

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15035

研究課題名(和文) 動的平衡状態にある膜蛋白複合体を生理的条件下で直接観察するための技術基盤の開発

研究課題名(英文) Development of technical basis for direct observations of membrane protein complex in dynamic equilibrium under a physiological condition

研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA, Yoshiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：60268183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：医学生理学の大きな進歩に繋がると期待される、脂質2重膜中で動的平衡状態にある膜蛋白複合体の1分子動態を、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いて生理的条件下で直接観察するための技術基盤の開発を行なった。

その結果、生理的細胞膜環境AFMプラットフォームは、ナノディスクを基盤に開発を進めるのが有望であることが分かった。また、高速AFMで得られた1分子動態および分子間相互作用の動画データの解析理論の開発過程において、1分子レベルと巨視レベル間におけるメソスコピックな領域において、分子間相互作用に関する未知の重要な分子動態プロセスが起こっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins functions with forming a complex in the plasma membrane. The mechanism of the membrane protein complexes is one of the most important in the physiology and medicine. We attempted to develop the technical basis for the direct observation of membrane protein complexes working in non-equilibrium dynamics under a physiological condition using the high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We found that the 'Nanodisc' should be the most likely candidate for the central parts of the 'physiological AFM platform' allowing us the successful direct observation for 'in vivo'-like dynamics of membrane protein complexes. We also attempted to establish a fundamental theory for interpreting the HS-AFM movie data of the intermolecular interaction. Several issues appeared in the theoretical study suggested the existence of an unknown important process for the intermolecular interaction in a mesoscopic level between the single-molecular and the macroscopic levels

研究分野：分子生理学・薬理学

キーワード：分子間相互作用 高速原子間力顕微鏡 1分子直接観察 膜蛋白複合体 脂質2重膜 ラフト 抗原-抗体反応 アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 医学・生理学的に重要な生命プロセスの多くは、形質膜およびオルガネラ膜上に発現しているチャンネル、トランスポーターおよびレセプターなどの機能性膜蛋白が集合して膜蛋白複合体を形成して、物理的・機能的に相互に影響を及ぼしあって機能していることに支えられている。その故に、あるひとつのチャンネルが、さまざま異なる組織・組織で発現した時に、そこで異なる膜蛋白と動的に相互作用することにより、異なる生理機能を果たすことができていると考えられる。

(2) この膜蛋白高次機能複合体の動作機構の解明は、医学生理学の大きな進歩に繋がると期待されるが、細胞生理学、生化学および免疫組織学的な研究が中心であり、その分子レベルでの詳細なメカニズムについては、ほとんど解っていない。この複合体の動作機構の解明には、1分子レベルのリアルタイム直接観察技術が非常に有用である。

(3) 高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は、溶液中で機能中の生体分子を電子顕微鏡レベルの空間分解能とビデオレートに迫る時間分解能で直接観察することを可能にした革新的な顕微鏡であり、申請者らはこの高速 AFM を用いて、生体分子の1分子レベルでの作動メカニズムの研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

(1) 上記の膜蛋白高次機能複合体の動作機構の解明は、医学生理学の大きな進歩に繋がると期待されるが、従来の生理・生化学的な測定法による間接的な知見では、それは単なる想像の範囲内でしかなかった。解明するためには、生体膜中で複数の膜蛋白が構造および相対位置を変えて、お互いに相互作用しながら機能を発揮している様子を直接、動画で観察しなければならない。

(2) 本研究では、脂質2重膜中で動的平衡状態にある膜蛋白複合体を構成している膜蛋白の1分子動態を、生理的条件下において

高速 AFM で直接観察するための基盤技術の開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

### ) 試料環境の改良

高速 AFM は、高時空間分解能の表面構造の変化情報を与えるが、試料は雲母(マイカ)製の AFM 測定ステージ上に置かれ、マイカの静電および疎水的な力場の影響を強く受けている。マイカの物性による影響を最小限にとどめて、膜蛋白が本来の動態を示すような細胞膜環境 AFM プラットフォームの作製を目指した。

### ) 高速 AFM 観察データの解析理論の確立

高速 AFM で得られた膜蛋白分子間相互作用についての1分子レベルでの動画データの解析技術を確認するためには、巨視的レベルでのデータとの整合性の検証を可能にする解析モデルの開発が重要である。本研究では、膜蛋白複合体中の各膜蛋白の動態および相対的位置変化の直接観察技術の開発用のモデルとして AQP4 と抗 AQP4 抗体の結合・解離の系を用いている。AQP4 と抗 AQP4 抗体の結合・解離動態についての高速 AFM 1分子データと巨視的データを整合的に再現可能なシミュレーションモデルの作成に挑戦した。

## 4. 研究成果

### ) 細胞膜環境 AFM プラットフォームの作成

(1) AFM ステージのマイカの物性による影響を最小限にとどめて、膜蛋白が本来の動態を示すようにマイカ表面と脂質2重膜の間に灌流液の層を作るために、直鎖構造 PEG 脂質誘導体を添加したリポソームを作製して、AFM ステージ上へ展開したが、PEG リン脂質誘導体の分布に偏りがある可能性が示唆された。

(2) そこで、次にナノディスクの適用を検討した(図1)。ナノディスクは灌流液組成等の条件を変えることにより、AFM ステージ上を側方移動するのが観察された。これは、ナノディスク下面と AFM ステージ間に灌流液層

が存在していることを示唆している。したがって、今後の方向性として、ナノディスクを中核とした細胞膜環境AFMプラットフォームの開発・熟成が考えられた。

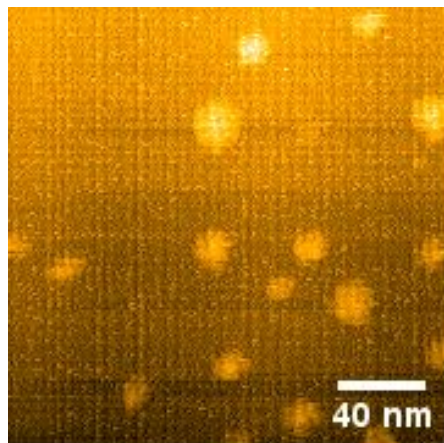


図1 . ナノディスクの高速AFM観察像  
直径約10~20 nm 厚さ7~8 nm

高速AFM観察データの解析理論の確立

(1) まず、巨視的レベルでのAQP4に対する抗AQP4抗体の結合・解離動態を調べるために、ELISAを用いたAQP4安定発現CHO細胞に対する抗AQP4抗体の結合量測定を行なった。

(2) その結果、抗体結合プロセスについては、溶液中抗体濃度に依存した2次蛍光抗体のELISAシグナル強度の時間依存性増加についての定量的データが得られた。抗体解離プロセスについては、溶液中の非標識抗AQP4抗体の濃度依存的に増速するELISAシグナル強度の指数関数的減衰が観察された。このことは、AQP4結合中の抗体と溶液中を浮遊している抗体の間での同一抗原に対する競合的結合阻害作用の存在を示唆している。

(3) これは高速AFMの1分子直接観察で得られた、秒レベルの早い結合・解離現象 (rapid unstable 結合) や、長時間の抗体作用後に抗体がAQP4アレイ上で動きながらもアレイ上に留まっている dynamic stable 結合状態と、定性的には、整合していた。

(3) つぎに、1分子観察で得られたrapid unstable (RU)結合状態および dynamic stable (DS) 結合状態と、ELISAで得られた巨視的な結合量測定データを整合的に理解するための理論の構築に挑んだ。AQP4アレイに対する抗AQP4抗体の結合・解離についての3遷移状態動態モデルを作成し、コンピュータ・シミュレーションを行なった(図2)が、一分子レベルでの抗体の結合・解離動態パラメータと巨視的な抗体の結合・解離動態パラメータを単純な3遷移状態動態モデル上で直接的に整合させるのは困難であることがわかった。

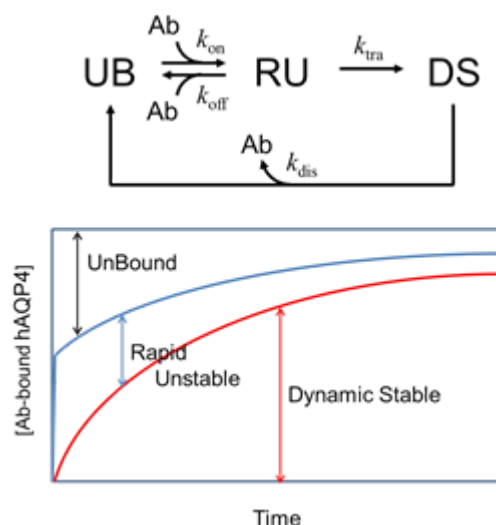


図2 . AQP4 - 抗AQP4抗体の結合・解離についての3遷移状態動態モデル(上)およびコンピュータ・シミュレーションの結果例(下)

(4) このことより、一分子レベルと巨視レベルとの間のメゾスコピックな領域において、分子間相互作用に関する未知の重要な分子動態プロセスが起こっている可能性を示唆している。このことにより、次のステップとしてメゾスコピックな領域での分子動態研究の重要性が明らかになった。

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)

Yu YC, Sohma Y, Hwang TC\*. On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in CFTR. *Journal of Physiology*, 査読有, 594(12), 2016, 3227-44  
doi: 10.1113/JP271723

Lin WY, Sohma Y, Hwang TC\*. Synergistic Potentiation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating by Two Chemically Distinct Potentiators, Ivacaftor (VX-770) and 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino) Benzoate. *Molecular Pharmacology*, 査読有, 90(3), 2016, 275-85  
doi: 10.1124/mol.116.104570

[学会発表](計 8 件)

Nakao K, Nakakuki M, Ishiguro H, Sohma Y: Characterization of a CFTR-mutant frequently found in Japanese cystic fibrosis patients. 14th European Cystic Fibrosis Society Basic Science Conference (国際学会) 2017年3月29日~4月1日 Algarve (Portugal)

中尾香菜子、石倉麗音奈、中莖みゆき、石黒 洋、政池知子、相馬義郎: 嚢胞性線維症日本人患者から同定された変異型 CFTR の特性解析 . 第 94 回日本生理学会年会 . 2017 年 3 月 28 ~ 30 日 . アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

中尾香菜子、石倉麗音奈、中莖みゆき、安井正人、石黒 洋、政池知子、相馬義郎: 日本人嚢胞性線維症患者から同定さ

れた CFTR 変異体の解析 . 第 90 回日本薬理学会年会 . 2017 年 3 月 15 ~ 17 日 . 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

相馬義郎: CFTR and AQP: Two channels deeply involved into incurable diseases . 第 93 回日本生理学会年会シンポジウム . 2016 年 3 月 22 ~ 24 日 . 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Sohma Y: Dynamic Bindings of Autoimmune IgG Antibodies against Autoantigen Membrane Proteins directly observed by High-Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM) . The Second Kitasato-Yale Fluid Symposium: Molecular Control of Cellular and Epithelial Function (国際シンポジウム) . 2015 年 12 月 5 日 . 北里大学白金キャンパス (東京都・港区)

相馬義郎、山下隼人: 高速原子間力顕微鏡を用いた水チャネル AQP4 への自己抗体の結合・解離動態の直接観察 . 平成 27 年度生理学研究所研究会「生体ホメオスタシスの gateway としての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス . 2015 年 9 月 15 ~ 16 日 . 生理学研究所 (愛知県・岡崎市)

相馬義郎: Monitoring ATP-hydrolysis cycle by electro-physiological approach: Patch-clamp recordings of CFTR . 第 53 回日本生物物理学会年会シンポジウム . 2015 年 9 月 13 ~ 15 日 . 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市)

相馬義郎、山下隼人: 高速原子間力顕微鏡を用いた膜蛋白への抗体結合・解離動

態の直接観察．平成 27 年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合」．2015 年 9 月 1～2 日．生理学研究所（愛知県・岡崎市）

〔図書〕（計 1 件）

Sohma Y, Hwang TC Cystic fibrosis and the CFTR anion channel. *In*: Zheng & Trudeau (eds), Handbook of Ion Channels, CRC Press Taylor & Francis Books Inc, Oxford, UK, 2015, pp 627 - 648 (ISBN-10: 1466551402)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学医学部薬理学教室

<http://www.pharm.med.keio.ac.jp/about/sohma.html>

Dalton Research Center, Univ of Missouri, USA

<http://dalton.missouri.edu/investigators/sohmay.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA, Yoshiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60268183

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内橋 貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)

金沢大学・数物科学系・准教授

研究者番号：30326300

西坂 崇之 (NISHIZAKA, Takayuki)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40359112

櫻井 実 (SAKURAI, Minoru)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授

研究者番号：50162342

佐藤 主税 (SATO, Chikara)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ

メディカル研究部門・研究グループ長  
研究者番号：00357146

(4) 研究協力者

余 盈君 (YU, Ying-Chun)

黄 自強 (HWANG, Tzyh-Chang)

加藤 孝信 (KATO, Takanobu)

藤村 章子 (FUJIMURA, Shoko)