

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15036

研究課題名(和文) 蛍光を発する非天然アミノ酸スキャンによる膜タンパク質の状況依存的構造変化の解析

研究課題名(英文) Analyses of structural rearrangements of membrane proteins by fluorescent unnatural amino acid scanning

研究代表者

久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：80211887

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、まず、蛍光非天然アミノ酸 (fUAA) を膜タンパク質に組み込みその強度変化から構造変化を検出する研究手法の種々の条件を最適化し、次にATP受容体チャネルP2X2を対象として実験を行い以下の知見を得た。(1) ATP投与による活性化時に、様々な領域に導入したfUAAの蛍光強度の変化が観察されグローバルな構造変化が示唆された。(2) 第1膜貫通部位のSer54にfUAAを導入した場合、ATP投与による電流の活性化より蛍光強度の変化は緩徐で、ポアの経時的拡大等の2次的構造変化が示唆された。(3) 膜電位依存的活性化に伴うfUAAの蛍光強度の変化は第2膜貫通部位のT339で観察された。

研究成果の概要(英文)：An experimental method has attracted attention which approaches structural rearrangement of membrane proteins by detecting the fluorescent intensity change of fluorescent unnatural amino acid incorporated at the position of stop codon introduced by mutation. We first optimized its various experimental conditions and then applied it to the ATP and voltage gated structural rearrangements of ATP receptor channel P2X2. We observed the followings. (1) ATP evoked structural rearrangements occur globally at various parts of P2X2. (2) At Ser54 in the transmembrane region 1, the fluorescent intensity change was much slower than the current activation upon ATP application, suggesting secondary structural rearrangements such as pore dilation. (3) Fluorescent change associated with voltage dependent gating was observed at T339 in the transmembrane region 2.

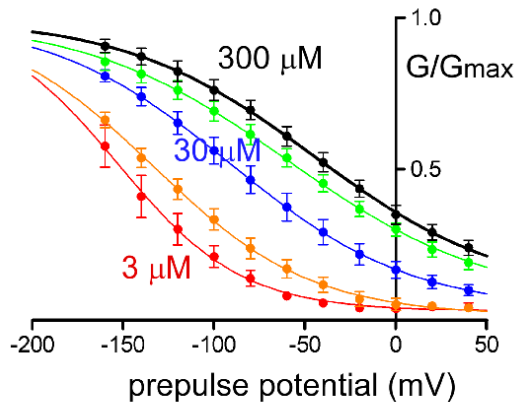
研究分野：分子生理学

キーワード：蛍光非天然アミノ酸 P2X2 ATP受容体チャネル 動的構造変化

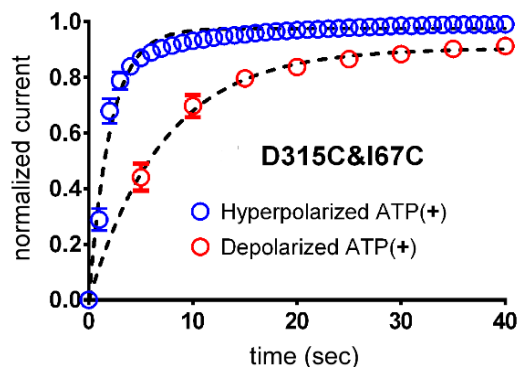
### 1. 研究開始当初の背景

ATP 受容体チャネル P2X2 は、細胞外の ATP によって活性化されるイオンチャネルで、膜 2 回貫通型のサブユニットが 3 個会合して構成される。膜貫通部位には膜電位依存性チャネルに見られる膜電位センサーのような、陽電荷を持つアミノ酸残基がクラスターする構造は存在しない。我々は、本研究の開始時点までに、P2X2 受容体の状況依存的な機能調節機構に関する研究を、電気生理学的研究手法を用いて進め、以下の知見を得ていた。

(1) P2X2 は、膜電位センサーを有しないにも関わらず膜電位依存性のゲーティングを示し、活性化速度、コンダクタンス-膜電位関係等の膜電位依存性は ATP 濃度に依存して変化する。すなわち、P2X2 は膜電位と ATP を複合的に感知する受容体チャネルである (下図) (Fujiwara et al. J Gen Physiol (2009), Keceli et al. J Physiol (2009), Keceli et al. J Gen Physiol (2014))



(2) また、膜電位依存性の構造変化を、導入した Cys 残基の修飾速度の膜電位依存性として捉えることにも成功した (下図)。(Keceli et al. J Physiol (2014))



(3) P2X2 は、細胞膜上の発現密度に依存して、透過イオンの選択性や膜電位依存性が変化する。(Fujiwara et al. J Physiol (2004)) このように、P2X2 チャネルは、膜電位センサーを有しないにも関わらず膜電位依存性を示し、細胞膜上発現密度依存性を示す、極めて

興味深いチャネルである。

近年の大きな進展として、Eric Gouaux 博士らによる P2X4 の ATP 非結合状態 (2009)、ATP 結合状態 (2012) の X 線結晶構造解析が挙げられる。結晶構造は、構造機能連関研究を進める上での重要な情報を与えるが、結晶という特殊条件下での構造であり、また、静止画であるため、動的な機能する姿とは異なる。特に、発現密度や膜電位に依存する構造変化に関する情報は皆無である。

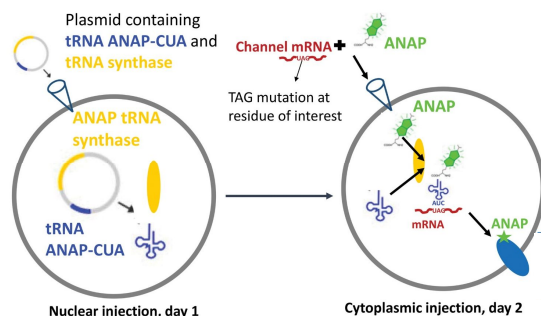
### 2. 研究の目的

本研究では、後述の高い優位性を有する、蛍光を発する非天然アミノ酸 (fluorescent UAA (fUAA)) をタンパク質にスキャン導入する新規研究手法を適用し、P2X2 の状況依存的動的構造変化に光生理学的手法で迫ることを目的とする。

具体的には、fUAA を P2X2 の様々な目的箇所に一か所ずつ取り込ませた変異体を系統的に多数作成して卵母細胞に発現させ、膜電位固定下でその蛍光強度変化を記録する。そして、その膜電位依存性等を網羅的に解析することにより、膜電位と ATP に依存するゲーティング時における動的構造変化を解析し、また、その構造変化の発現密度依存性を解析する。

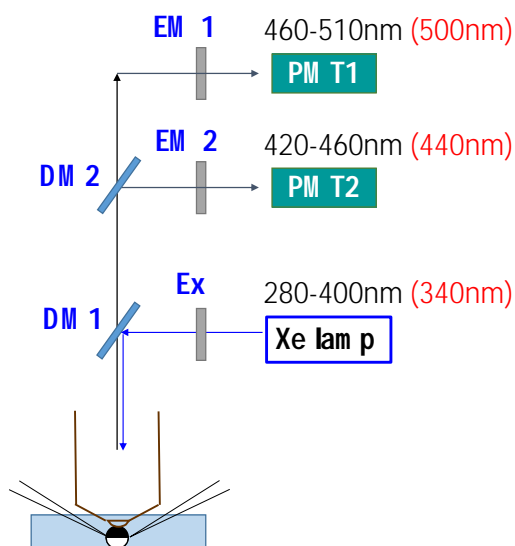
### 3. 研究の方法

fUAA を P2X2 に導入するには以下の 4 つが必要である (下図)。(1) fUAA である Anap、(2) Anap に特異的に結合する、UAG 配列認識用の CUA 配列を有する新規 tRNA、(3) Anap と、この tRNA を特異的に結合させる酵素 AnapRS、(4) 導入したい場所に、通常終止コドンとして使われる UAG を導入した P2X2 変異体の cRNA。実施にあたり、まず (4) を作成する。そして、ツメガエル卵母細胞の核に (2)、(3) をコードする cDNA の両方を乗せたプラスミド (米国 addgene 社から購入) を注入し、一日後 (1) Anap (韓国 FutureChem 社に合成を依頼) と (4) cRNA を注入することにより、Anap を取り込んだ P2X2 を膜上に発現させる (下図)。



倒立顕微鏡下で、2 本刺し膜電位固定法により ATP 投与および膜電位変化に対する電流

応答を記録し、同時に、340nmの光で励起し、440 nm および 500 nm の蛍光の強度変化を光電管により捉える。同様の実験を Anap を様々な部位にスキャン導入して行うことにより、構造変化に関する網羅的情報を得る。さらに、発現密度を変えて実施する（下図）。



#### 4. 研究成果

ラベル蛍光の強度変化により構造変化を検出する研究手法はイオンチャネルの動的構造機能連関研究において極めて有効である。なかでも、近年開発されたタンパク質中の目的箇所、非天然蛍光アミノ酸 (fUAA) を取り込ませて蛍光ラベルする方法は、かさばりが小さく機能的差し障りがないこと、ペプチドのバックボーンに直結するため微細な構造変化もできることから注目されている。我々は、まず、実験条件を最適化し、さらにATP受容体チャネルP2X2に適用して、ATP投与に伴う構造変化を検出することに取り組んだ。

2015年度には、以下のように実験条件の最適化を達成した。

(1) ツメガエル卵母細胞を用いた発現実験の鍵を握るのは、改変 tRNA と ligation 酵素をコードするプラスミドDNAの注入と、目的箇所にUAG配列を導入したイオンチャネル cRNA および fUAA の Anap の注入のタイミングと量である。我々は、一般に核へのDNA注入に必要と理解されている前遠心は不要であること、両者の注入を1日ずらすこと、Anapの注入量を最低限にすることにより、背景光を減弱し記録時のSN比を上げることができると等の最適条件を決定した。

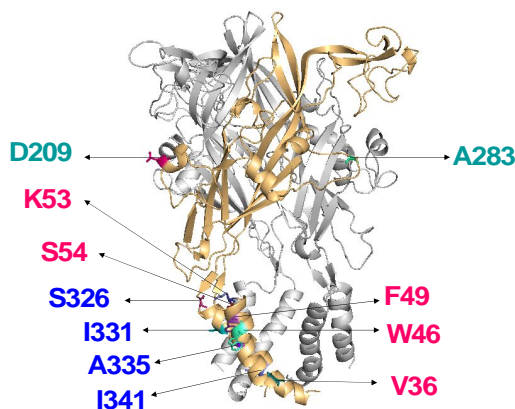
(2) また、高 NA 値 x20 の水浸レンズを上方からアプローチし、かつ水面の動揺による蛍光シグナルの揺れを最小限に抑えつつ速い溶液還流を可能にするパスを試行錯誤の上、完成した。

(3) 蛍光の測定においては、構造変化に伴う変化が小さいため、光源由来のノイズの減弱

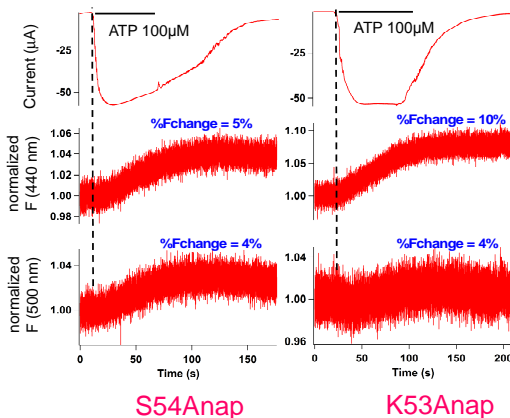
が課題であったため、複数種類の光源を試して、至適のものを決定した。さらに、蛍光の消退が問題となったため、励起光の強度の減弱を目的として4%のNDフィルターを2つ使用することにより克服した。

(4) 以上の条件設定の下で、P2X2 受容体の膜貫通部位、ATP 結合部位近傍、両者のリンカー部位等の20 以上の箇所に fUAA を導入し、そのいくつかでATP投与に伴う蛍光強度の変化の測定に成功した。その時点のコンストラクトでは、膜電位変化に伴う蛍光強度の変化を検出されなかった。

引き続き 2016 年度には、最適化された条件で実験を遂行し、以下の知見を獲得した。(5) ATP結合領域、膜貫通領域 TM1および TM2、両者をつなぐリンカー領域の多くのアミノ酸残基の位置に導入したfUAAが ATP投与に伴う蛍光強度の変化を示した。このことから、ATP結合に伴うグローバルな構造変化が示された（下図）。

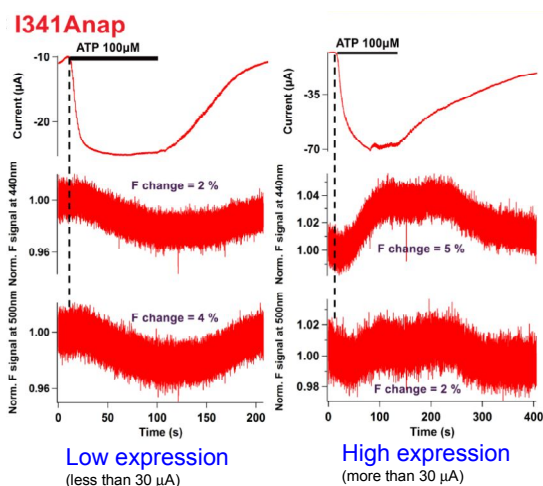


(6) その中で、TM1 の Ser53 および Ser54 の位置、TM2 の Ala335 の位置に Anap を導入した場合、ATP 投与による電流の活性化に比して蛍光強度の変化の速度は緩徐であった。チャネルの活性化自体ではなく、それに続くポアの拡大現象を反映している可能性が想定された（下図）。

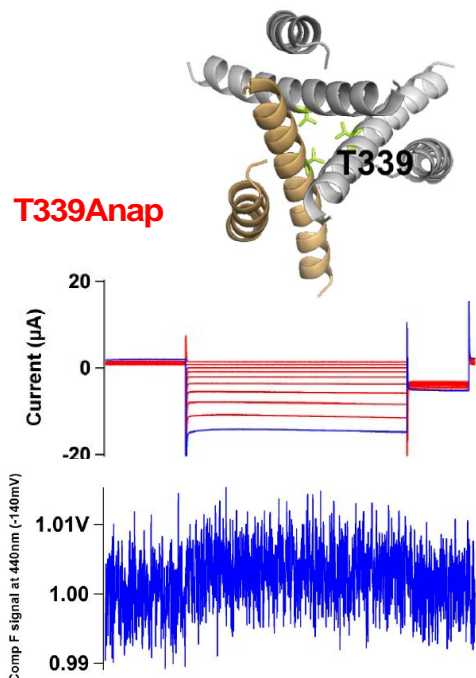


(7) TM1 の Val51、TM2 の Ile341 および Phe346 の位置に導入した場合、P2X2の膜上で

の発現密度に依存して、蛍光変化の向き（減弱/増加）の違いが観察された。これは発現密度に依存する構造変化を示唆するが、アーチファクトである可能性もあるため慎重に解析を進めている（下図）。



(8) 一方、膜電位変化に伴う変化はほとんどの部位で観察されなかった。その中で、チャネルポアの最狭部に位置する TM2の Thr339 の位置で、わずかながらも確実な変化が捉えられた。このことからP2X2が典型的な膜電位センサーを有しないものの膜電位に依存する構造変化を起こすことが示された（下図）。



これらの研究成果について、既に学会にて成果を発表し、また、現在、英文原著論文の作成準備中である。

#### 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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Andriani Rizki Tsari, Yoshihiro Kubo  
Voltage-clamp fluorometry analyses of the secondary structural rearrangements of ATP-gated P2X2 receptor  
第 94 回日本生理学会大会  
2017年3月30日  
アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）

Yoshihiro Kubo, Keceli Batu, Rizki Andriani  
Structural rearrangements of the ATP receptor channel P2X2 associated with voltage- and ATP- dependent gating of the pore.  
第 39 回日本神経科学学会  
2016 年 7 月 22 日  
パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Andriani Rizki Tsari, Yoshihiro Kubo  
Analyses of structural rearrangements of P2X2 by voltage-clamp fluorometry using fluorescent unnatural amino acid  
第 93 回日本生理学会大会  
2016 年 3 月 22 日  
札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

Yoshihiro Kubo  
Signal transmission within the P2X2 trimeric receptor and the voltage dependent structural rearrangements  
The 5th International Ion Channel Conference  
2015 年 6 月 29 日  
Luzhou Convention Center (Luzhou (China))

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
久保 義弘 (KUBO, Yoshihiro)  
生理学研究所・分子細胞生理研究領域  
・教授  
研究者番号：80211887
- (2) 研究分担者  
無し
- (3) 連携研究者  
無し
- (4) 研究協力者  
Tsari, Andriani Rizki  
生理学研究所・分子細胞生理研究領域  
・大学院生