

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02200

研究課題名(和文)分泌型スカベンジャー受容体AIMのリガンド認識機構

研究課題名(英文)Ligand recognition mechanism by the secreted scavenger receptor AIM

研究代表者

松岡 茂 (Matsuoka, Shigeru)

大分大学・医学部・特任准教授

研究者番号：60456184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネコの腎不全薬としても開発が進められ注目を集めているタンパク質であるAIMの分子メカニズムを化学実験により調査した結果、AIMの持つ多様な機能の一つに、遊離鉄による活性酸素発生の阻害効果があることを明らかにした。また、分子量約42000巨大分子であるAIMの部分構造を参考にして、分子量約1200のペプチドおよび分子量約500の低分子を設計・合成し、遊離鉄による活性酸素発生を防ぐ新規物質を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージによって生産されるタンパク質AIMは血流によって全身をめぐり、体内の異物や老廃物の除去を促進することで腎不全や肝臓がんなど多様な疾患の治療に寄与すると考えられ、注目を集めている。本研究では、AIMが遊離鉄イオンに結合して、活性酸素の発生を防ぐことを明らかにした。さらに、分子量約42,000のAIMの部分構造から、遊離鉄の活性酸素発生阻害効果を持つ分子量約1200のペプチドおよび分子量約500の低分子化合物を見出すことができた。遊離鉄は生体内で過剰な活性酸を発生して細胞を傷つける危険な化学種としても知られている。本研究は、遊離鉄を無毒化する低分子医薬品の開発に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：AIM has been attracting attention as a drug candidate for renal failure in cats. In this research, we performed chemical investigation on the molecular mechanism of AIM and revealed that one of the various biological functions of AIM is the inhibitory action to the generation of reactive oxygen species (ROS) by free iron. Furthermore, based on the molecular structure of AIM, we designed and synthesized a peptide with a molecular weight of about 1200 and a low molecule with a molecular weight of about 500, which possess inhibitory effect on the generation of ROS by free iron.

研究分野：生物分子科学

キーワード：スカベンジャー受容体 分子認識 活性酸素 分子機構 低分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マクロファージや樹状細胞などの食細胞が、パターン認識受容体 (PRR: pattern recognition receptor) を介して病原体関連分子パターン (PAMPs: pathogen associated molecular patterns) や障害関連分子パターン (DAMPs: damage associated molecular patterns) を認識すると、病原体の感染および細胞の障害を感知し、貪食やサイトカイン生産に引き続く様々な免疫応答が誘導される。PRR のリガンド認識は、免疫応答の起点となる分子機序である。

2005 年以降、主にサイトカイン生産に関わる PRR である Toll 様受容体についてリガンド結合部位の X 線結晶構造が解かれ (J. Choe, et al., *Science* 2005, 309, 581.), leucine-rich repeat 領域によるリポ多糖などの結合様式が明らかになってきた (I. Botos, et al., *Structure* 2011, 19, 447.)。しかしながら、貪食対象の認識に関与するスカベンジャー受容体 (SR: scavenger receptor) では leucine-rich repeat は見られず、リガンド結合構造も得られていないため、分子認識メカニズムについてほとんど分かっていない。2015 年、SR の一つである CD6 と、そのタンパク質リガンド CD166 の結晶構造がそれぞれ個別に明らかにされ、表面電荷の適合性から結合様式の推定がおこなわれた (P.E. Chappell, et al., *Structure* 2015, 23, 1426.)。しかし、CD166 は細胞接着に関わるリガンドであり、DAMPs や PAMPs とは構造が異なっており、SR による異物認識機構との関連性は低い。

SR の分子機構研究が困難な理由の一つとして、その多くが取り扱いの難しい膜タンパク質であることが挙げられる。そこで申請者らは、分泌型 SR である Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) に着目した。AIM は、膜結合型 SR の細胞外にみられるリガンド結合部位・SRCR (Scavenger-receptor cysteine-rich) ドメインが 3 つ繋がったユニークな構造を有する (Miyazaki, T. et al., *J. Exp. Med.* 1999, 189, 413.)。AIM も他の SR と同様に、マクロファージなどによる酸化 LDL およびガン細胞や死細胞の貪食を誘導し、さらに肥満や肝臓癌、急性腎不全の抑制・治療に関与することが明らかとなっている (Arai, S. et al. *Nat. Med.* 2016, 22, 183; Maehara, N. et al. *Cell Rep.* 2014, 9, 61; Kurokawa, J. et al. *Cell Metab.* 2010, 11, 479.)。またネコで多発する腎不全の分子機構に関与することも明らかとされた (Sugisawa, R. et al., *Sci. Rep.* 2016, 6, 35251)。

### 2. 研究の目的

本研究では AIM に結合する生体内の低分子リガンドの特定とその分子認識機構を解明することを目的とし、得られた構造情報から、AIM の多様な生理機能の一部を応用した新規物質の創製を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) はじめに腎不全時に血中に蓄積される尿毒素の一種であるカルボニル化合物と AIM を試験管中で混合し、質量分析および蛍光分析により経時的に反応生成物を検出・定量し、代表的な血中たんぱく質である血清アルブミン (ALB) と反応性の比較をおこなった。その結果、AIM のカルボニル付加体の生成速度は ALB の約 1.3 倍大きかった。また、尿毒素の一種であるタンパク質カルボニル化合物付加体としてカルボキシメチルリジン含有 BSA (CML-BSA) と AIM の結合親和性を等温滴定熱量計で調査したところ、コントロールの BSA は結合しなかったのに対し、CML-BSA では明確な反応熱が観測され、Kd 値 3.6  $\mu\text{M}$  の結合親和性が得られた (図 1)。これらの結果は、AIM がカルボニル化合物に関連した尿毒素と結合することを示唆する。

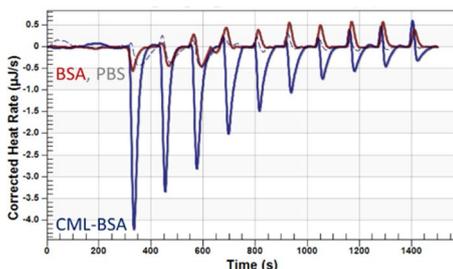


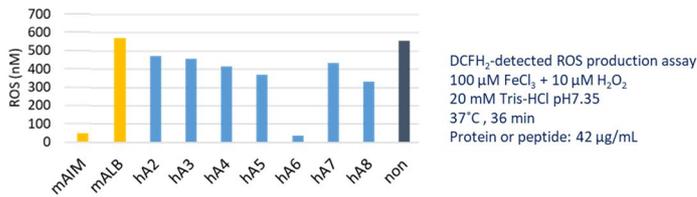
図 1 AIM と BSA および CML-BSA の等温滴定熱量測定

BSA または CML-BSA の PBS 溶液に AIM の PBS 溶液を滴下して、発生する結合熱を測定した。CML-BSA でのみ AIM との結合を示す明確な結合熱の発生が観測された。

(2) 次に、Isothermal titration calorimetry (ITC) や differential scanning fluorometry (DSF) を用いて代表的な生体内の金属イオンとの分子間相互作用を検証したところ、二価の鉄イオンが AIM と選択的に結合することが明らかとなった。

(3) 鉄イオンによるフェントン反応に対する AIM の作用を調査したところ、1  $\mu\text{M}$  の濃度で活性酸素種 (ROS) の発生を完全に阻害することが判明した。また、AIM の 3 つ SRCR ドメインそれぞれの活性を測定した結果、全てのドメインが活性を有することが判明した。この結果を基に、AIM の部分ペプチドを設計・合成して ROS 発生阻害活性を調べたところ、11 アミノ酸残基からなるモチーフ hA6 を見出した (図 2)。ホモロジー検索の結果この配列は SRCR 固有のもの

であった。

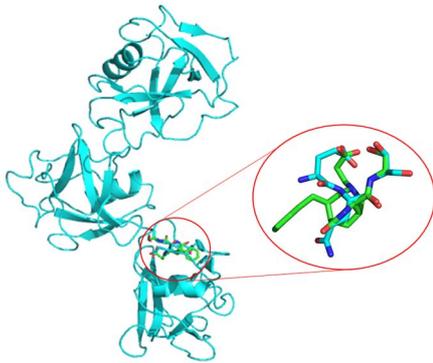


**図 2 AIM と部分ペプチドによる ROS 発生阻害効果**

AIM と部分ペプチド ha6 は、フェントン反応による ROS の発生を強力に阻害した。ROS の定量には蛍光試薬 (DCFH) を用いた。

(4) SRCR スーパーファミリ に属する AIM 以外の SRCR の機能も確認するため、ヒト AIM、ネコ AIM、マウス AIM およびヒト MSRE1、ヒト NETR1 の SRCR ドメインから、相当する 11 アミノ酸残基からなる配列ペプチドを合成し、ROS 発生阻害活性を比較した。その結果、全ての配列で ROS 発生阻害が見られ、最大の活性はヒト AIM 由来のペプチドで約 5 μM の IC<sub>50</sub> であった。

(5) CD6 をテンプレートとした AIM のホモロジーモデル三次元構造から 11 アミノ酸残基の空間的配置を予想し、この構造を基に低分子ペプチドミメティクスを設計・合成した。得られた低分子の ROS 発生阻害活性を調査したところ、元の AIM ペプチドには及ばないものの、数十 μM オーダーの濃度で明らかな ROS 活性阻害を示した (図 3)。



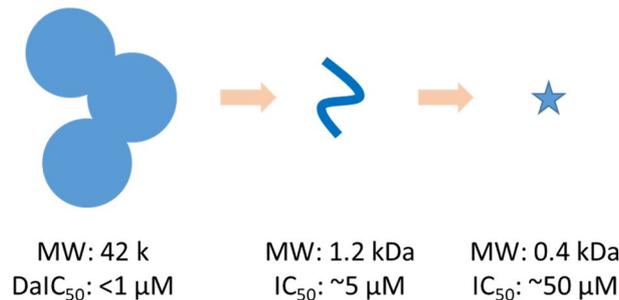
**図 3 AIM 部分構造と擬態低分子の重ね合わせ**

ROS 発生阻害活性を示した AIM 部分ペプチドの立体構造をホモロジーモデル (シアン) から予想し、アミノ酸側鎖の配置を模倣した低分子化合物 (緑) を設計・合成した。この低分子は AIM には及ばないものの、ROS 発生阻害活性を示した。

#### 4. 研究成果

本研究により、分泌型スカベンジャー受容体 AIM が鉄イオンに結合し、ROS 発生反応を強力に阻害することが明らかとなった。また、この反応に関与する部分アミノ酸配列を明らかにし、SRCR スーパーファミリ に共通する機能モチーフである可能性を示した。さらに、AIM のホモロジーモデル構造から得られるアミノ酸の空間的配置情報を基に低分子ペプチドミメティクスを設計・合成し、実際に ROS 発生阻害活性を有する新規化合物を得ることができた。

AIM の属するスカベンジャー受容体は体内の異物・老廃物の除去に関与する。マクロファージなど食細胞は、スカベンジャー受容体を介して異物・老廃物を細胞内に取り込み、リソソーム内で各種酵素や高反応性化学種である ROS を利用して対象分子を分解する。しかし一方で、過剰の ROS は細胞自体に障害を与える。本研究成果は、SRCR は遊離鉄に結合することで過剰な ROS 発生を抑えて、細胞への酸化ストレスを軽減している可能性を示唆する。AIM の新たな医療応用に資する知見と言える。また本研究で得られた低分子ペプチドミメティクスは、遊離鉄による過剰な ROS ストレスを押さえる機能を有し、生物研究ツール分子および医薬品リード化合物への発展が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, Miyazaki T.	4. 巻 4
2. 論文標題 The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaa1199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau1199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉澤良一, 平本絵美莉, 松岡 茂, 新井郷子, 宮崎 徹
2. 発表標題 ネコ特異的な腎疾患自己治癒機構の欠損
3. 学会等名 第17回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	宮崎 徹  (MIYAZAKI TORU)  (30396270)	東京大学・医学系研究科・教授   (12601)	
連携研究者	新井 郷子  (ARAI SATOKO)  (60422276)	東京大学・医学系研究科・准教授   (12601)	