

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08373

研究課題名(和文) ビタミンD受容体コファクターペプチドの網羅的合成と機能解析

研究課題名(英文) Systematic synthesis and functional analysis of vitamin D receptor cofactor peptides

研究代表者

山本 恵子 (YAMAMOTO, Keiko)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90147017

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)：ビタミンD受容体のコファクターペプチドを、マイクロウェーブを用いた固相法により、網羅的に合成した。合成した15種類のコファクターペプチドのうち、コアクチベーター由来のSRC2-2とRIP140-5で、ビタミンD受容体リガンド結合ドメイン(VDR-LBD)との複合体の結晶構造解析に成功した。さらに、表面プラズモン共鳴法により、RIP140-5は、これまで結晶化に汎用されてきたDRIP205-2よりも強いVDR-LBD親和性を示すことを明らかにした。コリプレッサーペプチドについては、13残基から19残基にすることでVDR-LBDに対する親和性を向上させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内受容体の一員であるビタミンD受容体(VDR)のコファクターペプチドを網羅的に合成し、ビタミンD受容体リガンド結合ドメイン(VDR-LBD)の結晶構造解析に有用なRIP140-5を見出したことは、これまで困難であったVDR-LBDとリガンドの組み合わせの共結晶構造の解析に貢献すると期待できる。核内受容体LBDは制御機構に共通点が多いため、本研究結果は、VDRのみにとどまらず、他の核内受容体の新規構造解析にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：A series of co-factor peptides for vitamin D receptor were comprehensively synthesized by microwave-assisted solid-phased synthesis method. Among them, co-activator peptides, SRC2-2 and RIP140-5, were succeeded in X-ray crystal structural analysis of the complex with vitamin D receptor ligand-binding domain (VDR-LBD). In analysis using surface plasmon resonance (SPR), RIP140-5 showed higher affinity for VDR-LBD than DRIP205-1 which is a co-activator peptide most used for the crystal structural analysis of VDR-LBD. Furthermore, we found that, in co-repressor peptide, the elongation from 13 to 19 amino acid residues increases the affinity for VDR-LBD.

研究分野：メディシナルケミストリー

キーワード：ビタミンD ビタミンD受容体 コファクター コアクチベーター コリプレッサー 結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内受容体はホルモンや医薬品の標的タンパク質であるため、世界中で研究が行われている。ホルモンや医薬品が結合するリガンド結合ドメイン (LBD) の構造解析で得られた構造から、LBD の構造変化により遺伝子転写が制御されていると考えられている。しかし、protein data bank に登録されている核内受容体 LBD の結晶構造の 97~98%は活性型である。理由は、活性阻害型や不活性型は不安定で結晶化が困難、また、アンタゴニストが結合した場合でもクリスタルパッキングの影響で活性型構造のみが観測されるからである。

我々は、溶液中のタンパク質構造を解析できる X 線小角散乱と結晶構造を活用する分子動力学計算を組み合わせることで構造解析を行い、核内受容体の一員であるビタミン D 受容体 (VDR) LBD の活性阻害型と不活性型の平均構造を明らかにし報告している¹⁾。さらに、結晶化に用いるコファクターペプチドの種類を変えることで、これまで観測されなかった VDR-LBD/コファクターペプチド複合体の構造を得ており、これは核内受容体 LBD の多様な構造を観測できる可能性を示している²⁾。

そこで、細胞中でタンパク質がとりうる多様な構造をスナップショットとして検出したいと考え、様々な種類のコファクターペプチドを用いた VDR-LBD の結晶構造解析を行う研究に着手した。核内受容体 LBD の構造解析に関する研究は、新規構造に基づいた医薬品の開発の足掛かりとして期待できる。

2. 研究の目的

核内受容体 LBD の多様な構造を明らかにする。核内受容体の一員である VDR の結晶化に必要なコファクターペプチドを網羅的に合成し、我々がこれまで蓄積してきた VDR-LBD の結晶構造解析に関する技術や知識を基に、VDR-LBD の多様な構造をスナップショット的にとらえる。さらに、コファクターペプチドと VDR-LBD との相互作用解析を行い、各コファクターペプチドの特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) VDR のコファクターペプチドを網羅的に合成する。核内受容体 LBD との相互作用に重要な LXXLL モチーフを含む十数残基のコファクターペプチドを固相合成する。
- (2) 網羅的に合成したコファクターペプチドを用いて、VDR-LBD との複合体の結晶化と結晶構造解析を行う。
- (3) コファクターペプチドの特徴を調べる。具体的には、VDR-LBD との相互作用を表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて解析する。また、円二色性 (CD) スペクトルを計測し、溶液中でのコファクターペプチドの構造的特徴を分析する。

4. 研究成果

- (1) コファクターペプチドのアミノ酸配列は、核内受容体コファクターの核内受容体相互作用部位の共通モチーフ (LXXLL/LXXII) から N 末端側に 5 残基および C 末端側に 3 残基を含む 13 残基として設計した。VDR のコファクターペプチドの網羅的な合成は、樹脂担体上で縮合反応と α -アミノ基の脱保護を繰り返してアミノ酸を伸長させる固相法により行った。その際、 α -アミノ基の保護基に Fmoc を用いた。また、効率的に合成を進めるために、マイクロウェーブ固相合成装置を使用した。樹脂からの切り出しおよび側鎖保護基の脱保護は酸性溶媒を用いて同時に行った。その結果、15 種の 13 残基コファクターペプチド (13 種のコアクチベーターペプチドおよび 2 種のコリプレッサーペプチド) を得た。コリプレッサーペプチド NCoR-2 については、13 残基のコリプレッサーペプチドの SPR による VDR-LBD 相互作用解析および CD スペクトル測定の結果を基に、19 残基のコファクターペプチドを設計し、合成した。

- (2) 強力なアゴニスト ($1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 [$1,25D_3$] または、その誘導体) 存在下、合成コファクターペプチドを用いて VDR-LBD の結晶化を行った。得られた結晶に X 線を照射したところ、コアクチベーターペプチドの SRC2-2 と RIP140-5 で解析可能な回折データが得られた。得られた回折データを解析した結果、コアクチベーターペプチド SRC2-3 と VDR-LBD 間で観測された 2 番目のチャージランブ²⁾ が、コアクチベーターペプチド SRC2-2 と VDR-LBD 間では形成されないことが明らかになった。

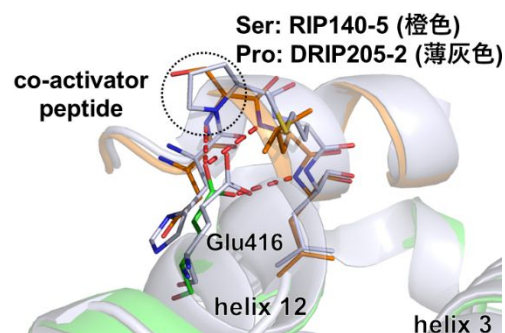


図 1. VDR-LBD Glu416 との相互作用様式における RIP140-5 と DRIP205-2 の比較

この違いはコアクチベーターペプチドに共通である LXXLL モチーフの近縁のアミノ酸残基が SRC2-2 と SRC2-3 では異なることに起因していると考えられた。コアクチベーターペプチド RIP140-5 を用いて得られた結晶構造と、VDR-LBD の結晶化で汎用される DRIP205-2 を用いた場合の結晶構造の比較から、Glu416 と RIP140-5 の水素結合は 3 本であったのに対し、DRIP205-2 では 2 本であることを見出した。Glu416 との水素結合の相手が、RIP140-5 では Pro でなく Ser であるため水素結合が増えたと考えられる (図 1)。コリプレッサーペプチドを用いた結晶化は、予測通り難航を極め、結晶を得ることができなかった。

- (3) SPR を用いてコファクターペプチドと VDR-LBD の相互作用解析を行った。その結果、 $1,25D_3$ 存在下におけるコアクチベーターペプチド RIP140-5 の VDR-LBD に対する K_D 値は 0.18 μM であり、VDR-LBD の結晶化に汎用されるコアクチベーターペプチド DRIP205-2 (K_D 値は 9.4 μM) より強い親和性を示した (図 2、上段)。これにより、Glu416 (VDR-LBD) との相互作用が RIP140-5 の結合に有利に働いたと考えられる。タンパク質複合体の安定性は結晶化に大きく影響すると考えられるため、RIP140-5 はこれまで結晶化が困難であった VDR-LBD とリガンドの組み合わせの共結晶構造解析に貢献すると期待できる。また、19 残基のコリプレッサーペプチド NCoR-2 (NCoR-2-19) を固相合成し、 $1,25D_3$ の存在下及び非存在下、VDR-LBD との結合の強さを調べた結果、13 残基の NCoR-2 は結合しなかったのに対し、19 残基の NCoR-2-19 ではそれぞれ 46 及び 57 μM の K_D 値を示し (図 2、下段)。19 残基以上の長さをもつコリプレッサーペプチドを用いることで、VDR-LBD とコリプレッサーの共結晶構造解析に新たな進展をもたらすと期待できる。さらに、コファクターペプチドの CD スペクトル測定の結果、コファクターペプチド単独では緩衝液中で α -ヘリックス構造を形成していない可能性が示された。

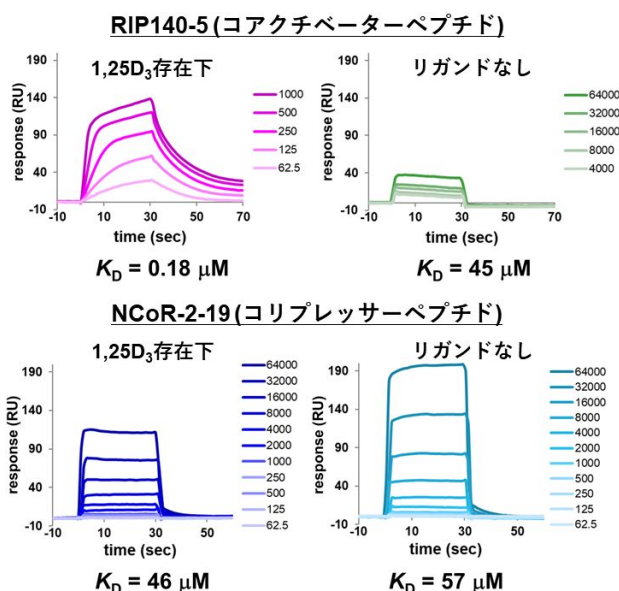


図 2. SPR によるコファクターペプチドと VDR-LBD の相互作用解析
上段：RIP140-5、下段：NCoR-2-19

< 引用文献 >

- Anami, Y., et al., Apo- and Antagonist-Binding Structures of Vitamin D Receptor Ligand-Binding Domain Revealed by Hybrid Approach Combining Small-Angle X-ray Scattering and Molecular Dynamics, *J. Med. Chem.*, 59, 2016, 7888-7900.
Egawa, D., et al., SRC2-3 binds to vitamin D receptor with high sensitivity and strong affinity, *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 2017, 568-574.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshizawa M, Itoh T, Hori T, Kato A, Anami Y, Yoshimoto N, Yamamoto K.	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of the histidine residue in vitamin D receptor that covalently binds to electrophilic ligands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 6339-6349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.8b00774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Akira, Yamao Makiko, Hashihara Yuta, Ishida Hiroaki, Itoh Toshimasa, Yamamoto Keiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Vitamin D Analogues with a p-Hydroxyphenyl Group at the C25 Position: Crystal Structure of Vitamin D Receptor Ligand-Binding Domain Complexed with the Ligand Explains the Mechanism Underlying Full Antagonistic Action	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 8394 ~ 8406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.7b00819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroaki Ishida, Keiko Yamamoto, Toshimasa Itoh
2. 発表標題 Design and synthesis of the vitamin D receptor ligand containing three-membered heterocyclic ring
3. 学会等名 The 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 寛明、山本 恵子、伊藤 俊将
2. 発表標題 ヘテロ小員環の環ひずみを利用した共有結合型ビタミンD誘導体の創製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋南美、永田志織、吉澤麻美、伊藤俊将、山本恵子
2. 発表標題 核内受容体コファクターペプチドとビタミンD受容体の相互作用解析に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nami Ohashi, Shiori Nagata, Mami Yoshizawa, Toshimasa Itoh and Keiko Yamamoto
2. 発表標題 RESEARCH FOR EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN SYNTHETIC CO-FACTOR-DERIVED PEPTIDE AND VITAMIN D RECEPTOR
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本恵子
2. 発表標題 ビタミンDと受容体
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第29回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉澤麻美、藤木麻衣花、伊藤俊将、山本恵子
2. 発表標題 側鎖末端にかさ高い置換基を有する共有結合型VDRリガンドに関する研究
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第29回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Yamamoto, Akira Kato, Toshimasa Itoh
2. 発表標題 Crystal structure of vitamin D receptor ligand-binding domain complexed with antagonist
3. 学会等名 The 18th Tetrahedron Symposium (Budapest) (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----