

# 生体分子間相互作用の構造生物学的研究

## Structural Biology of Intermolecular Interactions

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00502)

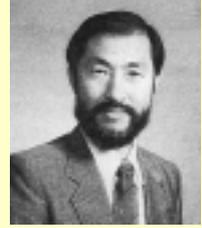
プロジェクトリーダー

藤吉 好則 京都大学大学院理学研究科・教授

コアメンバー

佐藤 公道 京都大学大学院薬学研究科・教授

光岡 薫 京都大学大学院理学研究科・助手



### 1. 研究目的

1) これまでに困難とされる膜蛋白質の構造解析を行う有力な方法を開発し、2) 膜蛋白質の構造研究における電子線結晶学の有用性を実証することを目的としている。

具体的には、水チャネル、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)、プロトンポンプなどの構造解析を目指し、それを通して、電子線結晶学が膜蛋白質の構造と機能研究を行う上で有力な方法となるかを検証することを目的とした。

### 2. 研究成果概要

1) 1990 年に R.Henderson ら [R.Henderson, J.M.Baldwin, T.Ceska, F.Zemlin, E.Beckmann and K.Downing, *J.Mol.Biol.* **213**, 899 (1990)] はバクテリオロドプシンの 3.5 Å 分解能での解析を行った。この解析により、膜蛋白質の構造を解析する 1 つの方法として電子線結晶学を用いることが 1 つの可能性として示された。これはこの分野の先駆的な仕事であったが、膜と垂直方向の分解能は 10 Å に満たない悪いものであったため、構造モデルの正確さが十分ではなかった。1994 年に光合成アンテナ蛋白質(LHCII)を 3.4 Å (膜と垂直方向に 4.5 Å) 分解能で解析できた [W.Kuehlbrandt, D.N.Wang and Y.Fujiyoshi, *Nature* **367**, 614 (1994)] ので、電子線結晶学を用いれば膜蛋白質の構造解析を行う 1 つの有力な手法となる可能性が大きくなった。このような分解能の向上が実現できた主な理由は、極低温電子顕微鏡を開発したことにある [Y.Fujiyoshi, T.Mizusaki, K.Morikawa, H.Yamagishi, Y.Aoki, H.Kihara and Y.Harada, *Ultramicroscopy* **38**, 241 (1991)]。最も重要な点は、試料を 4 K に冷却できるので、電子線損傷を室温に比べて 1/10 以下に減少させて像を撮影できることである。本プロジェクトで、この電子顕微鏡システムを改良して、氷に包埋したサンプルを直接 2 Å の分解能で観察できる使いやすい極低温電子顕微鏡を完成させた。すなわち、極低温電子顕微鏡を開発・改良するとともにコンピュータによる解析システムも改良し、膜蛋白質の構造研究のための有力なシステムを確立した (*Adv.Biophys.* **35**, 25-80 (1998))。この極低温電

子顕微鏡を、図 1 に示す。



図 1 第 3 世代の極低温電子顕微鏡

2) 膜蛋白質の 1 つの例として、光のエネルギーでプロトン膜の内側から外へポンピングするバクテリオロドプシンの 3 次元密度図を計算し、原子モデルを作製した。また、我々の解析では脂質分子の構造も決定した。電子線結晶学は膜に入ったままで膜蛋白質の構造を解析できるという特徴があるが、このバクテリオロドプシンの場合には生体内で 2 次元結晶を形成しているので、解析された脂質分子を含む構造は、生来のものであると期待できる。脂質分子に相当する密度図と脂質を含むバクテリオロドプシンの構造を図 2 に示す。すなわち、3 Å 分解能の解析でバクテリオロドプシンの原子モデルを作製するとともに、電子線結晶学で電荷の移動が解析できることを示唆した (*Nature* **389**, 206-211 (1997) & *J.Mol.Biol.* **286**, 861-882 (1999))。

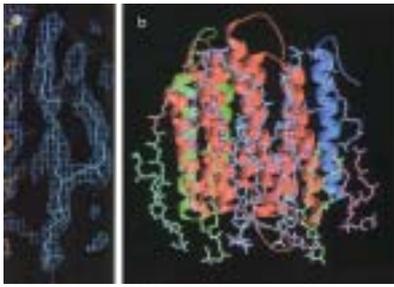


図2 脂質の密度図と分子モデル化(a) 脂質を含むバクテリオロドプシンの構造(b)

- 3) 地球上の生命は脂質 2 重膜で包まれた細胞から出来ており、しかもそれは水で満たされている。単純な脂質 2 重膜は水を僅かに透過するだけであるが、赤血球や腎臓などの細胞膜は多量の水を素早く透過することから、水を選択的に透過するチャネルの存在が予想されていた。最初に水チャネルであることが確認された膜蛋白質は、アクアポリン-1 と名付けられた。水チャネル、アクアポリン-1 はヒト赤血球から単離精製して 2 次元結晶を作製した。ところが、アクアポリン-1 は、ヒト由来の膜蛋白質であることから、結晶性の高い大きい 2 次元結晶は得られなかった。多くの試行錯誤の結果、最高の結晶でも結晶領域が  $1\ \mu\text{m}$  に満たないものであった。それでも、独自に開発した極低温高分解能電子顕微鏡を用いることで、分解能 3.8 Å の構造解析から、原子モデルを作製することが出来た。(図3)。この構造解析に基づいて、アクアポリン-1 についての研究から生じていた疑問に答えることができた。すなわち、このチャネルは 1 秒間に 20 億分子という非常に多くの水分子を透過するが、いかなる低分子物質もイオンも、プロトンさえも透過させない。プロトンは水分子が形成している水素結合のネットワークを通して実効的に容易に伝搬される。それゆえ、水を高速透過しつつプロトンの透過を阻止するには巧妙な機構が必要である。これらがどのように実現されているかが、電子線結晶学による構造解析で明らかになった。すなわち、水チャネル (AQP-1) の 6 Å 分解能での解析を行い (*Nature* 387, 624-627 (1997))、3.8Å 分解能での解析に成功して原子モデルを作製した。この結果、AQP-1 の発見以後長い間の疑問に構造学的な視点から答えを出した (*Nature* 407, 599-605 (2000))。

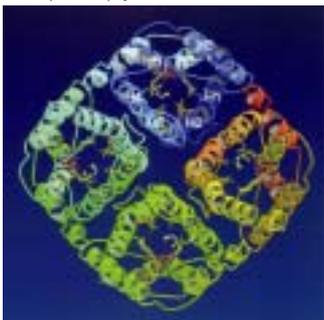


図3 アクアポリン - 1 の 4 量体の構造

4) nAChR の構造を 4.6 Å で解析した (*J.Mol.Biol.* 288, 765-786 (1999))。リガンドがチャネルの内側から結合部へ導入されて結合するという、新しいリガンド結合機構を示唆するとともに、細胞質側の新しい「窓」の存在とその意味を発見した。

5) GPCR (ETBR 等) の構造解析については、大量発現と精製のシステムを立ち上げ、受容体機能の研究を進めた (例えば、*Biochemistry* 39, 686-692 (2000)) が、結晶が作製できなかったため構造解析には至っていない。

6) なお、蛋白質の精製が困難で、不安定なために結晶化が困難な電圧感受性  $\text{Na}^+$  チャネルの立体構造を、極低温電子顕微鏡と単粒子解析法を用いて 19 Å 分解能で解析した (*Nature* 409, 1047-1051 (2001))。

以上のように、膜蛋白質の構造研究に電子線結晶学が有用であることを水チャネルとイオンチャネルについては実証した。

### 3. 結論

本事業により、すでに開発していた極低温高分解能電子顕微鏡の性能や操作性などを大きく改良することが出来た。またさらに、電子顕微鏡用試料の作製技術や構造解析用コンピュータプログラムなどの関連技術をも大きく進歩させることが出来た。それゆえ、2 次元結晶を作れば、X線結晶構造解析に匹敵するような原子モデルが作製される段階になった。実際、これまでに電子線結晶学で解析された 3 種類の膜蛋白質 (バクテリオロドプシン、光合成アンテナ蛋白質、水チャネル) の構造のすべては我々のシステムの寄与によって解析された。またこのシステムは欧米を始めとして世界各国が導入し始めている (現在までに、ドイツ 1 台、米国 2 台納入され、本年スウェーデンに 1 台納入される)。さらに、N.Unwin 博士 (英国ケンブリッジ MRCLMB) は、このシステムを用いた共同研究を行うために、頻繁に日本に滞在し、nAChR の構造解析を行っている。これを典型的な例として、世界からの共同研究の依頼が多数来ている。また、このシステムを用いて、引き続き膜蛋白質の構造と機能研究において、しかるべき成果を出せる見通しができつつある。本プロジェクトにより、困難な問題として残されてきた膜蛋白質の構造と機能の研究を推進できる展望が開けた。

### 4. 文献 (主要なもの五編)

- 1) T. Walz, T. Hirai, K. Murata, B. L. Smith, J. B. Heymann, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, P. Agre and A. Engel, *Nature*, 387, 624-627 (1997).
- 2) Y. Kimura, D.G. Vassilyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai and Y. Fujiyoshi, *Nature*, 389, 206-211 (1997).
- 3) A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell and N. Unwin, *J. Mol. Biol.*, 288, 765-786 (1999).
- 4) K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J.B. Heymann, A. Engel and Y. Fujiyoshi, *Nature*, 407, 599-605 (2000).
- 5) C. Sato, Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel and Y. Fujiyoshi, *Nature*, 409, 1047-1051 (2001).