2000年 第10号

電子線結晶解析による水チャネルの立体構造

現在までに多くのタンパク質がその原子レベルの構造 を解析されてきたが、そのほとんどは水溶性のものであ る. 膜タンパク質については、特に情報伝達における重 要性にも関わらず、原子モデルがわかっているものは数 えるほどしかない. その理由の一つに, 大きな三次元結 晶を作ることが難しいために,X線結晶解析の適用が 難しいことが挙げられる、一方、膜タンパク質や細胞骨 格タンパク質のいくつかは、比較的容易に二次元結晶や チューブ状結晶を作ることが知られている.実際に、二 次元結晶を用いた電子線結晶解析により、バクテリオロ ドプシン¹⁾やチューブリン²⁾の原子モデルが解かれてい る. そこで本稿では、現在我々のグループで構造解析を 進めているアクアポーリン1 (AQP1)を例にとって,X 線結晶解析と比較しながら電子線結晶解析の特徴を紹介 する.そして,水分子を選択的に通す水チャネルである AQP1 について現在わかってきた構造に関する知見を報 告する.

1. AQP1 の二次元結晶化

生体膜の水の透過性は部位によって大きく異なること が知られており、たとえば成人の腎臓では1日に1501 以上の水が再吸収されている. このような大量の水の移 動は、単純な脂質膜を越えた拡散では説明がつかない. その水分子を選択的に透過する一群のタンパク質ファミ リーが現在アクアポーリンと呼ばれており,3そのファ ミリーで最初に同定されたのが、人の赤血球に多く存在 する AQP1 である.4) その一次構造の大きな特徴は,前 半と後半の配列間に相同性が認められることと、その両 方にファミリーで保存されている Asn-Pro-Ala (NPA) モ チーフが存在していることである.また,水の透過を阻 害する水銀の結合部位(AQP1 では Cys189)が NPA モ チーフの近くにあることから、このモチーフが水の経路 の近くにあると予想されている.また,6つの疎水性が 高い領域があることから,6回膜貫通タンパク質と考え られている (Fig. 1).

膜タンパク質の二次元結晶はいろいろな方法で得られ ている.⁵⁾たとえば,電子線結晶解析で最初に原子モデ ルが解かれたバクテリオロドプシンは古細菌の膜状で天 然に二次元結晶を作っていることが知られており,その 紫膜といわれる膜画分をイオン性の界面活性剤を用いて

光 岡 薫

融合することにより,解析に適した大きな二次元結晶を 得ることができる.⁶目的のタンパク質が大量に存在す る膜画分にこのような方法を適用することにより,界面 活性剤による可溶化により機能が失われるような膜タン パク質を,脂質膜内にある状態を維持したままで結晶を 作り構造解析を行える.実際,ニコチン性アセチルコリ ン受容体のチューブ状結晶が,シビレエイの電気器官か らの膜画分を用いて界面活性剤なしで作成され,4.6Å 分解能で構造解析されている.⁷

一方 AQP1 の二次元結晶は,人の赤血球から可溶化 して精製した AQP1 を脂質膜に再構成することにより 作る.この二次元結晶を含んだベシクルは高い水透過性 を示すことから,AQP1 は結晶の状態でその機能を発揮 できることがわかっている.[®]このように二次元結晶は 脂質膜中にあるので,結晶状態で膜タンパク質の活性を 見ながら,機能と構造を関係づけていくことができる. また,二次元結晶ができる典型的なタンパク質濃度は, 三次元結晶の場合よりかなり低いので(AQP1 では約 1 mg/ml),得られるタンパク質量があまり多くないと きにも結晶化を試みることができる.

2. AQP1 の 4.5 Å 分解能の立体構造

AQP1の立体構造は、最初我々を含む3グループによ り独立に6つの膜貫通 α-ヘリックス (Fig. 1の H1 から H6)が分離できる程度の分解能で解析され,9-11) 最近我 々のグループにより分解能が 4.5 Å まで向上した.12) こ の分解能の向上は、もともと電子回折は3.5Åを超える 回折点が観測されていたので、単に回折パターンをより 多く撮ることで実現できた.電子線結晶解析では構造因 子の位相情報を,X線結晶解析での重原子置換体など の回折パターンを用いる方法ではなく、電子顕微鏡像か ら計算する.その電子顕微鏡像の方は、多くの結晶から の像を撮ることと同時に結晶性の良い領域を注意深く選 び出すことで分解能を向上することができた. この電子 顕微鏡像の撮影と画像解析が、現在電子線結晶解析でも っとも時間のかかる過程で、たとえば現状では1日に数 枚の像しか解析できない. そして, AQP1の4.5 Å 分解 能の解析では124枚の像を利用しており、実際に解析し たのは、その倍近くになる.しかし、この制約は計算機 のスピードがどんどん速くなってきているので主要な問

著者紹介 京都大学大学院理学研究科生物科学専攻(助手) 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 TEL. 075-753-4216 FAX. 075-753-4218 E-mail: kaorum@em.biophys.kyoto-u.ac.jp 426



Fig. 1. Sequence of AQP1 and the predicted membrane topology. The NPA signature motifs are with a gray background.

PXK)269

題ではなくなってきている.

H1

ここで注意しておきたいのは、二次元結晶は典型的に は直径1µm 程度と三次元結晶よりずっと小さいために 電子線損傷が問題となり、電子回折パターンまたは電子 顕微鏡像の撮影は結晶一つにつき1回が限度ということ である.たとえば我々のグループで行われた水素イオン ポンプであるバクテリオロドプシン (bR) の 3.0 Å 分解 能の解析では、366枚の電子回折パターンを用いた.13) そのため、得られる結果は366個の二次元結晶の平均と なるために、回折強度のばらつき具合を与える統計量 (R_{merge})はX線結晶解析の場合と比較してかなり悪く, 15.6%となっている.このため、現状では回折強度のみ を用いたモデルの最適化には注意が必要である.14)ー 方,電子顕微鏡像から計算される位相に関しては,その 残差が 26.7° で figure of merit でいうと 0.89 に対応し, X線結晶解析の初期位相より良い統計値を与える. こ のため、X線結晶解析の電子密度図に対応する電子線 結晶解析で得られる電位図は、原子モデルの最適化なし でも非常に解釈しやすい.

LI

その 4.5 Å 分解能の立体構造から,6 つの膜貫通ヘリッ クス以外に,分子の中央近くに短い α-ヘリックスが 2 つ,一つの膜貫通ヘリックスのように一端を向きあわせ て膜内に存在していることが明らかになった (Fig. 2). この2つの α -ヘリックスは, NPA モチーフを含むルー プ部分の比較的疎水性が高い部分に対応すると予想され る (Fig. 1の HB と HE).実際, その2つの α -ヘリッ



Fig. 2. A view of the experimental potential map of AQP1. The fitted poly-Ala helices are shown by a stick model and the potential map representing the loop from the short α -helix (HE) to a membrane surface was indicated by an arrow.

クスに対応する電位図の, 膜中央部分付近から両方の膜 表面に向かうループ部分も観測されており,全体として は Fig. 1の LB と LE に対応する電位図は X 型となる. この分子の中央付近の通路が水の経路と考えられる (Fig. 3). この膜内に水の通路(ポア)に面する形で短 い α -ヘリックス(ポアヘリックス)が存在している形 状は,最近構造が解かれた K⁺ チャネルと類似性があ る.¹⁵⁾

ここで、AQP1とK⁺ チャネルの透過経路を比較する ことにより、AQP1の水分子の選択を実現する分子機構 を考えてみる.K⁺ チャネルでは、中央の水の空洞中に、 ポアヘリックスの分極による負電荷により陽イオンが安 定に存在することができる.この構造とAQP1の立体 構造の大きな違いの一つは、AQP1では膜中央で通路が 最も細くなっていることである.この中央付近の通路の 直径は約3Å程度と考えられ、水分子の大きさとよく一 致している.つまり、この部分の立体障壁により水分子 より大きい分子の通過を阻害していると予想される.つ ぎの大きな違いは、K⁺ チャネルではポアヘリックスが



Fig. 3. Arrangement of α -helices in the AQP1 monomer. The broken line represents the pseudo two-fold axis of the monomer and the gray circle (3 Å diameter) indicate the position of the water pathway. The contour map shows the 10-Å slice of the potential map at almost the membrane center, where the water pathway is narrowest. While the proposed assignment of the helices was shown in the upper drawing, the lower panels show the possible 8 models fulfil the pseudo two-fold symmetry and the short LA and LD loops.

C端をイオンの経路に向けて配置し,陽イオンの電荷を 安定化しているのに対し,AQP1は逆にポアヘリックス のN端が水の経路に向いている.このため,ポアヘリ ックスからの正電荷が分極した水分子の負電荷をうち消 すと同時に,陽イオンの通過を阻害していると考えられ る(Fig. 4).つまり,立体障壁と分極の安定化という二 つの機構により水分子を選択していると予想できる.ま た,アクアポーリンファミリーで保存されている NPA モチーフの Asn との水素結合も,水分子の選択に寄与 しているかもしれない.

3. AQP1 の折り畳み

4.5 Åで解析した立体構造と一次配列が持っている特 徴を利用して、AQP1の折り畳まれ方を予想した.¹⁶⁾ま ず、解析された AQP1の1分子の立体構造は、一次構 造で観測された相同性に対応すると考えられる擬似の2 回対称性を持っていた (Fig. 3). これにより、全体を3 本ずつの膜貫通ヘリックスと1つのポアヘリックスの2 組に分けることができる.また、アクアポーリンファミ リーの一次構造を比較するとH1とH2をつなぐLAと H4とH5間のLDが非常に短い場合があることがわか る¹⁷⁾(最短はそれぞれ6残基と3残基).このことから、 H1とH2またはH4とH5は隣り合うと予想される.こ



Fig. 4. Schematic drawing of the stabilized water molecule at the center of the AQP1 monomer. The charges, which come from the polarization of helices and a water, were represented by ⊕ and ⊖. The position of the loops in the transmembrane region was estimated from the potential (Fig. 2).

廣明 秀一

の2つの制約から、N端とC端が細胞質側にあること も考えると、実現可能なAQP1の折り畳みは細胞外か ら見て Fig. 3の8つになる.ここで、この8つのモデ ルの中でどれがもっとも実際の立体構造と対応するかを 検討するために、いろいろな膜タンパク質の膜貫通へリ ックスのすべての残基を valine で置き換えて AQP1の 電位図に最適化して、各膜貫通へリックスの向きを予想 した. α -へリックスでは通常側鎖がN端側へ突き出る ので、側鎖に対応する電位まで考慮することにより、向 きを決めることができる.そして Fig. 3 に示したモデ ルが電位図にもっともよく合っていることがわかった.

このかなり複雑な折り畳みのもっとも顕著な特徴は, LC の位置であろう. H3 から H4 をつなぐループが, 分子を横切るように長く横たわることになる. 実際, ア クアポーリンファミリーで最短の LC の長さは16残基と 予想されており,¹⁷⁾このモデルとよく一致している. ま た, この LC の配置のためには, LE が最後に LC とぶ つかるように折り畳まれないといけないことは, 複雑な 折り畳みの経路を示唆するのかもしれない.

おわりに

このように、まだ分解能は原子モデルを作成するには 十分ではないが、電子線結晶解析を用いて AQP1 の立 体構造を得た.そして、その構造から予想される水チャ ネルの構造と機能の関連について、議論の余地のあるこ とまで含めて、得られた知見についてまとめた.現在、 より高い分解能の解析を進めており、その結果、上の議 論を確認すると共に水分子の透過の詳細な分子機構がわ かると考えている.電子線結晶解析は、二次元結晶さえ できれば、X線結晶解析と同様に原子モデルを得るこ とができる手段のひとつとしてほぼ確立されつつあり、 膜タンパク質のような三次元結晶作成が困難な試料への 応用が期待される.

本 AQP1 に関する研究は,藤吉好則教授,Prof. Peter Agre と Prof. Andreas Angel の 3 グループの共同研究の結果であり,ここ で,このグループにいたすべての共同研究者に厚く感謝の意を表 します.また,本稿の図の作成を手伝ってくれた廣明洋子さんと 大嶋篤典君に感謝致します.

献

- 1) Henderson, R. et al.: J. Mol. Biol., 213, 899 (1990).
- 2) Nogales, E. et al.: Nature, 391, 199 (1998).

文

- 3) Borgnia, M. et al.: Annu. Rev., Biochem., 68, 425 (1999).
- 4) Preston, G. M. et al.: Science, 256, 385 (1992).
- 5) Kühlbrandt, W.: Quart. Rev. Biophys., 25, 1 (1992).
- 6) Baldwin, J. and Henderson, R.: Ultramicroscopy, 14, 319 (1984).
- 7) Miyazawa, A.: J. Mol. Biol., 288, 765 (1999).
- 8) Walz, T. et al.: J. Biol. Chem., 269, 1583 (1994).
- 9) Li, H. et al.: Nat. Struct. Biol., 4, 263 (1997).
- 10) Walz, T. et al.: Nature, 387, 624 (1997).
- 11) Cheng, A. et al.: Nature, 387, 627 (1997).
- 12) Mitsuoka, K. et al.: J. Struct. Biol., 128, 34 (1999).
- 13) Kimura, Y. et al.: Nature, 389, 206 (1997).
- 14) Grigorieff, N. et al.: J. Mol. Biol., 259, 393 (1996).
- 15) Doyle, D. A. et al.: Science, 280, 69 (1998).
- 16) de Groot, B. L. et al.: J. Mol. Biol. in press (2000).
- 17) Heymann, J. B. and Engel, A.: J. Mol. Biol. 295, 1039 (2000).

NMR による構造生物学と創薬の橋渡し

廣明秀一

近年, 医薬品の開発の戦略として新しい方法論が定着 した.(1)コンビナトリアル・ケミストリーとハイスルー プット・スクリーニング(HTS)の組み合わせ,(2)論理 的薬物設計(rational design)のアプローチ,(3)薬理ゲノ ム学,の3つである.三者には,いずれも最先端の科学 ・技術の利用という思想が共通している.たとえば, (1)はリード化合物探索の高速化のためにロボティクス を利用することである.また,(2)は構造生物学の進歩 により増加し続けるタンパク質の立体構造情報をリード 創製・リード最適化に利用するための方法論である. (3)では創薬の標的となる新規の遺伝子を効率的に探索 するために、ゲノム情報を利用する.

NMR (核磁気共鳴法) の特徴は, タンパク質や核酸 の立体構造を決定するためにその水溶液を測定すること である.この特徴を活かして, タンパク質の構造決定の みにとどまらず, タンパク質と低分子リガンドの相互作 用を解析するための手法がいくつも実用化されている. こうした手法は, いずれもリード探索と論理的薬物設計 の両方の段階に適用可能であり, まさに「NMR により 構造生物学と創薬が橋渡しされる」と言っても過言では