

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔平成31（2019）年度研究進捗評価用〕

平成28（2016）年度採択分

令和元（2019）年5月1日現在

研究課題名（和文） **物理刺激で制御される膜蛋白質の分子機構の解明**

研究課題名（英文） **Molecular mechanism of membrane proteins activated by physical stimuli**

課題番号：16H06294

研究代表者

**濡木 理** (NUREKI OSAMU)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要：生物は、光、熱、音（機械刺激、重力）、電場などの物理刺激を感覚として受容し、これらを量子力学的あるいは（熱）力学的に膜輸送体によるイオン輸送に変換し、神経細胞を興奮させ、適切な行動をとる。しかしながら、これらの物理刺激がイオン輸送体を活性化するメカニズムに関しては未解明である。我々は、物理刺激で開閉が制御されるイオン輸送体に関して構造機能研究を進めて、物理センサーの分子機構を原子分解能レベルで解明する。

研究分野：構造生物学

キーワード：チャンネル， X線結晶構造解析，XFEL，クライオ電子顕微鏡単粒子解析

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで2度の基盤研究(S)の受給を受け、チャンネル、トランスポーターの結晶構造を、脂質キュービック相(LCP)法による結晶化と SPring-8 の高輝度シンクロトロンビームを用いることで、高分解能で決定する技術を創発し、相補的な生化学解析を行うことで、それらの分子メカニズムを解明してきた。その結果、化学センサーにおいては、膜輸送体が基質やカウンターイオンと結合すると、膜貫通ヘリックスがプロリン残基やグリシン残基において屈曲することで、外向き開口状態、閉状態、内向き開口状態に構造変化して輸送を行うことを明らかにした。

(2) 一方、物理センサーにおいては、光、熱、音（機械刺激、重力）、電場などの物理刺激が膜タンパク質によってどのように感受され、チャンネルの開口をもたらすのか、は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの成果・技術基盤を踏まえた上で、主に**物理刺激で開閉が制御されるイオン輸送体**に焦点を絞り、物理センサーが**どのように光、熱、音、電場などの物理刺激を感受し、これをチャンネルの開口と言う構造変化に変換**するのか、と言うメカニズムを原子分解能レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

標的である物理センサー膜タンパク質について、**X線結晶構造解析、X線自由電子レーザー、クライオ電子顕微鏡単粒子解析**など最先端の構造解析法を駆使し、これに**MD シミュレーション、ESR、1分子 FRET、原子間力**

**顕微鏡**などのダイナミクス解析を統合し、さらに**生化学的な機能解析**で補完することで、様々な角度から構造・動態と機能の相関を明らかにする。

4. これまでの成果

(1) **光を感受する膜輸送体**

SACLA X線自由電子レーザーを用いたチャンネルロドプシン (ChR) の時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析を行った結果、異性化したレチナールは捻じれ、3番目と7番目の膜貫通ヘリックスに構造変化を誘起し、DCゲートの水素結合ネットワークを壊し、水分子の流入、ひいてはチャンネルを開状態へと遷移させることが明らかになった。また最も長波長に吸収波長ピークを持つ ChR である Chrimson の結晶構造を 2.6 Å 分解能で決定し、レチナールのシフ塩基近傍の陽電荷、βイオン環近傍の負電荷およびレチナール結合ポケットが狭いことによる π 電子共役系の平面性が長波長シフトをもたらすことが明らかになった。さらに、これらの構造情報をもとに、吸収波長がさらに 20 nm 長波長にシフトした改変型 Chrimson (ChrimsonSA) を作成することに成功した。

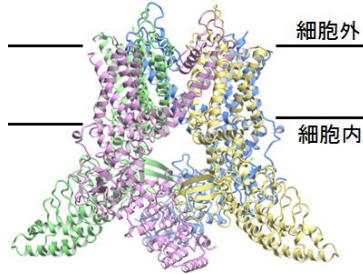
これまでのタイプ1(微生物型)、タイプ2(動物型)のロドプシンとは全く異なるヘリオロドプシン (HeR) の結晶構造を 2.4 Å で決定し、HeR が既知のロドプシンと比べ、膜に対するトポロジーが全く逆であること、レチナールのシフ塩基から細胞外側は疎水性残基で遮蔽されており、イオンの輸送は起こらず、シグナル伝達に働くことが示唆された。

#### [4. これまでの成果 (続き)]

酵素型ロドプシンであるロドプシングア  
ニル酸シクラーゼ (RhGC) およびロドプシン  
ホスホジエステラーゼ (RhPDE) の膜貫通ド  
メインの結晶構造を高分解能で決定し、光に  
よる酵素活性の制御機構を示唆した。

#### (2) **熱を感受する膜輸送体**

TRPV3 をナ  
ノディスクを  
用いて脂質 2  
重膜に埋め込  
みクライオ電子  
顕微鏡で構造  
解析すること  
で、S6 ヘル  
ックスの中央  
部が  $\pi$  ヘル  
ックスである過渡的な閉状態を  
リン脂質が安定化しており、このリン脂質が  
熱運動で外れると、チャンネルが開口するこ  
とを発見した。



#### (3) **音を感受する膜輸送体**

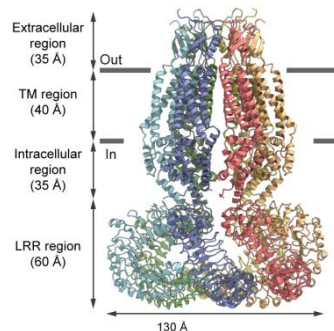
音感を増幅するヒト由来 Prestin の立体構  
造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により、  
3.4 Å 分解能で決定した。2 つの膜貫通サブ  
ユニットは傾きつつ離れており、また傾きの異  
なる複数の構造状態が確認されたことから、  
Prestin が陰イオンを感受してモータータン  
パクとして膜に振動を与えると考えられる。

#### (4) **電場を感受する膜輸送体**

味覚に働く電位依存性 ATP チャンネルである  
CALHM1 のホモ 8 量体の立体構造を、クライオ  
電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、2.8  
Å 分解能で決定することに成功した。また中  
枢神経系において重要な役割を果たす ATP 放  
出チャンネルである CALHM2 ホモ 11 量体につ  
いても単粒子解析により、3.5 Å 分解能で構造  
を決定した。また、光合成の明反応を駆動す  
るプロトン駆動力の調節に必須な、電位依存  
性 Cl<sup>-</sup> チャンネルである VCCN1 の立体構造を、  
クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法  
によって 3.0 Å の分解能で決定した。

#### (5) **浸透圧を感受する膜輸送体**

浸透圧に抗し  
て細胞体積を維  
持する陰イオン  
チャンネル、  
LRRC8A ホモヘキサ  
マー (ヒト由来)  
が、リポソーム  
パッチで機械刺  
激依存的な電気  
生理学活性を持  
つことを確認  
し、本構造をク  
ライオ電子顕微  
鏡の単粒子解  
析により 3.2 Å  
分解能で決定  
した。複数状態  
の単粒子解析  
により、環境中  
のイオン強度  
により細胞質ド  
メインと leucine-rich



repeat の境界のヘリックスの配向が変わる  
ことで、leucine-rich repeat の向きが大き  
く変わり、チャンネルの開閉が起こることが示  
唆された。

#### 5. 今後の計画

これまで多くの物理センサーの構造解析  
を行なうことで、物理刺激感受がチャンネルの  
開閉を誘引する機構が見えて来た。今後は、  
これらのメカニズムを機能解析、ダイナミク  
ス解析により検証する。さらに、これらの物  
理センサーの脂質膜中での構造遷移や、機械  
刺激応答 GPCR などの新たな標的膜タンパク  
質にも着目して本研究を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、  
連携研究者(平成 29 年度(2017 年度)まで)  
は点線を付してください。

(1) "Cryo-EM structure of the human  
L-type amino acid transporter 1 in complex  
with glycoprotein CD98hc" Lee, P.  
Wiriyaerkmkul, C. Jin, L. Quan, R. Ohgaki,  
S. Okuda, T. Kusakizako, T. Nishizawa, K.  
Oda, R. Ishitani, T. Yokoyama, T. Nakane,  
M. Shirouzu, H. Endou, S. Nagamori, Y.  
Kanai, \*O. Nureki *Nat. Struct. Mol. Biol.*  
*in press* (2019).

(2) "Crystal structure of the red light-  
activated channelrhodopsin Chrimson" K.  
Oda, J. Vierock, S. Oishi, S. Rodriguez-  
Rozada, R. Taniguchi, K. Yamashita, J. S.  
Wiegert, T. Nishizawa, P. Hegemann, \*O.  
Nureki *Nat. Commun.* **9**, 3949 (2018).

(3) "Cryo-EM structures of the human  
volume-regulated anion channel LRRC8"  
G. Kasuya, T. Nakane, T. Yokoyama, Y. Jia,  
M. Inoue, K. Watanabe, R. Nakamura, T.  
Nishizawa, T. Kusakizako, A. Tsutsumi, H.  
Yanagisawa, N. Dohmae, M. Hattori, H.  
Ichijo, Z. Yan, M. Kikkawa, M. Shirouzu, R.  
Ishitani, \*O. Nureki *Nat. Struct. Mol. Biol.*  
**25**, 797-804 (2018).

(4) "Structural insights into ligand  
recognition by the lysophosphatidic acid  
receptor LPA<sub>6</sub>" R. Taniguchi, A. Inoue, M.  
Sayama, A. Uwamizu, K. Yamashita, K.  
Hirata, M. Yoshida, Y. Tanaka, H. E. Kato,  
Y. Nakada-Nakura, Y. Otani, T. Nishizawa,  
T. Doi, T. Ohwada, R. Ishitani, J. Aoki and  
\*O. Nureki *Nature* **548**, 356-360 (2017).

<受賞・叙勲>

平成 30 年 紫綬褒章「構造生物学」

ホームページ等

<http://www.nurekilab.net/>