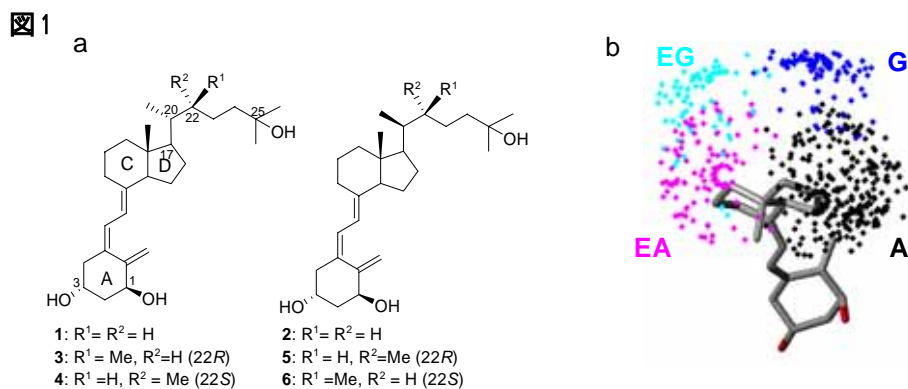


## 論文内容の要旨

論文題目 ビタミン D の構造活性相関とビタミン D 受容体リガンド結合領域の立体構造モデル

氏名 増野 弘幸

活性型ビタミンD, 1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (1), はカルシウムおよびリンの代謝調節の他, 免疫調節, 細胞の増殖抑制, 分化誘導などの多様な生理作用を行うホルモンであり, その作用は核内受容体(NR)であるビタミンD受容体(VDR)への結合を介して発現される. 選択的な作用スペクトルを持つビタミンD剤開発を目指し, 当研究室での研究が開始された当時, 1,000 を越える合成アナログが報告されていたが, それらの統括的構造活性相関研究は皆無であった.



著者らのグループは, ほとんどの活性アナログが1の側鎖修飾誘導体であること, 特に, 20位の立体異性体である 20-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (2)が1より高い活性を示すことに注目し, 側鎖のコンフォメーション解析に基づく構造活性理論を展開した. すなわち, 側鎖の系統的コンフォメーション解析に基づき, 1および2の側鎖 25-OH基が空間的に占める位置をドットマップで表し, それらが4つのグループに分けられることから, それら4つの領域にA,G,EAおよびEGと命名した(図1b). そして, 25-OH基が占める領域が1つに制限されるコンフォメーション制御アナログ4種(22-メチル化体の4つのジアステレオマー, 3~6)について検討した結果, 活性と側鎖の占める空間領域との間に関連が存在することが明らかになった. す

なわちVDR結合性はEA>A>G>EG, 分化誘導活性ではEA>A>EG>Gの順に活性が高くなる. 本アプローチを活性空間領域概念(active space region concept, ASRC)と提唱した.

本研究では(1)ASRC法を既知ビタミンDアナログに適用し, ASRCが全てのビタミンD側鎖アナログに広く適応できることを証明するとともに, 新たな空間領域(F)を見出した. 次いで(2)ASRCに基づいて新規高活性アナログを設計・合成し, 本アプローチの有用性を示した. さらに, (3)リガンド基盤の構造活性相関理論をVDRのリガンド認識の観点から検証するため, VDRのホモロジーモデルを構築し, レセプター構造基盤の構造活性相関の発現メカニズムについて検討した.

### ビタミンDの側鎖コンフォメーションと活性の関係

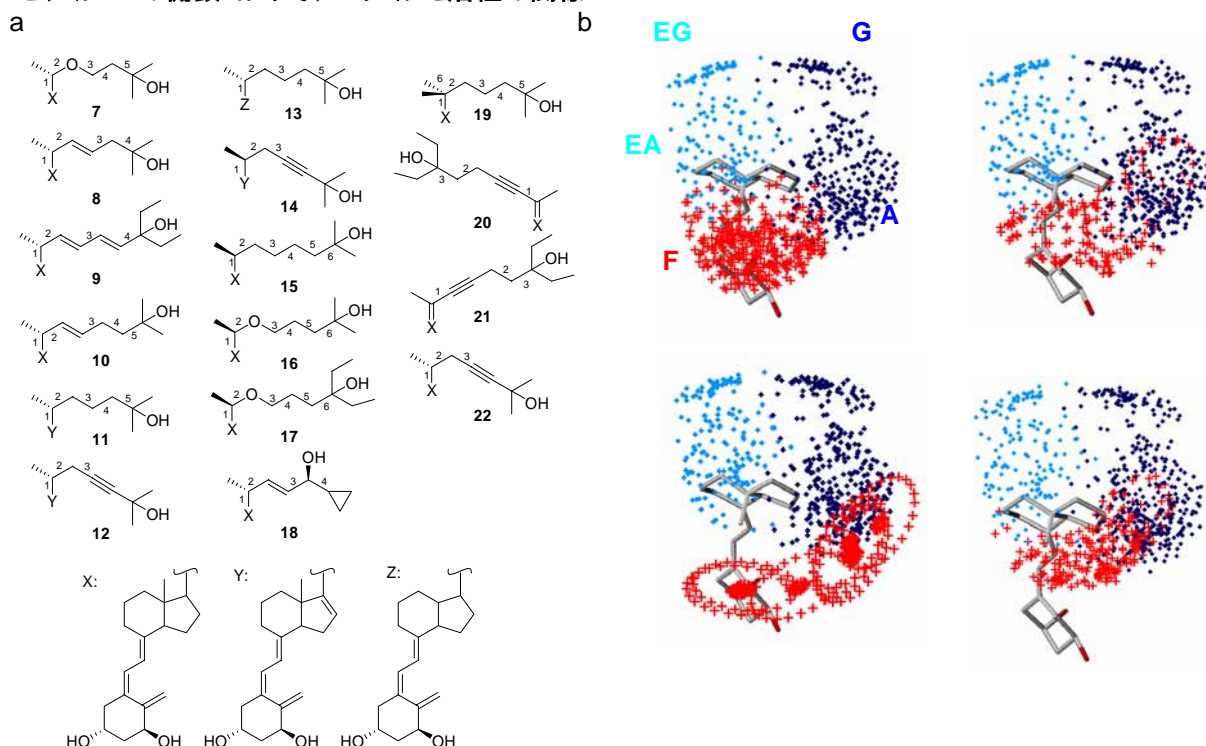


図 2. a. コンフォメーション解析を行ったアナログの構造. b. F 領域を占有する化合物のドットマップ 左上;OCT(7), 右上; 16-dehydro-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (8), 左下; 22,23-didehydro-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (9), 右下; MC903 (18). コンフォメーション解析を行った化合物を赤いドットで, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1) (青)と 20-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (2) (水色)で表した.

当時既知の活性型 D アナログの中から, 強い活性を持つアナログとそれらと構造が類似した化合物 16 種(図 2a)について側鎖のコンフォメーション解析を行った. 各化合物の最安定構造を初期構造とし, 側鎖の可動部分を 30 度ごとに回転させ, 発生させた存在可能な全てのコンフォマーを 25 位水酸基の位置で空間的にプロットし, ドットマップに表した. この結果以下の傾向が得られた: (i)ドットが図の左側にある化合物が右側にある化合物より活性が高い; (ii)ドットが前にある化合物が後ろにある化合物より活性が高い; (iii)一連の作用分離化合物はドットが A および EA 領域の前に存在する. この領域を新たに F 領域と命名した. 以上の結果から ASRC 法はほとんど全ての活性型 D 側鎖誘導体に適応できることが明らかとなった. ASRC による空間領域と活性との関係は以下のように要約できる: VDR 親和性, EA>F>A>G>EG; 転写活性, 分化誘導 EA>F>A>EG>G; ビタミン D 結合タンパク, A のみ; 骨塩溶出, EA>A=G>EG, F; 小腸 Ca 輸送, EA>A=G>>EG.

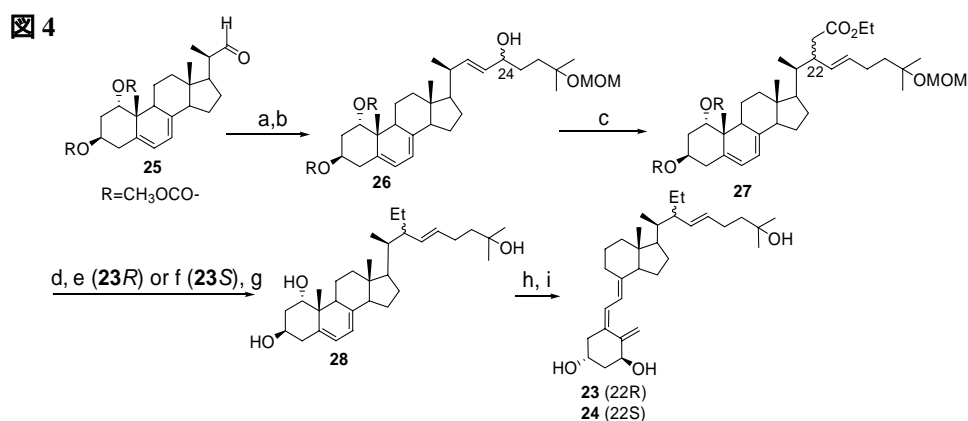
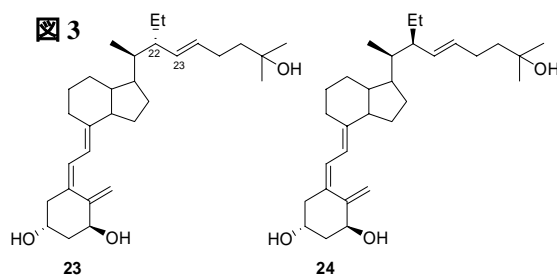
### 2. 活性空間領域コンセプト(ASRC)に基づく新規活性ビタミンDアナログの設計と合成

上記 ASRC から得られる構造活性相関を用いて, 作用分離アナログとなることが予測される新規アナログ 22R-ethyl-20-epi-23-dehydro-24,24-dihomo-

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(**23**)および対照として 22S体(**24**)を設計・合成した。**23**および**24**の25位水酸基は、それぞれEAおよびEG領域を占める。

ビタミン D 22位のアルキル基導入法として Claisen 転位を選択した。22-アルデヒド **25** を原料とし、側鎖を導入し Claisen 転位基質 **26** を得、オルト酢酸トリエチルを触媒量の酸の存在下加熱し 22-エトキシカルボニルメチル体 **27** を得た。エトキシカルボニル基を還元後、水酸基を除去し、22 エチル体とし、脱保護の後、光反応と続く熱異性化により目的物へと導いた。

**24** ヒドロキシ体 **26** は Mosher 法により立体構造を決定した。**27** は **26** のそれぞれの異性体から異なる単一の異性体が生成したことから Claisen 転位の6員環遷移状態を考慮し **27** の22位の立体配置を決定した。



(a) LDA, CH<sub>3</sub>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OMOM, THF, -78 °C; (b) NaBH<sub>4</sub>, CeCl<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MeOH, Pyridine or Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O (**22**, 54%); (c) CH<sub>3</sub>C(OEt)<sub>3</sub>, EtCOOH, toluene, reflux (**23**, 74%); (d) DIBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 °C; (e) (1) TsCl, Pyridine, 0 °C, (2) LAH, THF, reflux; (f) (1) I<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Imidazole, THF, (2) NaBH<sub>4</sub>, DMSO; (g) TsOH, 95% EtOH, reflux (**24R**, 43%; **24S** 14%); (h) hv (i) r.t., 2 weeks (**19**, 54%; **20**, 26%).

合成した **23** および **24** の VDR 親和性、転写活性、HL-60 細胞分化誘導活性、血清カルシウム上昇活性を1と比較検討した。その結果、22R体 **23** では VDR 親和性は1の 1/7 でやや弱いものの転写活性、分化誘導活性はそれぞれ1の 25 倍、98 倍と高い活性であった。カルシウム活性については1の 1.4 倍でありやや強い程度であった。これは EA 領域をとる化合物の性質によく一致している。22S体 **24** の VDR 親和性、転写活性、分化誘導活性はそれぞれ1の 1/500, 1/3, 0.7 倍といずれの活性も弱いという結果となった。これも EG 領域を占有する化合物の性質と一致する。以上のように ASRC は新しい機能を持つアナログを設計するために有効であることを示した。

### 3. ビタミン D 受容体(VDR)のホモロジーモデルの作成とドッキングモデル

次にビタミン D の構造活性相関を受容体のリガンド結合領域(LBD)の構造を基盤にした。1995 年に RXR の X 線結晶構造が報告されて以来、いくつかの NR-LBD の立体構造が明らかにされていたが、当時 VDR-LBD の立体構造は明らかではなかった。そこで私はホモロジーモデリングの手法により VDR-LBD の構造を構築することにした。

モデルは VDR にアミノ酸配列が最も類似している(Identity 27%) hRARγ/all-trans-retinoic acid の結晶構造(PDB entry: 2LBD)を鋳型とし、SYBYL を用いて構築し、分子力学法(tripos 力場)で構造最適化した。モデルを図 5a に示す。モデルの妥当性を評価した結果 Ramachandran plot で 99%の残基が許容領域に入る妥当な構造であった。

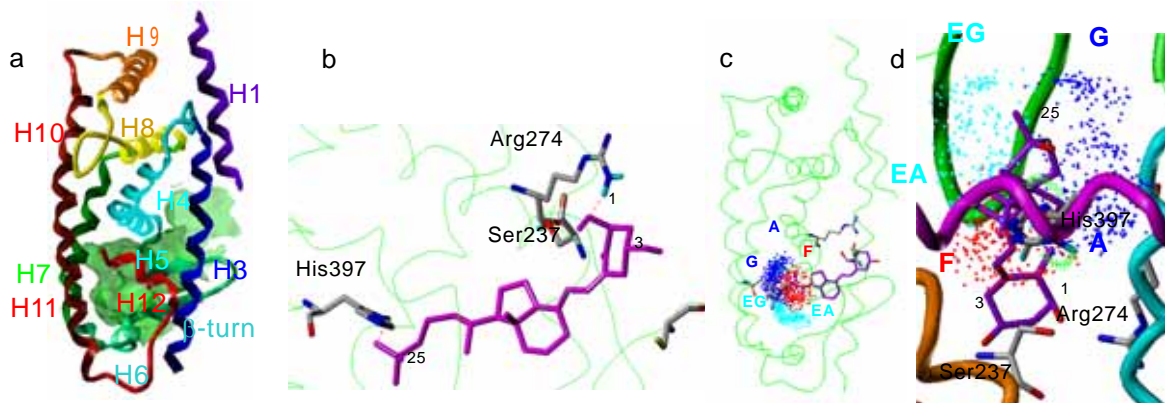


図5 a.構築したVDRモデルの構造.タンパクの骨格をリボンで,リガンド結合ポケットを緑色の表面で表した. b. ドッキングモデル. リガンドを紫色のスティック構造で表示した. タンパクはリガンドとの相互作用に重要な残基をスティック構造でその他の部分は骨格のみを緑色の線で表示した. c. ドッキングモデルにビタミンDの側鎖領域を重ねて示した. d. cの図をリガンド部分のみを拡大した.

続いてリガンドである  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1)のドッキングを検討した. まず既知のNR-LBD/リガンド複合体結晶構造(RAR, ER, PR, PPAR)のリガンド結合様式を比較検討した. NR-LBDには共通の位置にリガンド結合ポケット(LBP)が存在し,  $\beta$ -turn, ヘリックス (H) 3 およびH5 からなる部位とH11 の2か所でリガンドと水素結合を形成している.  $\beta$ -turn側ではリガンドはそれぞれの受容体に固有の定まった位置に収まっているが, H11 側はリガンドの位置に多様性がある. このことから多様な構造が収まるH11 側に側鎖が結合し, 2 位以外の構造修飾がほとんど知られていないA環が $\beta$ -turn側に結合していると考えた. CD環はステロイドホルモンの受容体への結合構造と同じ向きで容体と結合していると考えた.

リガンドの水酸基と水素結合を形成する可能性のある残基として Ser 237 (H3), Ser 275 (H5), Ser 278 (H5), Cys 288 ( $\beta$ -turn)および His 397 (H11)の5つを選択し, それらのアラニン変異体を作成し, リガンド親和性, 転写活性を測定した. その結果活性が著しく失われる His 397, Ser 237 をリガンドと水素結合している残基と特定した. Arg 274 は先天性II型くる病の原因変異として知られているので重要と考えた. 以上の結果から1位水酸基が Ser 237 と Arg 274, 25 位水酸基が His 397 と水素結合していると考えモデルを構築した. ドッキングモデルを図5bに示す. 25 位水酸基が水素結合している His397 はそのコンフォメーションを変化させ, 様々な側鎖修飾アナログをポケットに結合することを可能にしていると考えられる. このとき His397 は A, F, EA の3つの領域にのみ到達可能である(図5d, 緑色のドット). これはこれらの3つの領域をとるアナログが高い活性を示すことと一致している. そしてこの His397 残基とアナログの側鎖のコンフォメーションの違いが転写共役因子の選択性や標的遺伝子の選択性に影響していると考えられる.

私がVDR-LBDモデルを報告したのとほぼ同時にMorasらによりVDR-LBD deletion mutantと  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  複合体の結晶構造が報告された. 結晶構造では  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の1位, 25位の水酸基はモデルと同様にそれぞれArg 274, Ser 237, His 397 と水素結合している. この結果は構築したモデルと矛盾無くモデルの精度の高さを示している.

以上のように私は計算化学を応用し全てのビタミンD誘導体に応用できる新しい構造活性相関概念を確立した. またそれに基づき, 新規作用分離アナログの設計と合成に成功した. さらにVDR基盤の構造活性相関への展開をはかるため, VDR-LBDのホモロジーモデルを構築し,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  のドッキングモデルを作成した. それに基づき受容体によるそれぞれの空間領域の認識と, 異なる活性の発現メカニズムを提案した.