

温度・疼痛センサー蛋白質活性化機構の X 線 1 分子動態計測による 解明

研究代表者： 清水 啓史（医学系研究科・講師）

概 要	
	研究代表者はこれまでに金ナノ結晶を観測プローブとして蛋白質 1 分子の構造変化を計測する、X 線 1 分子動態計測法の開発を行ってきた。2008 年に Cell 誌で KcsA チャンネルの構造変化を発表した際にビデオレート（30 フレーム/秒）であった時間分解能をサブミリ秒まで向上させると共に、溶液条件を観測中に変化させ運動応答を計測することを可能にした。本研究では、温度・疼痛受容センサー蛋白質である TRP チャンネルの X 線 1 分子動態計測を行い、その活性化機構を分子揺らぎと構造変化の相関から動的に解明することを目指して研究を開始した。
関連キーワード	TRP チャンネル、1 分子計測、X 線回折、温度センサー、疼痛センサー

研究の背景および目的

X 線 1 分子動態計測法は金ナノ結晶を観測プローブとして蛋白質に取り付け、溶液条件によって異なる蛋白質の構造変化を、放射光白色 X 線を観測光として用いて動画計測する計測法である（図 1 参照）。代表者は以前、KcsA カリウムチャンネルを用いて観測を行い、開閉に伴うねじれ運動をビデオレートで計測することに成功した（H.Shimizu., et.al. Cell 2008）。その後、観測法開発により、1 画像を計測する観測速度をサブミリ秒にまで向上させて動画計測するとともに、溶液条件を観測中に変化させ運動応答を計測することを可能にした。本研究では、温度・疼痛受容センサー蛋白質である TRP チャンネルの 1 分子動態計測を行うことを目的とする。

TRP チャンネルファミリーはカチオン透過性のイオンチャンネル蛋白質であり、分子種によって異なる温度範囲で活性化する温度センサー分子である。また、トウガラシの辛み成分であるカプサイシン、ニンニクに含まれるアリシン、メントールなど、

味関連物質の受容体として、溶液 pH で開閉が制御される疼痛センサーとしても機能することが知られている。

近年、低温電子顕微鏡を用いた膜蛋白質の立体構造解析が盛んに行われており、次々に新規立体構造が得られている。TRP チャンネルファミリーはこの手法で構造解析が飛躍的に進んだ代表的な蛋白質群であり、様々な分子種の立体構造情報が蓄積している。リガンドや阻害剤による立体構造変化への影響も盛んに調べられているが、温度によって活性化される分子機構については静的な立体構造解析では解明が難しい。

本研究課題では、代表者が開発・改良を続けることで、高い時間・空間分解能をもつ 1 分子態計測法となった X 線 1 分子動態計測法を TRP チャンネル分子に応用することによって、分子が温度をはじめとする様々な刺激によって活性化する分子機構を動的に解明することを目指す。

研究の内容および成果

TRP チャンネルファミリーのうち、立体構造解析が最初になされたこと、室温より高い温度で活性化されること、リガンドによる活性化が起きることにより、TRPV1 を観測対象とすることとした。哺乳類の細胞を用いた、大量発現・精製・変異体の作製の必要があるため、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の発現・精製支援プロジェクトとして小川准教授（東京大学）、村山准教授（順天堂大学）が主催しているプロジェク

トの支援課題として採択され、発現・精製の支援を受けて研究を展開した。

ラットで得られている立体構造を参考にして、ヒト TRPV1 チャンネルの発現配列を決定した。X 線 1 分子動態計測を行うには、観測基板に分子の一端を固定し、他端に金ナノ結晶を取り付けて観測を行う。この時、分子の構造変化がきちんと測定できるように、固定方法を検討する必要がある。立体構造情報を利用しながら、固定サイト選択して

導入した。この TRPV1 チャンネルを培養細胞中に発現し、その機能を培養細胞中、および大量発現・精製後に人工脂質二重膜に再構成した状態で計測した。その結果、リガンドに対する機能応答、アンタゴニストに対する機能応答特性を保持していることを、その濃度依存性と共に確認した。この精製蛋白質を用いて X 線 1 分子動態計測を試みた。観測は大型放射光施設 (SPring-8) で行った。代表者がこれまでに放射光施設に導入した X 線集光ミラー、高速観測システムを用いてサブミリ秒時間分解能での 1 分子動態計測を行った。その結果アゴニスト存在下で大きなねじれ運動を計測した。これは TRP チャンネルの 1 分子の構造変化をリアルタイムでとらえた初めてのデータである。また、そのねじれ運動はアンタゴニストの存在下では起きないことが分かった。現在、観測データを蓄積・解析中であり、分子揺らぎと構造変化の相関などについて引き続き検討を行っている。観測データの初期解析結果については、アメリカ生物物理学会、日本生理学会に報告した。TRPV1 チャンネルは 43 度以上の温度で活性化される温度依存性のイオンチャンネルである。今後は温度に対する運動応答の計測を通じて、分子の活性化機構を動的に解明していきたいと考えている。

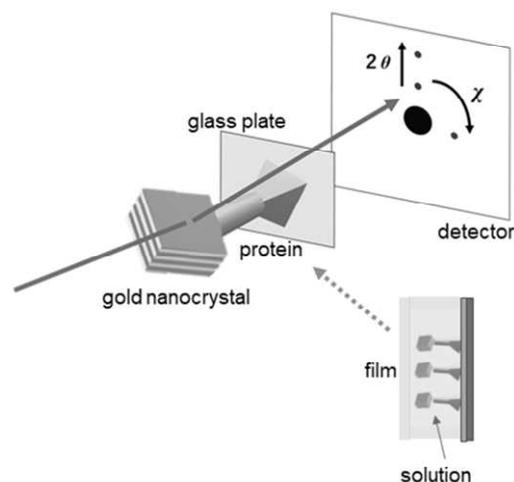


図 1. X 線 1 分子動態計測法の概要
蛋白質の構造変化を金ナノ結晶からの X 線回折点の運動として動画計測することができる。
(H.Shimizu B.B.A.Gen.subj. 2020 Feb;1864(2).
pii: S0304-4165(19)30125-4.より改変)

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- (1) Hirofumi Shimizu, *et. al.*,
Single-Molecule Twisting Motions during Gating of the Human TRPV1 channel Recorded with Sub-Millisecond Time Resolution. 64th Annual Meeting of Biophysical Society Feb14-20 2020, San Diego, USA
- (2) Hirofumi Shimizu, *et. al.*,
Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes of the Human Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channel Recorded using Diffracted X-ray Tracking. The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March17-19 2020, Beppu Ooita, Japan (誌上開催)

「特記事項」

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 申請中の助成金
- (1) 日本学術振興会・学術変革領域研究(A)・計画班・R2-R6・温度センシングの X 線 1 分子動画計測による理解・計画班代表・申請中
 - (2) 日本学術振興会・新学術領域研究(公募)・R2-R3・分子夾雑環境で定量的に生体分子 1 分子の分子揺らぎ・構造変化を計測する観測法開発・代表・申請中

R1 年度助成金

- (1) 日本学術振興会・基盤研究 (B)・H31 ~ R2、・膜電位存在下におけるイオンチャンネルの機能と構造変化の 1 分子同時計測・代表・採択・R1 年度 2,340 千円
- (2) 日本学術振興会・新学術領域研究(温度生物学)・H31~R1・X 線 1 分子動態計測による温度依存性イオンチャンネル開閉制御機構の動的解明・代表・採択・R1 年度 5,070 千円
- (3) 日本学術振興会・新学術領域研究(発動分子科学)・R1~R2・熱エネルギーを電気エネルギーに変換する分子機構の動的解明・代表・採択・R1 年度 2,860 千円
- (4) 日本学術振興会・挑戦的研究(萌芽)・R1 ~ R2・蛋白質の立体構造にタイムスタンプを付し構造遷移過程を解明する手法開発・代表・採択・R1 年度 2,500 千円

R1 年度学内競争的資金

- (1) ライフサイエンスイノベーションセンター「令和元年度重点プロジェクト研究および学内共同研究等研究費助成」・R1・温度・疼痛センサー蛋白質活性化機構の X 線 1 分子動態計測による解明・代表・採択・200 千円
- (2) 令和元年度 学長裁量経費「共同研究スタート支援」・R1・蛋白質の立体構造にタイムスタンプを付し構造遷移過程を解明する手法開発・代表・採択・400 千円