

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06172

研究課題名（和文）電位依存性チャネルの作動原理の直接観察

研究課題名（英文）Direct visualization of functional basis in voltage-dependent ion-channels

研究代表者

重松 秀樹 (Shigematsu, Hideki)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・研究員

研究者番号：00415928

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）：クライオ電子顕微鏡単粒子解析法によりイオン透過孔の構造変化を直接観察することに成功した。今回利用した試料は蛍光を利用した機能解析にも供され、数分間、膜電位を維持する事が確認されている。ここで確立された手法は、他の膜タンパク質にもそのまま適用する事が可能であり、その機能に伴う構造変化をより生理的な条件下であるリボソームを用いて解析する事が可能であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
リボソーム上に提示された膜タンパク質の機能構造をクライオ電子顕微鏡で明らかにすることは、今後の医薬品開発への応用や、実際に細胞が機能する現場を捉えるという基礎学問的な意義も重要である。

研究成果の概要（英文）：Conformational change in ion-pore has been revealed directly by using single particle electron cryo-microscopy in this study. The specimen used for image analysis had been utilized in functional analysis by using florescent spectroscopy and it revealed that it can maintain membrane potential in a few minutes. The method here can be applied to any other membrane proteins to see its function on close to physiological environment, liposome.

研究分野：生物物理

キーワード：クライオ電子顕微鏡 構造生物学 イオンチャネル 電位依存性

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法は、X線結晶構造解析にならぶ生体分子の構造解析手法として注目が集まって来ていた。特に結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析が精力的に取り組み、界面活性剤可溶化状態での解析が主ではあるが、界面活性剤を使わない手法の開発も取り組まれていた。中でも脂質ナノディスクを使った解析法は、脂質膜環境中に膜タンパク質が存在することの重要性を明らかにしていた。

一方、イオンチャネルの電位依存性については、ノーベル生理学賞を受賞した MacKinnon による一連の X線結晶構造解析を元に、多数の計算科学的アプローチが取られていた。中でも長時間の全原子分子動力学シミュレーションを可能とした専用計算機を利用した結果が、これまで構造解析できなかった膜電位存在下での電位センサーの不活性構造を示したとして支持されている。しかしながら、イオン透過に必要とされる膜電位が大きく異なっており、電位センサーの不活性構造の直接的な観察が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、脂質環境として脂質小胞を利用することで、膜電位の生じた状態での構造解析を達成し、イオンチャネルの膜電位依存的な機能構造の直接的な観察による理解を目的としている。クライオ電顕単粒子解析により、直接、膜電位による機能発現状態での構造解析を明らかにし、構造・機能相関について検討するものである。

3. 研究の方法

脂質小胞に再構成したイオンチャネルの構造解析は、米国 Yale 大学の Fred Sigworth 教授によって提唱され、最初の論文が 2009 年に Nature 誌に発表された。本研究では、分子動力学シミュレーションでも利用されている結晶構造が明らかになっている Kv1.2 チャンネルを用いる。電子顕微鏡は、理化学研究所放射光科学研究センター所有の Thermofisher Scientific 製 Glacios に Gatan 社の K2 summit 直接電子検出装置を組み合わせたものを使用した。

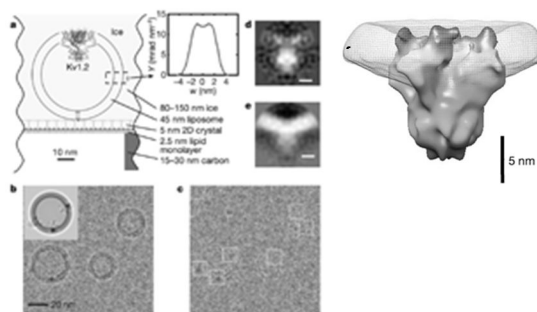
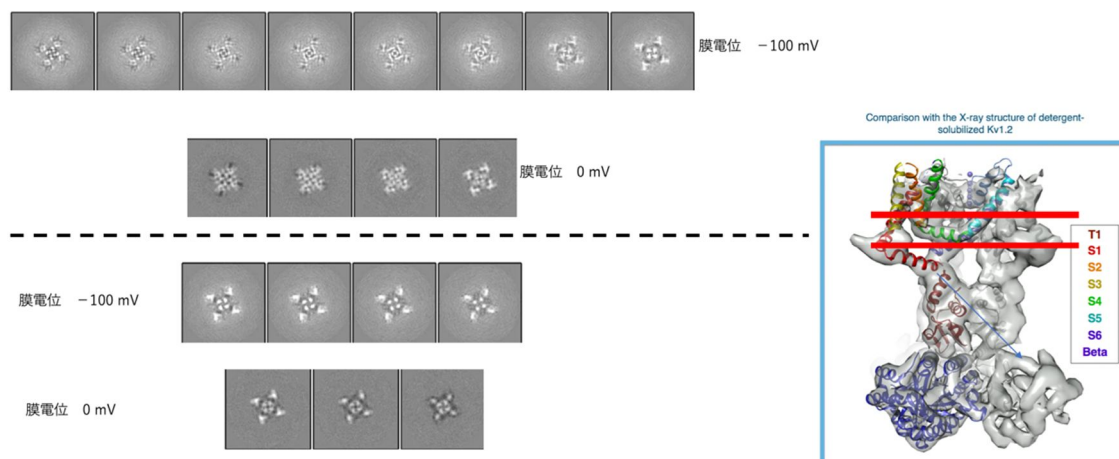


図 1. Wang and Sigworth *Nature* 2009 より

4. 研究成果

これまでの研究で、リポソームへの再構成法、同試料を用いた機能解析については、検討が終了している。今回、高分解能構造解析を目指す上で問題点となっている支持膜からのバックグラウンドノイズの低減、一視野でのタンパク質粒子数について検討をした。ノイズについては、市販グラフェン膜を電顕グリッドに転写し、UV/オゾンクリーナーを用いて表面処理することで、ノイズの少ない支持膜上に、Kv1.2 を提示したリポソームを密度高く固定する事が可能となった。このグリッドを用い、10,000~20,000 枚を撮影したデータを複数回取得する事で、解析を行った。



-100 mV 印加時のチャンネルポアの構造が 0 mV と異なっている事が明らかになっている。しかしながら、一視野での粒子数がリポソームの数に比べて稼げていないため、多くのデータを撮影してもなかなか分解能が上がっていない。界面活性剤可溶化状態で単粒子解析を行ったところ、3 Å 台の構造を得られているが、画像を分類したところ、膜貫通領域である サブユニットのみの粒子が多く見られ、これらがリポソーム上に存在する事で、 からなる粒子の数が低くなっている模様である。現在、エネルギーフィルタを装備した 300 kV の CRYO ARM 300 が納品された

ばかりではあるが、こちらの装置で最終データを取る事、コンストラクト及び精製法を見直して効率良くデータを揃える事で脂質膜上での電位変化に依存した構造変化を捉える事が可能と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shigematsu Hideki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Electron cryo-microscopy for elucidating the dynamic nature of live-protein complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129436 ~ 129436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129436	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 Tojo Shingo, Zhang Zhikuan, Matsui Hiroyuki, Tahara Masahiro, Ikeguchi Mitsunori, Kochi Mami, Kamada Mami, Shigematsu Hideki, Tsutsumi Akihisa, Adachi Naruhiko, Shibata Takuma, Yamamoto Masaki, Kikkawa Masahide, Senda Toshiya, Isobe Yoshiaki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19025-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 -
1. 著者名 Nojima Shingo, Fujita Yoko, Kimura Kanako Terakado, Nomura Norimichi, Suno Ryoji, Morimoto Kazushi, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Iwata So, Shigematsu Hideki, Kobayashi Takuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 252 ~ 260.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2020.11.007	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 Ishida Hanako, Asami Junta, Zhang Zhikuan, Nishizawa Tomohiro, Shigematsu Hideki, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Toll-like receptors in complex with UNC93B1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00542-w	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 Ayukawa Rie, Iwata Seigo, Imai Hiroshi, Kamimura Shinji, Hayashi Masahito, Ngo Kien Xuan, Minoura Itsushi, Uchimura Seiichi, Makino Tsukasa, Shirouzu Mikako, Shigematsu Hideki, Sekimoto Ken, Gigant Benoit, Muto Etsuko	4. 巻 220
2. 論文標題 GTP-dependent formation of straight tubulin oligomers leads to microtubule nucleation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202007033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202007033	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

1. 著者名 Takizawa Naoki, Ogura Yoshitoshi, Fujita Yoko, Noda Takeshi, Shigematsu Hideki, Hayashi Tetsuya, Kurokawa Ken	4. 巻 531
2. 論文標題 Local structural changes of the influenza A virus ribonucleoprotein complex by single mutations in the specific residues involved in efficient genome packaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 126 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.03.004	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 -

1. 著者名 Yokoyama Takeshi, Machida Kodai, Iwasaki Wakana, Shigeta Tomoaki, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Sakamoto Ayako, Yonemochi Mayumi, Harada Yoshie, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Tadakuma Hisashi, Imataka Hiroaki, Ito Takuhiro	4. 巻 74
2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1214.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022	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 Shima Tomohiro, Morikawa Manatsu, Kaneshiro Junichi, Kambara Taketoshi, Kamimura Shinji, Yagi Toshiki, Iwamoto Hiroyuki, Uemura Sotaro, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Ichimura Taro, Watanabe Tomonobu M., Nitta Ryo, Okada Yasushi, Hirokawa Nobutaka	4. 巻 217
2. 論文標題 Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 4164 ~ 4183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201711178	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 Shigematsu Hideki, Imasaki Tsuyoshi, Doki Chihiro, Sumi Takuya, Aoki Mari, Uchikubo-Kamo Tomomi, Sakamoto Ayako, Tokuraku Kiyotaka, Shirouzu Mikako, Nitta Ryo	4. 巻 217
2. 論文標題 Structural insight into microtubule stabilization and kinesin inhibition by Tau family MAPs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 4155 ~ 4163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201711182	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 Yamagata Atsushi, Miyazaki Yuri, Yokoi Norihiko, Shigematsu Hideki, Sato Yusuke, Goto-Ito Sakurako, Maeda Asami, Goto Teppei, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Shirouzu Mikako, Fukata Yuko, Fukata Masaki, Fukai Shuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural basis of epilepsy-related ligand?receptor complex LG11-ADAM22	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03947-w	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hideki Shigematsu, Youshan Yang, Yangyang Yan, Fred J. Sigworth
2. 発表標題 Progress in Cryo-EM Imaging of Kv1.2 Channels with Membrane Potential Applied
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松秀樹
2. 発表標題 Spring-8における共用を目指したクライオ 電子顕微鏡施設
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松秀樹
2. 発表標題 高分解能クライオ電子顕微鏡単粒子解析の検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Shigematsu, Youshan Yang, Yanyang Yan, Fred Sigworth
2. 発表標題 クライオ電顕による電位依存性チャネルの作動原理の可視化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Shigematsu, Youshan Yang, Yangyang Yan, Fred J. Sigworth
2. 発表標題 Cryo-EM Imaging of Kv1.2 Channels with Membrane Potential Applied
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meetings (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------