

AGEレセプターの分子多様性とそのメカニズム

金沢大学医学部医学科生化学第二講座 (主任: 山本 博教授)

Md. Joynal Abedin

後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) が特異受容体 (receptor for AGE, RAGE) を介して血管細胞を障害することが、糖尿病血管合併症の発症、進展に重要な役割を果たすことが知られてきた。しかし、AGEリガンド結合後の細胞内情報伝達経路や血管恒常性破綻のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。本研究で筆者は、RAGE後シグナリング解明への第一歩としてヒトRAGE蛋白の分子性状を調べた結果、以下の新知見を得た。まず、種々のヒト組織・細胞からの抽出物をウエスタンブロット分析すると、分子量の異なる二つのタイプが存在することが見出された。一つは分子量約55 kDaで肺で発現していることから「肺型」と命名した。もう一つは分子量約46 kDaで、血管内皮細胞、周皮細胞などで発現される分子種であることから「血管型」と命名した。逆転写-DNA増幅反応によるクローニングと塩基配列決定の結果、肺と血管細胞には同一の成熟型mRNAが存在することが明らかとなり、両細胞で同一の構造を有するプレRAGE蛋白が翻訳されると推定された。全長RAGE cDNAを鋳型とした試験管内転写・翻訳反応生成物は約51 kDaの位置に泳動され、小胞体膜の存在下ではプレRAGEは小胞体内への移行に伴って高分子化した。肺抽出物をグリコペプチダーゼFで消化すると、肺型RAGE蛋白のサイズは51 kDaに減少した。一方、血管型RAGE蛋白はグリコペプチダーゼFによっては全く影響されなかった。したがって、肺型はN-グリコシル化されており、血管型はこの修飾を受けていないと考えられた。領域特異的な抗体を用いたウエスタンブロット分析で血管型RAGE蛋白はN末端側16アミノ酸及びC末端側20アミノ酸に対応する抗体によっては認識されなかった。血管型RAGEは、肺型RAGEと比較して、より低濃度の界面活性剤存在下で可溶化されることが示された。したがって、以上の結果から、血管細胞で発現するRAGE蛋白は肺RAGE蛋白とは構造上異なっており、これは糖鎖付加や蛋白限定分解による翻訳後修飾の差によるものと推定された。本研究で見出されたRAGE蛋白の分子多様性は、AGEリガンドに対する細胞応答の多様性を理解するための基礎となるものと考えられる。

Key words advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE), diabetic complications, molecular heterogeneity, vascular endothelial cells, lung

グルコースなどの還元糖は蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応し、シッフ塩基、アマドリ転移化合物を経て、不可逆的な脱水、縮合、架橋により特異な吸光、蛍光を示す後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) を形成する。この現象は当初食品化学の領域で見出され、1912年 Maillard¹⁾ によって最初に記載されたことから、メイラード反応として知られている。近年に至り、メイラード反応は生体内でも加齢に伴って起り、特に糖尿病状態で慢性的な高血糖状態が続くと、循環血液や組織中でAGEの形成と蓄積が加速的に進行することが明らかにされた²⁾。さらに、この高血糖によるAGE蓄積が網膜症、腎症をはじめとする糖尿病合併症発症の原因の一つとなるものと推測されてきている。AGEの生物学的作用を仲介する特異レセプターや結合蛋白の存在も知られてきた。1992年 Nepperら³⁾ は、ウシ肺からAGE結合能を持つ細胞膜表面蛋白を分離し、AGEレセプター (receptor for AGE, RAGE) と名付けた。アセチル化低密度リポ蛋白、酸化低密度リポ蛋白といった変性蛋白のスカベンジャー受容体として知られているマクロファージクラ

スAスカベンジャー受容体もAGEの取り込み能を有する⁴⁾。Vlassaraのグループは⁵⁾⁶⁾、ラット肝臓からAGE結合活性を示すガレクチン-3複合体を分離した。これらのうち、糖尿病性の細小血管細胞変化にはRAGEが重要な役割を果たしている可能性が示唆されてきている。Yamagishiら⁷⁾ は、AGEがウシ網膜微小血管周皮細胞の増殖を遅延させるとともに、周皮細胞に対して急性毒性効果も発揮することを示した。AGEは血管内皮細胞にも直接作用し、血管新生を促す⁸⁾。一方で、プロスタサイクリン産生の低下とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1の産生亢進による血栓傾向も招く⁹⁾。AGEの内皮・周皮細胞作用は、RAGE mRNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドで消去されることから、RAGEとの相互作用を介するものと推定される。Tsujiら¹⁰⁾ は、AGEが腎メサンギウム細胞で細胞外基質の一種であるIV型コラーゲンの産生を亢進させ、これがRAGE mRNAに対するリボザイムで防止されたことから、糖尿病性腎症の初期病変であるメサンギウム領域の拡大にAGE-RAGE系が関与している可能性を提唱した。

平成11年11月24日受付, 平成12年1月12日受理

Abbreviations : AGE, advanced glycation endproducts; EN-RAGE, extracellular newly identified RAGE-binding protein; FBS, fetal bovine serum; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RAGE, receptor for AGE

このように、AGE-RAGE系は糖尿病性血管症特に細小血管症の発症に関係しているものと推察されるが、糖尿病で細小血管が障害されるメカニズムの全容を明かにするには、RAGE後の細胞内シグナリング経路を個々の細胞種で究明する必要がある。しかしながら、RAGE蛋白の実体や存在様式についてはなお不明な点が多く、またAGEリガンド受容後細胞内でRAGEと相互作用するセカンドメッセンジャー分子も未だ特定されていない。

そこで筆者は、RAGE後細胞内情報伝達経路解明への第一歩として、ヒト組織・細胞で発現しているRAGE蛋白の実体を明らかにすることを目的に本研究を行った。この結果、ヒトRAGE蛋白には分子多様性が存在し、血管細胞で発現しているRAGE蛋白は、従来肺での観察から推定されていた性状とは異なる分子性状をもつことが発見された。本研究ではさらに、この分子多様性がどのようなメカニズムで生ずるのかについても追求めた。

材料および方法

I. 組織、細胞

1. 組織

ヒト組織は、金沢大学医学部附属病院で外科的に切除された癌標本中の健常部を用いた。肺組織は第一外科(渡邊洋宇教授)、肝・膵組織は第二外科(三輪見一教授)、腎組織は泌尿器科(並木幹夫教授)、脳組織は脳神経外科(山下純宏教授)より分与された。各組織は氷上で細切後 -80°C で保存した。

2. 細胞

ヒト皮膚由来微小血管内皮細胞(Cascade, Portland, USA)は、クラボウ・バイオメディカル部(大阪)のマニュアルに従い、5%ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS), 5ng/ml塩基性線維芽細胞増殖因子, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン, 10ng/ml上皮成長因子, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ハイドロコチゾンと39.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ジブチリルcAMPを含むHu-MediaEB2培地中で維持した。ヒト脳微小血管周皮細胞はヒト正常脳皮質から培養化されたもので、製造会社(Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, USA)の推奨どおりCS-C完全培地中で維持した。ヒト胎児肺由来の線維芽細胞株MRC-5細胞¹¹⁾は理化学研究所細胞銀行(つくば市)から購入し、10%FBS(JRH Biosciences, Lenexa, USA)を含むRITC80-7培地中で維持した。ヒト単球細胞は健常ボランティアから採取した全血からConrad¹²⁾の方法により培養化した。

II. 試薬

ウサギ網状赤血球溶解液転写・翻訳共役キットはPromega社(Madison, USA)から購入した。組換えヒトRAGE蛋白の細胞外ドメインに対するウサギポリクローナル抗体は、三井製薬工業株式会社生物科学研究所(茂原市)より恵与された。ヒトRAGE蛋白の細胞内ドメインに対するウサギポリクローナル抗体は、サワデー・テクノロジー(東京)に委託して、ヒトRAGE cDNA配列³⁾から推定された16アミノ酸の配列(DRRQRRGEERKAPENQ)を化学合成し、これを抗原としてウサギを免疫後、得られた抗血清をさらにアフィニティー精製して得た。ヒトRAGE蛋白のN末端16アミノ酸(AQNITARIGELPLVKC)とC末端20アミノ酸(ERAELNQSEEPEAGESSTGG)に対するヤギポリクローナル抗体(N-16とC-20)は、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, USA)より購入した。グリコペプチダーゼFは、宝酒造(京都)

より購入した。

III. 組織・細胞抽出物の調製

凍結ヒト組織は、液体窒素中で粉末化後、Laemmli緩衝液¹³⁾(62.5mMトリス塩酸緩衝液(pH 6.8), 2% SDS, 10%グリセロール, 0.002%プロモフェノールブルー, 5%2-メルカプトエタノール)中で室温にて30-40秒超音波破碎した後、 100°C で5分間加熱した。培養細胞は、75cm²フラスコ中で80-90%コンフルエンスに達した時点で冷PBSで1回洗浄後、5mlの冷PBS中でスクレーパーを用いてフラスコ面からはがし、 4°C , 1000rpmの遠心で沈殿させた。沈殿物をLaemmli緩衝液に懸濁後、上記と同様に超音波破碎・加熱処理して細胞抽出物とした。

IV. 蛋白質の定量

蛋白濃度はウシ血清アルブミンを標準としてBradford法¹⁴⁾で測定した。

V. ウェスタンブロット分析

蛋白質をSDS-PAGEで分離した後、PVDF膜(Immobilon P, Millipore, Bedford, USA)上にセミドライ方式で電気的に転写した。転写後、PVDF膜上の蛋白非付着部位を5%脱脂ミルク, 1%ウシ血清アルブミンを含む0.1%Tween-20加PBSでブロッキングした後、ヒトRAGE蛋白細胞外ドメインあるいはRAGE蛋白の特定領域に対する抗体を一次抗体として、PVDF膜と反応させ西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギイムノグロブリンまたは抗ヤギイムノグロブリンを二次抗体として、ECL検出システム(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)を用いて可視化させた。

VI. RAGE cDNAの分離と構造決定

ヒト微小血管内皮細胞からQuick prep mRNA精製キット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてポリA⁺ RNAを分離し、これを鋳型としてMarathon cDNA増幅キット(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA)を用いてcDNAを調製した。得られたcDNAを鋳型とし、5'プライマーとしては既報のRAGE遺伝子¹⁵⁾のヌクレオチド番号6641-6662に対応し、5'端にXbaIアダプターを有する5'-GATCTAGACTGATGGATGGGATCTGTCTGTG-3', 3'プライマーとしてはヌクレオチド番号9752-9774に対応し、5'端にEcoRIアダプターをもつ5'-GAGAATTCGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3'を用い、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造)により微小血管内皮細胞RAGE cDNAを増幅した。増幅産物をXbaIとEcoRIで消化後、pcDNA3ベクター(Invitrogen, Carlsbed, USA)に連結し大腸菌JM109に移入した。形質転換JM109細胞からFlexiprepプラスミド分離キット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて組換えプラスミドDNAを分離精製した。さらに5'端および3'端領域の配列を知るため、ヒト微小血管内皮細胞ポリA⁺ RNAとMarathon cDNA増幅キットにより調製した微小血管内皮細胞由来cDNAおよびKlenTaq DNAポリメラーゼ(CLONTECH Laboratories)を用いた5'および3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)反応を行った。5'-RACEには、一次プライマーとして5'-CTGCACCCGAAAATCCCCTCATC-3'(RAGE cDNA3)のヌクレオチド番号277-299に対応し、ネステッドプライマーとして5'-GTGTTTCAGTTTCCATTCCAGCCGC-3'(RAGE cDNA3)のヌクレオチド番号141-164に対応し、5'-GCTCAAAACATCACAGCCCGATTG-3'(それぞれRAGE

VII. グリコペプチダーゼFによる脱糖鎖

ヒト肺および血管内皮細胞を1Mトリス塩酸緩衝液 (pH6.8), 1% SDS, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.1% NP-40中で溶解し, グリコペプチダーゼFと37℃で反応させた. 消化物はSDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 電気泳動, ウェスタンブロットティングで分析した.

成 績

I. ヒト RAGE 蛋白の多様性の発見

手術摘出ヒト組織・ヒト培養細胞からの抽出物を抗ヒト RAGE細胞外ドメイン抗体でウェスタンブロット分析すると, 図1に示すように, 肺とそれ以外の組織・細胞では異なる位置に主要バンドが検出された. 肺では, 約55 kDaの位置にもっとも強いシグナルが検出され, 約51 kDaと約46 kDaの位置に薄いバンドが検出された. 一方, ヒト肝臓, 腎臓, 脳および培養ヒト血管内皮細胞, 周皮細胞, 線維芽細胞と単球では, 約46 kDaの位置に単一バンドが検出された. 脾臓では, 約46 kDaのバンドに加え, 高分子側と低分子側に弱いシグナルを示す複数のバンドが認められた. 0.2 μ gの肺抽出物が与える約55 kDaバンドのシグナル強度と5 μ gの非肺組織・細胞が与える約46 kDaバンドのシグナル強度はほぼ同程度であった. 筆者は, 肺で認められた約55 kDaの免疫反応物を「肺型」RAGE蛋白, 血管内皮細胞ほかの非肺組織・細胞で認められた約46 kDaの免疫反応物を「血管型」と命名した.

II. RAGE 蛋白分子多様性の発生メカニズムに関する検討

1. 血管内皮細胞からの成熟型 RAGE mRNA 配列の決定.

一体どのようなメカニズムにより, 肺型と血管型という RAGE 蛋白の分子性状の違いが生み出されるのであろうか. ヒ

ト RAGE 遺伝子は, ハプロイドあたり1コピーしか存在しない単一のユニーク遺伝子であり, ヒト第6番染色体短腕21.3領域に局在する¹⁶⁾. したがって, RAGEの分子多様性出現のメカニズムは転写以降の段階に求められる. 筆者は, ヒト血管内皮細胞から RAGE cDNA を分離して全長の塩基配列を決定し, 得られたヌクレオチド配列をヒト肺 cDNA の配列⁹⁾と比較した. その結果, 図2に示すように, 一ヶ所のポリモルフィズム (アミノ酸番号100: グルタミン→アルギニン) を除き, 血管内皮と肺とで翻訳枠の全塩基配列および推定されるアミノ酸配列は同一であることが見いだされた. したがって, 肺と血管細胞では同一の構造を有するプレ RAGE タンパクが翻訳・産生されると推定された.

2. 肺型 RAGE 蛋白は翻訳後修飾を受けていそうである.

次に筆者は, 以下の目的で, 全長ヒト RAGE cDNA を用いた試験管内転写・翻訳・蛋白プロセッシング反応を行った. すなわち, 成熟 mRNA 配列から推定される翻訳枠で実際に翻訳されるのかどうか, 無細胞系での翻訳産物と細胞で作られる RAGE 蛋白のサイズはどう異なるか, 無細胞系に小胞体を加えた場合 RAGE mRNA 翻訳産物は加工を受けるかどうか, について検討した. その結果, 図3Aに示すように, 無細胞翻訳系での生成物 (=プレ RAGE) は約51 kDaで, 同時に泳動した肺型 (約55 kDa) と血管型 (約46 kDa) のいずれとも異なる位置に泳動された. このプレ RAGE は, 図3Bに示すように, 大腸菌で発現させたヒト RAGE の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体, cDNA 配列から推定された細胞内ドメインの合成アミノ酸配列に対するポリクローナル抗体のいずれによっても認識された. したがって, RAGE mRNA は推定された翻訳枠の通り翻訳されるものと判断された. 無細胞翻訳反応液中に小胞体を添加すると, 加えた小胞体量に依存して RAGE 蛋白バンドが高分子

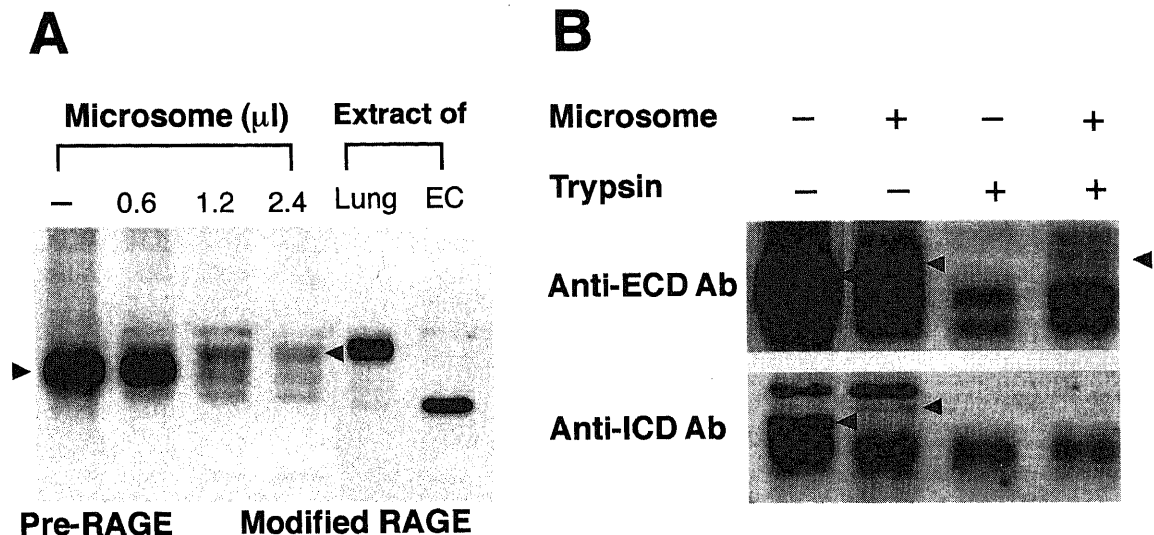


Fig. 3. *In vitro* transcription, translation, processing (A) and translocation (B) with full length RAGE cDNA. (A) One μ g of pBS/RAGE cDNA was translated in the presence of 0, 0.6, 1.2, and 2.4 μ l of canine pancreatic microsomal membranes. Translated products were analyzed by SDS-PAGE. Lung (0.1 μ g) and EC (5 μ g) extracts were run in parallel. RAGE protein was detected by Western blotting using the anti-RAGE extracellular domain (ECD) antibody. The positions of pre-RAGE and modified RAGE are indicated by arrow heads. (B) In the translocation assay, proteins were synthesized in the presence or absence of microsomes (2.4 μ l), were treated or not treated with 0.1 mg/ml trypsin. Then the proteins were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-RAGE extracellular domain (ECD) and anti-RAGE intracellular domain (ICD) antibodies. The positions of immunoreactive proteins are indicated by arrow head. Other bands seem to represent non-specific binding of anti-RAGE proteins to some components contained in reticulocyte lysates.

側にシフトし、肺型 RAGE 蛋白の位置に近づくことが観察された (図 3A)。このことは、プレ RAGE が小胞体内に移行し、小胞体腔内で何らかの付加修飾を受けた可能性を示している。さらに図 3B に示すように、小胞体の存在・非存在下に翻訳反応を行った後、トリプシンで処理すると、抗細胞外ドメイン抗体との反応性は小胞体によってトリプシン消化から保護されるのに対し、抗細胞内ドメイン抗体との反応性は小胞体存在下でも消失した。このことは、RAGE 蛋白のドメイン構成は、シグナル配列、細胞外ドメイン、一回膜貫通領域、細胞内ドメインというアミノ酸配列から推定されたトポロジーと一致することを示している。

3. 肺型 RAGE は N-グリコシド結合型糖鎖の付加を受けているが、血管型 RAGE はこの修飾を欠く。

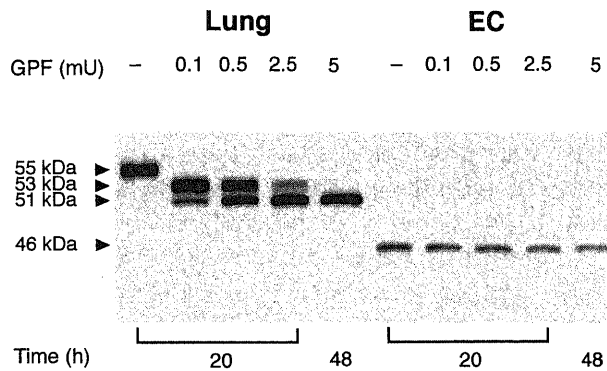


Fig. 4. Glycopeptidase F digestion of lung and EC extracts. 0.1 μg of human lung extract and 2.5 μg of EC extract were digested with indicated amounts of glycopeptidase F for the indicated time periods. Digests were analyzed by SDS-PAGE and by immunoblotting with anti-RAGE extracellular domain (ECD) antibody. Apparent molecular weight of each band is shown on the left.

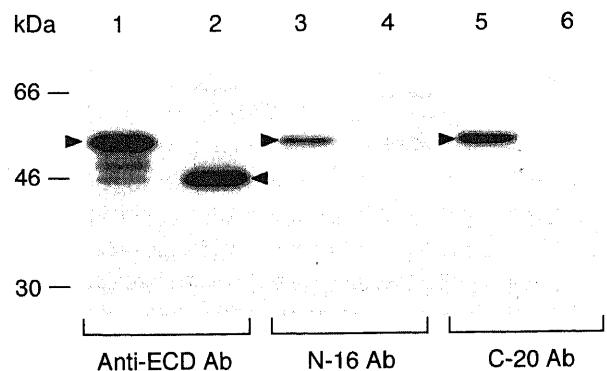


Fig. 5. Western blot analyses of lung and EC extracts using region-specific antibodies. 0.25 μg of lung extract and 12.5 μg of EC extract were separated by SDS-PAGE, immunoblotted using anti-RAGE extracellular domain (ECD) (lanes 1 and 2), N-16 (lanes 3 and 4), and C-20 (lanes 5 and 6) antibodies. The positions of the immunoreactive bands are indicated by arrow heads. Protein markers are shown on the left.

mRNA 配列から推定されるヒト RAGE 蛋白のアミノ酸配列中には Asn-X-Thr/Ser という N-グリコシド型糖鎖付加部位が二ヶ所存在する (図 2)。したがって、試験管内翻訳・蛋白プロセッシング反応で認められた小胞体存在下での RAGE 蛋白の高分子化は N-グリコシル化による可能性が考えられる。そこで筆者は、N-グリコシド型糖鎖をアスパラギンとの付着部位で特異的に切断する酵素であるグリコペプチダーゼ F¹⁷⁾ を用いてこの可能性を検証した。この結果、図 4 に示すように、肺抽出物では、55 kDa 蛋白はグリコペプチダーゼ F 存在下で消失し、新たに 53 kDa と 51 kDa の位置にバンドが出現した。酵素量の増加に伴って 53 kDa 蛋白は徐々に減少し、これに並行して 51 kDa 蛋白が増量した。5 mU グリコペプチダーゼ F、48 時間の消化では、51 kDa の単一バンドになった。一方、血管型 RAGE 蛋白はどの消化条件でも全くグリコペプチダーゼによる影響を受けず、常に 46 kDa の位置に泳動された。

4. 血管型 RAGE 蛋白は N 末端、C 末端とも肺型 RAGE 蛋白より短いかもしれない。

図 4 から分かるように、血管型 RAGE 蛋白のサイズは、グリコペプチダーゼ F で完全消化された肺型 RAGE 蛋白のサイズよりさらに小さい。そこで筆者は、肺と血管内皮細胞の抽出物を RAGE 蛋白上でエピトープが特定された抗体を用いてウェスタンブロット分析した。一つの抗体 (N-16) は成熟 RAGE タンパクの N 末端から 16 アミノ酸を認識し、もう一つの抗体 (C-20) は C 末端からの 20 アミノ酸の領域を認識する。この結果、図 5 に示すように、肺型 RAGE はいずれの抗体とも反応して約 55 kDa の位置に検出されたが、血管内皮細胞抽出物は N16, C20

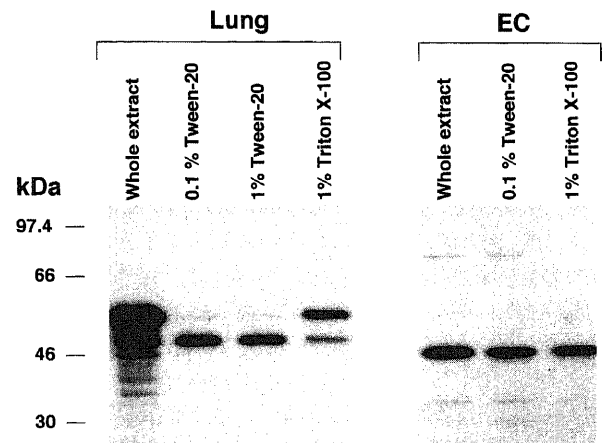


Fig. 6. Western blot analysis of lung and EC extracts that were extracted with the buffers containing different concentration of detergents. Frozen human lung tissue was crushed in liquid nitrogen, sonicated in HEPES-buffered saline containing 0.1% Tween 20, 1% Tween 20 or 1% Triton X-100, and extracted on ice for 30 min with gentle stirring. Human microvascular endothelial cells were scraped in phosphate-buffered saline from culture dishes and centrifuged. The pelleted cells were sonicated and extracted in HEPES-buffered saline containing 0.1% Tween 20 or 1% Triton X-100. 0.5 μg of the lung extracts and 5 μg of the EC extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using the anti-RAGE extracellular domain (ECD) antibodies. Whole lung extract and whole EC extract were loaded on the gel as control.

のいずれを用いても特異バンドを生じなかった。

5. 血管型 RAGE 蛋白と肺型 RAGE 蛋白は可溶性に差がある。

次に、血管型 RAGE 蛋白と肺型 RAGE 蛋白に可溶性の差があるかどうかを検討した。凍結ヒト肺組織を液体窒素中で粉末化後、それぞれ 0.1% Tween 20, 1% Tween 20 または 1% Triton X-100 を含む HEPES 緩衝生理食塩水中で超音波破碎した後、氷上で 30 分間攪拌抽出した。ヒト微小血管内皮細胞は、スクレイブ、遠心の後、それぞれ 0.1% Tween 20 または 1% Triton X-100 を含む HEPES 緩衝生理食塩水中で超音波破碎した後、氷上で 30 分間抽出した。抽出終了後、100,000 x g, 30 分間遠心し、可溶画分に回収される RAGE 蛋白量をウェスタンブロットにより分析した。その結果、図 6 に示すように、55 kDa 肺型 RAGE 蛋白は 0.1% Tween 20, 1% Tween 20 を含む緩衝液ではほとんど抽出されず、組織からの抽出・可溶化には 1% Triton X-100 の存在が必須であった。肺組織からは 0.1% Tween 20, 1% Tween 20 存在下では低分子量の RAGE 蛋白のみが抽出された。これに対し、血管型 RAGE 蛋白の多くが 0.1% Tween 20 により細胞から抽出・可溶化された。

考 察

RAGE は、コロンビア大 Stern のグループ³⁾によってウシ肺から分離された AGE 受容体で、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜表面蛋白である。その後、RAGE は血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、単球、マクロファージ、腎メサングウム細胞、線維芽細胞などの広範な細胞種で発現されていることが明らかになった⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。RAGE に結合するリガンドとしては、AGE 以外にアンフォテリン²⁰⁾、細胞外新規 RAGE 結合蛋白質 (extracellular newly identified RAGE-binding protein, EN-RAGE)²¹⁾、アルツハイマーアミロイド β 蛋白²²⁾ といった内在性蛋白も知られてきた。アンフォテリンと RAGE の相互作用は大脳皮質ニューロンのネットワーク形成に関係する可能性が示唆されている²⁰⁾。EN-RAGE は、RAGE が最初分離されたと同じ肺で同定された内在性リガンドで、EN-RAGE と RAGE との結合は種々の炎症性反応を仲介するようである²¹⁾。アルツハイマー病脳病巣で RAGE の発現が亢進し、RAGE 蛋白はアミロイド β 蛋白結合能を持つことから、RAGE とアルツハイマー脳症の関わりも示唆されてきている²²⁾。さらに、AGE と RAGE の相互作用は、糖尿病性網膜症^{7)~9)23)}、腎症¹⁰⁾ 発症、進展、に密接に関わっていることが推定されてきている。また AGE による内皮細胞接着分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の誘導と単球の内皮細胞への接着亢進が、抗 RAGE 抗体や可溶性 RAGE で阻害されたこと²⁴⁾ やストレプトゾトシンで糖尿病を誘発したアポリプロテイン E 欠損マウスにおける動脈硬化病変の形成が、可溶性 RAGE の投与で抑制されたこと²⁵⁾ から AGE-RAGE 系は糖尿病性大血管症の発症にも関わりうるものと考えられている。このように、RAGE が様々な細胞種で発現され、多様な細胞応答と種々の生理的・病的変化を引き起こすことが明らかにされてきた。したがって、いまだ不明な点が多い RAGE 後の細胞内情報伝達経路とそれを担うシグナル分子を明らかにすることは医学生物学上重要と考えられる。

本研究で筆者は、この RAGE 後のシグナリングの解明への第一段階として、種々のヒト組織・細胞で発現している RAGE 蛋白の分子性状を調べた。その結果、肺と非肺組織では免疫反応

性 RAGE 蛋白のサイズが大きく異なることがはじめて見出された。肺 RAGE 蛋白は約 55 kDa、血管内皮細胞・周皮細胞、脳、腎臓などで発現する RAGE 蛋白は約 46 kDa (図 1) であり、前者を「肺型」、後者を「血管型」と命名した。生体組織、細胞に存在する RAGE 蛋白の分子量に関する報告は比較的少ない。Schmidtら²⁶⁾²⁷⁾ は、ウシ肺から分離した RAGE 蛋白の分子量は約 35,000 で、これは完全長の RAGE 蛋白分子が分離の過程で分解されたためとしている。Yamagishiら⁹⁾ はヒト血管内皮細胞で約 46 kDa の RAGE 蛋白を本研究で用いたのとは別の抗体で検出している。Yanら²²⁾ はヒト脳 RAGE 蛋白の大きさを約 50 kDa と推定しており、血管型のサイズに近い。Sunら²⁸⁾ は、ラット肺のウェスタンブロットで 46 kDa の単一バンドを示している。これが、本研究で認められた肺型でなく血管型のサイズとほぼ同じであるのは、種差、用いた抗体の違いあるいは蛋白分解によるのかもしれない。

本研究は次に、このような RAGE 蛋白分子多様性が生ずるメカニズムについての検討を行った。血管内皮と肺で RAGE 蛋白をコードする成熟 mRNA 配列に 1 アミノ酸のポリモルフィズムを除き全く差異がなかったことから (図 2)、肺と微小血管内皮細胞では当該 mRNA から、シグナル配列、膜貫通領域を有する同一の構造の RAGE 蛋白が翻訳・産生されていると考えられた。全長ヒト RAGE cDNA を鋳型に無細胞系で、転写・翻訳して得られたプレ RAGE 蛋白の電気泳動上の見かけの分子量は約 51 kDa で、mRNA 配列から推定される分子量 42, 830 (404 アミノ酸) と比較して大きいのが、これは RAGE タンパクのアミノ酸組成の特徴によるものと推定される。試験管内翻訳反応を小胞体存在下に行くと、抗 RAGE 抗体と反応する産物は高分子化して肺型 RAGE のサイズに近づいた (図 3)。したがって、RAGE 蛋白は何らかの翻訳後修飾を受け得ると推定された。この翻訳後修飾の実体の少なくとも一部は N-グリコシド型糖鎖の付加であることが本研究ではじめて明らかになった。グリコペプチダーゼ F による不完全・完全消化により、肺型 RAGE は二ヶ所で N-グリコシル化を受けていることが証明された (図 4)。血管型 RAGE 蛋白はグリコペプチダーゼ F 処理によっては全く影響を受けず、したがって、肺型と血管型は、一つには、アスパラギン結合型糖鎖付加の有無、という点で明確に異なることが明らかとなった。さらに、N 末端と C 末端に対するエピトープ特異抗体を用いたウェスタンブロット分析 (図 5) から、血管型 RAGE 蛋白は、mRNA 翻訳枠から推定される N 末端の 16 アミノ酸と C 末端側の 20 アミノ酸のすべてが大部分を欠くものと推定された。したがって、RAGE 蛋白の翻訳後修飾には N-グリコシル化以外にも何らかのプロテアーゼによる限定分解が関係している可能性が考えられる。また、肺型 RAGE と血管型 RAGE の可溶性に差が認められ、血管型 RAGE がより低濃度の界面活性剤存在下でも抽出されたこと (図 6) から、血管型 RAGE はより可溶化されやすい状態で血管細胞に存在していると推定される。この理由を知るうえで、血管型 RAGE 蛋白の精製と構造決定が待たれる。なお、ごく最近可溶性 RAGE 蛋白をコードする RNA スプライスバリエントがヒト肺で見出された²⁹⁾。このような可溶性 RAGE が血管細胞にも存在する可能性も否定できない。また、血管細胞膜上にウェスタンブロットでは検出できないくらい微量の肺型 RAGE が存在している可能性も否定できないかもしれない。

本研究による RAGE 蛋白の分子多様性の発見の意義として、

以下の数点が考えられる。第一は、RAGEというレセプター後のシグナリング経路の解明に寄与し得ると考えられることである。RAGE後情報伝達に関して、田中ら³⁰⁾は、ヒトRAGE遺伝子の発現がAGEリガンド自体で亢進されることを見出し、NF- κ B (nuclear factor- κ B)がこのAGE応答性を司ることを明らかにした。Yanら³¹⁾は、AGEが培養マウス血管内皮細胞で酸化ストレスを誘導し、これがNF- κ Bの活性化をもたらすことを示した。Huttunenら³²⁾は、マウス神経芽細胞腫細胞でヒトRAGE cDNAを強制発現させるとアンフォテリン刺激で神経突起の伸長とNF- κ Bの活性化がおり、細胞内ドメインを欠失したRAGE cDNA導入細胞ではこれらの形質変化が誘導されないことを報告している。したがって、RAGEの下流には酸化ストレスやNF- κ Bが位置すると考えられるが、RAGEからのシグナルを直接受容するセカンドメッセンジャーはいまだ特定されていない。今後、血管型RAGE蛋白を精製してその構造を決定することにより、RAGE蛋白の細胞内ドメインと相互作用する細胞内分子の探索が可能になると考えられる。第二は、肺型と血管型というRAGE蛋白の分子性状の違いがRAGEを介する細胞応答の多様性の分子的基礎の一つとなっていると考えられることである。第三は、RAGEリガンドの種類とその結合特性もRAGE蛋白の分子性状のちがいに異なるかもしれないことである。第四は、組織特異的な遺伝子発現の調節機構特にダイファレンシャルな翻訳後修飾のしくみに関して、新しい概念が導かれるかもしれないことである。また、RAGE分子種のちがいにより蛋白としての安定性が異なることも考えられる。第五は、リガンド受容に際するコファクターの要求性がRAGE蛋白分子種により違わないかという点である。肺RAGEはラクトフェリンと複合体を形成することでAGE結合能が増すことが従来観察されてきている³⁾。血管型RAGE蛋白も同様のラクトフェリン依存性を示すのかどうか、あるいは別のコレセプター分子種の介在を必要とするのか、これも今後に残された課題である。最後に、RAGEとそれが関係する上流・下流の分子群は糖尿病性血管合併症やアルツハイマー脳症といった疾病の予防・治療上の分子標的となりうると考えられる。本研究でRAGE蛋白が組織により異なる分子性状を示すことが明らかとなったことから、今後RAGE関連分子を標的とする疾病の予防・治療戦略を考える上で組織特異的なターゲティングも可能になるかもしれない。

結 論

本研究で筆者は、RAGE後シグナリング解明への第一歩として、種々のヒト組織・細胞で発現しているRAGE蛋白の分子性状を調べた。その結果、

1. RAGE蛋白には分子多様性が存在し、肺型と血管型に大別されることが見出された。
2. 成熟RAGE mRNA配列には血管内皮と肺で差がなかった。
3. 試験管内転写・翻訳・蛋白プロセッシング反応で、プレRAGEは小胞体内で高分子化することが見いだされた。
4. この翻訳後修飾の実体はN-グリコシル化であり、肺型は二ヶ所で糖鎖付加を受けていた。
5. 血管型RAGE蛋白は、N-グリコシル化を全く受けていなかった。また、N末端の16アミノ酸とC末端の20アミノ酸を認識する領域特異的抗体によって認識されなかったことから、血管型RAGEは翻訳後何らかの蛋白限定分解を受けると推定され

た。

6. 血管型RAGEと肺型RAGEは可溶性に差があることが示され、血管RAGEはより可溶化されやすい状態で血管細胞に存在していると推定された。

以上の結果から、ヒトRAGE蛋白には分子多様性が存在することがはじめて明らかにされ、本研究はRAGEを介する細胞応答の多様性の理解やレセプター後細胞内情報伝達系との解明、さらにはRAGEと関連分子(群)を標的とする疾病予防・治療開発に手掛かりを与えたものと考えられた。

謝 辞

本研究と論文作成を指導いただいた金沢大学医学部医学科生化学第二講座の山本 博教授、米倉秀人助教授に感謝致します。また、ご激励ご協力頂いた金沢大学がん研究所内科の澤武紀雄教授と同内科のスタッフ、金沢大学医学部医学科生化学第二講座と同教育研究機器センターの皆様にも感謝致します。

本論文の要旨の一部は、第72回日本生化学会大会(横浜)で発表された。

文 献

- 1) Maillard ML-C. Action des acides amine's sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. Comptes Rendus 154: 66-68, 1912
- 2) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation endproducts in tissue and biochemical basis of diabetic complications. New Eng J Med 318: 1315-1321, 1988
- 3) Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J Biol Chem 267: 14998-15004, 1992
- 4) Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, van Berkel TJC, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature 386: 292-296, 1997
- 5) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. Proc Natl Acad Sci USA 93: 11047-11052, 1996
- 6) Stitt AW, He C, Vlassara H. Characterization of the advanced glycation end-product receptor complex in human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 256: 549-556, 1999
- 7) Yamagishi S, Hsu C-C, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, Kobayashi K, Yamamoto H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. Biochem Biophys Res Commun 213: 681-687, 1995
- 8) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis *in vitro*.

- Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272: 8723-8730, 1997
- 9) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41: 1435-1441, 1998
 - 10) Tsuji H, Iehara N, Masegi T, Imura M, Ohkawa J, Arai H, Ishii K, Kita T, Doi T. Ribozyme targetting of receptor for advanced glycation end products in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 583-588, 1998
 - 11) Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227: 168-170, 1970
 - 12) Conrad RE. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In Herscovitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A (eds) *Manual of macrophage methodology*, vol 13, pp 5-68, Immunology series. Marcle Dekker, New York, 1981
 - 13) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
 - 14) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 - 15) Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor for advanced glycation endproducts, PBX2 homeobox 2 gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene *int-3*. *Genomics* 23: 408-419, 1994
 - 16) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
 - 17) Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665-4671, 1985
 - 18) Yui S, Sasaki T, Araki N, Horiuchi S, Yamazaki M. Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Immunol* 152: 1943-1949, 1994
 - 19) Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2873-2877, 1992
 - 20) Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen J, Nagashima M, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin: mediation of neurite outgrowth and coexpression of RAGE and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270: 25752-25761, 1995
 - 21) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/Calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889-901, 1999
 - 22) Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Nagashima M, Morser J, Migheli A. RAGE and amyloid beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382: 685-691, 1996
 - 23) Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu C-C, Yamamoto H. Advanced glycosylation endproducts stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett* 384: 103-106, 1996
 - 24) Schmidt AM, Hori O, Chen J, Li J, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96: 1395-1403, 1995
 - 25) Park L, Raman KG, Lee KJ, Yan L, Ferran LJ, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated atherosclerosis by soluble receptor for AGE (sRAGE). *Nat Med* 4: 1025-1031, 1998
 - 26) Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, Wang F, Pan Y-C, Tsang T, Stern D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycation endproducts from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267: 14987-14997, 1992
 - 27) Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuabara K, Matsumoto M, Stern D. A novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45 (Suppl. 3): S77-S80, 1996
 - 28) Sun M, Yokohama M, Ishiwata T, Asano G. Deposition of advanced glycation endproducts (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Pathol* 79: 207-222, 1998
 - 29) Malherbe P, Richards FG, Gaillard H, Thompson A, Diener C, Schuler A, Huber G. cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Mol Brain Res* 71: 159-170, 1999
 - 30) 田中伸茂, 米倉秀人, 藤森英希, 山岸昌一, 山本 博. 後期糖化反応生成物受容体遺伝子の発現誘導機構. *生化学* 71: 983, 1999
 - 31) Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269: 9889-9897, 1994
 - 32) Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 19919-19924, 1999

Molecular Heterogeneity of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts Md. Joynal Abedin, Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 25 — 33 (2000)

Key words advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE), diabetic complications, molecular heterogeneity, vascular endothelial cells, lung

Abstract

Several lines of evidence suggest that interactions between advanced glycation endproducts (AGE) and their receptor (receptor for AGE, RAGE) in the vascular endothelial cells (EC) and pericytes play an important role in the pathogenesis of diabetic vascular derangement. However, how the AGE signal is transduced within and deteriorates vascular homeostasis has not yet been fully understood. In the present study, I examined the nature of human RAGE proteins as the first step toward the elucidation of the RAGE signaling. Western blot analysis of extracts from various human cells and tissues showed that there are two major types of RAGE proteins: a 55 kDa form I tentatively designated 'lung type' and a 46 kDa form designated 'vascular type'. RT-PCR cloning revealed that both EC and lung contained mature RAGE mRNA. *In vitro* translation of the RAGE cDNA generated the products that migrated at a position of 51 kDa, and in the presence of microsomal membranes pre-RAGE was transported into microsomes and modified therein to yield higher molecular weight products. Glycopeptidase F treatment of lung extracts resulted in a decrease in the 'lung type' RAGE with a concomitant increase in the 51 kDa form. The lung type was thus judged to be N-glycosylated. On the other hand, the 'vascular type' was not affected by the enzyme and so is assumed not to be N-glycosylated. Western blot analysis of lung and EC extracts with region-specific antibodies demonstrated that EC RAGE may lack N-terminal 16 amino acids and C-terminal 20 amino acids, as suggested by its loss of reactivity with N-16 and C-20 antibodies. EC RAGE could be extracted with the buffer containing 0.1% Tween 20 from microvascular endothelial cells, whereas lung RAGE could not be extracted in the presence of 0.1% or 1% Tween 20, and 1% Triton X-100 was required for the extraction of lung RAGE from the tissue. The results indicate that vascular RAGE has a different structure from lung RAGE, probably due to post-translational modifications including proteolytic processing, which could in turn lead to different cellular responses to the AGE ligands.