

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689012

研究課題名(和文) アンキリンによるイオンチャネルの膜上集積機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis for the ion channel anchoring of ankyrinG

研究代表者

藤原 祐一郎 (FUJIWARA, YUICHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：アンキリンGは自身がパルミトイル化され神経細胞や心筋細胞において種々のイオンチャネルを特定の場所に局在化させ膜の電気的興奮基盤を構築している。本研究では、アンキリンG自身のパルミトイル化を受ける領域の結晶構造を酸化・還元の状態を解析し、膜接着の分子動力学計算を行った。その結果、パルミトイル化は膜への接着を安定化することを明らかにした。パルミトイル化されていない状態や酸化状態のアンキリンGも膜近傍に漂うが、安定な接着面を形成しての膜結合は観察されなかった。これらの結果は膜近傍でアンキリンGは準備しており、パルミトイル化されると、固い構造基盤に基づいた膜の電気的興奮基盤を形成することを意味する。

研究成果の概要(英文)：Ankyrin-G (AnkG) configures the membrane-excitation platform by clustering various ion channels in neurons and cardiomyocytes. AnkG itself localizes to the specific areas on the plasma membrane via the s-palmitoylation of Cys. However, the structural mechanism how AnkG anchors to the membrane is not understood. In this study, we solved the crystal structures of the s-palmitoylation domain of AnkG in reduced and oxidized forms of the Cys, and performed the long-term molecular dynamics simulation of the membrane association. Here we report that the s-palmitoylation facilitated the membrane anchoring of AnkG, defining a stable binding interface to the plasma membrane. AnkG without s-palmitoylation was apparently in contact with the membrane but did not have a unique binding interface. These suggest that AnkG is ready to accept the Cys modification in the juxtamembrane region, and, once it happens, constitutes the rigid structural base of the membrane-excitation platform.

研究分野：生理学

キーワード：興奮収縮連関 跳躍伝導 イオンチャネル 構造機能連関 パルミトイル化

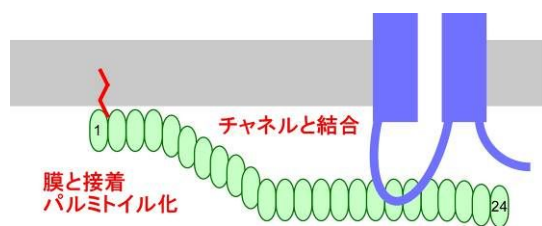
1. 研究開始当初の背景

代表的な興奮性細胞である神経細胞においては、発生した活動電位が軸索上を伝播することにより情報が電氣的に伝達される。活動電位を制御する電位依存性チャンネルやポンプは軸索上にランダム広汎に配置するのではなく、軸索起始部やランビエ絞輪といった特定の部位に限局・集積し、活動電位発生・跳躍伝導といった興奮の伝達に有利に配置が制御されていることが知られている。同様に心筋細胞においても、細胞膜上で電位依存性チャンネルはギャップ結合分子などと共に介在版、T 細管といった特定の部位に集積し、電氣的膜興奮と心筋収縮の連関に有利に配置している事が知られている。また、網膜視細胞では桿体細胞の外節に環状ヌクレオチド活性化型チャンネルが集積し光受容に伴う活動電位発生のトリガー機能を担っていることが報告されている。

しかしながら、これまで細胞の電氣的興奮の舞台上に登場する分子を対象に、その分子構造基盤に基づいて解析した報告は無く、イオンチャンネルの修飾機構の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

イオンチャンネル分子が細胞膜上の特定の部位に限局・集積するためには、裏打ち蛋白であるアンキリン G との相互作用が重要であることがこれまでに明らかにされている。アンキリン分子は、自身が脂質修飾(パルミトイル化)を受けることにより細胞膜上の目的の領域にとどまる事が報告されているが、その原子レベルでの機構は明らかでない。本研究は、チャンネルとアンキリン G との相互作用機構、アンキリン G のパルミトイル化による細胞膜接着機構に対して分子構造の観点から明らかにすることを目的に行われた。



3. 研究の方法

(1) アンキリンの結晶構造解析

アンキリン G 蛋白質、全長、パルミトイル化領域、チャンネル結合領域の発現と精製を行う。精製したアンキリン G 蛋白質の結晶化を行う。出来た結晶は随時 Spring-8 ビームラインにて回折実験を行い、構造を決定する。結晶構造と水溶液中での構造の整合性を動的散乱、CD スペクトラム、ゲル濾過解析を用いて解析する。

(2) 細胞膜接着の分子動学的解析

細胞膜とアンキリン G との相互作用を解析するため分子動力学シミュレーションを行い、膜接着における分子の挙動、動的構造

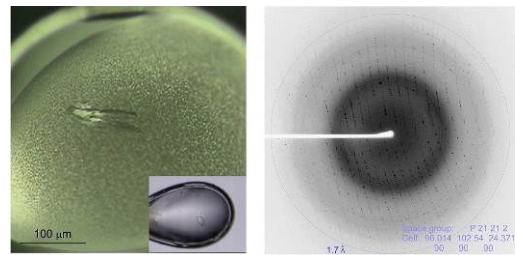
変化を観測する。

(3) 細胞機能との関係

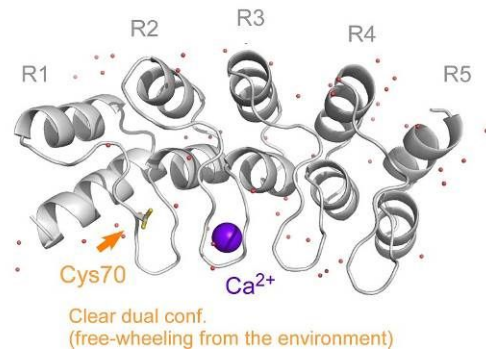
細胞に発現させたアンキリンおよび電位依存性チャンネルの局在と機能を解析する。

4. 研究成果

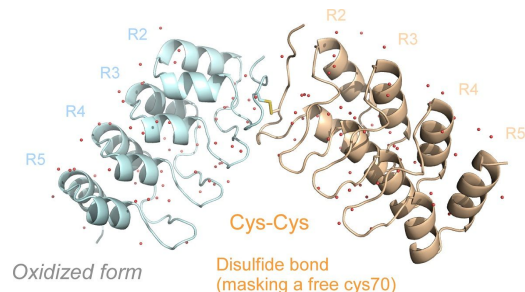
(1) アンキリン G 蛋白質、全長、パルミトイル化領域、チャンネル結合領域の発現・精製に成功した。パルミトイル化領域、チャンネル結合領域の結晶化に成功した。(図はパルミトイル化領域の結晶と 1.62Å の回折像)。

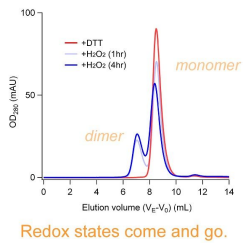


パルミトイル化領域の酸化還元 2 状態での結晶構造の決定に成功した。還元状態の構造は 33 残基の繰り返し配列からなるアンキリンリピートが 5 個連なった状態を呈していた。パルミトイル化修飾を受けるシステイン残基は蛋白質表面に位置し、その側鎖は二つのコンフォメーションを取り自由度が高いことが示唆された。パルミトイル化修飾構造基部の裏側には Ca^{2+} が結合しており、生理機能との関連が示唆される。



酸化状態の構造は 2 つのアンキリン G がジスルフィド結合により結合した状態を呈していた。パルミトイル化修飾を受けるシステイン残基が結合に使われ、酸化状態ではパルミトイル化が生じない事が示された。最初のアンキリンリピートの構造はほどけていた。

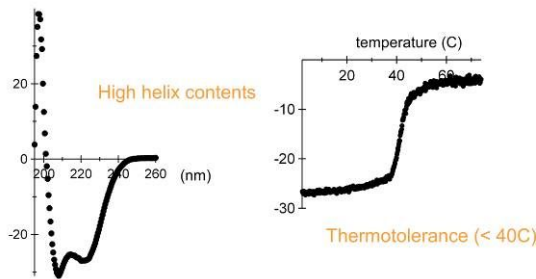




Redox states come and go.

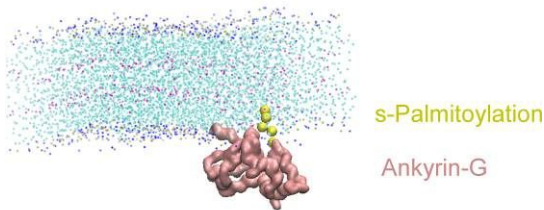
この酸化還元 2 状態の遷移は水溶液中でも生じる反応であることを、ゲル濾過分子量アッセイにて確認した。水溶液中の CD スペクトラムは高い α ヘリックス含

有量を呈し、解かれた構造と相違ない構造であることを確認した。



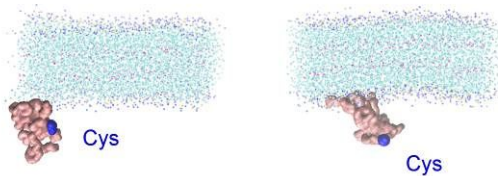
(2) アンキリン G (palmitoylated)、アンキリン G (non-palmitoylated)、アンキリン G (dimer, oxidized) の結晶構造を用いて分子動力学計算を行った。本研究では、1 μ s のシミュレーションを 100 本以上実行する。コンピュータの計算負担を軽減するため粗視化シミュレーションを用いて計算を行った。

Palmitoylation (+)



Stable insertion via palmitoylation

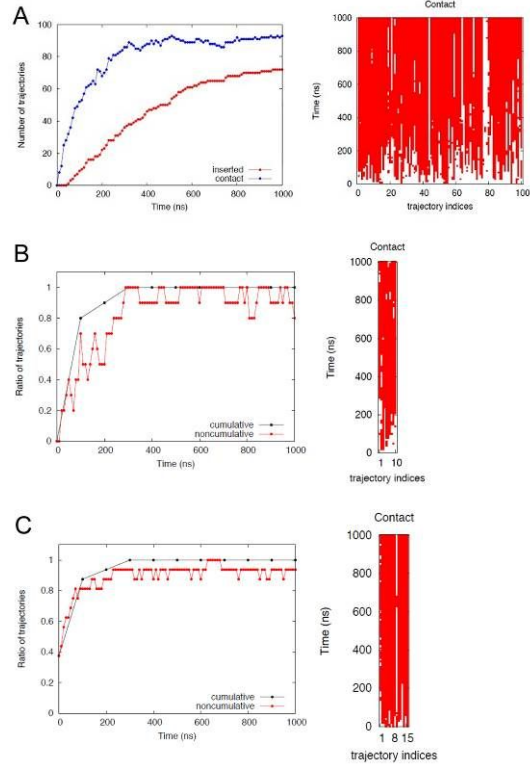
Palmitoylation (-)



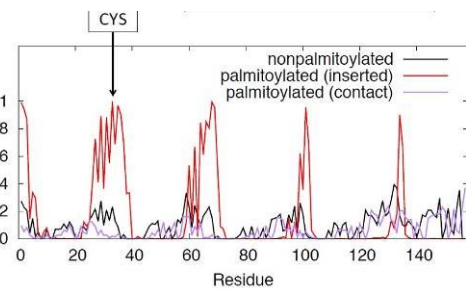
No unique binding interface

アンキリン G (palmitoylated) は接着離脱を繰り返しながら最終的には 100 本中 72 本のシミュレーションでパルミトイル化により膜に安定接着した (図 A)。アンキリン G (non-palmitoylated) は接着離脱を繰り返すのみで、安定接着は生じなかった (図 B)。アンキリン G (dimer, oxidized) も同様に接着離

脱を繰り返すのみで、安定接着は生じなかった (図 C)。



膜と相互作用する残基に突いて解析を行なった。パルミトイル化による膜との安定接着により、アンキリン G (palmitoylated) では、膜と相互作用する残基のピークが観測された。アンキリン G (non-palmitoylated) とアンキリン G (dimer, oxidized) は相互作用する残基のピークが観測されずランダムに膜と接着離脱を繰り返すことが明らかになった。



(3) 相互作用残基に変異を導入させたアンキリン G を海馬の初代培養に発現させ局在を観察した。また、電位依存性 Na チャネルをステーブルに発現させた培養細胞にアンキリン G を発現させ、機能修飾を解析した。

本研究により、アンキリン G が細胞膜に安定接着するためにはパルミトイル化が重要な役割を担うことが明らかになった。アンキリン G はパルミトイル化修飾を受けてない状態でも細胞膜直下に滞在し、いつでもパルミトイル化を受け膜へ接着できる準備状態にあることが示唆された。構造解析から明らかになった Ca^{2+} や酸化還元状態に依存した

修飾機構が、実際の細胞におけるイオンチャネルの局在にどのような影響をもたらすかを検討することが今後の課題となるであろう。

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8件)

Yasushi Okamura, Yuichiro Fujiwara, Souhei Sakata, Gating Mechanisms of Voltage-Gated Proton Channels, Annual Reviews of Biochemistry, 査読有、84巻、2015、in press

Fujiwara Y., Okamura Y. Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels, Current Topics in Membranes, 査読有、74巻、2014、259-292、DOI.10.1016/B978-0-12-800181-3.00010-5

Fujiwara Y., Kurokawa T., Okamura Y., Long α -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H⁺ channel, Journal of General Physiology, 査読有、143巻、2014、377-386、DOI.10.1085/jgp.201311082

Takeshita K., Sakata S., Yamashita E., Fujiwara Y., Kawanabe A., Kurokawa T., Okochi Y., Matsuda M., Narita H., Okamura Y., Nakagawa A., X-ray Crystal Structure of Voltage-gated Proton Channel, Nature Structural & Molecular Biology, 査読有、21巻、2014、352-357、DOI. 10.1038/nsmb.2783

Fujiwara Y., Kurokawa T., Takeshita K., Nakagawa A., Larsson HP., Okamura Y., Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H⁺ Channel, Journal of Physiology, 査読有、591巻、2013、627-640、DOI. 10.1113/jphysiol.2012.243006

Fujiwara Y., Takeshita K., Nakagawa A., Okamura Y., Structural Characteristics of the Redox Sensing Coiled-coil in the Voltage-gated H⁺ Channel, Journal of Biological Chemistry, 288巻、2013、17968-17975、DOI. 10.1074/jbc.M113.459024

Fujiwara Y., Nakagawa A., Okamura Y., Structure and function of dimeric assembly in voltage-gated H⁺ channel, Spring-8 Research Frontiers 2012, 査読有、2012巻、2013、14-15

Fujiwara Y., Kurokawa T., Takeshita K., Kobayashi M., Okochi Y., Nakagawa A., Okamura Y., The cytoplasmic coiled-coil mediates

cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1, Nature Communications, 査読有、3巻、2012、816、DOI. 10.1038/ncomms1823

〔学会発表〕(計18件)

奥田 裕子、米澤 康滋、鷹野 優、岡村 康司、藤原 祐一郎、電位依存性 H⁺ チャネル S4 領域のトリプトファン残基が 2 量体間で協同し脱活性化のキネティクスを遅くする、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 03 月 21 日、神戸

竹下 浩平、坂田 宗平、山下 栄樹、藤原 祐一郎、岡村 康司、中川 敦史、電位依存性プロトンチャネルの結晶構造、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 03 月 21 日、神戸

Yuichiro Fujiwara, Yasushi Okamura, Voltage-gated H⁺ channel dimer: from molecular structure to physiological function, 「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」領域終了記念シンポジウム、2015 年 03 月 6 日、大阪
藤原 祐一郎、岡村 康司、電位依存性 H⁺チャネルのゲート電流、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 09 月 25 日、札幌

藤原 祐一郎、近藤 寛子、城田 松之、小林 恵、竹下 浩平、中川 敦史、岡村 康司、木下 賢吾、イオンチャネルアンカー蛋白質(アンキリン G)の細胞膜接着機構の構造基盤、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 09 月 11 日、横浜
岡村 康司、藤原 祐一郎、川鍋 陽、坂田 宗平、黒川 竜紀、電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1 の動作原理、第 91 回日本生理学会大会(招待講演)、2014 年 03 月 18 日、鹿児島

藤原 祐一郎、岡村 康司、Voltage Sensing Mechanism in the Voltage-Gated H⁺ Channel、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16 日、鹿児島

奥田 裕子、岡村 康司、藤原 祐一郎、電位依存性 H⁺ チャネルのゲーティングに対する S4 領域の構造基盤、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16 日、鹿児島

藤原 祐一郎、黒川 竜紀、岡村 康司、Long α -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H⁺ channel、第 58 回米国生物物理学会大会、2014 年 02 月 19 日、San Francisco(米国)

竹下 浩平、坂田 宗平、山下 栄樹、藤原 祐一郎、川鍋 陽、黒川 竜紀、大河内 善史、松田 真、成田 宏隆、岡村 康司、中川 敦

史、X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF VOLTAGE GATED PROTON CHANNEL、第 58 回米国生物物理学会大会、2014 年 02 月 19 日、San Francisco (米国)

藤原祐一郎、竹下浩平、中川敦史、岡村康司、Structural Characteristics of the Redox Sensing Coiled-coil in the Voltage-gated H⁺ Channel、第 2 回 HD Physiology 国際シンポジウム、2013 年 06 月 28 日 ~ 2013 年 06 月 29 日、東京

藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司、Continuous α -helices of S4 and coiled-coil form the dimer interface in the voltage-gated H⁺ channel、第 2 回 HD Physiology 国際シンポジウム、2013 年 06 月 28 日 ~ 2013 年 06 月 29 日、東京

岡村康司、藤原祐一郎、坂田宗平、河合喬文、筒井秀和、大河内善史、Molecular diversities of voltage sensing: from ion permeation to enzyme、Neuro2013 (招待講演)、2013 年 06 月 20 日、京都

Fujiwara Y., Okamura Y., Crystal Structure of AnkyrinG: the Ion Channel Anchoring Protein、Neuro2013、2013 年 06 月 20 日、京都

藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、小林恵、中川敦史、岡村康司、Regulatory roles of the dimeric structure in the voltage-gated H⁺ channel、第 90 回 日本生理学会大会 (招待講演)、2013 年 03 月 27 日、東京
藤原祐一郎、電位依存性 H⁺チャネルの二量体化による活性制御とその構造基盤、第 3 回 神経科学と構造生物学の融合研究 (招待講演)、2012 年 10 月 04 日、大阪

藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司、電位依存性 H⁺チャネルのゲーティングと構造基盤、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」(招待講演)、2012 年 09 月 06 日、岡崎

藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、中川敦史、岡村康司、電位依存性プロトンチャネルのゲーティングを制御する分子機構、生理研研究所「温熱生理研究会」(招待講演)、2012 年 09 月 04 日、岡崎

〔図書〕(計 1 件)

藤原祐一郎、岡村康司、理化学研究所、脳科学辞典(電子書籍) 分担執筆 「膜電位センサー」、2012、電子書籍(A45 頁分に相当)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：20532980

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：