

令和元年6月13日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15180

研究課題名(和文) 蜘蛛毒と虫駆除薬を利用したプリン作動性シグナルの理解

研究課題名(英文) Understanding of the purinergic signaling using spider toxins and insecticides

研究代表者

藤原 祐一郎 (Fujiwara, Yuichiro)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20532980

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)：ATP受容体のP2Xは、痛みの受容と伝達、血管の拡張、炎症反応など様々な生理機能に関係している。これら生理機能はP2Xから流入する陽イオンによる膜の興奮やCa²⁺による細胞内応答により発揮される。本研究では、P2Xの新しいブロッカーやアクティベーターを用いて、イオンの透過性を決める分子基盤、生理作用に迫った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATP受容体のP2Xは、痛みの受容と伝達、血管の拡張、炎症反応など様々な生理機能に関係している。これら生理機能はP2Xから流入する陽イオンによる膜の興奮やCa²⁺による細胞内応答により発揮される。本研究により、P2Xのイオンの透過性の分子基盤とその生理機能が明らかになったことにより、将来的には、新しいタイプの鎮痛薬や抗高血圧薬への開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Purinergic ATP receptor channels (P2X) are responsible for maintaining various physiological functions such as pain sensation and transmission, dilation of blood vessels and inflammatory reaction. These physiological functions are exhibited by membrane excitation and Ca²⁺ dependent cellular reactions through P2X. In this study we explored the molecular basis of ion selectivity and its physiological roles using blockers and activators of P2X.

研究分野：生理学

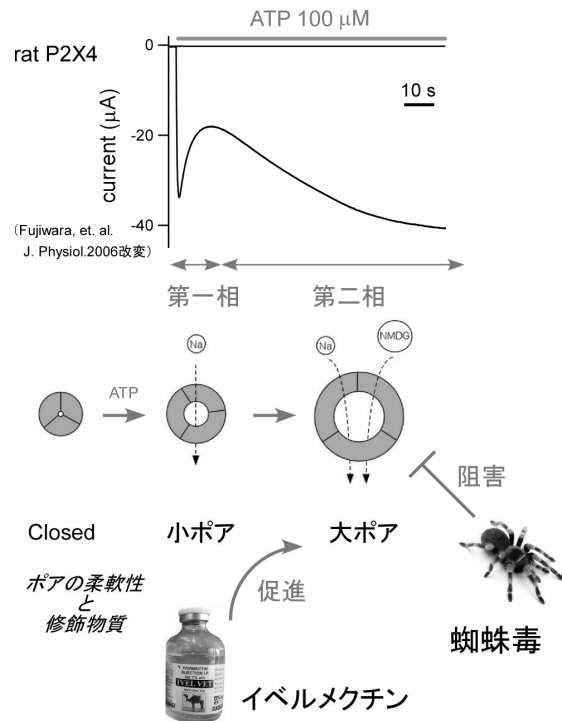
キーワード：ion channel

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP 受容体の P2X は、痛みの受容と伝達、血管の拡張、炎症反応など様々な生理機能に関係している。これら生理機能は P2X から流入する陽イオンによる膜の興奮や Ca^{2+} による細胞内応答により発揮される。興味深いことに P2X では、本来硬い分子構造基盤の上に成り立つとされるイオン透過に特徴があり、時間経過とともに透過するイオンのサイズが変化するという「ポアの柔軟性」を呈する。しかしながらその生理機能や分子メカニズムは解明されていない。

ATP などのプリン体が細胞間の情報伝達物質として広く生体機能調節に関わることはよく知られている。イオンチャンネル型 ATP 受容体の P2X は、神経伝達、筋収縮、痛みの受容と伝達、血管の拡張、味覚、炎症反応など様々な生理機能に関係している。これら生理機能は P2X を陽イオンが透過することによる細胞膜の電氣的興奮と Ca^{2+} 流入による細胞内応答により発揮される。P2X 受容体機能の最も興味深い点は、時間経過と共にイオン透過性が変化していく点にある。ATP 結合後すぐは Na^{+} や K^{+} などの小さい陽イオンしか通さないのに対して、数秒後には有機陽イオンなどのかなり大きな物質まで透過することが申請者らにより報告されている (Fujiwara & Kubo, J. Physiol., 2004, 2006)。しかしながら、その生理的意義や分子メカニズムは全く明らかになっていない。それは、各フェーズに対応した選択的阻害薬が見つかっていないため、大小二つのポアの機能を分離して検討することが出来ないためである。申請者はこれまでの P2X 研究を通じて、蜘蛛の分泌毒が選択的に電流の第二相 (大ポア) を阻害することを明らかにした。また、虫駆除薬のイベルメクチンは、虫の Cl^{-} チャンネルを活性化させ死に至らしめる本来の機能に加え、ほ乳類の P2X 受容体を著しく活性化させる。その機構はイベルメクチンが小ポアから大ポアへの移行を促進させ、全体の電流量を増やすと報告されている (Silberberg et al., Neuron, 2007)。これらの先行研究を手がかりに、本申請研究は、蜘蛛毒と虫駆除薬を利用して、P2X 受容体のポアの柔軟性に伴うイオン選択性変化の分子構造基盤と細胞機能を明らかにすることを目的に行う。



2. 研究の目的

本研究では、申請者が見いだした蜘蛛毒及び、虫駆除薬を利用して P2X4 受容体の「ポアの柔軟性」を固定し、各ポアサイズに対応した分子細胞機能を明らかにすることを目的としておこなう。構造生物学的解析や分子間相互作用解析を行い、大きなサイズのポアの構造、および毒・虫駆除薬の結合の構造基盤を明らかにする目的で行う。

3. 研究の方法

P2X 受容体のポアの柔軟性「時間経過と共にイオン透過性が変化する」の機能的側面および構造的側面を解析する。申請者の見いだした新規蜘蛛毒ブロッカー及び、イベルメクチンを利用して P2X4 受容体のポアの柔軟性を固定し、各フェーズに対応した分子細胞機能を明らかにする。細胞生理機能を明らかにする目的で、HEK 培養細胞およびマウス血管内皮細胞を用いて Ca^{2+} 流入にともなう細胞機能を解析する。分子生理機能を明らかにする目的で、P2X1-7 ファミリー間で各種蜘蛛毒の効果の違いを解析し、アミノ酸配列の違いを基に変異体を作成し電気生理学的に解析を行う。ポアの柔軟性と蜘蛛毒結合の構造基盤を明らかにする目的で、毒 - P2X4 複合体の結晶構造を解析する。毒 - P2X 間の分子間相互作用の解析を行う。毒の結合の分子動力学シミュレーション解析を行う。

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} の透過機能の解析

P2X 受容体の細胞生理機能発現に重要な Ca^{2+} 流入は、厳密に大・小どちらのポアで透過するのか分かっていない。HEK 培養細胞に野生型 P2X4 受容体を発現させ、パッチクランプ法にて Ca^{2+} 電流を解析した。 Ca^{2+} イメージング法を用いて蛍光顕微鏡下に Ca^{2+} 透過を解析する。蜘蛛毒投与にて第二相の電流を完全に遮断した状態、イベルメクチン投与にて第二相の電流を増やした状態で、それぞれ解析を行い、「どちらのポアに Ca^{2+} が透過するのか？」両方であれば、透過量・選択性に差異はあるのか？」を検討した。

(2) 血管内皮に対する毒の効果の解析

血管内皮が剪断応力 (shear stress) を受けた際に P2X4 受容体を介した Ca^{2+} 流入が起こり、

一酸化窒素(NO)が産生され血管が拡張する。この現象とポアの柔軟性との関連は分かっていない。P2X 受容体を発現させたゼノパス卵母細胞に shear stress を与え、P2X 受容体が開くのか、Ca²⁺を透過させるのかを電気生理学的に解析した。マウス肺毛細血管の初代培養血管内皮細胞に、還流装置により shear stress を与え、Ca²⁺イメージング法を用いて Ca²⁺流入を解析した。蜘蛛毒、イベルメクチン投与が Ca²⁺流入に与える影響を解析した。同様に、NO イメージング法を用いて NO 産生と蜘蛛毒、イベルメクチンとの関係を解析した。

(3) P2X1-7 ファミリー間で蜘蛛毒効果の解析

P2X ファミリー間で「ポアの柔軟性」は異なり、P2X1 や P2X3 は一相のみの電流で大ポアには遷移しないことが報告されている。蜘蛛毒の効果にファミリー間で違いはあるのだろうか？各 P2X1-7 を発現させた細胞に、蜘蛛毒を投与し電流の阻害効果を解析した。P2X4 以外には効果がないことを確認した。

(4) P2X 受容体分子に対する蜘蛛毒効果の解析

P2X ファミリー間でのアミノ酸配列の違いを基に変異体やキメラ体 P2X をデザインし、細胞に発現させ電気生理学的に毒の効果の解析を行った。野生型および変異体 P2X に対して、毒の結合解離定数、小ポア 大ポア遷移速度定数の解析を行った。

P2X 受容体蛋白と毒が結合した状態での結晶構造を解析することを目指して、Sf9 細胞を用いて発現・精製した。スクリーニングロボットにて結晶化を試みたが、回折する結晶は得られなかった。

(5) 蜘蛛毒およびイベルメクチンと P2X 受容体の結合を計算科学で解析

P2X 受容体に対する蜘蛛毒およびイベルメクチンの結合の状態を知るために、ドッキングシミュレーションを行った。蜘蛛毒の NMR 構造を用いて、Aout-Dock 法で結合ポケットを探索し、有効な結合ポケットかどうかを電気生理学的に解析した。機能解析 - 構造解析 - シミュレーションを行ったり来たりしながら、変異体を用いた解析も効果的に進め、分子間結合と動的機能との関係を解析した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y, Igarashi S, Suzuki EI, Nureki O, Hattori M, Ueda T, Shimada I, Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region., Proc Natl Acad Sci U S A., 査読有、113 巻、2016、4741-4746

DOI : 10.1073/pnas.1600519113

Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, zkuur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura Y., Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel, suggests role of S3 segment in activation gating., Biochim Biophys Acta., 査読有、1858 巻、2016、2972-2983

DOI : 10.1016/j.bbame.2016.09.008.

Kasuya G, Hiraizumi M, Maturana AD, Kumazaki K, Fujiwara Y, Liu K, Nakada-Nakura Y, Iwata S, Tsukada K, Komori T, Uemura S, Goto Y, Nakane T, Takemoto M, Kato HE, Yamashita K, Wada M, Ito K, Ishitani R, Hattori M, Nureki O., Crystal structures of the TRIC trimeric intracellular cation channel orthologues., Cell Res., 査読有、26 巻、2016、1288-1301

DOI : 10.1038/cr.2016.140.

Fujiwara Y, Kondo HX, Shirota M, Kobayashi M, Takeshita K, Nakagawa A, Okamura Y, Kinoshita K., Structural basis for the membrane association of ankyrinG via palmitoylation., Sci Rep., 査読有、6 巻、2016、23981

DOI : 10.1038/srep23981.

Kasuya G, Fujiwara Y, Tsukamoto H, Morinaga S, Ryu S, Touhara K, Ishitani R, Furutani Y, Hattori M, Nureki O., Structural insights into the nucleotide base specificity of P2X receptors., Sci Rep., 査読有、7 巻、2017、45208

DOI : 10.1038/srep45208.

Fujiwara Y., Temperature-Sensitive Gating of Voltage-Gated H⁺ Channels, Journal of Physiological Sciences, Supplement1, 査読有、67 巻、2017、S61

Kondo XH, Fujiwara Y., Shirota M., Kinoshita K., A study of dynamics of palmitoylated Ankyrin-G around a lipid bilayer by coarse-grained Simulations, Journal of Physiological Sciences, Supplement1, 査読有、67 巻、2017、S43

[学会発表](計 9 件)

藤原祐一郎、電位依存性プロトンチャネルの温度感受性ゲーティング、第 94 回日本生理学会大会(招待講演) 2017 年、浜松

近藤寛子、藤原祐一郎、城田松之、木下 賢吾、粗視化シミュレーションによるアンキリン G の細胞膜周辺での動態の解析、第 94 回日本生理学会大会(招待講演) 2017 年、浜松

藤原祐一郎、電位依存性 H⁺チャネルのゲーティングとその構造基盤、Advanced Biological Chemistry Seminar 2017 (招待講演) 2017 年 02 月 07 日~2017 年 02 月 07 日、京都

藤原祐一郎、Approaches to structural dynamics of the voltage-gated H⁺ channel gating., 第 95 回日本生理学会大会 (招待講演) 2018 年、高松

藤原祐一郎、電気生理で蛋白質を解析する、第 66 回 NCVV 研究者交流会 (招待講演) 2017 年、大阪

藤原祐一郎、What is the pH-gradient Sensing in the Voltage- Gated H⁺ Channel?、第 9 回アジアオセアニア生理学会 (第 96 回日本生理学会合同大会)(国際学会) 2019 年、神戸

神鳥和代、藤原祐一郎、Toward the understanding of hexose specificity of Na⁺ D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2、第 9 回アジアオセアニア生理学会 (第 96 回日本生理学会合同大会)(国際学会) 2019 年、神戸

片木絢子、藤原祐一郎、Ion Permeation of Voltage Sensor and its Foundation Structure、第 9 回アジアオセアニア生理学会 (第 96 回日本生理学会合同大会)(国際学会) 2019 年、神戸

藤原祐一郎、電位依存性 H⁺チャネルの電氣的・化学的勾配センシング機構、蛋白質研究会「構造情報に基づいた膜イオン輸送タンパク質の生理機能の解明に向けて」(招待講演) 2018 年、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。