

論文の内容の要旨

論文題目 P2X₄ 受容体の開閉制御機構の解明

氏名 湊 雄一

【序】 中枢神経系に発現している P2X₄ 受容体は、神経細胞からエキソサイトーシスや細胞の損傷によって放出された ATP の結合に伴って開口し、Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺などを非選択的に透過することにより、Ca²⁺を介したシグナル伝達や、シナプス後細胞の活動電位などを誘起する。

P2X₄ 受容体は、2 回膜貫通型のサブユニットが 3 量体を形成し、膜貫通領域がポアを形成する。また、細胞外ドメインのサブユニット界面に、ATP が結合する。近年、apo 状態と ATP 結合状態の構造が報告され、膜貫通領域はそれぞれ閉じた構造、開いた構造を形成していた (Fig.1A-D)。

P2X₄ 受容体は、apo 状態ではイオンを透過しない。ATP が作用すると内向きの電流が一過的に流れ、その後、ATP 存在下において、5 秒程度の時定数で減衰、すなわち脱感作し、最大値の数 % 程度の電流を流す、定常状態に達する (Fig.1E)。このような現象は、ATP 結合状態の P2X₄ 受容体が、結晶構造のような単一の状態では説明できない。しかしながら、P2X₄ の動的構造は不明である。

また、 α,β -methylene ATP は P2X₄ を開口させるが、その電流値は、ATP と比べて小さい (Fig.1F)。しかし、このように P2X₄ 受容体が部分的に活性化される機構は不明である。

そこで本研究では、P2X₄ がどのように脱感作するか、および α,β -methylene ATP がどのように P2X₄ を部分的に活性化するか、ということを解明するために、ATP および α,β -methylene ATP 結合状態における、P2X₄ 受容体の動的構造を明らかにすることを目的とした。

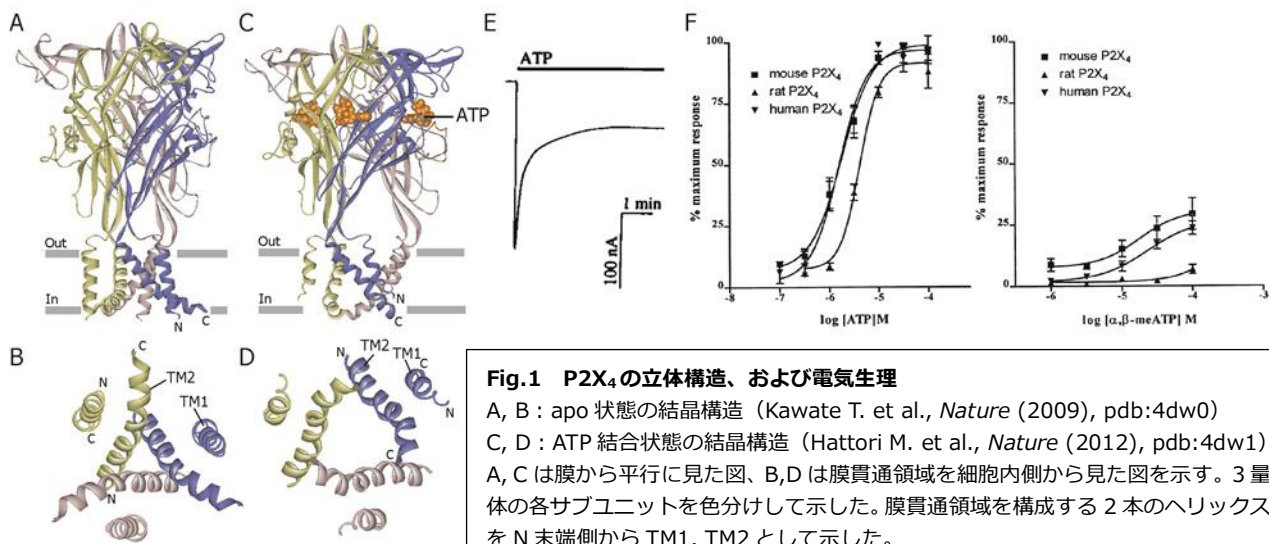


Fig.1 P2X₄の立体構造、および電気生理

A, B : apo 状態の結晶構造 (Kawate T. et al., *Nature* (2009), pdb:4dw0)
 C, D : ATP 結合状態の結晶構造 (Hattori M. et al., *Nature* (2012), pdb:4dw1)
 A, C は膜から平行に見た図、B, D は膜貫通領域を細胞内側から見た図を示す。3 量体の各サブユニットを色分けして示した。膜貫通領域を構成する 2 本のヘリックスを N 末端側から TM1, TM2 として示した。
 E : *X. Oocyte* に発現させた、rat P2X₄ の巨視的電流解析 (Wang CZ. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) より改変)。
 F: ATP(左)および α,β -methylene ATP 作用時 (右) の電流値の濃度依存性 (Jones CA. et al., *Br. J. Pharmacol.* (2000))。

【方法】

1. 試料調製

本研究では、zebrafish P2X_{4.1} の N 末端 27 残基、C 末端 24 残基を欠失し、構造非形成領域の M364 をロイシンに変異した発現系 (以降単に P2X₄ と表記) を用いた。N 末端に His タグおよび GFP を付加して、昆虫細胞発現系にて発現させた。メチオニンの側鎖メチル基選択的 ¹H, ¹³C 標識体は、培地に、[α,β,β -²H₃, methyl-¹³C] 標識メチオニン、および各種 ²H 標識アミノ酸を加えて発現させた。これを *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) により可溶化し、GFP の切断および精製を行った上で、¹H-¹³C HMQC スペクトルを測定した。リガンド結合状態のスペクトルを取得する際は、終濃度が 1 mM となるように ATP または α,β -methylene ATP を添加した。

【結果】

1. ATP の結合に伴う、P2X₄ の構造変化

P2X₄ のメチオニン選択標識体を調製し、apo 状態、ATP 結合状態において、それぞれ ¹H-¹³C HMQC スペクトルを取得した。その結果、P2X₄ のメチオニン残基数に対応する、5 個のシグナルが観測された。次に、各メチオニン残基の変異体を作製して、apo 状態および ATP 結合状態のスペクトルを測定した上で、野生型と比較することにより、5 個のシグナルを全て帰属した。その結果、apo 状態と ATP 結合状態では、リガンド結合部位に近い M108、および膜貫通領域に近い M268 や M325 を含む、細胞外領域に広く分布するメチオニン残基全ての化学シフトが異なっており、ATP 結合に伴い細胞外領域全体が構造変化することが明らかとなった (Fig.2)。

次に、膜貫通領域の構造変化を調べるために、膜貫通領域のシグナルの観測を試みた。開状態の結晶構造では、種間で保存された G350 を起点に、ポアを形成する TM2 が折れ曲がっている。また、human P2X₄ では、G350 に対応する残基の直下はメチオニン残基である。そこで、この G350 の直下にある L351 にメチオニン変異を導入して、メチオニン選択標識体の NMR スペクトルを測定した。その結果、野生型と比較すると、apo 状態、ATP 結合状態の両状態において、新たに 1 個のシグナルが観測された。したがって、新たに観測

されたシグナルを M351 と归属した。apo 状態と ATP 結合状態の M351 のシグナルを比較すると、化学シフトが約 0.1 ppm 異なっていた。したがって、ATP 結合に伴い、膜貫通領域の構造も変化することが示された (Fig.3)。

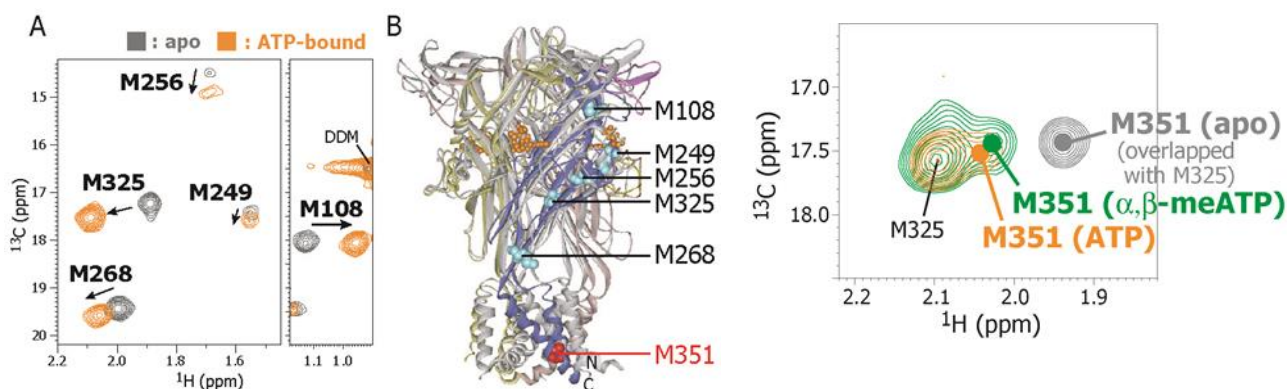


Fig.2 ATP 結合に伴う、P2X₄の細胞外領域のNMR スペクトルの変化
 A : apo 状態のスペクトルを灰色、ATP 結合状態のスペクトルを橙色にて示し、ATP の結合に伴うシグナルの変化を矢印で示した。
 B : 各メチオニン残基の位置を、P2X₄の ATP 結合状態 (開状態) の結晶構造上に示した。

Fig.3 各リガンド結合状態における M351 のシグナル
 apo 状態のスペクトルを灰色、ATP 結合状態のスペクトルを橙色、 α,β -methyleneATP 結合状態のスペクトルを緑色にて示した。

2. α,β -methylene ATP 結合状態と、ATP 結合状態における、構造の違い

次に、 α,β methylene ATP 結合状態における P2X₄ の構造を調べるために、 α,β -methylene ATP 結合状態のスペクトルを取得した。ATP 結合状態のスペクトルと比較した結果、ATP との結合に伴い、大きく構造変化する Left flipper と呼ばれるループの近傍に位置する M256 と、膜貫通領域の M351 の化学シフトが異なっており、これらの部位の構造が異なっていることが示唆された。また、 α,β -methylene ATP 結合状態の M351 の化学シフトは、apo 状態と ATP 結合状態の中間の値となっていた (Fig.3)。このように、活性の強さと対応した連続的な化学シフト変化が観測されたことから、 α,β -methylene ATP 結合状態において、膜貫通領域が、速いタイムスケールで化学交換している可能性を考えた。

3. α,β -methylene ATP 結合状態および ATP 結合状態における、膜貫通領域の動的構造平衡

そこで、膜貫通領域の化学交換の存在を調べるため、各リガンド結合状態における、M351 のシグナルの、温度依存的な変化を調べた。その結果、ATP 結合状態では、40°Cにおける M351 のシグナルは、20°Cにおけるシグナルと比べて、¹H の化学シフトが高磁場側に、すなわち apo 状態のシグナルに近づくように変化していた (Fig.4A)。apo 状態では、M351 に温度依存的な変化は観測されなかった (Fig.4B)。 α,β -methylene ATP 結合状態では、ATP 結合状態と同様に、M351 のシグナルの化学シフトは、温度上昇に伴って apo 状態のシグナルに近づいた (Fig.4C)。

また、細胞外領域のシグナルについても、温度依存的に変化するかを調べた。その結果、ATP 結合状態において、リガンド依存的な構造変化を反映する M256 や、M325 のシグナルに、温度依存的な化学シフト変化は観測されなかった。

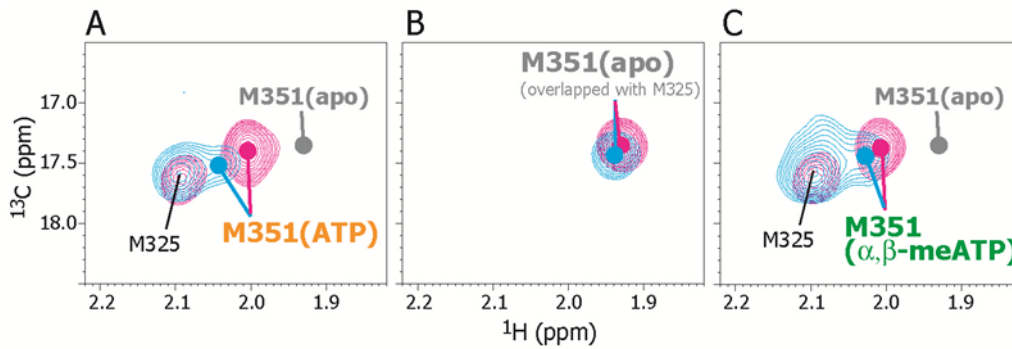


Fig.4 各リガンド結合状態における、M351のシグナルの温度依存的な変化

(A) ATP 結合状態、(B) apo 状態、(C) α,β -methylene ATP 結合状態における、M351のシグナルについて、20℃をシアン、40℃をマゼンタにて示した。また、ATP 結合状態、 α,β -methylene ATP 結合状態のスペクトルにおいては、40℃における apo 状態の M351 のシグナルの位置を灰色で示した。

【考察】

ATP 結合状態において、細胞外領域の M256 や M325 のシグナルに温度依存的な変化が観測されなかったことから、細胞外領域には構造平衡は存在しないことが示された。したがって、ATP が結合すると、細胞外領域には、結晶構造で見られているような構造変化が誘起され、単一の状態に固定されることが示唆された。膜貫通領域の動的構造について調べたところ、apo 状態においては、M351 のシグナルに温度依存的な変化が観測されなかったことから (Fig.4B)、膜貫通領域に構造平衡は存在しないことが示された。apo 状態では電流が流れないことから、結晶構造のように、膜貫通領域は閉じたまま固定されていると考えた。一方、ATP 結合状態では、M351 のシグナルに温度依存的な変化が観測された (Fig.4A)。したがって、ATP が結合すると、膜貫通領域には、apo 状態に対応する状態と、ATP 結合状態に特有な状態の間の構造平衡が生じることが示された。ATP 結合状態では電流が流れることから、この平衡は、ポアが閉じた状態と開いた状態の構造平衡であると考えた (Fig.5)。以上から、ATP が結合すると、細胞外領域の構造変化と共役して、膜貫通領域にポアが開いた状態と閉じた状態の構造平衡が誘起されるという機構を提唱する。ATP 添加後に脱感作し、定常状態に達するのは、この平衡状態に移行するためであると考えた。

また、 α,β -methyleneATP 結合状態において、細胞外領域の M256 の化学シフトが異なったことから、M256 近傍の構造が、ATP 結合状態とは異なることが示唆された。また、M351 のシグナルに温度依存的な変化が観測されたことから (Fig.4C)、ATP 結合状態と同様に、膜貫通領域はポアが開いた状態と閉じた状態の間の構造平衡にあることが明らかとなった。一方、 α,β -methyleneATP 結合状態の M351 のシグナルは、ATP 結合状態と apo 状態の中間に、すなわち ATP 結合状態よりも apo 状態のシグナルに近い位置に観測されたことから (Fig.3)、膜貫通領域の構造平衡は、ポアが閉じた状態に偏っていることが示された (Fig.5)。したがって、 α,β -methylene ATP が P2X₄ を部分的に活性化するのは、ATP 結合状態と比べて、細胞外領域の構造が異なることによって、膜貫通領域のポアが開いた状態が相対的に不安定になるためであると考えた。

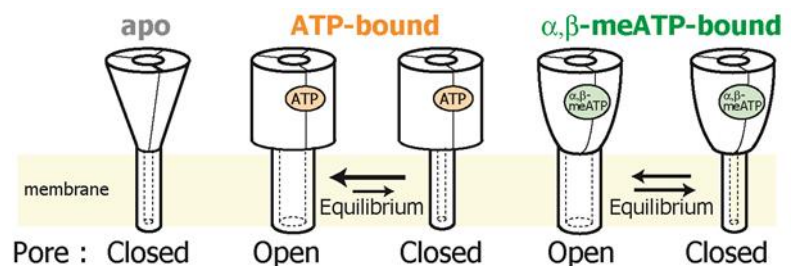


Fig.5 P2X₄の動的構造平衡モデル

apo 状態では、膜貫通領域に構造平衡はなく、ポアは閉じている。一方、ATP 結合状態、 α,β -methylene ATP 結合状態においては、ポアが閉じた状態と開いた状態の構造平衡にある。また、 α,β -methylene ATP 結合状態では、ATP 結合状態よりも、ポアが閉じた状態に平衡が偏っている。