

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07279

研究課題名(和文) 1分子ゆらぎの直接観察による膜蛋白の機能発現と障害発生のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for the mechanism of functional expression and dysfunction of membrane proteins through direct observations of single molecular fluctuation

研究代表者

相馬 義郎 (Sohma, Yoshiro)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：60268183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白人種に多い遺伝疾患嚢胞繊維症の原因遺伝子産物であるCFTRチャネルの機能発現および病理性遺伝子変異による発現障害の発生における分子「ゆらぎ」の関与について、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)および分子動力学シミュレーション(MD)を用いて調べた。その結果、ゲーティング機能に重要な2つのNBDの大きな「ゆらぎ」の高速AFMによる直接観察に成功した。白人最多のF508変異はNBD1-ICL4接合面に存在するが、NBD1およびICL4に存在する日本人病理性変異も同様に、CFTR分子の「ゆらぎ」に影響を与えて発現障害をおこしている可能性が、MDによって明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白およびそれらの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、その分子レベルでの詳細な動作メカニズムについては、ほとんど解っていない。研究代表者は、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いた蛋白1分子動態直接観察と分子動力学シミュレーションを組み合わせて、研究対象であるCFTRチャネルの機能発現における分子内ドメインのゆらぎの関与および、病理性遺伝子変異によって引き起こされる発現障害における分子ゆらぎの関与についての重要な知見を得た。これは現在までの組織・細胞レベルでの生理学や巨視的な生化学では得られない、新しい研究成果である。

研究成果の概要(英文)：CFTR is an anion channel plays a central role in the transepithelial ions and water transport, which mutations cause a congenital disease Cystic Fibrosis (CF). In this study, we investigated impact of molecular fluctuation of CFTR molecule for its function and expression in health and disease using high speed atomic force microscopy (HS-AFM) and molecular dynamics simulation (MD). HS-AFM showed a large fluctuation of two NBDs which drive the channel gating, suggesting that it might be a stochastic rather than predictable process. F508del mutation located at the NBD1-ICL4 interface is the most frequent in Caucasians. It is known the F508del-CFTR is degraded and poorly expressed because of its structural instability. The MD study indicated that the Japanese CF mutations in NBD1 and ICL4 as well as the F508del mutation affect the molecular fluctuations of CFTR protein. Thus the molecular fluctuation underlies the function and expression of CFTR in health and disease.

研究分野：分子経理学・分子薬理学

キーワード：膜蛋白複合体 抗原-抗体反応 分子間相互作用 1分子直接観察 高速原子間力顕微鏡 CFTR 嚢胞繊維症

1. 研究開始当初の背景

医学・生理学的に重要な生命プロセスの多くは、チャネル、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、物理的・機能的に相互作用していることにより成立していると考えられる。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。また、最近のクライオ電子顕微鏡法 (CryoEM) の発展により、多くの膜蛋白の立体構造が明らかになってきているが、それらはある条件下における平均化構造 (スナップショット) に過ぎず、膜蛋白の機能発現の理解への重要な第一歩ではあるが、その全体的な理解にはまだほど遠いものがある。

研究代表者は、現在までの高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いた抗原-抗体反応や膜蛋白 1 分子から膜蛋白複合体までの分子レベルでの直接観察を行ってきた。特に抗原-抗体反応においては、高速 AFM で観察された 1 分子レベルでの抗原と抗体の結合・解離動態と ELISA から得られる巨視的レベルでの結合・解離情報の間に無視できない相違が認められたことから、分子レベルと巨視レベルとの間のメソスコピックな領域における分子間相互作用に関する未知の分子動態プロセスの存在の可能性に気づいた。そして、そのプロセスには分子の「ゆらぎ」に基づいた機能的 (Stochastic) な事象が重要な役割を果たしているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

医学生理学の大きな進歩に繋がると期待される膜蛋白およびそれらの高次機能複合体の動作機構を、それらが示す「ゆらぎ」に着目して解明する。正常な機能発現におけるゆらぎの役割、そして異常なゆらぎが引き起こす機能障害についての知見を深めることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究の対象分子は、Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) である。

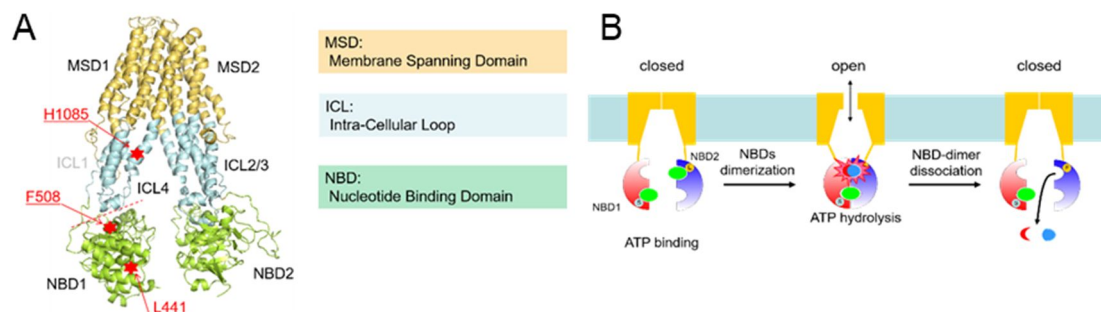
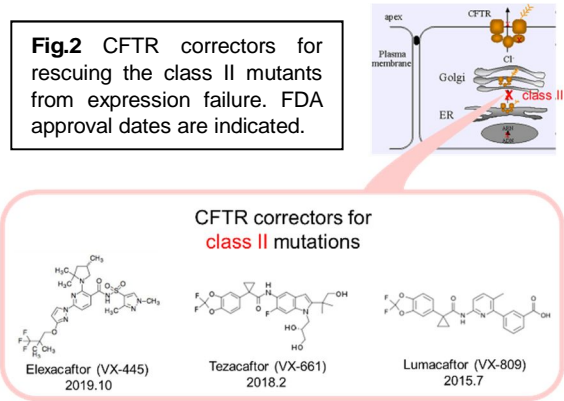


Fig.1 (A) Structure of CFTR and positions of the mutations, L441P, H108R and F508. Regulatory domain (RD) is omitted.

(B) ATP-dependent NBD-driven gating mechanism of CFTR channel.

CFTR は、白人種に高頻度に見られる常染色体劣性遺伝疾患嚢胞線維症 Cystic Fibrosis (CF) の原因遺伝子産物で、ABC トランスポータスーパーファミリーで唯一イオンチャンネルとして機能しているメンバー (ABCC7) である (Fig.1A)。CFTR チャンネルのゲーティングは、細胞内側にある 2 つの NBD の ATP 2 分子を挟み込んだ形での 2 量体形成と ATP 加水分解による解離のサイクルによって駆動されている (Fig.1B)。

CFTR 分子の細胞膜上での発現の障害を含めた、CFTR の機能発現障害は、嚢胞線維症を引き起こす。嚢胞線維症の分子病態メカニズムとして、病因性変異によって CFTR の分子構造が不安定になり、細胞膜上での発現前に細胞内で分解されてしまうクラス II 変異がある (Fig.2)。白人種で最も多く見られる $\Delta F508$ 変異体では、NBD1 と MSD を結び付けている ICL4 との接合面 (Fig.1A) が不安定化して NBD1 のゆらぎが大きくなり、クラス II 発現障害が起こると考えられている。最近、 $\Delta F508$ 変異体を発現増強させる目的で、発現増強薬 (corrector) である lumacaftor や elexacaftor が開発・承認された (Fig.2)。



本研究では、高速 AFM による CFTR の 1 分子レベルでの動態直接観察、FlipIn 安定発現系を用いた変異 CFTR の発現実験、および Amber 力場を用いた分子動力学(MD)シミュレーションを組み合わせて研究を進めた。

4. 研究成果

(1) CFTR の細胞内ドメインのゆらぎの直接観察

高速 AFM を用いて、リン脂質 2 重膜に組み込んだ CFTR 分子を細胞内側から観察すると、2 つの NBD と Regulatory Domain (RD) が構成されている構造物が大きくゆらいでいるのが観察された (Fig.3)。これにより、NBD の 2 量体化と解離の 2 つの状態を、単に直線的に行き来するのではなく、NBD が大きくランダムに「ゆらく」なかで機会的 (Stochastic) に会合して 2 量体を形成している可能性が示唆された。(16H05122 からの継続)

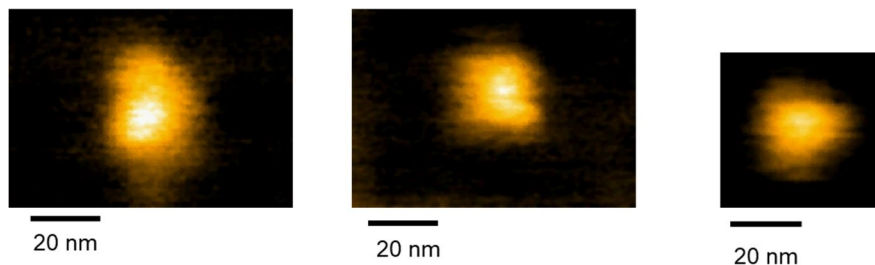


Fig. 3. Various shapes of the HS-AFM images obtained from the intracellular side of CFTR molecules.

(2) 日本人 CFTR 変異の発現障害と白人 F508 変異用治療薬の効果

日本人患者に見つかっている 22 種類の CFTR 変異から、クラス 変異 10 種類を特定した。日本人で 2 番目に多い L441P 変異および 2 番目に多い H1085R 変異は、このクラスグループに含まれている。

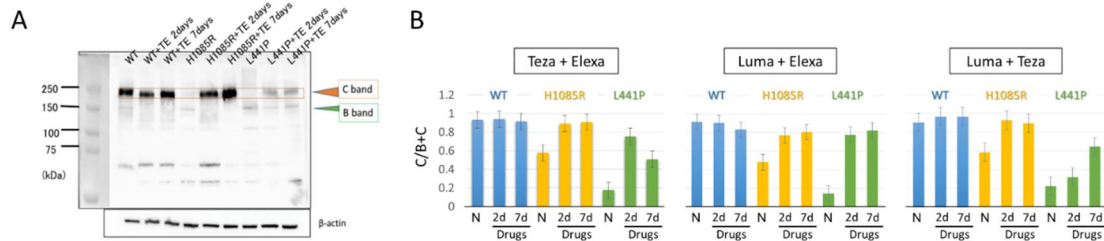


Fig. 4. Rescuing the Japanese CFTR mutants by combined applications of two of the three correctors. **(A)** Western blots of the WT-, H1085R- and L441P-CFTR after incubation with a mixture of tezacaftor and elexacaftor (TE) for 2 and 7 days. **(B)** Comparisons of the rescuing effects among the combinations of two correctors,

興味深いことに、白人 F508 変異体を安定発現させる目的で開発された発現補正薬 lumacaftor によって発現増強され、さらに最近開発された elexacaftor によってさらに相乗的に発現増強されることを発見した (Fig.4)。

(3) MD シミュレーションを用いた分子ゆらぎの解析と理解

Lumacaftor および elexacaftor は、F508 変異によってゆらぎが大きくなった NBD1 を安定化することによって、細胞膜上での発現を増強していると考えられているが、日本人 L441P 変異は NBD1 内にあり、H1085R 変異体は ICL4 に存在している。高速 AFM の 1 分子動態の動画データを正しく理解し、病因性変異が CFTR 分子に与える不安定性を分子のゆらぎとして捉えて定量的に解析するためには、MD シミュレーションが必要となる。

まず、クラス 変異において重要である NBD1 の MD モデルを作成し、NBD1 に存在する 5 つの日本人病因性変異 L441P、Y517H、L548Q、I556V、L571S のドメインの揺らぎに与える影響をシミュレートした。(例: Fig.5&6)

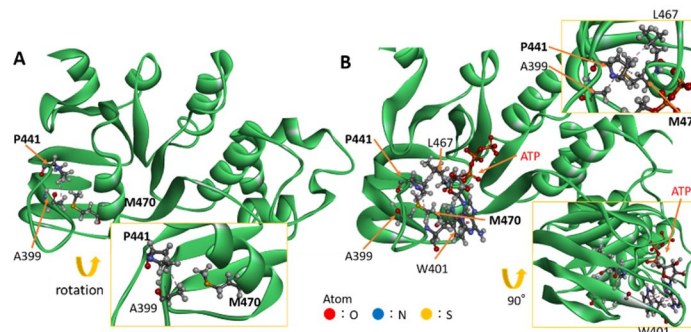


Fig. 5. Interaction analysis for the P441 residue in **(A)** apo-L441P (M470) and **(B)** atp-L441P (M470). The relevant residues are shown in the ball and stick model. The insets show different angles. Hydrogen bonding (2.8Å-3.5Å, green), Hydrophobic interaction (-5Å, purple)

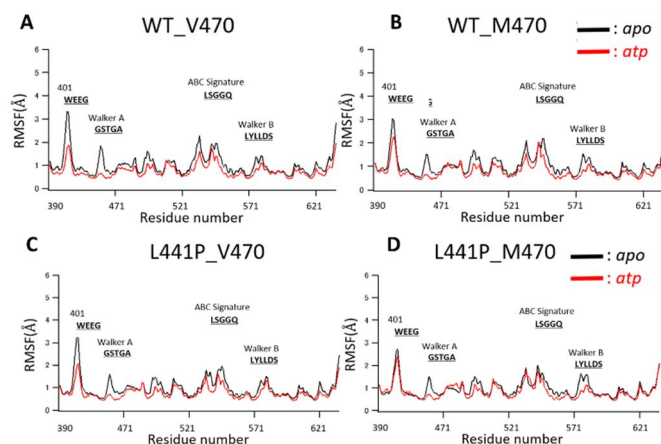


Fig. 6. RMSF (Root Mean Square Fluctuation) of NBD1 in **A:** WT (V470), **B:** WT (M470), **C:** L441P (V470) and **D:** L441P (M470). Note that the regulatory insertion (404-437 residues) was omitted because of its huge instability. Mean of five simulations

例として、上記の MD シミュレーションの結果、NBD1 のゆらぎが 1 次構造に沿って特定することができた (Fig.6)。NBD1 のゆらぎは ATP 結合の有無、L441P 変異の有無、そして CFTR のチャネル機能に関与している M470V 多型によっても影響されることが明らかとなった。また、ICL1-NBD1-ICL4 複合ドメイン MD モデルを作成し、ICL 4 に存在する H1085R 変異のクラス 発現障害メカニズムについての研究も進めている。

5.まとめ

本研究において、我々は分子ゆらぎという観点から、NBD に駆動されている CFTR チャネルのゲーティングメカニズムや CFTR の病理性変異による発現障害のメカニズムについての知見を深めた。そして F508 変異によって増大した NBD1 のゆらぎを抑える発現増強薬が、L441P や H1085R 変異体にも効果があることを明らかにした。これらの変異点はお互いに大きく離れており、同じ補正薬が効果を示すメカニズムは不明であるが、これらの日本人変異も F508 変異に似たゆらぎの変化に深く関連した分子病態メカニズムを持っていると考えられ、今後のさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 相馬義郎、君島莉央、相馬光流	4. 巻 90巻5号
2. 論文標題 尿管のイオン輸送調節におけるCFTRの役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 649 - 653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水正浩、大川詩織、松澤由佳、金子すずな、深田侑希、直井佑太、成田和希、石塚柊太、小川亜美、小川未裕、大塚悠花、黒澤歩実、君島莉央、相馬光流、中尾香菜子、相馬義郎
2. 発表標題 日本人型嚢胞線維症H1085RおよびL441P-CFTR変異体に対する白人型病因性CFTR変異体発現促進薬の効果
3. 学会等名 2021年度 生理学研究所研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 清水正浩、大川詩織、松澤由佳、金子すずな、深田侑希、直井佑太、成田和希、石塚柊太、小川亜美、小川未裕、大塚悠花、黒澤歩実、君島莉央、相馬光流、中尾香菜子、相馬義郎
2. 発表標題 日本人H1085RおよびL441P-CFTR変異体に対するVertex発現増強薬の効果について
3. 学会等名 第7回嚢胞性線維症情報交換会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Rio Kimishima, Hikaru Sohma, Masahiro Shimizu, Shiori Ohkawa, Yuka Matsuzawa, Suzuna Kaneko, Yuki Fukada, Kanako Wakabayashi- Nakao, Yoshiro Sohma
2. 発表標題 Functional rescue for the second and third most frequent disease-associated CFTR mutants in Japanese CF patients by the therapeutic drug for Caucasian mutants
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 君島 莉央、相馬 光流、岩井 翔吾、松澤 由佳、金子 すずな、深田 侑希、大川 詩織、清水 正浩、小林 奈央、直井 佑太、成田 和希、相馬 義郎
2. 発表標題 日本人CFTR変異体への白人型CFTR変異治療薬の効果について
3. 学会等名 2020年度 生理学研究所研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 君島 莉央、相馬 光流、岩井 翔吾、松澤 由佳、金子 すずな、深田 侑希、大川 詩織、清水 正浩、小林 奈央、直井 佑太、成田 和希、相馬 義郎
2. 発表標題 日本人CFTR変異体へのCFTR corrector Lumacaftor の効果について
3. 学会等名 第6回嚢胞性線維症情報交換会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 相馬 義郎、清水 正浩、大川 詩織、松澤 由佳、金子 すずな、深田 侑希、成田 和希、直井 佑太、君島 莉央、相馬 光流、岩井 翔吾、小林 奈央、中尾 香菜子
2. 発表標題 日本人嚢胞性線維症患者におけるCFTRチャネル変異体の機能不全
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>教員紹介 薬学部薬学科 国際医療福祉大学 https://otawara.iuhw.ac.jp/staff/yakugaku/4933.html 教員紹介 基礎医学研究センター 国際医療福祉大学 https://www.iuhw.ac.jp/center/fundamental/list.html</p>

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	内橋 貴之 (Uchihashi Takayuki) (30326300)	名古屋大学・理学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	古田 忠臣 (Furuta Tadaomi) (10431834)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	
研究分担者	中川 大 (Nakagawa Hiroshi) (40397039)	中部大学・応用生物学部・准教授 (33910)	
研究分担者	岩本 真幸 (Iwamoto Masayuki) (40452122)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	
研究分担者	大崎 寿久 (Osaki Toshihisa) (50533650)	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・人工細胞膜システムグループ・サブリーダー (82718)	

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