The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	終末糖化産物受容体の構造解析
Author(s)	吉田, 卓也
Citation	大阪大学低温センターだより. 2009, 148, p. 26-29
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/4776
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

終末糖化産物受容体の構造解析

薬学研究科　吉田　卓也（内線8222）

筆者の属する研究室では低温センターから供給される液体ヘリウムでNMRを稼動させ、蛋白質の構造・機能の研究を進めている。その中から本稿では最近行った終末糖化産物受容体の構造解析[1]について紹介する。

終末糖化産物（Advanced Glycation Endproducts ; AGE）とは聞きなれない言葉かも知れないが、日夜目にする食品等、例えばご飯のおこげであるとか、ホットケーキの茶色い部分、味噌・醤油などにも多く含まれている物質である。蛋白質のようなアミノ基を持った分子と、グルコースのように還元性を持つ糖はいわゆるメイラード反応を起こし、褐色物質を生成することが知られている。反応の前期では、蛋白質と還元糖が縮合してシッフ塩基を形成した後、アマドリ生成物が形成される。この産物は反応性が高く、続く反応後期で縮合・開裂・架橋形成などを含む複雑で非可逆的な反応が進行する。このように蛋白質が非酵素的に糖化・修飾されることによって生ずる分子の総称がAGEである。AGE化は褐変、蛍光の発生、塩基性残基の修飾による電荷の変化、溶解性の変化、架橋形成とそれによる分子量変化やプロテアーゼに対する耐性獲得など様々な変化を蛋白質にもたらす。

食品においては、メイラード反応による特有の色や香りの生成が期待されるが、これが人体で起こると厄介であることは想像に難くない。例えば、結合組織のコラーゲンがAGE化されると、皮膚や血管の劣化という形で現れることが考えられる。特に、血液中のグルコース濃度が高い糖尿病患者では、AGE生成が加速され、体内に蓄積されていると言われている。日本では糖尿病患者数はその予備軍の人数をあわせると1600万人を超え、深刻な問題となっている。糖尿病患者にとって大きな問題となるものが、三大合併症と呼ばれる腎症・網膜症・神経症という血管障害の発症である。また、三大合併症の他にも、糖尿病は全身の動脈硬化を促進することにより心筋梗塞、脳梗塞、下肢の閉塞性動脈硬化症を引き起こし、患者の生命を脅かす。これら糖尿病血管障害の進行が患者の余命やQOLを大きく左右するため、この血管合併症をいかに克服するかが大きな課題である。自然、AGEと糖尿病の関係がクローズアップされてくるが、そこで興味深いのは本稿で取り上げるAGE受容体（Receptor for AGE ; RAGE）の存在である。RAGEは1992年にAGEと結合する細胞表面受容体としてウシ肺から分離同定された55kDaの1回膜貫通型タンパク質である[2]。RAGEの発

現は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、周皮細胞および腎メサンギウム細胞などの血管系細胞やマクロファージなど、広範な組織で認められており、一般的な生理条件下での発現は低いが、**AGE**が蓄積している動脈硬化巣のような病変部位では発現が増加している。**RAGE**を過剰発現した糖尿病モデルマウスでは糖尿病合併症の憎悪がみられ、**RAGE**遺伝子をノックアウトした糖尿病モデルマウスでは進行が非常に遅いことが報告されている[3,4]。すなわち、糖尿病患者では蛋白質の**AGE**化による失活という直接的な作用に加え、**RAGE**を介した細胞内シグナリングによる作用が血管障害に大きく関与している。

RAGEは一次配列の相同性により免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、**1**つの可変領域様ドメインと**2**つの定常領域様ドメインを有する細胞外領域と、膜貫通領域、細胞内シグナル伝達領域から成る。このうち可変領域様ドメインに**AGE**結合部位が存在する。そこで筆者らは**AGE-RAGE**系の構造機能相関を解明するため、可変領域様ドメイン（**vRAGE**）の立体構造解析を**NMR**法によっておこなった。

^{13}**C,** ^{15}**N**によって同位体標識した**vRAGE**を調製し、各種**NMR**スペクトルを測定した。連鎖帰属法により主鎖・側鎖の化学シフトを同定し、さらに ^{13}**C-NOESY**スペクトル及び ^{15}**N-NOESY**スペクトル等より**1032**個の距離制限情報、**110**対の二面角制限情報、**21**対の水素結合情報を収集した。これらの制限情報を用いて立体構造計算を行った。

得られた立体構造のうち収束した領域における主鎖の**rmsd**値は**0.40** Å、重原子を含めた**rmsd**値は**0.73** Åであった。そのうち平均構造に最も近い**vRAGE**の溶液構造を**Fig. 1**にリボンモデル図で示す。**vRAGE**は**2**つのβシートを形成している**7**つのβストランド（**N**末端側より**A, B, C, D, E, F, G**）及びそれらを繋ぐ**6**本のループ（**N**末端側より**L1, L2, L3, L4, L5, L6**） より構成される**immunoglobulin fold**を有することが明らかとなった。これら**2**つのβシートは**B**ストランド**C**末端に位置する**Cys38**と**F**ストランド上に位置する**Cys99**間のジスルフィド結合により繋がれたβサンドイッチ構造を形成していた。興味深いことに**vRAGE**の立体構造を**immunoglobulin**の可変領域様ドメインの立体構造と比較すると、**vRAGE**の立体構造中では**C**ストランドから引き続く**2**つのβストランド（**C', C"**）が欠落しており、対応する領域には長いループ構造（**L3**）及びそれに引き続く短いαヘリックスが見られた。**H / D**交換実験において**vRAGE**中の**L3**ループと隣接するストランドとの間の水素結合は観測できず、**L3**ループが溶液中で柔軟な立体構造を有していることが予想された。そこで著者らは**L3**ループの運動性を調べるため、^{1}**H-**^{15}**N HSQC**スペクトルの温度依存性測定並びに蛋白質分子内の運動性の指標となる**{**^{1}**H}-**^{15}**N steady state NOE** （**nuclear Overhauser effect**）測定を

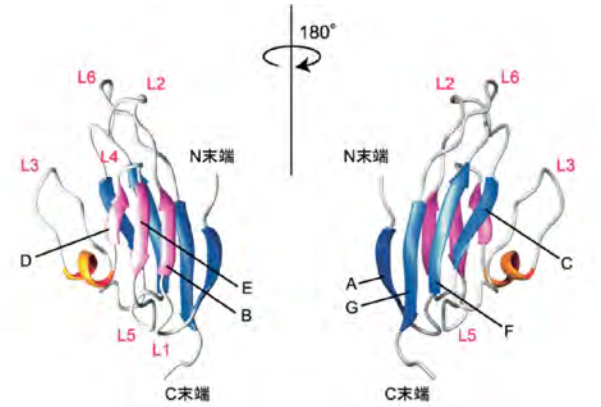

Figure 1 **(a) vRAGE**溶液構造のリボンモデル図。αヘリックス、βシートを模式的に示す。左図を垂直方向の軸を中心に**180°**回転させた立体構造を右図に示す。各βストランドの名称は一般的な**immunoglobulin fold**における通例に従った。

行った。**vRAGE**の **^{1}H-^{15}N HSQC**スペクトルにおけるシグナル強度は溶媒との化学交換のため一様ではなく、低温にすることで**L3**ループ上に位置する残基のシグナル強度が増大した。この結果は低温にすることで水との化学交換が抑制されたことに由来するものである。また、**{^{1}H}-^{15}N steady state NOE**実験の結果、**L3**ループ上に位置する残基は溶液中での高い運動性を表す小さい**NOE**値を示した。これらの結果より、**L3**ループは高度に溶媒側に露出しており溶液中で柔軟な構造を有しているという立体構造上ユニークな特徴を有していることが明らかとなった。

また、**vRAGE**分子表面は**L2**、**L3**、**L4**ループによって形成される疎水性の**cavity**によって特徴付けられていた（**Fig. 2**）。さらに、分子表面の静電荷分布解析の結果、**vRAGE**分子表面全体は正電荷を帯びていることが明らかとなった。これらの正電荷分布のうち**L2**ループ上に位置する**Lys39**、**Lys43**、**Lys44**、**Arg48**、**C**ストランド上に位置する**Lys52**、**F**ストランド上に位置する**Arg98**、**L6**ループ上に位置する**Arg104**、**Lys107**、**Lys110**によって特に密集した正電荷領域が形成されていた。多くの場合、静電的相互作用は蛋白質-リガンド相互作用において主要な役割を果たす。また、**RAGE**のリガンドである**AGE**はその形成過程においてアミノ基を失うことにより見かけの負電荷が増加することが知られている。そこで、著者らは**AGE-RAGE**相互作用の担い手として**vRAGE**分子表面を覆う正電荷に注目した。特に密集した正電荷領域を形成している塩基性残基、**Lys39**、**Lys43**、**Lys44**、**Arg48**、**Lys52**、**Arg98**、**Arg104**、**Lys107**、**Lys110**それぞれについてアラニン置換体を作成し、各置換体の**AGE**結合活性を評価した。興味深いことに、変異導入により結合活性の低下を引き起こした残基は全て**vRAGE**分子表面を特徴付けている**L2**、**L3**、**L4**ループによって形成された疎水性**cavity**周辺に位置していた。一方、変異導入によってほとんど結合活性に影響を及ぼさなかった残基は**vRAGE**立体構造上その反対側の表面に位置していた（**Fig 3**）。

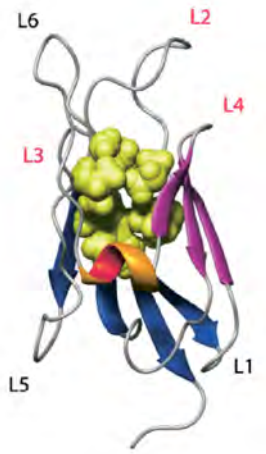

Figure 2　**vRAGE**溶液構造において疎水性**cavity**形成に関与する残基 の側鎖を立体構造上に示している。

以上のように、**NMR**を用いて**RAGE**の**AGE**結合ドメインの立体構造を解明し、その**AGE**結合部位を同定することができた。現在得られた知見に基づいてより詳細な**AGE**認識機構の解明と、糖尿病合併症治療に繋がる**RAGE**阻害剤開発を目指した研究を進めている。

本稿の内容は薬学研究科高分子化学分野（大久保研究室）の松本篤幸氏（現医薬基盤研究所）をはじめとする諸氏、金沢大学医学系研究科の山本博教授、および大阪薬科大学の小林祐次教授との共同研究です。また本研究では低温プローブを装着した**Varian**社製**INOVA 600**を主に使用しました。低温プローブは通常プローブに比べ数倍の感度を示し、本研究や蛋白質－薬剤分子の相互作用解析に威力を発揮しています。低温プローブは検出部・プリアンプがヘリウムガスで**25 K**に冷却されており、冷却機・コンプレッサー・断熱用真空ポンプなど様々な機械的パーツで構成されていてメンテナンス等はで戸惑うことが多く、低温技術の難しさに触れたような気がしています。規模は比較にもなりませんが、低温センターの維持・管理をされている方々には改めて頭が下がる思いです。この場を借りてお礼を申し上げます。

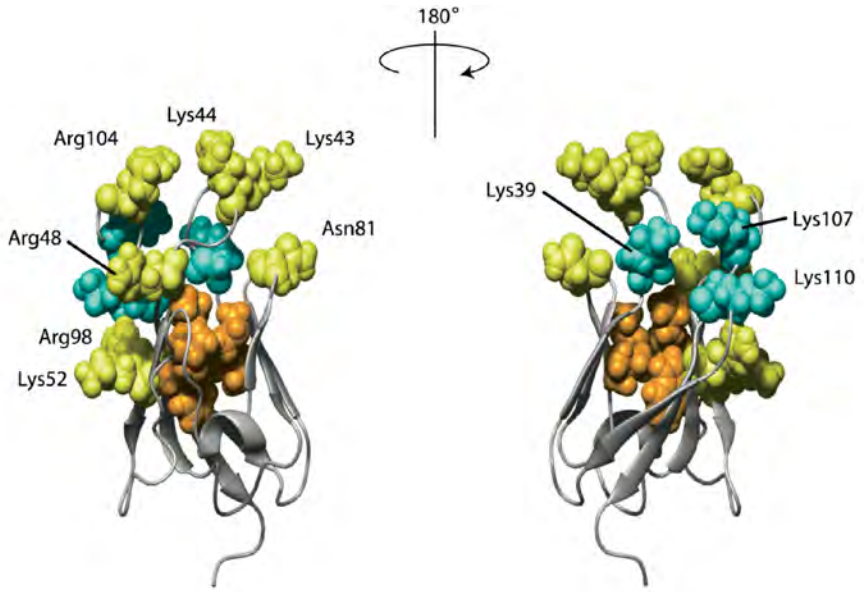

Figure 3　変異導入残基の**vRAGE**立体構造における空間配置。左図は部位特異的変異導入実験により明らかとなった**AGE**結合面を、右図はその反対面を示す。変異導入残基・疎水性**cavity**を形成している残基の側鎖を**space fill**モデルで示す。

参考文献

［1］**Matsumoto, S. et al.,**（**2008**）*Biochemistry* 47, **12299-122311**

［2］**Schmidt, A. M. et al..,**（**1992**）*J. Biol. Chem*. 267, **14987-14997**

［3］**Yamamoto, Y. et al.**（**2001**）*J. Clin. Invest*. 108, **261-268**

［4］**Myint, K. M. et al.**（**2006**）*Diabetes* 55, **2510-2522**