

みにれびゅう

構造から考える TRP チャネルの多様な刺激応答

山下 敦子

1. はじめに

TRP (transient receptor potential) チャネルは感覚受容のさまざまな局面で機能する陽イオンチャネルファミリーであり、多様な刺激に応答する多くの TRP チャネル分子が存在する。さらに、一つの TRP チャネル分子が物理刺激から化学刺激に至る複数の刺激に応答するという興味深い機能的特徴を持つ。このような多彩な機能を持つ TRP チャネルの構造研究は、解析が難しいとされる膜タンパク質の中でもとりわけ遅れていたが、最近、筆者らが真菌由来 TRP チャネルの制御領域の構造研究から得た知見に加え、米国の研究者らによって初めて TRP チャネルの主な領域を含む立体構造が原子レベルに迫る分解能で明らかにされるという大きな進展があった。本稿では、これらの TRP チャネルに関する最新の構造研究の結果を概説し、このファミリーのタンパク質が多様な刺激に応答できる仕組みを考察したい。

2. TRP チャネルの構造と機能の多様性

生物は外界から受ける光・化学物質・機械刺激・熱・浸透圧変化などのさまざまな刺激を感知する感覚機能を持っている。これらの感覚受容の幅広い過程で機能しているのが TRP チャネルと呼ばれる一群のタンパク質ファミリーで、刺激の受容体そのものとして機能するもの、刺激受容後の細胞内情報伝達の過程で機能するものなど、多くの過程で関与している¹⁾。TRP チャネルは酵母から哺乳類まで幅広く真核生物に存在する陽イオンチャネルで、TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPN, TRPP, TRPML の七つのサブファミリーから構成されている²⁾。このうちヒトでは TRPN を除く六つのサブファミリーに属する全 27 種類の分子が存在し、ほとんどの細胞でいずれかの分子の発現が

みられる。TRP チャネル分子は、6 回膜貫通型のイオンチャネル領域を持つ四量体分子という基本構造を共通して持つ。一方、膜貫通領域上流の N 末端側および下流の C 末端側に位置する細胞内領域の構造は、メンバーごとにきわめて多様である。この細胞内領域には、たとえば、タンパク質間相互作用領域となりうるアンキリンリピート、多量体形成に重要なコイルドコイル、Ca²⁺制御領域となりうる EF ハンドモチーフやカルモジュリン結合ドメインなどのさまざまな機能モジュールがみられ、それらの構成自体にも多様性がみられる。このような構造の多様性は、機能の多様性を産み出す一つの大きな要因になっていると考えられる。

一方興味深いことに、機能の多様性、具体的には多様な刺激によってチャネル機能が制御されるという現象は、ある一つの TRP チャネル分子においてもみることができる。たとえば TRPV1 は、43°C を超える高温、唐辛子の辛味成分カプサイシン、プロトンなど多彩な刺激に対しチャネルを開口し、Ca²⁺などの陽イオンを生体膜を介して透過させる応答を示す³⁾。このような物理刺激や化学刺激も含めた幅広い刺激に応答できるマルチモーダルな機能を持つことが、TRP チャネルファミリータンパク質の大きな特徴といえる。

このような TRP チャネルのマルチモーダルな機能制御がどのような仕組みで行われているのかは、非常に興味があるところである。タンパク質の機能の仕組みの解明には、タンパク質の立体構造を実際に「見」てそこから分子機能を探る、構造生物学が大きな威力を発揮してきた。しかしながら、TRP チャネルは、そもそも結晶構造解析が困難な膜タンパク質であるだけでなく、複雑な構造構成もあいまって、ごく最近まで構造を「見る」ことがきわめて困難な分子であった。これまでに明らかになってきたのは、分解能の低い電子顕微鏡像か、あるいは細胞内領域のいくつかのモジュールの結晶構造のみであった⁴⁾。

3. 真菌由来 TRPGz のマルチモーダルな機能とマルチモジュラーな制御領域

筆者らは TRP チャネルの構造解析を目指す過程で、麦類の赤カビ病を引き起こす糸状菌 *Gibberella zeae* 由来の

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1)

Structural basis of multimodal responses by TRP channels
Atsuko Yamashita (Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1, Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, Okayama 700-8530, Japan)

TRP チャンネルホモログタンパク質 TRPGz を偶然見いだした。酵母においては、上記七つのサブファミリーとは独立のファミリーである TRPY が存在し、液胞膜に局在して、細胞外からの浸透圧ショックに反応してチャンネルを開口し、液胞内 Ca^{2+} を細胞質側に透過させる機能を持つことがすでに知られていた^{5,6)}。そこでこの TRPGz の細胞内局在および機能について解析を行ったところ、TRPY と同様に液胞膜に局在し、浸透圧応答を示すだけでなく、急激な温度上昇・細胞外からの酸化剤添加・細胞内 Ca^{2+} 上昇・膜電位変化にも反応しチャンネルを開口するマルチモーダルな機能を持つことが明らかになった (図 1A)⁷⁾。さらには、細胞ストレスにより増加することが知られている生体膜中の各種のホスファチジルイノシトールリン酸によって上述

のすべての刺激応答が阻害されることも判明した。(なお、この現象はどの部位がリン酸化された異性体についても同様に見られたため、以降これらをまとめて PIPx と略す。) これらの結果は、ほかの TRP チャンネルファミリー同様、TRPGz もマルチモーダルなチャンネル制御機構を有していることを示している。TRPGz は、真菌においては TRPY1 と同様に⁸⁾細胞外ストレスへの応答反応に関与しているのではないかと考えられる。

さらに筆者らは、TRPGz のチャンネル機能を制御する領域を偶然見つけることにも成功した。我々はまず結晶化のための TRPGz の大量発現・精製を行ったが、残念ながら全長発現産物は得られず、おそらく細胞内で分解したとみられる複数の小さいタンパク質断片のみ観察された。しか

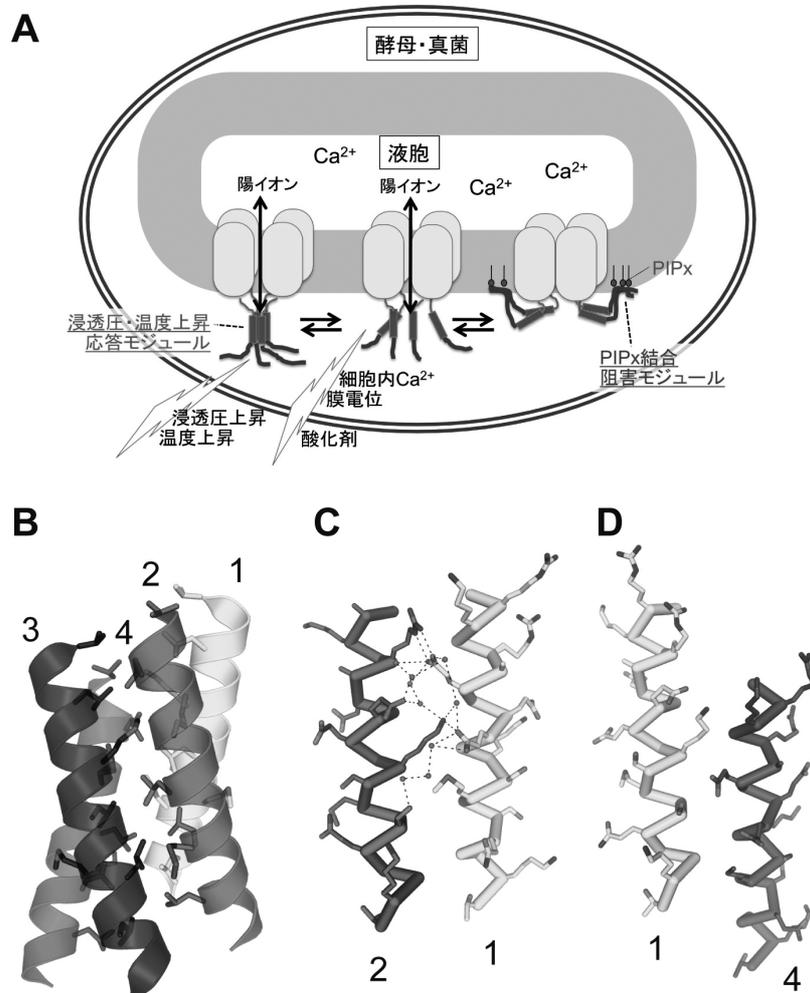


図 1 TRPGz 制御領域の構造と機能

(A) TRPGz の制御領域と機能の概略図。簡略化のため、TRPGz の N 末端側細胞内領域は省略している。(B) TRPGz ヘリックスバンドル領域の結晶構造。図の上部が N 末端、下部が C 末端である。ヘリックスバンドル内側の疎水性アミノ酸をスティックモデルで示す。(C) プロトマー 1-2 間、(D) プロトマー 1-4 間のバンドル外側の親水性相互作用。イオン結合または水素結合を破線で示す。

し、切断部位を同定し、その情報を手がかりにアミノ酸配列を見直してみると、これらが TRPGz の C 末端側細胞内領域にあり、切断部位と切断部位の間に、興味深い特徴的な配列が存在することがわかった⁶⁾。一つは、600~621 番目のアミノ酸残基で、コイルドコイルに特徴的なヘプタッドリピート配列をとっていた。もう一つは、コイルドコイル様領域の下流から C 末端に至る領域で、リシン残基が連続する塩基性の高い配列を有していた。

これらの領域とチャネル活性との関係を調べると、コイルドコイル様領域を欠損させた変異体では、浸透圧ショックや温度ショックに対する応答がみられなくなることがわかった⁷⁾。一方、細胞外酸化剤添加・細胞内 Ca^{2+} 上昇・膜電位変化に対する応答は、野生型同様にみられることが判明した。つまりこのコイルドコイル様領域は、浸透圧や温度ショックによってのみチャネルを開口する制御領域であることが明らかになった。対して、C 末端の塩基性領域は、PIP_x への結合能を持つことがわかり、上述した PIP_x 依存的な応答阻害を担う領域であることが明らかになった。つまり TRPGz は、(i) 浸透圧・温度ショックでチャネルを開口する制御領域 (コイルドコイル様領域)、(ii) 酸化剤添加・細胞内 Ca^{2+} ・膜電位変化によってチャネルを開口する、コイルドコイル様領域とは別に存在する未知の制御領域、(iii) PIP_x 結合によりチャネル活性を阻害する制御領域 (塩基性領域) を、複数の異なる機能モジュールとして (主に) 細胞内領域に持つ分子であることがわかった (図 1A)。このような細胞内領域のマルチモジュラーな分子構造は、上述のようにほかの TRP チャネルにも一般的にみられ、TRP チャネルがマルチモーダルな機能を持つ根本的な要因の一つであると考えられる。

4. 真菌由来 TRPGz のチャネル制御領域の構造特性

TRPGz の結晶化実験は、上述した部分断片も含めことごとくうまくいかなかったが、チャネル制御領域であるコイルドコイル様領域だけは、良好な結晶を得て結晶構造を決定することができた (図 1B)⁷⁾。この構造は、4 本の α ヘリックスが主に疎水結合で平行に会合した状態をとっており、四量体チャネル分子のそれぞれの領域が会合した状態にあたると思われた。この会合様式であるが、実はコイルドコイルではなく、らせん対称で会合したヘリックスバンドル構造であることが判明した。コイルドコイルの場合では、4 本のヘリックス間の相互作用に対称性があり、どのヘリックスも同じヘリックス間相互作用を持つはずであるが、らせん対称の場合は、4 本のヘリックスのうち、らせんの一番上と一番下に位置するもの間には、その他のヘリックス間の相互作用と同じ相互作用をとることができない。このため TRPGz では、ほかのヘリックス間でみら

れた荷電残基間のイオン結合や水素結合ネットワーク (図 1C) が、らせんの一番上と下の間では荷電残基の位置関係がずれてしまっていて形成されていなかった (図 1D)。

このヘリックスバンドル領域を含む C 末端側細胞内領域の超遠心分析を行ったところ、単量体、二量体、四量体の平衡状態にあり、会合の親和性はそれほど高くない (K_d 値が μM 弱~数十 μM レベル) ことが判明した。おそらくこの部位は、生体内で常に四量体として存在するわけではなく、離合・集散の平衡状態にあるものと推測される。この結果は、結晶構造でみられた、一部ヘリックス間相互作用に破れがみられる緩和な相互作用による会合状態とも一致する。次に、ヘリックス間相互作用を形成するアミノ酸残基に変異を入れ、段階的に親和性を弱めた変異体を作製しチャネル活性を調べると、バンドル領域の会合定数と浸透圧感受性チャネル応答の大きさに正の相関があることが判明した。つまり、浸透圧応答が起こるためには、ヘリックスバンドル領域が会合していなければならないことが明らかになった。

制御領域に関するさらなる構造情報を得るため、NMR 解析で C 末端側細胞内領域の構造解析を行ったところ、ヘリックスバンドル領域を除くほとんどの領域が、ランダムコイル構造をとっていることが判明した。つまり、PIP_x 依存的チャネル阻害を示す塩基性領域も含め、ほとんどがそのままの状態では特定の構造をとらない天然変性タンパク質領域として存在していると考えられる。このことは、アミノ酸配列からも天然変性領域と予測されること、タンパク質発現を行うとほとんど分解を受けること、ヘリックスバンドル領域以外の結晶が得られなかったこととも一致する結果である。これらは TRPGz 以外の酵母・真菌由来 TRP チャネルでも共通してみられる性質であった⁸⁾。

これらの構造特性を考え合わせると、複数の機能モジュールが連結する C 末端側細胞内領域は、単一なコンホメーションをとる静的な状態で存在するのではなく、ヘリックスバンドル領域が会合一解離した状態、塩基性領域と PIP_x が結合一解離した状態など、さまざまなコンホメーションの平衡状態にある動的な性質を有していると推測される (図 1A)。ヘリックスバンドル間の弱い相互作用、天然変性領域の柔軟な構造が、コンホメーションの多様性とダイナミクスを可能にしていると考えられる。もし仮にあるモジュールが特定のコンホメーションで固定されていたならば、別のモジュールが効率よく機能するのを妨げることがあるかもしれない。弱い相互作用・柔軟な構造によって達成される構造のダイナミクスは、複数の制御モジュールが、ある状況では独立に、またある状況では協同して機能するための重要な特性であり、TRP チャネルがマルチモーダルな機能を発現できる、目に見えないキープイントとなっているのではないだろうか。

5. TRPV1 の立体構造

構造研究が遅れていた TRP チャンネルであるが、昨年末、ファミリーでは初めての高分解能構造となるラット由来 TRPV1 の極低温電子顕微鏡構造が発表された⁹⁾。新しく開発された単電子検出器の利用と、電子線の分割照射および動き補正を組み合わせた最新のイメージ処理技術¹⁰⁾により、単粒子電子顕微鏡像ながら原子分解能に迫る 3.4 Å 分解能 (アミノ酸残基の側鎖の向きがわかるレベル) での構造解明を達成したものである。その全体構造は、同じく 6 回膜貫通型構造を持つ電位依存性イオンチャンネルファミリー (VGIC) のカリウムチャンネル^{11,12)} や細菌ナトリウムチャンネル¹³⁾ とよく類似しており、四量体の中心に各プロトマーの膜貫通領域 S5—ポアループ—S6 領域が集まって構成されるイオン透過経路と、それを風車状に取り囲んでおり、VGIC では電位センサーとして機能する膜貫通領域 S1—S4 領域から成り立っていた (図 2A)。さらに、細胞内領域に存在するアンキリンリピートと、TRP ドメインと呼ばれる保存された α ヘリックス領域の構造も合わせて明らかにされた。

一方で、VGIC の構造とは異なる特徴も観察されている。TRPV1 では、大きく開いた細胞外開口部と、近接するポアヘリックスに水素結合が形成されていない短いイオン選択フィルター、というように、構造的に柔軟性の高いイオン透過領域を持っていた (図 2B)。このような構造特性が、TRP チャンネル特有の、ポアダイレーションと呼ばれる大きな有機カチオンも透過可能な状態をとることがで

きる要因となっているのではないかとされている。また、今回各種アゴニストが結合した状態の構造も報告されたが¹⁴⁾、このうちクモ毒ペプチド (“double-knot” 毒素) は細胞外開口部に結合しており (図 2A)、この領域に大きな構造変化を引き起こしていた。このことから、この領域は潜在的にダイナミックな性質を有しているのではないかと推察され、そのような性質がチャンネル開口制御の背景にあるのではないかと指摘されている。さらには、透過経路をさらに進んだ細胞質に近い部分にも、径が縮まったゲート領域とみられる構造が存在しており (図 2B)、カプサイシン結合状態ではこの下部ゲートのみが開いた構造が観察された。これらの結果から、上部のイオン選択フィルターと下部ゲートと間のダイナミックなコミュニケーションが、さまざまな刺激に対する応答を統合し制御できる要因なのではないかと考察されている。筆者らが TRPGz のチャンネル制御領域にみた柔軟な構造・コンホメーションの多様性とダイナミクスという構造特性が、イオン透過そのものを担う膜貫通領域にもみられることが判明したわけである。多様な刺激応答ができる TRP チャンネルの機能を考える上で、きわめて重要な構造特性であろうと考えられる。

一方、今回の解析では、実は TRPV1 分子の細胞内領域のうちおよそ 4 割弱の部分の構造が明らかになっていない。筆者らが調べたところ、そのほとんどは、やはり天然変性領域と推定された⁸⁾。また、今回解析に用いられたチャンネル開口を制御するリガンドは、すべて膜貫通領域に対して結合するものであった。細胞内領域などのアロステリックな領域が、どのように膜貫通領域のチャンネル開口を制御するのかは、これからの課題となろう。

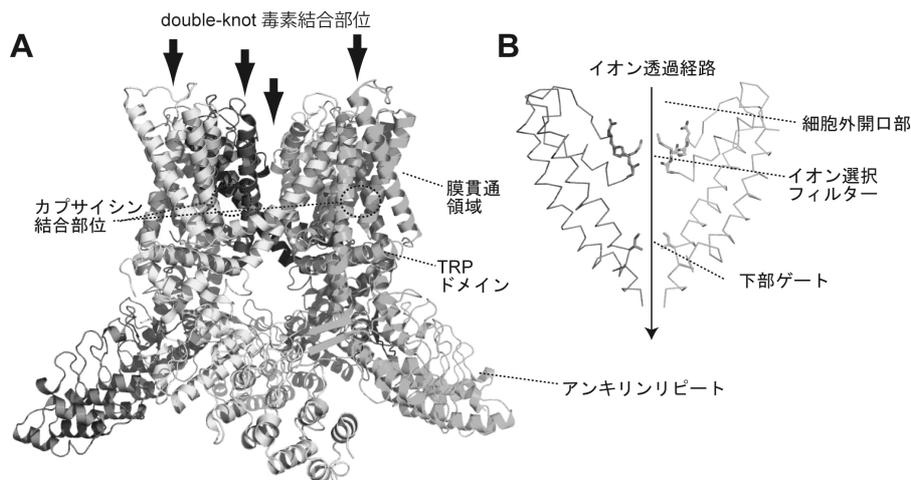


図 2 TRPV1 の電子顕微鏡構造

(A) TRPV1 の全体構造 (PDB ID: 3J5P)。今回解析されたアゴニスト結合部位も図中に示す (ただしカプサイシン結合部位は 4 か所中 2 か所のみ図示している)。(B) TRPV1 のイオン透過領域の構造。四量体のうち対角に存在する (A 中の左奥と右手前) 2 つのプロトマーの膜貫通領域 S5—ポアループ—S6 領域のみを示す。

6. おわりに

コンホメーションの多様性や天然変性領域に代表される構造の柔軟性は、均一な構造を持つ分子が規則正しく整列した結晶を必要とする X 線結晶構造解析が従来苦手とするところであった。TRP チャンネルの構造解析がこれまで遅れていたのは、このような構造的性質を持っていたからであることをあらためて実感させられる。最近の TRP チャンネル構造研究で我々が「見た」のは、まだ捕らえられていない多様なコンホメーション、構造が明らかにできていない領域、静的な構造解析ではみることができないそれらの織りなすダイナミクスが、TRP チャンネルの多彩な機能の重要な背景にある、つまり TRP チャンネルの機能を担う構造基盤について、現段階ではまだ「大切なものは、目に見えない」¹⁵⁾ 状況であることなのかもしれない。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、伊原誠特任助教（現近畿大学農学部）、東北大学大学院工学研究科・魚住信之教授、浜本晋助教、名古屋大学構造生物学センター・甲斐荘正恒教授、宮ノ入洋平特任助教、武田光広特任助教、東京電機大学・矢部勇博士との共同研究によるものです。共同研究者の方々ならびに本研究にご協力くださった方々に感謝いたします。

著者寸描

●山下敦子（やました あつこ）

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授。博士（農学）。

■略歴 1998 年京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了、同年理化学研究所基礎科学特別研究員、2000 年同研究所研究員、この間 03~05 年コロンビア大学博士研究員、06 年理化学研究所チームリーダー、12 年より現職。

■研究テーマ 感覚受容の構造生物学。

■ウェブサイト <http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/ayama/Structure/Top.html>

■趣味 ジョギング始めました。

- 1) Clapham, D.E. (2003) *Nature*, 426, 517–524.
- 2) Venkatachalam, K. & Montell, C. (2007) *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 387–417.
- 3) Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., & Julius, D. (1997) *Nature*, 389, 816–824.
- 4) Li, M., Yu, Y., & Yang, J. (2011) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704, 1–23.
- 5) Denis, V. & Cyert, M.S. (2002) *J. Cell Biol.*, 156, 29–34.
- 6) Palmer, C.P., Zhou, X.L., Lin, J., Loukin, S.H., Kung, C., & Saimi, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7801–7805.
- 7) Ihara, M., Hamamoto, S., Miyanoiri, Y., Takeda, M., Kainosho, M., Yabe, I., Uozumi, N., & Yamashita, A. (2013) *J. Biol. Chem.*, 288, 15303–15317.
- 8) Ihara, M., Takano, Y., & Yamashita, A. (2014) *Protein Sci.*, 23, 923–931.
- 9) Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013) *Nature*, 504, 107–112.
- 10) Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C.R., Braunfeld, M.B., Gubbens, S., Agard, D.A., & Cheng, Y. (2013) *Nat. Methods*, 10, 584–590.
- 11) Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (2003) *Nature*, 423, 33–41.
- 12) Long, S.B., Campbell, E.B., & Mackinnon, R. (2005) *Science*, 309, 897–903.
- 13) Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A. (2011) *Nature*, 475, 353–358.
- 14) Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., & Julius, D. (2013) *Nature*, 504, 113–118.
- 15) Saint-Exupéry, A. (1943) *Le Petit Prince*. Reynal & Hitchcock, New York.