

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18207006
 研究課題名（和文） 膜蛋白質複合体コネクソンの結晶構造解析によるギャップ結合の動作機構の解明
 研究課題名（英文）
 Crystal structural analysis of connexin-26 gap junction channel to elucidate functional mechanism of gap junction
 研究代表者
 月原 富武 (TOMITAKE TSUKIHARA)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授
 研究者番号：00032277

研究成果の概要：

隣接する細胞を連結して分子を細胞間で通過させる所をギャップ結合チャネルという。ヒトコノギャップ結合チャネルの構造を3.5Å分解能で決定した。得られた構造はこれまで見つかっている21種すべてのギャップ結合チャネルを代表する構造である。電子顕微鏡による体分解能の構造に基づいて提唱されていた4本の膜貫通ヘリックスの配置は誤りであることが明らかになった。アミノ末端ヘリックスがチャネルの中央部に集まってロート状の構造を形成し、この部分がチャネルの開閉の際に弁の役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2007年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2008年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

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：X線結晶構造解析、膜蛋白質、ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

蛋白質構造データベースに登録されている蛋白質の構造は既に、5万を越えていたが、膜蛋白質の構造は100種に満たないものであった。そのうちヒト由来のものは1,2件し

かなかった。本研究ではヒト由来の膜蛋白質のX線結晶構造解析を目指すものであり、挑戦的課題であった。また、隣接する二つの原形質膜を貫通する構造を原子レベルで決めようとするものであり、これまでには全く成

功例のない研究をであった。

1980年代からギャップ結合の構造研究は電子顕微鏡によって行われてきたが、原子レベルの構造には到らないために、その働きの仕組みを理解することが制約されていた。原子レベルの構造を明らかにする本研究への期待は大きいものがあった。

2. 研究の目的

生物の構造を上位の階層から辿っていくと、個体、器官、組織、細胞、細胞内小器官、超分子、蛋白質・核酸、小分子の階層構造がある。上位の階層の働きは直ぐ下の階層のものとの相互作用によって規定される。細胞が集まって出来ている組織の働きは細胞間の連携によって制御される。ギャップ結合は比較的小さな分子を細胞間で通過させて細胞間連携を円滑に行う。このギャップ結合を形成しているのは、コネクシンと呼ばれる膜蛋白質が6量体を形成しているコネクソンである。コネクシンの1アミノ酸置換遺伝子の中には種々の病気を起こすものが多い。本研究はコネクソンの構造をX線結晶構造解析によって決定して、細胞間の小分子輸送の仕組みを明らかにして、細胞間情報伝達の理解を深める。

3. 研究の方法

(1) 結晶の質の改善

現在、得られている結晶の分解能は5Åである。精製標品の評価は動的光散乱と電子顕微鏡観察で行っている。コネクシンに関しては動的光散乱による分散の単一性と電子顕微鏡による粒形の均一性は結晶化用標品としての適正の判断に有効である。精製標品の品質を動的光散乱と電子顕微鏡観察で確認した上、界面活性剤、結晶化剤、微量添加物、緩衝液

等を変えることによって3.5Å分解能を越える回折像を示す結晶を作成する。

(2) 同型な結晶を得ることができる凍結条件の確立

結晶は脆弱で、セットの回折データを収集するために多数の結晶を用いる必要になると予想される。そのために再現性良く同型な結晶を得ることの出来る凍結剤の選択と凍結法を確立する。

(3) 位相決定

結晶の散乱能は弱いので、SPring-8で最も強い蛋白研専用の生体超分子構造解析ビームラインで30秒以上の長時間露光によって回折強度データ収集を行う。Native結晶の3Å分解能データセット収集に少なくとも100個の結晶を使うことを見込んでいる。重原子置換体を調製し、異常散乱法を加味した重原子同型置換法によって初期位相を決定する。位相の精密化は非結晶学的対象を利用して行う。

(4) モデル構築と構造の精密化

3.5Å分解能の電子密度を得てモデル構築を行うと共に、SeMet 誘導体及びネイティブ結晶の異常散乱効果を利用してアミノ酸配列の同定を行う。構造の精密化を行って、膜貫通領域を含む全原子の座標を決定する。

(5) 機能についての考察

構造に基づいてチャンネルの開閉機構や1アミノ酸置換による病気との関係について考察する。

4. 研究成果

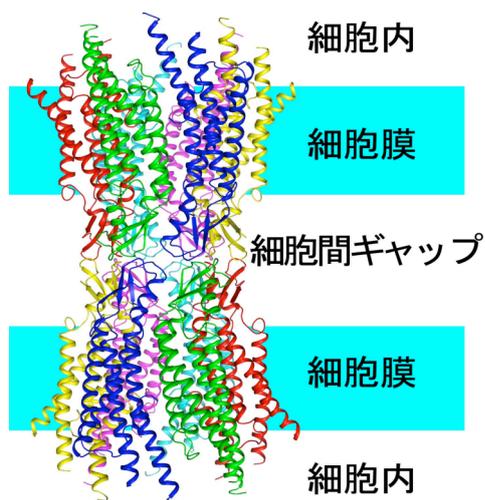


図 1

ヒトコネキシン-26ギャップ結合チャンネルの構造を3.5Å分解能で決定した。アミノ酸配列の同定はSeMet誘導体のSeの異常散乱ピーク位置とネイティブ結晶のS原子の異常散乱ピークによって確定した。その結果、隣接する細胞を直結する構造が明らかになった(図1)。細胞内にあるループ領域とカルボキシ末端ループを除いて、各アミノ

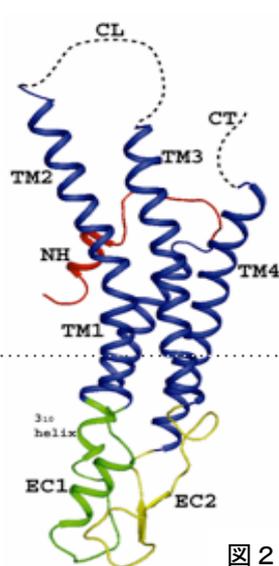


図 2

酸側鎖の配置も含めて決定することができた。モノマーの構造をリボンモデルで図2に示している。構造決定した領域は21種のヒトコネキシンにおいてアミノ酸残基の保存性の高い部分であり、得られた構造がすべてのギャップ結合チャンネルを代表する構造である。従来から提唱されていた4本の膜貫通ヘリックスの配置は誤りであることが明らかになった。難聴の原因になる変異は、構造を不安定にするものであった。アミノ末端領域には短いヘリックスがあり、コネクソンでは6個のアミノ末端ヘリックスがチャンネルの中央部に集まってロート状の

構造を形成している。図3はチャンネルの静電ポテンシャル表面縦に切って示している。上下にある黒く塗った部分がアミノ末端ヘリックスに相当し、この部分がチャンネルの開閉の際に弁の役割を果たしている。この弁の開閉機構も提案した。細胞外ループ領域がコネクソン間結合に係っていることを明らかにした。

ギャップ結合チャンネルとして最初の構造決定であり、今後の研究の要石となる構造を得た。

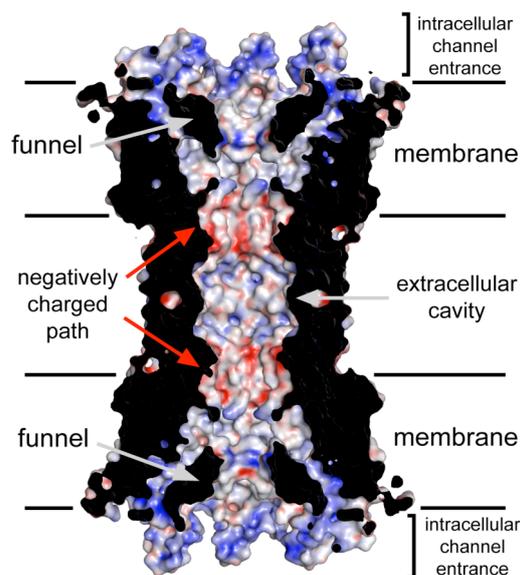


図 3

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2件)

- ① A description of the structural determination procedures of a gap junction channel at 3.5 Å resolution. Suga M, Maeda S, Nakagawa S, Yamashita E, Tsukihara T. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2009 (in press).
- ② Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution.

Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T.
Nature. 2009 Apr 2;458(7238):597-602.

[学会発表] (計6件)

- ① 中川 宗、Structure of the Human Cx26 gap Junction Channel、生命科学系GCOE ネットワーク・フォーラム2009、2009年2月14日、東京大学本郷キャンパス山上会館
- ② 前田 将司、ヒト由来コネキシン26ギャップ結合チャンネルのX線結晶構造解析、第7回コネキシン研究会、2008年12月19日-20日、京都府京都市ホテルルビノ京都堀川
- ③ 前田 将司、ヒト由来コネキシン26ギャップ結合チャンネルのX線結晶構造解析、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第5回公開シンポジウム、2008年12月18日-19日、茨城県つくば市つくば国際会議場
- ④ 前田 将司、ヒト由来ギャップジャンクションチャンネルのX線結晶構造解析、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3日-5日、福岡県福岡市福岡国際会議場
- ⑤ 前田 将司、X-ray structure of Human gap Junction Channel、第21回国際結晶学会年会、2008年8月23日-31日、大阪府大阪市グランキューブ大阪
- ⑥ 前田 将司、ヒト由来ギャップ結合チャンネルのX線結晶構造解析、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第4回ワークショップ、2008年6月16日-18日、兵庫県淡路市淡路夢舞台国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/GCOE/japanese/pico_intro/tsukihara/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月原 富武(TOMITAKE TSUKIHARA)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授
研究者番号: 00032277

(2) 研究分担者

山下 栄樹(EIKI YAMASHITA)
大阪大学・蛋白質研究所・助手
研究者番号: 00294132
(2006年-2007年)
田中 秀明(HIDEAKI TANAKA) 大阪大学・
蛋白質研究所・助手
研究者番号: 40346169
(2006年-2007年)

(3) 連携研究者

山下 栄樹(EIKI YAMASHITA)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号: 00294132
(2008年)
田中 秀明(HIDEAKI TANAKA)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号: 40346169
(2008年)