

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19687006
 研究課題名（和文）
 結晶構造解析による感覚受容体の作動機構の解明
 研究課題名（英文）
 Crystallographic analyses of functional mechanisms of sensory receptors
 研究代表者
 山下 敦子 (Yamashita Atsuko)
 独立行政法人理化学研究所・分子シグナリング研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：10321738

研究成果の概要（和文）：感覚受容体である TRP チャンネルのうち、機械刺激受容チャンネルについて、構造的に安定な細胞内ドメインを見いだし、そのドメインが機械刺激を受容したチャンネル活性に重要な領域であることを同定した。さらに、その領域について X 線結晶構造解析による立体構造解析を行い、ドメイン中のいくつかの領域の結晶を得て構造決定に向けた X 線回折強度データを収集するとともに、その中の 1 つの領域の結晶構造を決定した。

研究成果の概要（英文）：We identified a structurally-stable cytosolic domain of a mechanosensitive TRP channel, and found that the domain is a crucial region for its mechanosensitive channel activity. Structural analysis of the domain was performed by X-ray crystallography. A couple of regions in the domain were successfully crystallized and their X-ray diffraction data were collected. Among them, crystallographic structure of one region was determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 ・ 構造生物化学

キーワード：TRP チャンネル、機械刺激受容チャンネル、結晶構造

1. 研究開始当初の背景

視・聴・触・味・嗅覚などの感覚は、生命活動を維持して行く上で必要な外界からの情報を受容し、その変換・統合・処理を行うという、生物にとって重要な機能である。この感覚受容の第一段階、すなわち「我々は外界をどのように認識するのか」という問題は、外界からの刺激を受容する最前線の受容体

タンパク質が、ある化学物質をいかに認識するか、機械刺激にいかに反応するかという問題として、分子のレベルでアプローチすることが可能である。そしてそのメカニズムを知るためには、受容体の原子レベルでの立体構造情報が大きな手がかりとなる。すなわち、受容体とリガンドの結合様式を立体構造から明らかにする、異なる状態での受容体の構造から動作機構を考察する、などの構造学

生物学的アプローチが極めて重要である。

感覚受容については分子生物学的・生理学的解析により、情報伝達経路の配線図や関与するタンパク質などが徐々に明らかになってきていた。しかしながら、その全貌はまだ明らかではなく、さらに分子レベルでのメカニズムとなるとかなりの部分が未解明であった。特に研究開始当初は感覚受容体群の立体構造情報はほとんど得られておらず、この分野で分子メカニズムの理解が進んでいないことの一因となっていた。

感覚受容体の一例である TRP チャネルは、特定の温度域でチャネルが開く温度受容体や浸透圧受容体など、真核生物の主要な機械刺激受容体の一つとして機能している。また味覚受容体である酸味受容体など、化学受容体としての機能を持つものも多い。さらに、TRP チャネルの中には、他の感覚受容体から伝達された情報を受けイオンを透過させる、細胞内情報伝達経路の一員として機能しているものもある。これらの TRP チャネルについては、一部の細胞内ドメインのみの結晶構造や電子顕微鏡による二次元像の他には立体構造に関する情報が得られていなかった。類似のタンパク質の構造もわかっておらず、結晶構造が報告されている原核生物の機械受容チャネルとは全く相性がないため、TRP チャネルがどのようにして外界からの刺激を感じしチャネルを開くのか、その機能のメカニズムの詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、X 線結晶構造解析によって感覚受容体の原子レベルでの立体構造を明らかにし、得られた構造情報からそれらの受容体が機能するメカニズムを解明することを目的とした。具体的には、感覚受容体の 1 つである TRP チャネルの結晶構造を解明し、同じ試料について機能実験を行って、得られた結果を統合し感覚受容の分子機構を解明する基盤となる知見を得ることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 発現スクリーニング

各種生物種由来 TRP チャネル遺伝子、および既知の TRP チャネル配列をもとにデータベース検索にて見いだした TRP チャネルホモログ遺伝子について、N 末端 GFP 融合体または C 末端 GFP 融合体として発現する大腸菌発現用プラスミドを構築した。これら大腸菌を用いて発現し、菌体を破碎して得た粗抽出液を SDS-PAGE の in-gel 蛍光検出および蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーにて分析して、各遺伝子の発現を確認した。

(2) 出芽酵母による発現局在解析

TRP チャネルを C 末端 GFP 融合体として発

現する出芽酵母発現プラスミドを構築した。これを出芽酵母を用いて発現し、発現細胞を酵母液胞マーカーである CMAC を用いて染色した後、共焦点顕微鏡にて観察した。

(3) 出芽酵母を用いた機能解析

TRP チャネル全長および C 末端欠損変異体の出芽酵母発現プラスミドを構築した。これを用いて、エクオリン発現プラスミドとともに、出芽酵母の内在性浸透圧感受性チャネル *yvc1* 欠損変異株に形質転換し、エクオリンと共発現させた。発現細胞に発光基質セレンテラジンを導入し、細胞を含む培養液に 2.5 M ソルビトールを添加することによって浸透圧ショックを与え、細胞内カルシウム濃度変化をカルシウム-エクオリンアッセイにより発光測定した。

(4) 試料の大量発現および精製

結晶化用試料調製としては、TRP チャネル C 末端ドメインを GST 融合タンパク質として発現する大量発現用プラスミドを構築し、大腸菌を用いて大量発現を行った。得られた大腸菌を破碎し、粗抽出液をグルタチオンカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、GST を切除し、イオン交換クロマトグラフィーを行って精製標品を得た。セレノメチオニン化試料は、最小培地にセレノメチオニンおよびその他の各種アミノ酸を添加した培地を用いて大腸菌を発現し、得られた菌体から同様に精製した。

(5) 構造解析

精製 TRP チャネル C 末端ドメインおよび化学合成によって得た C 末端ペプチドを用いて、蒸気拡散法により結晶化を行った。得られた結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL26B1 または BL26B2 にて X 線回折強度データの収集を行った。セレノメチオニン化試料を用いて得られた結晶については、セレンの吸収端近傍の波長でのデータ収集 (C 末端ドメイン結晶については 1 波長、ペプチド結晶については 3 波長) を行った。C 末端ペプチド結晶の位相決定は、多波長異常分散法にて行った。得られた位相を用いて立体構造モデルを構築し、構造の精密化を行った。

4. 研究成果

(1) 安定発現する細胞内ドメインの同定

本研究課題では、機械刺激受容体の代表として、特に酵母由来の浸透圧感受性チャネルに着目し、発現解析を行った。まず、出芽酵母由来チャネルの配列をもとにデータベース検索し、別の酵母または真菌よりホモログ遺伝子を見いだして、このうち 5 遺伝子を新たにクローニングした。これら 5 遺伝子およびすでに別の研究者らによってクローニングされていた 3 遺伝子の合計 8 遺伝子について、それぞれ N 末端または C 末端 GFP 融合体として発現する大腸菌用発現ベクターを構築し、大腸菌での発現を行った。発現細胞の SDS-PAGE を行い、GFP 由来蛍光の in-gel 蛍光検出を行って発現

の確認を行ったところ、これらのうちのほとんどのタンパク質は、N末端またはC末端 GFP 融合体ともに、GFP と同等の分子量(約 30kDa)での発現しか確認できなかった。このことから、これらのチャネルタンパク質は、大腸菌の細胞内で極めて分解を受けやすく、全長はもちろん部分発現も得られないことが判明した。しかしながら、新たにクローニングしたホモログタンパク質のうち、赤カビ病菌由来の 1 種については、C 末端 GFP 融合体として発現したときのみ、約 50kDa 程度あるいはそれより小さい複数のバンドが検出された。このことから、このホモログについては、構造的に安定と考えられるあるまとまった構造単位での発現が見られることが明らかになった。また、同じ試料について蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った結果、単分散の様相を示したことから、この領域が構造解析に適した良好な性質を持つことを確認した。

この試料について、His タグ精製およびイオン交換クロマトグラフィーを行って部分精製し、各フラクションの N 末端分析を行って、目的のタンパク質の発現部位を同定した。その結果、発現が見られた領域は、この試料の C 末端 155 残基領域にあたることを確認した。(学会発表 1)

(2) TRP チャネルホモログの機能同定-発現部位の同定

上記(1)にて構造的に安定な C 末端ドメインを持つことが判明した赤カビ病菌由来試料は、新規にクローニングした機能未知遺伝子であったため、まず同試料の機能の同定を行った。

GFP 融合体を出芽酵母で発現させ、共焦点顕微鏡で観察した結果、既知の出芽酵母由来チャネルと同様に、本研究で見いだした赤カビ病菌由来のものについても、液胞膜に発現が見られることを確認した。

(3) TRP チャネルホモログの機能同定-チャネル活性の確認

既知の出芽酵母由来チャネルは、細胞外部より浸透圧を加えると、液胞膜に伝わる張力変化によりチャネルを開き、液胞内に蓄えられているカルシウムイオンを細胞内に放出する機能を持つことが報告されていた。本研究でクローニングした赤カビ病菌由来試料が同様の機能を持つかどうかを、出芽酵母に発現させ、確認した。

内在性浸透圧感受性チャネル欠損変異株に赤カビ病菌試料を発現させた出芽酵母細胞に浸透圧ショックを与えたところ、細胞内カルシウム濃度上昇が見られた。この結果から、この試料は浸透圧を感受して陽イオンを透過させるチャネル活性を持つことが示された。さらに、発現実験で見いだした C 末端

155 残基領域を欠失させたものについて同じ実験を行ったところ、浸透圧ショックを与えても全く細胞内カルシウム濃度変化が見られなかったのに対し、その約半分の領域にあたる C 末端 79 残基のみを欠失させたものについては、野生型とほぼ同程度の細胞内カルシウム濃度上昇が見られることがわかった。このことから、本研究にて見いだした C 末端ドメイン、特に同ドメインの N 末端側半分の領域は、浸透圧を感受したチャネル活性に必須の領域であることを見いだした。

(4) 試料調製条件の確立

以上の結果をもとに、赤カビ病菌由来浸透圧感受性チャネルの C 末端領域の結晶構造解析に向けた試料の大量調製を行った。

まず C 末端 155 残基について発現・精製を行った。精製試料のゲルろ過分析を行った結果、精製試料は四量体をとることを示唆する結果を得た。しかしながら、この試料を用いて結晶化条件の探索を行ったが、結晶を得ることはできなかった。

この 155 残基領域の NMR 測定を行った結果、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルから、この領域に二次構造をとらないランダムコイル領域が多く含まれることを見いだした。さらに二次構造予測を行った結果、この領域の C 末端側半分は明確な二次構造が予測されない一方、N 末端側半分はいくつかの二次構造を有していることが示唆された。

これらの結果を受けて、結晶化に用いる試料を、ドメイン全体から、浸透圧感受性チャネル活性に必須である同ドメインの N 末端側半分の領域に絞り込み、大腸菌を用いた発現系を構築して、精製条件を確立した。その結果、1 L の培養から約 5 mg の精製標品を得る系を確立した。精製試料のゲルろ過分析を行った結果、精製試料は同じく四量体をとっていることを示唆する結果を得た。

(5) X 線結晶構造解析

(4)にて得られた精製試料を用いて結晶化条件の探索を行った。その結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤に用いた条件で、板状結晶が得られることを見いだした。

得られた結晶について、SPRING-8 のビームライン BL26B1 または B2 にて X 線回折実験を行った。その結果、この結晶は正方晶系に属すことを確認した。そして、2.4 Å 分解能の回折強度データを収集した。さらに、構造決定のために必要なセレンメチオニン化試料についても結晶化を行い、野生型と同様の結晶を得ることに成功した。この結晶についても X 線回折強度データ収集を行い、セレン吸収端にあたる波長 0.979 Å の X 線を用いて、3 Å 分解能の回折強度データを収集した。

さらに、二次構造予測から同領域の中でもさらに安定な立体構造が予測された 21 残基部分について、化学合成ペプチドを用いて結晶化条件の探索を行った。その結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤に用いた条件で、棒状結晶が得られることを見いだした (図)。



図：21 残基ペプチドの結晶。

この結晶について SPring-8 のビームライン BL26B1 または B2 にて X 線回折実験を行った。その結果、この結晶は正方晶系で空間群 $P4_3$ に属することを確認し、1.4 Å 分解能の回折強度データを収集した。さらに、セレンメチオニン化ペプチドを用いて同様に結晶化し、得られた結晶を用いてセレン吸収端にあたる波長 0.979 Å 近傍の 3 波長にてそれぞれ 2 Å 分解能の回折強度データを収集した。

得られたデータをもとに多波長異常分散法を用いて位相を決定し、電子密度を計算して立体構造モデルの構築を行った。その結果、自動モデリングソフトを利用して、21 残基全領域を含む立体構造モデルの構築に成功した。得られた立体構造モデルの精密化を行い、 R 値 24.0 %、 R_{free} 値 26.2 % まで精密化した。

明らかになった構造から、この部分がチャネル構造の安定化に重要な役割を果たしている領域であることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①伊原誠、山下敦子「GFP 融合技術を活用したタンパク質結晶構造解析のための発現コンストラクト設計」日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡市。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 敦子 (Yamashita Atsuko)

独立行政法人理化学研究所・分子シグナリング研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10321738

(2) 研究分担者
なし。

(3) 連携研究者
なし。