

平成 22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790034
 研究課題名（和文） AGE レセプターの認識機構に着目した糖尿病合併症治療薬シード分子の創製
 研究課題名（英文） AGE-RAGE interaction as a target for drug design against diabetes complications
 研究代表者
 吉田 卓也（YOSHIDA TAKUYA）
 大阪大学・薬学研究科・助教
 研究者番号：00294116

研究成果の概要（和文）：

AGE レセプター（RAGE）の AGE 結合ドメインにおける動的なコンフォメーション変化を NMR 緩和実験及び分子動力学計算によって解析した。その結果に基づいて定めたターゲット構造に対し、低分子化合物のバーチャルスクリーニングをおこなった。結合が期待される化合物について、ELISA, SPR 及び NMR を用いた *in vitro* での結合実験を実施したところ、RAGE-AGE 結合阻害剤の候補分子を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We have analyzed the conformational dynamics of the variable-type domain of RAGE (Receptor for AGE), which has been revealed to contain the binding site of AGE. Based on the results of NMR and MD calculation, a combination of virtual and *in vitro* screening was carried out to find suitable chemical compounds to interfere with the AGE-RAGE binding. As a result, chemical compounds were identified as candidates for RAGE inhibitor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化等に伴い糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病患者の平均寿命は、一般人口より 10 年以上短く、死に至る以前にも、網膜症・腎症等の血管合併症により quality of life (QOL) が著しく損

なわれる。逆に、糖尿病を発症しても、血管合併症の発症・増悪を阻止できれば、患者の QOL は著しく改善される。従って糖尿病患者の合併症を抑制する手段を開発することは、医薬研究従事者に強く求められている課題である。糖尿病による高血糖状態では、還

元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応によって終末糖化産物 (Advanced Glycation End-products: AGE) と総称される一群の物質が生成・蓄積し、血管障害等の糖尿病合併症の重要な成因となっている。RAGE (Receptor for AGE) は AGE のレセプターとして知られる I 型膜タンパク質であり、細胞外領域はそのアミノ酸配列から 3 つの免疫グロブリン様ドメイン (V, C1, C2) からなる。RAGE は血管内皮細胞やマクロファージ等に発現しており AGE による血管障害に深く関与していることが示唆されている。そのため、RAGE は糖尿病合併症治療薬のターゲット分子として注目されている。しかし AGE はその生成過程から様々な分子種が生成しており、RAGE が強く結合できる AGE に限っても複数あると考えられているが、その詳細は明らかとなっていない。そのため AGE-RAGE の相互作用には不明な点が多く、有力な RAGE アンタゴニストも報告されていない。

そのような状況のなか、研究代表者は平成 17-18 年度科学研究費補助金(若手 B)「終末糖化産物 AGE レセプターの機能構造解析と創薬への応用」において、RAGE のリガンド認識機構の解明に取り組んできた。その結果現時点までに、NMR で決定した RAGE リガンド結合ドメイン (V ドメイン) の立体構造と、RAGE 変異体と AGE との結合アッセイ及び Biacore による RAGE-AGE 相互作用のリアルタイム解析によって、RAGE の特異な AGE 認識機構を明らかにしつつある。すなわち、主に静電相互作用によって RAGE 表面で捕獲された AGE が、RAGE のコンフォメーション変化を介して内部の疎水性領域と強く相互作用し認識されるという機構である。これは、RAGE が多様な AGE 種を曖昧さを許しながらも認識するため、通常のレセプターのようにリガンドの部分構造を認識するアミノ酸残基を空間的に配置するのではなく、リガンドの持つ性質を時間的に分割して認識する機構を備えていると理解できる。そこで糖尿病合併症治療薬のリード分子として RAGE アンタゴニストを合理的に開発する際には、この特異な機構を考慮しなければならないとの着想に至った。実際にこれまでの研究でアポ状態の RAGE リガンド結合ドメインの静的な構造に基づいてバーチャルスクリーニングを実施したが、充分高い親和性を持つ化合物は見出されていない。

2. 研究の目的

本研究では、AGE レセプターの特異なリガンド認識機構に着目し、糖尿病合併症治療薬リード分子の創製を目指して主に以下の課題に取り組んだ。

(1) RAGE のリガンド結合ドメインにおい

て、AGE 遭遇時に誘起され AGE-RAGE 結合を安定化するコンフォメーション変化を詳細に解明する。また AGE 非結合時においても AGE を受容できるコンフォメーションが存在しているか否かを明らかにし、存在していればどのような構造であるか解析する。この研究によって、RAGE アンタゴニストのターゲットとして有効性が高い構造・部位を明らかにする。

(2) 上記のターゲット構造に対し結合する分子、およびアポ状態の RAGE の立体構造を安定化し、RAGE のコンフォメーション変化を抑制する分子を *in silico* で探索・設計し、実際の RAGE 阻害を確認する。RAGE アンタゴニスト候補分子に関しては、RAGE 複合体の構造解析を行い、設計方針を検証する。

本研究の第一の特色は、RAGE の構造変化を伴う特異な AGE 認識機構に着目している点である。我々の研究によって、アポ状態の RAGE 構造だけではなく、構造変化を経て最終的にリガンドを受容する構造を含めてアンタゴニストの標的とするべきであると示唆された。ただし高い結合活性を持つ低分子 AGE は単離されていないので、現時点で複合体を作成しその構造を決定することはできない。そこで、NMR の手法によって、溶液中でアポ状態の RAGE 構造と平衡にあると思われるリガンド受容構造を解明することを目論んだ。さらに申請者は RAGE と主に静電相互作用で弱く結合する AGE 分画を既に得ており、これを用いて RAGE の構造変化を誘発できると考えた。このような手法で、高いリガンド親和性を示す RAGE の構造をあぶり出すことで、従来の静的な構造に基づいた方法に比較し、より親和性が高いリガンドを探索・設計できると期待した。このような存在比は低い活性に重要な構造の存在は最近注目されつつあり、将来的に合理的なリガンド創出における新しい方法論への展開も期待される。

本研究のもう一つの特色は、糖尿病合併症治療薬リード分子の創製において、RAGE 分子を標的としている点である。従来、糖尿病血管合併症の治療薬開発戦略として、既に AGE 生成阻害薬が研究されているが、AGE には非酵素的糖化反応で生じる様々な構造体があり、一方、RAGE 下流の細胞内情報伝達経路も細胞種や状態により異なる。したがって、リガンド側、細胞側両者の多様性が収斂する RAGE を標的とする点が重要である。RAGE アンタゴニストは治療薬シーズとして医学・薬学的に非常に意義深いのみならず、その研究を通じて、未解明な点が多い AGE-RAGE 系の役割について構造生物学的立場から新たな知見が得られると期待される。糖尿病血管合併症の治療薬シーズとして RAGE アンタゴニストは、前述のように極め

て社会的要請が高い物質である。また RAGE は、AGE 以外のリガンドとも相互作用し、その結果、ガンの転移や、感染症応答でも重要な役割を果たしていることが指摘されている。すなわち、RAGE アンタゴニストは、これらの機構を解析する優れたプローブとしても応用できる。

3. 研究の方法

NMR 緩和解析および分子動力学計算によって、AGE レセプター(RAGE)のリガンド認識部位の構造多形を解析し、in silicoでのリガンドスクリーニング標的構造を抽出する。

得られたターゲット構造に対して結合が期待される分子を市販低分子化合物の構造ライブラリーより in silicoで探索する。

入手可能な低分子化合物について実際に RAGE リガンド結合ドメインとの結合親和性を ELISA、SPR 及び NMR によって解析する。また、既知の RAGE リガンドと、RAGE との相互作用を解析し、低分子化合物による結合阻害を調べる。

4. 研究成果

AGE レセプター(RAGE)の認識機構の解明に重要であるリガンド結合によって誘起される動的なコンフォメーション変化を解析する準備として、RAGE リガンド結合ドメイン(可変領域様ドメイン、V ドメイン)の NMR 緩和測定、温度可変実験を行った。その結果、V ドメインに予想通りコンフォメーション多形が存在することが示された。また、PRE 解析用に RAGE の V ドメインと C1 ドメイン(定常領域様ドメイン)を連結した新たなコンストラクトを作成し、試料の大量調製に成功した。一方リガンドに関しては、AGE と RAGE との結合が AGE の調製法に依存して異なるカイネティクスを示すことを表面プラズモンセンサーによる解析で見出した。これは AGE の分子サイズに起因すると考えられ、AGE-RAGE 結合における動的なコンフォメーション変化を反映していることが推測される。さらに、これまで見出していたリガンドに比べより相互作用解析に適した溶解性の高いリガンド化合物を用い、スクリーニング手法である T2filter 及び diffusion filter 法の最適化を行うと共に、結合ドメインの相互作用部位について NMR を用いた化学シフト摂動法で解析した。その結果、これまで変異体解析で示唆されていた RAGE の AGE 結合部位周辺で化合物との相互作用が認められた。分子動力学計算によって、当該部位の構造アンサンブルを求めた。得られたターゲット構造に対して親和性の高い分子を in silico で探索した。入手可能な低分子化合物について実際に RAGE リガンド結合ドメインとの結合親和性を ELISA および SPR によって解析した。その

結果、RAGE との結合を示す化合物が得られた。また、RAGE の内在的リガンドとして、がんや炎症といった疾患に関与すると考えられる HMGB1 および S100 蛋白質が注目されている。そこで HMGB1 および S100 蛋白質について大腸菌の大量発現系を構築し、RAGE リガンド結合ドメインにおける相互作用部位を解析した。その結果、低分子リガンド中に、内在的リガンドと競合する可能性があるものを見出した。

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 2 件)

(1) Takahashi R, Nakamura S, Nakazawa T, Minoura K, Yoshida T, Nishi Y, Kobayashi Y, Ohkubo T., Structure and reaction mechanism of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. J Biochem., 2010, 147, 95-107, 査読有

(2) Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Ohkubo T, Kobayashi Y., Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction., Biochemistry, 2008, 47, 12299-311, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 藤田直子, 吉田卓也 他, 立体構造に基づく終末糖化産物 AGE 受容体とリガンド間の相互作用解析, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山市

(2) 吉田卓也 他, 非線形サンプリングデータ解析法の改良, NMR 討論会, 2009 年 11 月 11 日, 福岡市

(3) 原田秀作, 吉田卓也 他, AGE レセプター阻害化合物の探索と評価, 第 55 回日本生化学会近畿支部例会, 2008 年 5 月 24 日, 大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 卓也 (YOSHIDA TAKUYA)
大阪大学・薬学研究科・助教
研究者番号：00294116

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：