

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590108

研究課題名(和文) 核内受容体のアロステリックネットワークにおけるリガンドの役割

研究課題名(英文) Role of ligands for allosteric network of nuclear receptors

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

研究成果の概要(和文)：22位にブチル基をもつ活性型ビタミンD誘導体が、今まで知られていたビタミンD受容体のポケット構造とは異なるポケット構造を誘導する新しいタイプのアゴニストやアンタゴニストであることを見出した。次に、22位にアルキル置換基をもつ誘導体を系統的に合成し、それらの構造活性相関を解析し、興味深い活性を示した化合物と受容体の複合体のX線結晶構造解析を行った。その結果、リガンドは受容体のアロステリックネットワークを介してヘリックス12の位置を決定することで当該リガンド特有の作用を発現するのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Active vitamin D derivatives with 22-butyl substituent were found to be a new class of agonists and antagonists inducing the different pocket structure of the vitamin D receptor. Next, we synthesized vitamin D derivatives with 22-alkyl substituent and performed their SAR study. Then we tried X-ray crystallographic analysis of the complex of vitamin D receptor and ligand with particular activity. These results indicate that a ligand determines position of helix 12 via allosteric network and consequently expresses its particular activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ビタミンD、ビタミンD受容体、PPAR、転写因子、結晶構造、コンフォメーション変化、シグナリング、骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

本研究開始当時、核内受容体に関する研究の急速に進歩により、細胞内情報伝達における核内受容体とリガンドの相互作用の重要

性が認識されるようになっていた。1995年以降研究開始当初までに10種以上の核内受容体／リガンド複合体の結晶構造が明らかにされ、リガンドの構造が受容体の構造に影

響し転写を制御する、と考えられるようになった。リガンドを医薬品ターゲットとして考えた場合、注目すべき点は、リガンドの立体構造が受容体への結合性のみならず転写活性化にも大きな影響を持ち、リガンドの組織選択性、作用分離に大きな役割を果たしていることである。リガンドが情報伝達のスイッチとなることは知られていたが、その後の情報伝達機構はほとんど知られていなかった。

## 2. 研究の目的

活性型ビタミン D である  $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> ( $1,25D_3$ ) はカルシウム代謝を調節するホルモンであるが、それ以外に細胞の分化誘導や増殖抑制、免疫調節など多彩な生理作用を持つことが知られている。そのため、 $1,25D_3$  やその誘導体は骨疾患に加えてガンや免疫疾患の治療薬として期待されている。しかし、ガンや免疫疾患に有効な量では高カルシウム血症を併発することから、作用分離された誘導体の開発が望まれている。 $1,25D_3$  は、核内受容体の一員であるビタミン D 受容体 (VDR) に結合し遺伝子転写を介して上記作用を発現する。したがって作用分離した誘導体を論理的に創製するためには VDR への結合様式と共にリガンド結合によって引き起こされる VDR のアロステリック効果がどの様に伝わっていくのか明らかにすることが重要となる。パーオキシソーム増殖薬活性化受容体 (PPAR) は VDR と同じサブファミリーに属する核内受容体で  $\alpha, \gamma, \delta$  の 3 つのサブタイプが存在する。これらは生体内の脂質代謝・糖代謝に関与している。PPAR $\alpha$ は主に肝臓に、PPAR $\gamma$ は主に脂肪細胞に、PPAR $\delta$ は多様な組織に発現する。PPAR $\alpha$ アゴニストは高脂血症に、PPAR $\gamma$ アゴニストは糖尿病に、PPAR $\delta$ アゴニストは肥満に有効である。間葉系前駆細胞は PPAR $\gamma$ を活性化させると脂肪細胞に、不活化させると骨芽細胞に分化することも解ってきた。2型糖尿病治療薬として臨床応用されているチアゾリジン誘導体は、PPAR $\gamma$ を介して作用を発現する。チアゾリジン誘導体の血糖降下作用は強力であるが、肥満、浮腫、肝障害などの副作用を持つことから、新規薬剤開発の社会的要請が極めて強い。

申請者は上述の背景のもと、リガンド依存性アロステリックネットワーク機構を構造生物学的に明らかにしたいと考えた。本研究は核内受容体の一員であるビタミン D 受容体 (VDR) と PPAR のアゴニストやアンタゴニストを創製し、それらを用いて細胞内情報伝達におけるリガンドの役割、中でもアロステリックコミュニケーションにおけるリガンドの役割を、分子レベルのみならず原子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

近年飛躍的に発展した分子生物学、計算科学などの手法を用い、有機化学の視点から研究を行った。すなわち、VDR と PPAR のポケット構造に基づいてリガンドを設計し合成した。合成した化合物の生物活性 (遺伝子転写活性) を測定した。興味深い活性を示した化合物と受容体の複合体の結晶化を試み、生成した結晶の X 線結晶構造解析を行った。この結果を用いて、各リガンドの活性を受容体との相互作用の観点から検討した。具体的には、以下の通りである。

### (1) VDR とリガンドについて

- ① 22-ブチル-25, 26, 27-トリノル活性型ビタミン D 誘導体がアンタゴニスト作用を示すのではないかと考え、8 種の関連化合物の VDR アゴニスト作用並びにアンタゴニスト作用を、遺伝子転写活性、HL-60 細胞の分化誘導、CYP24A1 発現のリアルタイム PCR にて評価した。
- ② 特徴的な作用を示す化合物と VDR-LBD の複合体の X 線結晶構造解析を行った。用いたタンパク質は rat VDR-LBD (residues 116-423,  $\Delta$ 165-211) である。
- ③ 22 位にアルキル基をもつ種々の活性型ビタミン D 誘導体をデザイン・合成し、活性を評価した。
- ④ 疎水性相互作用が増強されたアナログを設計・合成し、生物活性を評価し、VDR との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

### (2) PPAR とリガンドについて

- ① 超長鎖脂肪酸の効率のよい合成法を確立し、それらを用いて 5-oxo-脂肪酸と 6-oxo-脂肪酸を合成した。
- ② 酸化型脂肪酸と PPAR $\gamma$ -LBD の複合体の結晶構造から相互作用を解析した。

## 4. 研究成果

初めに、VDR との疎水性相互作用が十分でない 22-ブチル-25, 26, 27-トリノル活性型ビタミン D 誘導体がアンタゴニスト作用を示すのではないかと考え、8 種の関連化合物の VDR アゴニスト作用並びにアンタゴニスト作用を遺伝子転写活性、HL-60 細胞の分化誘導、CYP24A1 発現のリアルタイム PCR にて評価した。その結果、22S-ブチル-25, 26, 27-トリノル活性型ビタミン D 誘導体が比較的強いアンタゴニスト作用を示すことを見出した。また、8 種の化合物の中から、アゴニスト作用やパーシャルアゴニスト作用を示す化合物を見出した。特徴的な作用を示す化合物と VDR-LBD の複合体の X 線結晶構造解析から、今まで知られていなかったリガンド-受容体相互作用を見出した。すなわち、

強いアゴニスト作用を示す化合物は、それまでに知られていた化合物が結合したリガンド結合ポケット構造と比較して、ポケットの下部とヘリックス 11 側を押し広げていることが示された。また、アンタゴニスト作用を示した化合物は、枝分かれした側鎖を収容するために新しいキャビティ（ブチルポケット）を形成することが示された。VDR アンタゴニストはポケットからはみ出してヘリックス 12 を正しい位置に folding させないと考えられているタイプとポケットには収容できるが何故かアンタゴニスト作用を示す 2 つのタイプが知られていた。今回我々が見出したアンタゴニストは上述のタイプとは異なり、第 3 の新しいタイプのアンタゴニストであることが、この結晶解析から明らかになった。この結果から、アゴニスト、パーシャルアゴニスト、アンタゴニストの論理的創製の可能性、延いては選択的作用を持つリガンドの論理的創製の可能性を示すことができた。

22 位にブチル基を持つ活性型ビタミン D 誘導体 (22-Bu 体) がビタミン D 受容体 (VDR) アンタゴニストとして作用することが明らかになったので、この新しいタイプのアンタゴニストである 22-Bu 体の構造活性相関を明らかにし、作用発現機構を構造生物学的に解明するために、22 位にアルキル基をもつ種々の活性型ビタミン D 誘導体をデザイン・合成し、活性を評価した。ビタミン D の共役トリエン構造は酸や光や酸素に不安定である。近年 10, 19-メチレンを 2 位に移した 2-メチレン-19-ノル構造が、共役トリエン構造を代替できることが報告された。そこで A 環が 2-メチレン-19-ノル構造で、22 位にブチル基、エチル基あるいは水素（無置換）を持ち、側鎖末端には水素、メチル基あるいはエチル基を持つ化合物をデザインした。合成は、キナ酸より誘導した A 環部とビタミン D<sub>2</sub> より誘導したグランドマンケトンカップリングさせた後、側鎖部を修飾する方法で行った。現在までに約 20 種の化合物を合成した。これら化合物のヒト VDR への結合親和性を [<sup>3</sup>H]-1, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> との競合的結合実験により評価した。その結果、いずれの化合物も 1, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の 0.03~数倍の VDR 親和性を示し、VDR のリガンドであることが明らかになった。また、遺伝子転写活性を検討した結果、22 位が水素の化合物はアゴニスト作用を示し、22 位にエチル基をもつ化合物はパーシャルアゴニスト作用を、22 位にブチル基をもつ化合物はアンタゴニスト作用を示した。ただし、1,25D<sub>3</sub> と同様の側鎖末端をもつ化合物は、22 位が水素、エチル基、ブチル基いずれであってもアゴニスト活性を示すという興味深い結果が明らかになった。

このように、活性型ビタミン D の 22 位に

アルキル基をもつ新しいクラスのビタミン D 受容体 (VDR) リガンドを創製し、それら一連の化合物は側鎖末端構造の違いによりアゴニストからアンタゴニストまで多様な活性を示すことを明らかにしたので、更に疎水性相互作用が増強されたアナログを設計・合成し、生物活性を評価し、VDR との複合体の X 線結晶構造解析を行い、リガンド依存性アロステリックネットワーク機構の構造生物学的解明を試みた。その結果、側鎖末端にジエチル基をもつ化合物の合成に成功した。合成化合物はアゴニスト活性を示し、VDR にブチルポケット形成を誘導し、側鎖末端のアルキル基とヘリックス 12 の残基が強く疎水性相互作用していることを明らかにした。以上の研究成果から、22 位にブチル基を持つ化合物はブチルポケットを形成すること、VDR のヘリックス 12 との疎水性相互作用の欠如がアンタゴニスト活性発現に必要なことが明らかになった。以上の結果から得られた情報に基づいて、現在、リガンド依存性アロステリックコミュニケーションを解明中である。

我々のグループは 4-oxodocosahexaenoic acid (DHA) が PPAR $\gamma$  へ共役付加する事を報告した。共役カルボニルを有する oxo 型脂肪酸は天然に多数存在するが PPAR $\gamma$  への結合様式はほとんど解明されていなかった。そこで、4-oxoDHA を基に、5-oxo-脂肪酸と 6-oxo-脂肪酸を DHA を出発原料として合成した。5-oxo-脂肪酸と 6-oxo-脂肪酸は、遺伝子転写活性から PPAR $\gamma$  のアゴニストであることが示された。また、X-線結晶構造解析より 4-oxoDHA と 5-oxo-脂肪酸及び 6-oxo-脂肪酸の共有結合様式はそれぞれ異なっている事が示された。大きいリガンド結合ポケットをもつ PPAR $\gamma$  は多様な脂肪酸に応答するリポッドセンサーと考えられているが、oxo-脂肪酸が PPAR $\gamma$  に共有結合したことから PPAR $\gamma$  は生体内に存在する多様な脂肪酸に多様な様式で結合することが示された。今後さらなるデータを積み重ね、PPAR $\gamma$  のリガンド依存性アロステリックコミュニケーションの解析に役立てる。

#### 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 6 件)

- ① Sakamaki Y, Inaba Y, Yoshimoto N, Yamamoto K. Potent Antagonist for the Vitamin D Receptor: Vitamin D Analogues with Simple Side Chain Structure. *J. Med. Chem.* **53**, 5813-5826 (2010). 査読有
- ② Yamagishi K, Yamamoto K, Mochizuki Y, Nakano T, Yamada S, Tokiwa H. Flexible Ligand Recognition of Peroxisome

Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ).  
*Bioorg Med Chem.Lett.* **20**, 3344-3347  
(2010) 査読有

- ③ Inaba Y, Nakabayashi M, Itoh T, Yoshimoto N, Ikura T, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. 22*S*-Butyl-1 $\alpha$ ,24*R*-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Recovery of vitamin D receptor agonistic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **121**, 146-150 (2010). 査読有
- ④ Itoh T, Yoshimoto N, Yamamoto K. Synthesis of oxidized fatty acid derivatives via an iodolactonization reaction. *Heterocycles.* **80**, 689-695 (2010). 査読有
- ⑤ Inaba Y, Yoshimoto N, Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. A New Class of Vitamin D Analogues that Induce Structural Rearrangement of the Ligand-Binding Pocket of the Receptor. *J. Med. Chem.* **52**, 1438-1449 (2009). 査読有
- ⑥ Tsai N-P, Huq M, Gupta P, Yamamoto K, Kagechika H, Wei L-N. Activation of Testicular Orphan Receptor 4 by Fatty Acids. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **1789**, 734-740 (2009). 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉本暢子、酒巻雄太、稲葉有香、伊藤俊将、中林誠、伊藤暢聡、山本恵子。22-ブチルビタミンD誘導体の作用発現機構に関する構造生物学的研究。日本薬学会第131年会。要旨集上にて発表。2011年3月5日。
- ② 伊藤俊将、吉本暢子、山本恵子。3つのオキソ型脂肪酸のPPAR $\gamma$ への結合様式の比較。日本薬学会第131年会。要旨集上にて発表。2011年3月5日。
- ③ 山本恵子、酒巻雄太、稲葉有香、吉本暢子。22-アルキルビタミンD誘導体の合成と生物活性評価。ビタミン学会第62回大会。盛岡。2010年6月11日。
- ④ 伊藤俊将、稲葉有香、山口拓也、山本恵子。高度不飽和長鎖脂肪酸の簡便な合成法の確立。ビタミン学会第62回大会。盛岡。2010年6月11日。
- ⑤ 稲葉有香、伊藤俊将、酒巻雄太、吉本暢子、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、清水正人、山本恵子。ビタミンD受容体ーリガンド結合領域と新規アゴニストの複合体のX線結晶構造解析。日本薬学会第130年会。岡山。2010年3月29日。
- ⑥ Keiko Yamamoto, Yuka Inaba, Makoto Nakabayashi, Toshimasa Itoh, Masato Shimizu, Teikichi Ikura and Nobutoshi Ito : 1, 24-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Analogs with Branched 22-Butyl Group: Biological Activities and Interaction with the Vitamin D Receptor. 14th Workshop on Vitamin D. Brugge, Belgium.

2009年10月8日。

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

吉田 有紀 (YOSHIDA YUKI)  
昭和薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：00297045  
伊藤 俊将 (ITOH TOSHIMASA)  
昭和薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：80536110