

Title	基礎情報として医学分野に役立つ構造生理学を目指して
Sub Title	Structural physiology going toward a better understanding in medical field
Author	藤吉, 好則(Fujiyoshi, Yoshinori)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.4 (2006. 12) ,p.221- 230
JaLC DOI	
Abstract	情報伝達機構において,受容体やイオンチャネルは重要な生理学的機能を担っている.また.イオンチャネルが正常に機能するためには,浸透圧変化に対応する水の膜透過制御が必要である.ヒトには,13種類の水チャネルが発現して様々な生理機能を担っており,病気との関連も明らかになってきている.脂質分子の中に存在する膜タンパク質の構造を,高分解能で解析できる極低温電子顕微鏡を開発した,それを活用する事で,水チャネルなどの膜タンパク質の生理的機能を分子構造から詳細に理解できるようになってきた.ニコチン性アセチルコリン受容体の構造も解析されて,ゲーティング機構などが解明され,関連する病気がより深く理解されるようになった
Notes	綜説
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20061200-0221

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

綜 説

基礎情報として医学分野に役立つ構造生理学を目指して

Structural physiology going toward a better understanding in medical field

京都大学大学院理学研究科

ふじ よし よしのり
藤 吉 好 則

Key Words：水チャンネル，イオンチャンネル，受容体，極低温電子顕微鏡，電子線結晶学

要 旨

情報伝達機構において、受容体やイオンチャンネルは重要な生理学的機能を担っている。また、イオンチャンネルが正常に機能するためには、浸透圧変化に対応する水の膜透過制御が必要である。ヒトには、13種類の水チャンネルが発現して様々な生理機能を担っており、病気との関連も明らかになってきている。脂質分子の中に存在する膜タンパク質の構造を、高分解能で解析できる極低温電子顕微鏡を開発した。それを活用する事で、水チャンネルなどの膜タンパク質の生理的機能を分子構造から詳細に理解できるようになってきた。ニコチン性アセチルコリン受容体の構造も解析されて、ゲーティング機構などが解明され、関連する病気がより深く理解されるようになった。

はじめに

多くのタンパク質構造が解析されるようになったが、生理的機能に関係なく単に解析する数を追うような構造分野の風潮は、基礎科学としての構造生物学にとってさえ良いことではない。医学や生理学との密接な関係を持った構造研究が必要で、それこそが医学分野にも興味を持たれる基礎科学であろう。

神経細胞などの情報は、各種受容体の働きと共にイオ

ンチャンネルの開閉制御に基づく膜電位の変化によって伝達される。細胞の中で最も多い分子である水が膜を透過する時に、イオンも透過すると情報伝達機能が成り立たなくなる。それゆえ、水とイオンの膜透過は、分離して制御されなければならない。最近、構造生理学とも呼ぶべき新しい研究分野が発展しつつある。生理学とは生命を論理的に理解する学問であるが、分子レベルから詳細な構造に基づいてさらに深く理解しようとするのが構造生理学であろう。この言葉が真に意味のあるものとなってきたのは、バクテリア由来のK⁺イオンチャンネル、KcsAのX線結晶構造解析を嚆矢となすR. マッキノン博士らの研究によってであろう。彼らは、生理学、特に電気生理学の研究において長い間の不思議な疑問として残されていたイオン選択性の機構を、このチャンネルの構造解析に基づいて解明した¹⁾。すなわち、K⁺チャンネルでは、半径1.33Åという大きいK⁺が、半径0.95Åの小さいNa⁺より10,000倍も速く透過されるという不思議に思われてきた機構を解明した。さらに、高い分解能の解析から、10⁶イオン/秒にも及ぶ速いイオン透過を実現する機構も提案した²⁾。これらの研究で、R. マッキノン博士はノーベル化学賞を水チャンネルの発見者P. アグレ博士と共に2003年に受賞することとなった。彼は引き続き、バクテリア由来のチャンネルの構造を解析して、ゲーティング機構についてパドルモデルと呼ばれている新しい提案を行った。しかし、この問題については研究者の

著者略歴

京都大学大学院理学研究科教授。1982年京都大学理学博士。専門は構造生理学。脳と神経系に興味を持って研究を進めており、チャンネルや受容体の構造を独自に開発した極低温電子顕微鏡で解析する研究が1つの柱となっていが、電気生理学的手法や光学顕微鏡などを含む様々な技術も導入して研究している。

間で論争が生じている。一方、アセチルコリン受容体の構造解析が極低温電子顕微鏡を用いて行われ、この受容体では一般に受け入れられるゲーティング機構が提案された³⁾。

水で満たされている細胞の膜では、情報伝達を担うイオンチャネルを通して行われるイオン透過に伴って、浸透圧の調整機構が必要である。この様に、細胞膜を通したイオンと水の透過制御機構は、生命機能を理解する上でも、健全に身体の恒常性を維持する機構を理解する上でも、それゆえ病気の原因を理解する意味でも必須の研究課題である。

ヒトにおける水チャネルの多様性

水チャネル、アクアポリン-1は赤血球から発見された分子量28 kDの膜タンパク質で、アフリカツメガエルの卵を使ってその水透過能がP. アグレらにより示された⁴⁾。水チャネルの水の選択的透過機構のモデルについては、電子線結晶学でアクアポリン-1の構造を解くことによって提案した⁵⁾。ほとんどすべての生物において水チャネルが発見され、ヒトではアクアポリン-0からアクアポリン-12と名付けられた13種類の水チャネルが同定されている⁶⁾。

アクアポリン-0はアクアポリン-1が見いだされる以前からその存在が確認されており、MIP (Major Intrinsic Protein) と呼ばれていた。この呼び名からも判るように、目の水晶体線維細胞に多く発現しており、水チャネルが発見される前はギャップ結合タンパク質のファミリーと考えられていた⁷⁾。しかし、水透過性のある水チャネルであった。このチャネルの場合、アクアポリン-1が見いだされる以前の発見という意味で、0という番号が与えられた。なお、アクアポリン-1とは異なり、水銀による水の透過阻害はなくて、細胞を接着する機能を有している。アクアポリン-1は眼圧の制御、緑内障などに関係しているが、アクアポリン-0は先天性の白内障などに関連することも分かってきている⁸⁾。

アクアポリン-1は赤血球から最初に発見されたが、この水チャネルは腎臓をはじめ多くの器官での発現が確認されている。各器官の中で、例えば、腎臓の刷子縁、近位曲尿細管、ヘンレ (Henle) ループの細い下降脚などの部分に特徴的に局在している⁹⁾。腎臓の他の部分には別の水チャネルが発現している。なお、各器官における水チャネルの分布の詳細は、高田等による文献9に詳しい。基本的にアクアポリン-1が無くても日常生活に重大な支障はないし、血清の浸透圧もアクアポリン-1

を持つ人と同じであった。明確な違いとしては、脱水状態においてアクアポリン-1を持つ正常なヒトは1000 mosmol/kg 程度に尿を濃縮するが、アクアポリン-1が無い患者さんの場合には、450 mosmol/kg 以上に尿を濃縮することができない¹⁰⁾。ただし、アクアポリン-1が無くても多尿症ではないし、腎臓の尿細管での水吸収に異常はみられない。それゆえ水に関する厳しい負荷がかからなければ、大きな支障なしに通常の日常生活を送ることができるようである。しかし、これらのことはアクアポリン-1が重要でないということの意味しているわけではない。

脳下垂体から放出されるバソプレッシンが体内の水調節を含むいくつかの重要な機能を担っていることが分かっていたが、腎臓の集合導管等に発現するアクアポリン-2が佐々木らによって見いだされた¹¹⁾。この水チャネルは、バソプレッシン依存的にダイナミックな制御を受けることによって水の恒常性に重要な寄与をしている。バソプレッシンはその受容体を活性化し、G タンパク質 (Gs) が活性化される。Gsがアデニル酸シクラーゼを活性化すると、cAMPの濃度が上昇してプロテインキナーゼA (PKA) が活性化されて、アクアポリン-2がリン酸化される。このリン酸化は、アクアポリン-2の膜表面への移動を制御しているので、結果として、水の吸収量、すなわち、尿として排泄する水の量を調節することができる。

アクアポリン-3は、水だけでなくグリセリンのような非イオン性の小さい水溶性分子をも透過する¹¹⁾。このタイプには、7, 8, 10, 11などの水チャネルが属するとされている⁶⁾。アクアポリン-3は肌を美しく保つためにも、怪我などをした場合の治療にも効果があるとされている。この水チャネルはpHによって、その水の透過性が変化するゲーティング機構がある点でも興味深い⁹⁾。

アクアポリン-4は脳等に発現が見られる水チャネルで、血管を取り巻くアストロサイトにおいて、結晶性のアレイを形成している¹²⁾。このチャネルは、少なくとも長さの異なる2つのスプライズバリエーションが知られている¹³⁾。結晶性アレイの大きさは、それらの発現の比率で調節される¹⁴⁾。また、この水チャネルは視床下部にみられるグリア細胞の層状構造部分にも観察される¹⁵⁾。ドーパミンによるアクアポリン-4のゲーティングを示唆する論文¹⁶⁾もあり、この神経伝達物質による水チャネルのゲーティング制御機構は特に興味深い。

角膜での発現が確認されているアクアポリン-5は、目の病気・治療などで注目されている¹⁷⁾。坪田博士らに

より、ショーグレンタイプのドライアイがアクアポリン-5の涙腺への輸送の欠陥に関わるものであることが示されている¹⁸。さらに、感情が激したときの涙や、おいしいものを見たときにでる唾液にも関係していると考えられ、脳からの情報でこの水チャネルが制御されている可能性がある。

アクアポリン-6は不思議なチャネルで、安井博士らの研究では水ではなく陰イオンを透過することが解明された¹⁹。アクアポリン-1の構造のところで述べるアクアポリンフォールドと名付けた構造を安定化する上で重要な、保存されているグリシン（2番目のヘリックス上のグリシン）が、アスパラギンとなっている。これをグリシンに変異すると陰イオンチャネルではなくて、水チャネルになる。

アクアポリン-7は脂肪細胞に発現しており、絶食の時などに脂肪が分解されてできたグリセロールを透過して供給する出口となっている。それゆえ、この水チャネルは肥満等と関係するようである²⁰。

アクアポリン-8とアクアポリン-10は消化管での発現がみられており、それ以外での発現も確認されている。例えば、アクアポリン-8は膵臓の腺房や肝臓の細胆管などにおいても確認されている。アクアポリン-9は肝細胞に発現されて、水とともにグリセロールの透過の機能が知られている²¹。これら以外にも、アクアポリン-11と12もその存在や機能が研究されており、意味のある水チャネルと確認されつつある。

水の選択的透過機構

アクアポリン-1は、1秒間におよそ20億もの水分子を透過しながら、イオンだけでなくプロトンの透過も阻害する。この機構を理解するために、極低温電子顕微鏡^{19, 20}を用いてアクアポリン-1の構造が3.8Å分解能で解析された²²。その結果、アクアポリンフォールドと呼ぶ不思議な構造が明らかになった。特に注目すべきは、短いヘリックスがチャネルの一方の側にN末端を接するように配置した構造である。この2本のヘリックスが接している部分のそれぞれにはNPAモチーフと呼ぶ配列が高度に保存されている。そのモチーフの中で、アスパラギンのカルボニル基は主鎖のNH基と水素結合してヘリックスを開始する働きをしている。その結果としてアミド基がチャネルの中へ突き出ることになる（図1a）。短いヘリックスが作る静電場のために、アスパラギンの近くに来た水分子は酸素をこのアミド基の方へ配向させられることにより、極めてスムーズな水素結合形成が行

われる（図1a）。アスパラギンがチャネル軸に平行に配置されていることと、水の分子軌道のために、2つの水素がチャネルの軸に垂直に配向させられるので、この水分子は隣り合う水分子とは水素結合を形成出来ない（図1）。この水分子が他の水分子との水素結合のネットワークを断ち切られることで、プロトンの伝搬が阻止される。しかも、NPA配列の位置に形成される狭い穴に来た水分子はバルクの水と比較して水素結合の数が1つ少ないだけで、エネルギー障壁はたかだか3 kcal/molと低いので、20億水分子/秒という速い水の透過が可能である⁶。おそらくこれらの機構を実現するために、アクアポリンフォールドという、不思議なヘリックスの配置と短いヘリックスを膜内に挿入した驚くべき構造が作りだされたのであろう。

アクアポリン-0の高分解能解析

電子線²³とX線結晶学²²によってアクアポリン-0の構造が解析されていたが、最近電子線結晶学を用いて、さらに高い1.9Å分解能でその構造が解析された²⁴。速い水透過を実現しながらプロトンさえも透過しない機構のモデルを解説する図1aの水分子の位置は、結晶学的に解析されたものではなく、チャネルの構造から類推して描いたものである。膜蛋白質の構造の詳細を知るには、脂質膜の圧力を受けているチャネルにおいて、水分子を観察する必要がある。図1bに矢印で示すように水分子も観察され、図1cにチャネル構造と共に示す水分子の位置から明らかなように、プロトン阻止のモデルが実証された。すなわち、1分子の水は高度に保存されているアスパラギンのアミド基と水素結合し、その両隣にある水分子とは水素結合しない水分子の配置が確認された²³。

アクアポリン-0は水晶体線維細胞を接着する分子として機能をしているが、レンズができあがるまでは水透過性があり、細胞接着性も弱い。C末端が分解酵素によって切断されると、N末端との相互作用がなくなり、細胞外に存在するループAが動いて細胞接着機能が強くなると共に、水チャネルが閉じて水を透過しなくなる。このゲーティング機構は理にかなっており、レンズができあがり、図2aに示すように毛様体筋によってレンズが形を変えても水が抜けて水晶体細胞がつぶれてしまわないようになっている。また、このアクアポリン-0は、水晶体線維細胞を接着する機能を担っているが、力が加わる状態でも脂質膜内に安定に存在しなければならない。膜内からはずれれば白内障のようにレンズが濁ることになってしまう。それゆえ、この分子と脂質分子の相互作

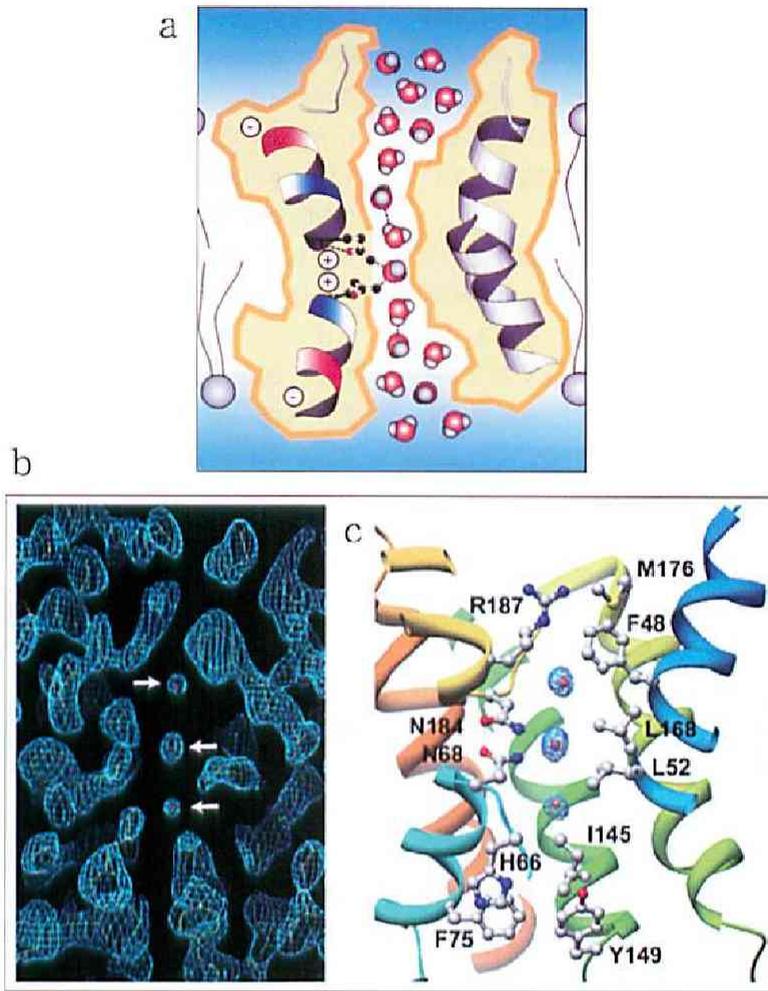


図1 水チャネルの断面の模式的構造
 アスパラジンと結合する水チャネルが他の水分子とは水素結合を形成できない様子を示す (a)。1.9Åで解析されたアクアポリン-0の密度図。矢印は水の密度を示す (b)。水分子を含むアクアポリン-0の構造図 (c)。(Thomasu Walz のグループとの共同研究)

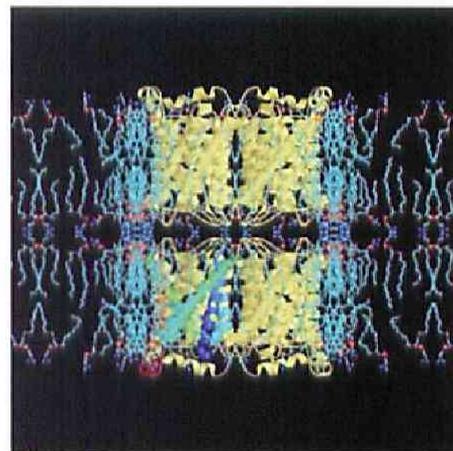
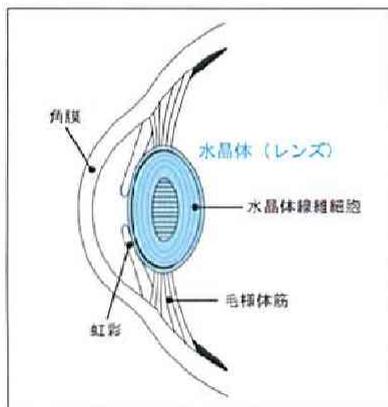


図2 (a) 目の模式図。レンズを形成する水晶体線維細胞
 (b) アクアポリン-0の4量体と規則的に結合した脂質分子。膜面に平行方向からの投影構造を示す。4量体から離れた部分にはアクアポリン-0が存在するがそれらを除いた図。(Thomasu Walz のグループとの共同研究)

- expressing red cell CHIP 28 protein. *Science* 256 : 385-387, 1992
- 5) Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y : Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407 : 599-605, 2000
 - 6) Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S : Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542 : 3-16, 2002
 - 7) Costello MJ, McIntosh TJ, Robertson JD : Distribution of gap junctions and square array junctions in the mammalian lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 : 975-989, 1989
 - 8) Shiels A, Bassnett S : Mutations in the founder of the MIP gene family underlie cataract development in the mouse. *Nature Genet.* 12 : 212-215, 1996
 - 9) Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y : Aquaporins : water channel proteins of the cell membrane. *Prog. Histochem. Cytochem.* 39 : 1-83, 2004
 - 10) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S : Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361 : 549-552, 1993
 - 11) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gjobori T, Mruo F : Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 6269-6273, 1994
 - 12) Zeuthen T, Klaerke DA : Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. *J. Biol. Chem.* 274 : 21631-21636, 1999
 - 13) Rash J E, Yasumura T, Hundson CS, Agre P, Nielsen S : Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 11981-11986, 1998
 - 14) Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P : Heterotetrameric composition of aquaporin-water channels. *Biochemistry* 38 : 11156-11163, 1999
 - 15) Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, Agre P, Rash JE : Aquaporin-4 square array assembly : opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 13609-13614, 2003
 - 16) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP : Specialized membrane domains for water transport in glial cells : high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17 : 171-180, 1997
 - 17) Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, Brismar H, Aperia A : Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283 : F309-F318, 2002
 - 18) Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P : Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am. J. Physiol.* 273 : C1549-1561, 1997
 - 19) Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N : Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 357 : 688-689, 2001
 - 20) Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P : rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402 : 184-187, 1999
 - 21) Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, Mtsubara K, Okubo K : Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 : 53-58, 1997
 - 22) Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN, Hediger MA : Molecular characterization of a broad selectivity neural solute channel. *J. Biol. Chem.* 273 : 24737-24743, 1998
 - 23) Fujiyoshi Y, Mizusaki T, Morikawa K, Yamagishi H, Aoki Y, Kihara H, Harada Y : Development of a superfluid helium stage for high-resolution electron microscopy. *Ultramicroscopy* 38 : 241-251, 1991
 - 24) Fujiyoshi Y : The structural study of membrane proteins by electron crystallography. *Adv. Biophys.* 35 : 25-80, 1998
 - 25) Harries WEC, Akhavan D, Miercke LJ, Khadmi S, Stroud RM : The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 14045-14050, 2004
 - 26) Gonen T, Sliz P, Kistler J, Cheng Y, Walz T : Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* 429 : 193-197, 2004
 - 27) Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T : Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* 438 : 633-638, 2005
 - 28) Brisson A, Unwin N : Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell Biol.* 99 : 1202-1211, 1984
 - 29) Toyoshima C, Unwin N : Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature* 336 : 247-250, 1988
 - 30) Unwin N : Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229 : 1101-1124, 1993
 - 31) Unwin N : *Nature* 373 : 37-43, 1995
 - 32) Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N : Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution : transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol. Biol.* 288 : 765-786, 1999
 - 33) Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N : Structure and

- gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423 : 949-955, 2003
- 34) Wick MJ, Mihic SJ, Ueno S, Mascia MP, Trudell JR, Brozowski SJ, Ye Q, Harrison NL, Harris RA : Mutations of γ -aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff : Evidence for an alcohol receptor? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 6504-6509, 1998
- 35) Mascia MP, Trudell JR, Harris RA : Specific binding sites for alcohols and anesthetics on ligand-gated ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 9305-9310, 1998
- 36) Croxen R, Newland C, Beeson D, Oosterhuis H, Chauplannaz G, Vincent A, Newsom-Davis J : Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor α subunit in patient with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 767-774, 1997
- 37) Grosman C, Salamone FN, Sine SM, Auerbach A : The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. *J. Gen. Physiol.* 116 : 327-339, 2000
- 38) Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, Engel AG : Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the ϵ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 758-762, 1995
- 39) Wang HL, Milone M, Ohno K, Shen XM, Tsujino A, Batocchi AP, Tonali P, Brengman J, Engel AG, Sine SM : Acetylcholine receptor M3 domain : Stereochemical and volume contributions to channel gating. *Nature Neurosci.* 2 : 226-233, 1999
- 40) Labarca C, Nowak M, Zhang H, Tang L, Deshpande P, Lester HA : Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature* 376 : 514-516, 1995
- 41) Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y : The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409 : 1047-1051, 2001
- 42) Sato C, Hamada K, Ogura T, Miyazawa A, Iwasaki K, Hiroaki Y, Tani K, Terauchi A, Fujiyoshi Y, Mikoshiba K : Inositol 1,4,5-triphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains. *J. Mol. Biol.* 336 : 155-164, 2004
- 43) Kelley SP, Dunlop JJ, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA : Cytoplasmic region determines single channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature*, 424 : 321-324, 2003
- 44) Finer-Moore J, Stroud RM : Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 155-159, 1984
- 45) Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S : Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335 : 645-648, 1988
- 46) Galzi JL, Devillers-Thierry A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP : Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359 : 500-505, 1992
- 47) Gunthorpe MJ, Lummis SCR : Conversion of the ion selectivity of the 5-HT (3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channels superfamily. *J. Biol. Chem.* 276 : 10977-10983, 2001
- 48) Keramidas A, Moorhouse AJ, French CR, Schofield PR, Barry PH : M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective. *Biophys. J.* 78 : 247-259, 2000
- 49) Corringer JP, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Changeux JP, Bertrand D : Mutational analysis of the charge selectivity filter of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 22 : 831-843, 1999

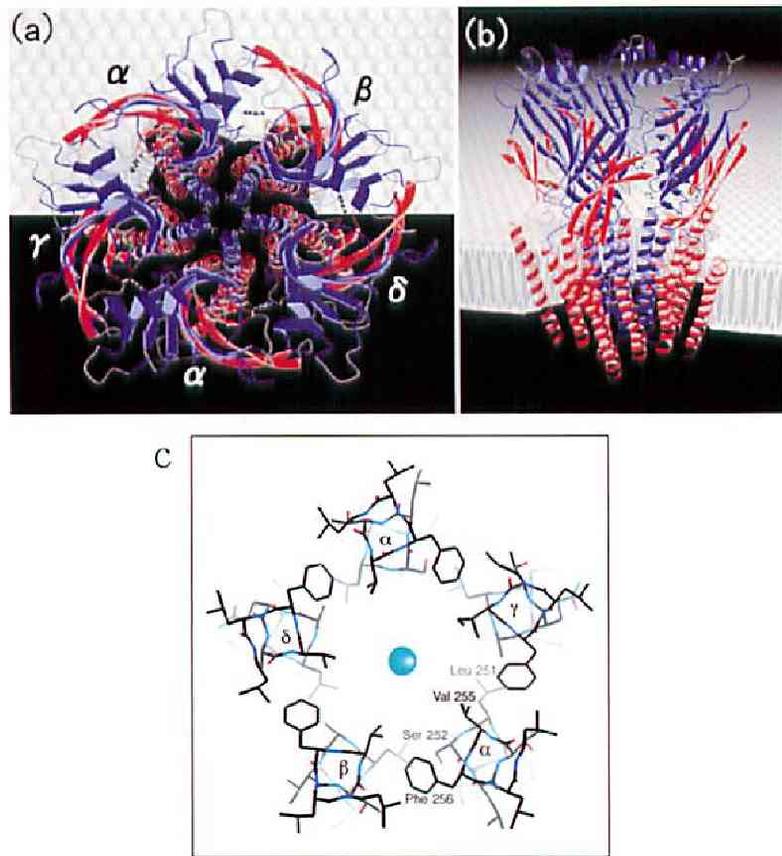


図3 nAChRの全体像

nAChRの三次元リボン構造モデルを、(a) 上から見た場合と、(b) 横から見た構造で、分子の半分から脂質膜を表示した図。5量体からなるnAChRの各サブユニットはそれぞれ4本の α ヘリックス(M1~M4)で膜を貫通しており、受容体全体では、膜を貫通している α ヘリックスは合計20本になる。膜貫通領域は内側リング(5本のM2ヘリックス)と外側リング(合わせて15本となるM1, M3, M4ヘリックス)から形成されており、内側リングはチャンネル内孔であると共に、イオンチャンネルのゲートとなる。受容体の活性化に伴い α サブユニットで構造変化の起こる細胞外領域の内側 β シートおよび内側リングは青色、受容体の外壁となる不動の細胞外領域の外側 β シート、および、膜貫通領域の外側リングは赤色で表示している。(c) チャンネルゲート部位のガードル構造。このファミリーの受容体で保存されているロイシン(Leu251)が隣のM2ヘリックスのアラニンやセリンといわゆるガードル構造を形成する。それゆえ、各サブユニットのM2ヘリックスにある疎水性アミノ酸残基が5回対称的に配置し、均等に相互作用している。閉じた状態で直径6Åだったチャンネルポアが、開いた状態では9Åに広がる。チャンネルの中心のイオンを青緑で示す。(Nigel Unwin, Atsuo Miyazawa との共同研究)

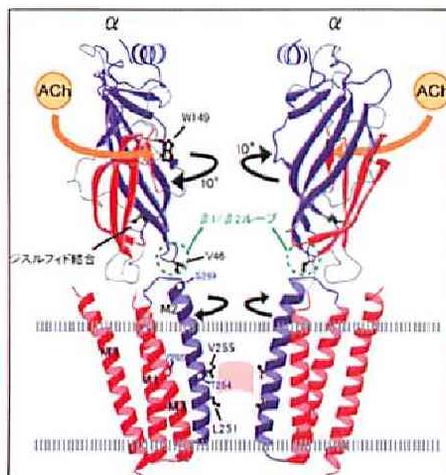


図4 ゲート開閉メカニズムのモデル図

nAChRの2つの α サブユニットだけを抜き出して描いてある。細胞外領域の内側 β シートおよび膜貫通領域の内側リングは青色、細胞外領域の外側 β シートおよび膜貫通領域の外側リングは赤色で表示している。細胞外領域の内側 β シート構造中にある短いループ部分($\beta 1/\beta 2$ ループ: 緑色で囲われた領域)の先端(バリン46)が、M2ヘリックスの末端にドッキングして回転運動を伝える。2本の平行破線は脂質二重膜を示す。(Nigel Unwin, Atsuo Miyazawa との共同研究)

用は安定でなければならない。図2bに示すように、アクアポリン-0が脂質分子としっかりと相互作用をしている構造が解析された。

アセチルコリン受容体

筋肉の動きを制御する運動神経の情報は、神経筋接合部において、神経終末から放出された神経伝達物質 (acetylcholine: ACh) が、筋肉の細胞膜 (ポストシナプス膜) に存在する受容体に結合することによって素早く伝達される。この情報伝達を担うのが、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor: nAChR) で、AChが結合することにより分子内で一過性の構造変化を起こしてイオンチャンネルを開口させる。その結果、細胞内外の電気化学的勾配に従って正イオンが通り抜けることにより筋細胞膜を脱分極させて、最終的には筋肉を素早く収縮させる。

1つの分子内に受容体とイオンチャンネルの2つの機能を合わせ持つ1群のタンパク質スーパーファミリー、リガンド開閉型イオンチャンネルには、nAChRの他にセロトニン (5-HT₃)、 γ アミノ酪酸 (GABA_A, GABA_B)、およびグリシンの各受容体が知られている。特にnAChRは、シビレエイの筋肉由来の電気器官から大量精製でき、チューブ状結晶が成長する²⁹⁾。この結晶作製法では、界面活性剤による処理がないので、受容体や脂質分子が生体内に近い状態で保たれている。それゆえ、これまでもnAChRの静止状態および活性化状態の構造研究が行われてきた²⁹⁻³²⁾。

アセチルコリン受容体の構造

我々が開発した極低温電子顕微鏡を用いて、2003年にnAChRの立体構造モデルを4Å分解能で解析することができた (図3)。この構造はnAChRの静止状態 (イオンチャンネルが閉じた状態) にある立体構造である³³⁾。nAChR分子は、5つのサブユニット (α , α , β , γ または ϵ , そして δ) からなる5量体で、それらが環状に配置して正イオン選択性のイオンチャンネルを形成している。nAChRは分子量約290 kDaの糖タンパク質で、外径は約80Å、膜に垂直方向の長さは約130Åで、そのうち細胞膜の外側に約70Åほど突出している。1サブユニットあたりM1からM4と呼ばれている4本の α ヘリックスが細胞膜を貫通している。5サブユニットから成る受容体1分子では、膜貫通領域は5本のM2ヘリックスからなる“内側リング”と、15本の α ヘリックス (M1, M3, M4) からなる“外側リング”の2つに分

割された形状をしている (図3a,b)。内側リングはチャンネルポアを形成しており、外側リングは細胞膜の脂質から内側リングを隔離する外壁となり、内側リングがチャンネルのゲートの開閉を引き起こすための構造変化ができるように、分子内に空間を確保する構造と考えられる。

またnAChRの構造から、同じスーパーファミリーに属しているグリシンおよびGABA_A受容体のアルコールや麻酔薬の結合部位が、膜を貫通している内側リングにあることが推測された³⁴⁾。これに関与するアミノ酸は、グリシン受容体の第267番目のセリンとGABA_A受容体の第270番目のセリンで、どちらも α サブユニットのM2ヘリックス上にある³⁵⁾。nAChRにおいて、これらのアミノ酸残基に相当するのは α サブユニットの第257番目のロイシンで、ここは細胞膜の脂質二重層内ではあるが、受容体の内側リングと外側リングの間にできた空間に面した位置にある。したがってnAChRの構造解析結果から、グリシンやGABA_A受容体に作用するアルコールや麻酔薬は、これら受容体の分子内にできた空間を通過して細胞膜内にある結合部位に到達していると説明できる。内側リングの作るチャンネルポアは、M2ヘリックス自身の屈曲と大きな疎水性アミノ酸残基の側鎖により膜の中央部で最も狭くなっており、そこでは隣合う疎水性アミノ酸残基同士の均等な相互作用によって、5回対称的なガードル状構造が形成されている (図3c)。チャンネル内孔の直径は、最も狭くなっている第251番目のロイシンおよび第255番目のバリンの位置で約6Åほどである。

上記のように水チャンネルアクアポリン-1は、速い水透過を行うにもかかわらず狭い部分は直径3Åである。一方、nAChRの静止状態のチャンネル径は最も狭いところで6Åと水チャンネルの倍の内径であるが、イオンや水を透過しない。これは非常に不思議なことに思われる。しかし、Na⁺やK⁺などの正イオンが水和していると、その第1水和殻の外径は最低でも8Å程度になる。アクアポリン-1の場合には2つのアスパラギン残基が水分子の酸素と水素結合して、直径2.8Åの水が3Åのチャンネルを透過する時のエネルギー障壁を低くしているが、nAChRのチャンネルにはその様な残基がなく、完全に疎水的な穴となっている。また、K⁺チャンネルでは、このチャンネル分子内に巧妙に配置された主鎖のカルボニル基が、水和したK⁺の水分子の代わりとなって水分子を自然にイオンから剥がす事ができて、K⁺を裸にできる構造が存在する¹⁾。一方nAChRは、その機能上速い応答が重要と考えられるチャンネルで、正イオン選択性ではあるが、K⁺チャンネル、Na⁺チャンネル、またはCa²⁺チャンネルなどに見られる特定のイオンに対する選択性は無い。

実際、ガードル状構造周辺には、 K^+ チャンネルのように水に代わる極性残基がないために、水和したイオンから水分子を剥離することができない。しかも、チャンネルはガードル部分から緩やかにラップ状に緩やかに広がっており、水和状態のイオンはチャンネル内の適当な位置に詰まってしまうので、イオンも水もこのチャンネルを透過できないのであろう（図3a）。

アセチルコリン受容体のゲーティング機構

nAChR のリガンド結合部位に ACh が結合すると、 α サブユニットの細胞外領域にある内側 β シートが 10° 右回転する。この内側 β シートの最初の 2 つの β ストランドの間 ($\beta 1/\beta 2$) には短いループ領域があり、このループ先端の第 46 番目のバリンが、M2 ヘリックスの先端に接触する構造になっている（図4）。このバリンと M2 ヘリックスとの間にできた「ピンとソケット」状の相互作用は、 α サブユニットの内側 β シートの回転運動をチャンネル内孔に面した M2 ヘリックスに伝えて、膜貫通領域の中央部にあるガードル構造を壊す。すなわち、nAChR の構造変化は、(1) ACh の結合により 2 つの α サブユニットにある内側 β シートが 10° 右回転する、(2) この回転がバリンで接触する M2 ヘリックスを右回転する、(3) M2 ヘリックスに伝えられた回転の動きが、ガードル状構造を保っていた疎水性アミノ酸残基間の相互作用を弱める、(4) M2 ヘリックスは外側リングに向かって右回転し、水和したイオンが透過できる大きさ（直径約 9 \AA ）までゲート領域が広がると同時に、膜貫通ポアに面していた疎水性側鎖がずれて疎水性が弱められる。こうして水和したイオンが通過できるようになり、すなわちイオンチャンネルが開くと考えられる。

5 屍体構造をした nAChR において、リガンドの結合により回転する領域を持つ 2 つの α サブユニットが、このゲートを開口させるのに必要な最低限の数であると思われる。nAChR のイオンチャンネル内孔の立体構造と、M2 ヘリックスの協調的な回転運動によるチャンネルゲートの開閉機構モデルは、いくつかの突然変異実験から得られた解析結果と非常に良く一致する。ゲートの開閉に影響を及ぼすチャンネル内孔における突然変異は、その変異導入場所により、(1) M2 ヘリックスと細胞外領域との間の連結に影響する突然変異、(2) M2 ヘリックス間の隣り合うアミノ酸残基同士の相互作用に影響する突然変異、(3) M2 ヘリックス以外の部分にあって、その動きを妨げる突然変異、の 3 つに分類できる。

まず分類 (1) の例の 1 つに、細胞外領域と直接連結している M2 ヘリックスの先端にある α サブユニット

の第 269 番目のセリン（図4）がイソロイシンに変化した自然突然変異がある。この突然変異は、遺伝性の筋無力症の原因であり、電気生理的な測定の結果から、イオンチャンネルの開口時間が長くなっていることが分かった^{36, 37)}。しかし、このチャンネルの開口時間の延長は、 α サブユニットではない他の 3 つのサブユニット (β , δ , ϵ) において、 α サブユニットに相当する場所での同じ突然変異では全く変化しない³⁷⁾。このことは、他のサブユニットの細胞外領域からの影響を受けないで、ACh 結合による細胞外領域の回転運動を膜貫通領域に伝達すると考えられる α サブユニットの持つ特別な役割と良く一致する。しかも、イソロイシンへの変異は、細胞外領域の回転運動を伝えるバリンと M2 との接触を強くしすぎて、 10° の回転が生じてもその接触が離れないのでゲートが開いたままになる。これにより細胞毒性の強いイオンの流入が続き、細胞死、すなわち重篤な筋無力症を引き起こされるのであろう（図4）。

次に、 ϵ サブユニットの第 264 番目のスレオニンがプロリンに変異したものは、別の遺伝性筋無力症を引き起こす突然変異で、自発的で長く続くイオンチャンネルの開口を生じさせる³⁸⁾。この突然変異は、分類 (2) の 1 つの例で、変異したアミノ酸残基が疎水性のガードル状構造またはチャンネルゲートを形成するための要素の 1 つであることによるものである。ゲートとなる M2 ヘリックスの一部を本来とは異なる方向に曲げてしまうプロリン残基の挿入は、静止状態におけるゲートの疎水的な相互作用を弱めて、チャンネルの閉口状態が不安定になってしまうようだと推測される。

さらに、遺伝性筋無力症の突然変異である α サブユニットの第 285 番目のバリン（図4）のイソロイシンへの変異は、チャンネルの開口時間を異常に短くする方向に導くもので³⁹⁾、これは分類 (3) の 1 つの例となる。 α サブユニットにおいて、この第 285 番目のバリンは M3 ヘリックス上にあり、M2 ヘリックス上の第 261 番目のバリンに立体配置的に非常に近い位置にある。もし、この位置にバリンよりも大きいイソロイシンの側鎖がくると、“動かない M3 ヘリックス”と“動く M2 ヘリックス”の間の相互作用を強め、結果としてゲートの開閉の動きを立体化学的に抑制することになり³⁹⁾、ゲートの状態を閉口に有利な平衡状態に移すと考えられる。

最後に、ゲートの開閉メカニズムに関して多くの突然変異実験がなされているが、特にチャンネルのゲートとなっているガードル状構造を安定化している特徴的なロイシン残基 (α サブユニットでは第 251 番目) に最も注目が集まっている。その 1 つの例として、どのサブユニット

においてもこの位置にあるロイシンをセリンに置き換えると、イオンチャネルの開口感受性を上昇させるという結果が報告されている⁴⁰⁾。これは、このスーパーファミリー間で保存されるロイシンが、隣のM2ヘリックスのアラニンまたはセリンと相互作用して、すべてのサブユニットにおいて均等に形成されるガードルが重要であるという構造解析の結果と合致する。

チャネルのイオン選択性

受容体の細胞内領域には、5つのサブユニットの間隙それぞれに、表面が負に帯電していると考えられるスリット状の開口部がある。このような開口構造は、単粒子解析によって解明された電圧感受性Na⁺チャネルや、IP₃受容体にも見いだされている^{11,42)}。このスリットの大きさは、最大で幅10Å、長さが15Å前後であると思われる。このスリット状構造は、チャネル開口時にゲートを通過した正イオンがチャネル内孔より細胞質内へ出ていくための通路であり、細胞内の膜表面を正イオンが拡散して効率よく脱分極を誘起できると考えられる。開口部の表面は負に帯電しており、正イオンのみを選択的に通し、細胞質内の陰イオンの通過を妨げるイオンフィルターの役割を、同時に果たしていると考えられる。興味深いことに、5-HT_{3A}受容体の細胞内領域にも、同様なスリット状の開口部の存在が示唆されている⁴³⁾。一次構造上、M4領域の直前にある“HA-stretch”と呼ばれるアミノ酸配列⁴⁴⁾に点突然変異を起こすと、イオンチャネルのコンダクタンスに大きく影響することから、HA-stretchがスリット状構造を縁取るように配置しており、そこを通過するイオンのコントロールを行っているとの考えを支持する。

これまで、突然変異体を用いた電気生理学的測定により、nAChRのイオン選択性に関わるアミノ酸残基についての検討が行われてきた。例えば、筋肉型のnAChRでは、M2ヘリックスの細胞内末端付近に形成されている“負に帯電したアミノ酸残基のリング”の負電荷を減少させると、受容体の正イオンコンダクタンスが大きく減少することが示された⁴⁵⁾。また、α7型nAChRのイオン選択性は、3つの点突然変異(バリンとスレオニン、グルタミン酸とアラニンの置換、そしてプロリンの挿入)により、正イオン選択性から陰イオン選択性に変化する⁴⁶⁾。また、同様なイオン選択性の変化が、同じファミリーに属する5-HT_{3A}受容体とグリシン受容体でも報告された。これら2つの受容体で、α7型nAChRの突然変異アミノ酸残基に相当する3つの残基をそれぞれ置

換すると、5-HT_{3A}受容体では正イオン選択性から陰イオン選択性に変化し⁴⁷⁾、逆にグリシン受容体では陰イオン選択性から正イオン選択性に変化した⁴⁸⁾。これらのことから、それぞれの受容体におけるイオン選択性の機構は、このスーパーファミリーにおいて共通の特徴であると考えられる。そのため、このイオン選択性に関わる一部の領域は、チャネルのイオン電荷選択性フィルターと呼ばれている⁴⁹⁾。しかしながら、nAChRの静電ポテンシャルモデルでは、チャネル内孔において非常に広範囲にわたり負電荷が分布している。したがって、突然変異実験により同定されたアミノ酸残基ばかりではなく、他の多くのアミノ酸残基も協調的に関与して、効率的な正イオン選択性と、その透過に必要なとされる静電的な環境を、チャネル内孔に造っていると思われる。

おわりに

多様な機能を有する水チャネルやイオンチャネルの構造と機能の解析が進むことによって、これらのチャネルがヒトの生理機能に重要であることがますます明らかになってきている。アクアポリン-0やアクアポリン-4が水チャネルでありながら細胞の接着の機能を有していることがそれらの機能上重要である事が判って来つつある。このようなアドヘネルと名付けた細胞接着とチャネルなどの複数の機能を併せ持つマルチファンクショナルチャネルの重要性もますます明らかになるであろう。チャネルや受容体の構造生理学研究の発展は医学分野へ詳細な情報を提供するので、これまで興味を持たれなかった構造研究が医学分野の先生方に興味を持って見ていただけるような構造生理学分野として発展することを願っている。

文 献

- 1) Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R: The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77, 1998
- 2) Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R: Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0Å resolution. *Nature* 414: 43-48, 2001
- 3) Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N: Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423: 949-955 2003
- 4) Preston G M, Carroll TP, Guggino WB, Agre P: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes