

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K18484  
研究課題名(和文) 巨大カルシウムチャネルであるリアノジン受容体の構造と制御機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of regulation of ryanodine receptor

研究代表者  
渡部 聡 (Watanabe, Satoshi)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50432357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、巨大カルシウムチャネルであるリアノジン受容体(RyR)の開閉制御機構を解明するため、ヒト由来RyRの安定発現株の構築および制御タンパク質であるカルセクエストリン(CSQ)やジャンクティン(JCT)の構造機能解析に取り組んだ。CSQについては、カルシウム濃度に依存して延長した構造からコンパクトな構造へとダイナミックに構造変化していることが明らかになった。またCSQとJCTのルーメンドメインとの相互作用解析を行ない、CSQに対して複数のJCTがヘテロに結合することが示唆された

研究成果の概要(英文)：Structural studies of huge calcium channel, Ryanodine receptors (RyR) and its regulatory proteins Calsequestrin (CSQ) and Junctin (JCT) were performed. CSQ has been found to assume an extended conformation or a compact conformation, depending on the calcium concentration. CSQ and JCT formed heterogeneous complexes likely through electrostatic interactions.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造解析 カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

細胞小器官の一つである小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の折りたたみおよび成熟化を担うほかに、細胞内におけるカルシウムイオンの貯蔵庫として機能している。通常、サイトゾル内のカルシウムイオン濃度は数  $\mu\text{M}$  程度に保たれているが、外界のシグナルに応答して小胞体からサイトゾルにカルシウムが流入し、ホルモンや消化酵素の分泌、筋収縮など様々な細胞応答反応が引き起こされる。小胞体からのカルシウム流出においては、IP<sub>3</sub> 受容体とリアノジン受容体 (RyR) の二つのカルシウムチャンネルが中心的な役割を果たしている。RyR は、全長約 5000 アミノ酸残基で構成された細胞内で最大の大きさをもつイオンチャンネルであり、小胞体膜上で 4 量体を形成して機能している。哺乳動物では 3 つのアイソフォームが知られており、RyR1 は主に骨格筋、RyR2 は主に心筋、RyR3 はユビキタスに発現しており、筋収縮や興奮性細胞応答において重要な役割を果たしている。RyR はこれまで細胞生理学等のアプローチで広く研究されているが、構造生物学的な研究は、電子顕微鏡による 10Å 程度の低分解能での解析に留まっており、結晶構造解析による部分構造も全体の約 15% 程度しか決定されておらず、RyR の分子機構はほとんど明らかになっていなかった。

RyR はサイトゾルおよび小胞体内腔側それぞれで、様々な調節タンパク質との相互作用によってチャンネルの開閉が制御されている。小胞体内腔では、1 分子あたり 30 個以上のカルシウムイオンを結合できるカルシウム結合タンパク質カルセクエストリン (CSQ) が大量に存在している。CSQ はカルシウムイオン濃度依存的に多量体を形成することでカルシウムを貯蔵し、小胞体内の遊離カルシウム濃度を約 1~2 mM に維持している。CSQ は、一回膜貫通タンパク質であるジャンクティン (JCT) およびトリアジン (TRD) を介して RyR と過渡的に相互作用していると考えられている。しかし、どのように RyR と相互作用しカルシウムイオンの放出に関わっているかは、ほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、カルシウムチャンネル RyR の制御メカニズムの解明を目指すものである。そこで、小胞体内腔において RyR の開閉調節に関与している CSQ、JCT について、両者の過渡的な相互作用様式を複合体の結晶構造解析によって明らかにし、調節分子間の連携の仕組みを明らかにする。またヒト由来全長 RyR について、構造解析に向けたヒト細胞発現系による高発現系の構築、および安定で均一な精製タンパク質を得るための精製方法を確立する。その後、精製タンパク質の結晶化に取り組み、最終的に全長 RyR の立体構

造を X 線結晶構造解析によって原子分解能で決定し、チャンネル開閉の分子基盤を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、構造機能解析を通して、カルシウムチャンネルの開閉機構の分子基盤の解明を目指すものである。ヒト由来 RyR1 および RyR2 については結晶化のための大量精製を目指してヒト培養細胞 HEK293 を用いた大量発現系の構築に取り組んだ。誘導発現系構築のためのベクターのセレクションを行った。また、調節タンパク質である CSQ および JCT について、大腸菌発現系に最適化した遺伝子をそれぞれ合成し、大量発現・精製の後に、結晶構造解析、X 線小角散乱解析を行った。X 線回折実験および X 線小角散乱実験は、放射光施設 SPring-8 および photon factory で行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト由来 RyR の安定発現株の構築

ヒト由来 RyR1 および RyR2 について、培養細胞 HEK293T を利用して、誘導発現系による発現系の構築を試みた。RyR は HEK293 内では分解されやすいことも予想されたため、細胞の大量培養後、発現誘導をかけた目的タンパク質を大量発現させる方法を採用した。誘導発現ベクターとして、広く利用されているテトラサイクリン誘導型と最近開発された Cumate 誘導型によるベクターなどを作成しトライした。しかし、RyR を組み込んだ発現ベクターは、ベクターサイズが 20kb を超えるためか、不安定で大腸菌内で容易に切断・組み換えされやすい性質があり、大量調製に難航したこともあり、誘導発現系の安定発現株の樹立には至っていない。一方、研究の過程において、海外の 3 グループから、最新のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によってラビット由来 RyR1 の全長構造が 3.8-6Å 分解能において報告され、RyR1 全体構造が近原子分解能レベルで明らかになった。そのため、CSQ と JCT の複合体構造の構造解析に重点的に取り組んだ。

### (2) CSQ の構造機能解析

CSQ は、328 アミノ酸残基で構成されており、ヒトでは CSQ1 と CSQ2 の二つのアイソフォームが存在する。CSQ1 はおもに骨格筋の筋小胞体に局在し、CSQ2 は心筋に存在している。本研究では、ヒト由来 CSQ1 および CSQ2 について、N 末端に His-tag を融合させたコンストラクトを作成し、大腸菌発現系による大量発現を確立し、高純度サンプルの精製に成功した。従来報告では、CSQ は、カルシウム非存在下でモノマーとして存在することが報告されていた。しかし、精製した CSQ1 について、ゲルろ過クロマトグラフィ

い体積（分子量が大きい）で CSQ1 が溶出する結果が得られた。さらにカルシウム濃度との関係を調べた結果、カルシウム濃度が上昇するに従って、モノマーの成分が増えることが分かった（図 1）。ゲルろ過と多角度光散乱検出器を組み合わせた SEC-MALS によって、各ピークの絶対分子量を調べた結果、興味深いことに、溶出体積変化に関わらず、分子量は変化しておらず、モノマーとして存在していることが分かった。つまり、カルシウム非存在下では、非常に延長した構造を取り、カルシウム濃度上昇に合わせて、よりコンパクトな構造を取ることが分かった。

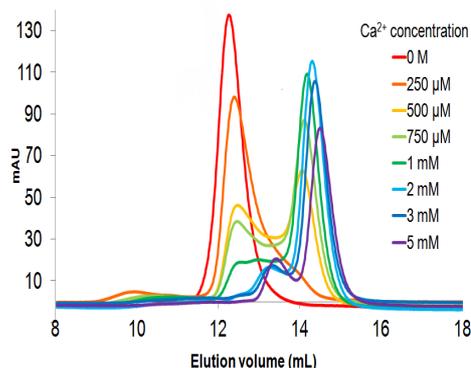


図1 ゲルろ過クロマトグラフィーにおけるカルシウム濃度に依存したCSQ1の溶出体積変化

次に CSQ の構造変化をより詳細に明らかにするために、カルシウム非結合型 CSQ1 について、結晶構造解析に取り組んだ。結晶化スクリーニングの結果、主にクエン酸ナトリウムと PEG400 を沈殿剤に用いた条件において柱状の結晶が得られた。得られた結晶を用いて放射光を用いた回折実験の結果、 $2.1\text{\AA}$  分解能を超える回折点が確認でき、反射強度データを収集した。位相決定は、既に報告されている CSQ1 の構造を用いて分子置換法によって決定した。構造解析の結果、従来報告された構造とは異なり、カルシウム非依存的な CSQ モノマー間の相互作用様式が明らかになった（図 2）。



図2 カルシウム非依存的なCSQ1の相互作用

しかし、モノマーの自体の構造は大きく変化がなかったため、今回の結晶化条件中では、コンパクトフォームの構造が安定であったことが示唆された。現在、エクステンドフォームの構造を調べるため、引き続き、結晶化条件の検索を進めている。

また、溶液中のエクステンドフォームの構造情報を得るために、SPring8 BL45XU において、X 線小角散乱実験を行った。予備的な散乱実験の結果、CSQ1 は放射線損傷を受けやすいことが分かり、バッファー条件および測定条件の最適化を進めている。比較的損傷が少なかった予備的散乱データの解析結果、SAXS の散乱強度から求められた推定分子量はモノマーであり、SEC-MALS の結果と一致した。散乱プロファイルから計算された Pr 関数は、やや横長に分布しており、CSQ1 のエクステンドフォームを支持する結果が得られた。

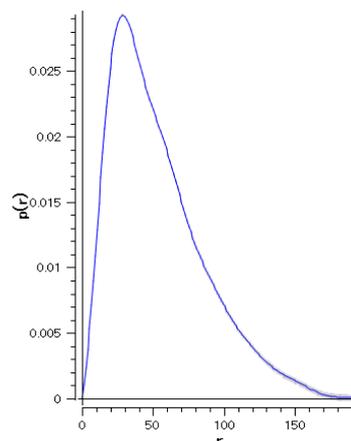


図3 CSQ1のX線小角散乱解析 (Pr関数)

### (3) JCT ルーメンドメインの構造機能解析

JCT は、210 残基からなる一回膜貫通タンパク質である。RyR と相互作用し、CSQ を RyR につなぎとめるアンカーとして機能していると考えられている。JCT のうち小胞体ルーメンドメインについて、二次構造予測から JCT-43:43-210 残基と JCT-68:68-210 の二つのコンストラクトを作成し、His タグまたは MBP タグを融合させた融合タンパク質として、大腸菌での大量発現・精製に取り組んだ。JCT-43 については、精製過程で次第に分解されてしまう傾向が見られた。JCT-68 について、Ni-アフィニティーカラム、および陽イオン交換カラムによって高純度の精製サンプルが得られた。JCT は構造情報が全くないため、精製した JCT-68 について、結晶化条件のスクリーニングを行った。現在までに、いくつかの条件でアモルファスは得られているが、結晶化には至っていない。

#### 4)CSQ-JCT 相互作用解析

精製した CSQ および JCT-68 について、ゲルろ過クロマトグラフィーによる相互作用解析を行った。興味深いことに、カルシウム非結合 CSQ と JCT-68 を混合すると、白濁し主に両者が沈殿しまう結果が得られた。pH やカルシウム濃度などをいくつか検討したが、いずれの条件においても沈殿が生じた。上清と沈殿成分を調べた結果、JCT の大部分が沈殿画分に回ってしまっていた。CSQ は分子表面に酸性アミノ酸が多いのに対して、JCT は塩基性残基が多いため、CSQ に対して複数の JCT が静電相互作用を介してヘテロに結合しており、CSQ と JCT 間の相互作用には複数の相互作用様式があることが示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

##### [雑誌論文](計 4 件)

Maegawa KI., Watanabe S., Noi K., Okumura M., Amagai Y., Inoue M., Ushioda R., Nagata K., Ogura T., Inaba K., “The Highly Dynamic Nature of ERdj5 Is Key to Efficient Elimination of Aberrant Protein Oligomers through ER-Associated Degradation” *Structure*. 査読有 S0969-2126(17)30102-8. 2017

DOI: 10.1016/j.str.2017.04.001

Arai K., Takei T., Okumura M., Watanabe S., Amagai Y., Asahina Y., Moroder L., Hojo H., Inaba K., Iwaoka M. “Preparation of Selenoinsulin as a Long-Lasting Insulin Analogue” *Angew Chem Int Ed Engl* 査読有. 56(20):5522-5526. (2017)

DOI: 10.1002/anie.201701654

Watanabe S., Harayama M., Kanemura S., Sitia R., Inaba K. “Structural basis of pH-dependent client binding by ERp44, a key regulator of protein secretion at the ER-Golgi interface” *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有 114(16): E3224-E3232. (2017)

DOI: 10.1073/pnas.1621426114

Ushioda R., Miyamoto A., Inoue M., Watanabe S., Okumura M., Maegawa KI., Uegaki K., Fujii S., Fukuda Y., Umitsu M., Takagi J., Inaba K., Mikoshiba K., Nagata K., “Redox-assisted regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5” *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有 113(41):E6055-E6063 (2016)

DOI: 10.1073/pnas.1605818113

##### [学会発表](計 15 件)

渡部 聡、原山麻奈美、天貝佑太、増井翔史、金村進吾、Sara Sannino、Roberto Sitia、稲葉謙次「分泌タンパク質の品質管理に

よる機能制御の構造基盤」日本結晶学会平成 28 年度年会、2016 年 11 月 18 日、茨城県立県民文化センター（水戸）

渡部 聡、原山麻奈美、天貝佑太、増井翔史、Sara Sannino、Roberto Sitia、稲葉謙次「小胞体タンパク質品質管理に

関与する ERp44 の pH と亜鉛イオンによる機能制御」第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、仙台国際センター（仙台）

渡部 聡、原山麻奈美、天貝佑太、増井翔史、Sara Sannino、Roberto Sitia、稲葉謙次「亜鉛イオンによる ERp44 を介した小胞体タンパク質品質管理機構の分子基盤」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 9 日、福岡国際会議場（福岡）

渡邊あゆ美、渡部 聡、金村進吾、奥村正樹、稲葉謙次「小胞体 Ca<sup>2+</sup>恒常性維持に関わるタンパク質 Calsequestrin の Ca<sup>2+</sup>濃度依存的な構造変化」生物物理学会東北支部会、2015 年 12 月 18 日 東北大学（仙台）

渡部 聡、増井翔史、稲葉謙次「小胞体タンパク質品質管理に関わる ERp44 の pH 依存的な構造ダイナミクス」第 15 回日本蛋白質科学会年会 2015 年 6 月 26 日、あわぎんホール(徳島)

渡邊あゆ美、渡部 聡、稲葉謙次「小胞体内のカルシウム貯蔵に関わる Calsequestrin とそのアンカータンパク質 Junctin の複合体の結晶化を目指した相互作用解析」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)

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

##### [その他] ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

渡部 聡 (WATANABE, Satoshi)  
東北大学・多元物質科学研究所・助教  
研究者番号： 50432357

##### (2)研究分担者

##### (3)連携研究者

##### (4)研究協力者