

大嶋篤典 (Atsunori Oshima)

E-mail:atsu@cespi.nagoya-u.ac.jp

TEL: 052-747-6837



ギャップ結合チャンネルの構造と機能の研究

ギャップ結合はほぼすべての多細胞生物が持つ細胞間コミュニケーションを担う構造体で、隣接細胞間において細胞質同士を直接連絡することによって電気的および化学的なカップリングを実現している。この機能は心筋細胞の電気的同調、胚発生、受胎能力、免疫系など、様々な生物学的プロセスに関与しており、この機能不全がヒトでは難聴や白内障などの疾患の原因となることが知られている。

ギャップ結合の構造は複数のチャンネルのクラスターが隣接細胞間を貫通し、2~4nmの隙間を形成していることから、そのチャンネルをギャップ結合チャンネルと呼ぶ(図 1)。ギャップ結合チャンネルは4回膜貫通型タンパク質が多量体構造を作り、中央を連絡通路として小分子量のシグナル分子を低い選択性で透過させる。不思議なことに2つの遺伝子ファミリーがこの共通した機能を果たすタンパク質として進化してきた。脊椎動物に存在するギャップ結合チャンネルはコネクシン(connexin: Cx)というタンパク質が作り、無脊椎動物が保有するギャップ結合チャンネルのタンパク質はイネキシン (innexin: INX) と呼ばれる。この両者のアミノ酸配列には類似性が見られないものの、膜面分の負染色電子顕微鏡像や凍結切断像の観察では区別がつかないほど似ている。機能的に似た構造を別々のタンパク質が作るに至った生物学的な意義は不明である。コネク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知られているが、イネキシンに関する研究は報告例が少なく、その構造はコネクシンに比べると未解明に等しかった。またギャップ結合チャンネルの開

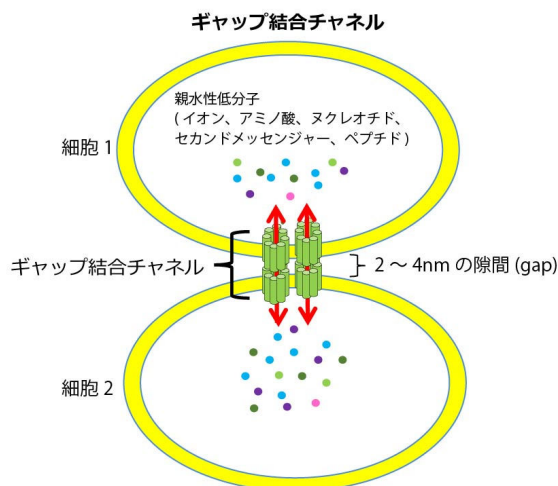


図 1 ギャップ結合チャンネルの模式図

隣接する細胞間をチャンネルが直接連絡して、細胞同士の電気的、化学的なカップリングを担う。細胞間に2~4nmの隙間(gap)があり、gap junction channel と呼ばれる。

閉機構については明確な構造基盤の説明には至っていない。こうした疑問に答える目的で、主にクライオ電子顕微鏡を用いたギャップ結合チャンネルの立体構造研究に取り組んでいる。

●コネキシン 26 (Cx26) の三次元構造の研究

脊椎動物に存在するコネキシングャップ結合チャンネルの開閉機構の解明を目的として、透過活性の低下が知られているヒト Cx26M34A 変異体の電子線結晶構造解析を行った。10Å 分解能の三次元再構成を行い、チャンネルの入口を物理的にふさぐプラグを確認した(図 2)[1]。大阪大学との共同研究で報告された Cx26 の X 線結晶構造はオープン構造と解釈され、N 末端が作るファネル構造がチャンネルの機能に重要な役割を果たす可能性が示唆されている[2]。一連の研究からコネキシンの N 末端がチャンネルの通路を物理的に開閉するモデルに言及した[1,3]。

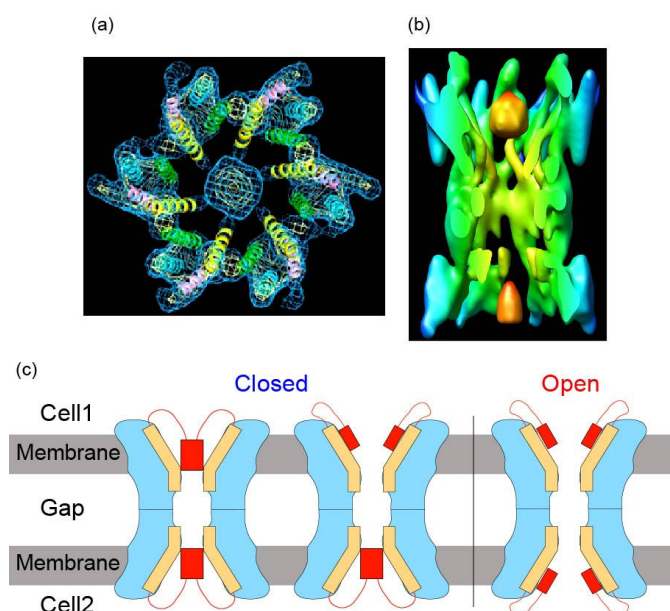


図 2 Cx26M34A の三次元構造[1]

(a) Cx26M34A を細胞質側から見た図。

(b) Cx26M34A を膜平面方向に見た断面図。通路の中央にプラグが確認される。

(c) Cx26 の N 末端 (赤色) が物理的にチャンネルの通路を閉じるモデル[3]。

●イネキシン 6 (INX-6) のクライオ電子顕微鏡高分解能単粒子解析

無脊椎動物に存在するイネキシン (innexin, INX) ギャップ結合チャンネルの多量体構造は不明であったが、線虫に存在する INX-6 の電子線結晶構造解析による立体再構成から、INX-6 ギャップ結合チャンネルは 16 量体構造であることを示した[4]。その後、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法によって、INX-6 の原子構造を決定した(図 3) [5]。

INX-6 は 16 量体構造および単量体構造ともに Cx26 と類似しており、細胞質ドメインがギャップ結合チャンネルとして初めて明らかになった。細胞内ループと C 末端が共にヘリックス-ターン-ヘリックスを作りながら相互作用しており、これが隣接サブユニット間で相互作用してドーム構造を形成し、N 末端ファネルから伸びるループに細胞質側から接触できる配置にあった。

こうした INX-6 と Cx26 の構造の類似性は、2つのファミリーの遺伝的な相関を示唆する。ギャップ結合チャンネルの機能において、N 末端ファネルの重要性は明確で、これはイネキシン、コネキシンの両ファミリーで共通している可能性がある。また細胞質ドームのコンフォメーション変化が容易に N 末端ファネルに伝わることから、細胞質ドメインがチャンネルの透過活性に関与していると解釈される。

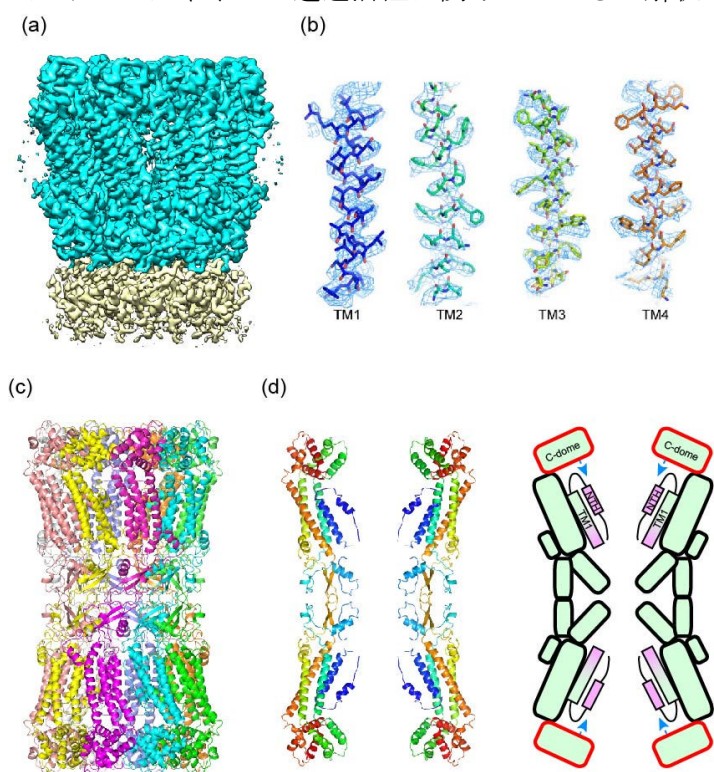


図3 INX-6のクライオ電子顕微鏡構造研究 [5]

- (a) INX-6 の三次元密度マップ
- (b) 膜貫通ヘリックスのマップとモデル
- (c) INX-6ギャップ結合チャンネルの原子モデル
- (d) (左)向かい合う INX-6 サブユニットによるチャンネルの通路を示す原子モデル。(右)N 末端ファネルと細胞質ドーム (C-dome:赤色) による制御モデル。

●膜タンパク質のクライオ電子顕微鏡高分解能単粒子解析のための試料調製法

クライオ電子顕微鏡の試料にはタンパク質粒子が重ならず薄くて均一な氷の層を作製する必要がある。しかし精製した膜タンパク質溶液中に含まれる界面活性剤ミセルはこの目的の妨げとなることがあり、可能な限りミセルの除去が望ましいが、同時に膜タンパク質を未変性に保つ必要がある。INX-6 のクライオ電子顕微鏡単粒子解析ではグリセロールを用いた密度濃度勾配超遠心法の GraDeR[6]がクライオグリッドの作製に有効であった(図 4)。このほか、ナノディスク再構成[7]もギャップ結合チャンネルに再現性良く適用できている。また、クライオグリッド作製における凍結手法も重要な要素で、セミオートデバイスとマニュアル操作による凍結を、対象となるタンパク質試料の濃度、

安定性、バッファ条件などを考慮して使い分けながら、理想的なクライオ電子顕微鏡用の試料作製を目指した努力を行っている。

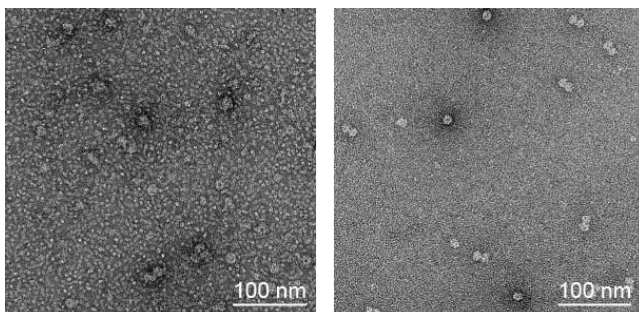


図 4 界面活性剤除去法 GraDeR [6]

GraDeR を行う前(左)と後(右)の INX-6 チャンネルの負染色電子顕微鏡像 [5]

研究設備

タンパク質大量発現を行うため、大腸菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞の培養系が立ち上がっている。タンパク質精製や精製タンパク質の性状分析を行うカラムシステム、活性測定を行う電気生理用測定機器、光学顕微鏡が設備されている。常温観察用の電子顕微鏡はタンパク質の性状チェックに用い、高分解能構造解析にはクライオ電子顕微鏡を用いる。クライオ電子顕微鏡には電子直接検出カメラが搭載され、迅速なフィードバックを可能にするオンサイトでの画像クオリティチェックが可能な環境を整えている。

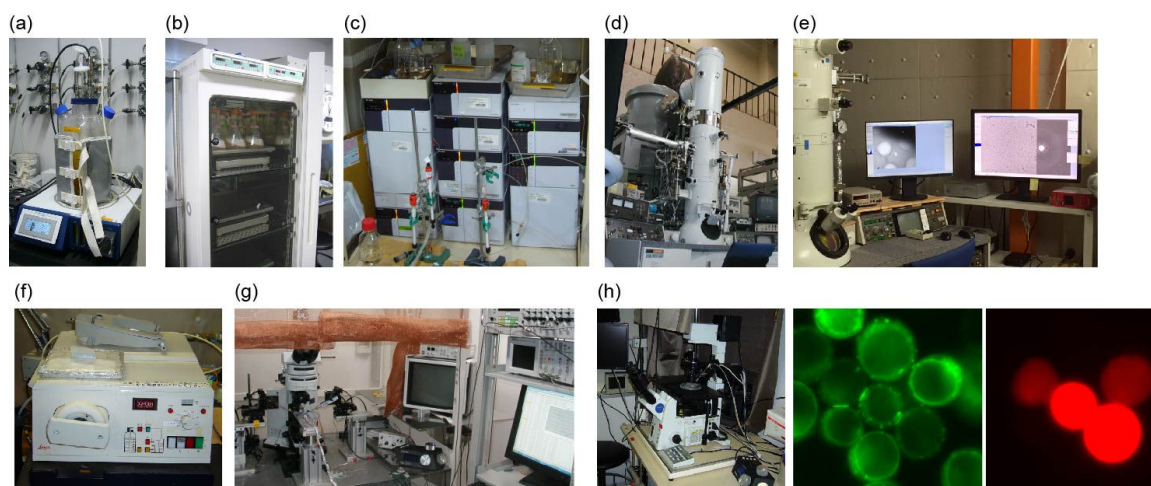


図 5 研究設備

(a) 昆虫細胞培養器 (b) 哺乳動物細胞培養器 (c) 蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー (d) JEOL クライオ電子顕微鏡 JEM-3000SFF (e) クライオ電子顕微鏡オンサイト画像クオリティチェック (f) クライオグリッド作製用マニュアルプランジャー (g) パッチクランプシステム (h) 蛍光顕微鏡マイクロインジェクションと INX-6 ギャップ結合チャンネルの蛍光色素透過活性観察

References

- [1] Oshima *et al.* *PNAS* **104**, 10034 (2007)
- [2] Maeda *et al.* *Nature* **458**, 597 (2009)
- [3] Oshima *FEBS Lett.* **588**, 1230 (2014)
- [4] Oshima *et al.* *J. Mol. Biol.* **428**, 1227 (2016)
- [5] Oshima *et al.* *Nat. Commun.* **7**, 13681 (2016)
- [6] Hauer *et al.* *Structure* **23**, 1769 (2015)
- [7] Leitz *et al.*, *BioTechniques* **40**, 601 (2006)