



平成 28 年 9 月 16 日

昭和薬科大学

高エネルギー加速器研究機構

公立大学法人横浜市立大学

## ビタミン D 受容体の不活性型と活性阻害型の構造を解明

### —創薬ターゲットとなるビタミン D 受容体とリガンドとの 相互作用機構を原子レベルで明らかに—

～アメリカ化学会の学術雑誌『JMC』(Journal of Medicinal Chemistry) に掲載～

(平成 28 年 9 月 8 日付オンライン掲載)

#### 本研究成果のポイント

- ビタミン D 受容体リガンド結合ドメインの不活性型と活性阻害型の構造を原子レベルで解明。
- ビタミン D 受容体は創薬ターゲットとして知られる核内受容体の一種で、解明した構造・相互作用機構は核内受容体全般への適用が期待できる。
- 目的の分子構造をより生体内に近い状態で得る解析手法を確立。分子ダイナミクス、生命機能の解明へ向けた貢献が期待できる。

#### 【概要】

ビタミン D 受容体 (VDR) は核内受容体の一種で、骨粗鬆症をはじめとする様々な疾病と関連していることが知られています。VDR の構造は、不活性型、活性型、活性阻害型の 3 つに大きく分類されます。安定な活性型 VDR は、今までに 100 以上の結晶構造が報告されてきました。一方、不安定な不活性型と活性阻害型の構造は未解明で、標的タンパク質との相互作用や機能調整がどのように行われているか分かりませんでした。本研究グループは、生体内に近い状態である、溶液中におけるタンパク質の構造を解析できる X 線小角散乱 (SAXS、注 1) と、既存の結晶構造を活用する分子動力学計算 (MD、注 2) を組み合わせて解析した結果、不活性型 VDR と活性阻害型 VDR の原子レベルの構造を初めて明らかにし、リガンド結合メカニズムを新たに提唱しました。

VDR の活性型、不活性型、活性阻害型の全ての構造が解明されたことで、それらの機能の発現・抑制の両方が制御可能となり、その仕組みを用いた創薬デザインの幅が大きく広がられました。

また SAXS と MD を組み合わせた解析手法は、VDR のように結晶構造解析では困難な、機能発現に動きを伴うタンパク質の原子分解能での解析に威力を発揮すると期待できます。

## 【論文情報】

雑誌名：Journal of Medicinal Chemistry

論文名：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, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00682

著者：Yasuaki Anami, Nobutaka Shimizu, Toru Ekimoto, Daichi Egawa, Toshimasa Itoh, Mitsunori Ikeguchi, Keiko Yamamoto.

## 【研究グループ】

- ・昭和薬科大学 創薬科学系 医薬分子化学研究室  
穴見康昭、江川大地、伊藤俊将 准教授、山本恵子 教授
- ・高エネルギー加速器機構 物質構造科学研究所  
清水伸隆 准教授
- ・横浜市立大学 生命医科学研究科 生命情報科学研究室  
浴本亨 特任助教、池口満徳 教授

\*本成果は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）、文部科学省フラッグシップ2020プロジェクト（ポスト「京」）重点課題1「生体分子システムの機能制御による革新的創薬基盤の構築」の支援により得られました。

## 【研究内容と成果】

### （1）背景

核内受容体は細胞核内における DNA 転写を調整するための受容体であり、米国食品医薬品局（FDA）が認可している医薬品の13%は核内受容体を標的にしているという報告もあります<sup>(i)</sup>。ビタミン D 受容体（VDR）はその一種で、リガンド（注3）である活性型ビタミン D<sub>3</sub>（1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>）が結合すると構造を変化させて標的 DNA に結合し、転写を制御します。

薬剤分子を創製する為には、薬剤となる分子が標的タンパク質に結合するメカニズムを理解することが重要です。また薬剤には、一般的に標的タンパク質の働きを強める「作動薬」と働きを阻害する（弱める）「阻害薬」があります。それらが結合する際の標的タンパク質との相互作用の違いから、それぞれの働きのメカニズムを明らかにすることも重要です。作動/阻害の両方の調整機構を明らかにし、生体内の反応を強めたり弱めたりするような薬剤を自在に開発できれば、核内受容体に関係している様々な疾病の新薬を生み出す可能性があります。

VDRにおいては、リガンドと結合する部位（ドメイン）（VDR-LBD）を用いて、これらのメカニズムを理解するための研究が行なわれています。特に、VDR-LBD が様々な作動薬と結合した活性型に関する X 線結晶構造解析の結果は100例以上報告され、12番目のヘリックス（注4）（ヘリックス12）が、遺伝子転写に重要な役割を果たすと考えられています（図1）。

一方で、リガンド非結合状態である不活性型に関する報告はなく、活性阻害型に関しては数例報告があるものの、本来異なるはずの活性型と同一の構造になっていました。これは結晶化により本来とは異なる構造に変形してしまったためと考えられます。従って、これまでは不活性型の構造や活性阻害の詳細なメカニズムは不明のままでした。

## (2) 研究内容と成果

本研究グループでは、ラット由来の VDR-LBD を用いて研究を行いました。まず、不活性型と活性阻害型の構造を得るために溶液試料の SAXS 実験を行い、溶液構造からの散乱強度曲線（実験曲線）を得ました。既存の 100 以上の活性型等の結晶構造から理論散乱強度曲線（理論曲線）を計算し、得られた実験曲線と比較しましたが、一致する構造はありませんでした。そこで、既存の結晶構造をベースに MD によって多数の派生構造を発生させ、そのような構造アンサンブルの中から実験曲線と一致する理論曲線を示す構造を選出しました（図 2）。

MD では、不活性型に関しては、既存の結晶構造からリガンドを取り除いた構造を基に計算のための初期構造を構築し適用しました。活性阻害型に関しては、既存の結晶構造の中から、SAXS 実験で使用した阻害薬に形が似ているリガンドが結合した構造を基に初期構造を構築しました。また、MD の計算中には、実験データからの束縛条件などは一切含まれていません。その結果、実験曲線と一致度の高い理論曲線を示す原子分解能の構造をそれぞれ得ました（図 3）。不活性型の構造では、ヘリックス 10 と 11 との主鎖間で水素結合が欠落して屈曲点を形成していると分かりました。この屈曲点でヘリックス 11 が外に曲がることで、リガンドのタンパク質内部への侵入を可能にしています。

一方、活性阻害型に関しては、ヘリックス 11 から 12 の一部の領域がほどけて広がってしまい、残ったヘリックス 12 が活性型のような様式をとることが出来ない構造になっていると分かりました。VDR はリガンドとの結合後に補助因子であるコアクチベータ（注 5）と結合することで DNA 転写の開始につながりますが、活性阻害型では、ヘリックス 12 がコアクチベータの結合サイトを塞ぐように局在化するため、結合が阻害されていると判明しました。

これまでは、既存の活性型の構造を基にヘリックス 12 の挙動を推測することによってリガンド結合メカニズムが推定されてきました。しかし、本研究によって不活性型の構造や活性阻害のメカニズムを説明できる構造が明らかになったため、不活性型、活性/阻害の調整機構を詳細に議論することが初めて可能となり、本研究グループは、これら VDR-LBD のリガンド結合メカニズムを“Folding Door Model”として新たに提唱しました（図 4）。

## (3) 研究の意義

ビタミン D 受容体の活性型、不活性型、活性阻害型全ての構造が解明されたことで、それらの機能の発現・抑制の両方が制御可能となり、その仕組みを用いた創薬デザインの幅が大きく広がられました。

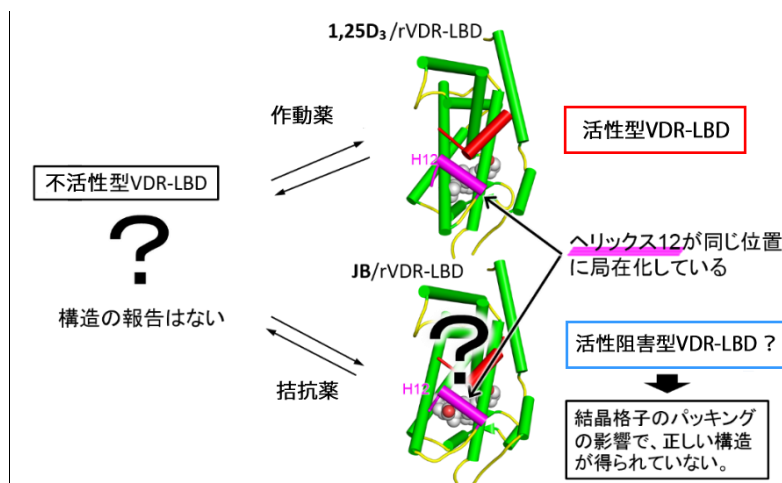
ビタミン D 受容体は、核内受容体ファミリーの一種です。このようなファミリー内では、アミノ酸配列の相同性（注 6）が高く、また構造的にも非常によく似ていることが知られて

います。例えば、同じ核内受容体であるレチノイドX受容体  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) のリガンド結合ドメイン (RXR $\alpha$ -LBD) は不活性型の結晶構造が報告されています<sup>(i)</sup>が、その構造では、今回明らかになった不活性型の VDR-LBD の構造と同様に、ヘリックス 10 と 11 の間に屈曲点があります。しかし、ヘリックス 11 の折りたたまれる向きが逆に内側になっており、リガンド結合ポケットを塞いでしまっているため、リガンド結合に不利な構造になっています。今回明らかになった不活性型の VDR-LBD と重ねると屈曲点が一致することから、RXR $\alpha$ -LBD では構造解析のために結晶化した影響でヘリックス 11 が内側に折り畳まれたのではないかと推測されます。

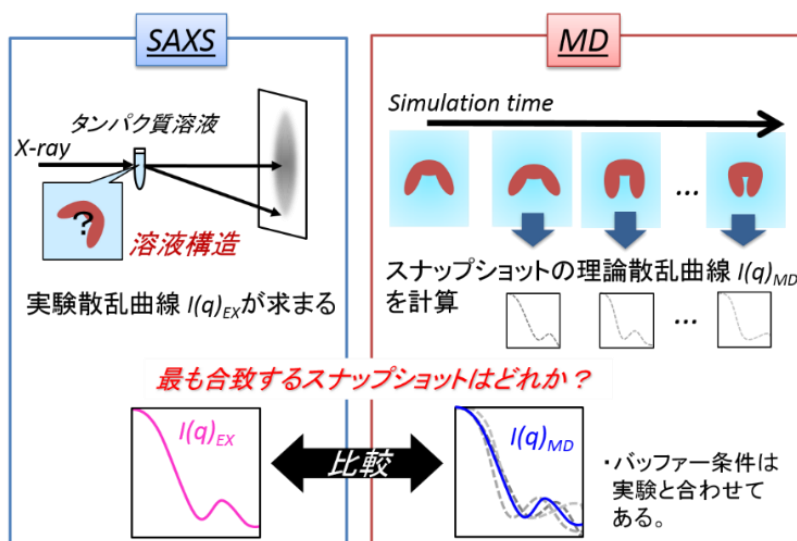
このように、本研究の成果は、これまで核内受容体に関して得られた様々な研究成果と密接に関係し、新たな構造学的知見をもたらしました。従って、今後の核内受容体をターゲットとする創薬研究に大きく貢献すると期待されます。

(i) *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 993–996. | doi:10.1038/nrd2199.

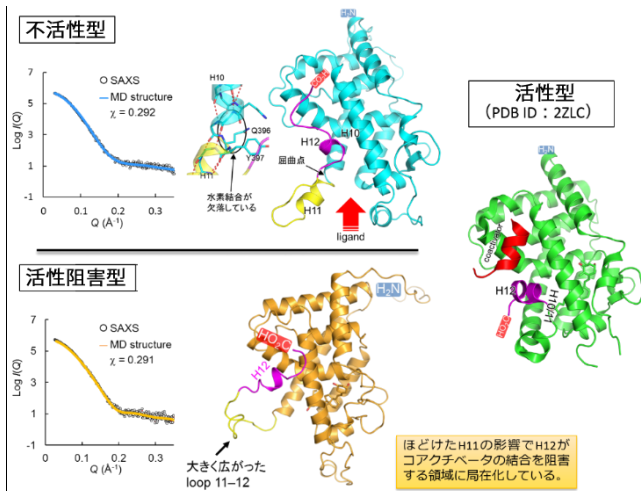
(ii) Bourguet, W. *et al.* (1995) *Nature*, **375**, 377–382. | doi:10.1038/375377a0.



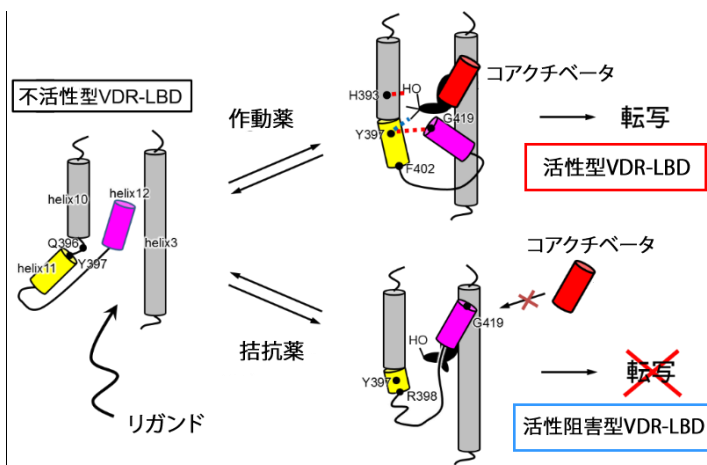
(図 1) VDR-LBD の結晶構造と問題点



(図 2) SAXS-MD 解析の概要



(図3) 本研究で明らかにしたVDR-LBDの不活性型と活性阻害型の構造。比較のため、既報の活性型の構造と並べている。



(図4) 本研究で提唱したリガンド結合メカニズム

### 【用語解説】

(注1) X線小角散乱 (Small-Angle X-ray Scattering=SAXS)

X線を試料物質に照射し、散乱されたX線のうち散乱角が小さい領域(〜5°)を計測することで物質の構造情報を得る手法。タンパク質を解析する場合は、基本的に溶液中に溶けている状態を計測するため、より生体に近い状態の構造情報を得られる。

(注2) 分子動力学計算 (Molecular Dynamics=MD)

原子や分子の動きをコンピュータシミュレーションによって解析する手法。タンパク質などの複雑な構造を持つ分子においても、原子分解能の構造情報を基に分子全体やアミノ酸残基、水分子の動きなどをコンピュータ上で再現することができる。

(注3) リガンド

タンパク質に結合する低分子の総称。作動薬や阻害薬もその一つと考えられる。

(注4) ヘリックス

タンパク質の構造中にあるパーツ形状の1種。タンパク質はアミノ酸の鎖が折り畳まれて立体構造を形成するが、鎖が折り畳まれる際に鎖の一部がバネのように右巻のらせん構造を形成したもの(図3参照)。図1や図4のように「筒」として模式化して表示することもある。

(注5) コアクチベータ

生理機能を活性化させるための補助因子(分子)。転写因子と結合して働き、その効率を上昇させる。

(注6) 相同性

アミノ酸配列や立体構造、機能が類似していること。

【お問い合わせ先】

<研究内容について>

(研究全般に関して)

昭和薬科大学 創薬科学系 医薬分子化学研究室

教授 山本 恵子

Tel: 042-721-1580

E-mail: yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp

(X線小角散乱に関して)

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所

准教授 清水 伸隆

Tel: 029-864-5595

E-mail: nobutaka.shimizu@kek.jp

(分子動力学計算に関して)

横浜市立大学 生命医科学研究科 生命情報科学研究室

教授 池口 満徳

Tel: 045-508-7232

E-mail: ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

<報道担当>

(高エネルギー加速器研究機構)

広報室長 岡田 小枝子

Tel: 029-879-6046

E-mail: press@kek.jp

(横浜市立大学)

研究企画・産学連携推進課

課長 渡邊 誠

Tel : 045-787-2510