

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590135

研究課題名(和文) ビタミンD受容体のポケット構造を制御するリガンドの戦略的創製

研究課題名(英文) Discovery of ligands that modulate the pocket structure of vitamin D receptor

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： ビタミンD受容体のリガンド結合ポケットの構造可変部位構造を制御するリガンドを創製することで、選択的作用をもつリガンド開発をめざした。その結果、ブチル基を収容するキャビティーの構造を制御する化合物は多数合成できた。それらは、アゴニスト、パーシャルアゴニストからアンタゴニストまで幅広い活性を示した。X線結晶解析の結果、パーシャルアゴニストの一つが、単結晶中に、アゴニスト型とアンタゴニスト型の2つの配座で存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： To develop vitamin D receptor ligands which separate the various biological activities of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, we focused on the structure of ligand-binding pocket of the receptor, especially the variable part of the pocket. As a result, we discovered vitamin D analogues with a branched side chain that induce structural rearrangement of the amino acid residues lining the ligand-binding pocket. These analogs showed agonistic, partial agonistic or antagonistic activities. By X-ray analysis, we found one of partial agonists exists in two conformations, namely agonist and antagonist conformations, in a single crystal.

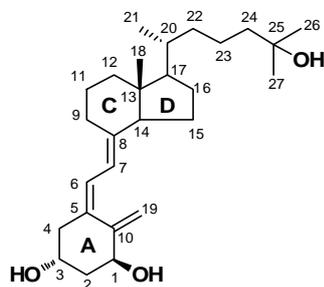
研究分野：医歯薬学

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 アゴニスト アンタゴニスト パーシャルアゴニスト 結晶構造 核内受容体 ポケット構造

1. 研究開始当初の背景

活性型ビタミン D 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・増殖抑制、免疫調節などを行う。したがって、骨調節剤以外にがん治療薬や免疫調節剤などとして期待されている。現在では、骨調節剤以外に免疫疾患である乾癬治療薬として欧米はもとより本邦でも使用されている。しかし、活性型ビタミン D のもつ多彩な生理作用に比して開発され使用されている疾患は限られている。がん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が問題である。近年、この問題を解決するために、作用分離したアナログの開発研究が欧米と日本を中心に活発に行われてきた。その結果、中外製薬で骨粗しょう症に特化した ED71 が開発され認可された。また、DeLuca のグループから 2 MD が報告され臨床開発中である。しかし、作用メカニズムが明確ではないため、論理的な創薬は難しかった。



active vitamin D₃

2. 研究の目的

活性型ビタミン D はビタミン D 受容体 (VDR) に結合し遺伝子転写を介して作用を発現する。VDR は、リガンド依存性転写因子である核内受容体の一員で、他の核内受容体と同様、リガンドである活性型ビタミン D が結合することにより不活性型から活性型に変化し標的遺伝子の転写を促進する。活性型ビタミン D のもつ多彩な生理作用はすべて上述の遺伝子転写を介する共通のメカニズムであると考えられているが、種々のアナログ研究からリガンドの構造が受容体の構造に反映されることが示唆されている。また、リガンドの構造活性相関研究は申請者のグループを含む多くのグループにより行われ、側鎖アナログや A 環アナログが開発されてきた。しかし、受容体構造と作用分離の観点からの研究はほとんどなされていなかった。そこで申請者は、受容体構造を制御するリガンドを戦略的に創製し、受容体構造と各種作用発現の関係を明らかにする研究を立案した。本研究では、受容体のポケット構造をダイナミックに変化させるリガンドの創製を行う。既に、申請者は、22 位に n-ブチル基を導入することにより、ブチル基を収容するキャビティが誘導されることを見出し、ポケット構造の制御が可能であることを証明した (*J. Med. Chem.* **52**, 1438-1449, 2009; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **121**, 146-150, 2010;

J. Med. Chem. **53**, 5813-5826, 2010)。申請者は、選択的な作用をもつリガンド創製をポケット構造の制御を指標に進める方法を立案し、研究を開始した。本研究は、受容体のポケット構造をダイナミックに変化させるリガンドを創製することを目的とする。

3. 研究の方法

ビタミン D 受容体のポケット構造は保存されており、構造変化させることは難しいと考えられている。申請者は、ループ領域を中心にポケット構造を変化させることは可能であると考えた。

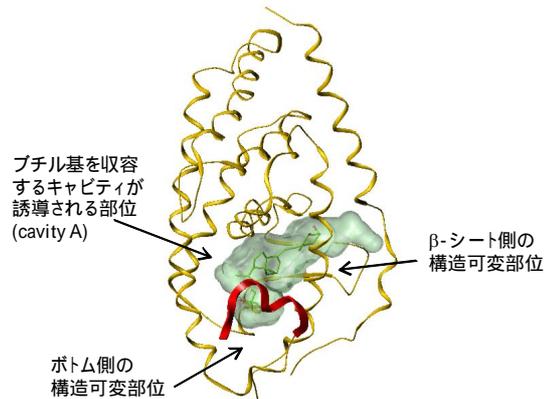


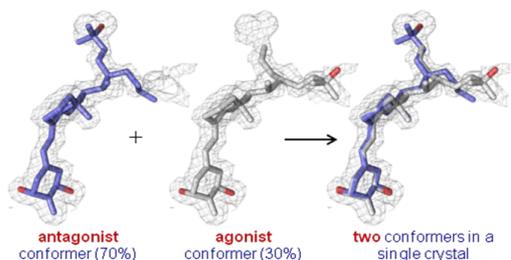
図1. 活性型ビタミンD/受容体複合体の結晶構造
リガンド結合ポケットは緑色で示す。

方法は、構造変化可能な3つのループ領域を選び、それぞれの領域構造を変化させるリガンドを、コンピュータを用いて設計する。続いて合成をおこない、受容体結合能や遺伝子転写活性を測定する。申請者のグループでは既に受容体のリガンド結合領域の大量発現に成功しているため、その方法を用いて受容体を大量発現させ、合成リガンドと受容体の複合体の結晶化を行い、X線結晶構造解析を行う。リガンド結合ポケットの Connolly surface を作成し、構造の変化を検討する。変化がある場合、主鎖構造が変化しているのかアミノ酸残基の側鎖コンフォメーションが変化しているのか明らかにする。

4. 研究成果

ビタミン D 受容体のリガンド結合ポケットにおける構造可変部位に着目し、それらの構造を制御するリガンドを創製することで、選択的作用をもつリガンド開発をめざした。可変部位のうち、ブチル基を収容することが知られていたキャビティ A の構造を制御する化合物は多数合成できた。それらは、ビタミン D 受容体のアゴニスト、パーシャルアゴニストからアンタゴニストまで幅広い活性を示した。すなわち、多彩な活性化合物を創製できた。ビタミン D 受容体リガンド結合領域との共結晶化を試みた結果、いくつかの複合体の良好な結晶が得られた。それらを用いて X 線回折実験を行ったところ、高い分解能の回折データを得た。計算・精密化の結果、

電子密度マップよりパーシャルアゴニストの一つにおいて興味深い結果を得た。すなわち、この化合物は、単結晶中に、側鎖のブチル基がブチルポケットに収容されるアゴニスト型(30%)と、水酸基を持つオリジナル側鎖がブチルポケットに収容されるアンタゴニスト型(70%)の2つの配座で存在することが明らかになった。結晶構造の結果から、この化合物がパーシャルアゴニストとしてふるまった理由は、2つの配座が混在することによる活性化の和によるものと考えられた。



本研究は、核内受容体/リガンド複合体中の単結晶中にアゴニスト結合コンフォーマーとアンタゴニスト結合コンフォーマーの両方を補足した初めての例であり、パーシャルアゴニズム発現機構の分子基盤となると考えられる。本成果は、Journal of Medicinal Chemistry (DOI: 10.1021/jm500392t)に受理された。各年度の成果は以下のとおりである。

1年目は、ビタミンD誘導体のブチル基を収容するために形成されるビタミンD受容体のキャビティ(ブチルポケット)の構造を制御する化合物を合成することを計画した。ブチルポケット側の構造変化を引き起こす化合物として、n-ブチル基以外の置換基を導入したりリガンド候補化合物を、モデリングソフトSYBYLを用いて設計し、22位にエチル基を導入し、側鎖末端にジエチル基をもつ誘導体およびその類縁体を合成することにした。A環は、天然ビタミンDのもつトリエン構造より安定で合成容易な2-メチレン-19-ノル型とした。合成はA環部とCD環部をWittig-Horner反応でカップリングさせた後、目的の部位を修飾することで達成した。合成した化合物の受容体への結合親和性をトリチウムラベルした活性型ビタミンDとの競合的結合実験により測定した。その結果、合成化合物はいずれも高い受容体親和性を示した。標的遺伝子転写活性を測定した結果、いずれもアゴニスト活性を示した。更に、ビタミンD受容体のリガンド結合領域と合成化合物の複合体のX線結晶構造解析も試みた。類縁体の一つである22-ブチル-24-ジエチル化合物の結晶構造解析には成功した。その結果、ビタミンD受容体にブチルポケットが形成された場合、C末端のヘリックス12とリガンドの相互作用が、アゴニスト・アンタゴニスト作用発現のメカニズムに

大きく影響を与えることが明らかになった。また、ブチルポケットが形成された場合、側鎖末端のジエチル基が受容体のポケット構造を安定型に保つことを明らかにした。

2年目は、ビタミンD受容体のβ-シート側のポケット構造を変化させるリガンドの創製を目指した。β-シート近傍はループも比較的多く、ポケット構造を変化させることが可能ではないかと考えた。そこでβ-シート近傍のCys288に着目し、このCys288にリガンドを共有結合させたならば、構造を変化させることができるのではないかと考えた。そこで、モデリングソフトSYBYLを用いて種々検討した結果、A環の2位にエノン構造をもつ置換基を導入することで、共有結合を形成できる可能性が示唆された。A環の2位からエノンまでの長さを変化させることで、Cys288までの距離を調節すると同時に、長さの違いがポケット構造の変化に繋がることも期待できる。具体的には4種の化合物を設計し、合成に着手した。ビタミンDのA環部はキナ酸を出発原料として合成を開始した。その結果、基本骨格は合成できた。

3年目は、冒頭にまとめた成果を得るための仕上げの研究を行った。

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)

Anami Y, Itoh T, Egawa D, Yoshimoto N, Yamamoto K. A mixed population of antagonist and agonist binding conformers in a single crystal explains partial agonism against vitamin D receptor: Active vitamin D analogues with 22R-alkyl group. *J. Med. Chem.* DOI: 10.1021/jm500392t. 査読有
山本 恵子. ビタミンDと関連タンパク質(CYP, DBP, VDR)の構造生命科学. *ビタミン*. **87**, 669-677 (2013). 査読有
 Yoshimoto N, Sakamaki Y, Haeta M, Kato A, Inaba Y, Itoh T, Nakabayashi M, Ito N, Yamamoto K. Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *J. Med. Chem.* **55**, 4373-4381 (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

穴見 康昭、伊藤 俊将、山本 恵子: 結晶構造に基づくビタミンD受容体パーシャルアゴニスト作用の分子基盤研究 日本薬学会第134年会(熊本、熊本大学)2014年3月28日
 吉澤 麻美、吉本 暢子、穴見 康昭、江川 大地、伊藤 俊将、山本 恵子: 側鎖に求電子基をもつビタミンD誘導体の設計と合成. 第57回日本薬学会関東支部大会

(東京、帝京大学) 2013年10月26日
加藤 晃、吉本 暢子、伊藤 俊将、山本 恵子 : ビタミン D 受容体の活性コンフォメーション形成を阻止するスーパーアンタゴニストの創製研究 第 24 回日本レチノイド研究会学術集会 (東京、星薬科大学) 2013年8月30日

Yasuaki Anami, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto : Synthesis and Characterization of Active Vitamin D Analogues with 22R-alkyl Group 14th Tetrahedron Symposium (Vienna) 2013年6月26日

穴見 康昭、吉本 暢子、伊藤 俊将、山本 恵子 : 22R-アルキルビタミン D 誘導体/受容体複合体のX線結晶構造解析 日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会 (東京、東京医科歯科大学) 2013年6月20日

加藤 晃、吉本 暢子、穴見 康昭、江川 大地、伊藤 俊将、山本 恵子 : ビタミン D 受容体の活性型コンフォメーションを阻止するリガンドの設計、合成と生物活性 日本薬学会第 133 年会 (神奈川、パシフィコ横浜) 2013年3月28日

穴見 康昭、酒巻 雄太、加藤 晃、吉本 暢子、伊藤 俊将、山本 恵子 : 22R-アルキル活性型ビタミン D 誘導体の合成と生物活性評価 第 23 回日本レチノイド研究会学術集会 (鳥取、米子コンベンションセンター) 2012年10月19日

中林 誠、島崎 美佳、増野 弘幸、清水 正人、山本 恵子、伊倉 貞吉、伊藤 暢聡 : I268T 変異 . ビタミン D 受容体のリガンド結合ドメインの結晶構造 . 日本ビタミン学会第 64 回大会 (岐阜、長良川国際会議場) 2012年6月23日

Keiko Yamamoto, Yuta Sakamaki, Yuka Inaba, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, Makoto Nakabayashi, Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito: Vitamin D Analogs with Simple Side Chain Structure: Agonists, Partial Agonists, and Antagonists for the Vitamin D Receptor. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Frontier of Medicinal Science. (Tokyo, Japan) 2011年12月1日

穴見 康昭、酒巻 雄太、蠅田 稔、吉本 暢子、伊藤 俊将、山本 恵子 : 22R-ブチル活性型ビタミン D 誘導体の合成と生物活性評価 ビタミン学会第 63 回大会 (広島、安田女子大学) 2011年6月5日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

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