

平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価用〕

◆記入に当たっては、「平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成26年4月25日現在

研究代表者 氏名	藤吉 好則	所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)	京都大学・大学院理学研究科・教授
研究課題名	膜を介する（チャネルおよびGPCRを中心とした）情報伝達の分子機構研究		
課題番号	16001005		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 藤吉 好則（京都大学・大学院理学研究科・教授） 研究分担者 溝口 明（三重大学・医学部・教授） 研究分担者 安井 正人（慶應義塾大学・医学部・教授）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成16年度	117,000 千円
平成17年度	119,600 千円
平成18年度	88,300 千円
平成19年度	70,200 千円
平成20年度	46,800 千円
総計	441,900 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

1. アクアポリンの構造・機能相関、選択的透過機構などの解明

研究期間内において、AQP4 を 3.2 Å 分解能で構造解析してこの水チャネルの細胞接着性の機能を見出した後、AQP0 を電子線結晶学では最も高い分解能の 1.9 Å で構造解析した (Nature 438, 633-638 (2005) 表紙 等)。しかし、これはチャネルが閉じた状態の構造であったので、速い水透過機構を詳細に理解するために、AQP4 の分解能を 2.8 Å にまで向上させることによって、チャネル内の水分子 8 個を全て可視化した。その結果、我々が 2000 年に提案した "Hydrogen bond isolation mechanism" をチャネル内の水分子の観察に基づいて実証することが出来た (JMB 389, 694-706 (2009))。この解析により、電子線結晶学の重要性が明確に示された。すなわち、X線結晶学を用いて、AQP4 の構造解析が 1.8 Å 分解能という、電子線結晶学の解析よりはるかに高い分解能で行われた (JD Ho et al., PNAS, 106, 7437-7442 (2009)) が、この解析では水分子を分離して観察することができなかった。その理由のカギは、X線の解析では、通常脂質分子を界面活性剤で除いた状態で構造解析されるという点にある。脂質膜が形成する特徴的比誘電率によりヘリックス双極子が強くなる効果が知られているが、X線では基本的にこの効果がない状態での解析になるので、本来の生理的条件とは異なる状況での構造解析になるおそれがある。水チャネルは、特徴的な短いヘリクスがチャネルの一方の側に配置され、脂質膜が形成する特徴的比誘電率によって強められるヘリックス双極子によって水分子を配向させ、疎水的な表面を有する水チャネル内には、その配向に呼応する位置にカルボニル基が配置されて、速い水透過を実現すると共にプロトン透過をさせない仕組みになっている。このような機能構造は、電子線結晶学による構造解析によってはじめて明らかになった。さらに、AQP4 の細胞質側の機能の解析も構造に基づいて行った (JMB 402, 669-681 (2010))。引き続き、脳における特徴的な発現がみられる AQP4 の阻害剤を開発する研究が進んでおり、立体構造に基づいた遺伝子改変マウスの作製も含めた構造と機能研究が進んでいる。

2. イオンチャネルの構造と機能解析

まだ解明されていない Ca^{2+} と Na^{+} のイオン選択性の機構と電位感受性のゲーティング機構を解明するために、 Na^{+} チャネルの電位センサードメインの配置やその動きやすさの解析を行った (BBRC, 399, 341-346 (2010), JBC, 286, 7409-7417 (2011))。 Na^{+} チャネルの C-末端に形成される 4 ヘリカルバンドルの構造解析を行い、速い不活性化機構などを解明した (Nature Commun., 3 739 pp1-8 (2012) 等)。さらに、 Na^{+} チャネルの膜内の構造を解析するために電子線結晶学を用いて 2 つの状態の構造解析を行った (JMB 425, 4074-4088 (2013) 表紙)。また、アセチルコリンの結合によりわずかな構造変化で制御されるアセチルコリン受容体の速いゲーティング機構を解析した (JMB 422, 617-634 (2012))。ギャップ結合チャネルの高分解能の構造解析を行うことにより、研究期間内の構造解析に基づいて提案したプラグゲーティングモデルを支持する結果を得た (Nature 454, 597-602 (2009))。ギャップ結合チャネルの初めての高分解能の構造解析が行われたことは重要である。さらに電子線結晶学による構造解析の分解能を向上させて、プラグゲーティングが細胞質側の複雑な構造に関わることも報告した (JMB 405, 724-735 (2011))。電位感受性 Na^{+} チャネルや、アセチルコリン受容体は細胞膜を透過するトランスセルラーなイオンチャネルであり、ギャップ結合も細胞膜を透過するチャネルを形成する細胞間接着分子であるが、細胞間を接着し細胞間のバリア機能を担うと共に、細胞間を透過するチャネル (パラセルラーチャネル) を形成するタイトジャンクションの中心となるクローディンの構造を解析した (Science, 344, 304-307 (2014))。この構造解析によって、クローディンの立体構造が初めて明らかになったことと共に、この 4 回膜貫通タンパク質が重合してストランドを形成する分子機構も明らかになった。なお、クローディンとホモロジーのある 4 回膜貫通タンパク質 IP39 の構造もクローディンの解析に先立って、構造解析した (Nature Commun., 4, 1766 pp1-8 (2013))。

3. GPCR の構造と機能解析

GPCRs は創薬のための重要な標的であり、実際、創薬標的の 30% 近くが GPCRs である。しかも、様々な情報伝達機構に関わっているため、膜を介する情報伝達機構を理解するには、GPCRs の構造と機能の解析は避けて通れない研究課題である。GPCRs の構造解析は Brian Kobilka の成功の後、多くの構造が解析されるようになった。これには主に 2 つの重要な試料作製技術の進歩が貢献している。その第 1 は、G タンパク質の活性化に最も重要と考えられてきた、そして動きやすい細胞内第 3 ループなどに T4 リゾチームのような構造が安定なタンパク質をキメラとして導入して、受容体を固める方法である。第 2 は、Chris Tate によって開発された変異を系統的に導入して、熱安定な変異体を見出して構造を解析する方法である。我々は長年ある GPCR の構造と機能の研究を進めてきた。構造解析を目指して、その GPCR の 2 次元結晶化を試みると共に、3 次元結晶化も平行して試みた。解析を目指した GPCR の構造解析を実現するために、400 残基を超えるアミノ酸の 1 残基ごとに変異を導入して、それぞれ熱安定化の程度を系統的に測定した。その結果、5 ヶ所に変異を入れることで野生型より 12 度程度熱安定になる変異体を見出した。この熱安定変異体に T4 リゾチームを細胞内第 3 ループに挿入する方法も行った。さらに、この T4 リゾチームの挿入位置の最適化も行った。このように、熱安定化変異体に、T4 リゾチームキメラを作製したこの GPCR を昆虫細胞を用いて大量発現し、併せて精製を行い、3 次元結晶化を行った。すなわち、この GPCR の構造と機能解析を総合的に行うと共に、多角的な構造解析の試みを行った結果、この G タンパク質共役型受容体とアゴニストとの構造を解析することについて成功した (論文作成中)。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

講演題目： Structural physiology of multifunctional channels (Special Lecture)

会議名・場所： IUPS2009 (36th International Congress of Physiological Sciences)・Kyoto/国立京都国際会館

開催時期： 平成21年7月27日～8月1日（30日）

講演題目： Recent advancements in structural analysis of AQP4 water channels and Cx26 gap junction channels

会議名・場所： CMBN guest lecture・Oslo, Norway/Oslo University

開催時期： 平成21年9月24日

講演題目： Structural physiology based on electron crystallography (Plenary Lecture)

会議名・場所： AsCA'09 (Joint Conference of the Asian Crystallographic Association & Chinese Crystallography Society)・Beijing, China/Jingyi Hotel

開催時期： 平成21年10月22日～25日（25日）

講演題目： Structural physiology of channels based on electron crystallography

会議名・場所： Cold Spring Harbor Conference Asia (Membrane Protein: Structure & Function meeting)・Suzhou, China / Suzhou Dushu Lake Conference Center

開催時期： 平成22年5月10日～14日（13日）

講演題目： Structural physiology of water and ion channels studied by electron crystallography (Plenary lecture)

会議名・場所： SCANDEM2010・Kista, Sweden/Kista Electrum

開催時期： 平成22年6月8日～11日（10日）

講演題目： Development of cryo-electron microscopes for high resolution electron crystallography

会議名・場所： Seminar・Stockholm, Sweden/Stockholm University, Arrhenius Laboratory

開催時期： 平成22年6月11日

講演題目： Structural physiology of water and ion channels

会議名・場所： Seminar・Stockholm, Sweden/Stockholm University, Arrhenius Laboratory

開催時期： 平成22年6月11日

講演題目： Structural physiology based on electron crystallography (The Christian B. Anfinsen Award)

会議名・場所： The 24th Annual Symposium of The Protein Society・La Jolla, USA/Manchester Grand Hyatt San Diego

開催時期： 平成22年8月1日～5日（1日）

講演題目： Strong Points of Electron Crystallography Shown in Water and Ion Channels

会議名・場所： Gordon Research Conferences (Three Dimensional Electron Microscopy)・New London, USA/Colby -Sawyer College

開催時期： 平成23年6月26日～7月1日（28日）

講演題目： 水とイオンチャネルの構造生理学

会議名・場所： レオロジー学会/名古屋大学

開催時期： 平成24年9月26日

講演題目： Structural Physiology of channels

会議名・場所： プレナリーレクチャー・動物細胞工学会/名古屋大学

開催時期： 平成24年11月27日～30日（28日）

講演題目： Key technology for structure-guided drug development

会議名・場所： Nagoya Symposium/名古屋大学

開催時期： 平成25年1月22日～24日（24日）

講演題目： 「Structural physiology of channels」

会議名・場所： International Symposium on Diffraction Structural Biology, Plenary lecture 2013 /名古屋市中小企業振興会館（吹上ホール）

開催時期： 平成25年5月26日～29日（27日）

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

【科学研究費助成事業】

基盤研究(S)、「電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究」、H22年度～26年度、217,230千円

【その他】

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」、H19年度～25年度、1,245,162千円

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

「Muse細胞を用いたin situ stem cell therapyの基盤研究開発」、H22年度～26年度、348,041千円

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」、H23年度～25年度、79,320千円

経済産業省

「ITを活用した革新的医薬品創出基盤技術開発」、H25年度～29年度、284,083千円（26年度まで）

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

1. アクアポリンの構造・機能相関、選択的透過機構などの解明

特に、脳に多くの発現が見られるAQP4は、脳浮腫や神経脊髄炎などに関係することから、その阻害剤の開発が期待されている。ラット由来のAQP4の阻害剤として、アセタゾールアミドを発見し、脳浮腫を軽減できることが明らかになった。この結果は、創薬を目指した重要な前進ではあるが、我々のさらなる研究で、ヒト由来のAQP4を阻害できないことが明らかになった。さらに研究を進めることで、げっ歯類とヒトのAQP4において異なるアミノ酸のどのアミノ酸がこの差をもたらしているかも解明できた。この様な研究から、ヒトのAQP4の阻害剤を開発する研究が進展している。また、このAQP4は水チャネルであるとともに、細胞を弱く接着する機能もあることを解明し、Adhennelと命名したが、水チャネルのこの新しい機能の解明も進んでおり、水チャネルのこの新たな知見は、特に脳における機能として興味深い。

2. イオンチャネルの構造と機能解析

電位感受性Na⁺チャネルの解析が進むことにより、Na⁺選択的チャネルが水和した状態でNa⁺イオンを透過させるイオン選択性の機構を新たに提案できるようになってきた。また、電位感受性Na⁺チャネルの2つの構造が電子線結晶学を用いて脂質膜の中で解析できたので、ゲーティングに関わる4つの部分(i) S4-S5リンカーヘリックス、(ii) S5-S6の細胞質側の疎水の相互作用、(iii) S6の細胞質側の負に帯電したアミノ酸を有する領域：NCRと命名、(iv) 細胞質側のヘリカルバンドルと選択性フィルターの間のストレス)を解明することができた。この様なイオンチャネルの構造と機能の解明とともに、リドカイのような局所麻酔剤と電位感受性Na⁺チャネルとの結合についての構造的な理解が深まってきた。神経筋接合部で重要な機能を担っているアセチルコリン受容体の速いゲーティング機構が構造に基づいて解析されたので、様々な疾患の分子レベルからの新たな知見が得られた。ギャップ結合チャネルの初めての高分解能の構造解析を行ない、電子線結晶学による構造解析も進んだので、ギャップ結合チャネルのゲーティング機構について、プラグゲーティングモデルという教科書を書き換える新たな知見を生み出した。タイトジャンクションの中心的分子である、クローデインの構造が解析できたことによって、タイトジャンクションを分子構造に基づいて研究することができる新しい段階へと進めることができるようになった。すなわち、クローデイン分子が細胞外に掌を向けたようなβシート構造を有しており、その表面電荷により透過するイオン選択性が制御されていることが明らかになったことにより、細胞間を透過するチャネル（パラセルラーチャネル）の機能を初めて分子構造レベルから理解できるようになった。さらに、クローデイン分子が重合して、ストランドを形成する機構、すなわち、重合のカギとなる分子間相互作用が明らかになったので、この細胞間を制御するバリアを通過させるようなドラッグデリバリー法の開発の基礎的情報・知見が得られた。

3. GPCRの構造と機能解析

本特別推進研究でも重要な研究課題として掲げたGタンパク質共役型受容体の構造と機能解析を進めることができ、ついに構造解析に成功した。この構造解析の結果から、血圧の制御をはじめ、抗がん剤の開発にも貢献することができる知見を得ることができるようになりつつある。このGタンパク質共役型受容体の構造情報をついに取得できるようになったので、アンタゴニストとの複合体の構造解析も進展し、創薬研究に貢献できることが期待される。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

1. アクアポリンの構造・機能相関、選択的透過機構などの解明

水チャネルの構造と機能研究については、世界的に大きな貢献ができていられると思われる。特に AQP4 の構造をはじめて解析したこと。そして、この水チャネルが、チャネル機能だけでなく細胞を弱く接着する機能もあることを解明して、Adhennel と命名した論文は、J. Mol. Biol. という専門的雑誌に 2006 年に発表したにもかかわらず、Citation が 189 になっている。また、このチャネルはスプライスバリエーションによって、アストロサイト細胞などにおいて大きなアレイ構造（結晶性の構造）を形成したり、それを消したりという機能を有するが、その機構を解明して BBA という専門誌に 2008 年に発表した。Citation は 42 となっており、この雑誌としては注目されていると思われる。

AQP4 の機能は複雑であり、まだ不明な点も多いが、脳浮腫や視神経脊髄炎などとの関係で注目されるようになっており、本特別推進研究による構造解析の結果が多くの研究者によって使用されるようになってきている。

AQP11 は水チャネルでありながら、水チャネルのファミリーにおいて保存されている NPA 配列が例外的に保存されていない。このチャネルが、水透過の機能を有することを解明して 2007 年に BBA に発表した論文の Citation は 55 となっており、AQP11 の水透過機能を証明した論文として、注目されている。

AQP0 の高分解能の構造解析を 2005 年に Nature に発表した論文は Citation が 274 である。

2. イオンチャネルの構造と機能解析

本特別推進研究の重要な研究課題として開始した電位感受性 Na⁺チャネルの構造と機能研究の進展により達成できた構造解析は、電位感受性イオンチャネルが脂質膜の中で解析された初めての例であり、J. Mol. Biol. の表紙に掲載された。

神経筋接合部で重要な機能を担っているアセチルコリン受容体の解析については、最初の原子モデルの Nature の論文は Citation が 687 になっているが、これに基づいて、速いゲーティング機構を 2012 年に発表した専門誌 J. Mol. Biol. の論文はすでに Citation が 20 になっている。アセチルコリン受容体の構造はこのタイプの受容体である、セロトニン受容体や、GABA 受容体、グリシン受容体等の重要な受容体と同じファミリーに属しているので、このアセチルコリン受容体の構造と機能解析がこれらの受容体を研究する上で、重要な基本構造となっている。

極低温電子顕微鏡を活用した単粒子解析法で、構造解析した IP3 受容体の論文は、2004 年に J. Mol. Biol. に発表した。その Citation は 58 である。

ギャップ結合チャネル、コネキシン 26 の構造解析を行ってプラグゲーティングモデルを提案した PNAS の論文は、2007 年に発表したのであるが、Citation は 75 となっている。その後 2009 年に発表した Nature の論文は Citation が 173 である。ギャップ結合の研究については、高分解能の解析、及び、教科書を書き換えることになったプラグゲーティングモデルの提案などで、世界をリードしている。このヒト由来のギャップ結合を形成しているコネキシンの研究は、さらに昆虫由来のイネキシンへと発展しており、コネキシンが 6 量体（ギャップ結合で 12 量体）を形成しているのとは異なり、イネキシンは 8 量体（ギャップ結合で 16 量体）を形成している。コネキシンノギャップ結合の穴の直径は最大 14 Å 程度であるが、イネキシンの場合には、さらに大きな穴を有するギャップ結合を形成していることなどが解明されるようになった。

ヒトの身体は、上皮細胞が体表面や器官表面をシート状に覆う事により内と外を分け隔てることで内部の恒常性を保っているが、上皮細胞は隣り合う細胞同士が密に接して、タイトジャンクションがベルト状に細胞外周を取り囲むことで細胞間を密着させている。このタイトジャンクションの中心となっている分子は、クローディンと名付けられた膜タンパク質であるが、この分子がどのような構造をとってタイトジャンクションを形成しているのかは、1998 年の発見以来の謎であった。本特別推進研究では、AQP4 や AQP0、コネキシン等の様に、チャネルでありながら、細胞接着性の機能を有する “Adhennel” と名付けるファミリーの構造と機能研究を進めてきた。そして、この Adhennel のファミリーに属すると考えているクローディンの構造研究も一貫して進めてきた。このクローディンは、パラセルラーのイオンチャネルであり、トランスセルラーなイオン透過を制御するチャネルとは異なるタイプのチャネルということが出来る。このクローディンについての構造と機能研究を進めてきた結果、ついに、クローディン-15 の構造を原子分解能で解析することに成功した。この構造解析により、クローディンが細胞外に掌を向けたような構造を形成しており、その掌が負電荷の表面を形成することで、正のイオンを選択的に透過しうることが理解された。さらに、この分子が脂質膜中で数珠つなぎに並んだ構造を形成することが明らかになり、細胞間隙を通るパラセルラーのイオン透過経路も予想する事ができた。今回明らかになった構造は、体表面や器官表面の細胞間をシールして多細胞の生命体の構築に重要な基本構造であり、この分子に関わる病気の理解と共に、細胞間隙を経由した新規ドラッグデリバリー法の開発などが期待される。Science 誌に発表されたので、この研究成果は朝日新聞をはじめとするマスメディアに取り上げられた。

3. GPCR の構造と機能解析

本特別推進研究の中でも重要な研究課題として掲げて研究を続けてきた G タンパク質共役型受容体の構造と機能解析を進めることができ、ついに、この GPCR とそのアゴニストとの複合体の構造を解析することに成功した。この構造解析の結果から、血圧の制御をはじめ、抗がん剤の開発にも貢献できると期待できる。この様なこの GPCR とアゴニストとの構造解析により、アゴニストが強く結合する機構が明らかになった。この構造解析に引き続き、アンタゴニストとの複合体の構造解析も進展している。この GPCR の構造解析により、創薬研究に貢献できるようになりつつある。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. Nature, 438, 633-638 (2005).	電子線結晶学による構造解析の中で最高の分解能、1.9Åで水チャネル AQP0 の構造を解析することによって、脂質分子やチャネル内の水分子をきれいに分離して解析した。	274
2	Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. J. Mol. Biol., 355, 628-639 (2006).	脳での顕著な発現が見られる水チャネル AQP4 の構造を 3.2Å 分解能で解析して、AQP4 が水チャネルでありながら細胞接着性の機能も有することや、アレイ構造を安定化する機構を明らかにした。	189
3	Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. J. Mol. Biol., 360, 934-945 (2006).	膜における解毒と酸化ストレスに対抗する機能を有する膜タンパク質であるミクロゾーマルグルタチオン合成酵素の構造を電子線結晶学を用いた解析した。	76
4	Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. PNAS, 104, 10034-10039 (2007).	電子線結晶学を用いたギャップ結合を形成するコネキシン分子の構造解析の結果、チャネル内にプラグ(栓)と名付けた構造が観察され、プラグゲーディングモデルを提案した。	75
5	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains. J. Mol. Biol. 336, 155-164 (2004).	極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析法で、IP3 受容体の構造を解析して、X線結晶学で構造解析されている部分構造をその中にはめ込むことで、この受容体の構造解析を行った。	59
6	Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Neuroimmun., 196, 181-187 (2008).	昆虫細胞を用いた AQP4 を大量発現し、エライザ解析のシステムを用いて、視神経脊髄炎の診断を行うことを可能とするアッセイ法を開発した。	56
7	Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. Biochim. Biophys. Acta., 1768, 688-693 (2007).	AQP11 は、水チャネルのファミリーで保存されている NPA 配列が保存されていない。それゆえ、この AQP11 が水透過活性を有するか否かが論争があった。この論文で、AQP11 には水透過活性があることを示した。	56
8	Improved specimen preparation for cryo-electron microscopy using a symmetric carbon sandwich technique. J. Structural Biol., 146, 325-333 (2004).	電子線結晶学では、電子線を照射するために試料に電荷が蓄積され、そのために電子線が曲げられてしまう。それゆえ、像飛びが起こり像質の低下が著しい。その問題を解決できるカーボンサンドイッチ法を開発した。	55
9	The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas. J. Mol. Biol., 367, 373-383 (2007).	単粒子解析法によって、TRPC3 の構造を解析した。その結果、大きく特徴的な細胞質側の構造が見られた。	46
10	Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. Biochem. Biophys. Acta., 1778, 1181-1189 (2008).	水チャネル AQP4 はスプライズバリエーションによって、結晶性のアレイを形成したり、それを妨げたりするが、その機構はアミノ末端側に存在するシステイン残基が脂質修飾を受けることによって制御されていることを解明した。	42

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 angstrom resolution. Nature, 458, 597-602 (2009).	コネクシン 26 の高分解能の構造解析により、ギャップ結合の構造を初めて原子モデルを作製できる分解能で解析した。	173
2	Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. PNAS, 107, 8639-8643 (2010).	ヒトの体内の間葉系の組織に、3 胚葉性に分化できる多能性幹細胞 (Muse 細胞と命名) が存在することを解明した。	81
3	Mechanism of Aquaporin-4's Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion. J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009).	AQP4 の構造解析を 2.8Å にまで向上させて、チャンネル内の 8 個の水分子をすべて可視化することによって、速い水の透過を実現すると共に、プロトンの透過を阻害する機構を解明した。	48
4	Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. PNAS, 108, 9875-9880 (2011).	iPS 細胞は、ヒトの組織に存在する多能性細胞 (Muse 細胞と命名) から作られること、Muse 細胞がないと iPS 細胞ができないことを示した。	38
5	Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4. J. Struct. Biol., 166, 16-21 (2009).	アセタゾールアミドが AQP4 の水透過を濃度依存的に、可逆的に阻害できることを示した。そして、AQP1 は阻害しないことを示した。	36
6	Inter-subunit interaction of gastric H ⁺ , K ⁺ -ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. EMBO J., 28, 1637-1643 (2009).	胃のプロトンポンプ H ⁺ , K ⁺ -ATPase はプロトンの濃度勾配を 100 万倍まで濃縮してポンピングできる機能を有する。それを実現するために、βサブユニットがラチェットの様に働くことを示した。	29
7	Gating Movement of Acetylcholine Receptor Caught by Plunge-Freezing. J. Mol. Biol., 422, 617-634 (2012).	スプレー法と急速凍結法を活用して、アセチルコリン受容体にリガンドが結合した状態と基底状態の構造を極低温電子顕微鏡を用いて解析することでゲーティング機構を解明した。	20
8	Water permeability and characterization of aquaporin-11. J. Struct. Biol., 174, 315-320 (2011).	AQP11 の水透過性の機構が論争になったので、界面活性剤が存在しない条件で、AQP11 の水透過の機能を測定した。その結果、AQP11 は水透過能を有することを証明した。	17
9	Conformational rearrangement of gastric H ⁺ , K ⁺ -ATPase induced by an acid suppressant. Nature Commun., 2, 155 pp1-7 (2011).	H ⁺ , K ⁺ -ATPase の阻害剤との複合体の構造解析により、阻害剤が K ⁺ イオンを阻害するように結合する構造を解明した。	17
10	Asymmetric Configurations and N-terminal Rearrangements in Connexin26 Gap Junction Channels. J. Mol. Biol., 405, 724-735 (2011).	電子線結晶学を用いてコネクシンの構造解析の分解能を向上させて、複雑な細胞質側の構造を明らかにするとともに、プラグが 6 回対称を有するのではなく、2 回対称で、2 段の構造を形成していることを解明した。	15

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

1. アクアポリンの構造・機能相関、選択的透過機構などの解明

水チャネルの構造と機能研究については、ラット由来の AQP4 の阻害剤の開発にも成功した (JSB 166, 16-21 (2009))。それゆえ、マウスやラットの実験では、このアセタゾールアミドという AQP4 の阻害剤によって、脳浮腫を軽減させることができることが明らかになってきた。この阻害剤を用いて AQP4 の阻害による脳浮腫を防ぐ薬の開発を進めている。ただし、現状では、ヒト由来の AQP4 には阻害効果が無いことが明らかになり、ラット由来の AQP4 とこの阻害剤との複合体の構造を解析した。これに基づいて、ヒトのための AQP4 阻害薬の開発を進めている。この阻害剤は脳浮腫のみならず視神経脊髄炎にも聞く可能性が期待できるという構造的知見を得ている。さらに別の水チャネルに関する創薬研究もある製薬企業と進めている。

2. イオンチャネルの構造と機能解析

電位感受性 Na⁺チャネルは、リドカイのような局所麻酔剤を結合するので、このタイプの電位感受性 Na⁺チャネルとそのブロッカーの複合体の構造解析と共に電気生理学的研究に基づいて、電位感受性 Na⁺チャネルの阻害剤開発が進んでいる。神経筋接合部で重要な機能を担っているアセチルコリン受容体の原子モデルの解析と、速いゲーティング機構を解析したので、このタイプの受容体を標的とした薬の開発がある企業との共同研究で進んでいる。

ギャップ結合チャネル、コネキシン26の構造解析を行ってプラグゲーティングモデルを提案し、高分解能の解析も行い、教科書を書き換えることになったプラグゲーティングモデルを提案している。このヒト由来のギャップ結合を形成しているコネキシンの研究は、さらに昆虫由来のイネキシンへと発展しており、これを標的とした薬の開発も進んでいる。

ヒトの身体は、上皮細胞が体表面や器官表面をシート状に覆う事により内と外を分け隔てることで内部の恒常性を保っているが、タイトジャンクションがベルト状に細胞外周を取り囲むことで細胞間を密着させている。このタイトジャンクションの中心となっている分子であるクローディンの構造を解析した。この分子は、AQP4 や AQP0、コネキシン等の様に、チャネルでありながら、細胞接着性の機能を有する“Adhennel”と名付けるファミリーの1員であるが、このクローディンは、パラセルラーのイオンチャネルであり、トランスセルラーなイオン透過を制御するチャネルとは異なるタイプのチャネルといえる。このクローディンは27種類が知られているが、その中で、クローディン—15の構造を原子分解能で解析することに成功した。この構造解析により、クローディンが細胞外に掌を向けたような構造を形成しており、その掌が負電荷の表面を形成することで、正のイオンを選択的に透過しうることが理解された。さらに、この分子が脂質膜中で数珠つなぎに並んだ構造を形成することが明らかになり、細胞間隙を通るパラセルラーのイオン透過経路も予想する事ができた。今回明らかになった構造は、体表面や器官表面の細胞間をシールして多細胞の生命体の構築に重要な基本構造であり、この分子に関わる病気の理解と共に、細胞間隙を経由した新規ドラッグデリバリー法の開発などが期待される。この研究成果は、Science 誌に発表された。この研究成果は朝日新聞をはじめとするマスメディアに取り上げられた(図1参照)。

2014年(平成26年)4月18日 金曜日 14版 社会 34

細胞くっつけるたんぱく質解明

皮膚や臓器などの表面で、細胞同士をくっつけてバリアーを作る「クローディン」の分子構造を名古屋大や大阪大などの研究チームが解明した。内側に物質を取り込む「門」の働きもするため、ミネラルの吸収障害などを治療する薬の開発に期待がかかる。18日付の米科学誌サイエンス電子版に発表する。

ヒトの皮膚や血管、腸の表面は細胞のバリアーで守られ、例えば血管からは血液が漏れない。このバリアーを作るため、隣り合う細胞同士を密着させるたんぱく質がクローディン。27種見つかっているが、詳しい分子構造は解明できていなかった。

研究チームは、マウス由来の「15番」と呼ばれるクローディンの結晶を、エックス線を使って解析。分子を作る約1300個の原子の配置を特定し、従来はぼんやりとした塊にしか見えなかった分子の内部の立体構造を明らかにした。

クローディンに異常があると、腸管でマグネシウムを吸収できずに低マグネシウム血症になったり、皮膚が乾燥しがちになったりする。詳しい分子構造が分かったことで、クローディンに働きかける薬の開発も可能になる。腸の表面のクローディンに働きかければ、腸内に効果的に薬を運ぶことも可能になるという。

研究に携わった名大の藤吉好則特任教授は「世界の研究者が見たいと思っていた構造が、やっと一つ見えた」と話している。(鈴木彩子)

たんぱく質「クローディン」のイメージ
外側 細胞 → クローディン
内側 ← 細胞
•細胞同士をくっつける
•物質が入り出す門の役割も
皮膚や血管など

ミネラル吸収障害治療に光

Headline
細胞くっつけるたんぱく質
肌や血管から水分や血液が漏れないのは、表面に細胞のバリアーがあるからだ。バリアー作りには欠かせない、細胞同士をびたりとくっつけているたんぱく質の分子構造を、名大や阪大のチームが初めて解き明かした。 34面

47564号(日刊)
朝日新聞
〒460-8488 名古屋市中区栄1-3-3
02-231-8131 www.asahi.com

図1 2014年4月18日の朝日新聞の記事

3. GPCRの構造と機能解析

本特別推進研究の中でも重要な研究課題として掲げて研究を続けてきたGタンパク質共役型受容体の構造と機能解析を進めることができ、ついに、このGPCRとそのアゴニストとの複合体の構造が解析できた。この構造解析の結果に基づいて、このGPCRを標的とした創薬研究が進んでいる。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）**(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）**

- 1) 本プロジェクトの構造と機能解析を行っていた京都大学の特任助教は、大学の准教授に昇任している。
- 2) 本プロジェクトに参加していた日本学術振興会特別研究員は、大学の助教に昇任している。
- 3) 本プロジェクトの解析を進めた京都大学大学院理学研究科博士後期課程の大学院生は、大学の助教に昇任している。
- 4) 本プロジェクトの構造と機能解析を行っていた京都大学研究員は、大学の特任准教授に昇任している。
- 5) 本プロジェクトの構造解析を行っていた京都大学研究員は、大学の特任准教授に昇任している。
- 6) 本プロジェクトの構造と機能解析を行っていた京都大学大学院博士前期課程の大学院生は、大学の特任助教に昇任している。
- 7) 本プロジェクトの機能解析を行っていた京都大学大学院博士前期課程の大学院生は、大学の特任助教に昇任している。
- 8) その他、本研究計画に参加した多くの大学院生が国内外の研究員やP Iとして活躍している。