

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840019

研究課題名(和文)電子顕微鏡法によるギャップ結合チャネルの構造と機能の研究

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of gap junction channels using electron microscopy

研究代表者

大嶋 篤典(Oshima, Atsunori)

名古屋大学・名古屋大学細胞生理学研究センター・准教授

研究者番号：80456847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではギャップ結合チャネルの開閉機構の解明を目的として、線虫に存在するイネキシン6(INX-6)の電子線結晶構造解析を行った。N末端の2-19残基を欠失したINX-6変異体(INX-6deIN)から二次元結晶が得られ、極低温電子顕微鏡像から膜平面10オングストローム分解能における三次元再構成に成功した。その結果、INX-6deIN ギャップ結合チャネルは16量体から成っていることが明らかとなった。チャネルの通路にはプラグに相当する密度が確認された。透過活性測定ではINX-6deINの活性は失われており、閉じている構造の一つを示すものであることがわかった。以上の結果は論文にまとめて発表した。

研究成果の概要(英文)：In this project, the structure of *C. elegans* innexin-6 (INX-6) was investigated using electron crystallography. Two dimensional crystals of N-terminal deleted INX-6 where 2 to 19 were eliminated were successfully obtained. The structure of INX-6deIN reveals the six-teen subunits, a hexadecamer. The plug density was observed on the channel pore pathway, suggesting a structure in a closed form. These results have been published as a research article

研究分野：構造生物学

キーワード：ギャップ結合チャネル イネキシン 電子顕微鏡 三次元再構成 二次元結晶

1. 研究開始当初の背景

ほぼすべての多細胞生物は隣接細胞同士がギャップ結合チャンネルで連絡されている。このチャンネルは発生、受胎能力、免疫機能など様々な生物プロセスに関与すると考えられており、ギャップ結合チャンネルの異常によって引き起こされるヒトの疾患も複数知られている。ギャップ結合チャンネルを構成するタンパク質には2つの遺伝子ファミリーが知られている。脊椎動物が持つコネキシンはヒトの疾患と関連するなどその重要性から構造研究が進んでおり、12量体でギャップ結合チャンネルを形成することが分かっているほか、複数の研究報告から開閉機構に関する示唆がなされてきた^(1,2,3)。しかし無脊椎動物に存在するイネキシンについては研究報告が少なく、その立体構造や開閉機構に関してはほぼ未解明であった。巨視的には区別がつかないほど似たこの構造体を、異なる二つのタンパク質が別個に作る生物学的意義を解明するために、イネキシンの立体構造を明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

(1) ギャップ結合チャンネルの多量体構造と生理的機能の理解を目的として、線虫イネキシン6(INX-6)の電子線結晶構造解析による構造研究を行った。コネキシンギャップ結合チャンネルの構造研究から我々が提示したプラグゲーティングモデルの一般性の解明を目的とした。

(2) ギャップ結合チャンネルの高分解能構造解析を目指し、極低温電子顕微鏡による単粒子解析を目的とした試料調製の最適化を行った。

3. 研究の方法

(1) 線虫 INX-6 を昆虫細胞発現系で大量発現し、Ni アフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。二次元結晶化にはN末端を18残基欠失した INX-6 Δ N を用いた。合成脂質 15:0 Lyso PC に精製した INX-6 Δ N を混合し、透析で二次元結晶を作製した。構造データ収集は極低温電子顕微鏡を用いて行い、加速電圧 300kV、ステージ温度 4 K の条件の下、Kodak SO-163 フィルムで撮影した。画像解析は MRC 二次元結晶構造解析パッケージを用いて行った。

(2) INX-6 チャンネルの活性測定は、GFP 融合 INX-6 を接地した昆虫細胞に発現させ、光学顕微鏡下で蛍光色素をマイクロインジェクションして1分後における色素の透過を測定した。

(3) INX-6 の精製タンパク質から GraDeR 法によってフリーの界面活性剤を除く操作を行った。具体的には界面活性剤を含んだ状態の INX-6 精製タンパク質をグリセロールの密度

濃度勾配遠心法で界面活性剤を含まない溶液中に向けて遠心沈降させるものである。GraDeR を行う前後におけるタンパク質溶液を回収、染色し、負染色電子顕微鏡像を比較した。

4. 研究成果

(1) INX-6 Δ N の二次元結晶化に成功し、合計 249 枚の極低温電子顕微鏡像を用いて水平方向 10Å 分解能における三次元再構成を得た。その結果、INX-6 Δ N は 8 量体のヘミチャンネルが向かい合って結合した 16 量体でギャップ結合チャンネルを形成していることが明らかとなった (図 1)。

コネキシン 26 (Cx26) の構造と比較するとサブユニットの数が多いだけでなく、外径、孔の内径などが大きいチャンネルである (図 2)。このことは INX-6 チャンネルがコネキシンチャンネルと比べてより大きな分子に対する透過性を持つという先行研究結果⁽⁴⁾を支持するものであった。また孔の内側にはプラグに相当する密度が確認され、Cx26M34A の先行研究に似た特徴を示すものであった⁽²⁾。

(2) 蛍光色素透過性の測定において、INX-6 Δ N は透過活性が失われていることが

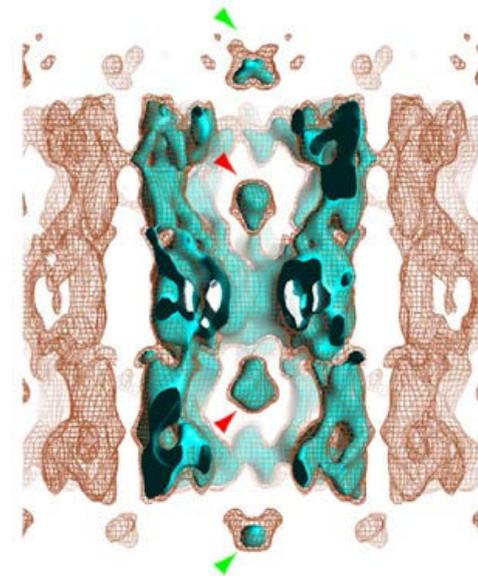


図 1 INX-6 Δ N の 10Å 分解能の三次元構造

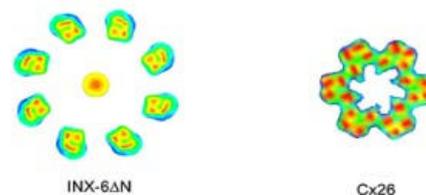


図 2 INX-6 Δ N (左) と Cx26 (右) の膜貫通領域の断面図

図 1、図 2

Oshima et al. (2016) J. Mol. Biol. 428, 1204

わかった。また野生型の INX-6 と共発現するとその活性を抑制することから野生型と高次構造複合体を形成していると解釈された。したがって本研究で得られた INX-6ΔN の立体構造は閉状態の一つを示している可能性があるが、N 末端を切断していることから生理的な構造でない可能性もあり、これについては今後の研究が必要である。

本研究は自然界に存在するギャップ結合チャネルの多様性と機能の相似性を示唆するものであり、今後のギャップ結合チャネルの研究に寄与するものである。

(1), (2)の結果は論文にまとめて発表した。

(3) 負染色電子顕微鏡像の観察結果から、ゲル濾過精製後の 0.02% LMNG 存在下において INX-6 チャネルは多量の LMNG ミセル分子に取り囲まれているが、GraDeR を行った後は、バックグラウンドのミセルがなく、かつ INX-6 チャネルのオリゴマーも保たれていることが確認された(図 3)。この手法は INX-6 においてはマイルドに界面活性剤分子を除く目的として有効であり、この試料を用いて今後極低温電子顕微鏡による単粒子解析を行う予定である。また、Cx26 の精製タンパク質を用いて GraDeR を行ったところ、GraDeR 後も Cx26 オリゴマーが安定に保持されていることを確認した。Cx26 は当初電子線結晶構造解析を行う計画を立てていたが、GraDeR が適用できた結果を受けて、単粒子解析による高分解能構造解析を目指す方針に変更して研究を継続している。GraDeR が他の膜タンパク質に対しても適用できれば、膜タンパク質の電子顕微鏡による構造解析に大きく寄与することが期待される。

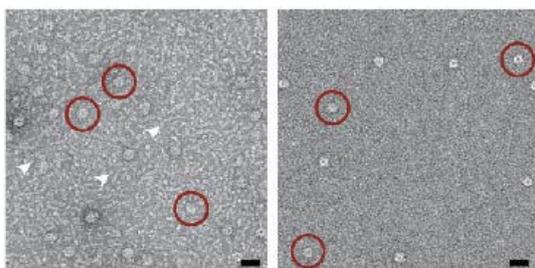


図 3 GraDeR 処理前 (左) 処理後 (右) の INX-6 の負染色像
Hauer et al. (2015) Structure 23, 1769

<引用文献>

1. Unwin, P. N. & Ennis, P. D. "Two configurations of a channel-forming membrane protein" Nature 307, 609-613, 1984
2. Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. and Sosinsky, G.E. "Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the

vestibule" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 10034-10039, 2007

3. Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. and Tsukihara, T., "Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5Å resolution" Nature 458, 597-602, 2009
4. Oshima, A., Matsuzawa, T., Nishikawa, K. and Fujiyoshi, Y. "Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* innexin-6 gap junction protein" J. Biol. Chem. 288, 10513-10521, 2013

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 3 件)

1. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y. "Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel" *J. Mol. Biol.* 428, 1204-1213, 2016. 査読有 [10.1016/j.jmb.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.011)
2. 大嶋篤典 ギャップ結合チャネルの構造と多様性、膜 (MEMBRANE), 41 (2), p.50~p.56, 2016. 査読有
3. Hauer, F., Gerle, C., Fischer, N., Oshima, A., Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Yokoyama, K., Fujiyoshi, Y. and Stark, H. "GraDeR: membrane protein complex preparation for single particle cryo-EM" *Structure* 23, 1769-1775, 2015. 査読有 [10.1016/j.str.2015.06.029](https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.029)

[学会発表] (計 9 件)

1. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF INNEXIN GAP JUNCTION CHANNELS STUDIED BY ELECTRON CRYSTALLOGRAPHY. 60th Biophysical Society Annual Meeting, February 27-March 2, 2016, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California
2. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., Three dimensional structure of *C. elegans* innexin gap junction channels BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日 (火) ~4 日 (金) 神戸ポートアイランド、神戸
3. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., Initial 3D reconstruction of innexin gap junction

channels by electron crystallography 電子線結晶構造解析によるイネキシングギャップ結合チャネルの初期三次元再構成
大嶋 篤典,松澤 朋寛,村田 和義,谷 一寿,藤吉 好則 日本顕微鏡学会 第71回学術講演会 2015年5月13日(水)~15日(金)、国立京都国際会館、京都

4. Oshima, A., Structure and diversity of gap junction channels studied by electron microscopy 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会、神戸国際会議場、神戸、2015年3月21日(土)~23日(月)
5. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Nishikawa, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y., "Electron Microscopic Studies of Invertebrate Gap Junction Channels", IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies, Nagoya University, Nagoya, January 15~16, 2015.
6. 大嶋篤典 電子顕微鏡で見るギャップ結合チャネルの構造と多様性 生理学研究所研究会 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用「次世代の生物電顕を考える」岡崎コンファレンスセンター、岡崎、2014年11月12(水)~13日(木)
7. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Nishikawa, K. and Fujiyoshi, Y., Electron microscopy of *C. elegans* innexin-6 gap junction channels indicates the characteristic subunit organization, 第52回日本生物物理年会、札幌コンベンションセンター、札幌、2014年9月25日(木)-27日(土)
8. Oshima, A., Matsuzawa, T., Murata, K., Nishikawa, K., and Fujiyoshi, Y., "Oligomeric form and function of *C. elegans* innexin-6 gap junction channels", the 23rd International Union of Crystallography (IUCr) Congress and General Assembly, Montréal, Québec, Canada, August 5~12, 2014.
9. 大嶋篤典、松澤朋寛、村田和義、西川幸希、藤吉好則 電子顕微鏡によるイネキシングギャップ結合チャネルの構造研究 日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会、幕張メッセ 国際会議場、千葉、2014年5月11日(日)~13日(火)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大嶋 篤典 (Atsunori Oshima)

名古屋大学細胞生理学研究所センター・准教授

研究者番号：80456847

(2)研究分担者

(3)連携研究者