Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | A description of a structure determination procedure of a gap junction channel at 3.5 Å resolution |
| Author(s) | 菅, 倫寛 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/58018 |
| 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。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【2】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 菅（すが）　倫（みち）　寛（ひろ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２３２８１　号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成21年 6 月19日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第４条第１項該当<br>理学研究科高分子科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | A description of a structure determination procedure of a gap junction channel at 3.5 Å resolution<br>(3.5Å分解能でのギャップジャンクションチャネルの構造決定手順) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教　授　中川　敦史<br>(副査)<br>教　授　奥山　健二　　准教授　鈴木　　守　　名誉教授　月原　冨武 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

細胞間での情報伝達は多細胞生物にとって最も重要な機能の一つである。ギャップジャンクションチャネルは細胞間で小分子を直に通過させることで情報伝達を可能にする。コネキシンと呼ばれる4回膜貫通タンパク質の6量体が細胞外で向かい合って連結し、計12量体からなる細胞間を貫く構造体がギャップジャンクションチャネルである。30年にわたるギャップジャンクションチャネルの構造機能研究はその結晶化されにくい構造ゆえ、低分解能で得られた電子顕微鏡の電子密度を基にしたものであった。我々の研究室では7年前にギャップジャンクションチャネルの結晶化に成功し、3年間の精製・結晶化条件の検討により7Å分解能の回折点を得た。

我々はギャップジャンクションチャネルの構造機能研究に向けた原子座標決定のために結晶の回折能の改善と低分解能の回折データからの構造解析方法の検討を並行して行ってきた。結晶の回折能改善のために様々な方法を試したところ脱水処理が問題解決へつながった。この脱水処理により回折分解能は7Åから3.5Åへと改善し、結晶間の同型性も改善した。これらの結晶を用いて3.5Å分解能の回折データを得ることに成功した。結晶の空間群は$C2$で、a=167.6, b=111.2, c=155.4, β=114.0であった。得られたネイティブデータを用いて結晶内のパッキングを決定した。ネイティブパターソン関数のから12量体のギャップジャンクションチャネルは原点に存在していることがわかった。自己回転関数を計算し非結晶学的対称(NCS)の6回軸方向が明らかとなった。さらに結晶学的な2回軸とNCSの2回軸が一致していてNCSの6回軸の方向はac面上のc*軸方向からの傾きだけで記述できることがわかった。この傾きを0.01°ごとに固定して、重原子誘導体から得た初期位相を位相拡張し、その時のR-factorとCcをプロットしていくことで3.5Å分解能のデータでNCSの6回軸の正確な方向が決定できた。精度良く決定されたNCSパラメータ下では電子密度が改善し、コネキシンの構造が4本のヘリックスから形成されていることをはっきりと確認できた。得られた電子密度とSeMet置換体から決定したメチオニンの位置から4本のヘリックスの順番を帰属することはできたが、一般的な3.5Å分解能のものと比べて不明瞭な電子密度であったため、原子モデル構築には至らなかった。電子密度改良のために同型性のわずかに異なる結晶を用意して、これらを実空間で平均化することで原子モデル構築可能な電子密度を得た。より正確な原子モデル構築のために硫黄の異常分散効果を利用して、ジスルフィド結合の位置決定を行い、細胞外領域の近接する3つのジスルフィド結合の位置を決定することに成功し、free Rは0.35まで減少した。

このようにしてギャップジャンクションの原子座標を得た。得られたモデルではチャネルの孔に接したヘリックスは以前報告されていたものとは異なっていた。3.5Å分解能という低分解能でも構造解析方法の工夫によってアミノ酸位置を正確に決定することができた。今回用いたこれあらの構造解析方法は分解能が得られない他のタンパク質結晶にも適用可能である。従って本研究によりタンパク質の構造機能研究の可能性は大きく広がった。

## 論文審査の結果の要旨

近年のタンパク質結晶学の様々な方法論の進歩により、多くのタンパク質の立体構造が短時間で決定されるようになってきた。その一方で、生物学的に重要なタンパク質であっても結晶性の問題等で構造解析が難航する場合も多い。

多細胞生物にとって、細胞間の情報伝達は非常に重要な機能の一つであるが、この情報伝達機構の一つに、ギャップジャンクションチャネルと呼ばれる構造体が知られている。コネキシン26は、ギャップジャンクションチャネルを形成するタンパク質の一つである。コネキシン26はコネクソンと呼ばれる6量体構造を形成する。2つの細胞それぞれの細胞膜を貫通するコネクソンが結合して12量体構造となることによりギャップジャンクションチャネルを形成する。2つの隣接する細胞は、この12量体構造の中心を通して分子量1000以下程度の低分子を透過することによって細胞間の情報伝達を行う。

本研究では、ギャップジャンクションチャネルの構造機能研究に向けた原子構造決定のための、結晶性の回折能の改善と亭分解能の回折強度データからの構造解析方法の開発を行い、3.5Å分解能のギャップジャンクションチャネルの原子構造決定を行った。

研究開始当初7Å程度の分解能であった結晶を、様々な試みを行った結果、脱水処理により3.5Å分解能の回折像を与え、さらに結晶間での同形性を確保できるようになった。

しかし、一般的には、3.5Å分解能のデータからは原子構造を決定することは難しいと言われている。本研究では、分子の結晶内での配向を正確に決定する方法を開発し、得られたパラメータを用いて非結晶学的対称平均化法に、結晶間平均化法と組み合わせ、セレノメチオニン置換体の異常分散効果も考慮することにより、電子密度を改良し、原子モデルの構築が可能な電子密度を得ることに成功した。さらに微弱なイオウの異常分散効果からジスルフィド結合の位置を決定することに成功した。

本研究では、ギャップジャンクションチャネルの原子構造を明らかにするとともに、今回用いられた様々な構造解析の方法・手順は、高い分解能の回折強度データが得られない他のタンパク質結晶にも適用可能であり、タンパク質の構造・機能研究の可能性を大きく広げ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。