

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院生研究
2010年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院	理学研究科	化学専攻
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・化学専攻・2年	元吉 沙也加	印
指導教員	所属・職名	氏名	
	理学部化学科・教授	常盤 広明	印
自然・人文・社会の別	自然 ・ 人文 ・ 社会	個人・共同の別	個人 ・ 共同 名
研究課題名	次世代のコンピュータ支援分子設計・結合カイネティクス融合型創薬システムの開発		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・化学専攻・2年	元吉 沙也加	
研究期間	2010	年度	
研究経費	500	千円	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

生体の生理作用誘導においては、生理活性物質およびタンパク質などが複合化して機能することによって、その活性が制御されている。本研究では、リガンド依存性の転写制御因子であるビタミン D 受容体と共役因子の複合体に対し、フラグメント分子軌道計算に基づく分子内相互作用解析を行った。同時に、生体分子間相互作用解析装置ピアコアを用いて、実験的研究と相補的に生体反応の理解をめざした。結果として、リガンド結合型受容体/共役因子複合体において、リガンドを起点とし、安定的なアミノ酸残基間相互作用がタンパク質接合面を介して連続的に形成されていることを見出すことができた。同時に、この相互作用の総和は、転写共役因子の結合および立体構造の異なるリガンドで、安定化が増幅されることが明らかとなった。今後は、生体の生理作用誘導の包括的な理解のため、DNAなども含めた分子系にも相互作用解析を展開する予定である。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[受容体/転写共役因子複合体] [分子内相互作用解析] [フラグメント分子軌道法]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

ビタミンD受容体 (Vitamin D Receptor: VDR) は、活性型ビタミンD₃[1 α ,25(OH)₂D₃]の結合を仲介して、共役因子と複合体を形成することによって、特定の生理作用を制御する。異なる立体構造をもつリガンドの結合は、受容体の転写共役因子結合性を変化させ、生理作用の強弱に違いを生じさせる。このため、リガンド結合型の受容体/共役因子複合体の分子特性を解明することは、リガンド依存的な受容体の生理作用誘導の本質的理解に重要である。

フラグメント分子軌道 (FMO) 計算では、分子をフラグメント (断片) 化し、個々のフラグメントとフラグメントペアに対して、環境静電場をふまえた分子軌道計算を実行し、得られたエネルギーを加算することで分子の全エネルギーを算出する。FMO 計算により、受容体などの生体高分子をリガンドなどの小分子と同等に、化学精度で統一的に取り扱うことが可能である。また、リガンドおよびアミノ酸残基を1フラグメントとすることで、フラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) からリガンド結合型受容体/共役因子複合体の分子内相互作用を定量的に評価することができる。

ピアコアは、生体分子相互作用解析装置のなかでも、リガンドと受容体および受容体と共役因子の直接的な結合をチップ上で観測し、分子が結合することによるチップの質量変化を計測することで、結合の有無だけでなく、特異性、強度、および速度を定量的に測定することができる。

本研究では、リガンド結合型の受容体/転写共役因子に対し (1) 理論的研究と (2) 実験的研究の両面から研究を展開し、相補的にリガンド依存的な VDR の共役因子結合性の分子論的メカニズムの解明を進めた。

(1) 理論的研究**1. 転写共役因子-受容体のタンパク質間相互作用解析**

本研究では、FMO-IFIE に基づく 1 α ,25(OH)₂D₃/VDR-LBD/DRIP205 複合体の網羅的な分子内相互作用解析により、リガンド依存的なタンパク質-タンパク質複合体形成において、アミノ酸残基間相互作用について、以下のように評価することができた。

我々は、これまでに、1 α ,25(OH)₂D₃ 結合型 VDR-LBD において、リガンドと空間的に離れた VDR の転写共役因子結合サイト (Activation Function domain: AF2) のあいだに、アミノ酸残基を介した特徴的な安定化相互作用 (Ligand-Ile271-Ile238-Val421) が形成されていることを見出している。本研究では、同相互作用が 1 α ,25(OH)₂D₃/VDR-LBD/DRIP205 複合体においても安定的なファンデルワールス相互作用エネルギーを示すことを明らかとした。また、VDR-AF2-DRIP205 間相互作用解析から、AF-2 に属する Val421 が、DRIP205 の有するロイシン群の Leu630 と有効なファンデルワールス相互作用を形成していることが示された。これにより、1 α ,25(OH)₂D₃/VDR-LBD/DRIP205 複合体において、リガンドを起点とした連続的な相互作用がタンパク質どうしの接合面を仲介して、受容体/共役因子内に形成されていることが理論的に示された。

リガンドと VDR-LBP アミノ酸残基間に形成される 36 のファンデルワールス相互作用エネルギーの総和を算出した結果、DRIP205 結合型および未結合型 1 α ,25(OH)₂D₃/VDR-LBD では、それぞれ -80.0kcal/mol および -75.3kcal/mol となり、結合型では -4.7kcal/mol 安定化することが示された。次いで、LBP アミノ酸残基と周辺 4.0Å 以内アミノ酸残基とのファンデルワールス相互作用エネルギーの総和を比較したところ、DRIP205 結合型および未結合型では、それぞれ -754.2kcal/mol および -719.6kcal/mol となり、結合型で -34.6kcal/mol 安定化していることが明らかとなった。これにより、1 α ,25(OH)₂D₃ 結合型 VDR-LBD の構成アミノ酸残基間では、DRIP205 結合による複合体形成において、VDR-LBD 全体で内部のファンデルワールス相互作用エネルギーが増強されることが示された。

VDR-LBD を構成する二次構造間の詳細な相互作用解析を行った結果、DRIP205 結合型および未結合型 1 α ,25(OH)₂D₃/VDR-LBD では、Phe422 とリガンドおよび Ile238 の相互作用エネルギーが、それぞれ -0.7 kcal/mol および -1.0 kcal/mol 安定化することが分かった。立体構造から考察すると、VDR-LBD のヘリックス 12 を構成する AF-2 アミノ酸残基 Phe422 は、DRIP205 結合型および未結合型で側鎖の立体構造を変化している。本研究では、この側鎖構造の変化に、Phe422 のファンデルワールス相互作用エネルギーの安定化に反映されていることを定量的に実証することができた。

研究成果の概要 つづき

以上より、リガンドを分子スイッチとした受容体/共役因子複合体形成における、タンパク質-タンパク質の協調的作用について、その内部にリガンドを起点としてアミノ酸残基を介した特徴的な相互作用のつながりが存在することを理論的に示すことができた。また、これまで定量的な評価が困難であった、共役因子結合による受容体 LBD の分子特性の変化について、これを構造変化に伴う分子内ファンデルワールス相互作用の増強として、定量的なエネルギーの実値をもって立証することに成功した。

これらの結果は、学術専門学会である第 62 回日本ビタミン学会 (2010 年 6 月, 学会発表 1) および PACIFICHEM 2010 (2010 年 12 月, 学会発表 2) にて発表した。また、本研究は、PACIFICHEM 2010 の First-Round Finalist for the Special Poster-Competition Session に選出された。

2. 20-epi 誘導体結合型 VDR-LBD の分子内相互作用解析

活性型ビタミン D₃[1,25(OH)₂D₃]の炭素 20 位をエピマー型に修飾した 20-epi 誘導体[1,25-20-epi-(OH)₂D₃]は、と比べて、VDR-LBD 結合能はほぼ同等である一方、細胞分化誘導作用は約 100 倍もの活性を示すことが報告されている。また、1,25-20-epi-(OH)₂D₃ が結合した VDR-LBD は、高い転写共役因子誘導性を示し、このことはリガンド結合依存的な VDR-LBD の分子特性と密接に関連していることが実験的に示唆されている。しかしながら、異なるリガンドに対して、リガンド結合に誘起される VDR-LBD の分子論的特性の違いを、実験のみから定量的に評価することは困難である。本研究では、1,25-20-epi-(OH)₂D₃ が結合した VDR-LBD に対し、FMO-IFIE に基づく分子内相互作用解析を行い、以下の点を明らかとした。

20-epi 誘導体結合型 VDR/LBD では、リガンドと VDR-LBP アミノ酸残基間に形成される 36 の相互作用エネルギーの総和が -125.0kcal/mol となり、1,25(OH)₂D₃ に比べて -2.7kcal/mol 安定化エネルギーが増加した。そのうちファンデルワールス相互作用エネルギーの成分は -79.2kcal/mol となり、1,25(OH)₂D₃ に比べて -4.0kcal/mol 安定化する結果が得られた。これにより、20-epi 誘導体結合型 VDR-LBD では、リガンドと LBP アミノ酸残基との相互作用がより安定化し、そのうちファンデルワールス相互作用エネルギーの寄与が大きいことが明らかとなった。

従来、リガンド結合に誘導される受容体の生理作用の高活性化は、LBP-リガンド間の相互作用解析に基づく結合能の増強を中心に議論されてきた。本研究は、VDR-LBD 全体に対し分子内相互作用変化を統一的に解析することによって、リガンドを基点とし AF2 構成アミノ酸残基にわたる空間を介した相互作用エネルギーの増幅が、リガンド結合型 VDR-LBD の分子特性を決定づけていることを、定量的なエネルギー変化として明示することに成功した。これらの成果は、日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月, 学会発表 3) に発表した。VDR の共役因子には、ヘテロダイマーを形成する RXR をはじめとした多様なタンパク質があり、それらのタンパク質高次複合体複合体が DNA に直接結合することによって転写を制御するため、こうした高次複合体すなわち、転写制御装置全体へと解析を展開する必要がある。VDR を介した転写制御装置全形の立体構造を理論的に構築した生体分子複合体内の相互作用コミュニケーションの包括的な解明が望まれる。

(2) 実験的研究

ビアコアを用いた実験においては、測定用チップ (CM5) に VDR-LBD を固定化し、チップ上の流路系にリガンドまたは共役因子を注入することによって、受容体とリガンドおよび共役因子の結合を計測する。本研究では、結合測定のための実験指針を得るために、以下の測定を行なった。3.2×10⁻⁷M の GST-tagged VDR-LBD (MW: 62kDa) が、CM5 に安定的に固定化されることを確認した。一方で、CM5 上の受容体へのリガンド結合については、リガンド 1,25(OH)₂D₃ 自体の分子量が小さいため、結合前後での VDR-LBD の質量変化を検出することは困難であることが分かった。次いで、VDR-LBD に対するリガンド依存的な DRIP205 の特異的結合性を評価するために、流路系に 1,25(OH)₂D₃ と DRIP205 (42kDa) が混在型・非混在型溶液を注入し、DRIP205 結合性変化の測定を試みた。しかしながら、いずれの場合にも CM5 の質量変化が認められず、VDR-LBD への DRIP205 結合が確認できなかった。今後は、CM5 に DRIP205 を固定化し、VDR-LBD を流路に入れるか、もしくは、測定に用いる溶液の溶媒の種類を変更するなど、実験系の再検討が必要である。新たな実験系で、1,25(OH)₂D₃ 依存的受容体-共役因子結合が確認され、十分な再現性が得られ後、立体構造の異なるリガンドおよび種類の異なる共役因子を用いたパターン解析が今後の課題である。

※ この (様式 2) に記入の成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書 (A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式) を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

②その他(学術発表等)

1. 元吉沙也加, 山岸賢司, 榎島誠, 山田幸子, 常盤広明, 日本ビタミン学会第62回大会, リガンドを介した $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ のアロステリックコミュニケーション, 2010年6月, 盛岡.
2. S. MOTOYOSHI, K. YAMAGISHI, S. YAMADA, H. TOKIWA, Theoretical Study of Agonist Ligands of the Vitamin D Receptor, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Honolulu, Hawaii, USA.
3. 元吉沙也加, 山岸賢司, 山田幸子, 榎島誠, 常盤広明, 日本薬学会第131年会, 作用選択的なビタミンDリガンドに関する理論的研究4, 2011年3月, 静岡.