



Title	アディポサイトカインの構造解析と生化学的研究
Author(s)	高橋, 亮
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47248
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	高橋 亮
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 21090 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	アディポサイトカインの構造解析と生化学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宇野 公之 (副査) 教 授 田中 徹明 教 授 北 泰行 教 授 小林 資正 助教授 大久保忠恭

論 文 内 容 の 要 旨

近年、脂肪細胞は単に中性脂肪の形でエネルギーを保存する貯蔵庫としてだけではなく、生活習慣病と密接に結びつく内分泌因子を分泌している内分泌臓器であることが明らかにされた。それらはアディポサイトカインと称され、既に様々な興味ある因子が報告されているが、本研究ではその中でアディポネクチンとビスファチンに注目し構造解析および生化学的研究を行った。

アディポネクチンは抗動脈硬化作用、さらにインスリン抵抗性の改善作用を担っていると報告されている。アディポネクチンは 244 残基からなり、生体内では 3 量体、6 量体、さらにこれらが会合した高分子量の会合体が存在し、この高分子量のアディポネクチンがより活性が高いため、多量体形成機構について様々な研究がなされてきた。現在までに提唱されているアディポネクチンの多量体形成モデルでは N 末端側に位置する 3 つの Cys 残基のうち 2 つが分子間 SS 結合を形成し、残りのフリーの Cys 残基が別の 3 量体のフリーの Cys 残基と SS 結合を形成し 6 量体を形成することが明らかとされている。アディポネクチンは Signal sequence、Variable region (以下 V と称す)、Collagen like domain (以下 C と称す)、Globular domain (以下 G と称す) から構成されている。本研究では会合体の形成における非共有結合を介した分子間相互作用の重要性を明らかにすることを目的に、SS 結合が形成されない還元剤存在下で V、C、G の各ドメインを組み合わせた配列からなるサンプル VCG、CG、G、及び VC を調製し、物理学的手法により各ドメインの多量体形成能を解析した。その結果、三本鎖を形成することが期待されるコラーゲン様アミノ酸配列 (X-Y-Gly)_n を持つ C ドメインのみでは三本鎖を形成せず、G ドメインを有するものは三本鎖を形成することが分かった。このことから、アディポネクチンの三量体形成には C ドメインではなく、G ドメインが主に機能していることが分かった。また濃度依存的に多量体を形成し、単量体≒3 量体≒12 量体の平衡が成り立つことを示した。従ってアディポネクチンの発現量の増加に従って活性の高い多量体の形成が促進されることが明らかとなり、その発現量の増大を図ることが、アディポネクチンに関連する病態の改善に寄与する可能性を示した。

もう 1 つのアディポサイトカインであるビスファチンはインスリン受容体に結合し血糖値降下作用を示す特徴を示すことから第二のインスリンといわれて注目されているが、これまでに高次構造は解析されておらず、また他のサイトカインとの配列相同性も無いため立体構造に関する情報はほとんど報告されていなかった。そこで本研究ではビスファチンの立体構造解析を目的に研究を行った。

大腸菌大量発現系から精製したビスファチンの結晶化にマイクロシーディング法を繰り返し用いることにより成功し、X 線結晶回折データから立体構造を分解能 2.0 Å で決定した。その結果、ビスファチンは結晶中において head-to-tail 型の二量体で存在し、各単量体は α/β パレル構造といわれる特徴的なドメインを含む 3 つのドメインから構成されることを示した。さらに二次構造として 17 本の β -strand と 18 本の α -helix の存在が示された。サイトカインとしての構造活性相関の解明には至らなかったが、ビスファチンは nicotinamide phosphoribosyl transferase (NMPRTase) 活性を有していることが既に報告されており、エネルギー代謝に深く関係している酵素としても非常に興味深い。すなわち nicotinamide (NM) と 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate (PRPP) から nicotinamide mononucleotide (NMN) を生成する反応を触媒する酵素として、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 生合成経路においても重要な役割を担っている。そこで NMPRTase としての構造相関の解析を深める事を目論み、NMPRTase とその基質である NM および PRPP との複合体 X 線結晶構造をそれぞれ決定した。これらの立体構造から NM、PRPP はいずれも α/β バレル構造の 2 量体形成面に位置していることなど基質認識様式を明らかにした。ここに得られた各基質との複合体構造と既に報告されている生成物の NMN との複合体構造を用いて、酵素反応中の基質と生成物の空間的モデルを立て、反応機構を考察した。これまでに大半の phosphoribosyl transferase (PRTase) は oxocarbonium ion を鍵中間体とする S_N1 で進行すると考えられてきたが、この鍵中間体を安定化すると期待できる陰性残基が NMPRTase の活性サイトには見出されなかった。このことから S_N2 反応で進行することが示唆された。そこでこの酵素反応機構を詳細に解明することを目的とし、NMR を用いた反応速度論解析を行った。その結果、系内には NM と PRPP から NMN が生成する主反応のほかに、PRPP から分解物が生成する副反応が 2 つ存在することを見出した。ピロリン酸の加水分解式を含め系内の 4 つの反応式をすべて考慮した最小二乗法フィッティングから、主反応の逆反応は正反応に比べて約 15 倍速いという興味深い結果を得た。また主反応は NM と PRPP の濃度に依存する二次反応で説明できたことから、この反応が S_N2 反応で進行することを明らかとした。さらに PRPP が oxocarbonium ion を経由して生成する加水分解産物が検出されなかったことから、この反応は S_N2 機構で進行することが結論付けられた。このように X 線結晶構造解析と NMR を用いた反応速度論解析から、NMPRTase は S_N2 機構で反応が進行することを初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は生活習慣病と密接に関連した脂肪細胞の内分泌因子である 2 種類のアディポサイトカイン、アディポネクチンとビスファチンに関して構造生物学及び生化学研究を行った。抗動脈硬化作用とインスリン抵抗性改善作用を持つアディポネクチンに関しては、構成ドメインを組み合わせた 4 種類の試料を用いて物理化学的アプローチにより溶液中では特定の会合体が存在すること及び単量体、3 量体、12 量体間に平衡が成り立つことを明らかとした。さらに会合体形成に関与するドメインを同定し非共有結合性分子間相互作用の重要性を明らかにし、高活性を有する多量体形成機構のモデルを提出した。インスリン受容体結合活性及び NAD 生合成に関与する酵素活性を有するビスファチンに関しては、X 線結晶解析法により単体及び基質との複合体の立体構造を高分解能で決定し基質選択性と酵素反応機構に関するモデルを提出した。さらに NMR を用いた反応速度論解析の結果と併せて S_N2 機構で反応が進行することを初めて明らかにした。

このような機構の解明は生活習慣病に対する医薬品の開発に関して有用な知見を与えるものと考えられ博士（薬学）の学位論文として相応しいものと認める。