

## 論文の内容の要旨

論文題目：脂質調節因子（PPAR $\gamma$ 、HMGR）のアゴニスト作用によらない機能制御化合物の創製

氏名：豊田洋介

脂質調節に関わるタンパク質である PPAR $\gamma$  と HMGR において、アゴニスト作用とは異なる作用で機能を調節する化合物が報告されており、それらに着目した研究を行った。

### (1) HMGR 分解誘導剤 SR12813 の光親和性標識プローブ候補分子の創製

【序論】HMGR (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) はコレステロール合成経路における律速酵素であり、コレステロールやオキシステロールなどによって転写レベルと翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御を受けることが知られている。転写レベルにおいては転写活性体である SREBP/SCAP 複合体に対し、Insig が結合することで転写が抑制される。一方で、翻訳後レベルにおいては、25-ヒドロキシコレステロール (25HC) が Insig に結合することで、ユビキチン E3 リガーゼ/Insig/HMGR の複合体が形成され、HMGR をポリユビキチン化することで HMGR の分解が起こる (Fig. 1)。HMGR 分解を起こす化合物として SR12813 が報告されているが、直接的なターゲット分子などは明らかになっていない。SR12813 による HMGR 分解には Insig が必須であるものの、SR12813 は Insig には結合しないことが示唆されていることから、SR12813 は HMGR に結合して前述のような複合体を形成しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証する為、SR12813 を光親和性標識プローブ化し、HMGR への結合証明を行うこととした。SR12813 を光親和性標識プローブ化するにはアルキンなどの検出用官能基と、アジドやジアジリンなどの光親和性標識基を導入する必要があるが、SR12813 では HMGR 分解活性を指標とした系統的な構造活性相関が報告されていないことから、簡易的な構造活性相関の取得を行い、それを基にプローブの設計を行うという方針で研究を進めた。

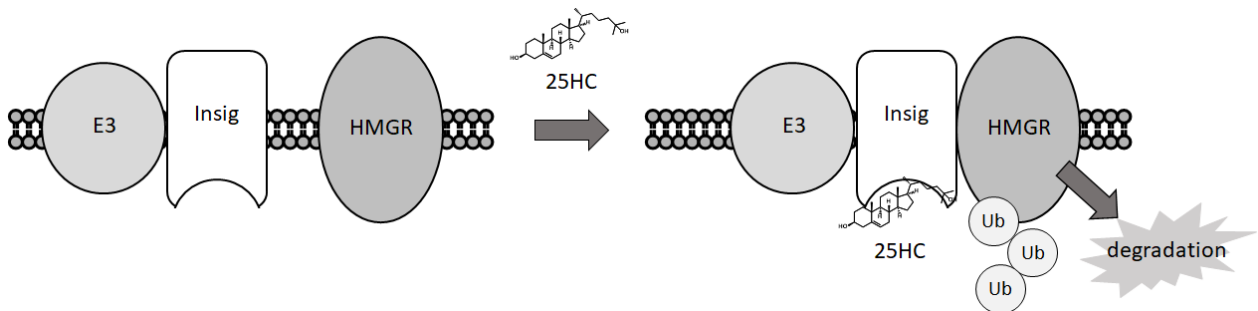


Figure 1 翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御メカニズム

### 【本論】

#### (1) 構造活性相関の取得とプローブ候補分子の創製

HMGR の分解活性は、HMGR の触媒ドメインを luciferase で置き換えた融合タンパク質を HEK293 に安定発現させ、化合物投与による細胞中の HMGR 量の変化を発光により定量した。

1) ターシャリーブチル基、二重結合、ヒドロキシ基についての検討

SR12813 の芳香環の 3 位と 5 位のターシャリーブチル基の重要性、二重結合体と単結合体の比較、ヒドロキシ基の必要性などの検討を行った結果、SR12813 よりも強い HMGR 分岐活性をもつ化合物 **1** と **2** の創製に成功した (Fig. 2)。特に化合物 **1** は報告例のある中で最も強い活性を有していると考えられる。これらの化合物をリードとして、プローブ化に必要な官能基の導入について検討を進めた。

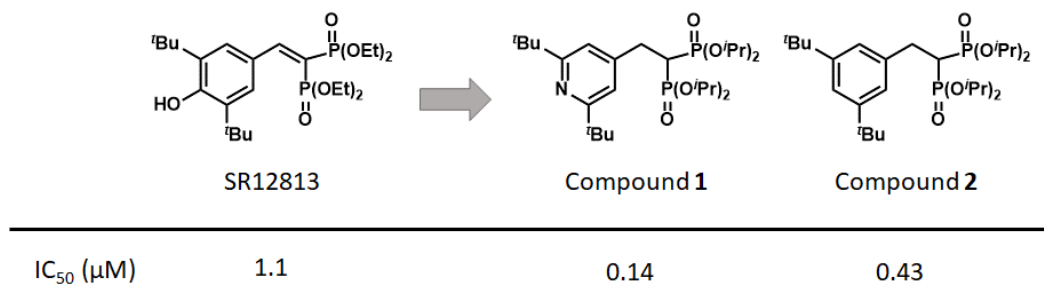


Figure 2 化合物 1、2 の HMGR 分解活性

2) プローブ化に必要な官能基導入についての検討

まず、芳香環のターシャリーブチル基のうち一方をプローブに変換できるかを検討した (table 1)。その結果、活性は低下するものの、アジド基 (**3**) やエチニル基 (**4**) に変換しても HMGR 分解活性が残ることが分かった。アジド基への変換がより活性を維持できたことから、

Table 1 ターシャリーブチル基の変換における活性評価

Compound	R	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>2</b>	<sup>t</sup> Bu	0.43
<b>3</b>	N <sub>3</sub>	1.4
<b>4</b>		2.7

Table 1 エステル上イソプロピル基の変換における活性評価

Compound	R	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	<sup>i</sup> Pr	0.14
<b>5</b>		0.60
<b>6</b>		0.76

アルキンを別の部位に導入できないかを検討した。次に、エステル上イソプロピル基を他のアルキル基に変換できるかを検討した (table 2)。その結果、活性は低下するものの、プロパルギル基 (**5**) やブチニル基 (**6**) に変換しても HMGR 分解活性が残ることが分かった。

ここまでの検討から、ターシャリーブチル基をアジド基に、エステル上イソプロピル基の 1 つをプロパルギル基に変換した光親和性標識プローブ候補分子 **srbAZY** を合成した (Fig. 3)。また、エステル上イソプロピル基の 1 つをジアジリンとアルキンを含むプローブユニットに変換した **srpDHY** も合成した。この 2 つのプローブ候補分子の活性を評価したところ、**srpDHY** は SR12813 よりも強い活性を有していることが明らかとなった。

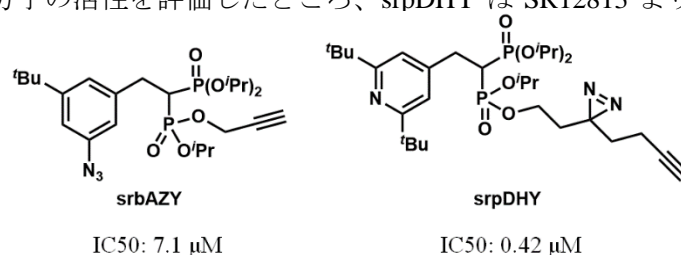


Figure 3 プローブ候補分子の構造と HMGR 分解活性の IC<sub>50</sub>

(2) HMGR への結合試験

創製した srpDHY を用いて HMGR のラベリング試験を行った結果を Fig. 4 に示す。その結果、srpDHY は UV 依存的なラベリングを起こし、そのラベリングが化合物の競合により阻害されることを確認することができた。すなわち、srpDHY は HMGR に結合することが明らかとなった。このことから、想定した通り SR12813 は HMGR に結合して HMGR の分解を誘導することが示唆された。

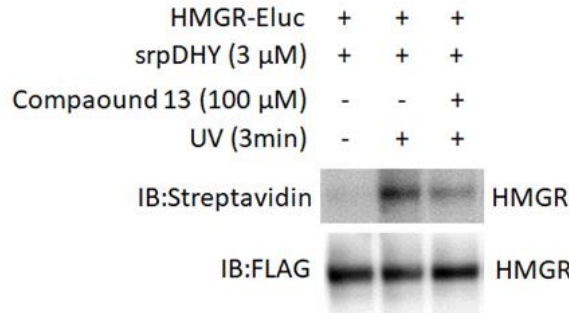


Figure 4 srpDHY を用いた HMGR への結合試験

【総括】

HMGR 分解作用を持つ SR12813 のターゲット分子を同定する為、SR12813 の光親和性標識プローブ化を行い、HMGR への結合試験を行った。プローブ化に際し、SR12813 の HMGR 分解活性を指標とした構造活性相関の取得、および現状最も強い HMGR 分解活性を有する化合物の創製に成功した。また、プローブを用いて HMGR への結合試験を行った結果、SR12813 類縁体は HMGR に結合することを明らかにした。本研究により HMGR 結合分子が同定されたことから、この結果が HMGR の X 線結晶構造の解明などに貢献することが期待される。

(2) PPARγ に transactivation 作用と transrepression 作用の相関関係の検証

【序論】ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor ; PPARγ) は脂質代謝や糖質代謝に関わる遺伝子を制御する核内受容体である。PPARγ はリガンド依存的に遺伝子プロモーター中の PPARγ 応答配列に結合して転写活性化を起こす transactivation 作用 (アゴニスト作用) だけでなく、プロモーター領域中に PPARγ 応答配列を持たないような炎症性遺伝子の発現をタンパク質間相互作用を介して抑制する transrepression 作用を有することが報告されている。当研究室では肝臓 X 受容体 (Liver X Receptor ; LXR) においてリガンドの構造展開によってこの 2 つの作用の分離を達成しているが、PPARγ においてはそのような transrepression 作用を有する PPARγ アンタゴニストの報告例はない。そこで、PPARγ においてはこの 2 つの作用が相関しているのではないかと考え、transactivation 作用の変化に付随する transrepression 作用の変化について検証した。

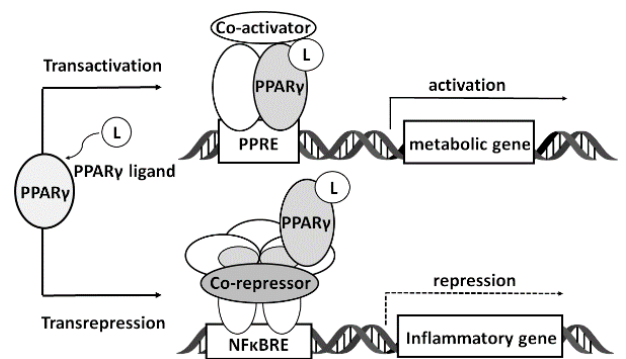
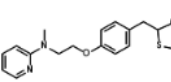





Figure 5 PPARγ における Transactivation 作用と transrepression 作用のメカニズム

【本論】 Transactivation 作用は全長 PPAR $\gamma$  と PPAR $\gamma$  応答配列を用いたレポータージーンアッセイにより評価し、transrepression 作用については PPAR $\gamma$  による transrepression 作用を受けることが知られている NF- $\kappa$ B 応答配列を用いたレポータージーンアッセイにより評価した。PPAR $\gamma$  アゴニストのロシグリタゾン、および所属研究室で創製されたアゴニスト **1**、**1** を由来とするパーシャルアゴニスト **2**、アンタゴニスト **3** において、両作用の最大活性を比較した結果を示す (Table 3)。その結果、フルアゴニストからアンタゴニストへと transactivation 活性が低下するに伴い、transrepression 活性も低下する結果となった。すなわち PPAR $\gamma$  においては transactivation 作用と transrepression 作用が相関していることが示唆された。この理由として、transrepression 作用の発現には PPAR $\gamma$  の Lys367 残基の SUMO 化が必要であるが、Lys367 はリガンド結合ポケット近傍に位置しており、transactivation 作用の変化に伴う PPAR $\gamma$  のコンフォメーション変化の影響を受けやすいためではないかと考える。

Table 3 Transactivation 作用と transrepression 作用の最大活性の比較

Compound		transactivation	transrepression
		Emax (%)	Maximum inhibition of NF- $\kappa$ B transcription (%)
Rosiglitazone		100	40
<b>1</b>		77	41
<b>2</b>		24	20
<b>3</b>		N. A.	N. A.

E<sub>max</sub>: Relative value compared to Rosiglitazone

Transrepression assay: measuring NF- $\kappa$ B transcription activation by TPA stimulation.

【総括】 本研究から、PPAR $\gamma$  においては transactivation 作用と transrepression 作用が相関することが明らかとなった。よって、transrepression 作用を維持した PPAR $\gamma$  アンタゴニストを創るには、これまでのようにリガンドとリガンド結合ポケットとの相互作用を変化させるような手法ではなく、既存のリガンドとは異なる PPAR $\gamma$  への結合様式を持つリガンドを探索し、Lys367 の SUMO 化能を指標とした構造展開を行うなど、別の戦略が必要であると考えられる。