

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770089

研究課題名(和文) マウス由来膜タンパク質TRICチャネルのX線結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystal structure of Tric channel

研究代表者

窪田 恵子 (Kubota, Keiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：50597870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：Tricチャネルは、小胞体からのカルシウム放出の制御機構の一旦を担っており、近年見つけた新しいタイプの3量体型陽イオンチャネルであるということからも大変興味深い。本研究では、構造学的観点からカルシウムシグナル制御機構を明らかにするために、昆虫細胞と大腸菌を用いたTricチャネルの大量調整法の確立、精製、結晶化、X線回折実験を行った。様々な種のTricを調製することに成功し、結晶化を行ったところ、クラミドモナスとバクテリア2種由来のTricで結晶化に成功した。特にバクテリア由来のSS0ではより大きな結晶が得られ、最高分解能7.5Åの回折斑点を得た。

研究成果の概要(英文)：Ca ions are important second messenger in many cellular signal transduction pathways. Trimeric intracellular cation (Tric) channels is thought to play an essential role in Ca-release control from intracellular stores. Furthermore, Tric channel represents a novel class of trimeric monovalent cation channel, especially behaves as K ion channel. To elucidate the structure basis of the Ca-release control mechanism, TricA was expressed in SF9 cells and E coli, and purified and crystallized. We have succeeded overexpression and purification of various Tric homologs. And we obtained the crystals of Chlamydomonas Tric and two type bacteria Trics. Especially, the crystals of SS0 greatly grew up and diffracted X-rays to 7.5-angstrom resolution.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 膜タンパク質 イオンチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物においてカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )は、細胞内シグナル伝達のスイッチとして広く利用されており、筋収縮やホルモン分泌、神経伝達、免疫応答、細胞死や細胞増殖等の多彩な生体機能の重要な調節を担っている。生体内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は主に  $\text{Ca}^{2+}$ を貯蔵している小胞体により調節され、各種刺激に反応して  $\text{Ca}^{2+}$ を小胞体内腔から細胞質へと放出し、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることにより、様々なシグナルを下流に伝達している。この  $\text{Ca}^{2+}$ は小胞体膜に存在するリアノジン受容体 (RyR) とイノシトール三リン酸受容体 (IP3R) の二つの  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルから放出される事が知られている (図1)。しかし、両チャネルの開口に伴い、陽イオンである  $\text{Ca}^{2+}$ が小胞体内腔から放出されると、微小閉鎖空間である小胞体内腔側に局所的な負電荷が発生し、 $\text{Ca}^{2+}$ 放出を阻害することが推定される。生理的条件下では、この  $\text{Ca}^{2+}$ 放出は数十ミリ秒にも及ぶことが観察されており、その機能メカニズムは長年不明とされてきた。この  $\text{Ca}^{2+}$ 放出における持続性は、興奮性細胞において下流の活動電位の頻度に深く関係しており、そのメカニズムの解明は極めて重要である。

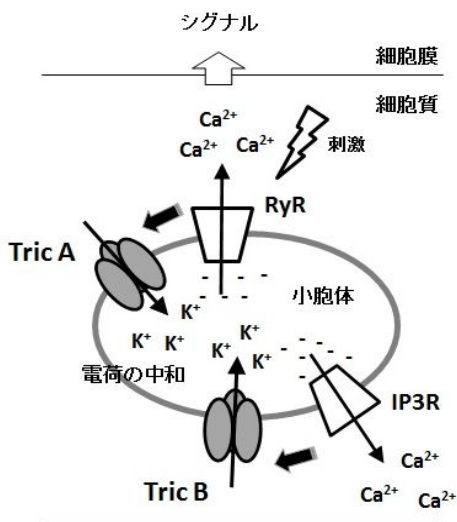


図1 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル制御におけるTricチャネルの役割

近年、カウンターイオンチャネルとして、小胞体膜に存在する Tric (Trimeric intracellular cation) A 及び TricB の二つのカリウムチャネルが発見され、RyR と IP3R の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出に連動して細胞内から小胞体内腔へカリウムイ

オン ( $\text{K}^+$ ) を放出することで、小胞体内腔に蓄積された負電荷を中和し、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを持続させていることが明らかとなった (Yazawa M *et al.*, *Nature*, 2007)。このことから、現在様々な分野で、多彩な生理機能を担うカルシウムシグナル制御の全容理解に注目が集まっている。

### 2. 研究の目的

$\text{Ca}^{2+}$ シグナル制御に関わるチャネルは膜タンパク質であり、立体構造の解明が遅れていることから、その詳細なるメカニズムは未だ不明な点が多い。RyR と IP3R の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出が TricA、TricB をどの様に活性化し連動しているかという点も不明であり、学術的にも大変興味深い。また、TricA のノックアウトマウスは、現在、脳梗塞や心筋梗塞の発生リスクが高いと問題視されている人間の夜間高血圧症と同様の症状を示すことが知られており、近年 TricA が原因遺伝子であると同定された (Yamazaki D *et al.*, *Cell Metab.*, 2011)。このことから、Tric はこれまで原因が不明であった夜間高血圧症の解明の足掛かりとして医学的にも大変興味深い。

そこで本研究では、カルシウムシグナル制御の鍵とも言える小胞体膜に存在するカウンターイオンチャネル、TricA と TricB を対象とし、その X 線結晶構造解析を行い、カルシウムシグナル制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 真核生物由来 TricA 及び TricB の発現系の構築

X 線結晶構造解析法において、構造を取り難い領域が含まれていると結晶の形成や成長が阻害されるほか、得られた結晶の X 線回折データにも悪影響を及ぼすことが多いことが知られている。そこで、最初にマウス由来の TricA 及び TricB についてディスオーダー予測プログラム、XtalPred-RF を用いて、構造を取り難い領域を解析した。その結果 C 末端側 39 残基と 43 残基が構造を取り難いことが示唆されたことから、全長及び C 末端側を削ったコンストラクトについて、C 末端側に

GFP と His タグを付加した融合タンパク質として、昆虫細胞を用いた大量発現系の構築を行った。

さらにホモログタンパク質であるゼブラフィッシュ由来の TricA 及び TricB とショウジョウバエの TricA、クラミドモナス由来の Cre1 も同様に全長及び C 末端側を削ったコンストラクトを作成し、昆虫細胞を用いた大量発現系の構築を行った。

#### (2) バクテリア由来の Tric の発現系の構築

近年、バクテリア由来の Tric ホモログタンパク質が発見されたことから、より安定性の高そうな 2 種類、*Vibrio Cholerae* Vch1 と *Sulfolobus solfataricus* SSO1 をクローニングし大腸菌を用いた大量発現の構築を行った。その際、C 末端側に His タグと GFP-His を付加したものを作成した。発現用大腸菌株は Rosetta(DE3)と発現ストレスに強いとされている C41(DE3)株を用い、発現誘導条件の最適化を行った。

#### (3) 蛍光ゲルろ過 (FSEC) 法による、界面活性剤の検討と性状の解析

融合タンパク質として C 末端側に GFP を付加し発現させた Tric タンパク質を、様々な界面活性剤で可溶化し、ゲル濾過分析を行い GFP の強度を検出した。これにより、Tric-GFP の可溶化後のタンパク質量及び会合状態を調べることで、Tric をより安定に保つことのできる界面活性剤の同定と各ホモログタンパク質の中でより性状の良いものの選択を行った。可溶化には界面活性剤として DDM、MNG3、TritonX-100、UDM、DM、C12E8 を用い、各々 1% 界面活性剤存在下、4、2 時間攪拌した後、15000 rpm、60 分遠心し、上清をゲル濾過サンプルとした。またゲル濾過の緩衝液は 0.1% 各界面活性剤を用いた。

#### (4) Tric の精製結晶化

マウス由来 TricA、TricB は昆虫細胞により大量発現したが、不安定で性状が悪かったことから、ホモログであるゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、クラミドモナス、バクテリア由来の Tric の C 末端側に His タグのみを

付加したコンストラクトを用いて、精製結晶化を行った。各菌体を超音波破碎した後、低速遠心により未破碎菌体を除去し、超遠心により膜下画分を得た。その後膜画分を各々最適な界面活性剤で可溶化、ニッケルカラム、ゲル濾過カラムにより精製を行った。各タンパク質を終濃度 6-10 mg/ml まで濃縮し、市販と自作のスクリーニングキットを用い、sitting drop 法で約 500 条件の結晶化スクリーニングを行った。また、各タンパク質を終濃度 10-40 mg/ml まで濃縮し、脂質キュービクフェーズ(LCP)法でも約 400 条件の結晶化スクリーニングを行った。脂質は monolein (9.9MAG)と monopalmitolein (9.7MAG)を用い、脂質とタンパク質の比が 6:4 で結晶化を行った。さらに通常の結晶化スクリーニングサンプルに脂質(POPC:POPE:POPG(3:1:1)、*E. coli* total extract、*E. coli* polar lipid extract)を添加し結晶化のスクリーニングも行った。

## 4. 研究成果

### (1) 真核生物由来 TricA 及び TricB の結晶化

全長と C 末端側を欠失させた、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、クラミドモナス由来 TricA、TricB の蛍光ゲル濾過法の結果、マウス由来の TricA、TricB はどの界面活性剤を用いても不安定で性状が悪いことが明らかとなった。一方、ゼブラフィッシュ由来 TricA、TricB とショウジョウバエ TricA は MNG3 で可溶化精製したところ、よりシャープなピークが得られ、結晶化に十分な純度の試料が得られたが、結晶は得られなかった。クラミドモナス由来の Tric は MNG3 で可溶化精製したところ、全長で結晶が得られた。しかし分解能が低く、構造解析に適した結晶ではなかった。

### (2) バクテリア由来の Tric の結晶化

真核生物の TricA、TricB で構造解析に十分な結晶が得られなかったことから、より耐熱性の高い、*Vibrio Cholerae* Vch1 と *Sulfolobus solfataricus* SSO1 をクローニングした。バクテリア Tric はどちらも安定で DDM をはじめとする多くの界面活性剤で精製が可能となった。両者の熱安定性を調べた結果、SSO1

は Tm が 65 、Vch1 は Tm が 50 と真核生物由来の Tric よりも安定性が高いことが明らかとなった。どちらも DDM で可溶化精製したところ、シャープなピークが得られ、結晶化に十分な純度の試料が得られたが、結晶は得られなかった。しかし、界面活性剤を DM に変えたところ結晶が得られた。結晶は Vch1 より SSO1 の方がより再現性が高く、大きく成長した。しかし SSO1 の結晶の分解能は 10

と低かった。そこで SSO1 の C 末端側の His タグの前に HRV3C による切断サイトを挿入したコンストラクトを作成し、DM で可溶化精製後 His タグを切断、結晶化を行ったところ、最高分解能 7.5 の棒状の大きな結晶が得られた(図2)。

今後は構造解析に適した分解能が得られる結晶を得るため、引き続き条件検討を行っていく予定である。特にミセルサイズの小さな界面活性剤を用い、構造解析に適した結晶の作成を試みる予定である。

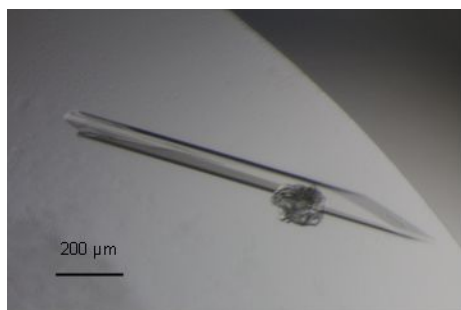


図 2 SSO1 の結晶

## 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〕

なし

〔学会発表〕

なし

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRRORLifeSciDivJp2/Welcome.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

窪田 恵子 (KUBOTA KEIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号 : 50597870

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし