

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06588

研究課題名(和文)骨形成に関する核内受容体の脂溶性シグナル伝達分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Structure and recognition mechanism for nuclear receptors involved in bone formation

研究代表者

杉山 成 (SUGIYAMA, Shigeru)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授

研究者番号：90615428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドX受容体(SXR)は、骨粗鬆症治療薬の標的タンパク質である。脂溶性ビタミンと結合することで活性化され、SXRとヘテロ2量体を形成し骨形成に関する遺伝子発現を誘導する。本研究では、SXRの分子認識機構の構造基盤を解明するためSXRの結晶構造解析を行った。各種脂溶性リガンドとSXRの複合体結晶を得るため、凝固ゲル中結晶化法の改良を行った。改良した本方法を用いることでSXRを熱変性させることなく凝固ゲル中SXR結晶の育成に成功した。さらに、凝固ゲル中結晶を50%DMSO含有水溶液に溶解させたリガンド溶液中へソーキングさせたところSXR複合体結晶の取得に成功し複合体構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂溶性ビタミンとSXRの相互作用は、脂溶性ビタミンの環状部分と側鎖部分の両方が協同的に関わっている。これらの多様な複合体構造の変化を原子レベルで明らかにすることによって、脂溶性化合物とタンパク質の新しい構造基盤を構築することができれば、その学術的意義は大きい。また、凝固ゲル中結晶化法はこれまで困難であった難水溶性化合物・タンパク質の複合体構造解析を容易にするだけでなく、新しい創薬法の開発へ向けて貢献できる技術である。本方法を汎用化することができれば、これまで困難であった難水溶性化合物と標的タンパク質との複合体構造を取得することが容易となり創薬への貢献が期待できるため社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The steroid X receptor (SXR) is a target protein of osteoporosis drugs. It is a transcription factor that is activated by binding to water-insoluble ligands and forms a heterodimer with SXR to induce gene expression involved in bone formation. In this study, we expressed and purified recombinant SXR to elucidate the structural basis of the molecular recognition mechanism of SXR. In addition, we have developed an advanced high-strength hydrogel crystallization method, which was necessary to obtain the complex structure of SXR with various water-insoluble ligands. As a result, we succeeded in obtaining hydrogel-grown apo-type SXR crystals with this method. Furthermore, we obtained SXR complex crystals by soaking hydrogel-grown apo-type SXR crystals in a solution of water-insoluble ligand dissolved in 50% DMSO solution, and clarified the complex structure.

研究分野：構造生物学

キーワード：転写因子 脂溶性ビタミン 凝固ゲル中結晶 X線結晶構造解析

体 SXR を 6M グアニジン塩酸塩を用いてリフォールディングした。次に、Ni クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって精製したサンプルをアポ型 SXR サンプルとした。

凝固ゲル中結晶化法は、一時的にタンパク質が高温 (40 ~ 50) に晒される工程が含まれており、不安定なタンパク質では不活性化または凝集するため本方法が適用できないといった問題があった。この課題を克服するため、はじめに透析膜を備えた手作りの結晶化装置を準備し、そこへゲルのみ凝固させ、後からタンパク質と結晶化剤を浸透させる新しい方法を検討した。本実験には 4 種類のモデルタンパク質 (グルコース・イソメラーゼ、ストレプトアビジン、エラスターゼ、リゾチーム) を用いた。X 線回折実験は SPring-8 を用いて行った。

(3) 改良凝固ゲル中結晶化法を用いた SXR 複合体構造解析

先述した改良凝固ゲル中結晶化法で育成したアポ型 SXR 結晶を用いて、ソーキング法 (図 3) により複合体結晶が観察可能かどうかを検討した。脂溶性リガンドとして SXR のアゴニストである SR12813 粉末とビタミン K3 である Menadione (MD) 粉末を脂溶性化合物の溶解によく使用される 50% DMSO 溶液にそれぞれ溶解させた。次に、50% DMSO 溶液中へ凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶をソーキングすることによって複合体結晶を作製した。さらに、SPring-8 にて X 線回折データを取得した後に構造解析を行った。複合体構造解析は先で解析した立体構造を初期モデルとして分子置換法を適用した。

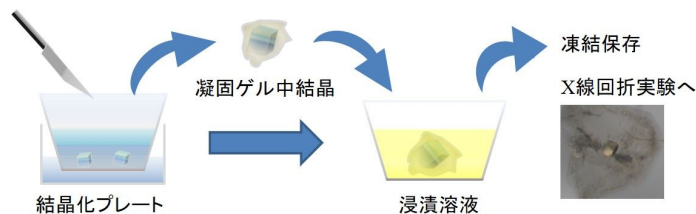


図 3 改良凝固ゲル中結晶を用いたソーキング法

(4) 脂溶性ビタミンに対する SXR の分子認識機構

先述した改良凝固ゲル中結晶化法で育成したアポ型 SXR 結晶を用いて、ソーキング法により複合体結晶を取得した。各種脂溶性ビタミン (Phylloquinone、Menadione、Menaquinone-4、Tocotrienol、Coenzyme Q ; 市販品を購入) を、脂溶性化合物の溶解によく使用される 3 種類の含水有機溶媒 (50 ~ 100% DMSO、2-プロパノール、エタノール) にそれぞれ溶解させた。次に、各種脂溶性ビタミンが溶解した含水有機溶媒中へ凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶をソーキングすることによって複合体結晶を作製した。

4. 研究成果

(1) SXR のサンプル調整とアポ型 SXR の構造解析

精製された SXR サンプルを用いた結晶化実験によって溶液中と凝固ゲル中からそれぞれ結晶が観察された (図 4)。得られた結晶を用いて X 線回折収集と構造解析を行ったところ、SXR のアポ型結晶構造を 2.6Å 分解能、凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶では 2.3Å 分解能でそれぞれ構造解析した (図 5)。結晶学的データは表 1 に示されている。その結果、SXR は非対象単位中にホモダイマーとして存在していた。SXR の立体構造は、10 個の α ヘリックスによって 3 層構造となった典型的な α -ヘリカルサンドイッチ構造と 5 本の逆平行 β シートによって構築されていた。一方、従来法で育成した結晶と凝固ゲル中結晶化法で育成した結晶の立体構造を比較した結果、

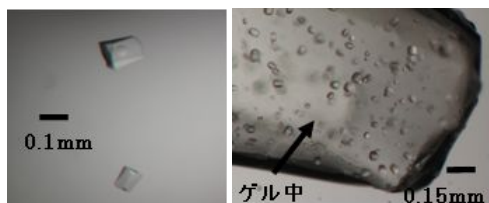


図 4 アポ型 SXR 結晶
(左) 従来結晶と (右) ゲル中結晶

表 1 アポ型 SXR の結晶学的データ

	SXR/SRC	SXR/SRC2	凝固ゲル中 SXR/SRC2
Source	SPring-8	SPring-8	SPring-8
Beam line	BL44XU	BL41XU	BL41XU
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)			
a, b, c	84.5, 88.6, 105.8	85.5, 89.5, 105.4	84.9, 89.7, 106.4
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	67.95 - 2.35	68.23 - 2.68	68.61 - 2.30
(High-resolution shell)	(2.39 - 2.35)	(2.73 - 2.68)	(2.34 - 2.30)
No. of unique reflections	33,196	23,307	36,507
Completeness (%)	99.7 (99.7)	99.9 (99.8)	99.2 (97.5)
Redundancy	8.6 (6.2)	12.4 (12.5)	5.7 (3.8)
Mean $I/\sigma(I)$	10.1 (2.1)	9.6 (1.5)	10.8 (2.5)
R_{merge}	0.071 (0.528)	0.138 (0.957)	0.057 (0.456)

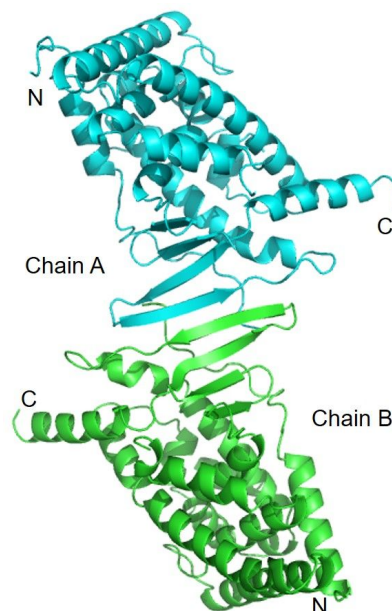


図 5 アポ型 SAT のホモダイマー構造

主鎖の平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation) は 0.25\AA 以下となり、ほぼ同じ立体構造であることが分かった。また、分子表面に存在するアミノ酸にも大きな構造変化は観察されなかった。これらの結果は、凝固ゲル中 SXR 結晶を用いたソーキング法による複合体結晶の作製は十分に可能であること示している。しかし、下記の 2 点について課題が発生した。凝固ゲル中 SXR 結晶は従来結晶と比べて低分解能結晶 (5\AA 分解能以下) である場合が多かった。これは SXR が熱に弱いタンパク質であることが主な原因であると考えられた。実際に、他の多くの転写因子と同様に、SXR は熱安定性の低いタンパク質であることが報告されている。対策として、サンプルを高温に晒す行程を含んでいる現在の凝固ゲル中結晶化法の改良が必要であると思われた。また、アポ型結晶の構造解析は再現性の確認も含めて n 数 5 個以上で実施した。それらの内の半数以上で、SXR の活性部位に何らかの電子密度が観察された。結果として、多くが十分なアポサンプルになっていないと考えられた。対策として、SXR サンプルをリフォールディングすることによってアポサンプルの取得を試みた。

(2) SXR サンプルの再調整と凝固ゲル中結晶化法の改良

再精製されたリフォールディング SXR サンプルを用いて従来法の溶液中結晶を取得した。得られた結晶を用いて X 線回折収集と構造解析を行ったところ、SXR が再現性よくアポ型結晶を取得できることを確認した。

図 6 は、改良された凝固ゲル中結晶化法の一連のプロセスを概略的に示している。透析膜を用いた本方法は、タンパク質溶液 (沈殿液) が凝固ゲルの上 (下) からゲル層に拡散する。その結果、タンパク質と沈殿剤の溶液がゲル層で混合される。具体的な方法は、まずカットしたピペットチップ (カットチップ) の一端に接着剤 (ニチバン株式会社) を塗布し透析膜を貼り付ける (分子量 cutoff, MWCO: $6\sim 8\text{kD}$)。接着剤は 24 時間で完全に硬化する。次に、 368K でゾル溶液にした 1.5% (w/v) アガロースゾル溶液 ($10\ \mu\text{L}$) を透析膜の付いたカットチップにロードした。ゾル溶液を 293K に 30 分間放置してゲル化した。次に、各タンパク質溶液 ($10\ \mu\text{L}$) を凝固ゲル上に添加した後、 277K で 30 分間静置することでゲル層にタンパク質溶液を拡散させた。カットチップは結晶化プレート (Hampton Research 社) の結晶化液滴上に置き、次に調製されたリザーバー溶液 ($35\ \mu\text{L}$) を分注した。最後に、結晶化プレートをシーリングテープ (日東電工株式会社) で密封し、 $277\ \text{K}$ (エラストラーゼ) および $293\ \text{K}$ (グルコース・イソメラーゼ、ストレプトアビジン、リゾチム) の温度でインキュベートさせた。その結果、改良凝固ゲル中結晶化法により全ての結晶は 1 週間以内にゲル中で成長した (図 7)。改良凝固ゲル中結晶化法で得られた結晶の品質を確認するために、X 線回折実験を行った。その結果、回折点は明確な鋭いスポットを示し完全なデータセットを収集することができた。このように、改良された本方法はタンパク質溶液に対して常に低温で操作できるため、不安定な SXR にも適用可能な方法であることが証明された。

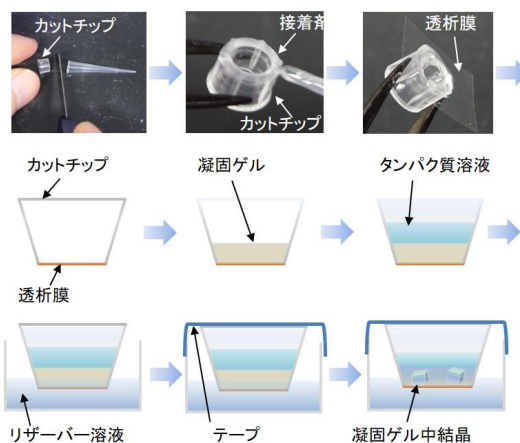


図 6 改良凝固ゲル中結晶化法

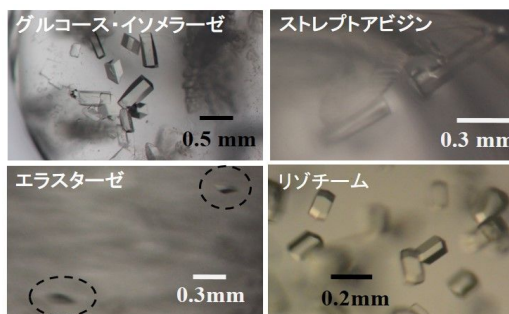


図 7 改良凝固ゲル中結晶

(3) 改良凝固ゲル中結晶化法を用いた SXR 複合体解析

改良凝固ゲル中結晶化法とリフォールディング SXR サンプルを用いて得られた凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶を 50% DMSO 溶液に溶解させた $25\ \text{mM}$ SR12813 溶液と $23\ \text{mM}$ MD 溶液へそれぞれ 1 時間ソーキングさせた。得られた結晶を用いて X 線回折収集と構造解析を行ったところ SXR-SR12813 では 1.90\AA 分解能、SXR-MD では 2.05\AA 分解能でそれぞれ結晶構造を決定した。結晶学的データは表 2 に示されている。その結果、SR12813 リガンドは SXR リガンド結合部位に結合しており、11 個のアミノ酸側鎖と疎水性相互作用していることが観察された (図 8)。また、Ser247 と His407 は 2 つの水素結合を形成し、SR12813 の酸素原子と Trp299 の芳香族インドール環との間には スタッキング相互作用が存在していた。これらの結果は、PDB に登録されている SXR- SR12813 複合体

表 2 SXR 複合体結晶の統計値

	SXR- SR12813	SXR- MD
Source	SPring-8	SPring-8
Beam line	BL44XU	BL44XU
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (\AA)		
a, b, c	85.4, 89.5, 105.5	85.2, 89.1, 105.7
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (\AA)	68.30 - 1.90	68.15 - 2.05
(High-resolution shell)	(1.93 - 1.90)	(2.09 - 2.05)
No. of unique reflections	64,505	50,967
Completeness (%)	99.7 (99.4)	99.3 (98.9)
Redundancy	8.1 (5.6)	5.9 (4.1)
Mean $I/\sigma(I)$	12.4 (2.8)	15.3 (2.1)
R_{merge} (%)	0.080 (0.538)	0.060 (0.587)
Refinement		
Resolution range (\AA)	61.81 - 1.90	68.15 - 2.05
No. of reflections	61,186	48,337
$R_{\text{cryst}} / R_{\text{ass}}$	0.23 / 0.25	0.26 / 0.30
Rmsd bond length (\AA)	0.023	0.032
Rmsd bond angle ($^\circ$)	2.0	2.5

構造と同じ結合様式であった。この結果は、改良凝固ゲル中結晶化法を用いて得られた凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶が 50% DMSO 溶液中でも崩壊すること無く、またソーキング法によって脂溶性リガンドが従来法と同様に複合体構造を形成させることができることを示している。対照的に、MD リガンドは SXR リガンド結合部位に MD リガンドと思われる電子密度を観察することができなかった。そのため、50% DMSO 溶液に溶解させた 23 mM MD 溶液 (SXR に対するモル比 200 倍) へ 3 時間ソーキングさせた。その結晶を用いて X 線回折収集と構造解析を行った。回折データは前回と比較して 2.8Å 分解能であったが、前回と同様に MD リガンドの電子密度は SXR リガンド結合部位に観察することができなかった (図 9)。対照実験として、共結晶化法および従来法で育成させた結晶を用いたソーキング法による複合体結晶での構造解析を行った。しかし、いずれの場合においても結合部位に電子密度を観察することができなかった。この原因の 1 つとして、脂溶性ビタミンは鎖長や不飽和度に依存して溶解性が大きく変わるため、評価系として用いた CD スペクトル解析では、脂溶性ビタミン-SXR 間の結合親和性が過大評価されていた可能性がある。実際に、疎水性の高い脂肪酸では、非特異吸着によりタンパク質への結合親和性が過大評価される場合が報告されている。

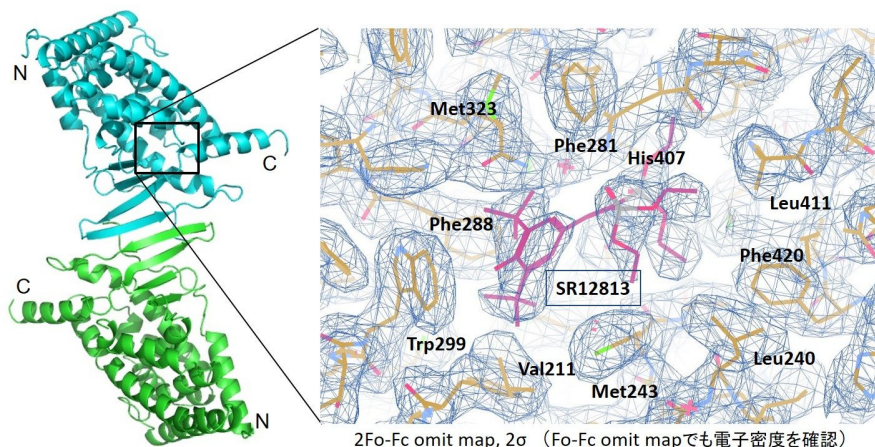


図 8 SXR-SR12813 複合体構造の活性部位

に、MD リガンドは SXR リガンド結合部位に MD リガンドと思われる電子密度を観察することができなかった。そのため、50% DMSO 溶液に溶解させた 23 mM MD 溶液 (SXR に対するモル比 200 倍) へ 3 時間ソーキングさせた。その結晶を用いて X 線回折収集と構造解析を行った。回折データは前回と比較して 2.8Å 分解能であったが、前回と同様に MD リガンドの電子密度は SXR リガンド結合部位に観察することができなかった (図 9)。対照実験として、共結晶化法および従来法で育成させた結晶を用いたソーキング法による複合体結晶での構造解析を行った。しかし、いずれの場合においても結合部位に電子密度を観察することができなかった。この原因の 1 つとして、脂溶性ビタミンは鎖長や不飽和度に依存して溶解性が大きく変わるため、評価系として用いた CD スペクトル解析では、脂溶性ビタミン-SXR 間の結合親和性が過大評価されていた可能性がある。実際に、疎水性の高い脂肪酸では、非特異吸着によりタンパク質への結合親和性が過大評価される場合が報告されている。

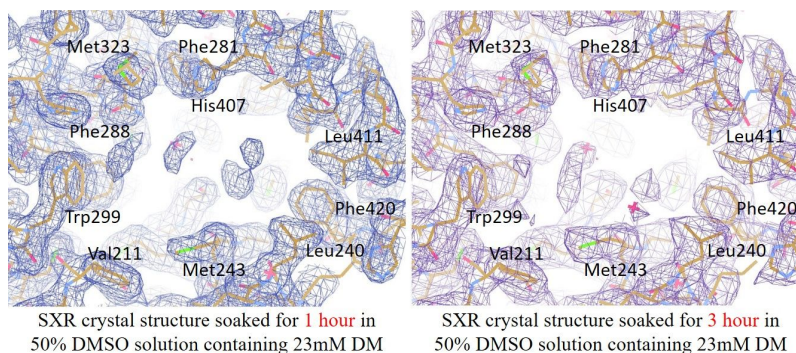


図 9 SXR-MD 複合体構造の活性部位

(4) 脂溶性ビタミンに対する SXR の分子認識機構

各種脂溶性ビタミン (Phylloquinone[PK]、Tocotrienol [VE]、Coenzyme Q4 [CoQ4]) を 3 種類の含水有機溶媒 (50 ~ 100% DMSO、2-プロパノール、エタノール) にそれぞれ溶解させた。各種脂溶性ビタミンが溶解した含水有機溶媒中へ凝固ゲル中アポ型 SXR 結晶をソーキングすることによって複合体結晶を作製した。得られた結晶を用いて X 線回折データを収集し (表 3)、現在、構造解析および立体構造の精密化が進行中である。

表 3 SXR 結晶の統計値

	SXR- PK 共結晶化	SXR- CoQ4 共結晶化	SXR- VE 共結晶化	SXR- PK 凝固ゲル結晶	SXR- CoQ4 凝固ゲル中結晶	SXR- VE 凝固ゲル中結晶
Source	SPring-8	SPring-8	SPring-8	SPring-8	SPring-8	SPring-8
Beam line	BL41XU	BL44XU	BL41XU	BL44XU	BL41XU	BL44XU
Space group	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)						
a, b, c	92.0, 92.0, 85.2	85.0, 87.2, 105.4	92.0, 92.0, 85.2	84.8, 89.7, 106.1	84.9, 89.7, 106.4	84.9, 89.6, 105.7
α, β, γ	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50 - 2.00	50 - 2.70	50 - 2.00	50 - 2.45	50 - 2.30	50 - 2.20
(High-resolution shell)	(2.03 - 2.00)	(2.75 - 2.70)	(2.03 - 2.00)	(2.49 - 2.45)	(2.73 - 2.68)	(2.24 - 2.20)
No. of unique reflections	25,211	22,297	25,389	27,313	36,507	41,546
Completeness (%)	99.4 (99.6)	99.8 (99.8)	99.5 (99.5)	89.7 (67.7)	99.2 (97.5)	99.6 (97.4)
Redundancy	10.1 (6.7)	10.4 (7.2)	9.4 (6.0)	4.3 (1.9)	5.7 (3.8)	6.3 (4.6)
Mean $I/\sigma(I)$	7.9 (2.1)	8.6 (2.0)	6.7 (2.3)	14.7 (2.0)	10.8 (2.5)	11.3 (2.2)
R_{merge}	0.087 (0.631)	0.090 (0.998)	0.107 (0.572)	0.054 (0.377)	0.057 (0.456)	0.172 (0.747)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hiroki Kondo, Masaki Kitagawa, Yuya Matsumoto, Masaya Saito, Marie Amano, Shigeru Sugiyama, Takashi Tamura, Hitoshi Kusakabe, Kenji Inagaki, Katsumi Imada	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural basis of strict substrate recognition of L-lysine -oxidase from <i>Trichoderma viride</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Sci.	6. 最初と最後の頁 2213-2225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3946	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 -

1. 著者名 Shigeru Sugiyama, Tomoya Kitatani, Taichi Naruse, Yumeto Otsuka, Hiroaki Adachi, Toshihiro Fujita, and Yusuke Mori	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of ultra-fine bubble water on protein crystal nucleation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 115505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abc2a0	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 Shigeru Sugiyama, Keisuke Kakinouchi, Hiroaki Adachi, Tsugio Nagasawa, Noriaki Kunimune, Michio Murata, and Yusuke Mori	4. 巻 60
2. 論文標題 Growth of protein crystals in high-strength hydrogels with the dialysis membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn. J. Appl. Phys.	6. 最初と最後の頁 15506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abd0c7	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山成, 垣之内啓介, 安達宏昭, 国宗範彰, 村田道雄, 森勇介
2. 発表標題 凝固ゲル中結晶化法による脂溶性化合物複合体解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬太智, 天野妙法華, 国宗範彰, 長澤次男, 安達宏昭, 森勇介, 杉山成
2. 発表標題 Development and evaluation of the high-strength hydrogel method for high versatility
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山成, 垣之内啓介, 廣田佳久, 中川公恵, 岡野登志夫, 村田道雄
2. 発表標題 凝固ゲル中結晶化法を用いた骨形成に関するステロイドX受容体の分子認識
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山成, 垣之内啓介, 安達宏昭, 国宗範彰, 村田道雄, 森勇介
2. 発表標題 凝固ゲル中結晶化法による脂溶性化合物複合体解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉山成, 他51名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 288
3. 書名 タンパク質結晶の最前線 (普及版)	

〔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
研究協力者	中川 公恵 (NAKAGAWA Kunie)	神戸薬科大学・准教授	
研究協力者	廣田 佳久 (HIROTA Yoshihisa)	芝浦工業大学・助教	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関