

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号： 34419

研究種目： 新学術領域研究

研究期間： 2012～2013

課題番号： 24116524

研究課題名（和文）

疾患において変動する代謝物リガンドによる核内受容体 PPAR γ の機能制御

研究課題名（英文）

Regulation of PPAR γ by endogenous metabolites in health and disease

研究代表者

白木 琢磨 (SHIRAKI, TAKUMA)

研究者番号： 10311747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）7,200,000 円、（間接経費）2,160,000 円

研究成果の概要（和文）：核内受容体 PPAR γ アゴニストによる 2 型糖尿病治療効果が明確であるにもかかわらず、生活習慣病において PPAR γ がどのように疾患に関与しているのかは不明である。本研究では、精製したリコンビナント PPAR γ に、ヘム合成の中間代謝物が PPAR γ に共有結合していることを発見した。遺伝性にヘム合成が亢進している EPP 患者で見つかったヘム合成の律速酵素 ALAS2 の変異遺伝子を用い、ヘム合成を亢進した細胞を構築したところ、共培養したマクロファージ細胞株 THP-1 における PPAR γ 活性が阻害された。従って、疾患においてヘム合成中間代謝物が PPAR γ を阻害する事で生活習慣病の進行を引き起こしている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Erythropoietic protoporphyria (EPP) patients show higher risk of metabolic syndrome such as atherosclerosis with unknown reason. Here, we found that the inhibition of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) by an erythroid-derived heme-related metabolite. Using the EPP cells expressing ALAS2 gene with dominant mutation (called as ALAS2delAT), we observed the perturbation of PPAR γ activity in co-cultured THP-1 macrophage cells. Phagocytosis-mediated application of exogenous heme-related metabolite complex to the THP-1 cells mimicked the effects of EPP cells. We also found that it covalently bound to the Cys285 in the PPAR γ LBD. Thus, this heme-related metabolite is the endogenous risk factor for the metabolic syndrome through the PPAR γ inhibition.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード： 転写制御 生体内代謝物 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病関連疾患である 2 型糖尿病の治療薬が PPAR γ アゴニストであることが明らかになり、以後、製薬会社を中心として合成リガンドの開発がすすんだ。申請者は、薬が実際に使われているにもかかわらず、内在性リガンドの認識機構に関しては不明であることに着目し、その結合様式を詳細に検討した。

【内在性脂肪酸リガンドの作用機構】

解析の結果、脂肪酸代謝物リガンド 15d-PGJ2 に含まれる α,β -不飽和ケトンにより PPAR γ のリガンド結合ポケットにあるシ

ステインとマイケル付加することを発見した。さらに、ケミカルバイオロジー研究により、 α,β -不飽和ケトンを持ついくつかの炎症性エイコサノイドの代謝物が PPAR γ リガンドとして機能する事を見いだした (Shiraki et al., JBC, 2005)。共有結合は PPAR γ の活性化に必要であることから (Shiraki et al., Biochem. J., 2006)、PPAR γ は内在性親電子性代謝物のセンサーであると考えている。

X 線結晶構造解析により、リガンドとの共有結合の有無により受容体が構造変化することが示され、内在性脂肪酸リガンドに関す

る受容体活性化モデルが実証された(Waku, Shiraki et al., J. Mol. Biol., 2009, FEBS Lett., 2009)。

【新規内在性リガンドの発見】

脂肪酸リガンドの結合した立体構造を見ると、大きなポケットが余っていることに気づいた。そこで、脂肪酸リガンドとは別にこのポケットに結合する新たなリガンドがあるのではないかと考え、内在性代謝物を検索したところ (Sionyu et al., PEDS, 2011)、神経伝達物質セロトニンの細胞内代謝物がこのポケットに作用する新しい PPAR γ リガンドであることを発見した。この内在性リガンドに含まれるインドール酢酸が結合と活性に重要であり、この化学構造モチーフを持つインドメタシンが全く同様の作用機構を持つアゴニストであることを見いだした (Waku, Shiraki et al., EMBO J. 2010)。

【着想に至った経緯】

以上の研究から、核内受容体 PPAR γ は脂肪酸代謝物とセロトニン代謝物という全く異なる2つの代謝物に対し、独立して応答出来る仕組みを持っていることが明らかとなった。このことから、PPAR γ は臓器毎、状況毎に異なる内在性リガンドにより制御されている可能性が示唆された。従って、生理的、病理的状況においてどのような内在性代謝物が実際に PPAR γ に作用しているのかを検討する必要があると考え本研究を着想した。

2. 研究の目的

PPAR γ に関しての内在性リガンドに関する研究が遅れているため、生活習慣病におけるどのような代謝変動が PPAR γ に関与するのかについては不明である。そこで、ヘム合成の中間代謝物が PPAR γ の抑制性リガンドであるという申請者自身の発見を元に、核内受容体を介した代謝と転写の情報変換の分子機構を解明し、生活習慣病関連疾患などの病態の理解につなげる。

ヘム代謝系の酵素であるフェロキラーゼの変異体マウスでは、通常食でも生活習慣病様の病態を示すことから、ヘム合成の変動が生活習慣病と関連が深いと考えられる。そこで、ヘム代謝物に焦点を絞り、PPAR γ に作用するリガンドの同定と、その作用機構を明らかにすることを計画した。代謝物リガンドの同定と作用機構の解析に加え、代謝物リガンドの増減が引き起こす細胞応答を探り、未

解明であった PPAR γ と生活習慣病病態との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

【リガンドの同定】

大腸菌を用いて PPAR γ のリコンビナント蛋白質を発現、精製し、そこに含まれるヘム関連代謝物を同定する。システイン変異体の PPAR γ を用いることで共有結合の関与を探る。

【ケミカルバイオロジーによるリガンド認識機構の解明】

プロテアーゼで断片化した後リガンドの共有結合したペプチドを MS/MS 解析し、リガンドを同定する。同定された代謝物のアナログを用いたケミカルバイオロジー研究により、結合に関与する化学モチーフを同定することで結合様式を確定する。

【代謝物で制御される遺伝子セットの解析】

マクロファージに分化誘導した THP-1 細胞は PPAR γ を発現しており、PPAR γ リガンドにより様々な応答を示す。分化した THP-1 細胞は食食能を持つようになるため、アルブミンに結合した代謝物を取り込み、ライソゾームから細胞質に取り込む。食食により取り込んだリガンドにより引き起こされる遺伝子の発現変化を RT-PCR およびウェスタンブロット法により確認する。

【代謝変動によりおこる細胞応答の解析】

同定された内在性リガンドの代謝変動により生活習慣病に関与している可能性が考えられる。そこで、代謝異常がマクロファージの PPAR γ の機能制御をしている可能性を探り、その分子機構を検証する。

4. 研究成果

【リガンドの同定】

大腸菌を用いて発現し、高度に精製した PPAR γ のリガンド結合領域蛋白質が薄く着色していることに気付いた。CD スペクトルを測定するとポルフィリンに特徴的なスペクトルが観察されたことから、ヘム関連代謝物であることが予想された。しかし、原子吸光測定では全く鉄が検出されないことから、ヘムではないことが明らかとなった。興味深いことにこの精製蛋白質は青色で励起すると黄色の蛍光を発することがわかった。このことから、PPAR γ に結合しているのはヘム前駆体のポルフィリンの一種である事が予想

された。そこで、ヘム前駆体であるアミノレブリン酸を培養液中に添加し、ヘム合成を促進した大腸菌から PPAR γ 蛋白質を精製したところ、着色、蛍光いずれも増加した。この試料を SDS-PAGE の後 PPAR γ 蛋白質のバンドを切り出し、トリプシンで完全分解した後、ペプチドの分子量測定を行った。その結果、Cys285 にボルフィリンが共有結合しているペプチドが同定された。従って、ヘム中間代謝物であるボルフィリンが PPAR γ のリガンドとして結合すると考えられた。

【ケミカルバイオロジーによるリガンド認識機構の解明】

ボルフィリンが PPAR γ のシステインに共有結合する機構を明らかにするために、ボルフィリンアナログを用いて共有結合に必要な官能基を明らかにした。その結果、ボルフィリンにあるビニル基がシステインとの共有結合に必要であることがわかった。ビニル基がプロピオン酸に置換されているヘム合成中間代謝物には PPAR γ との結合活性は見られないことから、PPAR γ による認識の特異性はボルフィリンのビニル基で決まっていることが明らかとなった。

【ヘム関連代謝物で制御される遺伝子セットの解析】

PPAR γ 依存性に発現調節を受けることが知られる遺伝子についてボルフィリンの添加の効果を検討した。マクロファージ細胞のモデルとして使われる THP-1 細胞を PMA で分化誘導し、ボルフィリンを添加したが PPAR γ の標的遺伝子に変動しなかった。一方、アゴニストである BRL49653 で刺激することにより発現誘導された FABP4 は、ボルフィリンの同時投与により発現が阻害された。別の標的遺伝子 CD36 の発現誘導を FACS で定量したところ、FABP4 と同様アゴニストである BRL49653 で誘導された場合に CD36 の発現がボルフィリンの同時投与で阻害されることが明らかとなった。つまり、ボルフィリンは PPAR γ に対する内在性のアンタゴニストとして機能する事がわかった。

【代謝変動によりおこる細胞応答の解析】

ボルフィリンの代謝異常が見られる疾患として Erythropoietic protoporphyria (EPP) がある。この遺伝病では赤血球におけるヘム産生が亢進しボルフィリンが蓄積してしまう事により様々な病態を誘導する。優性遺伝を示す EPP 家系で見つかったヘム合

成の律速酵素 ALAS の変異体を用いる事で、培養細胞において EPP モデルを構築した。この変異遺伝子を発現した細胞ではヘム代謝が亢進し、細胞内にボルフィリンが蓄積することが確認された。この細胞を上述の THP-1 細胞と共培養すると、THP-1 細胞の PPAR γ の機能が阻害されることから、EPP モデル細胞で産生されたボルフィリンは一度培養液中に分泌され、貪食されることでマクロファージ細胞の PPAR γ を阻害する事が明らかとなった。

以上の研究から、ヘム合成の中間代謝物であるボルフィリンが PPAR γ に対する新しいリガンドであることが明らかとなり、これまで知られる代謝物とは異なり内在性のアンタゴニストとして作用することがわかった。ボルフィリンが蓄積するとマクロファージの PPAR γ の活性が阻害され、マクロファージの機能阻害に繋がると考えられる。一般に様々な臓器に浸潤したマクロファージは、死細胞や老廃物を貪食することで臓器の機能維持を行っている。したがって今回発見した内在性代謝物による PPAR γ の活性阻害は疾患の進行を引き起こす可能性がある。今後、この代謝物の変動をマーカーとして疾患の進行を検証する研究が必要となるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M., Igarashi, K., Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *BBA*, 査読有, 1840, 2351-2360, 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.
2. Gamo, K., Shiraki, T., Matsuura, N., and Miyachi, H., Transactivation by Hesperetin Glucuronides is Distinct from That by a Thiazolidine-2,4-dione Agent. *CHEM.PHARM.BULL.*, 査読有, 62, 491-493, 2014, https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/5/62_c14-00021/_article

3. Li, J., Shiraki, T. and Igarashi, K., Bach1 as a regulator of mitosis, beyond its transcriptional function. *Communicative & Integrative Biology*, 査読無, 5, 1-3, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502211/>
 4. Li, J., Shiraki, T., Igarashi, K. Transcription-independent role of Bach1 in mitosis through a nuclear exporter Crm1-dependent mechanism. *FEBS Lett.*, 査読有, 586, 448-454, 2012, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579312000610>
 5. Shionyu-Matsuyama, C., Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Shirai, T., and Morikawa, K. Detecting structural similarity of ligand interactions in the lipid metabolic system including enzymes, lipid binding proteins, and nuclear receptors. *PEDS*, 査読有, 24, 397-403, 2011, <http://peds.oxfordjournals.org/content/24/4/397.long>
- 〔学会発表〕（計 10 件）
1. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., Multiple metabolic pathways regulate PPAR γ in multiple ways. CSHL meeting, Aug. 13-Aug. 17, 2013, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
 2. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., One receptor senses two ligands; the nuclear receptor PPAR γ monitors multiple cellular metabolism. Metabolism, Diet and Disease. May 29-May 31, 2012, Georgetown University Hotel and Conference Center, Washington DC, USA
 3. Waku, T., Shiraki, T., Morikawa, K., Structural basis for the activation of the nuclear receptor, PPAR γ , by fatty

- acid- and serotonin metabolites. 第 85 回日本生化学会大会, 2012/12/14-2012/12/16、福岡国際会議場
4. 白木琢磨「核内受容体 PPAR γ の機能解析：分子生物学的アプローチと生化学的アプローチ」第 84 回日本生化学会大会, 2011/9/21-2011/9/24, 国立京都国際会館
 5. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., Sertonin metabolites act on the nuclear receptor PPAR γ as endogenous ligands independently of fatty-acid metabolites. LXXVI Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, June 1-June 6, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

他 国内学会 ポスター発表 5 件

〔図書〕（計 3 件）

1. 白木琢磨、和久剛、森川耿右「生体内代謝物をモニターする転写システム：核内受容体 PPAR γ による転写を介した代謝ネットワーク間のクロストーク」生化学（日本生化学会）9 月号、749-761, 2013
2. 木下賢吾、白木琢磨企画特集「タンパク質構造機能相関再考」生化学（日本生化学会）8 月号、629-705, 2013
3. 白木琢磨「薬が作用するということ」化学と生物（国際文献社）3 月号 193-195, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木琢磨 (SHIRAKI TAKUMA)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：10311747

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし