

54. TRPA1 の立体構造解明と新規鎮痒剤の開発

日野 智也

*鳥取大学 大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻 生物工学研究室

Key words : TRPA1, イオンチャネル, アトピー性皮膚炎, 立体構造解析, キメラタンパク質

緒言

アトピー性皮膚炎は、10人に1人が罹患しているといわれ、特に10代以下の低年齢層において発症確率の高い炎症性疾患である。アトピー性皮膚炎の主症状は、皮膚の湿疹と慢性的な痒み感であり、痒みにより患部を掻くことで症状が悪化する悪循環を招き、症状が長期化する傾向が強い。現在、アトピー性皮膚炎における慢性的な痒みに対する医薬は、抗炎症作用を持つステロイド剤や抗ヒスタミン剤が主に用いられる。抗ヒスタミン剤については、受容体選択性に優れた第2世代の開発が進み、さらに京都大学の島村らによりヒスタミン H1 受容体の立体構造が解明されたことから¹⁾、より副作用の少ない優れた医薬品の開発が期待されている。しかしながら、現状においては、上記2種のいずれの薬剤においても副作用の問題を抱えており、異なる作用機序をもつ新規薬剤の開発が強く望まれている。最近になり、アトピー性皮膚炎における痒みの発症機序が分子レベルで明らかになりつつある。炎症状態の表皮角化細胞より放出されたサイトカインである thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、末梢神経 C 線維上の TSLP 受容体を介してホスホリパーゼ C を、さらに C 線維の細胞膜上に発現している Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) イオンチャネルの活性化により細胞内カルシウム濃度を上昇させることで C 線維の興奮を引き起こし、炎症性メディエーターの放出とともに痒み感覚の発生を惹起する²⁾。すなわち、TRPA1 の活性化を防ぐアンタゴニストは、アトピー性皮膚炎で用いられていたステロイドや抗ヒスタミン剤の様な従来薬とは異なる作用機序の医薬品となる可能性が期待される。

そこで、本研究ではヒト由来 TRPA1 タンパク質の大量調製系を確立し、立体構造に基づく合理的なアンタゴニストの創製を目指した TRPA1 の X 線結晶構造解析と、化合物ライブラリーを用いたタンパク質レベルでの医薬候補のスクリーニングを行うことを目的として研究を行った。

方法、結果および考察

1. ヒト由来 TRPA1 の大量発現

ヒト由来 *TRPA1* 遺伝子をガラクトース誘導型 p426-GAL1 プラスミドに導入し、出芽酵母 FGY217 を発現ホストとして培養温度、誘導のタイミング、培養時間について検討を行った。ここで、発現量の検討を容易にするために、EGFP を TRPA1 の N 末端あるいは C 末端に融合した形態で発現させた。その結果、C 末端への EGFP 融合体では、試行した培養条件下においてほとんど発現が認められなかったが、N 末端 EGFP 融合型 TRPA1 では、25 °C での培養において、ごく微量ではあるが発現することが分かった。さらに発現量を増加させることを目的として、膜タンパク質の大量発現に実績が豊富なメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に N 末端 EGFP 融合型 *TRPA1* 遺伝子を導入し発現を試みたが、発現量の増加は認められなかった。そこで、*P. pastoris* のコドン使用頻度に最適化した遺伝子を合成した上で、高発現株のスクリーニング及び発現条件の検討を行った結果、ヒト由来の塩基配列に比しておよそ3倍の発現量を得ることができた(図 1A)。つぎに発現させた TRPA1 の膜画分からの可溶化を試みた。これまでに膜タンパク質の結晶化に用いられた様々な界面活性剤について、可溶化効率、可溶化後の会合状態について評価を行った結果、多くの TRP チャンネルにおいて、一般に用いられる界面活性剤ドデシルマルトシド (DDM) ではほとんど可溶化できず、両イオン性界面活性剤として機能する Fos-Choline 14 を用いることで効率よく可溶化できることが分かった。可溶化された

*現所属：鳥取大学 大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻 構造生物学研究室

TRPA1 の会合状態をゲル濾過により分析した結果、4 量体の分子量に一致する位置に溶出した。TRP チャネルは 4 量体構造を形成することでイオンチャネルとして機能するため、*Pichia* 酵母で発現させた TRPA1 は機能する状態で可溶化できていることが示唆された (図 1B)。

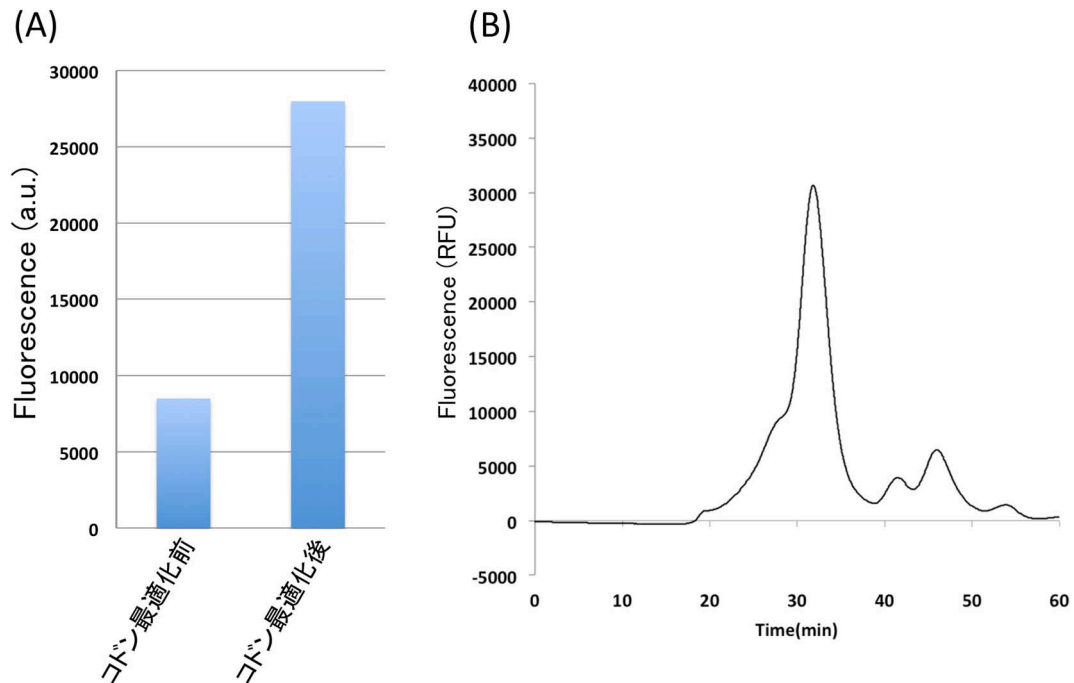


図 1. 完全長 TRPA1 の大量発現とその会合状態のゲル濾過分析

(A) ヒト由来 TRPA1 の使用コドンをもとに *Pichia pastoris* での発現に最適化することにより、*Pichia* 酵母でのヒト由来 TRPA1 の発現量は 3 倍程度向上した。

(B) *Pichia* 酵母に発現させたヒト由来 TRPA1 の蛍光ゲル濾過法を用いた会合状態の分析。溶出ピークの位置から 800~900kDa の分子量を持つ会合状態を形成していることが示唆された。このことから、*Pichia* 酵母を用いて発現した TRPA1 は 4 量体構造を持つことが予測された。

2. ヒト由来 TRPA1 の細胞内ドメインの発現

TRPA1 の細胞内ドメインは分子全体の約 8 割を占め、細胞内における様々な情報をイオンチャネルドメインに伝達するハブとしての役割を果たすと考えられており、TRPA1 の生理機能発現の根幹をなす極めて重要な領域である (図 2A)。本研究ではこの TRPA1 細胞内ドメインによる情報受容と伝達メカニズムの解明を目指し、細胞内ドメインの発現と精製を試みた。大腸菌を発現宿主として TRPA1 の N 末端細胞内ドメインについて、発現領域や付加する GFP の位置などを検討することにより立体構造解析に用いるに十分な量と純度の試料を得ることができた。ゲルろ過による会合状態の分析を行った結果、TRPA1 の N 末端細胞内ドメインは完全長の TRPA1 と同様の 4 量体を形成していることが示唆された。このことから、精製した試料は完全長と同様の機能を維持していると考えられた (図 2B)。

2015 年 4 月に電子顕微鏡により解明された TRPA1 の立体構造では、C 末端細胞内ドメインがコイルドコイルを形成し、4 量体構造の維持に寄与していることが明らかとなった。そこで、より天然に近い構造で細胞内ドメインを発現させるために、N 末端細胞内ドメインだけでなく C 末端ドメインも含む形態で可溶性タンパク質として発現させることを試みた。すなわち、膜貫通ドメインを可溶性タンパク質である EGFP に置換したキメラタンパク質をデザインし、出芽酵母に発現させた。その結果、EGFP の蛍光活性を維持しつつ 4 量体構造を持つキメラタンパク質の発現に成功した (図 2C)。現在、これら TRPA1 細胞内ドメインタンパク質の結晶化スクリーニングを行っている。

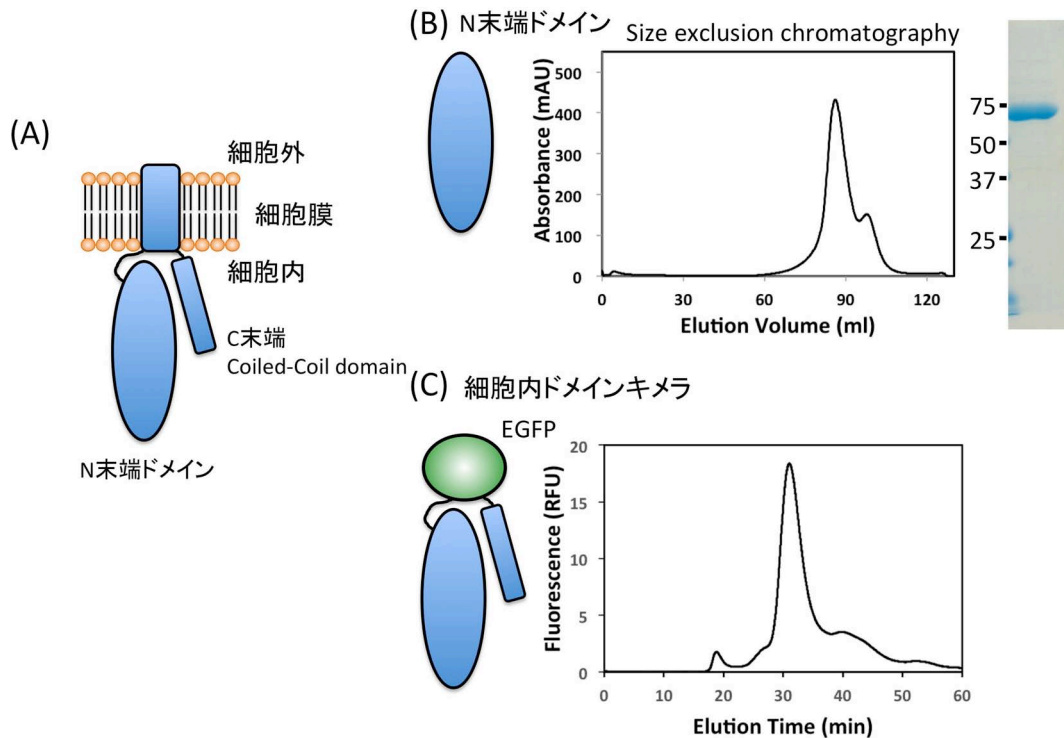


図2. TRPA1 細胞内ドメインの発現

- (A) TRPA1 の模式図。TRPA1 は N 末端細胞内ドメイン、イオンチャネルを形成する膜貫通ドメイン、Coiled-coil を形成し 4 量体構造の形成に関わる C 末端細胞内ドメインにより構成される。
- (B) N 末端細胞内ドメインの発現。大腸菌に発現させた N 末端細胞内ドメインは、ゲル濾過分析により、4 量体構造を持つことが示唆された。N 末端ドメインの大量発現と高純度精製は完了している。
- (C) 膜貫通ドメインを GFP に置換することで、細胞内ドメイン全体を可溶性タンパク質として発現させることができるキメラ TRPA1 の概念図。出芽酵母により発現させたキメラ TRPA1 は 4 量体構造を保持していることが示唆された。

3. TRP チャネルの高純度精製手法の確立

酵母で発現させた TRPA1 の精製では、EGFP に融合した His-tag を利用し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行っていたが、最終精製試料に夾雑タンパク質が多く混入する問題が多発した (図 3A)。そこで、より特異性と親和性に優れた抗体を用いたアフィニティ精製手法の検討を行った。TRPA1 の発現では常に EGFP 融合体として発現させていたことから、EGFP に特異的に結合する単一ドメイン抗体 nanobody を固定化した担体を自作し、TRPA1 の精製を試みた。その結果、His-tag を用いた精製と比較し格段に純度の高い試料を短時間で得ることに成功した。この精製手法を用いることで、複数種の TRP チャネルを純度よく精製できるようになった (図 3B)。

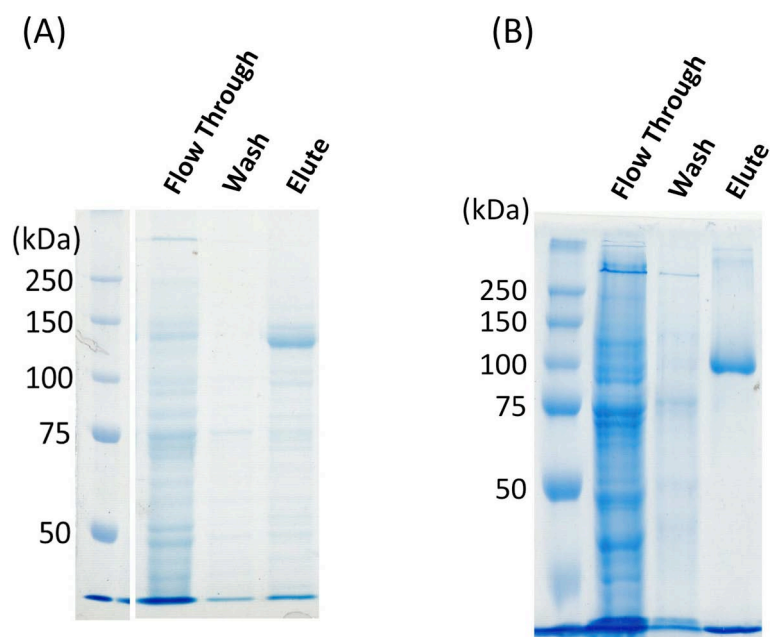


図3. GFP nanobody を用いた TRP チャンネルの精製

(A) Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製された TRP チャンネル。夾雑タンパク質のバンドが散見され、純度は高くないことがわかる。

(B) GFP nanobody 担体を用いた EGFP-TRP チャンネル融合体のアフィニティ精製。Ni 担体と比較すると格段に純度が向上している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、鳥取大学大学院工学研究科の柿阪哲也、鳥取大学工学部の寺岡佐智代および池尻みゆきである。

文献

- 1) Shimamura T., Shiroishi M., Weyand S., Tsujimoto H., Winter G., Katritch V., Abagyan R., Cherezov V., Liu W., Han G. W., Kobayashi T., Stevens R. C., Iwata S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*. 2011 Jun 22;475(7354):65-70. doi: 10.1038/nature10236. PubMedID: 21697825
- 2) Wilson S. R., Thé L., Batia L. M., Beattie K., Katibah G. E., McClain S. P., Pellegrino M., Estandian D. M., Bautista D. M. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):285-95. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.057. PubMedID:24094650