

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11350

研究課題名(和文) 構造生物学に基づく遺伝性難聴を中心とした疾患のトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) structural biology-based translational research in diseases with a focus on hereditary hearing loss

研究代表者

金子 寛生 (Kaneko, Hiroki)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・客員
研究員

研究者番号：10349946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：国立病院機構東京医療センターと連携し、全国の病院から集まる様々な遺伝性難聴のデータ解析を構造生物学的観点に基づき行った。対象遺伝子はこれまで行ってきた解析を含めると、TECTA, PDZD7, OTOF, OPA1, NOG, KCNQ4 など多岐にわたった。特に重要なEDNRBとGJB2の変異について、計算化学的手法に基づく多角的な解析を行い、遺伝性難聴を引き起こす分子発症メカニズムを提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、遺伝子疾患について、正常遺伝子の導入やゲノム編集を利用した遺伝子治療などが開発されつつある。また、患者iPS細胞から作られた内耳細胞に基づく疾患メカニズムの解明と治療薬の開発も行われてきている。しかし、構造生物学的な視点からの病態解析は、遺伝性難聴においてはまだ十分とは言えないという一面もあった。今回、我々が行った立体構造に基づく分子発症機構の解明は、新規な診断法と治療薬の開発、さらに遺伝子治療のための戦略を探るための重要な情報として貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with the National Hospital Organization Tokyo Medical Center, we analyzed data on various types of hereditary hearing loss collected from hospitals throughout Japan, on the basis of structural biology. The target genes for this study are of various types, including TECTA, PDZD7, OTOF, OPA1, NOG, KCNQ4, and so on. We conducted a multifaceted analysis based on a computational chemistry method for the mutations of EDNRB and GJB2, which are especially important, leading us to propose that a molecular pathogenesis mechanism causes hereditary hearing loss.

研究分野：計算構造生物学 生体生命情報学

キーワード：耳科学 構造生物学 遺伝性難聴 分子発症メカニズム バイオインフォマティクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

基礎から臨床への橋渡しをするトランスレーショナルリサーチ (TR) が、米国を中心に 90 年代から広がってきた。国内でも 2000 年代前半から、がんを中心に TR の基盤事業が産官学連携のもとに整備されてきた。遺伝性疾患においても、原因遺伝子の同定に基づいた病態の解明と予防・診断・治療への応用が注目されている。この裏には、網羅的ゲノム解析技術の急速な発展があるが、分析ができるインフォマティクスの不足が問題となっている。また、疾患遺伝子を特定しても、その標的治療薬を設計・開発するためには、構造生物学とバイオインフォマティクス・創薬計算化学の専門研究者が良いタイミングで参加する必要がある。現状では、基礎医学者と臨床医学者の間の橋渡しをするこのような研究者との連携がうまくとれていない。これが、日本の TR が遅れをとっている一因と考えられる。

このような背景のもと、研究代表者は、約 10 年前から、構造に基づいた遺伝性疾患の分子レベルでの病態解明に取り組んできた。例えば、北海道医療大学と連携して、Protein C の変異患者における血栓要因を、分子動力学を用いて解明した。2010 年以降は、国立病院機構・東京医療センターの臨床遺伝センターを研究の中心の場に置き、様々な遺伝性難聴について、分子発症メカニズムに関する研究を行ってきた。このように、研究代表者は、様々な臨床医からの依頼のもと、構造生物学・計算生物学の視点から病因の分子メカニズムに関する研究をこれまで一貫して行ってきており、自然な形でリバース TR に取り組んできている。

2. 研究の目的

臨床の場で発見される難聴を中心とした様々な遺伝性疾患について、その病因機構を構造生物学的見地から分子レベルで解明し、新規な診断および治療法の開発につなげることを目指す。本研究では、この目的を達成するために、臨床から基礎へ、さらに基礎から再び臨床へと戻ることができる、真の意味でのトランスレーショナルリサーチ (TR) の姿勢を重要視する。申請時における当初の研究目的は、次の通りである。

- (1) 構造生物学とインフォマティクスの視点から、病因の分子メカニズムを解明する。
- (2) 網羅的ゲノム解析を含む生化学的な実験結果との比較を通して、計算・理論から得られたメカニズムの検証を行う。
- (3) 分子メカニズムに基づき新規な診断および治療法を探る。

3. 研究の方法

蛋白質構造のモデリングは、主に SWISS-MODEL と MODELLER を使い行った。また、分子動力学計算については AMBER を、蛋白質同士のドッキング計算については ClusPro を主に用いた。分子の表示、構造の観察、簡単なモデル構築や分子重ね合わせなどは、全て Chimera を用いて行った。蛋白質同士の複数の重ね合わせについては、Python を用いて開発したオリジナルのソフトウェアを使用した。遺伝子データの解析には、SeqScape 2.6 software、DNASIS Pro などを用いた。

計算と表示は、主に、本研究課題で購入させていただいた iMac Pro を用いて行い、一部の計算にはワークステーション HPC5000-XI216TS-DB を用いた。複雑な立体構造については、Insight II によるグラフィックワークステーションと 3D ディスプレーの装置を用いた観察も併用した。

4. 研究成果

(1) これまで行ってきた遺伝性難聴のデータの解析と整理

本研究では、国立病院機構東京医療センターと連携し、全国の病院から集まる様々な遺伝性難聴のデータ解析を精力的に行った。東京医療センター側で解析した主に SNP 情報と臨床データに基づき、疾患原因遺伝子と変異部位について、配列上で新規性の確認ができた遺伝子が研究対象となった。研究開始初年度時までに解析を行った対象遺伝子は、*EDNRB*、*TECTA*、*PDZD7*、*OTOF*、*OPA1*、*NOG*、*KCNQ4* など多岐にわたった。これらの遺伝性難聴の遺伝子変異について網羅的な比較を行い、なんらかの共通因子があるかどうかを多角的に調べた。これは、共通の病因因子や構造変化、共通のマスターレギュレーター(薬物、上流転写因子、ncRNA)などを見つけることができれば、汎用的な診断・治療方法につながると考えたためである。しかし、それぞれの遺伝子産物となる蛋白質の機能も構造も多岐にわたっており、その変異による変化も多様性に富んでいるため、共通項を見つけ出すことは非常に困難であることがわかった。そのため、この方針は一旦保留とし、再び各論的な解析に戻り重要な難聴遺伝子だけに絞り、集中的に研究を進めることにした。まずは、この時点までで最も成果があがっていて重要度の高い *EDNRB* の解析をさらに進めることにした。

(2) *EDNRB* 遺伝子変異の解析

ワールデンブルグ症候群 1 型において、*EDNRB* 遺伝子のミスセンス変異 p.R319W ホモ接合体が新規に発見された。*EDNRB* (Endothelin receptor type B) 蛋白質は、7 回膜貫通型の GPCR であり、G₁₃ との結合によって活性が制御されることがわかっている。R319W 変異の意味を構造生

物学見地から探るため、次のような方法により、複合体モデル構造を求めた。まず、活性型 GPCR (2 アドレナリン受容体活性型) に G 蛋白質 (, ,) が結合した結晶構造 (PDB ID: 3SN6) を用いて、EDNRB の立体構造をモデリングした。次に、ヒトの G₁₃ を、G_s をテンプレートとしてモデリングした。最後に、2 アドレナリン受容体活性型に結合した G_s の位置情報を参考にして、活性型 EDNRB に G₁₃ (GTP や GDP を結合していない開いた状態) が結合した複合体モデルを構築した(図 1)。このモデル構造を用いて観察したところ、次のことがわかった。1) Wild type の EDNRB における Arg319 は、G₁₃ の静電ポテンシャル表面が負の部分と静電相互作用しているが、これが電氣的に中性な Trp に変異すると G との相互作用が弱くなる。2) 膜の外の溶媒に露出しているループ部位に存在しているアミノ酸が疎水性の Trp に変異すると、溶媒和エネルギーの著しい損失につながり、EDNRB 自体の不安定化が起こる。これらにより、GPCR にリガンド結合できても、その後の 3 つの G 蛋白質がうまく結合できず、細胞内へシグナルがうまく伝達されなくなることが変異難聴を引き起こす分子疾患メカニズムの 1 つであることがわかった。

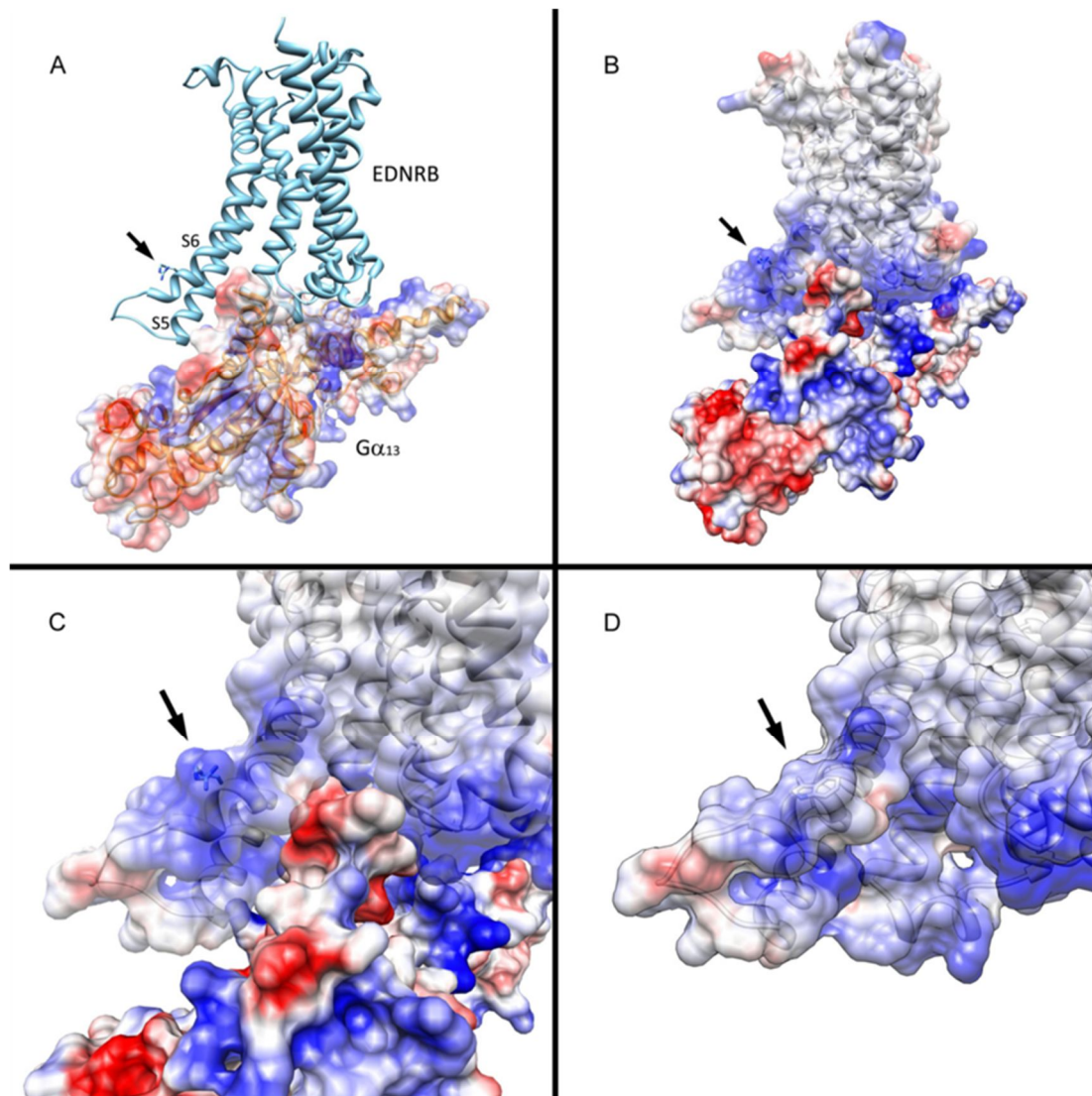


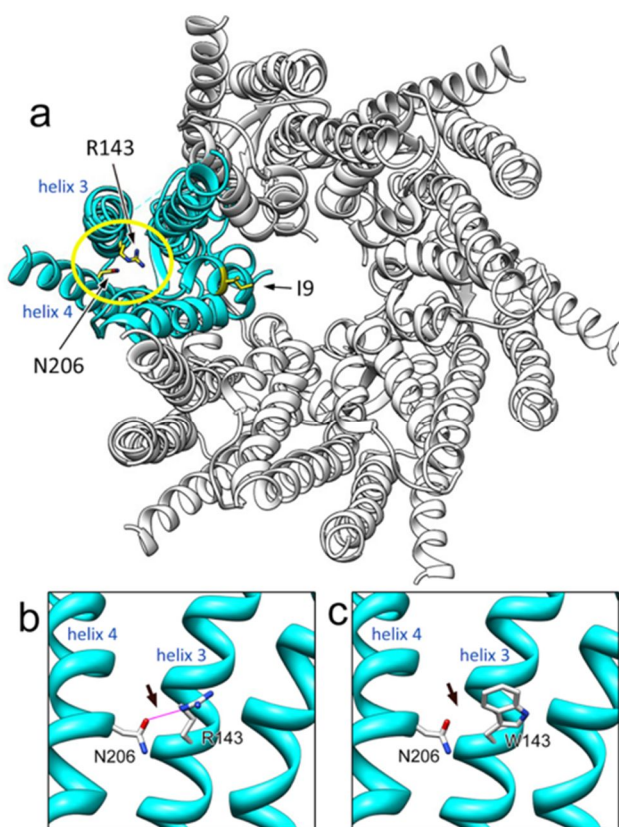
図 1 EDNRB-Gα13 の複合体構造モデル A. 予測した複合体モデルの全体図、矢印は変異部位を示す B. 静電ポテンシャル表面 (赤: 負、青: 正) C. 変異部位の拡大図 矢印は Wild Type の Arg319 を示す、D. 矢印は p.R319W 変異体の 319Trp を示す。

(3) GJB2 遺伝子変異の解析

GJB2 遺伝子は、connexin 26 (Cx26) として知られる Gap junction beta-2 protein (GJB2) をコードする遺伝子であり、内耳のカリウムイオンの移動に重要な役割を果たしていると考えられている。内耳は骨内部にあるリンパ液に満たされた臓器であり、生検できないため、遺伝子診断が感音難聴の確定診断法となる。これまで、補聴器や人工内耳によって聴力を補う方法以外に、疾患そのものを治療する根本的な方法はないと考えられてきたが、近年では、正常遺伝子の導入やゲノム編集を利用した遺伝子治療法などが開発されつつある。また、患者 iPS 細胞から作られた内耳細胞に基づく疾患メカニズムの解明と治療薬の開発も行われてきている。さらに、これまで GJB2 における様々な変異の高い重要性が報告されてきたが、構造生物学的見地からの議論はほとんどされていなかった。このような背景から、代表者らは、GJB2 遺伝子の変異が難聴にもたらす影響を分子論的な見地から解明し、診断法および治療薬の開発につなげることを目的と

して研究を行った。ここでは、GJB2 の頻出変異としてよく知られる p.R143W 変異を例にとり、連携研究者が得たもう片方のアレルの変異タイプを持つ難聴患者の聴力パターンデータを比較分析しながら考察を行った。

構造の観察やモデル計算の結果から、Arg143 が Trp に変異することにより、Asn206 および Ser139 との水素結合が消失し、Tyr136 との - カチオン相互作用が消滅することが示唆された (図 2 a: GJB2 が 6 分子集まった hemichannel の全体構造、水色は GJB2 の 1 分子に対応、b: 変異部位の拡大図 Wild Type、c: R143W 変異体 矢印の水素結合が消失)。特に、Asn206 との水素結合は、膜貫通領域における helix-3 と helix-4 の安定化に大きく寄与している。このことから、R143W 変異は、ヘリックス間相互作用などを著しく減弱し、GJB2 蛋白質の構造不安定化をもたらしたと考えることができる。GJB2 蛋白質が 6 分子集まった 6 量体によりヘミチャネル (connexon) が構成され、さらに 2 つの hemichannel から形成される gap junction が正しい構造をとることにより、正常なイオン透過機能を発現する。そのため、GJB2 蛋白質 1 分子の構造不安定化により、hemichannel 構造全体の不安定化が起こり、さらに Gap junction の構造変化が誘発されたと予測される。この Gap junction の構造変化が最終的にイオン透過能の減弱につながり、難聴を引き起こしたと結論した。



さらに、このことは、Arg143 の水素結合の相手となっている Asn206 の変異によっても重篤な難聴がもたらされるという我々の調査データから、この分子発症メカニズムが妥当なものであることが示唆された。

(4) 分子メカニズムに基づいた新規な診断および治療法の探索

EDNRB 遺伝子の変異と GJB2 遺伝子の変異の解析と分子発症メカニズムに基づき、新規な診断および治療法の開発が可能かどうかを調べた。遺伝子疾患の根本的な治療としては、CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術などを用いた遺伝子治療や遺伝情報を改変した患者 iPS 細胞から作製した組織の移植などの方法が、本来考えられる。しかし、ここでは、遺伝子の翻訳や splicing に影響を与えることで正常な蛋白質を作り出す比較的新規な概念に基づく遺伝疾患治療薬の開発や耳鼻科以外の疾患目的で使用されている既存薬の開発 (ドラッグリポジショニング) が可能かを、EDNRB と GJB2 に対して検討した。主に計算機的手法を使用し多角的な解析を試みたが、ここまでで得られた知見と分子発症機構からは、新規な治療薬を発見することはできなかった。

(5) 課題および反省点

研究期間の前半までは、当初計画よりも早く研究が進み、複数の難聴遺伝子の解析と構造生物学に立脚した詳細な分子発症機構も提案することができ、極めて順調であった。立体構造に基づく病因解析は、新規なコンセプトに基づいた治療法の開発や合理的なドラッグデザインに直接結びつきやすい。また、小児難聴における人工聴覚臓器 (人工内耳等) の手術前早期診断や効果・手術時期の的確な予測への貢献も期待できる。これらのことから、本研究で解明した構造生物学の分子発症機構のいくつかは、近い将来、診断や治療に寄与する可能性が十分あると考える。

しかし、申請当初の研究目的であった - 網羅的ゲノム解析を含む生化学的な実験結果との比較を通して、計算・理論から得られたメカニズムの検証を行う - という部分はほとんど成果が得られなかった。これは、担当分野の連携研究者が研究開始 1 年後に退職してしまったことによるところが大きい。これにより、生化学的な実験のほとんどがストップし、実験データに基づく発症モデルの検証が難しくなってしまったこと、実験・計算の相互フィードバックができなくなったことで新規治療薬やゲノム編集・遺伝子治療のためのデータを取得しにくくなったこと、網羅的ゲノム解析に基づくネットワーク解析が不十分に終わってしまったこと、などの重大な影響が出てしまった。さらに、データ解析のプロフェッショナルとして予定した研究協力者の長期入院による研究不参画など、当初の想察を著しく超える事態が重なった。研究が当初計画どおり

に進まない時の対応として、立体構造が計算で予測できないような場合の構造解析に関する共同研究先や薬物スクリーニングを行うための方法とその共同研究先など、あらゆる角度からの補償方法を考えておいたが、それ以前に必要となる基礎的な生化学データを得ることができなくなってしまった。これにより、新規な診断および治療法の探索の研究も十分に進まなかったことは大きな反省点と考える。

ただ、ここまで得られた知見に基づくさらなる研究課題も既に発案している。例えば、次のような内容である。*GJB2* の p.R143W 変異において、もう一方の対立遺伝子が正常型、構造的に軽微な変異型、構造的に重度な変異型のそれぞれのケースに対し、その表現型となる難聴の症状を調べたところ、相関があることが今回の研究の中で予備的に示された。各アレルから産生される正常型、軽微な変異型、重度な変異型蛋白質の発現量とそれらが6分子集まって構成されるヘミチャンネルにおける割合（6個に占める正常型、軽微変異型、重度変異型の構成比）について様々なケースを仮定し、それらの構造安定性を算出して得られた数値、例えば G などのエネルギー値などが難聴の度合いと一致すれば、計算的手法が術前早期診断や手術時期判断を判断するための定量的な補助データとなり得ると考える。具体的には、分子動力学計算などを用いたエネルギー計算と深層学習を用いた手法による組み合わせなどが有効と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazunori Namba and Hiroki Kaneko	4. 巻 144
2. 論文標題 Co-immunoprecipitation Methods for Detection of G Protein-Coupled Receptors in Brain Tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In: Odagaki Y., Borroto-Escuela D. (eds) Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissue. Neuromethods	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8985-0_1	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 Noriko Morimoto, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Hiroki Kaneko, Rika Kosaki, Tatsuo Matsunaga	4. 巻 45
2. 論文標題 Homozygous EDNRB Mutation in a Patient with Waardenburg Syndrome Type 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 222-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2017.03.022	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 Takahide Okuyama, Ryosuke Yamagishi, Jiro Shimada, Masaaki Ikeda, Yayoi Maruoka, Hiroki Kaneko	4. 巻 36
2. 論文標題 Structural and mechanistic insights into nuclear transport and delivery of the critical pluripotency factor Oct4 to DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular Structure and Dynamics	6. 最初と最後の頁 767-778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07391102.2017.1289124	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト
<http://www.nibiohn.go.jp/activities/nuclear-transport.html>
 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト
<http://www.oka-lab.info>
 日本大学 文理学部
<http://bio.phys.chs.nihon-u.ac.jp/teacher/kaneko/>

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
連携研究者	松永 達雄 (Matsunaga Tatsuo) (90245580)	独立行政法人国立病院機構 東京医療センター 臨床研究センター・聴覚・平衡覚研究部 部長 (82643)	
連携研究者	難波 一徳 (namba kazunori) (60425684)	独立行政法人国立病院機構 東京医療センター 臨床研究センター・聴覚・平衡覚研究部 研究員 (82643)	2018年3月で独立行政法人国立病院機構 東京医療センター を退職 その後は、研究協力者として参画