

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06156

研究課題名(和文) TRPチャンネルにおける多刺激応答の分子機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis for multimodal sensation in TRP channels

研究代表者

日野 智也 (HINO, Tomoya)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40373360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TRPチャンネルは1つのチャンネル分子で侵害刺激物質などの化学的刺激だけでなく、環境温度変化や機械刺激、浸透圧などの物理的刺激にも応答する多刺激受容型の陽イオンチャンネルである。本研究では、TRPチャンネルの活性化制御因子として知られる脂質分子PIP2の温度応答への影響を構造生物学的に明らかにすることを目的に、ヒト由来TRPV3のクライオ電子顕微鏡構造解析や時分割X線結晶構造解析に必要な微結晶化について研究を行った。その結果、Cryo-EMによる解析では原子モデルの作成に成功し、活性化制御に関わると思われる脂質分子の結合位置を見出した。また、TRPV3の微結晶化作成条件を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度感知はほとんどの人が日常的に感じる極めて身近な生理現象である。本研究ではその感覚を引き起こす最初の段階を担うタンパク質であるTRPチャンネルがどのようにして温度を感じ取るのかを原子レベルで明らかにしようという試みである。今回の結果は、脂質分子がTRPチャンネルの活性化制御に重要な役割を果たすことを示唆しており、このタンパク質分子の結晶作成に成功したことも含め、今後分子レベルでの温度感知理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：TRP channels are cation selective ion channels that respond not only to chemical stimuli such as pungent chemicals but also to physical stimuli including temperature changes, mechanical force, and osmotic pressure. In this study, we investigated the effect of PIP2, a lipid molecule known as a regulator of TRP channel activity, on the temperature responses. From the cryo-EM analysis, we successfully constructed atomic model of mouse TRPV3 and found that the lipid molecules are bound between the pore helix and S6 helix presumed to be involved in the channel activation process. We also found the conditions for the microcrystal formation of human TRPV3 for serial femto-second X-ray crystallography.

研究分野：構造生物学

キーワード：イオンチャンネル 膜タンパク質 X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

刻々と変動する環境に対応し生物が適切な生理応答や行動をとるためには、外部環境変化を正確に感知することが不可欠である。高等動物では、応答速度に優れたイオンチャンネルが環境情報の感知において主要な役割を果たしており、なかでも Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルは、1つのチャンネル分子で侵害刺激物質などの化学的刺激だけでなく、環境温度変化や機械刺激、浸透圧などの物理的刺激にも応答する多刺激受容型の陽イオンチャンネルとして知られる。研究開始当初までに、カプサイシン及び43°C以上の温度に応答するTRPV1のクライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)単粒子解析により、チャンネルが閉じた状態(Close)とリガンドによりチャンネルが開いた状態(Open)の立体構造が解析されている。これらの結果から、膜貫通領域に結合しているホスファチジルイノシトール4,5ニリン酸(PIP_2)がClose構造を安定化しており、これがリガンド分子と置き換わることにより構造変化を誘起し、Open型構造へと構造転移するという化学的刺激による活性化メカニズムが提唱された。 PIP_2 のこのような役割は、他のTRPチャンネルにおいても電気生理学的解析などで確認されており、TRPチャンネルに共通する活性化制御機構として考えられている。

これに対し、TRPチャンネルの物理的刺激受容機構については、部位特異的変異体や異なる温度閾値を持つTRPチャンネル間のキメラタンパク質を用いた電気生理学的解析などにより、温度受容に関わる部位の推定が行われているが、その同定には至っていない。他方、化学刺激活性化における鍵分子である PIP_2 の解離により、温度刺激に対する感受性が亢進する(すなわち活性化温度閾値の低下)ことが明らかにされている。これらのことから、温度刺激による活性化過程においても PIP_2 の解離がTRPチャンネルのOpen型への構造転移の引き金になっていると予測されているが、この仮説を立証しうる立体構造基盤は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、化学刺激受容の鍵分子である PIP_2 の温度刺激受容における役割の解明を中心として、さまざまな状態のTRPチャンネルの構造生物学研究を行うことにより、TRPチャンネルの多刺激受容機構を原子レベルで理解することを目指す。

本研究では、Open型構造の決定のために活性化温度が32°C付近であるTRPV3に着目し、各状態の立体構造解明を端緒として、将来的にはこれらの状態間の構造遷移をつぶさに観察することにより、TRPチャンネルにおける温度センシング機構を原子レベルで解明しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) TRPV3のClose型の構造解析

研究開始当初にはTRPV3の立体構造は報告されていなかった。そこで、温度変化に応じたTRPV3の構造変化を検出するために必須となる、活性化前のClose状態における立体構造情報をCryo-EMにより取得する。 PIP_2 の結合状態での構造決定には、脂質二重膜存在下での構造決定が望ましいため、膜骨格蛋白質MSPを用いたNanodisc再構成したTRPV3試料を調製する。

TRPV3における化学刺激や熱刺激に対する PIP_2 の影響を立体構造解析により解明するために、バクテリア由来ホスホリパーゼC(PI-PLC)により PIP_2 を分解・解離させた試料の調製方法を確立する。

さらに、温度刺激後の構造変化を検出するために、X線自由電子レーザーを用いた連続フェムト秒時分割X線結晶構造解析(SFX)に取り組む。本研究ではそのために必要となるTRPV3の微結晶化方法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) TRPV3のNanodisc再構成条件の確立

ピキア酵母に発現させたGFP融合型ヒト由来TRPV3(N末端及びC末端欠損変異体)をGFP Nanobodyを固定化した担体及びゲルろ過により高純度に精製した。この試料を用いて、他のTRPチャンネルなどでNanodisc再構成に用いられた膜骨格タンパク質MSP2N2を使用し、TRPV3の4量体1ユニットに対し、MSP2N2、添加する脂質のモル比を検討した。その結果、混合比率によっては4量体よりも大きな会合体を形成することがあったが、MSP2N2についてはTRPV3の4量体に対し2分子の比率が最も良く、また、脂質は添加量が少なくなるほど会合体の形成が少なくなり、脂質を添加しない条件において、ほとんど会合体のみられない再構成が可能であることがわかった(図1)。

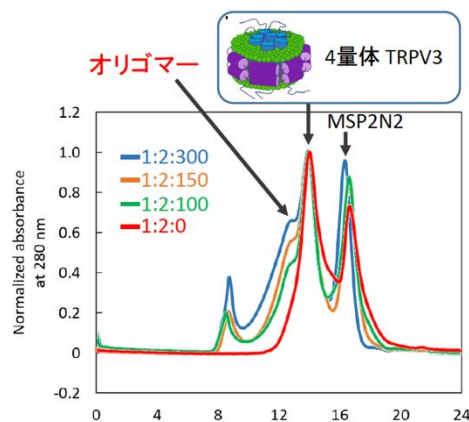


図1. 脂質混合比率を変化させたNanodisc化TRPV3のゲルろ過分析

(2)TRPV3 のクライオ電子顕微鏡単粒子解析

TRPV3 の Close 型構造を決定するために、分担研究者である東京大学理学研究科の西澤知宏助教らと共同研究を実施し、マウス由来 TRPV3 の Nanodisc 再構成状態について Cryo-EM により 3.3 分解能で立体構造を決定することに成功した。その結果、これまで Sensitize や Open 型の特徴と考えられていた膜貫通ヘリックス 6 の α -helix 構造が Close 型においても見られることがわかった。また、この α -helix を安定化する膜貫通ヘリックス間の相互作用を同定し、この相互作用がチャネル開口機能に必須であることを明らかにした。また、ポアドメインに結合する脂質分子を新たに見出し、この脂質分子の解離がチャネル開口につながる可能性を示唆した(図 2)。

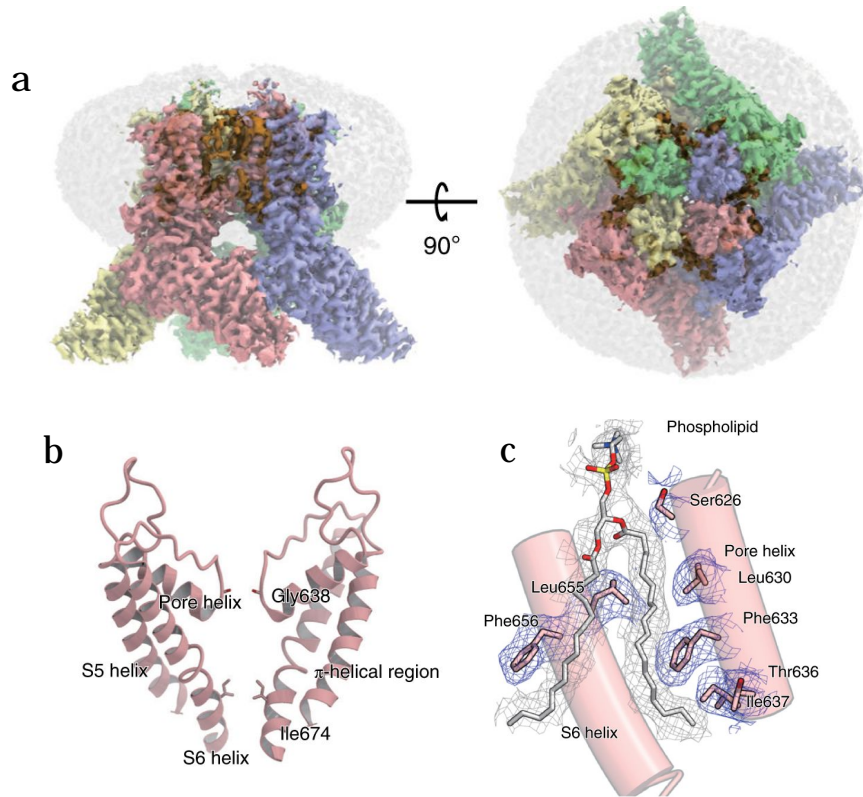


図 2. TRPV3 の Cryo-EM 構造解析

- a. 密度マップ, b. 膜貫通ヘリックス 5 および 6 の構造,
c. Pore helix とヘリックス 6 の間に見出された脂質分子

(3)PIP₂ を除去した TRPV3 試料の調製

精製した TRPV3 に結合していると予想される PIP₂ を除去することを目的とし、バクテリア由来 PI-PLC の大腸菌発現系を構築した。発現条件及び精製条件を検討した結果、高純度な PI-PLC を調製することができた。今後、精製した TRPV3 に作用させ、PIP₂ の除去が可能であるか検討を進める予定である。

(4) TRPV3 の結晶化

TRPV3 を用いて SFX を行うために、TRPV3 の微結晶作成を試みた。高純度に精製した試料を用いて結晶化スクリーニングを行ったところ、複数の条件において結晶を得ることに成功した。さらに条件を最適化し、大きさ 10 μ m 程度の微結晶を大量に得る条件を見出した。また、条件によっては 0.2 mm 程度の大きさを超える結晶を得ることもできた。これらの結晶を用い X 線回折実験を行なったところ、分解能は低いもののタンパク質に由来すると思われる回折斑点を検出することができた。現在さらに結晶化条件の最適化を進めており、これらの結晶を用いた SFX を含む X 線結晶構造解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada Hiroto, Kusakizako Tsukasa, Dung Nguyen T. H., Nishizawa Tomohiro, Hino Tomoya, Tominaga Makoto, Nureki Osamu	4. 巻 27
2. 論文標題 The structure of lipid nanodisc-reconstituted TRPV3 reveals the gating mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-0439-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyama Keisuke, Hino Tomoya, Kanadani Masahiro, Watanabe Bunta, Jae Lee Hyoung, Mizutani Masaharu, Nagano Shingo	4. 巻 5
2. 論文標題 Structural insights into a key step of brassinosteroid biosynthesis and its inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 589 ~ 594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-019-0436-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yun Choong-Soo, Nishimoto Kazuki, Motoyama Takayuki, Shimizu Takeshi, Hino Tomoya, Dohmae Naoshi, Nagano Shingo, Osada Hiroyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Unique features of the ketosynthase domain in a nonribosomal peptide synthetase?polyketide synthase hybrid enzyme, tenuazonic acid synthetase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11602 ~ 11612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013105	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細川航輔、前田朋輝、永野真吾、日野智也
2. 発表標題 結晶化に向けたヒト由来TRPV4変異体の構築
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田朋輝、小島要、細川航輔、永野真吾、日野智也
2. 発表標題 ヒト由来TRPV3の精製及び結晶化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川航輔、前田朋輝、野村弥生、佐藤有美、野村紀通、岩田想、永野真吾、日野智也
2. 発表標題 温度感受性イオンチャンネルhTRPV4の精製及び結晶化
3. 学会等名 令和元年度結晶学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田朋輝、小島要、永野真吾、日野智也
2. 発表標題 TRPV3のnanodisc再構成における脂質添加量の影響
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	西澤 知宏 (NISHIZAWA Tomohiro) (80599077)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教 (12601)	

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
---------	---------