

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成21年 3月31日現在

研究課題名（和文） 膜を介する（チャネルおよびGPCRを中心とした）
情報伝達分子機構研究

研究課題名（英文） Structural study of signal transduction through
membrane proteins, channels and receptors

研究代表者

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)

京都大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要：

膜蛋白質を中心とする情報伝達と制御の分子機構を構造の視点から理解することを目的として、具体的には、1) 水チャネルの構造と機能、活性制御、そして高次機能の研究、2) イオンチャネルの構造と機能解析および局在化機構等による高次機能の解析、3) エンドセリン受容体B型 (ETBR) 等の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の構造と機能解析の3つの研究課題を遂行した。

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・構造生物化学

キーワード： 構造生物学、シグナル伝達、神経科学、生理学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

膜を介した情報伝達の分子機構、特にチャネルや GPCR の研究の重要性はすでによく認識されているが、これらの構造研究は容易ではない残された困難な研究課題である。

2. 研究の目的

独自に開発した極低温電子顕微鏡システムを活用して、哺乳動物などの膜蛋白質を中心とする情報伝達と制御の分子機構を構造の視点から理解することを目的とする。

3. 研究の方法

膜蛋白質の生理的機能を理解するには、膜蛋白質が脂質2重膜中にある状態で構造解析する必要がある。このためには、電子顕微鏡を用いた構造解析が有効である。ただし、膜蛋白質の原子座標を決定できる様な高い分解能での構造を解析するには、電子線による蛋白質の損傷が深刻な問題である。電子線による損傷を桁違いに軽減することができて、2 Åの分解能を有する極低温電子顕微鏡を開発しているので、これらの装置を活用するとともに、電子線結晶学や単粒子解析法を用いて、一般には解析が困難とされている膜蛋白質の構造とその生理的機能を解明する。

4. 研究の主な成果

(1) 水チャネル、アクアポリンの構造と機能、活性制御、そして高次機能の研究

AQP0 の構造を 1.9 Å 分解能で解析して、2000 年に AQP1 の解析で提案した Hydrogen bond isolation mechanism と名づけた水チャネルの選択的透過機構で仮定した位置 (2000 年の *Nature* に発表) に水分子が存在することを確認した。この研究成果は、電子線結晶学の分解能の最高記録を更新し、脂質分子も含んだ構造を解析した (*Nature* **438**, 633-638 (2005): Articles, 表紙)。しかし、これはチャネルが閉じた状態の水が透過しない構造であるので、AQP1 と同じ様な速い水透過を行う AQP4 の構造を 2.8 Å で解析することによって、チャネル内の水分子を全て可視化し、Hydrogen bond isolation mechanism を実証した。しかも、AQP4 の新しい細胞接着機能を発見し、分解能を向上させて、脂質分子の構造まで解析することによって、AQP4 分子が向かい側の脂質分子 (PE) と直接結合した構造を解明した (*JMB* **389**, 694-706 (2009))。これらの結果、AQP0、AQP4 などの接着能を有する水チャネルや、ギャップ結合チャネルなどを *Adhennel* (Adhesive channel) と命名して、多機能性チャネルの構造生理学という分野を確立しつつある。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

AQP4 のアレイ形成安定化機構と N-末端側に存在するセリンへの脂質修飾によるアレイ阻害機構を解明した (**JMB** 355, 628-639 (2006), **BBA** 1778, 1181-1189 (2008))。

(2) イオンチャネルの構造と機能解析

神経伝達物質であるアセチルコリンの結合によってチャネルをすばやく開閉するアセチルコリン受容体のゲーティング機構を解明するために、スプレー法と急速凍結法を活用してチャネルが開いた構造の解析に成功し、以前に解析した閉じた構造 (2003 年に **Nature** に発表) から、リガンド結合ドメインがその下端のバリンを通してチャネル形成 M2 ヘリックスを僅かに動かすことで、すばやくチャネルを開閉する機構を解明した。電子線結晶学を用いて、電気シナプスをはじめ広い生物学的機能に関わるギャップ結合チャネル (Cx26) の閉じた構造を安定化する変異体 M34A の構造を解析し、**教科書を書き換えるプラグゲーティングモデルを提案した** (**PNAS** 104, 10034-10039 (2007))。さらに、X 線結晶学で解析した野生型の Cx26 の構造 (**Nature** 458, 597-602 (2009)) から、N-末端のヘリックスから成るプラグによるトランスジャンクショナルな膜電位依存性のプラグゲーティングモデルを提案した。

(3) GPCR 等の構造と機能解析

GPCR の 1 つの代表的受容体である ET_BR を昆虫細胞 SF+細胞を用いて発現し、リガンドが結合した状態の受容体を精製し結晶化を試みているが、構造研究は困難を極めている。それゆえ、各種構造安定化法の探索を進めている。胃の pH を 1 近くに保つためのプロトンポンプ HK-ATPase は、100 万倍ものプロトンの濃度勾配を形成できるが、電子線結晶学によるこのポンプの構造解析により、その驚異の分子機構を説明できるラチェットモデルを提案し、**EMBO Journal** に発表した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

極低温電子顕微鏡や周辺技術を独自に開発することにより、電子線結晶学を用いた膜蛋白質の構造研究のための技術を確立したので、膜蛋白質が脂質膜内にある状態の構造が高分解能で解析できるようになった。それゆえ、AQP0 を 1.9 Å 分解能で構造解析した例のように、現時点では電子線結晶学を用いて高分解能の構造解析がなされたすべての膜蛋白質について我々が貢献している。しかし、GPCR の構造が X 線結晶学により解析されはじめた状況を精査して ET_BR の構造と機能研究を行う必要がある。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1) K. Tani, T. Mitsuma, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Nishikawa, Y. Tanimura and **Y. Fujiyoshi**; "Mechanism of Aquaporin-4's Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion." **J. Mol. Biol.**, **389**, 694-706 (2009).
- 2) K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and **Y. Fujiyoshi**; "Inter-subunit interaction of gastric H⁺, K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle." **EMBO J.**, in the press (2009).
- 3) S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, **Y. Fujiyoshi** and T. Tsukihara; "Structure of the connexin-26 gap junction channel at 3.5 Å resolution." **Nature**, **458**, 597-602 (2009).
- 4) Y. Tanimura, Y. Hiroaki and **Y. Fujiyoshi**; "Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4." **J. Struct. Biol.**, **166**, 16-21 (2009).
- 5) H. Suzuki, K. Nishikawa, Y. Hiroaki and **Y. Fujiyoshi**; "Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues." **Biochem. Biophys. Acta.**, **1778**, 1181-1189 (2008).
- 6) A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, **Y. Fujiyoshi** and G. E. Sosinsky; "Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule." **PNAS**, **104**, 10034-10039 (2007).
- 7) K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and **Y. Fujiyoshi**; "Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity." **Biochim. Biophys. Acta.**, **1768**, 688-693 (2007).
- 8) T. Hige, **Y. Fujiyoshi** and T. Takahashi; "Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats." **Eur. J. Neurosci.**, **24**, 1955-1966 (2006).
- 9) Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi and **Y. Fujiyoshi**; "Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion." **J. Mol. Biol.**, **355**, 628-639 (2006).
- 10) T. Gonen, Y. Cheng, P. Sliz, Y. Hiroaki, **Y. Fujiyoshi**, S. C. Harrison and T. Walz; "Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals." **Nature**, **438**, 633-638 (2005).

ホームページ等

<http://em.biophys.kyoto-u.ac.jp/>