

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25711004

研究課題名(和文)ヒトにおける温度感知機構の構造生物学

研究課題名(英文)Structural biology of thermosensation in human

研究代表者

日野 智也(Hino, Tomoya)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40373360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物における温度感知は、環境温度の変化に適切に対応する上で不可欠な生理機能である。本研究では、ヒトの温度感知に関わるTRPイオンチャネルについて、その温度感知機構を原子レベルで理解することを目的とし、TRPチャネルの立体構造決定に向けた試料調製手法の確立と、結晶化を促進する抗体の作成に取り組んだ。その結果、9種のヒト由来温度感知型TRPチャネルをメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*で大量発現させることに成功し、GFP-nanobodyを固定化した担体を用いることで、迅速に高純度試料を精製する手法を確立した。さらに、TRPV4については立体構造認識抗体を複数種得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Thermosensation is an essential physiological process for the proper adaptation to the changes in environmental temperature. In this study, to gain insight into the molecular mechanisms of thermosensation operated by TRP ion channels, we challenged to determine the atomic structures of human TRP channels.

We successfully overexpressed 9 thermosensitive TRP channels by employing methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host strain and purified 5 channels by utilizing affinity column that is immobilized GFP-nanobody. In addition, we obtained several monoclonal antibodies that recognize conformational epitopes of TRPV4.

研究分野：構造生物学

キーワード：TRPチャネル イオンチャネル 膜タンパク質 X線結晶構造解析 タンパク質精製 タンパク質発現  
酵母

## 1. 研究開始当初の背景

われわれ人類の体温はおよそ 37 で一定である。この体温がほんの数 変化するだけでも、体内で起こるさまざまな化学反応の平衡を変化させるため、大きな体調変化を引き起こしてしまう。したがって、体温を変化させるような外気温の感知と、それに応じた行動あるいは体温を一定に保つための自律的な生理現象を作動させることは、生命の恒常性を維持する上で極めて重要な意味を持つ。

ほ乳類における温度感知の分子実体は長らく謎であったが、1997年に D. Julius らにより、辛み成分であるカプサイシンの受容体として機能する Transient Receptor Potential Vanilloid family 1 (TRPV1)イオンチャンネルが、43 以上の温度で活性化される温度受容体であることが明らかにされた (M.J. Caterina et al. Nature 1997)。TRPV1 は主に感覚神経終末に特異的に発現する 6 回膜貫通型の非選択的陽イオンチャンネルであり、活性化による細胞外カルシウムの細胞内への流入が引き金となり神経興奮を惹起する。D. Julius らの報告以降、冷温受容体である TRPA1 (Ankyrin family 1) を含む 8 種類の TRP チャンネルファミリーに属するタンパク質が温度感受性を示すことが次々と明らかになった。合計 9 種類の温度感受性 TRP チャンネルは、17 以下の低温から 52 以上の高温まで、ほ乳類が生きていく上で感じ取るべき幅広い範囲の温度を感じ取ることが可能である。

これまでに、温度感受性 TRP チャンネルによる温度感知の分子メカニズムに関する研究は、変異体解析や 1 次配列レベルでの研究が主であった。近年、出芽酵母発現系によって調製した TRPV1 (V.Y. Moiseenkova-Bell et al. PNAS 2008) や TRPA1 (T.L. Cvetkov et al. J. Biol. Chem. 2011) の電子顕微鏡による単粒子解析や、TRPV1 のアンキリンリピートドメインの X 線結晶構造 (P.V. Lishko et al. Neuron 2007) が報告されたが、低分解能であることや部分構造であることなど、現状では極めて限定的な立体構造情報が得られているにすぎない。そのため、TRP チャンネルによる温度感知メカニズムや活性化に伴うイオンチャンネル開孔の動的構造変化など、ヒトによる温度感知機構の原子レベルでの理解にはほど遠いのが現状である。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、抗体を用いた結晶化手法を高度化し、高品質の結晶化が極めて困難であった膜タンパク質の高分解能結晶構造解析に成功した。本技術の優れた点は、モノクローナル抗体 Fab フラグメントを膜タンパク質に結合させることにより、親水性領域の拡張と同時に、膜タンパク質の構造揺らぎを固定化可能なことである。TRP チャンネルは大きな細胞内ドメインを持つ膜タンパク質であるが、細胞外領域は極めて小さいこと、

結晶化時の温度域においてイオンチャンネルの開閉が起こりうるために構造揺らぎが大きく、そのため結晶化困難であることが予想されるが、これらの問題点は本技術を用いることによって克服可能であると考えられる。そこで、本研究課題では、抗体を用いた膜タンパク質結晶化技術を温度感受性 TRP チャンネル群に適用し、その結晶構造を高分解能で解明することにより、ヒトにおける温度感知機構の原子レベルでの理解に資する立体構造基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

9 種のヒト由来温度応答型 TRP チャンネルについて、出芽酵母を用いて最適な発現条件の検討を行う。可溶化に適した界面活性剤を決定したのち、Ni 担体とゲルろ過クロマトグラフィーにより高純度に精製する手順を確立する。精製した TRP チャンネルを抗原としてモノクローナル抗体を作成し、この中から結晶化に適した立体構造認識能を持つ抗体をスクリーニングする。この抗体の Fab フラグメントと TRP チャンネルの複合体について結晶化を試み、X 線結晶構造解析によりその立体構造の解明を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) 酵母を用いたヒト由来 TRP チャンネルの大量発現系構築

ヒト由来 TRP チャンネルのうち、温度に応答して活性化することが明らかとなっている 9 種類について、出芽酵母を発現系とし発現条件の検討を行った。検出を容易にするため、EGFP を融合させて発現させたところ、C 末端への EGFP 融合では多くの TRP チャンネルで微量の発現レベルであったが、EGFP の融合位置を N 末端側に変更することで、すべての TRP チャンネルについて、0.5mg/1L 培養以上の発現量が得られることが分かった。これらの EGFP 融合型 TRP チャンネル遺伝子をメタノール資性酵母 *Pichia pastoris* に導入することにより、さらに高い発現量を得られるようになった。

発現させた TRP チャンネルの可溶化条件検討では、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。一方、TRPV2 と TRPV3 では DDM で可溶化できることが分かった。界面活性剤で可溶化したのち、ゲルろ過で会合状態の分析を行った結果、いずれの場合も 4 量体の分子量に一致する位置に溶出した。TRP チャンネルは 4 量体構造を形成し、イオンチャンネルとして機能することから、機能する状態で可溶化できていることが示唆さ

れた。

## (2) Nanobody を用いた高純度精製手法の確立

酵母で発現させた TRP チャネルの精製では、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。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。TRP チャネルの発現では常に 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、TRP チャネルの精製を試みた。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。

## (3) 立体構造認識抗体の取得

大量に発現可能であり純度よく精製することができたヒト由来 TRPV4 について、Lipid A を含むリポソームに再構成したのちマウスへの免疫を行い、立体構造認識抗体のスクリーニングを行った。その結果、高い親和性を示す立体構造認識抗体を複数クローン取得することに成功した。

## 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 8 件)

Arima J., Shimone K., Miyatani K., Tsunehara Y., Isoda Y., Hino T., Nagano S. “Crystal structure of d stereospecific amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 82F2—insight into the structural factors for substrate specificity”

*FEBS J.*, 283, 337-349 (2016) 査読有

DOI:10.1111/febs.13579

Arakawa T., Kobayashi-Yurugi T., Alguel Y., Iwanari H., Hatae H., Iwata M., Abe Y., Hino T., Ikeda-Suno C., Kuma H., Kang D., Murata T., Hamakubo T., Cameron A. D., Kobayashi T., Hamasaki N., Iwata S.

“Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3”

*Science*, 350, 680-684 (2015) 査読有

DOI:10.1126/science.aaa4335

Kanadani M., Sato T., Hino T., Nagano S., Ozaki S.

“The crystal structure of heme acquisition system A from *Yersinia pseudotuberculosis* (HasA<sub>Ypt</sub>): Roles of the axial ligand Tyr75 and two distal arginines in heme binding”

*J. Inorg. Biochem.*, 151, 26-33 (2015) 査読有

DOI:10.1016/j.jinorgbio.2015.07.007

Nomura N., Verdon G., Kang H. J., Shimamura T., Nomura Y., Sonoda Y., Hussien S. A., Qureshi A. A., Coincon M., Sato Y., Abe H., Nakada-Nakura Y., Hino T., Arakawa T., Kusano-Arai O., Iwanari H., Murata T., Kobayashi T., Hamakubo T., Kasahara M., Iwata S., Drew D.

“Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5”

*Nature*, 526, 397-401 (2015) 査読有

DOI:10.1038/nature14909

Tanabe H., Fujii Y., Okada-Iwabu M., Iwabu M., Nakamura Y., Hosaka T., Motoyama K., Ikeda M., Wakiyama M., Terada T., Ohsawa N., Hato M., Ogasawara S., Hino T., Murata T., Iwata S., Hirata K., Kawano Y., Yamamoto M., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Yamauchi T., Kadowaki T., Yokoyama S.

“Crystal structures of the human adiponectin receptors”

*Nature*, 520, 312-316 (2015) 査読有

DOI:10.1038/nature14301

Suharni, Nomura Y., Arakawa T., Hino T., Abe H., Nakada-Nakura Y., Sato Y., Iwanari H., Shiroishi M., Asada H., Shimamura T., Murata T., Kobayashi T., Hamakubo T., Iwata S., Nomura N.

“Proteoliposome-based Selection of a Recombinant Antibody Fragment Against the Human M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor”

*Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 33, 378-385 (2014) 査読有

DOI:10.1089/mab.2014.0041

Sato N., Ishii S., Sugimoto H., Hino T., Fukumori Y., Sako Y., Shiro Y., Toshi T.

“Structures of reduced and ligand bound nitric oxide reductase provide insights into functional differences in respiratory enzymes”

*Proteins*, 82, 1258-1271 (2014) 査読有

DOI:10.1002/prot.24492

Hino T., Iwata S., Murata T.

“Generation of functional antibodies for mammalian membrane protein crystallography”

*Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23, 563-568 (2013) 査読有

DOI:10.1016/j.sbi.2013.04.007

[学会発表](計 36 件)

川越 雄斗、落合 晶也、三牧 祐哉、旦野 智也、永野 真吾

ヒト由来 TRPM8 の立体構造解析に向けた高純度精製試料調製の検討

第 88 回日本生化学会大会

2015 年 12 月 2 日

神戸ポートアイランド(神戸)

神野 晃弘、永野 真吾、日野 智也  
ヒト由来 TRPV1 イオンチャネルの構造  
生物学研究に向けた N 末端欠損変異体  
の発現および精製  
第 88 回日本生化学会大会  
2015 年 12 月 2 日  
神戸ポートアイランド (神戸)  
宮内 祐輝、浦川 典子、日野 智也、大  
城 隆、永野 真吾  
アルカン水酸化反応を触媒する酵素  
AlkB の結晶化に向けた精製条件検討  
第 88 回日本生化学会大会  
2015 年 12 月 2 日  
神戸ポートアイランド (神戸)  
田辺 弘明、元山 かん奈、池田 真理子、  
脇山 素明、寺田 貴帆、大沢 登、保坂 俊  
彰、羽藤 正勝、藤井 佳史、中村 祥浩、  
小笠原 諭、日野 智也、村田 武士、岩  
田 想、岩部 - 岡田 美紀、岩部 真人、  
平田 邦生、河野 能顕、山本 雅貴、染  
谷 友美、白水 美香子、山内 敏正、門  
脇 孝、横山 茂之  
アディポネクチン受容体の X 線結晶構  
造解析  
第 15 回日本蛋白質科学会年会  
2015 年 6 月 24 日  
あわぎんホール (徳島)  
Tomoya Hino, Yuki Miyauchi, Noriko  
Arakawa, Takashi Oshiro, and Shinzo  
Nagano  
Expression and purification of alkane  
monooxygenase from Rhodococcus sp.  
H-3  
Metals in Biology in Wako  
2015 年 6 月 16 日~17 日  
理化学研究所 (和光市)  
金谷 雅弘、日野 智也、水谷 正治、永  
野 真吾  
植物ホルモン「ブラシノステロイド」生  
合成の律速酵素 CYP90B1 の結晶構造解  
析  
日本生物物理学会第 7 回中国四国支部  
大会 2015 年 5 月 31 日  
徳島大学常三島キャンパス (徳島)  
浜本 春香、日野 智也、八木 寿梓、鈴  
木 宏和、永野 真吾、大城 隆  
ジベンゾチオフェンモノオキシゲナー  
ゼ (TdsC) の立体構造解析と機能改変  
日本農芸化学会 2015 年度大会  
2015 年 3 月 26 日~29 日  
ホテルグランヴィア岡山 (岡山)  
金谷 雅弘、水谷 正治、日野 智也、永  
野 真吾  
植物ホルモン「ブラシノステロイド」生  
合成に関するヘム酵素 CYP90B1 の X  
線結晶構造解析に向けた精製及び結晶  
化  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 16 日  
京都国際会館 (京都)

財津 俊彦、日野 智也、浅水 俊平、尾仲  
宏康、永野 真吾  
インドロカルバゾール骨格形成の鍵酵  
素 StaD の活性部位領域の発現と機能解  
析  
第 13 回日本蛋白質科学会  
2013 年 6 月 12 日~14 日  
とりぎん文化会館 (鳥取)  
高椋 勇樹、末永 敦、水谷 健二、日野 智  
也、岩田 想、村田 武士  
アデノシン A2A 受容体の結晶構造に基  
づいた新規阻害剤の創出  
第 86 回日本生化学会大会  
2013 年 9 月 13 日  
パシフィコ横浜 (横浜)

〔図書〕(計 4 件)

日野 智也、岩田 想、村田 武士  
改変型 CBB を用いた新規 Clear Native  
電気泳動法  
生物物理化学, 58, 18-20 (2014)  
日野 智也  
急加速する GPCR の構造生物学研究  
ファルマシア, 50, 857-861 (2014)  
日野 智也、岩田 想、村田 武士  
機能性抗体を用いたアデノシン A2A 受  
容体の結晶構造解析  
日本結晶学会誌, 55, 103-109 (2013)  
日野 智也、松本 悠史、當舎 武彦、杉  
本 宏、永野 真吾、城 宜嗣  
一酸化窒素還元酵素の結晶構造と呼吸  
酵素の分子進化  
化学と生物, 51, 679-685 (2013)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: アゴニストの親和性を亢進する抗ヒト  
アデノシン A2a 受容体モノクローナル抗体  
発明者: 小笠原 諭、日野 智也、島村 達郎、  
荒川 孝俊、万木 貴美、寿野 千代、村田 武  
士、小林 拓也、岩田 想  
権利者: 国立研究開発法人科学技術振興機構  
種類: 特許  
番号: 特許第 5750700 号  
取得年月日: 2015 年 5 月 29 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~bioeng/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 智也 (Hino, Tomoya)  
鳥取大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 40373360