

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22227004

研究課題名(和文)電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究

研究課題名(英文)Structural and functional study of membrane proteins based on electron crystallography

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,100,000円

研究成果の概要(和文)：重要な膜タンパク質である、水チャネル、イオンチャネル、ギャップ結合チャネル、アセチルコリン受容体、クローディン、H<sub>2</sub>O、K<sup>+</sup>-ATPaseの構造と機能研究を、主に電子線とX線結晶学を用いて進めた。例えば、細胞接着能を有するチャネル、アドヘネルファミリーに属するクローディンは、タイト結合において鍵となる分子である。その構造を解析し、上皮細胞間に形成されるパラセルラーチャネルモデルを提案し、タイト結合を崩壊させるウェルシュ菌毒素との複合体の構造も解析した。これらは、基礎生物学的に興味深い結果であるとともに、組織のバリアを通過させるドラッグデリバリーにも応用が可能と考えられる結果でもある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we studied structure and function of water channels, ion channels, gap junction channels, acetylcholine receptor, claudins and H<sub>2</sub>O, K<sup>+</sup>-ATPase, because these membrane proteins are important components in biological systems. We could obtain significant results in these research subjects by mainly electron and X-ray crystallography. For example, we intensively studied claudins, channels with adhesive function. Claudin is an adherens junction family protein and a key molecule in tight junctions. We analyzed structure of claudin-15 and proposed a paracellular channel model to explain channel function through epithelial cell sheets. We also analyzed the complex structure of claudin-19 and the C-terminal domain of Clostridium perfringens enterotoxin, which causes disintegration of tight junctions. These results are of great interest for both basic biology and the rational design of therapeutic agents that can potentially be used to deliver drugs across tissue barriers.

研究分野：構造生理学

キーワード：電子線結晶学 膜タンパク質 水チャネル イオンチャネル ギャップ結合チャネル クローディン  
アセチルコリン受容体 H<sub>2</sub>O, K<sup>+</sup>-ATPase

### 1. 研究開始当初の背景

独自に開発した極低温電子顕微鏡を用いて、3 Å を超える分解能で膜タンパク質の構造を解析することができるようになっており、このような極低温電子顕微鏡を活用することと多様な方法を駆使することで、膜タンパク質の構造と機能研究ができるようになってきていた。それゆえ、「電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究」を進めるべき状況であった。

### 2. 研究の目的

チャンネルを中心とする膜タンパク質、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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase などの構造を、電子線結晶学を用いて、生理学的な環境に近い脂質膜の中にある状態で解析すること、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した。そのために、これまでに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、様々な方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した。

### 3. 研究の方法

特に、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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase などの膜タンパク質の構造を生理学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、これまでに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。すなわち、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、スプレー急速凍結法を用いるとリガンド結合中間状態(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などを用いる。さらに、電子線トモグラフィ法を用いて、ギャップ結合などの構造を解析する。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、電気生理学的方法など様々な手法を総合的に用いてチャンネルを中心とする膜タンパク質の構造と機能研究を推進する。

### 4. 研究成果

#### 1) 水チャンネルの速い水選択透過・ゲーティング機構の解明と生理機能研究

先行研究において、AQP4 の Ser180 がリン酸化されることによって、この水チャンネルの水透過が阻害されるという発表があった (Zelenina et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F309-F318 (2002))。それゆえ、細胞質側の構造変化によるゲーティング機構を確認し、もし本当なら、その機構を解明

するために、AQP4 の S180D 変異体の構造解析を行い、機能解析も行った。その結果、S180D 変異体では水チャンネルの大きな構造変化がないこと、そして水透過性機能の変化もないことが明らかになった。必ずしもこの変異がリン酸化を確実に模倣しているかという問題は残るが、一般には、S180D 変異体が Ser180 のリン酸化を模倣するといわれているので、Ser180 によるリン酸化によってチャンネルの水透過性が阻害されるとする論文を支持しない結果となった。これらの結果をまとめて、論文として発表した (*J. Mol. Biol.*, **402**, 669-681 (2010))。

ノックアウトマウスの解析を行った結果、脳浮腫が軽減される以外に特徴的な表現型は見られなかった。例えば、ノックアウトマウスの視床下部のグリアルラメラの超薄切片像を観察すると、グリアルラメラに AQP4 分子を示す金粒子が無くなっていても、その膜間の接着の様子は、野生型とおおむね同じであった。それゆえ、構造解析から明らかになった 3<sub>10</sub>ヘリックス部分に対応する AQP1 の配列にした遺伝子改変マウスを観察したところ、グリアルラメラの接着構造が完全に広がっていることが確認された。

また、水チャンネルにおいて、高度に保存されている 2 つの NPA 配列の 1 つが NPC である AQP11 が水の透過性を有することを確実に証明することができて、透過しないとする論文を否定する結果を得たので、論文として発表した (*J. Struct. Biol.*, **174**, 315-320 (2011))。

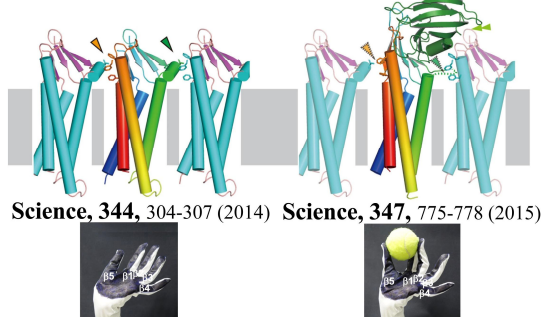
#### 2) Na<sup>+</sup>チャンネルのイオン選択機構の解析と、ゲーティング機構の解明

バクテリア由来の電位感受性 Na<sup>+</sup>チャンネル (NachBac) を用いて S4 と S5 のそれぞれにシステイン変異 (それぞれ T110C と M164C) を導入して、電気生理学的に機能解析を行った。この 2 重変異体を解析した結果、T110 と M164 がシステイン変異を導入すると S-S 結合が形成されることを確認することができた。さらに、T110C 変異体だけを導入して電気生理学的に解析した実験において、4 量体をリンカーでつないでサブユニット間の配置を制御できるようにした。そして、2 つのサブユニットだけに T110C を導入した場合に、隣り合う 2 つの T110 の位置に導入したシステインが S-S 結合を形成して、チャンネルを不活性化することが分かった。さらに、2 番目と 4 番目のサブユニットに導入した場合にチャンネルが閉じることが明らかになり、これはサブユニットが Z 型の配置をとっていることを示唆する結果になった。これらの結果を論文として発表した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **399**, 341-346



るパラセルラーのチャネル構造を説明することができる構造モデルを提案して論文: **J. Mol. Biol.**, **427**, 291-297 (2015)として発表した。そして、ウェルシュ菌の毒素とクローディンとの複合体の構造を解析し、タイトジャンクションストランドを崩壊させる機構の一端を解明して論文: **Science** **347**, 775-778 (2015)として発表した。このScience と JMB の論文もすでにサイテーションが5を超えてきており、これも注目を得る結果になっている。

クローディンのストランド構造 ウェルシュ菌(下痢原性)毒素



Science, **344**, 304-307 (2014) Science, **347**, 775-778 (2015)

図3 クローディン15の構造解析から明らかになったストランド構造と、それを崩壊させる相互作用が明らかになったクローディン19とウェルシュ菌の毒素のC末端ドメインとの複合体の構造。下に示すのは、クローディンの掌モデルで、ストランドを形成する時と、テニスボールで表現した毒素のC末端ドメインを結合した状態のモデルを示す。

#### 5) $H^+,K^+$ -ATPase の構造と機能解析

$H^+,K^+$ -ATPase の阻害剤との複合体の構造を解析して、論文として発表した (**Nature Commun.**, **2**, 155 pp1-7 (2011))。これまでに、100万倍という高い濃度勾配までプロトンポンピングできる機構としてラチェットモデルを発表している。そして、pHが中性に近い時には、ATPの1分子を分解するエネルギーで2個のプロトンをポンピングするが、pHが低くなるとATPの1分子を分解するエネルギーで1個のプロトンをポンピングするようにしていることを解明して論文として発表した (**PNAS**, **109**, 18401-18406 (2012))。さらに、数種類の構造を解析してそれらと比較することによって、A-M2 リンカーの重要性を解明して論文として発表した (**JBC**, **289**, 30590-30601 (2014))。

#### 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27件)

1. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. Y. Saitoh, H. Suzuki, K. Tani, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. *Science*, **347**, 775-778 (2015). 査読有  
doi: 10.1126/science.1261833

2. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. H. Suzuki, K. Tani, A. Tamura, S. Tsukita and Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.*, **427**, 291-297 (2015). 査読有  
doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.020

3. Systematic comparison of molecular conformations of  $H^+,K^+$ -ATPase reveals an important contribution of the A-M2 linker for the luminal gating. K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi. *J. Biol. Chem.*, **289**, 30590-30601 (2014). 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M114.584623

4. Crystal structure of a Claudin provides insight into the architecture of tight junctions. H. Suzuki, T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki and Y. Fujiyoshi. *Science*, **344**, 304-307 (2014). 査読有  
doi: 10.1126/science.1248571

5. Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel. 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. *J. Mol. Biol.*, **425**, 4074-4088 (2013). 査読有  
doi:10.1016/j.jmb.2013.06.036

6. The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strand by a trimeric unit repeat. H. Suzuki, Y. Ito, Y. Yamazaki, K. Mineta, M. Uji, K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi and S. Tsukita. *Nature Commun.*, **4**, 1766 pp1-8 (2013). 査読有  
doi:10.1038/ncomms2731

7. Cryo-EM structure of gastric  $H^+,K^+$ -ATPase with a single occupied cation binding site. K. Abe, K. Tani, T. Friedrich and Y. Fujiyoshi. *PNAS*, **109**, 18401-18406 (2012). 査読有  
doi: 10.1073/pnas.1212294109

8. Gating movement of acetylcholine

receptor caught by plunge-freezing.  
N. Unwin and Y. Fujiyoshi. J. Mol. Biol.,  
422, 617-634 (2012). 査読有  
doi:10.1016/j.jmb.2012.07.010

9.The carboxy-terminal helical bundle of  
the tetrameric prokaryotic sodium channel  
accelerates the inactivation rate. K. Irie, T.  
Shimomura and Y. Fujiyoshi. Nature  
Commun., 3, 793 pp1-8 (2012). 査読有  
doi:10.1038/ncomms1797

10.Conformational rearrangement of  
gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induced by an acid  
suppressant. K. Abe, K. Tani and Y.  
Fujiyoshi. Nature Commun., 2, 155 pp1-7  
(2011). 査読有.  
doi:10.1038/ncomms1154

〔学会発表〕(計30件)

1.藤吉好則, Structural physiology studied  
by cryo-electron microscopy, 日本解剖学会  
総会・日本生理学会大会, 平成27年3月2  
1日, 神戸国際会議場(神戸)

2. 藤吉好則, Structural Physiology of  
Adhennels, The 45<sup>th</sup> NIPS International  
Symposium, 平成26年11月28日, 生  
理学研究所(岡崎)

3. 藤吉好則, Structures of cell  
adhesive-channels, 16th International  
Conference on Retinal Proteins, 平成26  
年10月6日, 長浜ロイヤルホテル(長浜)

4. 藤吉好則, Key technology for  
structure-guided drug development,  
Nagoya Symposium, 平成25年1月24日,  
名古屋大学(名古屋)

5. 藤吉好則, Structural Physiology of  
channels, 動物細胞工学会, 平成24年11  
月28日, 名古屋大学(名古屋)

〔図書〕(計1件)

著者名: 藤吉 好則  
出版社: 岩波書店  
書名: 現代生物科学入門3 構造機能生物学  
(第4章「膜タンパク質構造機能生物学」  
P.161~192)  
発行年: 2011年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 3次元像構築方法、画像処理装置、お  
よび電子顕微鏡  
発明者: 藤吉好則, 石川勇, 細木直樹

権利者: 名古屋大学, 日本電子株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願2014-169003号  
出願年月日: 平成26年8月22日  
国内外の別: 国外

取得状況(計1件)

名称: 生体組織から分離できる多能性幹細胞  
画分  
発明者: 藤吉好則, 出澤真理, 吉田正順  
権利者: 名古屋大学, 東北大学, 株式会社  
Clio  
種類: 特許  
番号: 特願2011-522886  
出願年月日: 平成22年7月15日  
取得年月日: 平成25年1月25日  
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等  
論文リストをはじめとする成果  
<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp>

報道関連情報

1. 中部経済新聞(平成25年1月8日朝刊)  
「構造に指南された創薬戦略」

2. Nature 特集記事(平成25年1月10日)  
<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/to-kushu/detail/281>

3. 中日新聞(H26年4月18日朝刊)  
「栄養取り込む構造解明」

4. 朝日新聞(H26年4月18日朝刊)  
「細胞くっつけるたんぱく質解明」

5. 中日新聞(H27年2月13日朝刊)  
「細胞のバリアー緩む仕組み解明」

6. 朝日新聞(H27年2月13日朝刊)  
「細胞つなく仕組みを破壊」

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
藤吉 好則 (FUJIYOSHI Yoshinori)  
名古屋大学・大学院創薬科学研究科/細胞  
生理学研究センター・特任教授  
研究者番号: 80142298

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者  
大嶋 篤典 (OHSHIMA Atsunori)  
名古屋大学・大学院創薬科学研究科/細胞  
生理学研究センター・准教授  
研究者番号: 80456847

阿部 一啓 (ABE Kazuhiro)  
名古屋大学・大学院創薬科学研究科/細胞  
生理学研究センター・助教  
研究者番号：60596188