

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17245

研究課題名（和文）先天性腎尿崩症の治療法探索のためのアデニル酸シクラーゼとGs の構造解析

研究課題名（英文）The structure of human ADCY9 and Gs alpha subunit to explore therapeutic agents for congenital nephrogenic diabetes insipidus

研究代表者

野村 莉紗 (Nomura, Risa)

東京医科歯科大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：70868124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は先天性腎性尿崩症（NDI）の治療薬探索のため、腎集合管主細胞においてバソプレシン受容体（V2R）と共役して働くアデニル酸シクラーゼ（ADCY）の構造解析を試みた。ヒトADCY 3,6,9がV2Rと共役するが過去の研究から特にADCY6と9について発現精製とクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）の解析を行った。結果、ADCY6はヒト以外にも9種類の哺乳類のADCY6や200種の脊椎動物のconsensus配列などを作成したが発現状態が安定せず解析は困難であった。ヒトADCY9に関しては発現精製ができたため現在論文の準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADCYは10種類あり、広く生体内に発現し、Gタンパク質共役受容体と共役し調整をしている。bovinaのADCY9,8,5の構造が報告されているが、ADCYの発現精製自体が困難であることも多く、それゆえ既報も分解能が3.5前後と側鎖の評価などが十分ではない。ADCYは12本の膜貫通ドメイン(TM)と酵素活性部位(C1,C2)、TMとC1,C2を繋ぐドメイン(HD)があるが、Gタンパク質やATPの結合時のTMやHDの機能や酵素活性時における構造変化などが十分にはわかっていない。本研究はヒトADCY9においてより分解能のよい構造解析をすることで上記を明らかにする足がけとなる研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to analyze the structure of adenylyl cyclase (ADCY), which acts in conjunction with vasopressin receptor (V2R) in renal collecting duct principal cells, in order to search for a therapeutic agent for congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI). Human ADCY 3, 6, and 9 are conjugated with V2R, and based on past research, we specifically purified the expression of ADCY 6 and 9 and analyzed them using cryo-electron microscopy (cryo-EM). As a result, we created consensus sequences for ADCY6 in nine types of mammals other than humans and in 200 types of vertebrates, but the expression status was unstable and analysis was difficult. We have successfully expressed and purified human ADCY 9 and are currently preparing to publish it in a paper.

研究分野：細胞構造生理学

キーワード：アデニル酸シクラーゼ ADCY 9 クライオ電子顕微鏡 cryo-EM 先天性腎性尿崩症 NDI

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性腎性尿崩症 (NDI) は、腎臓における尿の濃縮が行われないことで1日に 10L 以上も尿が産生され、睡眠時なども関係なく 1-2 時間に 1 回排尿が必要になるなど QOL が著しく下がる、難治性疾患である。また新生児は能動的に水分摂取する事が難しいため容易に高調性脱水に陥り不可逆的な中枢神経障害となることも散見されている。治療方法は一部の利尿薬などを使って血中のナトリウムの上昇を抑えたり、ナトリウム制限、一部のプロスタグランジン合成阻害薬を使用したりするが十分な治療法とはいえず、多尿に伴い水腎症、水尿管、巨大膀胱など尿路系の拡張が起こり、腎不全などに至る例もある。

NDI の原因の約 8 割はバソプレシン受容体(V2R)の変異であり、残り 2 割がその下流の変異と言われている。尿の濃縮は、下垂体後葉からバソプレシンが分泌され、腎集合管の V2R に結合したのち V2R と共役した Gs がアデニル酸シクラーゼ(AC)と結合し、細胞内の cAMP の濃度が上昇、PKA を活性化し、AQP2 をリン酸化し集合管内から水を取り込んでいる。2018 年に安藤らが AKAPs-PKA 結合阻害薬が FMP-API-1/27 が PKA/AQP2 を直接活性化し尿崩症モデルマウスの治療に成功したことを報告した (Ando F., 2018)。我々は同シグナルパスウェイ上の AC の構造解析することで新たな治療を探索することを試みた。

AC は 10 種類あり、生体内で広く発現し G タンパク質共役受容体(GPCR)のシグナル下流にありその機能を調節する働きをもつ。AC1-9 は 12 回膜貫通部分を有する膜タンパク質で(図 1)、N 末端は細胞質にあり、6 回膜貫通の TM1-6 と、その後細胞質内に C1a,b 部分を有し、6 回膜貫通の TM7-12 ののち細胞質内に C2a,b を有する。C1a,C2a 部分は catalytic site で高度に保存されている [Dessauer CW, 2017]。腎集合管主細胞には AC3, AC6, AC9 が発現する事が知られていて (Hoffert JD, 2005)、特に AC6 が V2R と共役し大きな役割を果たしていると思われたため AC6 を中心にこれら 3 つのタンパク質の発現精製と解析することを目標とした。2019 年に bovine の AC9 の構造解析の論文が報告されており (Qi C., 2019)、その発現精製の方法に則って解析を進めることとした。

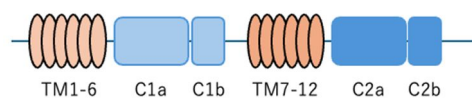


図 1 AC の構造の模式図

2. 研究の目的

本研究は NDI に対しての治療薬探索のため、腎集合管主細胞においてバソプレシン受容体(V2R)と競合するアデニル酸シクラーゼ(AC)を構造解析することを目的に行われた。

3. 研究の方法

(1) plasmid の設計

Human と bovine の AC6, AC9(それぞれ hAC6/bAC6(UniProt 043306/E1B9K3), hAC9/bAC9(UniProt Q08828/E1BM79)) と humanAC3(hAC3)(UniProt 060266)の合成遺伝子を作成しバキュロウイルス作成のため pFastBac/pFastBacMam vector に組み込んだ。(図 2)

AC6 に関してはそれ以外にも下記(i)-(vi)のコンストラクトを作成した。

(i) EGFP のないコンストラクトを作成した

(ii) PSIPRED というサイトを用いて human と bovine において配列からの予測構造をもとに N 末、C 末ともに短くした構造(hAC6 R113-S1168, bAC6 K77-S1168)と、コントロールとして bAC9 も K78-A1354 を作成した。

(iii) C 末あったタグを N 末に移動した。

(iv) 図 4 で後述するが hAC6 は発現精製の過程で N 末 60kDa くらいの長さで切れて分解していくことがわかったため hAC9 の TM1-6 までと、hAC6 の C1a 以降を合わせたキメラ遺伝子を作成した。

(v) 8 種類の脊椎動物の AC6 遺伝子を合成し発現を試みた。(Bison bison bison, Canis lupus familiaris, Danio rerio, Gorilla gorilla gorilla, Mus musculus, Peromyscus maniculatus bairdii, Roussettus aegyptiacus, Sapajus apella)(図 2 の(v) Animals)

上記 8 種類を選んだ基準は BLAST にて、human と相同性が非常に高いものと、上記の通り N 末 1/4 あたりで human と相同性が低い場所があるところがある生物を選んで作成した。

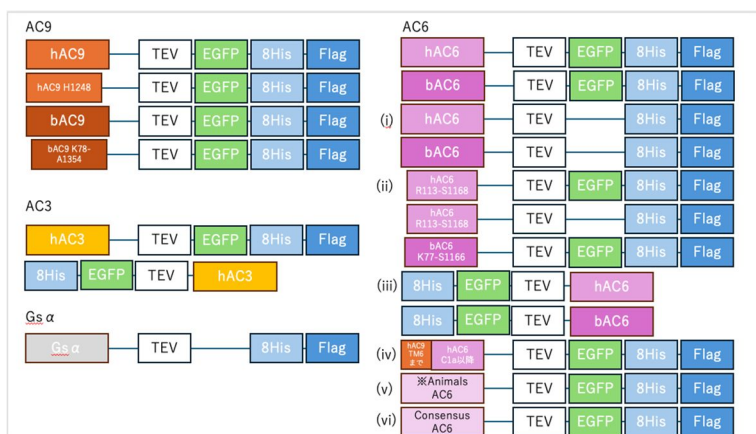


図 2: 作成したコンストラクト

(vi)脊椎動物 200 種類の ortholog の AC6 の fasta 配列をもとに、python のスクリプトで consensus sequence 候補を作成し threshold value が 1.0,のものを選択し AlphaFold2 を用いて予測構造を作成、PyMoL を用いて humanAC6 の予測構造と比較し酵素活性に関連する可能性のある部位は hAC6 の配列のままにし、遺伝子を合成した。

## (2)AC, Gs の発現、精製

### (i)AC の発現精製

上記コンストラクトの AC3, AC6, AC9 の合成遺伝子を作成し pFastBac1/pFastBacMam1 vector に組み込み昆虫細胞 (Sf9+細胞) を用いて Sf900-II (Thermo FisherScience) を用いてで培養しバキュロウイルスを作成した。その後 Sf9+細胞または Expi293F 細胞を用いて Sf900-II または FreeStyle 293 expression medium (Thermo FisherScience) 培地下で 27 または 30 で 2 日間振盪させながら発現した。Expi293F 細胞に関しては 5mM の Sodium Butyrate を加えた。

上記 vector にまずは C 末端側に GFP 蛋白質と His タグを入れておいた。精製方法は 2019 年の bAC9 の精製方法に則り (Qi C., 2019) 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を入れた buffer を用いて懸濁し Downce Homogenizer で 10 回ホモジナイズした。BechmanCoulter Ti45 で 34000rpm 40 分で超遠心をして膜を取り出したのち 1% DDM + 0.2% CHS, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl の buffer で膜を可溶化し 4 で 1hr rotation したのち同様に 34000rpm 40 分超遠心して可溶化上清を回収した。その後 GFP -GST レジンと結合、50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl 0.1% digitonin を加えた buffer で wash し回収、TEV で切断し elution した。その後 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.07% digitonin の SEC buffer で Superose6inc. 10/300 (cytiva) のカラムでゲル濾過を行い濃縮して回収した。

### (ii) Gs の発現精製

また V2R と共役するのは Gs なので、既報の通り Sf9+細胞を用いて上記同様にバキュロウイルスを作成し Gs を発現精製して複合体を作成した (Qi C., 2019)。

## (3)クライオ電子顕微鏡による撮像、解析

上記複合体を作成したのち、negative stain で粒子の状態を確認してから Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) を用いて blotting time 2s, Blotting force 10, 湿度 100%, 温度 4 で作成した。cryo-EM は JEM-Z320FHC electron microscope (JEOL) を使用し、K2 カメラ (2024/3 月からは K3 カメラ) を使用し 300kV、Calibrated pixel size 0.79, spherical aberration 3.4mm, Amplitude contrast 0.1 で撮像し、relion4.0 または cryoSPARC を用いて解析した。

## (4)Fluorescence-detection size-exclusion chromatography (FSEC)

12well plate に Expi 293F cell を  $2 \times 10^6$ /ml を 1ml まき FuGENE HE Transfection Reagent (Promega) を用いて transfection し 30 2 日間培養し一過性発現を行なった。細胞を回収し 50mM Tris-HCl 10mM EDTA, 2% DDM の solubilization buffer で懸濁し Superose6inc. 5/150 または 10/300 (cytiva) のカラムで蛍光ゲル濾過を行なった。

## (5)Immunoblotting

精製過程の flowthrow, wash, elution, elution 後の resin, 最終的に収集したタンパク質 (final) をそれぞれ 4xSB buffer (0.2M DTT) を加えてアクリルアミドゲル 5-20% で SDS-PAGE、ニトロセルロース膜に blotting した。Blocking one (nakarai) で Blocking 後、1次抗体 (6x-HisTag Antibody, host mouse, ThermoFisherScientific), 2次抗体 (anti mouse IgG H+L AP conjugate, PROMEGA) で反応させ、NBT+BCIP (PROMEGA) で発色させた。

## (6)negative stain

Grid (VECO Grid Cu 400 mesh) に 0.01mg/ml に希釈した試料を 3μl apply して 1.5% uranyl acetate (UA) で染色し透過電子顕微鏡 (JEM-1010) を用いて撮像した。

#### 4. 研究成果

##### (1) AC6, AC3 の発現精製

腎集合管主細胞における V2R の下流のシグナルとして、AC6 の関与が最も多く報告されているため、Human AC6 (hAC6) の発現に関して重点的に行った。まずは C 末側に EGFP と His タグを入れたコンストラクトを

pFastBac/pFastBacMam の両方で作成し昆虫、哺乳類の両細胞で発現させたが FSEC で確認したところ AC9 に比べて発現量が少なく wide peak で発現状態が良くないことが示唆された(図 3)。小スケールで発現させて精製してみると分子量が EGFP ありで 161kDa, elution 以降は TEV で切断しているのが 130kDa となるが、flowthrow の時点で 96kDa 付近にバンドがありまた polyband であることなどから分解されていることが示唆された(図 4)、小スケールで発現させてから detergent についても digitonin 以外にも GDN, LMNG などでも精製を試みたが発現状態は悪く収量も得られなかった。

その後タグの位置を N 末側にしたものや EGFP を抜いたもの、8 種類ほどのヒト以外の哺乳類の AC6 の遺伝子を合成したもの、hAC9 と hAC6 のキメラ、200 種類ほどの脊椎動物の AC6 の consensus 配列、などを作成して同様に発現精製を試みたが発現量が少なく、また大量発現を行っても精製中に分解していき発現状態が悪いことが示唆された(図 5)。

Human AC3 は AC6 以上に発現状態が悪く収量を望めなかった(図 3)。

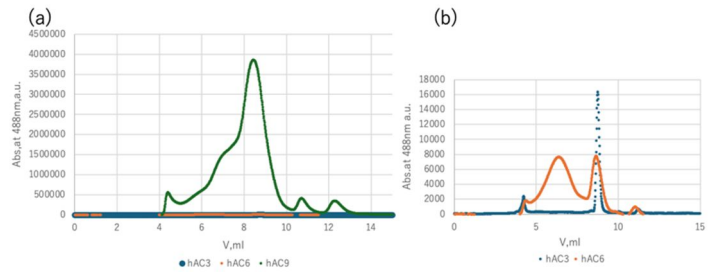


図 3:hAC3,hAC6,hAC9 の発現の比較

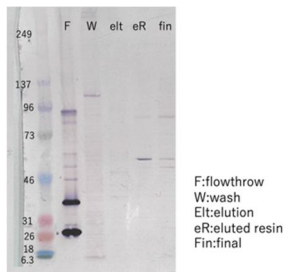


図 4:hAC6 の精製過程 (immunoblotting)

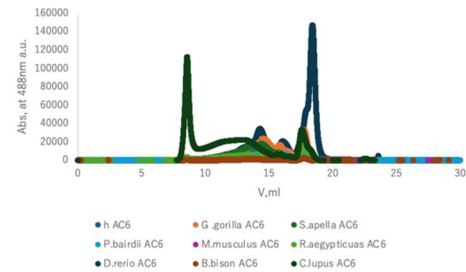


図 5:8 種類の哺乳類の AC6 の発現

##### (2) AC9 の発現精製

Human AC9 に関しては C 末端に EGFP, His タグを入れたコンストラクトで発現精製を行う事ができた。Digitonin 以外に GDN, LMNG でも発現を試みたが digitonin が一番精製において粒子が均一で状態が良く収量が得られた(図 6)。昆虫細胞で発現した Gs を別途精製し、0.5mMGTP S と 0.5mM AMP -PNP を加えた状態で複合体を作成し grid を作成、cryo-EM で撮像して解析を行った。

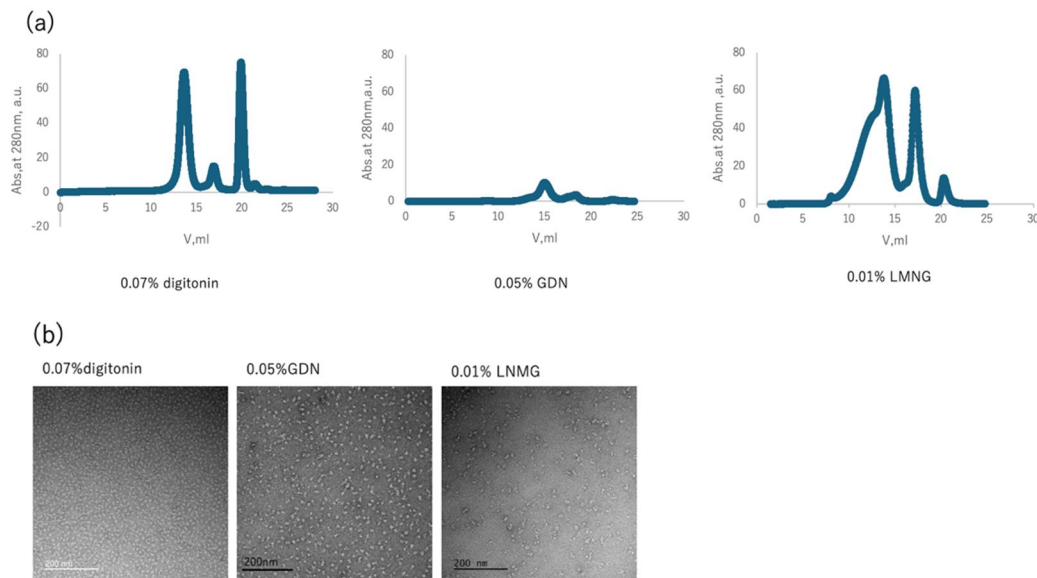


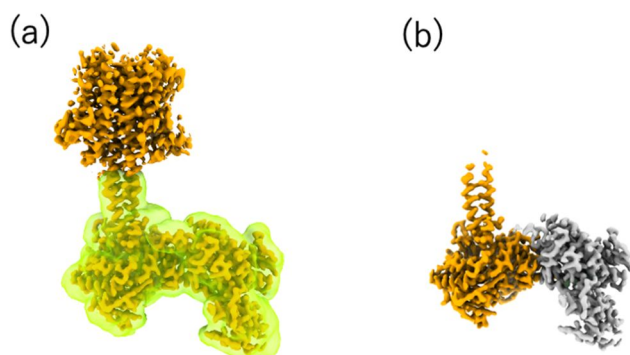
図 6:digitonin,GDN, LMNG 添加下の hAC9 の精製

(a) ゲル濾過チャート。14ml 付近が複合体のピーク。

(b) Negative stain

### (3)hAC9 の構造解析

上記の通り hAC9 と Gs の複合体の grid を作成し、12,411 枚を撮像し  $3.37 \times 10^6$  particles を抽出した。その後 2D classification で  $0.91 \times 10^6$  Particles を抽出、3D classification で3つのクラスに分け 170,990 particles を抽出した。細胞内ドメインのマスクを作成し map を構築し図7の通り 2.6 Å の分解能で構造を解析することができた(既報は 3.4 Å) [Qi C., 2019]. 本研究の構造解析により、より分解能の高い酵素活性ドメインの構造が解析されたため Gs と



との結合の様子がより詳細に解明できると考えられる。現在単体の構造解析なども行いつつ論文文化を進めている。

図 7 hAC9 の構造

(a) hAC9 と Gs 複合体の map. 緑色は細胞内ドメインのマスク

(b) (a)のマスキング部位の map. オレンジ色 : hAC9, グレー : Gs

### <引用文献>

#### 引用文献

- Ando F.S., Yui N., Morimoto T., Nomura N., Sohara E., Rau T., Sasaki S., Kondo Y., Kagechika H., Uchida S. Mori. (2018). AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *nature communications*.
- Dessauer CWVJ, Ostrom RS, Conti M, Dove S, Seifert R. Watts. (2017). International union of basic and clinical pharmacology. CI. structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases. *. Pharmacol Rev*2017;69:96-139.
- Hoffert JDCL, Fenton RA, Knepper MACHou. (2005). Calmodulin is required for vasopressin-stimulated increase in cyclic AMP production in inner medullary collecting duct. *J Biol Chem*.
- Qi C.S., Medalia O., Korkhov VM.Sorrentino. (2019). The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein. *Science*.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 抗ウイルス活性を有するペプチド、当該ペプチドを含む抗ウイルス剤、当該抗ウイルス剤の精製方法	発明者 藤吉好則、中村駿、 野村莉紗、谷村幸 宏、亀川亜希子、沼	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-103949	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗ウイルス活性を有するペプチド、当該ペプチドを含む抗ウイルス剤、当該抗ウイルス剤の製造方法	発明者 藤吉好則 中村駿 野村莉紗 谷村幸宏 亀川亜希子 沼本修	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-145370	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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	鈴木 翔大  (Suzuki Shota)	東京医科歯科大学	
研究協力者	鈴木 博視  (Suzuki Hiroshi)		
研究協力者	西川 幸希  (Nishikawa Kouki)		
研究協力者	藤吉 好則  (Fujiyoshi Yoshinori)		

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