

機関番号：14401  
研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2009～2010  
課題番号：21790201  
研究課題名（和文）人工イオンチャネルデザインに向けたチャネル会合モジュールの構造と機能の解析  
研究課題名（英文）Structural and functional analyses of the assembly modules of ion channels for artificial protein design.  
研究代表者  
藤原 祐一郎（FUJIWARA YUICHIRO）  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20532980

研究成果の概要（和文）：2量体として機能する電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルの会合領域の結晶構造を高解像度で決定することに成功した。電気生理学的機能解析を行うことにより、2量体間の機能的連携や温度感受性を担う機能が会合領域にある事を明らかにした。会合領域に変異を導入することで上記機能を自在に操る事に成功した。これらの知見は人工チャネルを設計する際に応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the high-resolution crystal structure of the assembly domain of the voltage-gated H<sup>+</sup> channel dimer. Electrophysiological analysis revealed that the temperature-sensitivity of the channel and the functional cooperativity within the dimer are regulated by the assembly domain. We also succeeded in modulating the channel function by mutating the assembly characteristic. Our results shed light on the artificial ion channel design.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

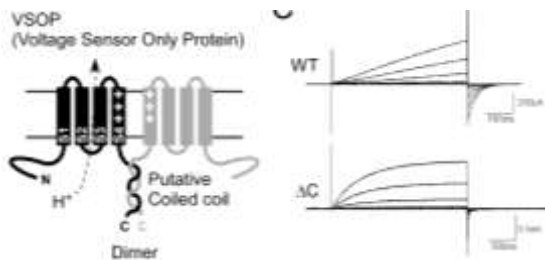
研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜、チャネル、トランスポーター、能動輸送

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性イオンチャネルは、生体および細胞内秩序を適切にかつダイナミックに調節する重要な分子である。電位依存性プロトンチャネルは、好中球・マクロファージなどに発現し細胞内プロトン濃度を調節し、免疫システムに関わる重要な分子である。電位依存性プロトンチャネルの研究はこれまで血球細胞を用いた電気生理学的研究を中心に行われてきたが、近年我々の研究室で cDNA が単離されたことで分子レベルの研究が急速に進展することが期待される。電位依存性プロトンチャネル(VSOP)は、電位依存性イオンチャネルの電位センサードメインに相同性が高い膜 4 回貫通分子で、2 量体として機能することが知られている。2 量体化を主に担っているのは C 端細胞内領域のわずか 50 アミノ酸であった。2 次構造予測からその領域は  $\alpha$ -ヘリックス構造をとると予測され、さらに繰り返し 7 残基ユニット中に 3 回 4 回おきに疎水性アミノ酸残基が出現するコイルドコイル構造をとることが予測される。また、その C 端細胞内領域の deletion 変異はゲーティングのキネティクスが著しく変化することが報告されており、コイルドコイルと予測される領域はチャネル会合、ゲーティング両方に対して重要な役割を果たすと考えられる。



本申請研究課題は、4 回膜貫通領域直後に存在する 2 量体化に寄与する構造を決定し、その構造情報をベースにした機能解析を行

いチャネルの会合とそれにリンクしたゲーティングのメカニズムを探る。また逆の視点から 2 量体会合領域をタンパクレベルで人為的に操作し、それに伴いチャネル活性の変化する人工チャネルの作成を目指す。

## 2. 研究の目的

(1) VSOP チャネル会合ドメインの X 線結晶構造解析。

(2) 構造情報を基にして作成した変異体 VSOP を使い電気生理学的機能解析、タンパク生化学的解析を行う。タンパクの性質とチャネル活性の相関を解析する。

(3) VSOP の C 端細胞内会合領域を熱、イオン強度、pH、redox で性質の変化するコイルドコイルに置換し、これら刺激で開くチャネルをデザインすることを試みる。

これまで行われてきた、イオンチャネルの機能的側面を対象とした研究は、分子生物学的手法と電気生理学的手法を組み合わせた解析の範囲にとどまっている。原子レベルで 3 次元座標を明らかとする本研究課題は革新的な展開である。本研究課題では、静止画にすぎない結晶構造情報に、その 3 次元座標を基にした電気生理学的機能解析とタンパク質生化学的解析を加え統合的に解析することで、「動的に機能する分子の姿に迫る!」。例えば、TRP チャネルのような熱や酸化還元により開閉するイオンチャネルを人工的に作ろうと考えたときに、完全に de novo でデザインすることは難しい、未だ誰も為し得ていない。本研究課題は実現可能な第一段階として既存の分子を利用した“ヘミ”人工イオンチャネル作成を試みる。“電位依存性チャネルの最小単位” (VSOP) と“タンパクフォールディングにおける最小会合単位” (コイルドコイル) を使って人工チャネルを

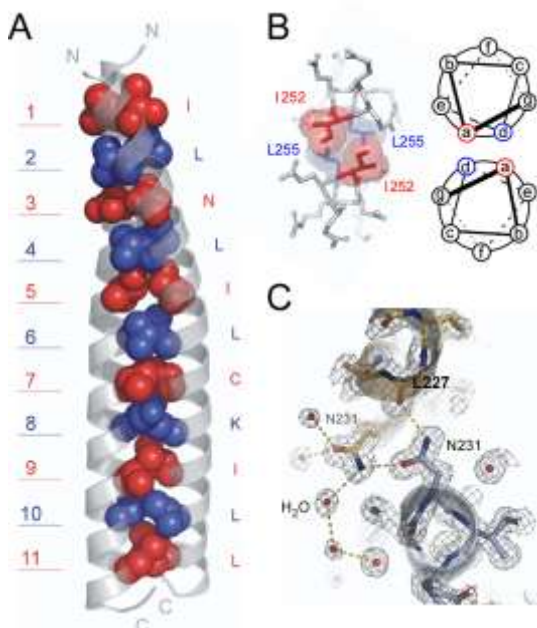
デザインする。最小のチャンネルタンパクを用いて行う今回の試みから得られる知見を応用すれば、生体内のより複雑で大きなイオンチャンネルの開閉機構の普遍的な理解に迫ることが出来ると考えている。

### 3. 研究の方法

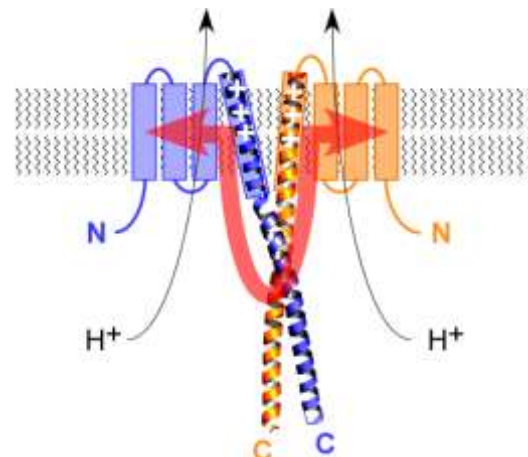
本申請研究はVSOPチャンネル会合ドメインのタンパクを発現、精製、結晶化し3次元構造をX線結晶構造解析で決定する。構造情報を基にした変異を導入した会合ドメインタンパク、および変異VSOPチャンネルの、生化学的性質の解析・電気生理学的機能解析を行い、両者の相関を解析する。また、VSOPのC端細胞内領域を外的にコントロールできる因子、温度、酸化還元(redox)、イオン強度、pHで性質の変化するコイルドコイルに置換したチャンネルをデザインし、チャンネル活性を人工的にコントロールすることを試みる。

### 4. 研究成果

H21年度はマウスVSOP細胞内会合領域のX結晶構造を高解像度(1.45Å)で決定することに成功した。細胞内会合領域は2量体並行コイルドコイル構造を呈していた。細胞内領域は2量体会合に寄与することを明らかとした。



構造を基にした変異体を作成し電気生理学的解析を行った。ゲーティング速度を調節する機能を有することを明らかとした。タンパク質生化学実験からコイルドコイル蛋白の熱安定性は弱く体温付近で融解し、またその融解温度は酸化還元による変化が観察された。H22年度は、細胞内領域を温度閾値の上昇したコイルドコイルに置換したチャンネルを作成し、温度閾値の上昇を電気生理学的に観察し、人工的に活性をコントロール出来るチャンネルの作成に成功した。また、マウスVSOP細胞内会合領域を酸化及び還元状態にて結晶を作成し構造決定することに成功した。併せて生化学的性質の解析を行い、細胞内会合領域は酸化還元に応答して会合安定性が変化することを示した。また膜貫通領域と細胞内領域をつなぐリンカー領域の二次構造解析を行い、ヘリックス構造を呈することを示した。電気生理学的機能解析から2量体に会合することでチャンネルが協調してゲーティングしていることを示し、さらに変異体チャンネルを解析することでリンカー領域の剛・柔軟性に対応してゲーティングの協調度合いが変化することを示した。以上の解析から、VSOPチャンネルは膜貫通領域から細胞内コイルドコイル領域までひとつながりのヘリックスとなっており、それ故、コイルドコイルの会合安定性情報がゲートに伝達され、熱や酸化還元によるゲーティングの修飾が起こることを明らかとした。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①Kubo Y, Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K, ” Structural and functional dynamics of the ATP receptor channel P2X(2)”、Brain Nerve 誌、査読有、62 巻、(2010)、1323-1329

② Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K, Kubo Y, ” Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X2 ATP receptor channel”、Journal of General Physiology 誌、査読有、133 巻、(2009)、93-109

③Chatelain FC, Gazzarrini S, Fujiwara Y, Arrigoni C, Domigan C, Ferrara G, Pantoja C, Thiel G, Moroni A, Minor DL, ” Selection of Inhibitor-Resistant Viral Potassium Channels Identifies a Selectivity Filter Site that Affects Barium and Amantadine Block.”、PLoS One 誌、査読有、4 巻、(2009)、7496-7502

④Kubo Y, Fujiwara Y, Keceli B, Nakajo K.、” Dynamic aspects of functional regulation of the ATP receptor channel P2X2.”、Journal of Physiology 誌、査読有、587 巻、(2009)、5317-5324

[学会発表] (計4件)

①藤原 祐一郎、黒川 竜紀、竹下 浩平、小林 恵、中川 敦史、岡村 康司、電位依存性プロトンチャネルの温度感受性ゲーテ

ィングは2量体会合構造安定性により決定する、第88回日本生理学会大会、2010年3月29日、横浜

②藤原 祐一郎、黒川 竜紀、竹下 浩平、小林 恵、中川 敦史、岡村 康司、Stability of the Cytoplasmic Dimer Assembly Regulates the Thermosensitive Gating of the Voltage-gated H<sup>+</sup> Channel、第55回生物物理学会大会(米国)(招待講演)、2010年3月8日、ボルチモア

③藤原 祐一郎、岡村 康司、電位依存性プロトンチャネル細胞内領域の結晶構造と機能的意義、生理学研究所研究会(招待講演)、2009年9月16日、岡崎

④久保 義弘、藤原 祐一郎、Batu Keceli, 中條 浩一、oltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X2 ATP receptor channel、第36回国際生理学会、2009年7月30日、京都

[図書] (計1件)

①藤原 祐一郎、Batu Keceli, 中條 浩一、山本 友美、久保 義弘、医学書院、「ATP 受容体チャネル P2X2 の膜上発現密度依存性と膜電位依存性」、生体の科学 「伝達物質と受容体」、2009年、502-503頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/tougouseiri/menu.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20532980

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：