

側鎖に嵩高い置換基を有する新規ビタミン D 受容体アンタゴニストの創製と作用メカニズムの解明

医薬分子化学研究室 加藤 晃

【緒言】

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 ($1,25D_3$) は、カルシウム代謝の調節を始めとして多彩な生理作用を有するホルモンである。近年、ビタミン D 受容体 (VDR) アンタゴニストは骨パジェット病などのビタミン D 機能亢進症の治療薬として期待されているだけでなく、ビタミン D の作用メカニズム解明にも有用であり基礎研究上のニーズも高まっている。しかし、VDR アンタゴニストの報告例は少なく、VDR との複合体構造の情報が乏しいため、複合体構造に基づいたアンタゴニスト設計が困難である。2002 年 Greene らの提案により、ステロイドホルモン受容体アンタゴニストは、活性発現に重要な役割を担う受容体のヘリックス 12 (H12) と立体反発する active antagonist と立体反発しない passive antagonist に分類されるようになった¹。active antagonist は自身の嵩高さによって H12 のフォールディングを阻止するので条件に関わりなくアンタゴニスト作用を示す。そこで本研究では、active antagonist の概念に基づいて強力な VDR アンタゴニストを設計・合成し、生物活性評価を行い、合成 VDR アンタゴニストの作用メカニズムを構造生物学的手法で解明し、創薬研究に貢献することを目的とした。

【結果・考察】

1. 側鎖末端に嵩高い置換基を有するビタミン D 誘導体の設計・合成と生物活性評価

側鎖末端に嵩高い置換基を有するビタミン D 誘導体 **1-5** を設計した (Fig. 1)。また、当研究室で見出した $22S$ -ブチル基がアンタゴニスト活性発現に有効であることに基づいて、 $22S$ -ブチル基を有する化合物 **1b-5b** も設計した²。A 環部は (-)-キナ酸を、CD 環部はビタミン D_2 を出発物質として合成し、A 環部と CD 環部のカップリングを行いビタミン D 骨格を構築した。その後、側鎖を構築し目的化合物 **1-5** の合成を完了した。VDR との結合親和性を評価したところ、合成化合物はすべて VDR の特異的リガンドであることが明らかになった。さらに、 $22S$ -ブチル基をもつ **1b-5b** は、**1a-5a** と比べて結合能が高い傾向があり、 $22S$ -ブチル基が VDR との親和性を高めることが示された。遺伝子転写活性を測定した結果、Cos7 細胞において、**1a**, **5b**, **6b** を除いたすべての化合物が遺伝子転写を誘導せず、 $1,25D_3$ の遺伝子転写能を濃度依存的に阻害した。また **2a**, **2b** は、HEK293 細胞においてもアンタゴニスト活性を示したことから、25 位にベンジル基をもつ **2a** 及び **2b** が強力な VDR アンタゴニストであることが明らかになった。

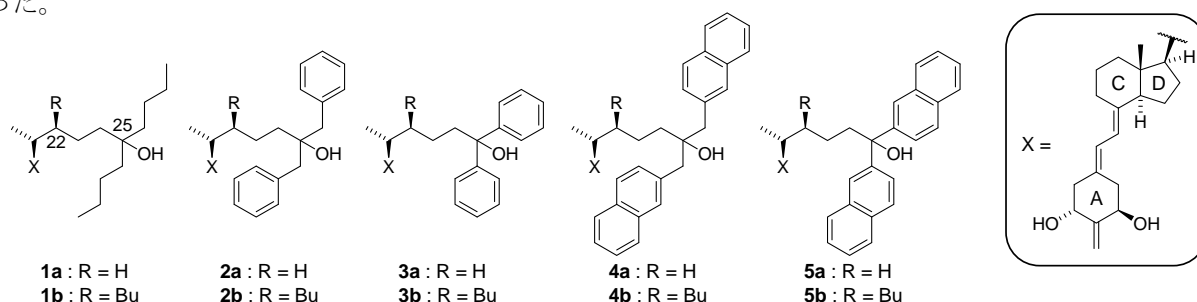


Fig. 1 嵩高い置換基をもつ目的化合物 **1-5**

2. 側鎖末端に嵩高い置換基を有する VDR アンタゴニストの作用メカニズム解明

強力なアンタゴニスト活性を示した **2a** 及び **2b** の作用メカニズムを明らかにするために、ラット VDR リガンド結合領域 (LBD) を用いて水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) 及び X 線結晶構造解析を行った。HDX-MS は溶液中のタンパク質の高次構造の動きを測定できる方法であり、リガンド-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用などの解析に用いられている。HDX-MS ではリガンド ($1,25D_3$, **2a**, **2b**) 存在下の VDR-LBD とリガ

ンドが存在しない apo VDR-LBD の重水素交換率の差 (ΔD) から、リガンド結合による VDR-LBD の構造変化を解析した (Table 1)。1,25D₃ は apo 体と比べて VDR-LBD 全体の重水素交換率を減少させ、安定化させた。2a は予想外なことに、ヘリックス 11 (H11)–H12 の安定化とヘリックス 6–7 (H6–7) の不安定化を引き起こした。VDR-LBD/2a 複合体の結晶構造解析にも成功し、H6–7 が構造変化し H12 がフォールディングする構造が得られた。以上の結果、2a は「H11–12 安定化アンタゴニスト」であることが明らかになった。H12 を安定化するアンタゴニストは他の核内受容体でも発見されておらず、核内受容体アンタゴニストを設計する際の新たな選択肢を提案することができた。一方、2b は H11-loop11–12 を不安定化し、H12 を安定化しなかった。このことから 2b は active antagonist であることが明らかになった。

Table 1 1,25D₃及び2a、2bのHDX-MSの結果

Region	Sequence	Structure	ΔD (%)		
			1,25D ₃	2a	2b
117-133	KDSLRLPKLSEEQQHIA	Hinge/H1	4	-2	-1
128-136	QQHIIALL	H1	1	1	-2
134-147	ILLDAHHTYDPTY	H1/Loop	-4	-3	4
134-150	ILLDAHHTYDPTYADF	H1/Loop/H2	-31	-29	-17
151-215	RDFRPPVRMDGSGSVTL	Loop	3	-5	-4
216-229	DLSPSLMPLHADL	Loop/H3	-52	-56	-48
230-240	VSYSIQKVIQVGF	H3	-22	-30	-24
245-255	PGFRDLTSSDDQ	H3/H4	3	4	2
251-275	TSSDQIVLLKSSAIEVIMLRNSQSF	H4/H5/S1	-33	-27	-47
288-299	DYKYDVTDVSKA	S3/H6	-13	5	-2
300-323	GHTLELIEPLIKFQVGLKLNLE	Loop/H7/Loop	-22	13	7
305-312	LIEPLIKF	H7	-29	8	1
305-321	LIEPLIKFQVGLKLNLE	H7/Loop	-42	-26	-41
316-329	KKLNLEHEEHLVLL	Loop/H8	-1	-12	-14
330-347	MAICIVSPDRPGVQDAKL	H8/Loop/H9	-1	-2	4
348-359	VEAIQDRLSNTL	H9	-2	-1	0
360-384	QTYIRCRHPGSHQLYAKMIQKLA	H9/Loop/H10	-22	-18	-12
375-381	LYAKMIQ	H10	6	16	16
376-400	YAKMIQKLADLRSLNEEHSKQYRSL	H10/H11	-27	-25	-23
385-405	DLRSLNEEHSKQYRSLSFQPE	H10/H11	-20	-27	7
403-413	QPENSMKLTPL	Loop/H12	-39	-34	6
408-415	MKLTPLVL	H12	-25	-38	0
416-423	EVFGNEIS	H12	-31	-57	-11

ΔD (%) 不安定化 ≤ 20 ≤ 10 n.s. ≥ -10 ≥ -20 ≥ -30 ≥ -40 < -40 安定化

3. 側鎖にフェノールを有する VDR アンタゴニストの作用メカニズム解明

嵩高い置換基としてフェノールを導入したビタミン D 誘導体は、側鎖構造に応じて様々な遺伝子転写活性を示した。これらの化合物の作用メカニズム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。その結果、VDR-LBD/アンタゴニスト複合体から、H11 が解けて一部のアミノ酸残基が観測されない結晶構造が得られた (Fig. 2)。この構造から、フェノールとヘリックス 10 上の His393 が立体反発し、H11 以降が大きくゆらいでいることが示唆された。H11 以降が大きくゆらいでいることから、本化合物は active antagonist であることが明らかになった。本研究により、VDR の active antagonist と VDR-LBD 複合体の結晶構造を初めて解析することに成功した。また、フェノールを有するアゴニスト、パーシャルアゴニストについても、結晶構造からそれぞれの化合物の作用メカニズムを明らかにすることができた。

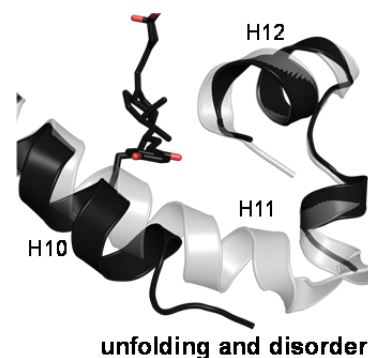


Fig. 2 H11 が解けた結晶構造

【結論】

VDR の強力な active antagonist を創製し、その作用メカニズムを HDX-MS 及び X 線結晶構造解析により明らかにした。また、H11–12 を安定化する核内受容体アンタゴニストすなわち「H11–12 安定化アンタゴニスト」を初めて見出した。さらに、H11 が解けた結晶構造解析に初めて成功した。本研究で得られた知見は、核内受容体アンタゴニストの設計の選択肢を増やし、核内受容体リガンドの創製研究に大きく貢献できると考えている。

【参考文献】

- 1) Shiau, A. K., Barstad, D., Radek, J. T., Meyers, M. J., Nettles, K. W., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., Agard, D. A., and Greene, G. L. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 359–364.
- 2) Sakamaki, Y., Inaba, Y., Yoshimoto, N., and Yamamoto, K. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5813–5826.

【本研究の誌上発表】

Kato A., Itoh T., Anami Y., Egawa D., Yamamoto K. Helix 12-stabilization antagonist of vitamin D receptor. *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27, 1750–1761.