

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05815

研究課題名（和文）無細胞系を基盤としたチャンネルタンパク質に対する阻害剤の効果評価系の構築

研究課題名（英文）Development of inhibitor evaluation system for channel proteins based on cell-free system

研究代表者

野澤 彰（Nozawa, Akira）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30432800

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）：無細胞系を利用してチャンネルタンパク質を合成し、脂質平面膜法により活性を検出する、完全in vitroのチャンネル解析系の構築に成功した。ヒトのナトリウムチャンネルであるNav1.7とクロライドチャンネルであるGABAARをモデルタンパク質として用い無細胞系による合成法を検討し、Nanion Technology社のOrbit miniを利用して活性の検出に成功した。また、この系を利用して阻害剤の効果を確認することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工的にタンパク質を合成する合成法と、人工脂質平面膜上にタンパク質を再構成し活性を測定する方法を組み合わせることで、膜輸送体タンパク質の一つであるチャンネルタンパク質の基質輸送活性を、完全に人工的な実験系で構築することに成功した。この系は単一のタンパク質の活性を解析できることから、生体内では困難な単一タンパク質の活性評価が可能になる。また、この系で阻害剤の効果も検出できたことから、阻害剤の評価系としても利用可能である。

研究成果の概要（英文）：A complete in vitro channel analysis system has been successfully constructed, in which channel proteins are synthesised in a cell-free system and their activity is detected by a lipid planar bilayer method. Using the human sodium channel Nav1.7 and the chloride channel GABAAR as model proteins, a cell-free synthesis method was investigated and the activity was successfully detected using Nanion Technology's Orbit mini. This system was also successfully used to confirm the effects of inhibitors.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：チャンネル 無細胞タンパク質合成法

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは膜貫通領域を有し、イオン (Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Cl^-) を選択的に透過させる膜タンパク質である。生体内では、イオンの膜透過を通じて、神経細胞における活動電位の発生、筋収縮、神経伝達物質の放出、ホルモン等の分泌など様々な重要な生理現象を担っている。それゆえ、イオンチャネルをコードする遺伝子の変異は、脳神経系の神経伝達、心臓の拍動、骨格筋の収縮などに異常をきたす様々な遺伝性疾患と関係することが知られている。多くの生理機能に関与することから、イオンチャネルを標的とした様々な医薬品が創出されている。2017年度の医薬品での売上高トップであった、神経障害性疼痛に対する鎮痛薬リリカ(電位依存性Caチャネル阻害剤)をはじめ、イオンチャネルを標的とした医薬品には売上高の上位に位置するものが多く、イオンチャネルは重要な創薬分野の標的分子として期待されていた。

創薬分野では、新しい薬効を示すリード化合物を見出すために効率的に多数の検体をスクリーニングする技術開発の重要性が高まっていた。一般にリード化合物の取得には少なくとも数万種類の化合物をスクリーニングする必要があり、それをこなすためには同時に多検体の化合物の効果を高い再現性で微量の反応系により判断可能な系の構築が求められる。酵素や受容体を対象とした場合には、酵素反応やリガンドとの結合などを指標とした上記条件を満たすスクリーニング系の構築が可能であり、活発な創薬活動が行なわれている。一方、イオンチャネルを含む膜輸送体タンパク質は、一般に細胞を利用した輸送活性測定系を利用してきたためにスループットの高い化合物評価系の開発が困難であり、薬剤の開発が遅れている状況であった。

本申請課題では、このような現状を踏まえ、イオンチャネルを標的としたハイスループット化合物スクリーニング系の構築を見据えた基盤技術の開発として、無細胞系を利用したイオンチャネル活性評価系の構築を目指して研究を開始した。

2. 研究の目的

本申請課題では、無細胞系を利用することにより、生細胞を必要としない *in vitro* チャネル活性測定系の構築を目的として研究を行った。

申請者は、これまでにコムギ無細胞系を用いて機能的な膜輸送体タンパク質をリポソーム上に合成する技術の開発を行ってきた(図1)。この方法で調製したシロイヌナズナ葉緑体内膜に局在する糖リン酸輸送体 AtPPT1 は、植物体から精製したものや酵母培養細胞から調製したタンパク質と同等以上の比活性を示すことが確認されている。膜輸送体タンパク質の機能解析は、大腸菌や酵母などの生細胞に発現させ、輸送基質の取り込みや排出を測定する系や、アフリカツメガエルの卵細胞に発現させ輸送基質の輸送を電流値として測定する方法が一般に利用されている。

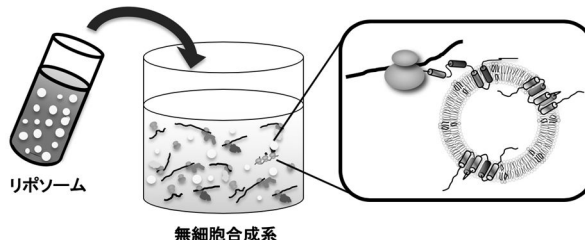


図1. リポソーム添加型コムギ無細胞系による膜タンパク質の合成
無細胞系にリポソームを添加することで、リポソーム膜上に膜タンパク質を合成することが可能になった。

しかし、これらの系では使用する細胞が有する輸送体の活性が存在することから、特定の輸送体の遺伝子を欠失させた変異体を利用したり、適切なバックグラウンド活性を差し引くなど、実験系の構築を慎重に進める必要がある。また、輸送体によってはこれらの系でうまく発現しないものや、細胞内小器官の膜上に局在する輸送体は原形質膜上に発現させることが難しく解析が困難な場合があり、汎用性が高い解析系とは言い難い。また、生細胞で発現させた膜タンパク質を膜画分から界面活性剤を利用して可溶化しプロテオリポソームに再構成する手法も用いられるが、この場合使用する界面活性剤の種類と濃度を検討する必要があり、適切な条件が設定できるとは限らない。これに対し、無細胞系を基盤としたタンパク質調製系は、偏ったコドン使用頻度を持った遺伝子からでも高効率でタンパク質を合成可能であるコムギ胚芽由来の無細胞合成系を利用することでほとんどの場合において機能解析に必要な量の輸送体タンパク質を合成可能である、細胞内小器官の膜タンパク質も容易にプロテオリポソームとして調製可能であるなど、生細胞を利用した系では調製が難しいタンパク質にも対応可能な汎用性の高い調製系であると言える。申請者らはこの無細胞合成系を基盤として膜輸送体タンパク質の解析系を構築しこれまでに多くのトランスポーターの機能解析を行ってきた。膜輸送体の解析系の構築にコムギ無細胞系で調製したタンパク質を利用する点に関しては、合成反応液の調製時に膜画分を除いたコムギ胚芽抽出液を利用しているので合成反応液には合成された膜タンパク質以外の膜タンパク質の混入が生じない、プロテオリポソームへの再構成時に界面活性剤を使用しないので界面活性剤の選択や濃度を検討する必要がない、といった利点があった。

本申請では、この申請者が独自に開発してきたコムギ無細胞合成系を基盤とした膜タンパク質調製法と、電気生理学的手法を融合させることで、汎用性の高い *in vitro* チャネル解析システムの構築を目指した。再現性の高い微量活性検出システムの構築は、将来的にイオンチャネル

を標的とした薬剤スクリーニング系の開発に繋がるものと期待された。

3. 研究の方法

本申請では、コムギ無細胞合成系によりイオンチャンネルを調製し、Nanion technologies 社の Orbit mini (図2) を利用することで、微量反応系で再現性の高い in vitro イオンチャンネル活性測定系の構築を試みた。

イオンチャンネルの活性測定法の開発に関しては、これまでに Nanion Technologies 社の Orbit mini で解析例が報告されているイオンチャンネルの中からヒトのナトリウムチャンネル Nav とクロライドチャンネル GABA_AR をモデルタンパク質として用いた。コムギ無細胞系でこれらのチャンネルを調製し、まずは既報の方法を参考に輸送活性の検出を目指した。

チャンネル活性の検出系構築後、チャンネルに対する阻害剤の評価系の構築を行った。

Nav と GABA_AR に対して、それぞれ阻害剤であるテトロドトキシンとピクロトキシンの阻害効果の検出を試みた。

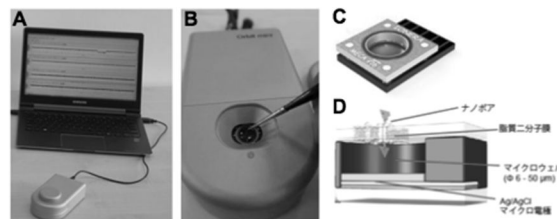


図2. Orbit miniを利用したチャンネル活性の測定

A. チャンネル活性の測定は脂質平面膜法により輸送活性を検出するNanion technologies 社の Orbit mini を利用する。B. 測定チャンパー内の微小細孔にPainting法により脂質二分子膜を形成する。C. 測定チャンパー。D. 測定チャンパー内の微小細孔部の拡大図。細孔に形成された脂質二分子膜にチャンネルタンパク質が配置され、脂質平面膜法によりチャンネル活性が測定される。

4. 研究成果

(1) チャンネル合成法の検討

200 kDa を超える大きなタンパク質である Nav1.7 は無細胞系での合成効率が高かったため、合成法の検討を行った。従来の重層法に加え透析重層法およびそれらの合成法において合成途中に mRNA を添加する方法を試してみた。その結果、Nav1.7 の合成量は、重層法 < 透析重層法 = 透析重層法+mRNA < 重層法+mRNA の順になった。

また、GABA_AR はヘテロ5量体のタンパク質構成でチャンネルを形成することから、複数種類の mRNA を混合してタンパク質の合成を試みた。しかし、単独の mRNA を使用して合成した場合には合成できるタンパク質が複数の mRNA を混合して合成した場合にはほとんど合成されなくなるという問題が生じた。これに関しては、混合する mRNA ごとに合成液を調製し、30分程度合成反応を進めたのちにそれらを混合するとそれぞれのタンパク質が合成されることが確認された。

(2) Orbit mini を利用したチャンネル活性の検出

まず Orbit mini の測定用チップにおいて電極孔のサイズの検討を行った。50, 100, 150 μm の3種のサイズの電極孔で平面膜の形成とその安定性について検討した。その結果、150 μm のものでは、平面膜を形成するのが少し難しいことと、膜の安定性も低いことがわかった。50 と 100 μm のものでは特に違いは感じられなかった。電極孔が大きいほど平面膜とプロテオリポソームの膜融合率が高くなると考えられることから以降の実験では 100 μm の電極孔の測定チップを利用することとした。

次に Nav1.7 を利用してチャンネル活性の検出を試みた。無細胞系にリポソームを添加し Nav1.7 を合成した。合成後、プロテオリポソームを沈殿として回収し Orbit mini にてチャンネル活性を測定した。その結果、Na⁺ イオンの輸送を示す電流値の波形が検出された。しかし、多くの場合波形は多段階の波形になっており、複数のチャンネルが膜上に存在していることが考えられた。そこで合成時に合成液に添加するリポソーム濃度の検討を行った。その結果、open 状態と close 状態と考えられる2段階の電流値のみが検出されるリポソーム濃度を決定することができた。この状態で、電圧を段階的に変化させ輸送活性によって生じる電流値を計測した。測定した電圧と電流値から I-V プロットを作成しコンダクタンス G(pS) を求めた。その結果無細胞系で合成した Nav1.7 のコンダクタンスは 17.4pS であり報告されている文献値と大きな差がないことが確認された。また、この電流値は Nav1.7 の阻害剤であるテトロドトキシンの添加により抑制されることが確認されたことから、検出されている電流値は Nav1.7 の輸送活性に由来すると考えられる。

GABA_AR に関しては 4, 3, の3種のサブユニットからなる5量体をリポソーム添加型無細胞タンパク質合成系で調製し、Nav1.7 と同様に遠心操作によりプロテオリポソームを回収し、Orbit mini にてチャンネル活性の検出を試みた。その結果、GABA を測定用チップに添加した時にクロライドの輸送を示す電流値が検出された。また、この電流値は GABA_AR の阻害剤であるピクロトキシンの添加により抑制されることが確認されたことから、検出されている電流値は GABA_AR の輸送活性に由来すると考えられる。

以上の結果より、本申請研究により無細胞系で合成したチャンネルを利用して Orbit mini により輸送活性を検出する系を確立できたと考える。また、この系を用いた実験結果から、この系では阻害剤の阻害効果も評価できると考えられる。しかし、この系では、これらのチャンネル活性を検出できることもあれば、できないこともあり、決まった時間内に毎回同じように活性を検出することは難しいことも明らかになった。本研究では、薬剤スクリーニングを視野に入れた阻害剤

の評価系を構築することを目的に掲げ実験を行った。この系では、単一の薬剤の評価を行うことは可能かもしれないが、数千数万の薬剤を対象とした薬剤スクリーニングを行うことは現段階では難しいと感じている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Ali MRM, Uemura T, Ramadan A, Adachi K, Nemoto K, Nozawa A, Hoshino R, Abe H, Sawasaki T, Arimura GI.	4. 巻 179
2. 論文標題 The Ring-Type E3 Ubiquitin Ligase JUL1 Targets the VQ-Motif Protein JAV1 to Coordinate Jasmonate Signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 1273-1284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.18.00715.	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 Santos HJ, Imai K, Makiuchi T, Tomii K, Horton P, Nozawa A, Okada K, Tozawa Y, Nozaki T.	4. 巻 286
2. 論文標題 Novel lineage-specific transmembrane α -barrel proteins in the endoplasmic reticulum of <i>Entamoeba histolytica</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 3416-3432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14870.	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 Miyamoto T, Uemura T, Nemoto K, Daito M, Nozawa A, Sawasaki T, Arimura GI.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tyrosine Kinase-Dependent Defense Responses Against Herbivory in Arabidopsis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.00776.	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 Moog D, Nozawa A, Tozawa Y, Kamikawa R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Substrate specificity of plastid phosphate transporters in a non-photosynthetic diatom and its implication in evolution of red alga-derived complex plastids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58082-8.	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 Miyoshi S, Tokunaga S, Ozawa T, Takeda H, Aono M, Miyoshi T, Kishi H, Muraguchi A, Shimizu SI, Nozawa A, Sawasaki T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Production of a rabbit monoclonal antibody for highly sensitive detection of citrus mosaic virus and related viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0229196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229196.	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 Uemura T, Hachisu M, Desaki Y, Ito A, Hoshino R, Sano Y, Nozawa A, Mujiono K, Galis I, Yoshida A, Nemoto K, Miura S, Nishiyama M, Nishiyama C, Horito S, Sawasaki T, Arimura GI.	4. 巻 3
2. 論文標題 Soy and Arabidopsis receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from Spodoptera species and mediate herbivore resistance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0959-4.	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 -

1. 著者名 Kido K, Yamanaka S, Nakano S, Motani K, Shinohara S, Nozawa A, Kosako H, Ito S, Sawasaki T.	4. 巻 9
2. 論文標題 AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Elife.	6. 最初と最後の頁 e54983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54983.	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 Nozawa A, Ito D, Ibrahim M, Santos HJ, Tsuboi T, Tozawa Y.	4. 巻 79
2. 論文標題 Characterization of mitochondrial carrier proteins of malaria parasite Plasmodium falciparum based on in vitro translation and reconstitution.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 102160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102160.	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 Kurokawa K, Kobayashi J, Nemoto K, Nozawa A, Sawasaki T, Nakatsuka T, Yamagishi M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of LhFT1, the Flowering Inducer of Asiatic Hybrid Lily, in the Bulb Scales.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 570915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.570915.	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 Inagaki H, Miyamoto K, Ando N, Murakami K, Sugisawa K, Morita S, Yumoto E, Teruya M, Uchida K, Kato N, Kaji T, Takaoka Y, Hojo Y, Shinya T, Galis I, Nozawa A, Sawasaki T, Nojiri H, Ueda M, Okada K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Deciphering OPDA Signaling Components in the Momilactone-Producing Moss Calohypnum plumiforme.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 688565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.688565	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山田 航大、谷崎 圭隆、竹田 浩之、野澤 彰、澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞技術を基盤としたイオンチャネル解析技術の開発
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 野澤 彰、谷崎 圭隆、山田 航大、横山 紗里、田中 響久、竹田 浩之、澤崎 達也
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系を用いたチャネルタンパク質解析系の構築
3. 学会等名 第14回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野澤 彰、山田 航大、竹田 浩之、澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞系を基盤としたイオンチャネル解析技術の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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