◆トピックス◆

アンギオテンシノーゲン - レニン複合体の立体構造：酸化還元によるアンギオテンシン放出の調節

中山大輔*, 宮田敏行*

中山大輔

A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release

Daisuke NAKAYAMA*, Toshiyuki MIYATA*

2005 年 東京薬科大学生命科学部卒業
2007 年 慶應義塾大学大学院医学研究科修士課程修了
同 年 国立循環器病センター 心臓生理部 流動研究員
2010 年 大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了
同 年 国立循環器病研究センター 分子病態部 非常勤研究員

Key words: angiotensinogen, renin, hypertension, ROS

1. はじめに

アンギオテンシノーゲンは、強力な血管収縮反応やアルドステロン分泌促進作用など多彩な作用を示す生理活性ペプチド、アンギオテンシン II の前駆体タンパク質である。アンギオテンシノーゲンは腎糸球体細胞から分泌され受容体に結合したレニンにより特異的に切断され、デカペプチドであるアンギオテンシン I を放出し、アンギオテンシン I はアンギオテンシン変換酵素 (ACE) により切断され、オクタペプチドであるアンギオテンシン II となる (図 1)。レニンの立体構造は既に決定されていたが、アンギオテンシノーゲンの立体構造はこれまで不明であった。

今回、ヒト、マウス、ラットのアンギオテンシノーゲン単独およびヒトアンギオテンシノーゲン - レニン複合体の立体構造が X 線結晶構造解析の手法で決定された¹⁾。アンギオテンシノーゲン単独の構造では、N 末端領域にあるレニン切断部位は分子に埋め込まれていた。しかし、レニンとの複合体では、アンギオテンシノーゲンの切断部位はレニンの活性中心に入り込んでおり、N 末端領域にある切断部位周辺に大きなコンフォメーション変化が起っていた。アンギオテンシノーゲンは Cys18 と Cys138 がジスルフィド結合を形成している。著者

らは、このジスルフィド結合は容易に還元されることを示した。次いで、酸化型アンギオテンシノーゲンは、還元型アンギオテンシノーゲンより受容体に結合したレニンで切断されやすく、アンギオテンシン I を産生しやすい構造であることを明らかにした。血漿中には酸化型と還元型のアンギオテンシノーゲンは約 3 : 2 の割合で存在し、妊娠高血圧腎症患者群では酸化型アンギオテンシノーゲン量の増えた人が多いことが示された。すなわち、ある種の高血圧患者では、酸化型アンギオテンシノーゲンが増えることにより、レニンによるアンギオテンシン I への変換が亢進している可能性が示唆された。本稿ではアンギオテンシノーゲン単独およびレニンとの複合体の立体構造を紹介するとともに、アンギオテンシノーゲンの酸化還元状態による血圧調節の可能性について述べる。

2. アンギオテンシノーゲン単独の立体構造

アンギオテンシノーゲンはセルピンファミリーに属するが、酵素阻害活性をもたない。アンギオテンシノーゲンは、N 末端領域が他のセルピンと相同性を示さず特有の配列を持ち、この領域にアンギオテンシンの配列がある。したがって、生理的に重要なアンギオテンシンを含む N 末端

*独立行政法人国立循環器病研究センター研究所分子病態部 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]
Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]
Tel: 06-6833-5012 (ext. 2477) Fax: 06-6835-1176 e-mail: dainaka@ri.ncvc.go.jp

図1 ヒトアンギオテンシノーゲンのN末端アミノ酸配列とレニンおよびアンギオテンシン変換酵素(ACE)での切断位置

領域の立体構造を予想することはできなかった。今回、アンギオテンシノーゲンの構造が決定された¹⁾。それによると、予想通り、アンギオテンシノーゲンは典型的なセルピンの構造を取り、その代表例であるアンチトロンビンの立体構造と似ていた(図2)。アンギオテンシノーゲンに特有のN末端領域であるが、N末端63残基には2つのヘリックスがあり、興味深いことに、レニンにより切断されるLeu10-Val11結合はレニンが接近できない位置に保持されていた。ヒト、マウス、ラットのアンギオテンシノーゲンの結晶構造が決定されたが、いずれもレニンで切断を受けるペプチド結合はレニンが接近できない構造であった。ヒトアンギオテンシノーゲンはMet235Thr変異をコードする遺伝子多型を持ち、高血圧との関連が指摘されている。立体構造では、この残基はアンギオテンシンが切断される部位から離れた外側のペプチドループに位置していた(図2)。

3. アンギオテンシノーゲン - レニン複合体の立体構造

アスパラギン酸プロテアーゼであるレニンは、N末端ドメインとC末端ドメインからなり、活性中心の2つのアスパラギン酸はそれぞれのドメインに1残基ずつ存在する²⁾。今回、ヒトアンギオテンシノーゲン - レニン複合体の立体構造が4.4Å分解能で明らかにされた(図3)。酵素基質複合体の結晶構造解析のため、レニンの活性中心に変異を導入した不活性型レニン Asp292Ala 変異体を用いられた。この複合体の立体構造の分解能は高くないので、レニン - アンギオテンシノー

ゲン間の詳細な相互作用はわからないが、レニンの活性中心残基周辺と基質であるアンギオテンシノーゲンのN末端領域の相互作用に加え、接触面積670Å²ほどの疎水性相互作用が見られる。アンギオテンシノーゲン単独の立体構造と異なり、レニンとの複合体では切断を受けるアンギオテンシノーゲンのN末端領域は10~20Å伸張して移動しており、レニンの活性中心に入り込んだ構造であった(図3, 4)。加えて、ジスルフィド結合に関わるCys138を含むCD-loopに大きなコンホメーション変化が起こっていた(図4)。

ヒトアンギオテンシノーゲンは4つのCys残基をもつが、Cys18-Cys138のみがジスルフィド結合を形成している。以前、著者らは、アンギオテンシノーゲンのN末端17残基を別のセルピンであるα1アンチトリプシンのN末端に挿入し、キメラ蛋白質Ang-Antitrypsinを発現させ、レニンの酵素学的パラメータを求める実験を行っていた。その結果では、Ang-AntitrypsinはアンギオテンシノーゲンよりアンギオテンシンIの生成が低かった³⁾。著者らはAng-AntitrypsinはCys18を持たないので、Cys18-Cys138結合が形成されないため、レニンによる切断効率が悪いのではないかと考えた。つまり、Cys18-Cys138結合の酸化還元状態でレニンによるアンギオテンシノーゲンの切断効率が変化するのではないかと考えた。

そこで今回、著者らは、アンギオテンシノーゲンのCys18-Cys138の酸化還元がレニンによる切断に与える影響を検討した。まず、このジスルフィド結合は不安定であり、容易に還元されることを示し、酸化型と還元型のアンギオテンシノーゲン分子の熱力学的安定性が異なることが示した。次いで、レニンによる切断効率を求めた。

4. アンギオテンシノーゲンの酸化還元によるアンギオテンシン生成の調節

アンギオテンシノーゲンは小胞体を通して酸化型で分泌され、血漿中で還元されると考えられる。生体内では、レニンは腎尿細管細胞のプロレニン受容体に結合してアンギオテンシノーゲンを切断する。著者らは、プロレニン受容体結合型レニンを用いて酵素学的性質を検討したところ、酸

図2 ヒトアンギオテンシノーゲンの立体構造のリボンモデル (PDB: 2WXW)

アンギオテンシノーゲンは、複数の β ストランドからなる3つの β シートと複数の α ヘリックスとコイル構造を持つ典型的なセルピン構造を取る。赤矢印: レニンにより切断される部位, 赤: 切断されて放出されるアンギオテンシン I, 青: Cys138 結合を含む CD-loop, 紫: 遺伝子多型で知られる Met235.

図3 ヒトアンギオテンシノーゲン (緑) - ヒトレニン Asp292Ala 変異体 (灰色) 複合体の立体構造リボンモデル (PDB: 2X0B)

赤矢印: レニン切断部位, 橙色: アンギオテンシン I 部分, シアン: CD-loop.

図4 ヒトアンギオテンシノーゲン単独 (アンギオテンシン I 部分: 赤, CD-loop: 青) とレニン複合体中のヒトアンギオテンシノーゲン (アンギオテンシン I 部分: 橙色, CD-loop: シアン) の構造の比較

レニン複合体中のヒトアンギオテンシノーゲンでは、Cys138 を含む CD-loop のコンフォメーションが変化し、N 末端領域がレニンと相互作用可能になる。

化型アンギオテンシノーゲンは還元型アンギオテンシノーゲンより効率よく切断された (kcat/Km 値で4倍の違い)。すなわち、酸化型アンギオテンシノーゲンはアンギオテンシン I を産生しやすい構造であることが明らかとなった。

還元された SH 基の修飾による活性の調節が他のタンパク質で知られている。そこで、血管弛緩作用を有する一酸化窒素 NO を還元型アンギオテンシノーゲンに作用させると、Cys18 と Cys138 の SH 基がニトロシル化された (図5)。このように SH 基が修飾を受けると、もはや酸化型へ戻

れないので、NO はアンギオテンシノーゲンを還元型に留め、アンギオテンシン産生を抑える機能を示すことが明らかとなった。生体内でも、NO のような SH 基を修飾する分子がアンギオテンシノーゲンを還元型に留め、アンギオテンシン産生を抑え、血圧調節に関わる可能性が考えられた。アンギオテンシノーゲンの立体構造と Cys18-Cys138 結合の酸化還元の知見から、アンギオテンシノーゲンの酸化還元応答による酸化型 - 還元型の変換は、アンギオテンシン産生を制御し、アンギオテンシンによる血管収縮の調節の新しいメ

図5 アンギオテンシノーゲンのCys18-Cys138ジスルフィド結合の酸化還元によるアンギオテンシン産生制御とそれを通じた新しい血圧調節機構

アンギオテンシノーゲンには酸化型と還元型が存在し、酸化型と還元型ではレニンに対する親和性が異なる。酸化型への変換は活性酸素種（ROS）などにより起こる。酸化型アンギオテンシノーゲンは、還元型より受容体に結合したレニンで切断されやすいため、アンギオテンシンIの産生が増加する。その結果、より多くのアンギオテンシンIIが産生され、血圧上昇などの生理作用が引き起こされると予想される。還元型アンギオテンシノーゲンのSH基は、血管弛緩作用を有するNOによりニトロシル化を受け、このニトロシル化アンギオテンシノーゲンは還元型と同じくレニンでの切断効率が悪いので、アンギオテンシン産生が抑えられる。このようにCys18-Cys138ジスルフィド結合の酸化還元状態により、アンギオテンシン産生が制御され、血圧調節などに寄与すると考えられる。妊娠高血圧腎症の患者では、酸化型アンギオテンシノーゲンが増加することにより血圧上昇が起こることが示唆された。

カニズムを示している。

5. 妊娠高血圧腎症での酸化型アンギオテンシノーゲンの増加

酸化ストレスが酸化還元応答を通して血圧の調節に影響を与えることが突発性の高血圧症などから報告されている^{4) 5)}。妊娠中においても、胎盤における機能不全より酸化ストレスが生じ、これらの酸化ストレスが妊娠高血圧腎症の病態に関与していることが報告されている⁶⁾。妊娠中に血圧が上昇する妊娠高血圧腎症は妊娠固有の疾患であり、妊娠中に発生する異常の中でも重要な疾患である。酸化型と還元型のアンギオテンシノーゲンは、容易に電気泳動で分離できる。そこで、著者らは、アンギオテンシン産生能が亢進している酸化型アンギオテンシノーゲンが妊娠高血圧腎症の患者に多く見られるかどうかを検討した。通常

ではヒト血漿中のアンギオテンシノーゲンの約60%は酸化型で、残りの約40%は還元型であり、この比率は性別や年齢によらず一定である。一方、妊娠高血圧腎症の患者では酸化型が約68%であり、残りの約32%は還元型であった。したがって、妊娠高血圧腎症患者では、酸化型アンギオテンシノーゲンは増加し、還元型は減少していることが明らかとなった。活性酸素種などにより酸化型への変換が起こると、酸化型アンギオテンシノーゲンはプロレニン受容体に結合したレニンにより切断されやすいため、アンギオテンシンの放出が増加し、血圧上昇を引き起こすと考えられる(図5)。

6. おわりに

アンギオテンシノーゲン単独及びアンギオテンシノーゲン-レニン複合体の立体構造とアンギオテンシノーゲンの酸化還元スイッチによる血圧調節を解説した。これまで、アンギオテンシンの生成はレニンとアンギオテンシノーゲンの量で制御されると考えられていたが、本研究により、アンギオテンシノーゲンは組織および血中の酸化還元状態により酸化型もしくは還元型へ構造変化し、それによりアンギオテンシン生成が制御されることが示された。さらに、妊娠高血圧腎症では酸化型アンギオテンシンの増加による病態発症の可能性が示唆された。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Zhou A, Carrell RW, Murphy MP, Wei Z, Yan Y, Stanley PLD, Stein PE, Pipkin FB, Read RJ : A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release. *Nature* **468** : 108-111, 2010.
- 2) Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK, Carilli CT, Lewicki JA, Baxter JD, James MN : Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* **243** : 1346-1351, 1989.
- 3) Streatfeild-James RM, Williamson D, Pike RN, Tewksbury D, Carrell RW, Coughlin PB : Angiotensinogen cleavage by renin : importance of a structurally constrained N-terminus. *FEBS Lett* **436** : 267-270, 1998.
- 4) Wilcox CS : Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney : a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289** : R913-935, 2005.
- 5) Harrison DG, Gongora MC : Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am* **93** : 621-635, 2009.
- 6) Myatt L : Review : Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* **31** Suppl : S66-69.