

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460155

研究課題名(和文) ビタミンD受容体を標的とする可逆的な共有結合型リガンドの創製

研究課題名(英文) Development of reversible covalent vitamin D receptor ligands

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンD受容体と可逆的に共有結合するリガンドとして、Michael acceptor の位に2つ目の電子吸引基をもつリガンドを設計した。初めにリトコール酸の側鎖にカルボニル基に加えてシアノ基をもつ誘導体を合成した。続いてビタミンDの側鎖にカルボニル基とシアノ基をもつ誘導体を合成した。合成ビタミンD誘導体と受容体の共有結合の有無をESI-MSを用いて調べたが、共有結合は認められなかった。一方、この研究課題立案のきっかけとなった側鎖にエノン基をもつビタミンD誘導体と受容体の共有結合形成については、ESI-MS解析及びX線結晶構造解析で詳細が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：As a ligand which reversibly covalently binds to the vitamin D receptor, a ligand having a second electron withdrawing group at the position of Michael acceptor was designed. First, a derivative having a cyano group in addition to a carbonyl group in the side chain of lithocholic acid was synthesized. Subsequently, a derivative having a carbonyl group and a cyano group in the side chain of vitamin D was synthesized. Covalent bond formation between the synthetic vitamin D derivative and the receptor was examined using ESI-MS, but no covalent bond was observed. On the other hand, details of the formation of covalent bonds between vitamin D derivatives having an enone group in the side chains and the receptor, which triggered this research project, were confirmed by ESI-MS analysis and X-ray crystal structure analysis.

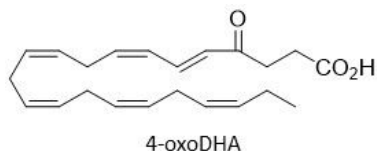
研究分野：タンパク質の立体構造に基づいたリガンド創製

キーワード：ビタミンD ビタミンD受容体 共有結合型リガンド

1. 研究開始当初の背景

酵素や受容体などのタンパク質と共有結合を形成する低分子化合物は標的タンパク質以外のタンパク質とも非特異的に共有結合を形成することが懸念されるため医薬として望ましくないと考えられている。しかし、医薬品の中には、アスピリンやプロトンポンプインヒビターなど、標的タンパク質をコバレント修飾することで作用を発現する医薬が存在し、現在 39 種が FDA から承認されている。コバレント修飾型医薬の特色は、作用が強力で持続性があり、コバレント修飾を意図せず開発された点である。近年、種々の研究手法が進歩したことで、共有結合を意図した合理的な医薬のデザインが可能であると考えられるようになってきた(*Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 307-317)。

我々は核内受容体 PPAR と共有結合するリガンド (4-oxo-docosahexaenoic acid: 4-oxo-DHA) の創製に成功している (*Nat Struct Mol Biol.* **2008**, 15, 924-931)。この化合物は *in vivo* で血糖降下作用をもち、肥満・浮腫・肝障害などの副作用が認められなかったことから、特許出願した。



我々は、我々が行ってきたコバレント修飾型医薬の実績を踏まえ、今まで望ましくないと考えられてきた共有結合型医薬を積極的に開発する研究に着手した。共有結合型医薬にはバイオアベイラビリティーの改善、標的タンパク質の構造制御による活性スペクトルの変化、新しい作用の発見などが期待できる。

2. 研究の目的

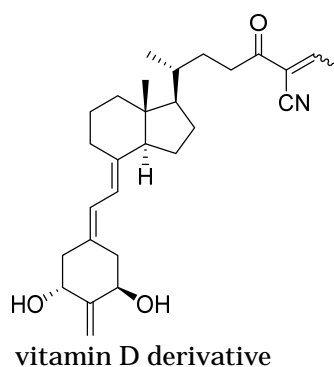
標的タンパク質と高い選択性で共有結合するのみならず、可逆的な共有結合を形成するリガンドを創製する。そのためにはリガンドの適切な位置に Michael acceptor を導入することが望ましいと考えた。そこで、PPAR と同様、核内受容体の一員であり、我々が長年研究対象としてきたビタミン D 受容体 (VDR) を標的とする共有結合型リガンドを創製することとした。

3. 研究の方法

- (1) VDR の Cys284 と可逆的な共有結合を形成する Michael acceptor をもつリトコール酸誘導体を設計し、合成する。
- (2) VDR の His393、His301 と可逆的な共有結合を形成する Michael acceptor をもつビタミン D 誘導体を設計し、合成する。
- (3) ESI-質量分析や X 線結晶構造解析を用いて、目的のアミノ酸残基と共有結合しているか、可逆的か、などを調べる。

4. 研究成果

- (1) VDR の Cys284 と可逆的な共有結合を形成する Michael acceptor をもつリトコール酸誘導体をビタミン D 受容体リガンド結合領域 (VDR-LBD) の立体構造に基づいて設計した。初めにリトコール酸のカルボン酸を残したまま 23 位にエノン構造を導入した化合物を設計したが、合成が極めて難しいことが判明した。そこでリトコール酸の 24 位カルボニル基のカルボニル基をエノンカルボニルとして用いる化合物を再設計した。再設計した化合物の合成は以下のとおりである。出発原料として用いたリトコール酸をメチルエステルとした後、3 位アルコールを保護した。アセトニトリルを求核剤とするエステルとのアルドール反応を種々試みたが進行しなかったので、エステルをアルデヒドに還元して行った。その結果、カルボニル基とニトリルを置換基としてもつ活性メチレン化合物を得ることができた。この化合物とアセトアルデヒドのアルドール反応を行った結果、低収率ながら目的の側鎖をもつリトコール酸誘導体の合成を達成した。
- (2) VDR の His393、His301 と可逆的な共有結合を形成するビタミン D 誘導体として (1) で述べたリトコール酸誘導体と同様の側鎖をもつビタミン D 誘導体を設計した。既に報告した活性型ビタミン D 誘導体の 24-アルコール化合物を出発物質として用いた。24 位アルコールをアルデヒドに酸化した後、アセトニトリルと縮合させた。続いて Dess-Martin 酸化、それに続くアセトアルデヒドとの縮合により、カルボニル基とシアノ基の二つの電子吸引基をもつ目的のエノン化合物の合成を達成した。



- (3) (2) で得たビタミン D 誘導体が共有結合を形成するか ESI-MS を用いて検討した。その結果、apoVDR のピークよりリガンドの分子量分シフトしたピークは観察されず、共有結合形成を確認することはできなかった。X 線結晶構造解析も行ったが、プレリミナリーな

結果ではあるが、共有結合は認められなかった。以上の結果から現在のところ、VDR を標的とする可逆的な共有結合型リガンドの創製には至らなかった。本研究を通じて、共有結合が可逆的か否かを検出する技術や方法論が定まっておらず、今後は検出技術や方法論の獲得が重要であると考えに至った。一方、この研究課題立案のきっかけの一つとなった側鎖にエノン基をもつビタミン D 誘導体と VDR-LBD の共有結合形成を ESI-MS スペクトルのみならず X 線結晶構造解析で詳細に明らかにすることができた。すなわち、ESI-MS スペクトルでは、4 つのビタミン D 誘導体が時間依存的に VDR のピークをリガンドの分子量分増加させ、共有結合形成が示された。またビタミン D 誘導体の側鎖構造の違いにより反応性が異なった。さらに VDR-LBD/ビタミン D 誘導体複合体の X 線結晶構造解析から、ビタミン D 誘導体は His301 の 1,4-共役付加により共有結合を形成することが判明した。

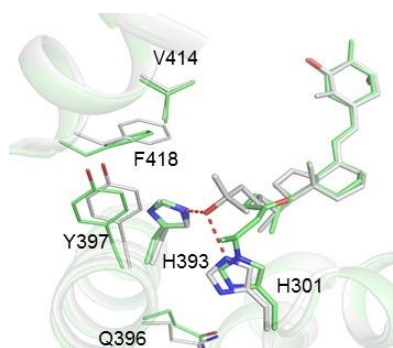


図 1 VDR-LBD/ビタミン D 誘導体複合体の X 線結晶構造解析。ビタミン D 誘導体(緑)が His301 と共有結合を形成している。

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 5 件)

Egawa D, Itoh T, Kato A, Kataoka S, Anami Y, Yamamoto K. SRC2-3 binds to vitamin D receptor with high sensitivity and strong affinity. *Bioorg Med Chem.* **25**, 568–574 (2017).

DOI: 10.1016/j.bmc.2016.11.020 査読有

Anami Y, Shimizu N, Ekimoto T, Egawa D, Itoh T, Ikeguchi M, Yamamoto K. Apo- and Antagonist-Binding Structures of Vitamin D Receptor Ligand-Binding Domain Revealed by Hybrid Approach Combining Small-Angle X-ray Scattering and Molecular Dynamics. *J. Med. Chem.*, **59**, 7888–7900 (2016)

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00682. 査読有

Kato A, Anami Y, Egawa D, Itoh T, Yamamoto K. Helix12-stabilization antagonist of vitamin D receptor. *Bioconjugate Chem.* **27**, 1750–1761 (2016). DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00246. 査読有

Anami Y, Sakamaki Y, Itoh T, Inaba Y, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Yamamoto K. Fine tuning of agonistic/antagonistic activity for vitamin D receptor by 22-alkyl chain length of ligands: 22*S*-Hexyl compound unexpectedly restored agonistic activity. *Bioorganic. Med. Chem.* **23**, 7274–81 (2015).

doi:10.1016/j.bmc.2015.10.026. 査読有

[学会発表](計 17 件)

加藤晃、山尾真貴子、梁原祐太、石田寛明、伊藤俊将、山本恵子：側鎖末端にフェノールを有する新規ビタミン D 受容体アンタゴニストの創製研究 日本薬学会第 137 年会(東北大学・宮城県仙台市) 2017 年 3 月 26 日

山本恵子、穴見康昭、清水伸隆、浴本亨、江川大地、伊藤俊将、池口満徳：SAXS-MD 解析を用いたビタミン D 受容体のアポ型及びアンタゴニスト結合型構造の解析 日本薬学会第 137 年会(東北大学・宮城県仙台市) 2017 年 3 月 26 日

山本恵子：ビタミン D 受容体の不活性型と活性阻害型の構造解明 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ(つくば国際会議場・茨城県つくば市) 2017 年 3 月 14 日

吉澤麻美、堀竜也、伊藤俊将、山本恵子：ビタミン D 受容体共有結合型リガンドの創製と結合様式解明 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ(つくば国際会議場・茨城県つくば市) 2017 年 3 月 14 日

吉澤麻美、堀竜也、穴見康昭、加藤晃、吉本暢子、伊藤俊将、山本恵子：ビタミン D 受容体と電子求引基を有するリガンド間の共有結合形成 第 27 回日本レチノイド研究会学術集会(昭和薬科大学・東京都町田市) 2016 年 10 月 22 日

加藤晃、伊藤俊将、山本恵子：ヘリックス 12 を安定化するビタミン D 受容体アンタゴニスト：HDX-MS 解析と結晶構造解析を用いて 第 27 回日本レチノイド研究会学術集会(昭和薬科大学・東京都町田市) 2016 年 10 月 22 日

Mami Yoshizawa, Tatsuya Hori, Yasuaki Anami, Akira Kato, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto : Design and synthesis of the active vitamin D analogues with an electrophile at the side chain. The

17th Tetrahedron Symposium (Meliá Sitges Hotel Congress Centre · Barcelona, Spain) 2016 年 6 月 29 日
Keiko Yamamoto, Yasuaki Anami, Akira Kato, Toshimasa Itoh : Agonistic and antagonistic activity of active vitamin D analogues with modified side chain. The 17th Tetrahedron Symposium (Meliá Sitges Hotel Congress Centre · Barcelona, Spain) 2016 年 6 月 29 日
 加藤晃、伊藤俊将、山本恵子 : アンタゴニスト結合による VDR の構造変化 : HDX 解析と結晶構造解析を用いて 日本ビタミン学会第 68 回大会 (富山国際会議場 · 富山県富山市) 2016 年 6 月 17 日
 吉澤麻美、堀竜也、穴見康昭、加藤晃、吉本暢子、伊藤俊将、山本恵子 : 側鎖に電子求引基をもつ活性型ビタミン D 誘導体の設計と合成 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜 · 神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 29 日
 加藤晃、伊藤俊将、山本恵子 : 水素-重水素交換質量分析法を用いたアンタゴニストによるビタミン D 受容体のコンフォメーション変化の解析 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜 · 神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 29 日
 穴見康昭、清水伸隆、浴本亨、江川大地、伊藤俊将、池口満徳、山本恵子 : X 線小角散乱 (SAXS) と分子動力学計算 (MD) を組み合わせた SAXS-MD 法によるビタミン D 受容体リガンド結合領域の相関構造解析 第 59 回日本薬学会関東支部大会 (日本大学薬学部 · 千葉県船橋市) 2015 年 9 月 12 日
 江川大地、伊藤俊将、片岡沙織、星野咲季、穴見康昭、加藤晃、山本恵子 : X 線結晶構造解析を用いたビタミン D 受容体とコアクチベーターペプチドの結合様式解明 日本ビタミン学会第 67 回大会 (奈良県新公会堂 · 奈良県奈良市) 2015 年 6 月 5 日
 穴見康昭、酒巻雄太、伊藤俊将、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、山本恵子 : 22S-ヘキシル活性型ビタミン D 誘導体の受容体結合構造と作用機構 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学 · 兵庫県神戸市) 2015 年 3 月 28 日
 江川大地、伊藤俊将、片岡沙織、星野咲季、穴見康昭、加藤晃、山本恵子 : ビタミン D 受容体とコアクチベーターペプチドの親和性に関する新規測定法構築 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学 · 兵庫県神戸市) 2015 年 3 月 26 日
 Akira Kato, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto : Design and synthesis of antagonist to prevent the active conformation of

Vitamin D receptor. The 15th Tetrahedron Symposium (Millennium Gloucester Hotel London Kensington · London, UK) 2014 年 6 月 24, 25 日

山本恵子、吉澤麻美、吉本暢子、穴見康昭、江川大地、伊藤俊将 : ビタミン D 受容体と共有結合するリガンドの創製研究 日本ビタミン学会第 66 回大会 (姫路商工会議所 · 兵庫県姫路市) 2014 年 6 月 14 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

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()