

# 神経機能素子研究部門

Division of Biophysics and Neurobiology

## 「我々の研究目標」

### 1. 生物物理学的観点から

イオンチャネル、受容体等の膜機能蛋白の  
分子機能のメカニズムと動的構造機能連関についての研究

### 2. 神経科学的観点から

各素子の特性の機能的意義を知るための  
脳スライスレベル、個体レベルでの研究

## 対象

イオンチャネル  
受容体  
G蛋白質

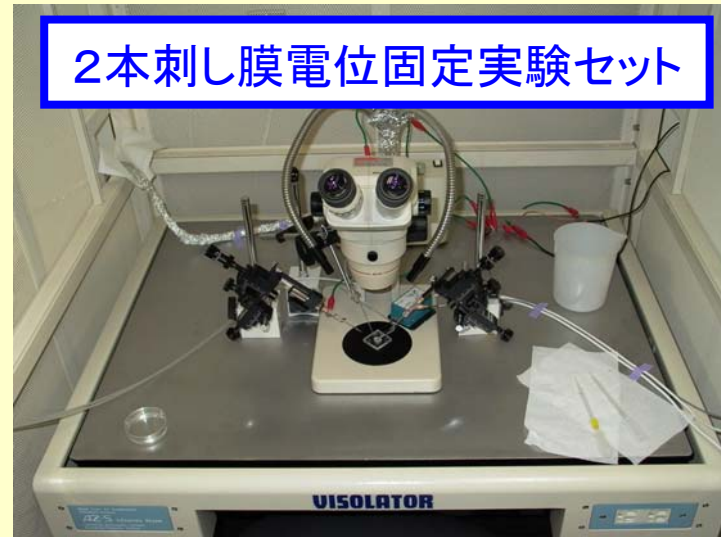
## 観点

分子機能  
構造機能連関  
動的構造変化  
生理的意義

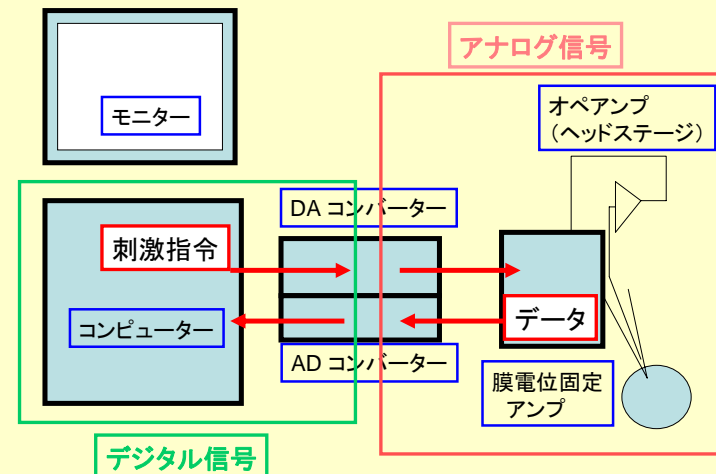
## 方法論

分子生物学	遺伝子操作
電気生理学	構造生物学
光学生理学	
細胞生物学	

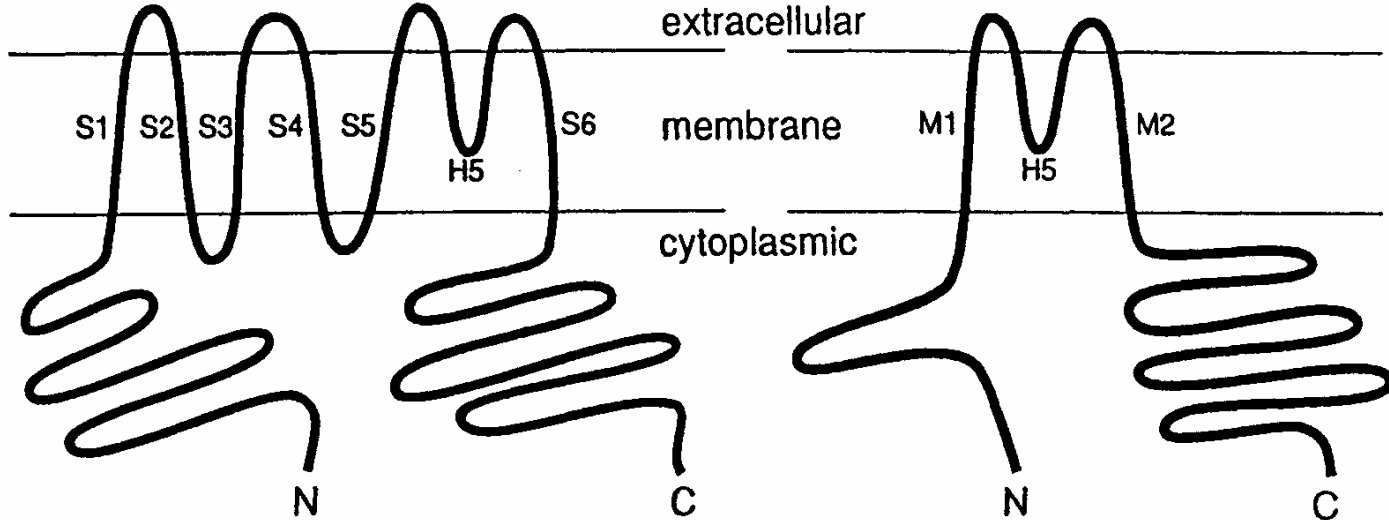
# ツメガエル卵母細胞を発現系として用いた イオンチャネル・受容体の機能解析



## 電気記録系

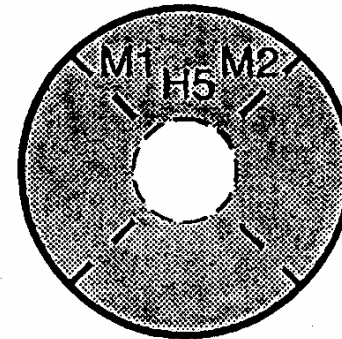
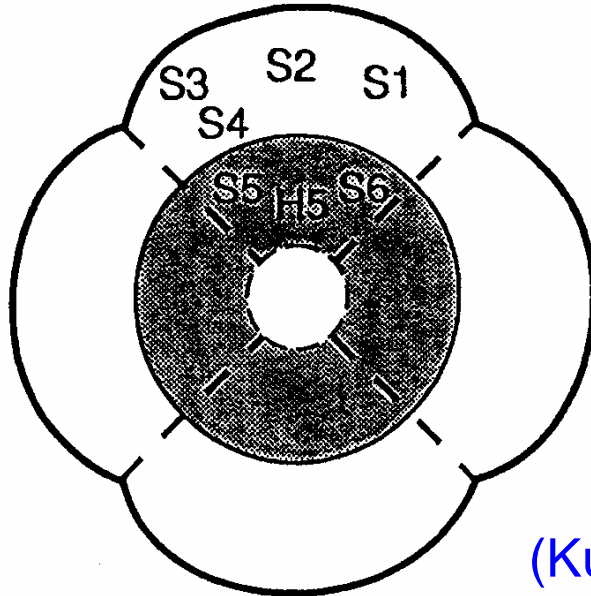


内向き整流性 K<sup>+</sup> チャネルの cDNA を世界で最初にクローン化した。



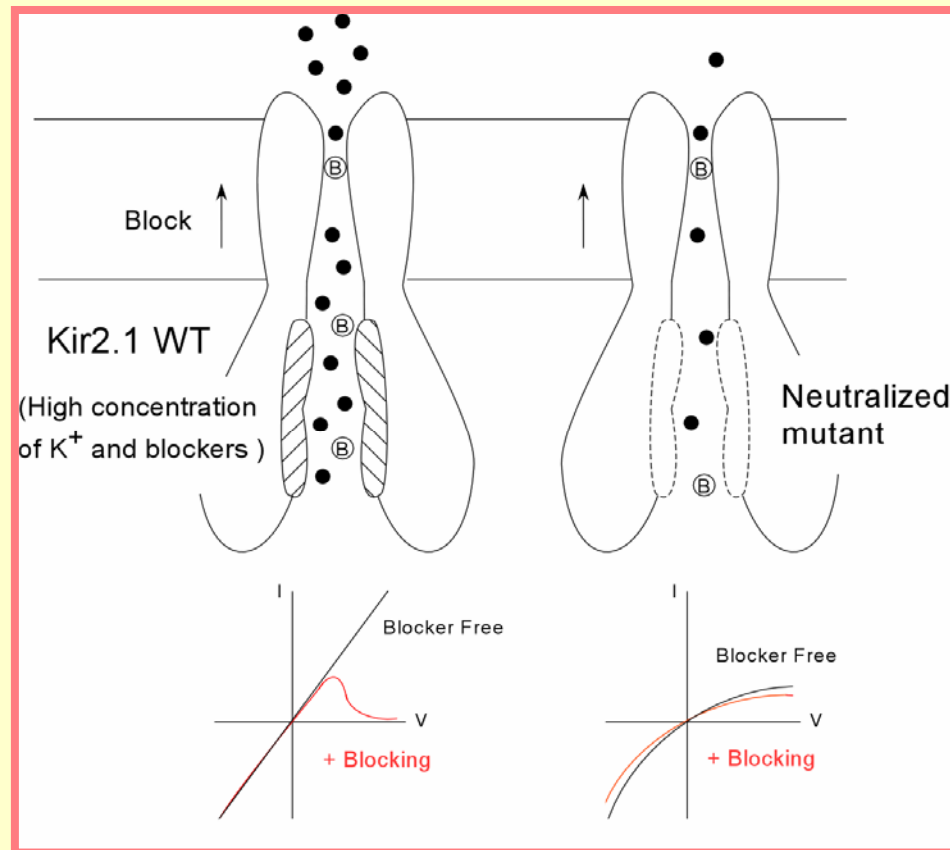
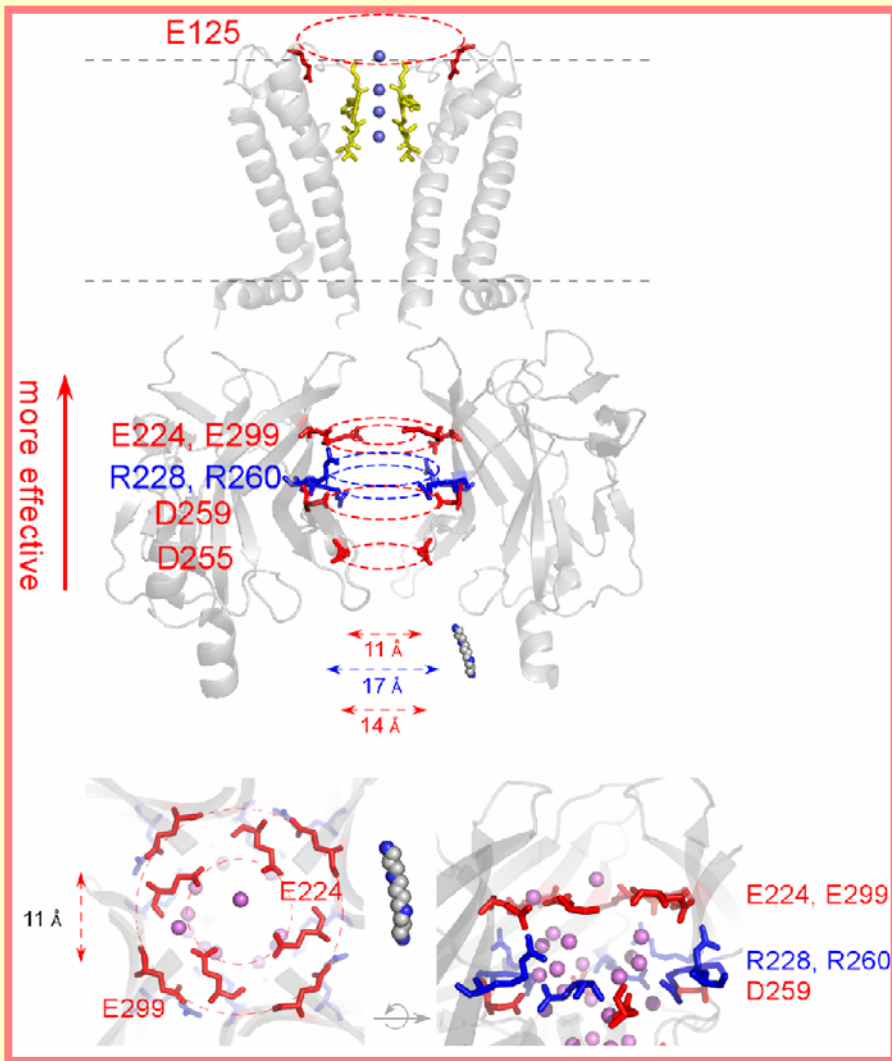
膜電位依存性 K<sup>+</sup> チャネル

内向き整流性 K<sup>+</sup> チャネル



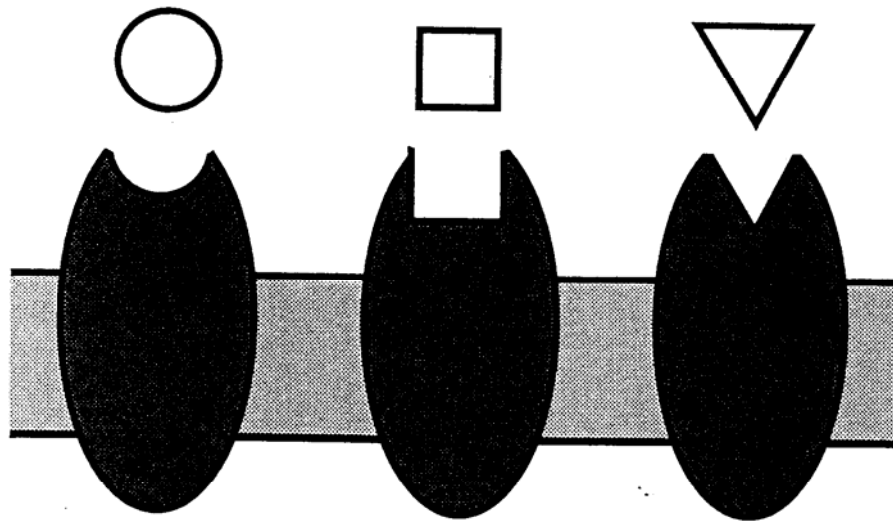
(Kubo et al., Nature 1993a,1993b)

# 内向き整流性 K<sup>+</sup> チャンネルの 整流性の分子基盤を明らかにした。



代謝型グルタミン酸受容体がグルタミン酸のみならず、  
細胞外の多価陽イオンによっても活性化されることを見いだした。

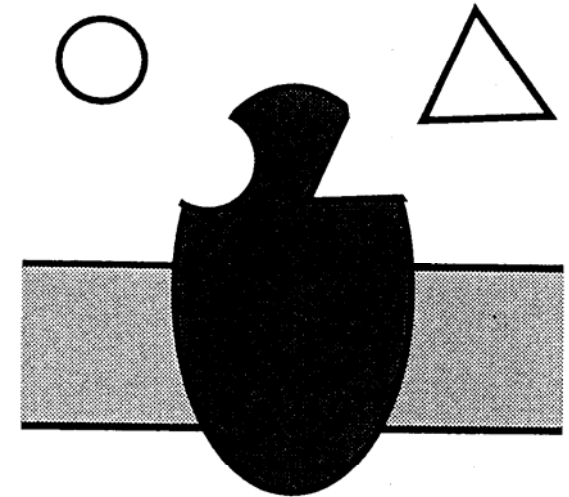
standard



???

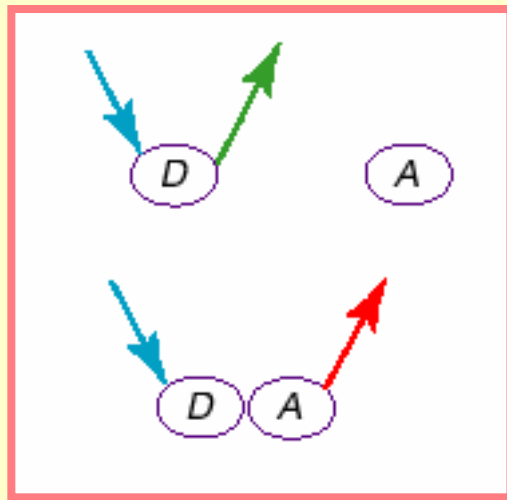
多価陽イオン

グルタミン酸

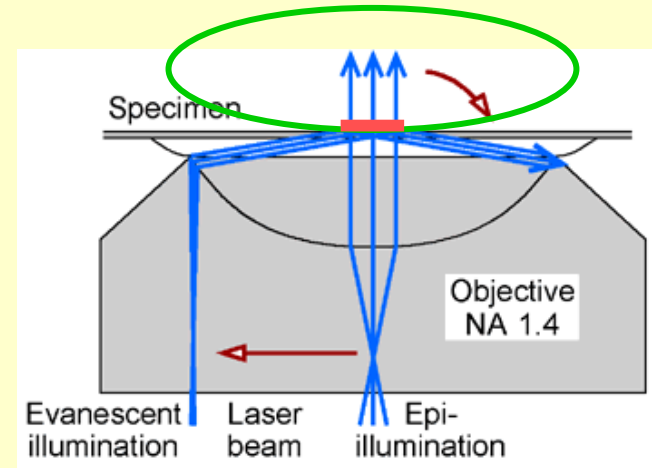


代謝型グルタミン酸受容体

# イオンチャネル・受容体の動的構造変化の FRET 法による光学的解析



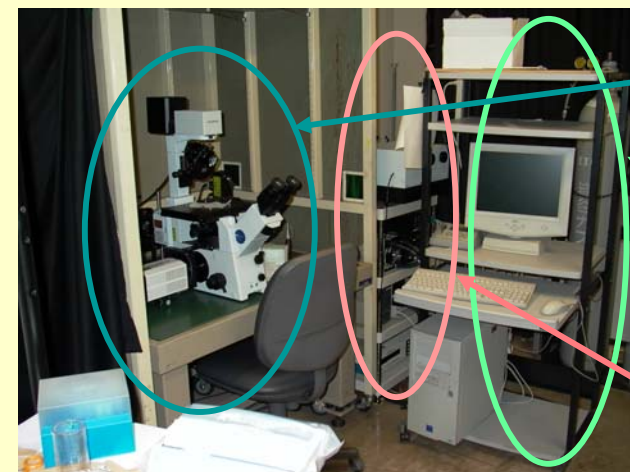
## 全反射照明顕微鏡



(オリンパス)

by (遺伝研 徳永先生)

## TIRF-FRET 実験セット



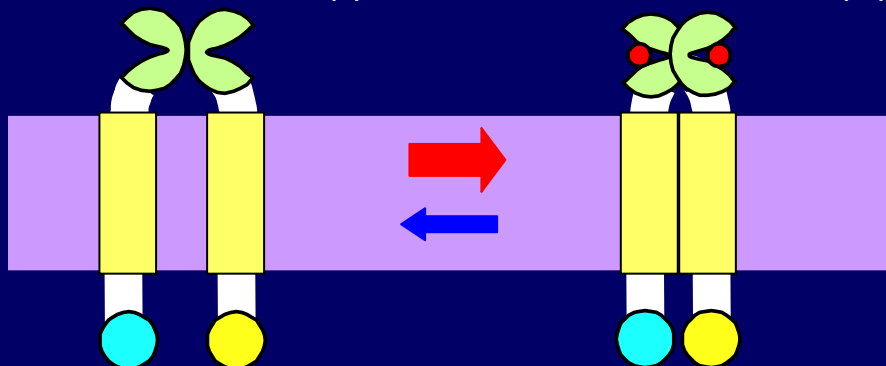
顕微鏡と  
カメラ

コンピューター

レーザー  
光源 2本  
と  
切換装置

グルタミン酸 (-)

グルタミン酸 (+)



FRET 効率

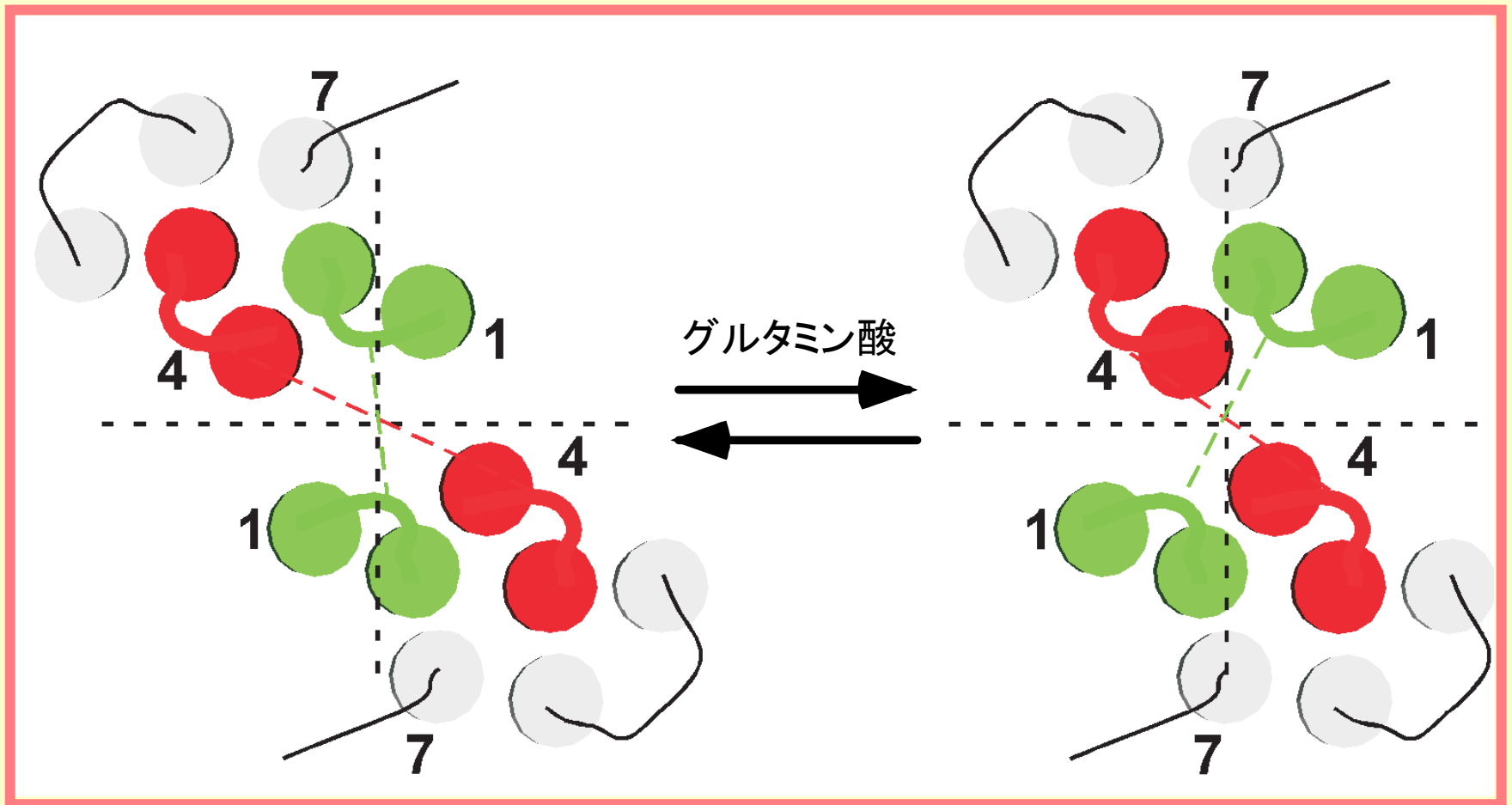
<

FRET 効率 ?

代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化を、  
光学的手法 FRETにより捕らえた。

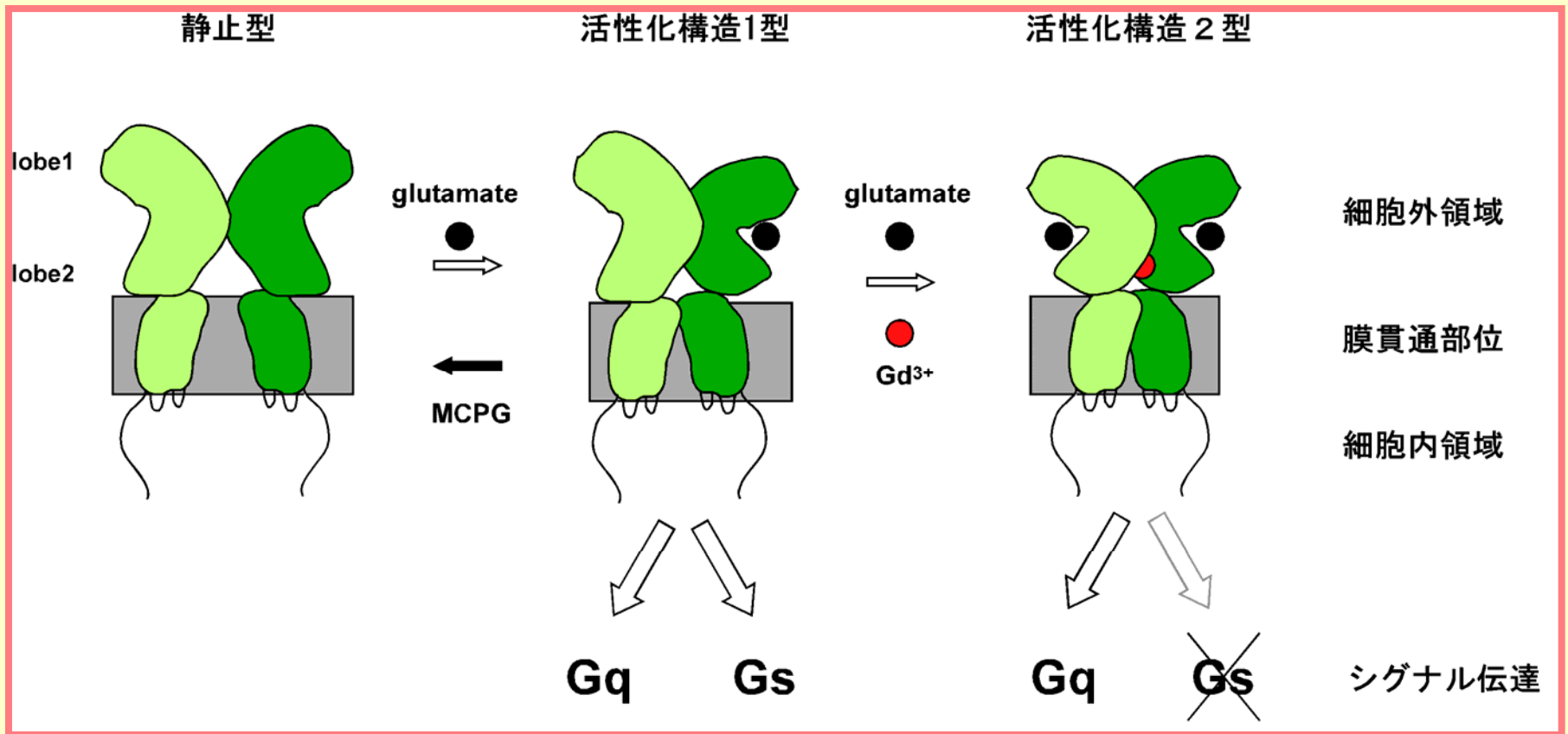
静止状態

活性化状態



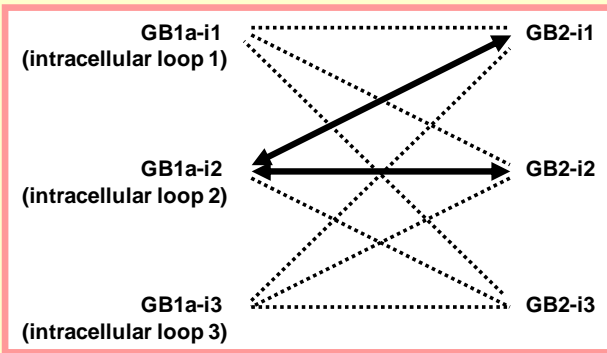


代謝型グルタミン酸受容体が「刺激の種類によって出力を変える」  
マルチパス切り換え器であることを見いだした。

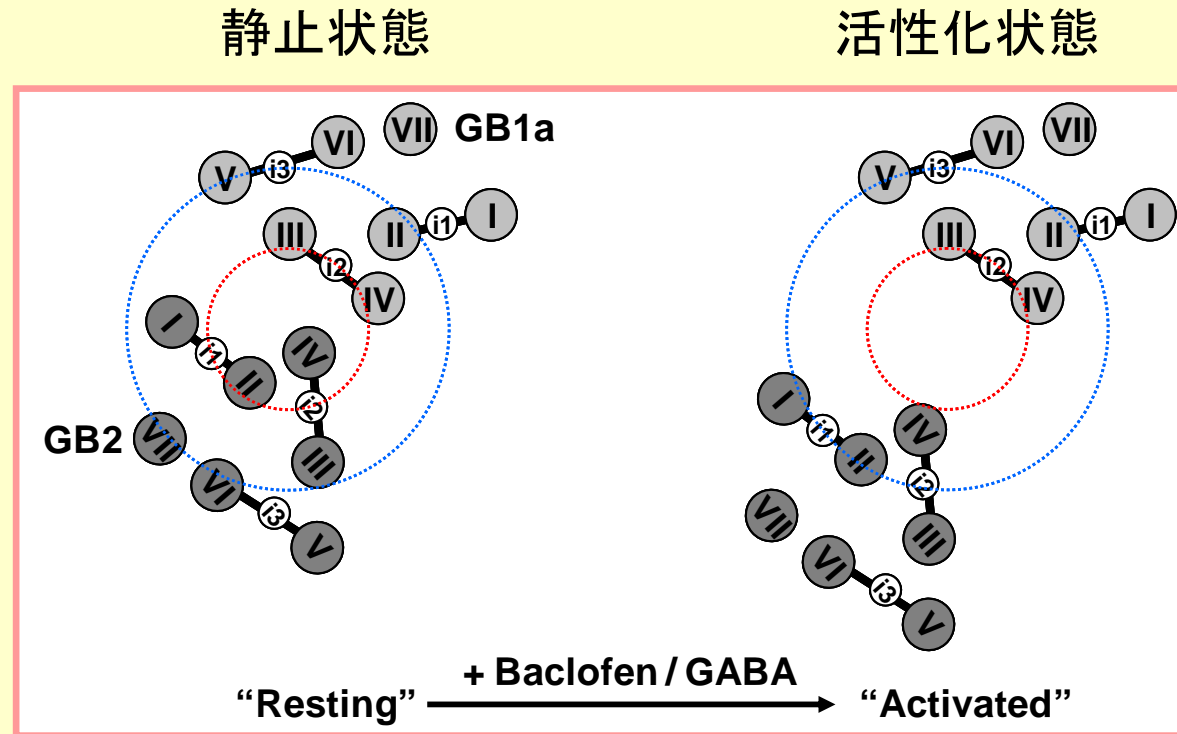


Tateyama and Kubo, Proc Natl Acad Sci USA (2006)

# 代謝型 GABA<sub>B</sub> 受容体 (ヘテロ 2量体) の動的構造変化を、 光学的手法 FRET により捕らえた。

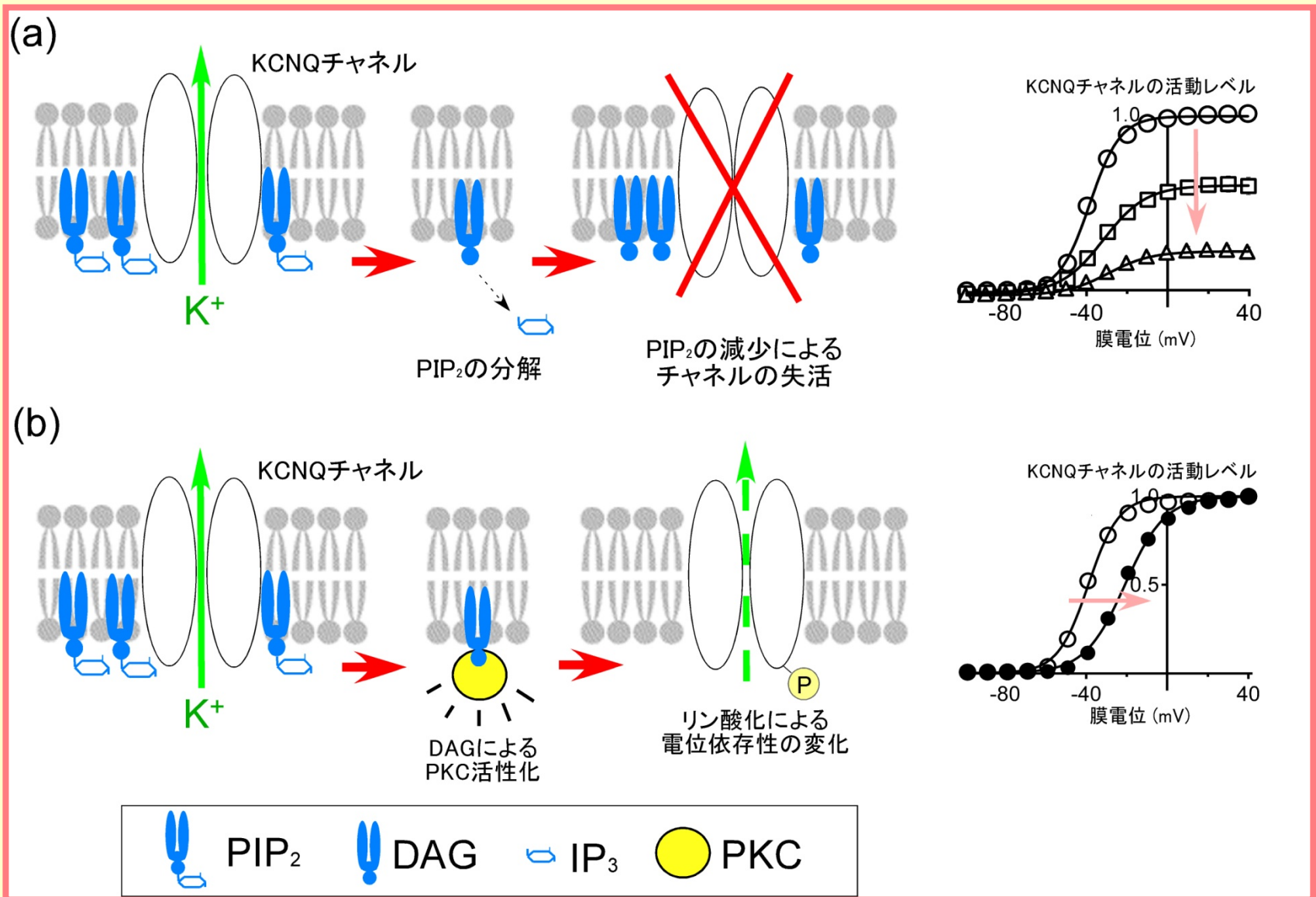


左: データのまとめ  
(太線は、FRET の低下を示す)  
右: データに基づいた、  
構造変化を説明するための模式図

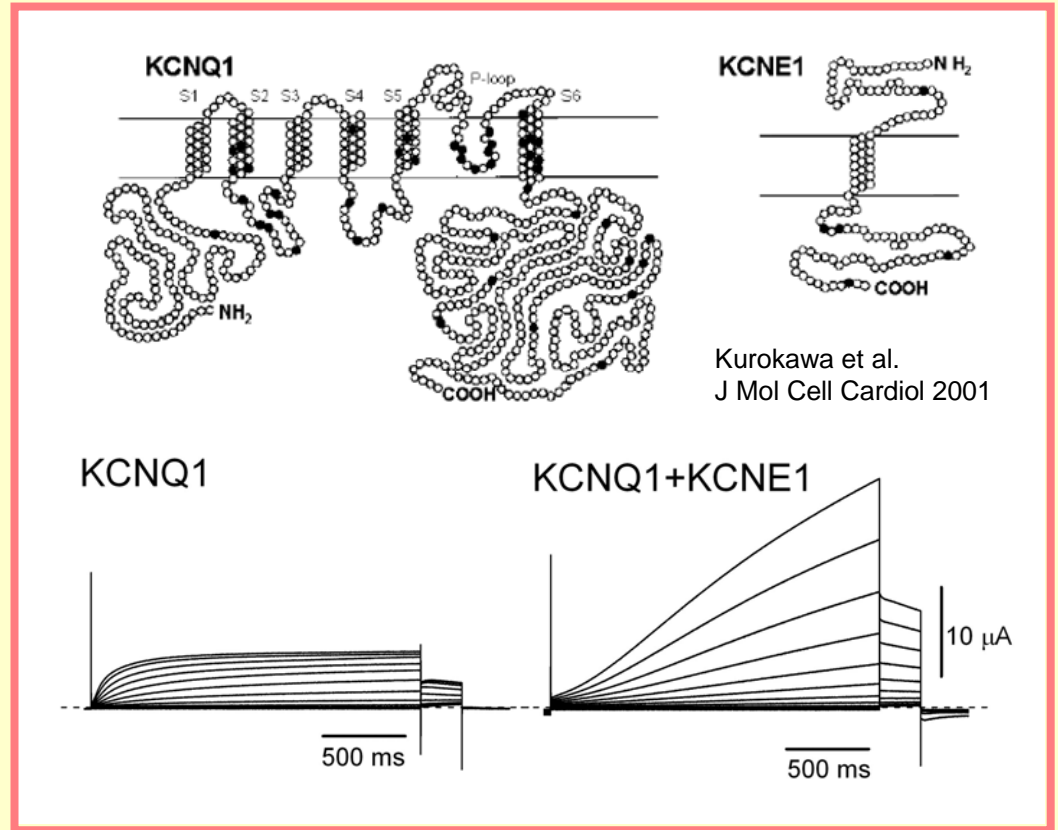


mGluR1 の場合と同様、サブユニット内構造変化は、マイナーだった。  
サブユニット間の相対的配置の変化が見られたが、それは、mGluR1 の場合と異なり、  
GB1a とGB2 の間で非対称だった。

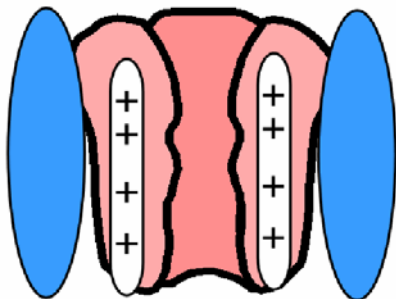
# KCNQ/Mチャネルの質的に異なる2種の抑制機構を見いだした。



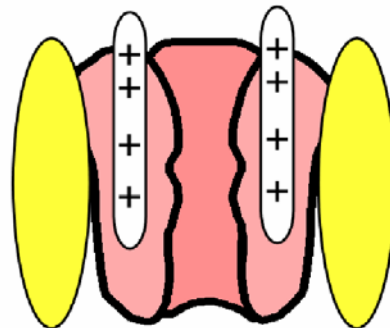
KCNE1 による  
 KCNQ チャネル電流の  
 活性化が遅くなるのは、  
 「膜電位センサーを  
 動きにくくすることによる」  
 ということを明らかにした。



KCNQ1+KCNE1



KCNQ1+KCNE3

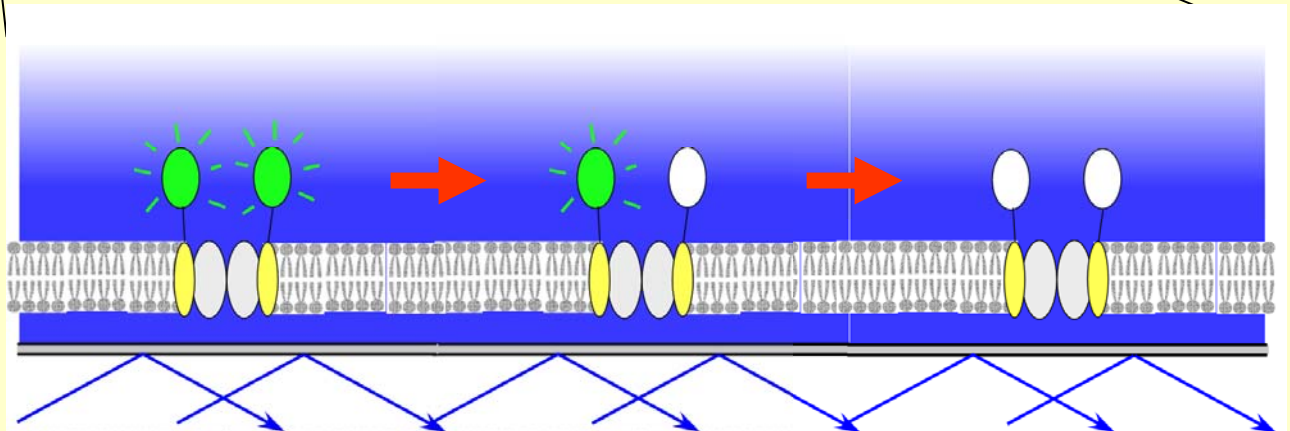
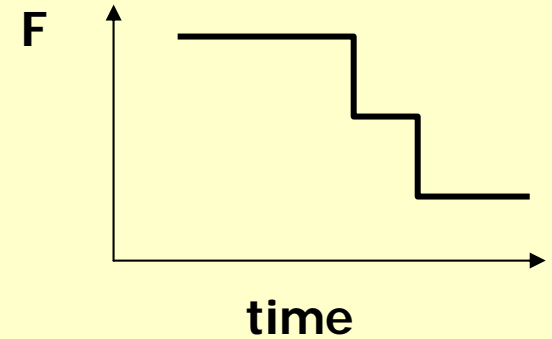
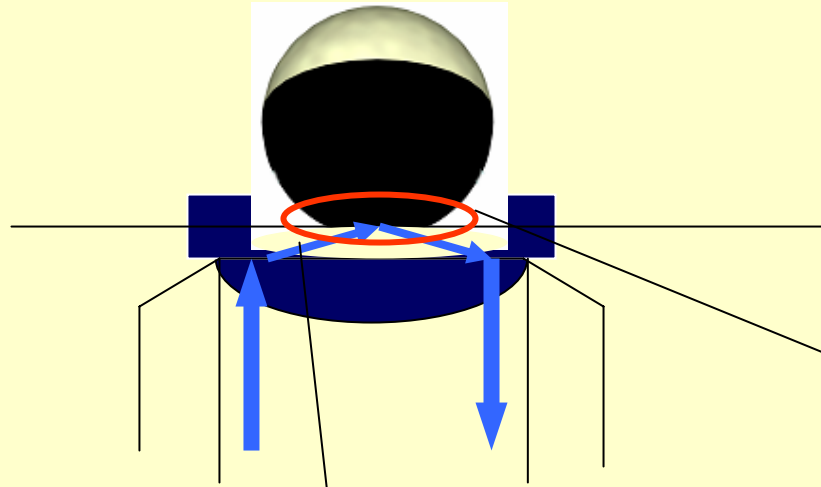


Nakajo and Kubo,  
 J Gen Physiol (2007)

# KCNQ1- KCNE1複合体中の各サブユニットの数の決定

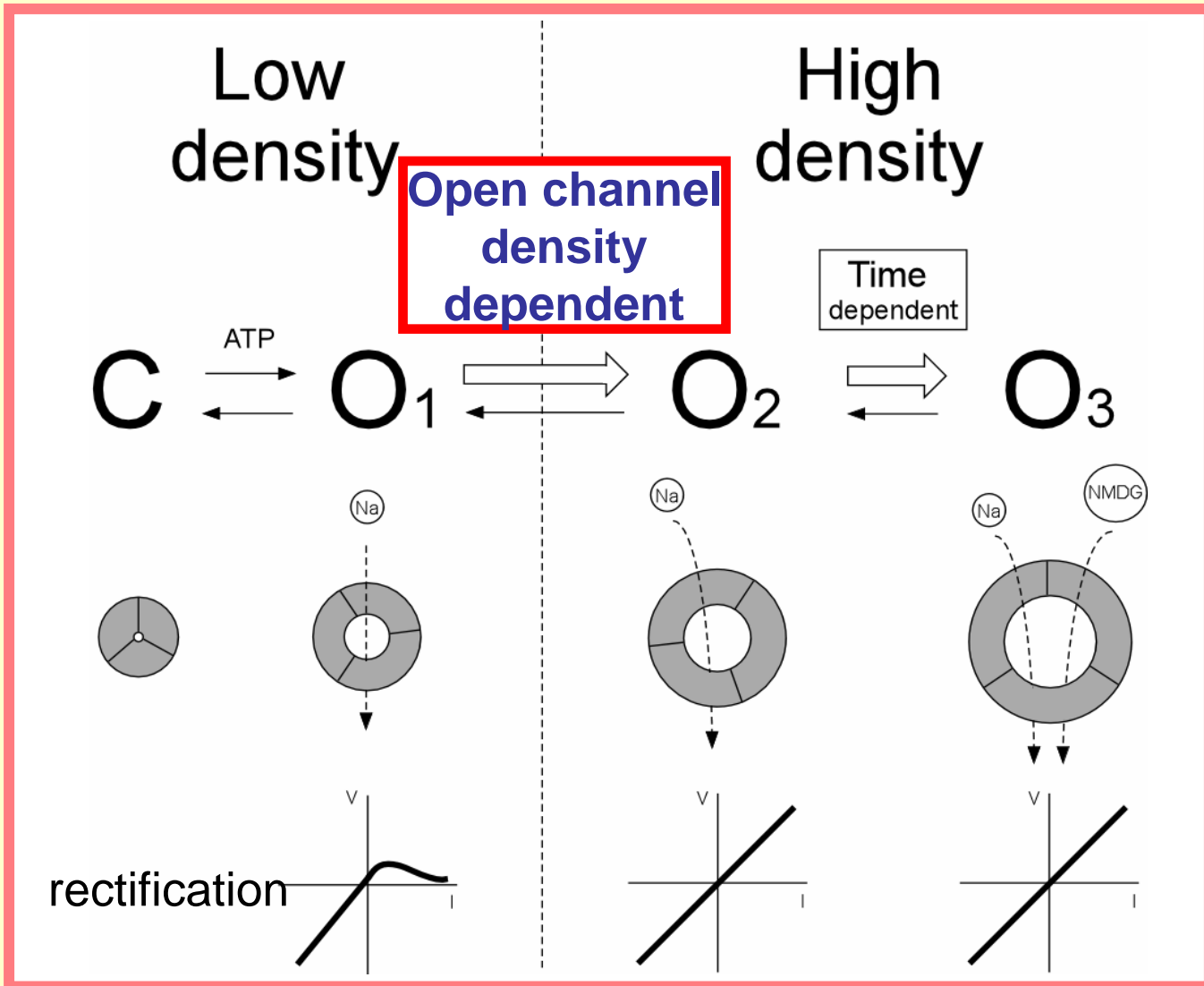
全反射照明下の単一分子イメージングにより  
蛍光の消退ステップを数える。

*Xenopus* oocyte



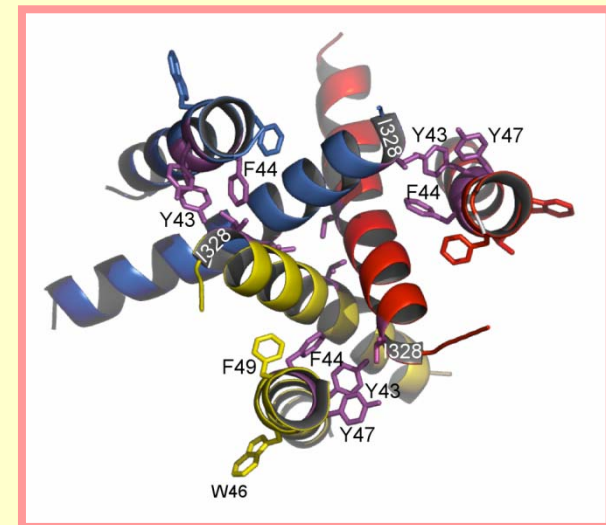
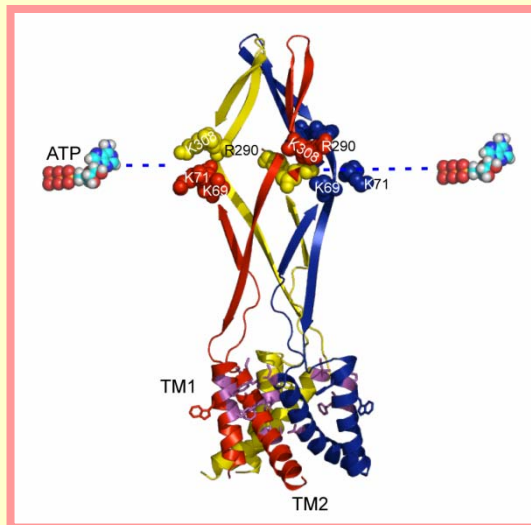
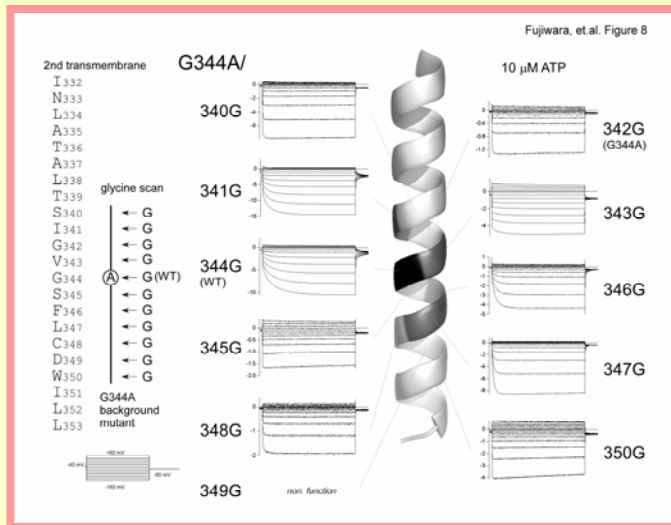
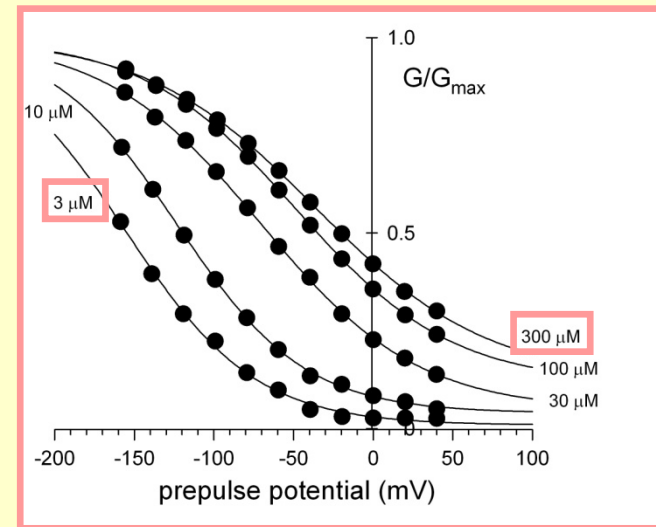
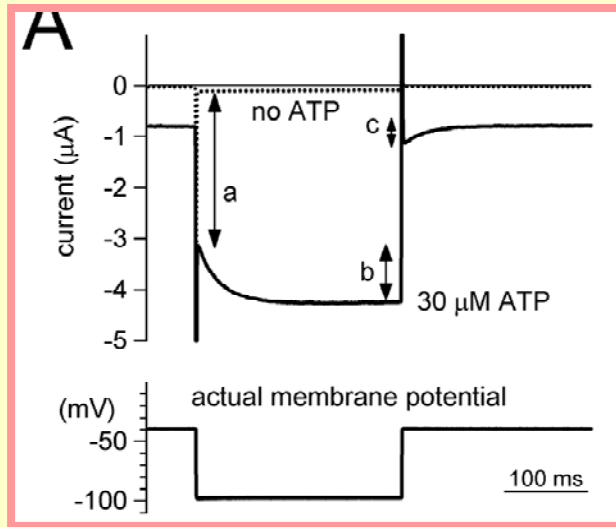
UC Berkeley  
Isacoff 研究室との  
共同研究

ATP 受容体チャネル P2Xのポアの性質が  
発現密度に依存して変化することを見いだした。



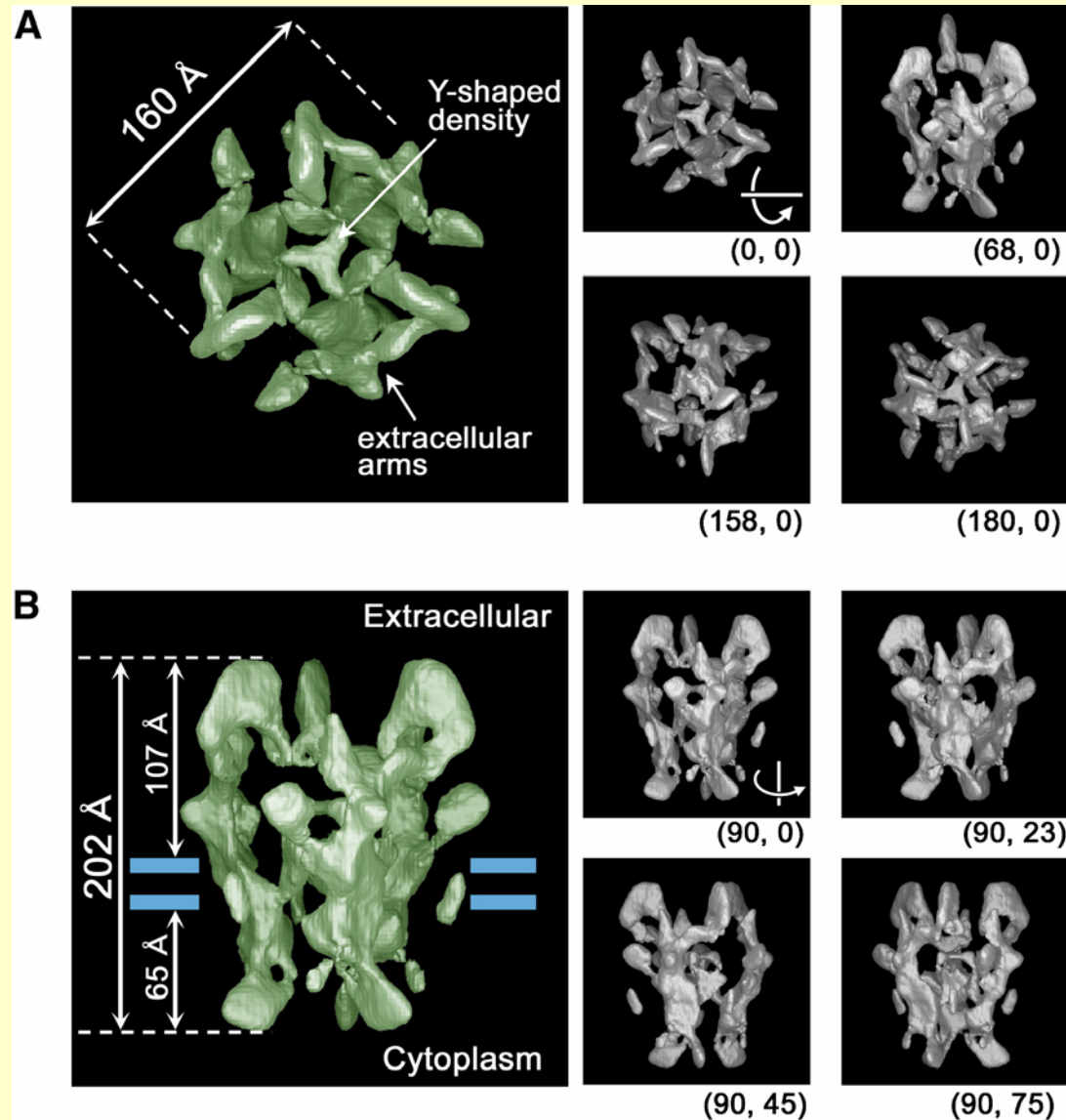
Fujiwara and Kubo, J Physiol (2004)

ATP 受容体チャネル P2X<sub>2</sub>が、膜電位センサーを有しないにも関わらず、膜電位と [ATP] に依存するゲートを示すことを見だし、さらに、その構造基盤を同定した。



# ATP受容体チャネルP2X<sub>2</sub>の再構成3次元構造の表面像

(極低温顕微鏡画像を元にした、単粒子構造解析による)



産総研・脳神経情報・  
佐藤主税研究室

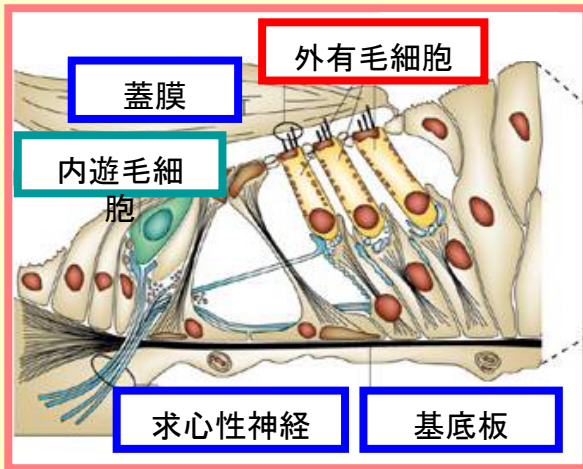
京大院理・生物物理  
藤吉好則研究室

との共同研究

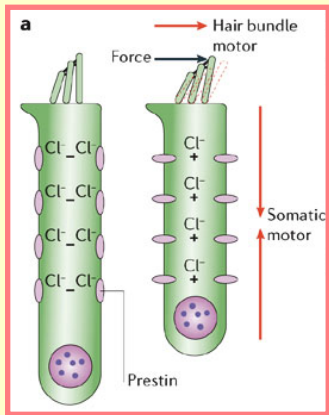
Mio et al., Structure (2009)



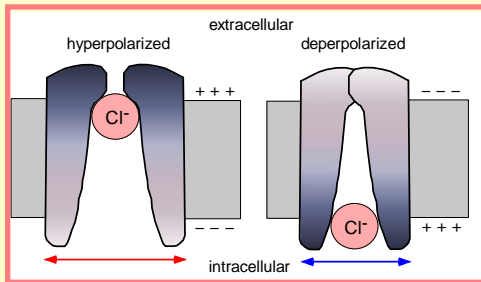
# プレステンの膜電位依存的構造変化の FRET 法による解析



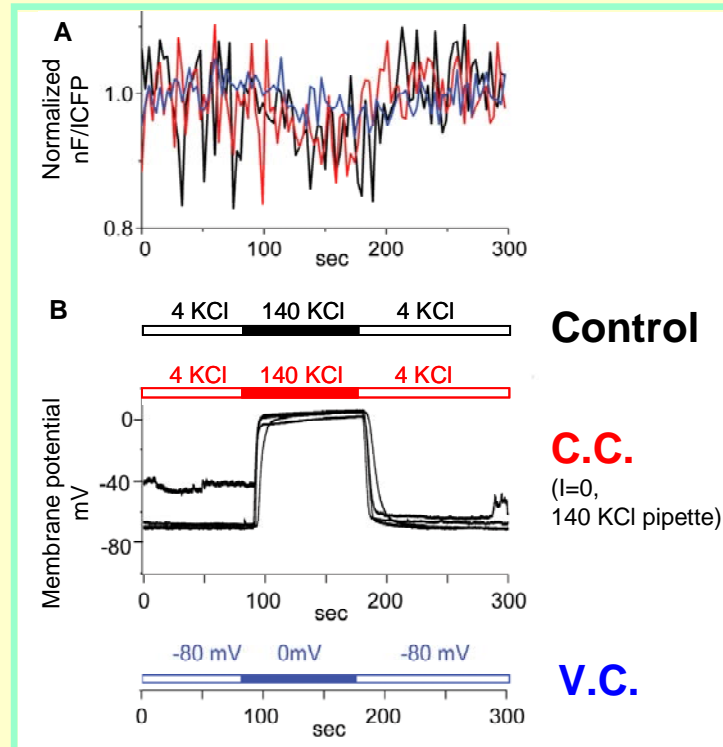
内耳外有毛細胞は膜電位変化に追隨して伸縮する。  
それを可能にしているのはプレステンという膜蛋白。



Oliver et al.  
Science  
(2001)

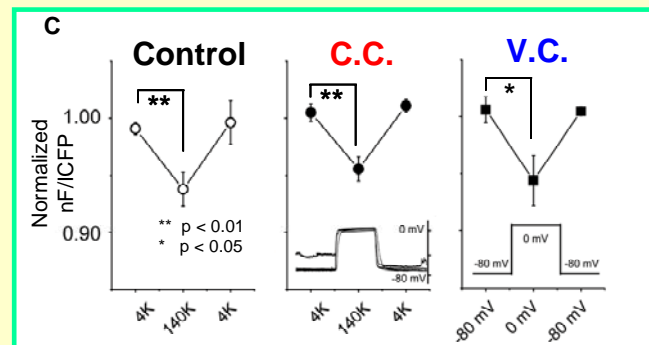


Fettiplace et al.  
Nat. Rev. Neurosci. (2002)



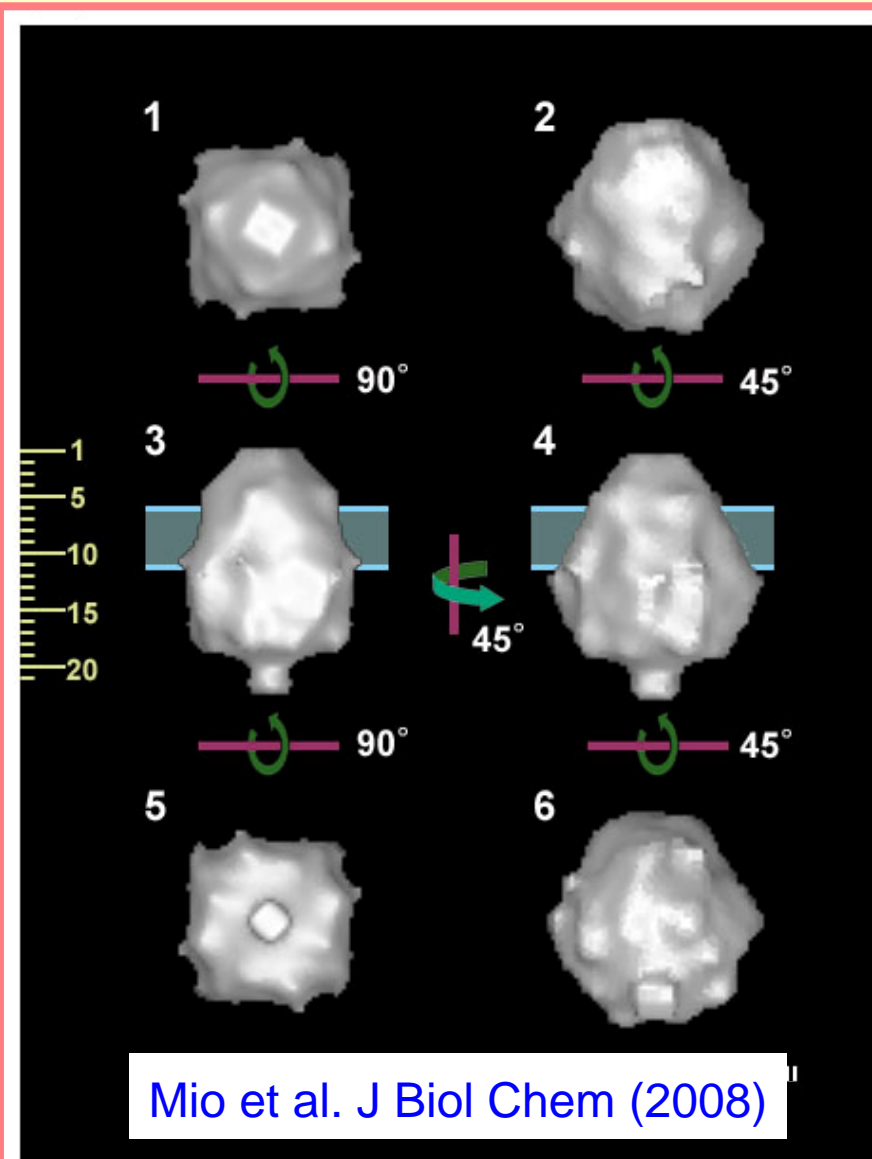
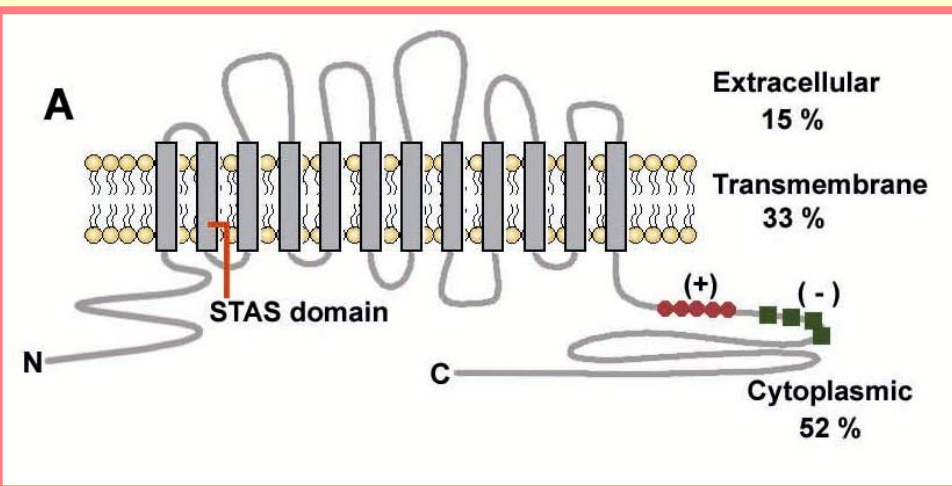
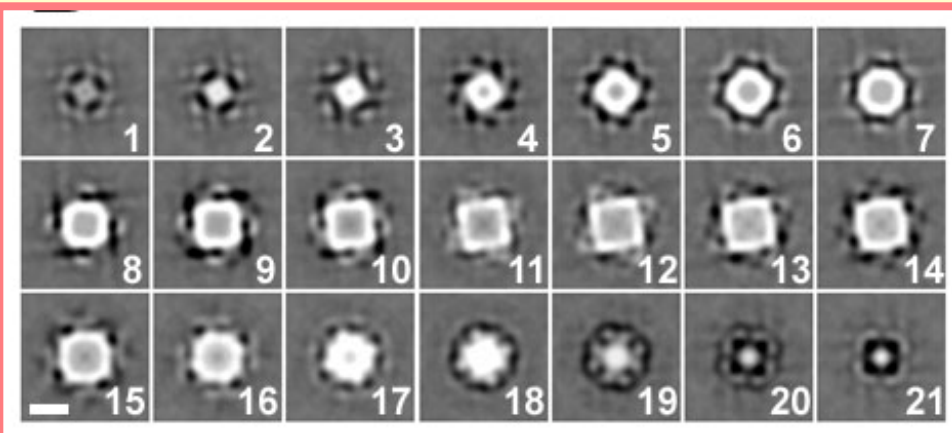
パッチクランプ法により  
膜電位をコントロールし、  
同時に  
その構造変化を、  
全反射照明下 FRET法に  
より解析した。

Gleitsman et al.  
(Am J Physiol, 2009)



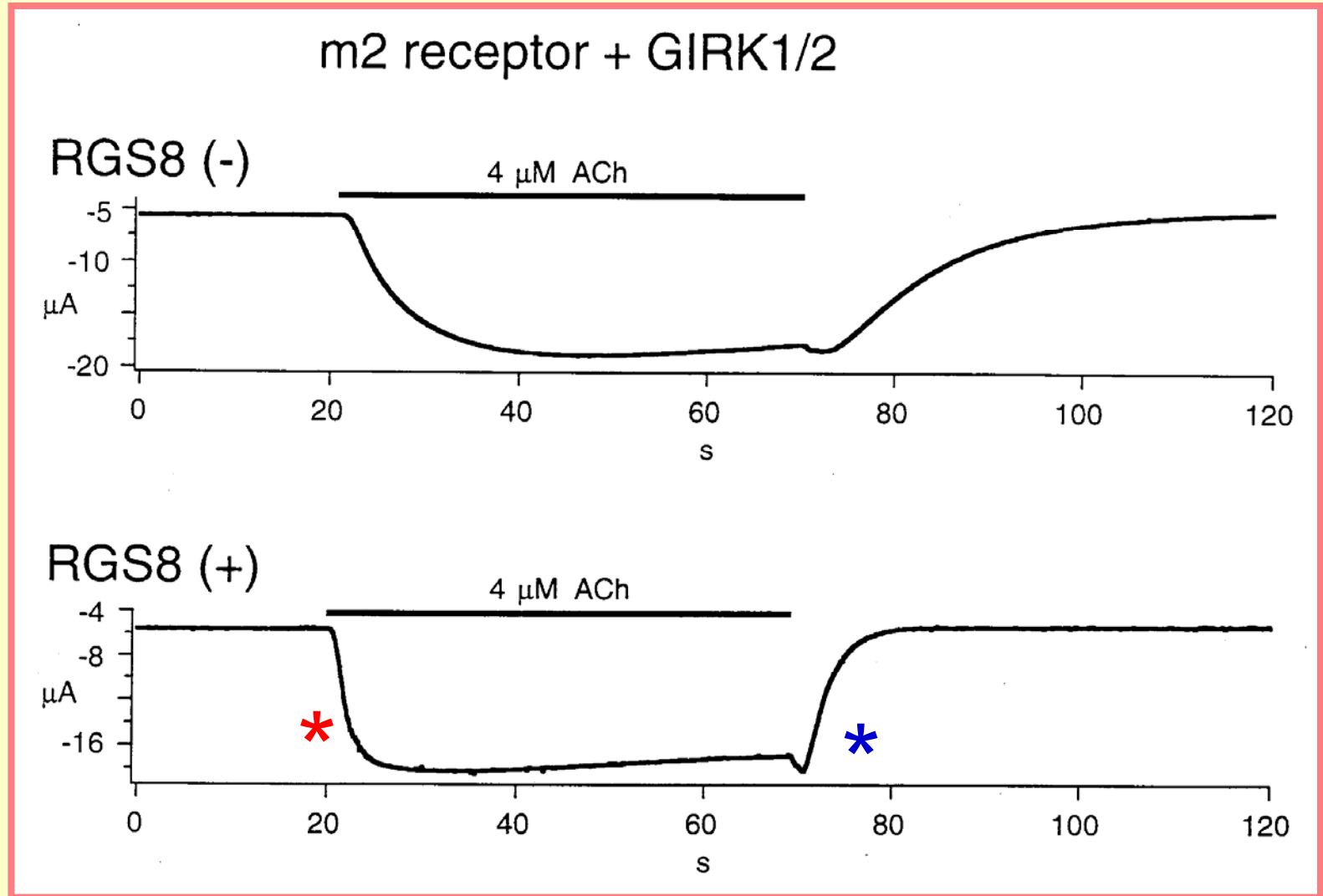
(Gleitsman氏は、  
JSPS summer student  
として2ヶ月滞在した。)

# プレスティン蛋白の Baculovirus Sf9 細胞発現系を用いた精製と単粒子構造解析を行った。

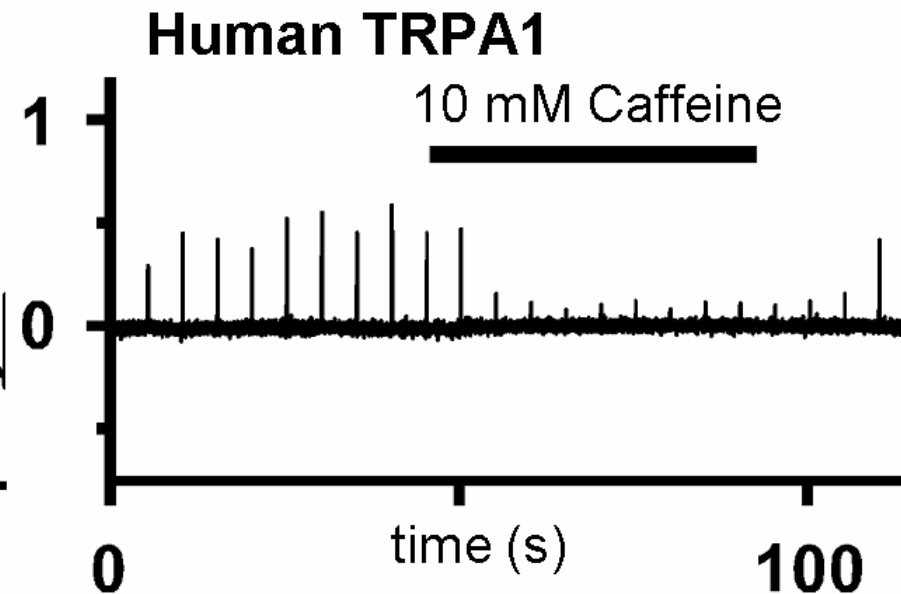
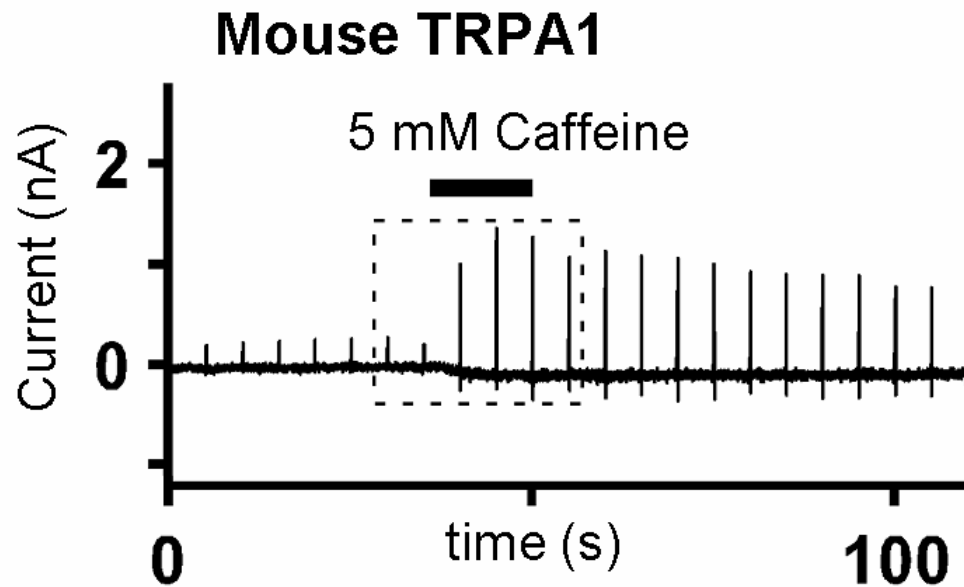


産総研・脳神経情報 佐藤主税グループ  
(三尾、小椋、佐藤)との共同研究

RGS蛋白がG蛋白質応答の -on, -off 過程の  
「加速因子」であることを見いだした。



マウスTRPA1チャンネルはカフェインにより活性化され、  
ヒトTRPA1チャンネルは抑制される。



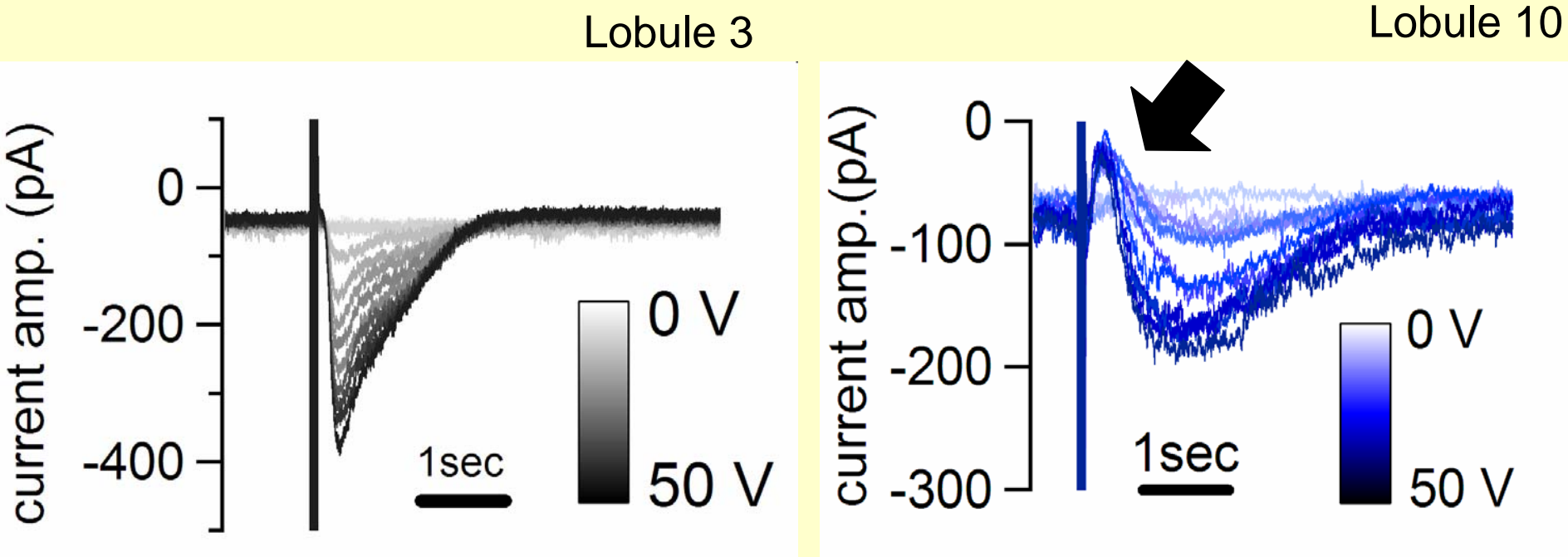
Nagatomo and Kubo, Proc Natl Acad Sci USA (2008)

マウス小脳 lobule10 の Purkinje 細胞において、分子層のテタヌス刺激により、GABA<sub>B</sub>受容体を介する緩徐な外向きシナプス電流が誘起されることを発見した。

さらに、

そのチャンネルが、Cs<sup>+</sup>透過性を有し、G<sub>βγ</sub>によって活性化されることを明らかにした。

分子種としては、KCNK13 チャンネルであることが示唆された。



(Ishii et al.)

## 研究室への参加を希望される方へ

### 我々の研究室にフィットする人

- (1) 何をみているか、実態のはっきりした研究をしたい人。
- (2) 分子生物と生理機能解析の両方を本格的にやりたい人。
- (3) 生物物理学的なことに興味のある人。

### 我々の研究室の特徴

- (1) 手取り足取りやっても、研究者は育たないという考えの下、**「自分で考え、自分の意志で動くこと」**を重んじています。そういうと聞こえはいいですが、実際は、言われたとおりにやっていればいいというわけでないので、**とても大変**です。
- (2) でも、決してほったらかしではなく、相談すれば、実力があって面倒見のいい先輩たちが、教えてくれます。