

# MD-SAXS 法によるビタミン D 受容体リガンド結合ドメインの不活性型および活性阻害型の溶液構造解析

清水伸隆

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

浴本 亨

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

穴見康昭

Texas Therapeutics Institute, The Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, The University of Texas Health Science Center at Houston 1881 East Road, Houston, TX 77054 U.S.A.

伊藤俊将

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

池口満徳

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

山本恵子

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

## 要旨

タンパク質を始めとする生体高分子を含む溶液試料を測定する X 線小角散乱 (SAXS) は、近年 BioSAXS と呼ばれ、*ab initio* モデリングによって溶液中の分子概形を獲得するために広く活用されている。この *ab initio* モデリングでは、SAXS と結晶構造解析などで得られた原子分解能構造を用いた剛体球近似や分子動力学計算 (MD) といった計算科学的手法を組み合わせたハイブリッドなアプローチ (相関構造解析) が行われている。MD-SAXS 法は、MD と SAXS を組み合わせた相関構造解析法であり、MD で計算された多数の構造アンサンブルから実験で得られた SAXS 曲線と一致度の高い理論 SAXS 曲線を与える原子分解能構造を選出し、解析することが可能である。本研究では、核内受容体であるビタミン D 受容体のリガンド結合ドメイン (VDR-LBD) に関して、これまで未定であったリガンド結合前の不活性型の構造状態 (アポ体) とアンタゴニスト (拮抗薬) が結合した活性阻害型 (アンタゴニスト結合体) の構造状態を明らかにし、それらの結果に基づいて VDR-LBD のリガンド結合メカニズムを新たに提唱している。本稿では、この VDR-LBD の解析結果に基づいて MD-SAXS 法の有効性についても解説する。

## 1. はじめに

X 線小角散乱 (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) は、ナノからマイクロスケールに渡る空間スケールにおいて、物質中の規則構造・階層構造や分子概形などの構造情報を獲得可能な手法である。その中でもタンパク質を始めとする生体高分子を含む溶液試料を測定する方法は、Biological SAXS, BioSAXS と呼ばれるなど、溶液中におけるこれらの分子の性状や概形を解析するために広く活用されている。元々古くからある手法で、国内でも Photon Factory が利用を開始した1983年頃には既に今で言うところの BioSAXS 実験が可能なビームライン (旧 BL-15A や BL-10C) が整備されており<sup>1,2)</sup>、以降活発なアクティビティが存在していた。しかし、現在のように構造解析の一手法として広く活用されるようになったのは、以下の2つ

のプログラムの公開がきっかけと思われる。第1に1995年にドイツ PETRAIII/EMBL の Svergun らが開発したプログラム CRY SOL<sup>3)</sup>である。Protein Data Bank (PDB) に登録された結晶構造解析などで得られたタンパク質のモデル構造を用いて理論的に散乱強度曲線を計算するこのプログラムは、仕様に関して現在でも議論はあるものの (ここでは詳細は割愛)、後述するように PDB 構造と SAXS 実験データの比較検討を容易にした。第2に1999年に同じく Svergun が開発したプログラム DAMMIN<sup>4)</sup>の公開である。このプログラムは、SAXS の一筆書きの散乱曲線を用いて *ab initio* に解析し、分子形状をダミー原子 (ビーズ) で表すことが可能である (ビーズモデルの構築)。この場合の *ab initio* 解析とは、散乱強度曲線から直接的に構造を計算するのではなく、散乱強度曲線を再現可能な構造モデルを推定する方法である。その結果、結晶化が困難

な分子においても少なくとも概形情報が得られるようになり、また、複合体を構成する分子単体の結晶構造はあっても複合体の結晶が得られない様な場合でも、BioSAXS 解析で複合体の概形が得られれば、その概形にパーツとなる分子の結晶構造を当てはめて、複合体の分子配置を推定することも可能である<sup>5-7)</sup>。既に DAMMIN 公開からおよそ 18 年が経過し、一時期は小角散乱の基礎理論を理解しないまま乱用されるなどの問題があったものの、2012 年には論文投稿レギュレーションもいったん定められ<sup>8)</sup> (詳細は、岐阜大の藤澤先生による本紙記事<sup>9)</sup>を参照された)、現在でも結晶構造解析を始めとしたオングストロームレベルの高分解能構造情報が得られる手法と連携して幅広く活用されており、多数の派生プログラムも作成されるなど<sup>10)</sup>、今なお発展を続けている。

一方で、上述の通り、忌憚無く申せば BioSAXS 解析は結晶構造などの高分解能構造があればこそ非常に生きてくる手法であると言えるのだが、結晶構造が無い場合やその結晶構造が不完全である場合、得られた結果を議論する際に様々な困難が生じてくる。例えば、あるタンパク質に関して相互作用相手との結合前後の構造変化を議論したいとする。結合前の結晶構造は得られているが結合後の結晶構造は無いため、BioSAXS で解析された結合後の分子概形と結合前の結晶構造を重ねて議論したいのだが、どうにもその構造変化を推定できない場合がある。さらに、結合前の状態の結晶構造と BioSAXS で得られた分子概形がそもそも違っているように見える場合、さらに話は難しくなる。実はこういった経験は結構あるのだが、このような問題を解決する一つのアイデアが、剛体球近似 (Rigid body Refinement) や分子動力学計算 (Molecular Dynamics, MD) といった計算科学を活用したアプローチである。上述したような複合体内の分子配置を概形に基づいて解析する際に、既知の原子分解能構造の剛体球近似モデルを焼なまし法 (Simulated Annealing) 等によって配置を最適化する方法が提唱されており、派生プログラムも含めて活発に活用されている<sup>10,11)</sup>。一方、MD と組み合わせた解析では、さらに高分解能な構造情報を引き出せる可能性がある。MD は結晶構造などの原子分解能構造を利用して、コンピュータシミュレーションによって特定の条件(溶液・力場)における一定時間内のタンパク質分子の動き(トラジェクトリ)を再現することで分子ダイナミクスを原子レベルで推定できる手法である。そこで、この MD 計算中に発生させた多数の派生構造(構造アンサンブル)の中から BioSAXS 実験で得られた散乱強度曲線を再現する理論散乱強度曲線を与える構造を選び出すことで、溶液中の構造状態を *ab initio* に推定する手法が提唱されている。この MD と SAXS を組み合わせた MD-SAXS 相関構造解析法に関して、最初にシステムティックに適用した解析は、MD プログラム CONCOORD<sup>12)</sup> と CRY SOL を利用した結果として上久保らが 2007 年に報告している<sup>13)</sup>。2009 年に

は荳口らが、溶液系と純溶媒系の全原子 MD シミュレーション (MARBLE, CHARMM22 力場) で得た構造アンサンブルから散乱強度曲線を計算する独自の MD-SAXS アルゴリズムを開発し、天然状態で明確な構造を持たない機能性タンパク質 (天然変性タンパク質) の構造状態推定を可能にしている<sup>14)</sup>。現在でも、このような研究例は少なく、日本の研究者が先駆的役割を果たしている解析法であると言っても過言では無い。このような背景を受け、今回我々は、核内受容体であるビタミン D 受容体リガンド結合ドメイン (Vitamin D Receptor-Ligand Binding Domain, VDR-LBD) の構造解析に MD-SAXS 法を適用し、その不活性状態、活性阻害剤との結合状態を原子分解能レベルの溶液構造として明らかにした<sup>15)</sup>。なお、以降では、MD-SAXS 法で得られた原子分解能構造を溶液構造と記述し、ビーズモデルの分子概形とは区別して表現する。

## 2. 研究背景

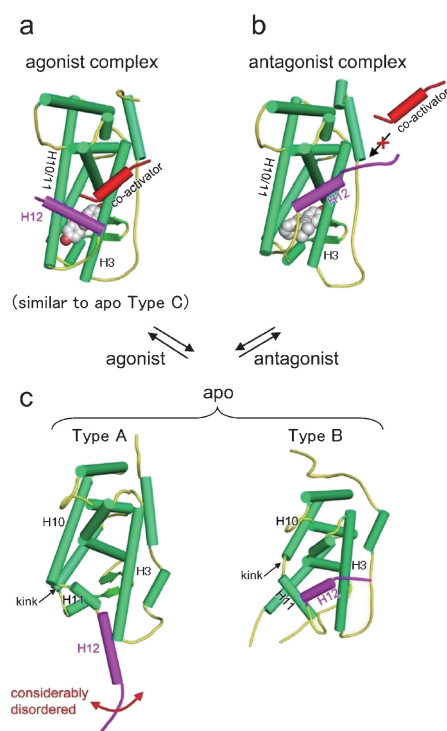
核内受容体は、細胞核内で特定の分子 (リガンド) と結合して、生物の発育、恒常性や新陳代謝などと関係のある特定の遺伝子の発現を制御するために DNA に特異的に結合するタンパク質 (転写因子) である<sup>16,17)</sup>。例えば、ヒトには女性ホルモンのエストロゲン受容体や男性ホルモンのアンドロゲン受容体を始めとして 48 種類存在することが知られている<sup>18)</sup>。そのため、「米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) が認可している医薬品の 13% は核内受容体を標的にしている」という報告もあるように<sup>19)</sup>、それらを標的とした創薬研究が活発に行われている<sup>20-22)</sup>。この核内受容体による転写制御反応は、以下の様に連続的に進行すると考えられている。第 1 にリガンドとの結合、第 2 にパートナーとなる受容体との結合 (2 量体化)、第 3 に補助因子 (コアクチベータ) との結合、そして DNA との結合へと進んでいく<sup>23)</sup>。核内受容体は、アミノ酸配列が高度に保存された DNA 結合ドメインと適度に保存されたリガンド結合ドメイン (LBD) で構築されているが、この転写活性はリガンド結合に伴う LBD の構造変化によって開始される<sup>24)</sup>。そこで、核内受容体のリガンド結合メカニズムを明らかにするために、X 線結晶構造解析や NMR 構造解析が多数行われてきた。

核内受容体のリガンド結合メカニズムを理解するためには、リガンド結合前の不活性型 (アポ体)、リガンドの中でも結合して機能を強める働きをするアゴニスト (作動薬) が結合した活性型 (アゴニスト結合体)、結合はするが機能を阻害するアンタゴニスト (拮抗薬) が結合した活性阻害型 (アンタゴニスト結合体) の 3 つの構造状態を明らかにする必要がある。これまでの結晶構造解析を始めとする構造学的な解析の結果、LBD の Helix 12 が反応中に構造変化することが示されている。アゴニストが核内受容体

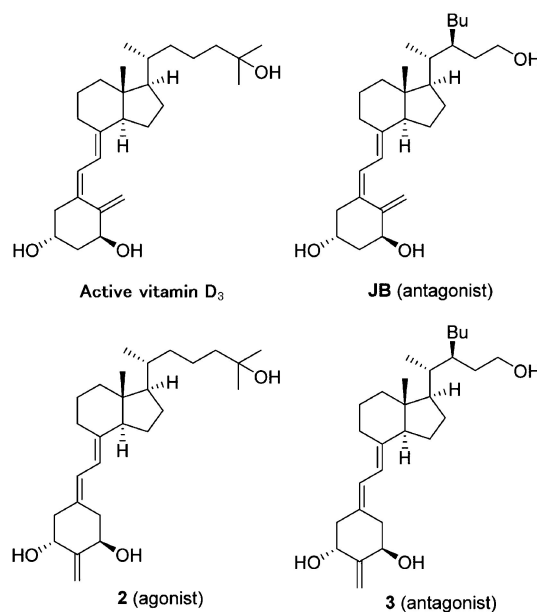
に結合すると、Helix 10と11の間の Loop 構造が Helix 化して連続した1本の Helix を形成するようになり (Fig. 1a), その結果 Helix 12は折りたたまれ、Activation Function 2 surface (AF-2 表面) と呼ばれる表面形状を構築する。その AF-2 表面にコアクチベータが結合した後、LBD は DNA に結合して標的遺伝子が転写される。アンタゴニストの結合では、アンタゴニストの構造に基づいていくつかの仮説が議論されている。アンタゴニストが結合すると、Helix 12の構造が不安定化し、Helix 12はアゴニスト結合体とは異なる位置に局在化して AF-2 表面を形成せず、結果としてコアクチベータが結合できないというメカニズムである (Fig. 1b)<sup>25-29</sup>。核内受容体のアポ体の結晶構造はいくつか報告されているが、Helix 12の構造状態を基に3つの形態 A, B, C に分類することができる。タイプ A は Helix 12が伸びた構造である (Fig. 1c)<sup>30</sup>。タイプ B は Helix 12が折り畳んだ構造で、これはアンタゴニスト結合体の結晶構造に似ている (Fig. 1c)<sup>31-33</sup>。そしてタイプ C は同じく Helix 12が折り畳んでいる構造だが、アゴニスト結合体によく似た構造である<sup>34,35</sup>。面白いことに、タイプ A と B に関しては、Helix 10と11の間にねじ

れがあることが共通の特徴で、その影響で Helix 3 側に曲がった Helix 11はリガンド結合部位に蓋をするような構造になっている。加えて、Helix 11の終わりから Helix 12までの C 末端の構造は結晶構造ごとに異なるなど多様性が見られる<sup>36-41</sup>。まとめると、核内受容体の転写活性は Helix 12の局所的な振る舞いによって制御されるとし、このようなメカニズムはマウス (リガンド) が檻 (リガンド結合部位) に入ると蓋 (Helix 12) が閉じる様子からマウスストラップモデルとして提唱されている<sup>42</sup>。

VDR は核内受容体ファミリーに属しており、ホルモン (生体内の特定の機能を調節するための情報伝達を担う物質) である活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub>) (Fig. 2) との結合によって、カルシウム代謝調節、細胞の分化誘導・増殖抑制、免疫調節などの生理機能に関与している<sup>43</sup>。VDR-LBD とアゴニストとの結合体に関しては100例近い結晶構造が報告されており<sup>44</sup>、それらは他の核内受容体の LBD のアゴニスト結合体と本質的に一致している。天然の活性型ビタミン D<sub>3</sub> と VDR-LBD の結合体、すなわちアゴニスト結合体に関しては SAXS による解析結果もあり、結晶構造から計算された理論散乱曲線と実験散乱曲線が一致していることから、結晶構造と溶液構造がおよそ一致していると報告されている<sup>45</sup>。一方、VDR-LBD のアポ体の結晶構造は報告が無く、おそらく Helix 10~12で構成される不規則な C 末端領域の構造に原因があると推測される。これらの Helix の構造は、他の核内受容体のアポ体の構造におけるタイプ A~C の間でも上述のように明確に異なっており、結晶化に対して不安定な構造領域であることを示している。また、NMR と水素重水素置換質量分析法 (HDX-MS) による



**Fig. 1** (Color online) Several conformations of nuclear receptors<sup>15</sup>. (a) The agonist complex form and (b) the antagonist complex form of the human estrogen receptor alpha ligand-binding domain (hER $\alpha$ -LBD) (PDB code 3ERD and 3ERT). (c) Apo forms of the human retinoid-X receptor alpha ligand-binding domain (RXR $\alpha$ -LBD, PDB code 1LBD, Type A) and the human testicular receptor 4 ligand-binding domain (TR4-LBD, PDB code 3P0U, Type B). These are classified into two types, A and B, respectively. Copyright (2016) American Chemical Society.



**Fig. 2** Active vitamin D<sub>3</sub> (hormone) and synthetic analogues<sup>15</sup>. Copyright (2016) American Chemical Society.



解析結果でも, Helix 12 周辺の構造がアポ体で不規則化している, アゴニストの結合に伴い規則構造に変化することが示唆されているが, 原子分解能レベルの構造情報は得られていない<sup>46,47</sup>). アンタゴニスト結合体に関しては, アゴニスト結合体と比べると非常に少ない 4 例の結晶構造が報告されている<sup>48-51</sup>). しかしながら, それらの Helix 12 を含む主鎖構造はアゴニスト結合体とほぼ一致しており, アンタゴニストの作用メカニズムを説明することができない結果となっている。一方で NMR の解析結果では, Helix 11 と 12 を含む C 末端がアンタゴニスト結合体ではアポ体同様に不規則化することが示されている<sup>46</sup>). 以上の状況から, VDR-LBD の転写活性の制御機構を理解するためには, アポ体とアンタゴニスト結合体の構造を明らかにすることが重要な課題であった。特に, Helix 12 周辺構造の変化が鍵であり, メカニズムの理解はもちろん, 立体構造をベースとしたリガンドの分子設計 (Structure-Based Drug Design, SBDD) を可能とするために, これらの構造変化に係わる正確な構造情報を得ることが必須であった。

### 3. VDR-LBD のアポ体とアンタゴニスト結合体の BioSAXS 測定解析

これまでの経緯から, 結晶構造解析で Helix 12 の周辺構造の挙動を理解するには限界があると考え, VDR-LBD のアポ体とアンタゴニスト結合体の構造を SAXS にて測定した。試料としてラット由来の VDR-LBD を使用し, その一次構造 (アミノ酸配列) は結晶構造解析で使用されているものと全く同じである。比較のために使用したアゴニスト結合体の結晶構造は, 我々が報告したアゴニスト **2** との複合体構造である (Fig. 2)<sup>15</sup>). アンタゴニスト結合体の解析のために, 安定性や合成のしやすさから図で示したアンタゴニスト **3** を選択している (Fig. 2)。比較のために使用したアンタゴニスト結合体の結晶構造はアンタゴニスト **JB** を使用しているが (Fig. 2)<sup>48</sup>), 両者の構造はよく似ており, 22 位に S 配置のプチル基をもつことが特徴である。従って, **3** は **JB** の代替分子とみなすことができる。アポ体とアンタゴニスト結合体の SAXS 実験を行い, それぞれ得られた実験散乱曲線と結晶構造から CRY SOL を用いて計算した理論散乱曲線を CRY SOL 上で比較した。アポ体に関しては結晶構造が無いため, アゴニスト結合体の結晶構造と比較した。Fig. 3a, 3c において, 実験曲線と理論曲線をそれぞれ重ねているが, 一見して特に  $q \sim 0.15 \text{ \AA}^{-1}$  以降の領域で一致していないことが分かり, 実際, CRY SOL が出力する両者の一致度を表す  $\chi^2$  値は, アポ体に関しては 0.89, アンタゴニスト結合体では 0.69 と示されていた。さらに, これまで公表されている VDR-LBD の全ての結晶構造に対して CRY SOL を用いて網羅的に比較を行ったところ, アポ体に関しては 0.54~0.87, アンタゴ

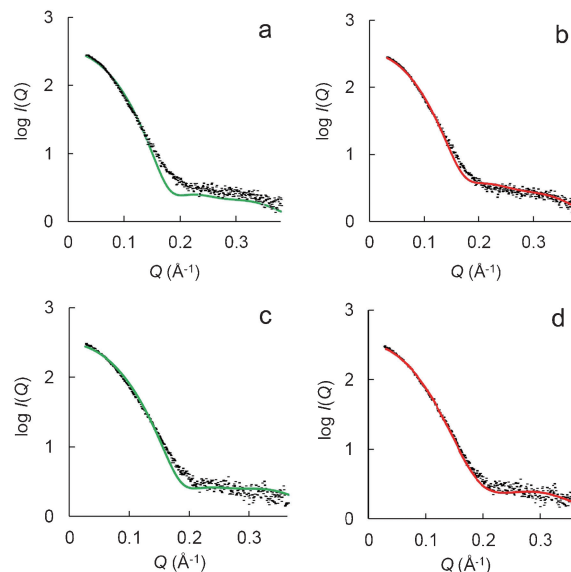


Fig. 3 (Color online) SAXS experimental curves of (a, b) apo and (c, d) antagonist **3** complex of VDR-LBD<sup>15</sup>). The experimental curves extrapolated to zero concentration are shown with black dots. The experimental curve of apo is compared with the theoretical curves calculated from the crystal structures of (a) agonist **2** complex (green,  $\chi^2=0.89$ , PDB code 5B41) and (b) ligand complex (red,  $\chi^2=0.54$ , PDB code 3WTQ). The experimental curve of antagonist **3** complex is also compared with the theoretical curves calculated from the crystal structures of (c) antagonist **JB** complex (green,  $\chi^2=0.69$ , PDB code 2ZX M) and (d) ligand complex (red,  $\chi^2=0.48$ , PDB code 3AUQ). All the theoretical curves are superimposed to each experimental data by CRY SOL. Copyright (2016) American Chemical Society.

ニスト結合体に関しては 0.48~0.76 となっていた。これらの中で, アポ体では 0.54, アンタゴニスト結合体では 0.48 と最も小さくなった結晶構造からの理論曲線と実験曲線を図で比較しているが (Fig. 3b, 3d), やはり  $q \sim 0.15 \text{ \AA}^{-1}$  以降の領域に違いがあるように見える。以上の結果から, 溶液中におけるアポ体とアンタゴニスト結合体の構造は, これまで報告されたリガンドとの結合状態にある結晶構造のどれとも一致していないと示唆された。

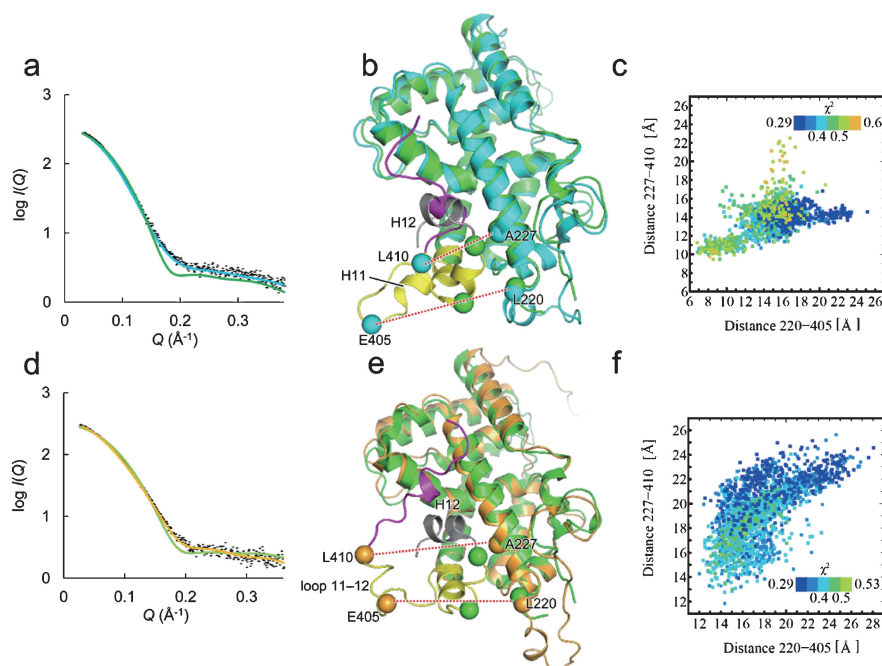
### 4. MD-SAXS 解析

この結果を受けて, VDR-LBD のアポ体とアンタゴニスト結合体に関して原子分解能の構造情報を得るために, 結晶構造を用いた MD シミュレーションを行った。アポ体に関しては, アンタゴニスト **JB** が結合した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た。アンタゴニスト結合体に関しては, 上述の通りアンタゴニスト **JB** が結合した結晶構造の **JB** を **3** に置き換えた構造を基に初期構造を構築した。MD 計算自体に SAXS 実験データからの束縛条件などは一切含まれていないが, 計算条件に試料の溶液条件は反映させ, 100 ナノ秒間の MD 計算で 50 ピコ秒毎に構造を出力させて 2,000 個

からなる構造アンサンブルを取得した。そのアンサンブル中の各構造に対してCRY SOLにて理論曲線を求め実験曲線との一致度を評価している。その結果、アポ体では $\chi^2$ 値が0.29まで下がった構造(アポMD構造)が得られた。Fig. 4aではアポ体の実験曲線、先のFig. 3aで比較したアゴニスト結合体の理論曲線、そして $\chi^2$ 値が0.29となるアポMD構造からの理論曲線を比較している。アゴニスト結合体とは異なり、 $q \sim 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ 以降の領域もアポMD構造の理論曲線は実験曲線と良く一致していることが分かる。Fig. 4bにはアポMD構造とアゴニスト結合体の結晶構造を重ねている。アポMD構造は基本的にHelix 10までは結晶構造とおよそ一致しているにも関わらず、Helix 11の終わりからHelix 12までの部分が異なっていた。Helix 12は一部ほどけていて、リガンド結合部位付近に位置して揺らいでいると推測されたが、Helix 11に関しては、蝶番のある折畳みドアのように中央から外側に折れ曲がって広がり、リガンド結合部位への入口を大きく開いているような構造になっていると示された。上述したように、アゴニストが結合するとHelix 12はリガンド結合部位への扉を閉めるような構造になると示されているため(Fig. 1a)、その点からもこのアポ体の構造が合理的であると直感的に分

かる。そこで、このリガンド結合部位の開き具合と $\chi^2$ 値との関係を検証するため、リガンド結合部位の入口側と奥側の開き具合に対して $\chi^2$ 値がどのように変化するか解析した。リガンド結合部位の入口側に当たるアミノ酸残基を220番目のロイシン(L220)、405番目のグルタミン酸(E405)、奥側に当たる残基を227番目のアラニン(A227)、410番目のロイシン(L410)と定め、L220-E405、A227-L410の $C_\alpha$ 原子間距離をそれぞれの開き具合の指標とした。Fig. 4cではそれぞれを横軸と縦軸にして、アンサンブル中の各構造の $\chi^2$ 値を色で示しながらプロットしたものであるが、入口側(L220-E405)と奥側(A227-L410)の距離は、それぞれ7-25 Å、9-23 Åの範囲で変動していた。これは、アゴニスト結合体の結晶構造での距離、10.8、5.5 Åよりも広がっていることを示している。さらに、入口側が開くほど $\chi^2$ 値が小さくなり、逆に奥側が広がった場合や両方とも閉じているような場合は、 $\chi^2$ 値が高くなる傾向が示された。従って、アポ体の溶液構造は既存のリガンド結合体の結晶構造とは異なり、リガンド結合部位の入口を開くようにHelix 11が途中から折れ曲がって広がった構造になっていると考えられる。

アンタゴニスト結合体についても同様にMDによる解



**Fig. 4** (Color online) Relationship between structure and  $\chi^2$  value<sup>15)</sup>. (a, d) SAXS experimental curves of (a) apo and (d) antagonist **3** complex of VDR-LBD are shown with black dots. Theoretical curves of ApoMD-structure (cyan line,  $\chi^2=0.29$ ), agonist **2** complex (green line,  $\chi^2=0.89$ ), AntagonistMD-structure (orange line,  $\chi^2=0.29$ ), and antagonist **JB** complex (yellow-green line,  $\chi^2=0.69$ ) calculated using CRY SOL are fitted to experimental curves, respectively. (b, e) ApoMD-structure (cyan) and AntagonistMD-structure (orange) are superimposed to (b) agonist **2** complex (green) and (e) antagonist **JB** complex (yellow-green), respectively. Helix 11 and loop 11-12 are shown in yellow, and helix 12 of MD and crystal structures are indicated by magenta and gray, respectively. (c, f) Distribution of  $\chi^2$  values for snapshots of (c) ApoMD structure ensemble and (f) AntagonistMD structure ensemble against the experimental profile of (c) apo or (f) antagonist **3** complex on a distance map. A point represents one structure in 2000 structure ensemble, and colors show the corresponding  $\chi^2$  value calculated by CRY SOL. Copyright (2016) American Chemical Society.

析を行い、最終的に  $\chi^2$  値が0.29となる構造（アンタゴニスト MD 構造）を得た。Fig. 4d に示すように、アンタゴニスト MD 構造から計算された理論曲線はアンタゴニスト結合体の結晶構造から計算された理論曲線と比べて、実験曲線と全  $q$  領域で良く一致していることが分かる。実際の構造では (Fig. 4e), アンタゴニスト MD 構造は Helix 11 と 12 の間のループ (Loop11-12) が広がった構造になっており、Helix 12 自体もその一部 (412 番目のプロリン (P412), 413 番目のロイシン (L413)) がほどけてしまっていると分かる。さらに、残った Helix 12 の一部はコアクチベータの結合部位 (AF-2 表面) 付近に局在化しており、結果として AF-2 表面の形成を阻害していた。そこで Loop11-12 と  $\chi^2$  値との関係性を検証するために、アポ体の時と同じ要領でリガンド結合部位に対する入口の開き具合を解析した。Fig. 4f はアポ体同様にプロットした結果であるが、構造アンサンブルに対して入口側 (L220-E405) と奥側 (A227-L410) では、それぞれ 12-28 Å, 12-26 Å といった距離の間で変動しており、これはアンタゴニスト結合体の結晶構造 (11.1, 5.5 Å) と比較するとかなり広がっていた。またアポ MD 構造と比較しても、入口側だけで無く奥側までリガンド結合部位が大きく広がった構造になると  $\chi^2$  値が下がる傾向が示されている。従って、アンタゴニスト結合体の溶液構造は、Loop11-12 から Helix 12 の一部までほどけて大きく広がっており、Helix 12 の残りの部分がコアクチベータの結合部位に局在化するような形状であると示唆された。

## 5. 解析手順・結果の妥当性の検証

上述したように、MD 計算には SAXS 実験データからの束縛は全く適用されていないが、そもそも一筆書きの散乱曲線にどれほどの構造的な特徴が反映されているのか？つまり「どの程度の構造の違いがあれば最終的に  $\chi^2$  値に反映されるのか？」という MD-SAXS 解析自体の妥当性に対して疑問を持つ方も居るように思われる。従って、我々の行った MD-SAXS 解析の手順において、そもそも「 $\chi^2$  値が低い = 溶液状態の構造再現性が高い」という結論を導くことが妥当なのか検証を行う必要がある。そこで、得られた  $\chi^2$  値と構造的な特徴との関係の正当性を示すために、異なる構造アンサンブルと実験データとの親和性を検証する目的で、以下のような交差検証を行った。まず、アンタゴニスト結合体の MD 計算で出力された構造アンサンブルからアンタゴニスト分子を取り除き、アポ体の実験データと CRY SOL にて比較したが、アポ体の実験データに近い構造は含まれていなかった。Fig. 5a では、先ほどと同様にリガンド結合部位の入口側 (L220-E405) と奥側 (A227-L410) の距離に対する  $\chi^2$  値の分布を示しているが、先のアポ体の解析結果と比べて値が全体的に上昇している。69%の  $\chi^2$  値が0.45より大きくなり、最も下

た値でも0.34であった。また、リガンド結合部位が開いた構造になっていても、こちらでは  $\chi^2$  値は下がっておらず、これは Helix 12 周辺の振る舞いが先のアポ MD 構造とは異なっていることを示している。この交差検証に使用している構造とアポ MD 構造の違いは、Loop11-12 の動きの違いで説明出来る。アポ MD 構造では、Helix 11 が蝶番のある折畳みドアのように途中から折れ曲がってリガンド結合部位の入口を開けている。逆に今回の交差検証では、対照的に Loop11-12 の動きによってリガンド結合部位の入口が開いている構造がほとんどであった。この構造の違いは Helix 12 の位置の違いによって生み出されている。アポ MD 構造では、Helix 12 の N 末端側は Helix 3 の中央付近に位置しており、Loop11-12 の自由度を抑制している。交差検証では、Helix 12 の C 末端側は、Helix 3 の末端に位置していて、Loop11-12 は緩んだ構造になっていた。これらの動きは、Fig. 4f と Fig. 5a で示されるリガンド結合部位の奥側 (A227-L410) の距離の分布の違いとして観測されている。以上の結果から、アポ MD 構造の Helix 11 と Helix 12 の位置・構造が SAXS 実験曲線を再現するのに妥当な状態にあると考えられる。最小値である  $\chi^2 = 0.34$  となった構造とアポ MD 構造から計算した理論曲線を比較すると (Fig. 5b),  $q = 0.15 \sim 0.3 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲が

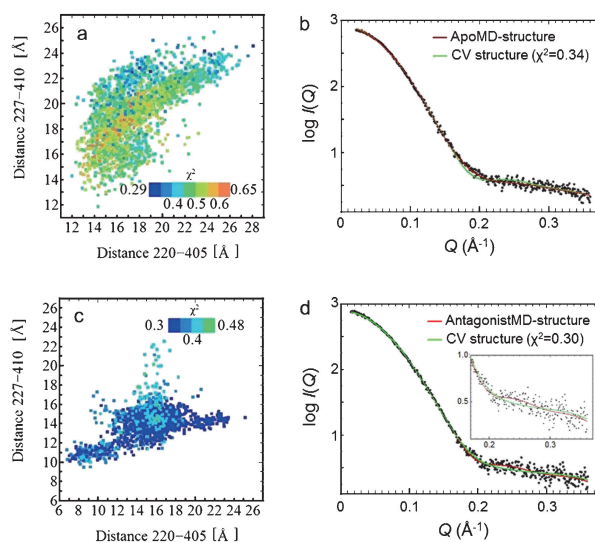


Fig. 5 (Color online) Results of the cross-validation (CV) analysis for apo and antagonist 3 complex are shown in (a, b) and (c, d), respectively<sup>15)</sup>. (a, c) Distribution of  $\chi^2$  value against (a) apo or (c) antagonist 3 complex shows on the distance map. A point represents one structure in 2000 structure ensemble prepared for each CV analysis. Colors show corresponding  $\chi^2$  value calculated by CRY SOL. (b) Experimental curve of apo (black dots) is fitted to theoretical curves calculated from ApoMD-structure (red line,  $\chi^2=0.29$ ) and the CV structure with  $\chi^2=0.34$  (green line). (d) Experimental curve of antagonist 3 complex (black dots) is also fitted to theoretical curves calculated from AntagonistMD-structure (red line,  $\chi^2=0.29$ ) and the CV structure with  $\chi^2=0.30$  (green line). Copyright (2016) American Chemical Society.



主に異なっているため、それは Helix 11や Helix 12 に関する違いを反映していると推測される。

逆にアンタゴニスト結合体の交差検証に関しては、アポ体の MD 計算で出力された構造アンサンブルをそのまま利用してアンタゴニスト無しで行ったが、 $\chi^2$  値は先のアンタゴニスト結合体の解析結果より全体的にむしろ低くなっていた。Fig. 5c には、これまで同様にリガンド結合部位の入口側 (L220-E405) と奥側 (A227-L410) の距離に対する  $\chi^2$  値の分布を示しているが、値の57%は0.35以下で、最も小さい値は0.30であった。そこで、この最小値  $\chi^2 = 0.30$  を示した構造とアンタゴニスト MD 構造を比較した (Fig. 5d)。この  $\chi^2 = 0.30$  の構造は、アンタゴニスト MD 構造とは  $q \sim 0.16 \text{ \AA}^{-1}$  付近から広角側の散乱曲線が異なっており、特に  $q \sim 0.24 \text{ \AA}^{-1}$  付近のピークが無いことが示された。実際、実験曲線との一致度はアンタゴニスト MD 構造からの理論曲線の方が高いため、その領域での違いは  $\chi^2$  値に少なからず影響を与えていると推測される。しかしながら、この交差検証に使用している構造アンサンブルにはアンタゴニストが結合していないため、いかに  $\chi^2$  値が低くてもアンタゴニストが結合可能な構造状態にあるのか検証が必要である。そこで構造中に仮想的にアンタゴニストを挿入してみた。その方法としては、アンタゴニスト MD 構造と交差検証中の構造アンサンブルを、両者の構造の差がほぼ見られない125~395番目のアミノ酸残基の RMSD が最小になる様にそれぞれ重ねて、アンタゴニストはその位置で構造に挿入されたとみなした。その結果、仮想的に挿入したアンタゴニストは、VDR-LBD の活性のために主要な役割を果たす幾つかの重要なアミノ酸残基と干渉していた。従って、アポ体の MD 計算で出力された構造アンサンブルにはアンタゴニストが安定に結合することは難しく、それらの構造がアンタゴニスト結合体の MD 計算において現れることは無いと言える。このように、「単に SAXS 実験曲線を再現する構造を導出する」という方針で考えれば、この交差検証で最も  $\chi^2$  値が下がった  $\chi^2 = 0.30$  の構造を選択しない理由はない。しかし、先に行った MD-SAXS 解析のアプローチでは、この構造はアンサンブル中に存在しえないため、決して選択されることは無い。以上のように、SAXS 実験曲線と MD によるダブルチェックが重要で、我々の解析の妥当性がこの交差検証で示されたと考える。

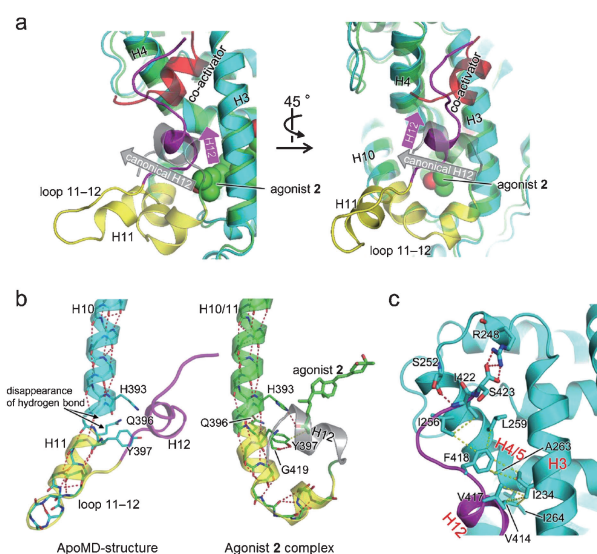
一方、この交差検証の結果、アポ体とアンタゴニスト結合体は、それぞれリガンド結合部位周辺の動きが明らかに異なると示された。また、アポ体における Helix 11 が外側に向かって曲がっている構造は、SAXS 実験曲線と矛盾しないために必要な形状であることも示唆され、アポ体のリガンド結合部位の開き具合はアンタゴニスト結合体よりも小さく、アンタゴニスト結合体におけるリガンド結合部位周辺の構造が、やはりリガンド結合を維持するために必要な状態と考えられる。このような結果から、アポ体や

アンタゴニスト結合体の構造的特徴は適切に区別することが可能で、我々の MD-SAXS 解析で得られたアポ MD 構造とアンタゴニスト MD 構造が SAXS 実験曲線を満たすもっともらしい溶液構造であると言える。

## 6. アミノ酸残基レベルにおける構造妥当性の検証

### 6.1 アポ体 MD 構造

アポ MD 構造に関して、アミノ酸残基レベルで詳細に分析した (Fig. 6)。Fig. 6a では、アポ MD 構造とアゴニスト結合体の結晶構造を重ねてリガンド結合部位付近を拡大し、コアクチベータの結合位置と Helix 11~12 の位置関係がよく分かるように 2 方向で表示している。まず、Helix 10~11 の間でこのように折れ曲がる構造になっている理由は、396番目のグルタミン (Q396) の主鎖の NH 基と392番目のグルタミン酸 (E392) の主鎖の CO 基の間で水素結合が欠落したことに原因があると判明した (Fig. 6b)。この水素結合が消失した部分が蝶番となり、Helix 10~11 の間で折畳みドアのように外に折れ曲がり、リガンド結合部位の入口を広く開けている。このような Helix 10~11 のねじれた構造は実験曲線を満たすために必須だ



**Fig. 6** (Color online) Structural characteristics for apo VDR-LBD in solution<sup>15</sup>. The color used is the same as in Fig. 4b. (a) Superimposition of ApoMD-structure and crystal structure of agonist 2 complex. ApoMD-structure shows that helix 11 bends to the outside and that helix 12 is put around the canonical active helix 12. (b) Magnification of the structure from helix 10 to the end of helix 12. Hydrogen bonds and hydrophobic interaction are shown by red dotted lines and yellow dotted line, respectively. (c) Hydrogen bonds (red dotted lines) between amino acid residues in the C-terminal part and hydrophobic interactions (yellow dotted lines) between helices 3, 4, and 12.

Copyright (2016) American Chemical Society.

が、これまでに報告された VDR-LBD の結晶構造（いずれもリガンド結合状態）では観測されていない。そこで、他の 4 種の核内受容体の LBD で報告されているアポ体の結晶構造と比較を行った。比較に用いたのは、レチノイド X 受容体  $\alpha$  (RXR $\alpha$ -LBD, PDB code: 1LBD), 光受容体の細胞特異的な核内受容体 (PNR-LBD, PDB code: 4LOG), 精巢受容体 4 (TR4-LBD, PDB code: 3P0U), トリ卵白アルブミン上流プロモータ転写因子 II (COUP-TF2-LBD, PDB code: 3CJW) の 4 種で、VDR-LBD のアポ MD 構造と重ねた。その結果、Helix 10~11 の間のねじれのポイント、すなわち水素結合の欠落ポイントは構造的に保存されていたが、VDR-LBD 以外では、Helix 11 は外側では無く内側に向かって折れ曲がりリガンド結合部位を覆うような構造になっていると判明した。このような構造はリガンド結合に対して著しく具合が悪く、対照的に、VDR-LBD で見られた Helix 11 が外にねじれるように開く構造であれば、リガンドはその結合部位へ容易に進入できると思われる。一方で、Helix 11 の終わりから一部がほどけた Helix 12 までの自由度の高い構造状態は、他の実験結果とも一致している。ヒトとラットの VDR-LBD の HDX-MS 実験では、Helix 11 から Helix 12 まではアポ体とアゴニスト結合体との間で構造の揺らぎ度合いが異なること示されている<sup>47,52</sup>。NMR でも Helix 11 と 12 を含めて VDR-LBD の構造がアゴニストの結合によって全体的に安定化することが示されている<sup>46</sup>。これらの結果は、この領域がアゴニストの結合によって不規則な状態から規則的な状態まで変化することを示唆している。もう少し詳しく見ると、VDR-LBD のアポ MD 構造では、一部がほどけた Helix 12 は活性部位周辺に位置しているが、コアクチベータの結合部位に向かって 90 度回転して Helix 3, 4 と相互作用している (Fig. 6a)。加えて、Helix 12 の C 末端側にある 422 番目のイソロイシン (I422) の主鎖の NH 基は、Helix 4 にある 252 番目のセリン (S252) の主鎖の CO 基と水素結合を、423 番目のセリン (S423) は Helix 3 と 4 の間にある 248 番目のアルギニン (R248) と塩橋をそれぞれ形成している (Fig. 6c)。また、Loop 11-12 の領域では、疎水性残基を内部に埋め込むように親水性残基を溶媒側に露出した構造となっている。以上の検証から、Helix 12 がタンパク質表面近くに局在化した構造は合理的であり、RXR $\alpha$ -LBD のアポ体 (Fig. 1c) のように Helix 12 が伸びて溶媒に完全に露出した構造より疎水性相互作用の観点からも妥当と考えられる。

### 6.2 アンタゴニスト結合体の MD 構造

アポ体同様にアンタゴニスト MD 構造に関しても、アンタゴニスト活性の構造メカニズムを議論するために、アミノ酸残基レベルで検証を行った (Fig. 7)。Fig. 7a では、アンタゴニスト MD 構造とアゴニスト結合体の結晶構造を重ねてリガンド結合部位付近を拡大し、コアクチベータ

の結合位置と Helix 11~12 の位置関係がよく分かるように 2 方向で表示している。397 番目のチロシン (Y397) (ヒトの VDR では Y401) は転写活性に重要なアミノ酸残基であると明らかにされている<sup>53-55</sup>。アゴニスト結合体の結晶構造では、Y397 はアゴニストのメチルグループと疎水性相互作用を形成しつつ、Y397 のフェノールの OH 基は Helix 12 にある 419 番目のグリシン (G419) の CO 基と水素結合を形成している (Fig. 7b)。対照的に、アンタゴニスト MD 構造では、アンタゴニスト **3** が 2 つのメチル基を欠損しているため、Y397 はアンタゴニスト **3** との間で疎水性相互作用を形成しない。また、アンタゴニスト **3** の 22S-配置のブチル基は、Helix 7 と 10/11 の位置を離

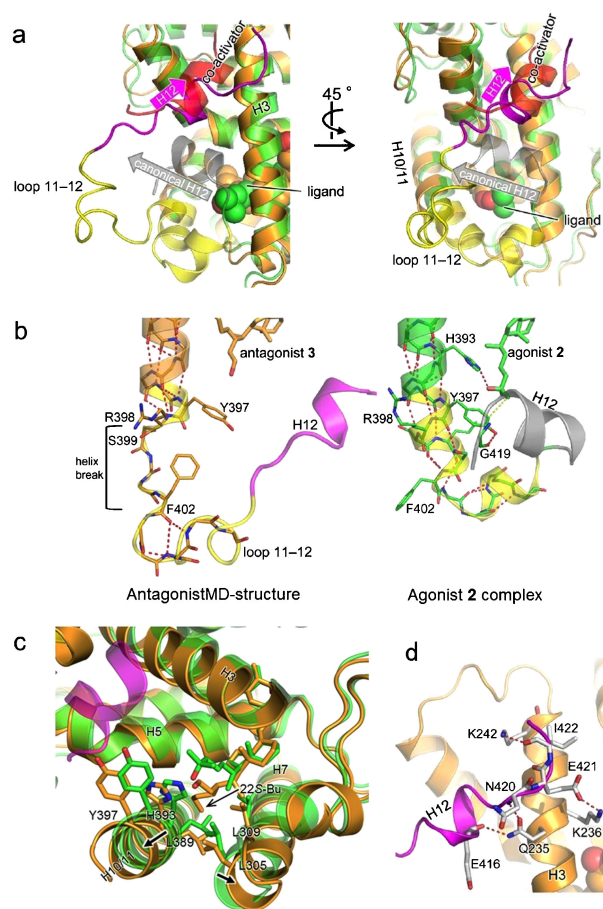


Fig. 7 (Color online) Structural characteristics of antagonist 3 complex in solution<sup>15</sup>. The color is the same as in Fig. 4e. (a) Superimposition of AntagonistMD-structure and crystal structure of agonist 2 complex. Helix 12 in AntagonistMD-structure is positioned in the same area as coactivator in agonist 2 complex. (b) Magnification of the structure from helix 10 to the end of helix 12. Hydrogen bonds and hydrophobic interaction are shown by red dotted lines and yellow dotted line, respectively. (c) Interactions between helices 7 and 10/11. The 22S-butyl group of antagonist 3 extends the distance between helices 7 and 10/11. (d) Interactions between amino acid residues in helices 3 and 12 are indicated by red dotted lines.

Copyright (2016) American Chemical Society.



し、両者の相互作用をアゴニスト結合体の時より弱めるように働いている (Fig. 7c)。このようなアンタゴニストによって引き起こされた相互作用の弱体化はC末端領域の安定性に影響し、Helix 11の末端部を自由度の高い構造へと変えている。さらに、アゴニスト結合体のHelix 11は402番目のフェニルアラニン (F402) までだが、アンタゴニスト MD 構造の Helix 11は398番目のアルギニン (R398) までと1ターン短くなっていた (Fig. 7b)。この状態に関して検証するために、他の核内受容体のLBD (エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ -LBD), レチノイン酸受容体 $\alpha$  (RAR $\alpha$ -LBD) とレチノイド X 受容体 $\alpha$ のLBDで318番目のフェニルアラニンをアラニンに変異させた変異体 (mRXR $\alpha$ -LBD (F318A))<sup>25,28</sup>) と比較した。それらのアゴニスト結合体とアンタゴニスト結合体をそれぞれ比較した結果、全ての構造でVDR-LBD同様にHelix 11はアンタゴニスト結合体の方が1ターン短いと判明した。VDR-LBDのアンタゴニスト結合体のNMR解析では、C末端領域が不規則化していると示されている<sup>46</sup>)。また、結晶構造においてもHelix11のC末端側は温度因子が高く不安定であるとする報告もあることから<sup>56</sup>)、VDR-LBDのアンタゴニスト結合体ではC末端部の構造自由度が高く、その結果としてHelix 12がAF-2表面の形成を阻害する位置に局在化すると示唆された (Fig. 7a)。

一方で、一部がほどけたHelix 12がなぜコアクチベータの結合を阻害するこの位置に局在化できるのか? という点についても検証を行った。その結果、コアクチベータの結合に関与するHelix 3の242番目のリジン (K242) とHelix 12の416番目のグルタミン酸 (E416) が電荷によるアンカーのような役割を担うことで、周辺のアミノ酸残基間における相互作用をサポートしていると推測された (Fig. 7d)。K242は422番目のイソロイシン (I422) とE416は235番目のグルタミン (Q235) とそれぞれ水素結合を形成し、さらに、420番目のアスパラギン (N420) もQ235と水素結合を形成し、421番目のグルタミン酸 (E421) は236番目のリジン (K236) と塩橋を形成している。これらの相互作用で生み出される構造安定性によって、Helix 12はコアクチベータの結合部位に局在化して居られるのだと示唆される。同様の例は、ER $\alpha$ -LBDとそのアンタゴニストである4-hydroxy tamoxifenとの複合体の結晶構造でも観測されていた。ER $\alpha$ -LBDのHelix 12上にある543番目のメチオニン (M543) と544番目のロイシン (L544) は、VDR-LBD同様に電荷によるアンカーと考えられるHelix 3上の362番目のリジン (K362) と水素結合を形成していた。従って、このようなアミノ酸残基間の相互作用によってHelix 12はHelix 3の横に固定され、コアクチベータの結合を阻害すると考えられる。

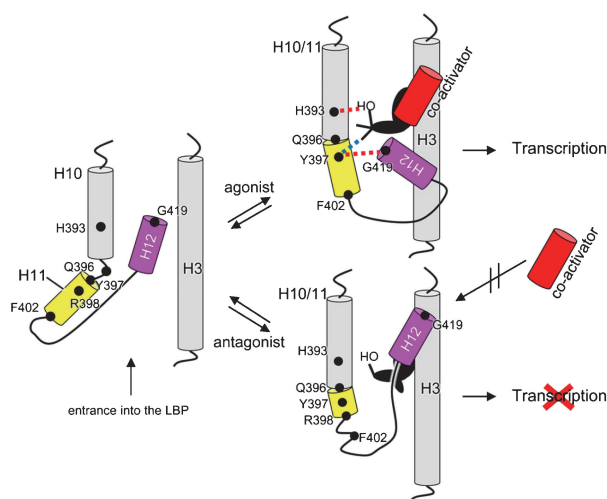
## 7. 結論

### 7.1 新しいリガンド結合メカニズムの提唱

本研究におけるMD-SAXS解析によって、アポ体とアンタゴニスト結合体の原子分解能の構造が同定されたため、既存のアゴニスト結合体の結晶構造も含めて3つの状態が全て明らかになった。これらの構造情報から、我々はFig. 8に示す「折畳みドアモデル (folding-door model)」と呼ぶ新たなリガンド結合メカニズムを提唱する。アゴニストが結合すると、様々な相互作用を形成しながらHelix 12が構造変化して扉であるHelix 11が閉じる。既存のマウスラップモデルでは、Helix 12が開閉を担うドアのような振る舞いをするようになってきているが、我々の提唱するこのモデルでは、Helix 12はHelix 11と協同的に動作する。この動作は、アポ体からアゴニスト結合体への構造変化に関して利点があり、Helix 12がタンパク質表面に位置するため、我々の折畳みドアモデルであれば、アゴニストは結合部位に容易にアクセスし、結合によってHelix 12は活性構造に変化できる。一方で、アンタゴニストが結合するとき、フレキシブルなLoop11-12によってHelix 12はAF-2表面の形成を阻害する位置に移動する。以上の様に、我々の折畳みドアモデルは、リガンド結合によるVDR-LBDの活性・活性阻害メカニズムを合理的に説明可能である。

### 7.2 留意点など、まとめ

アンタゴニストに関しては、今回使用したアンタゴニス



**Fig. 8** (Color online) Folding-door model for the conformational change of VDR-LBD upon ligand binding<sup>15</sup>). Helices 3 (H3, gray), 10 (H10, gray), 11 (H11, yellow), and 12 (H12, magenta) and loop (black) structures are represented by cylinders and lines, respectively. Amino acid residues involved in the conformational change are shown as black dots. Red and blue dashed lines show hydrogen bonds and hydrophobic interaction, respectively. Copyright (2016) American Chemical Society.

ト 3 とは異なる構造を持つため、異なるメカニズムでアンタゴニスト活性を生じると考えられる分子も存在する。今回使用したアンタゴニスト 3 は 22S-配置のプチル基を持ち、前項で触れたように、C 末端領域の相互作用を弱めて不安定化させ、Helix 12 を AF-2 表面の形成を阻害する位置に局在化させる状況を生み出す一因となっている。当然、構造が異なるアンタゴニストでは、そのような状況が生じない可能性があり、今後の検証が必要である。一方で、今回の結果を基に VDR-LBD に関して、「アポ体はなぜ結晶化できないのか？」や「正常な (=機能メカニズムの議論が可能な) アンタゴニスト結合体の結晶構造はなぜ得られないのか？」という疑問にも答えることができたように思う。両者ともに C 末端部の構造自由度の高さは、それだけで結晶化を阻害する要因になる。ラットとゼブラフィッシュの VDR-LBD はコアクチベータを添加することで結晶化されるが、それは AF-2 領域の形成が結晶化のために必要であると示唆している<sup>57,58</sup>)。ヒト VDR-LBD でも、Helix 3n がコアクチベータをまねるようにパッキングされることで、コアクチベータ無しでも結晶化される<sup>58</sup>)。実際、VDR-LBD のアンタゴニスト結合体は、コアクチベータ無しで結晶化させるのは困難であることから、リガンドとコアクチベータの結合が同時に起きているアゴニスト結合体様の構造状態に自然と収束することで、結晶化されていると推測される。

## 8. 最後に

本研究は MD-SAXS 法を適用することによって、非常に大きな成果を上げたと思う。我々は、SAXS 曲線が得られた時点でプログラム DAMMIN 等を用いて ab initio モデリングも実施し、アポ体とアンタゴニスト結合体のビーズモデルを得ていた。そのビーズモデルに既存の構造学的情報を基に結晶構造を当てはめて見たものの、その動きを推定するのは極めて困難であった。特に、「マウストラップモデル」という既存の構造変化モデルがあったため、どうしてもビーズモデルから推定される構造状態、構造変化をそのモデルに当てはめるように先入観を持った解析を行ってしまっていた。実際、アポ体のビーズモデルは VDR-LBD の C 末端部と思われる領域がアポ MD 構造同様に広がっていたのだが、当初はそこに緩んだ Helix 12 が当てはまるのだと推測していた。しかしながら、上述の通り、その領域に当てはまるのは Helix 12 ではなく Helix 11 だと示され、実際アポ体のビーズモデルとアポ MD 構造は良く重なっていた。

一方、「解析に適用している角度領域における SAXS データに含まれる構造情報では、アミノ酸残基レベルの構造を議論できるはずは無いのでは？」という指摘を受けることもある。実際、本解析に適用したのは  $q=0.01\sim 0.38 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲で、これは空間スケールとしては  $16.5\sim 628 \text{ \AA}$

に相当するため、実際その指摘は直感的には間違いでは無い。一方で、交差検証でも示されたように、分子の表面形状に関する情報は含まれているため、理論散乱曲線との一致度を示す  $\chi^2$  値を指標に、MD による構造アンサンブルの中から形状の一致度が高い分子構造を選出することは可能である。分子の表面形状を決める相互作用は、基本的に分子内 (複合体化すれば複合体を 1 分子とみなす) での相互作用に依存すると考えられるため、正しい表面形状を見出すことが可能であれば、その形状を決める相互作用、すなわち分子を構成するアミノ酸残基レベルの相互作用も同定できていると考えられる。当然、SAXS データだけでそこに到達することは不可能だが、逆に MD としても実験データと組み合わせることで、コンピュータ上の力場の中だけではなく生理条件下と直結した解析を行うことが可能である。従って、両者の Win-Win な関係はさらに続くと考えられるが、それに応じて MD-SAXS 法の適用例がさらに増えることを期待したい。

## 謝辞

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」) の支援を受けて実施された。

## 参考文献

- 1) Y. Amemiya, K. Wakabayasi, T. Hamanaka, T. Wakabayasi and H. Hashizume: Nucl. Instrum. Method **208**, 471 (1983).
- 2) T. Ueki, Y. Hiragi, M. Kataoka, Y. Inoko, Y. Amemiya, Y. Izumi, H. Tagawa and Y. Muroga: Biophys. Chem. **23**, 115 (1985).
- 3) D. I. Svergun, C. Barberato and M. H. J. Koch: J. Appl. Cryst. **28**, 768 (1995).
- 4) D. I. Svergun: Biophys. J. **76**, 2879 (1999).
- 5) D. Tsuchiya, N. Shimizu, M. Ishikawa, Y. Suzuki and K. Morikawa: Structure **14**, 237 (2006).
- 6) N. Rochel *et al.*: Nat. Struct. Mol. Biol. **18**, 564 (2011).
- 7) C. Koehler, A. Round, H. Simader, D. Such and D. I. Svergun: Nucleic Acids Res. **41**, 667 (2013).
- 8) D. A. Jacques, J. M. Guss, D. I. Svergun and J. Trehwella: Acta Cryst. D **68**, 620 (2012).
- 9) 藤澤哲郎: 放射光 **26**, 214 (2013).
- 10) M. V. Petoukhov, D. Franke, A. V. Shkumatov, G. Tria, A. G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H. D. T. Mertens, P. V. Konarev and D. I. Svergun: J. Appl. Cryst. **45**, 342 (2012).
- 11) M. V. Petoukhov and D. I. Svergun: Biophys. J. **89**, 1237 (2005).
- 12) B. L. de Groot, D. M. F. van Aalten, R. M. Scheek, A. Amadei, G. Vriend and H. J. C. Berendsen: Proteins **29**, 240 (1997).
- 13) H. Kamikubo, N. Shimizu, M. Harigai, Y. Yamazaki, Y. Imamoto and M. Kataoka: Biophys. J. **92**, 3633 (2007).
- 14) T. Oroguchi, H. Hashimoto, T. Shimizu, M. Sato and M. Ikeguchi: Biophys. J. **96**, 2808 (2009).

- 15) Y. Anami, N. Shimizu, T. Ekimoto, D. Egawa, T. Itoh, M. Ikeguchi and K. Yamamoto: *J. Med. Chem.* **59**, 7888 (2016).
- 16) D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans: *Cell* **83**, 835 (1995).
- 17) J. M. Olefsky: *J. Biol. Chem.* **276**, 36863 (2001).
- 18) V. Laudet: *J. Mol. Endocrinol.* **19**, 207 (1997).
- 19) J. P. Overington, B. Al-Lazikani and A. L. Hopkins: *Nat. Rev. Drug Discovery* **5**, 993 (2006).
- 20) E. Ottow and H. Weinmann: Eds. *Nuclear Receptors as Drug Targets*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2008).
- 21) H. Gronemeyer, J.-Å. Gustafsson and V. Laudet: *Nat. Rev. Drug Discovery* **3**, 950 (2004).
- 22) A. R. de Lera, W. Bourguet, L. Altucci and H. Gronemeyer: *Nat. Rev. Drug Discovery* **6**, 811 (2007).
- 23) D. J. Mangelsdorf and R. M. Evans: *Cell* **83**, 841 (1995).
- 24) D. J. Kojetin and T. P. Burris: *Mol. Pharmacol.* **83**, 1 (2013).
- 25) A. K. Shiau, D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard and G. L. Greene: *Cell* **95**, 927 (1998).
- 26) A. M. Brzozowski, A. C. W. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson and M. Carlquist: *Nature* **389**, 753 (1997).
- 27) A. C. W. Pike, A. M. Brzozowski, R. E. Hubbard, T. Bonn, A.-G. Thorsell, O. Engström, J. Ljunggren, J.-A. Gustafsson and M. Carlquist: *EMBO J.* **18**, 4608 (1999).
- 28) W. Bourguet, V. Vivat, J. M. Wurtz, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras: *Mol. Cell* **5**, 289 (2000).
- 29) A. C. W. Pike, A. M. Brzozowski, J. Walton, R. E. Hubbard, T. Bonn, J.-A. Gustafsson and M. Carlquist: *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 396 (2000).
- 30) W. Bourguet, M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras: *Nature* **375**, 377 (1995).
- 31) M. H. E. Tan, X. E. Zhou, F. F. Soon, X. Li, J. Li, E. L. Yong, K. Melcher and H. E. Xu: *PLoS One* **8**, e74359 (2013).
- 32) X. E. Zhou, K. M. Suino-Powell, Y. Xu, C.-W. Chan, O. Tanabe, S. W. Kruse, R. Reynolds, J. D. Engel and H. E. Xu: *J. Biol. Chem.* **286**, 2877 (2011).
- 33) S. W. Kruse, K. Suino-Powell, X. E. Zhou, J. E. Kretschman, R. Reynolds, C. Vornrhein, Y. Xu, L. Wang, S. Y. Tsai, M.-J. Tsai and H. E. Xu: *PLoS Biol.* **6**, e227 (2008).
- 34) R. T. Nolte, G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass and M. V. Milburn: *Nature* **395**, 137 (1998).
- 35) J. Uppenberg, C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg and A. Berkenstam: *J. Biol. Chem.* **273**, 31108 (1998).
- 36) F. Rastinejad, P. Huang, V. Chandra and S. Khorasanizadeh: *J. Mol. Endocrinol.* **51**, T1 (2013).
- 37) F. Rastinejad, V. Ollendorff and I. Polikarpov: *Trends Biochem. Sci.* **40**, 16 (2015).
- 38) B. C. Kallenberger, J. D. Love, V. K. K. Chatterjee and J. W. R. Schwabe: *Nat. Struct. Biol.* **10**, 136 (2003).
- 39) B. A. Johnson, E. M. Wilson, Y. Li, D. E. Moller, R. G. Smith and G. Zhou: *J. Mol. Biol.* **298**, 187 (2000).
- 40) J. P. Berger *et al.*: *Mol. Endocrinol.* **17**, 662 (2003).
- 41) J. Lu, D. P. Cistola and E. Li: *Biochemistry* **45**, 1629 (2006).
- 42) D. Moras and H. Gronemeyer: *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384 (1998).
- 43) J. W. Pike, M. B. Meyer and K. A. Bishop: *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **13**, 45 (2012).
- 44) F. Molnár: *Front. Physiol.* **5**, 191 (2014).
- 45) N. Rochel, G. Tocchini-Valentini, P. F. Egea, K. Juntunen, J. M. Garnier, P. Vihko and D. Moras: *Eur. J. Biochem.* **268**, 971 (2001).
- 46) K. K. Singarapu, J. Zhu, M. Tonelli, H. Rao, F. M. Assadi-Porter, W. M. Westler, H. F. DeLuca and J. L. Markley: *Biochemistry* **50**, 11025 (2011).
- 47) J. Zhang, M. J. Chalmers, K. R. Stayrook, L. L. Burris, R. D. Garcia-Ordóñez, B. D. Pascal, T. P. Burris, J. A. Dodge and P. R. Griffin: *Structure* **18**, 1332 (2000).
- 48) Y. Inaba, N. Yoshimoto, Y. Sakamaki, M. Nakabayashi, M. T. Ikura, H. Tamamura, N. Ito, M. Shimizu and K. A. Yamamoto: *J. Med. Chem.* **52**, 1438 (2009).
- 49) D. Miura, K. Manabe, K. Ozono, M. Saito, Q. Gao, A. W. Norman and S. Ishizuka: *J. Biol. Chem.* **274**, 16392 (1999).
- 50) S. Kakuda, S. Ishizuka, H. Eguchi, M. T. Mizwicki, A. W. Norman and M. Takimoto-Kamimura: *Acta Cryst. D* **66**, 918 (2010).
- 51) M. Nakabayashi, S. Yamada, N. Yoshimoto, T. Tanaka, M. Igarashi, T. Ikura, N. Ito, M. Makishima, H. Tokiwa, H. F. DeLuca and M. Shimizu: *J. Med. Chem.* **51**, 5320 (2008).
- 52) A. Kato, T. Itoh, Y. Anami, D. Egawa and K. Yamamoto: *Bioconjugate Chem.* **27**, 1750 (2016).
- 53) M. Choi, K. Yamamoto, T. Itoh, M. Makishima, D. J. Mangelsdorf, D. Moras, H. F. DeLuca and S. Yamada: *Chem. Biol.* **10**, 261 (2003).
- 54) K. Yamamoto, D. Abe, N. Yoshimoto, M. Choi, K. Yamagishi, H. Tokiwa, M. Shimizu, M. Makishima and S. Yamada: *J. Med. Chem.* **49**, 1313 (2006).
- 55) K. Yamamoto, Y. Anami and T. Itoh: *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 2378 (2014).
- 56) Y. Anami, T. Itoh, D. Egawa, N. Yoshimoto and K. Yamamoto: *J. Med. Chem.* **57**, 4351 (2014).
- 57) J. L. Vanhooke, M. M. Benning, C. B. Bauer, J. W. Pike and H. F. DeLuca: *Biochemistry* **43**, 4101 (2004).
- 58) N. Rochel, J. M. Wurtz, A. Mitschler, B. Klaholz and D. Moras: *Mol. Cell* **5**, 173 (2000).



著者紹介



**清水伸隆**

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

E-mail: nobutaka.shimizu@kek.jp

専門：X線小角散乱，生物物理学

**【略歴】**

2003年 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科修了，博士（理学）。高輝度光科学研究センター研究員，高エネ機構物構研特別准教授を経て，2014年1月より現職。



**沼本 亨**

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 特任助教

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

ac.jp

専門：生物物理学

**【略歴】**

2011年 九州大学理学府物理学専攻博士後期課程修了，博士（理学）。京都大学化学研究所博士研究員，横浜市立大学博士研究員を経て，2016年4月より現職。



**穴見康昭**

テキサス大学ヘルスサイエンスセンターヒューストン校 博士研究員

E-mail: Yasuaki.Anami@uth.tmc.edu

専門：創薬化学

**【略歴】**

2016年 昭和薬科大学大学院薬学研究科修了，博士（薬学）。2016年5月より現職。



**伊藤俊将**

昭和薬科大学医薬分子化学研究室 准教授

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

専門：創薬化学

**【略歴】**

2002年 東京薬科大学博士後期課程修了，博士（薬学）。東京医科歯科大生材工学振特別研究員，MRC-LMB研究員，レスター大研究員を経て，2015年より現職。



**池口満徳**

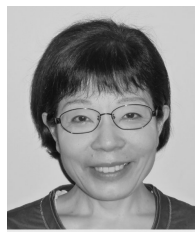
横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授

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

専門：生物物理学

**【略歴】**

1994年 東京大学大学院農学系研究科応用生命工学専攻博士課程修了，博士（農学）。東京大学農学部助手，横浜市立大学大学院助教授を経て，2015年4月より現職。



**山本恵子**

昭和薬科大学医薬分子化学研究室 教授

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

専門：創薬化学

**【略歴】**

1978年 千葉大学大学院薬学研究科中途退学，薬学博士。帝京大学薬学部，東京医科歯科大学医用器材研究所，東京医科歯科大学生体材料工学研究所を経て，2007年より現職。

---

# Solution structure analysis of apo and antagonist-binding form of vitamin D receptor ligand-binding domain studied by MD-SAXS hybrid approach

---

**Nobutaka SHIMIZU** Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK)  
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki, 305-0801, Japan

**Toru EKIMOTO** Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University  
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan

**Yasuaki ANAMI** Texas Therapeutics Institute, The Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, The University of Texas Health Science Center at Houston  
1881 East Road, Houston, TX 77054 U.S.A.

**Toshimasa ITOH** Laboratory of Drug Design and Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University  
3-3165 Higashi-Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan

**Mitsunori IKEGUCHI** Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University  
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan

**Keiko YAMAMOTO** Laboratory of Drug Design and Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University  
3-3165 Higashi-Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan

---

**Abstract** Small-angle X-ray scattering (SAXS) which measures a solution sample of biological molecules including protein is called BioSAXS in recent years, and it is widely used to obtain a molecular rough structure in solution using ab initio modeling. In the ab initio modeling, hybrid approach is performed combining SAXS with the computing science technique like rigid body refinement and molecular dynamics (MD) using an atomic resolution structure acquired by molecular crystallography etc. MD-SAXS is the hybrid approach combined MD and SAXS, and it can choose and analyze an atomic-resolution structure indicating a theoretical SAXS curve with high identity against an experimental SAXS curve from a large number of structure ensemble calculated by MD. In this study, we analyzed the unrevealed apo and antagonist-binding structures of nuclear receptor, vitamin D receptor ligand-binding domain (VDR-LBD) using MD-SAXS, and newly advocated the ligand binding mechanism of VDR-LBD based on the revealed structure states. The validity of the MD-SAXS approach based on the result of this VDR-LBD analysis is also described in this review.