The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | X-ray structure of human connexin26 gap junction channel at 3.5Å resolution |
| Author(s) | 前田, 将司 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49721 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【65】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 前　田　将　司（まえだ しょうじ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学位記番号 | 第　２２６９９　号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年３月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>理学研究科生物科学専攻 |
| 学位論文名 | X-ray structure of human connexin26 gap junction channel at 3.5Å resolution<br>**(3.5Å分解能でのヒト由来コネキシン26ギャップ結合チャネルのX線結晶構造解析)** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教　授　中川　敦史<br>(副査)<br>教　授　金澤　　浩　　教　授　福山　恵一　　教　授　長谷　俊治<br>名誉教授　月原　冨武 |

## 論文内容の要旨

＜研究の背景と目的＞

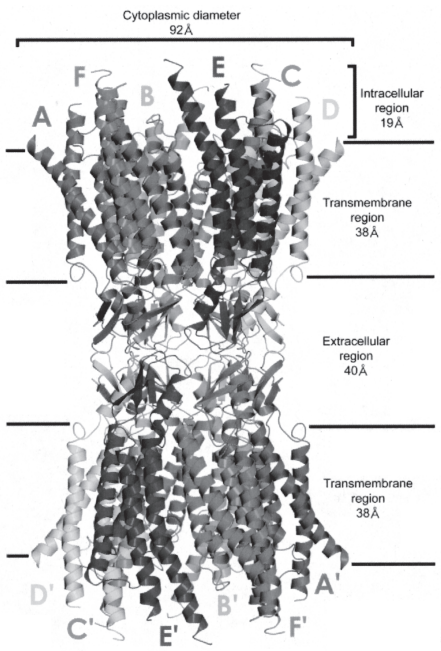
多細胞生物において細胞間連絡は最も基本的な機能の一つでありよく知られた例として、カドヘリンによる密着結合、シナプス、ホルモンによる内分泌等がある。その中でも、ギャップ結合は隣接する細胞間を物質的に直接共役する、非常に特殊な構造体である。ギャップ結合は電子顕微鏡下では細胞と細胞が２－４nmの隙間（ギャップ）を挟んで広範囲にぴったりと張り付いているように見られ、細胞膜に垂直な方向から見ると、これらは中央に１－２nmの孔を持った６角形の蛋白質複合体が密集して形成されている様子が観察される。このギャップ結合を形成する蛋白質複合体をギャップ結合チャネルといい、その実体は２つの隣接細胞からそれぞれ供与されたコネクソン(ヘミチャネル)と呼ばれる膜蛋白質複合体が細胞外領域で結合したチャネルである。一つのコネクソンはコネキシンと呼ばれる４回膜貫通型蛋白質が中央の孔を囲んで６量体を形成したものである。ギャップ結合はイオン、セカンドメッセンジャー、代謝物質など、分子量がほぼ1kDa以下の低分子を通すことが知られており、細胞間の恒常性維持や心筋の同期した収縮、細胞分化の際のシグナル伝達等に不可欠である。コネキシン遺伝子の変異の中には発生・心臓の拍動・神経伝達に異常を来すもの、白内障や難聴といった病気を引き起こすものが数多く報告されている。

本研究では、ギャップ結合チャネルの原子レベルでの構造形成基盤とそれに基づいた機能発現の詳細を理解するため、ヒト由来コネキシン２６(Cx26)からなるギャップ結合チャネルのＸ線結晶構造解析による構造決定を行った。

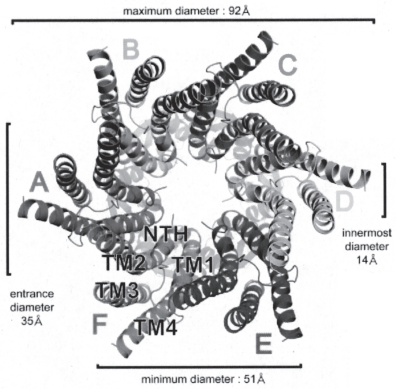
＜結果と考察＞

Baculovirusを用いた昆虫細胞発現系により発現させたCx26をギャップ結合膜の精製、可溶化、イオン交換、ゲル濾過を行うことで純度の高いCx26ギャップ結合チャネルを得た。結晶化条件のスクリーニングと最適化により比較的大きな結晶を得ることができたが、分解能が６～７Åと低く、構造解析には不十分であったため、脱水処理を行うことでその分解能を向上させた。結晶に対して１％ずつ抗凍結剤を加えてゆき、最終濃度に達した時点で大量のバッファーに移し替えて一晩から二晩放置することで結晶間の脱水状態のばらつきを抑えて、同型性の向上に成功した。同型な多数の結晶を用いて長時間露光によるデータ収集を行うことにより、最高3.5Å分解能までのデータセットの収集に成功した。位相決定はTaクラスターを用いた重原子同型置換法および同型性の異なる結晶からの位相を合わせるmulticrystal averaging、Taクラスター置換結晶のmultiwavelength anomalous dispersion法によって６Åまでの位相を求め、これを分子内の６回対称を用いたnon-crystallographic symmetry averagingと溶媒平滑化によるdensity modificationによって位相改良・位相拡張を行い、3.5Å分解能までの位相拡張を行った。

3.5Å分解能という、Ｘ線結晶構造解析としては低い分解能ながらセレノメチオニン置換体および天然硫黄原子の異常散乱データセットを用いた異常散乱差フーリエマップによって、コネキシンの４つの膜貫通ヘリックスを構造上に一義的に特定することができた。精密化後のモデルからは単量体構造・6量体構造を安定化していると考えられるアミノ酸相互作用を特定することができた。これらに関与するアミノ酸残基の多くはヒトでの遺伝病を引き起こすコネキシン点変異が発生する残基であり、変異から蛋白質の機能異常・遺伝病へとつながる構造的背景を考える上で重要な知見であると思われる。細胞外領域での６量体同士の結合様式についてもその原子基盤を明らかにすることができた。細胞内領域にはリジン・アルギニンといった残基が数多く存在しており、これらがチャネルの細胞内領域にポジティブな電気的環境を形成している。このポジティブ電荷はチャネルの細胞内入り口付近にネガティブ電荷を持った細胞内物質を集めて、効率よく透過させるのに有用であると考えられる。チャネル内孔については、Accessible Surface Area (ASA) の大きさからチャネルポアを形成している残基を特定した。これらの残基はチャネルの特性を決める上で非常に重要な役割を果たしていると考えられ、コネキシンごとのそれらのアミノ酸残基の多様性を調べていくことで、透過物質への選択性を決定する構造基盤が明らかになると期待される。今回我々が決定した構造中には、チャネル孔上部に６つのＮ末端ヘリックスからなる漏斗状の構造（Pore funnel）が見られた。これは以前２次元結晶構造解析によって確認された”Plug”と呼ばれる大きな電子密度の塊とは異なるものである。２つの構造解析の条件の違い・用いた遺伝子コンストラクトの違い・pore funnel形成に関与するアミノ酸残基・これまでの電気生理実験等を踏まえると、チャネルの開閉制御機構についての一つのモデルを




提唱することができる。すなわち、チャネル開状態では６つのＮ末端ヘリックスはわれわれの構造のようにpore funnelを形成し、中央に物質透過のための孔を作るが、チャネル閉状態、とくに細胞間に膜電位差が生じた場合のゲーティング（Vj gating と呼ばれる）ではこれら６つのヘリックスがチャネル内壁から外れ、孔中央で会合して plug を形成することで物理的にチャネルを閉じるというものである。




今回、我々の決定した構造（アミノ酸残基２－１０９、１２５－２１７）はコネキシン間で高度に保存された領域であり、従ってその構造も高度に保存されていると考えられる。今回得られた構造をもとに様々なコネキシンでの構造・機能研究が加速し、より深まることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

多細胞生物における最も基本的な機能の一つに細胞間連絡がある。その中でギャップ結合は、隣接する細胞間を物質的に直接共役する特殊な構造体である．ギャップ結合を形成するタンパク質複合体「ギャップ結合チャネル」は、２つの隣接細胞からそれぞれ供与されたコネクソンと呼ばれる膜タンパク質複合体が細胞外領域で結合したチャネルである。一つのコネクソンはコネキシンと呼ばれる４回膜貫通型タンパク質が中央の孔を囲んで６量体を形成したものである。本研究では、ヒト由来コネキシン 26（Cx26）から構成されるギャップ結合チャネルの 3.5Å分解能での立体構造をＸ線結晶構造解析法により決定した。

本研究は、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて発現させたコネキシン 26 ギャップ結合チャネルを用いて行った。膜タンパク質の場合、構造解析に必要なタンパク質試料の大量調製を行うためには、発現・精製条件の最適化のみならず、可溶化条件の決定が必要で、水溶性タンパク質に比べて、より膨大な数の試行錯誤を必要とする。これを解決するための一つの方法として、申請者は、電子顕微鏡を用いて短時間のうちに最適な可溶化条件の決定に成功した。また、得られた結晶は原子構造を明らかにするには十分な質を有していなかったが、様々な方法を試みた結果、脱水操作により結晶性の改善と分解能の向上に成功した。

本研究により世界で初めて明らかにされたギャップ結合チャネルの原子構造から、ギャップ結合チャネルの物質透過機構の理解、ヒトの遺伝性難聴に関連するコネキシン点変異体の機能異常につながる構造的な知見、細胞間膜電位差によるチャネルの開閉機構（Vj gating）など、ギャップ結合チャネルの様々な機能を理解することができるようになった。コネキシン 26 は、コネキシンファミリー間で高度に保存された領域を含んでおり、今後、様々なコネキシンでの構造・機能研究が進む、コネキシン研究のブレーク・スルーになることが期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。