

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23833

研究課題名（和文）容積感受性陰イオンチャンネルLRRC8のヘテロ多量体化と活性化能の関連性の解明

研究課題名（英文）Structural insights into the subtype-dependent function of the volume-regulated anion channel LRRC8

研究代表者

糟谷 豪（KASUYA, Go）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80845115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：5種類あるLRRC8A-Eは、細胞膨張を感知して活性化する容積感受性陰イオンチャンネルで、LRRC8Aを必須の構成要素とするヘテロ六量体を形成し塩化物イオンやオスモライトと呼ばれる浸透圧調節物質を細胞外に排出する。このうちLRRC8Dは非荷電性オスモライトのタウリンや抗悪性腫瘍剤のシスプラチンの透過に寄与することが知られているが、そのメカニズムは不明であった。本研究ではLRRC8Dホモ六量体の立体構造を決定し、構造情報に基づいて電気生理解析を行うことで、LRRC8Dが特異的に持つ細胞外狭窄部位のフェニルアラニン残基とN末端ヘリックスがLRRC8D特異的なイオン透過に関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRRC8ファミリーは、2014年と比較的新しく機能が明らかとなったタンパク質で、細胞膨張を感知して活性化する容積感受性陰イオンチャンネルの構成因子として同定されたものの、どのようにして細胞膨張を感知するのか、どのようなヘテロ多量体を形成するのかといったメカニズムも未だ決着に至っていない。また、LRRC8ファミリーのうちLRRC8Dアイソフォームは抗がん剤のシスプラチンの排出に関わっており、LRRC8Dの機能を抑制することががん治療への応用につながる可能性が期待されている。そのため、今回決定したLRRC8Dの構造情報はLRRC8の活性化能やシスプラチンの排出能の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Five LRRC8A-E proteins serve as the components of the volume-sensitive anion channels (VRACs). VRACs are formed by heterohexamers with LRRC8A as an essential component and the other four LRRC8 proteins. VRACs are activated by cell expansion to flux chloride ions and osmolites. Among the five LRRC8 proteins, LRRC8D is known to contribute to the permeation of uncharged osmolites such as taurine and an antitumor drug, cisplatin. However, the mechanism of how LRRC8D isoform contributes to VRACs functions remains unclear. This study determined LRRC8D homohexamer and conducted the structure-based electrophysiological analyses revealing that the phenylalanine residue at the extracellular constriction site and N-terminal helix of LRRC8D are important for LRRC8D-associated VRAC function.

研究分野：構造生物化学

キーワード：イオンチャンネル LRRC8 LRRC8D VRAC クライオ電子顕微鏡 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

細胞外の浸透圧の変化に応じて細胞の容積を常に一定の値に維持することは、動物細胞の正常な機能に必須である。細胞分裂や細胞遊走などの細胞運動や、等張下での細胞容積の減少による細胞死にも、細胞容積の調節が深く関わっている (Strange *et al.*, *J Gen. Physiol.*, **151**, 100-117, 2019)。LRRC8 ファミリーは、細胞膨張を感知して活性化する容積感受性陰イオンチャネル (Volume volume-regulated anion channel: VRAC) の構成因子であり、塩化物イオンやオスモライトと呼ばれる浸透圧調節物質を細胞外に排出することで細胞容積の維持に貢献する (Voss *et al.*, *Science*, **344**, 634-638, 2014; Qiu *et al.*, *Cell*, **157**, 447-458, 2014)。細胞膜上では、5種類あるアイソフォーム (LRRC8A-E) のうち LRRC8A を必須の構成要素とするヘテロ六量体を形成し機能していると考えられており、5種類ある LRRC8 遺伝子すべてを破壊したヒト HEK293 細胞において LRRC8A のみを過剰発現させた場合は、生理条件下と比較して非常に小さな細胞膨張異存的な電流が流れる (Deneka *et al.*, *Nature*, **558**, 254-259, 2018)。また、ヘテロ六量体 LRRC8 のアイソフォーム構成が、イオン透過性やイオン透過孔開閉などのチャネル特性に影響を与えている。例えば、LRRC8 ファミリーの中で最長のアミノ酸長を有する LRRC8D アイソフォームを含むヘテロ六量体は非荷電性オスモライトのタウリンや抗悪性腫瘍剤のシスプラチンの透過に寄与することが知られている (Jentsch *et al.*, *Pflügers Arch.*, **468**, 385-393, 2016)。

2018年に、申請者らを含む3つのグループがホモ六量体 LRRC8A の構造を別々に発表し、完全な6回対称軸ではなく3回対称軸を持つことや、イオン透過孔が六量体の中心軸に沿って存在することが明らかとなった (Deneka *et al.*, *Nature*, **558**, 254-259, 2018; Kasuya *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 797-804, 2018; Kefauver *et al.*, *Elife*, **7**, e38461, 2018)。しかしながら、ホモ六量体 LRRC8A の構造からは、ヘテロ六量体化するために重要なアミノ酸領域や、細胞膨張の感知に寄与するアミノ酸領域を同定することはできていない。さらに、LRRC8A 以外の LRRC8 アイソフォームが、VRAC のイオン透過能やイオン選択性にどのように寄与するかも不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、LRRC8 ファミリーのうち非荷電性オスモライトの透過を担う LRRC8D アイソフォームの立体構造解析を行うとともに、決定した立体構造情報をもとに電気生理解析を行った。そして、これらの実験から得られた結果をもとに、LRRC8 アイソフォームのうち LRRC8D が特異的に持つ VRAC における機能や、LRRC8 がヘテロ多量体化する仕組みと活性化能の関連性の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 構造解析

申請者らの先行研究を参考に、昆虫 *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf9 細胞に対して、バキュロウイルス発現系 (Bac-to-Bac システム) を利用して GFP 融合状態のヒト由来 LRRC8D アイソフォームを過剰発現した (Kasuya *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 797-804, 2018)。細胞を回収、破碎した後に GFP を特異的に認識するナノボディー抗体を用いてアフィニティー精製を行った (Kirchhofer *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 133-138, 2010)。アフィニティー精製産物は、更にゲルろ過クロマトグラフィーにかけた。最終的に得たサンプルをグリッド上で凍結することで構造解析用試料とした。作成したサンプルから、直接検出器 (K2 summit, Gatan 社) を備えたクライオ電子顕微鏡 (Tecnai Arctica, FEI 社) を用いて撮影、タンパク質の像を取得した。取得した像から解析ソフトウェア Relion2.1 等を用いて立体構造を得た (Kimanius *et al.*, *Elife*, **5**, 1-21, 2016)。

(2) 電気生理解析

5種類ある LRRC8 遺伝子すべてを破壊したヒト HEK293 細胞 (Voss *et al.*, *Science*, **344**, 634-638, 2014) において野生型ヒト由来 LRRC8D アイソフォームと野生型 LRRC8A アイソフォーム、もしくは構造情報をもとに作成したヒト由来 LRRC8D アイソフォーム変異体と野生型 LRRC8A アイソフォームを発現させた。これらの LRRC8 アイソフォームを発現した細胞から増幅器 (Axopatch 200B amplifier, Axon Instruments/ Molecular Devices 社) を用いる

ことで、細胞膨張依存的に流れる電流を測定した。

4. 研究成果

今回の研究成果は 2020 年に Communications Biology 誌に発表している (Nakamura *et al.*, *Commun Biol.*, **3**, 240, 2020)。そのため、本項では上記内容のまとめを記載する。

決定したヒト由来 LRRC8D の全体構造の分解能は 4.36Å で、以前に決定された LRRC8A と一致してホモ六量体を取っていた (Deneka *et al.*, *Nature*, **558**, 254-259, 2018; Kasuya *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 797-804, 2018; Kefauver *et al.*, *Elife*, **7**, e38461, 2018; Kern *et al.*, *Elife*, **8**, 1-23, 2019)。しかしながら、その配向には違いがありホモ六量体 LRRC8D 構造は二回対称軸を持つ“三量体の二量体”構造を示したのに対し、ホモ六量体 LRRC8 A 構造は三回対称軸を持つ“二量体の三量体”構造や六回対称軸を持つ構造を示していた。これは、LRRC8 ファミリーの立体配座の柔軟性を示唆していると考えられた。

ホモ六量体 LRRC8D の各サブユニットは 2 つの細胞外ループ (EL1 および EL 2)、4 つの膜貫通ヘリックス (TM 1-4)、N 末端側半分にある 2 つの細胞内ループ (IL 1 および IL 2)、ならびに C 末端側半分にあるロイシンリッチリピート N 末端側ヘリックス (LRRNT)、15 個のロイシンリッチリピート (LRR 1-15)、LRR1-15 に続くロイシンリッチリピート C 末端側ヘリックス (LRRCT) の各ドメインに加え、これまでに報告されている LRRC8A の構造では見られなかった N 末端ヘリックス (NTH) から構成されていた。この NTH はコネキシンチャネル (Maeda *et al.*, *Nature*, **458**, 597-602, 2009) やイネキシンチャネル (Oshima *et al.*, *Nat. Commun.*, **7**, 13681, 2016) でも見られた構造であり TM 1 ヘリックスの前の N 末端残基によって形成され、チャンネル孔内に突出していた。

ホモ六量体 LRRC8D の構造のイオン透過孔は細胞膜に垂直な中心軸に沿って存在しており、細胞外側に位置するヘリックス (EL 1 H) の N 末端先端で狭窄していた。これは、先に決定されたホモ六量体 LRRC 8 A の構造と一致していた。ただし、最も狭窄した部位を形成するアミノ酸に違いがあった。ホモ六量体 LRRC8D では、狭窄部位は Phe143 残基によって形成され、その孔の直径は 11.5 Å 以下であった。これは過去に報告された生理条件下で形成される VRAC の孔径 11.4-14.2 Å と近い値であった (Droogmans *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 35-40, 1999)。その一方で、ホモ六量体 LRRC8A の構造においては、狭窄部位は Arg103 残基によって形成され、その孔の直径は 7.6-9.6 Å であった。VRAC が LRRC8 のヘテロ六量体で構成されることを考慮すると、LRRC8D と LRRC8A のホモ六量体構造間に見られた狭窄部位の孔の直径の差が、LRRC8D アイソフォームが LRRC8A を含む VRAC ヘテロマーに挿入されることで、Cl⁻などの陰イオンよりも大きな非荷電性オスモライトの透過能の獲得に貢献している理由の一端であることが示唆された。この可能性を検証するために LRRC8D F143R 変異体を作成し、野生型の LRRC8A と共発現してイオン選択性を調べたところ、野生型の LRRC8A/8D ヘテロ六量体と比較して、LRRC8A/8D F143R 変異体体では Cl⁻よりもサイズの大きなグルタミン酸やグルコン酸の透過能が低下することが明らかとなった。

ホモ六量体 LRRC8D の構造においては、以前に決定されたホモ六量体 LRRC8A の構造とは異なり (Deneka *et al.*, *Nature*, **558**, 254-259, 2018; Kasuya *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 797-804, 2018; Kefauver *et al.*, *Elife*, **7**, e38461, 2018; Kern *et al.*, *Elife*, **8**, 1-23, 2019) N 末端ヘリックス (NTH) が確認された。NTH は Ala5 から Asn11 の 7 残基で構成されており、その C 末は TM1 ヘリックスへと続いていた。また、NTH はイオン透過孔において最も内側に位置しており、Leu4、Val7、Leu10 の 3 つの残基がイオン透過孔に面している一方で、Ala5、Ser9、Asp12 の 3 つの残基が NTH の次に内側に位置する TM1 ヘリックスに面していた。今回見られた NTH が生理条件下でも重要であるかどうかを調べるために、LRRC8D の NTH の 7 残基をそれぞれシステインに置換した変異体を作成し、野生型の LRRC8A と共発現することで、チオール反応試薬の 2-sulfonatoethyl methane-thiosulfonate (MTSES) による修飾が起こるかどうかを調べた。その結果、作成したすべての変異体は、細胞膨張依存的な電流を流すのに対し、MTSES 存在下では Val7 と Leu10 のシステイン変異体では細胞膨張依存的な電流の量を低下させ、また Leu4 のシステイン変異体では細胞膨張依存的な電流の量を増強させた。この結果から、これらの Leu4、Val7、Leu10 の 3 つの残基がイオン透過孔に面していることが示された。以上の結果から LRRC8D の N 末端領域はコネキシンチャネル (Maeda *et al.*, *Nature*, **458**, 597-602, 2009) およびイネキシンチャネル (Oshima *et al.*, *Nat. Commun.*, **7**, 13681, 2016) の場合と同様にイオン透過孔を狭窄するヘリックスとして働くことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Ryoki, Numata Tomohiro, Kasuya Go, Yokoyama Takeshi, Nishizawa Tomohiro, Kusakizako Tsukasa, Kato Takafumi, Hagino Tatsuya, Dohmae Naoshi, Inoue Masato, Watanabe Kengo, Ichijo Hidenori, Kikkawa Masahide, Shirouzu Mikako, Jentsch Thomas J., Ishitani Ryuichiro, Okada Yasunobu, Nureki Osamu	4. 巻 3
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the volume-regulated anion channel LRRC8D isoform identifies features important for substrate permeation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0951-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糟谷豪
2. 発表標題 容積感受性陰イオンチャネルLRRC8のクライオ電子顕微鏡法による構造解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------