

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05750

研究課題名（和文）高効率な復帰変異株獲得に基づく膜蛋白質とリガンドの相互作用解明法の有用性の検証

研究課題名（英文）Validation of the usefulness of the method for elucidating the interaction between membrane proteins and ligands based on the acquisition of highly efficient revertant strains

研究代表者

篠原 康雄（SHINOHARA, Yasuo）

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：60226157

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）：研究代表者は本研究で、自ら確立した高効率な復帰変異株獲得法を、膜タンパク質とリガンドの相互作用を解析するための新たな方法論として発展させることを計画、まずミトコンドリアのADP/ATP輸送体とその特異的阻害剤であるボンクレキン酸との相互作用の解析に着手した。その結果、ボンクレキン酸に対する抵抗性を示すADP/ATP輸送体の5つの変異株を獲得することができた。そこで更にその効率化を目指した研究に着手し、cDNAを細分化して、それぞれの領域に高効率に変異を導入することで、様々な単一の変異を有するタンパク質の創生が可能であることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質とリガンドの相互作用様式の解明は薬学や生物化学の研究における大きな課題であり、その効率的な方法論の確立が急務である。研究代表者らは自ら確立した高効率な復帰変異株獲得法を利用することで、リガンドと相互作用しているタンパク質のアミノ酸残基を特定することが可能であることを見出し、本研究ではその有用性の検証と、更なる効率化を目指した実験を遂行した。得られた知見は基礎生物学研究や創薬研究の発展に大きく貢献するもので、その学術的、社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to develop a new methodology for analyzing the interaction between membrane proteins and ligands, by using a highly efficient revertant acquisition method that we established by ourselves. As a result, we succeeded in getting five mutants of ADP/ATP transporter showing resistance to bongkreik acid. We tried to further improve the efficiency of this process. As a result, it was possible to create proteins with various single mutations, by subdividing cDNA and introducing mutations into each region with high efficiency.

研究分野：生物化学

キーワード：復帰変異株獲得法 タンパク質リガンド相互作用 ミトコンドリアの輸送体 ADP/ATP輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある特定のタンパク質がその阻害剤とどのように相互作用しているのかを解き明かすことは薬物とタンパク質の相互作用を理解することの第一歩とも言える重要な課題である。一般的な手法としては photoaffinity labelling の手法を用いた阻害剤と標的タンパク質の架橋実験に基づいた方法や両者の複合体の結晶構造解析の手法があるが、前者は化学反応性を高めた阻害剤アナログの調製を必要とするし、後者は標的タンパク質の結晶化という高度な実験手法を必要とする。一方で、より簡便な手法として、阻害剤存在下で活性を示す「復帰変異株」を獲得するという方法があるが、従来用いられてきた変異誘発剤を添加する方法では、ゲノムに非選択的な変異が入るために、オフターゲット効果によるアーティファクトを回避しないといけないという課題を抱えていた。一方で、標的タンパク質にのみ変異を入れる方法としては、その cDNA にランダム変異を入れる error prone PCR が有用であるが、ベクターとのライゲーションと宿主への導入効率の低さが課題であり、復帰変異株獲得の手法としては適用困難であった。研究代表者らは error prone PCR 法と酵母の高効率な形質転換法である gap repair cloning の手法を併用することで、高効率に復帰変異株を獲得することが可能であることを見出した(山越ら、Mitochondrion 32(2017)1)。

2. 研究の目的

本研究では、標的とする分子をコードする cDNA だけに選択的に変異を入れる error prone PCR 法と酵母の高効率な形質転換法である gap repair cloning を併用することで、高効率な復帰変異株の獲得法を確立し、標的タンパク質の阻害剤との相互作用様式の解明法として実用化することを目的とした。

3. 研究の方法

研究対象としては、ボンクレキン酸とカルボキシアトラクチロシドという極めて親和性の高い阻害剤(いずれも作用濃度は μM 以下)が知られているミトコンドリアの ADP/ATP 輸送体を取りあげ、そのボンクレキン酸との相互作用の様式を解き明かすことに取り組むこととした。ボンクレキン酸を、中性の液性条件下でミトコンドリアに添加しても ADP/ATP 輸送体に対する阻害作用を示さないが、弱酸性条件下で添加すると阻害作用を示す(BBA 223(1970)460)。これはボンクレキン酸の作用部位が ADP/ATP 輸送体のマトリックス側に存在し、中性 pH ではボンクレキン酸が膜を透過できず、作用部位に到達できないが、pH5~6 の弱酸性条件下では、ボンクレキン酸の3つのカルボン酸が protonate され、疎水性が高まるために膜を移行できるようになり、膜の内側の作用部位に到達できるようになるためであることが知られている(Pharm. Ther. 7(1979)329)。

また、酵母はグルコースを炭素源として培養すると、解糖系と酸化的リン酸化の両方のプロセスで ATP を合成することで生育するが、グリセロールを単一炭素源として培養すると、酸化的リン酸化反応のみで ATP の合成を行う。このため、pH をやや低めに調製したグリセロール培地にボンクレキン酸を塗布した培地では、ATP の合成は酸化的リン酸化でのみ行われるが、ボンクレキン酸が ADP/ATP 輸送体を阻害するために酵母は生育できない。

この条件下で、ADP/ATP 輸送体の遺伝子にランダム変異を導入した DNA 断片の mixture を調製し、酵母に導入してやると、ボンクレキン酸に耐性を示すようになった ADP/ATP 輸送体の cDNA を獲得した酵母のみが生育可能になり、当該酵母が保持している ADP/ATP 輸送体の cDNA の塩基配列を解析すれば、ボンクレキン酸に耐性をもたらすアミノ酸置換を明らかにすることができることになる。実際に先行研究によってボンクレキン酸耐性をもたらす4つのアミノ酸置換が見出され(J. Bioenerg. Biomemb. 35(2003)243)、本法の有用性が確認されていた。本研究ではこの問題について、研究代表者らが開発したより効率的なスクリーニングの手法を適用することで、ミトコンドリアの ADP/ATP 輸送体において、ボンクレキン酸と相互作用しているアミノ酸残基の特定を試みることにした。

4. 研究成果

これまでの予備的な研究で、ADP/ATP 輸送体にボンクレキン酸耐性をもたらすいくつかの点変異を見出すことができていた。ほぼ同時期に Kunji 教授らによって発表された、ボンクレキン酸と複合体を形成した ADP/ATP 輸送体の結晶構造中で、研究代表者らが見出していた、ボンクレキン酸耐性をもたらす置換が起きていたアミノ酸残基が、実際にボンクレキン酸と相互作用していることが検証され、この方法論の妥当性が証明された。一方で、結晶中ではボンクレキン酸と相互作用しているにもかかわらず、変異体が獲得できていなかったアミノ酸残基も存在し、実験手法のより一層の改善の必要性が認識された。

そこで、PCR を行う際のヌクレオチドや Mg^{2+} と Mn^{2+} の濃度を検討することで、変異の頻度を高め、PCR によるライブラリーのスクリーニングのより一層の深化を図った。その結果、PCR 産物に変異を誘発する頻度を高めることが可能になったが、増幅された cDNA に複数のアミノ酸置換が入っているケースが認められた。この問題を回避する目的で、完全長の cDNA にランダム変異を入

れるのではなく、cDNA の限られた領域だけに高効率にランダム変異を入れるという実験をくりかえすことで、個々のアミノ酸の置換に伴うポンクレキシン耐性の変化を高深度で網羅的にサーチすることが可能であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshinobu Fujiwara, Takeshi Ito, Atsumi Toiyama, Takenori Yamamoto, Naoshi Yamazaki, Mitsuru Shindo, Yasuo Shinohara	4. 巻 4
2. 論文標題 Suramin inhibits mitochondrial ADP/ATP carrier, not only from the cytosolic side but also from the matrix side, of the mitochondrial inner membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 92-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.3_92	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 -
1. 著者名 森山芳則、篠原康雄	4. 巻 141
2. 論文標題 創薬のためのトランスポーター研究戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 489-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00204-F	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 -
1. 著者名 山本武範、山田安希子、篠原康雄、渡辺 朗	4. 巻 61
2. 論文標題 ミトコンドリアのカルシウムイオンチャネル(カルシウムユニポーター)のCa ²⁺ 取り込み制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 157-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.157	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 -
1. 著者名 Akira Watanabe, Kousuke Maeda, Atsushi Nara, Mei Hashida, Mizune Ozono, Ayaka Nakao, Akiko Yamada, Yasuo Shinohara, Takenori Yamamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantitative analysis of mitochondrial calcium uniporter (MCU) and essential MCU regulator (EMRE) in mitochondria from mouse tissues and HeLa cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 811~826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13371	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 -

1. 著者名 新藤 充、岩田隆幸、狩野有宏、篠原康雄	4. 巻 80
2. 論文標題 Synthesis and conversion of bongkrelic acid and its bioactivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1136 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.80.1136	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 -

1. 著者名 Kazuto Takegawa, Takeshi Ito, Atsushi Yamamoto, Naoshi Yamazaki, Mitsuru Shindo, Yasuo Shinohara	4. 巻 101
2. 論文標題 KH 17, a simplified derivative of bongkrelic acid, weakly inhibits the mitochondrial ADP/ATP carrier from both sides of the inner mitochondrial membrane	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Biology Drug Design	6. 最初と最後の頁 865 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cbdd.14194	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 篠原康雄
2. 発表標題 酵母の発現系を用いたミトコンドリアタンパク質の研究
3. 学会等名 高齢化と生体恒常性研究会 (産総研四国センター主催) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 剛、藤原克展、問山温未、山本武範、山崎尚志、新藤 充、篠原康雄
2. 発表標題 スラミンはミトコンドリアADP/ATP輸送体を膜の両側から阻害する
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
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
---------	---------