

Title	高速AFMを用いた1分子動態観察によるABCトランスポータの動作機構の解明
Sub Title	Study for mechanism of ABC transporters based on single molecular direct observations using high speed Atomic Force Microscopy.
Author	相馬, 義郎(Soma, Yoshiro) 内橋, 貴之(Uchihashi, Takayuki) 西坂, 崇之(Nishizaka, Takayuki) 櫻井, 実(Sakurai, Minoru) 佐藤, 主税(Sato, Chikara) 山下, 隼人(Yamashita, Hayato) 余, 盈君(Yu, Ying-Chun) 黄, 自強(Hwang, Tzyh-Chang)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
JaLC DOI	
Abstract	医学・生理的に重要な役割を果たしているABCトランスポータ・スーパーファミリーに共通したATP依存性駆動ドメイン(NBDエンジン)の作動メカニズムとその異常についての研究を, CFTRチャネルをモデルとして, 高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を含む複数の1分子測定法を組み合わせて行なった。その結果, CFTR分子の細胞内側に存在する, 活性調節(R)ドメインを含めたNBDエンジン部分の1分子動態観察に成功した。さらに分子間相互作用の高速AFM観察技術の確立をめざした抗原-抗体反応の直接観察および病因性CFTR変異体の分子生理学・薬理学的研究で成果を挙げることができた。 ABC transporter superfamily is one of the biggest protein families which members play essential physiological roles in human. The members in the ABC transporter superfamily share highly-conserved Nucleotide Binding Domain (NBD) underlying their ATP-driven mechanisms. We investigated molecular mechanism of the 'NBD engine' in an ABC member, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) using single-molecular measuring methods including high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We succeeded the first direct observation of dynamics of the intracellular complex consisting of two NBDs and regulatory (R) domain in CFTR using HS-AFM. We also obtained results in the direct observations of binding/unbinding process between AQP4 and anti-AQP4 antibody as a model of the molecule-molecule interactions. In addition, we performed several molecular physiological/pharmacological studies for disease-associated CFTR mutants.
Notes	研究種目 : 基盤研究(B)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2016 課題番号 : 25293049 研究分野 : 分子生理学・薬理学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25293049seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25293049seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号 : 32612

研究種目 : 基盤研究(B) (一般)

研究期間 : 2013 ~ 2016

課題番号 : 25293049

研究課題名 (和文) 高速AFMを用いた1分子動態観察によるABCトランスポータの動作機構の解明

研究課題名 (英文) Study for mechanism of ABC transporters based on single molecular direct observations using high speed Atomic Force Microscopy.

研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA, Yoshiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60268183

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 13,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : 医学・生理的に重要な役割を果たしているABCトランスポータ・スーパーファミリーに共通したATP 依存性駆動ドメイン (NBD エンジン) の作動メカニズムとその異常についての研究を、CFTRチャネルをモデルとして、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を含む複数の1分子測定法を組み合わせて行なった。その結果、CFTR分子の細胞内側に存在する、活性調節(R)ドメインを含めたNBDエンジン部分の1分子動態観察に成功した。さらに分子間相互作用の高速AFM観察技術の確立をめざした抗原-抗体反応の直接観察および病因性CFTR変異体の分子生理学・薬理学的研究で成果を挙げることができた。

研究成果の概要 (英文) : ABC transporter superfamily is one of the biggest protein families which members play essential physiological roles in human. The members in the ABC transporter superfamily share highly-conserved Nucleotide Binding Domain (NBD) underlying their ATP-driven mechanisms. We investigated molecular mechanism of the 'NBD engine' in an ABC member, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) using single-molecular measuring methods including high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We succeeded the first direct observation of dynamics of the intracellular complex consisting of two NBDs and regulatory (R) domain in CFTR using HS-AFM. We also obtained results in the direct observations of binding/unbinding process between AQP4 and anti-AQP4 antibody as a model of the molecule-molecule interactions. In addition, we performed several molecular physiological/pharmacological studies for disease-associated CFTR mutants.

研究分野 : 分子生理学・薬理学

キーワード : ABCトランスポータ - ATP加水分解 NBDドメイン 膜輸送 分子間相互作用 抗原 - 抗体反応 原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ATP Binding Cassette (ABC) トランスポータスуперファミリーは、相同性の非常に高い ATP 加水分解ユニット Nucleotide Binding Domain (NBD) を共通して持つ蛋白質スуперファミリーで、そのメンバーの多くは、NBD に結合した ATP を加水分解しながら、有機アニオンや薬剤の能動輸送をはじめとする様々な異なる生理的機能を発揮している膜蛋白である。

(2) ABC トランスポータ・スуперファミリーのメンバーは、その多様な機能に対応してそれぞれ大きく異なる構造の Membrane Spanning Domain (MSD) を持っているにもかかわらず、ほぼ共通した構造を持つ NBD によって駆動されている(図 1)ことから、NBD は他のドメインには依存しない独立性の高い動作メカニズムを持っていると考えられる。したがって、この NBD は、バーサタイルなナノレベルの ATP 加水分解エンジン“NBD エンジン”であると捉えることができる。

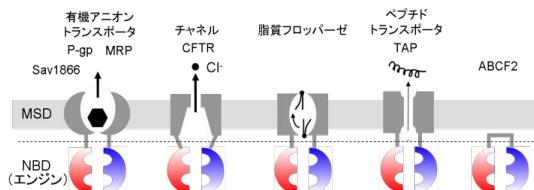


図 1. ABC トランスポータ・スуперファミリー

(3) 最近の研究により、NBD エンジンは、ふたつの NBD がそれぞれの Walker A & B motifs と他方の NBD の Signature sequence と向かい合わせの位置にあって 2 つの ATP 結合部位(ABP1&2)を形成しており、それぞれが ATP を 1 分子ずつ挟み込んだ形で NBD 二量体の形成・解離を繰り返して機能するという作業仮説(図 2)が唱えられているが、直接的な確証は得られていない。

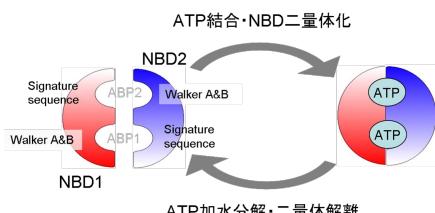


図 2. ABC トランスポータ NBD エンジン

(4) ABC トランスポータ・スуперファミリーの一員である Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) チャネルはこのスуперファミリーの中で唯一イオンチャネルとして機能しており、NBD の二量体化に伴ってチャネルゲートが開き、NBD 二量体の解離によってチャネルゲートが閉じると考えられている(図 3)。このように、CFTR ではパッチクランプ法に

よってシングルチャネル電流を測定・モデル解析することによって、一分子レベル・リアルタイムで NBD における ATP 結合・加水分解・解離サイクルの情報を得ることができます。このことから、申請者は、CFTR をモデルとして用いることによって“NBD エンジン”的動作メカニズムの研究を行ってきた。

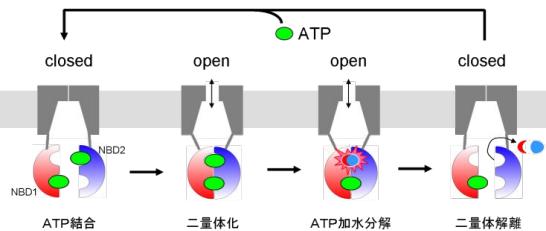


図 3. CFTR チャネルのゲーティングモデル

(5) しかし、上記の結論は、CFTR から得られたシングルチャネル電流という機能データを構造モデルに基づいて解釈しただけ(Structure-guided functional study)であり、ある意味、単なる類推に過ぎないことを否めない。さらにチャネル以外の機能を持つ他の ABC トランスポータを研究対象にすることはできなかった。

(6) 最近、金沢大学安藤敏夫教授のグループによって、溶液中で機能中の生体分子を電子顕微鏡レベルの空間分解能とビデオレートに迫る時間分解能で直接観察することを可能にした革新的な 1 分子観察技術・高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)が開発された。

## 2. 研究の目的

(1) ABC トランスポータ・スуперファミリーは、P-glycoprotein や CFTR など医学的に非常に重要な膜輸送蛋白を数多く含んだスуперファミリーであり、そのメンバーは共通した ATP 依存性駆動ドメイン(NBD エンジン)を持っている。この NBD エンジンの作動原理の理解とそれに基づく活性制御技術は、医療そしてナノ科学を通じて人類に多大な益をもたらすと期待される。

(2) 本研究では、高速 AFM による 1 分子ライブイメージングを中心として、シングルチャネル電流測定等、複数の最新 1 分子測定法を組み合わせることで NBD エンジンの力学的作動様式およびその駆動原理の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

本研究における基本目標は、NBD エンジンの力学的作動様式およびその駆動原理の解明である。

(1) NBD エンジンの動作サイクル中における構造変化の直接観察と動作機構の解明  
高速 AFM を用いて、溶液中で作動中の CFTR(ABCC7)、P-gp(ABCB1) および ABCF2 の 1 分子動態イメージングを行う。野生型における

る ATP の有無による比較、様々な ATP 非加水分解型変異体や非加水分解 ATP アナログが NBD エンジンの動態に影響を調べることにより、NBD の機械的な構造変化を明らかにし、現在広く受け入れられている NBD2 量体仮説を検証する。

(2) NBD エンジンの基本構造単位および MSD からの独立性とその分子基盤の解明  
ABC トランスポータの大きな特徴としては、大きく構造・機能の異なる MSD を基本構造が共通な 1 種類の NBD が駆動しているという NBD エンジンが持つバーサーティル(汎用)性がある。主に CFTR 変異体のシングルチャネル電流測定により機能面からこのバーサーティル性の構造基盤を明らかにする。

上記の 2 課題はお互いに密接な関係にあり、これら実験および結果の検討は相補的に行う。

#### 4. 研究成果

(1) CFTR チャネルの高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いた 1 分子動態観察を中心で研究を行なった。まず、単離精製した可溶化 CFTR 蛋白の高速 AFM 観察を行なった。この条件下では CFTR は AFM ステージ上で横倒位になつてあり、以前の単粒子解析(SPA)の結果と同様に、卵型の CFTR 分子が 2 量体を形成しているのが確認できた。さらに SPA では捉えることができなかつた活性調節(R)ドメインと思われる構造物が、CFTR 分子の細胞内側底面部で揺らいでいるのを観察できた。これは、CFTR における R ドメインの分子内での位置および動態について初めて得られた情報である。

(2) CFTR は R ドメインが PKA によるリン酸化を受けることによって活性化される。そこで、PKA 触媒サブユニットを添加して高速 AFM 観察を行なったところ、PKA 触媒サブユニットが R ドメインを含めた細胞内側ドメインに繰り返し接触・解離する様子が観測できた。しかしながら、それに引き続いた R ドメインの構造および動態の変化は観察できなかつた。これは、限られた観察時間に加えて、AFM ステージ上で横倒位という非生理的環境に起因しているのではないかと考えられた。

(3) そこで、より生理的な環境下で実験を行なうために、AFM ステージ上で展開した脂質 2 重膜中に CFTR を再構成して、高速 AFM 観察を行なった。その結果、CFTR2 量体における R および NBD1/2 ドメインと思われる計 6 つのドメインが揺らいでいるのが直接観察できた。しかしながら、CFTR の脂質 2 重膜への挿入の成功確率が低く、確証を得るに十分なデータを得るためには、より大量の CFTR 蛋白を発現・精製するシステムの確立が必要であると考えられた。

(4) 異なる複数の分子間の相互作用は、生命

システムを構成している最も重要な基本プロセスのひとつである。そこで、CFTR 1 分子動態観察に加えて、分子間相互作用の高速 AFM 観察技術の確立をめざし、水チャネル AQP4 への抗 AQP4 抗体の結合動態の直接観察を試みた。発現・精製した(M23-)AQP4 を、高速 AFM ステージ上に展開したリン脂質 2 重膜に組み込み、特徴的なアレイ構造を取らせることに成功した。

(5) この規則アレイ中の M23-AQP4 は、細胞内側を AFM ステージ側に、細胞外側を AFM 探査針側に向いていることが、高速 AFM による表面構造と結晶構造との比較、およびそれぞれ AQP4 細胞外および内ドメインを抗原とする抗体の結合の可否から確認できた。この(M23-)AQP4 アレイに抗 AQP4 モノクロナール抗体を投与して、高速 AFM による抗原 - 抗体反応の 1 分子レベルの直接観察に成功した。

(6) 上記の実験に加え、病因性 CFTR 変異体の分子生理学・薬理学的研究を行なった。さらに、国際共同研究として、膵 細胞におけるインスリン分泌機構における CFTR の役割の解明や、MD シミュレーションを用いた NBD 二量体化における水のエントロピー・エンタルピーの寄与についての理論的研究を行なった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

##### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

Yu YC, Sohma Y, Hwang TC\*. On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in CFTR. *Journal of Physiology*, 査読有, 594(12), 2016, 3227-44  
doi: 10.1113/JP271723

Lin WY, Sohma Y, Hwang TC\*. Synergistic Potentiation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating by Two Chemically Distinct Potentiators, Ivacaftor (VX-770) and 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino) Benzoate. *Molecular Pharmacology*, 査読有, 90(3), 2016, 275-85  
doi: 10.1124/mol.116.104570

Guo JH, Chen H, Ruan YC, Zhang XL, Zhang XH, Fok KL, Tsang LL, Yu MK, Huang WQ, Sun X, Chung YW, Jiang X, Sohma Y, Chan HC\*. Glucose-induced electrical activities and insulin secretion in pancreatic islet -cells are modulated by CFTR. *Nature Communication*, 査読有, 15;5, 2014, 4420  
doi: 10.1038/ncomms5420

Furukawa-Hagiya T, Yoshida N, Chiba S, Hayashi T, Furuta T, Sohma Y, Sakurai M\*. Water- mediated forces between the nucleotide binding domains generate the power stroke in an ABC transporter. *Chemical Physics Letters*, 査読有, 2014; 616-617, 2014, :65-170  
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.10.038>

Furukawa-Hagiya T, Furuta T, Chiba S, Sohma Y, Sakurai M\*. The power stroke driven by ATP binding in CFTR as studied by molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 117, 2013, 83-93  
doi: 10.1021/jp308315w

Sohma Y\*, Yu YC, Hwang TC. Curcumin and Genistein: the combined effects on disease-associated CFTR mutants and their clinical implications: *Current Pharmaceutical Design*, 査読有, 19(19), 2013, 3521-3528  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4939248/>

相馬義郎\*,山下隼人 チャネル1分子を動画で見たい。 ABC トランスポーター CFTR チャネルの ATP 駆動性ゲーティング: 静止画から動画へ. 日本薬理学会雑誌, 査読無, 141巻5号, 2013, 230-234  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/141/5/141\\_230/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/141/5/141_230/_article/-char/ja/)

[学会発表](計 15 件)

相馬義郎 CFTR and AQP: Two channels deeply involved into incurable diseases . 第 93 回日本生理学会年会シンポジウム . 2016 年 3 月 22 ~ 24 日 . 札幌コンベンションセンター ( 北海道・札幌市 )

Sohma Y: Dynamic Bindings of Autoimmune IgG Antibodies against Autoantigen Membrane Proteins directly observed by High-Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM) . The Second Kitasato-Yale Fluid Symposium: Molecular Control of Cellular and Epithelial Function ( 国際シンポジウム ). 2015 年 12 月 5 日 . 北里大学白金キャンパス ( 東京都・港区 )

相馬義郎、山下隼人 : 高速原子間力顕微鏡を用いた 水チャネル AQP4 への自己抗体の結合・解離動態の直接観察 . 平成 27 年度生理学研究所研究会「生体水メオスタシスの gateway としての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス . 2015 年 09 月 15 ~ 16 日 . 生理学研究所 ( 愛知県・岡崎市 )

相馬義郎 : Monitoring ATP-hydrolysis cycle by electro-physiological approach: Patch-clamp recordings of CFTR . 第 53 回日本生物物理学会年会シ

ンポジウム .2015 年 09 月 13~15 日 . 金沢大学角間キャンパス( 石川県・金沢市 )

相馬義郎、山下隼人 : 高速原子間力顕微鏡を用いた膜蛋白への抗体結合・解離動態の直接観察 . 平成 27 年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合 . 2015 年 9 月 1~2 日 . 生理学研究所 ( 愛知県・岡崎市 )

Sohma Y, Yu Y, Nakakuki M, Ishiguro H : Expression, function and phenotype of CFTR mutants found in Japanese CF patients . 第 92 回日本生理学会年会シンポジウム .( 招待講演 ). 2015 年 3 月 21~23 日 . 神戸コンベンションセンター ( 兵庫県・神戸市 )

Sohma Y : Two novel direct observations in membrane transports: transepithelial water diffusion and single channel molecules . Kitasato-Yale Fluid Symposium 2015( 招待講演 ). 2015 年 3 月 2 日 . 北里大学白金キャンパス ( 東京都・港区 )

Sohma Y : Two novel approaches to CFTR single molecular dynamics and water transport physiology: high-speed AFM and CARS microscopy . Seminar, Cystic Fibrosis Center, The University of North Carolina at Chapel Hill ( 招待講演 ). 2015 年 02 月 20 日 . Chapel Hill, NC, USA

Sohma Y : Mechanism of ATP-dependent gating in CFTR channels . Australian Physiological Society Meeting 2014( 招待講演 ). 2014 年 11 月 30 日 ~ 12 月 03 日 . Brisbane ( Australia )

Sohma Y : Let ' s " See " ATP-dependent gating of CFTR channels . The 45th NIPS International Symposium

" Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins " ( 招待講演 ). 2014 年 11 月 25 ~ 28 日 . 岡崎コンファレンスセンター ( 愛知県・岡崎市 )

Sohma Y: Structure and fluctuation of single CFTR molecules observed by high-speed atomic force microscopy . International symposium " Cystic fibrosis in Asia from basics to clinics " ( 招待講演 ). 2014 年 09 月 29 ~ 30 日 . 名古屋大学 野依記念学術交流館 ( 愛知県・名古屋市 )

相馬義郎、山下隼人、余 盈君、安井正人 : CARS 顕微鏡と高速原子間力顕微鏡 : 上皮膜輸送研究に有用な 2 つの革新的測定技術 . 第 91 回日本生理学会大会 . 2014 年 3 月 16~18 日 鹿児島大学郡元キャンパス ( 鹿児島県・鹿児島市 )

山下隼人、会津心之亮、加藤純悟、阿部陽一郎、安井正人、相馬義郎 : 高速 AFM によるアクアポリン 4 チャネルの直接観察 . 第 51 回日本生物物理学会年会シンポジウム . 2013 年 10 月 28~30 日 . 国立京都国際会館 ( 京都府・京都市 )

相馬義郎、山下隼人 : 高速 AFM による膜機能分子のゆらぎの直接観察 . 平成 25 年度生理研研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」 . 2013 年 9 月 5~6 日 岡崎コンファレンスセンター ( 愛知県・岡崎市 )

相馬義郎:ABC トランスポータ CFTR チャネルの ATP 駆動ゲーティング機構\_第341 回情報計算化学生物(CBI)学会講演会(招待講演), 2013 年 8 月 2 日, 東京大学山上会館大会議室(東京都・文京区)

〔図書〕(計 1 件)

Sohma Y\*, Hwang TC Cystic fibrosis and the CFTR anion channel. In: Zheng & Trudeau (eds), Handbook of Ion Channels, CRC Press Taylor & Francis Books Inc, Oxford, UK, 2015, pp 627 - 648 総ページ 660 (ISBN-10: 1466551402)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
慶應義塾大学医学部薬理学教室  
<http://www.pharm.med.keio.ac.jp/about/sohma.html>  
Dalton Research Center, Univ of Missouri, USA  
<http://dalton.missouri.edu/investigators/sohmay.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相馬 義郎 (SOHMA, Yoshiro)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60268183

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

内橋 貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)  
金沢大学・数物科学系・准教授  
研究者番号: 30326300

西坂 崇之 (NISHIZAKA, Takayuki)  
学習院大学・理学部・教授  
研究者番号: 40359112

櫻井 実 (SAKURAI, Minoru)  
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授  
研究者番号: 50162342

佐藤 主税 ( SATO, Chikara )  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・研究グループ長  
研究者番号: 00357146

(4)研究協力者

山下 隼人 (YAMASHITA, Hayato)  
余 盈君 (YU, Ying-Chun)  
黃 自強 (HWANG, Tzyh-Chang)