

研 究 報 告 書

「ATP作動性陽イオンチャネルP2X受容体の時空間ダイナミクスの解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研 究 者: 服部 素之

1. 研究のねらい

ATP は生命において代謝、生合成、能動輸送などのエネルギー源として広く用いられている。従来からよく知られていたこれらの役割に加えて、細胞外 ATP を介したシグナル伝達が近年注目されている。ATP 作動性陽イオンチャネル P2X 受容体は細胞外 ATP シグナル伝達における主要な ATP 受容体であり、筋肉収縮、痛覚、炎症反応など幅広い生命現象との関わりから、創薬ターゲットとしても注目を集めている。本研究では、この P2X 受容体の X 線結晶構造解析と電気生理学的解析を中心とし、以下の 3 点を研究のねらいとする。

第一に、P2X 受容体の X 線結晶構造解析と電気生理学的解析を行うと共に、異分野連携により、NMR 法、FTIR 法および分子動力学法等による相関構造解析およびダイナミクス解析を行う。これら要素技術を相乗的に用いることで、「P2X 受容体のダイナミクスの理解」を目指す。

第二に、上記の P2X 受容体の X 線結晶構造解析を通して得られる P2X 受容体の発現系などの技術基盤と異分野連携を組み合わせることで、P2X 受容体を標的とした化合物の同定および電気生理学的解析等による化合物の機能評価を行う。さらに機能制御化合物と P2X 受容体との複合体構造解析を行い、P2X 受容体によるそれら化合物の認識機構の構造基盤を解明する。これらの成果は、P2X 受容体を標的とした創薬の実現に重要な知見となる。

第三に、サブタイプの組み合わせによって、生体内の幅広い組織における多様な機能を発揮する P2X 受容体ヘテロ複合体等の膜タンパク質複合体の X 線結晶構造解析に向けた「組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体の構造解析の技術基盤」の確立を行う。これは、複合体間の相互作用に基づきその機能発現および制御が行われている他の数多くの真核生物由来膜タンパク質複合体の構造解析にも適用可能なものである。そのため、この技術基盤の確立は、「複合体形成を介した膜タンパク質の時空間ダイナミクスの理解」という「次世代構造生命科学」におけるフロンティアを大きく前進させるものとなる。

本計画では、上記の実現を通して、「P2X 受容体のダイナミクスの理解」、「P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見の提供」、「組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の創出」をねらう。

2. 研究成果

(1) 概要

P2X 受容体のダイナミクスの解明のため、「ATP および亜鉛結合型プレ開状態」のダニ由来 PX 受容体の構造決定を行った(図 1A)。亜鉛イオンは P2X 受容体を含む多くのチャネルに対する開閉制御因子として知られているが、P2X 受容体への作用機序の詳細は不明であった。この立体構造に基づき、亜鉛結合部位変異体についての電気生理解析および分子動力学シミュレーションを行うことで、立体構造情報とあわせて「亜鉛イオンによるチャネル活性化

促進のダイナミクス」を明らかにした (Kasuya G, et al. *Cell Reports*, 2016)。

さらに、P2X 受容体のダイナミクスの解明に加えて、各種化合物による制御機構の解明に向けた取り組みとして、特に CTP と $\alpha\beta$ -meATP に注目した研究推進を行った。

CTP は、P2X 受容体に対する弱い親和性を持ったアゴニストとして知られている。本研究では、「CTP 結合型」のゼブラフィッシュ P2X4 受容体の構造決定を行った (図 1B)。この構造と既知の ATP 結合型構造との比較に基づき、電気生理学的解析および赤外分光法による解析を推進することで「P2X 受容体の塩基特異性」を明らかにした (分子科学研究所古谷祐詞准教授、大阪大学藤原祐一郎准教授との共同研究。投稿論文準備中)。さらに、メチオニンの $^{13}\text{CH}_3$ 等を指標とした NMR 解析により、P2X 受容体の部分作動薬である $\alpha\beta$ -meATP 下における構造平衡を明らかにすることで、 $\alpha\beta$ -meATP による P2X 受容体の部分活性化作動機構を解明した (東京大学薬学系研究科嶋田一夫教授・上田卓見助教との共同研究。Minato Y, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, in press)。これら化合物の作用機序は、P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見となりうる。また、チャネルに対する阻害剤等の新規化合物の同定のため、化合物スクリーニングに適用可能な「脂質膜デバイスを用いた P2X 受容体の一分子活性計測」の確立もあわせて行った (東京大学工学系研究科野地博行教授・渡邊力也助教との共同研究。国際学会にて発表済)。

さらに、膜タンパク質複合体発現評価技術基盤の確立を試み、この技術を適用することで新規膜タンパク質 1 種の構造決定に貢献した (投稿論文準備中)。これらの成果は、組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の確立につながる。

(2) 詳細

研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」

P2X 受容体のダイナミクスの解明のため、X 線結晶構造解析により「ATP および亜鉛結合型プレ開状態」のダニ由来 PX 受容体の構造決定を行った (図 1A)。亜鉛イオンは P2X 受容体を含む多くのチャネルに対する開閉制御因子として知られている。この立体構造に基づき、亜鉛結合部位変異体についての電気生理解析および分子動力学シミュレーション推進することで、細胞外ドメインのドメイン界面への亜鉛イオン結合が活性化促進に重要であること、また、その際の亜鉛イオン依存的な P2X 受容体のダイナミクスの詳細が明らかとなった (Kasuya G, et al. *Cell Reports*, 2016)。

さらに、メチオニンの $^{13}\text{CH}_3$ 等を指標としたゼブラフィッシュ由来 P2X4 受容体の NMR 解析により、P2X 受容体の部分作動薬である $\alpha\beta$ -meATP 下における構造平衡の解析を行った (東京大学薬学系研究科嶋田一夫教授・上田卓見助教との共同研究)。その結果、 $\alpha\beta$ -meATP 下結合状態において、P2X4 受容体の膜貫通領域が閉じた状態と開いた状態の平衡状態にあることにより、 $\alpha\beta$ -meATP による P2X 受容体の部分活性化が引き起こされていることが明らかとなった (Minato Y, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, in press)。リガンド作動性イオンチャネルに対する部分作動薬は、医薬品の候補としても注目されており、したがって、この成果は研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」に加えて、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」の観点からも重要であると考えられる。

以上の成果により、研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」については、X線結晶構造解析、電気生理学的解析、異分野連携による他の生物物理学的手法の 3 者を組み合わせた相関構造解析によるダイナミクスの解明という目的を予定通り達成できたと考えられる。

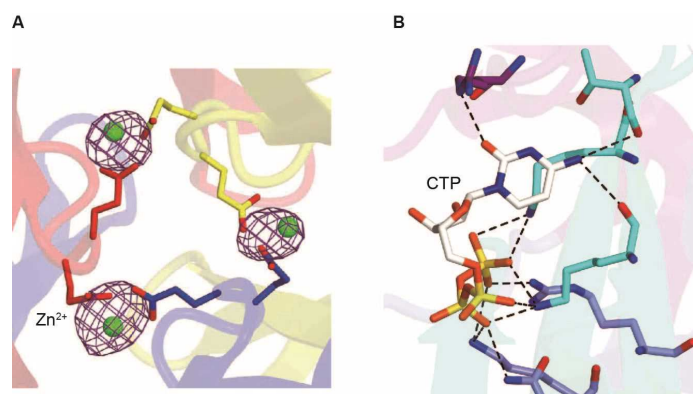


図1. 本研究で得られた P2X 受容体構造 (A) 亜鉛結合型構造 (B) CTP 結合型構造

研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」

各種化合物による制御機構の解明に向けた取り組みとして、まず、上記の $\alpha\beta$ -meATP に加え、ATP と同じヌクレオシド三リン酸である CTP について、「CTP 結合型」のゼブラフィッシュ P2X4 受容体の構造決定を行った(図 1B)。CTP は、P2X 受容体に対する弱い親和性を持ったアゴニストとして知られている。この構造と既知の ATP 結合型構造との比較に基づき、ATP および CTP それぞれの塩基認識に重要なアミノ酸残基を同定し、それらの残基に対する変異体について、電気生理学的解析および赤外分光法による解析を推進することで「P2X 受容体の塩基特異性」を明らかにした(分子科学研究所古谷祐詞准教授、大阪大学藤原祐一郎准教授との共同研究。投稿論文準備中)。CTP におけるピリミジン骨格を持つ P2X 受容体阻害剤の過去の報告などから、CTP の認識機構の解明は P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見となりうると考えられる。

また、チャネルに対する阻害剤等の化合物の同定に向けた「脂質膜デバイスをを用いた P2X 受容体の一分子活性計測」の確立を行った(東京大学工学系研究科野地博行教授・渡邊力也助教との共同研究。国際学会にて発表済)。これは、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素を利用したチャネル活性の 1 分子計測 P2X4 の非標識デジタル個数計測を可能とするものであり化合物スクリーニングにも応用可能な系である。

以上の成果により、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」については、P2X 受容体を標的とした化合物スクリーニングの系の確立および立体構造による P2X 受容体による化合物の認識機構の構造基盤の解明という成果から、研究目的を概ね達成できたと考えられる。

研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発現・構造解析の基盤技術の確立」

膜タンパク質複合体発現評価技術基盤として、蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー法を応用した膜タンパク質複合体形成スクリーニング法の確立を行った。確立した手法を膜タンパク質とそれに対する抗体との複合体形成評価に適用することで、新規膜タンパク質 1 種の構造決定に成功した(抗体作成について京都大学医学部岩田想教授との共同研究。投稿論文準備中)。これらの成果は、組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の確立につながると考えられる。以上の成果から、研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発

現・構造解析の基盤技術の確立」については、ヘテロ複合体などの真核生物由来膜タンパク質複合体の構造決定には至らなかったものの、技術確立の面では進展が得られたと考えられる。

3. 今後の展開

本研究により得られた知見、技術基盤を元にさらなる相関構造解析を行うことで、受容体のダイナミクスの解明と制御の深化につながると考えられる。具体的には、結晶構造が得られているダニ由来 P2X 受容体については、これらの立体構造情報および大量精製系を活用した NMR 解析をすでに進めており、これによりチャネル開閉のダイナミクスがより明らかになることが期待される。また、本研究により培われた膜タンパク質の高度発現技術基盤を活用することで、他の医学的に重要な膜タンパク質の構造解析への貢献が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況については、「2. 研究成果」に記したように、研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」についてはほぼ予定通り、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」についても概ね達成できたといえる。その一方で、研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発現・構造解析の基盤技術の確立」については技術確立の進展にとどまりつつも、新規膜蛋白質 1 種の構造決定に貢献するなど一定の達成をすることができたと考えられる。また、研究の進め方、特に研究実施体制としては、本領域の特色といえる「異分野連携」を積極的に推進することで、領域の内外における様々な研究者との共同研究を進める形での研究実施を行うことができたと考えられる。また、研究費執行については研究計画に沿った執行を行った。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、イオンチャネルの作動機構の解明という基礎科学上の貢献に加え、本研究における CTP や $\alpha\beta$ -meATP などの化合物の P2X 受容体による認識、作用機序の解明は、今後、これらの知見がアカデミア内外で活用されることで、受容体を標的とした創薬の実現が近づくことが期待される。また、本研究により培われた膜タンパク質の高度発現技術基盤を活用することで、他の医学的に重要な膜タンパク質の構造解析へのさらなる貢献が期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

弱い親和性のアゴニストである CTP との結合構造解析を行い、電気生理学的な解析でアゴニストとしての必要要件が示された。また、色々な共同研究を通じてこの受容体の構造と機能について多くの知見を得た点は評価できる。

分子全体の構造変化を記述する方法として X 線結晶構造解析だけでは十分ではないので、今後は、結晶構造解析だけでなく電子顕微鏡と組み合わせると良いと思われる。また、P2X は多くのアゴニスト、アンタゴニストが知られている受容体なので、ヘテロ3量体の組み合わせと共に、色々な組み合わせにより面白い知見が得られると期待される。

今後は、本さがけの枠内に限らず、自他共に達成を実感できるような研究をして時空間ダイナミクスの解明を進めて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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 receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. in press
2. 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 Reports*. (2016) 14, 932–944. *Corresponding author
3. Takeda H, Hattori M, Nishizawa T, Yamashita K, Shah ST, Caffrey M, Maturana AD, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg2+ channel MgtE. *Nat Commun*. (2014) 5:5374.
4. Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, Newstead S, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110, 11343–11348..
5. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H, Nureki O.:Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* (2013) 496, 247–251.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(口頭発表)

1. 「イオンチャネル型細胞外 ATP 受容体の構造とチャネル活性化機構」第 86 回日本生化学会大会、2013 年
2. 「Mechanism of ligand recognition and activation of ATP-gated cation channels」、第 91 回日本生理学会大会、2014 年
3. 「Structural insights into ATP binding and channel gating in bacterial MgtE Mg2+ channels」Cold Spring Harbor-Asia Conference-Membrane Proteins: Structure & Function、2015 年

受賞

1. 第11次「青年千人計画」選出、2015 年

著作物

1. 実験医学増刊 Vol.32 No.10「構造生命科学で何がわかるのか, 何ができるのか」第 2 章
膜タンパク質の構造生物学 7. ATP 作動性陽イオンチャネル P2X 受容体