

## 151. 細胞膜の局所性興奮調節機構の構造基盤

藤原 祐一郎

Key words: イオンチャネル, 構造機能相関, 興奮収縮連関, 跳躍伝導, パルミトイル化

大阪大学 大学院医学系研究科  
生理学講座

### 緒言

代表的な興奮性細胞である神経細胞においては、発生した活動電位が軸索上を伝播することにより情報が電氣的に伝達される。活動電位を制御する電位依存性チャネルやポンプは軸索上にランダム広汎に配置するのではなく、軸索起始部やランビエ絞輪といった特定の部位に限局・集積し、活動電位発生・跳躍伝導といった興奮の伝達に有利に配置が制御されていることが知られている。同様に心筋細胞においても、細胞膜上で電位依存性チャネルはギャップ結合分子などと共に介在板、T 細管といった特定の部位に集積し、電氣的膜興奮と心筋収縮の連関に有利に配置している事が知られている。また、網膜視細胞では桿体細胞の外節に環状スクレオチド活性化型チャネルが集積し光受容に伴う活動電位発生のトリガー機能を担っていることが報告されている。

これらのチャネル分子が特定の部位に限局・集積するためには、裏打ち蛋白であるアンキリン G との相互作用が重要であることがこれまでに明らかにされている。アンキリン分子は、自身が脂質修飾（パルミトイル化）を受けることにより細胞膜上の目的の領域にとどまる事が報告されているが、その原子レベルでの機構は明らかでない。近年、種々のイオンチャネル・裏打ち蛋白機能における分子構造基盤が検討されている<sup>1-5)</sup>。本研究は、アンキリン G のパルミトイル化による細胞膜接着機構に対して分子構造の観点から明らかにすることを目的に行われた。

### 方法および結果

#### 1. アンキリン G パルミトイル化領域の結晶構造解析

##### 1) 蛋白質の発現と精製

アンキリン G の N 端は膜結合領域と称され、パルミトイル化修飾を受け細胞膜と接着する。ラットアンキリン G 蛋白質の膜結合領域前半部 (resi. 30-200) に His タグを付加し、大腸菌を用いてリコンビナントに発現させた<sup>4)</sup>。発現させた蛋白質はクロマトグラフィーを用いて高純度に精製し、結晶化実験に用いた。

##### 2) 蛋白質の結晶化と回折実験

結晶化ロボット、結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件の検討を行い<sup>2)</sup>、酸化還元<sup>3)</sup>の2つの結晶化条件を得ることに成功した。

(還元条件) 0.05 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS (pH 6.5), 30% v/v PEG 550 MME

Cryocondition: +20% PEG200

(酸化条件) 0.01 M Magnesium chloride hecahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride (pH 7.5), 1.6 M Ammonium sulfate

Cryocondition: +25% PEG200

作製した2つの蛋白質結晶を用いて、SPring-8 ビームラインにて回折実験を行った。それぞれ、1.62 Å, 1.83 Å の高分解能の回折像が得られた (図 1)。

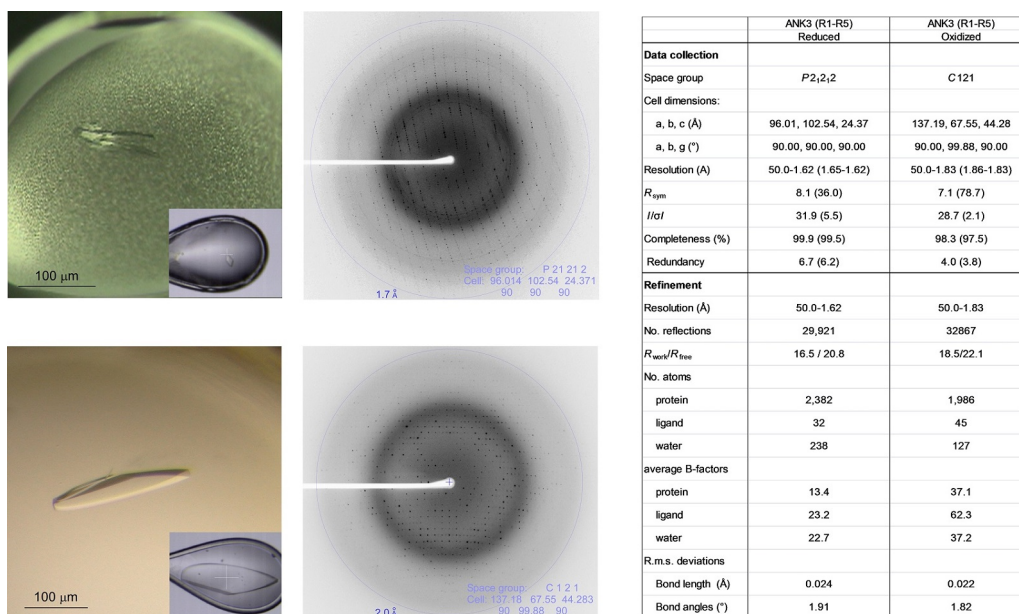


図1. アンキリン G の結晶と回折実験.

還元状態（上段），酸化状態（下段）の蛋白質結晶と回折像，回折データと精密化の詳細（右）.

### 3) 構造解析

分子置換法により構造を解き，精密化を行い最終的な構造を決定した.

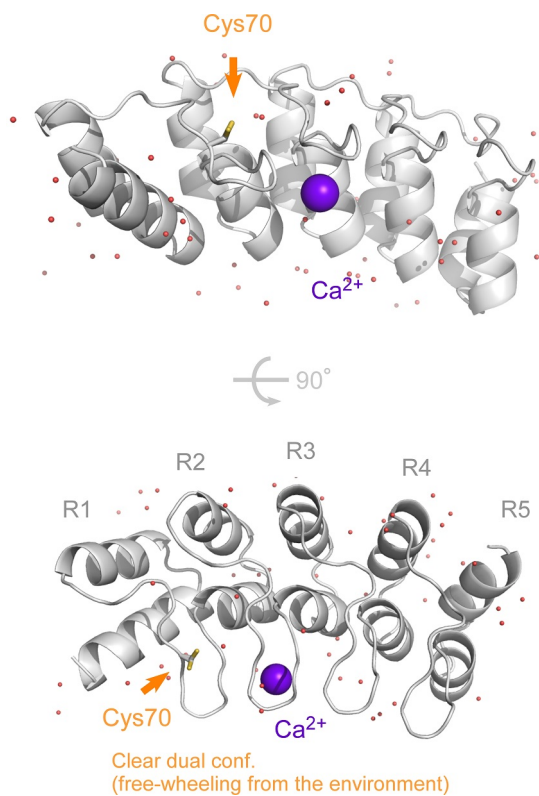


図2. アンキリン G 細胞膜接着領域の結晶構造（還元状態）.

還元状態の構造は 33 残基の繰り返し配列からなるアンキリンリピートが 5 個連なった状態を呈していた。パルミトイル化修飾を受けるシステイン残基は蛋白質表面に位置し、その側鎖は二つのコンフォメーションを取り自由度が高いことが示唆された。パルミトイル化修飾構造基部の裏側には  $\text{Ca}^{2+}$  が結合しており、生理機能との関連が示唆される (図 2)。

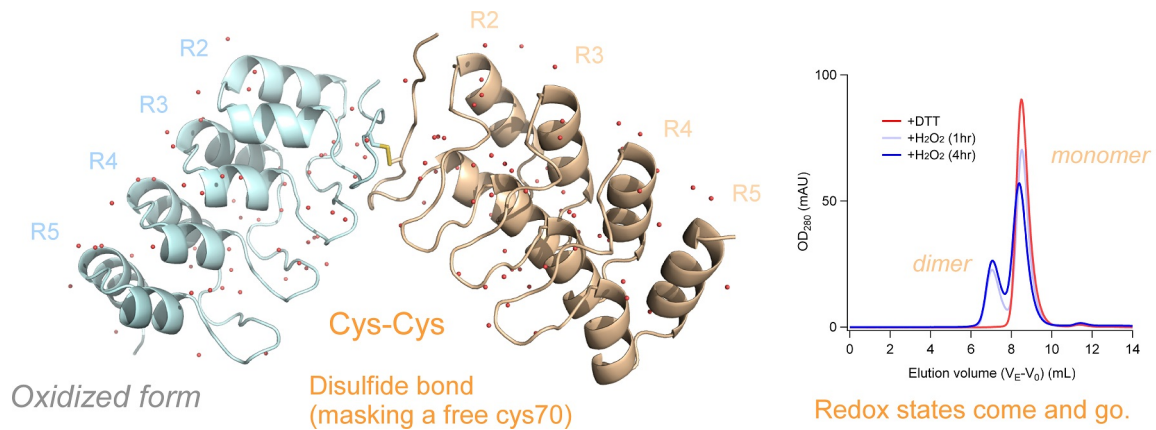


図 3. アンキリン G 細胞膜接着領域の結晶構造 (酸化状態) とゲル濾過分子量アッセイ。

酸化状態の構造は 2 つのアンキリン G がジスルフィド結合により結合した状態を呈していた (図 3)。パルミトイル化修飾を受けるシステイン残基が結合に使われ、酸化状態ではパルミトイル化が生じない事が示された。最初のアンキリンリピートの構造はほどけていた。この酸化還元 2 状態の遷移は水溶液中でも起こることを、ゲル濾過分子量アッセイにて確認した (図 3)。

## 2. パルミトイル化アンキリン G の細胞膜接着機構の分子動力学的解析

アンキリン G (palmitoylated), アンキリン G (non-palmitoylated), アンキリン G (dimer, oxidized) の結晶構造を用いて分子動力学計算を行った。本研究では、 $1 \mu\text{s}$  のシミュレーションを 100 本以上実行する。コンピュータの計算負担を軽減するため粗視化シミュレーションを用いて計算を行った (図 4-6)。

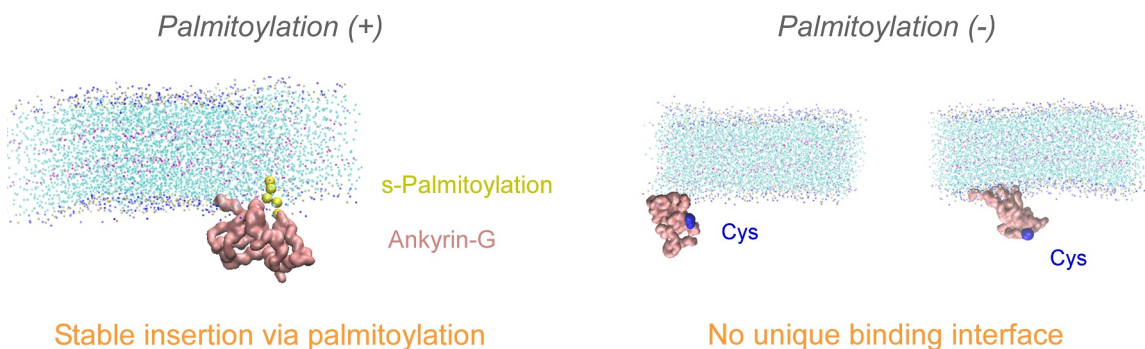


図 4. MD シミュレーション (Palmitoylated vs Non-palmitoylated)。

パルミトイル化により膜との安定な接着面が形成される。パルミトイル化修飾が無い状態であっても膜へ近づくと安定接着が生じない。

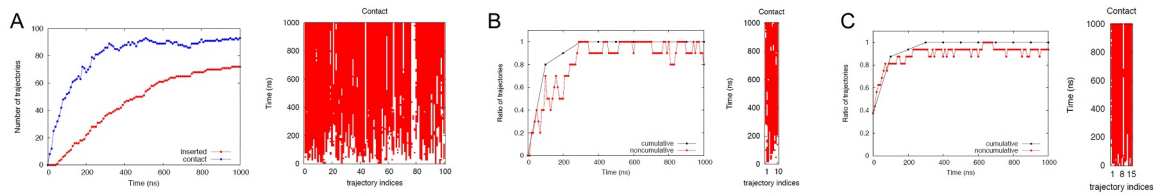


図5. 膜とのインターラクション.

A) アンキリン G (palmitoylated) は接着離脱を繰り返しながら最終的には 100 本中 72 本のシミュレーションでパルミトイル化により膜に安定接着した. B) アンキリン G (non-palmitoylated) は接着離脱を繰り返すのみで、安定接着は生じない. C) アンキリン G (dimer, oxidized) もアンキリン G (non-palmitoylated) と同様に接着離脱を繰り返すのみで、安定接着は生じない.

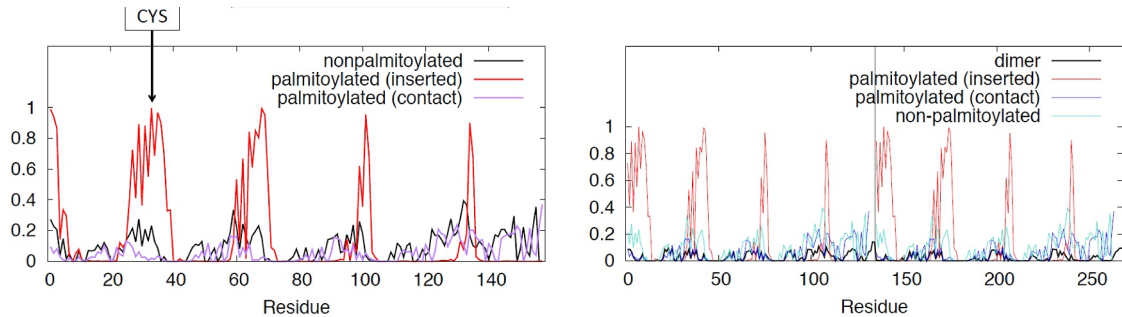


図6. 膜との相互作用残基.

左) パルミトイル化による膜との安定接着により、アンキリン G (palmitoylated) では、膜と相互作用する残基のピークが観測された. 右) アンキリン G (non-palmitoylated) とアンキリン G (dimer, oxidized) は相互作用する残基のピークが観測されずランダムに膜と接着離脱を繰り返す.

## 考 察

本研究により、アンキリン G が細胞膜に安定接着するためにはパルミトイル化が重要な役割を担うことが明らかになった<sup>6)</sup>. アンキリン G はパルミトイル化修飾を受けてない状態でも細胞膜直下に滞在し、いつでもパルミトイル化を受け膜へ接着できる準備状態にあることが示唆された. 構造解析から明らかになった  $\text{Ca}^{2+}$  や酸化還元状態に依存した修飾機構が、実際の細胞におけるイオンチャネルの局在にどのような影響をもたらすかを検討することが今後の課題となるであろう.

## 共同研究者

本研究を遂行する過程で、共同研究者として東北大学大学院・情報科学研究科の近藤寛子、城田松之および木下賢吾が参画し、分子動力学的解析を遂行した.

## 文 献

- 1) Fujiwara, Y., Kurokawa, T. & Okamura, Y. : Long  $\alpha$ -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated  $\text{H}^+$  channel. *J. Gen. Physiol.*, **143** : 377-386, 2014.
- 2) Takeshita, K., Sakata, S., Yamashita, E., Fujiwara, Y., Kawanabe, A., Kurokawa, T., Okochi, Y., Matsuda, M., Narita, H., Okamura, Y. & Nakagawa, A. : X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21** : 352-357, 2014.

- 3) Fujiwara, Y. & Okamura, Y. : Temperature sensitive gating of voltage-gated proton channel. *Curr. Top. Membranes*, **74** : 259-292, 2014.
- 4) Fujiwara, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A. & Okamura, Y. : Structural characteristics of the redox sensing coiled-coil in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.*, **288** : 17968-17975, 2013.
- 5) Fujiwara, Y., Kurokawa, T., Takeshita, K., Nakagawa, A., Larsson, H. P. & Okamura, Y. : The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel Hv1. *J. Physiol.*, **591** : 627-640, 2013.
- 6) Fujiwara, Y., Shirota, M., Kobayashi, M., Takeshita, K., Nakagawa, A., Kinoshita, K. & Okamura, Y. : Structural basis for the membrane association of ankyrinG: the ion channel anchoring protein. *Neuroscience 2014* (Abstract of the papers of the 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama) : P2-014, 2014.