

PPAR δ 選択的アゴニストの創製と受容体-リガンド複合体構造情報を踏まえた選択性発現機構解明

春日淳一,^a 大山拓次,^b 中込 泉,^c 青山 惇,^a 迫 久美子,^a
槇島 誠,^d 広野修一,^c 森川耿右,^b 橋本祐一,^a 宮地弘幸^{*,a,e}

Design and Synthesis of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Delta Agonists and Its Implication to the Driving Force to Elicit PPAR Delta Selectivity

Jun-ichi KASUGA,^a Takuji OYAMA,^b Izumi NAKAGOME,^c Atsushi AOYAMA,^a
Kumiko SAKO,^a Makoto MAKISHIMA,^d Shuichi HIRONO,^c Kosuke MORIKAWA,^b
Yuichi HASHIMOTO,^a and Hiroyuki MIYACHI^{*,a,e}

^aInstitute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, ^bInstitute for Protein Research, Osaka University, 6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan, ^cSchool of Pharmaceutical sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirogane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan, ^dSchool of Medicine, Nihon University, 30-1 Oyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan, and ^eGraduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

(Received January 9, 2009; Accepted February 27, 2009)

A series of 3-(4-alkoxyphenyl)propanoic acid derivatives was prepared as candidate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ -selective agonists, based on our previously discovered potent human PPAR α/δ dual agonist TIPP-401 as a lead compound. Structure-activity relationship studies clearly indicated the importance of the chain length of the alkoxy group at the 4-position, and the *n*-butoxy compound exhibited the most potent PPAR δ transactivation activity and highest PPAR δ selectivity. The (*S*)-enantiomer of a representative compound (TIPP-204) exhibited extremely potent PPAR δ transactivation activity, comparable to that of the known PPAR δ -selective agonist GW-501516. To understand why TIPP-204 shows high selectivity for hPPAR δ among hPPAR subtypes, and why TIPP-401, a structurally related compound, is a hPPAR α/δ dual agonist, computational docking of TIPP-401 to the ligand binding domains of hPPAR α and hPPAR δ and X-ray structure analysis of TIPP-204-hPPAR δ ligand binding domain were carried out. The results allowed identification of certain amino acids as putative determinants of the hPPAR δ selectivity of TIPP-204. To confirm the significance of these amino acids, GAL4-fusion proteins of mutated hPPAR δ s and hPPAR α s were prepared, and the transactivation activity of TIPP-204 toward the mutants was evaluated. The amino acid(s) that predominantly influence the potency and selectivity of TIPP-204 are different from that of the well-known PPAR δ -selective agonist GW-501516, which belongs to a different chemical class. The significance of these amino acids was confirmed by the examination of the complex structure between TIPP-204 and hPPAR δ . The results revealed several interactions relevant to the hPPAR δ -selectivity of the two ligands and will be useful for logical hPPAR δ ligand design.

Key words—PPAR delta agonist; X-ray crystallography; computer ligand docking

1. はじめに

21世紀における医療上の急務課題として、メタボリックシンドローム治療薬の創製が焦眉の急である。血糖、中性脂肪、コレステロールの総合的恒常性制御の観点から代謝性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) が注目されている。PPARには複数のサブタイプが見い出され、現在哺乳動物においては PPAR α , PPAR δ , PPAR γ の3種類が存在する。PPAR α は肝臓や腎

^a東京大学分子細胞生物学研究所 (〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1), ^b大阪大学蛋白質研究所 (〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3), ^c北里大学薬学部 (〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1), ^d日本大学医学部 (〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1), ^e岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1)

*e-mail: miyachi@pharm.okayama-u.ac.jp

臓等脂肪酸異化能の高い組織に分布していて脂肪酸の代謝や輸送に関連する遺伝子、コレステロールや中性脂肪の代謝に関連する遺伝子発現制御を担う。¹⁾ PPAR γ は白色脂肪組織や褐色脂肪組織に顕在し、脂肪細胞の分化誘導に対し中心的役割を果たす。また、成熟した脂肪細胞での脂肪の貯蔵を亢進させる。²⁻⁵⁾ 一方、PPAR δ は骨格筋を含め各臓器・組織に普遍的に発現する。PPAR各サブタイプ間でのリガンド結合領域の相同性は60-70%程度であり、またX線結晶構造解析によりリガンド結合空間が他の核内受容体と比べかなり広いことが明らかとなっている。PPARを標的とした医薬創製を指向した研究は、PPAR α とPPAR γ がそれぞれ高脂血症治療薬フィブラート類及び抗糖尿病薬グリタゾン類の分子標的であることが判明したため急速に進展した。⁶⁾ 一方残りのPPARであるPPAR δ は、多くの臓器組織にほぼ普遍的に発現していたため発現分布からはその機能を推測することが難しく、PPAR δ の生理的機能に関しては未解明であった。しかし近年、遺伝子改変マウスを用いた研究やPPAR δ 選択的アゴニストのパイオニア化合物として知られるGSK社のGW-501516 (Fig. 1; 以後GWと略記)を用いた研究により、PPAR α やPPAR γ のみならずPPAR δ も血糖・中性脂肪代謝制御やエネルギーバランス制御、コレステロールの逆転送過程に深く関与している核内受容体であることが解明されつつある。⁷⁻¹⁰⁾ PPAR δ に関する生化学・分子生物学的研究の進展は目覚ましい。一方創薬の観点からは、これまでにいくつかのPPAR δ 選択的アゴニストの報告が散見されるのみであり、その構造活性相関に関する知見や構造多様性等情報も乏

しい。さらに既存のPPAR δ 選択的アゴニストはGWの基本骨格である(2-メチル)フェノキシ酢酸構造を有するものが大半である。筆者らは核内受容体リガンドの合理的分子設計・創製の一環として代謝性核内受容体PPARに着目している。これまでに1,3,4-三置換ベンゼン誘導体の創製に従事し、既に高活性かつPPAR α 選択的アゴニスト活性及びPPAR α/δ デュアルアゴニスト活性を有する一連の光学活性1,3,4-三置換フェニルプロピオン酸誘導体KCL (1; Fig. 1)¹¹⁻¹³⁾及びTIPP-401 (2; Fig. 1)^{14,15)}を創製した。従来のグリタゾン系PPAR γ アゴニストやフィブラート系PPAR α アゴニストが1,4-二置換ベンゼン誘導体であるのに対し特徴的基本構造と考えている。筆者らはこれらの化合物をもとに、これまでに得られた構造活性相関の知見を加味した合成展開により、1,2,4-三置換ベンゼン誘導体であるGWとは構造が異なるPPAR δ 選択的アゴニストの創製が可能であると考え、その合成研究並びに活性評価を計画した。

本総合論文においては、構造情報に基づいたPPAR α/δ デュアルアゴニスト2を先導化合物として用いたPPAR δ 選択的アゴニストTIPP-204 (3; Fig. 1)の創製と、そのPPAR δ リガンド結合領域(PPAR δ LBD)との結合モデル解析、点変異PPARサブタイプを用いたミュレーション解析、さらにPPAR δ LBDとの複合体X線結晶構造解析を踏まえたPPAR δ 選択性発現機構解明研究を報告する。

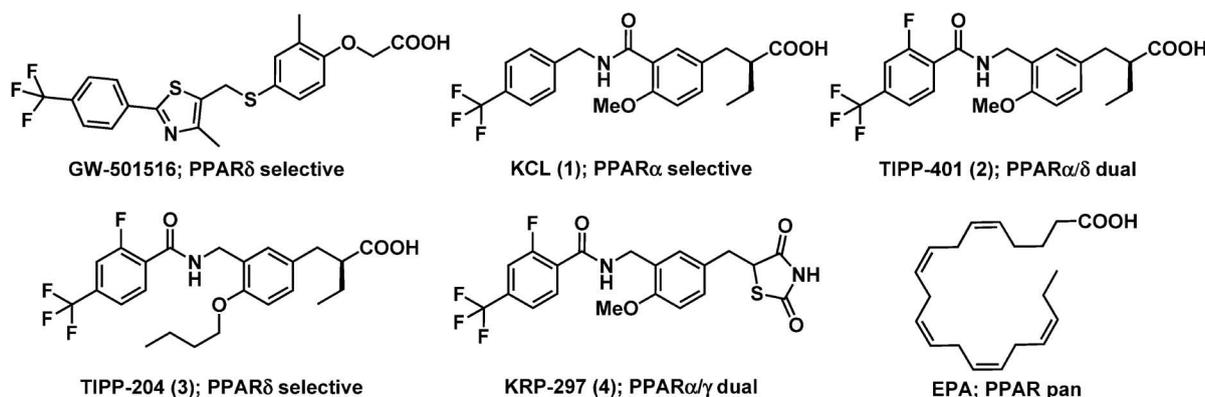


Fig. 1. Structures of the Representative Ligands Possessing PPARs Activity

2. X線結晶構造情報に基づいた PPAR δ 選択的アゴニストの創製

2-1. PPAR δ 選択的化合物創製の作業仮説

筆者らは選択的 PPAR γ アゴニスト活性発現に重要と考えられていたチアゾリジン-2,4-ジオン骨格を有するにも係わらず、PPAR γ のみならず PPAR α にも同等の結合活性、転写活性化作用を示す“デュアルアクション PPAR アゴニスト”である KRP-297 (4; Fig. 1) のチアゾリジン-2,4-ジオン骨格を α -置換プロピオン酸に変換した化合物 (1^{16,17}) が PPAR γ 活性を示さず、PPAR α 選択的活性化作用を示すことを見出した。そこで化合物の適切な構造修飾により、各種 PPAR サブタイプ選択的リガンドの創製が実現できるとの作業仮説を立てた。化合物 1 は構造上 3 つのモジュールに分けて考えることができる。すなわち 1) 酸性頭部部分、2) リンカー部分、3) 疎水性末端部分の 3 モジュールである。筆者らはリンカー部分を逆アミド型構造に変換することにより PPAR α 選択的アゴニスト 1 に PPAR δ 活性も付与できることを見出した。代表的化合物である 2 の PPAR α 及び PPAR δ に対する転写活性化作用の EC₅₀ 値はいずれも 10 nM と強力な“デュアルアクション PPAR α/δ アゴニスト”であった。

化合物 2 の PPAR α 活性を低下させ、一方 PPAR δ 活性をさらに向上させることができれば PPAR δ 選択的化合物は創製できる。そのための方策として筆者らは、2004 年当時既に報告されていた PPAR アゴニストの X 線結晶構造解析結果に着目した。当時 PPAR γ アゴニストと PPAR γ リガンド結合領域 (LBD) との複合体 X 線結晶構造は種々解かれていた。一方 PPAR δ アゴニストに関する X 線結晶構造解析の例は弱い活性を示す天然不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA; Fig. 1) のみであった。¹⁸⁾

筆者らは、X 線結晶構造が報告されていた PPAR γ アゴニストや PPAR α アゴニストはいずれも疎水性末端部分がヘリックス 2' 側を向いたテールダウン構造で結合しているのに対し、EPA は同様のテールダウン構造と、疎水性末端部分が逆にヘリックス 2 側を向いたテールアップ構造の 2 通りの結合様式で PPAR δ LBD に結合していることに着目した (Fig. 2)。筆者らは、“分子モデリング解析か

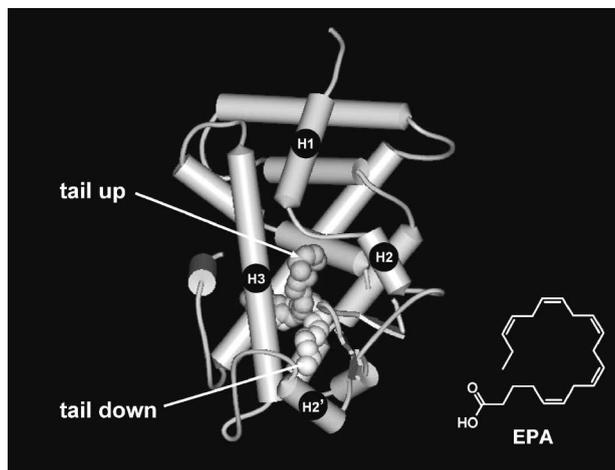


Fig. 2. The Structure of the PPAR δ -EPA Complex (PDB ID: 3GWX)

The PPAR δ polypeptide backbone is shown as a cylinder. The carbon atoms of EPA in the tail-up or tail-down configurations are shown respectively.

ら、同様にテールダウン構造で結合していることが推測された 1^{19,20} の構造に、テールアップに相当する側鎖を導入できれば EPA と同様二方向性での相互作用が可能となり、PPAR δ に対する親和性が向上するのではないかと作業仮説を立てた。化合物 1 の 4 位メトキシ基がテールアップ方向に存在することに注目し、2 の各種 4 位アルコキシ誘導体の合成を行った。

2-2. 4 位アルコキシ誘導体の合成 目的化合物群の合成を Chart 1 に示した。出発原料に各種 4-アルコキシベンズアルデヒドを用い、各種ホスホン酸エステルとの HWE 反応により桂皮酸エステル誘導体とした。引き続き接触還元により二重結合の還元を行って 4-アルコキシフェニルプロピオン酸エステル誘導体 (6a-f) を得た。アルコキシ基のオルト位をホルミル化し、得られたベンズアルデヒド誘導体 (7a-f) と 4-トリフルオロメチルベンズアミド誘導体との還元的アミドアルキル化²¹⁾を行って第二級アミド誘導体 (8a-l) に変換した。最後にアルカリ性条件で加水分解を行いエステル部分を脱保護して所望の α -置換フェニルプロピオン酸誘導体 (9a-l) を全 5 工程、通算収率 20–50% で得た。

化合物 9 にはカルボキシ基の α 位に不斉炭素が存在するため一対のエナンチオマーが存在する。いずれのエナンチオマーがより高活性を示すのか確定するために 9 の不斉合成を行った。光学活性 9i (=

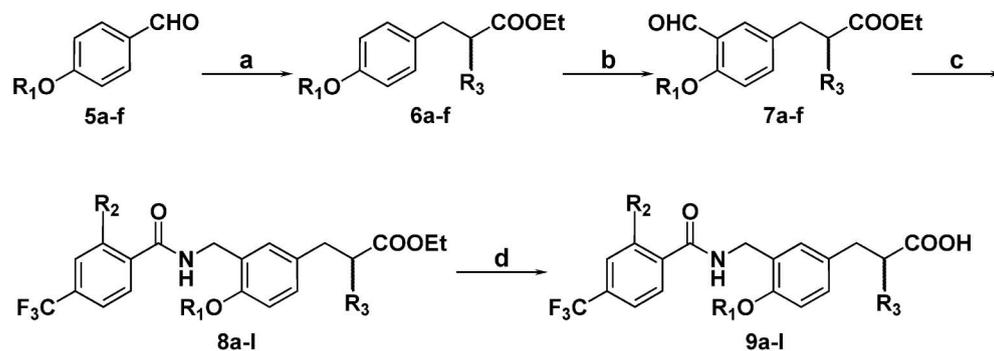


Chart 1. Synthetic Route to the Present Series of Compounds

(a) (I) $(\text{EtO})_2\text{POCH}(\text{R}_3)\text{CO}_2\text{Et}$, tBuOK , THF, rt., 75–90%; (II) H_2 , 10% Pd-C, AcOEt, rt., 90–95%; (b) TiCl_4 , MeOCHCl_2 , CH_2Cl_2 , -30°C , 85–95%; (c) benzamide derivative, $(\text{Et})_3\text{SiH}$, TFA, toluene, reflux, 70–85%; (d) aq-LiOH, EtOH, rt., 60–78%.

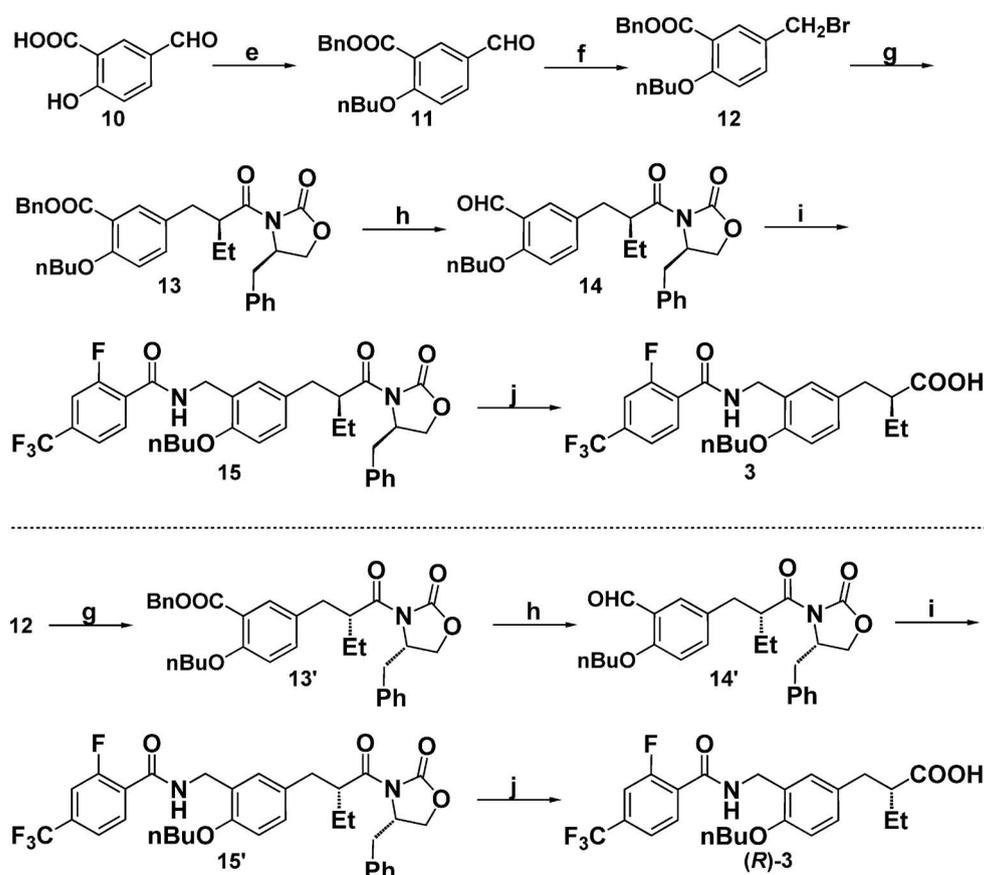


Chart 2. Synthetic Route to the Optically Active Phenylpropanoic Acid Derivatives

(e) (I) BnBr , KHCO_3 , DMF, rt., 85%; (II) $n\text{BuI}$, K_2CO_3 , DMF, rt., quant.; (f) (I) NaBH_4 , EtOH, rt., 80%; (II) PBr_3 , ether, 0°C , 65%; (g) LiHMDS, (R) -3-butyryl-4-benzyloxazolidine-2-one, THF, -30°C – 0°C , 70%; (h) (I) H_2 , 10% Pd-C, AcOEt, rt., 90%; (II) BH_3 -THF, THF, 0°C –rt., quant.; (III) activated- MnO_2 , CH_2Cl_2 , rt., 80%; (i) 2-fluoro-4-trifluoromethylbenzamide, $(\text{Et})_3\text{SiH}$, TFA, toluene, reflux, 75%; (j) LiOH H_2O , aq- H_2O_2 , THF- H_2O , 70%; (k) LiHMDS, (S) -3-butyryl-4-benzyloxazolidine-2-one, THF, -30°C – 0°C , 70%.

3) の合成ルートを Chart 2 に示した。5-ホルミルサリチル酸を KHCO_3 存在下ベンジル化してカルボキシ基を選択的にベンジルエステルとしたのち、 K_2CO_3 存在下ヨードブタンで水酸基をブチルエーテル化した。次にホルミル基を還元してヒドロキシ

メチル基としたのち水酸基を PBr_3 で臭素化して求電子反応剤 **12** を合成した。化合物 **12** と (R) - N -ブチリル-4-ベンジルオキサゾリジノンとのエバンス不斉アルキル化²²⁾を行い光学活性オキサゾリジノン誘導体 **13** を 98% d.e で得た。化合物 **13** はジエチル

エーテルで再結晶することにより HPLC 分析で 100% d.e にまでジアステレオマー比を向上させることができた。化合物 **13** を接触還元して安息香酸誘導体とし、カルボキシ基のボラン還元、活性化二酸化マンガン酸化を行いベンズアルデヒド誘導体 **14** へと変換した。化合物 **14** と 2-フルオロ-4-(トリフルオロメチル)ベンズアミドとのトリエチルシランを用いた還元的アミドアルキル化ののちリチウムパーオキシドによる不斉補助基の除去を行い、目的とする (*S*) 配置の α -置換フェニルプロピオン酸誘導体を 10 工程、通算収率 12% で得た。その光学純度はキラルカラムを用いた HPLC 分析で 99% e.e 以上であることを確認した。同様にして、**14** と (*S*)-*N*-ブチリル-4-ベンジルオキサゾリジノンとのエバンス不斉アルキル化反応を機軸とした合成法により、逆の立体配置である (*R*) 配置の α -置換フェニルプロピオン酸誘導体も合成した。

2-3. 4 位アルコキシ誘導体の PPARs 転写活性とその構造活性相関 合成した各種アルコキシ誘

導体の PPAR 各サブタイプ転写活性化作用 (EC_{50}) を Table 1 に示した。活性値は数値が小さいほど強い転写活性化作用を示すことを表す。筆者らの実験系においても GW は強力かつ PPAR δ 選択的転写活性化作用を示し、評価システムの妥当性を確認することができた。今回合成した一連の α -置換フェニルプロピオン酸誘導体は、PPAR γ に対しては **9h** 以外は EC_{50} 値が $1 \mu\text{M}$ 以上であり、高活性を示さない構造であることが確認された。PPAR α に対する転写活性化作用に関しては、メトキシ基やエトキシ基等鎖長の短いアルコキシ誘導体が高活性を示した。一方 PPAR δ に対する転写活性化作用に関してはより長いアルコキシ誘導体が高活性であり、*n*-プロポキシ体や *n*-ブトキシ体が高活性を示した。このように PPAR α と PPAR δ で高活性を示すアルコキシ基の長さが異なることを明らかにすることができた。一方、これまでに筆者らは本系統化合物の疎水性末端部分や中央ベンゼン環の 6 位にフッ素原子を導入すると、疎水性相互作用の向上に起因する

Table 1. Transactivation Activities of the Present Series of Compounds on Each PPAR Subtypes

No.	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ (nM)		
				PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
9a	H	Me	Et	18 ± 8	170 ± 40	2600 ± 400
9b	H	Et	Et	12 ± 3	15 ± 4	1800 ± 900
9c	H	<i>n</i> Pr	Et	77 ± 11	6.8 ± 0.6	1300 ± 100
9d	H	<i>n</i> Bu	Et	520 ± 120	4.8 ± 0.6	1300 ± 100
9e	H	<i>n</i> Hexyl	Et	1200 ± 300	45 ± 5	2300 ± 200
9f	H	Bn	Et	>10000	110 ± 20	6200 ± 1500
9g	F	Me	Et	8.2 ± 1.4	21 ± 1	2200 ± 500
9h	F	<i>n</i> Pr	Et	41 ± 8	1.7 ± 0.1	650 ± 10
9i	F	<i>n</i> Bu	Et	280 ± 40	1.9 ± 0.2	1400 ± 200
9j	H	Me	Me	19 ± 3	210 ± 30	>10000
9k	H	Me	<i>n</i> Pr	70 ± 21	120 ± 10	3600 ± 600
9l	H	Me	<i>n</i> Bu	230 ± 30	700 ± 150	2400 ± 100
3 (= (<i>S</i>)-9i)				250 ± 40	0.91 ± 0.2	1100 ± 160
(R) - 3 (= (<i>R</i>)-9i)				620 ± 60	8.3 ± 1.5	7000 ± 1900
GW				1000 ± 460	1.8 ± 0.3	8600 ± 1200

Compounds were screened for agonist activity on PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected HEK-293 cells. EC_{50} value is the molar concentration of the test compound that affords 50% of the maximal reporter activity detected for the positive control. Fenofibric acid, GW-501516 and ciglitazone served as positive control for the hPPAR α , hPPAR δ and hPPAR γ transactivation assay, respectively. *n*=3.

と考えているが、各 PPAR 転写活性が一様に向上することを見出した。¹¹⁾ そこで疎水性末端部分であるベンゼン環 2 位にフッ素原子を導入した化合物を合成し評価すると、PPARs 活性が今回の場合にも全般的に向上することを確認した。化合物 **9i** はラセミ体ではあるが、GW と同等の強い PPAR δ 転写活性と高い PPAR δ 選択性を併せ持つ化合物であった。

化合物 **9i** にはカルボキシル基の α -位に不斉炭素が存在するので一対のエナンチオマーが存在する。いずれの立体異性体が高活性を示すのかを確定するために各エナンチオマーをエバンス不斉アルキル化反応を機軸とした方法によって合成 [3 及び (*R*)-3] し活性評価を行ったところ、いずれの PPAR サブタイプに対しても (*S*) 体の方が (*R*) 体よりも高活性であり、(*S*) 体の方が高活性を示すことを明らかにした。このようにして筆者らは天然不飽和脂肪酸である EPA の複合体 X 線結晶構造を踏まえた、構造情報に基づく考察により α -置換フェニルプロピオン酸型 PPAR δ 選択的アゴニスト **3** の創製に成功した。

2-4. 化合物 **3** の PPAR δ 選択性発現機構の解明

2-4-1. 化合物 **3** の結合モデルの構築と考察

化合物 **3** はなぜ高い PPAR δ 選択的活性化作用を示し、PPAR α に対する活性は低下したのだろうか？筆者らは、PPAR α / δ デュアルアゴニストである **2** を創製した段階で、**2** と PPAR α LBD 並びに **2** と PPAR δ LBD との複合体構造モデルの構築を実施した。その解析の概略を Fig. 3 に示した。はじめに **2** に関してドッキング解析のための初期配座をランダムに 20 コンホマー発生させた。次にこれまでに報告されている PPAR δ LBD の X 線結晶構造を結合部位の立体構造に基づき分類し、その中で代表的な 5 構造 (PDB No.: 1GWX-A, 1GWX-B, 1YOS-A, 2B5O-A, 2J14-A) に対して、Glide4.0 (Schrödinger 社) を用いてリガンドをフレキシブルに扱ったタンパク質-リガンドドッキングスタディを行った。そして得られたドッキングポーズ群に対してリガンドと受容体間の相互作用エネルギーの指標である Glide Score を算出した。複合体 X 線結晶構造既知のリガンドを学習セットに用いた解析で Glide Score の最上位ポーズがいずれも真の結合ポーズを再現していたことから、**2** の場合においても Glide

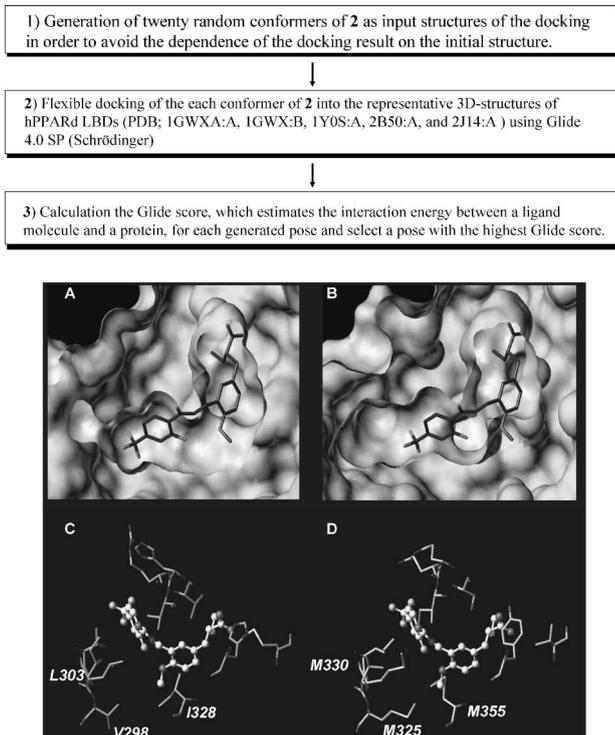


Fig. 3. Flow Diagram to Construct the Modeling Structure of **2** Bound to hPPAR δ LBD and hPPAR α LBD, and the Molecular Modeling Structures of the Binding Mode of **2** Complexed with PPARs

A, C: the binding pose of **2** complexed with hPPAR δ (A: the protein is depicted as a Connolly's molecular surface map, C: representative amino acids interacting with **2** are shown). B, D: the binding pose of **2** complexed with hPPAR α (B: the protein is depicted as a Connolly's molecular surface map, D: representative amino acids interacting with **2** are shown).

Score の最上位ポーズを **2** と PPAR δ LBD の複合体構造モデルとして決定した。この **2** と PPAR δ LBD の複合体構造モデルに PPAR α LBD を重ね PPAR δ LBD を除くことによって、**2** と PPAR α LBD の複合体構造モデルを構築した。Figure 3 (A-D) に解析結果 (リガンド及びリガンド結合部位周辺構造) を示した。Figure 3 (A) と Fig. 3 (B) は PPAR 各サブタイプ LBD をコノリー表面で図示した結果 (A; PPAR δ , B; PPAR α)、Fig. 3 (C) と Fig. 3 (D) は **2** の近傍に位置するアミノ酸をスティック表示で示したものである (C; PPAR δ , D; PPAR α)。このモデル構造を比較してアルコキシ基周りに関して示唆されたことは、**2** のメトキシ基の近傍に窪みが存在すること、そして PPAR δ の窪みの方が、対応する PPAR α の窪みよりも大きいということであった。概算では PPAR δ の方が約 3 倍大きな窪みが構成されていた。アミノ酸レベルで詳細にながめると、窪

みは疎水性ポケットであり、PPAR α ではメチオニン 325, メチオニン 330, メチオニン 355 と側鎖の長いアミノ酸残基で構成されていた。一方 PPAR δ では対応する窪みはバリン 298, ロイシン 303, イソロイシン 328 と PPAR α のメチオニンと比べ、より鎖長の短いアミノ酸残基で構成されていることが判明した。

2-4-2. ミューテーションスタディによる鍵アミノ酸残基の解明 先に示した各種アルコキシ誘導体の構造活性相関 (Table 1) から、PPAR α に関しては鎖長の短いアルコキシ基が最大活性を示し、一方 PPAR δ の場合には中程度の鎖長のアルコキシ基が最大活性発現には重要であることが判明した。この事実は 4 位アルコキシ基と、対応する疎水性の窪みとの相互作用の違いが高い PPAR δ 選択性発現の主たる理由と推測された。この考察を検証するために、さらには **3** の PPAR δ 選択的活性化作用にどのアミノ酸残基がより重要な寄与をしているのかを理解するためには、PPAR δ と PPAR α の対応するアミノ酸残基をそれぞれ置き換えた点変異 PPAR を

用いたミューテーションスタディが最適であると考えた。そこで、PPAR δ のバリン 298, ロイシン 303, イソロイシン 328 をそれぞれ対応する PPAR α のメチオニンに置換した点変異 PPAR δ LBD と酵母の転写因子 GAL4 との融合タンパク質を作成し、各種 PPAR アゴニストの転写活性化作用が点変異によりどのように変化するのか検討した。²³⁾ 結果を Fig. 4(A-C) に示した。Figure 4(A) は GAL4 と各ミュータント PPAR δ LBD の概念図であり、Fig. 4(B) は 10 nM の各種 PPAR アゴニストを用いた場合の転写活性化作用の相対値である。Figure 4(C) は各種 PPAR アゴニストの野生型及びミュータント PPAR δ に対する転写活性化作用の EC₅₀ 値である。実験に用いたのは **3**, **GW**, 及び **2** である。

化合物 **3** の転写活性化活性は野生型ヒト PPAR δ に対しては高活性を示すが、298 番目のバリンをメチオニンに変換したミュータント (V298M; アミノ酸側鎖が大きくなり、結果的にはポケットを小さくする変異) では活性が著しく低下した [Fig. 3(B, C)]. 一方、328 番目のイソロイシンをメチオ

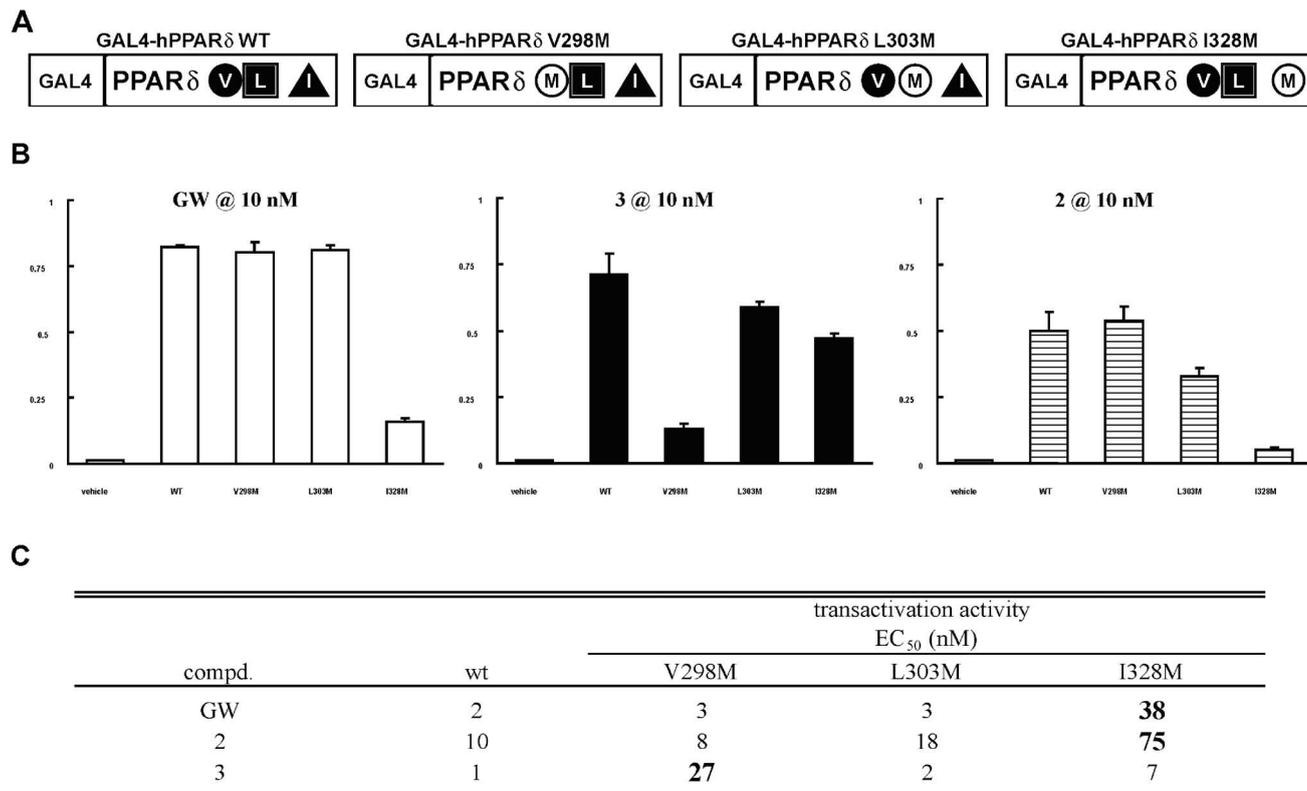


Fig. 4. A Single Amino Acid Residue Predominantly Determines Subtype-specific Agonist Recognition

A: A schematic representation of GAL4-fusion point mutants, B: Transactivation activities of 10 nM **GW**, **2**, and **3** on wt-hPPAR δ and the pointmutated-hPPAR δ s, C: EC₅₀ values of the transactivation activities of **GW**, **2**, and **3** on wt-hPPAR δ and the pointmutated-hPPAR δ s.

ニンに変換したミュータント (I328M) を用いた場合には野生型 PPAR δ と比べ活性低下の度合いは軽度であり, 303 番目のロイシンをメチオニンに変換したミュータント (L303M) を用いた場合には野生型 PPAR δ と比べ活性低下はほとんど認められなかった (Fig. 3 (B, C)). このように **3** の PPAR δ 活性発現には特に PPAR δ の 298 番目バリンとの相互作用の重要性が示唆された. 一方 **3** とは基本骨格の異なるフェノキシ酢酸構造の PPAR δ 選択的アゴニストである GW においては, **3** とは異なり 298 番目のバリンをメチオニンに変換したミュータント (V298M) に対しては転写活性を保持していたが, **3** では影響が大きくはなかった 328 番イソロイシンのメチオニンへの変異 (I328M) により活性が低下した [Fig. 4 (B, C)]. このように同じ PPAR δ 選択的アゴニストであっても, 影響を受けるアミノ酸残基が異なることを明らかにすることができた. 興味深いのは PPAR α/δ デュアルアゴニストである **2** である. **2** は化学構造上は PPAR δ 選択的アゴニストである **3** に類似している. しかし, **3** とは異なり 298 番目のバリンをメチオニンに変換したミュータントに対しては転写活性を保持していた. 一方, **3**

では活性低下の度合いは軽度であった 328 番イソロイシンのメチオニンへの変異 (I328M) が最も大きく影響し, 活性が低下した [Fig. 4 (B, C)]. つまり **2** が強く影響を受けるアミノ酸残基のパターンというものは **3** とは異なり, むしろ GW と同様に I328M ミューテーションの影響を 3 つのアミノ酸残基の中では強く受けることが判明した.

2-4-3. 複合体 X 線結晶構造解析 ミューテーションスタディから **3** の PPAR δ 選択的活性化作用には特に PPARLBD の 298 番アミノ酸がバリンであるか (PPAR δ LBD) メチオニンであるか (PPAR α LBD) の違いが重要であることが示唆された. しかしこれはなぜであろうか? 分子モデリングはその精度は十分に高いが, その詳細説明のためには複合体としての X 線結晶構造解析が必要と考えた. そこで, 大量の PPAR δ LBD タンパク質精製作業と, 多数の結晶化条件検討を精力的に繰り返した結果, **3** 及び **2** と PPAR δ LBD との複合体 X 線結晶構造をそれぞれ 3 Å 及び 2.7 Å の解像度で解くことに成功した. 結果を Fig. 5 (E-H) に示した. Figure 5 (E) は PPAR δ LBD-**3** 複合体の全体像, Fig. 5 (F) は PPAR δ LBD-**2** 複合体の全体像, Fig. 5 (G)

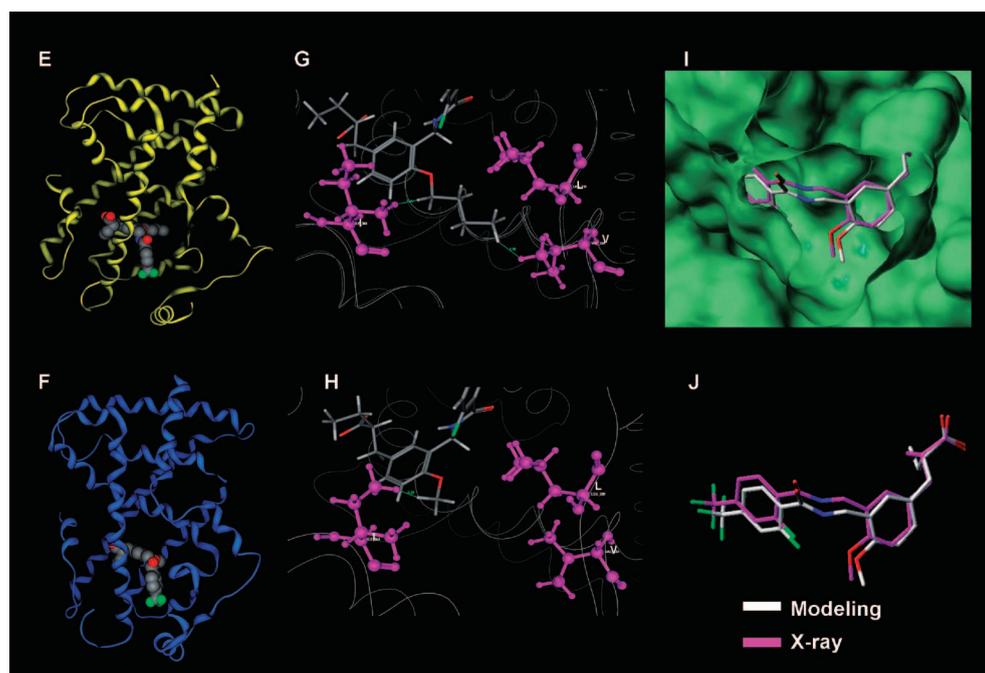


Fig. 5. Comparison between the 2-PPAR δ LBD and the 3-PPAR δ LBD Complexes

E: An overview of the structure of 3-hPPAR δ LBD complex, F: An overview of the structure of 2-hPPAR δ LBD complex, G: Close-up view of the *n*-butoxy chain of **3** in the binding site, H: Close-up view of the methoxy chain of **2** in the binding site, I: Superimposition of the modeling structure and the X-ray structure of **2** bound to hPPAR δ LBD, J: Close-up view of both **2** in the binding site.

は PPAR δ LBD-3 複合体における 3 の *n*-ブトキシ基近傍の拡大図, Fig. 5(H) は PPAR δ LBD-2 複合体における 2 のメトキシ基近傍の拡大図である. 化合物 3 では *n*-ブトキシ基の末端メチル基は 298 番目のバリンとファンデルワールス相互作用を形成していた. したがって, このバリン (PPAR δ LBD の 298 番アミノ酸) をさらに嵩高いメチオニン (対応する PPAR α LBD のアミノ酸) に置換すると側鎖が長すぎて 3 と立体反発が生じることが推測された. 化合物 2 の場合メトキシ基は鎖長が短いのでこの疎水性ポケット部分との相互作用 (特に 298 番バリンとの相互作用) が弱いことが推測された. したがって, 奥底部分に存在するバリンを, さらに嵩高いメチオニンに置換しても相互作用的には影響が認められなかったと推測する. メトキシ基のメチル基近傍には 328 番のイソロイシンが少し離れて存在している. この部分がメチオニンとなり嵩高くなると反発が多少生じ活性が低下したのではないかと推測する.

2-4-4. X 線結晶構造との比較によるモデリングの精度解析 今回筆者らは PPAR δ 選択的アゴニストの創製を目的として, α -置換フェニルプロピオン酸型アゴニスト 3 の創製に成功した. また 3 の PPAR δ に対する結合様式をモデリング解析を用いて推定し, さらに X 線結晶構造解析を行って PPAR δ 選択性発現機構を相互作用するアミノ酸のレベルで明らかにすることができた. この過程で筆者らは, PPAR α/δ デュアルアゴニスト 2 と PPAR δ LBD とのモデリング構造と X 線結晶構造の 2 つの構造を得ることができた. 創薬化学研究において, “コンピューターモデリング構造はどれだけ X 線結晶構造を再現しているのだろうか?” ということは重要に思われた. そこでモデリング構造と X 線結晶構造の 2-PPAR δ LBD 複合体の重ね合わせを実施した. 結果は Fig. 5(I, J) に示した. Figure 5(I) は双方の重ね合わせの結果であり, PPAR δ LBD はコノリー表面で図示した. Figure 5(J) は双方における 2 の構造のみ表示したものである. リガンド 2 の位置のずれは 0.63 Å, 2 の配座のずれは 0.36 Å と高い精度であることが示された. これは, 今回のモデル構造構築における論理展開の妥当性を強く示唆するのであり, 市販のタンパクリガンドドッキングソフトをルーチ的にそのまま使ったのではここまでの精度は決して得られなかつ

たと推察する.

3. まとめ

筆者らは 1,3,4-三置換ベンゼンをスキップホルドに用いた PPAR アゴニスト創製を研究し, これまでに PPAR α 選択的アゴニスト (1), PPAR α/δ デュアルアゴニスト (2) 等一連の光学活性 α -置換フェニルプロピオン酸誘導体を見出した. その結果, 1,3,4-三置換ベンゼンの PPAR スキップホルドとしての有用性を明らかとした. その研究の一環として今回 PPAR δ 選択的アゴニスト活性を有する光学活性 α -置換フェニルプロピオン酸誘導体 (3) の創製に成功し, さらに 3 の高い PPAR δ 選択性発現機構を明らかにした.

PPAR リガンド研究の歴史を振り返るに, 特定サブタイプ (特に PPAR γ と PPAR α) に着目した, サブタイプ選択的アゴニスト創製を目指した研究が精力的に行われてきた. しかし, 各サブタイプはそれぞれに特徴的な遺伝子発現制御機能も存在するが, 一方でかなり重複した遺伝子発現制御機能を有する側面も存在する.¹⁴⁾ また副作用軽減の可能性から, PPAR デュアルアゴニスト, PPAR パンアゴニスト, さらに PPAR アンタゴニストの創製が注目されている. いずれにせよメタボリックシンドロームといった多因子性難治疾患への PPAR をベースにしたアプローチにおいては, いずれのサブタイプ選択性が好ましいのか (好ましくないのか) のバリデーションは, 特にヒトを対象に考えた場合には確立されていないのではないかと考える. さらに近年, PPAR の機能が血糖・中性脂肪・コレステロールの恒常性制御のみならず, 記憶・睡眠・免疫応答や細胞の分化・誘導の過程においても重要な機能を示す “多能性” が示され, 各生体内反応における PPAR 各サブタイプの寄与に関する研究はこれからの学問とも考える.¹⁵⁾

このような背景を踏まえると, アカデミアにおける基礎創薬化学の観点からは, 単一の基本骨格構造体から種々の特徴的サブタイプ選択性を示す PPAR リガンドを自在に創製できる方法論の確立及びその実践, さらにそのサブタイプ選択性発現機構の構造生物学的解析という研究展開は重要と考えている. 筆者らの開発した各種 PPAR リガンドが今後の PPAR 研究に多少なりとも寄与できれば幸いである.

REFERENCES

- 1) Aoyama T., Peters J. M., Iritani N., Nakajima T., Furihata K., Hashimoto T., Gonzalez F. J., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5678–5684 (1998).
- 2) Lambe K. G., Tugwood J. D., *Eur. J. Biochem.*, **239**, 1–7 (1996).
- 3) Elbrecht A., Chen Y., Cullinan C. A., Hayes N., Leibowitz M., Moller D. E., Berger J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 431–437 (1996).
- 4) Sundvold H., Brzozowska A., Lien S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 857–861 (1997).
- 5) Tai T. A., Jennermann C., Brown K. K., Oliver B. B., MacGinnitie M. A., Wilkison W. O., Brown H. R., Lehmann J. M., Kliewer S. A., Morris D. C., Graves R. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 29909–29914 (1996).
- 6) Staels B., Auwerx J., *Curr. Pharmaceut. Des.*, **3**, 1–14 (1997).
- 7) Amri E. Z., Bonino F., Ailhaud G., Abumrad N. A., Grimaldi P. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 2367–2371 (1995).
- 8) Kliewer S. A., Forman B. M., Blumberg B., Ong E. S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D. J., Umesono K., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7355–7359 (1994).
- 9) Oliver Jr. W. R., Shenk J. L., Snaith M. R., Russell C. S., Plunket K. D., Bodkin N. L., Lewis M. C., Winegar D. A., Sznaidman M. L., Lambert M. H., Xu H. E., Sternbach D. D., Kliewer S. A., Hansen B. C., Willson T. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 5306–5311 (2001).
- 10) Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R. X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 15924–15929 (2003).
- 11) Nomura M., Tanase T., Ide T., Tsunoda M., Suzuki M., Uchiki H., Murakami K., Miyachi H., *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599 (2003).
- 12) Miyachi H., Nomura M., Tanase T., Suzuki M., Murakami K., Awano K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 333–335 (2002).
- 13) Nomura M., Tanase T., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2101–2104 (2002).
- 14) Kasuga J., Hashimoto Y., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 771–774 (2006).
- 15) Kasuga J., Makishima M., Hashimoto Y., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 554–558 (2006).
- 16) Nomura M., Satoh H., Kinoshita M., Maeda M., Tsunoda M., Murakami K., Miyachi M., Awano K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 533–538 (1998).
- 17) Murakami K., Tobe K., Ide T., Mochizuki T., Ohashi M., Akanuma Y., Yazaki Y., Kadowaki T., *Diabetes*, **47**, 1841–1847 (1998).
- 18) Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Parks D. J., Blanchard S. G., Brown P. J., Sternbach D. D., Lehmann J. M., Wisely G. B., Willson T. M., Kliewer S. A., Milburn M. V., *Mol. Cell*, **3**, 397–403 (1999).
- 19) Uchiki H., Miyachi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 365–367 (2004).
- 20) Miyachi H., Uchiki H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3145–3149 (2003).
- 21) Dube D., Scholte A. A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2295–2298 (1999).
- 22) Evans D. A., Ennis M. D., Mathre D. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1737–1739 (1982).
- 23) Kasuga J., Oyama T., Nakagome I., Makishima M., Hirono S., Morikawa K., Hashimoto Y., Miyachi H., *ChemMedChem*, **3**, 1662–1666 (2008).