

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08296

研究課題名(和文) 相互作用化合物に基づくベータバレル型チャンネルVDACの立体構造と機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of structure and function of mitochondrial voltage-dependent anion channel using the interacting molecules

研究代表者

染谷 友美 (Kimura-Someya, Tomomi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80450401

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)：ミトコンドリア外膜で陰イオンや様々な物質輸送を担う膜タンパク質であるVDACは、エネルギー生産、脂質代謝、細胞死制御などミトコンドリア機能に深く関わり、がん等の疾患との関連も報告されている。本研究では、正しく折りたたまれたVDACの立体構造を解析し、ホモ7量体を形成していることを見出した。この結果は、生体内での活性発現にオリゴマー化が関与するという報告とも合致する。また、VDACと相互作用し細胞機能を制御する化合物の結合構造の解析も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正しく折りたたまれたVDACの構造は、生体内での構造を反映していると考えられた。この構造に基づき、VDACに作用する化合物を設計したり、既存の相互作用化合物の最適化を行ったりすることで、VDACの関与が指摘されている疾患である、がんや神経変性疾患に対する治療薬の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), which is located in the outer mitochondrial membrane, plays important roles in various cellular processes. We determined high-resolution crystal structures of heptameric human VDAC1 prepared by using a cell-free protein synthesis system, which avoided the need for denaturation and refolding of the protein. We also tried to determine the structure of VDAC1 complexed with the interacting compound.

研究分野：膜タンパク質生化学

キーワード：無細胞タンパク質合成 イオンチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

VDAC はミトコンドリア外膜で陰イオンを輸送するチャンネルで、様々な物質輸送も担うことが知られている。そのため、エネルギー生産、脂質代謝、細胞死制御などミトコンドリア機能に深く関わり、がん等の疾患との関連も報告されている。一方でその構造・機能については不明な点が多かった。

VDAC は、真核生物由来膜タンパク質としてはユニークな バレル構造を持つ。ヒト・マウス VDAC1 とゼブラフィッシュ VDAC2 の結晶構造が既に報告されていたが、大腸菌封入体からの変性・リフォールドを経て調製されたタンパク質の結晶を用いており、動物組織より精製された VDAC の解析結果と相反する点もあることから、これらの構造が生体内配置を反映しているかは疑問であった。本研究グループでは、無細胞タンパク質合成系を用いた、変性を伴わない VDAC 調製法を確立し、VDAC1 の高分解能構造を取得することに成功していた。

一方で、研究協力者であるどど等は、VDAC と相互作用し細胞機能に影響する化合物を開発していたが、化合物結合構造は未知であった。VDAC に化合物を結合させることでタンパク質構造を固定し、結晶化の促進や結晶品質の向上が期待できると同時に、本化合物の結合構造を明らかにすることで化合物展開が可能になることも期待されたため、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、正しく折りたたまれた バレル型チャンネル VDAC1, VDAC2, VDAC3 それぞれの立体構造を解析し、続いて、相互作用化合物結合構造を明らかにし、化合物の作用様式を解明することを目的とした。本研究グループで確立した、変性を伴わない VDAC 調製法を用い、タンパク質合成条件、精製条件の改良や、変異体作成によって高品質試料を調製し、X線解析その他の構造解析手法によって立体構造を解析する。得られる複合体構造情報から VDAC 各サブタイプに選択的な化合物の開発へと発展させることができ、将来的には新規メカニズムに基づく医薬品への応用につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) VDAC1, VDAC2, VDAC3 の構造解析用サンプル調製：VDAC1, VDAC2, VDAC3 の試料調製には、膜タンパク質合成に最適化した無細胞タンパク質合成法を利用した[1]。合成された VDAC タンパク質を Ni アフィニティー精製、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。ゲルろ過結果は、精製タンパク質の性状評価にも利用した。

(2) 結晶化条件の検討：VDAC1, VDAC2, VDAC3 各単体、および、VDAC3 変異体について、蒸気拡散法による結晶化条件スクリーニングを行った。相互作用化合物との複合体については、化合物を添加した VDAC の結晶化スクリーニングと、VDAC のみの結晶に化合物を浸漬することにより化合物入り結晶を得た。SPring-8 BL32XU にて X 線回折実験を行った。

(3) クライオ電顕解析用サンプル調製：VDAC1 精製用界面活性剤を様々な界面活性剤に置換したサンプル、複数種の apolipoprotein で調製した nanodisc へ再構成したサンプルを調製し、負染色による電子顕微鏡観察を行った。良好な像を得たサンプルについては、クライオ電顕観察も行った。

(4) VDAC1, VDAC2, VDAC3 に対するモノクローナル抗体の作成：研究協力者のどど等と協力し、VDAC1, VDAC2, VDAC3 それぞれの一部領域ペプチドを抗原として、ラットを免疫した。得られたハイブリドーマ培養上清について、リボソーム再構成 VDAC1, VDAC2, VDAC3 および SDS 変性 VDAC1, VDAC2, VDAC3 をそれぞれ用いた ELISA によって、非変性抗原(リボソーム再構成抗原)に結合し、変性抗原には結合しないことを指標に、立体構造認識抗体を選抜した。さらに、精製抗原を用いた蛍光ゲルろ過により、高親和性抗体を含む培養上清を選択し、ハイブリドーマクローニングへ進めた。クローニング後のハイブリドーマ培養上清についても同様のアッセイを行い、抗体の性質が変化していないことを確認した。

4. 研究成果：

(1) 無細胞タンパク質合成法による VDAC1, VDAC2, VDAC3 の構造解析用高品質サンプル調製：ヒト由来 VDAC1, VDAC2, VDAC3 の試料調製には、膜タンパク質に最適化した無細胞タンパク質合成法を利用した。特に VDAC3 は複数のジスルフィド架橋を必要とし、酸化還元状態に応じてチャンネル活性が変化することから、架橋に関与しないと考えられる複数の Cys のうち 2 つを Ala に置換する変異体を作成し、一方のコンフォーメーションへの固定を試みた。ゲルろ過ピーク形状を指標に最適な変異の組み合わせを検索したが、野生型と比べて安定性が大きく向上した変異体は確認されなかった。しかし、いずれの変異体とも比較的良好な性状を示した。

(2) 無細胞合成 VDAC の結晶化条件の検討：VDAC1, VDAC2, VDAC3 各単体の結晶化条件スクリーニングを行った。VDAC1 は既に構造解析可能な結晶を得ていたため、構造解析をさらに進め、ホモ7量体を形成していることを見出した。また、VDAC1 と相互作用化合物との共結晶化、および、VDAC1 単体結晶への化合物浸漬を行い、得られた結晶の X 線解析を行った。化合物を浸漬した VDAC1 結晶については構造解析まで進めたが、化合物に相当する電子密度は観察されなかった。一方、VDAC2 と VDAC3 については、変異体も含め、結晶が得られなかった。

(3) 無細胞合成 VDAC のクライオ電顕構造解析用サンプル調製：相互作用化合物の結合部位同定には、共結晶構造解析を第一の手法としているが、共結晶化などが困難な場合に備え、最近構造解析の主流となりつつあるクライオ電子顕微鏡構造解析の併用を視野に入れ、クライオ電顕用サンプル調製条件検討を行った。VDAC1 を様々な界面活性剤で可溶化、また、複数種の脂質ディスクへ再構成し、電顕観察を行った。負染色による試料観察では、 β バレルタンパク質に特徴的な概形が観察されるものの、分子サイズが小さく膜外領域がほとんど無いために、単体ではクライオ電顕単粒子解析が困難であった。次項(4)の各種抗体断片と VDAC1, VDAC2, VDAC3 を組み合わせたサンプルを複合体のゲルろ過性状評価にて選別し、電顕観察用試料調製を行った。

(4) VDAC1, VDAC2, VDAC3 に対するモノクローナル抗体の作成：結晶化促進および電子顕微鏡観察を容易にするために有効なモノクローナル抗体を取得するため、研究協力者のどどと協力し、VDAC1, VDAC2, VDAC3 それぞれの一部領域を抗原としてラット免疫を行った。得られたハイブリドーマ培養上清について、リポソーム再構成 VDAC1, VDAC2, VDAC3 および SDS 変性 VDAC1, VDAC2, VDAC3 をそれぞれ用いた ELISA、蛍光標識二次抗体および精製 VDAC1, VDAC2, VDAC3 を用いた蛍光ゲルろ過性状分析の評価結果から、高親和性かつ立体構造認識抗体を含む培養上清を選択し、ハイブリドーマクローニングへ進めた。クローン化抗体についても同様に性状分析を行って良好な性状が失われていないことを確認し、2 種のハイブリドーマクローンを選択した。これらの細胞から抗体可変領域遺伝子をクローニングし、構造解析に適した抗体断片 (Fab, scFv, Fv-clasp 等) の発現系を作成した。IgG、Fab 等の抗体および抗体断片形状で複合体の安定化を試みるために、様々な組み合わせで複合体調製、安定性と性状の評価を行ったが、結晶化スクリーニングに利用できる結合強度の複合体は得られなかった。

抗体を結晶化やクライオ電顕解析用のツールとして用いるためには、立体構造を認識し、抗原を一定のコンフォーメーションに固定することが重要であるため、新たな研究課題として、結晶化品質の VDAC 全長タンパク質を抗原として免疫し抗体を作製する研究を開始した。本抗体を用いた構造解析に期待している。

(参考文献)

[1] Shinoda T, et al. Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane proteins. Sci Rep. 6, 30442 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Hosaka T, Okazaki M, Kimura-Someya T, Ishizuka-Katsura Y, Ito K, Yokoyama S, Dodo K, Sodeoka M, Shirouzu M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1749-1758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3211	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保坂 俊彰, 岡崎 正晃, 染谷 友美, 桂 芳子, 伊東 夏織, 横山 茂之, どど孝介, 袖岡 幹子, 白水 美香子
2. 発表標題 ヒト由来ミトコンドリア外膜タンパク質Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)の結晶構造解析とオリゴマー形成
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
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
研究協力者	保坂 俊彰 (Hosaka Toshiaki)	国立研究開発法人理化学研究所 (82401)	
研究協力者	どど 孝介 (Dodo Kosuke)	国立研究開発法人理化学研究所 (82401)	

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
---------	---------