

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：23201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14904

研究課題名(和文) 活性型ビタミンDの高感度検出系の開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive detection system for active form of vitamin D

研究代表者

榊 利之 (Toshiyuki, Sakaki)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：70293909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分割型ルシフェラーゼの技術を用いてビタミンD受容体(VDR)リガンドを高感度に検出するバイオセンサーを開発した。VDRのリガンド結合領域(LBD)のN末端およびC末端側に、分割したルシフェラーゼのN末領域(LucN)およびC末領域(LucC)を融合したタンパク質である。活性型ビタミンDがバイオセンサー内のLBDに結合すると構造変化を引き起こす。その結果、LucNおよびLucCの位置が近接し、ルシフェラーゼ活性が増加する。また、LucNにペプチドを付加したものとLBD-LucCの2つの分子からなるバイオセンサーを開発した。これはリガンドが結合すると2分子間の相互作用が強まり発光が増加する。

研究成果の概要(英文)：A biosensor to detect vitamin D receptor (VDR) ligand with high sensitivity was developed using the technology of the split-type luciferase. The N-terminal portion (LucN) and C-terminal portion (LucC) of the split luciferase was fused to N-terminus and C-terminus of the VDR-ligand-binding domain (LBD), respectively. The binding of active form of vitamin D to LBD in the biosensor induces a conformational change of the biosensor. Consequently, the LucN and LucC positions are contiguous to increase luciferase activity. We also successfully developed a biosensor consisting of LucN with additional peptide and LBD-LucC. When the ligand binds to LBD, the interaction between the two molecules is enhanced, and then the luciferase activity is increased.

研究分野：生化学

キーワード：ルシフェラーゼ ビタミンD受容体 シグナル伝達 高感度検出系 キメラ酵素

1. 研究開始当初の背景

これまでに 1000 種類以上ものビタミン D 誘導体が合成・研究されているにもかかわらず、医薬品に至っている化合物は極々僅かであるのが現状である。その主な理由は、ビタミン D 誘導体の VDR への親和性が低いことや体内の種々の代謝酵素によって、速やかに不活性化なものへと代謝されてしまうことが挙げられる。従って、VDR への親和性が高く、代謝酵素による不活性化を受けにくい化合物の開発は、上述した、多くの疾患の治療薬となる可能性が高い。膨大な数のビタミン D 誘導体の中から、VDR に結合する化合物を簡便かつ短時間に探索・評価する検出系の構築は、医薬品開発に重要な役割を果たすと考えられる。これまでに、VDR リガンドをスクリーニングし、その親和性を測定するシステムとして、ウシ胸腺 VDR を用いた競合アッセイ、さらに、SRC-1 等のコアクチベーターを利用した方法が広く用いられている。一方、細胞を使うシステムとして、ビタミン D 応答配列 (VDRE) 含有プロモーター・ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた系が知られる。これらの方法は、高コストであったり、長時間を要するなどの問題点がある。これらの問題点を解決するために、分割型ルシフェラーゼを用いた新規 VDR リガ検出系を開発したが、発光が低い上、アゴニストが結合すると発光が減少するタイプであった。

2. 研究の目的

ビタミン D 受容体のアゴニストを簡便かつ高感度に検出できる発光増大型バイオセンサーの開発

3. 研究の方法

(1) 1 分子型バイオセンサー発現プラスミドの構築

pCR-BIunt II-TOPO-hVDR を鋳型とし、PCR によってヒト由来ビタミン D 受容体 (VDR) の LBD (リガンド結合領域 121-427 aa) を増幅した。また、Luc2 (ホタルルシフェラーゼ) をコードする pGL4.31 (Promega) ベクターを鋳型にし、LucN (Luc2 1-1246 bp)、LucC (Luc2 1247-1650 bp) を PCR でそれぞれ増幅した。PCR 産物を混合したものを用い、オーバーラップ PCR 法によって LucN、LBD、LucC を連結した。また、LucN と LBD の間に LXXLL モチーフを持つ種々のペプチドとフレキシブルリンカー-GGGGSx3 を挿入した。

(2) 2 分子型バイオセンサー発現プラスミドの構築

上記の発現プラスミドを鋳型にし、PCR により LucN-VDNHPMLMNLKDN をコードする DNA 断片を増幅し、発現プラスミドを構築した。さらに LBD-LucC 発現プラスミドを構築した。

(3) 1 分子型および 2 分子型バイオセンサー発現細胞におけるルシフェラーゼ発光測定  
アフリカミドリザルの腎臓由来の COS-7 細胞を 10 % FBS を含む DMEM 培地 (フェノールレッド含有) に懸濁し、 $0.7 \sim 1.0 \times 10^6$  個の細胞を 10 cm の培養皿に播種した。その後、5 % CO<sub>2</sub>、

37 で 24 時間培養後、リポフェクション法で COS-7 細胞内に遺伝子導入を行った。作製した 1 分子型および 2 分子型バイオセンサーをコードするプラスミド DNA と Lipofectamine 2000 混合し、細胞に導入した。遺伝子導入してから 24 時間後、培地を除去し、1×PBS で細胞を洗浄した。細胞をトリプシン処理によって剥がして回収後、懸濁した細胞を、1 ウェルあたり  $1.5 \times 10^4$  個の細胞数で播種し、5 % CO<sub>2</sub>、37 で 24 時間培養した。遺伝子導入してから 48 時間後、各ウェルに VDR アゴニストを投与してからマイクロプレートリーダーを用いて経時的に発光測定を行った。

4. 研究成果

LucN-(GGGGS)x3-LBD-LucC または LucN-NHPMLMNLKDN-(GGGGS)x3-LBD-LucC バイオセンサーを発現させた COS-7 細胞に 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加してから 120 分間の発光の相対変化量を比較した。発光変化量は、100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 添加後 5, 10, 15, 30, 60, 90 および 120 分時点での発光量を 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 添加前 0 分の発光量で割り、さらに 0.1% EtOH 添加群の発光量で割って得られた値をプロットした。LucN-(GGGGS)x3-LBD-LucC バイオセンサーは 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 添加後の発光量が約 40 % 減少したが、LucN-NHPMLMNLKDN-(GGGGS)x3-LBD-LucC バイオセンサーは発光量が約 6 倍増加した。LucN-(GGGGS)x3-LBD-LucC バイオセンサーの LBD に、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が結合すると、発光能を失う構造に変化するのに対し、LucN-NHPMLMNLKDN-(GGGGS)x3-LBD-LucC バイオセンサーは、LBD の構造変化に加えて、LXXLL 配列 (NHPMLMNLKDN) と LBD 間の相互作用も含むため、この 2 つの構造変化が、発光能の復活に大きく寄与しているものと考えられる。従って、目的である 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に応答して発光が増加するバイオセンサーの構築に成功した。

一方、2 分子型については LucN-NHPMLMNLKDN または LBD-LucC を単独、LucN-NHPMLMNLKDN および LBD-LucC を共発現させた COS-7 細胞に 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加し、60 分後の相対発光変化量を比較した。その結果、LucN-NHPMLMNLKDN または LBD-LucC を単独で発現させた COS-7 細胞では、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加しても発光は検出出来なかった。これに対し、LucN-NHPMLMNLKDN および LBD-LucC を共発現させた COS-7 細胞では、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に応答して発光が増加した。この発光増加は、バイオセンサータンパク質内の LXXLL 配列と LBD 間相互作用が生じる際に、LucN と LucC が再構成されて発光が復活したことを示唆している。

LXXLL 配列と (GGGGS)x3 を挿入した

LucN-LXXLL-(GGGGS)×3-LBD-LucC バイオセンサーはアゴニストに反応して発光量が増加した。すなわち、本研究の主目的である、アゴニストに反応して発光が増加するタイプのバイオセンサーを得ることに成功した。立体構造の情報がないため、理由を詳細に説明することはできないが、きわめて幸運であったといえる。また、LXXLL 配列の Leu を Ala に変えると活性が低下することから、LXXLL 配列が重要であることは間違いない。また、2 分子型では、アゴニストに反応してバイオセンサー内の LXXLL 配列と LBD 間相互作用が生じる際に、LucN と LucC が再構成されて発光が復活することが確認された。

1 分子型も 2 分子型も、アゴニストに反応して発光が増加するため、細胞や個体レベルでのビタミン D やその代謝物を可視化できる可能性がある。さらに、今回開発したバイオセンサーをコードする遺伝子組み換え動物（ゼブラフィッシュやマウスなど）の作製は、現在の分析技術では困難である個体の発生や発達、成長期におけるビタミン D の分布や作用機序を可視的に解析できる可能性もある。

#### 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 3 件)

1. Mano H, Ikushiro S, Saito N, Kittaka A, Sakaki T. Development of a highly sensitive *in vitro* system to detect and discriminate between vitamin D receptor agonists and antagonists based on split-luciferase technique *J Steroid Biochem Mol Biol.* 178, 55-59 (2018)
2. 真野 寛生, 生城 真一, 高野 真史, 橋高敦史, 榊 利之  
分割型ルシフェラーゼを用いたビタミン D 受容体リガンド検出系の構築および化合物スクリーニングへの応用  
ビタミン, Vol. 91, No.3 pp165-172 (2017)
3. Mano H, Nishikawa M, Yasuda K, Ikushiro S, Saito N, Sawada D, Honzawa S, Takano M, Kittaka A, and Sakaki T Novel screening system for high-affinity ligand of heredity vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutant R274L using bioluminescent sensor. *J Steroid Biochem Mol Biol.*(2017)

167,

61-66

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 真野寛生, 生城真一, 高野真史, 齊藤望, 橋高敦史, 榊利之  
分割型ルシフェラーゼを用いたビタミン D 受容体リガンドの新規検出系の開発および応用  
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (横浜) 2017.12.6-9
2. 真野寛生, 生城真一, 高野真史, 橋高敦史, 榊利之 高感度かつ短時間にビタミン D 誘導体の親和性を評価する方法の開発  
日本ビタミン学会第 69 回大会 2017. 6.8-9 (横浜)
3. 真野寛生, 西川美宇, 安田佳織、生城真二、高野真史、橋高敦史、榊利之  
分割型ルシフェラーゼを用いたビタミン D 受容体リガンド検出バイオセンサーの応用  
日本ビタミン学会第 68 回大会 2016.6.17-18 (富山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：分割型ルシフェラーゼ及びそれを用いたビタミン D 受容体リガンドの高感度検出法  
発明者：榊 利之、真野寛生、西川美宇  
権利者：富山県立大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-210604  
出願年月日：2017 年 10 月 31 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 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

榊 利之 (SAKAKI TOSHIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：70293909

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

生城 真一 (IKUSHIRO SHINICHI)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50244679

安田 佳織 (YASUDA KAORI)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：70707231

西川 美宇 (NISHIKAWA MIYU)

富山県立大学・工学部・嘱託研究員

研究者番号：90749805

(4) 研究協力者

真野 寛生 (MANO HIROKI)