

高速 AFM によるナノ動態計測を用いた分子創薬基盤の開発

慶應義塾大学医学部薬理学教室

山下 隼人

1. 研究の背景と目的

現在の創薬プロセスでは1つの医薬品を製品化するのに多大な時間と費用が必要であり、少子高齢化が進む我が国では、より少ない研究開発費で効率的な創薬を実現するための技術革新が求められている。分子標的治療はその突破口となるアプローチの一つで、体内の特定の分子を狙い撃ちしてその機能を制御することで病気を治療する最新の治療コンセプトである。しかし、その実現には分子レベルからターゲットの作動メカニズムを理解する必要がある。そこで、本研究では生理溶液中において機能している生体分子そのものの動態を直接観察可能である高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いて、医学的に重要な疾患に関与する膜輸送タンパク質のナノレベルでの動態可視化に取り組んだ。ターゲットとして特に膜輸送タンパク質の中で最大のファミリーを形成し、薬剤(抗がん剤など)排出ポンプをメンバーに多く持つ ABC トランスポータと脳神経系の疾患に関与するアキアポリン4(AQP4)の1分子イメージングを行った。ミクロな構造ダイナミクスから病態の分子メカニズム解明に迫る事で、これらの知見を分子創薬実現に向けた基盤技術へと繋げる事が本研究の目的である。

2. 結果及び考察

2.1 ABC トランスポータの1分子構造の可視化

全ての ABC トランスポータは、ファミリー内で相同性の高い2つの NBD (Nucleotide Binding Domain) を持っており、ATP の結合・加水分解・解離のサイクルを繰り返しながら、それぞれのトランスポータの機能発現に必要な機械的駆動力を発生する ATP 依存性「NBD エンジン」として機能していることが知られている(図1)。従って、この NBD エンジンの活性制御技術が開発できれば、それはすべての ABC トランスポータの活性制御に適用可能である。しかしながら、NBD エンジンの動作サイクル中の構造変化や ATP 加水分解サイクルとの関係など、その動作メカニズムはよく解っていない。

本研究では、まず ABC ファミリー内で唯一イオンチャンネルとして機能しているメンバーでパッチクランプや遺伝子解析などを用いてその機能が詳しく調べられている CFTR(図1左端)の1分子イメージングを行った。HEK cell から単離精製された可溶化 CFTR

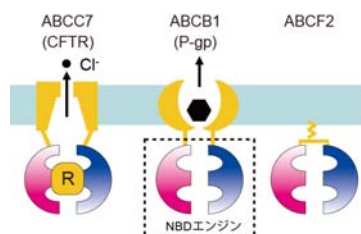


図1: ABC トランスポータの例

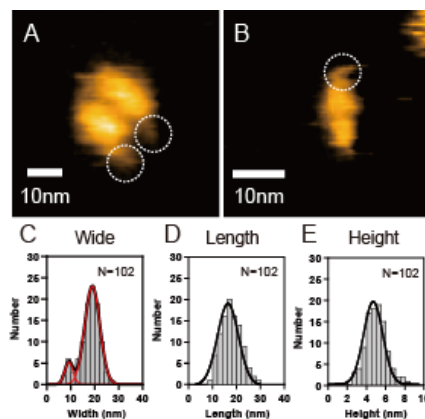


図2: CFTR の高速 AFM 観察

分子をマイカ基板に吸着させ高速 AFM 観察した所、2つの分子がペアになった2量体構造(図 2A)と単量体構造(図 2B)が観察され、それぞれの分子に突起構造が観察された(図 2A、B の点線)。これは CFTR に特徴的な NBD エンジンの制御を行う Regulatory domain(RD)であると考えられた。そこで RD に特異的に結合する抗体との複合体 CFTR の観察を行った結果、該当部分に抗体の結合が観察された。さらに NBD 直近の C 末端に付された FLAG-tag に結合する抗体との複合体の観察を行った所、2量体構造の側面に抗体の結合が観察されことから、NBD が RD の直下に位置している事が分かった。また、CFTR 分子サイズを解析した結果(図 2C,D,E)、分子の幅に単量体と2量体を示す2つのピーク(図 2C の約 10nm と 20nm)が見られ、分子数の大半が大きい方のピークに分布している事から、単離 CFTR の大半が2量体を形成している事が分かった。次に CFTR の膜中での構造および挙動を調べるため、脂質膜への再構成を行った。再構成膜をマイカに展開し、高速 AFM 観察を行った所、膜中に分子が散在し、それら分子の構造揺らぎを観察する事に成功した。また、これらの分子に蛍光修飾した FLAG-tag 抗体を結合させ、CCD カメラで観察した結果、マクロスケールでの膜中の CFTR の分布を示す蛍光像の撮影に成功した。これは CFTR が安定に膜に再構成されている事を示している。現在、これらの結果をまとめ論文投稿に向けて準備中である。

一方、CFTR を含め多くの ABC トランスポータは天然での発現量が少なく、結晶化出来ていないため、その構造研究は大きく遅れている。そこで、高速 AFM で ABC トランスポータの構造ダイナミクス観察および解析をより容易にするため、大量発現可能な昆虫細胞発現系の構築に取り組んだ。まず突破口として、NBD のみを主要な構造として持つ ABCF2(図 1 右端)の大量発現を行い、単離精製に成功した。現在、精製タンパク質の ATP 加水分解能の解析を行っており、今後、高速 AFM にてこの NBD の構造変化の可視化に取り組む予定である。

2.2 アクアポリン集合構造と自己免疫疾患の初期分子過程の可視化

アクアポリン 4(AQP4)は哺乳動物の脳に多く発現しており、水透過および細胞接着に関わっている。特に、アストロサイトのエンドフィートでは格子状のアレイ構造を形成し、このアレイの大きさは2種類のアイソフォーム(M1,M23)の発現割合に応じて変化する事が知られているが、機能との関連は明らかになっていない。本研究では、ヒト AQP4 の M1 および M23 それぞれを昆虫細胞で発現、単離精製し、脂質膜に再構成を行って、高速 AFM により観察した。その結果、M23 は 100×100nm 以上の大きなアレイ構造を形成し、この構造中でアクアポリン分子が4量体を形成する様子を高分解能で撮影する事に成功した(図 3)。一方、M1 は M23 のようなアレイ構造を形成せず、膜中において4量体が散在している様子が観察された。そこでこれらの試料を用いて、自己免疫疾患である視神経脊髄炎の初期過程として、アクアポリンへ自己抗体が結合する様子をリアルタイムで観察した。その結果、抗体注入後の Transient

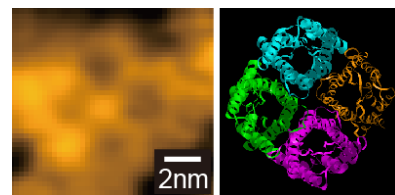


図 3:AQP4 四量体の高速 AFM 像(左)と原子モデル(右)

phase において、抗体はアクアポリンへ結合解離を繰り返す、その結合寿命にはアレイ構造の有無と抗

体結合の Valency(Monovalent と Bivalent binding)が強く関係している事が分かった。これらの結果をまとめ、現在論文投稿に向けて準備中である。

3. まとめと課題

本研究では、疾患に関与する膜輸送タンパク質の高速 AFM イメージングを通して、ミクロな構造ダイナミクスから病態の分子メカニズムの解明に取り組んだ。ABC トランスポーターの観察では、CFTR の 1 分子構造の可視化およびドメインの識別に成功した。今後は、薬剤投与時の構造変化の詳細を明らかにしていきたい。アクアポリンの観察では、精製タンパク質を脂質膜へ再構成する事で、脳のアストロサイトで見られるようなアレイ構造を再現する事ができた。さらに、自己免疫疾患の初期過程を分子レベルで可視化する事にも成功した。これらの結果は、アクアポリンが関与する視神経脊髄炎だけでなく、自己免疫疾患全般に広く役立てられる事が期待される。

謝辞

本研究は公益財団法人新世代研究所の研究助成により推進されました。関係者の方々に深く御礼申し上げます。

学会発表

相馬義郎、山下隼人、内橋貴之、安井正人、黄自強、安藤敏夫、「高速 AFM による CFTR チャネルのゆらぎの一分子動態観察」、日本生理学会(東京)、2013 年、3S61G-6

総説

相馬義郎、山下隼人 「チャネル 1 分子を動画で見たい」、日本薬理学雑誌、2013 Vol.141 No.5

