

# 分子シグナリング研究チーム

## Molecular Signaling Research Team

チームリーダー 山下 敦子

YAMASHITA, Atsuko

視覚・聴覚・触覚・味覚・嗅覚などの「感覚」は、環境や異なる個体から受け取ったさまざまな情報を変換、統合、認知、処理するという生物にとって重要な機能である。当研究チームでは、感覚受容の第一段階、すなわち外界からのシグナルを受容しそれを生体内で伝達されるシグナルに変換するまでの過程に焦点をあて、それらに携わるタンパク質の構造を知ることにより、その分子メカニズムを明らかにすることを目標として研究を行っている。具体的には、感覚受容体やその後のシグナル伝達に関わるタンパク質・イオンチャネルなどを対象に、SPRING-8 を利用した X 線結晶構造解析を中心とした立体構造解析、および生化学的・生理学的手法を用いた機能解析を平行して行い、得られた知見を統合して感覚受容のしくみを理解することを目指している。

### 1. 感覚受容体の構造・機能解析

感覚受容、すなわち「我々は外界をどのように認識するのか」という問題に対し分子レベルでアプローチする上で極めて重要な第一歩となるのが、外界からの刺激を受容する最前線の感覚受容体タンパク質が、ある化学物質をいかに認識するか、機械刺激にいかに対応するかというメカニズムを理解することである。そこで、本年度発足した当研究チームの第一の研究課題として、感覚受容体の構造・機能研究を開始した。具体的には、化学刺激に対する受容体の代表として味覚受容体、機械刺激に対する受容体の代表として浸透圧受容体、の 2 種の受容体の結晶構造解明を目指した立体構造研究に着手した。

感覚受容体は、我々ヒトにおける言語（音声）受容や昆虫におけるフェロモン受容など、生物の個体間の情報伝達に重要な役割を果たしている。これまで生体内（細胞間や細胞内）での情報伝達については分子のレベルからのアプローチがなされてきたが、感覚受容体研究は、個体間の情報伝達のメカニズムを分子レベルで考える第一歩となると考える。さらに、感覚受容体の類似の受容体タンパク質が生体内での細胞間の情報伝達にも使われているため、感覚受容体研究で得られる知見は、生体内外を含めたタンパク質による情報認識・伝達の分子機構解明へ重要な知見になると考える。

#### (1) 味覚受容体の構造・機能解析（芦川、山下）

味覚受容体である甘味受容体および旨味受容体は、舌上および口腔内の味蕾にある味細胞の細胞膜に存在する膜タンパク質であり、G タンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属するタンパク質群である。これらの受容体は、T1R ファミリーと呼ばれる 3 種類のタンパク質(T1R1, T1R2, T1R3) がヘテロ二量体を構成して機能しており、T1R1/T1R3 二量体が旨味受容を、T1R2/T1R3 二量体が甘味受容を担っている。またこれらの分子には細胞外ドメインが存在し、多くの味物質の結合・認識部位となっている。これら甘味・旨味受容体について、結晶構造解析を目指した発現条件の検討に着手した。まず、ヒトおよびマウス由来で種々の発現長（全長、細胞外ドメインなど）を持つ T1R の発現スクリーニング用のベクターを構築した。また、大腸菌を用いた発現系で、宿主や培養条件などを様々に変え、

発現条件の検討に着手した。本年度探索した限りにおいては、残念ながら期待する発現長、フォールディングおよび発現量で受容体が発現する条件を見いだすことができなかったため、今後引き続き検討を行う。

#### (2) 浸透圧受容体ホモログの構造・機能解析（伊原、山下）

近年いくつかの酵母から、液胞膜に存在し浸透圧依存的にチャネルを開いて陽イオンを透過させる浸透圧受容体が見いだされている。この受容体について、結晶構造解析を目指した発現条件の検討に着手した。まず、データベース検索を行い、報告されている受容体と相同性を持つ酵母および真菌由来のタンパク質をいくつか新たに見いだした。このうち、5 種のホモログタンパク質の遺伝子について、酵母および真菌からクローニングを行った。浸透圧受容体として機能が同定されている 3 種を含め、これら合計 8 種の遺伝子の発現スクリーニング用のベクターを構築し、大腸菌を用いて発現条件の検討を行った。これらの受容体あるいは受容体ホモログタンパク質を発現させた大腸菌は強い増殖阻害が観察されたが、発現条件の検討により、ある程度の細胞増殖を示しタンパク質発現が見られる条件を確立することができた。その結果、これらの受容体は非常に不安定で全長での発現はほとんど得られなかったが、あるホモログについては、細胞内ドメインと見られる部分領域を安定かつ多量に発現できることを見いだした。得られた領域は溶液中で単分散状態を示し、結晶構造解析の対象として有望であると考えられる。

### 2. 感覚受容細胞内シグナル伝達に関わる分子の構造・機能解析（山下）

感覚受容細胞における外界からの刺激の受容機構を理解するには、感覚受容体分子そのものの理解に加え、それらの受容体を制御するタンパク質や、受容体からの情報伝達を担うシグナル伝達タンパク質などの機能メカニズムを知ること重要である。本年度は機械刺激受容体制御タンパク質について、データベース検索を行い、いくつかの高度好熱菌由来のホモログタンパク質の存在を見いだした。その中から、6 種の遺伝子のクローニングを行い、発現スクリーニング用のベクター構築を行うなど、構造・機能解析に向けた準備作業を行った。

---

“Sense”, such as vision, audition, touch, gustation, and olfaction, is an important function for living organisms to receive, transduce, integrate, recognize and process a wide array of information from environment. In this research team, we focus on the first step of sensing through signal reception from environment to signal transduction and transfer in a cell. We aim to elucidate molecular mechanisms of this process by knowing structures of involving proteins. The pivot of our study is structural analysis of sensory receptors, signaling proteins, and ion channels by X-ray crystallography using SPring-8 beamlines. We also carry out functional analysis of these proteins with biochemical and physiological approaches. The object of this team is to understand the sensing mechanisms by integrating the structural and functional information.

### 1. Structural and functional analyses of sensory receptors:

In order for the first step of a molecular-level approach on a question how we recognize environments, it is indispensable to know mechanisms how sensory receptors at the front line toward environments recognize chemical substances or response upon mechanical stimuli. In this first year of our research team, we started structural and functional studies of sensory receptors as our first and primary research project. Our current targets are taste receptors, as a representative of chemoreceptors, and an osmosensor protein, as a representative of mechanoreceptors.

Sensory receptors play key roles for receiving information from environment, and thus enable signaling between individuals, such by human verbal communication and insect pheromonal communication. Although analyses of proteins responsible for signaling inside and between cells in our bodies have so far preceded in the research field of molecular biology and biochemistry, molecular analyses of sensory receptors might serve as the first step for understanding of signaling between individuals at molecular level. Furthermore, members of the same protein families of sensory receptors also function as receptors for various intercellular signaling substances, such as hormones, cytokines, and neurotransmitters. Structural studies on sensory receptors thus might provide significant basis to address mechanisms how proteins recognize and transduce information both from outside and inside of our bodies.

#### (1) Taste receptors.

Taste receptors are membrane proteins existing in taste buds on tongues and oral cavities. Among those, sweet and umami taste receptors belong to the G-protein coupled receptor family. They function as heterodimers consisting of the T1R family proteins; umami taste receptors of T1R1/T1R3, whereas those for sweet consist of T1R2/T1R3. These proteins possess extracellular domains responsible for binding and recognition of many taste substances. In this year, we started to explore conditions for expression of these receptors toward crystallographic studies. In the first, we constructed vectors of T1R proteins for expression screening using human- and mouse-derived genes with various kind of lengths (such as for full length, extra cellular domains, etc.). We then began to screen expression conditions using *E. coli* expression systems by changing host cells and culture conditions. Among we tested, we have unfortunately not found appropriate conditions for expression in the aspect of molecular weight, folding, and amount of expressed proteins. Thus we are going to continue screening of expression condition.

#### (2) Osmosensor proteins.

Recently presence of cation permeable channel proteins which are located at vacuole membranes and response to osmotic force has been reported in several yeasts. We started to explore conditions for expression of these osmosensor proteins toward crystallographic studies. In the first, we carried out a database search and newly found several proteins homologous to the receptors from yeasts and fungus. Among them, we cloned 5 different genes from yeast and fungus sources. We then constructed vectors of 8 genes, including three already identified their functions, for expression screening, and started to explore expression conditions using *E. coli* systems. Although *E. coli* cells showed strong growth inhibition upon expression of these receptors and receptor homologs, we successfully found out a condition enabling moderate cell growth and protein expression. As a result, we found that a cytoplasmic region from one homolog protein showed stable and high expression, though expression of full length receptor proteins were hardly observed among all tested proteins. The region showed monodispersity in solution and is thus expected to be a promising candidate for a crystallographic study.

### 2. Structural and functional analyses of signaling proteins in sensory cells

In order to understand mechanisms of reception of environmental stimuli by sensory cells, it is indispensable to know functional mechanisms of proteins responsible for regulation and downstream signaling of sensory receptors, as well as those of the receptors themselves. In this year, we started preparation toward structural and functional analyses of those proteins. In the first, we carried out a database search and found several proteins homologous to a regulatory protein for mechanosensor proteins from hyperthermophilic bacteria. Among them, we cloned 6 different genes and constructed vectors for expression screening.

---

## Staff

### Head

Dr. Atsuko YAMASHITA

### Members

Dr. Yuji ASHIKAWA

Dr. Makoto IHARA

---

## 誌 上 発 表 Publications

### [ 雑誌 ]

( 原著論文 ) \* 印は査読制度がある論文誌

Narita A., Takeda S., Yamashita A., and Maéda Y.: "Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study", EMBO J. 25, 5626-5633 (2006). \*

### ( 総説 )

山下 敦子: "トランスポーターの立体構造と機能", 22, 実験医学 24, No. 17, pp.2576-2582 (2006).

山下 敦子, 岩田 想: "既存の説を「ひっくり返した」輸送

体の構造", 実験医学 25, No. 4, pp.494--495 (2007).

#### 口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Yamashita A., Singh S. K., Kawate T., Jin Y., and Gouaux E.: "Crystal structure of a bacterial homolog of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Naha, Nov. (2006).

(国内会議)

山下 敦子: "細菌由来ホモログの結晶構造から探るNa<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質トランスポーターの構造と機能", 第16回細胞電気薬理研究会, 横浜, 3月 (2006).

山下 敦子: "X線結晶構造解析で知るタンパク質のはたらくしくみ", 第15回理化学研究所里庄セミナー, 岡山県里庄町, 8月 (2006).

山下 敦子: "Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの構造・機能解析", 第44回慶応義塾大学総合医科学研究センターセミナー, 東京, 8月 (2006).

山下 敦子: "Crystallographic and functional studies of a bacterial homolog of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependent neurotransmitter transporters", 自然科学研究機構分子科学研究所ナノフォーラム「New Cutting Edge and Perspective of Structural Biology」, 岡崎, 10月 (2006).

山下 敦子: "Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの構造と機能", 平成18年度生理学研究所シナプス研究会「シナプス形成と可塑性機考得の統合的理解へ向けた学際的アプローチ」, 岡崎, 11月 (2006).

成田 哲博, 武田 修一, 山下 敦子, 前田 雄一郎: "Determination of actin filament end structure by cryo electron microscopy", 日本分子生物学会2006フォーラム「分子生物学の未来」, 名古屋, 12月 (2006).