

平成21年5月31日現在

研究種目：特別推進研究
研究期間：2004～2008
課題番号：16001005
研究課題名（和文）膜を介する（チャネルおよびGPCRを中心とした）
情報伝達分子機構研究
研究課題名（英文）Structural study of signal transduction through membrane proteins,
channels and receptors
研究代表者
藤吉 好則（FUJIYOSHI YOSHINORI）
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80142298

研究成果の概要：

膜蛋白質を中心とする情報伝達と制御の分子機構を構造の視点から理解することを目的として、具体的には、1) 水チャネルの構造と機能、活性制御、そして高次機能の研究、2) イオンチャネルの構造と機能解析および局在化機構等による高次機能の解析、3) エンドセリン受容体B型（ETBR）等のG蛋白質共役型受容体（GPCR）の構造と機能解析の3つの研究課題を遂行した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	117,000,000	35,100,000	152,100,000
2005年度	119,600,000	35,880,000	155,480,000
2006年度	88,300,000	26,490,000	114,790,000
2007年度	70,200,000	21,060,000	91,260,000
2008年度	46,800,000	14,040,000	60,840,000
総計	441,900,000	132,570,000	574,470,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学、シグナル伝達、神経科学、生理学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

膜を介した情報伝達の分子機構、特にチャネルやGPCRの研究の重要性はすでによく認識されているが、これらの構造研究は容易ではない残された困難な研究課題である。

2. 研究の目的

独自に開発した極低温電子顕微鏡システムを活用して、哺乳動物などの膜蛋白質を中心とする情報伝達と制御の分子機構を構造の視点から理解することを目的とする。

3. 研究の方法

膜蛋白質の生理的機能を理解するには、膜蛋白質が脂質2重膜中にある状態で構造解析する必要がある。このためには、電子顕微鏡を用いた構造解析が有効である。ただし、膜蛋白質の原子座標を決定できる様な高い分解能での構造を解析するには、電子線による蛋白質の損傷が深刻な問題である。電子線による損傷を桁違いに軽減することができて、2Åの分解能を有する極低温電子顕微鏡を開発しているため、これらの装置を活用するとともに、電子線結晶学や単粒子解析法を

用いて、一般には解析が困難とされている膜蛋白質の構造とその生理的機能を解明する。

4. 研究成果

(1) 水チャネル、アクアポリンの構造と機能、活性制御、そして高次機能の研究

AQP0 の構造を 1.9 Å 分解能で解析して、2000 年に AQP1 の解析で提案した Hydrogen bond isolation mechanism と名づけた水チャネルの選択的透過機構で仮定した位置 (2000 年の *Nature* に発表) に水分子が存在することを確認した。この研究成果は、電子線結晶学の分解能の最高記録を更新し、脂質分子も含んだ構造を解析した (*Nature* 438, 633-638 (2005): Articles, 表紙 (図 1))。しかし、これはチャネルが閉じた状態の水が透過しない構造であるので、AQP1 と同じ様な速い水透過を行う AQP4 の構造を 2.8 Å で解析することによって、チャネル内の水分子を全て可視化し、Hydrogen bond isolation mechanism を実証した (図 2)。しかも、AQP4 の新しい細胞接着機能を発見し、分解能を向上させて、脂質分子の構造まで解析することによって、AQP4 分子が向かい側の脂質分子 (PE) と直接結合した構造を解明した (*JMB* 389, 694-706 (2009)) (図 3)。これらの結果、AQP0、AQP4 などの接着能を有する水チャネルや、ギャップ結合チャネルなどを **Adhennel** (Adhesive channel) と命名して、多機能性チャネルの構造生理学という分野を確立しつつある。AQP4 のアレイ形成安定化機構と N-末端側に存在するセリンへの脂質修飾によるアレイ阻害機構を解明した (*JMB* 355, 628-639 (2006), *BBA* 1778, 1181-1189 (2008))。

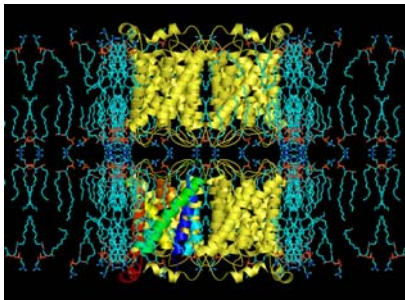


図 1. 脂質分子を含む細胞を接着する AQP0 の構造。

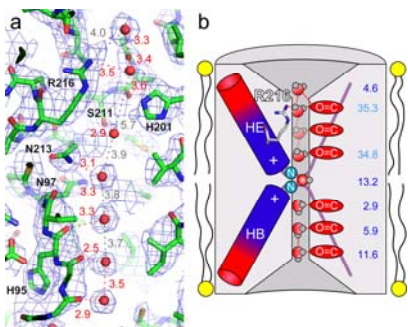


図 2. AQP4 チャネル内の水分子の構造。

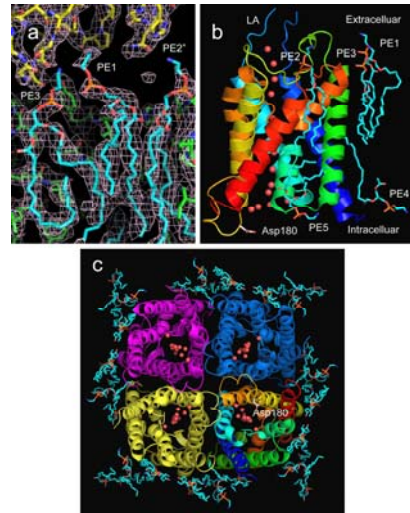


図 3. リン酸化変異体 S180D の高分解能構造解析による AQP4 および水と脂質分子の構造解析。

(2) イオンチャネルの構造と機能解析

神経伝達物質であるアセチルコリンの結合によってチャネルをすばやく開閉するアセチルコリン受容体のゲーティング機構を解明するために、スプレー法と急速凍結法を活用してチャネルが開いた構造の解析に成功し、以前に解析した閉じた構造 (2003 年に *Nature* に発表) から、リガンド結合ドメインがその下端のバリンを通してチャネル形成 M2 ヘリックスを僅かに動かすことで、すばやくチャネルを開閉する機構を解明した。電子線結晶学を用いて、電気シナプスをはじめ広い生物学的機能に関わるギャップ結合チャネル (Cx26) の閉じた構造を安定化する変異体 M34A の構造を解析し、**教科書を書き換えるプラグゲーティングモデルを提案した** (*PNAS* 104, 10034-10039 (2007)) (図 4)。さらに、X 線結晶学で解析した野生型の Cx26 の構造 (*Nature* 458, 597-602 (2009)) から、N-末端のヘリックスから成るプラグによるトランスジャンクショナルな膜電位依存性のプラグゲーティングモデルを提案した。

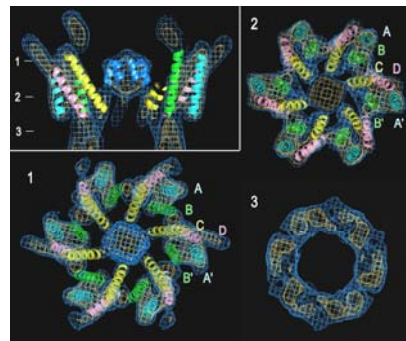


図 4. ギャップ結合チャネルのプラグ構造。

(3)GPCR等の構造と機能解析

GPCRの1つの代表的受容体であるET_BRを昆虫細胞SF+細胞を用いて発現し、リガンドが結合した状態の受容体を精製し結晶化を試みているが、構造研究は困難を極めている。それゆえ、各種構造安定化法の探索を進めている。胃のpHを1近くに保つためのプロトンポンプHK-ATPaseは、100万倍ものプロトンの濃度勾配を形成できるが、電子線結晶学によるこのポンプの構造解析により、その驚異の分子機構を説明できるラチェットモデルを提案し、**EMBO Journal**に発表した。

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10件)

- ① K. Tani, T. Mitsuma, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Nishikawa, Y. Tanimura and Y. Fujiyoshi; “Mechanism of Aquaporin-4’s Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion.” *J. Mol. Biol.*, **389**, 694-706 (2009), 査読有。
- ② K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and Y. Fujiyoshi; “Inter-subunit interaction of gastric H⁺, K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle.” *EMBO J.*, in the press (2009), 査読有。
- ③ S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi and T. Tsukihara; “Structure of the connexin-26 gap junction channel at 3.5 Å resolution.” *Nature*, **458**, 597-602 (2009), 査読有。
- ④ Y. Tanimura, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi; “Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4.” *J. Struct. Biol.*, **166**, 16-21 (2009), 査読有。
- ⑤ H. Suzuki, K. Nishikawa, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi; “Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues.” *Biochem. Biophys. Acta.*, **1778**, 1181-1189 (2008), 査読有。
- ⑥ A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky; “Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule.” *PNAS*, **104**, 10034-10039 (2007), 査読有。
- ⑦ K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi; “Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity.” *Biochim. Biophys. Acta.*, **1768**, 688-693 (2007), 査読有。
- ⑧ T. Hige, Y. Fujiyoshi and T. Takahashi; “Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats.” *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 1955-1966 (2006), 査読有。
- ⑨ Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi; “Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion.” *J. Mol. Biol.*, **355**, 628-639 (2006), 査読有。
- ⑩ T. Gonen, Y. Cheng, P. Sliz, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, S. C. Harrison and T. Walz; “Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals.” *Nature*, **438**, 633-638 (2005), 査読有。

[学会発表] (計10件)

- ① Y. Fujiyoshi; “Structure and function of adhenels: adhesive channels” (Invited lecture), Network of Excellence-3D-EM Final Meeting, Brdo (Slovenia), 2009.2.9-13
- ② Y. Fujiyoshi; “Structure and function of Multifunctional channels” (Keynote lecture), IUCr2008, Osaka (JAPAN), 2008.8.23-31
- ③ Y. Fujiyoshi; “Structure and Function of Multifunctional Channels” (Special Lecture), Neuroscience2008 (The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society) Tokyo (JAPAN), 2008.7.9-11
- ④ Y. Fujiyoshi; “Structure and function of aquaporins” (Keynote lecture), The 5th International Conference of Aquaporin, Nara (JAPAN), 2007.7.13-16
- ⑤ Y. Fujiyoshi; “Structural physiology of multifunctional channels” (Keynote lecture), Joint International Symposium “Membrane Transport as a universal Biological mechanism”, Kyoto (JAPAN), 2007.1.13-14
- ⑥ Y. Fujiyoshi; “Structure and function of cell adhesive”, 5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology, Zürich (SWITZERLAND), 2006.9.15-16
- ⑦ Y. Fujiyoshi; “Structure and function of water channels”, 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology, Poitiers (FRANCE), 2005.10.9
- ⑧ Y. Fujiyoshi; “Structure and function of various water channels” (Keynote Lecture), The 2nd Bilateral Japan-UK Symposium on Structural Genomics and Proteomics, Yokohama (JAPAN), 2005.5.28-30
- ⑨ Y. Fujiyoshi; “Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor”, The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama (JAPAN), 2004.10.13-16
- ⑩ Y. Fujiyoshi; “Structure and function of

channels observed through an electron beam” (Special Lecture), 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 -From Gene to Body-, Kyoto (JAPAN), 2004.8.22-27

[図書] (計 3 件)

- ① T. Walz, Y. Fujiyoshi and A. Engel; “The AQP structure and functional implications.” *Handb. Exp. Pharmacol.*, **190**, 31-56 (2009), Springer-Verlag.
- ② M. Yasui; “pH Regulated Anion Permeability of Aquaporin-6.” *Handb. Exp. Pharmacol.*, **190**, 299-308 (2009) Springer-Verlag.
- ③ 光岡 薫, 藤吉 好則; “膜タンパク質のナノバイオロジ— チャネルの分子構造を機能” ナノバイオロジ— ナノテクノロジーによる生命科学 (共立出版) 第 4 章, 37-47 (2004) 共立出版.

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

- ① 名称: Specimen stage-moving device for charged-particle beam system
発明者: Yoshinori Fujiyoshi, Tomohisa Fukuda
権利者: JEOL Ltd.
種類: 特許
番号: 08251272. 4
出願年月日: 2008. 3. 31
国内外の別: 国外
- ② 名称: Specimen stage-moving device for charged-particle beam system
発明者: Yoshinori Fujiyoshi, Tomohisa Fukuda
権利者: JEOL Ltd.
種類: 特許
番号: 12/057835
出願年月日: 2008. 3. 28
国内外の別: 国外
- ③ 名称: 固体内部の組織学的イメージ像を観察・取得する方法
発明者: 溝口 明, 楠木 正人
権利者: 三重大学
種類: 特許
番号: 特願 2007-129723
出願年月日: 2007. 5. 15
国内外の別: 国内
- ④ 名称: 荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置
発明者: 藤吉 好則, 福田 知久
権利者: 京都大学, 日本電子(株)
種類: 特許
番号: 特願 2007-094862
出願年月日: 2007. 3. 30
国内外の別: 国内

⑤ 名称: トップエントリ式試料ステージ傾斜装置

発明者: 藤吉 好則, 出口 俊二
権利者: 京都大学, 日本電子(株)
種類: 特許
番号: 特願 2005-205558
出願年月日: 2005. 7. 14
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://em.biophys.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 80142298

(2) 研究分担者

溝口 明 (MIZOGUCHI AKIRA)
三重大学・医学部・教授
研究者番号: 90181916

安井 正人 (YASUI MASATO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90246637