

論文内容の要旨

申請者氏名 Yudhi Nugraha

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptors) PPAR はホルモンの核内受容体スーパーファミリーに属する亜鉛フィンガー (zinc-finger) 型転写因子である。脂肪酸類をリガンドとする3つのサブタイプ、PPAR α 、PPAR γ 及び PPAR δ (又は PPAR β)、が知られている。内在性の結合リガンドの同定や構造研究に基づいた合成アゴニストの開発が進んでいる PPAR α と PPAR γ とは対照的に、PPAR δ の研究は様々な困難から遅れており、ヒトへの処方可能な薬剤開発には至っていない。一方、糖尿病の経口第一選択薬として広く使用されているメトホルミン (metformin) は、直接の標的タンパク質については不明なことが多かったが、最近になって、最新のビーズ技術を駆使してリガンドからの標的タンパク質を探索する方法により、メトホルミンの直接の標的が PPAR δ である可能性が示唆された。PPAR δ の合成アゴニストとしては、GW501516 等の酸性のフェノキシ酢酸誘導体が知られていたが、メトホルミンはグアニジウム基をもつ塩基性のビグアニド (biguanide) 系薬剤であり、化学構造に共通性がない。そこで、メトホルミンと PPAR δ との相互作用やその特異性の機構を原子レベルで解明する目的で本構造生物学的研究を開始した。まず、PPAR δ のリガンド結合ドメイン LBD (ligand-binding domain) の組換えタンパク質を調製した。この LBD は不溶性沈殿として発現するので、変性剤を用いて可溶化した後に再生させる条件を見出して、高度に精製可能な実験系を確立した。精製試料を用いて LBD との複合体を結晶化して、大型放射光施設 SPring-8 で 2.0 Å の分解能の X 線強度データを収集した。メトホルミンと同じビグアニド系薬剤の一つでフェンホルミンについても複合体結晶を作成して 2.3 Å 分解能のデータ収集に成功した。構造決定の結果、メトホルミンは、LBD の Arm I と呼ばれるリガンド結合空洞に入り込み、メトホルミンのグアニジウム基が LBD の Thr253、His287、His413、Tyr437 と直接の水素結合を形成することで、特異的に結合していることを解明した。これらの相互作用を通して空洞の入口を α -ヘリックス H12 で封鎖することで、活性型の LBD コンホメーションを誘導することを見出し、アゴニストとしての機能メカニズムを解明した。また、既知の複合体構造との比較から、メトホルミンのグアニジウム基の役割は、フェノキシ酢酸誘導体でカルボン酸の役割と類似していることを発見した。更に、PPAR α や PPAR γ の LBD との構造比較から、Thr253 が特異性に重要な立体的な役割を果たしていることも解明した。これらの成果により、既知の化合物と全く異なる PPAR δ アゴニストや、新規の経口糖尿病薬の開発の鍵となる重要な構造的基礎を提供した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yudhi Nugraha

本研究は、メトホルミンが PPAR δ のアゴニストとして、PPAR δ を特異的に活性化するメカニズムを構造生物学の手法で明らかにしている。具体的には、先ず PPAR δ の LBD の組換えタンパク質調製を大腸菌の系を用いて確立して、高分解能 (2.0 Å) の複合体結晶の作製に成功している。PPAR δ の LBD は不溶性画分に発現するので、変性剤を用いた可溶化とタンパク質フォールディングの再生実験を実現している。また、ストリーキング等の方法で工夫することにより、X 線回折実験に適した結晶を得ている。大型放射光施設での回折実験で得た X 線強度データをもとに構造決定に成功している。その結果、以下のことを明らかにしている。第 1 に、メトホルミンが、PPAR δ の LBD のリガンド結合空洞中に結合していることを明らかにすることで、メトホルミンが PPAR δ と直接に相互作用することを支持する実験的データを提供した。第 2 に、この結合は、Thr253、His287、His413、Tyr437 との直接の水素結合や、Thr253、Leu433、Phe246、Met417 等との非極性相互作用を通して安定化されているという、結合の詳細を解明した。第 3 には、LBD の α -ヘリックス H12 の Leu433 や Tyr437 との直接の相互作用を通してこの α -ヘリックスがリガンド結合空洞の Arm I に蓋をするという、メトホルミンのアゴニストとしての作用メカニズムを明らかにした。第 4 には、PPAR α や PPAR γ の LBD の既知構造との比較により、PPAR δ に特徴的な Thr253 (PPAR α や PPAR γ では Ser) との水素結合と非極性相互作用が PPAR α や PPAR γ では失われること示すこととで、特異性のメカニズムを明らかにした。第 5 には、メトホルミンとその標的タンパク質との直接の相互作用を観測する実験的データを初めて示した。メトホルミンが効果を及ぼすとされる標的タンパク質には諸説あるが、どれもメトホルミンが直接相互作用するか否かを判定できる実験データに欠けていたので、この意義は大きい。最後に、PPAR δ は脂質異化・輸送・蓄積等の制御において重要であり、ヒトの臨床応用可能な薬剤開発が待たれていた。これまでに開発されてきたフェノキシ酢酸誘導体の PPAR δ 合成アゴニスト GW50151 等は発がん性等の副作用があり、ヒトへの処方には至っていない。これとは対照的に、メトホルミンは経口糖尿病薬として広く市場で処方されており、安全性が担保されているので、PPAR δ が直接の標的タンパク質であることを証明した本研究は、新規治療薬としての応用や新薬開発の大きなブレークスルーの契機を与えている。

以上のように、本論文はメトホルミンと PPAR δ の分子薬理学の基礎のみならず、臨床応用や新薬開発にも寄与するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。