

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成30年3月15日現在

チャネルを中心とした構造生理学的研究

Studies in structural physiology of channels

課題番号：15H05775

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)

名古屋大学・細胞生理学センター・客員教授



研究の概要

チャネル等の膜タンパク質は、脳をはじめとする情報伝達の機能を担い、体の様々な機能を制御している。これら膜タンパク質の構造と機能を分子レベルから理解するためには、それらの構造を高い分解能で解析する必要がある。この研究分野を「構造生理学」と名付けて研究を行ってきた。近年、発展を見せている単粒子解析法などを用いて構造生理学研究を進めている。

研究分野：生物学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の構造情報は、重要であるが、その構造解析は容易ではなかった。クライオ電顕を用いた単粒子解析法によって、結晶を作製することなく構造解析した結果が報告され (M. Liao et al., **Nature** **504**, 107-112 (2013))、注目されている。しかし、膜タンパク質は脂質膜内で構造解析しなければ機能構造を理解できない場合があり、膜タンパク質の構造を脂質膜内で解析することが望まれる。

2. 研究の目的

6種類の膜タンパク質（ギャップ結合チャネル、アセチルコリン受容体、水チャネル、Na<sup>+</sup>チャネル、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase、タイト結合など）の機能を理解するために、脂質膜内で、それらの構造解析を行う。この様に、**チャネルを中心とした構造生理学的研究**を推進することを目的とする。

3. 研究の方法

膜タンパク質を脂質膜内で構造解析する方法としては、電子線結晶学が有効であるが、成否がわからない結晶化の試みを続ける必要がある。近年、クライオ電顕による単粒子解析法が発展したので、それを改良して脂質膜の中で膜タンパク質の構造解析が可能な方法を開発して、チャネルを中心に構造と機能研究を行い、構造生理学と名付ける分野を発展させる。

4. これまでの成果

i) コネキシン26の構造解析から、12量体でギャップ結合チャネルが形成されていることなどを明らかにしていたが、無脊椎動

物のギャップ結合チャネル、イネキシンの2次元結晶を作製して立体構造解析を行った結果、16量体でギャップ結合チャネルを形成していることが明らかになった (**J. Mol. Biol.** **428**, 2265-74 (2016))。しかし、その分解能は10Åと低かったので、単粒子解析のシステムを立ち上げる努力を行い、界面活性剤を除く試料作製法であるGraDeR法も開発して (**Structure** **23**, 1769-75 (2015))、単粒子解析法によりイネキシンの構造を3.3Å分解能で解析することに成功した。この構造解析では、細胞質側を含む構造が解析でき、論文として発表した (**Nature Commun.** **7**, 13681 (2016))。ii) 膜タンパク質を結晶化することなく、脂質膜の中で構造解析できるIBSA法を提案し、新しいクライオ電子顕微鏡の開発を本課題とは異なる予算で進めている。このシステムを用いて課題ii)も進めている。iii) 水チャネル、アクアポリン-4 (AQP4)とその阻害剤との複合体の構造を電子線結晶学を用いて5Å分解能で解析して、AQP4の水透過経路を塞ぐ位置に阻害剤アセタゾラミド (AZA)が結合している構造を明らかにした (**Microscopy** **65**, 177-84 (2016))。しかし、このAQP4の2次元結晶は、2枚の膜が重なった結晶で、AZAを結合するとその相互作用が弱くなって、結晶性が悪くなる。それで、2次元結晶の質を向上させると共に、極めて多くのデータ収集を行って、良い分解能の結晶からのデータのみを選び出すことによって、3Å分解能での解析に成功した。ところが、この

分解能の解析でも、阻害剤の結合様式を正確に決定できていないことが明らかになったので、分解能を 2.8 Å にまで向上させることに成功した (論文準備中)。

iv) 局所麻酔薬が電位感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルに結合する場合の要素となるアミノ酸残基や結合様式を電気生理学的に研究して、その結果を論文として発表した (**FEBS J.** **283**, 2881-95 (2016))。また、電位感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルの構造を解析することによって、Na<sup>+</sup>チャンネルの電位感受性に重要と思われる要素を明らかにした (**FEBS Letters** **592**, 274-83 (2018))。

v) 胃薬 vonoprazan と H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase との複合体構造と、SCH28080 とこのプロトンポンプとの複合体構造の解析を行った。H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase は胃において、100 万倍の H<sup>+</sup> の濃度勾配を実現できる最も大きな勾配を形成できるプロトンポンプである。この構造を、原子モデルができる分解能で構造解析した。これらの構造解析で、胃薬として発売され、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase への結合モデルが提案されている vonoprazan の結合様式も初めて明らかにされた。その結果、vonoprazan は提案されていた位置とは異なり、阻害剤が結合していないときには結合空間がない場所に結合していることが明らかになった (**Nature**, in press (2018))。

vi) 本課題開始以前に、クローデインの構造を解析し (**Science** **344**, 304-7, (2014))、タイト結合モデルを提案していた (**J. Mol. Biol.** **427**, 291-7 (2015))。また、クローデイン 19 とウェルシュ菌毒素の C 末端 (C-CPE) の複合体の構造を解析して、タイト結合の崩壊モデルを提案していた (**Science** **347**, 775-8 (2015))。それをさらに進めて、クローデイン 3 と C-CPE との複合体の構造解析のために構造安定化できる変異体を見出し、構造解析を行った (**Acta Crystallographica**, in press (2018))。

以上、6 種類の研究課題を総合的に進め、「構造生理学」と命名している分野の研究を行っている。その他、エンドセリン受容体関連の構造・機能研究の成果を論文発表した (**Nature** **537**, 363-8 (2016), **J. Mol. Biol.** **428**, 1227-36 (2016), **Nature Struct. Molec. Biol.** **24**, 758-64 (2017))。

## 5. 今後の計画

6 研究課題を進める。イオンの濃度勾配を形成することでチャンネルの機能に深く関わる P type ATPase の構造解析に成功し、プロトンポンプの構造と機能について **Nature** 誌に発表したもので、これをさらに進める (課題 v)。プロトンは透過しないで速い水透過機能を有し、脳浮腫などに関わる AQP4 とその阻害剤複合体の構造を解析したので、論文発表すると共に、阻害剤の

開発を目指す (課題 iii)。水チャンネルが透過させないイオンの透過制御を行う電位感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルの gating 機構の解明を進める (課題 iv)。膜タンパク質のナノディスクを用いた構造解析を試みる (課題 ii)。トランスセラーチャンネルであるギャップ結合チャンネル (課題 i) と、パラセラーチャンネルであるタイト結合 (課題 vi) の構造・機能研究は順調に進捗しているので、これらを堅持して研究を進める。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ・ 藤吉好則. 2016 年藤原賞受賞.
- ・ K. Abe, K. Irie, H Nakanishi, H Suzuki and Y. Fujiyoshi. Crystal structures of the gastric proton pump. **Nature**, in press (2018).
- ・ W. Shihoya, T. Nishizawa, K. Yamashita, A. Inoue, K. Hirata, FMN. Kadji, A. Okuta, K. Tani, J. Aoki, Y. Fujiyoshi, T. Doi and O. Nureki. X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog. **Nature Struct. Molec. Biol.**, **24**, 758-764 (2017).
- ・ A. Oshima, K. Tani and Y. Fujiyoshi. Atomic structure of the innexin-6 gap junction channel determined by cryo-EM. **Nature Commun.**, **7**, 13681 (2016).
- ・ W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki and T. Doi. Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. **Nature**, **537**, 363-368 (2016).
- ・ A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi and T. Doi. Thermostabilization of the human endothelin type-B receptor. **J. Mol. Biol.**, **428**, 2265-2274 (2016).
- ・ A. Oshima, T. Matsuzawa, K. Murata, K. Tani, Y. Fujiyoshi. Hexadameric structure of an invertebrate gap junction channel. **J. Mol. Biol.**, **428**, 1227-1236 (2016).
- ・ A. Kamegawa, Y. Hiroaki, K. Tani, and Y. Fujiyoshi. Two-dimensional crystal structure of aquaporin-4 bound to the inhibitor acetazolamide. **Microscopy**, **65**, 177-184 (2016).
- ・ F. Hauer, C. Gerle, N. Fischer, A. Oshima, K. Shinzawa-Itoh, S. Shimada, K. Yokoyama, Y. Fujiyoshi and H. Stark. GraDeR: membrane protein complex preparation for single-particle cryo-EM. **Structure**, **23**, 1769-1775 (2015).
- ・ Y. Fujiyoshi. Development of the field of structural physiology. **Proc., Jpn Acad., Ser. B**, **91**, 447-468 (2015).

ホームページ等

<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/>