P2X受容体の構造とATP依存的な
チャンネル活性化機構

服部素之 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 / 科学技術振興機構さきがけ

1. はじめに

ATP は、細胞内におけるエネルギー源として代謝、生合成系など多様な生命現象において非常に大きな役割を果たしている。その一方で、イオンチャンネル型の P2X 受容体と G タンパク質共役型の P2Y 受容体という 2 種類の細胞外 ATP 受容体が約 20 年前に分子クローニングされ^{1),2)}、それ以後、細胞外におけるシグナル分子としての ATP の機能に大きな注目が集まっている。

P2X 受容体は、細胞外 ATP により活性化される非選択性陽イオンチャンネルである。P2X 受容体ファミリーはそのアミノ酸配列に基づき、7 つのサブタイプに分類されると共に生体における幅広い発現に伴い、筋肉収縮、神経疼痛、味覚、炎症反応など、多様な生命現象において重要な役割を果たしている³⁾。しかしながら、構造解析が困難とされる真核生物特有の膜タンパク質であることから、その高分解能立体構造情報としては、近年までゼブラフィッシュ由来 P2X₄ 受容体のアポ型閉状態の構造が決定されているのみであった⁴⁾。そのため、P2X 受容体による ATP 認識機構や ATP 依存的なチャンネル活性化機構の理解に必要な ATP 結合型の詳細な立体構造はこれまでに明らかになっていなかった。

2. ATP 結合型開状態の P2X 受容体の X 線結晶構造

ATP 結合型 P2X 受容体の立体構造を解明すべく、ゼブラフィッシュ由来 P2X₄ 受容体に複数の変異導入およびその変異体の結晶化を行い、ATP 存在下において得られた結晶を用いて、2.8 Å 分解能の X 線回折像を得た。変異導入のうち特に C 末端 24 残基の欠失変異はクリスタルパッキングの改善に大きく寄与した。この回折データおよび既知のアポ型閉状態の P2X 受容体の結晶構造を用いた分子置換法により構造決定を行った⁵⁾。この際、結晶化に用いた発現系の電気生理学的な解析により、この発現系が P2X₄ 受容体として

の ATP 依存的なチャンネル活性を保持していることを合わせて確認した。結晶化の促進を目的とした変異導入は一般的に用いられているが、変異導入による機能の欠失が生理条件を反映しない立体構造決定につながる可能性があるため、結晶化に先立って発現系の機能評価は構造解析、特に膜タンパク質の構造解析では常に留意したい。

P2X₄ 受容体は、可溶性の細胞外ドメインと合計 6 回の膜貫通ヘリックスを含む膜貫通ドメインから構成され、ホモ 3 量体を形成している (図 1a)。また、3 量体を形成する各サブユニットは、イルカを模したような形をしており (図 1b)、以後の立体構造の説明には適宜このイルカモデルを用いる。

ATP 存在下において構造決定された P2X₄ 受容体ホモ 3 量体の構造中では、各サブユニットに ATP が 1 分子ずつ結合しており (図 1a)、P2X 受容体 3 量体に対して合計 3 つの等価な ATP 結合部位が同定された。この ATP 結合部位は、隣り合うサブユニット A, B における Body ドメインから主に形成され、膜貫通ドメインから約 40 Å 程度と大きく離れていた (図 1)。

また、アポ型の P2X 受容体の立体構造では、膜貫通ドメインにおけるイオン透過孔はせまく閉じていたのに対し、今回の ATP 結合型の P2X 受容体の構造中では、部分的に水和したイオン透過が可能で 7 Å 程度の直径にまで大きく開いた形状となっていた (図 1c)。

さらには、本結晶構造から示唆された ATP 認識やイオン透過に関わる残基は過去の変異体解析の結果ともよく一致しており^{6),7)}、今回決定した ATP 存在下における P2X 受容体の立体構造は、イオンチャンネル型細胞外 ATP 受容体である P2X 受容体の ATP 結合型開状態、つまり活性化状態を反映したものであると考えられた。

3. チャンネル活性化機構

今回解析した ATP 結合型開状態および既知のアポ

Structure and ATP-dependent Gating Mechanism of P2X Receptors
Motoyuki HATTORI

Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo / JST PRESTO

※図 1 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

型閉状態のそれぞれのサブユニット構造の重ね合わせから、ATP 結合部位および膜貫通ドメインにおいて有意な構造変化がみられた (図 1b). これら構造変化に基づき、P2X 受容体のチャネル活性化機構を議論する。

ATP 結合部位は、隣りあうサブユニット A, B における Body ドメインから形成されると共に、Head ドメイン (A), Dorsal Fin (B) および Left Flipper (A) によって囲まれている (図 1b, d). ATP 結合の際、Head ドメインおよび Dorsal fin が互いに近づくように構造変化するのに対し、Left Flipper は、ATP 結合部位から押し出されるような構造変化を示す。さらに、Left Flipper (A) および Dorsal Fin (B) に起こるこの構造変化は、

これらのドメインとつながる両サブユニットの β シートから構成される Body ドメインが外側へ大きく広がるような動きへとつながっていく (図 1d).

この ATP 依存的な Body ドメインの拡大は、このドメインと膜貫通ドメインとの構造的な共役から、膜貫通ドメインにおけるイオン透過孔の拡大へとつながり、チャネルの開状態から閉状態への構造変化、つまり、チャネルの活性化を引き起こす (図 1d).

興味深いことに、P2X 受容体においてみられるような「リガンド結合が β シートから構成される細胞外ドメインのコア領域の拡大を引き起こし、 β シート領域と膜貫通ドメインの構造的共役に基づき、膜貫通ドメインにおけるイオン透過孔の開閉へとつながる」といったチャネル開閉機構が、進化的には異なる起源を持つ 3 量体チャネルであるプロトン感受性 Na^+ チャネル ASIC においてもみられることがごく最近報告されている⁸⁾.

本研究では、P2X 受容体の立体構造に基づき、ATP 依存的なチャネル活性化機構を提唱した。これらの知見は、細胞外 ATP シグナル伝達の開始を保証する分子機構の理解を大きく進展させるものであるといえるだろう。

謝 辞

本研究はオレゴン健康科学大学の Eric Gouaux 博士の指導の下で行われました。この場を借りて深く感謝いたします。また、本稿の執筆にあたり有益なコメントを頂いた濡木研究室大学院生の加藤英明さんに感謝いたします。

文 献

- Webb, T. E. *et al.* (1993) FEBS Lett. **324**, 219-225.
- Valera, S. *et al.* (1994) Nature **371**, 516-519.
- Surprenant, A., North, R. A. (2009) Annu. Rev. Physiol. **71**, 333-359.
- Kawate, T. *et al.* (2009) Nature **460**, 592-598.
- Hattori, M., Gouaux, E. (2012) Nature **485**, 207-212.
- Jiang, L. H. *et al.* (2000) J. Biol. Chem. **275**, 34190-34196.
- Li, M. *et al.* (2008) Nat. Neurosci. **11**, 883-887.
- Baconguis, I., Gouaux, E. (2012) Nature **489**, 400-405.

図 1 ATP 結合型開状態における P2X4 受容体の結晶構造とチャネル活性化機構. (a) ATP 結合型 P2X4 受容体 3 量体構造. (b) イルカモデルに基づき着色されたサブユニット構造. ATP 結合型の 3 量体の構造とアポ型の 3 量体の構造を重ね合わせた際のアポ型の構造の単一サブユニットも灰色で示した. (c) 細胞内側からみた膜貫通ドメインの 3 量体構造. (d) チャネル活性化機構の模式図.

服部素之 (はっとり もとゆき)

東京大学大学院理学系研究科特任助教・JST さきがけ研究者 (兼任)

2009 年東京工業大学生命理工学研究科博士課程修了。13 年より現職。

研究内容: 膜輸送体の構造生命科学

連絡先: 〒113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16

E-mail: mhattori@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

服部素之