

【基盤研究(S)】
生物系 (生物学)



研究課題名 電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究

京都大学・大学院理学研究科・教授 藤吉 好則

研究分野：総合領域

キーワード：分子・細胞神経科学

【研究の背景・目的】

遠い目標は、ヒトの能力や個性が形成される機構を原子レベルの分解能で構造的に理解することである。それに向かって、電子線結晶学を用いて、水チャンネル、イオンチャンネル、ギャップ結合チャンネル、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。そのために、これまで独自に開発してきた極低温電子顕微鏡システムを柱として、変異導入、遺伝子改変マウス作製、多様な電子顕微鏡技術、高分解能光学顕微鏡法、パッチクランプなど多様な手法を駆使することで、膜タンパク質の生理機能を構造生物学的に理解することを目指す。

【研究の方法】

本課題では、水チャンネル、イオンチャンネル、ギャップ結合チャンネル、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することを目指して、これまで独自に開発してきた極低温電子顕微鏡システムなどを活用する。特に、高分解能の構造解析から脂質分子や水分子を観察できて、スプレー法と急速凍結法を用いるとリガンド結合などの中間状態 (ダイナミクス) を研究できる電子線結晶学を柱とする研究手法を用いる。中でも、脳での発現が見られる水チャンネル AQP4 の構造を電子線結晶学を用いて解析することによって、水チャンネルでありながら、細胞接着性の機能を有することを発見して、“Adhennel”ファミリーと命名した。さらに、細胞接着性の機能とチャンネル機能を併せ持つことがわかっているギャップ結合チャンネルの構造を解析して、新しいプラグと名づけた密度を観察した。この電子線結晶学の結果とX線結晶学の高分解能の解析に基づいて、プラグゲーティングモデルを提案した。しかし、このチャンネルのゲーティング機構は複雑であり、特に細胞質側の構造を自然な状態で解析する必要がある。そのために、電子線結晶学を用いた構造解析を進めている。また、傾斜機構付きヘリウムステージを搭載した極低温電子顕微鏡を開発している。この極低温電子顕微鏡と電子線トモグラフィ法を用いて、ギャップ結合構造などを、脂質

2重膜を分離して観察できるような分解能で解析する。その他に、膜タンパク質の生理機能を理解するために、変異導入、遺伝子改変マウス作製、多様な電子顕微鏡技術、高分解能光学顕微鏡法、パッチクランプなど多様な手法を総合的に活用する。

【期待される成果と意義】

電子線結晶学を用いて、各種チャンネルの構造を解析することによって、それらの機能を分子レベルから深く理解できるようになる。構造に基づいた遺伝子改変マウスなどの解析から、構造と機能の関係を個体において確認できることも期待される。さらに、電子線トモグラフィ用極低温電子顕微鏡も開発したので、分解能が向上し、脂質2重膜を分離して観察できると共に、大きい膜タンパク質を直接観察できるようになってきている。さらに、高分解能光学顕微鏡 (ShinyaScope) をはじめ各種光学顕微鏡や、電気生理学的技術、構造に基づく遺伝子改変マウス作製など、幅広い技術を用いて研究している。膜タンパク質の高分解能の構造解析とそれらの機能研究とが密接に結びついた研究を進めることによって、構造生理学と名づける分野の発展を目指す。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ 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).
- ・ 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).

【研究期間と研究経費】

平成22年度－26年度
167, 100千円

【ホームページ等】

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