

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770147

研究課題名(和文)プロトン濃度勾配維持に関連する膜タンパク質の電子線結晶学を用いた構造機能解析

研究課題名(英文)Electron crystallographic analysis of two dimensional crystals of membrane proteins maintaining proton gradient

研究代表者

谷 一寿(Tani, Kazutoshi)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・特任准教授

研究者番号：20541204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電子線結晶学のための構造解析方法を開発し、膜タンパク質である水チャネル(aquaporin-4)及び胃プロトンポンプ(H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase)の立体構造を生体内に近い脂質二重膜内に存在する状態で観察することで、それぞれの立体構造と機能との相関を解析した。その結果、各々異なる様式でプロトン濃度勾配を維持しつつも、物質輸送を行うための重要な調節箇所を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Our developed software package for electron crystallography is very powerful and effective to determine three dimensional structures of membrane proteins reconstituted into lipid bilayers including aquaporin-4 and gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Using electron crystallography of two-dimensional crystals, we could elucidate their structures and conformational changes during molecular passages.

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：高分解能電子顕微鏡解析 タンパク質 構造生物学 電子線結晶学 二次元結晶 アクアポリン aquaporin-4 H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 膜

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜を介したプロトンの濃度勾配は、エネルギー合成や電位差による信号伝達をはじめ多くの生命活動維持という点において重要な働きをしており、勾配差の消失は生命活動において致命的であることを意味している。プロトンは、水素結合を形成した水分子のネットワーク下においては、プロトンワイヤと呼ばれる電荷移動の現象を使って、分子の拡散速度よりも非常に速い速度で移動することもできる。そのため水チャネルのように速い水透過を実現しつつプロトンの透過を阻害する機構や、胃壁細胞内外におけるプロトン濃度勾配差  $10^6$  倍にも到達できる胃プロトンポンプの能動輸送および逆流を防ぐ機構については、依然多くの疑問が残されている。

プロトン勾配差のように膜によって隔てられることが生理学的に重要な場合、できる限り生理的条件に近い、つまり脂質に埋まった状態の膜タンパク質の構造機能解析を進めることに意義があり、本研究の課題を進める必要があると考えている。

### (1) 水チャネルの高い水の選択性と速い水透過性機構

脳での発現量が多い aquaporin-4(AQP4)の構造は、我々が最初に構造解析しており、この分子の構造研究については世界的に一日の長がある。特に構造的考察から AQP4 における細胞接着機能を示唆し、実験により証明した点はユニークであり、その際提唱した「チャンネルでありながら細胞接着の機能を有する(adhennel)機能」に高い注目がなされるようになってきている。更に AQP4 の高分解能での立体構造解析を行うことで、脂質やチャンネル内の水分子を可視化することに成功している。

### (2) 胃プロトンポンプのプロトン逆流を防ぐラチェット機構

胃壁細胞に多く発現している胃プロトンポンプは、胃酸分泌によってバクテリア等の体内への侵入を防ぎ、消化を助けてくれるが、過剰な分泌は胃潰瘍を引き起こすことから、古くからの薬剤ターゲットとしても知られている。プロトンポンプは P 型 ATPase に属し、酵素活性のある  $\alpha$  鎖とフォールディングを助ける  $\beta$  鎖から構成されており、 $\alpha$  鎖は筋小胞体に多く含まれるカルシウムポンプと高い相同性を有する。カルシウムポンプの場合には、既にほとんどの反応中間体が原子分解能で立体構造決定されたことで解明が進んでいるが、これまでプロトンポンプではほとんど構造情報がなかった。我々のグループが今年発表した極低温電子顕微鏡による 6.5 Å 分解の立体構造が、ほぼ唯一であり、それと共に「酵素活性に直接関与しないとされていた  $\beta$  鎖がプロトンの逆流を防ぐラチェッ

トとして機能する」という新しいモデルを提唱し、変異体の実験と立体構造から証明することができている。

## 2. 研究の目的

膜タンパク質におけるプロトン濃度勾配維持機構に関して、水チャネルを中心として電子線結晶解析を用いて構造を決定し解明することを目的としている。本解析手法を用いることで、膜タンパク質が生体内に近い脂質二重膜内に存在する状態を実現できるため、病気の原因を分子レベルで理解する上での大きな知見が得られると予想される。具体的には、1) プロトンの移動を伴わない水チャネルの高い水の選択性と速い水透過性機構、2) 胃プロトンポンプのプロトン逆流を防ぐラチェット機構を、極低温電子顕微鏡から得られたデータを用いて立体構造を決定し、分子レベルから理解することを目指したい。

## 3. 研究の方法

これまでに多くの膜タンパク質の立体構造を原子分解能で解析してきた実績をもつ、第三世代の極低温電子顕微鏡(JEOL-3000SFF)を用いて、膜タンパク質二次元結晶から電子顕微鏡写真あるいは電子線回折図形を収集した。得られたデータに対して、開発した解析ソフトウェアを適用させて構造解析を行ない立体構造を得ることができた。

## 4. 研究成果

### (1) 電子線結晶学のための構造解析方法開発

#### ① 解析ソフトウェア開発

スタンダードな電子線結晶学解析ソフトとして広く使用されている MRC パッケージは、解析の理論および手法としては成熟しているものの操作性に難しさがあり、通常の使用においては1枚の画像解析に1時間程度の時間が必要となっていた。一方で、変異体や様々なリン酸化アナログとの共結晶など、解析すべき対象は増えてきており、解析の時間短縮改善は急務を要していた。

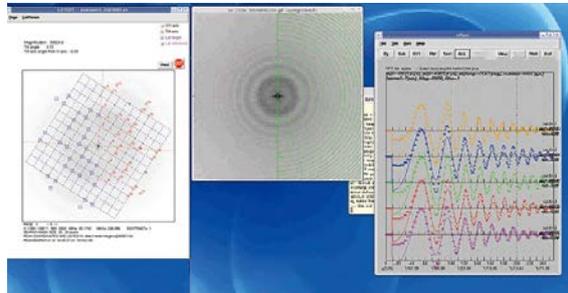


図1. 開発した電子線構造解析ソフト

そこで操作性が容易なグラフィックインターフェース(GUI)を開発し、それに伴い構

造解析プログラムも更新し効率化を図った。新しく開発したソフトウェアを使用することで、データ収集を含めて最短3ヶ月程度で8 Å分解能の立体構造を得ることも可能になった。このような操作性向上により、ギャップ結合チャンネルを構成するコネキシン26、ミドリムシの細胞膜に多く存在するIP39、バクテリア由来Naチャンネル等と多くの膜タンパク質の立体構造を従来と比較して短時間での決定が可能になった。下記は、その操作画面一例(図1)。

また、得られたH<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの三次元再構成像の信頼性を評価する客観的な方法として、Bootstrap法を電子線構造解析法への適用を試みることで、8 Å分解能でも重い原子のRb<sup>+</sup>を使用すればイオン結合サイトの占有変化をはっきりとデンシティの変化として示せることがわかった。(3)③の説明と図6を参照)

## ②試料調整法の改善

二次元結晶の試料調整時に、支持膜であるカーボンで挟み込むことはチャージアップとよばれる現象を抑えることに大変有効であることは既に2006年に報告している。一方で、この方法は単にこの現象を抑えて画像解析が可能な良質な電子顕微鏡像の割合を増やすだけでなく、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseのような水溶性部位が大きな膜タンパク質の場合、カーボンサンドウィッチが二次元結晶の保水効果を高めてくれることで、結晶の質も維持してくれることを示すことができた(図2)。(阿部一啓博士との共同研究)

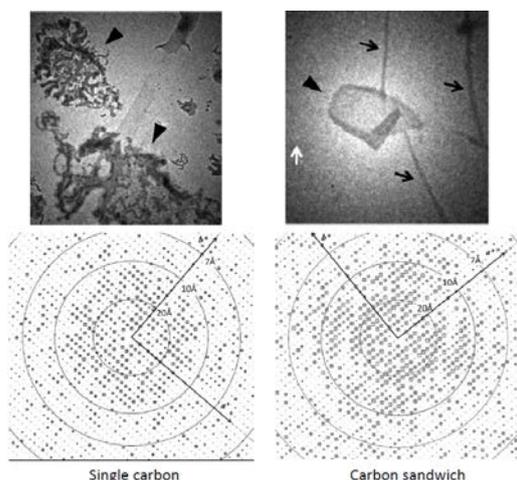


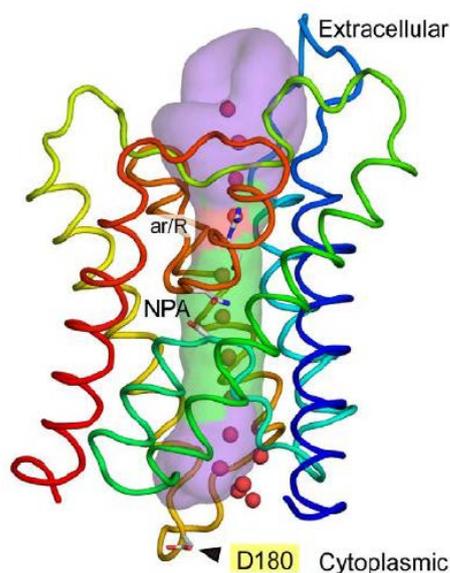
図2. カーボンサンドウィッチ法の保水効果  
通常の試料調整法(左)では、結晶のそばでも塩析出が認められ(黒矢頭)、最も保存状態のよい結晶を用いても下図反射点のS/N比分布図で10 Å分解能程度までに留まる。

## (2)水チャンネルAQP4の立体構造と機能

### ①細胞室側による水透過機構調節

ループD領域に存在するAQP4のSer180は、リン酸化を介して水透過速度を減少させることが知られており、脳内における水分調節に関与していると考えられている。そこでリン酸化を模倣する変異体としてAspを180番目の残基に導入したものの、*in vitro*で再構成膜を使用したproteoliposomeの系でも、*in vivo*のHEK293細胞に強制発現させた場合でも、水透過性は野生型と比較して顕著な変化はなかった。これは、原子分解能で決定した変異体と野生型の立体構造比較とも一致し、変異体は透過経路が開状態であることを示唆した(図3)。このことよりAspでは、負電荷が不足して閉状態の構造変化を誘導できなかった可能性が高いと考えられる。

図3. AQP4のSer180変異体立体構造



### ②チャンネル内の水分子

2.8 Å分解能で構造解析された水チャンネルAQP4変異体の立体構造と、これまでに構造が決定されている他の水チャンネルに対して膜貫通部分を用いて主鎖を重ね合わせた後比較したところ、水分子の位置は基本的にチャンネルポアを形成しているループ領域の主鎖由来のカルボニル基の酸素と水素結合を形成して位置を安定化させていることが示唆された。また、これまでの構造解析及び分子動力学計算で示唆されていたようにsingle fileとして水分子がチャンネル内を通過すると言われていた様子も、この重ね合わせの水分子の位置の様子ともよく一致することが確認できた。

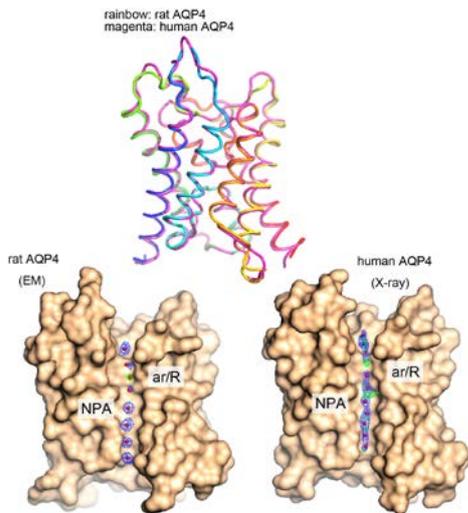


図4. AQP4 立体構造比較(電子線、X線)

また、種によるアミノ酸の違いはあるもののラットとヒトの AQP4 分子は、それぞれ電子線(2.8 Å分解能)とX線(1.8 Å分解能)構造解析によって決定されており、それらの比較を行ったところ RMSD=0.607 Å とほぼ同じ立体構造をとることがわかった。しかしながら、水分子の見え方が大きく異なっており、分解能が高いX線構造解析の結果のほうが水分子由来のデンシティは繋がって見えていることから、脂質によるポアヘリックスの双極子モーメントの増大が示唆された(図4)。

### (3) 胃プロトンポンプの立体構造と機能

(阿部一啓博士との共同研究)

#### ① 胃酸抑制剤との共結晶構造

新型の胃酸抑制剤である胃プロトンポンプ阻害剤 SCH-28080 との共結晶構造決定(図5a)に成功し、デンシティマップにフィットさせたホモロジーモデルに対して阻害剤とのリガンドドッキング計算を行うことで位置の推定を行ったところ、リガンド結合推定位置に相当する箇所タンパク質由来以外のデンシティが確認されたのみならず、これまで実験によって推定されてきたリガンド結合に重要とされてきた膜貫通ヘリックス4、5、および6の近傍にあるルーメン側のくぼみにあるアミノ酸残基付近に位置することも判明した(図5b)。

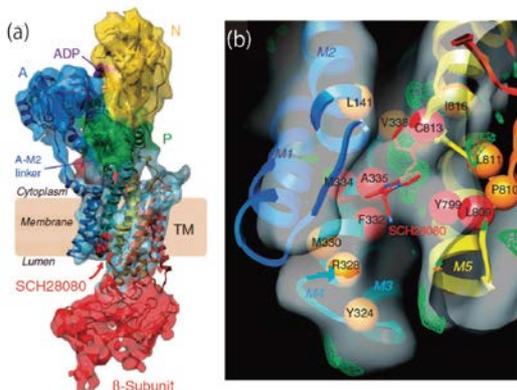


図5. 胃プロトンポンプの立体構造

(a) 全体構造, (b) 薬剤 SCH-28080 (赤色 stick 表示)の結合部位

特に SCH-28080 の結合部位は、膜貫通ヘリックスの再配置によって形成され、この変化は細胞質側のドメインにも伝わり、その結果ルーメン側で開いたコンフォメーションを取ることになる。今回の結果は、胃プロトンポンプの胃酸抑制剤結合部位についての最初の構造学的証拠であり、この種の薬剤によって誘導されるコンフォメーション変化を明らかにしており、低分解能の立体構造ながら阻害剤の改良に向けた情報を提供できた。

#### ② K イオン存在下での結晶構造

胃プロトンポンプは、ATP エネルギーを消費して細胞外  $K^+$  と細胞内  $H^+$  (胃酸) を交換することで胃内腔を pH 1 に保つことができる。ATP の加水分解エネルギーは有限のため、細胞内外の pH 差が広がるにつれて、輸送する陽イオンの量子数が通常の  $2K^+/2H^+$  から  $K^+/H^+$  へと減ることが予想されたが、実際に確認されたことはなかった。本研究では、 $K^+$  と同じ第一族元素で重い  $Rb^+$  を使って  $Rb^+ \cdot E2 \sim A1F$  状態の立体構造を決定したところ 8 Å 分解能であっても  $Rb^+$  の位置が一か所であることを示唆でき、生化学的にもこの量子数の変化を検出することができた。また、結晶学的統計値が多少悪くなるものの  $K^+$  結合型の立体構造も決定し、 $Rb^+$  結合型と同じであることも確認した。

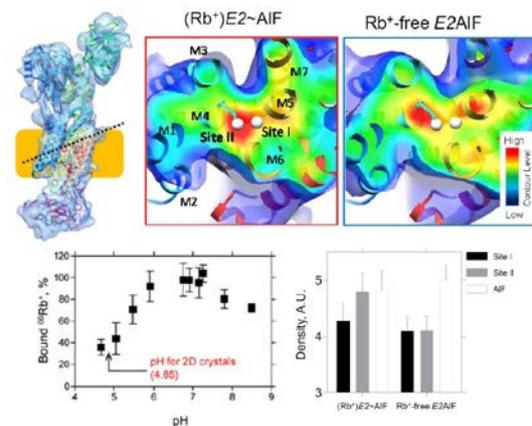


図6.  $Rb^+$  結合に伴う胃プロトンポンプの立体構造変化

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① H. Suzuki\*, T. Nishizawa\*, K. Tani\*, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki and Y.

- Fujiyoshi, “Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions”, *Science* **344**, 304-307, 2014, 査読有 (\*Equally first author)
- ② S. Shimada, K. S-Itoh, S. Amano, Y. Akira, A. Miyazawa, T. Tsukihara, K. Tani, C. Gerle and S. Yoshikawa, “Three-dimensional structure of bovine heart NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by electron microscopy of a single negatively stained two-dimensional crystal”, *Microscopy* **63**, 167-174, 2014, 査読有
- ③ K. Tani and Y. Fujiyoshi, “Water channel structures analysed by electron crystallography”, *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 1605-1613, 2014, 査読有
- ④ S. Maeda, K. S-Itoh, K. Mieda, M. Yamamoto, Y. Nakashima, Y. Ogasawara, C. Jiko, K. Tani, A. Miyazawa, C. Gerle and S. Yoshikawa, “Two-dimensional crystallization of intact F-ATP synthase isolated from bovine heart mitochondria”, *Acta Cryst.*, **F69**, 1368-1370, 2013, 査読有
- ⑤ F. Yang, K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi, “Carbon sandwich preparation preserves quality of two-dimensional crystals for cryo-electron microscopy”, *Microscopy* **62**, 597-606, 2013, 査読有
- ⑥ C. J. Tsai\*, K. Tani\*, K. Irie\*, Y. Hiroaki, T. Shimomura, D. G. McMillan, G. M. Cook, G. F. X. Schertler, Y. Fujiyoshi and X. D. Li, “Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel”, *J. Mol. Biol.* **425**, 4074-4088, 2013, 査読有 (\*Equally first author)
- ⑦ K. Tani, C. P. Arthur, M. Tamakoshi, K. Yokoyama, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi and C. Gerle, “Visualization of two distinct states of disassembly in the bacterial V-ATPase from *Thermus Thermophilus*”, *Microscopy* **62**, 467-474, 2013, 査読有
- ⑧ H. Suzuki, Y. Ito, Y. Yamazaki, K. Mineta, M. Uji, K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi and S. Tsukita, “Strand formation by a trimeric unit repeat of four-transmembrane proteins in *Euglena*”, *Nat. Commun.*, **4**, 1766 pp1-8, 2013, 査読有
- ⑨ K. Abe, K. Tani, T. Friedrich and Y. Fujiyoshi, “Cryo-EM structure of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase with a single occupied cation-binding site”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18401-18406, 2012, 査読有
- ⑩ K. Yakata, K. Tani<sup>§</sup> and Y. Fujiyoshi, “Water permeability and characterization of aquaporin-11”, *J. Struct. Biol.* **174**, 315-320, 2011, 査読有 ( §Corresponding author.)
- ⑪ K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi, “Conformational rearrangement of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase induced by an acid suppressant”, *Nat. Commun.* **2**, 155, 2011, 査読有
- ⑫ A. Oshima, K. Tani, M. M. Toloue, Y. Hiroaki, A. Smock, S. Inukai, A. Cone, B. J. Nicholson, G. E. Sosinsky and Y. Fujiyoshi, “Asymmetric Configurations and N-terminal Rearrangements in Connexin26 Gap Junction Channels”, *J. Mol. Biol.* **405**, 724-735, 2011, 査読有
- ⑬ T. Mitsuma\*, K. Tani\*, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, H. Suzuki, H. Hibino, Y. Kurachi and Y. Fujiyoshi, “Influence of the cytoplasmic domains of aquaporin-4 on water conduction and array formation”, *J. Mol. Biol.* **402**, 669-681, 2010, 査読有 (\*Equally contributed.)
- ⑭ K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi, “Structural and functional characterization of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase with bound fluorinated phosphate analogs”, *J. Struct. Biol.* **170**, 60-68, 2010, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 谷一寿, “極低温電子顕微鏡による膜タンパク質の二次元結晶構造解析”, 日本顕微鏡学会, 2014, 幕張メッセ国際会議場 (風戸賞受賞講演)
- ② 伊藤泰行, 鈴木博視, 山崎裕自, 峯田克彦, 氏昌未, 阿部一啓, 谷一寿, 藤吉好則, 月田早智子, “Strand-forming polymerization of four-transmembrane proteins in *Euglena* through intermolecular interactions of tandem trimers”, 第62回日本細胞生物学会大会 (2013年6月19~21日), ウィンクあいち
- ③ 谷一寿, Ching-Ju Tsai, 入江克雅, 廣明洋子, 下村拓史, Duncan G. McMillan, Gregory M. Cook, Gebhard X. Schertler, 藤吉好則, Xiao-Dan Li, “Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel.” 第51回日本生物物理学会年会 (2013年10月28

- ～30日), 京都国際会館
- ④ 鈴木博視、伊藤泰行、谷一寿、山崎裕自、氏昌未、峯田克彦、月田早智子、藤吉好則, “ELECTRON CRYSTALLOGRAPHY OF EUGLENOID FOUR-TRANSMEMBRANE PROTEIN REVEALED THE LINEAR POLYMERIZATION BY A COMBINATION OF THREE-WAYS OF INTERMOLECULAR INTERACTION”, Biophysical Society 57<sup>th</sup> Annual Meeting (2013年2月2～6日), Philadelphia, PA, USA
  - ⑤ 谷一寿, “結晶構造解析によるチャネルの立体構造と機能の解明”, 第20回連続研究会～次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発～, 2010, 福井 (招待講演)
  - ⑥ 谷一寿, 三瀆忠典, 廣明洋子, 亀川亜希子, 鈴木博視, 藤吉好則, “Involvement of cytoplasmic construction with aquaporin-4 functions.” 第48回日本生物物理学会年会(2010年9月20～22日), 東北大学

[図書] (計2件)

- ① 藤吉好則, 中川敦史, 前田雄一郎, 小田俊郎, 嶋田一夫, 西田紀貴, 谷一寿, 加藤博章, “現代生物科学入門 構造機能生物学”, 岩波書店, 2011, pp.161-192
- ② Y. Tanimura, K. Tani, H. Suzuki, K. Nishikawa, A. Kamegawa, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, STRUCTURE AND INHIBITOR OF WATER CHANNEL IN BRAIN., “Water: The Forgotten Biological Molecule”, D. L. Bihan and H. Fukuyama ed., Pan Stanford Publishing, 2011, pp.179-204.

[その他]

- ① ホームページ:  
[http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/BasicBiol/tani/tani\\_jp.htm](http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/BasicBiol/tani/tani_jp.htm)
- ② 谷一寿, 第7回(平成25年度)風戸賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 一寿 (TANI KAZUTOSHI)  
名古屋大学・細胞生理学研究センター・  
特任准教授  
研究者番号: 20541204

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)  
名古屋大学・細胞生理学研究センター・  
特任教授

研究者番号: 80142298

阿部 一啓 (ABE KAZUHIRO)

名古屋大学・細胞生理学研究センター・  
助教

研究者番号: 60596188