

氏 名	刑 部 伸 彦
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2816 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 16 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	カーボンサンドイッチ法を用いた電子線結晶学によるアクアポリン-4の構造解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 吉 好 則 教 授 七 田 芳 則 教 授 梅 田 真 郷

論 文 内 容 の 要 旨

アクアポリン-4 (AQP4) は脳に優勢的に発現する水チャネルであり、脳浮腫に関与する重要な分子である。AQP4 は脳内の、特に血管平滑筋の無い脳内毛細血管を取り巻いているアストロサイトのエンドフィートや、浸透圧、グルコースおよび温度センサーとして働いていると考えられている視床下部のグリア細胞に多く発現している。エンドフィートではAQP4 が特徴的な格子状構造体を形成し、視床下部ではAQP4 を発現するグリア細胞がラメラ様構造をとっていることが、解剖学的に見出されている。この興味深い機能を担っている部位に発現しているAQP4 の水透過機構を詳細に調べることを目的として、バキュロウィルスと Sf9 昆虫細胞を用いた発現系により大量に調製したラット AQP4 から電子線結晶学による高分解能構造解析を試みた。これは、哺乳動物の膜タンパク質の構造解析を発現系で行った最初の例である。

作製した結晶は膜が二重に重なった二層型結晶であった。さらに困難なことに、この二層の結晶の重なり方が一様ではなく様々なタイプの二次元結晶が混在したものであった。非常に高い分解能の回折点が観測される結晶でも、電子回折パターンからだけでは重なり方が異なる結晶を選別することができない。それゆえ、高い分解能の電子回折パターンが得られる同じ結晶から、電子顕微鏡像を撮影することによって、結晶のタイプを分類する必要性が生じた。従来の電子顕微鏡用試料作製方法では、高い傾斜角の試料から良い像が撮影できる割合は非常に低く、良い回折パターンが得られた結晶を分類できる効率が悪く構造解析は不可能であった。そこで我々は、試料作製方法の改良を試み、カーボンサンドイッチ法という新しい方法で、AQP4 二次元結晶を用いて高傾斜試料においても高分解能の極低温電子顕微鏡像を効率よく撮影することに成功した。このカーボンサンドイッチ法により、電子線結晶学によってタンパク質の構造解析を、今後より迅速に進めることができる。

カーボンサンドイッチ法で収集したデータを用いて、3.2 Å 分解能の立体構造を解明することができた。この構造からAQP4 の速い水分子透過性が、その狭く長い、疎水性チャネルポアの特異な構造により、水透過のエネルギー障壁をいくつかの領域に分散することで実現されていることが明らかになった。また、結晶の層内のAQP4 四量体は、ヘリックス間相互作用により一方向で再構成していることが分かった。二次元結晶の分子のパッキングが、エンドフィートで見られる格子構造のものと同じであることを示唆する結果が得られた。さらに、二層型結晶の2枚のシートは、ヘリックス3-4間のループ上の特徴的な短い 3_{10} ヘリックスでのみ、弱く相互作用しており、この二層間の特異的な相互作用から、グリア細胞ラメラで発現するAQP4 の接着分子としての役割が新たに示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

アクアポリンは、生体における水や電荷を持たない小分子の移動を担うチャネルであり、このファミリーのタンパク分子について高分解能の立体構造がわかっている数少ないチャネルでもある。その構造解析は、まず電子線結晶学により行われ、その後X線結晶解析でも原子モデルが決定されており、水透過機能の解析などが現在盛んに研究されている。また例え

ばヒトでも、その50%以上が水で構成されていることを考えると、生命の維持に重要な役割をしていると考えられ、その点からも現在大変注目されている膜タンパク質の一つである。実際にヒトでは、少なくとも11種類のアクアポリンが見つかり、特に脳においては星状細胞などに主にAQP4が発現している。AQP4は赤血球膜などに大量に存在するAQP1などと同じように、一秒間に10億個以上の水分子を通す非常に速い水の透過を行うことが知られていた。そこで速い水透過機構の理解のため、申請者は、組み換えバキュロウィルスとSf9昆虫細胞を使うシステムで発現したラットAQP4の二次元結晶を用いて、その電子回折図形から分子置換法により3.2Å分解能の構造解析を行った。これは、発現系を用いては乳類の膜タンパク質の原子モデルを決定した初めての例となる。

そのAQP4の二次元結晶は、二枚の脂質二重層が重なったもので、その二枚の間の相互作用が弱いことから、二枚の重なり方が一種類のみでないことがわかった。そのため、電子回折図形と同時に電子顕微鏡写真を撮影し、その顕微鏡像から計算した位相を用いて、結晶中の分子配置を確定し、同一の配置の結晶のみを用いて解析を行う必要があった。しかし従来は、大きく傾斜した試料から傾斜軸の垂直方向に分解能の良い電子顕微鏡像が得られる確率が非常に低く、高分解能の回折図形と同時に解析できる顕微鏡像を得なければならない、このようなデータ収集は非常に困難であった。申請者は、カーボン膜を二枚用いて試料を挟むことで、解析に用いることができる高分解能の電子顕微鏡像を得る確率を従来の30%程度から90%まで向上した。この試料作製法の改良は、二枚が重なっているタイプの結晶のみでなく、通常の二次元結晶においても、効率的にデータを収集するのに今後大変役立つと考えられる。

申請者は、解析されたAQP4の立体構造から、水の透過経路に関して、従来からわがっていたar/R領域という最も狭くなっている領域以外に、ALIV領域という穴の大きさが水一分子程度の疎水領域を新たに見いだした。これらの領域の間にNPA領域といわれるファミリーで保存された水との相互作用部位があり、この三つの領域に水透過のエネルギー障壁となる部分を分散することで速い透過が実現されるというモデルを提案している。また、二次元結晶に見られる二枚の脂質二重層間での相互作用から、AQP4が水の透過のみでなく細胞の接着にも寄与する可能性を示唆している。以上の立体構造からの仮説には検証の余地があるが、以後のAQP4研究を明瞭に方向付けることができる結果である。特にAQP4が細胞接着にも関与している可能性は、AQP0が目レンズ線維細胞において細胞膜を結合するジャンクションとしても機能していることが知られていることなどから大変興味深く、脳機能との関係も考えられる重要な知見である。以上から、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。そして、論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。