

# X線1分子追跡法を用いたTRPイオンチャネル運動の高速時分割計測と制御機構の理解

三尾和弘

産業技術総合研究所 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ  
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-2-3

藤村章子

産業技術総合研究所 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ  
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-2-3

倉持昌弘

茨城大学大学院 理工学研究科 〒316-8511 茨城県日立市中成沢 4-12-1

関口博史

高輝度光科学研究センター 散乱・イメージング推進室 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

佐々木裕次

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 〒277-8561 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

## 要旨

カプサイシン受容体であり、また熱に対する細胞センサーとして働く TRPV1 のリガンド応答時の分子運動を、X線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) を用いて解析した。DXT では標的タンパク質分子に数十ナノメートルの金ナノ結晶を化学標識し、そのナノ結晶の動きと連動した分子揺らぎや回転運動を、高速時分割撮影した回折点運動の統計学的解析から評価する。実測時間毎に層別して解析するライフタイムフィルタリング法を用いることにより、細胞外のチャネルポア近傍では、リガンド投与により数十  $\text{pm}^2/\text{ms}$  という極めて小さい拡散定数で時計回りの回転運動バイアスが検出された。そこからは、クライオ電顕解析のみでは得られなかった、カプサイシンによるゲーティング機構の一端を垣間見ることができた。

## 1. はじめに

近年のクライオ電子顕微鏡の進歩により、結晶化が難しく解析が遅れていたタンパク質や、巨大分子であるがために NMR やインシリコシミュレーション等の技術が適用できなかった高分子複合体においても、近原子分解能レベルの構造情報が得られるようになりつつある<sup>1)</sup>。

同時に、その動的構造情報に対する期待の高まりを感じる。タンパク質が作動する時、そこには必ず構造変化、即ち分子内運動を伴う。その運動をリアルタイムに捕捉しようと、さまざまな試みが行われている。近年では短波長 X 線自由電子レーザー (X-ray Free Electron Laser: XFEL) の空間コヒーレンス性が極めて高い超短パルス光源を用いて、微小結晶における分子構造変化をフェムト秒～ミリ秒レベルで検出することに成功している<sup>2)</sup>。

また電子顕微鏡の検出器の進歩により、多くの膜タンパク質の構造が結晶を用いずに解かれるようになった。クライオ電顕単粒子解析法では3次元再構築の際に複数の構造の存在を仮定して、溶液中で存在する中間体構造を情報

学的に解析する試みも行われている<sup>3)</sup>。

それらは微小ながらも結晶を必要としたり、遷移時間に関する情報を他の計測技術で補わなければならないといった制限はあるものの、それぞれの構造が変化していく様子が実データで示されることに対して、大いに期待が持たれている。

我々は分子内部の運動を計測することを目的に、X線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) を用いている。DXT では標的タンパク質の一部を数十ナノメートルの金ナノ結晶でラベルし、X線照射時に発生する回折点の運動を高速時分割に記録する。そのナノ結晶の動きと連動した分子揺らぎや回転運動を統計学的に時系列解析することでタンパク質1分子の運動を導出する。高い時空間分解能で運動計測が可能であり、分子サイズの1/100であるピコメートル精度でのリアルタイム計測と、測定時のフレームレートに応じて  $\mu\text{s}$  から  $\text{ms}$  の時間分解能を持つ。

DXT は溶液条件下で計測可能であり、また試料を結晶化させる必要が無い。そのため、脂質環境や相互作用分子の制御に応じた解析が容易で、直接・間接的な分子修飾等

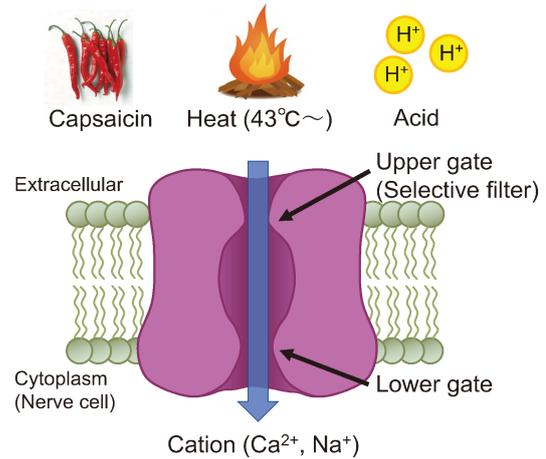
の影響も検出可能である。我々は一次知覚神経に多く発現して疼痛刺激の感受に機能する、TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) の運動解明を行なった<sup>4)</sup>。そこからは、クライオ電顕構造解析のみでは得られなかった、カプサイシンによるゲーティング機構の一端を導くことができたので概説する。

## 2. クライオ電顕解析による TRPV1 構造情報

1989年に Craig Montell らによってクローニングされたショウジョウバエの *trp* 遺伝子は、光刺激に対する受容器活性が刺激の間継続できず、一過性の活性しか示さない (transient な receptor potential を示す) 変異株の原因遺伝子であった<sup>5)</sup>。他の遺伝子ハンティングの例に漏れず、*trp* に関しても90年代に入り哺乳類ホモログの探索が精力的に進められた。その結果、ヒトでは27チャンネルに及ぶスーパーファミリー (transient receptor potential (TRP) superfamily) を構成することが明らかとなった。それらは、構造、機能によって6つのサブファミリー、TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin), TRPA (ankyrin) に分けられており、昆虫や線虫が持つ TRPN (no mechanoreceptor potential C) を含めて、現在 TRP チャンネルは7つのサブファミリーに分類されている。

今回我々が分子動態研究に用いた TRPV1 は唐辛子の辛味成分であるカプサイシンの受容体として、ラット後根神経節 (Dorsal root ganglion) の cDNA ライブラリーからクローニングされた<sup>6)</sup>。TRP チャンネルには、複数のシグナルにより活性化するマルチモード活性を示すものが多い。TRPV1 もカプサイシンの他に、酸刺激 (プロトン) やアナンダミド等の炎症性物質、物理刺激としての熱 (43°C 以上) などによっても開口する、ミステリアスなチャンネルである (Fig. 1)。TRPV1 受容体は無髄 C 線維や小径有髄 (A $\delta$  線維) などの一次知覚神経に多く発現しており、活性化によって痛みや灼熱感を惹起する侵害受容器として働いている。そのため TRPV1 受容体の新規阻害剤の探索は、鎮痛剤開発の観点からも期待されている。

TRPV1 はまた、クライオ電顕単粒子解析法を用いて、巨大な膜タンパク質としては初めて近原子分解能で構造決定された分子としても広く知られている<sup>7,8)</sup>。David Julius と Yifan Cheng のグループは、精製した TRPV1 の界面活性剤を両親媒性ポリマーのアンフィポル (Amphipol A8-35) と置換することで、安定性と水溶性を向上させた。さらに当時開発されたばかりの電子直接検出カメラ (Direct detection camera: DDC) を用いることで高品質画像を取得した。DDC では CCD (Charge coupled device) のようにシンチレータを介した電子-光変換を必要とせず、またムービーモードで撮影した画像を「ずれ」を補正して重ね合わせる (Motion correction) が可能なた



**Fig. 1** (Color online) TRPV1 is a homo-tetrameric cation permeable channel that is activated by various stimuli such as capsaicin, heat and acidity. Cryo-EM structure revealed that the TRPV1 channel comprises dual gate system with the upper gate functioning the selectivity filter, and the lower gate near the cytoplasmic end of the transmembrane domain.

め、電子線照射による試料微動 (Beam-induced movement) を回避することが可能になった。さらにステージ安定性の高い高性能電子顕微鏡の利用と自動撮影による大量画像の取得、ベイズ統計学を採用した最先端のコンピュータプログラム等の総合力により、約100キロダルトンのサブユニットが4個集まって構成される巨大タンパク質の構造を、分解能3.4 Å で報告した<sup>7)</sup>。

その3次元構造から明らかになったチャンネル内部のイオン通路は、大きく開いた細胞外開口部に続き、S5, S6 膜貫通領域間に存在するポアループ領域により狭窄部が形成されていた。これらは四量体の会合面に位置し、他の電圧感受性チャンネル同様、イオン選択フィルターとしての機能が想定された。TRPV1 ではさらに、細胞質付近にも S6 領域の679番イソロイシン (ラット TRPV1) で形成される狭窄部位が存在し、下部ゲートと考えられている。リガンド等で活性化して、イオンがチャンネルを通過するためには、上部、下部の2つのゲートを通過しなければならない。

同時に発表された2報の論文では、アポ構造 (リガンド非結合型) の他に、カプサイシン結合型と、同じく開口リガンドである蜘蛛毒 (Double-knot toxin: DkTx) およびハッカクキリン由来のカプサイシンアナログ、レシニフェラトキシン (Resiniferatoxin: RTX) 結合型の構造も報告されている。アゴニストであるカプサイシンは、膜内領域の細胞質近傍で、隣接するサブユニット間に形成されるポケットに結合し、ポアを開口させる。クライオ電顕解析では、ポケット領域にカプサイシンの電子密度が検出されており、脂溶性の高いカプサイシンは細胞膜脂質の助けを借りて TRPV1 と結合することが示唆された。一方ゲートの構造については、DkTx/RTX 結合型では上部下部ゲ

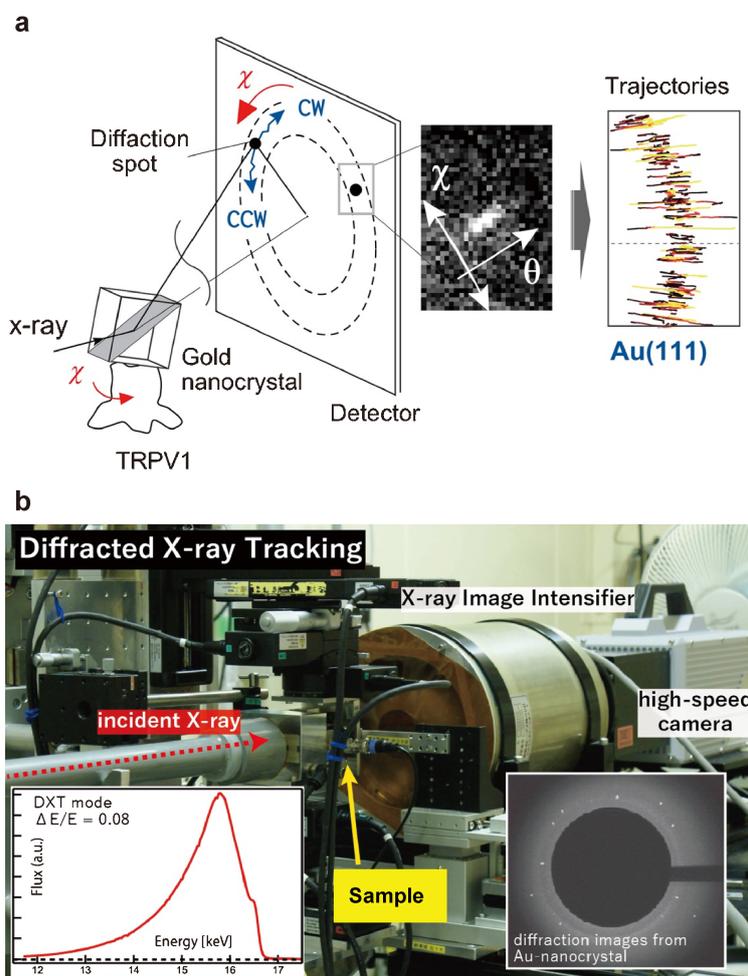
トそれぞれに4.6 Å → 7.7 Å, 5.3 Å → 9.3 Åの通路の拡張が確認され、開構造としてイオンが通りうることを示された。一方カプサイシン結合型は、下部ゲートの拡張(5.3 Å → 7.6 Å)は認められるものの、上部ゲートは狭窄したままであった<sup>8)</sup>。

カプサイシン存在下で解析された構造は、多くの読者の期待を裏切って「閉構造(closed form)」を提示することになった。もちろん構造解析はdisorder領域を除いたminiTRPV1で行われており、またタンパク質分子は細胞中では脂質環境中に存在してリン酸化を含む各種分子修飾を受けているため、必ずしも生体環境を反映していない可能性もある。しかし、カプサイシン結合だけではチャンネル開口には不十分であることを示唆していた。そこでその謎の解明に向けて、我々は分子ドメインの運動を高速・高分解能で解析できるDXTを用いて解析することとした。

### 3. DXT法によるTRPV1の運動解析

#### 3.1 DXT分子運動計測法

DXTは1998年に佐々木らによって発案された、X線を利用した1分子計測法である<sup>9)</sup>。DXTではKCl基板上でエピタキシャル成長させた、20–60 nm程度の大きさの、結晶性の高い金ナノ結晶を使用する。それらをタンパク質分子の観察目的部位にラベルし、SPring-8などの大型放射光施設で計測することにより、目的分子の内部運動に連動したナノ結晶の方位変化を回折斑点の動きとして時分割追跡する(Fig. 2a)。DXTでは入射するX線に対して傾斜方向(tilt:  $\theta$ )とねじれ方向(twist:  $\chi$ )の2軸情報を取得する。検出角度分解能は使用するX線検出器のピクセルサイズとサンプルとカメラ間の距離(カメラ長)に依存するが、これまでのところ0.1~0.01 mrad程度を実現してきた。このX線1分子追跡法DXTは、分子内部の回転



**Fig. 2** (Color online) The DXT measurement system. (a) Schematic of the DXT data collection. Pink-beam X-rays from the SPring-8 synchrotron radiation facility elicited trackable diffraction spots from the gold nanocrystals. The trajectories were projected and analyzed on the  $\chi$ - $\theta$  coordinates, separately. The central panel shows a movement of the diffraction spot, and the right panel shows trajectories from Au (111) spots. (b) DXT measurement system and the X-ray flux in PIN diode detector for the incident beam. X-rays from the beamline (BL40XU, SPring-8, Japan) with energy widths from 14.0–16.5 keV (undulator gap = 30.1 mm) were used for DXT measurements (left inset). The sample-to-detector distance was set 60 mm in our DXT measurement.

運動を計測できるが、並進運動に換算するとピコメートル精度の位置決定が可能で、測定最高速度は数百ナノ秒の時分割観察が可能であった。現在まで DNA や巨大膜タンパク質の1分子内部運動の計測に成功している<sup>10-14</sup>。

DXT の大きな特長として、波長の短い X 線をプローブとしているので高精度である（角度精度で mrad スケール）。また高輝度 X 線を用いることでマイクロ秒オーダーといった分子の機能に関わる時間領域での計測が可能である。さらに溶液条件下での計測が可能で、様々な pH や温度環境下において計測できる点などが挙げられる。これらの利点により連続的実時間測定による運動計測が可能な技術である。

測定は SPring-8 の BL40XU で行った。DXT ではナノ結晶からの回折斑点の動きを高時間分解能で測定するため、高輝度かつエネルギー幅が広い X 線入射 (Fig. 2b, 赤実線スペクトル  $\Delta E/E=0.08$ ) が必要である<sup>15</sup>。

サンプル損傷対策としてガルバノ式 X 線高速シャッターを同期させたミリ秒オーダーの露光時間制御を行い、低残光型の X 線イメージインテンシファイア（浜松フォトニクス V5445P）と可視光・高速カメラ（フォトロン FASTCAM SA1.1）を用いてフレームレート 100  $\mu$  秒に設定し、各スポットあたり 100 フレームの撮影を行った (Fig. 2b)。

### 3.2 DXT による TRPV1 の運動解析

リガンド作動時の TRPV1 の運動を理解するために、我々は S1-S2 ループ (VSL 領域) と、S5-Pore ループ (ポア領域) に、別々に金ナノ結晶と結合しうるメチオニントグ (メチオニクラスタ) を導入し、それぞれの運動を観察した。N 末端にはヒスチジントグを導入し、Au/Cr を蒸着したカプトン基板上に作成した Ni-NTA 自己形成膜に結合させた (Fig. 3)。

まず何も作用させていない時にチャネルの各部位の運動はどうなっているのだろうか？ それぞれから輝点を 1 万点程度抽出し、運動計測を行なった。解析には 2 種類の方法を行なった。一つは平均自乗変位 (Mean square displacement: MSD) 曲線で、もう一つは各運動の運動変位ガウシアン分布表記である。

MSD 曲線の傾きからは、平均的な運動特性を把握できるほか、経時的な傾きの変化から、その運動が単純ブラウン運動に属するものか、あるいは何かの外力によって動きが拘束されて特定の体積内から抜け出せない運動、あるいは逆に、外力によって運動が亢進された状態であるかが区別できる。もう一つの運動変位分布解析では、各輝点がどのような運動をしているかを分布図として示したものであり、一つの大きなガウシアン分布で表される均一の運動パターンを持っているか、あるいは異なる運動様式を持つ複数のポピュレーションの集合体であるのかを解析することが可能である。それぞれの運動を、傾き運動 ( $\theta$ ) と回

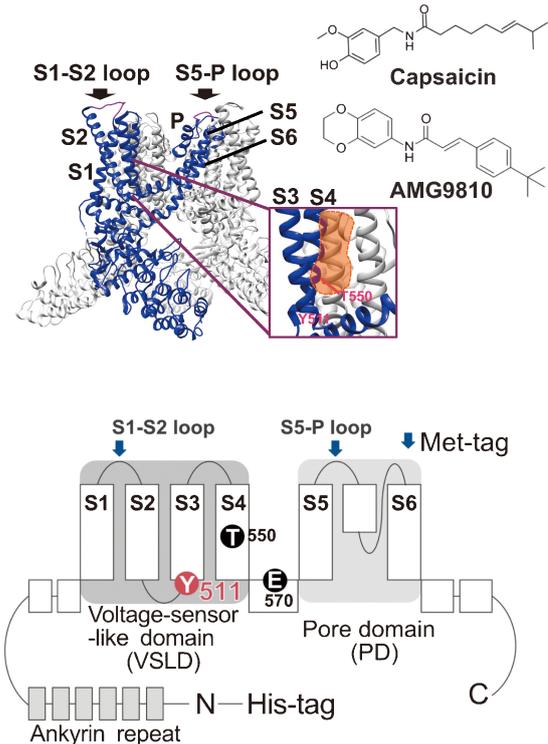


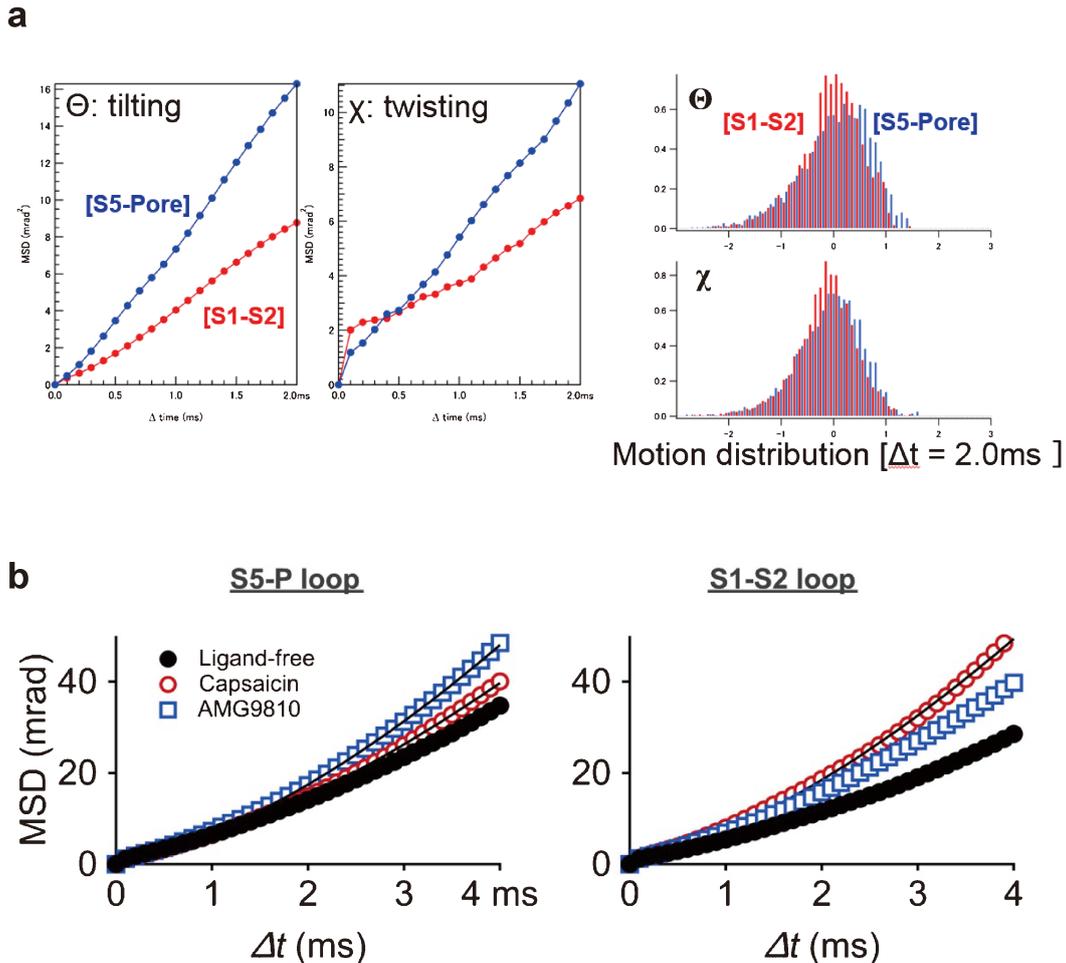
Fig. 3 (Color online) A voltage sensor-like domain (VSLD) is composed of the first four helices (S1-S4) and a pore domain (PD) is formed by the last two helices (S5 and S6) and the intervening pore sequence. Capsaicin binding pocket (colored in yellow) was assigned at the interface of adjacent subunits: located between the S4-S5 linker and the S3 helix of one subunit and the S6 helix of another subunit. For specific binding of gold nanocrystals to the TRPV1 proteins, Met-tag sequence (MGGMGGM) was introduced at a S1-S2 loop (for VSLD labeling), or a S5-Pore loop (for PD labeling).

転運動 ( $\chi$ ) に分解し、時間運動の積算値 (MSD) で比較した。その結果、 $\theta, \chi$  のいずれにおいても、S5-Pore の運動の方が S1-S2 ループよりも大きいことを示していた (Fig. 4a)。

VSL 領域に相当する電圧感受性チャネルの電位センサーは、ポジティブチャージを持つヘリックスの空間的配置を変えて電位変化を感知し、また内向き整流性 K チャネル等に見られるように、2 回膜貫通のポアドメイン (ここで言う S5-Pore-S6 領域に相当) のみでもチャネル構造として成立する。そのため S5-Pore と比較して S1-S2 ループの方が揺らぎが大きいと予想された。しかし DXT の結果は S5-Pore の方が大きい運動を示していた。おそらくポア領域ではリガンド作動により小さな力で容易に構造変化が起こるように、エネルギー障壁近くまで分子振動が行われているのだろう。

### 3.3 リガンド作動時の TRPV1 の分子運動

我々はこの系を用いて、カプサイシン投与時の TRPV1 の運動計測を行なった。先ほど同様 MSD カーブを作成し



**Fig. 4** (Color online) Mean square displacement (MSD) curves and Gaussian distributions were obtained from the trajectory analysis of gold nanocrystals. (a) In the native condition, fluctuation at a position of S5-Pore was higher than that of S1-S2 loop (left), which was also demonstrated by the different peak positions in the Gaussian motion distribution graphs (right). (b) MSD curves for the  $\chi$  axis shows the enhanced movement of TRPV1 by the capsaicin and competitive antagonist AMG9810.

てみると、ポア領域、V S L 領域いずれにおいてもカプサイシン投与により傾きの増大が確認された (Fig. 4b, 回転運動  $\chi$  のみを表示)。これはすなわち、カプサイシンによりラベルした領域の運動が亢進している事を示している。ちなみにその運動の上昇は、ポア近傍よりも V S L 領域で顕著に観察された。一方、カプサイシンの競合阻害剤である AMG9810を作用させた場合の運動計測も行なった。AMG9810はカプサイシンだけでなく、プロトンや熱、TRPV1に対する各種内在性リガンドによる活性も広く抑制する。阻害剤を作用させた場合に分子のブラウン運動が抑制されるであろうという予想とは逆に、AMG9810を反応させた際にもカプサイシン同様運動が亢進されるという、興味深い結果が得られた。

### 3.4 ライフタイムフィルタリングの導入

運動をさらに詳細に理解するために、全ての輝点の回転角度をプラス方向とマイナス方向の2つに分けて解析

し、回転方向の導出を試みた。その際、タンパク質上部 (細胞の外側) から見た時の細胞外領域の運動に関して、右回転の振れを時計軸方向 (CW)、左回転の振れを反時計軸方向 (CCW) と定義した。しかし残念ながら、回転角の分布曲線は  $0^\circ$  を中心に左右均等に分布し、回転方向に関する情報は得られなかった。後から考えればそれは至極当然のことであり、細胞質側末端を基板に固定されているチャンネルの上部の運動は一様に回り続けることは無く、捻れたり解けたりしているに違いない。

そこで我々は、運動速度を加味したデータ解析を行うこととした。金ナノ結晶から得られる回折点は、重ね合わせるとトラジェクトリーを形成するが、放射光のエネルギー幅で得られる領域しか検出することはできない。速い運動から得られる輝点は現れてから消失するまでの時間が短く、遅い運動から得られる輝点は存在時間が長い。そこで我々は得られたデータを輝点の継続時間 (ライフタイム) で層別して、各々について解析を行なった。

継続時間 0~2.0 ms の短いライフタイムを持つ輝点の解析では、リガンドによる差はあまり見られなかったが (Fig. 5a), 2.0~4.0 ms の中程度ライフタイムの解析では、ligand-free と capsaicin においては、S5-P と S1-S2 どちらの観察点においても、マイナス方向の回転バイアスが確認された (Fig. 5b)。これは細胞内領域を基板に固定したタンパク質の細胞外領域が、時計回りに回るバイアスを示している。クライオ電顕解析で開構造として報告された DkTx/RTX 結合型で見られるものと同様の運動方向のため、チャネルを開状態に導く運動バイアスであると想定された。興味深いのは、リガンドと反応していないアポ TRPV1 も開バイアスを示したことである。チャネル分子は常に開状態に向けた運動バイアスを提示していると考えられた。一方、阻害剤 AMG9810を加えたものではこの開方向バイアスは消失し、S5-P ループでは非バイアス状態となり、また S1-S2 ループではプラス方向の回転バイアスが確認された。

アポ型とカプサイシン結合型の運動の差異は、長い lifetime データ (ゆっくり動く運動) で明瞭に見られた。輝

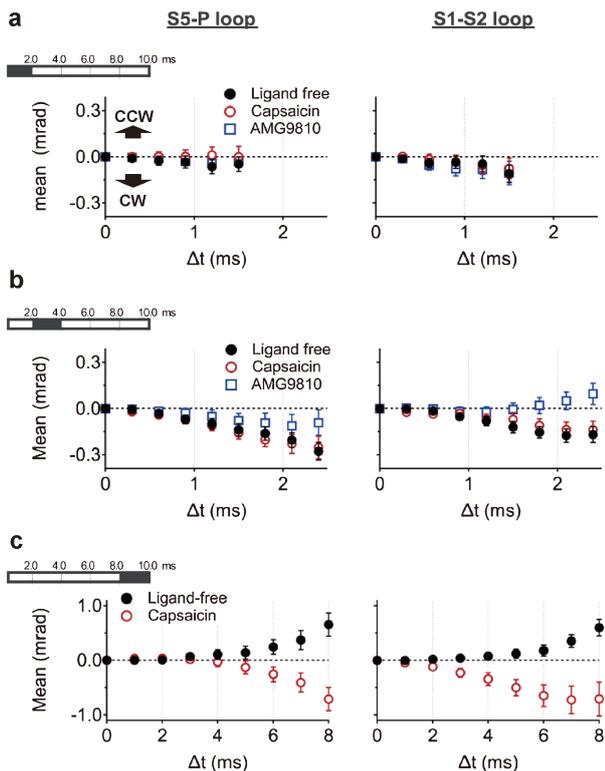
点継続時間 8~10 ms の遅い運動のデータ解析では、カプサイシンでは CW の回転運動バイアスが継続して検出されたのに対し、アポ TRPV1 では CCW の運動が示された (Fig. 5c)。

### 3.5 カプサイシン非感受性変異体を用いた分子運動解析

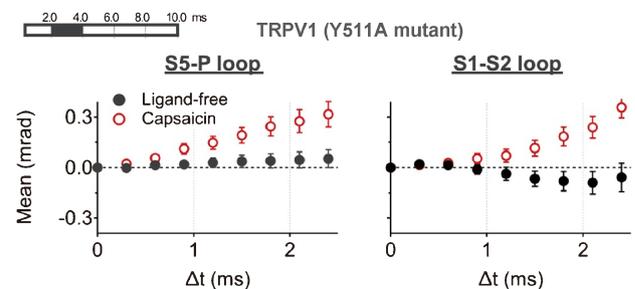
カプサイシン結合ポケットは S3 の 511 番チロシンや S4 の 550 番スレオニン等の残基で形成される (Fig. 3a)。実際、511 番チロシンをアラニンに変えた変異体 (Y511A) では、カプサイシンに対する反応性が消失することが知られている<sup>16)</sup> (プロトン反応性は保持されている)。そこで我々は、カプサイシン非感受性である Y511A 変異体を用いて分子動態の解析を行なった。リガンドが存在しない状態では、S5-P, S1-S2 どちらの観察点においても非バイアス状態であった。しかしカプサイシンを加えると、Y511A の運動は CCW の回転バイアスにシフトした (Fig. 6)。これは先に述べたアポ TRPV1 に阻害剤 AMG9810を加えた時と類似した運動パターンであった。おそらくアポ TRPV1 が示していた開方向への回転バイアスが失われたためであろうと考えられた。

### 3.6 考察

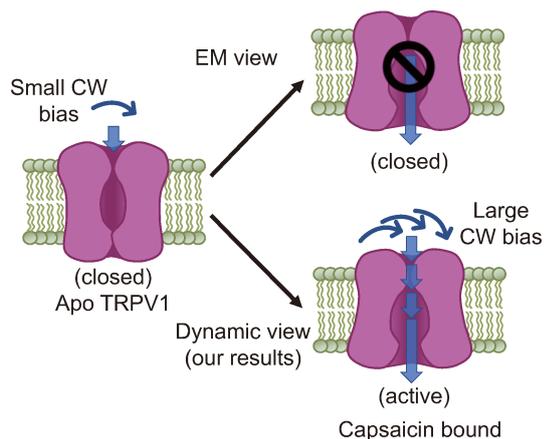
これらの結果と、先にクライオ電顕解析で報告されている TRPV1 の構造情報から、我々はカプサイシンによる活性化機構を次のように考えている (Fig. 7)。クライオ電顕解析で明らかになったカプサイシン結合構造は、下部ゲートのみ開口し、上部ゲートは閉じたままである<sup>8)</sup>。最近報告された地リス全長 TRPV1 のクライオ電顕解析でも、カプサイシン結合型構造は上下両ゲート共にきつく閉まったままであった<sup>17)</sup>。今回我々が得た結果では、アポ TRPV1 もカプサイシン結合 TRPV1 も同様に、チャネル開口方向への回転バイアスを持っており、そのバイアスはカプサイシン投与により長いライフタイムを持つ運動にも継続されていた。これらの結果を総合して考えると、カプサイシン



**Fig. 5** (Color online) The mean plot for the angle  $\chi$  at different lifetime groups. (a) Data for the short LT  $< 2.0$  ms was mostly non-directed or slightly clockwise (CW) biased at both the S5-P loop (left) and S1-S2 loop (right). (b) The medium LT group ( $2.0 \leq LT < 4.0$  ms) showed CW bias for both ligand-free and capsaicin, while AMG9810 showed non-biased (S5-P loop) or counterclockwise (CCW) biased (S1-S2 loop). (c) The long LT group of  $8.0 \leq LT < 10.0$  ms: capsaicin sustained CW bias while ligand-free showed CCW biased.



**Fig. 6** (Color online) The mean plots for the angle  $\chi$  of the long lifetime filtering ( $2.5 \leq LT < 4.0$  ms) for the Y511A mutant. Ligand-free Y511A showed non-biased (S5-P loop) or slightly CW biased (S1-S2 loop), while Y511A with capsaicin showed CCW biased both at S5-P loop and S1-S2 loop.



**Fig. 7** (Color online) Proposed model for capsaicin induced activation of TRPV1 based on DXT motion analysis. Cryo-EM structure for the capsaicin bound TRPV1 showed closing conformation at the upper gate. Our dynamic analysis using DXT technique demonstrated the long-lasting rotational bias toward clockwise (CW) by capsaicin, which may lead to ion permeation at the upper gate.

の主作用は下部ゲートの開口と、上部ゲートの振動頻度の上昇であり、それによりカルシウム流入が促進されるのではないかと想定された。カプサイシン等のリガンド結合は、このちょっとしたトリガーを引くことで上部ゲートをオープンさせるのかもしれない。

クライオ電子顕微鏡によるタンパク質高分解能構造解析は既に確立した技術となり、既に多くのTRPチャンネルに関して近原子分解能の構造が報告されている<sup>18)</sup>。単粒子解析法では数万~数十万個の粒子を使用して、それらを分類、整列、平均化させることで2D画像分類を行い、更にそれらを用いて3Dマップを構築してゆく。近年広く使われている解析ソフトウェアRELION<sup>19)</sup>ではそれらの過程にベイズ推定の枠組みを採用しており、最大事後確率推定(Maximum a posteriori estimation)のEMアルゴリズムで従来より高い精度で最適解に近づけることができるようになった。

適切な数の3D classificationを設定することにより、複数の3次元構造を提示することも可能である。この方法は、精製物中に紛れ込んでいた異種タンパク質や、変性等により構造の崩れたタンパク質を除外し、主目的の構造をより高い分解能で解析できるようになるだけでなく、目的タンパク質が溶液中で取る複数のコンフォメーションの構造や、さまざまな頻度で現れる反応中間体の構造を提示するためにも役立つと考えられている。これらはタンパク質の結晶構造解析では得ることの難しい、クライオ電顕解析のアドバンテージの一つとも考えられている。

しかし、それら中間構造間の遷移速度が非常に速くて出現頻度が極端に低い場合や、エネルギーレベルが高いなどの場合には、3次元分類を用いた中間体構造の解明が極めて難しいと考えられる。現在までのところクライオ電顕解

析ではカプサイシンによる開構造は報告されていない。Zheng達は、MDシミュレーション等の技術と組み合わせて、カプサイシン結合により比較的遅い時間軸のS4-S5linkerとS6結合の動きを伴う、conformational waveを引き起こす説を提案している<sup>20)</sup>。我々の今回行ったDXT分子動態解析は、従来の構造解析技術だけでは提示することの困難な、分子振動に基づく機能メカニズムの解明に有効な技術であると考えている。

## 4. 終わりに

筆者らが研究対象としている一つのタンパク質の歴史を眺めた時、10年を単位とする大きな流れを感じる。1989年に発見されたショウジョウバエ光受容異常の遺伝子 *trp* は、90年代にはヒトでは27ものTRP superfamilyとなる多様な遺伝子群を構成することが判明した。2000年代にはさまざまな細胞センサーとしての機能や関連疾病などが明らかとなり、2013年にはクライオ電顕解析によるTRPV1の構造解明を皮切りに、多くのTRPチャンネルの詳細構造が明らかとなった。さて2020年代は何の時代であろうか? 「分子動態に基づく作動機構の理解」が少しでもお役に立てることを期待いたします。

## 謝辞

放射光新参者の著者(三尾)を、暖かく迎え入れて頂いた放射光研究者の皆様にご感謝いたします。なお本研究はJSPS 科研費 JP17H05539, JP18K06601, JP26102748およびJST CREST JP18071859の助成を受けたものである。また本研究はSPRING-8の課題番号2017A1140, 2018A1417, 2019A1498の研究課題として行った。

## 参考文献

- 1) Y. Cheng: Science **361**, 876 (2018).
- 2) E. Mizohata, T. Nakane, Y. Fukuda, E. Nango and S. Iwata: Biophys Rev. **10**, 209 (2018).
- 3) A. Nakanishi, J.I. Kishikawa, M. Tamakoshi, K. Mitsuoka and K. Yokoyama: Nat Commun. **9**, 89 (2018).
- 4) S. Fujimura, K. Mio, M. Kuramochi, H. Sekiguchi, K. Ikezaki, M. Mio, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, T. Kubo and Y. C. Sasaki: J Phys Chem B. **124**, 11617 (2020).
- 5) C. Montell and G. M. Rubin: Neuron **2**, 1313 (1989).
- 6) M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius: Nature **389**, 816 (1997).
- 7) M. Liao, E. Cao, D. Julius and Y. Cheng: Nature **504**, 107 (2013).
- 8) E. Cao, M. Liao, Y. Cheng and D. Julius: Nature **504**, 113 (2013).
- 9) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagihara: Phys. Rev. E **62**, 3843 (2000).
- 10) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi and N. Yagi: Phys. Rev. Lett. **87**, 248102 (2001).
- 11) H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y. C. Sasaki

- and S. Oiki: Cell **132**, 67 (2008).
- 12) H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichianagi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda and Y. C. Sasaki: PLoS One **8**, e64176 (2013).
  - 13) H. Sekiguchi, Y. Suzuki, Y. Nishino, S. Kobayashi, Y. Shimoyama, W. Cai, K. Nagata, M. Okada, K. Ichianagi, N. Ohta, N. Yagi, A. Miyazawa, T. Kubo and Y. C. Sasaki: Sci. Rep. **4**, 6384 (2014).
  - 14) H. Kozono, Y. Matsushita, N. Ogawa, Y. Kozono, T. Miyabe, H. Sekiguchi, K. Ichianagi, N. Okimoto, M. Taiji, O. Kanagawa and Y. C. Sasaki: Biophys. J. **108**, 350 (2015).
  - 15) H. Sekiguchi and Y. C. Sasaki: Jpn. J. Appl. Phys. **58**, 120501 (2019).
  - 16) S. E. Jordt and D. Julius: Cell **108**, 421 (2002).
  - 17) K. D. Nadezhdin, A. Neuberger, Y. A. Nikolaev, L. A. Murphy, E. O. Gracheva, S. N. Bagriantsev and A. I. Sobolevsky: Nat Commun. **12**, 2154 (2021).
  - 18) 3次元電子顕微鏡データナビゲーター (<https://pdbj.org/emnavi/?lang=ja>)
  - 19) S. H. Scheres: J. Struct. Biol. **180**, 519 (2012).
  - 20) F. Yang, X. Xiao, B. H. Lee, S. Vu, W. Yang, V. Yarov-Yarovoy and J. Zheng: Nat Commun. **9**, 2879 (2018).

## 著者紹介

**三尾和弘**

産業技術総合研究所 産総研-東大オペランド OIL 単一状態計測チーム ラボチーム長  
E-mail: kazu.mio@aist.go.jp

専門：電子顕微鏡構造解析，X線分子運動解析

**【略歴】**

1990年東北大学大学院動物発生学博士前期修了，博士（理学）。ライオン株式会社研究員，UCSF 訪問研究員を経て2009年4月より産業技術総合研究所。

**藤村 章子**

産業技術総合研究所 産総研-東大オペランド OIL 単一状態計測チーム 特別研究員  
E-mail: shoko-san@aist.go.jp

専門：生物物理学

**【略歴】**

2017年学習院大学自然科学研究科 博士（理学）取得。2018年3月より現職。

**倉持昌弘**

茨城大学大学院理工学研究科 助教  
E-mail: masahiro.kuramochi.vw26 @ vc.ibaraki.ac.jp

専門：生物物理学，神経科学

**【略歴】**

2017年3月筑波大学大学院生命環境科学研究科博士後期課程修了。博士（学術）。2017年4月東京大学大学院新領域創成科学研究科助教，2021年5月より現職。

**関口博史**

高輝度光科学研究センター 放射光利用研究基盤センター 主幹研究員

E-mail: sekiguchi@spring8.or.jp

専門：生物物理

**【略歴】**

2004年3月 東京工業大学生命理工学研究科博士後期課程修了，博士（理学）。2004年 食品総合研究所 博士研究員，同年 東京工業大学生命理工学研究科 助手，2007年から同・助教を経て2009年 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任助教。2012年高輝度光科学研究センター 研究員。2017年より現職。

**佐々木裕次**

東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻 教授

E-mail: ycsasaki@k.u-tokyo.ac.jp

専門：新規計測技術考案とその命名，加えてその周辺領域の基盤的研究技術開発。現在は，X線1分子追跡法の開発と世界展開。

**【略歴】**

1991年3月東北大学大学院工学研究科博士課程修了，工学博士。1991-1997年日立製作所。1997-2008年財団法人 高輝度光科学研究センターにて放射光を用いたX線1分子追跡法の考案・開発に従事。2008年11月より現職。

---

# Time-resolved measurement of TRP ion channel dynamics and understanding of its control mechanisms using the diffracted X-ray tracking technique

**Kazuhiro MIO**

AIST-UTokyo Advanced Operando-Measurement Technology Open Innovation Laboratory (OPERANDO-OIL), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 6-2-3 Kashiwanoha, Chiba 277-0882, Japan

**Shoko FUJIMURA**

AIST-UTokyo Advanced Operando-Measurement Technology Open Innovation Laboratory (OPERANDO-OIL), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 6-2-3 Kashiwanoha, Chiba 277-0882, Japan

**Masahiro KURAMOCHI**

Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

**Hiroshi SEKIGUCHI**

Center for Synchrotron Radiation Research, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Hyogo 567-5198, Japan.

**Yuji C. SASAKI**

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Chiba 277-8561, Japan.

---

**Abstract** Capsaicin induced intramolecular dynamics of TRPV1 channel was analyzed by the Diffracted X-ray Tracking (DXT) method. In the DXT, gold nanocrystals were chemically labeled onto the target molecules. The diffraction spots generated from the gold nanocrystals were captured by the high-speed camera as time-resolved manner. The molecular fluctuation and rotational motion of the target proteins were evaluated by the statistical analysis of the movement of diffraction spots. Lifetime filtering method that stratifies the analysis by the bright spots duration depicted a clockwise rotational bias with a very small diffusion constant in the vicinity of the extracellular channel pore. The results provide a glimpse of TRPV1 gating mechanisms induced by capsaicin, which was not clarified only by the cryo-EM structural analysis.