

研究題目 COPD 発症に関連する CFTR ダウンレギュレーション責任分子の探索

研究組織

研究代表者：沖米田 司（関西学院大学 生命環境学部）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：日向 大智（関西学院大学 生命環境学部）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

気道の慢性炎症を主徴とする嚢胞性線維症の原因タンパク質 CFTR の後天的な機能異常は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の一因となる（Hanrahan, Am J Physiol Cell Physiol 2022）。CFTR はタバコ煙や細菌感染により、細胞膜からダウンレギュレーションされる可能性が示唆されている。これらの COPD 病因分子による CFTR ダウンレギュレーションの機構は十分に理解されていない。そこで本研究では、CFTR インタラクトーム解析を行い、CFTR ダウンレギュレーションに関与する責任分子を明らかにすることを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

1. 共免疫沈降法による CFTR インタラクトーム解析 (IP-MS 法)

形質膜等に発現する成熟型 CFTR の結合タンパク質を解析可能であるか検討するために、クロスリンカーを用いた IP-MS 法を行った。ビオチン化シグナルを保有した CFTR 安定発現気道上皮細胞株 (CFBE) に 0.1% ホルムアルデヒドを室温 10 分間処理し、CFTR 複合体を架橋した。細胞を可溶化後、Streptavidin Dynabeads を用いて CFTR 複合体を単離し、質量分析を行った。主に小胞体に局在する変異体 CFTR を比較対象として用いた。解析の結果、野生型 CFTR に結合する分子として、形質膜に発現する SLC トランスポーター等が同定された。一方、CFTR 変異体では小胞体局在分子が同定された。従って、本解析により CFTR 結合分子を同定可能であることが確認された。しかしながら、クロス

リンク処理を行う短時間では、COPD 病因分子による CFTR ダウンレギュレーションの誘導が困難であったため、本解析法を中断した。

2. AirID を用いた CFTR インタラクトーム解析
近接ビオチン化が可能である AirID を野生型 CFTR の N 末端 (AirID-CFTR)、または、C 末端に融合した CFTR-AirID 安定発現気道上皮細胞 (BEAS-2B) を用いて、COPD 関連物質である緑膿菌外毒素 Pyocyanin (PYO) 処理による CFTR 結合分子の変化について解析した。慢性的な緑膿菌感染を想定して PYO を 2 日間処理し、最後の 1 日ではビオチンを添加し、近接ビオチン化を行った。ビオチン化タンパク質を Western blot で確認後、近接ビオチン化タンパク質を MS 解析で同定した。PYO 処理により CFTR 結合が増加する可能性がある分子を同定し、その中にはユビキチン関連分子や炎症関連分子が含まれていた。今後、ノックダウン実験により、同定した候補分子が CFTR ダウンレギュレーションに関与するか否かを明らかにする予定である。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果
上記 2. の検討により、PYO 処理後に野生型 CFTR に結合するユビキチン関連分子や炎症関連分子を同定した。これらは COPD 病因分子による CFTR ダウンレギュレーションに関与する可能性がある。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究は、COPD 病因分子による CFTR ダウ

ンレギュレーション機構を明らかにするものである。本共同研究により、その分子機構が解明されれば、慢性炎症性肺疾患の COPD 発症に関わる分子機構や、CFTR 機能異常による慢性炎症発症の分子機構が明らかとなる。本研究は CFTR が関連する嚢胞性線維症 (CF) や COPD の予防・治療戦略の提案に大きく貢献する可能性を秘めている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

AirID を用いた近接ビオチン化法では十分なビオチン化に長時間(1 日等)必要であるため、数時間で起こる COPD 病因分子による急性反応 (CFTR エンドサイトーシス) が追跡できない。今後、短時間(1 時間)でも近接ビオチン化が可能となる TurboID の使用を検討する。