

## 溶液中のタンパク質と疎水性リガンドの 相互作用様式の解明



研究ノート

大久保 忠 恭\*

Interaction between protein and hydrophobic ligand in solution

Key Words : NMR, hydrophobic interaction, solution structure

### はじめに

医薬品の開発において欠かせないのが溶液中でのタンパク質-リガンド間またはタンパク質-タンパク質間相互作用の詳細な理解である。表面プラズモン共鳴、等温滴定熱量測定、蛍光共鳴エネルギー移動などの様々な実験的手法により相互作用部位の解明が行われている。その中でも、核磁気共鳴 (NMR) は分子量が約 30kDa 以下の生体高分子の立体構造を決定し、またリガンド結合部位を同定する手段として広く利用されている。NMR による相互作用の研究においてよく用いられるのは化学シフト、緩和時間、NOE 等である。各 NMR シグナルの化学シフト値はリガンドの結合に伴う結合部位近傍環境の変化を敏感に反映する。環境の変化は立体構造に起因するが、関与する要素が多いため、化学シフト値の変化から直接立体構造の変化量を導くのは困難である。緩和時間よりタンパク質とリガンドの相互作用の動的側面に関する情報を得ることができる。タンパク質とリガンドが強く結合している場合、NOE から複合体の立体構造を決定できる。

これまでの SBDD (Structure-Based Drug Design) や FBDD (Fragment-Based Drug Design) などの手法を用いた新規医薬品のデザインでは、タンパク質複合体の立体構造情報より得られる静電相互作用、水素結合等の特異的な熱力学的エンタルピー項の相

互作用を中心に設計が行われてきた。しかし、実際の結合においては、これらの相互作用に加えて疎水性相互作用やタンパク質やリガンドの構造変化等の動的挙動が重要な働きを果たしているが、その寄与を見積もることは困難であった。我々の研究室では NMR 及び X 線結晶構造解析による複合体の立体構造決定に加えて、等温滴定型熱量計 (ITC) 測定や NMR 等から得られる動的挙動のデータを用いて疎水性結合の形成機構を解明して、疎水性低分子に対するタンパク質製剤デザイン法の開発を目指している。本稿では L-PGDS 及び RAGE とリガンドの相互作用様式の解明について紹介する。

### L-PGDS と疎水性リガンドの相互作用<sup>2),3)</sup>

リポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) は、脳内でのプロスタグランジン H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) からプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) への異性化反応を触媒している。生成物である PGD<sub>2</sub> は、内因性睡眠誘発物質として自然な睡眠を誘発する。現在、様々な睡眠導入剤が使用されているが、通常の睡眠段階を経ず睡眠後も自然な睡眠状態にならないため危険な副作用を引き起こしている。このため、L-PGDS の酵素としての機能の解明は、副作用の少ない睡眠薬の開発に繋がると期待されている。また、一次構造の比較から L-PGDS は、リポカリンファミリーと呼ばれる疎水性低分子輸送タンパク質ファミリーに属していることが明らかにされている。リポカリンファミリータンパク質の基本構造は、8つのβストランドからなるβバレルと1本の長いαヘリックスよりなっており、βバレルの内部で特定の疎水性低分子と結合する。しかし、L-PGDS はリポカリンタンパク質の中でも際立って広いリガンド選択性を有しており、基質である PGH<sub>2</sub> だけでなく化学構造や大きさが全く異なるレチノイド、ビリルビン、アミロイドβペ



\* Tadayasu OHKUBO

1958年9月生  
大阪大学 理学研究科 無機及び物理化学専攻 (1988年)  
現在、大阪大学 薬学研究科 高分子化学分野 教授 理学博士 構造生物学、薬品物理化学  
TEL : 06-6829-8220  
FAX : 06-6829-8221  
E-mail : ohkubo@pms.osaka-u.ac.jp

プチドとも強く結合することが報告されており、脳内の組織障害性脂溶性物質の捕捉タンパク質（スカベンジャー）として働いていると考えられている。くも膜出血患者の脳脊髄液中から L-PGDS とビリルビン等の複合体が見出されている。しかしながら、L-PGDS の疎水性低分子認識機構は解明されていなかった。そこで、大阪バイオサイエンス研究所の裏出良博博士、大阪府立大生命環境科学研究科の乾隆教授との共同研究で NMR による立体構造決定と相互作用解析を行った<sup>1)~7)</sup>。

大腸菌を用いた L-PGDS の大量発現系・精製系を構築し、NMR を用いて溶液中の遊離型 L-PGDS の立体構造決定を行った。L-PGDS は一般的なりポカリンファミリータンパク質に比べて、大きな cavity を  $\beta$  バレルの内部に持っていた。次に、レチノイン酸及び安定基質誘導体 U-46619 と L-PGDS の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した。レチノイン酸と U-46619 の結合に伴う化学シフト値の変化をプロットした (図 1. A, B)。大きな変化が観察された残基を L-PGDS の立体構造上で示した (図 1. C, D)。

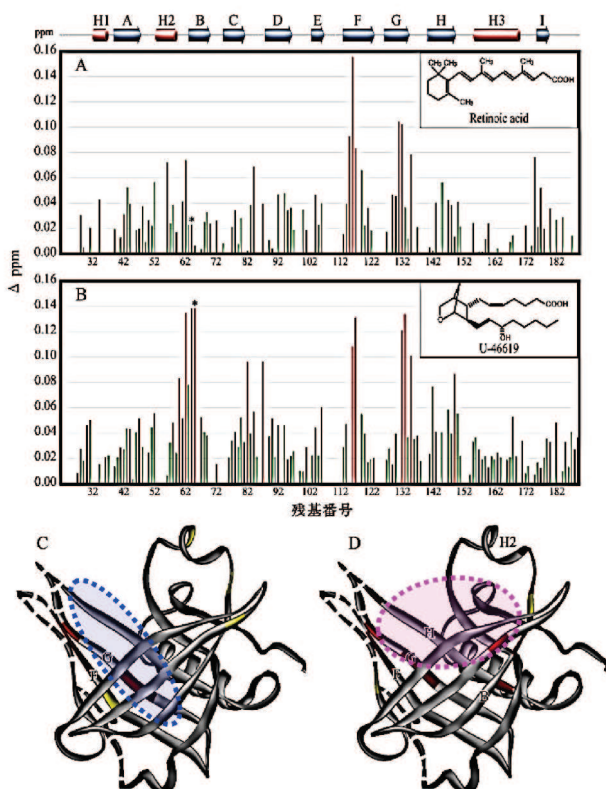


図 1. (A) レチノイン酸と (B) 基質誘導体 U-46619 滴定時の化学シフトの変化。(C) レチノイン酸と (D) U-46619 添加時に化学シフト値が大きく変化した残基を立体構造上で示し、両者の結合部位を点線で囲んだ。

レチノイン酸の結合による化学シフト値の変化がもっとも大きかった残基は、ストランド F,G から  $\beta$  バレル底部に集中していた。このことから、レチノイン酸の結合領域は、図 1. C の青色の円で囲まれた領域であると考えられた。一方、U-46619 の結合による変化が大きかった残基は、 $\beta$  バレル上部に広く分布していた。これらのことから、U-46619 および  $\text{PGH}_2$  の結合領域は、図 1. D のマゼンダ色の円で囲まれた  $\beta$  バレル上部の領域であると考えられた。レチノイン酸と  $\text{PGH}_2$  の結合領域は異なっていた。

さらに、より詳細なリガンド結合様式を明らかにするため、ソフトウェア AutoDock を用いて、リガンド結合モデルを作成した (図 2)。モデルでは、レチノイン酸は  $\beta$  ストランド F,G に沿って、シクロヘキセン環が  $\beta$  バレル底部に挿入する形で結合していた。一方で、 $\text{PGH}_2$  結合モデルにおいて、 $\text{PGH}_2$  は親水的な領域を含む  $\beta$  バレル上部に結合していた。酵素反応を受ける  $\text{PGH}_2$  のペルオキシド基は、活性中心の Cys65 と約 4 Å で近接しており、両者が接触して反応することが十分に可能であることが示された。レチノイン酸と  $\text{PGH}_2$  の結合モデルを重ね合わせたところ、両者とも互いに重大な立体障害を引き起こしておらず、両者同時に L-PGDS と結合できる可能性が示唆された。

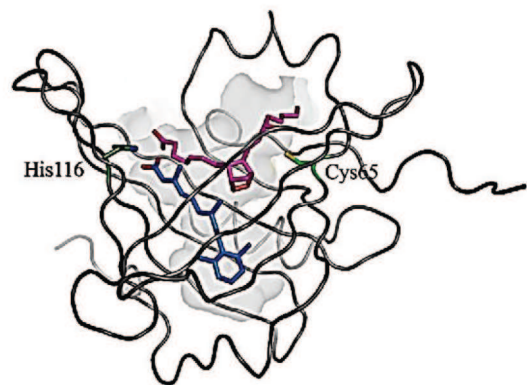


図 2. レチノイン酸と  $\text{PGH}_2$  の結合モデルの重ね合わせ図。左側がレチノイン酸、右側が  $\text{PGH}_2$ 。

そこで、レチノイン酸の L-PGDS 酵素活性阻害様式を調べた。その結果、レチノイン酸は、L-PGDS の酵素活性を非競合阻害し、図 2 のモデルを支持した。次に、NMR を用いて L-PGDS と基質安定誘導体 U-46619 の複合体溶液構造を決定した。

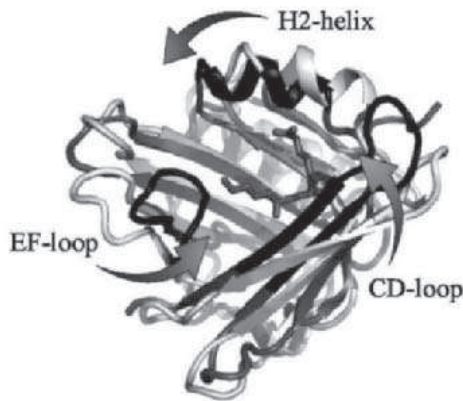


図3. L-PGDS遊離型 (灰色) から基質誘導体結合型 (黒色) への構造変化

図3に遊離型と複合型の立体構造を示した。複合型と遊離型では $\beta$ バレル中核の構造は、ほとんど変化していないが、 $\beta$ バレル上部のCD-ループ、EF-ループおよびH2-ヘリックスの領域で構造が大きく変化して複合体形成に伴い $\beta$ バレル上部の入り口を閉じて蓋をするように構造変化を起こしていた。このことは、リガンド結合によりL-PGDSの慣性半径が減少するというX線小角散乱法の結果とも一致していた。以上のことから、L-PGDSは、様々な形状・大きさの疎水性リガンドに自らの構造を適応させるという、他のリポカリンファミリータンパク質に見られない特徴を持つことが明らかとなった。このようなリガンド捕捉機構により、L-PGDSは“広いリガンド選択性”と“リガンドとの強い結合”を成り立たせていると考えられる。

### RAGEと疎水性リガンドの相互作用

終末糖化産物 (Advanced Glycation Endproducts ; AGE) は、生体中で主にアミノ酸やタンパク質のアミノ基やアミド基とグルコースやフルクトースのような還元性を持つ糖のアルデヒド基が非酵素的に反応して最終的に生成する一連の化合物群の総称である。この反応はメイラード反応と呼ばれ、反応の前期段階ではアミノ基と還元糖の縮合によりシッフ塩を経て反応性の高いアマドリ化合物が生成し、その後の後期反応ではアマドリ化合物が不可逆的な脱水・開裂・架橋形成反応などを繰り返し、黄褐色で特有の蛍光を持つAGEが生成する。後期反応は非常に複雑な反応過程から成っており、その詳細はほとんど解明されていない。生成したAGEは低分子

量AGEと高分子量AGEに大別できる。高分子量AGEである糖化タンパク質では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が報告されている。図4に低分子量AGEの化学構造の例を示すが、反応物からは想像もできない多様な化合物群が生成している。

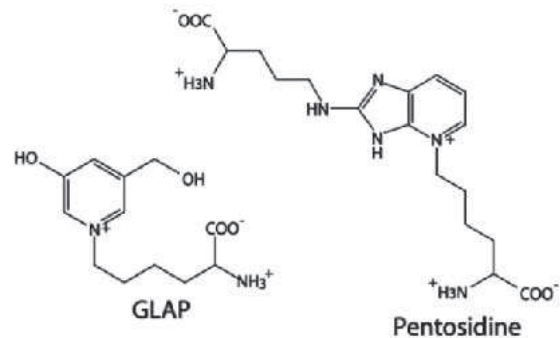


図4. 低分子量AGEの化学構造の例

AGEの産生は糖尿病状態や加齢で加速される。また、免疫学的手法により、糖尿病患者の病変部にAGEが蓄積することが知られており、糖尿病性合併症との関連が指摘されていた。患者数が1600万人を超え、糖尿病は社会的にも大きな問題となっている。糖尿病ではインスリンの分泌障害や標的臓器における作用不全によって慢性の高血糖状態が持続されている。糖尿病患者の生命予後とQuality of Life (QOL) 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糖尿病網膜症・腎症・神経症という血管障害の発症である。また、冠動脈硬化などの血管合併症によって全身の組織障害が引き起こされている。このため、慢性の血管合併症を防いでいくことが糖尿病治療では重要な課題となっている。高血糖状態で増加したAGEが細胞表面でAGE受容体 (receptor for AGE; RAGE) と相互作用することで腎症・網膜症などの糖尿病性血管合併症に至ることが報告されている。RAGEは1992年にウシ肺からAGEと結合する細胞表面受容体として分離同定された55kDaの1回膜貫通型タンパク質である。AGEと結合することでRAGEは細胞内にシグナルを伝達し、最終的に転写制御因子であるNF- $\kappa$ Bが活性化され異常な血管新生を引き起こす。RAGEは糖尿病患者の病変部では大量発現しているが、健常

人の体内ではほとんど発現していない。また、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悪化がみられ、RAGE遺伝子をノックアウトしたマウスでは進行が非常に遅い。このため、RAGEは糖尿病性血管合併症治療のための有効な薬剤標的とみなされている。

AGE-RAGE系の作用機構を解明するため、我々はAGE結合部位を含むRAGEの細胞外領域の可変領域様ドメイン(vRAGE)のNMRによる立体構造決定と相互作用解析を金沢大学医学系研究科の山本博教授との共同研究で行った<sup>8)</sup>。<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>Nによって同位体標識したvRAGEを調製し、連鎖帰属法により主鎖・側鎖の化学シフトを同定し、溶液中の立体構造決定を行った。vRAGEの溶液構造を図5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。

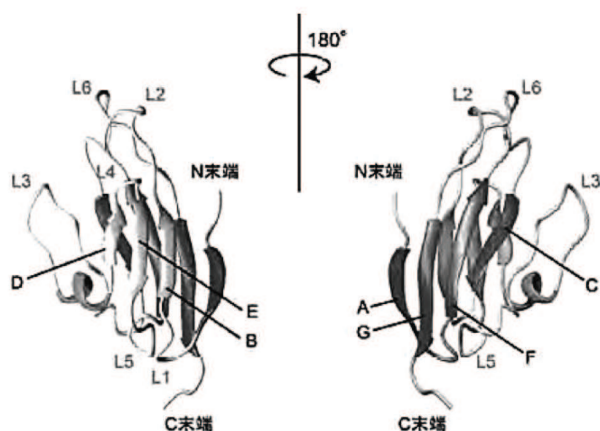


図5. vRAGEの溶液構造

H/D交換実験、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの温度依存性測定並びに{<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>N steady state NOE 測定の結果から、vRAGE中の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。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。そこで、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。

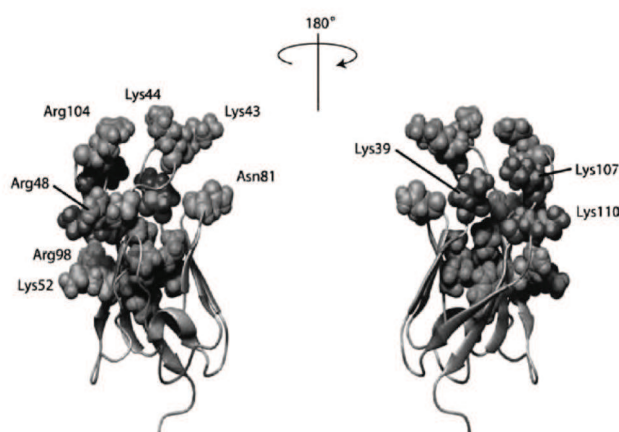


図6. 変異導入残基のvRAGE立体構造における空間配置

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(図6)。

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。

## 参考文献

- 1) Inui, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1999) **266**, 641-646
- 2) Inui, T., et al., *J. Biol. Chem.*, (2003) **278**, 2845-2852
- 3) Shimamoto, S., et al., *J. Biol. Chem.*, (2007) **282**, 31373-31379

- 4) Iida, T., et al. FEBS J., (2008) **275**, 233-241
- 5) Miyamoto, Y., et al., J. Struct. Biol., (2010) **169**, 209-218
- 6) Fukuhara, A., et al. J. Control Release, (2012) **159**, 143-150
- 7) Shimamoto, S., et al. Biomol. NMR Assign., in press
- 8) Matsumoto, S., et al., Biochemistry, (2008) **47**, 12299-12311

