

令和元年5月30日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21289

研究課題名(和文) アセチルコリン受容体のリガンド依存的構造変化の動的な解明

研究課題名(英文) Molecular dynamics of ligand-dependent structural changes of nicotinic acetylcholine receptor

研究代表者

西野 有里(Nishino, Yuri)

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：20342826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチン性アセチルコリン受容体はリガンド作動性のカチオンチャンネルで、構造の異なる少なくとも3つの活性状態があることが知られている。本研究課題により、リガンド存在時の、活性状態の変化に伴う受容体細胞外領域上部の回転運動を、生きている哺乳類培養細胞を用いてX線1分子追跡法により、捉えることができた。また、受容体のチャンネルの開口を阻害する毒素によって回転は止められたことから、今回、捉えられたリガンド結合部位を含む細胞外領域の回転運動は、チャンネル開閉と連関があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの受容体は、解明されていないものも含めて様々なタンパク質や脂質によって活性が調節されているが、それらは弱い結合と解離を繰り返しているため、生体から複合体として取り出すことは困難である。本研究課題により、生きている哺乳類の細胞に存在している状態でニコチン性アセチルコリン受容体のリガンド依存的な分子内運動を捉えることができた。この手法は他の創薬のターゲットとなっている受容体やトランスポーターについても適用可能であり、種々の創薬シーズの効果を、生きた細胞を用いて動的に検出できる画期的な手法となる。

研究成果の概要(英文)：Nicotinic acetylcholine receptor exhibits at least three functional states. The structure of nicotinic acetylcholine receptor is switched among the three states. In this study rotation of extracellular domain was detected in presence of ligand by Diffracted X-ray tracking using live mammalian cell culture, which is related to the transition of functional states. The rotation was stopped by a toxin, which inhibits opening of the receptor channel. It was considered that the rotation of extracellular domain including ligand binding site is correlated to the open-close mechanisms of the receptor channel.

研究分野：分子生物学、電子顕微鏡法

キーワード：ニコチン性アセチルコリン受容体 分子内運動 チャンネル内包型受容体 リガンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) をはじめとした Cys-loop super family of the ligand-gated ion channel (Cys-loop 受容体) の多くは、アルツハイマー病や筋無力症など難治性疾患の創薬ターゲットとなっている重要なタンパク質である。Cys-loop 受容体は構造の異なる少なくとも3つの活性状態をとると考えられているが、すべての活性状態で立体構造が解かれた Cys-loop 受容体はなく、異なる受容体の種々の活性状態における構造からリガンド依存的なチャネル開閉機構が提唱されていた。

また、nAChR は受容体の周囲に存在している脂質やさまざまな分子によってチャネル開閉が制御されていることが知られている。そのため、チャネル開閉機構を調べるためには、受容体を細胞膜から取り出さずに、生体にある状態で解析することが望ましい。これまでに、シビレイの電気器官から調製したプロテオリポソームを用いて、電気器官に多量に発現している nAChR のリガンド依存的な分子内運動を、X 線 1 分子追跡法 (DXT) により解析していたが (引用文献) 生きている細胞を用いて nAChR の分子内運動を解析した例はなかった。

2. 研究の目的

生きている細胞を測定試料として、細胞表面に発現している nAChR のリガンド依存的な分子内運動を DXT により解析し、nAChR の構造と併せて、リガンド依存的な nAChR の活性状態の変化について議論する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

紫外線照射滅菌およびゼラチンコーティングした 1cm 角のカプトン膜、または番号とグリッドが刻まれたカバーガラスを培養皿に入れて、C2C12 細胞を播種し、100%コンフルエントになった時点で培養液中の血清を 10%ウシ胎児血清から 5%ウマ血清に変えて筋管細胞へ分化誘導することによって、nAChR を細胞表面に発現させた。

(2) 抗体結合金ナノ結晶の調製

塩化カリウム結晶上の金ナノ結晶を 6-メルカプトヘキサノールでコーティングした後、抗 nAChR 抗体 Fab' を含む緩衝液で金ナノ結晶を溶かし出し、透析を行って塩化カリウムを除いた後、ウシ血清アルブミン (BSA) とともに、ソニケーションすることによって金ナノ結晶を分散させた。

(3) 金ナノ結晶の標識

細胞培養液に抗 nAChR 抗体 Fab' 結合金ナノ結晶を添加して、4℃で1時間インキュベートした。その後、培養液で洗浄し、リガンドを添加して測定試料とした。番号とグリッドが刻まれたカバーガラス上で培養した細胞については、金ナノ結晶添加時に蛍光分子が結合した プンガロトキシムも併せて添加した。

(4) 電子顕微鏡法

金ナノ結晶の分散は、ホルムバル膜を張った銅グリッドを親水化し、金ナノ結晶を含む水溶液を添加して 30 秒置いた後、濾紙で余剰の水分を吸い取り、透過型電子顕微鏡で観察した。また、番号とグリッドが刻まれたカバーガラス上で培養した細胞は標識後、蛍光顕微鏡を用いて nAChR の局在を観察し、アルデヒド固定、エタノール脱水を行った後、凍結乾燥し、蛍光が観察された部位を番号とグリッドから特定し、走査型電子顕微鏡で金ナノ結晶の有無を観察した。

(5) 分子内運動計測

細胞が接着しているカプトン膜を培養液が満たされた状態で厚み 12.5 μm の閉鎖系セルに格納し、温度調節チャンバーにセットした。二次元 X 線検出器を用いて時分割型ラウエ計測を行い、CMOS カメラを用いて金ナノ結晶に由来する回折像の連続画像を記録した。Image J、Python、Trackpy 等を用いて画像解析を行い、MSD カーブを作成した。

(6) nAChR の構造解析

シビレイ電気器官を破碎して超遠心分離を行うことによって膜画分を分離し、界面活性剤を用いて nAChR を可溶化した後、nAChR に対するアフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて nAChR を精製した。種々のリガンドを添加した後、多数の小孔のあいたカーボン膜を張った銅グリッドに添加して急速凍結することによって氷包埋し、クライオ透過型電子顕微鏡で画像を取得し、Eos を用いて単粒子解析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を試料とした DXT の確立

DXT によりタンパク質の分子内運動を計測するためには運動を計測したい部位に特異的に金属ナノ結晶を標識する必要がある。しかしながら、DXT で実績のある金ナノ結晶は互いに凝集しやすく、またタンパク質表面に露出したチオール基と強力に結合する。そこで、nAChR に金ナノ結晶を標識するために、抗 nAChR 抗体 IgG をフィシンを用いて Fab' に消化してシステインが表面に露出した Fab' と金ナノ結晶を結合させた。しかしながら、Fab' を結合させるだけでは金ナノ結晶が分散しなかったため、金ナノ粒子の分散安定化によく用いられているクエン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール (PEG)、チオール基付加 PEG (PEG-SH) を添加して金ナノ結晶の分散状態を透過型電子顕微鏡で観察し、比較検討した。その結果、図 1 で示したように、クエン酸ナトリウムと PEG で金ナノ結晶の分散効果が認められたため、Fab' 結合金ナノ結晶溶液にそれらを添加することにした。

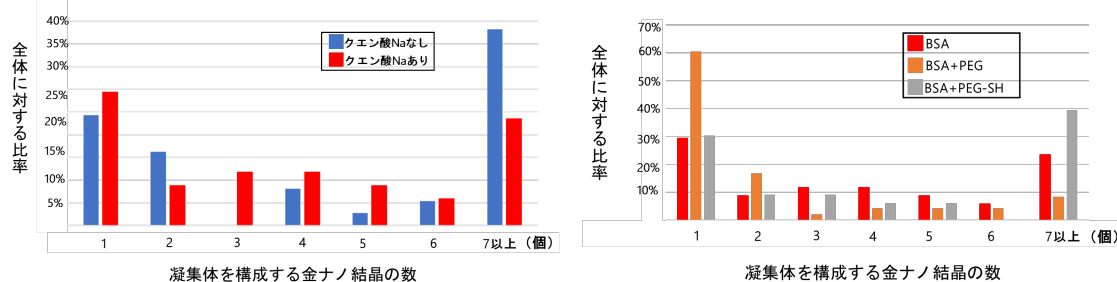


図 1 金ナノ結晶の分散条件の検討
各条件について 25 視野における金ナノ結晶の分散状態をヒストグラムで表した。

DXT では、測定試料を、基板とするカプトン膜に固定する必要がある。そこでまず、厚さの異なるカプトン膜上で哺乳類培養細胞を接着培養する検討を行った。その結果、7.5 μm 、12.5 μm 、50 μm のいずれの厚さのカプトン膜でも問題なく細胞を接着培養できることが分かった。薄いカプトン膜を用いる方が、測定時のノイズを減らすことができることから、7.5 μm の厚さのカプトン膜を用いることにした。

続いて、調製した抗 nAChR 抗体 Fab' 結合金ナノ結晶による nAChR の標識について検討を行った。番号とグリッドが刻まれたカバーガラス上で筋管細胞を培養して nAChR を含むポストシナプス複合体を形成させ、蛍光標識して nAChR の局在を調べた後、蛍光が観察された部位を走査型電子顕微鏡で観察 (光子電子相関顕微鏡法) し、金ナノ結晶の有無を調べた。その結果、標識された金ナノ結晶の細胞内への取り込みを防ぐために 4 で標識した場合でも、蛍光観察により nAChR の局在が確認された部位で金ナノ結晶が検出され、nAChR を標識できることを確認できた (図 2)。

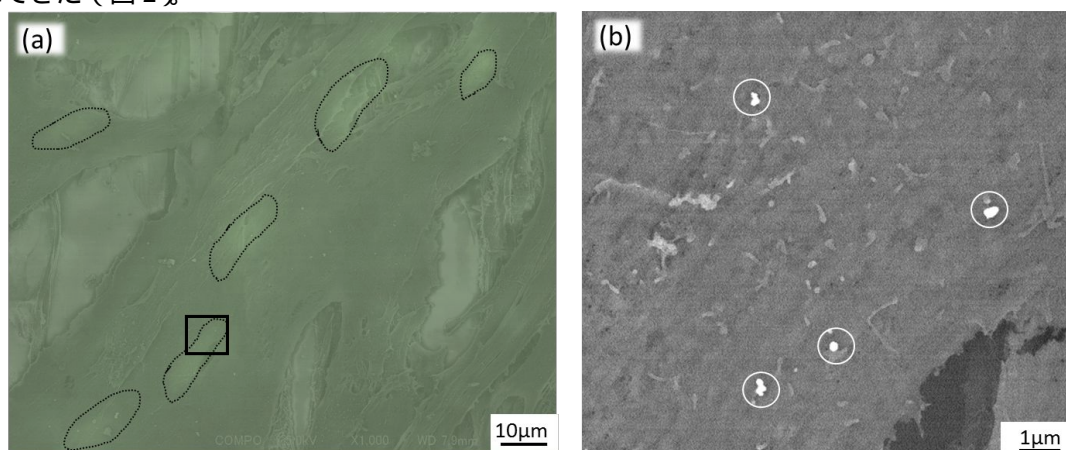


図 2 培養細胞表面 nAChR の光子電子相関顕微鏡観察
(a) 蛍光顕微鏡像と走査型電子顕微鏡像の重ね合わせ。nAChR 由来の蛍光が観察された部位を点線で示した。
(b) 走査型電子顕微鏡像。(a) の黒四角部分を拡大した。金ナノ結晶を白丸で囲った。

また、DXT では、試料に X 線を照射する必要がある。高いシグナルを得るためには高輝度の X 線照射が効果的であるが、強い X 線を照射すると細胞にダメージを与えてしまう可能性がある。そこで、nAChR を金ナノ結晶で標識したカプトン膜上の筋管細胞に、ピンクビーム X 線を照射後、細胞を位相差顕微鏡で観察し、細胞に対するダメージのない X 線照射条件を調べた。その結果、1MGy を超えるような条件 ($E=15.0 \text{ keV}$, $2.5 \times 10^{14} \text{ photon/s}$, ビーム径 $0.2 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm}$, 照射時間 0.1 秒) では、細胞に図 3a のような照射痕が見られた。図 3 では全面に太さ 10 μm 程度の細長い細胞が接着しているが、照射部位の細胞の形状が異なっているために、周囲より明るい色に見える。また、入射 X 線強度を 10^{12} photon/秒 (15 keV) に減らすと照射痕は見ら

れなかったが、金ナノ結晶由来の回折点を高輝度で検出することができなかった。条件検討の結果、温度チャンバーを用いて試料の温度を 4 に保った状態で、50 μm のピンホールを通した X 線 (15.7 keV, 10^{13} photon/sec) を 10 msec で照射することによって (40 kGly 相当) ダメージのない状態で金ナノ結晶の動きに対応する回折点の動きを検出できることが分かった (図 3b)。

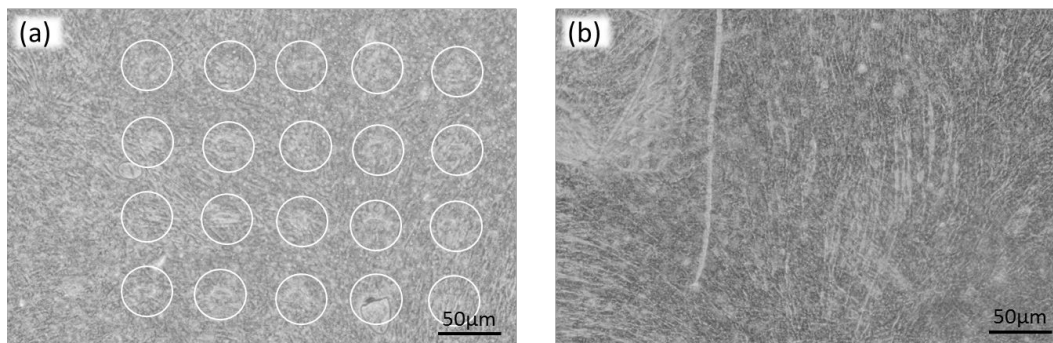


図 3 培養細胞に対する X 線照射条件の検討
(a) 室温で X 線照射後の細胞の位相差顕微鏡像。照射痕を白丸で囲った。
(b) 4 で X 線照射後の細胞の位相差顕微鏡像。

(2) 培養細胞の細胞膜中での nAChR のリガンド依存的な分子内運動の解析

リガンドの結合と解離に伴った nAChR の分子内運動を解析するために、リガンド結合部位を含む nAChR サブユニット細胞外領域の上部部分 (図 4a) に対する抗体を介して、カプトン膜上で接着培養した筋管細胞表面の nAChR を金ナノ結晶で標識した。作動薬であるカルバミルコリンまたはチャネル開口を阻害する毒素である プンガロキシンを添加して X 線を照射し、DXT の解析を行った。その結果、図 4 で示したように、方向の回転運動はリガンドの違いによって差は見られなかった一

方、方向の回転運動は、カルバミルコリン存在下に捉えられた運動が プンガロトキシシン存在下では大きく抑制されていた。カルバミルコリン存在下では、カルバミルコリンの結合と解離により、nAChR が静止状態 活性化状態

脱感作状態を行き来していると考えられる。細胞外領域上部の方向の回転運動が、nAChR の活性化状態の変化に伴う分子の動きであることが明らかになった。この手法は他の創薬のターゲットとなっている多くの受容体やトランスポーターについても適用可能であり、種々の創薬シーズの効果を、生きた細胞を用いて動的に検出できる画期的な手法となる。

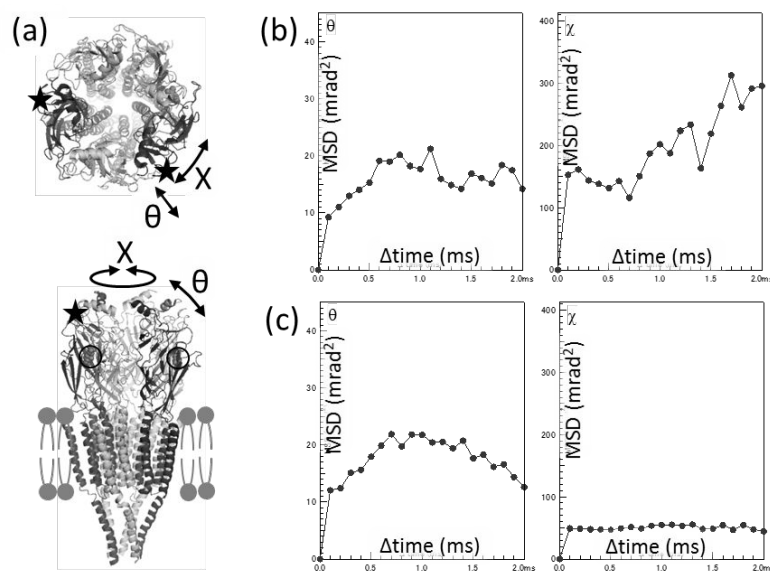


図 4 nAChR のリガンド依存的な分子内運動の解析
(a) nAChR の構造 (top view と side view) と計測した回転の方向。星印: 抗体結合部位。細胞外領域の 3 番目のシートに直結した部分。黒丸: リガンド結合部位。
(b) カルバミルコリン添加時の 方向および 方向の運動の MSD カーブ
(c) プンガロトキシシン添加時の 方向および 方向の運動の MSD カーブ。

(3) 各活性化状態における nAChR の構造解析

シビレエイの電気器官からカラムクロマトグラフィーを行って nAChR を精製し、各種リガンドを添加してインキュベートした。ネガティブ染色を行って透過型電子顕微鏡で観察したところ、リガンド添加後も図 5a のように nAChR は分散して存在することが確認できたため、氷包埋してクライオ透過型電子顕微鏡で画像取得を行った (図 5b)。得られた像を用いて単粒子解析を行ったところ、ニコチンを添加して脱感作状態に固定した場合に、細胞外領域に静止状態では見られない隙間が存在している可能性が示された。隙間は方向の回転運動によって生じたと考えられる。本研究により得られた分子内運動とチャネル開閉運動との関連については、今後さらにチャネルを構成している領域の分子内運動を計測することにより解明されることが期待される。

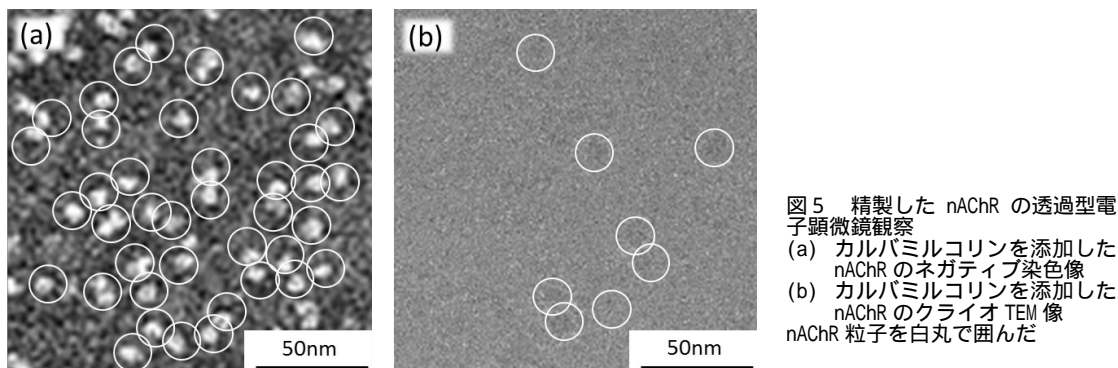


図5 精製した nAChR の透過型電子顕微鏡観察
 (a) カルバミルコリンを添加した nAChR のネガティブ染色像
 (b) カルバミルコリンを添加した nAChR のクライオ TEM 像
 nAChR 粒子を白丸で囲んだ

(4) 金属結合ペプチドタグを用いた生体内金属ナノ結晶形成の検討

本研究課題では、培養筋管細胞を用いて、神経筋シナプスに存在する nAChR の分子内運動解析を行うことに成功した。中枢シナプスに存在する nAChR についても解析を行うために、金属結合ペプチドタグ融合 nAChR を発現する NG108-15 細胞を作製し、細胞表面の金属結合ペプチドタグ融合 nAChR がリガンドと結合できることを確認した。異種発現系でのカチオニックリポソームを用いた一過性の nAChR の発現は困難であったため、nAChR のシャペロンタンパク質である ric3 を IRES 配列とともにプラスミドに組み込み、レトロウィルスベクターを用いて定常的な発現細胞株を作製した。また、構造解析を行うために、金属結合ペプチドタグ融合 nAChR の大腸菌発現系を構築し、カラムクロマトグラフィーを用いて金属結合ペプチドタグ融合 nAChR を SDS-PAGE で単一バンドとして精製することができた。今後、筋管細胞と同様の方法で NG108-15 細胞でも DXT の測定を行い、構造解析の結果と併せてリガンド依存的な分子内運動と nAChR のチャンネル開閉メカニズムについて議論を深めて行くとともに、金属結合ペプチドタグによって形成された金属ナノ結晶を用いた DXT についても実現のために検討を進めたい。

引用文献

Hiroshi Sekiguchi, Yasuhito Suzuki, Yuri Nishino, Suzuko Kobayashi, Yoshiko Shimoyama, Weiyang Cai, Kenji Nagata, Masato Okada, Kouhei Ichiyanagi, Noboru Ohta, Naoto Yagi, Atsuo Miyazawa Tai Kubo, Yuji C Sasaki, Real time ligand-induced motion mappings of AChBP and nAChR using X-ray single molecular tracking, Scientific report, 2014, 6384

5. 主な発表論文等

[学会発表](計5件)

Yukari Noma, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa, Internalized molecular localization of nAChR and MuSK, 19th International Microscopy Congress, 2018 年 9 月 9 日~14 日, International Convention Centre (Sydney, Australia)

Yuri Nishino, Mizuho Kaise, Atsuo Miyazawa, Molecular distribution analysis of nicotinic acetylcholine receptor and MuSK on the cell surface by correlative fluorescent microscopy and cryo-SEM, 19th International Microscopy Congress, 2018 年 9 月 9 日~14 日, International Convention Centre (Sydney, Australia)

大石鴻一郎, 西野有里, 宮澤淳夫, 大腸菌に対する金結晶標識に向けた金処置の影響についての検討, 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会, 2018 年 5 月 29 日~31 日, 久留米シティプラザ (福岡県・久留米市)

野間有加里, 西野有里, 宮澤淳夫, 相関顕微鏡法を用いた nAChR クラスターの分子局在解析, 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会, 2017 年 5 月 30 日~6 月 1 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Yuri Nishino, Mizuho Kaise, Yoshiko Ito, Ayumi Ishihara and Atsuo Miyazawa, Improved observation technique for hydrous specimens by cryo-SEM, The 3rd East-Asia Microscopy Conference, 2017 年 11 月 7 日~10 日, (Busan, South Korea)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。