



|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Adiponectin多量体形成の構造基盤                                                       |
| Author(s)    | 多久和, 綾子                                                                     |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                            |
| Version Type | VoR                                                                         |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/56170">https://doi.org/10.18910/56170</a> |
| rights       |                                                                             |
| Note         |                                                                             |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 多久和 綾子 )

論文題名 Adiponectin多量体形成の構造基盤

## 論文内容の要旨

Adiponectinは脂肪組織から分泌されるホルモン：アディポサイトカインのひとつとして同定されたタンパク質である。インスリン抵抗性の改善作用や、抗動脈硬化作用を示し、血中濃度はBMIや糖尿病の発症率と逆相関することから、メタボリックシンドロームの新規治療ターゲットとして注目を集めている。Adiponectinの一次配列は、N末端のシグナル配列に続いて、可変領域、コラーゲン様ドメイン、球状ドメインの3つの領域で構成されており、ヒトAdiponectinは226残基のタンパク質として分泌される。生体内でAdiponectinは多量体を形成し、基本構造である3量体や、それがさらに会合した6量体、さらにはより大きなHMW(High Molecular Weight multimer)として存在する。これらの多量体は会合数によって、受容体への結合活性やAMPK経路の活性化能等が異なり、中でもHMWは最も生理活性の高い分子種であると言われている。また、全Adiponectinに対するHMWの割合がBMIやインスリン抵抗性と負の相関を示す、HMWを形成できない遺伝子変異を持つ人は糖尿病を発症するといった報告もある。Adiponectinの生理機能の理解と、肥満関連疾患の新規治療戦略創出に向けた基礎研究として、Adiponectinの多量体形成機構の解明が期待されている。

Adiponectinの多量体のうち、3量体の形成に重要な役割を果たしている構造基盤は、コラーゲン様ドメインにおける三重らせん構造の形成と、球状ドメインの3量体化である。6量体は、可変領域に存在する保存されたCys残基を介した3量体間のジスルフィド結合により形成すると言われている。HMWについても、その形成過程におけるこのジスルフィド結合の適切な制御が重要であるとの報告や、ジスルフィド結合の形成や架け替えに関わる複数のシャペロンが関与しているとの報告がある。一方で、in vitroでHMWを穏やかに還元してもその会合状態が保たれることから、このジスルフィド結合は一旦形成されたHMW構造の維持には必須でないことが示唆された。また、HMWはpH変化によって容易に3量体へと解離することからも、HMWの構造形成にはジスルフィド結合以外に非共有結合性の分子間相互作用が寄与していると考えられる。この分子間相互作用に関わる重要な要素として、翻訳後修飾が注目されている。Adiponectinの翻訳後修飾としては、コラーゲン様ドメインにおけるPro残基のヒドロキシ化と、Lys残基のヒドロキシ化およびグリコシル化、可変領域におけるThr残基のジシアル酸およびガラクトースによる修飾が報告されている。このうち、コラーゲン様ドメインで修飾されるLys残基をArg残基に変異させるとHMW形成が抑制されることなどから、Lys残基における修飾が重要であると示唆されている。しかし、これまでの知見は、いずれも翻訳後修飾の寄与を間接的に示すものであり、具体的にどのような相互作用メカニズムが存在しているのかについては全くわかっていない。

そこで本研究では、Adiponectin HMW形成に関わると考えられているドメインを含み、均一な修飾を有する試料を用いて、生体内におけるAdiponectin多量体形成の再現を試み、また物理化学的手法によってその物性と構造の評価を行った。まず、一連の研究に用いる試料として、Adiponectin可変領域とコラーゲン様ドメインに由来する配列を持つ89残基のペプチドVC-Hyp<sub>4</sub>とVC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>を設計した。VC-Hyp<sub>4</sub>はコラーゲン様ドメインにおいて4つのProがヒドロキシ化し4(*R*)-hydroxyprolineとしたもの、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>は4つのProのヒドロキシ化に加えて、同じくコラーゲン様ドメインにおいて4つのLysを修飾しグルコシルガラクトシルヒドロキシリジン( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-0-hydroxylysine)としたものである。これらは固相合成法とネイティブケミカルライゲーション法を用いたペプチド合成により調製した。また、コントロールとして修飾を持たないペプチドVCを大腸菌発現系を用いて調製した。さらに、全長Adiponectin試料として非修飾の3量体を大腸菌発現系を用いて、修飾されているHMWをヒト血漿から精製することで調製した。アニーリングを行った3種類のペプチドと、2種類の全長Adiponectinについて4℃でのCDスペクトルを測定すると、いずれのスペクトルにも220~235nm付近にポリプロリン2型ヘリックス構造に由来する正のピークが見られ、すべての試料が4℃でコラーゲン三重らせん構造を形成していた。次いで、このCDスペクトルで極大値を示した波長におけるCD値の温度変化を観測し、三重らせん構造の転位温度( $T_m$ )を測定した。その結果、VC-Hyp<sub>4</sub>の $T_m$ はVCと比べて5.9℃高く、Proのヒドロキシ化によって三重らせん構造が安定化していた。さらに、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>の $T_m$ は著しく向上しており、VCより21.3℃、VC-Hyp<sub>4</sub>より15.4℃高かった。この結果から、コラーゲン三重らせん構造を安定化させる修飾として知られているProのヒドロキシ化だけでなく、Lysのグリコシル化もまたコラ

ーゲン三重らせん構造の安定性を向上させることが明らかになった。また、全長Adiponectinとの比較により、C末端が球状ドメインで束ねられることでコラーゲン三重らせん構造の安定性はさらに向上することが示され、天然Adiponectinのコラーゲン様ドメインは、修飾と球状ドメインの3量体化の相乗的な安定化効果でその高い安定性を実現していることが示唆された。

つづいて、これらの試料について、超遠心沈降速度法を用いた分子量分布の解析を行い、多量体形成状態を評価した。その結果、VCおよびVC-Hyp<sub>4</sub>は単量体と3量体のみで構成されていた一方で、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>は単量体、3量体、6量体、18量体を主な成分として含むことが明らかになった。また、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>について還元状態で沈降速度法の実験を行うと、6量体は観測されなくなり、18量体が主な成分として残っていた。天然のAdiponectin HMWは18量体であることが知られており、今回血漿から精製してきたHMWもまた均一な18量体であったことから、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>が形成した18量体という多量体は、HMWに相当するものだと結論付けた。さらに、還元しても解離しないという性質も天然のAdiponectin HMWと一致しているほか、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>が天然Adiponectinと同様に18量体以上の多量体を形成しないことから、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>の形成した18量体では天然状態のHMWと同様のメカニズムによる会合が起こっており、天然の多量体形成を再現できていると示唆された。

そこで、VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>18量体の構造に基づく、天然のAdiponectin HMW形成機構の解明を目指して、18量体モデル構造を構築した。得られたモデル構造において、Lys残基に付加された糖鎖を介した水素結合による3量体間の相互作用が観察され、18量体全体としてその内部で閉じた水素結合ネットワークを形成していた。このことから、多量体形成が18量体止まりであり、それ以上の多量体を形成しない性質を説明するモデルとなっているといえる。VC-Hyp<sub>4</sub>/Ghl<sub>4</sub>の多量体形成プロファイルは内在性のAdiponectinのそれと同様であることから、天然のAdiponectin HMWのコラーゲン様ドメインも今回のモデルと同様の様式で会合していることが期待される。

本研究の成果として得られた以上の知見は、Adiponectinの構造安定化と多量体形成に翻訳後修飾が直接関与していることを初めて明らかにしたものである。現在Adiponectinの血中濃度や多量体構成は数多くの疾患や病態のバイオマーカーとして利用することが検討されている。本研究における成果は、Adiponectinにおける翻訳後修飾も、疾患のリスクや予後のより正確な診断に利用できるバイオマーカーとなる可能性を示唆している。また、コラーゲン三重らせんが会合して形成される繊維・シート・ゲルなどの高次構造は、生体適合性の高いバイオマテリアルとしての応用が進んでいる。本研究では、コラーゲンで散見される、グルコースとガラクトースによるLysのグリコシル化が果たしている役割を明らかにしたことで、今後、より単純な配列を持ったモデルペプチドを利用した研究により、その役割が定量的に議論できる可能性を提示した。そして、本研究における、グルコシルガラクトシルヒドロキシリジン残基を介したコラーゲン三重らせん同士の会合の発見は、研究および医療分野で活用できる新たな性質を持った会合体の設計を可能にするものである。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 多 久 和 綾 子 ) |     |           |
|-------------------|-----|-----------|
|                   | (職) | 氏 名       |
| 論文審査担当者           | 主 査 | 教授 大久保 忠恭 |
|                   | 副 査 | 教授 宇野 公之  |
|                   | 副 査 | 教授 小比賀 聡  |

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、生活習慣病の予防・診断および治療の鍵分子として注目されているAdiponectinが血液中で形成する多量体の役割を明らかにするため、円偏光二色性(CD)スペクトルと分析用超遠心を用いて解析を行いAdiponectin 18量体のモデル構築に成功した。Adiponectinはアディポサイトカインのひとつとして発見されたタンパク質でインスリン抵抗性改善作用や抗動脈硬化作用を示し、血液中では3量体を最小単位として6量体およびさらに大きなHMWと呼ばれる多量体を形成する。多量体の中でもHMWが最も高い受容体結合活性およびAMPK経路の活性化能を示すことから、Adiponectinの多量体形成機構の解明が新規生活病治療法の開発に際して重要であると考えられている。申請者はAdiponectinが三重らせん構造を形成するコラーゲン様ドメインを含んでいることに注目し、様々な修飾を施した合成コラーゲン様ドメインのCDスペクトルと超遠心分析の解析を行った。その結果、HMWの主要成分が18量体であること、および安定な三重らせん構造を形成するためには、配列中の特定のプロリン残基のヒドロキシル化とリジン残基の糖鎖修飾が必須であることを明らかにした。以上の実験結果をもとに申請者は計算科学的手法を用いて立体障害等の生じないコラーゲン様ドメインの18量体モデルの構築を行った。得られたモデル構造は3本のペプチド鎖からなる三重らせん構造が6個、環状に配置されて6回対称性を示しており、HMWの電子顕微鏡像とも一致していた。また、モデル構造中では構造安定化に寄与する水素結合ネットワークが形成されていたが、修飾された残基を介した水素結合により三重らせん同士が結合していた。本モデルは、HMWがなぜ18量体なのか、またそれ以上の多量体が存在しないのかという疑問に合理的な解答を与えるものであった。

上記成果はAdiponectinの多量体形成機構の構造的基盤を明らかにしたもので、特に翻訳後修飾やジスルフィド結合が多量体構造の安定化に果たす役割を明らかにしたことの意義は大きく、動脈硬化症や糖尿病に対する有効かつ実用的な新規治療法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(薬科学)の学位論文として相応しいものと認める。