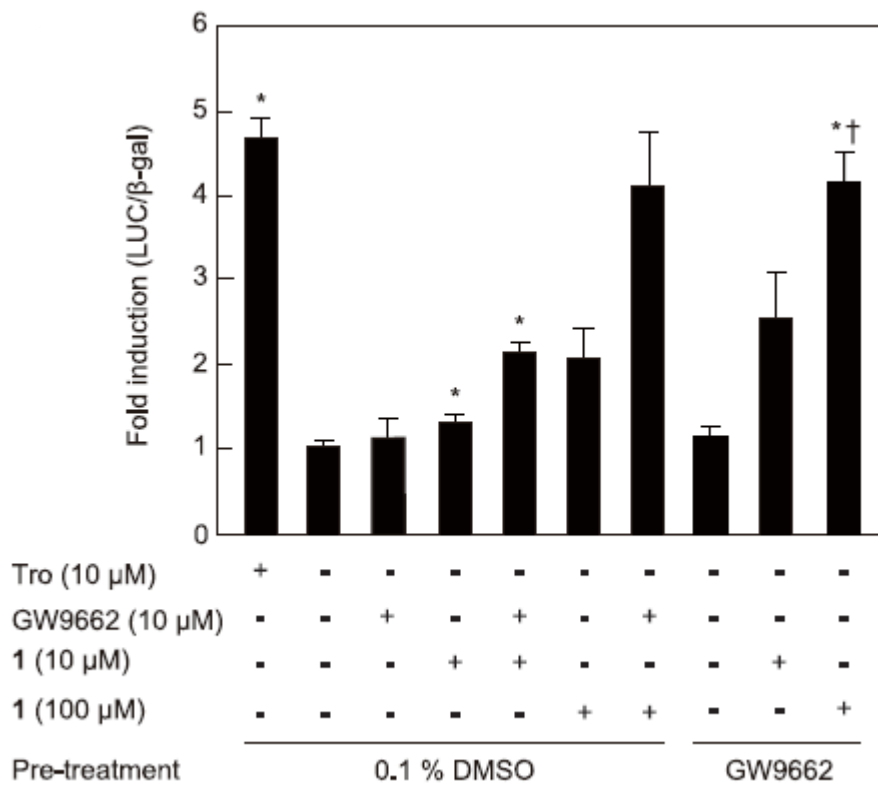
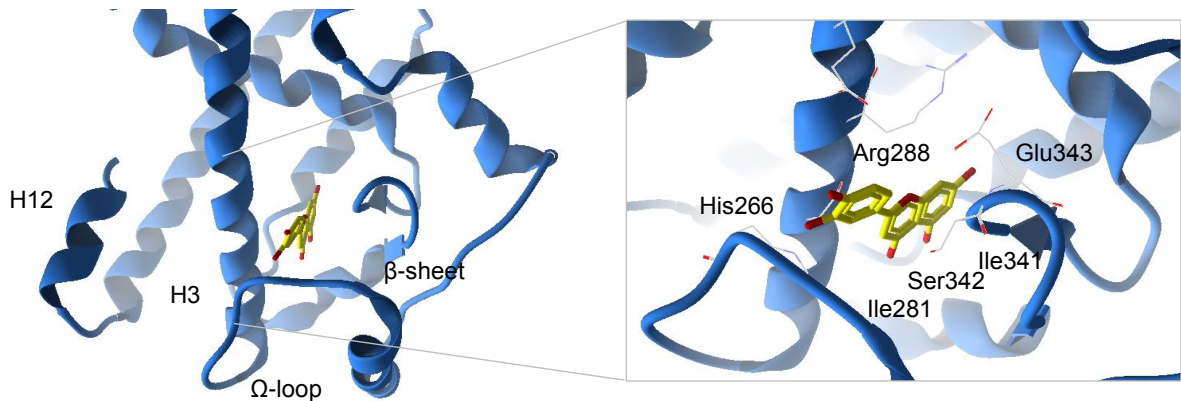


Figure 1M. GW9662 前処理および共処理時の PPAR γ 協調的活性化の比較

GW9662が結合したPPAR γ に対しても化合物**1**の協調的活性がみられるか、レポーターアッセイにより検証した。vehicle (DMSO 終濃度0.1%) またはGW9662で1時間前処理後、vehicle, トログリタゾン (Tro ; 10 μ M) 、化合物**1** (10, 100 μ M) およびGW9662 (10 μ M) を加えて6 時間処理した。その結果、GW9662を前処理後、化合物**1**を単独処理した場合でも協調的活性化を示した。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicleとの有意差: * $p < 0.05$ 。GW9662処理群との有意差: † $p < 0.05$ 。



Yellow : Luteolin

Figure 1N. PPAR γ LBD におけるルテオリンの結合様式

PPAR γ LBD とルテオリンの結合様式 (PDB code 3SZ1) を示した。ルテオリンはヘリックス 3・ β -シート・ Ω -ループに近くに結合し (左図)、右図に示すアミノ残基 (His266、Arg288、Ile281、Ser342、Ile341、Glu343) と相互作用する。

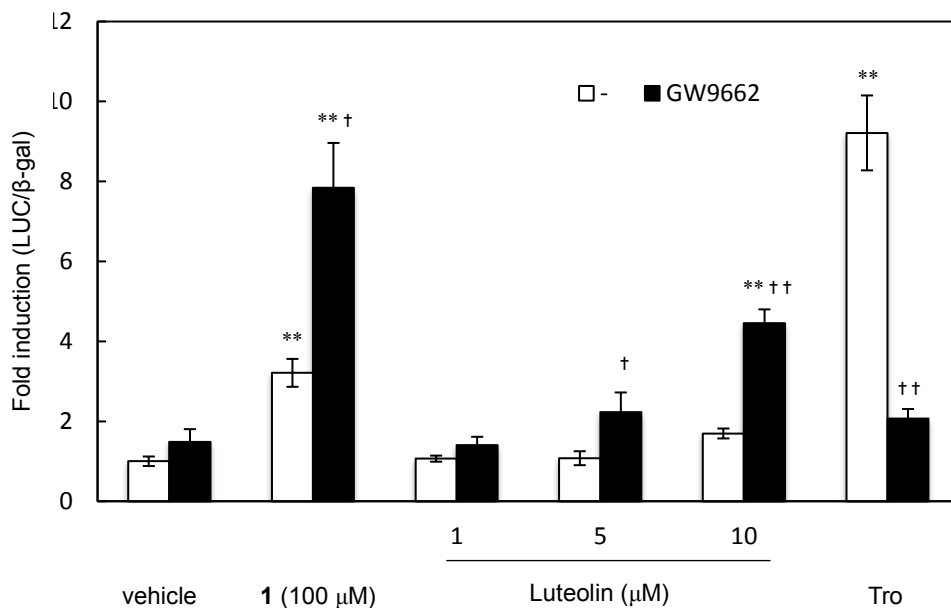


Figure 10. 化合物1 およびルテオリンとGW9662とのPPAR γ 協調的活性化

ルテオリンが、化合物1と同様にGW9662とのPPAR γ 協調的活性を示すかレポーターアッセイにより検証した。サンプルとして1、5、10 μ Mのルテオリン、10 μ MのGW9662を用いた。ルテオリンは、化合物1より活性が弱いものの濃度依存的に協調的活性化を示した。トログリタゾン (Tro)は10 μ M、化合物1は100 μ Mの濃度でそれぞれ用いた。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD))を示した。vehicleとの有意差; ** P < 0.01。GW9662処理群との有意差; † P < 0.05 †† P < 0.01。

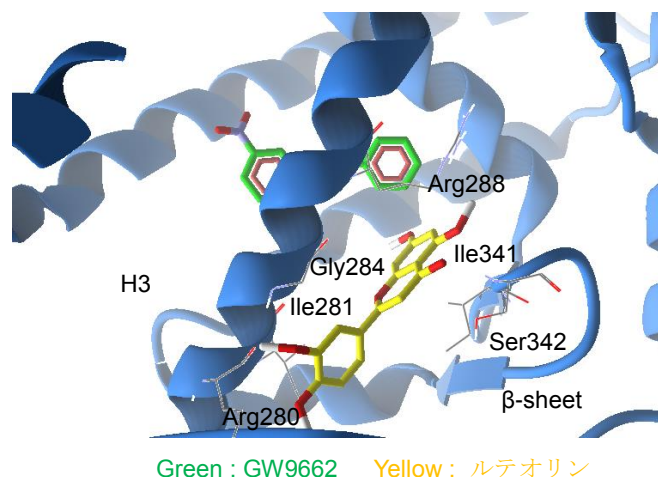


Figure 1P. GW9662 結合型のヒト PPAR γ LBD に対するルテオリンの推定結合様式

ヒト PPAR γ LBD に GW9662 が結合した場合の結晶構造を RCSB Protein Data Bank より引用し (PDB code: 3B0R)、GW9662 をリガンドからコファクターに変換後、このヒト PPAR γ -GW9662 複合体に対するルテオリンのドッキングシミュレーションを行った。ルテオリンは GW9662 存在下でも Figure 1N と類似した結合様式を示すことが推測された。ヘリックス 3 の Ile281、Gly284、Arg288 残基と、 β シート内では Ser342、Ile341 残基と相互作用することが示唆された。

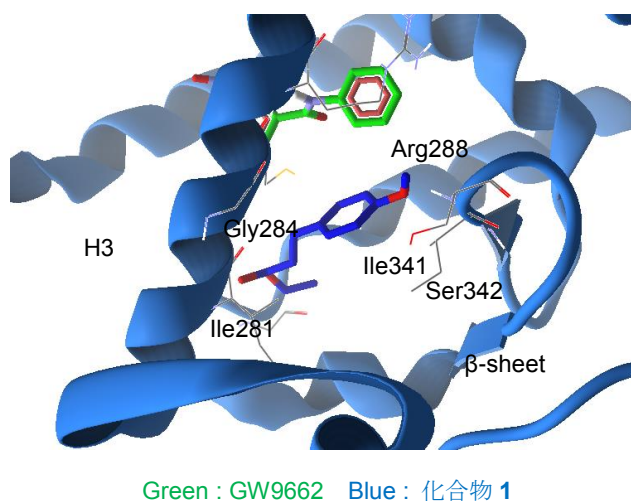


Figure 1Q. GW9662 結合型のヒト PPAR γ LBD に対する化合物 1 の推定結合様式.

ヒト PPAR γ -GW9662 複合体に対して、化合物 1 はルテオリンと同様にヘリックス 3、 Ω ループ、 β シートの近傍に結合することが推測された。また Ile281、Gly284、Arg288、Ile341、Ser342 などのアミノ残基と相互作用することが示唆された。

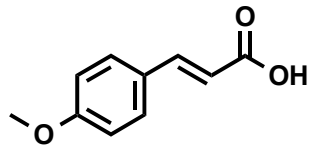
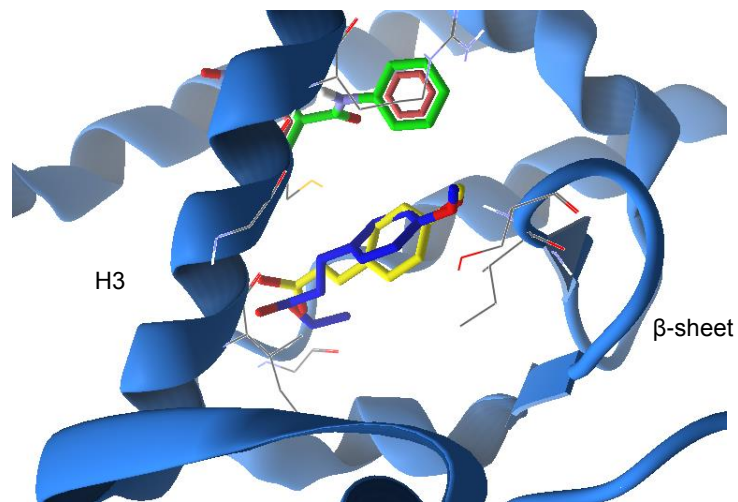


Figure 1R. 4-メトキシけい皮酸の構造式



Green : GW9662 Blue : 化合物 1 Yellow : 4-methoxy cinnamic acid

Figure 1S. 化合物 1 および 4-メトキシけい皮酸 の GW9662 結合型ヒト PPAR γ LBD に対する推定結合様式の重ね合わせ

ヒト PPAR γ -GW9662 複合体に対する 4-メトキシけい皮酸のドッキングシミュレーションを行った結果、4-メトキシけい皮酸は化合物 1 の結合様式とほぼ一致した。

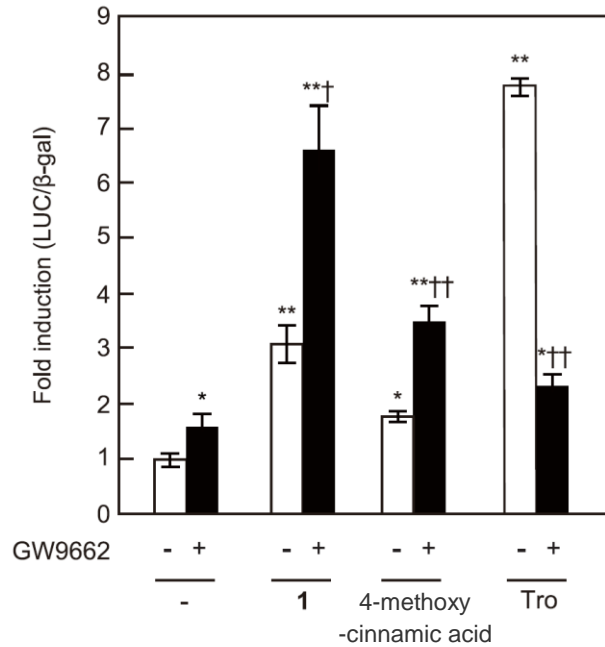


Figure 1T. 化合物 **1** および 4-メトキシけい皮酸の GW9662 との PPAR γ 協調的活性化

4-メトキシけい皮酸が、化合物**1**と同様にGW9662とのPPAR γ 協調的活性を示すレポーターアッセイにより検証した。サンプルとして100 μ Mの4-メトキシけい皮酸、10 μ MのGW9662を用いた。4-メトキシけい皮酸は、化合物**1**より活性が弱いものの濃度依存的に協調的活性化を示した。10 μ Mのトログリタゾン (Tro)、100 μ Mの化合物**1**を用いた。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicleとの有意差: * p < 0.05, ** p < 0.01。GW9662処理群との有意差: † p < 0.05, †† p < 0.01。

第二章

「GW9662 と化合物 **1** の推定結合様式に基づいたハイブリッドリガンドの構造設計と合成」

前章で述べた GW9662 と化合物 **1** の協調的活性化と同程度、PPAR γ アゴニスト活性を持つハイブリッドリガンドを創製するために、本章では PPAR γ に対する推定結合様式を検証した。さらに推定結合様式における両化合物の位置関係を考慮して、GW9662 と化合物 **1** の構造を融合させた化合物を設計・合成し、両化合物の結合様式を模倣するハイブリッドリガンドの創製を行った。

[2-1 材料および方法]

実験に使用した各種機器・器具・試薬

^1H -核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR)

日本ブルカー株式会社、AVANCEIII400 型 (400 MHz) を使用した。データは次のように記載した。

^1H NMR (測定溶媒, 400 MHz) : δ 化学シフト値 (水素の数, 多重度, 結合定数)

化学シフト値は、使用した重溶媒に含有される TMS (0 ppm) を内部標準として ppm で示した。多重度は、s = singlet (一重線)、d = doublet (二重線)、dd = double doublet (複合二重線)、ddd = double double doublet (複合二重線)、t = triplet (三重線)、q = quartet (四重線)、m = multiplet (多重線) で示した。結合定数は $J = \text{Hz}$ で示した。

^{13}C -核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR)

日本ブルカー株式会社、AVANCEIII400 型 (400 MHz) を使用した。データは次のように記載した。

^{13}C NMR (測定溶媒, 400 MHz) : δ 化学シフト値 (炭素の数)

化学シフト値は、重クロロホルムで測定した場合は溶媒中に含まれるクロロホルム (77.2 ppm) を、重メタノールで測定した場合は溶媒中に含まれるメタノール (49.2 ppm) を、重 DMSO で測定した場合は溶媒中に含まれる DMSO (39.5 ppm) を内部標準として示した。

高分解能質量分析スペクトル

HR-ESI-TOF-MS, Waters Xevo G2-S QToF (Waters) を使用した。データは次のように記載した。

HR ESI-MS (イオン化の種類) m/z 質量 (シグナルの帰属) (Calcd for 分子式: 分子式)

の計算値).

薄層クロマトグラフィー

Merck 社製シリカゲル F254 (0.25 mm) を用いた。展開後の物質の検出は UV (254nm) ランプを照射し、さらに 3 %リンモリブデン酸-濃硫酸-濃リン酸の混合液、および 3 %ジニトロフェニルヒドラジン-濃硫酸の混合液に浸した後、ホットプレート上で加熱し、発色させることによって行った。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Wako、ワコーゲル C-200 カラムクロマトグラフ用を使用した。山善株式会社製のガラスカラムに充填し、分離に用いた。自動設定中圧分取液体クロマトグラフ EPCLC-W-Prep 2XY A-Type (山善株式会社) を用いて分取を行った。

溶液の濃縮

アスピレーターで減圧下、ロータリーエバポレーター (日本ビュッヒ株式会社) を使用し、約 40 °C 以下で濃縮した。

反応の後処理

通常の後処理は、反応混合物に酢酸エチルを加えて数回抽出し、飽和食塩水を用いて洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにより乾燥させ、硫酸マグネシウムをろ過してから濃縮し、油状物または粗結晶を得た。

試薬

クロロホルム・メタノール・ジクロロメタン・ヘキサン・酢酸エチル・THF の有機溶媒は Nacalai Tesque より購入した。(EtO)₂P(O)CH₂COOEt は東京化成工業、2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol は Sigma Aldrich、それ以外は和光純薬工業より購入した。全ての試薬は有機合成用試薬を精製せずに使用した。

ハイブリッドリガンド 5 および 6 の合成

2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol (8) の合成

2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol (7, 200 mg, 1.2 mmol) をメタノール (10 mL) に溶解し、亜鉛粉末 (785 mg, 12 mmol) および 塩化アンモニウム (321 mg, 6 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液をろ過・濃縮してメタノールを除去した後、通常

の後処理を行い、有機層を洗浄・乾燥後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20×150 mm; クロロホルム/メタノール, 95:5) で分離・精製し、2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol (**8**, 137 mg, 1 mmol, 83 %)を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.76 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.81 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 6.56 (2H, m), 6.62 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.10 (1H, m) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 39.4, 63.7, 113.5, 116, 119.5, 129.7, 139.9, 146.8 ppm.

tert-butyl (3-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbamate (**9**) の合成

2-(3-aminophenyl)ethan-1-ol (**8**, 131 mg, 1 mmol) を脱水 THF (10 mL) に溶解し、(Boc)₂O (218 μL, 1 mmol) を滴下しながら加え、室温で 18 時間攪拌した。その後、さらに (Boc)₂O (220 μL, 1 mmol) を滴下しながら加え、室温で 4 時間攪拌した。反応液を濃縮して、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20×150 mm; ヘキサン/酢酸エチル, 65:35) で分離・精製し、*tert*-butyl (3-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbamate (**9**, 217 mg, 0.9 mmol, 96 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.51 (9H, s), 2.43 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.84 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 6.57 (1H, s), 6.90 (1H, m), 7.17 (1H, m), 7.21 (1H, m), 7.30 (1H, s) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 28.5 (3C), 39.4, 63.7, 80.7, 116.9, 119.3, 123.9, 129.3, 138.8, 139.8, 153 ppm.

3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenethyl 4-methylbenzenesulfonate (**10**) の合成

p-toluensulfonyl chloride (191 mg, 1 mmol) を脱水ジクロロメタン (7 mL) に溶解し、DMAP (12 mg, 0.1 mmol) およびトリエチルアミン (279 μL, 2 mmol) を加え、0 °Cになるまで氷冷・攪拌した。混合溶液に脱水ジクロロメタン (5 mL) に溶解した *tert*-butyl (3-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbamate (**9**, 217 mg, 0.9 mmol) を滴下し、0 °C 下で 18 時間攪拌した。反応液をジクロロメタンおよび水で分配し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20×150 mm; ヘキサン/酢酸エチル, 90:10) で分離・精製し、3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenethyl 4-methylbenzenesulfonate (**10**, 318 mg, 0.8 mmol, 89 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.52 (9H, s), 2.83 (3H, s), 2.91 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 4.19 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 6.44 (1H, s), 6.79 (1H, m), 7.16 (3H, m), 7.28 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.69 (2H, d, *J* = 8.5 Hz) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 21.8, 28.5 (3C), 35.5, 70.7, 117.2, 119, 123.8, 128.1 (2C), 129.4, 130 (2C), 133.2, 137.4, 138.8, 144.8, 152.8

ppm. HR ESI-MS (positive ion) m/z 430.1115 (M + K)⁺ (Calcd for C₂₀H₂₅NO₅SK: 430.1091).

tert-butyl (3-(2-(4-formylphenoxy)ethyl)phenyl)carbamate (11) の合成

3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenethyl 4-methylbenzenesulfonate (**10**, 306 mg, 0.78 mmol) を脱水アセトニトリル (12 mL) に溶解し、炭酸カリウム (161 mg, 1.17 mmol) を加え、室温で 20 分攪拌した。混合溶液に *p*-hydroxybenzaldehyde (114 mg, 0.94 mmol) を加え、加熱還流にて 18 時間攪拌した。反応液を水およびクロロホルムで分配し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20×150 mm; ヘキサン/酢酸エチル, 93:7) で分離・精製し、*tert*-butyl (3-(2-(4-formylphenoxy)ethyl)phenyl)carbamate (**11**, 192 mg, 0.56 mmol, 72 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.52 (9H, s), 3.10 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.25 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 6.50 (1H, s), 6.96 (1H, m), 7.00 (2H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.14 (1H, m), 7.24 (1H, m), 7.43 (1H, s), 7.82 (2H, d, $J = 9.1$ Hz) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 28.5 (3C), 35.8, 69.1, 80.7, 115 (2C), 117, 119.2, 123.8, 129.3, 130.1, 132.2 (2C), 138.8, 138.9, 153, 164.1, 191 ppm. HR ESI-MS (negative ion) m/z 340.1559 (M - H)⁻ (Calcd for C₂₀H₂₂NO₄: 340.1549).

ethyl(*E*)-3-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenethoxy)phenyl)acrylate (12) の合成

(EtO)₂P(O)CH₂COOEt (132 μL, 0.66 mmol) を脱水アセトニトリル (4 mL) に溶解し、塩化リチウム (29 mg, 0.66 mmol) および DBU (200 μL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。混合溶液に脱水アセトニトリル (1 mL) に溶解した *tert*-butyl (3-(2-(4-formylphenoxy)ethyl)phenyl)carbamate (**11**, 149 mg, 0.44 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液に通常の後処理を行い、有機層を洗浄・乾燥後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20×150 mm; ヘキサン/酢酸エチル, 95:5) で分離・精製し、ethyl(*E*)-3-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenethoxy)phenyl)acrylate (**12**, 160 mg, 0.39 mmol, 89 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.33 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.52 (9H, s), 3.07 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.18 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 4.25 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 6.59 (1H, s), 6.88 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.95 (1H, m), 7.17 (1H, m), 7.22 (1H, m), 7.40 (1H, s), 7.44 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 14.7, 28.7 (3C), 36, 60.6, 69, 80.8, 115.2 (2C), 116, 117.1, 119.3, 124, 127.5,

129.4, 130 (2C), 138.9, 139.3, 144.6, 153.1, 160.9, 167.7 ppm. HR ESI-MS (positive ion) m/z 434.1929 (M + Na)⁺ (Calcd for C₂₄H₂₉NO₅Na: 434.1943).

ethyl (*E*)-3-(4-(3-aminophenoxy)phenyl)acrylate (**13**) の合成

ethyl(*E*)-3-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenoxy)phenyl)acrylate (**12**, 130 mg, 0.31 mmol) を酢酸エチル (1 mL) に溶解し、4N HCl / EtOAc (2 mL) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 10×300 mm; ヘキサン / 酢酸エチル, 95:5) で分離・精製し、ethyl (*E*)-3-(4-(3-aminophenoxy)phenyl)acrylate (**13**, 94.8 mg, 0.27 mmol, 86 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30 (3H, t, J = 7.1 Hz), 3.16 (2H, t, J = 6.8 Hz), 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.27 (2H, t, J = 6.8 Hz), 4.88 (2H, s), 6.35 (1H, d, J = 16.0 Hz), 6.94 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.29 (1H, m), 7.40 (1H, m), 7.46 (2H, m), 7.52 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.61 (1H, d, J = 16.0 Hz) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 14.8, 36.3, 61.6, 69.4, 116.2 (2C), 116.6, 122.2, 124.8, 128.7, 131.1 (2C), 131.4, 132.2, 143.1, 145.9, 162.3, 169.2 ppm. HR ESI-MS (positive ion) m/z 312.1621 (M + H)⁺ (Calcd for C₁₉H₂₂NO₃: 312.1600).

ethyl (*E*)-3-(4-(3-(2-chloro-5-nitrobenzamido)phenoxy)phenyl)acrylate (**5**) の合成

ethyl (*E*)-3-(4-(3-aminophenoxy)phenyl)acrylate (**13**, 40 mg, 0.12 mmol) に脱水ジクロロメタン (2 mL)、トリエチルアミン (50 μL, 0.36 mmol) を加え、溶解するまで攪拌した。混合溶液に 5-chloro-2-nitrobenzoyl chloride (27.8 mg, 0.13 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を水およびクロロホルムで分配し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 10×300 mm; ヘキサン / 酢酸エチル, 70:30) で分離・精製し、ethyl (*E*)-3-(4-(3-(2-chloro-5-nitrobenzamido)phenoxy)phenyl)acrylate (**5**, 42.7 mg, 0.086 mmol, 75 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (3H, t, J = 7.1 Hz), 3.10 (2H, t, J = 6.8 Hz), 4.20 (2H, t, J = 6.8 Hz), 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.24 (1H, d, J = 15.8 Hz), 6.87 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.12 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.32 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.41 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.48 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.56 (1H, s), 7.57 (1H, d, J = 15.8 Hz), 8.16 (1H, m), 8.38 (1H, s), 8.48 (1H, m) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 14.4, 35.8, 60.6, 68.6, 115.1 (2C), 115.8, 118.8, 121, 125.1, 126, 126.2, 127.4, 129.5, 129.9 (2C), 131.6, 136.9, 137.5, 137.9, 139.6, 144.5, 146.6, 160.7, 162.7, 167.7 ppm. HR ESI-MS (negative ion) m/z

493.1168 (M - H)⁺ (Calcd for C₂₆H₂₂N₂O₆Cl: 493.1166).

ethyl (*E*)-3-(4-(3-(3-nitrobenzamido)phenethoxy)phenyl)acrylate (**6**) の合成

ethyl (*E*)-3-(4-(3-aminophenethoxy)phenyl)acrylate (**13**, 30 mg, 0.086 mmol) に脱水ジクロロメタン (2 mL)、トリエチルアミン (37.5 μL, 0.27 mmol) を加え、溶解するまで攪拌した。混合溶液に 3-nitrobenzoyl chloride (17.5 mg, 0.094 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を水およびクロロホルムで分配し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 10×300 mm; ヘキサン/酢酸エチル, 65:35) で分離・精製し、ethyl (*E*)-3-(4-(3-(3-nitrobenzamido)phenethoxy)phenyl)acrylate (**6**, 32.0 mg, 0.070 mmol, 81 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.06 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 4.16 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 4.27 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 6.46 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 6.99 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.12 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.32 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.65 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.66 (1H, m), 7.75 (1H, s), 7.84 (1H, m), 8.43 (2H, m), 8.80 (1H, m), 10.58 (1H, s) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 14.2, 34.9, 59.8, 68.2, 114.8 (2C), 114.9, 116.4, 118.7, 122.4, 124.8, 126.1, 126.6, 126.7, 128.6, 130.1 (2C), 134.2, 136.3, 138.8, 144.1, 147.7, 160.3, 163.3, 166.4 ppm. HR ESI-MS (negative ion) *m/z*: 459.1583 (M - H)⁻ (Calcd for C₂₆H₂₃N₂O₆: 459.1556).

Molegro Virtual Docker を用いた結合様式の推定

Molegro Virtual Docker ver.6.0.1 (Molegro Aps) を用いて、ソフトウェアのマニュアルに従い、化合物の PPAR_γ LBP に対する結合部位を推定した。

ハイブリッドリガンド **5** の結合解析では、PPAR_γ 共有結合性アゴニストである 15-oxo-ETE が結合したヒト PPAR_γ LBD の結晶構造 (PDB code: 2ZK4) を用いた。ハイブリッドリガンド **5** の塩素原子は求核置換反応により脱離することを考慮し、塩素原子を水素原子に置換した構造の化合物をドッキングに用いた。当該部位で共有結合の形成が生じると考えられることを考慮し、リガンドの結合部位を対象残基上に捕捉した上でドッキングを行う手法である、constraint-docking により結合部位の解析を行った。具体的にはハイブリッドリガンド **5** のニトロベンゼン環の 5 位の炭素を PPAR_γ LBD の Cys285 残基の硫黄原子の部位に固定 (捕捉) した条件下で、リガンド構造のドッキングを行った。

なおドッキングシミュレーションで用いたリガンドの構造式は Marvin Sketch

5.11.5 を用いて作成した。またリガンドの結合部位および結合ポケットの容量は Molegro 社の cavity detection algorithm に従って算出した。

[2-2 結果および考察]

GW9662 と化合物 1 に基づいたハイブリッドリガンドの構造設計と合成

第一章のドッキングシミュレーション結果により、GW9662 のベンゼン環が化合物 1 のベンゼン環と近接することが推定されたため、これらベンゼン環をつなぐこととした。ベンゼン環同士をつなぐために、互いの位置およびリンカーを検討した。まず、位置に関しては、化合物 1 のベンゼン環が GW9662 のアニリン構造のメタ位に位置した推定結合様式であったため、GW9662 のアニリン構造のメタ位に化合物 1 を配置した。次に、リンカーに関しては種類と長さを検討した。リンカーの種類は、最も単純な構造から検討するため、アルキル基を用いた。アルキルリンカーの長さは炭素原子 1-5 個の範囲で検討した (Figure 2A)。アルキルリンカーの長さを最適化するために、MVD を用いて各リンカーでつないだハイブリッドリガンド 5a、5、5b、5c および 5d の結合様式を推定し、最も化合物 1 と GW9662 の結合様式と近いリンカーを選択することにした (Figure 2B)。ドッキングシミュレーションから、3 個以上の炭素原子からなるリンカーを持つハイブリッドリガンド 5b、5c および 5d では GW9662 とリンカー部分が LBP の大半を占めてしまうため、ケイ皮酸の構造部位が空洞部またはヘリックス 3 から突出する結果となった。一方で、2 個以下の炭素原子から成るリンカーを持つハイブリッドリガンド 5a および 5 では、GW9662 と化合物 1 の結合様式とほぼ同様となった。以上の結果から、合成する化合物の候補をハイブリッドリガンド 5a および 5 に決定した。最初に 1 個の炭素原子から成るリンカーで GW9662 と化合物 1 をつないだハイブリッドリガンド 5a の合成を試みた。しかし、本研究で用いた合成条件では、中間体のベンジル基は不安定で、次の合成反応へ進むことができなかった。そこで、ハイブリッドリガンド 5a を合成候補から除外し、次に二つの炭素原子 (ヒドロキシエチル) で GW9662 と化合物 1 を接続したハイブリッドリガンド 5 の合成を試みた (Figure 2C)。並行して GW9662 の Cl 原子を H 原子に置換した非共有結合性アナログ 6 を合成した。リガンド 5 および 6 は Sigma Aldrich から購入した 7 を出発物質として合成した (Figure 2D)。7 のニトロ基を亜鉛により還元し、8 を 83 % の収率で得た。8 のアミノ基を Boc 基で保護し、9 を 96 % の収率で得た。9 のヒドロキシル基を塩化パラトルエンスルホニル (*p*-toluenesulfonyl chloride) でトシル化し、10 を 89 % の収率で得た。スルホン酸塩である 10 とパラヒドロキシベンズアルデヒド (*p*-hydroxybenzaldehyde) をエーテル結合し、11 を 72 % の収率で得た。11 のアルデヒド基をホーナー・ワズワース・エモンズ反応によってアルキルホスホン酸ジエステルと反応させ、 α , β 不飽和カルボニルである 12 を 84 % の収率で得た。Boc 基を分離し、13 を 92 % の収率で得た後、アミンである 13 に 5-chloro-2-nitrobenzoyl

chloride または 3-nitro-benzoyl chloride を結合させ、ハイブリッドリガンドである **5** および 化合物 **6** を各々75%、81%の収率で得た。

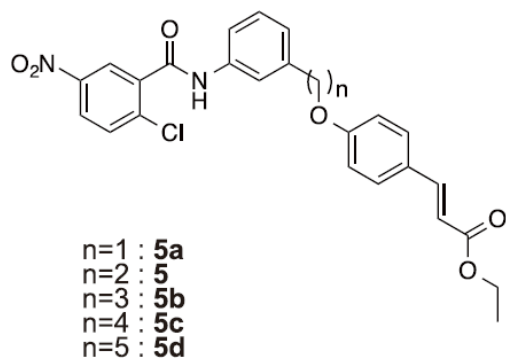


Figure 2A. ハイブリッドリガンド**5a**、**5**、**5b**、**5c**および**5d**の構造式

GW9662および化合物**1**の推定構造様式に基づき、アルキルリンカーが炭素原子1~5個の長さのハイブリッドリガンドを検討した。

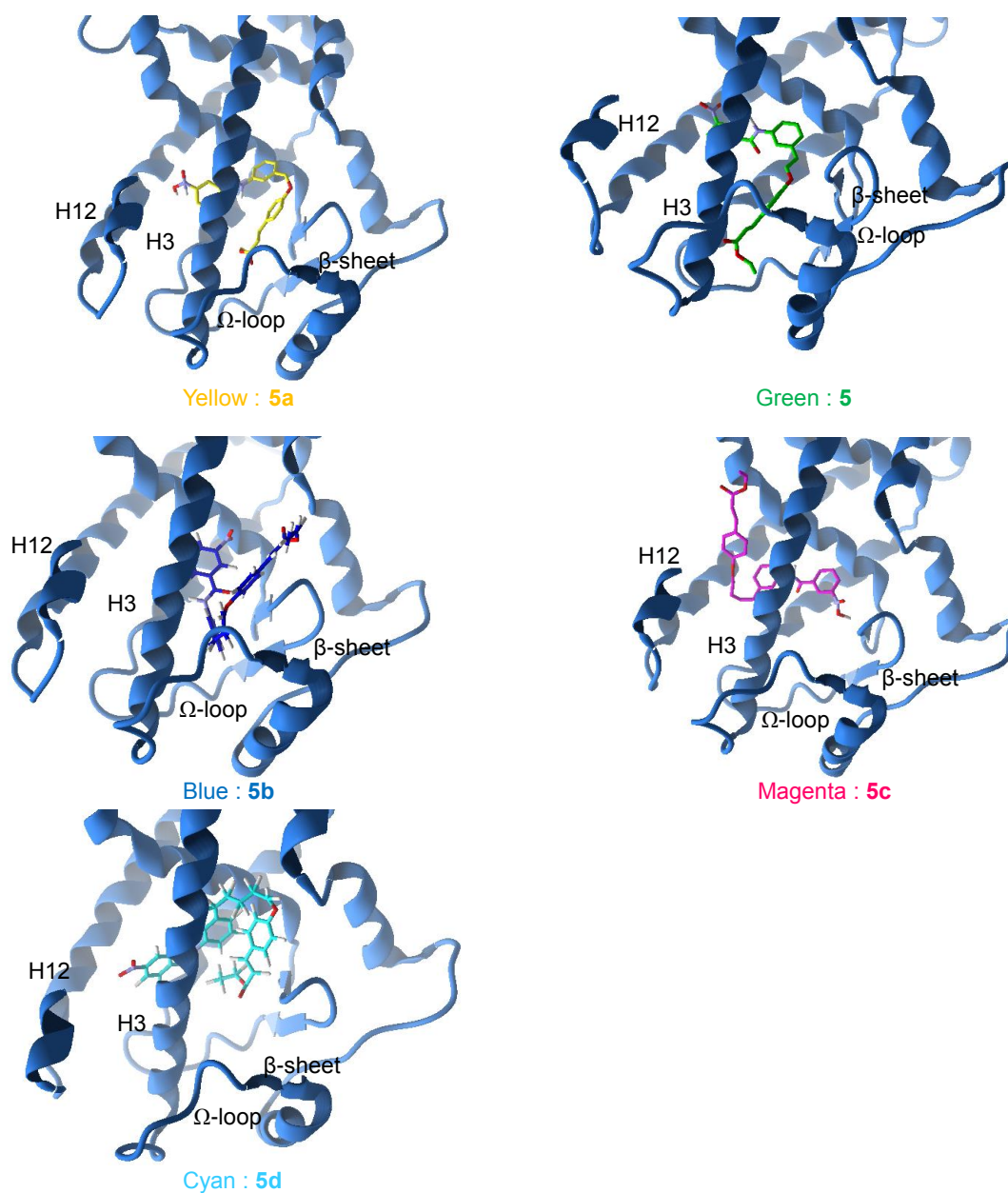
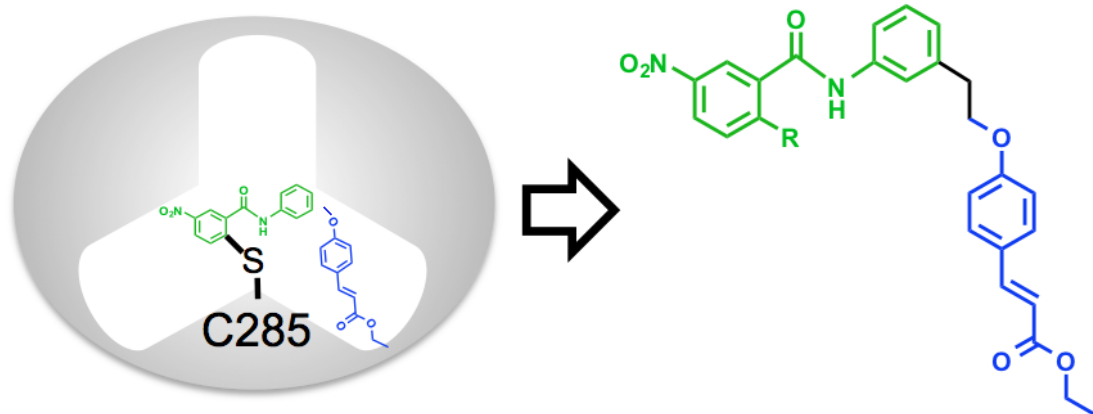


Figure 2B. ヒト PPAR γ LBD に対するハイブリッドリガンド **5a**、**5**、**5b**、**5c** および **5d** の推定結合様式

ヒト PPAR γ -GW9662 複合体に対して、3 個以上の炭素原子から成るリンカーを持つハイブリッドリガンド **5b**、**5c** および **5d** ではケイ皮酸の構造部位が空洞部を突出し、GW9662 と化合物 **1** と異なる結合様式となった。一方で、2 個以下の炭素原子から成るリンカーを持つハイブリッドリガンド **5a** および **5** では GW9662 と化合物 **1** の結合様式とほぼ同様となった。結合解析では、PPAR γ 共有結合性アゴニストである 15-oxo-ETE が結合したヒト PPAR γ LBD の結晶構造 (PDB code: 2ZK4) と、ハイブリッドリガンド **5a**、**5**、**5b**、**5c** および **5d** の塩素原子を水素原子に置換した構造の化合物をドッキングに用いた。constraint-docking により結合部位の解析を行った。



Green : GW9662

Blue : 1

5 : R = Cl

6 : R = H

Figure 2C. GW9662 と化合物 1 の融合化合物の設計

GW9662 と化合物 1 の推定結合様式を基に、両者を融合させた構造を有するハイブリッドリガンド **5** と、その非共有結合性アナログである化合物 **6** をデザインした。

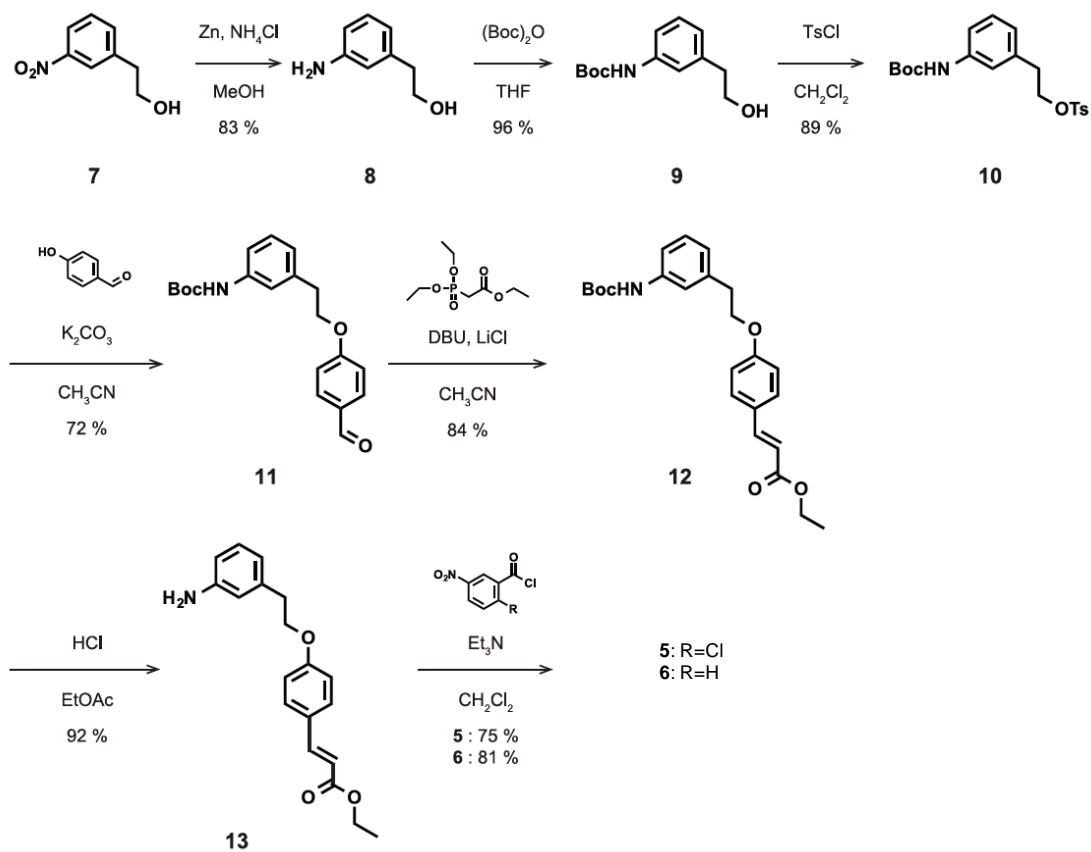


Figure 2D. ハイブリッドリガンド **5** および化合物 **6** の合成スキーム

第三章

「合成したハイブリッドリガンドの PPAR γ アゴニスト活性の評価と推定結合様式の解析」

本章では、合成したハイブリッドリガンド **5** が Cys285 残基に共有結合を確かに形成するか検討を行うと同時に、共有結合依存的に PPAR γ 依存性の転写を活性化させるか検証した。さらに、ドッキングシミュレーションを用いて、推定結合様式の解析を行い、既存の共有結合性アゴニストである、内因性の酸化型不飽和脂肪酸の結合様式との比較を行った。

[3-1 材料および方法]

MS/MS を用いたハイブリッドリガンド **5** の共有結合残基同定

20 μ M hPPAR γ 組換え体タンパク質 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl および 1 mM TCEP) 4 μ L に、ハイブリッドリガンド **5** および **6** を 1 μ L 添加し、30 分室温で静置した。その後、SDS および還元剤を含有した 6 倍濃縮の試料緩衝液 (Nacalai Tesque) を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分熱変性させ、SDS-PAGE 用の試料とした。以下の行程は、京都大学大学院生命科学研究科 渡邊祐三氏にご協力頂いた。SDS-PAGE 用の試料を 4-15 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲルを CBB 染色した。30 kDa 付近にある目的のバンドを切り出した後、5 % メタノールおよび 7% 酢酸を含む水溶液で CBB を脱色し、脱色後に超純水で置換した。その後、ゲル片を脱水し、トリプシン溶液 (25 mM 重炭酸アンモニウム) を加えて 37 $^{\circ}$ C 12 時間ゲル内消化した。消化したゲル片に抽出液 (50 % アセトニトリル / 0.1 % TFA) を加えて、ペプチド断片の溶出を行い、試料とした。この試料を LTQ LC/MS/MS (Thermo Fisher Scientific) を用いて MS/MS 解析した。

ローダミンマレイミドアッセイ

第一章に記載した方法と同様の方法で行った。

3T3-L1 細胞の培養

マウス線維芽細胞株 3T3-L1 は、京都大学大学院農学研究科 松井徹博士より継代数 7 代の細胞を供与いただき、培養後、9 代で凍結保存されている株を用いた。10% fetal bovine serum (FBS, biowest)、1% penicillin streptomycin (P.S., Gibco) を添加した高グルコース、グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウムを含有する Dullbecco's modified eagle medium (DMEM, Wako) にて 37 $^{\circ}$ C、5 % CO $_2$ で培養し、

増殖状態を確認しながら、ディッシュ内 70 %コンフルエントの状態のときに以下の手順で継代を行った。PBS (-) で細胞表面を洗浄し、2.5 g/l Trypsin /1 mM EDTA (Nacalai Tesque) を添加して細胞をディッシュから剥離した。培地を添加して、剥離反応を停止すると共に細胞を懸濁させた後、懸濁した細胞溶液を再度ディッシュに播種した。継代数がおおよそ 13 代で使用した。

Real-time PCR を用いた遺伝子発現量の定量

3T3-L1 細胞を 6 または 12 穴プレートに、それぞれ 1.5×10^5 、 6.5×10^4 cells/well の濃度で播種し、100 %コンフルエントの状態になるまで培養した。100 %コンフルエントの状態から 2 日培養した後、インスリン 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、IBMX 0.5 mM、Dex 1 μM の分化誘導培地で 2 日培養した。その後、インスリン 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のみの培地で 2 日培養し、誘導を終了した。誘導終了後、試料を 48 時間添加し、セパゾール (Nacalai Tesque) で total RNA を回収した。回収した total RNA 1 μg を鋳型にして、ReverTra Ace (東洋紡)を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を 25 倍希釈し、Table.3-1 のプライマーおよび THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡)を使用して反応液を調製した。Thermal Cycler Dice Real Time System II 装置 (TAKARA) を用いて、以下の条件で PCR を行い (Table.3-2)、蛍光検出による定量を行った。

Table.3-1 Real-time PCR に用いたプライマー塩基配列

	Forward primer	Reverse primer
β -actin	5'-GGCCAACCGTCAAAAGATGA-3'	5'-CAGCCTGGATGGCTACGTACA-3'
adiponectin	5'-CACCTACGACCAGTATCAG-3'	5'-GCCAGTAAATGTAGAGTCGT-3'
aP2	5'-GTCACCATCCGGTCAGAGAG-3'	5'-CTTGTGGAAGTCACGCC-3'

Table.3-2 Real-time PCR の条件

	温度	時間	
初期変性	94 °C	2 分	
変性	94 °C	15 秒	← 40 サイクル
アニーリング	56 °C	15 秒	
伸長	72 °C	30 秒	

プラスミドの調製およびルシフェラーゼアッセイによる PPAR、ERR 各サブタイプ活性化評価

pUAS-tk-luc、pCMX-GAL4-hPPAR γ および pact β -gal は第一章で用いたものと同様のプラスミドである。pCMX-GAL4-hPPAR α および β は京都大学大学院生命科学研究科 垣塚彰博士より供与いただいた (46)。また各プラスミドの調製および GAL4/UAS システムによるルシフェラーゼアッセイによる PPAR 各サブタイプの活性化測定は第一章と同様に行った。

Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) 法を用いたコアクチベータとの相互近接状態の測定

TR-FRET 法を用いたコアクチベータのリクルーティング (相互近接状態) の測定はキットのプロトコールに準じて実施した (LanthaScreen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。リガンドを分注した黒色 384 well プレート (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria, catalog no. 784900) に GST タグが付いた PPAR γ -LBD、テルビウムで標識した抗 GST 抗体およびフルオレセイン蛍光標識したペプチドを添加し、最終濃度 5 nM GST-PPAR γ LBD、5 nM 抗体、125 nM ペプチドおよびリガンドになるよう調整した。室温で 1 時間静置し、TECAN Ultra 384 microplate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) を用いて 340 nm で励起状態を測定した後、495 nm でテルビウムの発光、520 nm で FRET シグナルを検出した。

MTT アッセイ

HepG2 および未分化の 3T3-L1 細胞を 1×10^4 cells/well の濃度で 96 well プレートに播種し、24 時間 37°C で培養した。その後、サンプルを添加し、さらに 24 時間/48 時間 37°C で培養した。培養後、PBS で 5 mg/mL になるよう希釈した 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; DOJINDO, Kumamoto, Japan) を 10 μ L ずつ添加した。4 時間培養後、10% SDS/PBS で希釈したホルマザン色素を 100 μ L ずつ滴下し、Multi-detection micro plate reader (Powerscan HT, Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

[3-2 結果および考察]

ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ アゴニスト活性と共有結合性

第二章で合成したハイブリッドリガンド **5** が PPAR γ と共有結合するか、マスマスペクトロメトリー（質量分析計）を用いて評価した。PPAR γ LBD 組換え体タンパク質とハイブリッドリガンド **5** の複合体をトリプシン処理して高速液体クロマトグラフィーフーリエ変換質量分析計で分析を行った。PPAR γ LBD 組換え体タンパク質に対する共有結合の有無は、ハイブリッドリガンド **5** とその非共有結合性アナログである化合物 **6** を処理した PPAR γ LBD トリプシン分解物の質量を比較することで検証した。ハイブリッドリガンド **5** が共有結合することが想定される Cys285 残基が含まれるペプチド配列 (IFQGCQFR, (M+2H)²⁺, m/z 499.7480) は、ハイブリッドリガンド **5** を処理したサンプルで m/z 728.8233 へ質量シフトしていることが同定された (Figure 3A)。この質量シフトは、塩素原子を除くハイブリッドリガンド **5** の分子量 ((M+2H)²⁺, m/z 230.1) と同等であったため、ハイブリッドリガンド **5** が共有結合していることが示唆された。さらに MS/MS 解析を行い、ハイブリッドリガンド **5** が Cys285 残基に結合しているか検証した。y3-イオンとシステインを含む y4-イオンの m/z 差分が、クロロ基が外れた状態のハイブリッドリガンド **5** ((M+H)⁺, m/z 459.1) とシステインの分子量の合計 m/z 561.20 と同等であったため、ハイブリッドリガンド **5** の結合部位は Cys285 残基と確定された (Figure 3A)。一方、化合物 **6** では同様の検出が見られなかった。

さらにハイブリッドリガンド **5** が Cys285 残基と共有結合能を有するか検証するために、SH 基と反応し、共有結合する特徴を持つローダミンマレイミドを用いて *in vitro* アッセイを行った。PPAR γ LBD にハイブリッドリガンドを反応させることで、ローダミンマレイミドが結合できず、蛍光シグナルが弱くなることが予想された。その結果、Figure 3B に示されるようにローダミンマレイミドで蛍光修飾される PPAR γ LBD が減少したことから、ハイブリッドリガンド **5** は PPAR γ LBD に対して共有結合することがより強く示唆された。また、この特徴は非共有結合性アナログである化合物 **6** では蛍光シグナルが弱くならなかったことから、ハイブリッドリガンド **5** が PPAR γ LBD の Cys285 残基と共有結合を形成することがより明確に示唆された。

次に、ルシフェラーゼレポーターアッセイによってハイブリッドリガンド **5** が PPAR γ を活性化するか検証した。Figure 3C に示すようにハイブリッドリガンド **5** は μM 以下の濃度で PPAR γ を活性化することが示された。一方で、フルアゴニストであるトログリタゾンと比較すると PPAR γ の最大転写活性はおよそその半分の強度であった。このことから、ハイブリッドリガンド **5** は部分的に PPAR γ を活性化するパーシャルアゴニストであることが示唆された。ここでハイブリッドリガンド **5** がパーシャルアゴニス

トであるか検証するため、パーシャルアゴニストはアゴニスト存在下で、その活性を部分的に抑制するアンタゴニストとしての作用も示す点に着目した。その結果、トログリタゾンとハイブリッドリガンド **5** を併用して添加した場合、フルアゴニストであるトログリタゾンの活性が、50%程度に一部抑制された (Figure 3D)。以上のことから、ハイブリッドリガンド **5** は PPAR γ のパーシャルアゴニストである可能性が示唆された。さらに PPAR γ の補因子である DRIP/TRAP220 複合体と呼ばれる転写コアクチベータ複合体 および NCoR-ID2 と呼ばれる転写リプレッサーの各ペプチドに対するリクルーティング能力を検証した。補因子のリクルーティング能力の検証は TR-FRET アッセイによって評価した。トログリタゾンは PPAR γ LBD の DRIP/TRAP220 複合体ペプチドフラグメントに対する結合が強化、つまりリクルーティング能力を大きく増加させた。またコリプレッサーである NCoR-ID2 を乖離する能力も同様に増加させた (Figure 3E)。一方で、ハイブリッドリガンド **5** は DRIP/TRAP220 複合体ペプチドフラグメントに対するリクルーティング能力、NCoR-ID2 を乖離する能力ともに増加したが、両方ともトログリタゾンより弱い結果となった。以上の結果から、ハイブリッドリガンド **5** はパーシャルアゴニストであることが強く示唆された。一方で、ハイブリッドリガンド **5** は他の PPARs サブタイプ (PPAR α および PPAR β/δ) を活性化しなかったことから (Figure 3F)、ハイブリッドリガンド **5** は PPAR γ 特異的なパーシャルアゴニストであることが示唆された。ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ アゴニスト活性における EC₅₀ 値は 14.0 nM で GW9662 と協調的活性化をする化合物 **1** の EC₅₀ 値 23.9 μ M と比較して 1/1707 倍小さい値となった。このように小さいリガンド同士を組み合わせることによって、もとのリガンドよりも結合親和性や生理活性が亢進する事象は他にも報告がある (37, 38)。

またハイブリッドリガンド **5** とは対照的に、非共有結合性アナログである化合物 **6** では、レポーターアッセイで PPAR γ アゴニスト活性を検討したところ、活性を示さなかった。また PPAR γ LBD の C285A 変異体を用いたレポーターアッセイではハイブリッドリガンド **5** の活性が示されなかった (Figure 3G)。さらに、ハイブリッドリガンド **5** は脂肪細胞分化型 3T3-L1 に対して添加して培養した場合、PPAR γ の標的遺伝子であるアディポネクチンと aP2 の発現を顕著に増加させた。一方で化合物 **6** では、これらの発現の増加が見られなかった (Figure 3H)。これらの結果から、ハイブリッドリガンド **5** は Cys285 に共有結合を介して、内因性 PPAR γ を活性化することが示唆された。

ハイブリッドリガンド **5** の Cys 残基との共有結合は、クロロ基の求核置換反応だけではなく、マイケル付加によってケイ皮酸の α , β -不飽和カルボニル基と Cys 残基が反

応している可能性も考えられる。またマイケル付加による共有結合性リガンドは他の Cys 残基とも結合するため、オフターゲット効果が生じる可能性が考えられる。しかしながら、以下の二つの理由から、ハイブリッドリガンド **5** は細胞内で PPAR γ 特異的に反応することが考えられる。第一に、細胞内で Cys 残基に対するマイケル付加反応は十分に反応物がない場合は起こらず、反応物の濃度が 10 μ M 以上であることが要求される (39)。一方で、ハイブリッドリガンド **5** は細胞を用いたレポーターアッセイ系において nM オーダーで PPAR γ を活性化していた。この nM オーダーの濃度では Cys 残基とケイ皮酸がマイケル付加反応によって共有結合する濃度に達しておらず、他の受容体との反応は生じづらいと考える。第二に選択的 PPAR γ アンタゴニストである GW9662 部分に由来する Cys285 残基との結合が、PPAR γ に対する反応特異性を生じさせていると考えられる。この見解はハイブリッドリガンド **5** が PPAR のサブタイプのうち、PPAR γ は活性化する一方で、他の二つのサブタイプは活性化しないことに裏付けられる (Figure 3F)。また、ハイブリッドリガンド **5** は化合物 **1** と同様に、PPAR γ 転写活性化濃度において HepG2 および 3T3-L1 への細胞毒性がないことが示された (Figure 3I)。以上のことから、ハイブリッドリガンド **5** は少なくとも PPAR γ 転写活性化濃度においては、細胞増殖や細胞内シグナル伝達に影響を及ぼし、細胞毒性につながるようなオフターゲット効果がみられないことが示唆された。

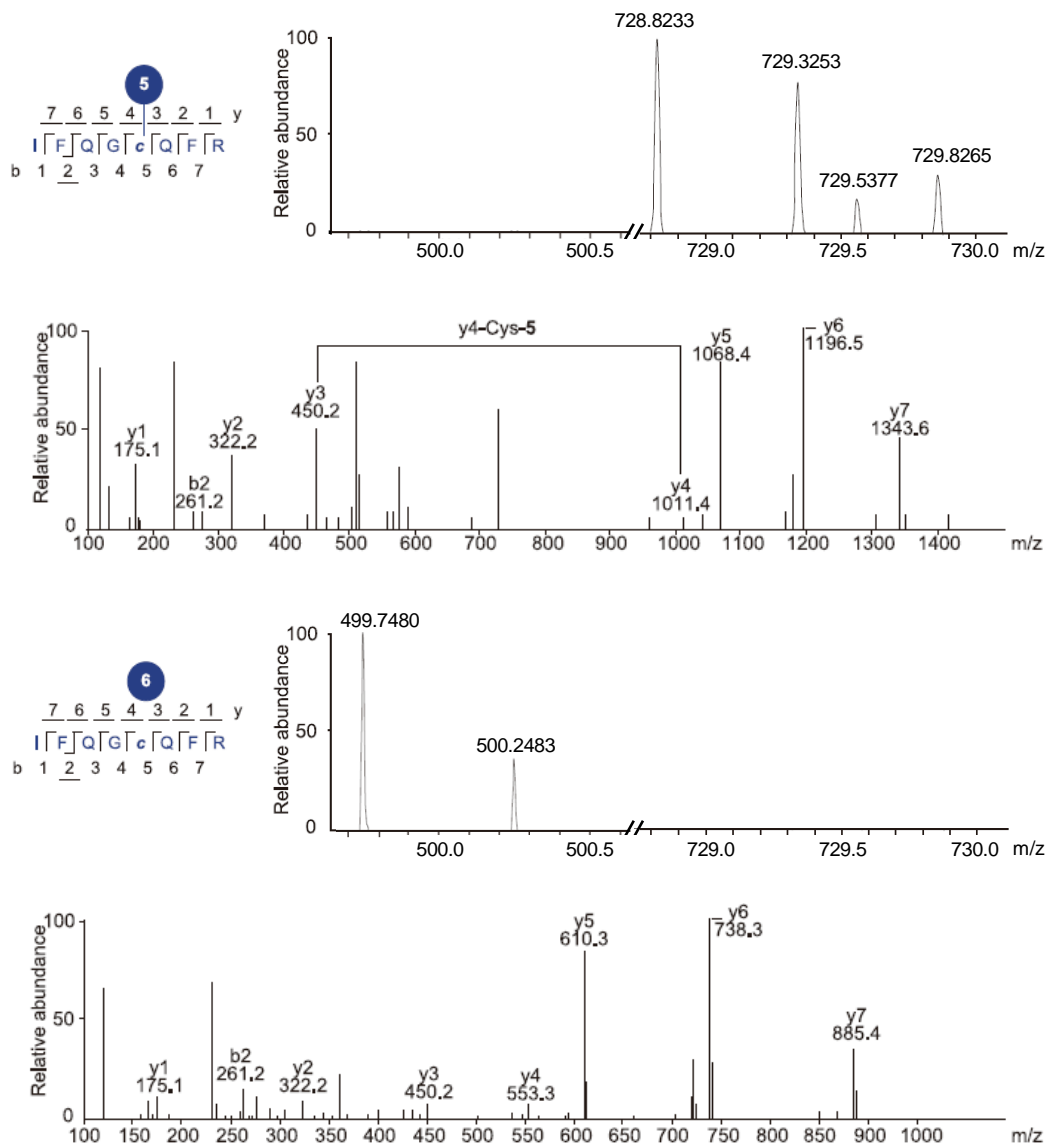


Figure 3A. ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ LBD に対する共有結合位置の解析

LC-FT-MS/MS を用いて PPAR γ LBD の Cys285 残基とハイブリッドリガンド **5** の共有結合を検証した。トリプシン処理によって得られるペプチド配列 IFQGCQR に、ハイブリッドリガンド **5** の質量が足されたペプチドの検出を検証方法とした。検出された y- および b-イオンに下線を引いた。ペプチド配列 IFQGCQR (m/z 499.7480) は m/z 728.8233 へ質量シフトしていることが同定された。さらに MS/MS 解析を行い、y3-イオンおよび y4-イオン間にハイブリッドリガンド **5** とシステインの合計 m/z 561.20 が検出された。一方、化合物 **6** では同様の検出が見られなかった。

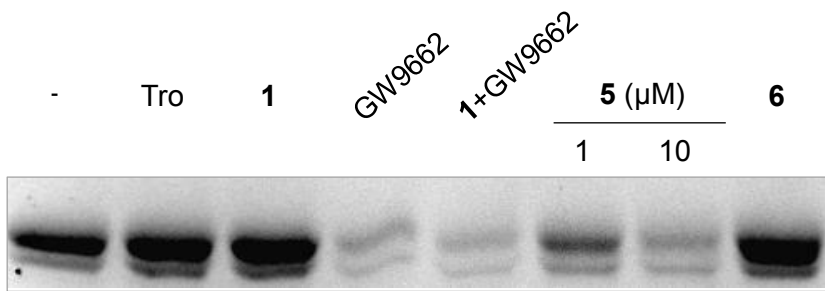


Figure 3B. ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ LBD に対する共有結合能の評価

ローダミンマレイミドアッセイを用いて、ハイブリッドリガンド **5** が PPAR γ LBD に対して共有結合するか検証した。蛍光標識された PPAR γ LBD のバンドが減少していることからハイブリッドリガンド **5** の共有結合が示された。また化合物 **6** では同様の傾向が見られなかった。サンプルとして vehicle (DMSO 終濃度 0.1 %, -), トログリタゾン (Tro; 10 μ M)、化合物 **1** (100 μ M)、GW9662 (10 μ M)、ハイブリッドリガンド **5** (1、10 μ M)、化合物 **6** (10 μ M) を PPAR γ LBD 組換え体タンパク質と反応させ、SDS-PAGE で分離後、LAS-1000 plus Image Analyzer を用いて蛍光を検出した。

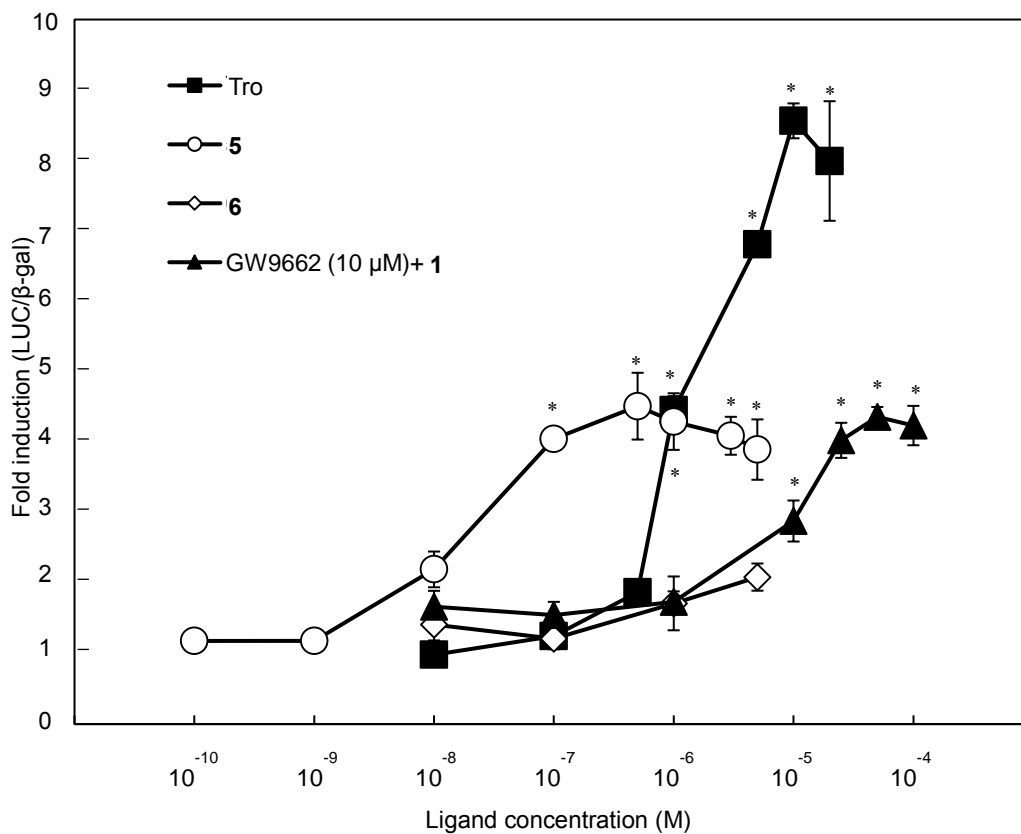


Figure 3C. ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ 転写活性の評価

ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ 転写活性をレポーターアッセイにより検証した。サンプルとしてハイブリッドリガンド **5** を 0.1 nM~5 μ M、共有結合能が欠失した化合物 **6** を 10 nM~5 μ M の濃度で用いた。ハイブリッドリガンド **5** は転写活性を示した一方で、化合物 **6** は転写活性を示さなかった。トログリタゾン (Tro) は 10 nM~10 μ M、GW9662 は 10 μ M、化合物 **1** は 10 nM~100 μ M の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有差; * p < 0.001。

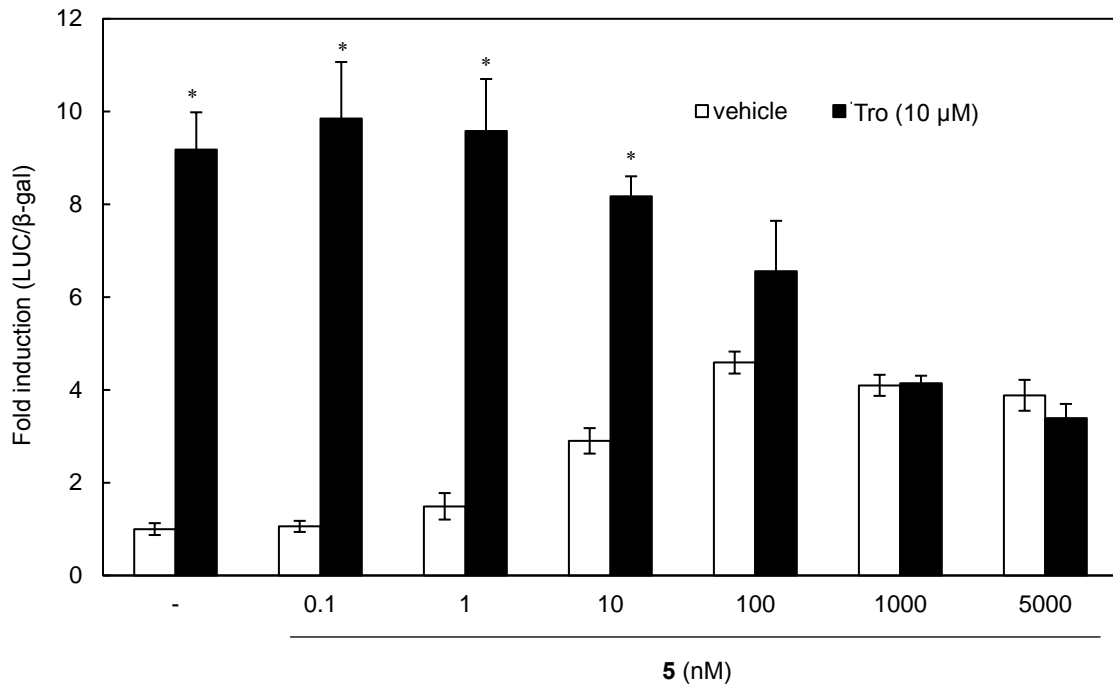


Figure 3D. ハイブリッドリガンド**5**のトログリタゾンに対するPPAR γ 転写活性の競合阻害

ハイブリッドリガンド**5**のトログリタゾンに対するPPAR γ 転写競合阻害活性を検証した。ハイブリッドリガンド**5**を0.1 nM~5 μ Mの濃度で用いた。トログリタゾンのアゴニスト活性は、ハイブリッドリガンド**5**の共処理によって阻害されることが示された。トログリタゾン (Tro) は10 μ Mの濃度で用いた。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicleとの有意差; * p < 0.01。

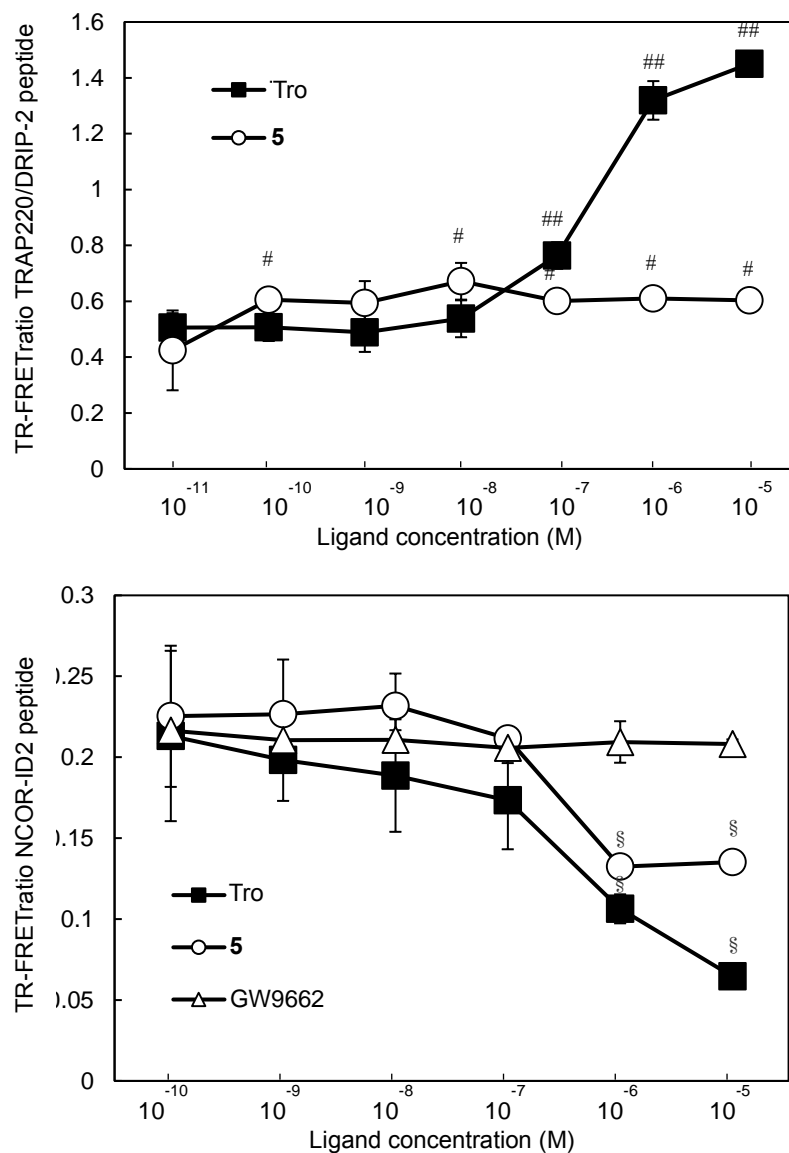


Figure 3E. ハイブリッドリガンド **5** の補因子リクルーティングに与える影響

ハイブリッドリガンド **5** がパーシャルアゴニストであるか検証するために、PPAR γ の補因子である DRIP/TRAP220 複合体 (転写コアクチベータ複合体)、NCoR-ID2 (転写リプレッサー)に対するリクルーティングがどの程度変化するか検証した。補因子のリクルーティング強度の検証は TR-FRET アッセイによって評価した。サンプルとしてトログリタゾン (Tro) を 0.01 nM~10 μ M、ハイブリッドリガンド **5** を 0.01 nM~10 μ M、GW9662 を 0.1 nM~10 μ M の濃度で用いた。トログリタゾンは PPAR γ LBD の DRIP/TRAP220 複合体ペプチドフラグメントに対するリクルーティング強度を大きく増加させた。またコリプレッサーである NCoR-ID2 を乖離強度も同様に増加させた。一方で、ハイブリッドリガンド **5** はトログリタゾンと同様の傾向で、弱い強度を示した。縦軸は n = 4 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD) を示す。vehicle との有意差; # p < 0.05, ## p < 0.01, § p < 0.005。

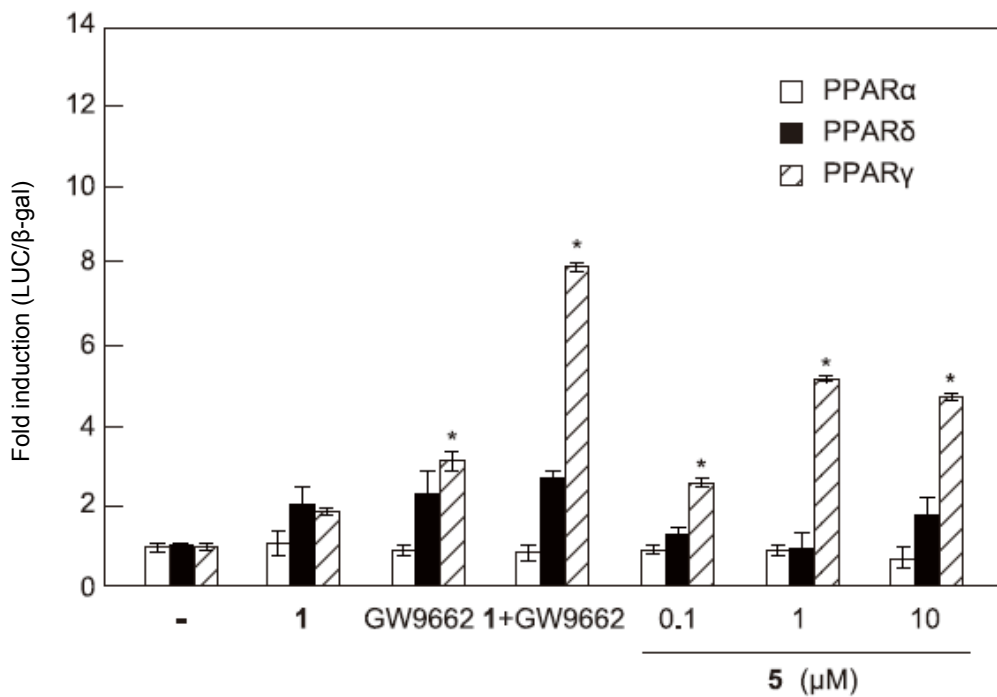


Figure 3F. ハイブリッドリガンド **5** の PPAR 各サブタイプに対する転写活性の評価

ハイブリッドリガンド**5**のアゴニスト活性がPPAR γ 特異的な活性か検証した。トログリタゾン (Tro) は 10 μ M、GW9662 は10 μ M、化合物**1** は100 μ M、ハイブリッドリガンド**5** は0.1、1、10 μ Mの濃度で用いた。ハイブリッドリガンド**5**はPPAR γ に対して転写活性を示したが、PPAR α , β/δ は転写活性を示さなかった。化合物**1**とGW9662の共処理の場合も同様の結果がみられた。縦軸はvehicleを1とした時の相対値 (n = 3の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicleとの有意差; * $p < 0.01$ 。

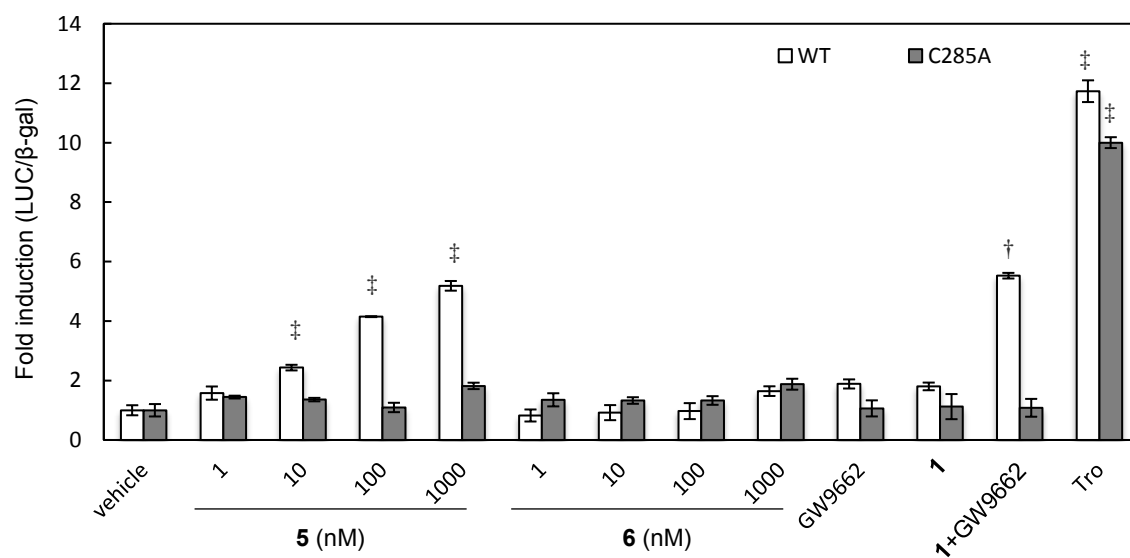


Figure 3G. ハイブリッドリガンド **5** の PPAR γ 野生型/変異型における転写活性の評価

ハイブリッドリガンド **5** と PPAR γ の共有結合が、PPAR γ 転写活性に重要なレポーターアッセイにより検証した。レポーターアッセイには pGal4 DBD-humanPPAR γ LBD の野生型/C285A 変異型プラスミドを用いた。ハイブリッドリガンド **5** は野生型において転写活性を示した一方で、C285A 変異型に対して転写活性を示さなかった。トログリタゾン (Tro) は 10 μ M、GW9662 は 10 μ M、化合物 **1** は 100 μ M、ハイブリッドリガンド **5, 6** は各々 1、10、100 nM、1 μ M の濃度で用いた。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 3 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; $^*p < 0.01$ 。GW9662 処理群との有意差; $^{\dagger}p < 0.05$ 。

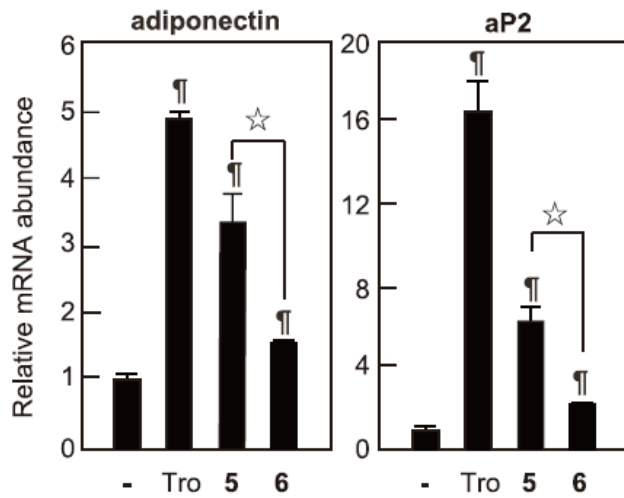


Figure 3H. ハイブリッドリガンド **5** の内因性 PPAR γ 標的遺伝子発現にもたらす影響
 ハイブリッドリガンド **5** の脂肪細胞分化型 3T3-L1 細胞におけるアディポネクチンおよび aP2 の mRNA 発現量に対する影響を検証した。脂肪細胞分化型 3T3-L1 細胞にトログリタゾン (Tro ; 10 μ M) 、ハイブリッドリガンド **5** (1 μ M) および化合物 **6** (1 μ M) を 48 時間添加した。RNA を抽出した後、real time RT-PCR によって相対的な mRNA 発現量を測定した。発現量は β -actin mRNA 量によって標準化した。ハイブリッドリガンド **5** はアディポネクチンと aP2 の発現を顕著に増加させた。一方で化合物 **6** では発現の増加が見られなかった。縦軸は vehicle を 1 とした時の相対値 (n = 4 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD)) を示した。vehicle との有意差; † p < 0.01。化合物 **6** 処理群との有意差; * p < 0.001。

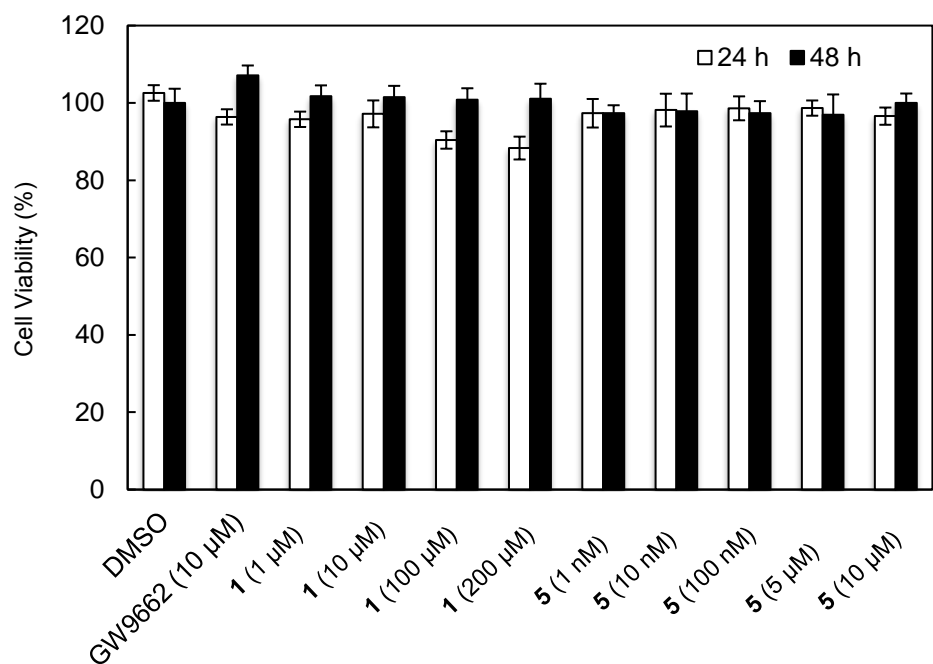
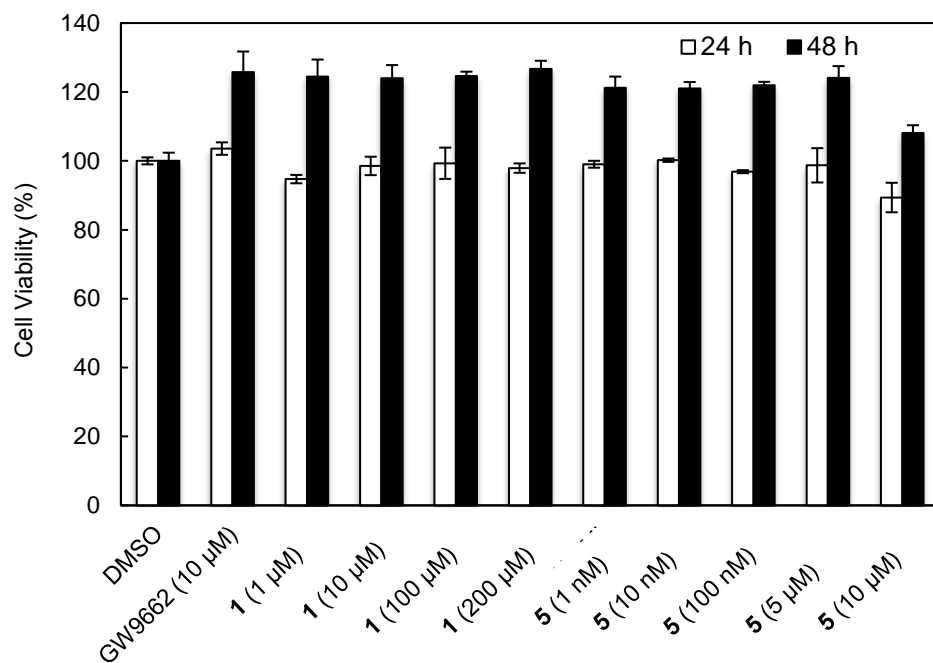


Figure 3I. 化合物 **1** とハイブリッドリガンド **5** の細胞生存に与える影響

化合物 **1** とハイブリッドリガンド **5** が HepG2 (上図) および 3T3-L1 細胞 (下図) に対して毒性を示すか MTT アッセイを用いて検証した。GW9662 は 10 μ M、化合物 **1** は 1、10、100、200 μ M、ハイブリッドリガンド **5** は 1、10、100 nM、5、10 μ M の濃度で用いた。サンプルを 24 時間または 48 時間添加したのち、測定した。化合物 **1** とハイブリッドリガンド **5** ともに細胞毒性はみられなかった。n = 4 の平均相対値 \pm 標準偏差 (SD) を示す。

内因性の共有結合性リガンドの結合様式とハイブリッドリガンド **5** の推定結合様式の比較

現在までに X 線結晶解析により、内因性の不飽和脂肪酸と Cys285 残基の共有結合によって活性化した PPAR γ 立体構造が報告されている。また酸化不飽和脂肪酸は効率的に Cys285 との共有結合を形成して Ω ループ領域を安定化させることが知られている (26)。他にも、森川らが 15d-PGJ₂ により活性化した PPAR γ LBD の立体構造変化モデルを提唱している。そのモデルにおいて Cys285 の共有結合修飾は、活性化のための「スイッチ」として作用すると考えられている。その上で、非共有結合の不活性な中間複合体は、「ドッキング状態」、一方で共有結合の活性複合体は「ロック状態」として示されている (40, Figure 3J)。

ただし、内因性不飽和脂肪酸の転写活性は、リガンドの種類に特異的である。例えば、 α 、 β -不飽和ケトンによって Cys285 残基と共有結合を形成する不飽和脂肪酸のうち、15-オキソ-エイコサテトラエン酸 (15-oxo-ETE) および 15d-PGJ₂ は PPAR γ の転写を活性化する一方で、8-oxo-ETE は活性化しない (41)。このリガンド特異性は上記の Ω ループ領域での立体構造変化の違いに起因すると考えられる。本研究の合成リガンド (ハイブリッドリガンド **5**) は Cys285 の共有結合修飾を介して PPAR γ を活性化するため、15-oxo-ETE および 15d-PGJ₂ と同様の様式で、PPAR γ LBD、特に Ω ループ領域の構造変化をもたらす可能性がある と推測される。

この仮説を検証するために、MVD を使用し、PPAR γ LBD に対するハイブリッドリガンド **5** の推定結合様式と 15-oxo-ETE および 15d-PGJ₂ との結合様式を比較検討した。現在までに X 線結晶解析を用いた研究によって 15d-PGJ₂ のアルキル鎖は、ヘリックス 3 の軸に直交配置し、15d-PGJ₂ のカルボキシル基はヘリックス 12 の Tyr473 と水素結合を形成することが明らかになっている (PDB code 2ZK1; Figure 3K)。一方、15-oxo-ETE の結合様式は、ヘリックス 3 の軸と平行で、 β シート、ヘリックス 5、ヘリックス 3 と相互作用することが示されている (PDB コード 2ZK4; Figure 3K)。これら脂肪酸の結合様式と MVD によって導出されたハイブリッドリガンド **5** の推定結合様式は部分的に一致していた。ハイブリッドリガンド **5** の GW9662 部分のニトロベンゼングループは 15d-PGJ₂ のシクロペンテン環と、一方のケイヒ酸部分のベンゼン環は 15-oxo-ETE のアルキル鎖と近い位置を占めることがドッキングシミュレーションによって予測された (Figure 3L)。結合様式で異なる点としては、15d-PGJ₂ と 15-oxo-ETE はヘリックス 5 と相互作用する一方で、ハイブリッドリガンド **5** はより直接的に Ω ループと β シートに結合することが示唆された (Figure 3L)。このハイブリッドリガンド **5**

のヘリックス 3 の軸周辺に巻きつくような立体構造は、内因性の脂肪酸よりも、ヘリックス 3 および Ω ループの周辺領域を安定化する可能性が考えられる。

以上の結果から、ハイブリッドリガンド **5** は PPAR γ LBD に共有結合する内因性の脂肪酸の結合様式を部分的に模倣する一方で、一部異なる結合様式を取り得る新しいタイプの共有結合性アゴニストであることが示唆された。今後、PPAR γ アゴニスト活性のない共有結合性リガンドを模倣するようなハイブリッドリガンド **5** のアナログを合成することで、会合するコファクターや下流の生体応答の比較が可能となり、脂肪酸代謝メカニズムを解明するための有効なケミカルツールとなると考えられる。また創薬の観点から、ハイブリッドリガンド **5** の *in vivo* における生理活性を検証し、シーズ化合物としての開発を模索する必要がある。

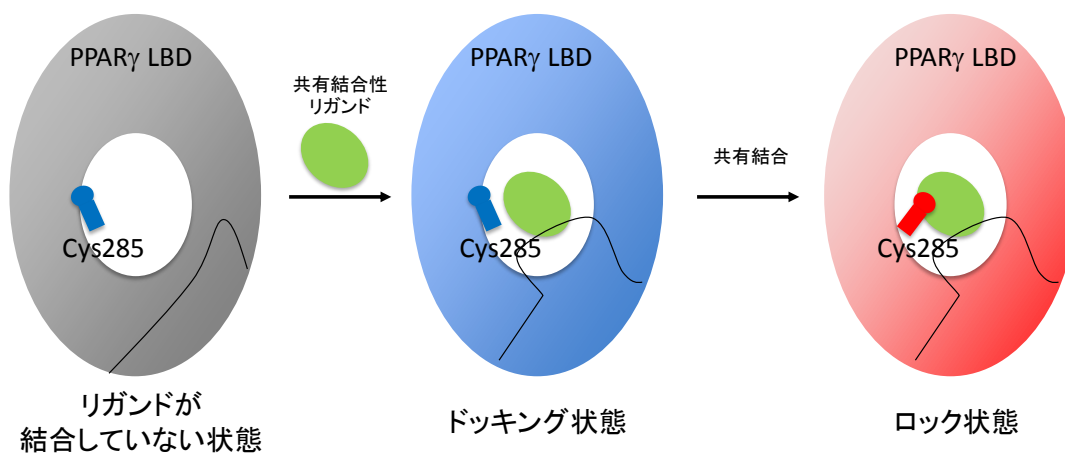


Figure 3J. PPAR γ LBD における Cys285 残基への共有結合の役割

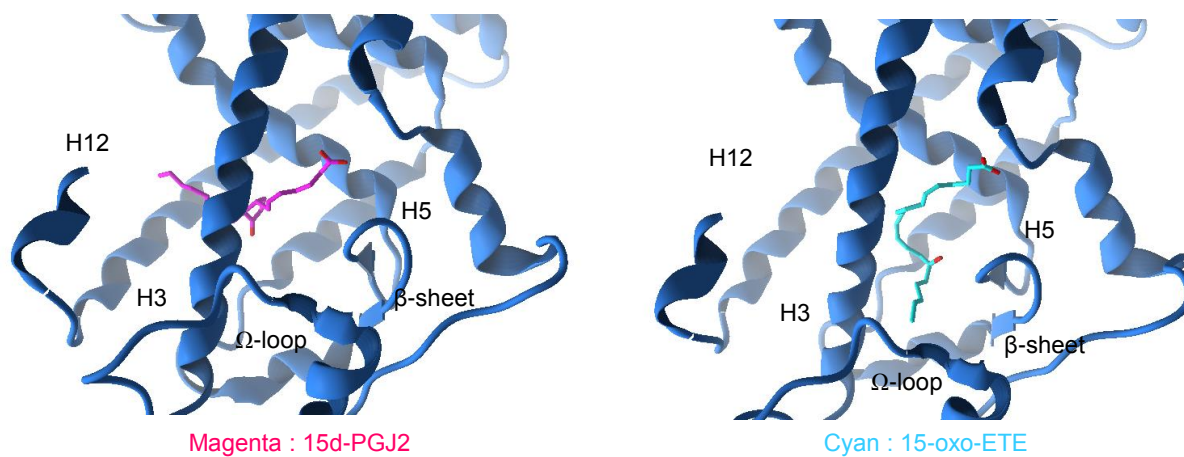


Figure 3K. PPAR γ LBD における 15d-PGJ₂ (左)、15-oxo-EETE (右) の結合様式

PPAR γ LBD と 15d-PGJ₂ (PDB code 2ZK1)、15-oxo-EETE (PDB code 2ZK4) の結合様式を示した。

[まとめ]

本研究では PPAR γ LBP 内部の空洞が他の核内受容体と比較して大きいという特殊性に着目した、新規リガンド開発のための新たな方法論を考案し、新奇共有結合性アゴニストの創製に成功した。本法に基づき、PPAR γ を協調活性化する植物由来のケイ皮酸誘導体と GW9662 の組合せを同定し、それらの推定結合様式をもとに、両者を融合させたハイブリッドリガンド **5** を合成した。このハイブリッドリガンド **5** は PPAR γ LBD の Cys285 残基に対する共有結合修飾を介して、 μM 以下の濃度 (EC₅₀: 14.0 nM) で、PPAR γ の転写活性を亢進した。この新奇アゴニストであるハイブリッドリガンド **5** は、PPAR γ アンタゴニストとして知られる GW9662 のアニリン部位に疎水性構造を付加した化学構造を有し、これまでに報告されているアゴニストの骨格構造と大きく異なる。このことは、本手法が、創薬における重要な課題である候補化合物の化学構造の多様化に貢献し得ることを示唆している。

ハイブリッドリガンド **5** を創製するに至った本研究の手法は、**fragment-based drug discovery (FBDD)** のひとつである **fragment-linking** に類似している。**fragment-linking** では、同時に近接して標的に結合する二つ以上の低分子量化合物を、核磁気共鳴 (NMR)・表面プラズモン共鳴 (SPR)・ハイスループットの X-線スクリーニングなどの生物物理学的技術を用いて同定する。これら二つの化合物は、その後、適当なリンカーを使用して結合され、単一分子として合成される (42)。しかし、我々のアプローチは厳密に **fragment-linking** と定義できない。なぜなら FBDD 研究における低分子化合物ライブラリは 300 Da 以下のリガンド、いわゆる「フラグメント」で構成される。この戦略とは異なり、本研究では、スクリーニング源として、天然物抽出物を「化合物ライブラリ」として使用した。抽出物ライブラリは、典型的なフラグメントライブラリより多く複雑な構造の化合物を含んでいる。つまり、本研究のようなライブラリの使用は、従来のフラグメントスクリーニングと同一ではないことが示唆される。本研究では抽出物をライブラリとして使用して、GW9662 とのパートナーリガンドを同定することに成功したものの、より効率的な同定につなげるためには、小さな「断片」を含む化合物ライブラリからスクリーニングしていく必要がある。本研究のアプローチは、典型的なフラグメントスクリーニングに使用される生物物理学的検出技術ではなく、簡便な細胞ベースのスクリーニングに基づき、パートナーリガンドを同定することが可能であることから、効率性の観点で注目に値すると考えられる。

また、フラグメントを結合するにあたって、フラグメントの構造から計算するシークエンシャルドッキング (43, 44) の発展も、本研究のアプローチを推進するための一助となる。特に複数のリガンドの結合様式の特徴解明や、ハイブリッドリガンドのデザイ

ンにおいて有効だと考えられる。これらツールと潜在的な応用性を考慮すると、本研究のアプローチは PPAR γ リガンドを創製するにあたって、より効果的な戦略である。

創製されたハイブリッドリガンド **5** は、非共有結合性アゴニストである従来のチアゾリジン誘導体よりも持続的な効果が期待される。共有結合性の薬剤は、その「不可逆的」な結合力の強さから、長期間にわたって効果を発揮し続けるというメリットがあり、実際のがん・感染症・消化器・中枢神経領域で治療薬として承認されている (45)。ターゲット以外のタンパク質にも共有結合してしまい、強いオフターゲット効果によって思わぬ副作用を生んでしまうリスクが考えられるが、これまでに共有結合性薬剤が上市されていることから、オフターゲット効果が弱い共有結合性のリガンドであれば十分に実用化が考えられる。今後、安全性面を検証することで、ハイブリッドリガンド **5** の薬学的価値が明らかとなると思われる。

[参考文献]

1. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files, *Science* 294, 1866-1870.
2. Berger, J., and Moller, D. E. (2002) The mechanisms of action of PPARs, *Annu. Rev. Med.* 53, 409-435.
3. Nagy, L., and Schwabe, J. W. (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch, *Trends Biochem. Sci.* 29, 317-324.
4. Tontonoz, P., and Spiegelman, B. M. (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ , *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.
5. Ricote, M., Valledor, A. F., and Glass, C. K. (2004) Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 230-239.
6. Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., and Milburn, M. V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor γ , *Nature* 395, 137-143.
7. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., and Kajimura, S. (2012) PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein, *Cell Metab.* 15, 395-404.
8. Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995) 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ , *Cell* 83, 803-812.
9. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., and Evans, R. M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature* 358, 771-774.
10. Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., and Lehmann, J. M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4318-4323.
11. Guan, Y., Hao, C., Cha, D. R., Rao, R., Lu, W., Kohan, D. E., Magnuson, M. A., Redha, R., Zhang, Y., and Breyer, M. D. (2005) Thiazolidinediones expand body

- fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption, *Nat. Med.* *11*, 861-866.
12. Home, P. D., Pocock, S. J., Beck-Nielsen, H., Curtis, P. S., Gomis, R., Hanefeld, M., Jones, N. P., Komajda, M., and McMurray, J. J. (2009) Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial, *Lancet* *373*, 2125-2135.
 13. Vidović, D., Busby, S. A., Griffin, P. R., and Schürer, S. C. (2011) A combined ligand- and structure-based virtual screening protocol identifies submicromolar PPAR γ partial agonists, *ChemMedChem* *6*, 94-103.
 14. Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Yamamoto, T., Taimatsu, A., Matsui, N., Kimura, K., Saito, M., Hosokawa, M., Miyashita, K., Fushiki, T. (2002) Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes, *FEBS Lett.* *514*, 315-322.
 15. Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., and Kondo, K. (2004) Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor α and γ and reduce insulin resistance, *J. Biol. Chem.* *279*, 33456-33462.
 16. Rau, O., Wurglics, M., Paulke, A., Zitzkowski, J., Meindl, N., Bock, A., Dingermann, T., Abdel-Tawab, M., and Schubert-Zsilavecz, M. (2006) Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ , *Planta Med.* *72*, 881-887.
 17. Liang, Y.C., Tsai, S.H., Tsai, D.C., Lin-Shiau, S.Y., and Lin, J.K. (2001) Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by flavonoids in mouse macrophages, *FEBS Lett* *496*, 12-18.
 18. Tsuda, T., Ueno, Y., Aoki, H., Koda, T., Horio, F., Takahashi, N., Kawada, T., and Osawa, T. (2004) Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 149-157.
 19. Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Mae, T., Kishida, H., Nishiyama, T., Tsukagawa, M., Konishi, E., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K., Kitahara, M. (2003) Phenolics with PPAR γ ligand-binding activity obtained from licorice

- (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A(y) mice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *13*, 4267-4272.
20. Weidner, C., de Groot, J. C., Prasad, A., Freiwald, A., Quedenau, C., Kliem, M., Witzke, A., Kodelja, V., Han, C. T., Giegold, S., Baumann, M., Klebl, B., Siems, K., Muller-Kuhrt, L., Schurmann, A., Schuler, R., Pfeiffer, A. F., Schroeder, F. C., Bussow, K., and Sauer, S. (2012) Amorphutins are potent antidiabetic dietary natural products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 7257-7262.
 21. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jenderberg, L., Berkenstam, A. (1998) Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ , *J. Biol. Chem.* *273*, 31108-31112.
 22. Gampe, R. T. Jr., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T.M., Xu, H. E. (2000) Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors, *Mol. Cell* *5*, 545-555.
 23. Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Maebara, K., Nakamori, R., and Morikawa, K. (2010) The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites, *EMBO J.* *29*, 3395-3407.
 24. Leesnitzer, L. M., Parks, D. J., Bledsoe, R. K., Cobb, J. E., Collins, J. L., Consler, T. G., Davis, R. G., Hull-Ryde, E. A., Lenhard, J. M., Patel, L., Plunket, K. D., Shenk, J. L., Stimmel, J. B., Therapontos, C., Willson, T. M., and Blanchard, S. G. (2002) Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662, *Biochemistry* *41*, 6640-6650.
 25. Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T. S., Kakizuka, A., and Jingami, H. (2005) α,β -unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor γ , *J. Biol. Chem.* *280*, 14145-14153.
 26. Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, L., Yamamoto, K., and Schwabe, J. W. (2008) Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids, *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 924-931.
 27. Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C. S., Khoo, N. K., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Motanya, U. N., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R., Xu, H. E., Batthyany, C. I., Chen, Y. E.,

- Hallis, T. M., and Freeman, B. A. (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions, *J. Biol. Chem.* *285*, 12321-12333.
28. Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., Kawada, K., Han, J., Isoda, H., Neffati, M., Akita, T., Maejima, K., Masuda, S., Kambe, T., Mori, N., Irie, K., and Nagao, M. (2013) Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *440*, 204-209.
29. Sadowski, I., Ptashne, M. (1989) A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* *17*, 7539
30. Pugh, C. W., O'Rourke J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit, *J. Biol. Chem.* *272*, 11205-11214.
31. Vu, H., Pham, N. B., and Quinn, R. J. (2008) Direct screening of natural product extracts using mass spectrometry, *J. Biomol. Screen.* *13*, 265-275.
32. Cummins, L. L., Chen, S., Blyn, L. B., Sannes-Lowery, K. A., Drader, J. J., Griffey, R. H., and Hofstadler, S. A. (2003) Multitarget affinity/specificity screening of natural products: finding and characterizing high-affinity ligands from complex mixtures by using high-performance mass spectrometry, *J. Nat. Prod.* *66*, 1186-1190.
33. Aci-Sèche, S., Genest, M., and Garnier, N. (2011) Ligand entry pathways in the ligand binding domain of PPAR γ receptor, *FEBS lett.* *585*, 2599-2603.
34. Genest, D., Garnier, N., Arrault, A., Marot, C., Morin-Allory, L., and Genest, M. (2008) Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPAR γ receptor as probed by molecular dynamics simulations, *Eur. Biophys. J.* *37*, 369-379.
35. Puhl, A. C., Bernardes, A., Silveira, R. L., Yuan, J., Campos, J. L., Saidemberg, D. M., Palma, M. S., Cvorro, A., Ayers, S. D., Webb, P., Reinach, P. S., Skaf, M. S., and Polikarpov, I. (2012) Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin, *Mol. Pharmacol.* *81*, 788-799.
36. Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H., Sipes, I. G., and Tagami, H. (2007) A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients, *Food Chem. Toxicol.* *45*, S1-23.

37. Taylor, S. J., Padyana, A. K., Abeywardane, A., Liang, S., Hao, M. H., De Lombaert, S., Proudfoot, J., Farmer, B. S., 3rd, Li, X., Collins, B., Martin, L., Albaugh, D. R., Hill-Drzewi, M., Pullen, S. S., and Takahashi, H. (2013) Discovery of potent, selective chymase inhibitors via fragment linking strategies, *J. Med. Chem.* **56**, 4465-4481.
38. Howard, N., Abell, C., Blakemore, W., Chessari, G., Congreve, M., Howard, S., Jhoti, H., Murray, C. W., Seavers, L. C., and van Montfort, R. L. (2006) Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors, *J. Med. Chem.* **49**, 1346-1355.
39. Dinkova-Kostova, A. T., Massiah, M. A., Bozak, R. E., Hicks, R. J., and Talalay, P. (2001) Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3404-3409.
40. Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., and Morikawa, K. (2009) Atomic structure of mutant PPAR γ LBD complexed with 15d-PGJ $_2$: novel modulation mechanism of PPAR γ /RXR α function by covalently bound ligands, *FEBS Lett.* **583**, 320-324.
41. Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H., and Morikawa, K. (2009) Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids, *J. Mol. Biol.* **385**, 188-199.
42. Scott, D. E., Coyne, A. G., Hudson, S. A., and Abell, C. (2012) Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology, *Biochemistry* **51**, 4990-5003.
43. Vass, M., Agai-Csongor, E., Horti, F., and Keserü, G. M. (2014) Multiple fragment docking and linking in primary and secondary pockets of dopamine receptors, *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1010-1014.
44. Lane, J. R., Chubukov, P., Liu, W., Canals, M., Cherezov, V., Abagyan, R., Stevens, R. C., and Katritch, V. (2013) Structure-based ligand discovery targeting orthosteric and allosteric pockets of dopamine receptors, *Mol. Pharmacol.* **84**, 794-807.
45. Singh J., Petter RC., Baillie TA. and Whitty A. (2011) The resurgence of covalent drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 307-317.
46. Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., and Kakizuka, A. (2003) PPAR γ coactivator 1 β /ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12378-12383.

47. 吉田光多郎 (2012) PPAR γ アンタゴニスト変換活性を有する物質の精製, 京都大学生命科学研究科生体情報応答学分野, 修士論文

[謝辞]

本研究を行う本研究を進めるにあたり、素晴らしい研究環境を与えて下さり、4年間にわたってご指導頂いた指導教員の京都大学大学院生命科学研究所永尾雅哉教授に感謝いたします。

また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂き、研究をご指導頂いた現、筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授 宮前友策先生に感謝いたします。

広い視点から有益なご指摘・アドバイスをしてくださった京都大学大学院生命科学研究所垣塚彰教授、佐藤文彦教授、神戸大朋准教授、増田誠司准教授、京都大学大学院農学研究科入江一浩教授に感謝いたします。本研究の協調的活性を示す化合物の同定にご尽力いただいた前任者の吉田光多郎氏に感謝いたします。

日常の研究生活でお世話になった生体情報応答学分野・分子応答機構学分野の研究室の皆様感謝します。事務面では嶋林かほる氏に大変お世話になりました。

また本研究を遂行する上で、研究室外でも様々な方にお世話になりました。京都大学大学院生命科学研究所垣塚彰教授には pCMX-GAL4-hRXR α , pCMX-GAL4, pCMX-GAL4-hPPAR $\alpha/\beta/\gamma$ プラスミドを分与いただきました。京都大学大学院生命科学研究所技術専門職員 渡邊 祐三氏には、LC-FT-MS の測定にご協力いただきました。日本新薬 山科植物資料館の秋田徹博士、前嶋一宏氏には、天然物抽出物の試料を提供いただきました。山梨大学環境学部生命工学科 大山 拓次 准教授には PPAR γ LBD の組換え体タンパク質を分与いただきました。これらの方々に感謝いたします。

最後に研究生活を送る間、生活を温かく支えていただいた家族に感謝いたします。

本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Anna Ohtera, Yusaku Miyamae, Kotaro Yoshida, Kazuhiro Maejima, Toru Akita, Akira Kakizuka, Kazuhiro Irie, Seiji Masuda, Taiho Kambe, and Masaya Nagao
Identification of a New Type of Covalent PPAR γ Agonist using a Ligand-Linking Strategy

ACS Chemical Biology, 10(12), 2794-2804, 2015