

論文の内容の要旨

論文題目

Structural insights into the ligand recognition and functional regulation of the ATP-gated P2X receptor channels

(ATP 作動性チャネル P2X 受容体における基質認識および機能調節の構造基盤)

氏名 糟谷 豪

【背景・目的】

物質代謝や生合成のエネルギー物質として様々な生体内反応に寄与する ATP は、細胞間の神経伝達物質としても利用される。P2X 受容体は細胞外 ATP をリガンドとする、真核生物特有の非選択性陽イオンチャネルである。P2X 受容体には 7 つのサブタイプ (P2X1-P2X7) が存在し、これらがホモもしくはヘテロの三量体を形成することで機能する。P2X 受容体の活性化は、神経伝達や血管新生など多岐にわたる機能に関与する。P2X 受容体の各サブユニットは ATP や各種調節イオンが結合する細胞外ドメイン、非選択性の陽イオン透過孔を形成する膜貫通ドメイン、チャネル開閉を調節する細胞内 N および C 末端から構成される。P2X 受容体の立体構造については、ゼブラフィッシュ由来 P2X4 のアポ型閉状態および ATP 結合型開状態の決定を契機に、ヒト由来 P2X3 のアポ型閉状態、ATP 結合型開状態、競合阻害剤結合型閉状態とパンダ由来 P2X7 の非競合阻害剤結合状態を加えた計 3 つのサブタイプに由来する構造がこれまでに解かれており、これらの構造情報に基づいて ATP 依存的な開閉機構や、アゴニストおよび阻害剤の認識機構などが明らかになりつつある。その一方で、P2X 受容体の機能に関する分子機構については未解明な点も多く残っている。本研究では以下 3 つの分子機構に焦点を当てるとともに、X 線結晶構造解析およびその他生物学的手法を用いて、その解明を試みた。

1. P2X 受容体を持つ、ATP を強く認識する一方で、CTP は弱く認識し、GTP や UTP は認識しないというヌクレオチド塩基への特異性
2. P2X 受容体の開閉が二価金属イオンにより制御される機構
3. P2X 受容体に競合阻害剤 TNP-ATP が結合し、機能抑制が起こる機構

【CTP 結合型ゼブラフィッシュ由来 P2X4 の構造解析 (ヌクレオチド塩基特異性の解明)】

ATP 結合型構造が決定されたものと同じゼブラフィッシュ由来 P2X4 コンストラクトを昆虫細胞 Sf9 で過剰発現・精製し、CTP を加え結晶化を行った。そして、2.8Å の分解能で CTP 結合型

ゼブラフィッシュ由来 P2X₄ の構造を得た。既知の ATP 結合型構造と比較、および構造比較に基づいた電気生理学的解析および分光学的解析を行った所、CTP のシトシン環と ATP のアデニン環のいずれもが3本の水素結合で認識されているものの、その水素結合距離がCTPよりもATPで長くなっていた。このことから、水素結合距離がヌクレオチド塩基の特異性を決定していることが明らかとなった。

【ATP と Zn²⁺ 結合型ダニ由来 P2X の構造解析 (二価金属イオンによる制御機構の解明)】

複数生物種由来 P2X のスクリーニングにより無脊椎動物のダニ由来 P2X コンストラクトが安定に発現することを見出し、ヒト細胞 HEK293S GntI⁻を用いて過剰発現・精製して、ATP を加え Zn²⁺存在下で結晶化を行った。そして、2.9Å の分解能で ATP および Zn²⁺結合型ダニ由来 P2X の構造を得た。ATP は既知の P2X 受容体の構造と同じく、三量体境界面の ATP 結合ポケットに結合していた。他方で Zn²⁺は三量体の境界面 (M1 サイト) および ATP 結合サイト共役部 (M2 サイト) の2箇所に確認された。構造情報に基づいた電気生理学的解析および分子動力的解析を行った所、M1 サイトは P2X 受容体の活性化増強に関わっている一方で、M2 サイトは Mg²⁺の結合を模すると共に、Mg²⁺による開閉調節に関与していることが明らかとなった。

【競合阻害剤 TNP-ATP 結合型チキン由来 P2X₇ の構造解析 (競合阻害剤による抑制機構の解明)】

複数生物種由来 P2X₇ のスクリーニングによりチキン由来 P2X₇ コンストラクトが安定に発現することを見出し、ヒト細胞 HEK293S GntI⁻を用いて過剰発現・精製して、競合阻害剤 TNP-ATP を加えて結晶化を行った。そして、3.1Å の分解能で TNP-ATP 結合型チキン由来 P2X₇ の構造を得た。この構造を既知の TNP-ATP 結合型ヒト P2X₃ の構造と比較した所、TNP-ATP の持つトリニトロフェニル基の配向が大きく異なることが分かった。更に、構造情報に基づいた分子動力的解析を行った所、このトリニトロフェニル基が活性化状態への移行を阻害している事が明らかとなった。

【考察と展望】

本研究では P2X 受容体のヌクレオチド塩基への特異性、二価金属イオンによる機能調節機構、競合阻害剤による不活性化機構に焦点を当て、X 線結晶構造解析によりその仕組みの解明を試みた。今後は、ヘテロ三量体での P2X 受容体の構造解析や、P2X 受容体とアクセサリ膜タンパク質の複合体での構造解析など、構造生物学的により高難度の課題に挑戦したい。