The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	終末糖化産物受容体(RAGE) リガンド認識に関する構造生物学的研究
Author(s)	松本, 篤幸
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49674
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

【５】

氏　　名	松（まつ）　本（もと）　篤（しげ）　幸（ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２２８７４　号
学位授与年月日	平成21年３月24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	**終末糖化産物受容体（RAGE）リガンド認識に関する構造生物学的研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 准教授　大久保忠恭 （副査） 教　授　宇野　公之　　教　授　藤岡　弘道　　教　授　田中　徹明

論　文　内　容　の　要　旨

糖尿病はインスリン作用不全による慢性的な高血糖状態で規定される疾患である。この高血糖状態が持続した結果、血中では糖と種々の蛋白質との間で一般にメイラード反応として知られる非酵素的な反応が進行し、終末糖化産物（advanced glycation end products; AGE）と総称される一群の分子種が生成される。これらAGE分子群が細胞表面受容体（receptor for AGE; RAGE）と相互作用することで腎症・網膜症などに代表される大血管から細小血管に至る糖尿病性血管合併症が引き起こされることが知られている。このことから、現在RAGEは糖尿病性血管合併症克服の為の有効な薬剤標的とみなされている。しかしこれまで、RAGEを介した糖尿病性血管合併症の発症及び進展の開始点であるAGE-RAGE相互作用に焦点を当てた構造生物学的な視点からの研究はほとんどなされていなかった。この大きな理由として受容体であるRAGEの詳細な立体構造に関する情報が皆無であることが挙げられる。そこで本研究で著者は、糖尿病性血管合併症の発症及び進展に深く関与するAGE-RAGE相互作用機構の詳細を解明する為、NMRを用いてRAGEのAGE結合ドメイン（vRAGE）の立体構造解析を行い、得られた立体構造情報に基づいた部位特異的変異導入実験及び速度論的解析によりAGE-RAGE相互作用機構のモデルを提唱した。またこれらの研究によって明らかとなった相互作用情報に基づき、コンピューターを用いたバーチャルスクリーニングによりAGE-RAGE結合阻害低分子の同定に成功した。以下に本研究の要点をまとめて示す。

NMRによる立体構造解析の結果、vRAGEはβストランドに富んだimmunoglobulin foldを有していることが明らかとなった。1000個の立体構造計算を行い、得られた立体構造のうちエネルギーの最も小さい15構造の重ねあわせから算出した、収束した領域（Gln24 – Lys37, Leu49 – Thr55, Pro71 – Gln100, Tyr113 – Val117）における主鎖のrmsd (root mean square deviation) 値は0.40 Å、重原子を含めたrmsd値は0.73 Åであった。これらの構造はPDB (protein data bank) に登録した（PDB code: 2E5E)。興味深いことに、vRAGEの溶液構造中では、典型的な

immunoglobulinの可変領域様ドメインの立体構造中で見られる2つのβストランドが欠損しており、対応する領域には長いループ構造（L3ループ）が存在していた。そこで、L3ループ領域の溶液中での構造上の特徴を詳細に調べる為、様々な温度での^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル並びに蛋白質内部の運動性が分かる^{1}H-^{15}N steady state NOEの測定を行った。その結果、L3ループは高度に溶媒側に露出しており、柔軟な立体構造を有しているという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3つのループ領域（L2、L3、L4ループ）によって形成される疎水性cavity、並びに分子表面に露出した塩基性残基によって形成される密集した正電荷領域で特徴付けられていることが明らかとなった。

これまでの研究よりAGEはその形成過程で蛋白質部分の塩基性残基の修飾により、みかけの負電荷が上昇することが知られている。このことから著者はvRAGE分子表面で密集した正電荷領域を形成している塩基性残基をアラニン残基に置換し、得られた置換体それぞれについてAGE結合活性をELISAにより評価した。その結果、AGE認識にはvRAGE分子表面において広範囲に分布したLys43、Lys44、Arg48、Lys52、Arg98、Arg104由来の正電荷が相加的に関与していることが示された。さらに、これらの変異導入により明らかとなったAGEと関与する残基は空間的にL2、L3、L4ループで形成される疎水性cavityに隣接して存在していることが明らかとなった。また、SPR法において結合時間を様々に変化させて得られるBSA-AGEとvRAGEの解離曲線を用いて解離速度定数を算出した結果、結合時間を延長するに従って本来一定である解離速度定数が減少することが明らかとなった。このことはBSA-AGE - vRAGE相互作用には2段階の過程が存在することを示している。これらの相互作用情報並びに立体構造上の特徴より、著者はAGE-RAGE相互作用機構としてvRAGE分子表面の密集した正電荷領域を介した静電的相互作用及びL2、L3、L4ループで形成される疎水性cavityを介した立体構造変化を伴う疎水性相互作用による2段階で進行するモデルを提唱した。

さらに、疎水性cavityを標的としたバーチャルスクリーニングにより4つの化合物（化合物**1**、化合物**2**、化合物**3**、化合物**4**）をAGE-RAGE結合阻害候補化合物として得ることができた。ELISAによる阻害活性評価の結果明らかとなったそれぞれのIC_{50}値は、5.0×10^{-5} M、5.9×10^{-4} M、1.9×10^{-3} M、8.8×10^{-5} Mであった。これらのうち化合物**3**についてはSPR法によりvRAGEとの直接結合を確認することができ、そのK_D値は3.1×10^{-3} Mであった。化合物**1**、化合物**2**、化合物**4**については溶解度の問題からvRAGEとの直接結合を確認することはできなかった。また、化合物**3**合成過程において生じる合成副産物として、より高い活性を示す2つの化合物**3**類縁体（化合物**5**、化合物**6**）を得ることができ、これらの化合物構造の同定に成功した。ELISAによる阻害活性評価及びSPR法による結合活性評価の結果、化合物**5**、化合物**6**それぞれのIC_{50}値は1.1×10^{-4} M、7.4×10^{-4} M、K_D値はそれぞれ5.3×10^{-5} M、1.0×10^{-4} Mであり、化合物**3**よりも高いAGE-RAGE結合阻害活性を示した。

本研究で得られたこれらの知見はAGE-RAGE相互作用のさらなる理解のみならず、糖尿病性血管合併症を標的とした新規作用機序を有する薬剤の開発に大きく貢献するものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は糖尿病性血管合併症と密接に関連した終末糖化産物（AGE）と総称される一群の分子種とAGE受容体（RAGE）に関して構造生物学及び生化学研究を行い、RAGEのリガンド認識機構を解明した。RAGEは腎症・網膜症などの糖尿病性血管合併症克服の為の有効な薬剤標的とみなされているが、AGE-RAGE相互作用機構の解明はほとんど行われていなかった。そこで申請者は結合活性評価によりRAGEのAGE結合ドメイン（vRAGE）を同定し、NMR法を用いてvRAGEの立体構造を決定した。その結果、vRAGEの分子表面に３つのループ領域によって形成される疎水性cavityと塩基性残基が密集した正電荷領域が存在することを初めて明らかにし、緩和時間やNOEの解析から疎水性cavity中の１つのループ領域が高度に溶媒側に露出して柔軟な立体構造を有していることを示した。塩基性残基の部位特異的変異の導入によりAGE結合に関与する残基を同定し、速度論的解析により静電的相互作用と疎水性相互作用により２段階で進行するAGE-RAGE相互作用機構の新たなモデルを提唱した。得られた立体構造情報に基づいたバーチャルスクリーニングにより疎水性cavityを標的としたAGE-RAGE結合阻害候補化合物を設計することが可能となり、候補化合物及びその合成副産物の中から、ELISA法による阻害活性評価及びSPR法による結合活性評価で結合阻害活性を持つ数種類の低分子化合物の同定に成功した。

上記成果は糖尿病性血管合併症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であると考えられ博士（薬学）の学位論文として相応しいものと認める。