

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07266

研究課題名(和文)細胞間結合チャネルの高分解能単粒子解析

研究課題名(英文)High-resolution single particle analysis of intercellular channels

研究代表者

大嶋 篤典(Oshima, Atsunori)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・教授

研究者番号：80456847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：線虫が持つギャップ結合チャネルのinnexin-6(INX-6)の構造研究をクライオ電子顕微鏡を用いて行い、可溶化状態の原子構造を決定した。INX-6は16量体を形成し、オープン状態の構造と解釈された。INX-6はヒトに存在するコネキシン26とアミノ酸配列の類似性が見られないにもかかわらず、その構造は非常によく似ていた。また脂質ナノディスクに再構成したINX-6ヘミチャネルの構造解析にも成功し、脂質二重膜内ではN末端が構造変化するとともに、チャネルの通路を埋める密度が確認された。この結果からチャネル通路の開閉に脂質分子が関与するという知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにしたINX-6の構造解析から、新規の膜タンパク質複合体の原子構造の決定に、結晶化を必要としないクライオ電子顕微鏡単粒子解析法が有効であることを示した。無脊椎動物と脊椎動物ではアミノ酸配列の相同性の低いタンパク質から共通点の多いチャネル構造が形成されることを明らかにした。クライオ電子顕微鏡法は、創薬ターゲットとして大きな割合を占める膜タンパク質の構造研究に今後も役立てられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We obtain the cryo-electron microscopy structures of *Caenorhabditis elegans* innexin-6 (INX-6) gap junction channels at atomic resolution. The INX-6 gap junction channel comprises hexadecameric subunits in an open state. The INX-6 structure is highly similar to the human connexin-26 structure, despite the lack of significant sequence similarity. We also have a hemichannel structures of INX-6 in a lipid nanodisc showing that flat double-layer densities obstruct the channel pore. Comparison of the hemichannel structures of a wild-type INX-6 in detergent and nanodisc-reconstituted N-terminal deletion mutant reveal that lipid-mediated N-terminal rearrangement and pore obstruction occur upon nanodisc reconstitution. Together with molecular dynamics simulations and electrophysiology functional assays, our results provide insight into how the large-size pore of gap junction hemichannels can be completely closed in a lipid bilayer.

研究分野：構造生物学

キーワード：ギャップ結合チャネル クライオ電子顕微鏡 高分解能構造解析 イネキシン 単粒子解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほぼすべての多細胞生物はギャップ結合チャンネルと呼ばれる細胞間コミュニケーションを担う膜貫通構造を保持している。この構成タンパク質には2種類あり、一つは脊椎動物に見られるコネキシン(Cx)、もう一つは無脊椎動物が持つイネキシン(INX)である。これらはいずれも4回膜貫通型であるが、アミノ酸配列の相関性は認められない (Phelan (2005) *Biochim Biophys Acta* 1711, 225)。アミノ酸配列の相関性が低く、進化的な関係が不明瞭な2種類のタンパク質が、ギャップ結合チャンネルという巨視的には似た構造を別々に作るに至った学問的な意義は不明である。またギャップ結合チャンネルの開閉機構については未解明の点が多い。こうした疑問に答えるため、ギャップ結合チャンネルの立体構造とその開閉機構を解明するための研究に取り組んでいる。

(1)コネキシン 26(Cx26)の三次元構造と開閉機構の研究

脊椎動物に存在するコネキシンギャップ結合チャンネルの開閉機構の解明を目的として、透過活性の低下が知られているヒト Cx26M34A 変異体 (Oshima et al. (2003) *JBC* 278, 1807)の電子線結晶構造解析を行った。10Å 分解能の三次元再構成を行い、チャンネルの入口を物理的にふさぐプラグを確認した (Oshima et al. (2007) *PNAS* 104, 10034)。大阪大学月原研との共同研究で得られた Cx26 野生型の X 線結晶構造では、N 末端がチャンネル通路入口の内側で漏斗状の構造を形成していた(Maeda et al. (2009) *Nature* 458, 597)。

(2)イネキシン-6(INX-6)の電子線結晶構造解析

無脊椎動物に存在するイネキシンギャップ結合チャンネルの構造と開閉機構を理解するため、線虫が持つギャップ結合チャンネルタンパク質 INX-6 の電子線結晶構造解析を行った。INX-6 の二次元結晶を作製し、三次元再構成を 10Å 分解能で計算した。その結果、INX-6 ギャップ結合チャンネルは 16 量体構造で、チャンネルの通路に 4 つの密度が存在することを明らかにした(Oshima et al. (2016) *J. Mol. Biol.* 428, 1227)。

2. 研究の目的

本研究は線虫が持つギャップ結合チャンネルタンパク質 INX-6 の構造を極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析で高分解能構造解析し、INX-6 の開閉機構を解明する。そのために分解能の向上に必須である direct electron detector を装着した極低温電子顕微鏡を用いると共に、膜タンパク質の高分解能単粒子解析に必要な試料調製法の開発を行う。本研究によって、可溶化状態と脂質二重膜に再構成された状態の INX-6 の高分解能構造解析を行って、ギャップ結合チャンネルの開閉機構の解明に迫る。同時に単粒子解析の専門性を向上させて、膜タンパク質を高分解能構造解析する手段として今後の研究に単粒子解析を適用するための基盤技術の確立を目指した研究を行う。

3. 研究の方法

(1) INX-6 ギャップ結合チャンネルのクライオグリッド試料調製の最適化

通常膜タンパク質は界面活性剤を含んだ状態で精製される。しかしフリーの界面活性剤ミセルはそれ自身がクライオ電子顕微鏡像の粒子のコントラストを下げるほか、ミセル存在下ではクライオグリッドのホールの中央から粒子が逃げていなくなる傾向があるため、薄い氷の膜に埋まった粒子の試料を作製しにくい。そこで、INX-6 チャンネルの精製標品からフリーの界面活性剤ミセルを除去するため、グリセロール密度濃度勾配超遠心法の GraDeR(Hauer et al. (2015) *Structure* 23, 1769)を用いて調製した試料からクライオグリッドを作製し、粒子のコントラストの上昇を試みた。

(2) クライオ電子顕微鏡による INX-6 の高分解能構造解析

クライオ電子顕微鏡は日本電子製 JEM-3000SFF を使い、データ記録は Gatan 製の K2 summit direct electron detector を用いて行った。電子線照射中の試料微動を補正し、EMAN2 で自動ピクアップした粒子を、RELION でクラス分けと精密化の計算を行って三次元再構成を行った。

(3) 脂質ナノディスク再構成とクライオ電子顕微鏡構造解析

INX-6 のヘミチャンネルを精製し、脂質二重膜内で構造解析するために POPC と MSP2N2 を用いたナノディスク再構成を行った。また、INX-6N 末端欠失変異体(INX-6Ndelta)ヘミチャンネルのナノディスク再構成と野生型 INX-6 ヘミチャンネルの可溶化状態の構造解析を行って比較した。

4. 研究成果

(1) 線虫 INX-6 ギャップ結合チャンネルの可溶化状態のクライオ電子顕微鏡高分解能構造解析
野生型 INX-6 を精製し、GraDeR 法(Hauer et al. (2015) *Structure* 23, 1769)によって界面活性剤ミセルを除去した(図 1)。この試料からクライオグリッドを作製し、クライオ電子顕微鏡像の収集を行った。画像解析の結果 INX-6 ヘミチャンネルを 3.3Å 分解能で(図 2(a))、INX-6 ギャップ結合チャンネル(16 量体)を 3.6Å 分解能で構造解析することに成功し、原子モデルの構築に成功した(図 2(b))。INX-6 単量体の構造は N 末端ヘリックス、膜貫通ヘリックスの配置、2 本の細胞外ループ間の S-S 結合が Cx26 と一致していた。INX-6 ギャップ結合チャ

ネルは鼓型で、チャンネル通路の入口の中で N 末端がファネル構造を取っていることも Cx26 と共通していた(図 2(c))。チャンネルの通路は最も狭い部分でも 10Å 以上の直径があり、オープン状態と考えられた。INX-6 の細胞内ドメインはヘリックス-ターン-ヘリックス-モチーフが多く、細胞内ループと C 末ループが相互作用してコアを形成していた。これが多量体構造中では 8 個連なって屋根型の細胞質ドームを形成しており、その下端がファネルを作る N 末端ループと相互作用する位置にあった。本研究により明らかになった INX-6 と Cx26 の構造の類似性は、2 つの遺伝子ファミリーの遺伝的な祖先が同一で、分岐から非常に長い時間を経て相同性が見られないほどにアミノ酸配列が変化した可能性を示唆する。INX-6 のドーム状の細胞質ドメインはギャップ結合チャンネルとして初めて解明された部分である。細胞質ドームのコンフォメーション変化は容易に N 末端ファネルに伝わることから、INX-6 の細胞質ドメインがチャンネルの透過活性に関与していると解釈される(図 2(d))。また N 末端のファネル構造は Cx26 と INX-6 で共通していることから、ギャップ結合ファミリーにおいて保存されている可能性が示され、N 末端ファネルがギャップ結合チャンネルの物質透過の制御機構の中で最も重要な部分を担うと考えられる。本研究によって、自然界に存在するギャップ結合チャンネルにはアミノ酸配列や立体構造に多様性が存在しつつも、その機能に主要な部分は保存されているという、ギャップ結合チャンネルの構造と機能に関する新たな解釈が得られた。また本研究は GraDeR を用いて膜タンパク質の原子分解能単粒子解析を達成した最初の例となり、今後さらに需要の高まるクライオ電子顕微鏡の分野において、膜タンパク質の高分解能単粒子解析を実現するサンプル調製法の一つとして、今後広く利用される可能性を示すものである。本研究は論文としてまとめ、Nature communications 誌に発表した(Oshima et al. (2016) Nat. Commun. 7, 13681)。

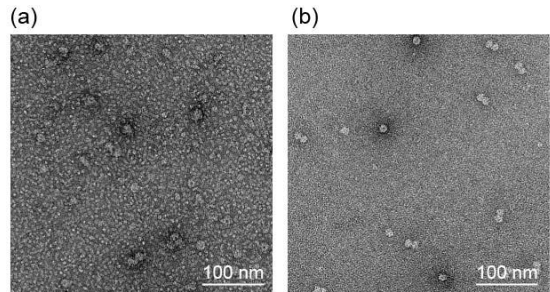


図 1 INX-6 チャンネルの GraDeR による界面活性剤除去 (a) GraDeR 前の INX-6 チャンネル (b) GraDeR 後の INX-6 チャンネル

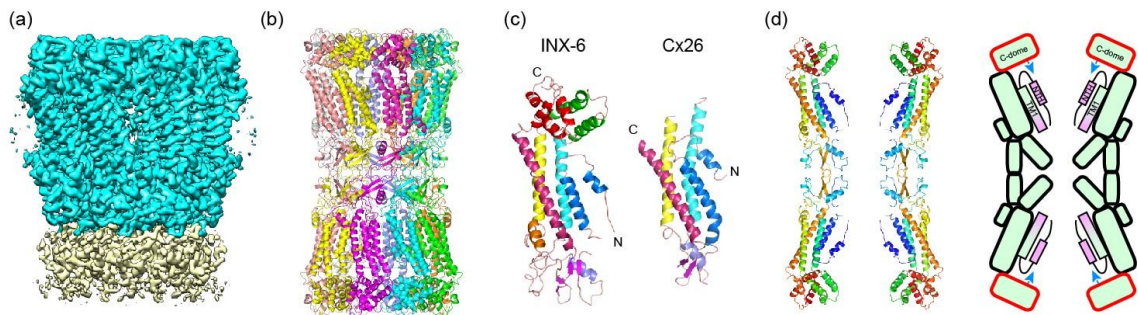


図 2 INX-6 のクライオ電子顕微鏡高分解能単粒子解析

(2) INX-6 ヘミチャンネルのナノディスク再構成状態と可溶化状態のクライオ電子顕微鏡高分解能構造解析

クライオ電子顕微鏡単粒子解析で既に解かれた線虫 innexin-6(INX-6)の原子構造はギャップ結合を形成した状態で、かつ可溶化状態のチャンネルであった(Oshima et al. (2016) Nat. Commun. 7, 13681)。より天然に近い状態で機能を解明するためには、本来膜タンパク質が機能する脂質二重膜中に再構成された状態での構造解析が望ましい。また、ギャップ結合形成メカニズムを理解するためには、ギャップ結合が外れたヘミチャンネルの状態での構造解析を行う必要がある。これらの目的を達成するため、INX-6 ヘミチャンネルをナノディスク脂質二重膜に再構成した状態でクライオ電子顕微鏡構造解析に取り組んだ。

ナノディスク再構成した野生型 INX-6 ヘミチャンネルの構造はチャンネルのポアの中に二重層の密度が現れ(図 3(a)) 細胞外領域の特に第 2 ループが不安定化していた。この構造からギャップ結合形成時に細胞外第 2 ループの持つ相互作用の重要性が示唆された。可溶化状態の野生型 INX-6 チャンネルとナノディスクに再構成した N 末端欠失変異体の構造と比較すると(図 3(b, c))、脂質二重膜が存在するか否かで N 末端の配置が異なっており、ナノディスク再構成によってポアの通路が妨げられていると解釈されるものであった。共同研究に基づく分子動力学シミュレーションでは脂質分子が隣接するサブユニットの膜貫通領域の間に入り込んでいく様子が確認され、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的機能解析の結果は intact な N 末端が正常にポアを開くのに不可欠であることを示すものであった。これらを総合すると、INX-6 ギャップ結合チャンネルが持つ大きなポアが脂質二重膜中でどのように閉じるのかという問題について、脂質分子がチャンネルのポアに入り込むことによって INX-6 の N 末端が構造変化を起こし、ポアを塞ぐというメカニズムが示唆された。本研究は論文としてまとめ、現在投稿中であ

る。

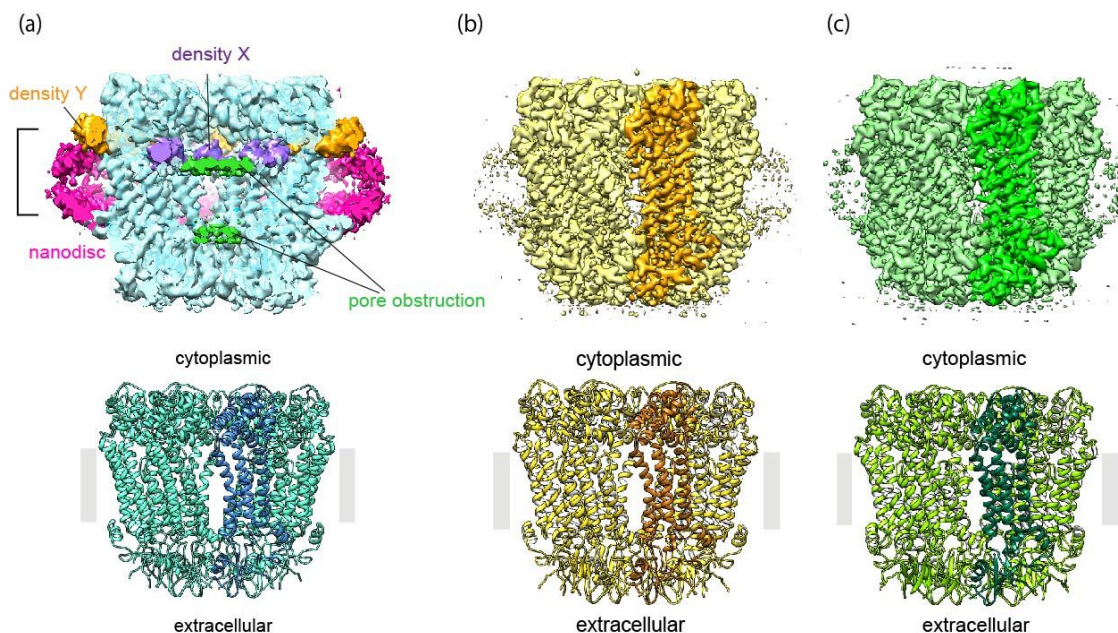


図3 INX-6ヘミチャネルのクライオ電子顕微鏡構造解析

- (a) ナノディスク再構成された野生型 INX-6 ヘミチャネルのマップ (上) とモデル (下)
(b) ナノディスク再構成された INX-6 の N 末端欠失変異体のマップ (上) とモデル (下)
(c) GraDeR によって調製された可溶化状態の INX-6 ヘミチャネルのマップ (上) とモデル (下)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Oshima, A., Potential of cryo-EM for high-resolution structural analysis of gap junction channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 54, 78-85, 2019 (査読有)
2. 大嶋篤典 イネキシנגァップ結合チャネルの原子分解能単粒子解析 顕微鏡, 52, 153-159, 2017 (査読無)
3. Oshima, A., “Structure of an innexin gap junction channel and cryo-EM sample preparation” *Microscopy* 66, 371-379, 2017 (査読有)
4. Oshima, A., Tani, K. and Fujiyoshi, Y. “Atomic structure of the innexin-6 gap junction channel determined by cryo-EM” *Nat. Commun.* 7, 13681 doi: 10.1038/ncomms13681, 2016 (査読有)
5. 大嶋篤典 ギャップ結合チャネルの構造と多様性、膜(MEMBRANE), 41(2), p.50~p.56, 2016 (査読無)

[学会発表](計 16 件)

1. 大嶋篤典、細胞間結合チャネルのクライオ電子顕微鏡法、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 29 日(木)、パシフィコ横浜、横浜、
2. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡を用いたギャップ結合チャネルの構造研究、第 79 回応用物理学会秋季学術講演会、2018 年 9 月 18 日(火)~21 日(金)、名古屋国際会議場、名古屋、
3. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡用の試料調製とデータ収集、PF 研究会 : X 線とクライオ電子顕微鏡で挑む生命の機能と私たち、2018 年 9 月 7 日(金)~8 日(土)、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 小林ホール、つくば、
4. 大嶋篤典、ギャップ結合チャネルのクライオ電子顕微鏡構造解析と試料調製、日本顕微鏡学会 第 74 回学術講演会、2018 年 5 月 29 日(火)~31 日(木)、久留米シティプラザ、久留米、
5. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を利用した膜タンパク質複合体の構造研究、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日(日)~3 月 28 日(水)、ガーデンホテル金沢、金沢、
6. 大嶋篤典 創薬を目指したクライオ電子顕微鏡による構造研究、第 4 回 名古屋大学の卓越・先端・次世代シンポジウム「生命科学のフロントランナー」、2018 年 1 月 11 日(木)

名古屋大学、名古屋、

7. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡法を用いたギャップ結合チャネルの構造研究 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017 年 12 月 6 日(水)~9 日(土)神戸ポートアイランド、神戸、
8. 大嶋篤典、Single particle cryo-EM of a gap junction channel 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日(火)~21 日(木) 熊本大学、熊本、
9. Oshima, A., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., Structure of the C. elegans innexin-6 Gap Junction Channel, Microscopy & Microanalysis 2017 meeting, August 6 – August 10, 2017, St. Louis, MO
10. Oshima, A., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., Cryo-EM structure of an innexin gap junction channel at atomic resolution, Janelia Conference “Electrical Synapses” April 30 – May 3, 2017, Janelia Research Campus, Ashburn, VA
11. 大嶋篤典、谷一寿、藤吉好則 クライオ電子顕微鏡を用いた INX-6 ギャップ結合チャネルの原子分解能単粒子解析 日本薬学会第 137 回年会 2017 年 3 月 24 日(金)~27 日(月) 仙台国際センター、仙台、
12. 大嶋篤典、ギャップ結合チャネルの構造と cryo-EM サンプル調製法 日本学術振興会構造生物 169 委員会 第 52 回研究会 2017 年 3 月 6 日(月) 東京大学山上会館、東京、
13. 大嶋篤典、Cryo-EM Hands-on Workshop 2017 年 2 月 23 日(木)~24 日(金) 東京大学、東京
14. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡による膜タンパク質の高分解能単粒子解析 第 3 回名古屋大学-ラクオリア創薬 創薬シンポジウム 2016 年 12 月 8 日(木) 名古屋大学鶴舞キャンパス 鶴友会館、名古屋、
15. 大嶋篤典、クライオ電子顕微鏡による Innexin-6 ギャップ結合チャネルの原子分解能構造 日本顕微鏡学会関西支部特別講演会 2016 年 10 月 29 日(土) 京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ、宇治、
16. 大嶋篤典、ギャップ結合チャネルの多様な構造と機能 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日(日)~27 日(火) 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス、仙台、

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。