

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06601

研究課題名(和文) シャコー・マリー・トゥース病の解明に向けたPMP22とMPZの構造生物学解析

研究課題名(英文) Structural analyses of PMP22 and MPZ to reveal the molecular basis of Charcot-Marie-Tooth disease

研究代表者

坂倉 正義 (Sakakura, Masayoshi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：20334336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シャルコー・マリー・トゥース病(CMTD)の原因遺伝子産物であるヒト由来MPZの細胞外ドメイン(hMPZ-ECD)の膜接着活性をサイズ排除クロマトグラフィー及び電子顕微鏡を用いて検出する手法(ナノミエリン法)を開発し、hMPZ-ECDが結晶中で形成する3種類のドメイン間ホモフィリック相互作用のうち、2種類(CisおよびHead-to-head)の相互作用が膜接着に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において開発したナノミエリン法は、ミエリン特有の多重層膜構造を試験管中において再構成する新規解析手法であり、細胞を用いたミエリンの再構築手法と比較して簡便に、MPZ変異が多重層膜形成に及ぼす影響を評価することが可能である。本手法は、CMTDの病因解明のみならず、膜多重層形成に関与するタンパク質を標的とした薬物のスクリーニングなどに活用することが可能であり、医学・薬学的意義が存在する。

研究成果の概要(英文)：Myelin protein zero (MPZ) plays an essential role to stack lipid bilayers in peripheral myelin, and amino acid substitutions of the protein cause a neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease. To understand the molecular mechanism of the membrane adhesion by MPZ, we solved the crystal structure of the extracellular domain of human MPZ (hMPZ-ECD). In the crystal, hMPZ-ECD formed a doughnut-like 4mer, and the tetramer formed two types of 8mers; a stacked-doughnut-like (type 1) 8mer and an 8-shaped (type 2) 8mer. We analyzed the multimerization capability of the nanodiscs on which the hMPZ-ECD variants were immobilized. The hMPZ-ECD variant with the amino acid substitution at the type 2 inter-4mer interface induced the multimerization of the nanodiscs as the wild-type protein did, while the variant with the substitution at the type 1 interface did not induce the multimerization. These results suggested the type 1 interaction between the hMPZ-ECD-4mer is important for the membrane stacking.

研究分野：構造生物学

キーワード：シャルコー・マリー・トゥース病 PMP22 MPZ ミエリン 末梢神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シャルコー・マリー・トゥース病 (CMTD) は、罹患頻度の高い (1/2500 人) 遺伝性神経変性疾患である。特に患者数が多い 1A 型 CMTD (CMT1A) は、四肢の筋力低下、感覚障害等を主症状とし、患者は歩行困難などによる QOL の低下を余儀なくされるが、本疾患に対する有効な治療手段は未だに確立されていない。CMT1A は機能および構造未知の膜タンパク質である末梢ミエリンタンパク質 22 (PMP22) をコードする遺伝子の重複により引き起こされる。遺伝子変異と病態の関係から、PMP22 の過剰発現がミエリンにおける膜重層化に負の影響を与える可能性が考えられる。

ミエリンを構成するシュワン細胞の細胞膜上に最も多く発現するタンパク質はミエリンタンパク質ゼロ (MPZ) である。遺伝子変異に伴う MPZ のアミノ酸残基置換は、1B 型 CMTD (CMT1B) を発症させる。これまでにラット由来 MPZ の細胞外ドメイン (rMPZ-ECD) の X 線結晶構造が報告されているが、ミエリンにおける MPZ の多量体化状態や、MPZ-ECD と膜の相互作用の有無など、未解明の点が残されている。

PMP22 と MPZ-ECD は相互作用を形成すると報告されており、この相互作用が膜重層に影響を与える可能性が考えられる。しかし、本相互作用の詳細 (結合部位、親和性) には未だに解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、CMT1 の疾患メカニズムの一端を解明するため、CMT1 の原因遺伝子産物である PMP22 および MPZ が、末梢ミエリンにおける脂質膜多重層の形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。具体的には (1) 末梢ミエリンにおいて MPZ 依存的に脂質二重膜の多重層が形成されるメカニズムを解明すること、(2) MPZ 依存的な膜多重層形成に影響を及ぼすと考えられる MPZ と PMP22 の相互作用メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) リコンビナント hMPZ-ECD の調製

大腸菌を用いてヒト由来 MPZ の細胞外ドメイン (以下、His-tag 付ヒト由来 MPZ-ECD を hMPZ-ECD-His、Tag 無しヒト由来 MPZ-ECD を hMPZ-ECD と記述する) を発現させた。菌体内の不溶性画分中に発現した目的タンパク質を、変性剤 (尿素) を用いて可溶化した hMPZ-ECD-His については変性状態で  $\text{Ni}^{2+}$  固定化レジン (Roche, cOmplete His-Tag Purification resin) を用いた IMAC 精製を行った。タンパク質溶液中の変性剤濃度を、透析により徐々に低下させることにより hMPZ-ECD(-His) を巻き戻した。巻き戻した hMPZ-ECD を、陰イオン交換クロマトグラフィー (Cytiva, Q Sepharose Fast Flow) およびサイズ排除クロマトグラフィー (Cytiva, HiLoad Superdex 200 16/600) により精製した。hMPZ-ECD(-His) の部位特異的アミノ酸置換体は、野生型 hMPZ-ECD(-His) と同様の手順で調製した。

#### (2) hMPZ-ECD の X 線結晶構造解析と NMR 解析

精製した hMPZ-ECD を蒸気拡散法により結晶化した。得られた結晶について Spring-8 のビームラインを用いて X 線回折実験を行った。得られた回折データより、分子置換法を用いて、hMPZ-ECD の立体構造を 2.0 Å の分解能で決定した。hMPZ-ECD の NMR 解析は、Bruker 社製 Avance III HD 800 を用いて、pH 6.4、25 または 37 °C の条件下において行った。

#### (3) hMPZ-ECD 固定化ナノディスクの重合状態の解析

分子内に Ni-NTA を有する脂質 (Merck, DOGS-NTA- $\text{Ni}^{2+}$ ) と DMPC の混合脂質をコール酸に可溶化し、膜外周タンパク質である MSP1D1 を混合した後、界面活性剤を除去することによりナノディスク (Nano-Lipoprotein Particle ; NLP) を調製した。得られた  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-NLP に対して hMPZ-ECD-His を添加し、His-tag と  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA の結合を介して hMPZ-ECD-His を NLP の膜表面に固定化した。得られた hMPZ-ECD 固定化 NLP の重合度は、サイズ排除クロマトグラフィー (Cytiva, Superdex 200 increase 10/300) により解析した。さらに、サイズ排除カラムから溶出した hMPZ-ECD 固定化 NLP (重合体) の負染色電子顕微鏡像を、日本電子社製 JEM-1230 装置を用いて観測した。

#### (4) リコンビナント PMP22 の調製

ヒト由来 PMP22 の遺伝子を導入した酵母 *Pichia pastoris* を用いて PMP22 の発現を行った。フラスコ中の 30 °C の最小培地中で酵母細胞を培養し、菌が増殖した後、菌体をファーメンターに移した。温度を 20 °C に下げ、メタノールを添加して目的タンパク質の発現を誘導した。メタノール添加の約 24 時間後に菌体を回収した。菌体は高圧ホモジナイザー (Avestin 社製 EmulsiFlex-C3) を用いて冷却しながら破碎し、低速遠心により未破碎菌体を除いた後、超遠心分離により膜画分を沈殿させた。膜画分中の PMP22 を界面活性剤 DDM により可溶化した後、 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA レジン (Qiagen) およびサイズ排除クロマトグラフィー (Cytiva, Superdex 200 increase 10/300) により精製した。

### 4. 研究成果

## (1) リコンビナントヒト由来 MPZ(-ECD)の調製および性状解析

### 全長 MPZ の調製および解析

酵母 *Pichia pastoris* を用いたヒト由来 MPZ (全長 hMPZ) の発現系を構築した。全長 hMPZ を発現させた酵母細胞の膜画分から 1 L 培養当たり約 0.5 mg の全長 hMPZ を得た。得られた全長 hMPZ をリポソームに導入し、電子顕微鏡を用いて脂質膜の形状を観測したが、明瞭な多重層構造は観測されなかった。次に、全長 hMPZ を組み込んだナノディスク (Nano-Lipoprotein Particle; NLP) を調製し、電子顕微鏡観測を行った。この結果、二量体化した NLP と考えられる粒子が僅かに観測されたが、粒子の多量体化は明確に観測されなかった。全長 hMPZ は収率が低く、精製後の純度が低かったため、さらなる研究展開が難しいと考え、hMPZ の細胞外ドメイン (hMPZ-ECD) を活用した解析にシフトした。

### MBP 融合体として発現させた hMPZ-ECD の調製

先行論文を基に MBP 融合型 hMPZ-ECD の発現系を構築し、大腸菌を用いた発現を行った。大腸菌の可溶性画分中に発現した MBP 融合型 hMPZ-ECD から酵素 (Factor Xa) 消化により hMPZ-ECD を切り出し、サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。しかし、Factor Xa による切断効率が低く、hMPZ-ECD を単離することが困難であった。そこで、酵素切断効率を上昇させるため、切断部位を Factor Xa 認識配列から thrombin 認識配列に変更する、MBP と hMPZ-ECD を連結するリンカー配列を伸ばす等の改変を行った。この結果、1 L 培養当たり約 0.4 mg の hMPZ-ECD が得られたが、依然として構造解析研究を行うためには収量が少なかった。

### 変性巻き戻し法による hMPZ-ECD の調製

大腸菌による非融合型の hMPZ-ECD の発現を試みた。HMPZ-ECD は大腸菌の不溶性画分中に発現したため、これを変性巻き戻し法により再構成した。この結果、構造解析を行うために十分と考えられる、1 L 培養当たり 4 mg 以上の hMPZ-ECD を得ることに成功した。HMPZ-ECD の C 末端にヒスチジンタグを付加した hMPZ-ECD-His についても概ね同様のプロトコールで培養・精製を行い、目的タンパク質を得た。

### hMPZ-ECD とアガロースの相互作用解析

HMPZ-ECD のサイズ排除クロマトグラフィーを行った結果、hMPZ-ECD 単量体の溶出位置が、単量体以下の分子量に相当することが明らかとなった。この結果は、hMPZ-ECD 単量体がサイズ排除クロマトグラフィーの担体である agarose と結合することを示唆する。hMPZ-ECD と agarose の相互作用形成の有無を明らかにするため、NMR を用いた相互作用解析を行った。まず、agarose ゲルを  $\beta$ -agarase (ニッポン・ジーン) により、Neoagaro-oligosaccharide に分解した。得られた Neoagaro-oligosaccharide を (MBP 融合体として発現させた) hMPZ-ECD に添加して NMR スペクトルを測定し、Neoagaro-oligosaccharide 非存在下において測定した NMR スペクトルと比較した。この結果、トリプトファンインドル NH 基に由来するシグナルにおいて化学シフト変化が観測されたことから、hMPZ-ECD-His がトリプトファン残基を介して Neoagaro-oligosaccharide と結合することが示された。Neoagaro-oligosaccharide は構成糖としてガラクトースを含む。HMPZ-ECD がミエリン膜中のガラクトースを含む糖脂質 (ガラクトセレブロシドなど) と結合する可能性が考えられる。

### hMPZ-ECD とリン脂質の相互作用解析

hMPZ-ECD とリン脂質の相互作用形成の有無を明らかにするため、大豆由来のリン脂質であるアソレクチンを用いてナノディスク (NLP) を調製し、(MBP 融合体として発現させた) hMPZ-ECD と混合してサイズ排除クロマトグラフィーによる分析を行った。この結果、NLP と hMPZ-ECD は、それぞれ単独の溶出ピークを与え、複合体に由来する溶出ピークは観測されなかった。HMPZ-ECD は、リン脂質とは結合しないと考えられる。

## (2) MPZ の多量体化メカニズムの解析

### hMPZ-ECD の多量体化状態の解析

サイズ排除クロマトグラフィーにより hMPZ-ECD-His のみかけの分子サイズを解析した結果、hMPZ-ECD-His は 8 量体の分子量に相当する位置と、単量体以下の分子量に相当する位置に溶出した。各溶出ピークに含まれる hMPZ-ECD-His の多量体化状態を明確にするために、多角度光散乱検出サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-MALS) を行った。この結果、hMPZ-ECD-His の 2 つの溶出ピークは、それぞれ 8 量体および単量体を含むことが明らかとなった。さらに、各溶出ピークに含まれる hMPZ-ECD-His を再度サイズ排除クロマトグラフィーにより分析した結果、いずれのピーク成分を分析しても、8 量体と単量体の両方のピークが出現した。この結果から、溶液中において 8 量体と単量体が平衡状態を形成していることが示された。

### hMPZ-ECD 多量体の結晶構造解析

これまでにラット由来 MPZ-ECD (rMPZ-ECD) の多量体の結晶構造、および MBP と融合した状態の hMPZ-ECD 単量体の結晶構造が解明されていたが、hMPZ-ECD の多量体構造は明らかにされていなかった。そこで hMPZ-ECD の X 線結晶構造解析を行い、多量体の立体構造を 2.0 Å の分解能で決定した。HMPZ-ECD 多量体の構造は、3 カ所のアミノ酸残基置換部位を除いて、rMPZ-ECD 多量体の構造とよく一致した (RMSD = 0.29 Å)。結晶中で hMPZ-ECD は Cis 相互作用

用を介してドーナツ状の4量体を形成していた。さらに、向きの異なる2個の4量体が head-to-head 相互作用を介して縦に積み重なった8量体 (head-to-head 型8量体) と、向きの異なる2個の4量体が trans 相互作用を介して8の字型に連結した8量体 (trans 型8量体) の2種類の8量体構造が観測された。これらの向きの異なる4量体間の相互作用が、2枚の脂質二重膜を貼り合わせる原動力として働くと考えられるが、head-to-head 型8量体と trans 型8量体が、同時に形成される可能性は低く、いずれかの相互作用が結晶中においてのみ形成されるクリスタルコンタクトである可能性が考えられる。一方、これら両方の相互作用がミエリン形成の異なる段階において別々に形成される可能性も考えられる。

#### hMPZ-ECD の部位特異的変異体の解析

溶液中における hMPZ-ECD-8 量体の形成に重要なドメイン間ホモ相互作用を同定するため、Cis, Head-to-head, Trans の各相互作用面において向かい合ったドメインと直接的な相互作用を形成する残基 (Cis 相互作用面: W24, Head-to-head 相互作用面: W28, Trans 相互作用面: R38, R45, H52) を Ala に置換した変異体を調製し、各変異体の多量体形成能をサイズ排除クロマトグラフィーにより解析した。この結果、W24A および W28A 変異体については単量体由来ピークのみが出現し、R38A, R45A, H52R 変異体については、野生型と同様に8量体と単量体の溶出ピークが出現した。これらの結果から、溶液中の8量体形成には、Cis および Head-to-head 相互作用が重要であり、Trans 相互作用は寄与しないことが示された。また、Cis 相互作用のみ、Head-to-head 相互作用のみが形成されたときにそれぞれ生じると考えられる4量体、2量体については、いずれも観測されず、これらの多量体は溶液中における安定性が低いことが示唆された。

#### NMR を用いた hMPZ-ECD のホモ相互作用解析

溶液中における hMPZ-ECD の多量体化状態を明らかにするため、NMR を用いた hMPZ-ECD の解析を行った。まず、hMPZ-ECD の主鎖 NH 基の NMR スペクトルを測定した結果、hMPZ-ECD 単量体に由来すると考えられる線幅の狭いシグナルが、概ねアミノ酸残基数に相当する個数観測された。これらの NMR シグナルを帰属するために、<sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N により標識した hMPZ-ECD サンプルを調製し、一連の三重共鳴スペクトルを測定した。得られたスペクトルを解析し、hMPZ-ECD に存在する 116 個の主鎖 NH 基のうちの 113 個について NMR シグナルの帰属を確定した。次に、hMPZ-ECD 由来シグナルの hMPZ-ECD 濃度依存性を解析した。この結果、Q71, H86, R77 など、Cis および Head-to-head 相互作用界面に存在する残基の一部において濃度依存的な化学シフト変化が観測された。これらの残基に加えて、Val17-S22, I83, I85 など、結晶中において観測されたホモ相互作用界面のいずれにも属さない残基において、濃度依存的な化学シフト変化が観測された。さらに溶液中における hMPZ-ECD のホモ相互作用領域を正確に決定するため、<sup>2</sup>H および <sup>15</sup>N により標識した hMPZ-ECD と非標識 hMPZ-ECD を 1:3 のモル比で混合したサンプルを調製し、転移交差飽和実験を行った。得られたスペクトルを解析した結果、W24, E68, R77, N87 など、Cis および Head-to-head 相互作用界面に存在する残基の一部において、非標識 hMPZ-ECD から <sup>2</sup>H/<sup>15</sup>N 標識 hMPZ-ECD への飽和移動に由来する、NMR シグナルの強度減少が観測された。これらの残基に加えて、V17, I83-I85 の結晶中においてホモ相互作用が観測されなかった残基においても強度変化が観測された。以上の NMR 解析結果から、溶液中において hMPZ-ECD は、Cis・Head-to-head 相互作用に加えて、I83-I85 を含む領域において、結晶構造においては観測されないホモ相互作用を形成することが示された。I83, V84, I85 の3残基は、CMTD 関連アミノ酸変異部位であり、I83T, I85T は Dejerine Sottas Syndrom (DSS; 重症型 CMTD) \ V84F は CMT1B を誘起することが知られている。したがって、これらの領域における hMPZ-ECD のホモ相互作用は、ミエリン形成、あるいはミエリン形成異常に関与する可能性が考えられる。

#### (3) MPZ 依存的な脂質二重膜多重層形成メカニズムの解析

##### hMPZ-ECD 依存的な多重層膜再構成システム (ナノミエリン) の構築

リコンビナント hMPZ-ECD が膜重層化活性を有するか否かを判定するためのアッセイ系として、ナノディスクを利用したミエリン様脂質二重膜粒子重合体の構築を行った。Ni<sup>2+</sup>-NTA が付加された脂質を含むナノディスク (Ni<sup>2+</sup>-NTA-NLP) を調製し、この表面にヒスチジンタグを介して hMPZ-ECD-His を結合させた。得られた hMPZ-ECD 固定化 NLP (hMPZ-ECD-NLP) において、hMPZ-ECD は全長 MPZ と同様の配向で脂質二重膜上に固定化される。hMPZ-ECD-NLP の重合状態をサイズ排除クロマトグラフィーにより解析した結果、hMPZ-ECD-NLP は排除体積において溶出し、hMPZ-ECD-NLP が多量体化していることが示された。次に、hMPZ-ECD-NLP に対してヒスチジンタグが付加されていない hMPZ-ECD を添加し、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。この結果、排除体積におけるピーク強度が減少し、hMPZ-ECD-NLP が hMPZ-ECD のホモ相互作用依存的に重合していることが示された。さらに、イミダゾール存在下において hMPZ-ECD-NLP のサイズ排除クロマトグラフィーを行った結果、排除体積におけるピークが消失した。この結果も、hMPZ-ECD-NLP の重合が、hMPZ-ECD 依存的に生じたことを示す。

サイズ排除カラムから溶出した hMPZ-ECD-NLP 重合体 (以後、ナノミエリンと記述する) の構造状態を明らかにするため、ナノミエリンの負染色電子顕微鏡像の解析を行った。多くのナノ

ミエリンは hMPZ-ECD-NLP が直線状に連結することにより構成されていたが、分岐・環化したナノミエリンも観測された。NLP 間の距離は 50 ~ 103 Å (平均 76 Å) であった。この距離は、Head-to-head 相互作用で連結した hMPZ-ECD 8 量体の高さ (約 70 Å) と近い。

#### hMPZ-ECD のアミノ酸残基置換がナノミエリンに及ぼす影響の解析

ナノミエリン形成に寄与する hMPZ-ECD のホモ相互作用を同定するため、部位特異的 Ala 変異を導入した hMPZ-ECD-His を用いて hMPZ-ECD-NLP を調製し、それらの重合状態を解析した。Cis 相互作用面に変異が導入された W24A 変異体と Head-to-head 相互作用面に変異が導入された W28A 変異体を用いて調製した hMPZ-ECD-NLP について、サイズ排除クロマトグラフィー分析を行った結果、溶出位置から推定した見かけの分子量が 323 K (W24A) / 346 K (W28A) であり、1 粒子の NLP (211 K) に hMPZ-ECD (15 K) が 8 分子結合した場合の分子量と概ね一致した。さらにこれらの hMPZ-ECD-NLP の負染色電子顕微鏡像の解析を行った結果、hMPZ-ECD-NLP は多量体を形成せず、各粒子が分散して存在することが明らかとなった。一方、Trans 相互作用面に変異が導入された R38A 変異体、R45A 変異体、H52R 変異体を用いて調製した hMPZ-ECD-NLP についてはサイズ排除クロマトグラフィー、負染色電子顕微鏡解析のいずれにおいても、野生型 hMPZ-ECD と同様の結果が得られた。以上の結果から、末梢ミエリンの膜重層構造形成において MPZ-ECD の Cis および Head-to-head 相互作用が重要な役割を果たすことが示された。これらの相互作用部位における CMTD 関連アミノ酸残基置換は、hMPZ-ECD のホモ相互作用を減弱化することにより、ミエリンの膜重層構造の形成不全を誘起する可能性が考えられる。

#### (4) PMP22 の解析

##### リコンビナント PMP22 の調製

酵母 *P. pastoris* の膜画分から抽出し、DDM ミセル中に可溶化した PMP22 をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した結果、見かけの分子量 111 K および 73 K に溶出ピークが出現した。みかけの分子量 73 K に対応するピークに含まれる PMP22 について結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。

##### PMP22 と hMPZ-ECD の相互作用解析

上記 111 K と 73 K の両方の溶出ピークに含まれる PMP22 を hMPZ-ECD と混合し、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。この結果、PMP22 と hMPZ-ECD は別々に溶出し、複合体に由来する溶出ピークは観測されなかった。PMP22 が hMPZ-ECD 単量体と相互作用を形成する場合、hMPZ-ECD 単量体とサイズ排除カラムのアガロース担体の間の相互作用が、hMPZ-ECD-PMP22 間相互作用を競合的に阻害する可能性が考えられる。そこでアガロースの影響を排除するため、NMR を用いた PMP22 と hMPZ-ECD の相互作用解析を行った。Met および Val のメチル基を  $^{13}\text{C}$  により標識した PMP22 を調製し、DDM ミセル中に可溶化した状態で NMR スペクトルを測定した。この結果、Met または Val のメチル基に由来すると考えられる約 25 個の NMR シグナルが検出された。次に、hMPZ-ECD 添加に伴う PMP22 由来シグナルの変化を解析した。この結果、約 7 個のシグナルについてシグナル強度の低下が観測され、PMP22 と hMPZ-ECD の結合が示唆された。

#### (5) 研究の総括

本研究において、従来法を大きく上回る収率でリコンビナント hMPZ-ECD を得る手法を確立した。さらに、リコンビナント hMPZ-ECD とナノディスク技術を組み合わせることにより、末梢ミエリンにおける多重層膜を試験管内で再構成する手法 (ナノミエリン) を開発した。

これらの手法を用いた解析により、hMPZ-ECD の Cis および Head-to-head 相互作用が末梢ミエリンにおける膜重層に重要であることを明らかにした。先行研究において、末梢ミエリンにおける細胞外の膜間距離は約 47 Å であり、MPZ-ECD 間の Trans 相互作用が膜と膜の貼り合わせに重要であると提唱されていた。本研究結果はこの従来説と異なる膜重層メカニズムを示す。近年マイクロ X 線回折法を利用した解析により、末梢ミエリンにおける膜間距離は均一ではなく、測定位置により 39-65 Å の様々な距離を示すことが報告された。Head-to-head 相互作用により結合した MPZ-8 量体が存在するエリアにおいては、膜間距離が従来想定されていた値よりも長く、一方 MPZ 密度が小さいエリアでは膜間距離が短い可能性が考えられる。一方、ミエリン形成の初期段階において、膜を近接させるために Head-to-head 相互作用が形成されるが、その後のミエリンの成熟段階において、Head-to-head 相互作用が他の相互作用 (Trans 相互作用、または MPZ-糖脂質間相互作用) に置き換わり、膜間距離が減少する可能性も考えられる。これらの仮説を検証するためには、今後末梢ミエリンを形成するシュワン細胞を用いた細胞実験を行う必要がある。

今後ナノミエリンを用いることにより、hMPZ-ECD 上における様々な CMT1 関連アミノ酸残基置換が膜重層に及ぼす影響を、迅速に解析することが可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Vanoye Carlos G., Sakakura Masayoshi, Follis Rose M., Trevisan Alexandra J., Narayan Malathi, Li Jun, Sanders Charles R., Carter Bruce D.	4. 巻 294
2. 論文標題 Peripheral myelin protein 22 modulates store-operated calcium channel activity, providing insights into Charcot-Marie-Tooth disease etiology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12054 ~ 12065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.006248	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂倉正義、田辺幹雄、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 脂質二重膜の多重層化に重要なミエリンタンパク質ゼロ細胞外ドメインのホモ相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂倉正義、田辺幹雄、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 脂質二重膜の重層化を担うミエリンタンパク質ゼロ細胞外ドメインのホモ相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂倉正義、森雅樹、高橋栄夫
2. 発表標題 NMRを用いたミエリンタンパク質ゼロの構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森雅樹、坂倉正義、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 末梢ミエリンの膜重層化に関するタンパク質MPZと脂質との相互作用解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
研究分担者	三尾 和弘  (Mio Kazuhiro)  (40470041)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・ラボチーム長    (82626)	

	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
研究協力者	田辺 幹雄  (Tanabe Mikio)  (00716871)	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授   (82118)	
研究協力者	辺見 真生  (Henmi Masami)		
研究協力者	森 雅樹  (Mori Masaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------