

Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301

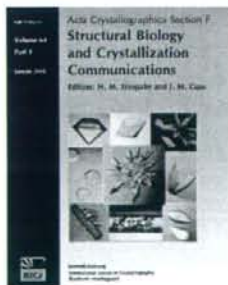
Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya Takenouchi,
Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara and Midori Takimoto-Kamimura

Acta Cryst. (2008). **F64**, 970–973

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Reproduction of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. It includes four categories of publication: protein structure communications; nucleic acid structure communications; structural genomics communications; and crystallization communications. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. *Section F* is essential for all those interested in structural biology including molecular biologists, biochemists, crystallization specialists, structural biologists, biophysicists, pharmacologists and other life scientists.

Crystallography Journals Online is available from journals.iucr.org

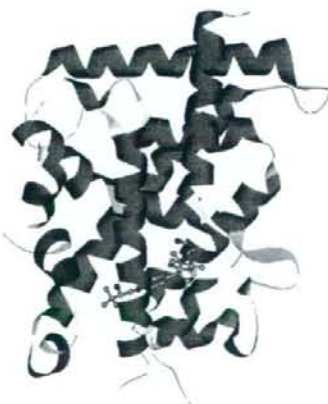
Shinji Kakuda,^{a*} Kazuhisa Okada,^a Hiroshi Eguchi,^a Kazuya Takenouchi,^a Wataru Hakamata,^b Masaaki Kurihara^b and Midori Takimoto-Kamimura^a

^aTeijin Institute for Biomedical Research, Japan, and ^bDivision of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, Japan

Correspondence e-mail: s.kakuda@teijin.co.jp

Received 16 May 2008
Accepted 19 August 2008

PDB Reference: vitamin D receptor ligand-binding domain–YR301 complex, 2zfx, r2zfsf.



© 2008 International Union of Crystallography
All rights reserved

Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301

Vitamin D receptor (VDR) is a ligand-inducible hormone receptor that mediates $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ action, regulating calcium and phosphate metabolism, induces potent cell differentiation activity and has immunosuppressive effects. Analogues of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ have been used clinically for some years. However, the risk of potential side effects limits the use of these substances. LG190178 is a novel nonsecosteroidal ligand for VDR. (2S)-3-[4-(3-[(2R)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy]-3-methylphenyl)pentan-3-yl]-2-methylphenoxy] propane-1,2-diol (YR301) is the only one of the four evaluated stereoisomers of LG190178 to have strong activity. To understand the strong activity of YR301, the crystal structure of YR301 complexed with the rat VDR ligand-binding domain (VDR LBD) was solved at 2.0 Å resolution and compared with the structure of the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex. YR301 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ share the same position and the diethylmethyl group occupies a similar space to the C and D rings of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. YR301 has two characteristic hydroxyl groups which contribute to its potent activity. The first is 2'-OH, which forms hydrogen bonds to the NE2 atoms of both His301 and His393. The other is 2-OH, which interacts with Ser233 OG and Arg270 NH1. These two hydroxyl groups of YR301 correspond exactly to 25-OH and 1-OH, respectively, of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The terminal hydroxyl group (3-OH) of YR301 is directly hydrogen bonded to Arg270 and also interacts indirectly with Tyr232 OH and the backbone NH of Asp144 via water molecules. Additional derivatization of the terminal hydroxyl group using the positions of the water molecules might be useful for the design of more potent compounds.

1. Introduction

The vitamin D receptor (VDR) is a member of the nuclear receptor superfamily, with which it shares structural and functional similarity (Mangelsdorf *et al.*, 1995). It contains three principal domains, a variable N-terminal domain that contains a ligand-independent activation function, a central highly conserved DNA-binding domain and a large C-terminal ligand-binding domain (VDR LBD), and a short linker between the DNA-binding domain and the VDR LBD. VDR is a ligand-dependent transcriptional regulator that acts in several physiological processes and is an important target for a wide spectrum of clinical applications such as osteoporosis, psoriasis and secondary hyperparathyroidism.

The function of VDR is regulated by the binding of vitamin D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, which induces a conformational change of LBD that allows the recruitment of a coactivator from the p160 (Kalkhoven *et al.*, 1998) or the DRIP/TRAP (Rachez *et al.*, 1999) families. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates calcium and phosphate metabolism, induces potent cell differentiation activity and has immunosuppressive effects (Bouillon *et al.*, 1995; Lieberherr, 1987; HENDY *et al.*, 2006). Most analogues of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ have been synthesized with the goal of improving the biological profile of the natural ligand in order to decrease its hypercalcaemic effects for therapeutic application (Stein & Wark, 2003).

Vitamin D₃ analogues can be classified as steroidal and nonsteroidal based on their structures. The endogenous $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and modified analogues have some shortcomings that limit their general use, mainly their potential for side effects and their mode of admini-

stration (Mizwicki & Norman, 2003). Nonsteroidal vitamin D₃ analogues have been under investigation for many years.

YR301 is a member of a novel class of VDR ligands that have the potential to provide improved therapeutic benefits while reducing the risk of side effects. In *in vitro* transcriptional assays and VDR affinity assays, only the (2*S*,2'*R*)-isomer (YR301) exhibited potent transcriptional activity (Hakamata *et al.*, 2008). To gain further insight into the structure–activity relationships of vitamin D and to determine the basis of the observed selectivity effect on a molecular level, we solved the crystal structure of rat VDR LBD in complex with YR301. A comparison of this structure with the structure of rat VDR LBD complexed with 1 α ,25(OH)₂D₃ (Vanhook *et al.*, 2004) provides clues to achieving tissue selectivity and obtaining more effective potential therapeutic agents.

2. Material and methods

Rat VDR LBD (residues 116–423) lacking the flexible insertion region (residues 165–207) was amplified by polymerase chain reaction technology using the appropriate primers and inserted between the *Nde*I site and the *Not*I site of pET28a (Novagen). The resulting fusion protein contained a His tag and an N-terminal thrombin cleavage site. The constructs were produced as described by Vanhook *et al.* (2004) and were then transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Novagen). Expression was carried out in LB medium containing 20 μ g ml⁻¹ kanamycin with 500 μ M isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 293 K for about 16 h before harvesting by centrifugation. The cell pellets were suspended in 20 mM Tris–HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol (2-ME) and were lysed by 20 mg ml⁻¹ lysozyme. The fused protein was purified by affinity chromatography

Table 1

Data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters (Å)	
<i>a</i>	44.22
<i>b</i>	47.33
<i>c</i>	136.43
Data collection	
Beamline	PF NW12
Wavelength (Å)	1.000
Resolution (Å)	50.00–2.00
Total No. of reflections	292936
Unique reflections	20439
<i>R</i> _{merge} †	0.088 (0.341)
Completeness (%)	100.0 (99.7)
Multiplicity	7.7 (7.2)
Average <i>I</i> (<i>hkl</i>)	31.2 (6.49)
Refinement statistics	
<i>R</i> factor (%)	20.6
<i>R</i> _{free} ‡ (%)	25.8
R.m.s. deviation from ideal values	
Bond lengths (Å)	0.017
Bond angles (°)	1.59

† $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of *i* reflections with intensities $I_i(hkl)$ and common indices *h*, *k* and *l*. ‡ $R_{\text{free}} = \sum_{hkl} | |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| | / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factors. R_{free} is calculated for a randomly chosen 5% of reflections and *R* factor is calculated for the remaining 95% of reflections.

using an Ni-Sepharose column. The rat VDR LBD was eluted using a buffer consisting of 20 mM Tris–HCl pH 8.0, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 5 mM 2-ME, 400 mM imidazole. Cleavage with 50 units of thrombin per millilitre was performed overnight at 277 K. After thrombin treatment, an LBD consisting of residues 116–423 with a tag remnant of sequence GSHM attached to the N-terminus was produced. The rat VDR LBD was further purified using a gel-filtration column (GE Biosciences) equilibrated with 10 mM Tris–HCl pH 7.0, 100 mM NaCl and 10 mM DTT (buffer I) before crystallization.

YR301 was synthesized as previously described by Hakamata *et al.* (2008). Crystallization experiments were performed using the hanging-drop vapour-diffusion method. The ligands were added to aliquots of the purified protein in a fivefold molar excess. We have cocrystallized the rat VDR LBD with YR301 and a synthetic peptide containing the LXXLL sequence of the coactivator DRIP 205. The synthetic peptide, with amino-acid sequence KNHPMLMNLKDN-NH₂, was added to the rat VDR LBD/YR301 in a fivefold molar excess over the protein. Crystallization conditions were similar to those used for the VDR LBD–1 α ,25(OH)₂D₃ complex crystals; 1 μ l of protein solution (10 mg ml⁻¹ in buffer I) was mixed with an equal

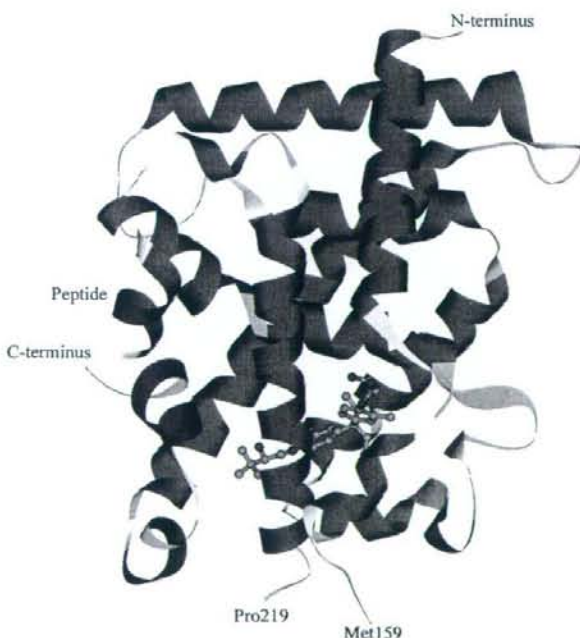


Figure 1
Overall structure of the VDR LBD–YR301 complex structure, showing the position of YR301 (shown as a ball-and-stick model).

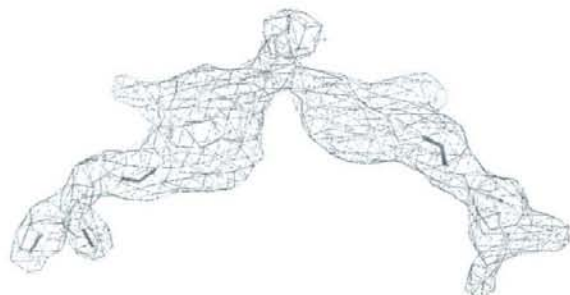


Figure 2
Conformation of the bound YR301. YR301 is shown in the $F_o - F_c$ electron-density OMIT map contoured at 1.0σ .

volume of the reservoir solution, which contained 100 mM MOPS pH 7.0, 200 mM ammonium citrate, 20% PEG 4000 and 4% 2-propanol, and equilibrated against 1 ml reservoir solution (Vanhook *et al.*, 2004). Single crystals grew to suitable dimensions in 2–4 d. Crystals were cryoprotected in 30% glycerol and cooled at 79 K and X-ray data were collected on beamline NW12 at Photon Factory. The data were processed using the *HKL-2000* software package (Otwinowski & Minor, 1997).

We carried out molecular replacement using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997) from *CCP4* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) with the coordinates of the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex [PDB code 1rk3; the solvent molecules and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were removed] as the initial model. Refinement was carried out using the program *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997). A sample containing a random 5% of the total reflections in the data set was excluded for R_{free} calculations. After rigid-body refinement, electron density for $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and the YR301 ligand was clearly constructed using *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004). In the final refinement at 2.0 Å, the crystallographic R factor and R_{free} were 20.6% and 25.8%, respectively, with good stereochemistry. Statistics of the data collection and final structure are summarized in Table 1. Figures were produced using *DS Visualizer* (Accelrys; <http://accelrys.co.jp/>).

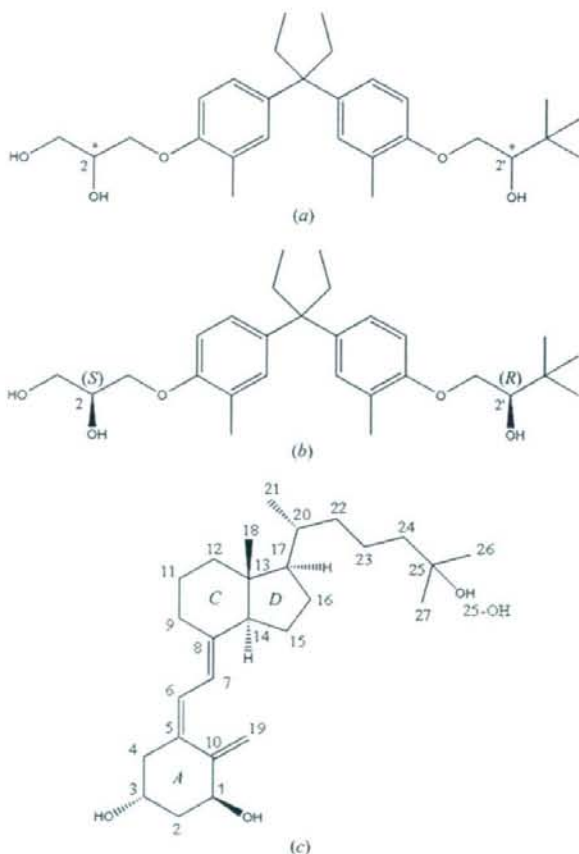


Figure 3
Chemical structures of (a) LG190178, (b) YR301 [(2*S*)-3-[4-(3-[4-[(2*R*)-2-hydroxy-3,3-dimethylbutoxy]-3-methylphenyl]pentan-3-yl)-2-methylphenoxy]propane-1,2-diol] and (c) $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D_3).

3. Results and discussion

The overall structure of the VDR LBD–YR301 complex is very similar to that of the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex and we obtained a good electron-density map of the protein from Leu116 to Ser423 without the residues in the loop between 160 and 218 at 2.0 Å resolution. When compared with the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex, the root-mean-squared deviation (*r.m.s.d.*) on C^α atoms is 1.25 Å for the VDR LBD–YR301 complex. The two protein backbones are superposable. The structure of the VDR LBD–YR301 complex and the electron density for YR301 are shown in Figs. 1 and 2, respectively.

YR301 is a nonsecosteroidal vitamin D_3 analogue which embeds in the ligand-binding pocket in the same position as $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex. The chemical structures of YR301 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ are shown in Fig. 3. YR301 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ share the same position and the diethylmethyl group occupies a similar space to the *C* and *D* rings of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, as shown in Fig. 4. The hydrophobic pocket is filled by the diethylmethyl group, which interacts with Trp282.

The interactions between the receptor and the ligand involve both hydrophobic and electrostatic contacts. A schematic representation of the interactions is shown in Fig. 5. The 2'-OH group of YR301 hydrogen bonds to His301 NE2 (2.71 Å) and His393 NE2 (2.74 Å) of VDR LBD. The 2-OH group of YR301 interacts with Ser233 OG (2.79 Å) and Arg270 NH1 (2.76 Å). In comparison, the 25-OH group of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ interacts with His301 NE2 (2.85 Å) and His393 NE2 (2.70 Å) and the 1-OH group interacts with Ser233 OG (2.76 Å) and Arg274 NH1 (2.83 Å). The 2'-OH and 2-OH groups of YR301 play exactly the same roles as the 25-OH and 1-OH groups of the natural ligand. Although the 3-OH group of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ forms

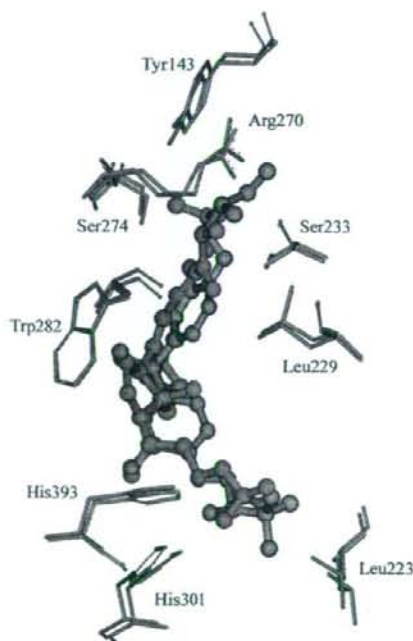


Figure 4
Ligand-binding pocket of the structure of the VDR LBD–YR301 complex superimposed on the structure of the VDR LBD– $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ complex. YR301 is shown in red and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is shown in blue.

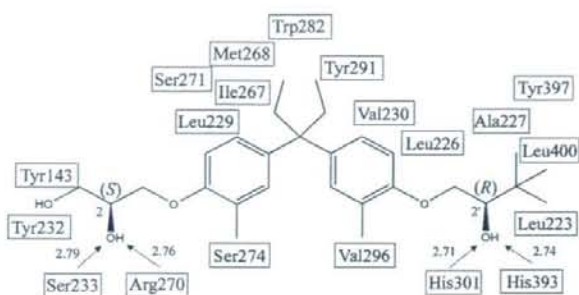


Figure 5
Schematic representation of the interactions between YR301 and VDR at a distance cutoff of 4.0 Å. Arrows correspond to hydrogen bonds between ligand and protein residues. The numbers show the distances of these hydrogen bonds in Å.

a hydrogen bond to Tyr139 OH and Ser274 OG, YR301 does not interact with those amino acids. It is probable that additional interactions with those amino acids might increase the binding affinity (Hakamata *et al.*, 2008). In the present study, we find that the terminal hydroxyl group of YR301 forms three direct hydrogen bonds to Arg270 NH1 and interacts indirectly with Tyr232 OH and Asp144 NH *via* mediated water molecules (W55, W57 and W58), despite the disorder of W57 as shown in Fig. 6. We think that the hydrogen bonds of the terminal hydroxyl groups anchor the ligands to the receptor in VDR LBD–YR301. The nonsteroidal vitamin D₃ analogue YR301 is a mimic of the natural ligand 1 α ,25(OH)₂D₃. Additional derivatization of the terminal hydroxyl group using the positions of the water molecules might be useful for the design of more potent compounds.

In this communication, we present the crystal structure of the VDR LBD–YR301 complex and compare it with the structure of the VDR LBD–1 α ,25(OH)₂D₃ complex. YR301 has been proven to be a selective vitamin D receptor with reduced effects on bone compared with other receptors and the structural information described here provides further details of its ligand-binding characteristics and provides some new insights into its ligand-binding requirements, which may aid in the discovery of more selective and effective potential therapeutic agents.

References

- Bouillon, R., Okamura, W. H. & Norman, A. W. (1995). *Endocr. Rev.* **16**, 200–257.
Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.

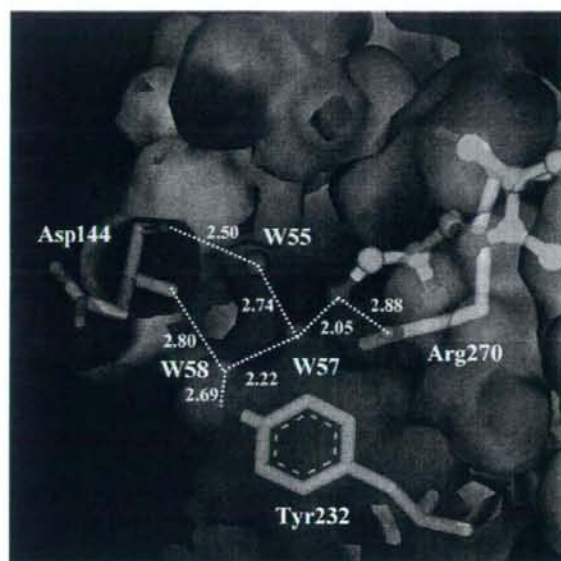


Figure 6
Interaction between the terminus of YR301 and VDR LBD. Negative charge is shown in red and positive charge in blue. The C atoms of VDR side chains are shown in grey and those of YR301 are shown in green. Hydrogen bonds are denoted by dotted lines and the numbers show their distances in Å.

- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst.* **D60**, 2126–2132.
Hakamata, W., Sato, Y., Okuda, H., Honzawa, S., Saito, N., Kishimoto, S., Yamashita, A., Sugiura, T., Kittaka, A. & Kurihara, M. (2008). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 120–123.
Hendy, G. N., Hruska, K. A., Mathew, S. & Goltzman, D. (2006). *Kidney Int.* **69**, 218–223.
Kalkhoven, E., Valentine, J. E., Heery, D. M. & Parker, M. G. (1998). *EMBO J.* **17**, 232–243.
Lieberherr, M. (1987). *Biol. Chem.* **262**, 13168–13173.
Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R. M. (1995). *Cell*, **83**, 835–839.
Mizwicki, M. T. & Norman, A. W. (2003). *J. Bone Miner. Res.* **18**, 795–806.
Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 240–255.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V. & Gamble, M. (1999). *Nature (London)*, **398**, 824–828.
Stein, M. S. & Wark, J. D. (2003). *Expert Opin. Invest. Drugs*, **12**, 825–840.
Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
Vanhook, J. L., Benning, M. M., Bauer, C. B., Pike, J. W. & DeLuca, H. F. (2004). *Biochemistry*, **43**, 4101–4110.

最近の研究から

輸送レクチン VIP36 による高マンノース型糖鎖認識の構造基盤

佐藤匡史¹, Nathan P. Cowieson², 袴田 航³, 井手尾浩子^{4,5}, 福島慶子^{4,5}, 栗原正明³, 加藤龍一¹,
山下克子^{4,5}, 若槻壮市¹

¹高エネ研・物構研・構造生物学研究センター, ²Queensland 大学・Institute for Molecular Bioscience, ³国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部, ⁴東京工業大学・イノベーション研究推進体, ⁵科学技術振興事業機構 CREST

Structural Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan by Transport Lectin VIP36

Tadashi Satoh¹, Nathan P. Cowieson², Wataru Hakamata³, Hiroko Ideo^{4,5}, Keiko Fukushima^{4,5}, Masaaki Kurihara³,
Ryuichi Kato¹, Katsuko Yamashita^{4,5} and Soichi Wakatsuki¹

¹Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization ²Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia ³Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences ⁴Innovative Research Initiatives, Tokyo Institute of Technology ⁵CREST, Japan Science and Technology Agency

1. はじめに

細胞の中には膜によって仕切られた細胞内小器官(オルガネラ)があり、それぞれのオルガネラは専門の機能を担っている。これらオルガネラは「輸送小胞」を介して、相互に積み荷(タンパク質や脂質)のやりとりをしている。この輸送小胞による積み荷タンパク質の輸送は、厳密にコントロールされていて、送り手側のオルガネラに留まるべきタンパク質と受け手側のオルガネラへと送り出されるタンパク質の選別が行われている。細胞質領域をもつ膜タンパク質は、膜の細胞質側に局在している輸送小胞と直接結合でき、選別・輸送される[1]。一方、細胞質側の領域を持たない可溶性のタンパク質の選別・積み込みは、積み荷タンパク質と輸送小胞を同時に結合して繋ぐ膜貫通型の積み荷タンパク質レセプターがこれを担っている[2]。

小胞体で生合成されてくるタンパク質の多くはN型糖鎖修飾を受けるが、輸送小胞への選別とN型糖鎖には密接な関係があることがわかっている。すなわち、マンノース6リン酸受容体(MPR), VIP36, ERGIC-53, Emp46/47pなどが積み荷タンパク質のN型糖鎖を荷札として、選別・積み込みを行う積み荷タンパク質レセプター(輸送レクチン)として機能していることが明らかにされている[3-5]。その中でもP-type (mannose-6-phosphate) レクチンファミリーに分類されるカチオン依存性および非依存性MPRの構造生物学的研究は進んでおり、それぞれ糖鎖結合型および非結合型の構造が明らかにされている[6-9]。一方、L-type (leguminous-like) レクチンファミリーでは、これまでにラット由来ERGIC-53のCa²⁺結合型および非結合型、Emp46pのK⁺結合型および非結合型、Emp47pの金属非結合型の構造が明らかにされているが[10-12]、積み荷タンパク質および糖鎖との複合体構造は解析されていない。また近年、ERGIC-53の遺伝子変異により、糖タンパク質である血液凝固因子(第V因子および第VIII因子)の小胞体からゴルジ体への輸送に機能的障害を生じ、

血友病と同様の出血性症状を呈する疾病が引き起こされることが明らかにされた[13]。従って、これら輸送レクチンの立体構造研究は、糖タンパク質輸送に関わる疾患についての理解を深め、最終的にはその治療の道へと繋げるための重要な課題の一つである。高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所の若槻壮市教授を中心とする構造生物学研究センターのグループは、東京工業大学の山下克子教授、国立医薬品食品衛生研究所の袴田航主任研究官(現)日本大学生物資源科学部、専任講師)のグループとの共同研究で、VIP36と糖鎖との複合体の高分解能X線結晶構造解析に成功した[14]。本稿では、高分解能を示す単結晶が得られるまでの経緯も併せて、Ca²⁺依存性の輸送レクチンVIP36について紹介する。

2. VIP36の結晶化、回折データ収集および構造決定

イヌ由来のVIP36は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製を行った。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。まず最初に、ERGIC-53およびEmp46/47pの結晶構造[10-12]を基に糖鎖認識ドメイン(CRD)に対応する51-278残基を用いたコンストラクトを作成した。結晶は20°Cにおいて短時間で様々な結晶化条件で得られたものの(Fig. 1a)、いずれもモザイク性が高く多結晶であったため、回折データ収集に適したものではなかった。このコンストラクトを用い、さらに他の結晶化条件の検討を行ったが、いずれも全く改善は認められなかった。我々はこの実験と並行して、VIP36がC末端に短いstalkドメインを持つことから、CRDに加えて様々な長さのstalkドメインを持つコンストラクト(51-286, 51-295, 51-301, 51-322残基)を作成し、結晶化を試みていた。しかしながら、数週間に渡り4°Cおよび20°Cで仕込んだ結晶化プレートの観察を続けたが、結晶を確認することが出来なかった。4°Cで仕込んだ結晶



Figure 1
Crystals of VIP36. (a) The crystals of VIP36 CRD (residues 51-278). (b) The crystals of Ca^{2+} -bound VIP36 CRD with stalk domain (residues 51-301). (c) The crystals of $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_6$ -bound VIP36 CRD with stalk domain (residues 51-301). (d) The crystals of $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_6/\text{GlcNAc}$ -bound VIP36 CRD with stalk domain (residues 51-301). A black bar indicates 0.1 mm.

化プレート 20 枚、計 1920 条件を定期的に観察するのはハードな実験であったこと、CRD (51-278 残基) の結晶化条件の検討に重点を置いていたため、仕込んでから 1 ヶ月後の観察を怠っていた。その後、筆者は一向に改善されない CRD の結晶に嫌気がさし、 4°C で仕込んだ結晶化プレートを約 3 ヶ月ぶりに観察した。その結果、51-301 残基のコンストラクトのみにおいて、全く新しい条件で結晶らしき物体を発見し、その後結晶化条件の最適化を行ったところ、数日で美しい結晶を得る事が出来た (Fig. 1b)。ドメインの結晶化を進めるに当たって、筆者は教訓として「コンストラクトは削るだけでなく、延ばしたのもも試す」、「 4°C での結晶観察は怠らない」の 2 点を再認識させられた。ちなみに現在、高エネ研・構造生物学研究センターには低温室での結晶観察自動化装置が導入されており、タンパク質結晶の量産に役立っている。

VIP36 の Ca^{2+} 結合型の結晶は、PF-AR NW12A ビームラインを用いて 1.80 \AA 分解能で回折データを収集した。構造解析は、ERGIC-53 の Ca^{2+} 結合型の CRD をサーチモデルとして分子置換法で行った。空間群は $C2$ で、非対称単位中に 2 分子の VIP36 が存在していた。 Ca^{2+} 非結合型の結晶は、 Ca^{2+} 非存在下では結晶が全く得られなかったことから、 Ca^{2+} 結合型の結晶に 10 mM EDTA を浸漬して調製した。回折データは PF-AR NW12A を用いて 2.10 \AA 分解能で収集した。これまでに VIP36 は生化学的実験から N 型糖鎖の高マンノース型糖鎖、特に $\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man}$ 結合を多く持つ D1 アームを認識することが明らかにされている [15,16]。そこで我々は、高マンノース型糖鎖の D1 アームおよびその近傍の糖鎖構造に一致する様々な長さの種類糖鎖を用いて複合体の解析を行った。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mannose}$ (Man) 結合型は Ca^{2+} 結合型の結晶に 50 mM Man を浸漬して調製した。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man}$ (Man_2) および $\text{Ca}^{2+}/\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man-}\alpha\text{1.3-Man-}\beta\text{1.4-GlcNAc}$ ($\text{Man}_3/\text{GlcNAc}$) 結合型は、共結晶化 (モル比 1:10) により調製した (Fig. 1c, d)。一方、 $\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man-}\alpha\text{1.2-Man}$ 、 $\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man-}\alpha\text{1.3-Man}$ および $\text{Man-}\alpha\text{1.3-Man-}\beta\text{1.4-GlcNAc}$ 糖鎖を用いての共結晶化も試みたが、回折データの収集に適した結晶を得る事が出来なかった。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_2$ 結合型の格子常数は Ca^{2+} および $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}$ 結合型のものとほぼ同じであった。一方、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_3/\text{GlcNAc}$ 結合型の空間群および格子常数は Ca^{2+} および $\text{Ca}^{2+}/\text{Man}_2$ 結合型のものと全く異なっており、空間群は $P2_12_12_1$ で非対称単位中に 5 分子の VIP36 が存在して

いた (Table 1, Appendix 参照)。 $\text{Ca}^{2+}/$ 糖鎖結合型の回折データの収集は全て PF BL-5A で行った。Table 1 に結晶学的データ、回折データおよび精密化の統計値を示す。

3. 糖鎖認識ドメイン (CRD) と stalk ドメイン

VIP36 の CRD の全体構造は、L-type レクチンによく見られる凹型および凸型 β シートからなる β サンドイッチ構造から構成されていた (Fig. 2a)。ERGIC-53 および Emp46/47p の CRD と比較してみると、アミノ酸配列の同一性は 18-34% とさほど高くはないが、その全体構造はよく似ていた (root mean square deviation = $0.8\text{-}1.2 \text{ \AA}$)。一方 stalk ドメインは、大部分はループ構造からなり、二次

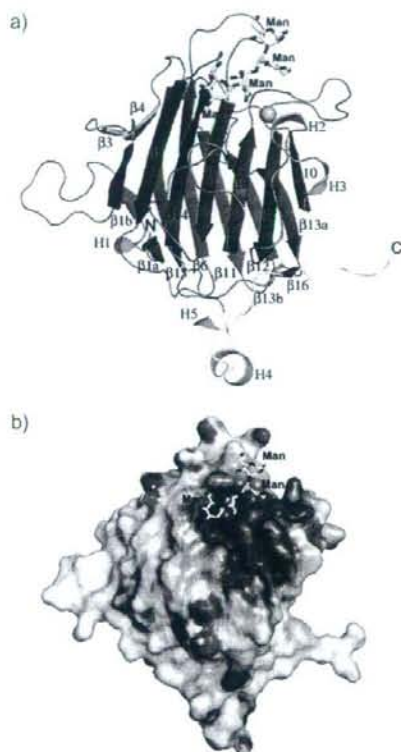


Figure 2
Overall structure of the exoplasmic/luminal domain of VIP36. The secondary structures are highlighted (β -strands belonging to the concave β -sheets, red; β -strands belonging to convex β -sheets, blue; β -strands belonging to β -hairpin, cyan; β -strands belonging to the short β -sheet formed between the stalk domain and one of the loops of the CRD, magenta; helices, green), and the loops of the CRD and stalk domain are colored gray and white, respectively. The bound Ca^{2+} is shown as a pink sphere. The bound oligomannoses are superimposed from the VIP36 complex structures with $\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man}$ (Man_2) and $\text{Man-}\alpha\text{1.2-Man-}\alpha\text{1.3-Man}$ (Man_3) and are shown as a yellow stick model. The reducing-end mannose residue in the Man_2 -bound form is omitted because its position is almost the same as that of the $\text{Man}_3/\text{GlcNAc}$ -bound form. The surface models (b) are shown in the same orientations as in (a) and colored according to the electrostatic surface potential (blue, positive; red, negative; scale from -10 to $+10 \text{ kT/e}$).

構造は α ヘリックス(H4)に続き、 3_{10} ヘリックス(H5)、CRDの β 13bと逆平行 β シートを形成する β ストランド(β 16)が存在していた。また Ca^{2+} および $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 結合型において、stalkドメインは結晶学的な対称分子と水素結合を介して相互作用し、主に逆平行 β シート(297-299残基)を形成していた。恐らくこのstalkドメインを介した結晶中での相互作用がVIP36結晶化成功の鍵であったと思われる。

ERGIC-53およびEmp46/47pのstalkドメインは約140-200残基からなり、coiled-coil構造を持つと推測され、多量体を形成することが明らかになっている[17,18]。一方、VIP36のstalkドメインは約40残基でERGIC-53やEmp46/47pのものと比較すると約100-160残基短く、coiled-coil構造を持たないと予想されている。また、超速心分析法および化学架橋剤を用いた実験から、VIP36は生体内において単量体で存在すると推測されている[19]。実際、我々もゲルろ過クロマトグラフィーによりVIP36が単量体で存在し、結晶構造解析によりstalkドメインの半分にあたる279-301残基はcoiled-coil構造を形成しないことを明らかにした。以上の結果から、生体内においてVIP36はERGIC-53やEmp46/47pとは異なり単量体で機能することが強く示唆された。

4. Ca^{2+} 依存的に糖鎖と結合

VIP36の Ca^{2+} 結合部位は、豆科レクチンやERGIC-53と同じ様に凹んだ β シート上の負に荷電したポケットに存在していた(Fig. 2b)。しかしながら、豆科レクチンやERGIC-53とは異なりVIP36の金属結合部位は Ca^{2+} の1箇所のみであった。豆科レクチンやERGIC-53では、VIP36で見られた Ca^{2+} 結合部位に加えて、2つ目の金属結合部位が存在する(Fig. 3)。豆科レクチンでは Mn^{2+} (S1)、ERGIC-53では Ca^{2+} (M1)がさらに結合し、1つ目の Ca^{2+} 結合部位(S2もしくはM2)の安定化に寄与しているが、それらの金属結合部位は豆科レクチンとERGIC-53間で保存されていない。豆科レクチンでは、1つ目の Ca^{2+} (S2)が糖鎖リガンドと相互作用するアミノ酸側鎖を固定させていることが結晶構造解析により明らかにされている[20]。VIP36は1分子の Ca^{2+} としか結合しない新奇のL-typeレクチンであると言える。

これまでで生化学的実験により、ERGIC-53およびVIP36は Ca^{2+} 依存性の輸送レクチンであることが示唆されている[16,21]、それらの詳細なメカニズムは明らかにされていない。そこで我々は、 Ca^{2+} 結合型に加えて Ca^{2+} 非結合型の構造解析を行い、 Ca^{2+} が結合することにより Ca^{2+} と(直接もしくは水分子を介して)結合しているAsp131, Asn166, His190の側鎖が動くことを明らかにした(Fig. 4)。後で詳しく述べるが、 Ca^{2+} 糖鎖結合型の構造では豆科レクチンで報告された構造の様に、 Ca^{2+} が糖鎖リガンドと相互作用するアミノ酸側鎖(Asp131, Asn166, His190)を固定させており(Fig. 5)、VIP36の Ca^{2+} 依存性の糖鎖認識メカニズムが詳細に明らかになった。

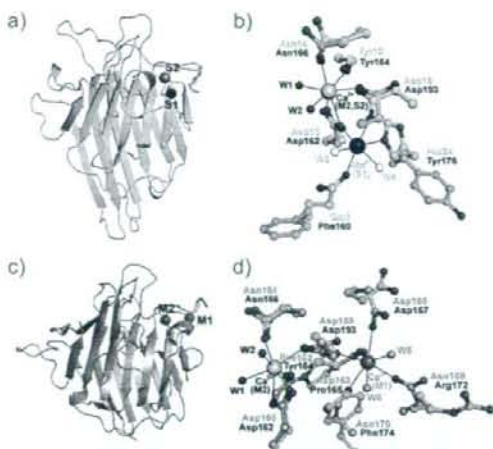


Figure 3

(a) Overall structure of ConA monomer. The bound Mn^{2+} (S1) and Ca^{2+} (S2) are shown as large black and gray spheres, respectively. (b) Comparison between VIP36 (green) and ConA (cyan) metal-binding site structures. Residues of VIP36 and ConA are labeled in black and cyan, respectively. The Ca^{2+} in VIP36 is shown as a large pink sphere. Because the position of Ca^{2+} at the S2 site in ConA is almost the same as in VIP36, it is not shown. Water molecules found in the S1 site of ConA are shown as small white spheres and are labeled W3 and W4. (c) Overall structure of ERGIC-53 CRD. The bound Ca^{2+} are shown as large magenta spheres (M1 and M2). Because the position of Ca^{2+} at the M2 site in ERGIC-53 is almost the same as in VIP36, it is not shown. Water molecules found in the M1 site of ERGIC-53 are shown as small orange spheres and are labeled W5 and W6. Residues involved in the metal binding are shown as ball-and-stick models.

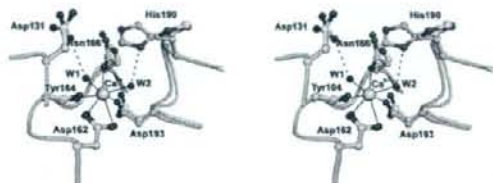


Figure 4

Ca^{2+} -binding site and its conformational changes upon Ca^{2+} binding of VIP36. The Ca^{2+} -bound and metal-free structures are shown in stereo and colored in green and cyan, respectively. Residues coordinating Ca^{2+} and those with notable conformational changes are shown in ball-and-stick models. Water molecules are labeled W1 and W2. Ca^{2+} -coordinating bonds are solid lines, and hydrogen bonds are dotted lines.

5. 高マンノース型糖鎖のD1アームを特異的に認識

これまでの生化学的実験により、VIP36が高マンノース型糖鎖のD1アームを認識することが明らかにされている[15,16]。そこで我々は高マンノース型糖鎖のD1アームおよびその近傍の糖鎖構造に一致するMan, Man₂およびMan,GlcNAc結合型の立体構造解析を行った。Man,GlcNAc結合型では、VIP36はGlcNAc残基を認識していないため、電子密度は観測されなかった。糖鎖リガンドは、予

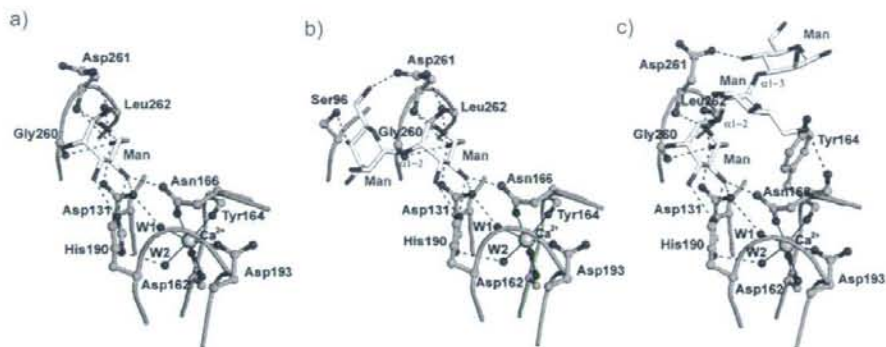


Figure 5

Carbohydrate ligand-binding site of VIP36. (a) Structure of mannose and Ca^{2+} -binding site of VIP36. (b) Structure of $\text{Man-}\alpha\text{-1,2-Man}$ (Man_2) and Ca^{2+} -binding site of VIP36. (c) Structure of $\text{Man-}\alpha\text{-1,2-Man}$ (Man_2) and Ca^{2+} -binding site of VIP36. The bound carbohydrate residues are shown as yellow stick models. Residues of VIP36 binding to the ligands are shown in ball-and-stick models.

想通り豆科レクチンで報告されている構造の様に凹んだ β シート上の Ca^{2+} に近接したポケットに結合していた (Fig. 2)。 Man 結合型の糖結合サイトは、 Man_2 および $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ 結合型の構造でも共通して存在しており、アミノ酸残基との相互作用が最も多く観測された (Fig. 5)。この糖結合サイトは、 Ca^{2+} と結合している Asp131, Asn166, His190 の側鎖および Gly260, Asp261, Leu262 の主鎖から構成されていた。以上3種の糖鎖との複合体と生化学的データの結果を併せて考察すると、VIP36は Ca^{2+} 依存的に高マンノース型糖鎖のD1アームに一致する $\text{Man-}\alpha\text{-1,2-Man-}\alpha\text{-1,2-Man}$ という糖鎖構造を厳密に認識していることが明らかになった。また、この結果に基づきVIP36と高マンノース型糖鎖 ($\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$)との複合体モデルを作製したところ、VIP36とD1アーム以外の糖鎖との間に目立った立体障害がないことが確認された (Fig. 6a)。

通常高マンノース型糖鎖のD1アームは細胞内小器官のシスゴルジにおいて、ゴルジマンノシダーゼIによりトリミングされることが知られている。従って、VIP36はトランスゴルジネットワークに輸送される積み荷タンパク質を輸送する場合、積み荷タンパク質の高マンノース型糖鎖のD1アームと結合することでゴルジマンノシダーゼIによるトリミングを回避しながら、目的地に運ぶことが考えられる。一例として、積み荷タンパク質の一つとして明らかにされている唾液 α アミラーゼとVIP36の複合体モデルを示す (Fig. 6b)。輸送レクチンVIP36は糖鎖を荷札にして、このように膜の上で結合して目的地に積み荷タンパク質を輸送させると考えられる。

我々の報告 [14] とほぼ同時に、東京大学大学院新領域創成科学研究科の山本一夫教授らのグループにより、VIP36の新たな相互作用分子BiPが同定された [22]。BiPは小胞体分子シャペロンの一つで、その報告によるとVIP36とBiPは糖鎖を介さないタンパク質・タンパク質の相互作用で結合し、小胞体において共局在することが示さ

れている。今後、VIP36の様々な細胞を用いた細胞内局在の解析、更なる積み荷タンパク質の同定およびその糖鎖構造の解析により、VIP36による高マンノース型糖タンパク質の輸送メカニズムの理解がさらに深まることが期待される。

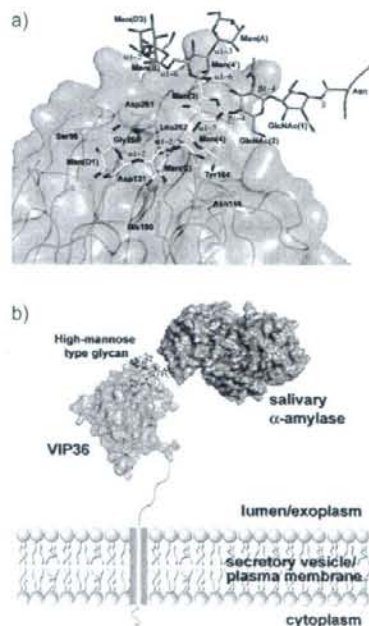


Figure 6

Model for binding between VIP36 and high mannose type glycan ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$). (a) The high mannose type glycan is indicated by a stick model. In the oligosaccharide, the part determined in this study is colored in yellow. The modeled D2 and D3 arms and N-linked chitobiose moiety of the high mannose type glycan are shown in purple. The types of glycosidic linkages are also indicated. Residues involved in the ligand binding are shown as ball-and-stick models. (b) Model for binding between VIP36 and salivary α -amylase carrying $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ in rat secretory vesicles.

謝辞

PF BL-5A, BL-6A および PF-AR NW12A での回折データ収集にあたり、ご協力頂いた PF ビームラインスタッフの方々に心より感謝致します。なお本研究の一部はタンパク 3000 プロジェクトの研究助成により進められた。

引用文献

- [1] M. J. Kuehn, J. M. Herrmann, and R. Schekman, *Nature* **391**, 187 (1998).
- [2] W. J. Belden, and C. Barlowe, *Science* **294**, 1528 (2001).
- [3] P. Ghosh, N. M. Dahms, and S. Korfeld, *S. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202 (2003).
- [4] K. Fiedler, and K. Simons, *Cell* **77**, 625 (1994).
- [5] K. Sato, and A. Nakano, *Mol. Biol. Cell* **13**, 2518 (2002).
- [6] D. L. Roberts, D. J. Weix, N. M. Dahms, and J. J. Kim, *Cell* **93**, 639 (1998).
- [7] L. J. Olson, J. Zhang, N. M. Dahms, and J. J. Kim, *J. Biol. Chem.* **277**, 10156 (2002).
- [8] L. J. Olson, R. D. Yammani, N. M. Dahms, and J. J. Kim, *EMBO J.* **23**, 2019 (2004).
- [9] L. J. Olson, N. M. Dahms, and J. J. Kim, *J. Biol. Chem.* **279**, 34000 (2004).
- [10] L. M. Velloso, K. Svensson, G. Schneider, R. F. Pettersson, and Y. Lindqvist, *J. Biol. Chem.* **277**, 15979 (2002).
- [11] L. M. Velloso, K. Svensson, R. F. Pettersson, and Y. Lindqvist, *J. Mol. Biol.* **334**, 845 (2003).
- [12] T. Satoh, K. Sato, A. Kanoh, K. Yamashita, Y. Yamada, N. Igarashi, R. Kato, A. Nakano, and S. Wakatsuki, *J. Biol. Chem.* **281**, 10410 (2006).
- [13] W. C. Nichols, U. Seligsohn, A. Zivelin, V. H. Terry, C. E. Hertel, M. A. Wheatley, M. J. Moussalli, H. P. Hauri, N. Ciavarella, R. J. Kaufman, and D. Ginsburg, *Cell* **93**, 61 (1998).
- [14] T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, and S. Wakatsuki, *J. Biol. Chem.* **282**, 28246 (2007).
- [15] S. Hara-Kuge, T. Ohkura, A. Seko, and K. Yamashita, *Glycobiology* **9**, 833 (1999).
- [16] Y. Kamiya, Y. Yamaguchi, N. Takahashi, Y. Arata, K. I. Kasai, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, K. Yamamoto, and K. Kato, *J. Biol. Chem.* **280**, 37178 (2005).
- [17] K. Sato, and A. Nakano, *Mol. Biol. Cell* **14**, 3055 (2003).
- [18] E. P. A. Neve, U. Lahtinen, and R. F. Pettersson, *J. Mol. Biol.* **354**, 556 (2005).

- [19] K. Fiedler, and K. Simons, *J. Cell Sci.* **109**, 271 (1995).
- [20] J. M. Rini, K. D. Hardman, H. Einspahr, F. L. Suddath, and J. P. Carver, *J. Biol. Chem.* **268**, 10126 (1993).
- [21] C. Appenzeller-Herzog, A. C. Roche, O. Nufer, and H. P. Hauri, *J. Biol. Chem.* **279**, 12943 (2004).
- [22] D. Nawa, O. Shimada, N. Kawasaki, N. Matsumoto, and K. Yamamoto, *Glycobiology* **17**, 913 (2007).

(原稿受付日: 2007年11月15日)

著者紹介

佐藤匡史 (Tadashi SATOH)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・博士研究員(産学連携), 博士(生物資源科学)(現)米国 National Institutes of Health・National Cancer Institute-Frederick・Postdoctoral Visiting Fellow

e-mail: tadashi.satoh@kek.jp, satoh@mail.nih.gov

略歴: 平成 10 年日本大学農獣医学部卒業, 平成 12 年日本大学大学院農学研究科修士課程修了, 平成 15 年日本大学大学院生物資源科学研究科博士後期課程修了, 平成 15 年 4 月より高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・博士研究員(産学連携), 平成 19 年 9 月より米国 National Institutes of Health・National Cancer Institute-Frederick・Macromolecular Crystallography Laboratory・Postdoctoral Visiting Fellow

最近の研究: 糖鎖修飾と細胞内タンパク質輸送の構造生物学に関する研究。

趣味: サッカー(トップ・オフエンシブハーブ)

加藤龍一 (Ryuichi KATO)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・准教授, 理学博士

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-6177

FAX: 029-879-6179

e-mail: ryuichi.kato@kek.jp

若槻壮市 (Soichi WAKATSUKI)

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・教授, Ph.D.

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-5631

FAX: 029-879-6179

e-mail: soichi.wakatsuki@kek.jp

(Appendix)

Table 1. Data collection and refinement statistics of VIP36

Crystallographic data	VIP36	VIP36/Ca ²⁺	VIP36/Ca ²⁺ /Man	VIP36/Ca ²⁺ /Man, C2	VIP36/Ca ²⁺ /Man,GlcNAc P2,2,2,
Data set	VIP36	VIP36/Ca ²⁺	VIP36/Ca ²⁺ /Man	VIP36/Ca ²⁺ /Man, C2	VIP36/Ca ²⁺ /Man,GlcNAc P2,2,2,
Space group	C2	C2	C2	C2	P2,2,2,
Unit cell					
<i>a</i> / <i>b</i> / <i>c</i> (Å)	171.0/45.2/117.1	170.1/45.4/116.1	171.2/45.0/117.0	171.2/45.5/117.4	57.2/151.2/177.1
α / β / γ (°)	90.0/132.6/90.0	90.0/131.5/90.0	90.0/131.9/90.0	90.0/132.7/90.0	90.0/90.0/90.0
Data processing statistics					
Beam line	PF-AR NW12A	PF-AR NW12A	PF BL-5A	PF BL-5A	PF BL-5A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Resolution (Å)	50-2.10 (2.18-2.10)	50-1.80 (1.86-1.80)	50-1.80 (1.86-1.80)	50-1.65 (1.71-1.65)	50-2.50 (2.59-2.50)
Total reflections	128 308	228 854	191 856	283 509	350 729
Unique reflections	38 945	62 420	62 207	80 482	54 228
Completeness (%)	93.7 (78.9)	97.8 (97.1)	96.1 (84.5)	98.4 (91.1)	99.9 (100.0)
<i>R</i> _{merge} (%)	8.3 (31.4)	5.9 (38.5)	9.9 (28.2)	5.1 (28.6)	13.3 (37.6)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	13.4 (3.7)	14.6 (3.1)	9.1 (2.9)	14.4 (3.4)	8.8 (5.8)
Refinement statistics					
Resolution (Å)	20 - 2.10	20 - 1.80	20 - 1.80	20 - 1.65	20 - 2.50
<i>R</i> _{work}	22.5	20.5	20.6	19.9	22.1
<i>R</i> _{free}	27.8	24.1	24.5	22.8	27.9
R.m.s.d. from ideal values					
Bond length (Å)	0.012	0.012	0.011	0.011	0.013
Angle distance (Å)	1.34	1.33	1.33	1.32	1.41
Ramachandran plot (%)					
Most favored	87.5	88.1	89.0	88.5	86.6
Additionally allowed	11.8	11.4	10.5	10.8	13.3
Generously allowed	0.7	0.5	0.5	0.7	0.1
Number of molecules and atoms					
Protein atoms	3913	3957	3974	4071	9617
Water molecules	194	421	429	418	66
Ca ²⁺ ions	0.5	2	2	2	5
Cl ions	4	11	13	8	
Glycerol atoms	18			12	
Sugar atoms			24	46	80
Average <i>B</i> _{iso} (Å ²)					
Protein atoms	32.3/46.6	21.2/28.1	24.4/29.5	22.9/32.0	24.0/28.9/23.8/ 26.5/36.7
(A/B/C/D/E chain)					
Water molecules	36.5	29.9	32.9	33.4	20.6
Ca ²⁺ ions	33.4	23.5	21.8	20.0	25.4
Cl ions	44.0	29.4	32.0	33.5	
Glycerol atoms	47.9			33.1	
Sugar atoms			23.0	27.6	39.5

藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感 光合成明・暗反応の同時促進は可能か

光合成は陸上植物をはじめ藻類や一部のバクテリアで行なわれている。近年、光合成の増感、生物資源や食糧の増産、バイオ燃料生産用の植物生産、さらに生物を用いた二酸化炭素の固定による温暖化抑制などの点から注目が高まってきている。

遺伝子組換えによる光合成の増強の研究は、暗反応(カルビン・ベンソン回路)については、他の生物のより優れた特性をもつ酵素遺伝子の導入を試みた報告が多数あるが、成功例はきわめて少ない。たとえば、トウモロコシの酵素遺伝子をイネ⁽¹⁾に導入した例や、バクテリアの酵素遺伝子をタバコ⁽²⁾に導入した例が報告されている。一方、明反応の増強については、フェレドキシン-NADPH還元酵素の高発現についての報告⁽³⁾がある程度で、明反応生成物の中心となるATPの増強の報告は見あたらない。その第一の理由は、図1に示した高等植物における明反応のチラコイド膜中の電子伝達を行なうタンパク質複合体の一種である光化学系II(PSII)複合体、プラストキノン(PQ)、シトクロム(Cyt) b_6/f 複合体、光化学系I(PSI)複合体が巨大分子であるために、それらの単離や解析が難しく、部分構造を除いて立体構造が未解明だからである。ただ、下等生物の光合成細菌の反応中心については1980年代にMichelら(1988年ノーベル賞)によってX線結晶構造解析が行なわれており、この結果が植物の電子伝達系を検討する際によく

参考にされている。第二の理由は、これらチラコイド膜貫通タンパク質複合体を遺伝子組換えによって膜中に発現させることが未だ不可能であることなどである。

生物の生育環境と進化に目を向けてみると、バクテリアや緑藻においては、図1のCyt b_6/f と光化学系Iの間の電子伝達を行なうのはプラストシアニン(PC)またはCyt c_6 であり、紅藻ではCyt c_6 のみである。一方、緑藻から進化して陸に上がったと考えられている陸上植物ではPCのみが電子伝達体として機能しており、Cyt c_6 遺伝子は進化の過程で欠落したと推定されてきた。

ところが2002年に、Cyt c_6 に類似する遺伝子が、高等植物のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)⁽⁴⁾や他の生物においても確認された(植物中でのそのタンパク質の発現は確認されていない)。新たに確認されたCyt c_6 様タンパク質は、バクテリアや藻類のCyt c_6 とアミノ酸配列で比較すると共通して12個のアミノ酸残基の挿入が明らかとなり、Cyt c_{6A} と名付けられた。しかし、その電子伝達能の有無については意見が二分されてきた。筆者らがシロイヌナズナのCyt c_{6A} 遺伝子から大腸菌でそのリコンビナントをつくり、他の藻類のCyt c_6 と比べてところ、Cyt c_{6A} は図2に示すように、12残基のアミノ酸ストレッチを有しており、酸化還元電位がきわめて低いために光合成電子伝達体として機能できないことがわかり⁽⁵⁾、Cyt c_6 遺伝子の植物への導入実験の必要性が

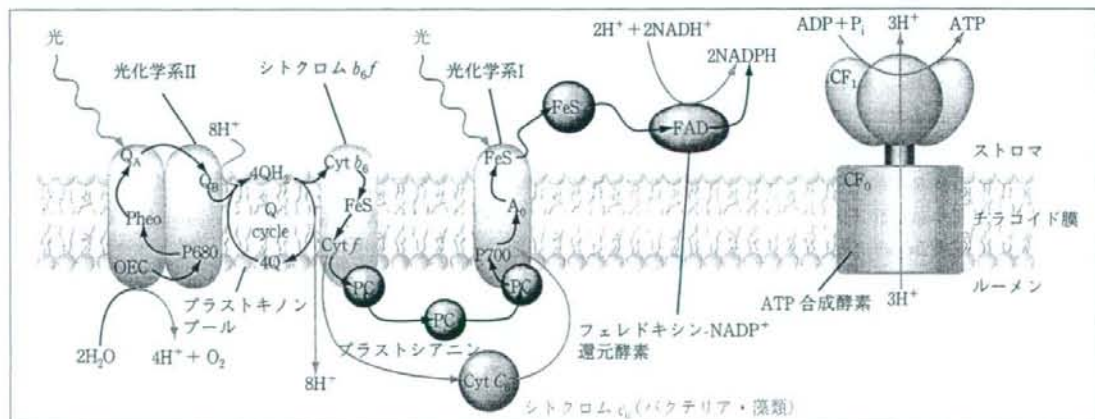


図1 ■ 植物の光合成明反応

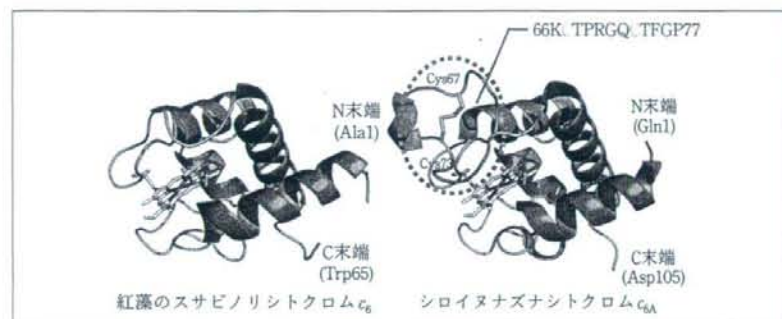


図2 ■ シトクロム c_6 とシトクロム c_{6A} との立体構造比較

クローズアップされた。Cyt c_{6A} 遺伝子の植物中での役割は不明であるが、ジスルフィド結合をもつことなどから、筆者らは植物体の防御に関わる遺伝子かもしれないと考えている。

Cyt c_6 と PC は図1の光合成電子伝達系で同じ機能を有するが、アミノ酸配列や構造はまったく異なる。しかし、興味深いことに、両タンパク質は、分子量（～10 kDa）、酸化還元電位 (E_m : 330～380 mV) および等電点 (pI : ～5.5) がほぼ類似している。また、両者は、上流および下流のタンパク質と相互作用するパートナーを認識するための酸性パッチや疎水性領域を表面に形成し、よく保存されている。これらの事実から、Cyt c_6 も高等植物由来の Cyt b_6/f (図1参照) および PSI と静電的相互作用する可能性は大であると筆者らは考え、「バクテリアや藻類の Cyt c_6 を陸上植物で発現させることができれば、光合成能を高めた植物体の作出が可能であるかもしれない」と着想した。

まず、シロイヌナズナの PC と PSI を調製し、これにキセノンフラッシュ照射し、電子伝達が正確に行なわれることを確認した。同様に、紅藻の一種スサビノリの Cyt c_6 とシロイヌナズナ PSI について、シロイヌナズナの PC の場合と同一モル数で比較したところ、電子伝達速度は Cyt c_6 が数倍速い結果を示した。すなわち、紅藻スサビノリの Cyt c_6 は優れた電子伝達分子であることが判明した⁽⁶⁾。

次に、本命であるシロイヌナズナにスサビノリの Cyt c_6 遺伝子を形質転換させる *in vivo* の実験を行なった⁽⁶⁾。その結果、60日目のデータによれば、形質転換体の背丈、葉丈、根長は、野生株のそれぞれ1.3、1.1、1.3倍と有意な差が認められた。成分の変化については、ATP および NADPH 量は野生株の1.9と1.4倍であった。これは、

Cyt c_6 遺伝子の導入により、光合成電子伝達系および光リン酸化反応が増強されたこと、すなわち明反応が促進されたことを示している。一方、クロロフィル量、デンプン量、総タンパク質量など暗反応に関わる成分については、いずれも野生株の1.2倍であった。さらに、光合成能を比べたところ、形質転換株および野生株間の飽和光下における量子収率（光子が吸収されたときの蛍光となって光子が放出される確率）、生育光下における PSII の量子収率、および PSII における熱放散の割合には変化がないが、光合成電子伝達系全体の電子伝達速度は2.4%増加し、PQ プールにおける還元型 PQ の量は30%減少していた。これらの結果は、スサビノリ Cyt c_6 遺伝子のシロイヌナズナへの導入が、光合成電子伝達系の律速段階である還元型 PQ から Cyt b_6/f への電子伝達量を効率よく促進させ、全体の光合成電子伝達効率を増加させ、同時にデンプン合成などの暗反応も促進させたことを示している。

上記の光合成明反応の増強実験では、結果的に暗反応も促進されていたが、今後、種々の植物で同様の検討を試みる必要があり、本研究の光合成電子伝達を進化と構造生物学から取り組む着想が生物資源の増産や二酸化炭素固定促進の糸口の一つになればと考えている。

- 1) M. S. B. Ku, S. Agarie, M. Nomura, H. Fukayama, H. Tsuchida, K. Ono, S. Hirose, S. Toki, M. Miyao & M. Matsuoka: *Nature Biotechnology*, 17, 76 (1999).
- 2) Y. Miyagawa, M. Tamoi & S. Shigeoka: *Nature Biotechnology*, 19, 965 (2001).
- 3) R. E. Rodriguez, A. Lodeyro, H. O. Poli, M. Zurbriggen, M. Peisker, J. F. Palatnik, V. B. Tognetti, H. Tschiersch, M.-R. Hajirezaei, E. M. Valle & N. Carrillo: *Plant Physiology*, 143, 639 (2007).
- 4) R. Gupta, Z. He & S. Luan: *Nature*, 417, 567 (2002).
- 5) H. Chida, T. Yokoyama, F. Kawai, A. Nakazawa, H. Akazaki, Y. Takayama, T. Hirano, K. Suruga, T. Satoh,

S. Yamada, R. Kawachi, S. Unzai, T. Nishio, S. Y. Park & T. Oku: *FEBS Lett.*, 58, 3763 (2006).

- 6) H. Chida, T. Yokoyama, F. Kawai, A. Nakazawa, H. Akazaki, Y. Takayama, T. Hirano, K. Suruga, T. Satoh, S. Yamada, R. Kawachi, S. Unzai, T. Nishio, S. Y. Park

& T. Oku: *Plant Cell Physiol.*, 48, 948 (2007).

(奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航, 日本大学大学院生物資源科学研究科)

小胞体 Ca^{2+} 放出を支える TRIC チャンネル カウンターイオンチャンネルの発現

細胞の主要なオルガネラである小胞体には、タンパク質の修飾や各種代謝など様々な機能が知られている。中でも、細胞内 Ca^{2+} ストアとして必要に応じて細胞質へ Ca^{2+} を放出する機能は、最も普遍的な機能の一つである。小胞体から放出された Ca^{2+} は、筋収縮、神経活動、免疫応答、細胞増殖や細胞死など、多彩な細胞機能を制御している。細胞内の主要な無機イオンは Na^+ , K^+ , Cl^- であり、 Ca^{2+} 濃度はそれらの 1/100 程度に過ぎない。細胞質の Ca^{2+} 濃度は 100 nM 程度に抑えられ、小胞体内腔には 0.5~1 mM 程度になっている。小胞体内腔と細胞質の間では主要無機イオンの分布に偏りが認められず、 Ca^{2+} については約 10^4 倍の濃度差があるものの、小胞体には極端な電位差や浸透圧は存在しないと考えられている^(1,2)。

小胞体上の Ca^{2+} 放出チャンネルが開くと、圧倒的な濃度勾配を利用して Ca^{2+} が放出される。しかし、 Ca^{2+} はプラス荷電している陽イオンであるため、 Ca^{2+} 放出と同時に内腔側がマイナス荷電することになる。 Ca^{2+} 放出領域の内腔側に負の膜電位が発生すると、それ以上の Ca^{2+} の放出が電気的に妨げられることになる。したがって、効率的な Ca^{2+} 放出が成立するために

は、膜電位の発生と同時にそれを中和する仕組みが必要であると推論される(図 1-A)。この考察に基づいて仮想されたカウンターイオンチャンネルは、 Ca^{2+} 放出と同調して陽イオンを内腔へ導く(または陰イオンを細胞質へ導く)チャンネルと規定される^(3,4)。その実体は長い間不明であったが、筆者らのチームにより発見された TRIC チャンネル (trimeric intracellular cation channel: 三量体の細胞内陽イオンチャンネル) が、少なくとも筋細胞でカウンターイオンチャンネルとして機能していることが判明した⁽⁵⁾。

筆者の研究室では、小胞体 Ca^{2+} シグナリングに関わると推定されるタンパク質を、単クローン抗体、シグナル配列トラップ法や密度勾配遠心による膜分画法などを駆使して検索している。この分子検索の中で、約 300 アミノ酸により構成される TRIC チャンネル A 型と B 型と命名した 2 つの相同な膜タンパク質が見いだされた。A 型は神経・筋組織に主に分布し、B 型はほぼすべての組織に発現している。疎水性プロット解析からは、TRIC チャンネルは複数回にわたり小胞体膜を貫通することが推定され、生化学実験により 3 本の膜貫通セグメントがその分子内に予想された(図 1-B)。また、TRIC チャンネル

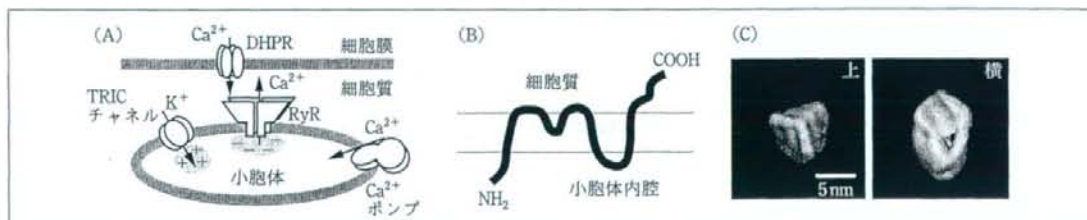


図 1 ■ 心筋細胞における小胞体 Ca^{2+} 放出と TRIC チャンネル

(A) 心筋細胞の収縮では、細胞膜上のジヒドロピリジン感受性 Ca^{2+} チャンネル (DHPR) が膜電位上昇を感じて開口し、それに伴い発生する Ca^{2+} 流入が引き金となりリアノジン受容体チャンネル (RyR) が開口し、小胞体から Ca^{2+} が放出される。TRIC チャンネルは、 Ca^{2+} 放出により発生する小胞体内腔側の荷電を K^+ 流入により中和して、リアノジン受容体チャンネルの Ca^{2+} 放出機能を支える役割を有すると思われる。一方、細胞質に放出された Ca^{2+} は、 Ca^{2+} ポンプの働きにより、再び小胞体内に汲み上げられる。(B) 生化学的実験結果から、図示した TRIC チャンネルの小胞体膜貫通様式が推定される。(C) 精製した試料の電子顕微鏡像から TRIC チャンネルの三次元像を再構築し、その上方と側面からの観察像を図示した。



The 2 α -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D₃ analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu)

Shinobu Honzawa,^{a,†} Yasuhiro Yamamoto,^a Atsushi Yamashita,^b Takayuki Sugiura,^b Masaaki Kurihara,^c Midori A. Arai,^a Shigeaki Kato^d and Atsushi Kittaka^{a,*}

^aDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Kanagawa 229-0195, Japan

^bDepartment of Hygienic Chemistry and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Kanagawa 229-0195, Japan

^cNational Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^dInstitute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-0032, Japan

Received 19 November 2007; revised 18 December 2007; accepted 19 December 2007

Available online 14 January 2008

Abstract—We designed and synthesized 1 α - and 1 β -hydroxymethyl-2 α -(3-hydroxypropyl)-25-hydroxyvitamin D₃ (**2a,b**) and related analogues 2 α -(3-hydroxypropyl)-25-hydroxyvitamin D₃ (**3**), Posner's analogues of 1 α - and 1 β -hydroxymethyl-25-hydroxyvitamin D₃ (**4a,b**), as well as 2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (**5**), to confirm the effect of the 1 α -hydroxy group and/or 2 α -(3-hydroxypropyl) group of vitamin D₃ analogues with the modified A-ring moiety on the mutant vitamin D receptor, VDR(Arg274Leu). The 2 α -(3-hydroxypropyl) group showed better effect on enhancement of the transcriptional activity through the mutant VDR than the 1 α - and 1 β -hydroxymethyl groups.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃, **1**) has drawn the attention of many researchers in academia and industry, because of its wide variety of biological and pharmacological activities.¹ It is well known that **1** regulates calcium and phosphate homeostasis together with parathyroid hormone (PTH) and calcitonin, and its deficiency causes osteomalacia or rickets. 1 α ,25(OH)₂D₃ has also been shown to influence cell differentiation and growth, and **1** and its analogues have been investigated as drugs for diseases such as cancer, psoriasis, immunodeficiency, and so on. Many of the functions of **1** are mediated through binding to a specific nuclear receptor, the vitamin D receptor (VDR), which is a member of steroid-thyroid hormone receptor superfamily.² These receptors act as transcription factors, which activate or suppress gene transcription in response to intra- or

extracellular stimuli in a ligand-dependent fashion. X-ray crystal structure analysis³ shows that **1** is anchored in the ligand binding domain (LBD) of the VDR through hydrogen bonds between hydrophilic amino acid residues and three hydroxy groups of **1**, that is, 1 α -OH, 3 β -OH, and 25-OH (Fig. 1). It seems reasonable that the substitution of one or more of these amino acids would reduce the affinity of **1** for the VDR. A rare genetic disease called hereditary vitamin D resistant rickets (HVDRR) has been clinically recognized to occur resulting from mutations of VDR.⁴ Mutations appear in every part of the receptor, and two mutations that relate to hydrogen bond formation are known so far (His305Gln and Arg274Leu), the latter showing severe rickets. Arg274 forms hydrogen bond with 1 α -OH (Fig. 1), and its substitution with hydrophobic Leu leads to detrimental loss of the affinity for **1** (ca. 1/1000 against the wild type receptor).⁵ To overcome the low activity of **1** in the mutant receptor, two research groups have reported vitamin D analogues designed for the mutant receptor. Koh et al. reported 1 α -O-benzylated analogues in which *O*-benzyl groups were expected to compensate for the loss of affinity by new hydrophobic interactions through the benzyl group and the resulting hydrophobic pocket of the mutant receptor.⁶ Posner and co-workers

Keywords: Vitamin D analogues; Vitamin D receptor; Mutant vitamin D receptor; Structure–function relationships.

* Corresponding author. E-mail: akitaka@pharm.teikyo-u.ac.jp

[†] Present address: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences (NUPALS), Niigata 956-8603, Japan.

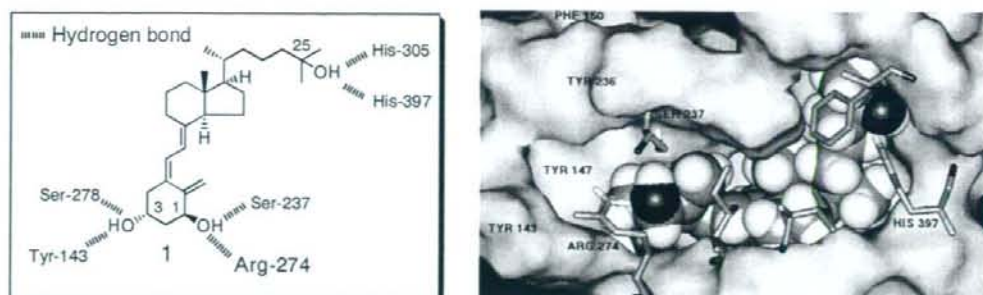


Figure 1. Crystal structure of VDR bound to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1) by D. Moras and co-workers³.

showed that 1-hydroxymethylated analogue has improved the vitamin D action by the mutant receptor,⁷ but this restoration effect was brought about by double modification, because the side chain was also changed. In order to confirm the effect of the 1α -hydroxymethyl group on the mutant receptor, and to increase the activities of the analogues further, we designed analogues that have 2α -(3-hydroxypropyl) group, a functional group has been found in our laboratory to potentiate the vitamin D action,^{8,9} with or without a 1α -hydroxymethyl group (Fig. 2). Our group has already reported that 2α -(3-hydroxypropyl)- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (5) could act as a ligand for a mutant VDR(Arg274Ala), which was an artificial mutant related to the mutant VDR(Arg274Leu).¹⁰ In the LBD of the VDR, there is a water channel connecting the A-ring part of the LBD to the surface of the VDR and forming a network of hydrogen bonds.³ The 2α -substituent affects the presence and/or the location of the water molecules in the channel, and X-ray crystal structure demonstrated that the terminal hydroxy group of 5 acts as one of the water molecules to form hydrogen bonds with Arg274 and the other water molecule located in the ligand binding pocket (LBP) to organize the network and to enhance the binding affinity for the VDR.¹¹

2. Results and discussions

2.1. Synthesis

Retrosynthetic analysis of the vitamin D derivatives, 2a,b and 4a,b, is shown in Scheme 1. The strategy was to use the palladium-catalyzed coupling reaction

of CD-ring precursor bromoolefin 6 and A-ring synthon enynes reported by Trost et al.¹² The CD-ring precursor 6 could be prepared from vitamin D_3 ,¹³ and A-ring enynes were synthesized from D-glucose. Our synthetic procedure reported recently¹³ was modified in order to introduce hydroxymethyl group into the 1-position of vitamin D_3 framework. As shown in Scheme 2, the known sugar epoxide 7¹⁴ reacted with allylmagnesium chloride in THF to give allyl substituted compound in good yield. The resulting secondary hydroxy group was silylated, and then the terminal alkene was hydroborated, and oxidative workup furnished primary alcohol, which was protected as pivalate to give 8. Stereoselective reductive ring opening reaction of benzyldene acetal was carried out by using TFA- Et_3SiH in the presence of molecular sieves 3A.¹⁵ Secondary alcohol 9 was oxidized by TPAP-NMO, and then Lombardo methylation¹⁶ proceeded in good yield to give 10. Hydroboration of *exo*-methylene group was carried out with $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, and then oxidative workup gave a diastereomeric mixture of primary alcohols (ratio 1.3:1), which could be separated at this stage by silica gel flash column chromatography. Each isomer was transformed in the following scheme in diastereomerically pure form. The primary hydroxy group was protected as the pivalate (11a,b), and benzyl ether was converted to the mesylate (12a,b), which was subjected to a nucleophilic bromination reaction. Reductive ring opening of the bromo ether (13a,b) gave the primary alcohol (14a,b), which upon treatment with TsCl followed by TBAF furnished the epoxide (15a,b) in good yield. Addition of lithium acetylide to the epoxide and methanalysis of the pivalate gave the triol, which was pro-

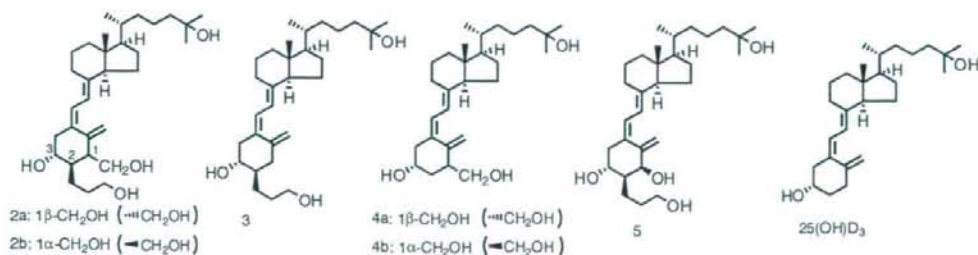
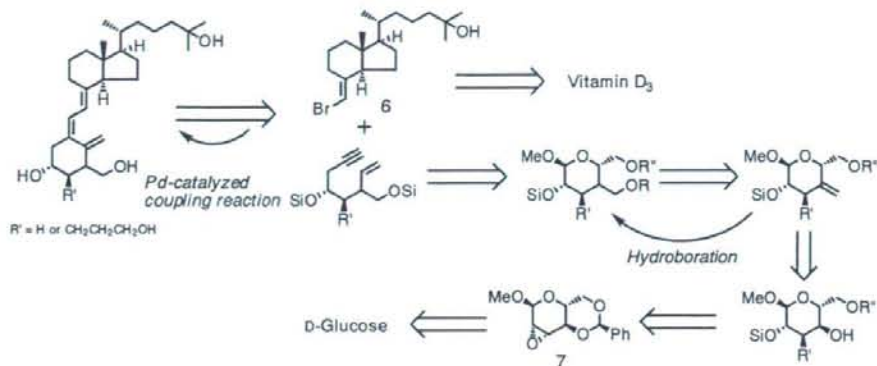
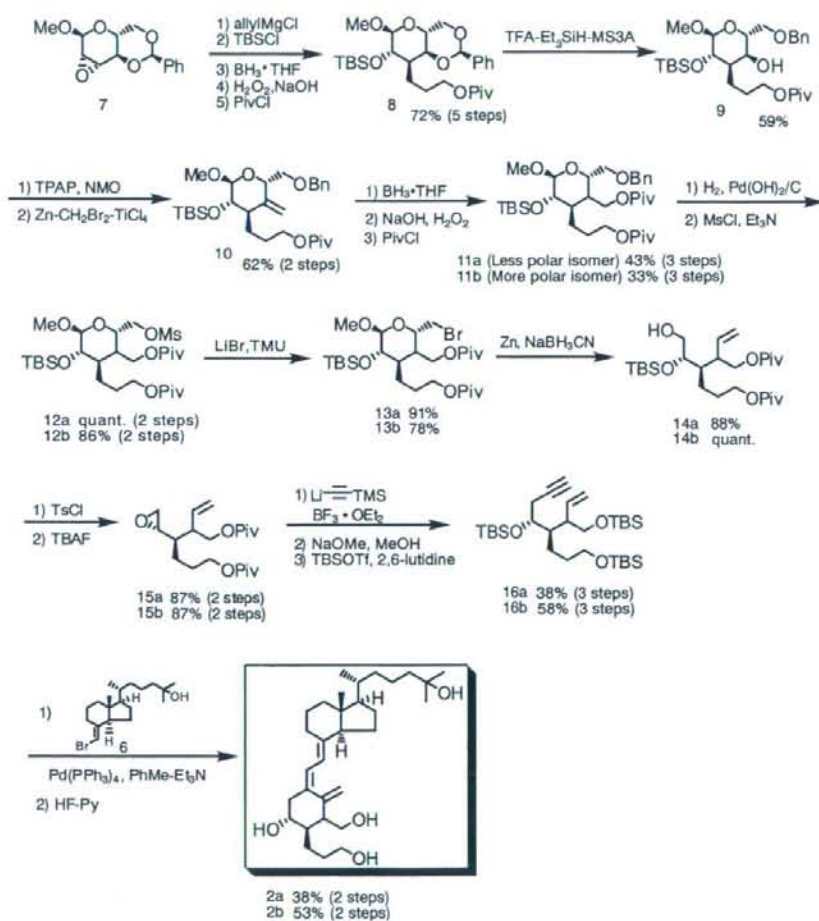


Figure 2. Structures of vitamin D_3 analogues tested.



Scheme 1. Retrosynthetic analysis of 1-hydroxymethylated analogues.



Scheme 2. Synthesis of 1 α - and 1 β -hydroxymethyl-2 α -(3-hydroxypropyl)-25-hydroxyvitamin D₃ analogues **2a** and **2b**.

ected as the TBS ether (**16a,b**). Trost coupling reaction of the A-ring enyne (**16a,b**) and the CD-ring bromoolefin **6**, followed by deprotection of the TBS groups, gave the desired analogues (Scheme 2).

The stereochemistry at the 1-position could be determined by 2D NMR (HH-COSY) and NOE experiments for **2b** that was derived from **11b** (more polar isomer). NOE enhancement was observed between 3-H and meth-

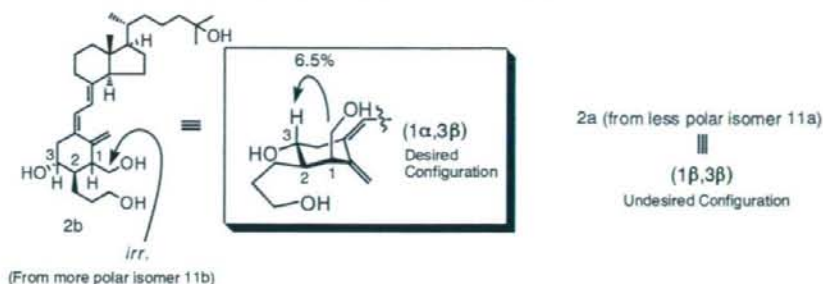
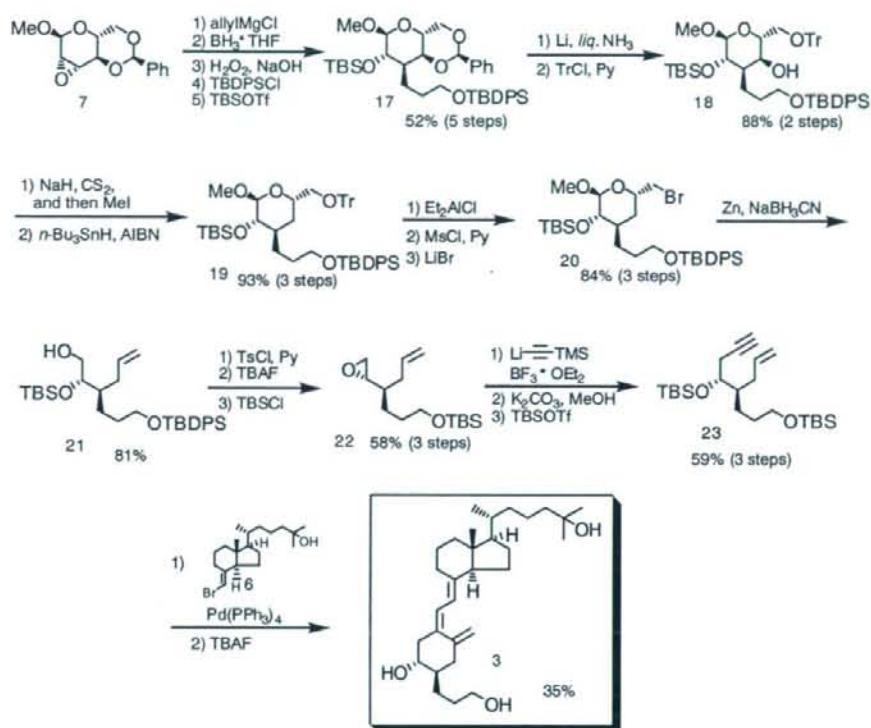


Figure 3. NOE experiments for 2b.



Scheme 3. Synthesis of 1-unsubstituted analogue 3.

ylene protons (or one of the methylene protons) of the hydroxymethyl group at the 1-position, so this isomer must have the $1\alpha,2\alpha,3\beta$ -configuration and, accordingly, the other isomer must have $1\beta,2\alpha,3\beta$ -stereochemistry (Fig. 3).

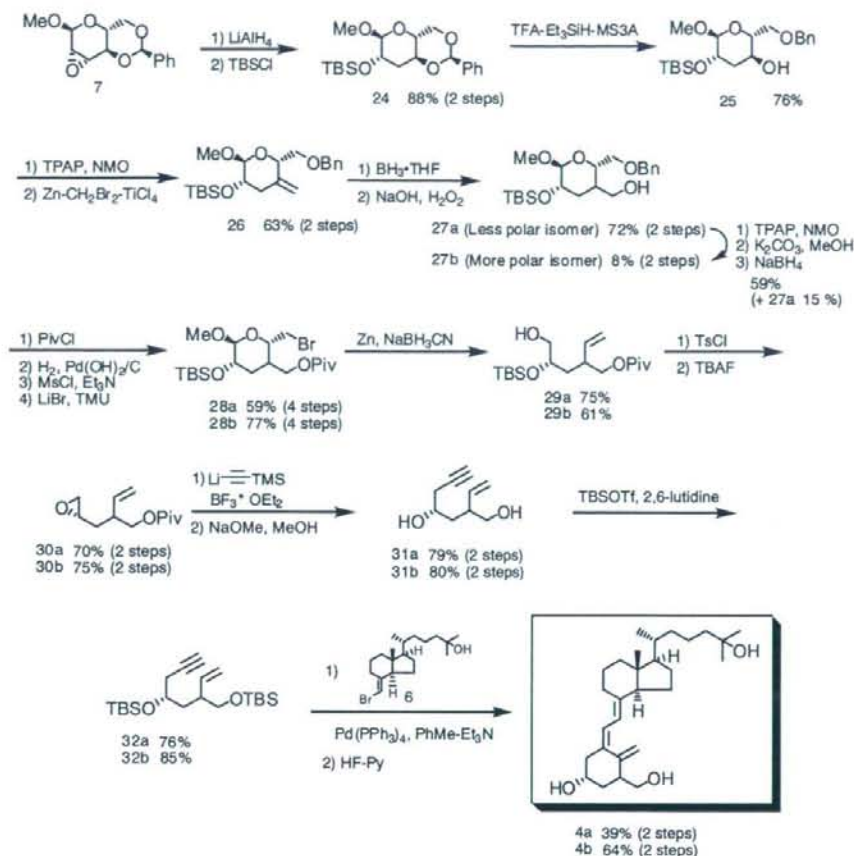
As a reference compound, 2α -(3-hydroxypropyl)-25-hydroxyvitamin D₃ (3), which does not have a 1α -OH group but does have a 2α -(3-hydroxypropyl) group, could also be prepared by the similar procedure as shown in Scheme 3. Deoxygenation at the 1-position could be achieved by way of xanthate formation and *n*-Bu₃SnH reduction.

Another reference compounds, 1-hydroxymethyl-25-hydroxyvitamin D₃ (4a,b), could be also prepared sub-

stantially by the same manner, except that epoxide ring opening of 7 was carried out with LiAlH₄¹⁷ (Scheme 4). At the stage of hydroboration of 26, the diastereoselectivity was relatively high (ca. 8.4:1) in contrast with the 2α -(3-hydroxypropyl) series. The configuration of the major diastereoisomer could be inverted via oxidation, epimerization, and reduction. Stereochemistry of 4a and 4b was similarly determined by NMR experiments (Fig. 4).

2.2. Biological testing

All synthesized analogues were purified by preparative reverse phase HPLC. Reporter assays were carried out utilizing luciferase activity. The fusion protein was used for assays, which consist of DNA-binding domain of Gal4



Scheme 4. Synthesis of 2-unsubstituted analogues 4a and 4b.

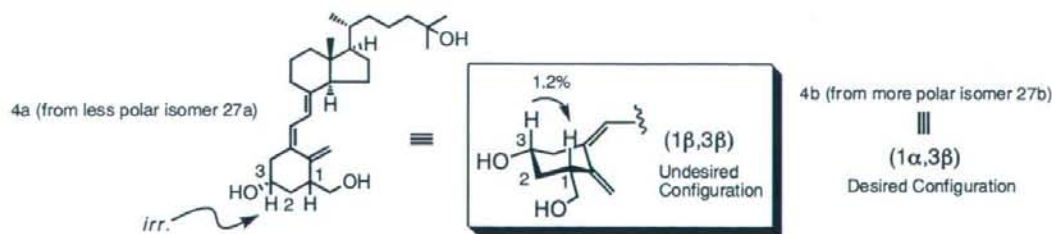


Figure 4. Determination of the stereochemistry of 2-unsubstituted analogues.

(transcription factor protein of *Saccharomyces cerevisiae*) and human VDR LBD.¹⁸ Site-directed mutagenesis was conducted to construct the LBD of Arg274Leu, and reporter assays were carried out by using both wild type and mutant VDR. Other than the analogues synthesized above, 2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25(OH)₂D₃ (5)^{8b} and 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) were also assayed in order to compare the effects of 1- and 2 α -substituents.

As shown in Figure 5, when assays were performed on the wild type VDR, the 1-hydroxymethylated analogues

(2a,b and 4a,b) were found to be rather less effective than the natural hormone 1, irrespective of the presence of the 2 α -(3-hydroxypropyl) group (Table 1). The results could be expected because of steric hindrance of the 1-hydroxymethyl group. When the effect of the 2 α -(3-hydroxypropyl) group was compared in the series of 1-hydroxymethylated analogues (2a,b and 4a,b), the transcriptional activities were lower at 10⁻⁸ M by the introduction of 2 α -(3-hydroxypropyl) group in both the 1 α - and 1 β -hydroxymethyl analogues (Table 2). The A-ring of 4a,b might be located at the different

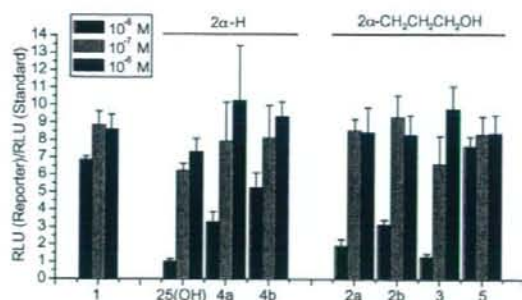


Figure 5. Reporter assays for wild type VDR ($n = 3$, means \pm SD).

position from the A-ring of **1** in the LBD, and the 2α -(3-hydroxypropyl) group of **4a,b** does not work as a positive motif for binding to the wild type VDR. Comparing the activities of **5** with its 1-deoxy analogue, **3**, the transcriptional activity of **3** was lower at 10^{-8} M, similar to the case in the 2-unsubstituted series (i.e., **1** and **25(OH)D₃**), previously reported in SAR studies.¹ This confirms that the presence of the 1α -OH group is very important for vitamin D action even in the presence of the 2α -(3-hydroxypropyl) group.

When the mutant receptor (Arg274Leu) was assayed (Fig. 6), the replacement of the 1α -hydroxy group of **1** to the 1α -hydroxymethyl group (**4b**) appears to increase its transcriptional activities. While the introduction of the 1β -hydroxymethyl group (**4a**) showed little effect (Table 1). In contrast, in the 2α -substituted series, the effect of the substituent at the 1-position appeared not to be so dramatic (compare **2b**, **3**, and **5** in Figure 6 and Table 1), which may imply that an attractive interaction between the terminal OH group of the 2α -(3-hydroxypropyl) group and sites in the mutant receptor plays the dominant role, and accordingly, this substituent could represent an active motif for the mutant receptor as the 1α -OH group does for the wild type.

The recovery of the affinity by another attractive interaction was the theme of the paper published recently.¹⁹

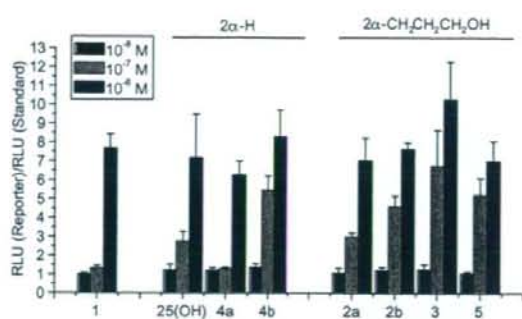


Figure 6. Reporter assays for mutant VDR(Arg274Leu) ($n = 3$, means \pm SD).

The fact that the hydrogen bond between the 1α -OH group of **1** and Arg274 in the wild type receptor LBD plays an important role for vitamin D action has been supported by an X-ray diffraction study,³ and alanine scanning mutational analysis²⁰ has also demonstrated the importance of the hydrogen bond. Destruction of this hydrogen bond would result in reduction of the affinity between the analogues and the mutant receptor. We planned to create a hydrophobic interaction between an alternative substituent at the 1-position and the hydrophobic cavity formed by the mutation. This approach has been formally applied by Koh's group, who synthesized and assayed 1-*O*-benzyl analogues of **1**.^{6a} Posner and co-workers have reported on 1α -hydroxymethyl analogues with reduced calcemic action,^{7,21} an interesting feature among the vitamin D derivatives that retain non-classical activity. We chose to model our target compounds initially on Posner's compounds and to examine the effect of a 2α -substituent on affinity to the mutant VDR. In the case of the 2-unsubstituted series, the 1α -hydroxymethyl analogue was most effective (Table 1). However, in the case of the 2α -substituted series, modification at the 1-position was not critical, that is, the activities of 1α -hydroxymethylated **2b**, 1α -unsubstituted **3**, and 1α -hydroxylated **5** were similar (Table 1). We assumed that this averaging effect of the activities of the 1-substituted analogues

Table 1. Summary of the effects of the 1α -substituent of the vitamin D₃ derivatives on the transcriptional activities mediated by wild type/mutant VDR

2α -Substituent	Wild type VDR	Mutant VDR
$-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	H \sim 1β -CH ₂ OH \leq 1α -CH ₂ OH < 1α -OH 3 \sim 2a \leq 2b < 5	1β -CH ₂ OH < 1α -CH ₂ OH \sim H \sim 1α -OH 2a < 2b \sim 3 \sim 5
-H	H < 1β -CH ₂ OH < 1α -CH ₂ OH < 1α -OH 25(OH)D ₃ < 4a < 4b < 1	1α -OH \sim 1β -CH ₂ OH < H < 1α -CH ₂ OH 1 \sim 4a < 25(OH)D ₃ < 4b

Table 2. Summary of the effects of the 2α -substituent of the vitamin D₃ analogues on the transcriptional activities mediated by wild type/mutant VDR

1-Substituent	Wild type VDR	Mutant VDR
α -CH ₂ OH	H (4b) \geq 2α -(CH ₂) ₃ OH (2b)	H (4b) \sim 2α -(CH ₂) ₃ OH (2b)
β -CH ₂ OH	H (4a) \geq 2α -(CH ₂) ₃ OH (2a)	H (4a) < 2α -(CH ₂) ₃ OH (2a)
α -OH	H (1) < 2α -(CH ₂) ₃ OH (5)	H (1) < 2α -(CH ₂) ₃ OH (5)
H	H (25(OH)D ₃) \sim 2α -(CH ₂) ₃ OH (3)	H (25(OH)D ₃) < 2α -(CH ₂) ₃ OH (3)