

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670105

研究課題名(和文)天然膜中におけるイオンチャネルの構造動態解析

研究課題名(英文)Analysis of dynamical structures of ion channel in native membrane

研究代表者

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：20311201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、天然膜中におけるCa²⁺放出チャネル(リアノジン受容体：RyR)の構造解析を、Zernike位相差クライオ電子顕微鏡トモグラフィー(ZPC-cryoET)を用いて行い、その動的な構造および周辺機能分子との動態を明らかにすることを試みた。ウサギ骨格筋よりRyRの活性を保った状態で筋小胞体を抽出し、これをZPC-cryoETで解析した結果、筋小胞体膜上にRyRの大きな膜外構造が観察された。これに既知のRyRのマップを当てはめることで天然膜中でのRyRの構造を同定することができた。今後、さらに分解能を上げることにより、その動的構造や周辺分子との動態を解明する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to analyze the structure of Ryanodine receptor (RyR), Ca²⁺ release channel in native sarcoplasmic reticulum (SR) membrane using Zernike phase contrast cryo-electron tomography (ZPC-cryoET), and to reveal the dynamics and the associations with cooperative molecules. SR purified with a mild condition where RyR kept the enzymatic activity showed the large protrusive density on the membrane surface. The density showed a regular square shape representing the homo-tetramer structure of RyR. A cryo-electron microscopy map of RyR was well fitted into the density, suggesting that it was the RyR structure in the native membrane. Currently, the resolution is limited. Collecting and averaging more data will improve the resolution in the future, enabling to reveal the dynamical structure and associations with cooperative molecules.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 クライオ電子顕微鏡 イオンチャネル トモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルの開閉機構の構造学的研究は、X線、NMR、電子顕微鏡(電顕)、分光法等によって行われてきたが、チャネルタンパク質を可溶化・精製してその分子のみを取り出し、これを結晶化したり人工膜に再構成したりする形で進められて来た。しかし、これらの方法では、すでにチャネル分子の環境が天然からはかなりかけ離れており、実際の構造変化をどの程度反映しているかどうかを判断することができない。一方、最近利用されるようになってきたクライオ電子顕微鏡トモグラフィーは、チャネルタンパク質を含む生体膜をそのまま三次元的に画像化することができる。しかし、試料の電子線損傷の問題から十分なSN比を稼ぐことができず、分解能をあまり上げることができなかった。この問題に一石を投じるべく、報告者が所属する生理学研究所では、約15年前から永山國昭教授が中心となりカーボン薄膜による電子顕微鏡用Zernike位相板の開発を進めてきた。そして、このZernike位相板を電顕の対物絞りの位置に挿入することにより、透過光と散乱光とを干渉させて、氷包埋などの無染色試料において、制限された電子線照射量でも十分なコントラストを得ることに成功した(Murata et al. Structure 2010)。本研究では、この最先端の位相差クライオ電子顕微鏡トモグラフィーを用いて、天然の膜内に埋まったチャネル蛋白質の構造変化を観察することを試みる。そして、得られた三次元画像をさらに多変量解析により分類して平均化することにより、個々のチャネル分子の揺らぎや周辺分子の相互作用も含めた自然に近い状態の真の構造を明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

イオンチャネル開閉の分子機構は、チャネルタンパク質を可溶化・精製して、人工膜に再構成する方法で研究が進められて来た。これに対して報告者は、国内唯一の位相差クライオ電子顕微鏡トモグラフィーを使って、イオンチャネルの開閉に伴う構造変化を天然の膜中で一分子ごとに可視化し、これを統計学的に処理して構造解析する方法を提案する。その研究対象として、本研究では骨格筋の筋小胞体膜に存在するCa²⁺放出チャネル(リアノジン受容体)を小胞ごと活性が保たれた状態で抽出し、Zernike位相板を使って像コントラストを高めてクライオ電子顕微鏡トモグラフィーを行い、三次元再構築する。そして、個々のチャネル分子像を抽出して多変量解析により分類・平均化し、天然の膜中における揺らぎも含めたイオンチャネルの構造変化と、周囲の機能分子の動態を合わせて構造解析する。

3. 研究の方法

本研究計画では、筋小胞体膜中でのリアノジン受容体の構造解析を小胞ごと安定に取り出して、これを位相差クライオ電顕トモグラフィーで立体再構成し、可視化された個々のチャネル分子を多変量解析により分類して平均化する。この操作をチャネルを開口させた膜小胞膜についても行い、天然の膜中でのチャネルの開閉に伴う構造変化をその揺らぎも含めて解析する。さらに、周辺でリアノジン受容体と協調的に働く機能分子についてもその構造動態を解明する。本研究を遂行するため、以下の5つの課題を設定し研究分担者と協力してこれを行う。

(1) 筋小胞体膜の抽出とリアノジン受容体の活性測定

報告者の研究グループはこれまでに骨格筋の興奮収縮連関の現場であるトライアド膜断片を、そこに多数含まれるCa²⁺放出チャネル(リアノジン受容体)と電位依存性Ca²⁺チャネル(ジヒドロピリジン受容体)の活性を十分に保ったままウサギ骨格筋より抽出することに成功している(Murata et al. BBRC 2001)。この方法を応用し、筋小胞体膜断片を安定に抽出する。そして、膜試料中のリアノジン受容体の活性をラジオアイソトープで標識されたリアノジンの結合活性で測定し、また同時にその電顕像も参考にしながら、最も活性が保持されかつ膜形態が維持されている試料調製を検討する。

(2) 筋小胞体膜の位相差クライオ電顕トモグラフィー

課題1で安定に抽出された筋小胞体膜を直ちに生理研に移送し、これを液体エタン中で急速凍結して、電顕グリッド上に氷包埋する。次に、これらの凍結試料を位相差クライオ電子顕微鏡にクライオ試料ホルダーを使ってセットし、リアノジン受容体が集積した筋小胞体を見つけてその連続傾斜像を2°間隔で±70°の範囲で撮影する。撮影にはZernike位相板を対物レンズの後焦点面に挿入して、少ない電子線量でも十分な像コントラストが得られるように調整する。以上、このようにして後の解析に十分な数の傾斜像を収集する。

(3) リアノジン受容体サブトモグラムの解析

課題2で取得した筋小胞体膜の連続傾斜像からIMODソフトウェア(Kremer et al. 1996)を使って三次元再構成を行う。そして、それぞれの三次元トモグラムからリアノジン受容体のサブトモグラムを切り出し、既知のリアノジン受容体の電顕マップ(EMDB: EMD-1274)を初期モデルとしてアライメントを繰り返す、平均化する。十分にアライメントされたリアノジン受容体のサブトモグラムをEMAN2ソフトウェア(Tang et al. 2007)

を使って多変量解析し、分類して平均化する。この操作により個々のチャンネル分子の揺らぎに起因する微細な構造変化を解析する。

(4) リアノジン受容体の開口に伴う構造変化の解析

チャンネルを開口させた試料の作製では、抽出された筋小胞体膜試料に Ca^{2+} とリアノジンを加え 20 で 2 時間反応させる。これまでのデータから、この条件でほぼすべてのリアノジン受容体が開口状態に移行すると考えられる。このリアノジン受容体の開口試料を課題 2~3 と同じ方法で、試料作製、データ収集、データ解析して、チャンネルが開口した状態のリアノジン受容体の構造をその揺らぎも含めて解析する。得られた構造を先に解析した閉口状態のリアノジン受容体の構造と比較して、チャンネルの開口に伴う構造変化の詳細を明らかにする。また、これまで報告されている界面活性剤で可溶化したリアノジン受容体の単粒子構造解による開閉構造のモデルとも比較して、その違いを考察する。

(5) リアノジン受容体周辺機能分子の動態解析

リアノジン受容体と直接的および間接的に相互作用する蛋白質としては、筋小胞体内でカルシウムを保持しているカルセクエストリン、活性を調節する FKBP-12、カルモジュリン、ミツグミンなどが知られている。また、トライアド膜を形成する部分にはこれに加えて、ジャンクチン、トライアジンなどがあり、これら多くの周辺機能分子がリアノジン受容体と協調的に存在している。天然膜からの直接の構造解析では、これらの周辺分子の動態も合わせて解析できることが大きなメリットである。前述の方法で得られたリアノジン受容体のサブトモグラムには、リアノジン受容体と相互作用するこれら機能分子の構造も含まれているので、サブトモグラムの周辺構造も含めて分類・平均化することで探索し、チャンネルの開閉においてこれらの分子がどのように機能に関与しているかを構造学的に明らかにする。すでに X 線結晶解析や NMR など構造が解かれている分子については、その原子モデルを PDB からダウンロードして、先に解析されたサブトモグラムのクラス平均像にフィットさせる。このようにして、リアノジン受容体の天然膜中の構造に加えて、その周辺機能分子の動態も分子レベルで合わせて解析することができる。

4. 研究成果

(1) 筋小胞体膜の抽出とリアノジン受容体の活性測定

Mitchel et al. (1983, JCB 96: 1008) の方法をもとにしてウサギ骨格筋より抽出した膜断片のうち、RyR1 が最も多く含まれる画

分にリアノジンを結合させてその結合活性を測定した。その結果、十分なリアノジンの結合活性が得られた。この画分をクライオ電子顕微鏡で観察したところ、RyR1 と考えられるサイズの膜タンパク質を膜断片上に観察することができた (図 1)。

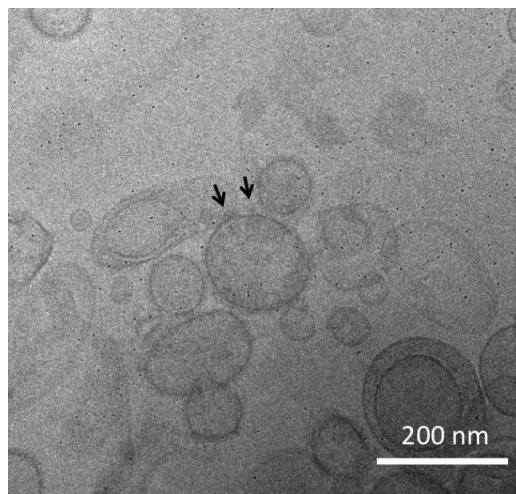


図 1 筋小胞体膜上のリアノジン受容体 (矢印) のクライオ電子顕微鏡像。

(2) 筋小胞体膜の位相差クライオ電顕トモグラフィ

図 1 の筋小胞体膜を位相差クライオトモグラフィで解析したところ、小胞膜上に RyR1 に特徴的なマッシュルーム状の膜外部分を確認することができた (図 2)。

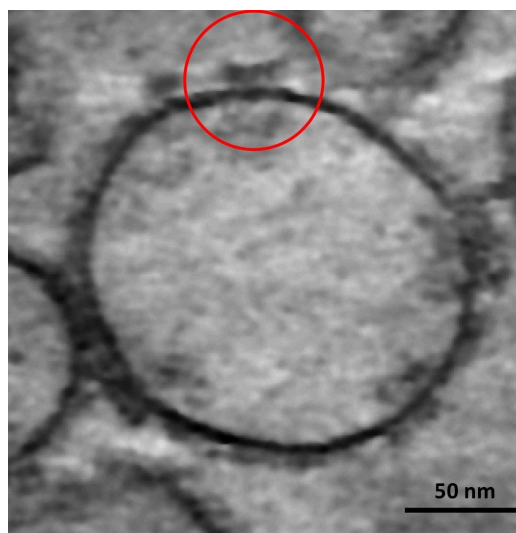


図 2 筋小胞体膜上のリアノジン受容体 (赤円) の位相差クライオトモグラフィ-Z スライス像。

(3) リアノジン受容体サブトモグラムの解析

前述のトモグラムからリアノジン受容体と考えられる領域を切り出し、これに 4 回回転対称を仮定すると、リアノジン受容体のホモテトラマー構造に近い像を得ることができた (図 3)。

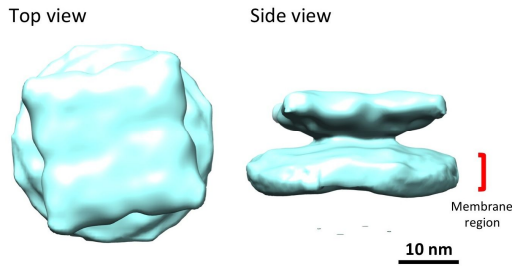


図 3 リアノジン受容体と考えられる領域に 4 回回転対称を仮定。

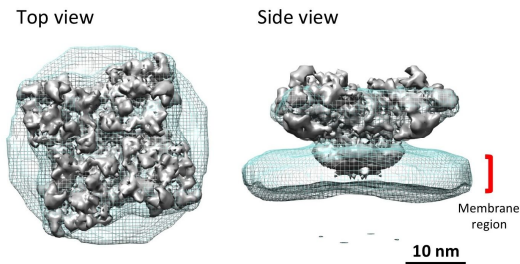
(4) リアノジン受容体の開口に伴う構造変化の解析

抽出した筋小胞体に Ca^{2+} とリアノジンを加え 20 で 2 時間反応させたあと、同様に急速凍結して、位相差クライオ電顕トモグラフィで解析を試みたが、試料の中にリアノジン受容体を含む小胞を見つけることが困難で構造解析に至らなかった。

(5) リアノジン受容体周辺機能分子の動態解析

発見できたリアノジン受容体のサンプルの数が少なく、リアノジン受容体が存在する領域のサブトモグラムの平均化までできなかったため、確実な周辺構造を同定することはできなかった。ただ、リアノジン受容体の部分については、EMDB からの単粒子構造解析マップ (EMD-2752) をフィッティングすることにより、受容体の天然膜中での位置を同定することができた (図 4)。

図 4 リアノジン受容体の領域に単粒子電子顕微鏡解析マップ (EMD-2752) をフィッティング。



本研究により骨格筋筋小胞体天然膜中におけるリアノジン受容体を同定することができた。今後さらに研究を進めることにより、その開口構造や周辺機能分子の動態構造を明らかにできると考えられる。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

村田和義、國安明彦 (2015.11.18) 天然膜中におけるイオンチャネルの構造動態解析・SSSEM 研究部会 & 生理研研究会合同ワークショップ・岡崎コンファレンスセンター (愛知・岡崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)
生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授
研究者番号: 20311201

(2) 研究分担者

國安 明彦 (KUNIYASU, Akihiko)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号: 90241348