

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 Molecular Basis Study of Vitamin D Receptor Partial Agonism Based on Crystal Structure

穴見康昭、伊藤俊将、江川大地、吉本暢子、山本恵子*

昭和薬科大学 医薬分子化学研究室, 〒194-8543 町田市東玉川学園 3-3165

Yasuaki Anami, Toshimasa Itoh, Daichi Egawa, Nobuko Yoshimoto, Keiko Yamamoto
Laboratory of Drug Design and Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, 3-3165
Higashi-Tamagawagakuen, Machida, 194-8543, Japan

1 はじめに

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_3 は、核内受容体スーパーファミリーの一員である転写因子ビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、そのコンフォメーションを活性型へと変化させることで遺伝子転写を介して Ca 代謝調節などの生理作用を発現する。コンフォメーション変化は helix11 にある His397 (ラットでは His393) と水素結合することで安定化し、活性を制御している helix12 が折りたたまれ活性型のコンフォメーションとなると考えられている。近年、VDR において多数の結晶構造が報告されている。我々は 22S-配置のブチル基、エチル基をもつビタミン D 誘導体が、VDR のリガンド結合ポケットにブチルポケットを誘導することを見出し、それらは側鎖末端構造に依存して活性を示すことを明らかにした。続いて 22R-アルキルビタミン D 誘導体を合成し、活性を評価したところ、側鎖構造に依存して活性を示すが、22S 体とは異なる活性を示すことが明らかになった。

本研究は、22R 体が VDR とどのような相互作用をしているのかを明らかにすることを目的として X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

大腸菌で発現させたラット VDR-リガンド結合ドメイン (rVDR-LBD) を精製し、Hanging drop 法を用いて、22R 体との共結晶化を試みたところアゴニストとパーシャルアゴニストで良好な結晶を得たので、高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折データを取得した。

3 結果および考察

アゴニスト **1** は分解能 2.4\AA で構造情報を得ることができた。解析の結果、電子密度マップから単一のコンフォメーションで VDR と結合しており (図 1A)、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 と同様、Tyr143, Ser233, Arg270, Ser274, His301, His393 と水素結合を形成し、さらに活性を制御している helix12 と疎水性相互作用していた。そのため、アゴニスト

活性を説明する結晶構造であることが明らかになった。

一方、パーシャルアゴニスト **2** は異なる条件の結晶でそれぞれ分解能 1.9\AA , 2.0\AA で構造情報を得ることができた。興味深いことに 1 つの結晶中に 2 通りのコンフォメーションで結合していた (図 1B)。

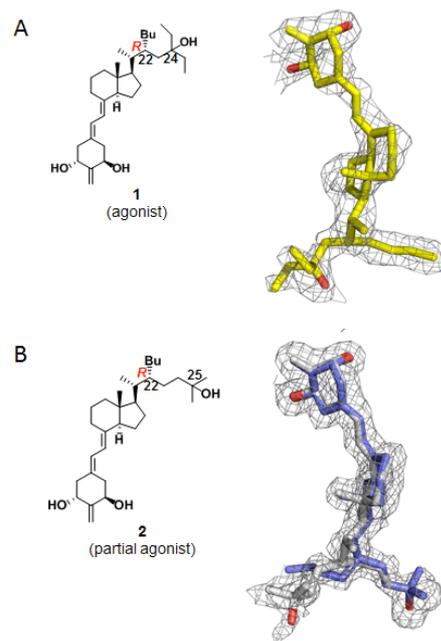


図 1. リガンドコンフォメーション

また、その割合は電子密度の差マップより青のコンフォメーションが 70% でメジャーコンフォマー、グレイのコンフォメーションが 30% でマイナーコンフォマーであると決定した。さらに、リガンド周辺のアミノ酸残基もリガンドに対応して 7:3 のロータマーで混在していた。VDR の活性に最も重要な His301 と His393 との水素結合は異なっており、メジャーコンフォマーでは His393 と水素結合することができず、His301 と水を介して水素結合していた (図 2)。そのため、VDR を安定な活性型のコンフォメーションにすることができない。それに対し、マイナーコンフォマーでは His393 と水を介して水素

結合していたため、安定な活性型のコンフォメーションになることができると考えられる。以上のことから、メジャーコンフォマーはアンタゴニスト活性を反映した構造で、マイナーコンフォマーはアゴニスト活性を反映した構造であると考えられる。両コンフォマーの和がパーシャルアゴニスト活性に反映されたことが強く示唆された[1]。

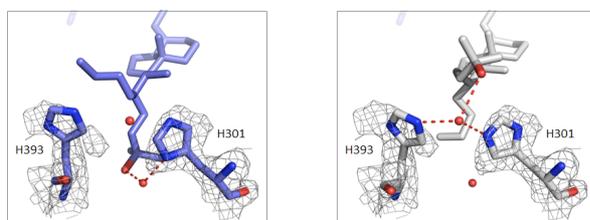


図 2. リガンドと His301, His393 との水素結合

4 まとめ

本研究は、核内受容体においてアンタゴニストコンフォメーション、アゴニストコンフォメーションの両方を一つの結晶中に捕捉することができた初めての例であり、他の核内受容体のパーシャルアゴニスト活性の作用発現機構にも適用できる可能性があると考えられる。

謝辞

X 線回折強度データ測定においては、PF スタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

参考文献

[1] Y. Anami. *et al.*, *J. Med. Chem.* **57**, 4351-4367 (2014).

成果

1 日本薬学会第 134 年会優秀発表賞 (口頭発表)

*yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp