

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15135

研究課題名(和文) リガンドポケットのない核内受容体に対する天然由来アゴニスト探索と活性化機序解析

研究課題名(英文) Natural-derived agonist search and activation mechanism analysis for nuclear receptor without ligand pocket

研究代表者

小谷 仁司 (Kotani, Hitoshi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：10594640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究対象としてリガンドポケットを持たない核内受容体を活性化する天然由来アゴニストの探索と活性化機序解析に取り組んだ。リガンドポケットを持たないため、ヘテロダイマーを形成するRetinoid X receptor (RXR) に作用するリガンドによりヘテロダイマー活性化を検討するアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて生薬抽出エキスのスクリーニングをおこなった結果、コウボク、シユクシヤ、サンズコンといった生薬エキスにヘテロダイマー活性化作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまではリガンドポケットがないために作用するリガンドの開発が難しいことが現状の問題となっていた。本研究で、ヘテロダイマーを形成するRXRのリガンドにより、ヘテロダイマー活性化を可能とすることが示され、リガンド活性の評価系も構築された。また、生薬エキス中に活性化する成分が含まれていることも明らかになった。これらの結果から、今後これまで困難であったリガンドポケットのない核内受容体に対する薬剤開発が大きく発展するとともに、伝統医薬品の利用が再評価されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I searched for natural occurring agonists for nuclear receptor without ligand pocket, and analyzed their activation mechanisms. Since it does not have a ligand pocket, an assay system was constructed to examine heterodimer activation by a ligand acting on retinoid X receptor(RXR) forming a heterodimer. As a result of screening the herbal medicine extracts using this assay system, heterodimeric activating action was found in the herbal medicine extracts such as Magnoliae Cortex, Amomi Semen and Sophorae Subprostratae Radix.

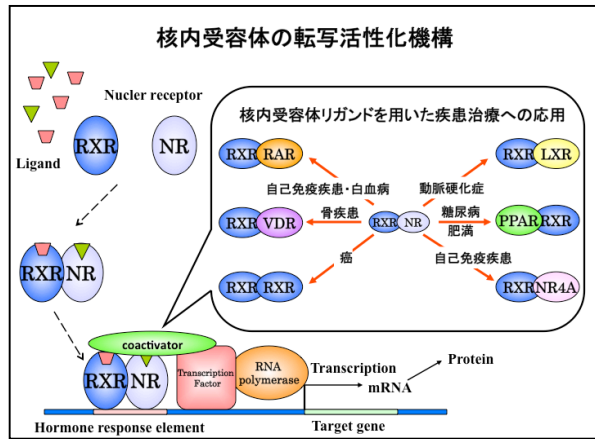
研究分野：天然物化学

キーワード：T細胞 核内受容体 NR4A2 天然物 制御性T細胞 癌 リガンド RXR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内受容体は様々な脂溶性低分子化合物をリガンドとし、細胞の分化・糖代謝・脂質代謝・骨代謝などの生体反応を制御する転写因子である。核内受容体はヒトにおいて 48 種類存在するが、エストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR) などのようにホモダイマーを形成するものと、RXR とヘテロダイマーを形成するものと大きく分かれる。この RXR は様々なヘテロダイマーパートナー受容体と結合し、パートナー受容体の標的遺伝子の発現誘導を補助する働きがあると考えられている。しかし、核内受容体 NR4A ファミリーは、核内受容体の中でもリガンドポケットが無く、リガンド結合ができない構造となっているが、免疫系の制御性 T 細胞の分化に非常に重要な転写因子であることがこれまでに報告されている。(Sekiya et al, Nat Immunol. 2013. 14(3):230-7.)

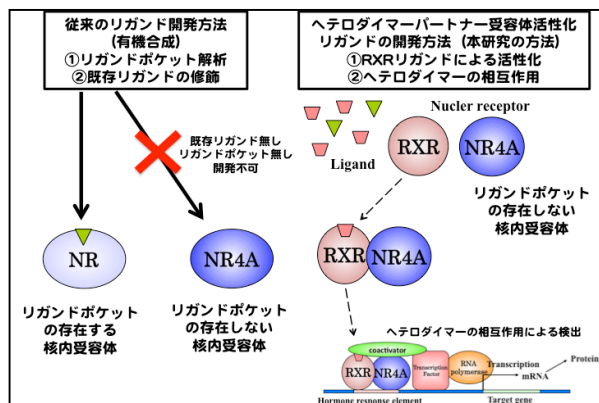


### 2. 研究の目的

本研究では、核内受容体 RXR リガンドを用いてリガンドポケットの無いヘテロダイマーパートナー受容体 (NR4A ファミリー) の転写活性化を制御することを目的とし、RXR リガンドの探索と機能解析を行うこととした。本研究は新たな核内受容体活性化の指標として、ヘテロダイマー活性化という点に着目し、リガンドポケットを持たない核内受容体 (NR4A) の活性化制御を行うことを目的としている。 様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し、ヘテロダイマーパートナー受容体の標的遺伝子発現誘導を補助する機能を持つ RXR (retinoid X receptor) を標的として、リガンドポケットを持たない核内受容体 NR4A1, 2, 3 (NR4A ファミリー) を選択的に活性化する天然由来アゴニストの探索と活性化機序解析を行う。本研究が完成することにより、これまで活性化制御できなかった NR4A ファミリーの機能解析が進むとともに、NR4A ファミリー活性化による自己免疫疾患治療への応用も可能となることが考えられる。

### 3. 研究の方法

これまでの核内受容体のリガンド開発研究は、タンパクの立体構造解析などによるリガンドポケット構造を、計算科学を用いてポケットにあてはまる化合物をシュミレーションすることにより、リガンド候補化合物を有機合成化学的に作製することや、既存のリガンドを有機合成により修飾することで選択性を持たせるような開発研究が多くを占めていた。また、化合物ライブラリーによるスクリーニングや、私がこれまで行ってきた生薬エキスからのリガンド探索も、一つの受容体に対するアッセイ系を指標として用いることで、受容体に結合するリガンドの探索を行ってきたものであった。しかし本研究は、RXR とヘテロダイマーを形成するという視点で評価を行うことにより、いくつもの複雑な活性化機序を考える必要が生じるが、これまでの観点では見つけることができなかつたリガンドポケットのない核内受容体の活性化物質を発見することができる。特に、リガンドポケットが無いことや既存のリガンドが無いことから、前述の有機合成による活性化物質の合成は不可能であることは明らかである。 そこで図のような、ヘテロダイマー選択的な活性化を評価するアッセイ系 (レポーターアッセイ) の構築を行った後、各抽出エキスのスクリーニングを行うこととした。



### 4. 研究成果

本研究では、新たな核内受容体活性化の指標として、ヘテロダイマー活性化という点に着目し、リガンドポケットを持たない核内受容体の活性化制御をおこなうことを目的として研究をすすめ、核内受容体 NR4A1 および NR4A2 の発現プラスミドのクローニングをおこなった。その後、既存の RXR 発現プラスミドと組み合わせたルシフェラーゼレポーターアッセイ系により、既知の RXR 合成アゴニストの活性を評価したが、ヘテロダイマー活性化作用は見出せなかつた。次に、NR4A2 のリガンドバインディングドメイン部分だけを発現プラスミドとしてクローニングし、連携研究者が有機合成化学的に XCT0135908 という既報の NR4A2 活性化剤を作製し、それ

らを用いて NR4A2 転写活性を評価した。その結果、XCT0135908 で濃度依存的な転写活性化が確認された。また、RXR 合成アゴニストとしてこれまでの研究で用いてきた Bexrotene についても同様の活性を評価したところ、転写活性化の強度がかなり弱い結果となった。

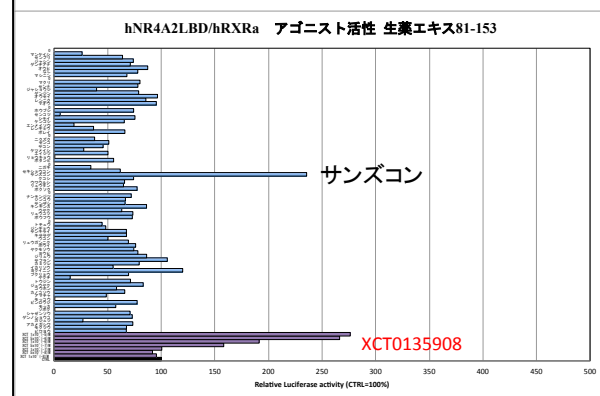
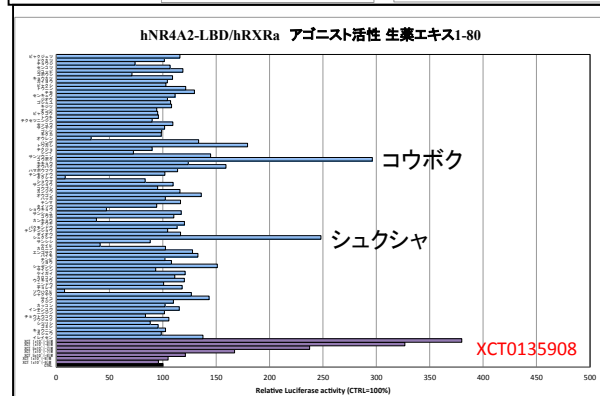
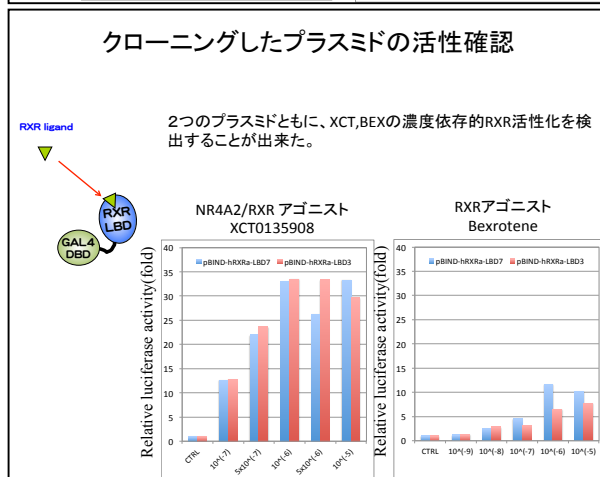
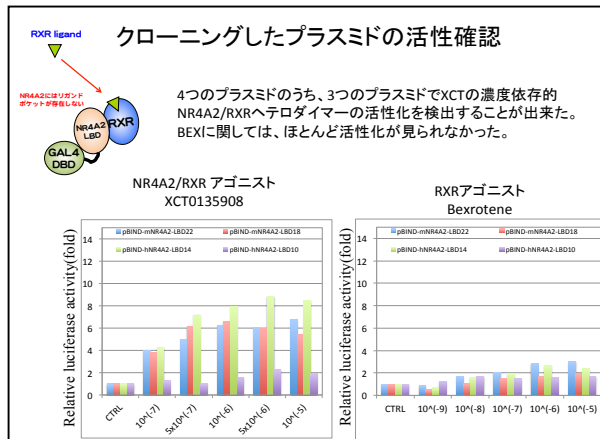
また、この XCT0135908 が核内受容体 RXR に結合していることを確認するために、RXR 単独に対するルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して評価したところ、XCT0135908 は濃度依存的な活性化が確認され、Bexrotene よりも活性化の強度も高いことが確認された。

研究計画では、この XCT0135908 の有機合成が当初含まれていなかったため、大きく時間を要してしまい研究の進捗が遅れてしまった。生薬エキスの NR4A2/RXR アゴニスト活性のスクリーニング評価を作製したルシフェラーゼアッセイ系によりおこない、図のような結果を得た。

スクリーニングにより、3 つの生薬エキスに NR4A2/RXR ヘテロダイマー転写活性化作用(アゴニスト作用とする)をみいだした。これらの 3 つの生薬エキスはコウボク、シュクシャ、サンズコンであり、これまでの RXR リガンド探索の研究から既にコウボクとサンズコンからは RXR アゴニストを単離同定し、論文報告済みである。(Kotani H. et al. Journal of Natural Products. 73(8):1332-1336. 2010., Inoue M et al. Journal of Natural Products 77(7):1670-1677. 2014) しかし、これまでの RXR 単独のスクリーニング方法では見出すことができなかったシュクシャに NR4A2/RXR ヘテロダイマー活性化作用を見出した。

本研究は挑戦的萌芽研究という挑戦的な研究課題であり、アッセイ系の作製からポジティブコントロールとなる化合物の有機合成、スクリーニングの実施といった研究を実施することができたが、やはり当初の計画通り研究を進めることは難しく、新たなヘテロダイマー活性化成分の同定に至ることはできなかった。しかし、本研究の結果によりこれまでに RXR アゴニストを同定してきたコウボク、サンズコンの 2 つのエキスが NR4A2/RXR のヘテロダイマーを活性化することができることを明らかにすることができた。これらの 2 つのエキスについては、活性成分がコウボク：ネオリグナン Magnolol, Honokiol、サンズコン：プレニルフラボノイド

2-[[3'-hydroxy-2', 2'-dimethyl-8'-(3-methyl-2-butenyl)}chroman-6'-yl]-7-hydroxy-8-(3-methyl-2-butenyl)chroman-4-one、  
2-[[2'-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7'-(3-methyl-2-butenyl)-2', 3'-dihydrobenzofuran}-5'-yl]-7-hydroxy-8-(3-methyl-2-butenyl)chroman-4-one といった化合物であることを明らかにしているため、これらを使ったヘテロダイマー活性化の機能解析を評価することが可能であるため、今後詳細な検討を進めていきたいと考えている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Inao T, Iida Y, Moritani T, Okimoto T, Tanino R, Kotani H, Harada M.

Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin.

*Oncotarget* 査読有り 9(39): 25545-25556. 2018. DOI:10.18632/oncotarget.25370

〔学会発表〕（計 2 件）

① ○小谷仁司、矢作忠弘、片川和明、飯田雄一、原田守  
免疫賦活作用を有する天然由来成分の探索と機能解析  
日本生薬学会第 65 回年会（2018 年 安田女子大学 広島）

② ○渡辺美咲、矢作忠弘、小谷仁司、小川拓哉、古川めぐみ、松崎桂一  
桂枝加朮附湯の骨芽細胞および破骨細胞に対する影響  
日本生薬学会第 65 回年会（2018 年 安田女子大学 広島）

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：片川 和明

ローマ字氏名：(KATAKAWA, kazuaki)

研究協力者氏名：矢作 忠弘

ローマ字氏名：(YAHAGI, tadahiro)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。