イオンチャネル内蔵型受容体の高選択的リガンド認識と機能調節に関する生物有機化学研究

近畿大学農学部　伊　原　　誠

はじめに

イオンチャネル内蔵型受容体は，神経伝達物質受容体としてのみならず環境応答センサーとしても重要な働きをしている．それゆえ，その機能調節機構の理解は基本的生命現象の解明だけでなく，生物制御剤の開発を初めとする応用への可能性を秘めている．このような背景のもと，演者はイオンチャネル内蔵型受容体のリガンド認識と機能制御の解明をめざした研究を展開してきた．講演では，本奨励賞に関わる研究推進に大きく寄与した技術開発研究，タンパク質の新規非変性電気泳動法と昆虫神経細胞に対するパッチクランプ法の確立，そして真菌TRPチャネルのマルチモーダルな活性化制御の分子機構およびネオニコチノイドの昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体に対する高選択的相互作用の分子機構について紹介する．

1.　イオンチャネル内蔵型受容体の構造機能相関研究に向けた技術開発研究 ~FN-PAGE の開発とパッチクランプ条件の確立

構造生物学的アプローチによりイオンチャネルの機能-構造相関研究を行うためには，解析に必要なイオンチャネルの異種発現コンストラクト設計を迅速に進める必要がある．研究開始当時，GFP融合技術と液体クロマトグラフィーを組み合わせた蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー（FSEC）が開発され普及し始めていたが，逐次分析のため解析できる試料数に限界があった．そこで，解析のハイスループット化が期待されるNative-PAGE法に着目し，その条件を探索した．その結果，スルホコハク酸系陰イオン界面活性剤の一種をチャージキャリアとして用いることで，膜タンパク質の構造を保ちながらも，明瞭な電気泳動バンドを与える条件を見いだしFN-PAGEの開発に至った（図1A）．一方で昆虫神経細胞のイオンチャネル内蔵型受容体と各種リガンド間相互作用の分子機構解析には，長時間に渡り安定した測定が必要である．そこで，電気生理学的実験手法であるパッチクランプ測定に使用する電極内溶液組成を精査しリガンド処理により誘起されるイオン電流を長時間にわたり記録可能なパッチクランプ条件を確立した（図1B）．

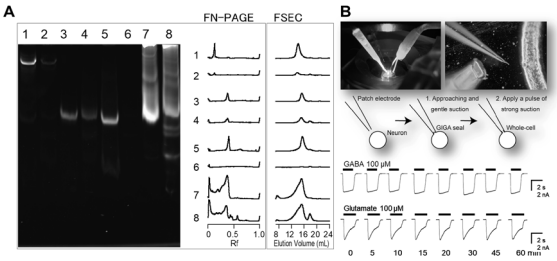

図1.　イオンチャネルの構造・機能相関研究に向けて開発した膜タンパク質の迅速な性状解析を可能とするFN-PAGE（A）と長時間に渡り安定なイオン電流記録を可能としたパッチクランプ測定法（B）（Ihara et al., *Anal. Biochem.* 2014; *Invert. Neurosci.* 2005より許可を得て転載）．

2.　真菌 Transient receptor potential（TRP）チャネルのマルチモーダルな活性化制御の分子基盤研究

Transient receptor potential（TRP）チャネルは，ヒトや昆虫を含む多くの真核生物において，温度や浸透圧の他，ケミカルリガンドなどの細胞外情報の受容および細胞内情報伝達に関与している．TRPチャネルの興味深い特性として，ひとつのチャネルが異なったメカニズムにより活性化されるというマルチモーダルな制御機構があげられる．しかし，どの様なしくみでTRPチャネルが多様な情報に応答できるのか不明であった．そこでGFP融合技術を活用して構造生物学的研究に適用可能な真菌TRPチャネルを探索し，赤カビ病菌（*Gibberella zeae*）から［1］浸透圧変化，［2］温度上昇，［3］H_2O_2による酸化ストレス，［4］細胞質Ca^{2+}および［5］膜電位の変化を感知してチャネルを開口するTRPチャネル（TRPGz）を見いだした（図2）．

TRPGzが様々な外部刺激に対して応答できる機能制御には，細胞内ドメイン（CTD）が関与すると推測し，その構造特性を分析超遠心法やNMRにより解析した．その結果，CTDは単量体・二量体・四量体の平衡状態にあり，浸透圧や温度刺激によるイオンチャネルの開口にはCTDの会合が重要な役割を果たす一方で，Ca^{2+}や膜電位変化に対する応答にはCTDが関与しないことが明らかになった．つぎに，CTDの多量体化が生じる機構とCTDに動的な構造変化が伴う理由についてさらに検討したところ，CTDに存在する，強いねじれをもつヘリックスバンドル構造が関与することが明らかになった．さらに，TRPGzのカルボニル末端近傍に存在する塩基性アミノ酸クラスターの機能を調べたところ，当該塩基性アミノ酸クラスターがイノシトールリン脂質（PIPs）に対する親和性を示すとともに，それらは浸透圧や温度変化に伴う液胞膜上のTRPGzチャネルの開口抑制に関与することを見出した．

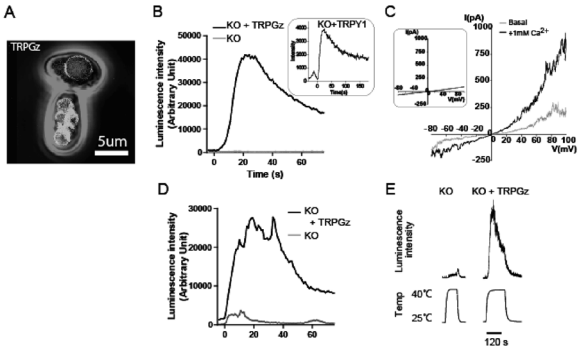

図2.　赤カビ病菌TRPチャネル（TRPGz）の特徴：TRPGzは出芽酵母に発現させると液胞膜上に局在し（A）；浸透圧（B）；膜電位変化（C）；酸化ストレス（D）および温度上昇（E）に応答するマルチモーダルな活性化機構を有する（Ihara et al., *JBC* 2013より許可を得て転載）．

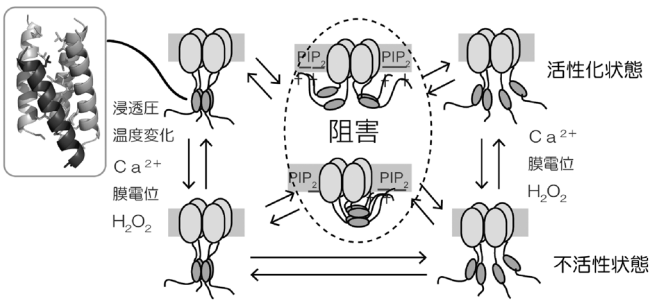

図3. TRPGz のマルチモーダルな制御の分子構造基盤

これらの研究を通じて，浸透圧や温度変化により TRPGz が液胞からのカルシウムイオンの放出を連鎖的に引き起こして細胞内シグナルカスケードのスイッチを入れる一方，カルシウムイオン濃度の上昇により誘起される液胞膜中の PIP_2 濃度上昇を検知してチャネル機能が制御されること，そして本 TRP チャネルが離合集散可能な弱い相互作用で会合する CTD を有することで，浸透圧や膜電位，イノシトールリン脂質など様々な形態の刺激によって制御されるというマルチモーダルな機能制御を可能にしていることを構造生物・生理学的に明らかにした（図3）.

3. 昆虫制御物質の活性発現と選択性の分子機構の解明

多くの動物に共通する神経シナプス伝達のうち，昆虫の神経伝達機構を選択的に制御・調節することは，安全性に優れた昆虫制御剤を開発するうえで重要である．そこで，昆虫のイオンチャネル内蔵型受容体に作用する昆虫制御剤，特にネオニコチノイド系生物制御剤の活性発現と昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対する選択的結合機構の解明に取り組んだ．まず，電気生理学的手法パッチクランプ法と二電極膜電位固定法を用いた解析によって，化学構造の類似性が高いネオニコチノイドであっても，化合物間において分子標的である nAChR に対する相互作用に顕著な違いがあること，すなわち化合物によってアンタゴニストとして作用する場合からアセチルコリン以上の応答を誘起するスーパーアゴニストとして作用すると場合までバラエティに富むことを見出した．

次に，その分子機構をより詳細に明らかにするために，ヨーロッパモノアラガイ由来で nAChR のアゴニスト結合ドメインに相同な構造をもつタンパク質，アセチルコリン結合タンパク質（AChBP）とネオニコチノイドとがつくる複合体結晶の X 線結晶構造を明らかにした．そして，その立体構造に基づいて，nAChR の non-α サブユニットの loop D 領域にて広く保存されている塩基性アミノ酸との相互作用（図4A）によってネオニコチノイドが昆虫の nAChR に対する選択性を示すと提唱するとともに，昆虫の nAChR サブユニットタンパク質で見られた一アミノ酸多型がネオニコチノイドのアゴニスト活性に顕著に影響を及ぼすことを発見しその分子機構を明らかにした．さらに，Loop D に塩基性アミノ酸導入した変異型 AChBP とネオニコチノイド複合体結晶の X 線結晶構造を解析することにより結晶構造中でネオニコチノイドが loop G 領域の塩基性アミノ酸とも相互作用することを見いだした．この発見から，昆虫の nAChR では，α サブユニット同士が隣接した受容体が形成されること（図4B），そして昆虫の nAChRα サブニットでは，LoopD-E-G 領域のアミノ酸残基が協調して，ネオニコチノイドの昆虫 nAChR に対する選択性をいっそう高めていることを見いだした（図4C）.

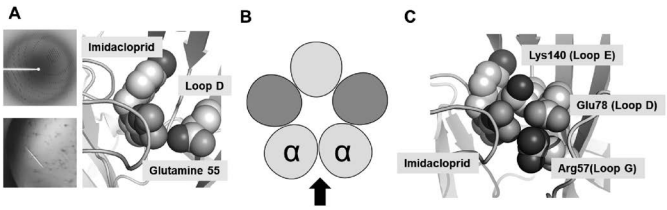

図4. ネオニコチノイドの昆虫 nAChR に対する選択毒性と多様な生理活性発現の分子機構
（A）ヨーロッパモノアラガイ由来 AChBP とイミダクロプリド複合体結晶および X 線結晶構造（B）昆虫の nAChR は α サブユニット同士が隣接することで形成されるアゴニスト結合部位にネオニコチノイド高親和性結合部位が形成される（C）昆虫の nAChR における α–α サブユニット同士の境界に，Loop D-E-G のアミノ酸残基からなるネオニコチノイドとの相互作用に有利な構造が形成される．

また本研究で得られた知見は，同受容体を標的とする生物制御剤開発のみならず，将来発生する可能性のある薬剤耐性昆虫の予測とその対策への知見として活用できると期待される．

おわりに

以上の研究成果は，真菌や昆虫の生体機能の高選択的化学調節機構における基盤概念を提供し，基本的生命現象の理解を深めることに貢献したことから，広範な応用研究へと発展する可能性を秘めている．今後もイオンチャネルの動作原理の解明をすすめていくとともに，イオンチャネルが関与する生命現象を追求し，環境に調和した生物制御剤の開発を見据えた農芸化学研究に貢献していきたい．

謝　辞　本研究は，近畿大学農学部，理化学研究所放射光科学総合研究センター・構造生理学研究グループ・分子シグナリング研究チームおよび岡山大学大学院医歯薬学総合研究科にて行われたものです．本研究を行う機会を与えていただくとともに，公私にわたり懇切な御指導，御支援を賜りました近畿大学農学部　松田一彦先生，岡山大学大学院　山下敦子先生に心より御礼申し上げます．University College London の David B. Sattelle 先生には，昆虫制御物質の活性発現と選択性の分子機構解析に関する研究で多くの助言をいただきました．深く感謝いたします．X 線結晶構造解析を研究に取り入れるにあたり，大阪大学産業科学研究所　岡島俊英先生に御指導・御助言を賜りました．深く御礼申し上げます．NMR 解析は名古屋大学構造生物学センター甲斐荘正恒先生，宮ノ入洋平先生および武田光広先生との共同研究によって，酵母液胞膜を使用したパッチクランプ実験は東北大学大学院　魚住信之先生，浜本晋先生および東京電機大学　矢部勇先生との共同研究によって行われました．快く研究にご協力していただき深く感謝いたします．ノースウェスタン大学　故楢橋敏夫先生，理化学研究所　小田俊郎博士（現東海学院大学）には，それぞれ昆虫の神経細胞を用いたパッチクランプ実験と分析超遠心解析で御助言・御指導をいただきました．厚く御礼申し上げます．また，様々な面からご支援いただいた，近畿大学，理化学研究所，岡山大学の研究室のスタッフ，学生および研究支援者の方々に深く感謝いたします．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長の河田照雄先生に厚く御礼を申し上げます．