

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24506

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22634

研究課題名（和文）張力感知アミノ酸に着目した膜タンパク質-脂質相互作用の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of lipid-protein interactions focusing on tension-sensing amino acids

研究代表者

野村 健（Nomura, Takeshi）

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号：10706790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細菌機械受容チャネルMscLは、膜張力を直接感知し開口するが、その開閉機構については不明な点が多い。本研究では膜張力を最も感知していると考えられるF78に着目し、これを他の19種類のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し、機械刺激に対する応答を調べた。パッチクランプ法によりイオン電流を計測したところ、酸性・塩基性アミノ酸残基に置換した変異体ではチャネル活性が見られなかったが、疎水性または親水性アミノ酸残基に置換した変異体においては、野生型と同様、または急速な開閉、開口時間が長い等の特徴を示した。以上の結果より、MscLの機械刺激感受性はアミノ酸残基の特性に大きく依存していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚、触覚、平衡感覚および固有感覚などに関与する受容器として機械受容チャネルが広く知られている。なかでも大腸菌機械受容チャネルMscLは、その結晶構造が明らかになっており、機械受容チャネル研究の初期段階から格好の材料として用いられてきたものの、その開閉機構に関しては不明であった。本研究は、MscLの機械刺激感受性にアミノ酸残基の特性が大きく関与していることを明らかにした。これらの結果は、機械受容チャネルの開閉メカニズムに重要な知見を与えるとともに、機械受容チャネルに関与する疾患の解明にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The bacterial mechanosensitive channel MscL directly opened by membrane tension from the cell membrane. However, the detailed gating mechanism of MscL is still remains unknown. Here, we focused on Phe-78 which has been considered as a mechanosensor of MscL, and replaced with 19 other amino acid residues to investigate the mechanosensitivity of F78X mutants by using the patch clamp technique. The channel currents of mutants which were replaced with acidic and/or basic amino acid residues, no channel activities were observed. On the other hand, hydrophobic and/or hydrophilic amino acid residues exhibited flickering, long open times and same behavior as wild-type MscL. These results suggested that the tension sensing from the cell membrane largely depends on the characteristics of the amino acid residues.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：機械受容チャネル メカノセンサー 細胞膜張力 タンパク質-脂質相互作用 大腸菌 MscL パッチクランプ法 電気生理学

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。

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる細胞は外界からの機械刺激を感じて応答するが、細胞の機械刺激を感知する分子実体の代表格として機械受容チャネルが知られている。これまでバクテリアからヒトまで様々なタイプの機械受容チャネルの候補が同定され、なかでも原核生物では MscS と MscL、真核生物では TREK、TRAAK および PIEZO1/2 チャネル等のゲーティング機構に関する研究が盛んに行われている。機械受容チャネルのゲーティング機構において、最も詳細な研究が進められている MscL は、細胞膜への伸展刺激で生じる膜張力で活性化される。

申請者は、2004 年に脂質二重膜の外葉と特異的に相互作用している MscL のメカノセンサー部位( Phe-78 )を同定した( Yoshimura et al., Biophys J, 2004 )。また、2012 年には MscL を取り巻く脂質環境の違いが機械刺激の感受性に影響を及ぼすことを明らかにしている( Nomura et al., PNAS, 2012 )。しかしながら、チャネルの構造変化や機能発現に直接影響を与えていると考えられる脂質二重膜との相互作用の解析は、細胞膜を構成する個々のリン脂質を解像できるレベルで細胞膜を可視化する必要があり、そのためには高度な設備や技術が不可欠である( Norimatsu et al., Nature, 2017 )。一方、パッチクランプ法を用いたイオン電流の記録は、チャネルタンパク質 1 分子の機能状態をリアルタイムで捉えることができ、膜タンパク質と脂質との相互作用の研究を飛躍的に進展させることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究を統合し、機械刺激に対する MscL の張力感知機構を解明することを目的とする。具体的には、まず F78X MscL 突然変異体を作成し、細胞の増殖パターンおよび生存率の基礎データを取得する。その結果を踏まえ、パッチクランプ法を用いた電気生理学的実験を実施する。

## 3. 研究の方法

予備実験の結果を基に、本研究では機械刺激に対する MscL の張力感知機構の解明に向け、以下の2つを明らかにすることを目標とした。

### (1) 突然変異体の作成、細胞増殖パターンおよび生存率の解析

F78 を 19 種類のアミノ酸に置換した F78X MscL 突然変異体を作成し細胞膜上に過剰発現させ、細胞の増殖パターンの解析および低浸透圧ショックによる生存率の検定を行った。

### (2) F78X MscL 突然変異体の機械刺激感受性の評価

F78X MscL 突然変異体を過剰発現させた巨大スフェロプラストを用いて、機械刺激に対する応答を電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて計測し、機械刺激感受性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) F78X MscL 突然変異体の細胞増殖パターンおよび生存率の解析

野生型および F78X MscL 突然変異体を液体培養し、2 時間後に 1 mM IPTG を添加した。機能獲得 (GOF) 突然変異体である G22N においては、添加後直ちに細胞増殖が抑制された (図 1)。また、F78E においても IPTG 添加 2 時間半後に増殖の抑制が見られた。一方、野生型および F78E を除く F78X MscL 突然変異体においては、IPTG 添加後も増殖が見られた。

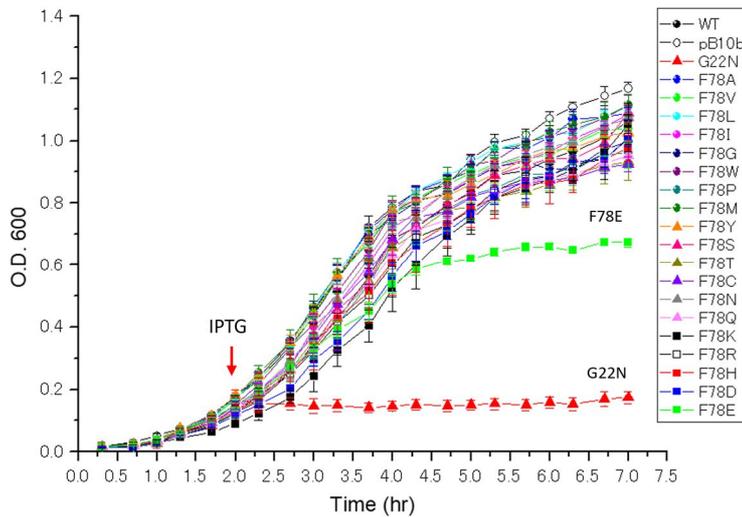


図 1 野生型および F78X MscL 突然変異体の細胞増殖パターン

高浸透圧溶液での培養から低浸透圧溶液に晒す低浸透圧ショックを与え、その後、一晚寒天培養しコロニーの数を計測したところ、酸性および塩基性アミノ酸残基に置換した突然変異体において生存率の顕著な低下が認められた (図 2)。一方、疎水性および親水性アミノ酸残基に置換した突然変異体においても生存率が低下が見られた。

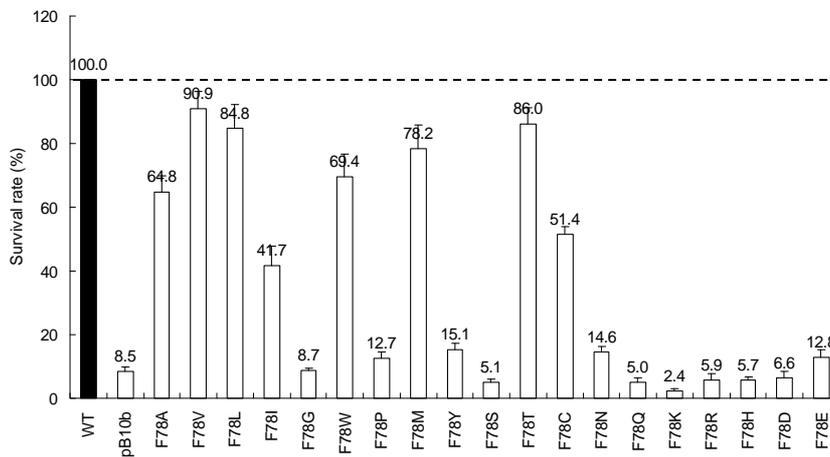
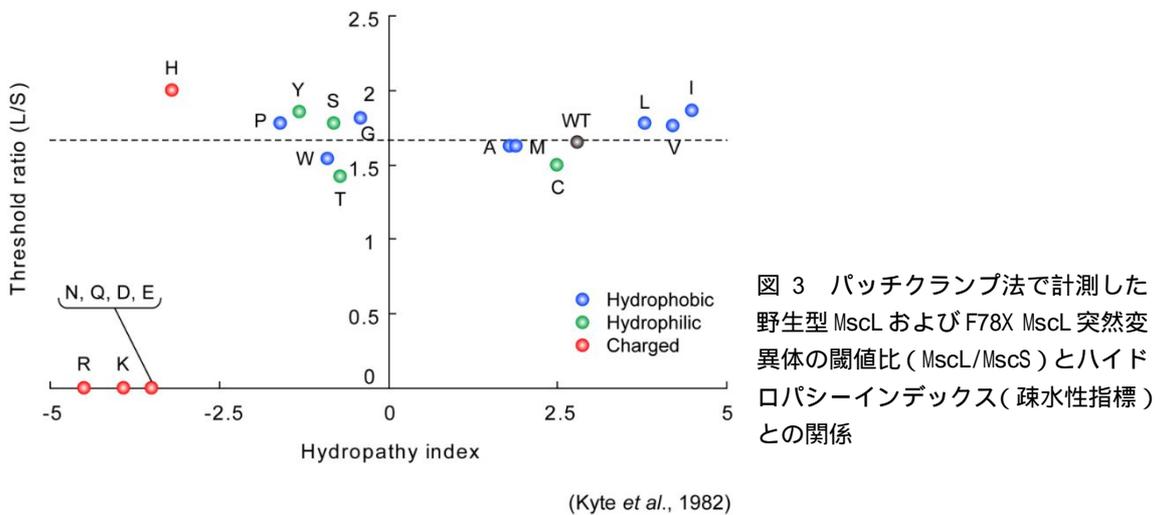


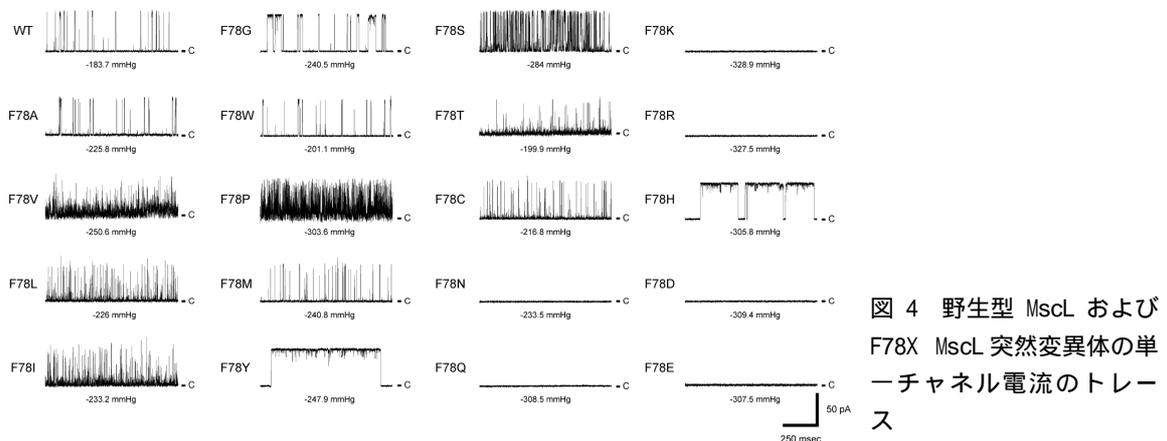
図 2 野生型 MscL および F78X MscL 突然変異体の低浸透圧ショック後の生存率の比較

(2) F78X MscL 突然変異体の機械刺激感受性の評価

F78X MscL 突然変異体を過剰発現させた巨大スフェロプラストを用いて、パッチ膜の伸展（機械刺激）に対する応答を計測し、MscL と MscS がそれぞれ最初に開いた時の圧力比（MscL/MscS）から機械刺激感受性を評価した。疎水性アミノ酸残基全てにおいて機械刺激感受性を評価することができたが、F78N および F78Q を除いた親水性アミノ酸残基と酸性および塩基性アミノ酸残基においては、機械刺激感受性を評価することができなかった。野生型および F78X MscL 突然変異体の機械刺激感受性および疎水性指標との関係を調べたところ、疎水性指標値が小さくなると MscL の機械刺激に対する応答が低下することが示された（図 3）。これらの結果より、膜張力の感知にはタンパク質と脂質との疎水性相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



単一チャンネル電流レベルでの挙動を比較したところ、酸性および塩基性アミノ酸残基に置換した突然変異体ではチャンネル活性が見られなかったが、疎水性または親水性アミノ酸残基に置換した突然変異体においては、野生型と同様、または急速な開閉（flickering）、開口時間が長い等の特徴を示した（図 4）。



以上の結果から、MscL の機械刺激感受性はアミノ酸残基の特性に大きく依存していることが示された。先行研究によると、F78 は脂質との相互作用が最も強く、張力を感知するメカノセンサーであると考えられてきた (Sawada et al., Channels, 2012)。今回、F78 を 19 種類のアミノ酸残基に置換し機械刺激感受性を評価できたことは、機械受容チャネルを取り巻く脂質環境との相互作用を深く理解することに繋がり、膜張力感知機構の解明に貢献することが期待される。

#### 【引用文献】

1. Yoshimura K, Nomura T, Sokabe M. Loss-of-function mutations at the rim of the funnel of mechanosensitive channel MscL. *Biophys J.* 86(4): 2113-20, 2004
2. Nomura T, Cranfield CG, Deplazes E, Owen DM, Macmillan A, Battle AR, Constantine M, Sokabe M, Martinac B. Differential effects of lipids and lyso- lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(22): 8770-5, 2012
3. Norimatsu Y, Hasegawa K, Shimizu N, Toyoshima C. Protein-phospholipid interplay revealed with crystals of a calcium pump. *Nature.* 545(7653): 193-198 2017
4. Sawada Y, Murase M, Sokabe M. The gating mechanism of the bacterial mechanosensitive channel MscL revealed by molecular dynamics simulations: from tension sensing to channel opening. *Channels (Austin).* 6(4): 317-31, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------