

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05122

研究課題名(和文) 1分子動態観察による膜蛋白複合体の自己組織化と機能発現の動的連関機構の解明

研究課題名(英文) Study for functional mechanism of membrane protein complexes from the perspective of self-organization using single molecule direct observations.

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いた膜蛋白/脂質ラフト高次機能複合体の動態の直接観察に挑戦した。

その結果、膜蛋白AQP4およびCFTRの2重脂質膜中への再構成技術の確立と再構成された膜蛋白複合体の高速AFM観察に成功した。これらの再構成された膜蛋白は、予想よりはるかに大きくダイナミックに揺らいでいることが発見できた。さらにAQP4を抗原とする抗体の抗原-抗体反応の直接観察を行い、自己免疫疾患成立過程における重要な所見が得られた。

また、将来的に本研究の重要な研究対象となる病因性CFTR変異体、特に日本人・アジア人に特有な変異体の研究も並行して行い、重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学・生理学的に重要な生命プロセスの多くは、必要に応じて生体膜上で機能性膜蛋白が集合して形成された膜蛋白/脂質ラフト高次機能複合体によって遂行されている。この動的な膜蛋白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、機能面および静止構造についての研究はあっても、分子動態についての直接的な測定データが乏しく、その分子レベルでの動的なメカニズムについてはほとんど解っていない。本研究では、高速原子間力顕微鏡を用いて、機能中の膜蛋白複合体の動態の1分子レベルで直接観察・解析するための基盤技術の開発に挑戦し、初期段階として満足できる成果をあげることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted direct observations for dynamics of membrane protein complex in the membrane rafts using using a high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). First we succeed to establish a method for purifying functional membrane proteins, e.g. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) and Aquaporin 4 (AQP4), and reconstituting them in a lipid bilayer. First we observed single molecular dynamics of CFTR and succeeded to identify large fluctuation of presumable NBD and R-domain of CFTR protein. Next we successfully visualized the single molecule dynamics of the anti-AQP4 monoclonal antibodies interacting with AQP4 molecules forming a supramolecular orthogonal array structure reconstituted in lipid membrane, which initiates a severe immune-disease in human, Neuromyelitis Optica (NMO). We also study disease-associated CFTR mutants causing a life-shorten disease Cystic Fibrosis, which should be important research targets in near future.

研究分野：分子生理学

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 脂質2重膜ラフト アクアポリン

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

(1) 医学・生理学的に重要な生命プロセスの多くは、必要に応じて生体膜上で機能性膜蛋白が集合して形成された膜蛋白/脂質ラフト高次機能複合体によって遂行されている(図1)。この動的な膜蛋白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、直接的な測定データが乏しく、その分子レベルでの動的なメカニズムについてはほとんど解っていない。

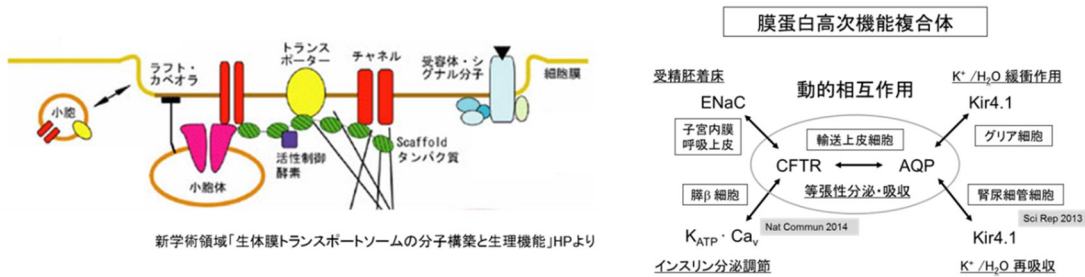


図1 膜蛋白複合体による生理機能発現

2. 研究の目的

(1) 本研究では、膜蛋白/脂質間の相互作用に基づいた動的秩序形成および自己組織化の視点から膜蛋白複合体形成・解離と機能発現の動的連関メカニズムの解明に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) 機能中の膜蛋白複合体の分子動態の直接的動画観察を可能にする高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を基盤観察技術として(図2)

- 1) 各膜蛋白の機能を保持したままでの発現・精製系の確立、
- 2) 膜蛋白複合体が生体膜中と同様な動態を示すための細胞膜環境観察プラットフォームの開発および、
- 3) 膜蛋白分子間相互作用についての1分子動画データの解析技術の確立に挑戦した。

(2) 研究試料としては、嚢胞線維症 Cystic Fibrosis 原因遺伝子産物である Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)陰イオンチャネルおよび水チャネル Aquaporin (AQP)の一種である AQP4 を軸として、これらと機能的に深い関係があると考えられる上皮型 Na⁺ チャネル(ENaC)や ATP 感受性 K⁺チャネル(K_{ATP})等を選定した(図1)。

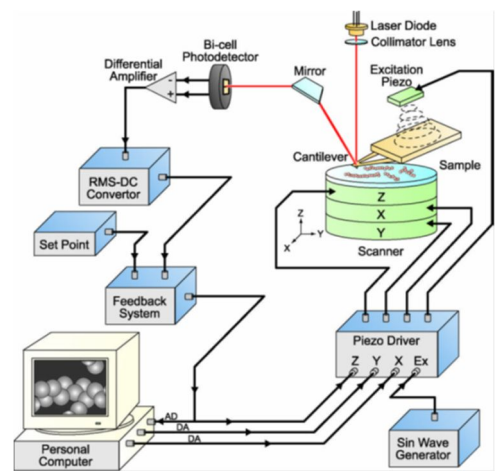


図2 高速AFM装置

4. 研究成果

(1) 膜蛋白複合体の分子動態の直接的動画観察

AQP4 の 2 つのアイソフォーム M1-AQP4 と M23-AQP4 および CFTR を人工脂質 2 重膜に組み込んだ状態で高速 AFM 観察することに成功した。特に M23-AQP4 については、電子顕微鏡で細胞膜上に観察される規則正しいアレイ構造を高速 AFM で直接観察することができた。

さらに、M23-AQP4 アレイおよび単体として存在している M1-AQP4 に、抗 AQP4 抗体を投与して、抗体の結合・解離の動態観察にも成功した。

これらの高速 AFM を用いた 1 分子直接観察結果のうちで最も興味深い現象である、脂質 2 重膜中で規則正しいアレイ構造をとっている M23-AQP4 に対する抗 AQP4 抗体の結合・解離、アレイ上の“歩行”、歩行中の抗体どうしの衝突、そして抗体クラスター形成といった現象の相互関係の解明および全体の定量的・統合的理解を追求した(図3)。そのために、上記の各現象において各状態間を任意の確率で移動、さらに各現象間を任意の確率で移動する stochastic 数理モデルを作成し、モンテカルロシミュレーションを行った(図4)。このシミュレーション結果と ELISA 実験で得られた巨視的レベルでの結合・解離動態との整合性を求めたが、定量的な整合を取ることはできなかった。このことから、1 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も示唆された。

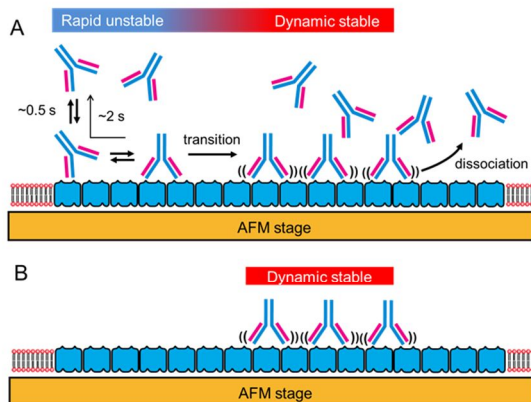


図3 高速AFM観察に基づいたM23-AQP4アレイへの抗体結合-解離モデル (A)抗体投与中 (B) 投与後

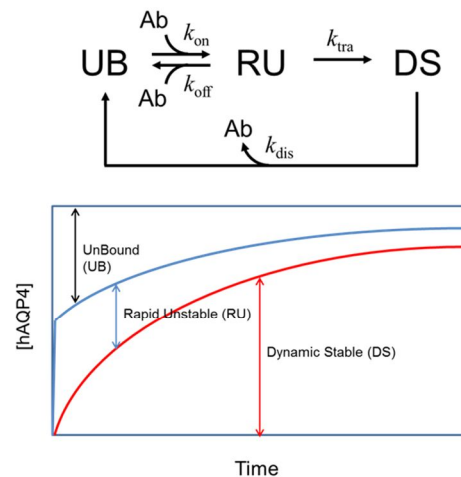


図4 M23-AQP4アレイにおける抗体結合-解離についての(A)シミュレーションモデルと(B)シミュレーション結果

このことを受けて、まず、M23-AQP4 アレイ上に 1) 近接して複数の抗体が結合した場合における相互作用による抗体解離促進と、2) アレイ上のある一点(抗原)に抗体が結合した場合のその近接した抗原への新たな抗体の結合の阻害、さらに 3) 抗体のアレイ上の歩行現象を加味した大規模シミュレーションを実行中である。

(2) 細胞膜環境観察プラットフォームの開発

高速 AFM 用の細胞膜環境観察プラットフォームを開発するために、AFM 観察ステージのマイカ表面と脂質 2 重膜の間に灌流液の層を作る目的で、直鎖構造 PEG 脂質誘導体を添加したりリポソームを作製して、AFM ステージ上へ展開したが (図 5)、PEG リン脂質誘導体の分布に偏りがあるようで、均一で安定な脂質二重膜面を形成することは困難であった (図 6)。

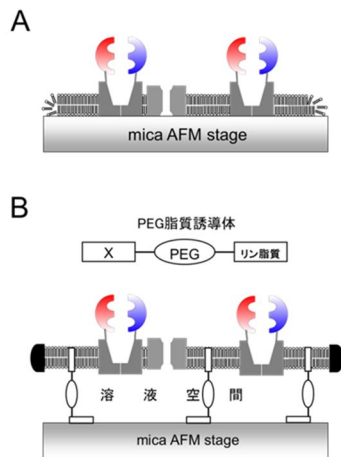


図5 (A) 現行AFMステージ (B) 細胞膜環境AFMプラットフォーム

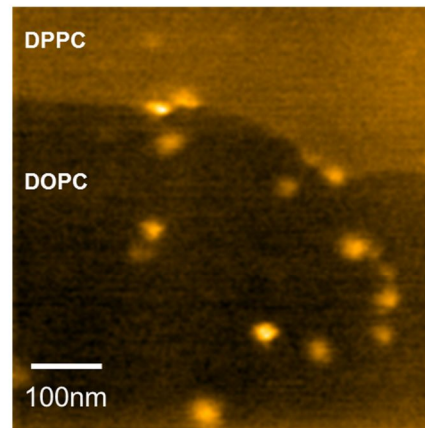


図6 AFMステージ上に展開されたDPPC/DOPC脂質2重膜像

また、この効果は、高速 AFM で組み込まれた膜蛋白の挙動を観察することで評価していたが、この方法では間接的な評価しかできないので、さらに広範囲により直接的に評価するために、AFM ステージ上に近接場光を展開することを計画・準備中である (図 7)。

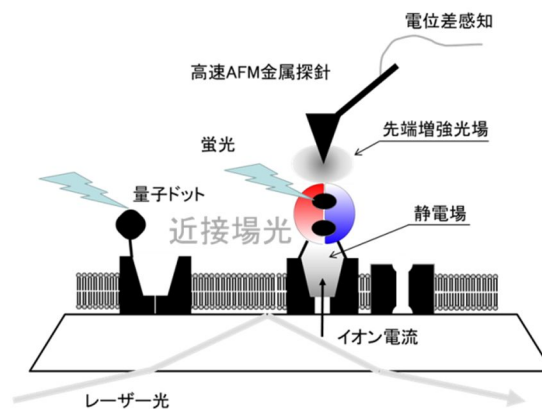


図7 近接場光下における量子ドットおよびAFM 探針先端増強光を利用したハイブリッドAFM

(3) 病理性 CFTR 変異体

将来的に本研究の重要な研究対象となる病理性 CFTR 変異体、特に日本人・アジア人に特有な変異体の研

究も並行して行なった。

嚢胞線維症 Cystic Fibrosis (CF)は、白人種における代表的な遺伝性疾患のひとつである。日本人を含む他人種においては、CF患者の数は少ないが、白人種とは異なるタイプのCFTR変異がみられる。日本人に最も高頻度に見られる病因性変異はエクソン 16-17 b にわたる大規模欠損変異である(Nakakuki et al. J Hum Genet 2012)。16-17 b 欠損変異では、CFTR 蛋白における 970 番目に位置するグリシン(G970)から、1122 番目のトレオニン(T1122)までの 153 個のアミノ酸の欠損がフレームシフトなしに起こるため ((G970-T1122)変異)、3 つの膜貫通ヘリックス TM9-11 および 4 番目の細胞内ループ ICL4 に相当する部分が失われる。この (G970-T1122)変異体では、蛋白は合成されるが、ゴルジ体での糖鎖修飾等の成熟過程が正常に行われず、細胞膜での発現が阻害されていること(class 変異)を明らかにした(図8)。

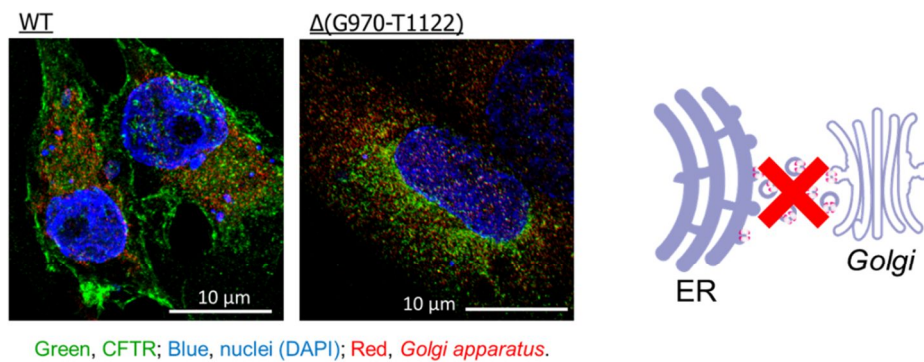


図8 日本人に最も多く見られるΔ(G970-T1122)変異はERからGolgiへ移動が阻害されたクラスII変異である

日本で同定された 21 種類の病因性 CFTR 変異のうち、蛋白が合成されない class I 変異が 1 種類、(G970-T1122)変異に加え 2 番および 3 番目に多い L441P と H1085R 変異を含む class 変異が 11 種類、そして細胞膜への発現は正常であるが、チャネル機能が障害されている class II 変異が 10 種類含まれていた。さらに、欧米で最も多くみられる class II 変異 F508 の治療薬として開発された VX-809 (Lumacaftor) の日本人特有の CFTR 変異への効果についても検討し、いくつかの class II 変異体に効果があることを確認した。

(4) 今後の展望

上記のように当該研究は、計画した当時には予想できなかった多くの技術的問題に直面して、困難な展開となってはいるが、最終目標達成のために研究を粛々と進めてきた。現在、これらの研究成果の論文発表の準備中である。

当該研究においては、上記以外に数多くの新たな発見があった。そのなかでも、1) 多くの膜蛋白が予想以上に大きく揺らいでいること、および 2) 1 分子レベルで観察された現象の集合がそのまま巨視レベルで観察されている現象となるのではない、つまりメゾスコピックレベルにおいて今までに明らかにされていない法則が働いている可能性が示唆されたことは、当該研究におけるキーワードである自己組織化へとつながる非常に重要な発見であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yeh Han-I, Qiu Liming, Sohma Yoshiro, Conrath Katja, Zou Xiaoqin, Hwang Tzyh-Chang	4. 巻 151
2. 論文標題 Identifying the molecular target sites for CFTR potentiators GLPG1837 and VX-770	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 912 ~ 928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201912360	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 該当する
1. 著者名 Wakabayashi-Nakao K, Yu Y, Nakakuki M, Hwang TC, Ishiguro H, Sohma Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Characterization of (G970-T1122)-CFTR, the most frequent CFTR mutant identified in Japanese cystic fibrosis patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0626-4	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 Odera M, Furuta T, Sohma Y, Sakurai M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Molecular dynamics simulation study on the structural instability of the most common cystic fibrosis-associated mutant F508-CFTR.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophys Physicobiol.	6. 最初と最後の頁 33 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.15.0_33	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 該当する
1. 著者名 Yeh Han-I, Sohma Yoshiro, Conrath Katja, Hwang Tzyh-Chang	4. 巻 149
2. 論文標題 A common mechanism for CFTR potentiators	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201711886	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 該当する

1. 著者名 Jih Kang-Yang, Lin Wen-Ying, Sohma Yoshiro, Hwang Tzyh-Chang	4. 巻 34
2. 論文標題 CFTR potentiators: from bench to bedside	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coph.2017.09.015	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 Lin W.-Y., Sohma Y., Hwang T.-C.	4. 巻 90
2. 論文標題 Synergistic Potentiation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating by Two Chemically Distinct Potentiators, Ivacaftor (VX-770) and 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino) Benzoate	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 275 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.116.104570	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 該当する

1. 著者名 Yu Ying-Chun, Sohma Yoshiro, Hwang Tzyh-Chang	4. 巻 594
2. 論文標題 On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 3227 ~ 3244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP271723	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 相馬義郎、君島莉央、岩井翔梧、相馬光流、小林奈央、中尾香菜子
2. 発表標題 日本人由来の CFTR 変異体の分子病態学的特性
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 大分・別府 (誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬義郎、君島莉央、相馬光流、小林奈央、岩井翔吾
2. 発表標題 日本人嚢胞線維症患者のCFTR 分子病態生理学
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム：構造生物学の先にあるもの」 大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬義郎
2. 発表標題 日本人嚢胞線維症患者の分子病態生理学と治療学
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜・間質の機能連関と病態発現機構解明のためのストラテジ ー」 岡崎・愛知
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakabayashi-Nakao K, Yu Y, Nakakuki M, Hwang TC, Ishiguro H, Sohma Y
2. 発表標題 Characterization of disease-associated CFTR-mutants found in Japanese cystic fibrosis patients
3. 学会等名 42nd European Cystic Fibrosis Conference, Liverpool, UK (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakabayashi-Nakao K, Yu YC, Nakakuki M, Hwang TC, Ishiguro H, Sohma Y
2. 発表標題 CHARACTERIZATION OF THE MOST FREQUENT CFTR-MUTANT FOUND IN JAPANESE CYSTIC FIBROSIS PATIENTS
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬義郎
2. 発表標題 CARS顕微鏡を用いた経上皮膜水拡散現象の研究
3. 学会等名 生理研研究会「体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・総合的理解」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会，長崎
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第94回日本生理学会年会，浜松
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakao K, Nakakuki M, Ishiguro H, Sohma Y
2. 発表標題 Characterization of a CFTR-mutant frequently found in Japanese cystic fibrosis patients
3. 学会等名 14th ECFS Basic Science Conference, Algarve, Portugal (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sohma Y
2. 発表標題 Channel function in normal and Asian-mutant CFTR
3. 学会等名 2016 International Conference of Physiological Sciences, The Logic of Life, Beijing, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>国際医療福祉大学薬学部薬学科 教員紹介 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