

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440024

研究課題名(和文) 脳におけるアキアポリン4の立体構造と機能連関

研究課題名(英文) Structural and functional relationship of aquaporin-4 in brain

研究代表者

谷 一寿 (Tani, Kazutoshi)

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：20541204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳で主に発現している水チャネルAQP4の構造と機能相関を解明するために、二価カチオンである水銀と脱炭酸酵素阻害剤でもあるアセタゾラミド(AZA)がそれぞれ結合した状態を極低温電子顕微鏡像を用いて立体構造解析を決定した。水銀は細胞質側、AZAは細胞外側から特異的に阻害できることを明らかにできた。水銀結合型では、結合位置を原子レベルで特定できなかったが、結合サイトを含むループDのコンフォメーション変化が引き起こされないことがわかった。AZA結合型では、AZAの立体配置まで特定できなかったが、ポアを塞ぐ位置で結合し水透過を抑制していることがわかった。更なる分解能向上が創薬へ向けての鍵である。

研究成果の概要(英文)：To reveal the inhibition mechanisms of water channel aquaporin-4 (AQP4), we determined the AQP4 structures in complex with mercury or acetazolamide, an inhibitor of dehydrogenase, using cryo-electron microscopy. The binding sites of mercury and AZA were found at the cytoplasmic and the extracellular side, respectively. In the mercury bound AQP4 structure, the binding sites were not determined at atomic level, but mercury binding could not invoke the large conformational change of the loop D of AQP4 including the binding site of Cys178. The AZA bound AQP4 revealed the AZA binding site to block water pathway near the channel entrance at the extracellular side, but we could not model the conformation of AZA due to the ambiguous density corresponding to the binding site. Further improvement of the crystal quality of AZA bound AQP4 is a crucial key to develop the high affinity inhibitors for AQP4.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生理学 電子線結晶学 二次元結晶 アキアポリン-4 極低温電子顕微鏡 水透過機構

## 1. 研究開始当初の背景

拡散速度に近い速度で水分子を膜透過させる水チャネル aquaporin-1(AQP1)がヒト赤血球から発見されて以来、そのホモログが細菌から哺乳類まで広く存在し、哺乳類ではAQP0 から AQP12 の計 13 種類が発見され、四量体として機能していることが知られている。本課題で対象としている AQP4 は、最初に立体構造が決定された AQP1 と同じく水だけを通す水チャネルであるが、発現パターンが異なり、主に脳、血管平滑筋の無い脳内毛細血管を取り巻くアストロサイトのエンドフィート、浸透圧、グルコースおよび体温センサーとして働いている視床下部のグリア細胞に多く発現している。エンドフィートでは AQP4 が特徴的な格子状アレイ構造を作り、水透過の調節を担っていると考えられている。脳では AQP4 のほかにも AQP1 や AQP9 が一部発現しており、脳脊髄液と密接な関係にある。Science 誌(2013年)で報告された睡眠中の脳脊髄液(CSF)による アミロイドのクリアランスは脳を正常に維持する上で欠かせないことが示されており、今後脳内における CSF の維持機能は重要になり、水チャネルとの関連性も注目視されるようになるであろう。この他に AQP4 の自己抗体が引き起こす視神経脊髄炎(Neuromyelitis optica; NMO)は非常に重篤であり再発性も高く、現在その原因メカニズムの特定が進みつつある。私たちは、このように興味深い機能を担っている AQP4 の立体構造を原子レベルで最初に明らかにし、構造学的見地から AQP4 における細胞接着機能を示唆および実験により証明し、その際「チャネルでありながら細胞接着の機能を有する(adhennel)機能」を提唱した。この細胞接着機能は、視床下部のグリア細胞のラメラ様構造形成のしくみとしても重要であり注目を集めた。これらのような脳における AQP4 の機能と立体構造の相関を観察するためには、できる限り生理的条件下に近い状態の構造機能解析を進めることが最適であると考えられる。

## 2. 研究の目的

脳に多く発現している水チャネル aquaporin-4(AQP4)は、頭蓋骨に囲まれた閉鎖空間である脳内の水分調節を適切に行う仕組みを備えていると考えられている。本研究で使用する電子線結晶学は、膜蛋白質を生理的条件下に近い脂質二重膜内で観察することができるため、立体構造にガイドされた機能実験やドラッグデザインと組み合わせることで、分子あるいは原子レベルの制御機構や病気のメカニズムを明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

数多くの膜タンパク質の立体構造を原子分解能で解析してきた実績をもつ、第三世代の極低温電子顕微鏡(JEOL- 3000SFF)を用い

て、膜タンパク質二次元結晶から電子顕微鏡写真あるいは電子線回折図形を収集した。更に近年開発された電子直接検出装置である K2 Summit (Gatan 社)を、このような旧式の本電子顕微鏡でもスムーズにデータ収集できるように周辺機器と機器コントロールシステム開発も併せて行った。収集したデータは、開発した解析ソフトウェアを使用して構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)水チャネル AQP4 の立体構造と機能

#### 二価カチオンによる水透過阻害機構

脳における AQP4 の水透過調節の機構を解明するために、ドーパミン等によって引き起こされるカスケード反応によってリン酸化される 180 番目の残基であるセリンの変異体(S180D)の機能測定と高分解能の構造解析を行った。予想に反してこの変異 AQP4 は水透過性を変化させないこと、チャネル孔が閉じた構造変化は認められないことを確認した。一方で、リン酸化部位のセリン残基に近い Cys178 を介して二価陽イオンにより水透過性が抑えられ、イオン種に依存して抑制の度合いが異なるという報告がなされており、この付近に重要な調節弁に相当するものが存在することが示唆されている。但し、水を透過する状態の AQP4 構造の Cys178 の場所はチャネル孔から 10 程度離れており、二価陽イオンが直接穴をブロックすることは不可能であり作用機構ははっきりしていない。そこで我々は現在得られている AQP4 の二次元結晶に複数種の二価陽イオンを添加することで、透過性が抑えられた状態の立体構造を決定した。

二価カチオンの添加によるグリッド上での局所的な大幅な濃度変化による結晶性の悪化が引き起こされたが、試料調整時の湿度調整等を含めた試料作成方法の改善に努めることで安定的に実像データが収集できるようになった。最終的に、極低温電子顕微鏡像を用いて二次元結晶の実像を収集することで、直接位相情報を得て 6 分解能での立体構造解析を行い、明瞭な膜貫通ヘリックスを観察することができた。更に同じ分解能でのチャネルが開いた状態の AQP4 と比較するために、二次元結晶の実像を収集し構造解析を進め、最終的に 2 つの立体構造を比較したところ、対応するヘリックスの位置や傾きに大きな変化はなかった。一方で、細かく見ていくと、細胞質側の Cys253 残基付近にデンシティの差が認められる場所を特定することができた。この位置は、当初予想されていた 2 か所のカチオン結合部位の 1 つに相当するが、直接ポアを塞ぐ位置ではなく、水透過の抑制に対して間接的に作用している可能性が示唆された。水を透過しない閉状態の AQP4 の二次元結晶を作製でき、6 分解能ではあるものの二価カチオンの結合に伴う細かなコンフォメーション変化を観察するこ

とができた。水透過アッセイの実験結果からは、二次元結晶の結晶化条件の二価カチオン濃度では水透過がほぼ阻害されているはずであるが、この分解能では大きなコンフォメーション変化が認められなかった(図1)。また、水透過アッセイの実験結果により、野生型よりも低い水銀濃度で水透過の阻害効果が高い変異体(Cys178 付近)も見つかった。これらのことから、細胞質側の二価カチオンによる透過抑制は、ループ構造の変化を含む大きな構造変化は伴わないが、Cys178 付近の局所的な変化によって制御されている可能性が示唆され、今後の原子分解能構造解析によってはじめて阻害機構が解明されるであろうことが期待される。

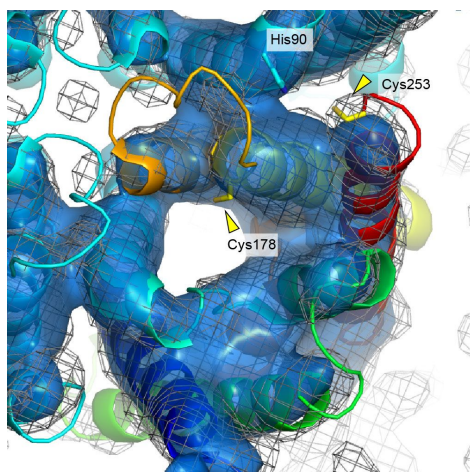


図1：水銀結合型 AQP4 立体構造（細胞質側）  
虹色リボン：AQP4、stick 表示：Cys178, Cys253、  
灰色 mesh：非水銀結合型 AQP4、青色 surface：  
水銀結合型 AQP4。

#### アセタゾラミドによる水透過阻害機構

脱炭酸酵素の阻害剤であるアセタゾラミド(AZA)を用いることで、アフィニティは低いものの AQP4 の水透過活性を下げられることが知られており、AZA と結合した AQP4 二次元結晶を作製し、極低温電子顕微鏡像を用いて二次元結晶の実像データから 5 分解能の立体構造解析を行った。三次元再構成像からは、明瞭な膜貫通ヘリックスを観察することができただけでなく、細胞外側での AZA の結合位置に関するもおおよそ特定することができた。また、リガンドドッキングシミュレーションと組み合わせることで、エネルギー的に安定な複数のリガンドドッキングポーズを提示できた。シミュレーションによるリガンドの予想結合位置および観察されたデンシティは一致し、直接ポアを塞ぐ位置にあるため、AZA が AQP4 の水透過を抑制しているという実験結果と一致した(図2)(Microscopy, 2016)。また、これまで AZA の AQP4 に対する阻害作用に関しては、非常に低いアフィニティも相まって長らく議論

が続いていたが、阻害剤である AZA が AQP4 に結合した状態を可視化できた意義は非常に大きい。

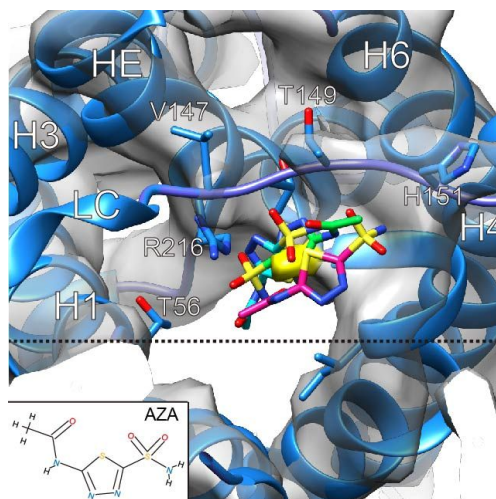


図2：AZA 結合型 AQP4 立体構造（細胞外側）  
青色リボン：AQP4、stick 表示：docking  
simulation によって推定される AZA、灰色  
surface：AQP4、黄色 surface：AZA 結合サイ  
ト。

更に、原子分解能で AZA の結合位置を特定するため、結晶条件の改善を含めて分解能向上をめざした。同一結晶条件内に含まれる複数の対称性をもつ二次元結晶が生成されるため、回折データ撮影後の同じ結晶の実像を収集し、結晶系の分類を行う必要があるため時間を要したが、最終的に P4<sub>2</sub> に属する二次元結晶の電子回折データから 3.2 分解能での立体構造解析が可能になった。リガンドに相当するデンシティは、直接ポアを塞ぐ位置で結合し、AQP4 の水透過を抑制していることがはっきりし、5 分解能の三次元再構成像で推定された結合位置とも一致した。

AZA 結合に伴う細胞外側の大きなコンフォメーション変化は観察することができなかったが、AZA の結合時のコンフォメーションを確定することはできなかった。今後、データ数を増やすことである程度の分解能向上(3.0)は期待できるが、より詳細な情報を得るためには、新規コンストラクトや結晶条件再探索の必要がある。同じ水チャネルの仲間である AQP1 には結合しないといった特異的な結合性についても考察を行いたい。更に、AZA のメチル誘導体であるメタゾラミド(MZA)では、AQP4 を阻害できないこともわかっているので、AZA の詳細な立体結合状態が可視化できれば、メチル誘導体によって結合できなくなる理由も説明することができ、AQP4 に対してより高いアフィニティを持つリード化合物設計のガイドになると考えている。

これまで AQP4 ノックアウトマウスに於いては、他の水チャネルによる機能重複により

脳における表現型の重要な差ははっきりと示されなかったが、今後のアフィニティの高い特異的阻害剤開発により AQP4 独自の脳内での機能を明らかにできる可能性はある。

## (2)クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析方法開発

AZA が結合した AQP4 の二次元結晶でも、同様なアレイ形成に重要な N 末端側の密度が確認されていることから、3.2 分解能の電子回折データと 5 分解能の実像データ（フィルムに記録）を組み合わせたハイブリッドのデータを生成し、新たな構造解析方法を進めることで、通常の解析では確認できなかった N 末端側の主鎖構造をある程度特定でき、アレイ形成の足場を提供する部分がかかってきた。

しかし、記録媒体であるフィルムや電子回折図形由来のデータでは、格子状アレイ形成に重要な N 末端側の密度が原子レベルの詳細な可視化ができないことが、今回の結果わかってきたため、更なる分解能向上を目指して、最近脚光を浴びている直接電子検出装置（direct electron detector ; DED）と呼ばれる K2 Summit（Gatan 社）を導入した高分解能の画像の記録システム開発を試みた。

K2 Summit を効率よく使用できるように、コントロール PC 上でモーション補正プログラムを起動できるよう GUI（グラフィックユーザーインターフェース）ベースのシステム開発を行った。効果的に使用できるようにデータ収集条件および画像処理条件を探索したところ、最適な条件は 3 万倍の倍率で 3 分解能程度の実像をモーション補正プログラムの適用することで、ナイキスト周波数限界以上の分解能をリアルタイムで画像収集することが可能となった（図 3）。この開発したシステムを用いることで、将来的には、実像データのみで二次元結晶高分解能三次元再構成が有望であることもわかってきた。また、このシステムは単粒子構造解析に対しても有用であり、ギャップ結合チャネル Innexin-6 の原子分解能構造解析（Nat. Commun., 2016）のデータ収集の効率化に貢献した。

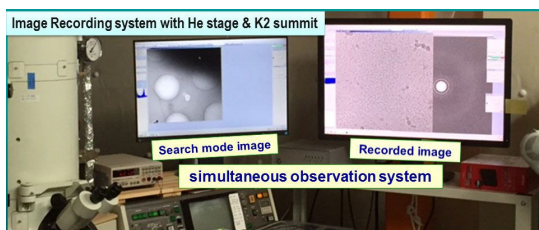


図 3 : K2 Summit を用いた画像収集システム

## 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 14 件)

H. Suzuki, K. Tani, Y. Fujiyoshi, "Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2017) in press, 査読有

A. Oshima, K. Tani, Y. Fujiyoshi, "Atomic structure of the innexin-6 gap junction channel determined by cryo-EM", *Nat. Commun.* **7** (2016) 13681, 査読有

A. Kamegawa, Y. Hiroaki, K. Tani, Y. Fujiyoshi, "Two-dimensional crystal structure of aquaporin-4 bound to the inhibitor acetazolamide", *Microscopy* **65** (2016) 177-184, 査読有 (\$Equally corresponding author)

H. Tanaka, Y. Yamamoto, H. Kashihara, Y. Yamazaki, K. Tani, Y. Fujiyoshi, K. Mineta, K. Takeuchi, A. Tamura, and S. Tsukita, "Claudin-21 has a paracellular channel role at tight junctions", *Mol. Cell Biol.* **36** (2016), 954-964, 査読有

Y. Osuda, K. Shinzawa-Itoh, K. Tani, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, C. Gerle, "Two-dimensional crystallization of monomeric bovine cytochrome c oxidase with bound cytochrome c in reconstituted lipid membranes", *Microscopy* **65** (2016) 263-267, 査読有

A. Oshima, T. Matsuzawa, K. Murata, K. Tani, Y. Fujiyoshi, "Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel", *J. Mol. Biol.* **428** (2016) 1227-1236, 査読有

A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi, T. Doi, "Thermostabilization of the human endothelin type-B receptor", *J. Mol. Biol.* **428** (2016) 2265-2274, 査読有

W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki, T. Doi, "Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1", *Nature* **537** (2016) 363-368, 査読有

H. Suzuki\*, K. Tani\*, A. Tamura, S. Tsukita, Y. Fujiyoshi, "Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions", *J. Mol. Biol.* **427** (2015) 291-297, 査読有 (\*Equally first author)

Y. Saitoh\*, H. Suzuki\*, K. Tani\*, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, Y. Fujiyoshi, "Structural insight into tight junction

disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin", *Science* 347 (2015) 775-778, 査読有 (\*Equally first author)  
C. Jiko, K.M. Davies, K. Shinzawa-Itoh, K. Tani, S. Maeda, D.J. Mills, T. Tsukihara, Y. Fujiyoshi, W. Kuhlbrandt, C. Gerle, "Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals", *eLife* 4 (2015) e06119, 査読有  
S. Shimada, K. S-Itoh, S. Amano, Y. Akira, A. Miyazawa, T. Tsukihara, K. Tani, C. Gerle, S. Yoshikawa, "Three-dimensional structure of bovine heart NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by electron microscopy of a single negatively stained two-dimensional crystal", *Microscopy* 63 (2014) 167-174, 査読有  
H. Suzuki\*, T. Nishizawa\*, K. Tani\*, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, Y. Fujiyoshi, "Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions", *Science* 344 (2014) 304-307, 査読有 (\*Equally first author)  
K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi, "Systematic Comparison of Molecular Conformations of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Reveals an Important Contribution of the A-M2 Linker for the Luminal Gating", *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 30590-30601, 査読有

〔学会発表〕(計5件)

谷一寿, "クライオ電子顕微鏡によるチャネルの原子分解能構造解析", 理研シンポジウム, 2016年11月8日, 横浜  
K.Tani, "Crystal structure of a claudin, a main component of tight junctions", 日本生理学会大会(2015年3月22日), 神戸  
谷一寿, "クローデインの結晶構造を基にしたタイトジャンクション構造", 蛋白研セミナー, 2014年12月4日, 大阪  
谷一寿, "極低温電子顕微鏡による膜タンパク質の二次元結晶構造解析", 日本顕微鏡学会, 2014年5月11日, 幕張メッセ国際会議場  
K.Tani et. al, "Two alternative conformation of a voltage-gated sodium channel", 第62回日本細胞生物学会大会(2014年5月11~13日), 幕張メッセ国際会議場

〔その他〕

ホームページ:

[http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/BasicBiol/tani/tani\\_jp.htm](http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/BasicBiol/tani/tani_jp.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷一寿 (Tani, Kazutoshi)  
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: 20541204

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者なし