

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08236

研究課題名(和文) 複数分子間の相互作用解析に基づく核内受容体ダイマー活性化の動的構造基盤

研究課題名(英文) Structural Basis for Nuclear Receptor Dimer Activation Based on Multi-Molecular Interaction Analysis

研究代表者

吉田 卓也 (Yoshida, Takuya)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：00294116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核内レセプターによる転写制御においては、リガンド依存的にレセプターに結合する転写共役因子が選択されることが重要である。本研究では代謝制御に重要な核内レセプターPPAR/RXR からなるヘテロダイマーにおいて、両レセプターのアゴニストが転写共役因子の選択に及ぼす影響を解析した。その結果、複数の転写共役因子ペプチドが存在する場合、各レセプターは結合ペプチドが異なる複数の状態間で動的な平衡状態にあることが示された。また一方のレセプターに対するリガンド結合が、相手側レセプターへの転写共役因子結合を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内レセプターは生活習慣病やがんの薬剤標的として重要であり、これまで多くの構造的な知見が集積されてきた。しかし核内レセプターによる転写制御は多数の分子が関わる非常に複雑な過程であり、作動薬を合理的に分子設計することは、未だ困難である。本研究で明らかとした、核内レセプターによる転写共役因子選択の新たな機構は、望ましい応答を惹起できる適切な作動薬の設計や評価に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：In transcriptional regulation by nuclear receptors, transcriptional cofactors bind to the receptor in a ligand-dependent manner. In this study, we analyzed the effect of agonists on the selection of transcriptional cofactor-derived peptides by a heterodimer consisting of the nuclear receptor PPAR/RXR, which is important for metabolic regulation. We found the existence of a dynamic equilibrium in solution among multiple states where each receptor has a different binding peptide. Ligand binding to one of the receptors regulates cofactor binding to the other receptor, indicating a dynamic allosteric communication between receptors.

研究分野：構造生物学

キーワード：核内受容体 PPAR RXR NMR 転写共役因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトでは 48 種類存在する核内レセプターは、ホモ/ヘテロダイマーを形成して DNA の特定の配列に結合し、代謝産物・ホルモン等のリガンドに依存的な転写制御作用を発揮して、代謝-転写ネットワークの調節に関わっている。例えば PPAR は RXR とヘテロ二量体を形成し、脂質代謝関連酵素の発現を制御してインスリン抵抗性に関与する。その作用から、生活習慣病やがんの創薬標的タンパク質として 1990 年代より多くの製薬企業において盛んに研究され、生理作用が異なるフルアゴニスト・パーシャルアゴニスト・アンタゴニストが種々創出された。また、そのリガンド結合ドメイン(LBD)について多数の結晶構造が決定されてきた。その結果、構造生物学的な観点からは、核内レセプターに共通する転写活性化メカニズムとして、C 末端側ヘリックス(Helix 12; H12)の構造がリガンド依存的に変化し、種々の転写共役因子(コアクチベーター、コリプレッサー)との結合を制御するモデルが広く受け入れられている。

しかし、結晶構造中の H12 は、リガンドの有無・種類に依存せず活性型となっている場合が多く、リガンド間の活性の差異については必ずしも説明できない。2008 年に初めてほぼ全長の PPAR-RXR-DNA 複合体の立体構造が報告され、核内レセプターの活性化機構についての理解が大きく前進すると思われた。しかし H12 の役割について革新的な知見はなく、またこの構造は結晶パッキングの影響を大きく受けており、ドメインの相対配置などはクライオ電子顕微鏡の結果と矛盾するとの指摘もある。NMR 及び HDX-MS によって、PPAR-LBD の立体構造が大きく揺らいでいることも報告され、リガンドの作用の違いは LBD の動的構造からも議論されているが、リガンドによる構造安定化の違いがどのように転写共役因子との結合選択性に結びついているのかははっきりしていない。また、リガンド結合によるアロステリックな作用が RXR のような二量体パートナー側で転写共役因子の結合にどのように影響するかも不明な点が多い。応募者は、リガンド結合時の構造及びその揺らぎの変化と転写共役因子の選択性を同時に解析することにより、これらの問題を明らかに出来ないかと考え、これまでに NMR による検討で、PPAR には転写共役因子の結合状態が複数存在し、その占有率および状態間の交換速度がリガンド依存的に変化することを見出した。また転写共役因子の結合モチーフ配列に依存して、PPAR との結合親和性が  $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ M の範囲で変化し、その値はさらにリガンドによって変動することが示された。すなわち、PPAR-LBD が取りうる構造多形には、様々な転写共役因子に応じた多様性が備わっており、その間の専有率がリガンドによって変化していると考えられた。実際、異なるコアクチベーター由来のペプチドを用いた実験では、共通した LBD 認識モチーフである LxxLL 配列を有するにも関わらず、部分的に異なるシグナル変化が観測され、その結合様式が異なる可能性が示唆された。またこれらのシグナルに注目することで、複数のコファクター共存下においても、LBD がそれぞれにどの程度結合しているか識別できる可能性が示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、PPAR/RXR 系を中心に、核内レセプターの活性化機構の理解を深化するため、複数の転写共役因子ペプチドが混在する条件下で、PPAR/RXR それぞれへの結合選択性が各種のリガンドによってどのように変調されるかを明らかにしたいと考えている。そのため、まず各々の転写共役因子が、核内レセプターヘテロダイマーのどちらにどれだけ結合しているか解析可能な新たな実験系を構築することを目的とする。また、核内レセプターの構造多形の特徴を明らかにし、相互作用解析を実施する。さらに可能であれば、PPAR/RXR 系の知見を他のサブタイプや異なるレセプターにおいて検討する。

### 3. 研究の方法

転写共役因子と核内レセプターとの結合は、転写共役因子に含まれる結合モチーフ(LxxLL/LxxxLxxxLモチーフ)を介している。その周辺配列の多様性と、リガンド依存的な LBD の構造揺らぎが結合親和性をファインチューニングする結果、様々な転写共役因子が共存する中で特定の転写共役因子との結合が選択されると考えられる。また、リガンド/転写共役因子の結合は、ヘテロダイマー間でのアロステリックな相互作用を通じ、互いのヘテロダイマーパートナー分子におけるリガンド/転写共役因子の結合親和性を変化させうる。この同時相互作用を観測するには、複数の転写共役因子共存下において、それぞれが、ヘテロダイマー中のどちらの LBD にどの程度結合しているか識別する必要がある。そのため、本研究では、NMR の化学シフト摂動(CSP)が結合分子種の違いを反映することを活かす。また単なる CSP では変化が少なく、ヘテロダイマー系での解析が困難になることがある程度予想されるため、転写共役因子ペプチドにキレート部位を導入し、ランタノイドイオンを付加することを計画している。異なる磁化率異方性テンソルを持つランタノイドを用いることで、それぞれの分子に対して磁氣的に異なるタグ付けが実現できる。ランタノイドの大きな常時性シフト・磁気緩和効果の利用と、ヘテロダイマー構成タンパク質間における選択的な同位体標識により、ヘテロダイマー系での相互作用分子の識別を可能とする。

以上の実験系を作成した後、まず PPAR-LBD、及び RXR-LBD について複数の転写共役因子ペプチドが共存する混合系における分子間相互作用を系統的・定量的に評価する。各レセプター単独での解析後は、PPAR/RXR-LBD ヘテロダイマーの系を解析する。この過程で実験系を確立すると共に、リガンド/転写共役因子の種類とその濃度変化がどのように転写共役因子間のスイッチングを実現しているかを明らかにしていく。また、ヘテロダイマー中のレセプター間に

は、アロステリック作用を通じた結合因子の制御が存在すると想定される。その様態を明らかにすると共に、背景にあるレセプターの構造多形について解析する。

#### 4. 研究成果

ランタノイドイオンのキレート部位を有する転写共役因子ペプチドを用い、Gd<sup>3+</sup>による常磁性緩和促進効果 (PRE) を利用することで、動的な転写共役因子の結合を解析する実験系を作成できた。その結果、PPAR $\alpha$ -LBD はリガンド非結合時において、NCoA1 ペプチド結合型と NCoR1 ペプチド結合型との交換状態にあることが確認された。この特性は、PPAR $\alpha$ -LBD がリガンド結合に依存して素早くコファクターを入れ替えるために重要である可能性がある。ここに PPAR アゴニストが結合すると、PPAR $\alpha$ -LBD の構造が変化し、NCoA1 ペプチドのみが強固に PPAR $\alpha$ -LBD に結合することが示された。

PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマーについては、個別にアミノ酸選択標識したヘテロダイマーを再構成して作成することで、高分子量にもかかわらず NMR 解析可能な実験系を作成できた。上記の PRE を用いた実験により、PPAR $\alpha$ -LBD/RXR $\alpha$ -LBD ヘテロダイマーについて、リガンド依存的にコファクターとの動的な結合状態が段階的に変化していく様子を捉えることができた。アポ状態の PPAR $\alpha$ -LBD/RXR $\alpha$ -LBD ヘテロダイマーは、その PPAR $\alpha$  側に NCoA1 ペプチドと NCoR1 ペプチドが共に結合できる状態にある一方、RXR $\alpha$  側には主に NCoR1 ペプチドが結合している。ここに PPAR $\alpha$  アゴニストが結合しても PPAR $\alpha$  とコファクターペプチドとの相互作用に与える影響は小さい。一方、RXR $\alpha$  アゴニストが結合した場合は、RXR $\alpha$  側に NCoA1 ペプチドが結合するようになる。さらに両アゴニスト共に結合した場合は、NCoR1 ペプチドが PPAR $\alpha$  側から外れるとともに、NCoA1 ペプチドは RXR $\alpha$ -LBD よりも PPAR $\alpha$ -LBD に優先的に結合する状態へと変化していることが観測された。これらの結果は PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  が“パーミッシブ”ヘテロダイマーであり、RXR $\alpha$  アゴニストのみの結合によってもコアクチベーターがリクルートされるという先行研究と矛盾しない一方で、PPAR $\alpha$  アゴニストが、ヘテロダイマー間のアロステリック作用を通じて RXR $\alpha$  側へのコアクチベーターの結合様式を変化させることを新たに示唆した。

以上、当初目的としていた PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマーにおける、転写共役因子選択のダイナミクスを観測することに成功した。その詳細な分子メカニズムについては、当初予想したような分子の構造多形という観点からは十分な知見を得ることはできなかった。一方、今回見出したヘテロダイマー間のアロステリック作用を含む転写共役因子選択の新たな機構は、今後核内レセプターを標的とした創薬研究において、より望ましい応答を惹起できる適切な作動薬の設計や評価に役立つと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Takuya, Oki Hiroya, Doi Michihiro, Fukuda Syohei, Yuzuriha Tomohiro, Tabata Ryotaro, Ishimoto Kenji, Kawahara Kazuki, Ohkubo Tadayasu, Miyachi Hiroyuki, Doi Takefumi, Tachibana Keisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural Basis for PPAR Activation by 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine Derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-020-64527-x">https://doi.org/10.1038/s41598-020-64527-x</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田卓也
2. 発表標題 NMRで見るタンパク質の過渡的な複合体形成
3. 学会等名 平成29年度日本分光学会NMR分光部会講習会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口俊介、吉田卓也、河原一樹、大久保忠恭
2. 発表標題 NMRによる核内受容体PPAR /RXR ヘテロダイマーの相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考