

表1 ■ 代表的なTRPチャンネルとモジュール構造

	代表的なモジュール構造		代表的なサブタイプとその活性調節因子
	N末端側	C末端側	
グループ1			
TRPA	アンキリンリピート, EFハンドモチーフ		TRPA1 ----- 17℃以下, カラシ油,
TRPV	アンキリンリピート	コイルドコイル, カルモジュリン 結合ドメイン	TRPV1 ----- 43℃以上, カプサイシン, pH
TRPM		TRPドメイン, カルモジュリン 結合ドメイン, キナーゼドメイン	TRPM8 ----- 23 ~ 28℃, メントール, PIP ₂ , pH
TRPN	アンキリンリピート	TRPドメイン	NOMPC ----- 機械刺激
TRPC	アンキリンリピート, コイルドコイル	TRPドメイン, コイルドコイル, カルモジュリン結合ドメイン	TRPC3 ----- カルシウムストアの枯渇, ジアシ ルグリセロール, 機械刺激
グループ2			
TRPML		EFハンドモチーフ	TRPML1 --- pH, カルシウムイオン
TRPP		コイルドコイル, EFハンドモ チーフ	TRPP2 ----- カルシウムイオン, PIP ₂ , 機械刺 激
真菌由来ホモログ			
TRPY		ヘリックスバンドル, 塩基性アミ ノ残基クラスター	TRPY1 ----- 浸透圧, カルシウムイオン TRPGz ----- 浸透圧, カルシウムイオン, PIP, 酸化ストレス, 温度変化

ネルでありながら、複数の刺激で活性化されるという機能的特徴をもつ（マルチモーダルな活性化機構）⁽⁸⁾。たとえば、カプサイシン受容体として知られるTRPV1は、膜電位変化のほか、カプサイシンや酸、高温（43℃以上）でもイオンチャンネルの開口が起こり（表1）、細胞内メッセンジャーであるカルモジュリンによってチャンネル活性の抑制を受けることも知られている⁽⁹⁾。

このように、興味深い性質を示すTRPチャンネルであるが、アミノ酸配列から予測される膜貫通領域と細胞内・外ループ部分のトポロジーに基づいて、大きくグループ1とグループ2に分類される（表1）。哺乳類のTRPチャンネルはさらにTRPA (ankyrin), TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPML (muco lipin) そしてTRPP (polycystin) の6つのファミリーに分類されている。昆虫や線虫においてはさらに、TRPN (no mechanoreceptor potential C) が見いだされており、これらを合わせて一般的にTRPチャンネルは7つに分類されている。

2. TRPチャンネルの構造

TRPチャンネルは図1に示すように、6つの膜貫通ヘリックスTM1-TM6とTM5とTM6に挟まれた領域にイオンチャンネルポアを形成するポアヘリックスを有するコア構造と、そのN,C末端側に細胞内領域をもち、4量体を構成して機能している。細胞内領域には、TRPチャンネルのサブタイプに応じてさまざまなモジュールをもっており（表1）、そのモジュールによってTRPチャンネル

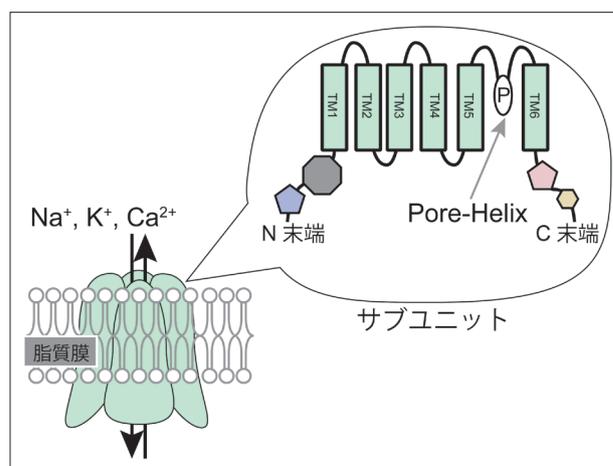


図1 ■ TRPチャンネル

TRPチャンネルは脂質膜上に存在する膜タンパク質であり、4量体を形成することでイオンチャンネルとして機能する。TRPチャンネルは、一般的に、ナトリウムイオンやカリウムイオンだけでなくカルシウムイオンも透過させる非選択的なカチオンチャンネルである。TRPチャンネルを構成するサブユニットタンパク質は、TM1～TM6までの膜貫通領域と、イオンチャンネルを形成するポアヘリックス (P) からなっている。N末端・C末端側には種々のモジュール構造を有している。

のマルチモーダルな制御が達成されていると考えられる。単一のTRPチャンネルが、温度・圧力・酸化還元状態・pH・外来化学物質など、化学刺激、物理刺激をまたいだ、さまざまな刺激に対して応答できる特徴には、それぞれの刺激に対して応答するためのモジュール構造が存在すると考えられている^(6,10)。しかし、モジュール構造と機能のかかわりに関する定量的な解析は、熱感受

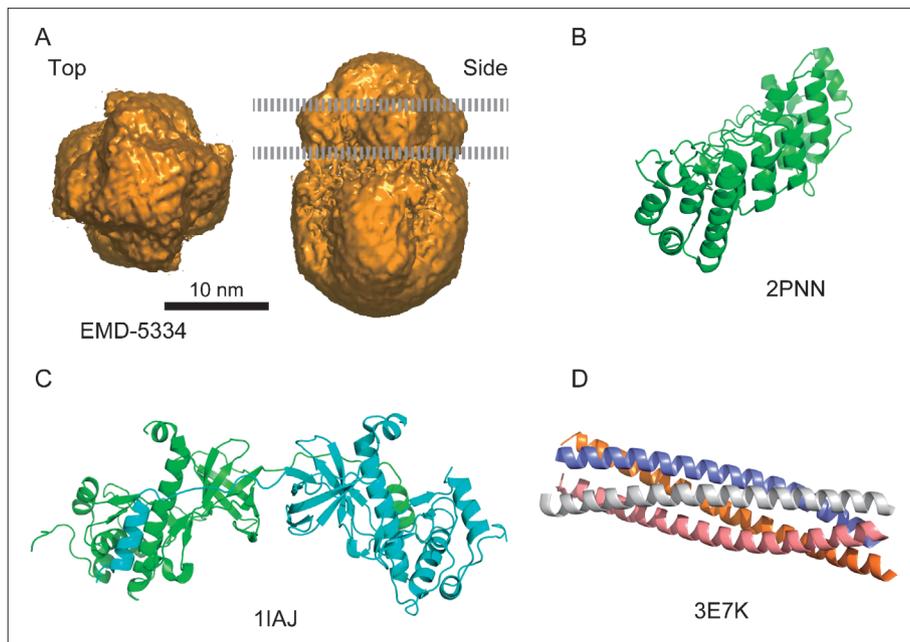


図2 ■ 哺乳類TRPチャネルの構造情報

(A) TRPA1の電子顕微鏡単粒子解析像、図中破線部分は構造から予測した細胞膜の界面の位置を示す、(B) TRPV1のアンキリンリピート、(C) TRPM7の α -キナーゼドメイン、(D) TRPM7のコイルドコイルドメイン、の各X線結晶構造。図はPDB、EMDBから得た座標、マップより作成。

性TRPV1・V2の温度センサーモジュール（TM1領域近傍のN末端側細胞内ドメイン）⁽¹⁰⁾の例など限られた報告しかなく、多くの研究ではチャネルタンパク質の部分的な欠損体を用いた機能欠失体によって、モジュールの機能が提案されている。モジュールと機能制御の関連を詳細に議論するためには、構造と機能の相関研究による構造生物学的なアプローチからTRPチャネル制御機構を解明することが望まれてきた。

TRPチャネルは、電子顕微鏡による単粒子解析により、いくつかの分子について全体構造が得られている。TRPA1（図2A）、TRPC3、TRPM2、TRPV1、4の構造が明らかにされたことによって、それまで予想されてきたように、TRPチャネルと同じ電位依存性カチオンチャネルスーパーファミリーに属する電位依存性カリウムチャネルなどと同様に、4量体の中心にイオンチャネルポア構造を有することが示され⁽¹¹⁾、ファミリー間のメンバーで構造・機能の比較が可能になった⁽¹²⁾。ところが、電子顕微鏡解析によって得られる立体構造の分解能は低いため、TRPチャネルの機能の詳細について議論することは難しい（本稿出版直前に、電子顕微鏡による単粒子解析法によって、立体構造から機能に迫ることが可能な高い分解能で、TRPV1の立体構造が発表された^(13,14)。今後さまざまな機能状態での立体構造情報が蓄積することにより、TRPチャネルの機能制御の分子メカニズムの理解も大きく進展すると期待される）。一方で、TRPチャネルがもつモジュール構造のうちのいくつか、たとえばコイルドコイル、キナーゼドメイン、

アンキリンリピートなどについては、X線結晶構造解析によってモジュール単独での高分解能の構造が報告されている（図2B, C, D）。ところが、これら構造が明らかにされたモジュールとTRPチャネルのイオンチャネル開口制御の関連性そのものが明確でないものも多く、チャネル開口制御のメカニズムの理解はこれまで進んでいるとは言いがたい状況にあった。

そこで筆者らは、TRPチャネルのなかでも比較的簡単な機能制御モジュール構造をもつと推測された真菌由来TRPチャネルファミリーに着目し、これらをモデル分子として、TRPチャネルのマルチモーダル制御の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った⁽¹⁵⁾。

真菌由来TRPチャネルTRPGzの開口制御の仕組み

1. 真菌由来TRPチャネルファミリー

酵母やカビなどの真菌類では、上述した7種のTRPチャネルに分類されないTRPチャネルファミリーが見いだされている。最も研究されている真菌TRPチャネルが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来TRPY1 (yeast vacuolar conductance 1, YVC1) である⁽¹⁶⁾。TRPY1は、液胞膜に存在し、高浸透圧や液胞膜の膜伸展によって開口して、細胞質内のカルシウムイオン濃度上昇を引き起こす。さらに、細胞質内のカルシウムイオンによってチャネルの開口が促進されることが明らかにされている⁽¹⁷⁾。 *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*

などの酵母由来のTRPチャネルであるTRPY2, TRPY3も、TRPY1欠損出芽酵母に異種発現させた場合浸透圧応答性を示すこと、液胞パッチクランプ実験によって液胞膜に浸透圧を与えた際にチャネル開口が生じること、さらに液胞にカルシウムイオンを処理した際にチャネル開口が増加することが示されている。これらのことから、真菌のTRPチャネルファミリーは液胞膜上に発現し、共通の機能として浸透圧とカルシウムイオンによる制御を受けるといった機能的特徴をもつと考えられており⁽¹⁸⁾、細胞外からのストレスに対する応答反応に何らかの役割を果たしている分子ではないかと推測されている。

筆者らは、これらの真菌TRPチャネルファミリーのなかから、赤カビ病菌 *Gibberella zeae* 由来で細胞外刺激に対し高い応答性を示すTRPチャネルを見だし、TRPGzと名づけ、その後の解析を行うことにした。

2. TRPGzのマルチモーダルなチャネル開口制御

TRPGzは、TRPY1と40%、ヒトTRPCチャネルと約20%の配列相同性を示すイオンチャネルである。TRPY1欠損出芽酵母に異種発現させた場合、TRPGzは液胞膜上に局在発現し、イクオリンを用いたカルシウムイオンレポーターアッセイによって、①1.2 M以上のソルビトール刺激、②急速な温度上昇、③H₂O₂処理によって細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を引き起こすこと、さらに液胞膜を使ったオルガネラパッチクランプ実験から④細胞質内のカルシウムイオン濃度依存性なチャネル開口活性と、⑤膜電位依存性なチャネル開口活性をもつことが明らかになった。すなわち、TRPGzは浸透圧応答、酸化還元状態への応答、膜電位、カルシウムイオン依存性なチャネル開口などマルチモーダルなチャネル開口制御機構を有しており、TRPチャネルがもつ機能的特徴をもつプロトタイプであると言える。

3. TRPGzの機能モジュール

マルチモーダルなチャネル開口制御は、細胞内ドメインのモジュールが関与していると考えられることから、細胞内ドメインのチャネル活性制御との関係に興味もたれた。そこで、まずTRPGzのC末端側細胞内領域 (TRPGz-CTD) の機能にせまるため、TRPGz-CTD試料を組換えタンパク質として調製し、サイズ排除クロマトグラフィーによって分析したところ、多量体形成を示す結果が得られた。そこで、分析超遠心法を用いて精密な会合プロファイルを解析したところ、TRPGz-CTDは単量体・2量体・4量体間の平衡状態にあることが示された。また、NMR解析により、CTDは大部分が二次構造をもたない天然変性タンパク質領域で構成されており、柔軟な構造を取っていることが明らかになった。

アミノ酸配列の二次構造予測ならびにアミノ酸配列のプロファイリングを行ったところ、TRPGzはCTD中に酸性アミノ酸のクラスター、コイルドコイルと予想されるHeptadリピートと塩基性アミノ酸のクラスターを見いだした。これらモジュールのうち、コイルドコイルは、一般的にタンパク質間の相互作用や多量体化に関与することが知られているモジュール構造である。そこで、その領域を欠損させたところ、変異型TRPGzは①高浸透圧と②温度上昇に対する応答性を失ったものの、液胞膜局在や③H₂O₂処理④細胞質カルシウムイオン濃度および⑤膜電位依存性なチャネル開口活性は保持していた。

そこで、コイルドコイルと予測された領域を結晶化し、X線結晶構造解析を行ったところ、この領域の立体構造は、一見コイルドコイルに類似しているが、らせん対称を伴う強いねじれをもったヘリックスバンドルであることが明らかになった (図3A)。TRPGzヘリックスバンドルの全体像を眺めると、ロイシンやメチオニン残基が4本のヘリックスの中心部分で疎水性のコアを作

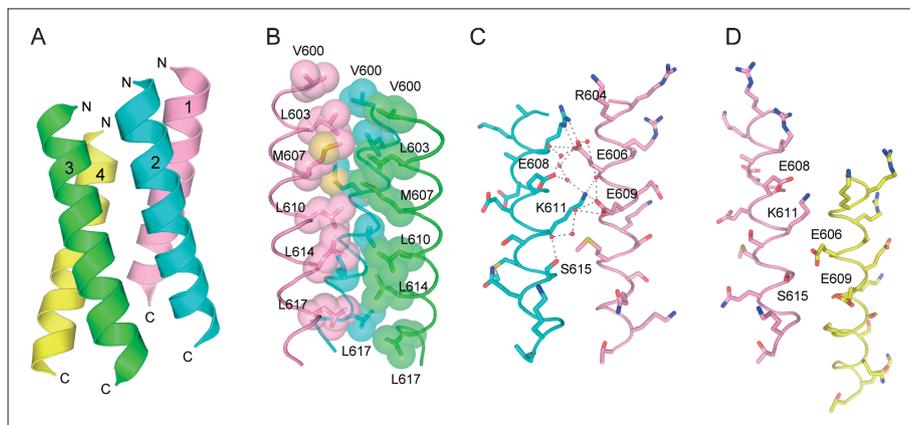


図3 ■ TRPGzのコイルドコイルと予測された領域のX線結晶構造

(A) 全体構造 (B) 疎水性相互作用 (C) プロトマー1~2間の親水性相互作用 (D) プロトマー1~4間の親水性相互作用

文献15より転載*。

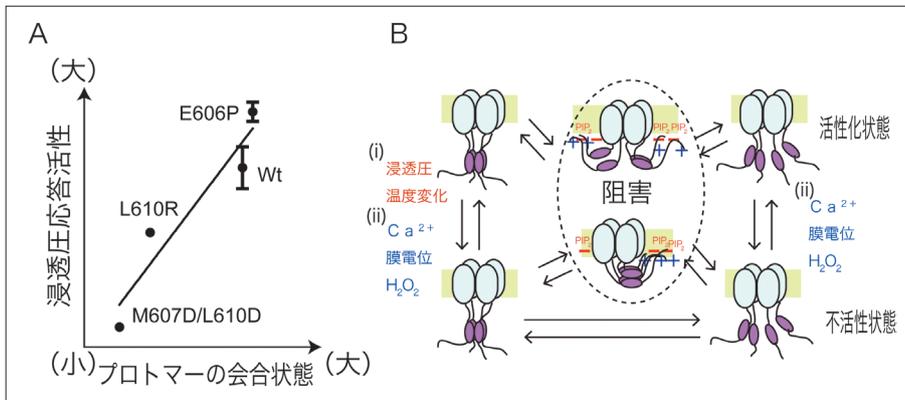


図4 ■ TRPGzの浸透圧応答性とTRPGz-CTDの多量体形成能との関係

(A) TRPGz-CTD の会合度と浸透圧上昇応答との相関。Wt (Wild type) : 野生型, M607D/L610D, L610R, E606P : TRPGz-CTD 中ヘリックスバンドル領域に点変位をもつ変異体。(B) TRPGz チャンネル開口の推定制御メカニズム。TRPGzは、さまざまな刺激によって不活性化状態(図中下段の状態)から活性化状態(図中上段の状態)へ転換するが、このうち(i) CTD中のCC領域が会合しているときのみ起こる浸透圧・温度変化による活性化と、(ii) CC領域の会合状態とは無関係に起こるカルシウムイオン・膜電位・H₂O₂による活性化という、異なる複数の活性化経路がある。(i) (ii)のいずれの経路による活性化も、液胞膜上のPIP₂濃度が上昇し、TRPGzのC末端に存在する塩基性アミノ酸クラスターがPIP₂と結合することによって、チャンネル開口阻害を受ける(図中央破線で囲まれた状態)。文献15を改変し転載*。

り、密な疎水性のパッキングを形成していた(図3B)。

このX線結晶構造を参考に、ヘリックスバンドルの会合状態が弱まることを期待して、バンドル内のプロトマー間相互作用に関与しているアミノ残基(図3B, C, D)に点変位を導入したTRPGzを作成して浸透圧応答の強度を測定するとともに、同じ点変位を有するTRPGz-CTDを作成してCTDの会合状態を分析超遠心で解析した。その結果、TRPGz-CTDに存在するヘリックスバンドルを介した相互作用が、浸透圧応答強度に正の相関を示すという知見を得た(図4A)。

ヘリックスバンドルの親水性相互作用を詳しく見てみると、プロトマー1-2, 2-3, 3-4間においてはプロトマー間で、グルタミン酸-アルギニン、リジン残基を介して塩橋や水分子を介した水素結合などによる親水性の相互作用ネットワークが見られたものの(図3C)、プロトマー4-1間ではらせん対称によってプロトマーの相互作用部位の位置関係のシフトが起こり、もはや前述の親水性相互作用のネットワークを作ることができなくなっていた(図3D)。

一方で、塩基性アミノ酸残基のクラスターはホスファチジルイノシトール二リン酸(PIP₂)などの酸性脂質と選択的に相互作用することが知られており、ほかのTRPチャンネルにおいてもPIP₂の機能制御の例が報告されている。TRPGzにおいても、当該領域の脂質結合性とチャンネル機能制御の関係について検討したところ、確かにPIP, PIP₂などのリン脂質との結合活性を有すること、さらにPIP, PIP₂を系に添加するとTRPGzを介した膜イオン電流を著しく低下させることが明らかとなっ

た。

4. 複数の機能モジュールによるマルチモーダルなチャンネル開口制御

一般的なヘリックスバンドルやコイルドコイルは、10⁻⁹ M程度の解離定数をもつ強い相互作用を有するものがあるが、本稿で紹介したTRPGzのC-末端側の細胞内ドメインは、遠心分析による会合状態の解析から、解離定数がマイクロMオーダーという比較的弱い相互作用で、かつ1⇌2⇌4量体の平衡状態で存在することが明らかになった。4量体のチャンネルポアドメインにCTDがアンカリングされている状態を仮定すれば、仮想的なCTDの局所濃度がマイクロMオーダーになることから、TRPGz-CTDは生理的条件下においても会合と非会合の平衡状態にあることが強く推測された。一方で、一般的にPIP₂結合タンパク質とPIP₂間の解離定数はピコからサブナノMであることが推測されており、TRPGz-CTDの塩基性アミノ酸残基クラスターにおいても、PIP₂などの酸性脂質と相互作用する解離定数は同程度である可能性がある。興味深いことに、酵母は高浸透圧状態ストレスを与えると、TRPY1を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とともに、各種シグナル伝達カスケードが動き、数分のうちに液胞膜上のPIP₂濃度上昇が引き起こされることが古くから知られている。つまり、TRPGzは液胞膜上のPIP₂濃度変化に応じたチャンネル活性の抑制機構を持ち合わせていることになる。

これらの事実は、TRPGz-CTDが生体内において、ある特定の状態で占有されることなく、会合状態-非会

合状態、PIP₂ 結合状態-非結合状態など、多様な状態を取り得ることを示唆している。TRPGzはTRPGz-CTD中のヘリックスバンドルと塩基性アミノ酸残基クラスターによる多様な機能状態の分子種の存在比のバランスによってチャネル開口制御をしていることになる(図4B)。

おわりに

TRPGzの機能制御領域(CTD)に見られたように、ほかのTRPチャネルの細胞内ドメインについても複数の機能モジュールから成り立っており、ある程度の柔軟性のある構造をもっているのではないかと推測される。これまでTRPチャネルの構造解析を困難にしていた要因としてこのような構造の柔軟性にも一端があるのではないかと推察されるが、逆に生理学的意義を考えると、さまざまな機能モジュールを効率良く機能させることを可能にする柔軟な構造こそが、TRPチャネルが多様な刺激に対する応答性を獲得するために適した構造であると考えられる。

謝辞：本稿で紹介した筆者らの研究は、東北大学大学院工学研究科の魚住信之教授、浜本晋博士、名古屋大学構造生物学センターの甲斐荘正恒教授、宮ノ入洋平博士、武田光広博士、東京電機大学の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。

*This research was originally published in "the Journal of Biological Chemistry". Ihara *et al.*, Molecular bases of multimodal regulation of a fungal transient receptor potential (TRP) channel. *J. Biol. Chem.*, **288**, 15303-15317 (2013). © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

文献

- 1) B. Nilius & G. Owsianik: *Genome Biol.*, **12**, 218 (2011).
- 2) F. H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman & W. A. Catterall: *Pharmacol. Rev.*, **57**, 387 (2005).
- 3) D. J. Cosens & A. Manning: *Nature*, **224**, 285 (1969).
- 4) C. Montell & G. M. Rubin: *Neuron*, **2**, 1313 (1989).
- 5) M. Gees, B. Colsoul & B. Nilius: *Cold Spring Harb. Perspect. in Biol.*, **2**, a003962 (2010).
- 6) D. E. Clapham: *Nature*, **426**, 517 (2003).
- 7) K. Venkatachalam & C. Montell: *Annu. Rev. Biochem.*,

76, 387 (2007).

- 8) T. Numata, D. Kozai, N. Takahashi, K. Kato, Y. Uriu, S. Yamamoto, T. Kaneko, T. Shinmoto & Y. Mori: *Seikagaku*, **81**, 962 (2009).
- 9) A. Szallasi, D. N. Cortright, C. A. Blum & S. R. Eid: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 357 (2007).
- 10) J. Yao, B. Liu & F. Qin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11109 (2011).
- 11) M. Li, Y. Yu & J. Yang: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **704**, 1 (2011).
- 12) J. Kalia & K. J. Swartz: *Sci. Rep.*, **3**, 1523 (2013).
- 13) Liao *et al.*: *Nature*, **504**, 107 (2013).
- 14) Cao *et al.*: *Nature*, **504**, 113 (2013).
- 15) M. Ihara, S. Hamamoto, Y. Miyanoiri, M. Takeda, M. Kainosho, I. Yabe, N. Uozumi & A. Yamashita: *J. Biol. Chem.*, **288**, 15303 (2013).
- 16) C. P. Palmer, X. L. Zhou, J. Lin, S. H. Loukin, C. Kung & Y. Saimi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7801 (2001).
- 17) Z. Su, X. Zhou, S. H. Loukin, Y. Saimi & C. Kung: *J. Membr. Biol.*, **227**, 141 (2009).
- 18) X. L. Zhou, S. H. Loukin, R. Coria, C. Kung & Y. Saimi: *Eur. Biophys. J.*, **34**, 413 (2005).

プロフィール



伊原 誠 (Makoto IHARA)

2005年近畿大学大学院農学研究科博士後期課程修了/同年同大学農学部研究員/2006年理化学研究所放射光科学総合研究センター研究員/2012年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科特任助教/2013年近畿大学農学部応用生命化学科講師<研究テーマと抱負>リガンド開口型イオンチャネルの開口制御<趣味>ジギング(魚釣り), ドライブ, 旅行



山下 敦子 (Atsuko YAMASHITA)

1998年京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了/1998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2003~2005年コロンビア大学博士研究員/2006年理化学研究所放射光科学総合研究センターチームリーダー/2012年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授<研究テーマと抱負>感覚受容の構造生物学<趣味>おいしいチョコレート菓子のスクリーニング