

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19770104
 研究課題名（和文）糖尿病の慢性化に関する受容体 RAGE とそのリガンドとの複合体の結晶構造解析
 研究課題名（英文）X-ray crystallography of RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) involved in chronic diabetes
 研究代表者
 氏名（アルファベット）石谷隆一郎（Ryuichiro Ishitani）
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号 90361568

研究成果の概要：

レセプター型 RAGE の C 末端細胞質ドメインと膜貫通ドメインを欠いた構造をもつスプライシングアイソフォーム、分泌型 sRAGE (soluble RAGE) の結晶化スクリーニングを様々な条件について行った。また、低分子量の基質となりうる合成ペントシジンとの複合体の結晶化スクリーニングを行った。さらに、アンフォテリンと S100A12 タンパク質を、sRAGE と同様に大腸菌における大量発現系を構築し、大量調製を行った。アンフォテリンに関しては、2通りの異なる領域を発現させるコンストラクトを作成し、それぞれ大量調製を行った。さらに sRAGE との複合体の結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶を得るには至らなかった。今後さらに、安定ドメインのみの発現系を作成し、大量調製、結晶化スクリーニングを行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

グルコースなどの還元糖は蛋白質のアミノ基と反応しシッフ塩基を生成するが、それがさらに複雑な不可逆反応を経て、後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) を生成する。特にこの AGE は糖尿病状態で加速的に生成が亢進し、糖尿病血管障害の原因の一つと考えられている。RAGE (Receptor for AGE) はこの AGE に対する特異的受容体として分離同定された 55 kDa の

受容体蛋白質である。RAGE の発現レベルは生理的な条件化では低いですが、糖尿病患者の血管内皮細胞などで発現が増強している。RAGE に AGE が結合することで炎症反応系因子や血管内皮増殖因子の発現が誘導され、血管新生・血栓形成を起こす。その結果、網膜症による失明や、粥状動脈硬化などの糖尿病血管障害を引き起こすと考えられている。実際、糖尿病のモデルマウスにおいて、RAGE の細胞外ドメインのみを過剰発現させ、野生型 RAGE に

リガンドが結合するのを妨害することで、糖尿病血管障害様の症状が抑制されることが示されている。一方で、RAGE は上記の AGE 以外に、アンフォテリン、S100A12 蛋白質など様々なリガンドと相互作用する多機能な受容体であることがわかっている。

2. 研究の目的

RAGE は糖尿病の慢性化による合併症、炎症・血管障害を防ぐ薬剤開発のターゲットとして重要であり、RAGE の効果的な阻害剤の設計を行うには、RAGE がどのように AGE を認識するか構造の面から理解する必要がある。本研究では、RAGE あるいは RAGE と AGE あるいはアンフォテリン、S100A12 蛋白質との複合体の結晶構造解明を目指し、効果的な薬剤の開発に結びつける。

3. 研究の方法

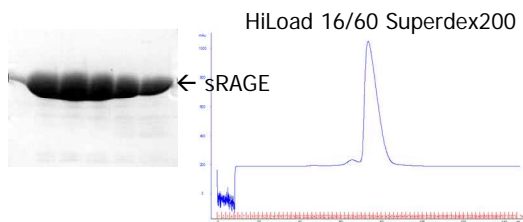
ヒト由来 RAGE の細胞質領域(sRAGE)単独の構造解析に関しては、大腸菌を用いた系により大量調製を行い、結晶化条件のスクリーニングを行う。結晶が得られ次第、結晶化条件の改良を行い、高分解能結晶が育成する条件を探索する。sRAGE の3つのイムノグロブリンドメイン (N 末端から V, C1, C2 ドメイン)のうち、C1 と C2 ドメイン間には柔軟なリンカー領域があることが知られているため、V+C1 ドメインのみからなるコンストラクトも作成し、精製・結晶化を試みる。AGE との複合体の構造解析に関しては、RAGE に特異的に結合することが知られているペンチシジンとの複合体の構造解析を行う。アンフォテリン、S100A12 蛋白質との複合体に関しては、過去の研究結果を参考に結合部分を発現する系を作成し、ゲル濾過クロマトグラフィー等の生化学的実験から安定な複合体を形成することが確認されたものから、結晶化スクリーニングを行う。高分解能結晶が得られた場合は、セレノメチオン標識 sRAGE の結晶を調製し、大型放射光施設 SPring-8、PhotonFactory 等で回折像測定を行い、多波長異常分散法にて位相決定を行う。

4. 研究成果

全長 sRAGE

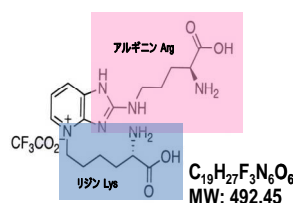
全長 sRAGE(23-332 aa)アミノ酸領域を挿入した pET 系プラスミドを用いて、Origami B 株を形質転換させて、大腸菌組換えの N 末端 His タグ融合タンパク質として大量発現させた。超音波破碎のあとで上清を回収して、Ni-NTA カラム、His タグを切断し、Heparin アフィニティーカラム、Superdex 200 ゲル濾過カラムの順で精製した。最終的に最大 50 mg/mL まで濃縮した後、結晶化初期スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはでき

なかった。



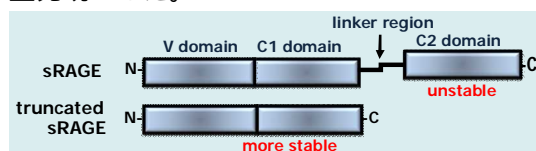
全長 sRAGE と AGE 複合体

RAGE と結合する AGE のうち、生体内で確認されているのが pentosidine である。東工大・細谷研究室との共同研究により化学合成した pentosidine を終濃度 1 mM で、上記のプロトコールで精製した全長 sRAGE と混合し、結晶化初期スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかった。

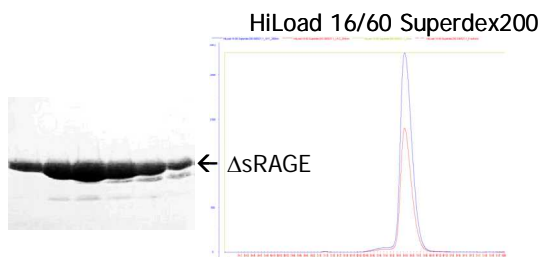


sRAGE 単独あるいは AGE との複合体

結晶化の妨げとなっている可能性がある、C2 ドメインを削った sRAGE(23 - 243aa)のコンストラクトを作成した。そのアミノ酸領域を挿入した pET 系プラスミドを用いて、Origami B 株を形質転換させて、大腸菌組換えの N 末端 His タグ融合タンパク質として大量発現させた。



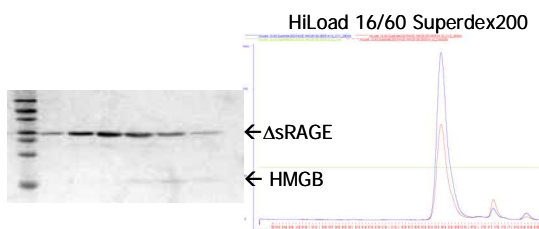
超音波破碎ののちに上清を回収して、Ni-NTA カラム、His タグを切断し、ResourceS 陽イオン交換カラム、Superdex 200 ゲル濾過カラムの順で精製した。最終的に最大 10mg/mL まで濃縮した後、結晶化初期スクリーニングを行った。また、全長 sRAGE の場合と同様に、上記のプロトコールで精製した sRAGE を pentosidine と終濃度 1 mM で混合して、結晶化初期スクリーニングを行った。



HMGB1, S100A12 との結合

RAGE のリガンドなのでと報告されている、S100A12, アンフォテリン(HMGB1)との複合体形成を検討した。

まず HMGB1(88-183aa)を挿入した pGEX 系のプラスミドを用いて、BL21 株を形質転換させて、大腸菌組換えの N 末端 GST 融合タンパク質として大量発現させた。超音波破碎ののちに上清を回収して、Glutathione Sepharose カラム、GST タグを切断し、ResourceQ 陰イオン交換カラム、Superdex200 ゲル濾過カラムの順で精製した。さらに濃縮して、前述のプロトコールで精製した sRAGE と混合してゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、安定な複合体を作らないことが判明した。同様に S100A12 も安定な複合体を作らないことが判明した。これらのリガンドには RAGE の糖鎖修飾が関わっている可能性があり、今後昆虫細胞で発現させた RAGE を用いて同様の結合実験を行う予定である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

- Higuchi T, Hattori M, Tanaka Y, Ishitani R, and Nureki O., Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein. *Proteins*, [in press] (2009). 査読有り
- Nishimasu H, Ishitani R, Yamashita K, Iwashita C, Hirata A, Hori H, and Nureki O, Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, [in press] (2009). 査読有り
- Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Ishitani R, and Nureki O, Structural basis of tRNA modification with CO₂ fixation and methylation by wybutosine synthesizing enzyme TYW4. *Nucleic Acids Res.*, [in press] (2009). 査読有り
- Nozawa K, O'Donoghue P, Araiso Y, Gundllapalli S, Ishitani R, & Soll D, Nureki O. The structure of the pyrrolysyl-tRNA synthetase:tRNA^{Pyl} complex reveals the molecular basis of orthogonality. *Nature* **457**, 1163–1167 (2009). 査読有り
- Seto A, Ikushima H, Suzuki T, Sato Y, Fukai S, Yuki K, Miyazawa K, Miyazono K, Ishitani R, & Nureki O Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of GCIP/HHM transcriptional regulator. *Acta Crystallogr.* **F65**, 21–24 (2009). 査読有り
- Tsukazaki T, Mori H, Fukai S, Ishitani R, Mori T, Dohmae N, Perederina A, Sugita Y, Vassilyev D G, Ito K, & Nureki O. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature* **455**, 988–991 (2008) 査読有り
- Ishitani R, Sugita Y, Dohmae N, Furuya N, Hattori M, & Nureki O. Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15393–15398 (2008) 査読有り
- Ishitani R, Yokoyama S, & Nureki O. Structure, dynamics, and function of RNA modification enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 330–339 (2008) 査読有り
- Ishitani R, Terada T, & Shimizu K. Refinement of comparative models of protein structure by using multicanonical molecular dynamics simulations. *Mol. Simul.* **34**, 327–336 (2008). 査読有り
- Araiso Y, Palioura S, Ishitani R, Sherrer R L, O'Donoghue P, Yuan J, Oshikane H, Domae N, Defranco J, Soll D, & Nureki O. Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1187–1199 (2008) 査読有り
- Tomita K, Numata T, Fukai S, Ishitani R, & Nureki O. Animated crystallography of genetic code translation. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **51**, 101–102 (2007). 査読有り
- Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Senda M, Senda T, Ishitani R, & Nureki O. Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *J. Mol. Biol.* **372**, 1204–1214 (2007). 査読有り
- Levengood J D, Roy H, Ishitani R, Soll D, Nureki O, & Ibba M. Anticodon recognition and discrimination by the alpha-helix cage domain of class I lysyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **46**, 11033–11038 (2007). 査読有り
- Hattori M, Tanaka Y, Ishitani R, & Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the cytosolic domain of a cation diffusion facilitator family protein. *Acta Crystallogr.* **F63**, 771–773 (2007). 査読有り

15. Hattori M, Tanaka Y, Fukai S, Ishitani R, & Nureki O. Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature* **448**, 1072–1075 (2007). 査読有り
16. Hattori M, Tanaka Y, Fukai S, Ishitani R, & Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the full-length Mg²⁺ transporter MgtE. *Acta Crystallogr.* **F63**, 682–684 (2007). 査読有り
17. Tanaka Y, Hattori M, Fukai S, Ishitania R, & Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the cytosolic domain of the Mg²⁺ transporter MgtE. *Acta Crystallogr.* **F63**, 678–681 (2007). 査読有り
18. Sato Y, Fukai S, Ishitani R, & Nureki O. Crystal structure of the Sec4p·Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8305–8310 (2007). 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

1 . 石谷隆一郎, 杉田有治, 濡木理, 「マグネシウム輸送体 MgtE の分子動力学シミュレーション」生物物理学会第45回年会, 2007年12月21日パシフィコ横浜

2 . Ishitani R, Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Senda M, Senda T, & Nureki O. “Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA.” tRNA workshop 2007, 2007年11月1日スウェーデン, ウプサラ

3 . 石谷隆一郎, 杉田有治, 濡木理, 「マグネシウム輸送体 MgtE の分子動力学シミュレーション」生物物理学会第46回年会, 2008年12月福岡国際会議場

4 . Ishitani R, Sugita Y, Dohmae N, Furuya N, Hattori M, & Nureki O. “Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study.” Gordon Research Conference, 2008年7月20日イタリア, ルッカ

5 . Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Ishitani R, and Nureki O. “Structural basis of tRNA modification with CO₂ fixation and methylation by wybutosine synthesizing enzyme TYW4” Gordon Research Conference, 2009年1月11日アメリカ, ヒューストン

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石谷隆一郎 (Ryuichiro Ishitani)
東京大学・医科学研究所・准教授
90361568

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし