

電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究

Structural and functional study of membrane proteins
based on electron crystallography

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科

/細胞生理学研究センター・特任教授



研究の概要

電子線結晶学を用いて、水チャネル、イオンチャネル、ギャップ結合チャネル、アセチルコリン受容体、 H^+ 、 K^+ -ATPase などの膜タンパク質の構造を生理的な環境に近い脂質膜の中にある条件で解析し、それらの生理機能を構造生物学的視点から理解する。そのために、観る技術を中心として、分子生物学や電気生理学的技術など多様な手法も用いて研究する。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：①分子・細胞神経科学 ②分子神経生物学 ③チャネル

1. 研究開始当初の背景

広い生物学分野で基礎と応用の両分野において、膜タンパク質の構造の重要性が認識されてきた。電子線結晶学を用いると、膜タンパク質が脂質膜の中にある状態で構造解析ができる。生物試料の電子線損傷を低減させ、試料を氷に包埋して観察できる高性能の極低温電子顕微鏡システムを開発してきた。このシステムを活用して膜タンパク質の高分解能での構造研究を目指すことができる。

2. 研究の目的

神経科学においても重要と考えられる水チャネルやイオンチャネル、ギャップ結合チャネル、アセチルコリン受容体、 H^+ 、 K^+ -ATPase (現状では神経細胞との関連は議論されていないが、 H^+ による神経情報の制御には興味がある) などの膜タンパク質の構造を、生理的な環境に近い脂質膜の中にある条件で解析すること、そして、それらの生理機能を構造生物学的視点から理解することを目的とする。

3. 研究の方法

基本的には、膜タンパク質を昆虫細胞で発現し、精製し、2次元結晶化を行い、独自に開発した極低温電子顕微鏡を用いて様々な傾斜角度で(可能な場合には)電子線回折像を撮影し、電子顕微鏡像も撮影し(回折像が撮影できない小さい結晶の場合には電子顕微鏡像だけから)構造を解析する。必要な場合には、電気生理学的測定や遺伝子改変マウス作製など様々な手法を用いて解析を行う。

4. これまでの成果

極低温電子顕微鏡システムを活用して電子線結晶学による構造解析研究を進めた結果、以下の結果を得た。

1) 水チャネルの構造・機能研究

脳に多くの発現が見られる AQP4 の構造解析でチャネル内の水分子を完全に分離して観察することにより H-bond isolation 機構を証明し、AQP4 分子の細胞内の構造が水透過に与える影響について解析した。

2) Na^+ チャネルの構造・機能研究

バクテリア由来の電位感受性 Na^+ チャネルの電位感受性ドメインが大きく動くこと、S4 ヘリックスが上下に動くことなどをシステム変異の導入により確認した。 Na^+ チャネルの C-末端側の構造解析により、4本のヘリカルバンドルが形成され、その安定性がこのタイプのチャネルの不活性化を促進していることを解明した。さらに、 Na^+ チャネルの2つの異なるコンフォメーションの構造を解析することにより、チャネル開閉機構に重要と考えられる因子を見出した。

3) ギャップ結合チャネルの構造・機能研究

ヒト由来のギャップ結合チャネル、コネキシン 26 の構造解析に基づいてプラグゲーティングモデルを提案したが、ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構の制御に関わると考えられる細胞質側の構造を、結晶のパッキングの影響を受けていない状態で解析する必要があった。電子線結晶学による構造解析の結果、N-末端の6本のヘリックスが

同じ高さでプラグを形成しているのではなく、2本が浅くチャンネル内に挿入されて4本がより深く挿入されている構造が明らかになった(図参照)。

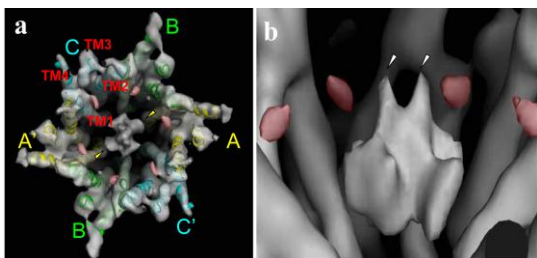


図 電子線結晶学で解析した Cx26 の構造。結晶内での人為的相互作用の影響を受けていない細胞質側の複雑な構造が解析された (a)。N 末端のヘリックスが 2 段の配置になってプラグを形成していることが明らかになった (b)。

また、無脊椎動物のイネキシンの発現系を確立し、機能解析と構造解析を行った。これはイネキシンの初めての構造解析である。

4) アセチルコリン受容体の構造・機能研究
神経筋接合部のアセチルコリン受容体 (AChR) の構造を英国 MRC の Nigel Unwin 博士との共同で解析したが、さらに進めてゲーティング機構を解明するために、神経筋接合部で行われる現象を模倣するスプレー法を用いてアセチルコリンを受容体に吹きかけ、その直後 (5 ミリ秒程度後) に液体エタン中に落下させて急速凍結する方法により、AChR のチャンネルが閉じた構造と共に、開いた構造をも解析した。その結果、ごくわずかな分子の動きでゲーティングが制御されていることが明らかになった。この結果は、脳からのシグナルで分子構造を大きく変えようとすると動きが遅くなるが、小さい分子構造の変化は素早いシグナル伝達には適した機構と考えられる。

5) H^+, K^+ -ATPase の構造・機能研究
P-type ATPase のファミリーに属する H^+, K^+ -ATPase に AlF, BeF, MgF という 3 種類のインヒビターが結合した構造を解析し、比較することで E2P 状態の構造が明らかになった。 H^+, K^+ -ATPase のインヒビターである SCH2808 との複合体の構造を解析することにより、膜貫通ヘリックスが大きく動いて結合した構造を形成することも解明された。さらに、pH4 という酸性条件での構造解析から、 H^+, K^+ -ATPase によるプロトンのポンピングにおいて、中性条件近くでは 1 分子の ATP を分解することにより 2 個の H^+ と K^+ をポンピングするが、酸性条件ではプロトンの濃度勾配が大きくなり、その勾配に逆らってポンピングする場合には、1 分子の ATP を分解するときに 1 個の H^+ と K^+ をポンピングすることを、構造解析に基づいて解明した。

5. 今後の計画

- ・ AQP4 の接着機能を担う 3_{10} ヘリックスを AQP1 のループに変異させ接着能を無くした AQP4 だけを発現するマウスの解析を進めることで、AQP4 の生理的機能の解明を目指す。
- ・ Na^+ チャンネルの構造をより高い分解能で解析することにより、 K^+ チャンネルでは分からない Na^+ イオン選択性の機構を解明する。
- ・ イネキシンの構造解析の分解能を向上させることで、イネキシンの構造により形成されるギャップ結合とコネキシンのギャップ結合の類似点と相違点を明らかにする。
- ・ H^+, K^+ -ATPase と新しいインヒビターとの複合体の構造を解析することにより、 H^+ をポンピングする機構をより深く理解する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) Oligomeric structure and functional characterization of *C. elegans* innexin-6 gap junction channels. A. Oshima, T. Matsuzawa, K. Nishikawa and Y. Fujiyoshi. *J. Biol. Chem.*, in press.
- 2) The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strand by a trimeric unit repeat. H. Suzuki, Y. Ito, Y. Yamazaki, K. Mineta, M. Uji, K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi and S. Tsukita. *Nature Commun.*, in press.
- 3) Cryo-EM structure of gastric H^+, K^+ -ATPase with a single occupied cation binding site. K. Abe, K. Tani, T. Friedrich and Y. Fujiyoshi. *PNAS*, **109**, 18401-18406 (2012).
- 4) Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. N. Unwin and Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.*, **422**, 617-634 (2012).
- 5) The carboxy-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate. K. Irie, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi. *Nature Commun.*, **3**, 793 pp1-8 (2012).
- 6) Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels. T. Simomura, K. Irie, H. Nagura, T. Imai and Y. Fujiyoshi. *J. Biol. Chem.*, **286**, 7409-7417 (2011).
- 7) Conformational rearrangement of gastric H^+, K^+ -ATPase induced by an acid suppressant. K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi. *Nature Commun.*, **2**, 155 pp1-7 (2011).
- 8) Asymmetric configurations and N-terminal rearrangements in connexin26 gap junction channels. A. Oshima, K. Tani, M. M. Toloue, Y. Hiroaki, A. Smock, S. Inukai, A. Cone, B. J. Nicholson, G. E. Sosinsky and Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.*, **405**, 724-735 (2011).

受賞

2010 年 Christian B Anfinsen Award

ホームページ等

<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp>

<http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/>