

# 原子間力顕微鏡による受容体タンパク質の動的構造解析

「受容体」とは我々の体の中にある機能的なタンパク質で、体の中のさまざまな機能を発揮したり、病気のとときに薬が作用するために必要な分子です。この受容体の機能や構造を知るとは生理的なメカニズムの解明に重要であるほか、それを人工材料と組み合わせて新たな機能性材料・素子をつくり出す際に非常に重要です。本稿では生体内から取り出した一分子の受容体の構造と機能に関連する構造変化を直接観察した研究成果を紹介します。

しのぎ よういち  
篠崎 陽一

NTT物性科学基礎研究所

## 受容体とは

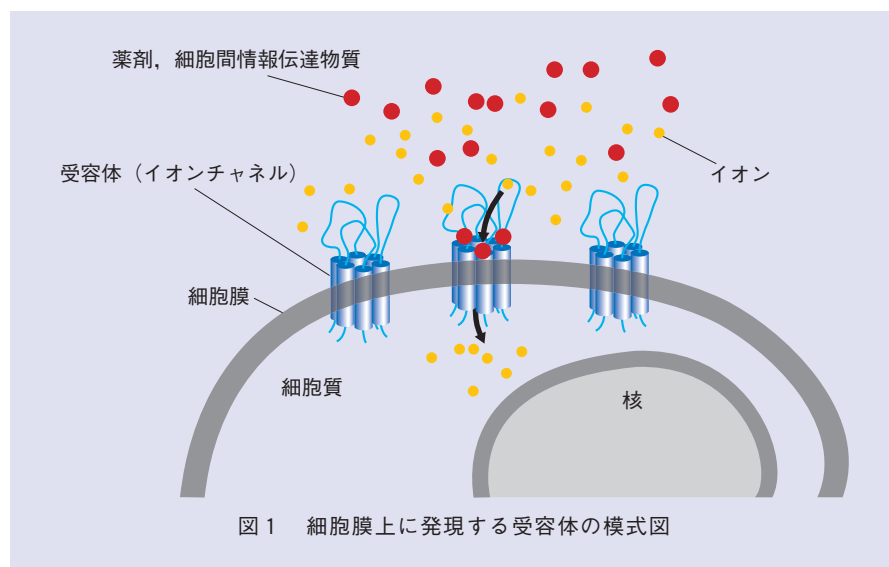
「受容体」とはその名のとおりに、細胞が外界からの情報を「受容」するための生体が持つ装置です。受容体は多くの場合、細胞膜に存在する膜タンパク質であり、約10万種あるヒトのタンパク質のうち、約3分の1を占めています。受容体の具体的な機能としては、ホルモンや薬などの生理活性物質と呼ばれる物質が作用するための役割を果たします。また、受容体の機能が損なわれたり、過剰になったりすることがさまざまな病気の原因となります。疾患に対する薬物治療の多くはこの受容体の機能を調節することで発揮されます。近年の調査では、米国で開発されている薬剤の標的約45%が受容体であるという報告がなされています<sup>(1)</sup>。このように、受容体は創薬研究の観点からも非常に重要なターゲットです。

受容体は大きく分けて2種類のタイプに分類されます。それぞれ「GPCR型（または代謝型）受容体」「イオンチャンネル型受容体」と呼ばれます。GPCR型受容体は細胞外部分にリガンドと呼ばれる低分子化合物などが結合すると細胞内に存在するGタンパク質をグアノシン二リン酸（GDP）結合

型からグアノシン三リン酸（GTP）結合型に変換することによって細胞内に情報を伝達します。一方、イオンチャンネル型受容体は細胞外部分にリガンドが結合すると構造を変化させ、細胞膜に挿入された部分が穴（ポア）構造をつくります。このポアを通してイオンが細胞内外に移動します（図1）。このイオンの移動が細胞にとって電気的な情報として感知されます。本稿ではこのイオンチャンネル型受容体の研究成果<sup>(2)</sup>について紹介します。

イオンチャンネル型受容体はほとんどの場合、膜タンパク質が数分子会合して初めて機能を発揮します。例えば、

本稿で紹介するアデノシン三リン酸（ATP）受容体では3つの分子が会合して1つの機能的なイオンチャンネル（ATP受容体チャンネル）を形成します。上述のように、イオンチャンネルの機能発現にはそのポア構造を閉状態から開状態へと変化させることが必須であり、構造を調べることがその機能メカニズムの解明と深く関連しています。現在多くの研究グループが用いる手法の主なものにX線結晶回折があります。この方法は非常に高い空間分解能がある反面、タンパク質を結晶化した状態で解析するため、生体内の環境とは大きく異なり、また構造変化などの動的な



変化を経時的に観察することは難しい、などの問題点があります。そこで、我々は受容体の構造を「生きたまま」「高空間分解で」「経時的に」解析を行うため、原子間力顕微鏡 (AFM) と呼ばれる手法を新たに取り入れて研究を行いました。AFMは走査型プローブ顕微鏡の一種で、サンプルの表面構造を検出する装置です。溶液中で観察を行うことができるため、生体分子、例えばDNAなどの核酸、脂質およびタンパク質の解析に有効です。

### AFMによるATP受容体の解析

ATP受容体はATPが結合することで活性化する受容体で、ナトリウムやカルシウムイオンなどの陽イオンを細胞内に透過します。ATP受容体1分子(サブユニット)の構造は図2左に示すように、2つのシリンダーの膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン、および1つの細胞外ドメインで構成されます。細胞外ドメインには6つのβストランド(水色の矢印型の構造)が存在し、これらに水素結合が形成されることで1つのβシート構造を形成すると考えられています<sup>(3)</sup>。上述のように、ATP受容体は3分子集合することで1つの機能的なイオンチャンネル(ATP受容体イオンチャンネル)を形成します。今回研究対象としているATP受容体は「P2X<sub>4</sub>」と呼ばれるサブタイプ(種類)で、脊髄や脳などの中枢神経系に広く存在します。特に、脊髄後角のミクログリアに発現するP2X<sub>4</sub>受容体が「神経因性疼痛」と呼ばれる麻薬性鎮痛薬も奏効しないような難病の原因であること<sup>(4)</sup>から、医学的見地からも重要な研究ターゲットとして注目を集めています。精製したATP受容体イオンチャンネルはへき開したマイカ上に静置し、AFMで観察を行いました。無刺

激時のATP受容体イオンチャンネルは丸い、または三角形に近い形状でしたが、ATPで刺激すると3つの小さな球(三量体)に変化しました。ATP受容体イオンチャンネルはATPによって膜貫通部分のポアを開くため、これに伴って各ATP受容体分子間の距離が広がったと考えられます。

一方、刺激前に三量体構造を観察できなかったのは1つの受容体(サブユニット)間の距離がAFMの空間分解能よりも近かったからだと考えられます。図2で示したものは刺激前と刺激後の2つの状態での構造を観察していますが、これでは本当に連続的に構造が変化して刺激後の構造をとるかは

分かりません。そこで、高速AFM<sup>(5)</sup>と呼ばれる最近開発された装置を用い、刺激後の連続的な変化を観察しました。

図3に示すように、ATPで刺激する前は丸い形状をしています。ATPで刺激すると、直ちに構造が変化し、1つの丸い形から三量体へと変化しました。その後、3つの球の距離が広がっていきました。このように、ATP受容体イオンチャンネルはATP刺激に応じて大きな構造変化を起こしますが、この変化が生理機能と関連するかについては構造を観察するだけでは分かりません。そこで、次に我々は精製したATP受容体チャンネルの機能を測定する実験系を構築しました。

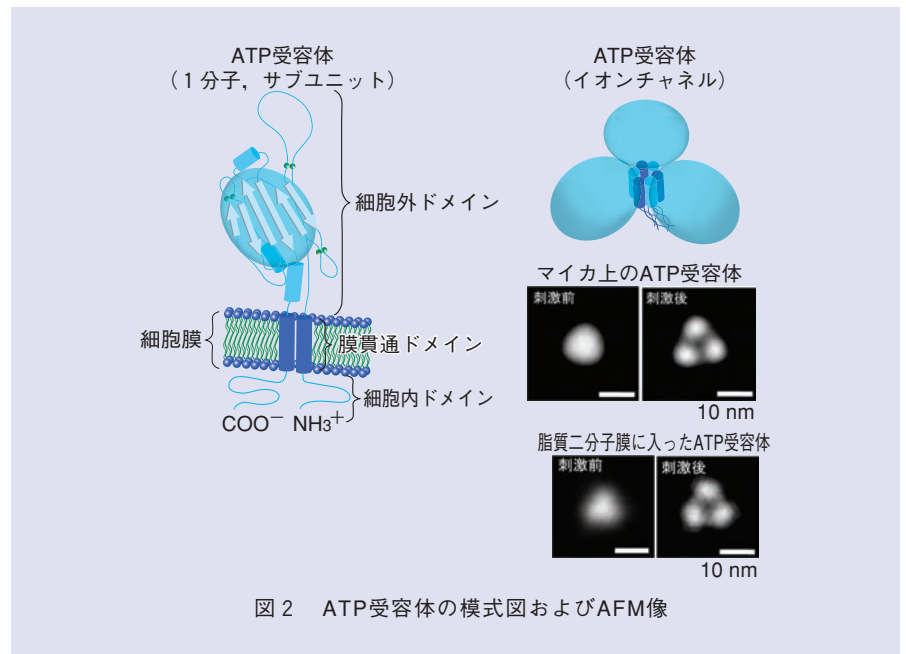


図2 ATP受容体の模式図およびAFM像

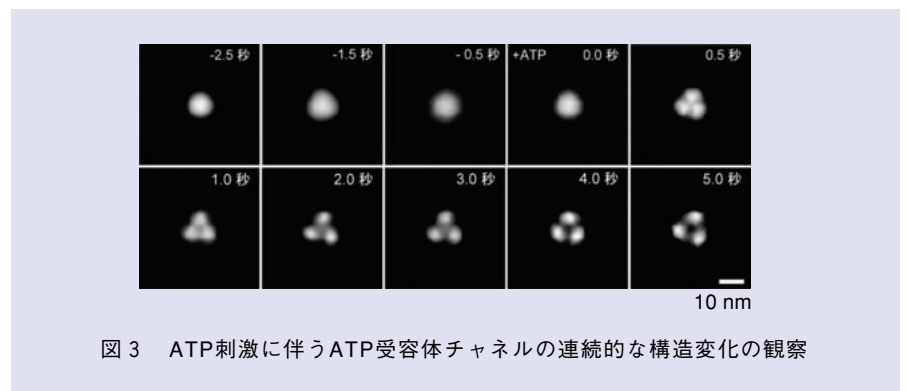


図3 ATP刺激に伴うATP受容体チャンネルの連続的な構造変化の観察

AFM像と推定される構造を比較するとATP受容体チャンネルは上面図のように観察されます(図2右)。実際、ATP受容体イオンチャンネルをマイカ上に展開した脂質二分子膜(人工的に作成した細胞膜)中に再構成(挿入)してAFM観察を行うと、マイカ上に静置した場合と同じ形状が観察されました。ATP受容体イオンチャンネルは細胞外ドメインがATPと結合することで活性化するため、この脂質二分子膜に再構成したATP受容体イオンチャンネルが機能した場合、観察される構造は細胞外ドメインであるといえます。イオンチャンネルの機能は、イオンと結合して蛍光を発する試薬(指示薬)を用いることで測定できます。本研究では、この試薬を用いてATP受容体イオンチャンネルの機能を測定しました。基板にポアを作成し、その中にカルシウム指示薬を加えて、ポアの上下を脂質二分子膜で覆いました。脂質二分子膜にATP受容体イオンチャンネルを再構成し、外部にカルシウムイオンを含む緩衝液(バッファー)を加えました。この状態ではポアにはカルシウムイオンが入らないため、ポアにあるカルシウム指示薬は蛍光を発しませんが、ATPで刺激するとポアの蛍光強度が著しく増加しました(図4)。これは、ATP受容体イオンチャンネルにATPが結合することで活性化し、膜貫通ポアが開き、そのポアを通してカルシウムイオンがポアの外から中へ流入したためだと考えられます。

### ポアダイレーション

ATP受容体イオンチャンネルには通常の活性化に伴って形成されるポアとは別に大きなポアを形成することが知られています。この現象は「ポアダイレーション」と呼ばれ、1979年にCockcroft

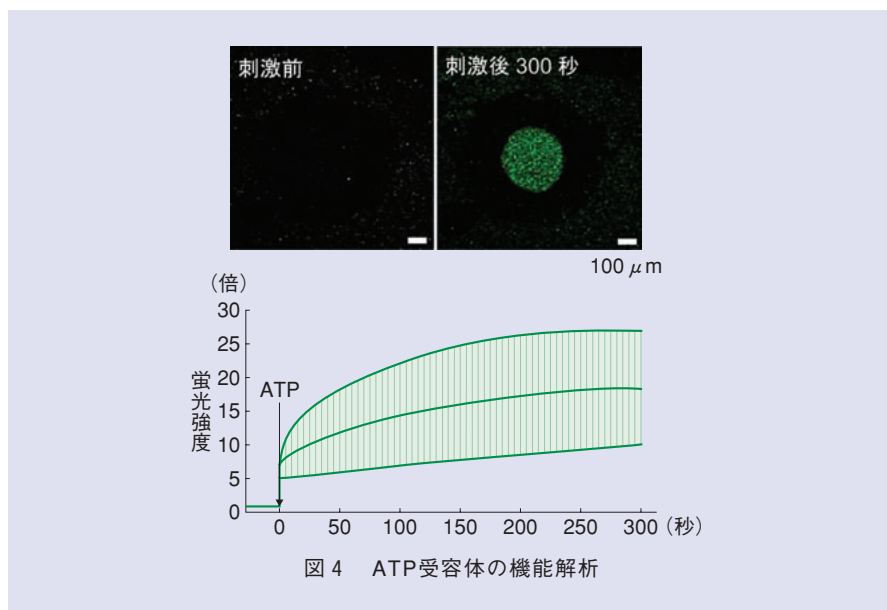


図4 ATP受容体の機能解析

とGompertsが発見しました<sup>(6)</sup>。通常、ATP受容体イオンチャンネルは活性化したときに $\text{Na}^+$ や $\text{Ca}^{2+}$ などのイオンを透過しますが、 $\text{P2X}_2$ や $\text{P2X}_7$ 、 $\text{P2X}_4$ などはポアダイレーションを起こし、もっと大きなサイズの分子も透過するようになります。今までこの内容について多くの研究がなされていますが、本当にATP受容体イオンチャンネルが単独でポアダイレーションを起こすかどうかについては決着が付いておらず、この現象の発見から30年間直接的な証拠が待ち望まれてきました。

図3に示したように、ATP受容体イオンチャンネルは三量体へと構造変化した後、サブユニット間の距離が大きくなりました。この構造はまさにポアダイレーションと思われる変化であり、その構造が機能的に相当する構造かを確かめるために機能解析を行いました。本研究で対象としている $\text{P2X}_4$ 受容体は細胞外のカルシウムイオンの濃度が低いときにのみ、ポアダイレーションを引き起こすことが報告されています<sup>(7)</sup>。そこで、カルシウムイオンがあるときとないときの構造の比較と、そのときに起こる分子透過性の変化を調べました

(図5)。ポアダイレーションを機能的に調べる方法として、大きな分子、例えばエチジウム(分子サイズ:  $1.4 \times 1.1 \times 0.52 \text{ nm}$ )やN-メチル-D-グルコサミン(分子サイズ:  $1.0 \times 0.76 \times 0.53 \text{ nm}$ )の透過を見る方法<sup>(2)</sup>があります。エチジウムは二本鎖DNAに結合することで赤い蛍光を発するため、エチジウムが流入する側にDNAを入れておけばこの蛍光強度の増加をエチジウムの透過として評価することができます。エチジウム透過はカルシウム非存在下ではATP刺激後に観察されました(図5)が、カルシウム存在下では観察されませんでした。AFM観察では、カルシウムイオンがない場合のみ、ATP受容体イオンチャンネルはポアダイレーションの構造を示し、カルシウムイオンがある場合は三量体構造ではあっても中心に大きなポア構造は観察されませんでした。

### 新たな構造変化モデルの提唱

本研究では初めて①ATP受容体イオンチャンネルの三量体構造、②ATP刺激による構造変化の経時的観察、③ポアダイレーションに相当する構造の



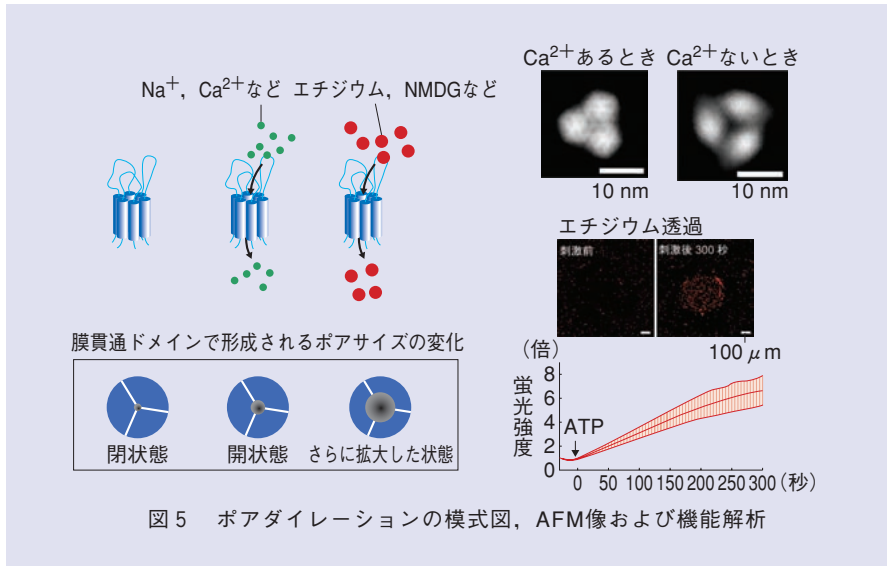


図5 ポアダイレーションの模式図、AFM像および機能解析

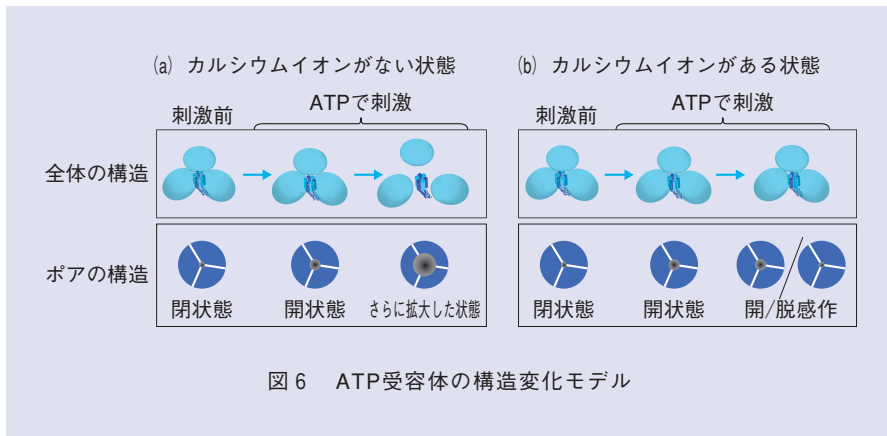


図6 ATP受容体の構造変化モデル

理解することやさまざまなノウハウを蓄積することが大切です。生体情報を検知できるバイオデバイスができればより感性豊かな次世代の通信技術を確立できると期待されます。

■参考文献

- (1) J. Drews: "Drug Discovery: A Historical Perspective," Science, Vol.287, pp.1960-1964, 2000.
- (2) Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K. Inoue, and K. Torimitsu: "Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X<sub>4</sub> receptors," PLoS Biol., Vol.7, No.5, e1000103.
- (3) B. S. Khakh and R. A. North: "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and diseases," Nature, Vol.442, pp.527-532, 2006.
- (4) M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter, and K. Inoue: "P2X<sub>4</sub> receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury," Nature, Vol.424, pp.778-783, 2003.
- (5) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Murayama, K. Saito, and A. Toda: "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules," Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.98, pp.12468-12472, 2001.
- (6) B.S. Khakh, X. R. Bao, C. Labarca, and H. A. Lester: "Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds," Nat. Neurosci., Vol.2, pp.322-330, 1999.
- (7) S. Cockcroft and B. D. Gomperts: "ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells," Nature, Vol.279, pp.541-542, 1979.

観察、および④その機能解析に成功しました。過去の研究結果では膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが活性化に伴って構造変化を起こすことは報告されていましたが、細胞外ドメインが大きく構造変化することに関しては全く報告されておらず、我々は新たな構造変化モデルを提唱しました(図6)。無刺激の状態ではATP受容体イオンチャネルは「閉じた」状態にあります。細胞外ドメイン間の距離は非常に近接し、膜貫通ドメインのポアも閉じているため、イオンは通過できません。ATPが結合し、活性化すると構造変化を起こし、膜貫通ドメインのポアは開き、細胞外ドメイン間の距離が広がります。カルシウムイオンが存在する

条件下ではAFMで観察する限りはそれ以上の構造変化は観察されません。機能解析の結果から、ポアは次第に閉じていくようです。一方、カルシウムイオンが存在しない条件では、構造はさらに変化して細胞外ドメイン間の距離がもっと大きくなります。この条件ではエチジウムの透過が長時間観察され、巨大なポアが形成されていると考えられます。

今後の展望

私たちの研究内容は生体分子とデバイスを組み合わせて生体機能を検出できるバイオデバイスを創出するための基盤技術の確立です。生体分子をデバイスと組み合わせるためにはその物性を



篠崎 陽一

生体機能に重要なタンパク質を観察し、理解することは生物学的な理解を深めることだけでなく、それらの工業的な応用のためのさまざまな知見を我々に与えてくれます。このような研究は新しい通信技術や医療技術への応用につながると期待しています。

◆問い合わせ先

NTT物性科学基礎研究所  
機能物質科学研究部  
TEL 046-240-3235  
FAX 046-270-2364  
E-mail shinozak@nttbl.jp