

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659117  
 研究課題名（和文）ATP 受容体チャネル活性化時のシグナルフローのタンデムコンストラクトによる解析  
 研究課題名（英文）Analyses of the signal flow upon activation of ATP receptor channel by tandem repeat constructs  
 研究代表者  
 久保 義弘 (KUBO YOSHIHIRO)  
 生理学研究所・分子生理研究系・教授  
 研究者番号：80211887

研究成果の概要（和文）：ATP 受容体チャネル  $P2X_2$  は、3 個のサブユニットからなるが、2 分子の ATP の結合で活性化される。本研究は、2 分子の ATP 結合のシグナルが、3 量体中をどのように流れるかを明らかにすることを目的とした。3 量体中の変異の数を厳密にコントロールして導入する手法により 3 量体  $P2X_2$  の様々な領域に 1、2 もしくは 3 個の変異を導入して解析を行った。その結果、活性化シグナルは、ATP 結合部位、およびリンカー部位では、ATP の結合した 2 つのサブユニット上を伝わって流れ、膜貫通部位のイオン透過領域においては、3 つのサブユニットに拡がることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：ATP receptor channel  $P2X_2$  consists of three subunits, but it is known to be activated by binding of two ATP. The aim of this research was to understand how the activation signal by two ATP flows in the trimer. By establishing a method to introduce mutations controlling the number of mutations in the trimer, we introduced 1, 2 or 3 mutations at various amino acid residues in the trimer. The results suggested that the activation signal flows on the two ATP bound subunits down to the linker level and it spreads to three subunits at the ion channel pore level.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学、生体分子、タンパク質、ATP、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

結晶構造解析により ATP 受容体チャネル  $P2X_4$  が、2 回膜貫通型サブユニットの 3 量体であることが確定し、また、ATP 結合部位が膜貫通部位から遠く離れており、両者が beta シート構造のリンカー部位で連結されていることも明らかになった (Kawate et al. 2009) (図 1)。一方で、Hill 係数が 2 であること等から  $P2X_2$  チャネルは 2 分子の ATP の結合により活性化することが知られている。2 分子の結合が充分であるなら、活性化シグナ

ルは、リンカー部分や膜貫通部位では 3 量体のうちのいくつのサブユニットを伝播するのかという点は、未解明である。

我々は、これまでに、 $P2X_2$  が膜電位センサーを有しないにも関わらず、ATP 投与後の定常状態において膜電位依存性のゲーティングを示すこと等 (J Gen Physiol 2009; J Physiol 2009) を明らかにした。その経過中に、(a) ATP 結合部位の変異体 (K308A 等) を膜電位依存的活性化の観点からも解析し、(b) 膜貫通部位の変異体 T339S が膜電位依存

性を失うこと（図2）、(c) リンカー部分の変異体 D315A の ATP 濃度-応答関係が 2 成分からなり、高感受性成分は膜電位依存性を欠くこと（図3）を見いだした。これらの有用な変異体の知見を本研究の目的の達成に活用することとした。

図1 P2X<sub>2</sub>受容体の結晶構造、および我々が着目した部位

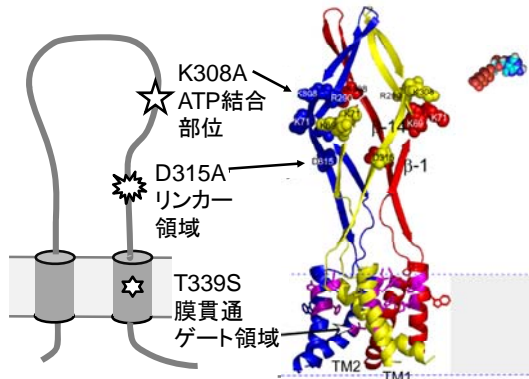


図2 T339S 変異による機能の変化

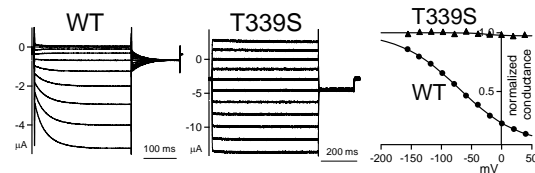
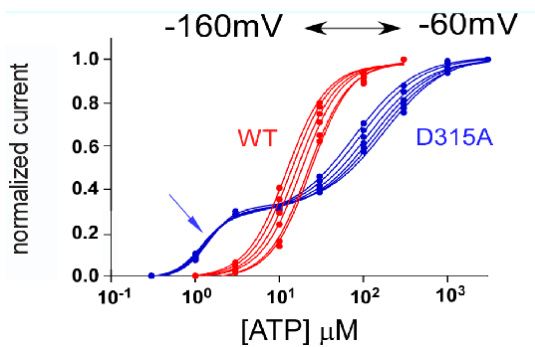


図3 D315A 変異による機能の変化



## 2. 研究の目的

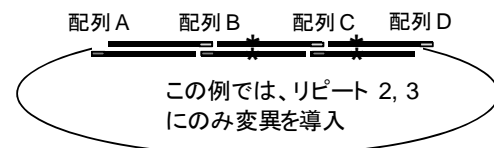
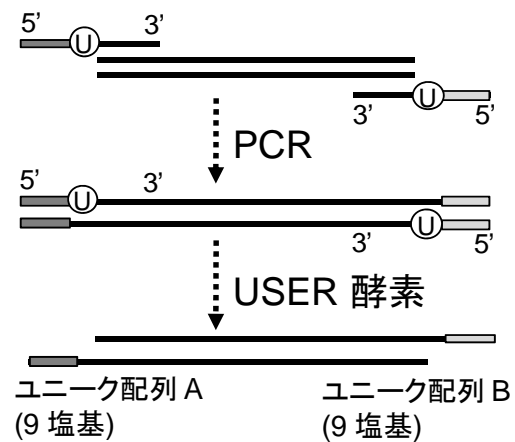
ATP 受容体チャネル P2X<sub>2</sub> はホモ 3 量体で構成されるが、2 分子の ATP の結合により活性化し、また、膜電位センサーを有しないにもかかわらず膜電位依存性のゲーティングを示す。本研究は、「リガンド結合からリンカーを経由し膜貫通部位のゲート開口に至る活性化シグナルの流れを、特にシグナルが流れるサブユニット数の観点から、明らかにすること、また、「ATP 結合と膜電位変化による活性化シグナルの集約機構を明らかにすること」を目的とした。我々は P2X<sub>2</sub> の ATP 結合や膜電位依存的活性化に影響を与える、1. で記した種々の変異体を同定していた。本研

究の目的達成のため、高効率 3 タンデムリピート作成法により 3 量体中にこれらの変異を「数と位置を正確に規定して」導入したコンストラクトを作成して電気生理学的解析を行った。

## 3. 研究の方法

P2X<sub>2</sub> の活性化時の分子内シグナルフローを明らかにすることを目指す本研究では、3 量体 P2X<sub>2</sub> 中の 3 サブユニットに、デザイン通りの位置、数の変異を導入することが必須で、それは、3 タンデムリピートの構築により可能となる。その作成は、一般的な方法では非常に効率が低い。そこで本研究では、Uracil を含んだ PCR プライマーを用いて各リピートを増幅し、Uracil-specific excision reagent (USER enzyme) を用いて、十分な長さの特異的 3' overhang 配列を得て、3 リピートをデザイン通りの順番で一挙にベクターにつなげる方法を用いる（図4）。作成したコンストラクトをツメガエル卵母細胞に発現させ、ATP-応答関係、コンダクタンス-膜電位関係、ゲート電流等、ATP と膜電位に依存する活性化の性質を電気生理学的に解析する。

図4 USR 法によるタンデムコンストラクトの高効率作成



## 4. 研究成果

(1) リガンドである ATP の結合という情報が分子内をどのように流れてチャネルのゲートの開口に至るか、特に、3 量体中のいくつのサブユニットを伝わっていくのかが、研究の焦点である。その目的の達成には、3 量体中に導入する変異の位置と数を厳密に規定

することが必要なので、3. で記した方法により、会合する3つのサブユニットをタンデムにつなげる方法により、1ないし2ないし3カ所の変異を導入した変異体を作成して、電気生理学的解析を行い、下記の知見を得た。

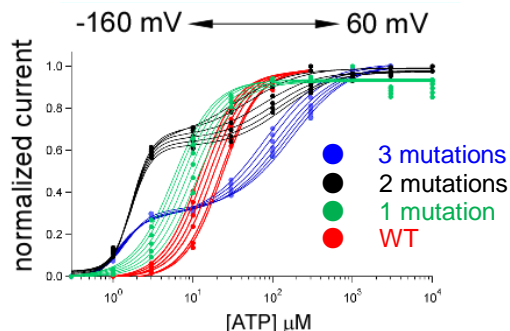
① ATP結合部位 K308Aの変異

3量体中に K308A を1カ所導入しても受容体チャネルとしての機能に大きな変化は見られなかった。2カ所導入すると、機能はほぼ失われた。よって ATP2 分子の結合が必要かつ充分であることが明らかになった。

② 細胞外 ATP 結合部位と膜貫通領域 TM2 をつなぐリンカー領域 D315Aの変異

D315A 変異を3カ所導入すると、[ATP]-応答関係が、2成分を示す。このことから、D315は、ATPの結合情報をゲートに伝えるリンカーであると考えられる。D315A 変異を、3量体中に1カ所導入しても、この形質は見られなかったが、2カ所導入すると明確に観察された。よって、正常な機能には、2カ所の正常なリンカー部位が必要であることが明らかになった。

図5 D315A 変異を3量体中に、1, 2, 3個導入した変異体の機能解析



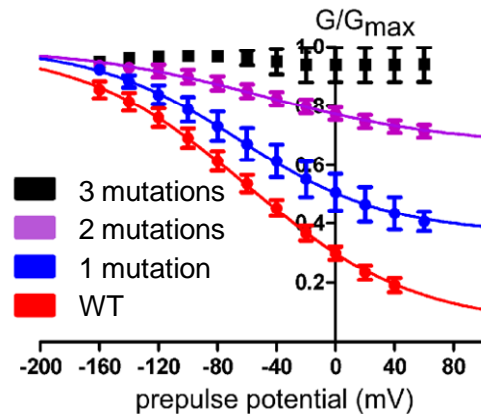
③ ゲート開口に関わる膜貫通領域の T339S の変異

P2X<sub>2</sub> は膜電位依存性を示すが、T339S 変異を3カ所導入すると膜電位依存性が失われ、ATP存在下ではどの膜電位でも開くようになるため、ゲート機能に寄与すると考えられる。3量体のこの部位に、1, 2, 3カ所の変異を導入したところ連続的に性質の変化が見られた(図6)。よって、この高さでは、ATPの結合情報は3つのサブユニットに伝達され、3つのサブユニットが等しく貢献していることが示された。

④ 以上の知見をまとめると、ATP結合部位(K308A)、リンカー部位(D315A)では、2個の正常なサブユニットが必要充分で、ポア領域(T339S)では、変異の数が増えると段階的に性質が変化することから、3つのサブユニットが

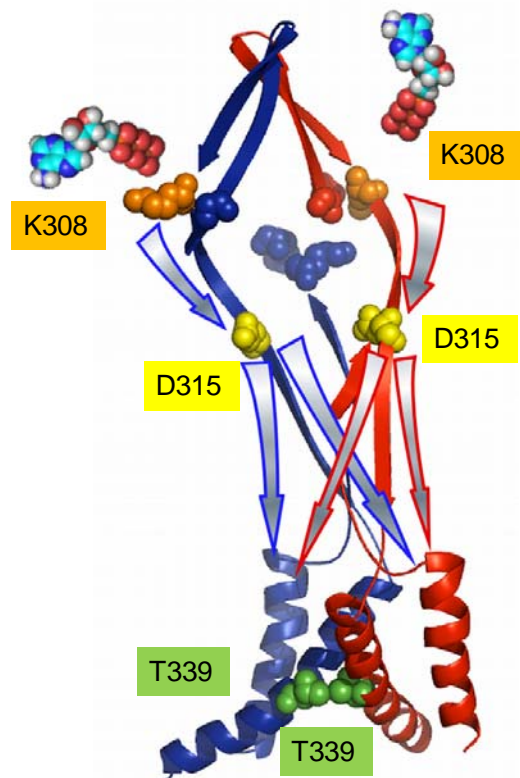
等しく貢献していることが明らかになった。

図6 T339S 変異を3量体中に、1, 2, 3個導入した変異体の機能解析



(2) さらに、シグナルのフローを直接的に解析するために、同一サブユニット上(シス)もしくは異なるサブユニット上(トランス)に、上述の異なる高さの変異を導入して、その性質の解析を行った。

図7 P2X<sub>2</sub> 受容体3量体中における、ATP分子の結合による活性化シグナルの流れ



① K308AとD315Aの場合には、シス変異の場合には、野生型と近い性質を示し、トランス変異の場合には、性質が大きく変化することを見いだした。2つの正常なサブユニットが必要充分であることを示している。シス変異の場

合には、2つの野生型サブユニットが残っているので、2つの正常なサブユニットがあれば、野生型に近い正常な性質を示すこと、そして、K308およびD315のレベルまでは、ATP結合シグナルが同一サブユニット上を流れることを示すものである。

② K308AとT339Sの場合は、変異をシス位置に導入した場合と、トランス位置に導入した場合で、性質に大差がなかった。

③ D315AとT339Sの場合にも、シス変異とトランス変異で、性質に大差がなかった。

(3) (1) (2)の実験結果を統合すると、2分子のATPが結合し、その活性化シグナルは、D315のレベルまで、同一サブユニット上を流れ、その後、T339Sのレベルでは、3つのサブユニットに等しく拡がる(図7)という活性化メカニズムが示された。

この研究成果について、既に学会にて成果を発表し、また、現在、英文原著論文作成の最終段階にある。

#### 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)

[学会発表] (計7件)

① Batu Keceli, Yoshihiro Kubo  
Subunit stoichiometry and signal flow analyses in the P2X2 trimer upon voltage- and [ATP]-dependent activation  
第90回日本生理学会大会  
2013年03月29日  
タワーホール船堀、東京都

② Yoshihiro Kubo, Batu Keceli  
Overview of the structure-function relationship and the regulation mechanisms of ATP receptor channel P2X.  
第86回 日本薬理学会年会, シンポジウム  
「Updating physiological understanding of P2X receptor functions for novel pharmacology」(招待講演)  
2013年03月21日  
福岡国際会議場、福岡県

③ Yoshihiro Kubo  
Analyses of the signal flow and subunits' contribution in the P2X2 trimer upon voltage and [ATP]-dependent activation by three tandem repeat constructs  
Purine 2012 International Meeting, Symposium "Structure and dynamic properties of P2X receptors" (招待講演)  
2012年06月01日  
九州大学医学部百年講堂、福岡県

④ Batu Keceli, Yoshihiro Kubo  
Structural rearrangements of the linker region between the ATP binding site and the transmembrane domains upon P2X2 receptor channel gating.

Purine 2012 International Meeting,  
2012年06月01日  
九州大学医学部百年講堂、福岡県

⑤ Batu Keceli, Yoshihiro Kubo  
Structural rearrangements of the b-sheets linking the ATP binding site to the transmembrane domains upon P2X2 receptor channel gating  
第89回日本生理学会大会  
2012年3月29日  
松本文化会館(長野県)

⑥ Batu Keceli, Yoshihiro Kubo  
Analyses of the signal flow and subunits' contribution in the P2X2 trimer upon voltage- and [ATP]-dependent activation by three tandem repeat constructs.  
Gordon Research Conference -Ligand Recognition and Molecular Gating-  
2012年1月16日  
Four Points Sheraton (Ventura, CA, USA)

⑦ Batu Keceli, Yoshihiro Kubo  
Analyses of the signal flow and subunits' contribution in the P2X2 trimer upon voltage- and [ATP]-dependent activation by three tandem repeat constructs.  
第34回日本神経科学大会  
2011年9月17日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/biophys/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 義弘 (KUBO YOSHIHIRO)  
生理学研究所・分子生理研究系・教授  
研究者番号: 80211887

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し

##### (4) 研究協力者

Keceli Batu (KECELI BATU)  
生理学研究所・分子生理研究系・特別協力  
研究員  
研究者番号: 80645250