

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08274

研究課題名(和文) 高効率な復帰変異株獲得による膜蛋白質とリガンドの相互作用解析法確立と創薬への応用

研究課題名(英文) Use of highly efficient procedure in getting revertant cells, for studies of interaction manner between membrane protein and its inhibitor

研究代表者

篠原 康雄 (SHINOHARA, Yasuo)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授

研究者番号：60226157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：error prone PCRで調製されたADP/ATP輸送体の変異cDNAライブラリーと酵母の高効率なgap-repair cloning法を併用して、ボンクレキン酸存在下で輸送機能の復帰したADP/ATP輸送体の変異株を獲得する実験を進めた。その結果、すでに知られていたL142S、G298Sの2つの変異を再現できるとともに、I200V、S245P、V300Iという新たな変異を同定することができた。更にこれらの変異したアミノ酸が、実際にボンクレキン酸からファンデルワールス距離内にあることが結晶構造解析で証明され、我々の方法が実用的なものであることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質とリガンドの相互作用の様式を理解は、創薬を考える上で極めて大きな課題であるが、これまでは光親和性標識かタンパク質のX線結晶構造解析しか実験法が確立されておらず、新たな研究手法の開発が急務であった。

今回の研究によって、我々が見出した高効率な復帰変異株獲得による膜蛋白質とリガンドの相互作用解析法が実用的なものであることが示され、新たな研究手法になり得るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We tried to isolate the revertant yeast cells viable on the glycerol plate containing bongkrekinic acid, by screening the library of yeast cells expressing randomly mutated mitochondrial ADP/ATP carrier. As a result, we succeeded in identifying two known mutations of L142S and G298S, and three unknown mutations of I200V, S245P and V300I. Furthermore, these identified amino acids were shown to locate closely to bongkrekinic acid, by independently achieved crystallographic analysis of the ADP/ATP carrier complexed with bongkrekinic acid.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ADP/ATP輸送体 ボンクレキン酸 分子間相互作用 復帰変異株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質がそのリガンドとどのように相互作用しているのかを解析することは、創薬を考える上で極めて大きな課題である。しかし、これまで膜タンパク質とリガンドの相互作用の様式を解明する方法としては、光親和性標識を用いて相互作用しているアミノ酸残基を同定するか、リガンドの結合したタンパク質の結晶構造を X 線で解析する方法しか実験法が確立されておらず、新たな研究手法の開発が急務であった。

2. 研究の目的

膜タンパク質とその阻害剤の相互作用の様式を理解する別の方策として、阻害剤存在下でも活性を示す「復帰変異株」を取得するという方法がある。この方法の rationale は「阻害剤存在下でも活性を示すタンパク質では、阻害剤との親和性を低下させるアミノ酸の変異が起きているので、変異したアミノ酸残基が阻害剤と相互作用している」というものである。

しかし、従来用いられてきた復帰変異株獲得法では、エチルメタンサルホン酸(EMS)や UV 照射によってゲノムにランダム変異を入れる方法が採用されており、標的タンパク質の遺伝子以外にも変異が入るため、オフターゲット効果の排除が大きな課題であった。また、標的タンパク質をコードする cDNA に特異的に変異を入れる方法としては、PCR 反応液の Mg^{2+} を Mn^{2+} に置き換えることで変異を誘発するという「error prone PCR 法」が利用可能であったが、調製された変異 cDNA ライブラリーをベクターに結合し、細胞に導入するプロセスの効率が低く、実用的ではなかった。

我々は error prone PCR 法と酵母の遺伝子修復能を利用した gap repair cloning 法を併用することで、極めて高効率に復帰変異株を獲得する方法を確立することに成功した。そこで、この方法を用いることで膜タンパク質とその阻害剤の相互作用の様式を解析できるのではないかと考え、本研究ではこの可能性について検討することにした。

3. 研究の方法

標的タンパク質としてミトコンドリア内膜の ADP/ATP 輸送体を選び、その特異的な阻害剤であるボンクレキシン酸との相互作用の様式を理解することを目指し、実験系の構築を進めた。

野生型酵母では、ミトコンドリアの 2 型 ADP/ATP 輸送体 (yAAC2) の遺伝子を破壊すると、その酵母は酸化的リン酸化反応で ATP を合成できなくなるため、グルコース培地では生育できるが、グリセロール培地で生育できなくなる。しかし、yAAC2 遺伝子破壊株に酵母の 2 型 ADP/ATP 輸送体の発現ベクターを導入すると、この酵母はグリセロール培地で生育できるようになる。そこで、発現させる ADP/ATP 輸送体の cDNA に error prone PCR で変異を入れ、vector と gap repair させることで変異体をランダムに発生させることとした。

4. 研究成果

まず、ボンクレキシン酸耐性になった変異株を同定するためのスクリーニング系の構築が重要な課題であった。ボンクレキシン酸はミトコンドリアの内側から ADP/ATP 輸送体に作用することが知られているが、3 つのカルボキシル基を有しているため、中性条件下では膜透過性が低く、ミトコンドリアの外側から添加して ADP/ATP 輸送体を阻害させるためには反応液の pH が 5 程度の弱酸性でないといけない。しかし、pH5 ではグリセロールを添加した寒天培地が固化せず、この問題の克服が第一の課題であった。幸い、あらかじめ pH5 に調製した培地をオートクレーブするのではなく、オートクレーブ後に pH を低下させることで寒天培地を固化させることができることを見出すことができた。また、塗布するボンクレキシン酸の至適濃度の特定も大きな課題であったが、2 μ M のボンクレキシン酸を塗布した寒天培地を用いるという実験条件を特定することができた。

ボンクレキシン酸耐性を示す酵母のスクリーニングを繰り返し、いくつかの耐性株の獲得ができたが、この段階での株は false positive なものも少なくなく、取れてきた耐性株からプラスミドを抽出し、yAAC2 欠損株に再度戻し、その変異が本当にボンクレキシン酸耐性をもたらすかを再確認するという実験が必要不可欠であった。

このような実験を行うことで、false positive な変異株を除去、本当にボンクレキシン酸耐性を獲得していると思われる酵母株のプラスミドのシーケンス解析を行ったところ、L142S、I200V、S245P、G298S、V300I という 5 つのアミノ酸変異が、ボンクレキシン酸との親和性を弱めることを突き止めることができた。

ボンクレキシン酸耐性を示す酵母をとってくることによって ADP/ATP 輸送体のボンクレキシン酸と相互作用しているアミノ酸残基を特定するというアプローチには EMS や UV 照射という従来法を用いた先行研究があり、L142S と G298S は過去の研究でも特定されていた。報告されていたのと全く同じである 142 番目の Leu と 298 番目の Gly というアミノ酸が、やはり全く同じ Ser というアミノ酸に変異したものをとってくることができたことに、我々はとても驚いた。ADP/ATP 輸送体はおよそ 300 のアミノ酸からなるタンパク質なので、そのランダム変異体の総数は 20^{300} という天文学的な数字になる。これらの中から、ボンクレキシン酸耐性を獲得した ADP/ATP 輸送体を同定するためには、かなり高効率なスクリーニングを必要とするが、このようなアミノ酸残基を同定できたことから、我々の確立した復帰変異株獲得法がかなり実用性の高い方法であることが判明した。

過去の報告にあったボンクレキン酸耐性を示す変異株を再現できたことで、我々の方法の有効性がある程度確証できたが、やはり「同定できたアミノ酸残基が本当にボンクレキン酸と相互作用しているのだろうか」という疑問は払拭できないまま研究を進めていた。そのような中で、2019年の正月に衝撃的な論文が発表された。英国 Medical Research Council の Kunji 博士らがボンクレキン酸の結合した ADP/ATP 輸送体の結晶構造を解き明かしたのである (Cell 176(3):435-447, doi:10.1016/j.cell.2018.11.025.)。彼らはボンクレキン酸が結合することで ADP/ATP 輸送体が界面活性剤の溶液中で不安定になるという問題を克服するために、野生型のパン酵母ではなく、耐熱性酵母 *Thermothelomyces thermophila* を使った、サイトソル側のアミノ酸ネットワークを強化することでタンパク質の熱安定性を高めることを明らかにしていた Q302K という点変異を入れること、更に ナノボディをかませるといふありとあらゆる英知を集めて結晶化にこぎつけていた。

とても嬉しかったことに、彼らの結晶構造中でも L142、I200、S245、G298 に相当する L135、I193、S238、G291 の 4 つのアミノ酸残基はボンクレキン酸からファンデルワールス距離内にあることが判明し、我々の方法が実際に阻害剤と相互作用しているアミノ酸残基を同定する方法として work することを検証することができた (V300 はボンクレキン酸から少し離れていたが、このアミノ酸が離れていたのは我々が用いた野生型のパン酵母と彼らの用いた耐熱性酵母 *Thermothelomyces thermophila* の種差を反映しているものと考えているが、この検証はまだできていない)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki N, Kanazawa K, Kimura M, Ike H, Shinomiya M, Tanaka S, Shinohara Y, Minakawa N, Itoh K, Takiguchi Y.	4. 巻 677
2. 論文標題 Use of modified U1 small nuclear RNA for rescue from exon 7 skipping caused by 5'-splice site mutation of human cathepsin A gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2018.07.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto T, Tsunoda M, Ozono M, Watanabe A, Kotake K, Hiroshima Y, Yamada A, Terada H, Shinohara Y.	4. 巻 652
2. 論文標題 Polyethyleneimine renders mitochondrial membranes permeable by interacting with negatively charged phospholipids in them	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2018.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroshima Y, Sakamoto E, Yoshida K, Abe K, Naruishi K, Yamamoto T, Shinohara Y, Kido JI, Geczy CL.	4. 巻 119
2. 論文標題 Advanced glycation end-products and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide increase calprotectin expression in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 1591-1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.26319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujita S, Suyama M, Matsumoto K, Yamamoto A, Yamamoto T, Hiroshima Y, Iwata T, Kano A, Shinohara Y, Shindo M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of simplified functionalized bongkreikic acid analogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 962-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshima Y, Yamamoto T, Watanabe M, Baba Y, Shinohara Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2018.01.005	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 -

1. 著者名 Unten Y, Murai M, Yamamoto T, Watanabe A, Ichimaru N, Aburaya S, Aoki W, Shinohara Y, Miyoshi H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Pentenediol-Type Compounds Specifically Bind to Voltage-Dependent Anion Channel 1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1141-1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b01209.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yamazaki N, Ohya T, Kawaguchi Y, Hiroshima Y, Yamamoto T, Shinohara Y, Takiguchi Y.
2. 発表標題 Two structural features of the 3' region of the carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) gene specifically observed with human but not with rodents
3. 学会等名 The 43rd FEBS Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamazaki N, Shinomiya M, Ike H, Shinohara Y, Minakawa N, Itoh H, Takiguchi Y.
2. 発表標題 Use of modified U1 small nuclear RNA for improved formation of properly spliced mRNA encoding human cathepsin A from the gene having an IVS7 +3a>g mutation
3. 学会等名 The 43rd FEBS Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原康雄
2. 発表標題 酵母を用いたタンパク質発現系の魅力 ~ミトコンドリアのタンパク質研究と創薬研究に おける有用性~
3. 学会等名 第15回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuo Shinohara
2. 発表標題 Functional expression of mammalian mitochondrial phosphate carrier in yeast cells.
3. 学会等名 The First International Conference on Pharmaceutical and Clinical Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠原康雄
2. 発表標題 ミトコンドリアのタンパク質の研究における 酵母の発現系の有用性
3. 学会等名 九州大学先導物質化学研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原康雄
2. 発表標題 酵母の発現系を用いた ミトコンドリアの輸送体の構造と機能の解析
3. 学会等名 同志社大学生命医科学部セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原康雄
2. 発表標題 ミトコンドリアのタンパク質研究と創薬研究における酵母を用いた発現系の有用性
3. 学会等名 次世代バイオナノ研究会（招待講演）
4. 発表年 2020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