

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670108

研究課題名(和文) 温度受容分子の統合的機能解析

研究課題名(英文) Integrative functional analysis of thermosensitive ion channels

研究代表者

藤原 祐一郎 (Fujiwara, Yuichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が温度を感じ取るメカニズムを明らかにすることを目的に、末梢感覚神経に発現し温度を感知するTRPチャネルファミリーを対象に、分子の構造と機能の解析を行った。卵母細胞を用いた機能解析を行い、野生型および変異体TRPチャネルに対して温度に依存した活性の測定を行った。温度感知に重要な働きを持つドメインとして知られる、TRPV1とTRPM8の細胞内コイルドコイルドメインおよびTRPA1のアンキリンドメインの蛋白質の発現・精製を大腸菌を用いて行った。TRPM2およびTRPM3のコイルドコイルドメインの、高解像度の結晶構造を解析することに成功した。各種TRPコイルドコイルドメインの熱安定性を解析した。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of thermosensation in our body, we analyzed structure-function of TRP channels that have a major role in thermosensation in the peripheral sensory nervous system. We analyzed electrophysiological properties of wild-type TRP channels and the mutants expressed in oocytes. We expressed and purified coiled-coil domain proteins of TRPV1 and TRPM8 and the ankyrin domain protein of TRPA1, that are reported to be involved in temperature sensing, with *E. coli* expression system. We also succeeded in determining the high resolution crystal structures of the coiled-coil domains of TRPM2 and TRPM3. We analyzed thermal stabilities of the coiled-coil domain proteins.

研究分野：生理学

キーワード：生理学 温度 イオンチャネル 構造機能相関 生物物理学

### 1. 研究開始当初の背景

温度環境は生命維持にとって重要な因子であり、生理学者は古くから「人間は如何にして温度を感じているのか?」という問題に対して取り組んできた。温度をセンスする分子がイオンチャネルであると分かったのは最近の話である。2000 年前後にクローニングされた温度を感知する TRP チャネルファミリーは Thermo TRP と称され、精力的に研究が進められている。現在では、変異体を用いた解析などから温度を感じるドメインが分子に存在することが明らかとなって来ている。

「そもそもチャネル蛋白が温度を感じる事が出来るのは何故なのか?」

天然のタンパク質には marginal stability と呼ばれる絶妙にバランスの取れた安定な状態が存在し、温度が上昇(下降)すると立体構造が変化する。分子内にある温度感知ドメインの熱による立体構造の変化が、膜貫通領域のゲートに伝わり、チャネルが開閉することが考えられるが、この一連の過程は未だかつて詳細に解析されていない。最近、申請者らは、好中球などの貪食細胞に発現し体温感知の一端を担うと考えられている電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルの細胞内構造の熱安定性がチャネル開閉の温度依存性と深く関わっていることを見いだした(Fujiwara et. al. Nature communications (2012))。本研究では、この知見を発展させ、熱という物理的入力から Thermo TRP を介して温度を感じるという生物学的出力に変換される仕組みを明らかにしたい。

### 2. 研究の目的

(全体構想)我々は 36.5 の体で恒常性を保って生きています。そして、時に火や氷雪を「熱い」「冷たい」と感じて回避します。本研究では、我々が温度を感じ取るメカニズムを分子の構造と機能のレベルから明らかにすることを目的に行われます。

(具体的目標)温度を感知するイオンチャネル(Thermo TRP)の温度を感知するドメインの結晶構造を高解像度で解き、そのタンパク質ドメインの温度特性を熱力学的に解析します。Thermo TRP のイオンチャネルとしての機能を電気生理学的に温度変化と対応させて解析します。温度という「共通のパラメータ」で解析軸を統一して結晶構造 - タンパク質 - 分子機能とシームレスな解析を行い、「イオンチャネルの温度感知機構」の普遍的な概念の確立を目指します。

### 3. 研究の方法

TRP チャネルが温度を感知できる機構を解明するため、学際的な方法を取り入れて解析を行なう。

(1)温度受容特性を決定するドメインのタンパク質を大腸菌を用いて発現・精製し、部分構造の詳細とチャネル機能の理解を目的に

結晶構造解析を行う。

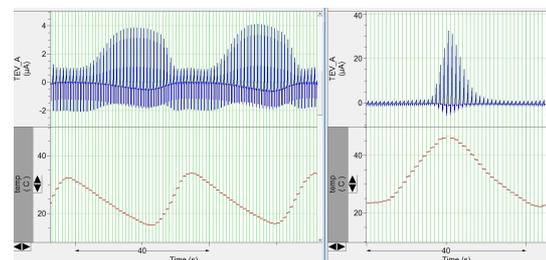
(2)細胞内ドメイン蛋白の熱力学的性質でイオンチャネルの温度受容特性が決まるのかどうかを知ることを目的に、温度上昇に伴うタンパク質の二次構造変化と、その温度閾値・温度依存性を解析する。

(3)Thermo TRP の電気生理学的性質をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて解析する。構造情報を基に作成した変異体チャネルやキメラチャネルの温度感知特性を比較解析し、温度変化に伴う細胞内領域の構造変化が温度に依存して開き閉じるチャネル機能に変換される機構を考察する。

### 4. 研究成果

(1)ThermoTRP の電気生理学的解析。

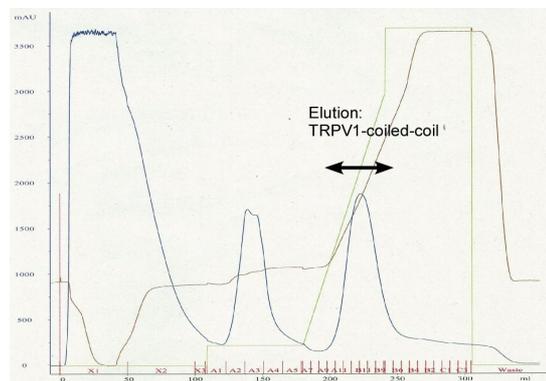
アフリカツメガエル卵母細胞に、温度上昇を感知して開く human TRPV1、human TRPV2、human TRPV3、human TRPV4 および温度下降を感知して開く human TRPPA1、human TRPM8 の cRNA をインジェクションし、発現させ、温度変化に伴う電流を測定した(図1)。閾値を超える温度の上昇や下降に伴う電流値の変化が測定できた。



(図1、左:TRPM8 の電流と温度変化、右:TRPV1 の電流と温度変化)

(2)温度を感知するドメインの蛋白精製。

TRPV1 と TRPM8 の細胞内領域を入れ替えたキメラ変異体の電気生理学的解析を行った先行研究から、TRPV1 と TRPM8 の温度感知ドメインは細胞内に存在する可能性が示唆されている。また、同様に TRPA1 の細胞内アンキリンリピートドメインに変異を導入した先行研究から、TRPA1 の温度感知ドメインも細胞内領域に存在することが示唆されている。

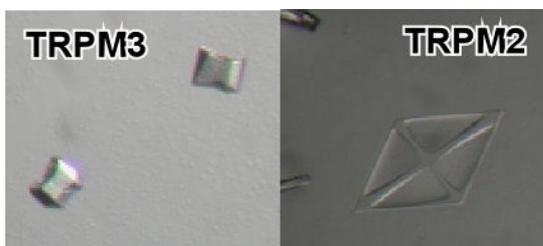


(図2、ニッケルアフィニティー絡むを用いて精製した TRPV1 の細胞内ドメイン)

TRPV1、TRPM8 のコイルドコイルドメイン蛋白質および TRPA1 のアンキリンリピート蛋白質をリコンビナントに大腸菌を用いて発現し精製を行った(図2)。発現効率および精製効率を高めるために maltose-binding protein を付加した。同様の方法で、TRPM2、TRPM3 のコイルドコイルドメイン蛋白質の発現・精製を行った。精製した蛋白質は後述する蛋白質化学的解析に用いた。

### (3)TRP の細胞内領域の結晶構造解析。

精製した TRPV1、TRPM8、TRPM2、TRPM3 のコイルドコイルド蛋白質を用いて結晶作成を試みた。スクリーニングキットを用いて結晶化実験を行い、複数の結晶化条件にて TRPM2 および TRPM3 の結晶が得られた(図4)。



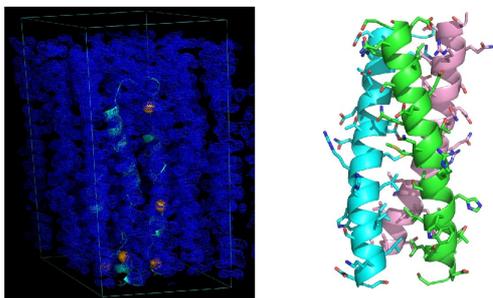
(図4、左：TRPM3(結晶条件 0.05M NH<sub>4</sub>F, 15% MPD, 0.1 M NaOAc pH5.0)、右：TRPM2 のコイルドコイルドメインの蛋白質結晶(結晶条件 0.005 M KCl, 0.05M Hepes pH7.3, 45% EtOH))

得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。それぞれ、

(TRPM3)space group: P3  
unit cell: 39.207 39.207 81.418 (Å)  
a=,b=,c= 90.000 90.000 120.000 (deg)  
resolution: 50.0-1.90 (2.02-1.90) (Å)

(TRPM2) space group: P21  
unit cell: 23.747 90.112 39.071 (Å)  
a=,b=,c= 90.000 90.478 90.000 (deg)  
resolution: 50.0-1.30 (1.39-1.30) (Å)

の回折データが得られ、構造解析を行った。TRPM3 の初期位相は SeMet を用いた蛋白質結晶の回折像から求めた。TRPM2 の初期構造は先に解けた TRPM3 の結晶構造から分子置換法を用いて解析した(図5)。初期構造から精密化を行いモデル構築した。



(図5、左：TRPM3 の結晶格子と電子密度、オレンジはセレン原子、右：TRPM2 のコイルドコイルドメインの結晶構造リボンモデル)

結晶構造は予測に反して 3 量体構造であ

った。これは TRP チャンネルが 4 量体で機能することを考えると驚くべきことである。TRP チャンネルは代表者らの研究からコイルドコイルドメインを利用して 4 量体会合を行っているという報告があり、今回構造の解けた TRPM2 および TRPM3 では会合が緩い状態になっていることが考えられる。

### (4)コイルドコイルドメインの熱安定性

発現・精製したコイルドコイルドメイン蛋白質の熱安定性を CD スペクトラムを用いて解析した。一般的に高い熱安定性 ( $T_m > 70$ ) を呈することが知られるコイルドコイル蛋白質であるが、おおむね低い  $T_m$  (40 ~ 55) を呈した。

### (5)変異体を用いた機能解析

コイルドコイルドメインを欠失させた変異体を作成し、電気生理学的機能解析を行ったところ、電流は観察されなかった。また、今後の full-length チャンネルの結晶構造解析のため大腸菌のチャンネルの膜貫通領域と TRP の細胞内領域を連結したキメラチャンネルを作成し電気生理学的測定を行ったが、電流は観察されなかった。

以上の結果を統合すると、TRP チャンネルは比較的熱安定性の弱いフレキシブルな構造を取り得る会合領域を細胞内領域に有して、その温度感受性を担っていることが予測される。細胞内会合領域の締め具合と、それに連結する膜貫通領域ゲートの柔軟性が温度によるゲーティングを生み出すことが予測される。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Fujiwara Y., Kondo HX, Shirota M, Kobayashi M, Takeshita K, Nakagawa A, Okamura Y, Kinoshita K.、Structural basis for the membrane association of ankyrinG via palmitoylation.、Sci Rep.、査読有、in press

Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y., Igarashi S, Suzuki E, Nureki O, Hattori M, Ueda T, Shimada I.、Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region.、Proc Natl Acad Sci U S A.、査読有、in press

Kasuya G, Fujiwara Y., Takemoto M, Dohmae N, Nakada-Nakura Y, Ishitani R, Hattori M, Nureki O.、Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels.、Cell Rep.、査読

有、14 卷、2016、932-944、DOI. 10.1016/j.celrep.2015.12.087  
Okuda H, Yonezawa Y, Takano Y, Okamura Y, Fujiwara Y.、Direct Interaction between the Voltage-sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H<sup>+</sup> Channel Dimers.、Journal of Biological Chemistry、査読有、291 巻、2016、5935-5947、DOI. 10.1074/jbc.M115.666834  
Okamura Y, Fujiwara Y., Sakata S, Gating Mechanisms of Voltage-Gated Proton Channels.、Annual Reviews of Biochemistry、査読有、84 巻、2015、685-709、DOI. 10.1146/annurev-biochem-060614-034307.  
Fujiwara Y. Okamura Y. Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels、Current Topics in Membranes、査読有、74 巻、2014、259-292、DOI.10.1016/B978-0-12-800181-3.00010-5  
Fujiwara Y., Kurokawa T., Okamura Y.、Long  $\alpha$ -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel.、Journal of General Physiology、査読有、143 巻、2014、377-386、DOI.10.1085/jgp.201311082  
Takeshita K., Sakata S., Yamashita E., Fujiwara Y., Kawanabe A., Kurokawa T., Okochi Y., Matsuda M., Narita H., Okamura Y., Nakagawa A.、X-ray Crystal Structure of Voltage-gated Proton Channel.、Nature Structural & Molecular Biology、査読有、21 巻、2014、352-357、DOI. 10.1038/nsmb.2783  
Fujiwara Y., Kurokawa T., Takeshita K., Nakagawa A., Larsson HP., Okamura Y.、Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H<sup>+</sup> Channel.、Journal of Physiology、査読有、591 巻、2013、627-640、DOI. 10.1113/jphysiol.2012.243006  
Fujiwara Y., Takeshita K., Nakagawa A., Okamura Y.、Structural Characteristics of the Redox Sensing Coiled-coil in the Voltage-gated H<sup>+</sup> Channel、Journal of Biological Chemistry、288 巻、2013、17968-17975、DOI. 10.1074/jbc.M113.459024  
Fujiwara Y., Nakagawa A., Okamura Y.、Structure and function of dimeric assembly in voltage-gated H<sup>+</sup> channel.、Spring-8 Research Frontiers 2012、査読有、2012 巻、2013、14-15

〔学会発表〕(計 16 件)

藤原祐一郎、糟谷豪、服部素之、瀧木理、ATP 受容体(P2X)の 2 価イオンによる修飾とリガンド選択性の構造基盤、第 9 3 回日本生理学会大会、2016 年 03 月 24 日、札幌  
藤原祐一郎、Electrophysiological approaches to structural dynamics of the voltage-gated H<sup>+</sup> channel.、第 5 3 回日本生物物理学会年会、2015 年 09 月 15 日、金沢  
奥田 裕子、米澤 康滋、鷹野 優、岡村 康司、藤原 祐一郎、電位依存性 H<sup>+</sup> チャネル S4 領域のトリプトファン残基が 2 量体間で協同し脱活性化のキネティクスを遅くする、第 1 2 0 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 9 2 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 03 月 21 日、神戸  
竹下 浩平、坂田 宗平、山下 栄樹、藤原 祐一郎、岡村 康司、中川 敦史、電位依存性プロトンチャネルの結晶構造、第 1 2 0 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 9 2 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 03 月 21 日、神戸  
Yuichiro Fujiwara, Yasushi Okamura、Voltage-gated H<sup>+</sup> channel dimer: from molecular structure to physiological function、「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」領域終了記念シンポジウム、2015 年 03 月 6 日、大阪  
藤原 祐一郎、岡村 康司、電位依存性 H<sup>+</sup>チャネルのゲート電流、第 5 2 回日本生物物理学会年会、2014 年 09 月 25 日、札幌  
藤原 祐一郎、近藤寛子、城田 松之、小林 恵、竹下 浩平、中川 敦史、岡村 康 司、木下 賢吾、イオンチャネルアンカー蛋白質(アンキリン G)の細胞膜接着機構の構造基盤、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 09 月 11 日、横浜  
岡村康司、藤原祐一郎、川鍋陽、坂田宗平、黒川竜紀、電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1 の動作原理、第 91 回日本生理学会大会(招待講演)、2014 年 03 月 18 日、鹿児島  
藤原祐一郎、岡村康司、Voltage Sensing Mechanism in the Voltage-Gated H<sup>+</sup> Channel.、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16 日、鹿児島  
奥田裕子、岡村康司、藤原祐一郎、電位依存性 H<sup>+</sup> チャネルのゲーティングに対する S4 領域の構造基盤、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16 日、鹿児島  
藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司、Long  $\alpha$ -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel.、第 58 回米国生物物理学会大会、2014 年 02 月

19日、San Francisco (米国)  
竹下浩平、坂田宗平、山下栄樹、藤原  
祐一郎、川鍋陽、黒川竜紀、大河内善史、  
松田真、成田宏隆、岡村康司、中川敦  
史、X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF  
VOLTAGE GATED PROTON CHANNEL、第58  
回米国生物物理学会大会、2014年02月  
19日、San Francisco (米国)  
藤原祐一郎、竹下浩平、中川敦史、岡  
村康司、Structural Characteristics  
of the Redox Sensing Coiled-coil in  
the Voltage-gated H<sup>+</sup> Channel、第2  
回 HD Physiology 国際シンポジウム、  
2013年06月28日～2013年06月29日、  
東京  
藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司、  
Continuous  $\alpha$ -helices of S4 and  
coiled-coil form the dimer interface  
in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel、第  
2回 HD Physiology 国際シンポジウム、  
2013年06月28日～2013年06月29日、  
東京  
岡村康司、藤原祐一郎、坂田宗平、河  
合喬文、筒井秀和、大河内善史、  
Molecular diversities of voltage  
sensing: from ion permeation to  
enzyme、Neuro2013 (招待講演)、2013  
年06月20日、京都  
Fujiwara Y., Okamura Y., Crystal  
Structure of AnkyrinG: the Ion  
Channel Anchoring Protein、Neuro2013、  
2013年06月20日、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
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：