

細胞の構造生物学

遠くを見る望遠鏡

興味

遺伝子だけでなく教育や環境が人を作る機構
Nurtureの分子機構

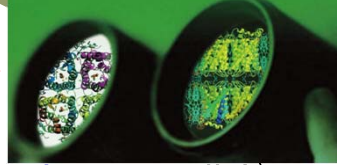
GOAL

個性や能力を分子レベルから理解したい:
構造生理学

創薬基盤技術の開発

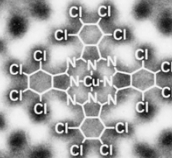
構造に基づいて

Long-term view makes you happy



名古屋大学大学院創薬科学研究科 細胞生理学研究センター 藤吉好則

電子顕微鏡で原子分解能が達成できる



塩化フタロシアニン銅の 1.8Å分解能 の電子顕微鏡像

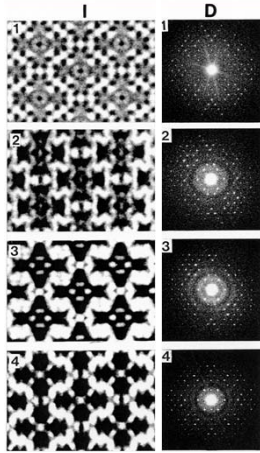
Chlorinated Copper Phthalocyanine

Chemica Scripta., 14, 47-61 (1978/79)

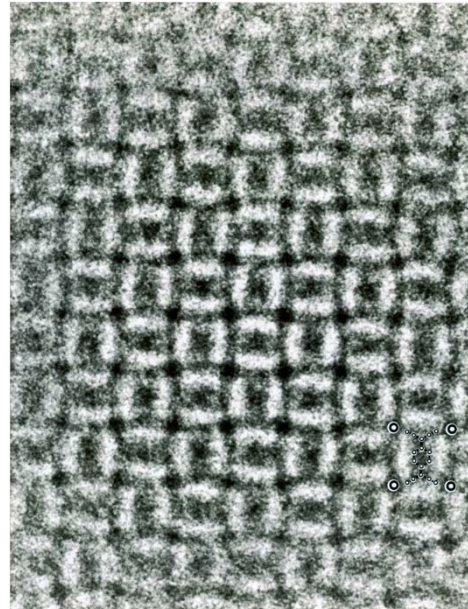
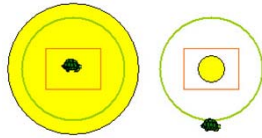
電子線最少照射装置開発

銀・TCNQ複合体

Nature, 285, 95-97 (1980)



MDS (Minimum Dose System)



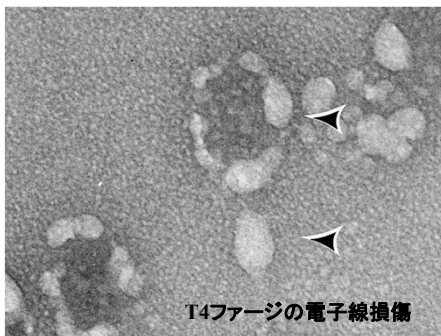
電子線損傷による分解能限界

Adv. Biophys. 35, 25-80 (1998)

電子線損傷の軽減が必須

電子線損傷のために、100 Åより高い分解能での観察は不可能

原子爆弾の爆心地と同じ程度のエネルギー

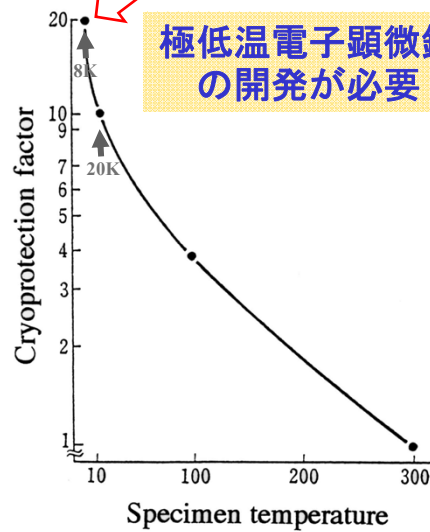


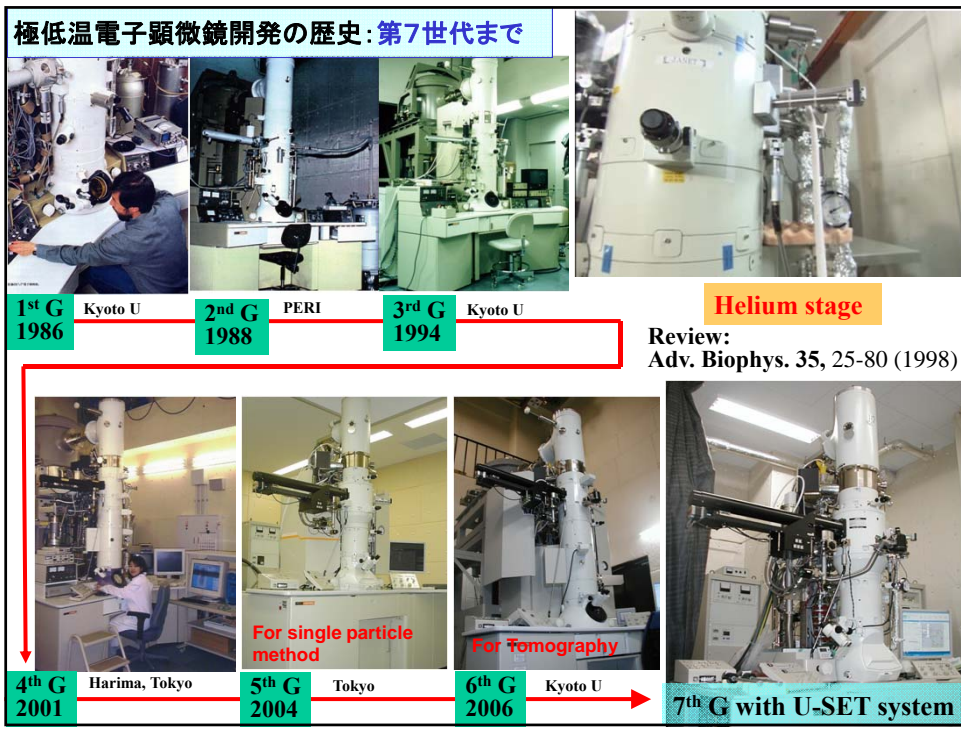
T4ファージの電子線損傷

冷却

8K以下で、室温の20倍の電子線照射が可能

極低温電子顕微鏡の開発が必要





電子線結晶学

- ・膜の中で構造研究が出来る
- ・小さい結晶でも構造解析可
- ・結晶の両側が開いている
- ・位相が像から直接計算される

Henderson R, Unwin PNT, *Nature*, 257, 28-32 (1975)

Bacteriorhodopsin

a

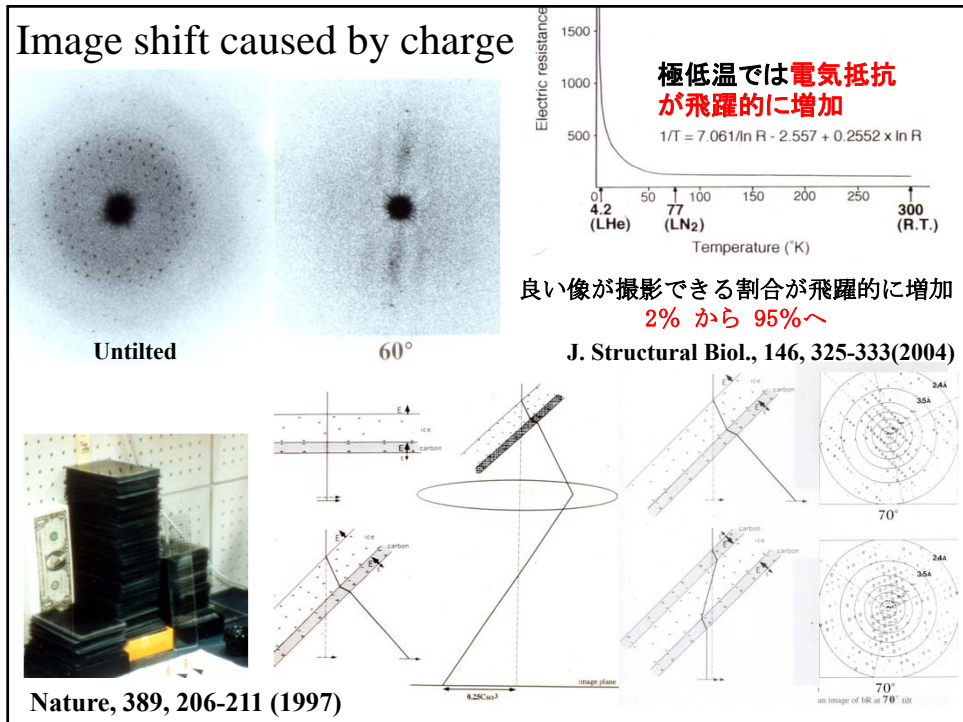
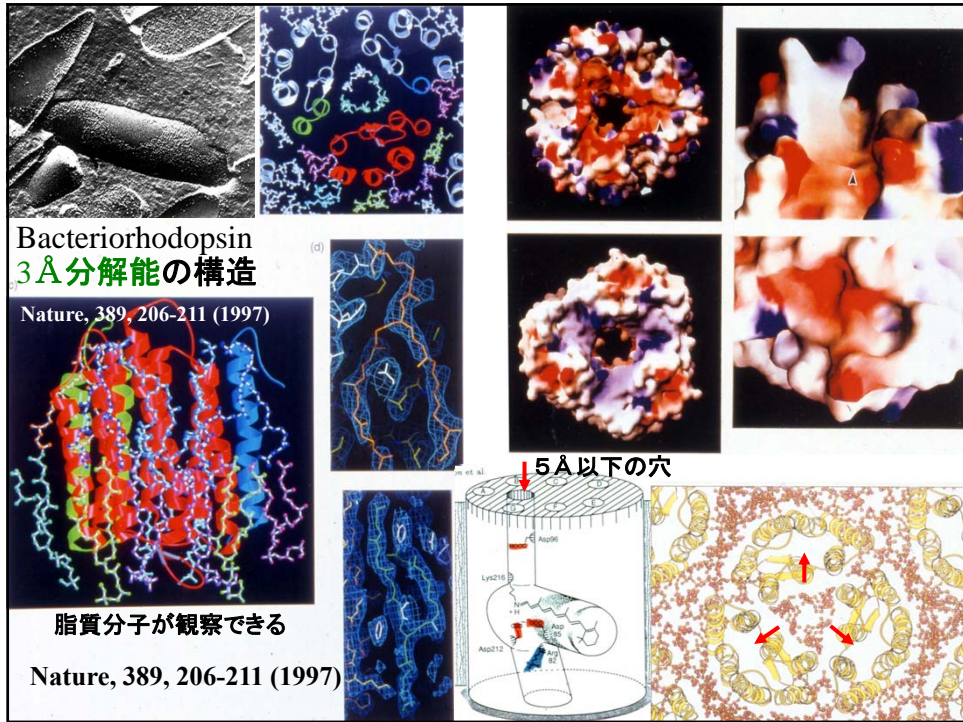
b

Nature, 389, 206-211 (1997)

H⁺K⁺-ATPase by K Abe

PNAS, 109, 18401-6 (2012)
 Nature Comm. 1154, 1-7 (2011)
 EMBO J 28, 1637-43 (2009)

H⁺を100万倍の濃度勾配まで⁶pumping



典型例: AChRの構造

チューブ状結晶からの構造解析

AChR: アセチルコリン受容体

Nature, 423, 949-955 (2003)

by N Unwin

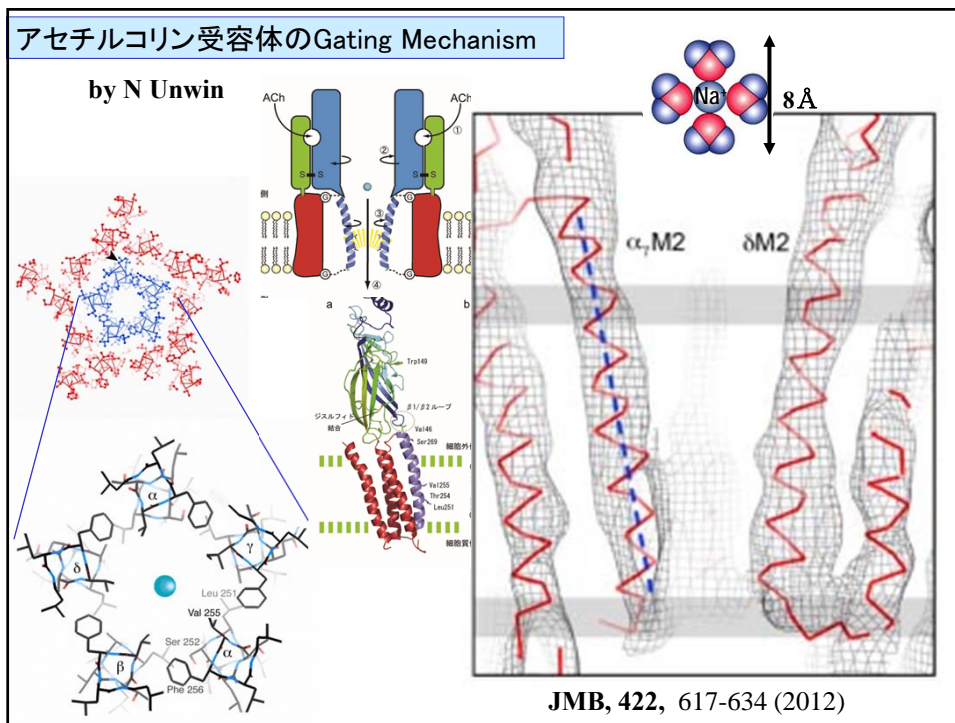
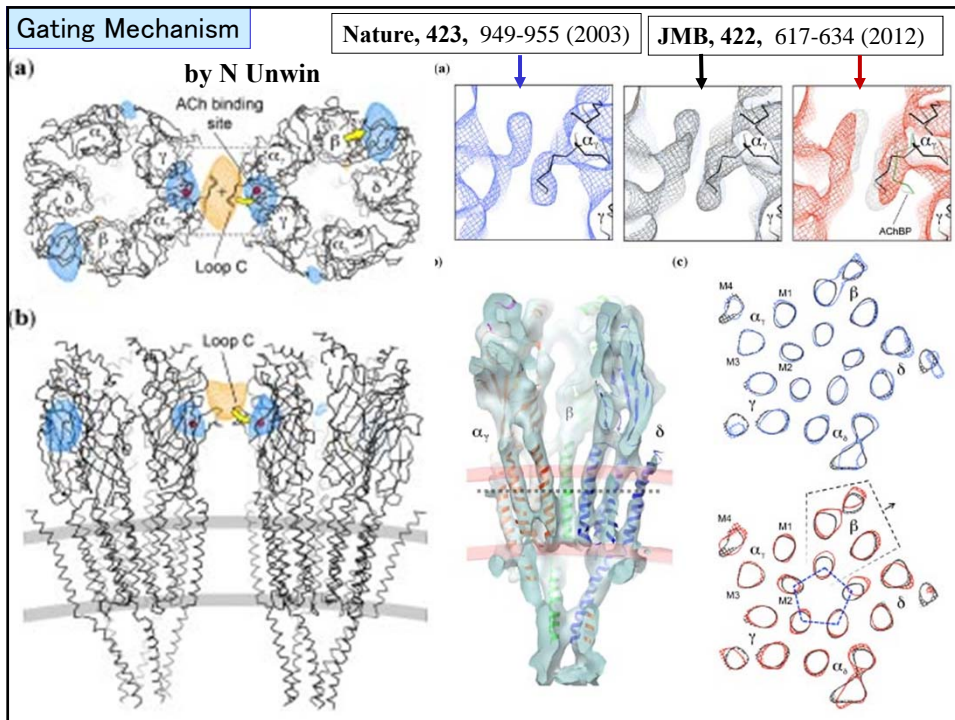
Gating Mechanism

神経筋接合部

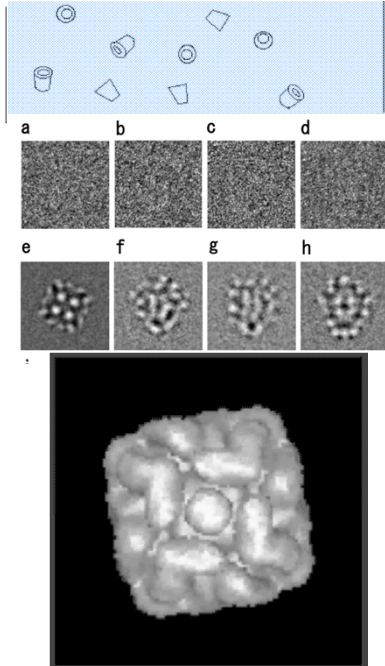
by N Unwin

Nigel Unwin, Nature 373, 37 (1995)

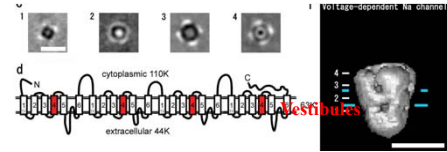
JMB, 422, 617-634 (2012)



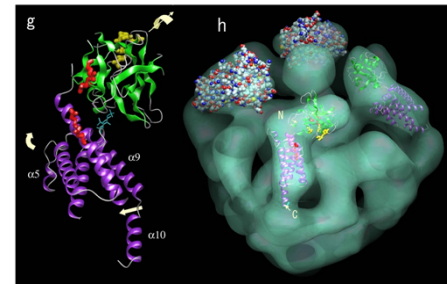
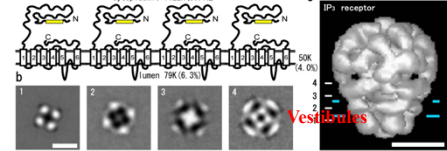
単粒子解析法：脊椎動物由来の構造解析を考えたが高分解能解析はできず



Na-channel, Nature, 409, 1047-1051 (2001)



IP₃R., J. Mol Biol., 336, 155-164 (2004).

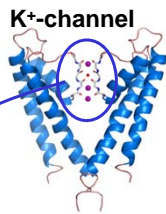


イオン選択性の機構

D.A. Doyle et al. Science 280, 69-77 (1998)

Y. Zhou et al. Nature 414, 43-8 (2001)

Roderick MacKinnon



1) $K^+ \gg Na^+$, 2) $10^8 K^+/\text{sec}$

K⁺-channel YYYYY

Na⁺-channel Ca²⁺-channel

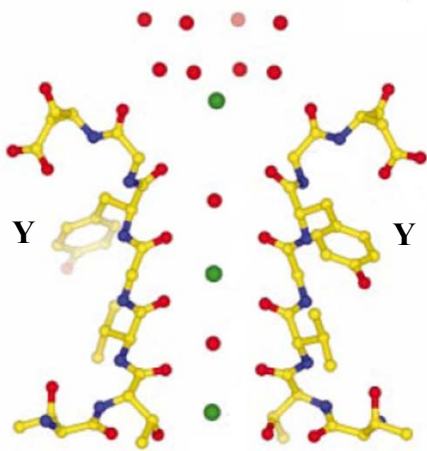
24TM S1~S6 × 4Domain

DEKA(Na_v) EEEE(Ca_v) motif

Na²⁺ channel to Ca²⁺ selective

DEKA → EEEE

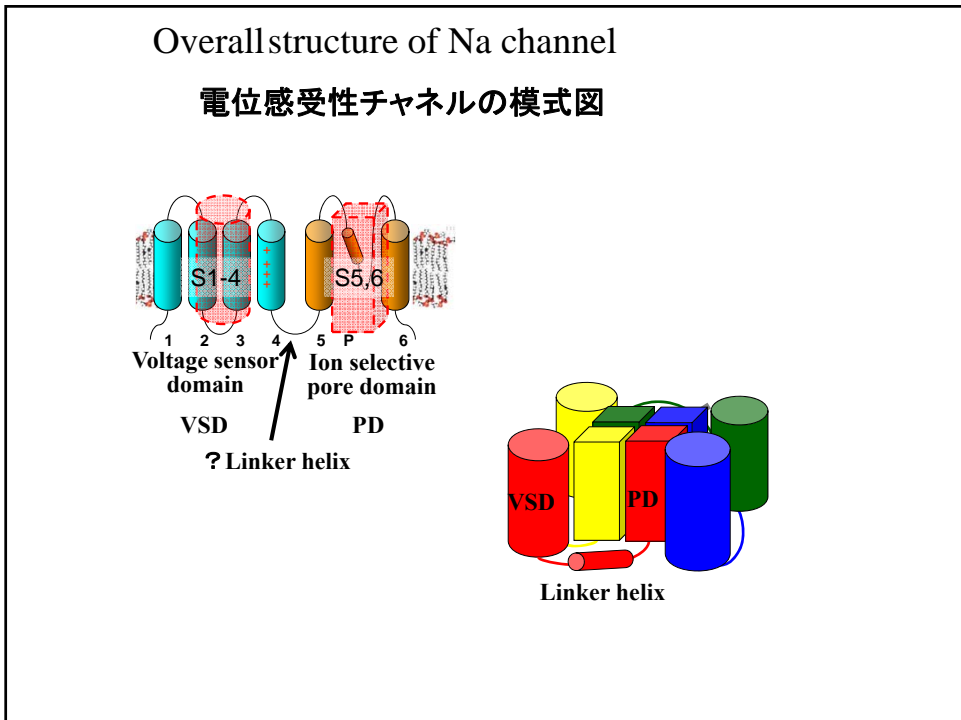
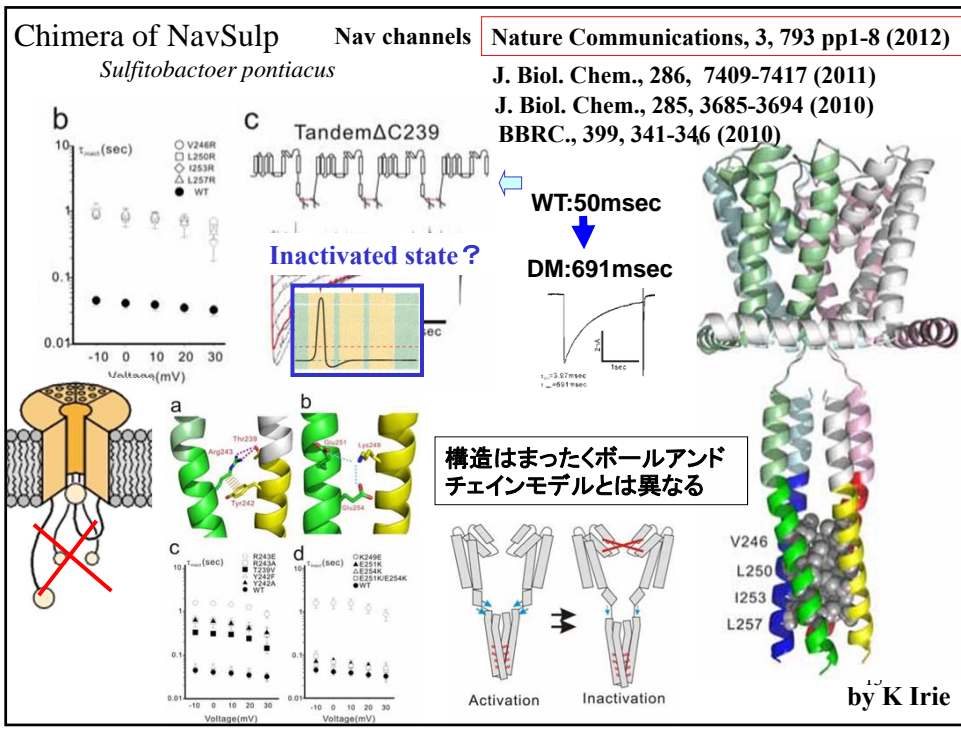
イオン選択性もまだなぞ



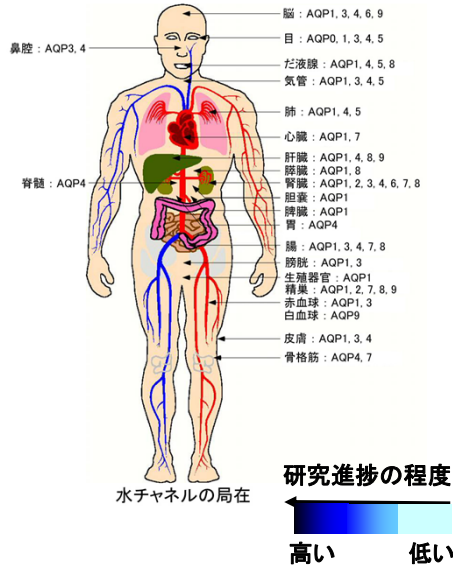
KcsA	LVVYDLYP	強カリウム選択性
Sh	TVVYDMTP	- 全カリウムチャンネル
heag	SVVFNVSP	弱カリウム選択性
HCN2	CIVYRQAP	- HCN チャンネル
TrpV1	TIVMDLEP	陽イオン/カルシウムチャンネル
NaKba	FVVDANFSP	- TRP チャンネル
NaKbc	FVVDNFSP	- CNG チャンネル
CNGA1	FIVSTPP-P	- IP3/ライアノジン受容体
Ca ²⁺ I	ITVMDVDP	- イオンチャンネル型グルタミン酸受容体
Ca ²⁺ II	LTVDWNSV	- NaK チャンネル?
Ca ²⁺ III	STPFVPEE	強カルシウム選択性
Ca ²⁺ IV	ATVFAWDL	- 電圧感受性カルシウムチャンネル
Na ⁺ I	MTQDFWENL	弱ナトリウム選択性
Na ⁺ II	LCVWIEETM	- 電圧感受性ナトリウムチャンネル
Na ⁺ III	ATFKWMDL	
Na ⁺ IV	TTSAWDGL	

$K^+ \gg Na^+$, 2) $10^8 K^+/\text{sec}$

William N Zagotta, Nature 440, 429 (2006)



水チャネルの構造と機能



- AQP0:** 白内障、細胞接着
- AQP1:** 腎臓はじめ多くの場所に発現
- AQP2:** ダイナミックな機構、心臓疾患等多くの病気治療対象
- AQP3:** 水だけでなくグリセロール透過、美容、怪我などに関係、肺、消化管
- AQP4:** 細胞接着、躁鬱病や多発性硬化症等にも関連し高次の脳機能と
- AQP5:** ドライアイ、唾液分泌、汗腺、肺
- AQP6:** 水チャネルのファミリーながら、陰イオンチャネル、脳での機能、腎
- AQP7:** グリセロール透過、脂肪細胞、腎
- AQP8:** グリセロール消化管、膵臓、腺房、肝臓
- AQP9:** グリセロール、肝細胞、脳、白血球
- AQP10:** グリセロール、消化管
- AQP11:** NPAがNPC腎性嚢胞症、脳、肝細胞
- AQP12:** NPAがNPT、オルガネラに発現

aquaporin-1の機能

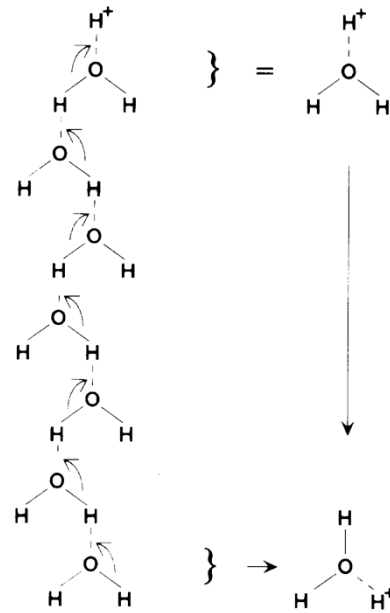
水銀イオンはどのように水透過を阻害するか? => 水銀イオンの利尿作用!

どのような機構で水だけを選択透過するのか?

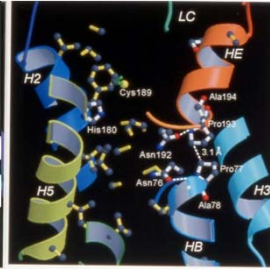
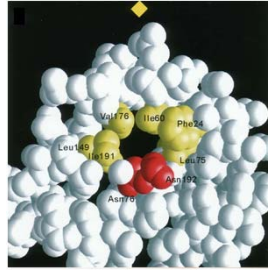
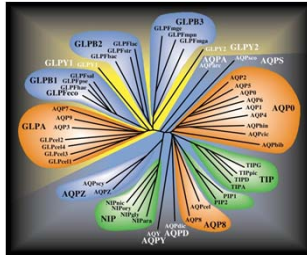
非常に速い水の透過性はどのようにして実現されるか (1秒間に30億もの水分子を透過)?

速い水透過をしながらプロトンをも透過しない機構は?

水チャネルの構造解析が必要

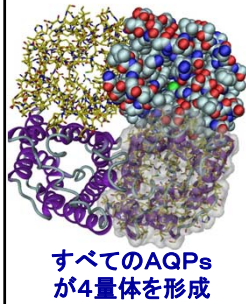


2次元結晶と構造

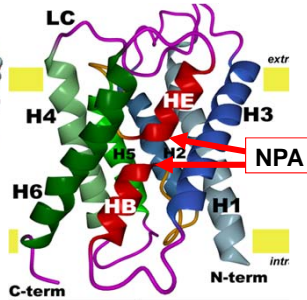


地球上のほとんどすべての生命に発現

Nature, 387, 624-7 (1997)
Nature, 407, 599-605 (2000)



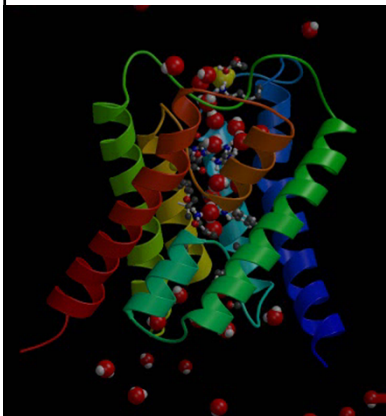
すべてのAQPsが4量体を形成



水選択透過の分子機構

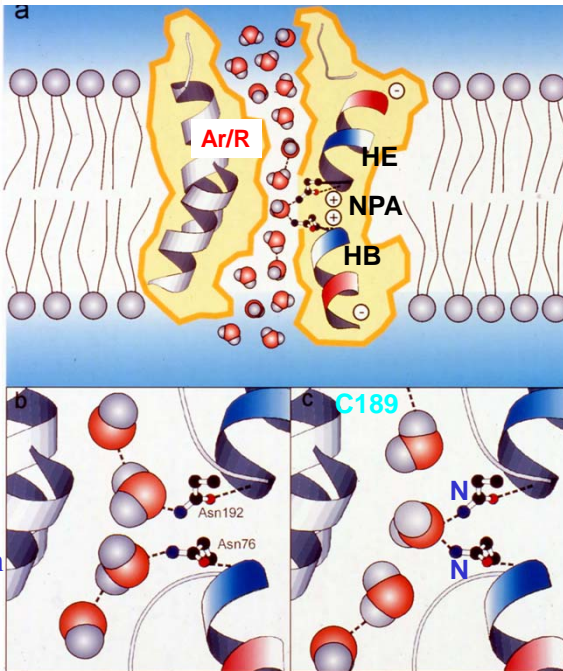
Nature, 407, 599-605 (2000)

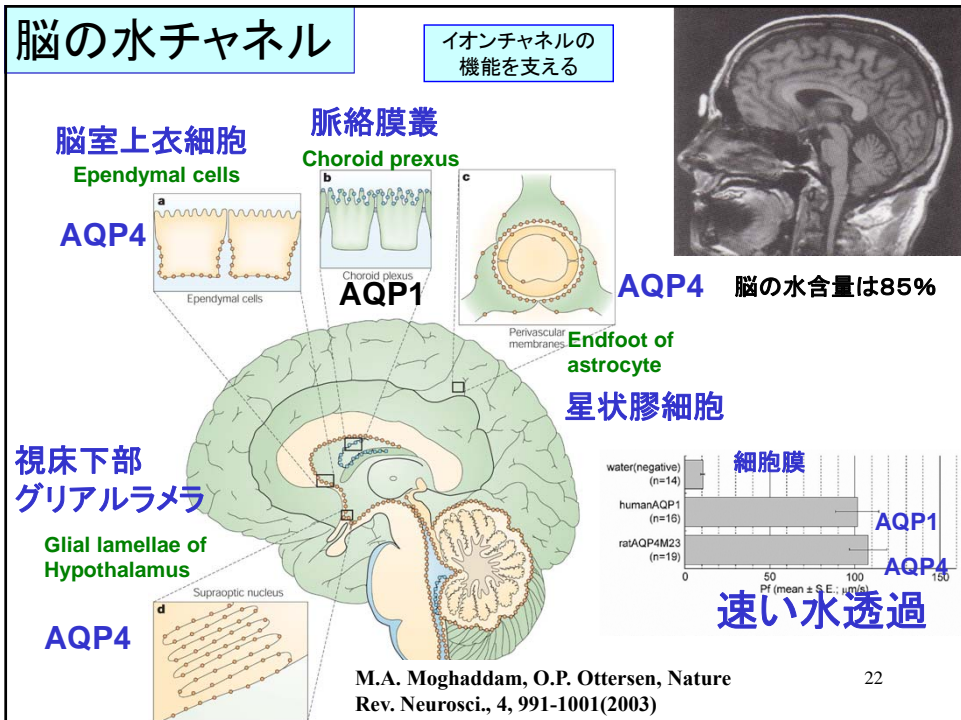
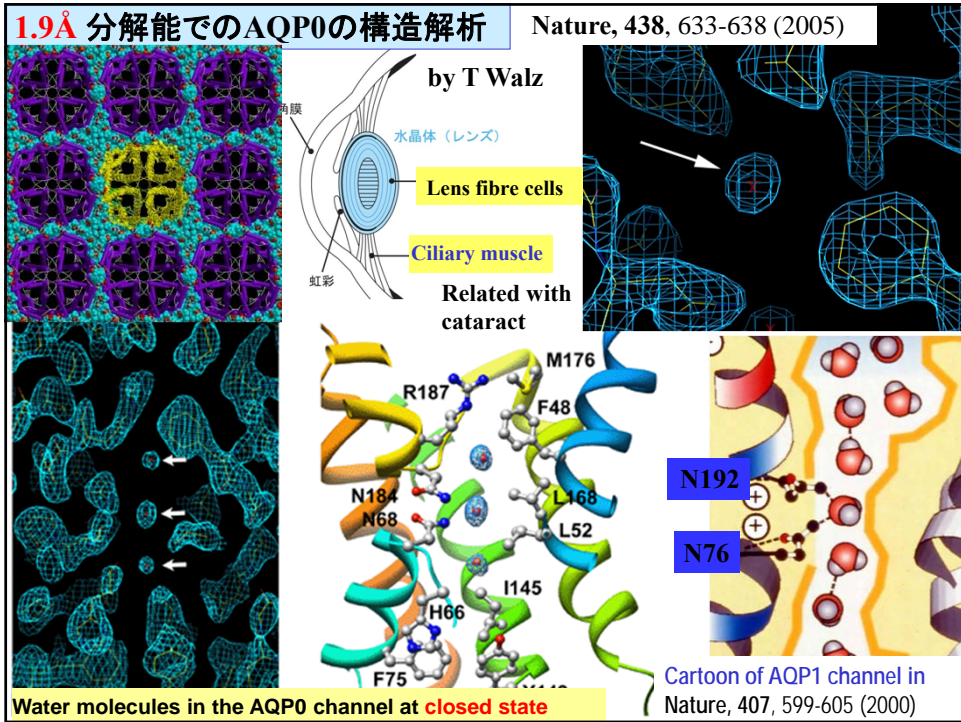
H-bond isolation mechanism



Courtesy of Grubmueller
Analysed at 3.8Å resolution

- Global orientation turning
- Desolvation effect of ions



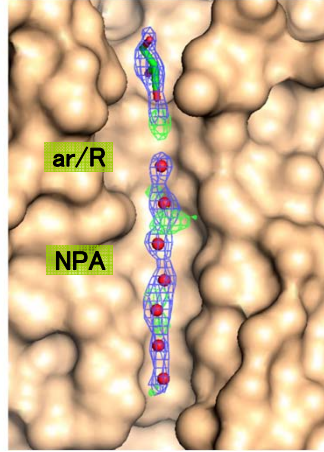
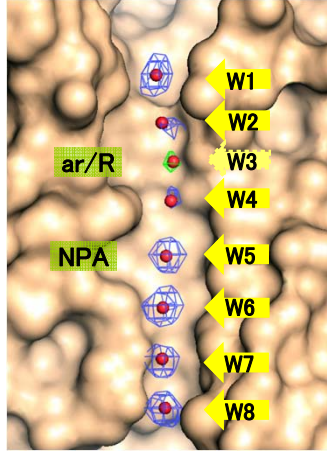


AQP4の構造解析

？常識と異なる？

電子線結晶学
2.8 Å 分解能

X線結晶学
1.8 Å 分解能



8個の水分子を分離

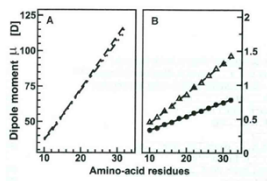
水分子の分離不良

J. Mol. Biol., **389**, 694–706 (2009)

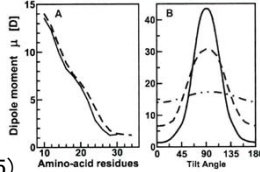
JD Ho et al., *PNAS* **106**, 7437–42 (2009)

比誘電率とHelix Dipole

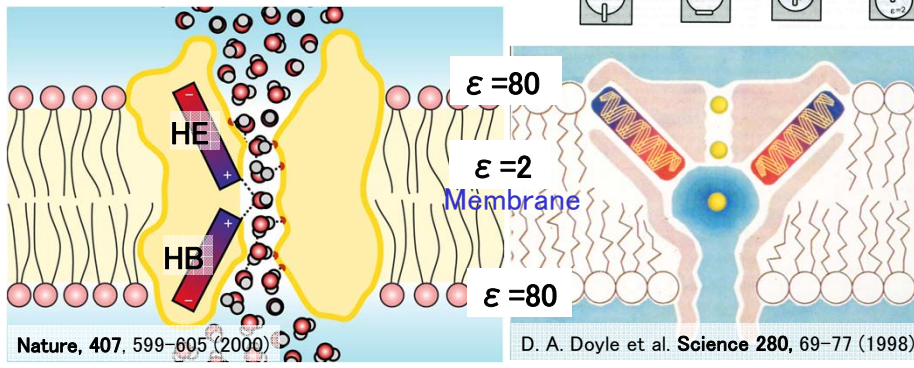
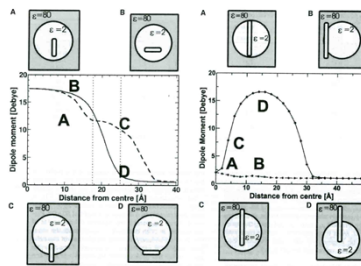
Membrane



Durba Sengupta et al.,
Structure **13**, 849–55 (2005)



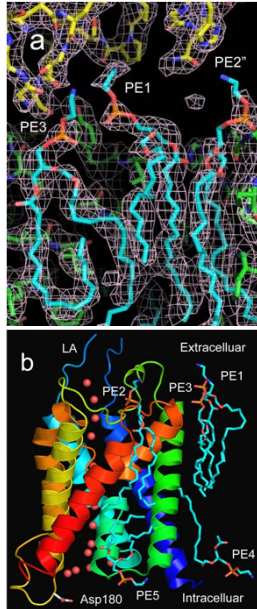
比誘電率: ϵ
双極子モーメント: μ



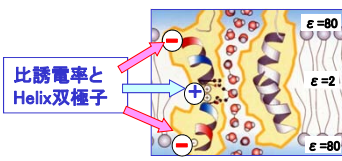
Nature, **407**, 599–605 (2000)

D. A. Doyle et al. *Science* **280**, 69–77 (1998)

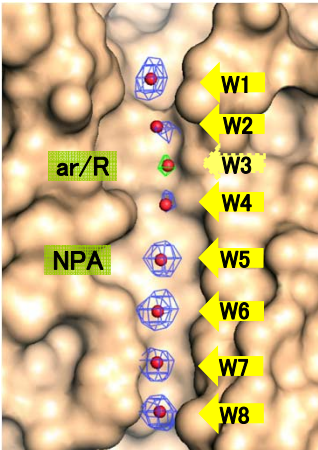
電子線結晶学の優位性:
AQP4の膜の中での構造



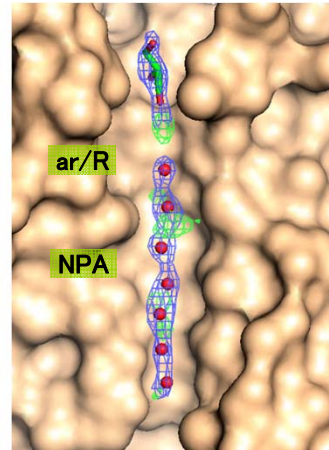
電子線結晶学
2.8 Å 分解能



X線結晶学
1.8 Å 分解能



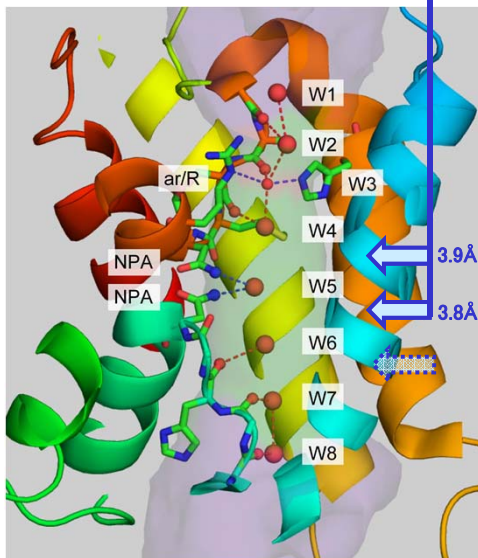
膜内で8個の水分子を分離
J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009)



ミセル中で水分子の分離不良
JD Ho et al., *PNAS* 106, 7437-42 (2009)

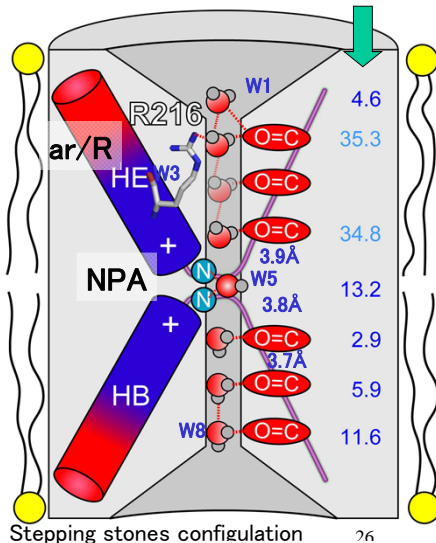
チャネル内の水分子と選択透過

H-bond isolation mechanism



AQP4の構造解析で1秒間に
30億の水分子を選択透過する機構解明

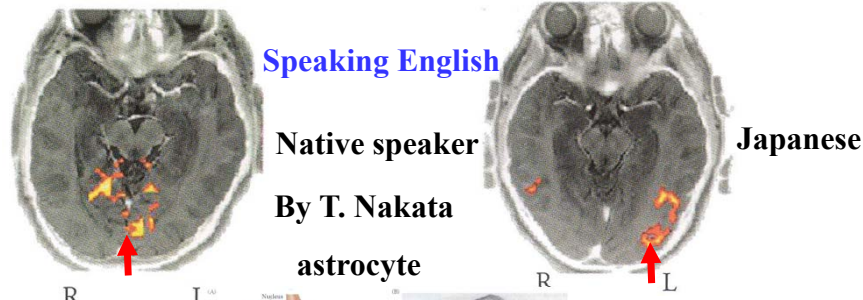
Temperature factors



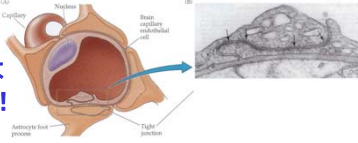
Stepping stones configuration

J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009)

脳における血流の制御機構

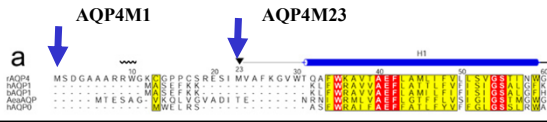
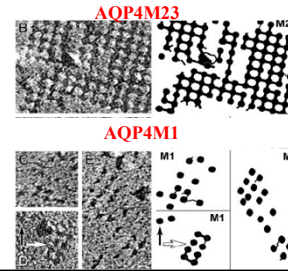


脳の毛細血管には血管平滑筋がない!



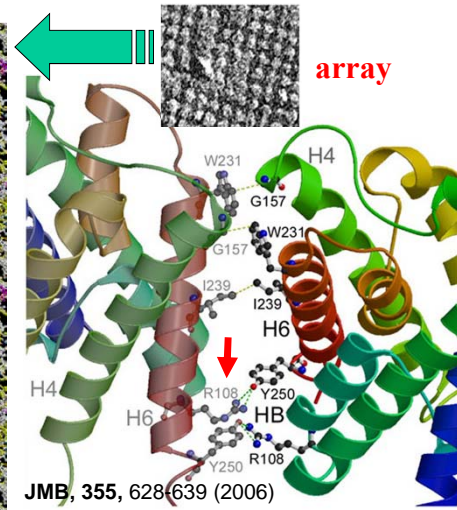
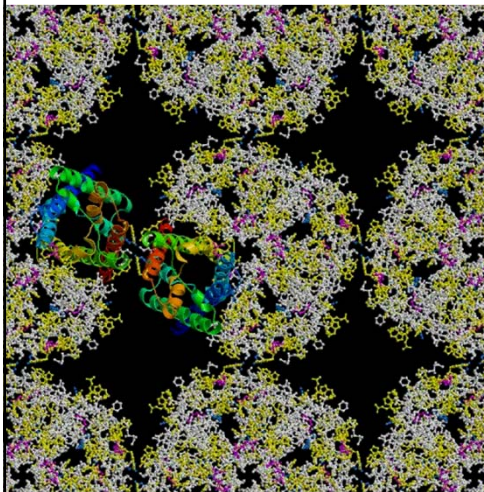
AQP4 はグリア細胞の endfeet で orthogonal array を形成し、その大きさは制御されている

AQP4 in brain



The orthogonal arrayの制御機構

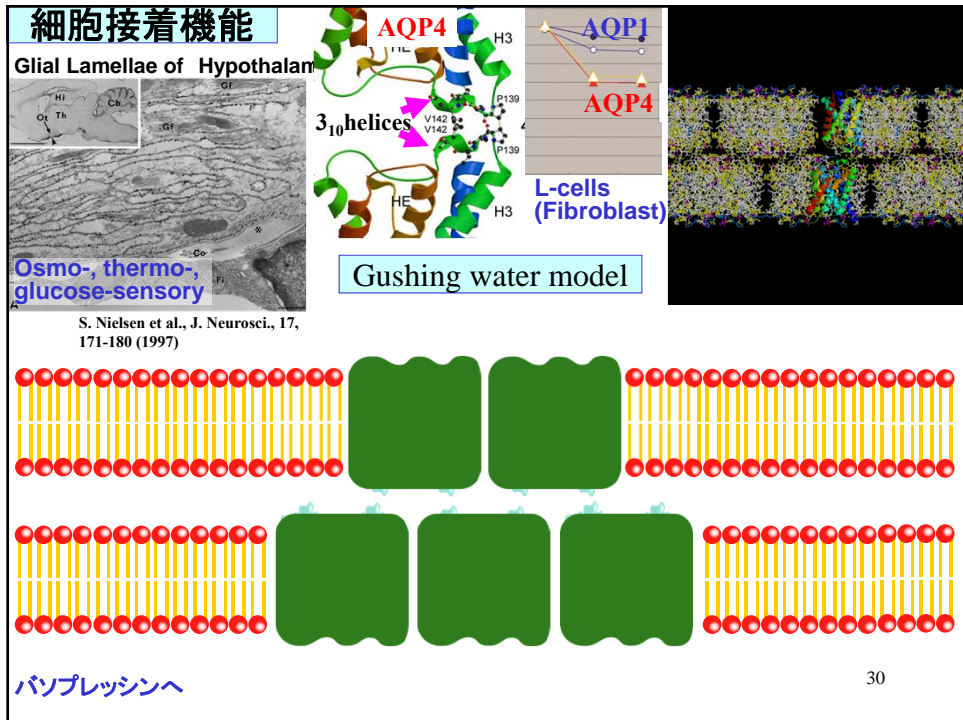
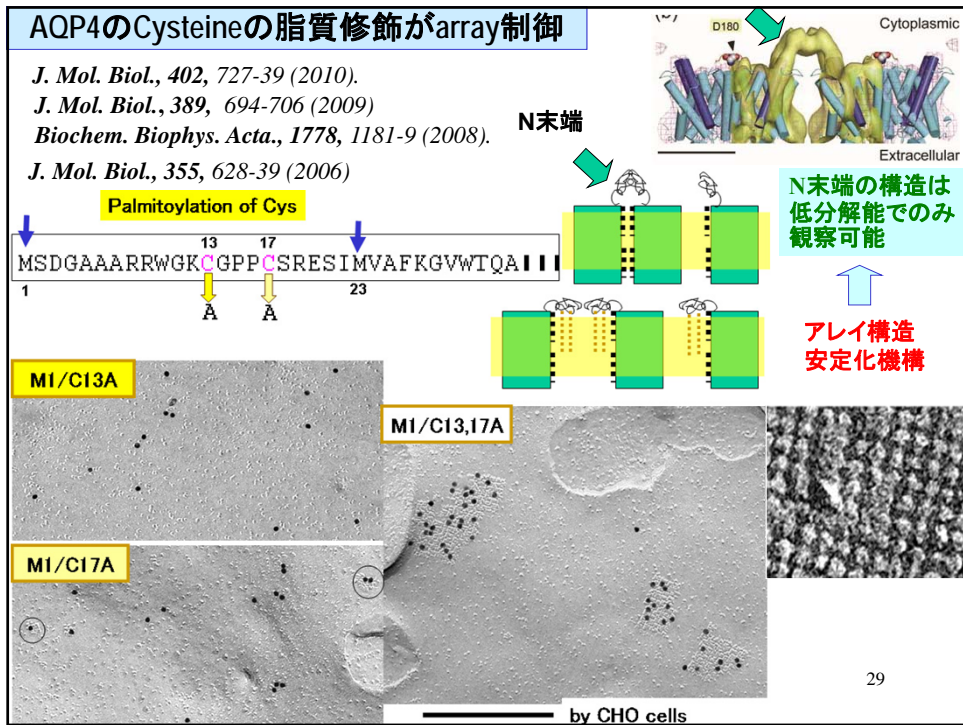
2次元結晶はarray構造を表現



JMB, 355, 628-639 (2006)

by Y Hiroaki et al





脳が多機能性水チャネル, AQP4

1) 速く高い水選択性チャネル
 2) 細胞接着機能
 3) 脂質分子:PEとの直接結合
 4) arrayの形成と制御
 5) PDZ domainとの結合
 6) dopamineによるgating?
 7) multiple sclerosis, neuromyelitis optica(視神経脊髄炎) and manic depression (bipolar disorder, mesial temporal lobe epilepsy)
 8) 細胞分化との関連?

Weak adhesion
Lipid modification

**視神経脊髄炎
インフルエンザ脳症
脳浮腫**

AQP4 binds with lipid molecules

M. Zelenina et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol., 283, F309-F318 (2002)

Ser180Asp
phosphorization

J. Mol. Biol., 402, 727-39 (2010).
J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009)
BBA, 1778, 1181-9 (2008).
J. Mol. Biol., 355, 628-39 (2006)

31

Gushing water model-2: Hypothetical

Heberle J et al., (1994) Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature* 370: 379-382.

Array of AQP4
Pia
Astrocyte
Lumen

Slow
Fast
Proton channel or Pump
H⁺


Cerebrum
Cerebellum

Stellate cell
 Ascending branch of granule cell axon
 Basket cell
 Granule cells
 Mossy fiber
 Purkinje cell
 Parallel fiber
 Golgi cell
 Molecular layer
 Granular layer
 Medullary layer
 Recurrent collaterals
 Climbing fiber

新しい生理学概念; Adhennels;

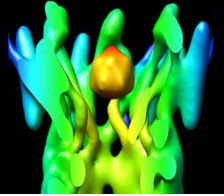
Multifunctional cell adhesive channels concatenating

Ashura



Gap Junction channels

Cardiac development, fertility, the immune system, electrical signalling



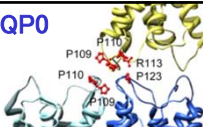
PNAS, 104, 10034-10039 (2007)

GOAL

個性や能力の形成機構を分子レベルから理解したい

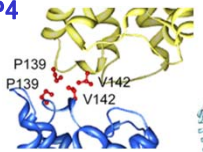
氏より育ち

AQP0



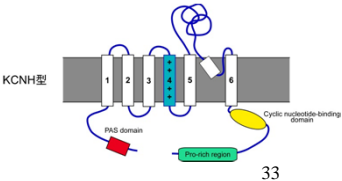
Nature, 438, 633-638 (2005)

AQP4



JMB, 355, 628-639 (2006)
JMB, 389, 694-706 (2009)
JMB, 402, 727-739 (2010)

10¹¹ neural cells, 10¹⁵ synapses

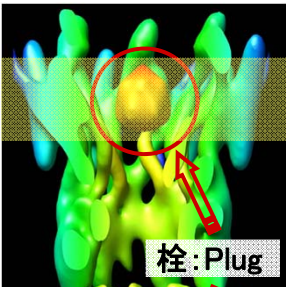


Adhesive Ion channel X

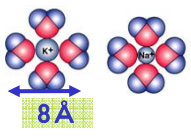
Cx26M34A mutantの解析

by A Oshima

PNAS, 104, 10034-10039 (2007)



栓: Plug

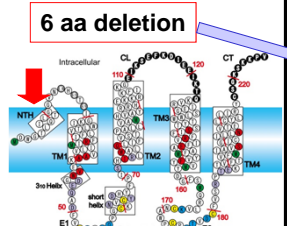
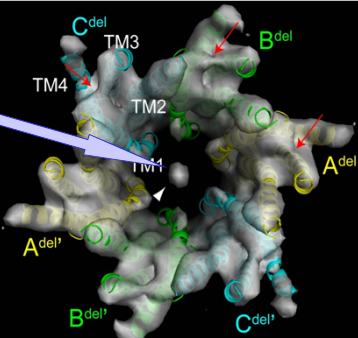


8 Å

Constrictions are narrower than 8 Å

Plugモデル提案

6 aa deletion

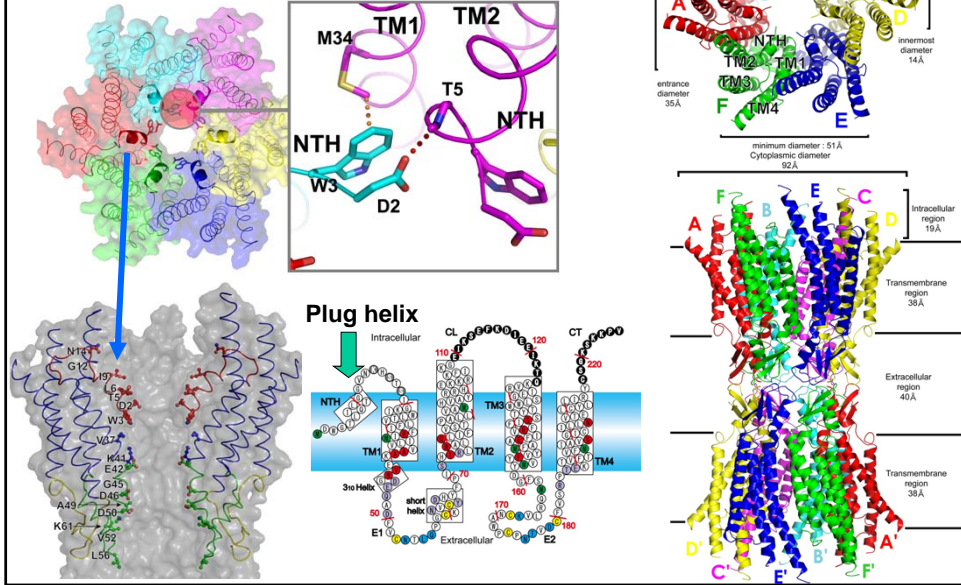



J. Mol. Biol., 405, 724-35 (2011)

Cx26のX-rayによる構造解析

Nature, 458, 597-602 (2009)

by S Maeda

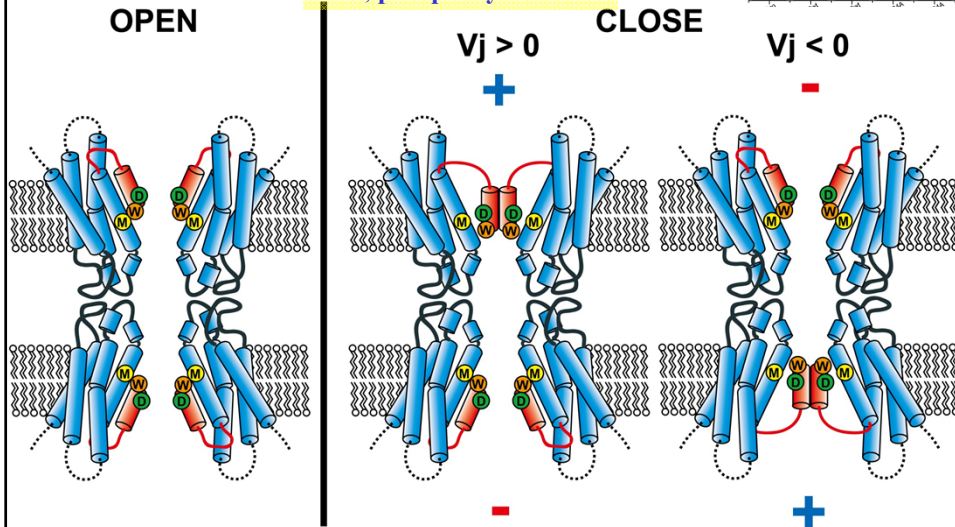
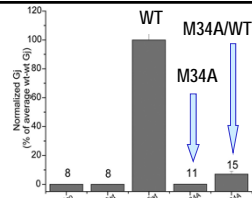


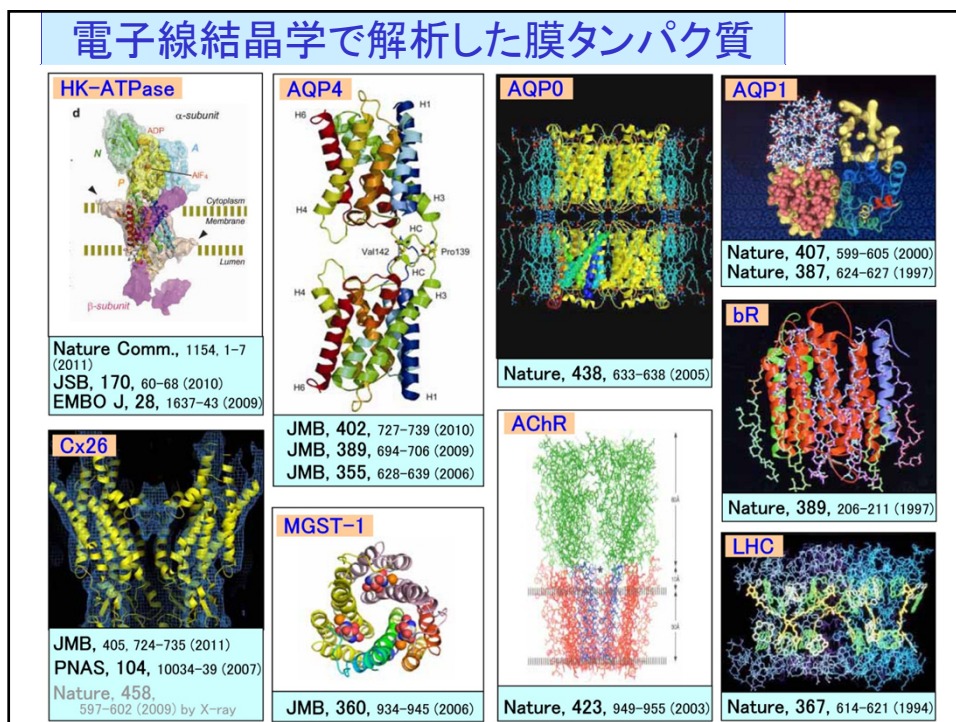
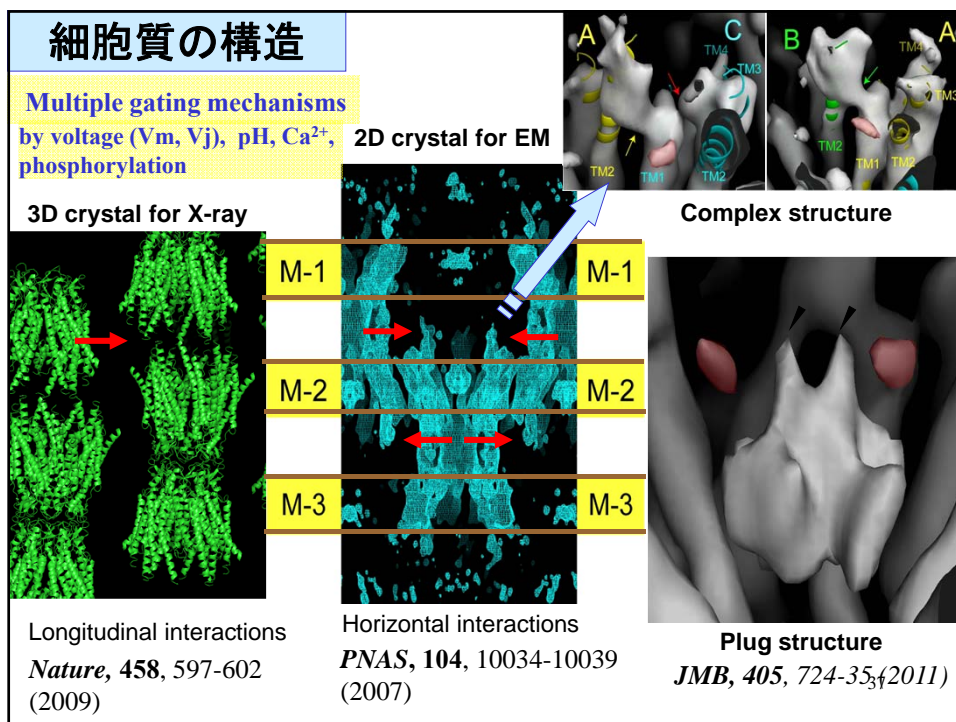
Gating by transjunctional voltage, V_j

Nature, 458, 597-602 (2009)

Multiple gating mechanisms

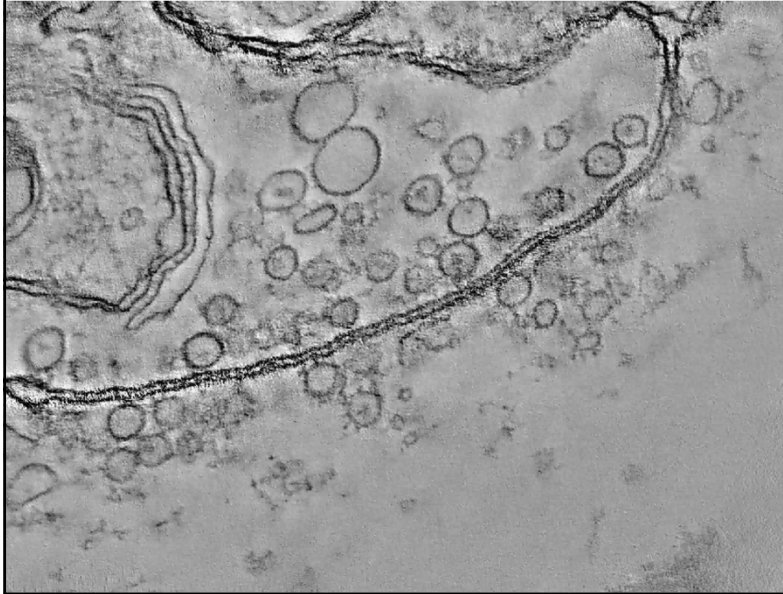
by voltage (V_m , V_j), pH, Ca^{2+} , phosphorylation



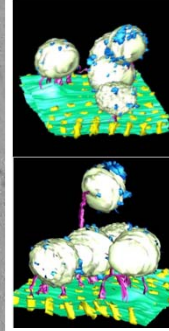


Electron tomography of innexin-gap junction of crayfish

J. Struct. Biol., 175, 49-61 (2011)



トモグラフィー
による立体構
造: 染色



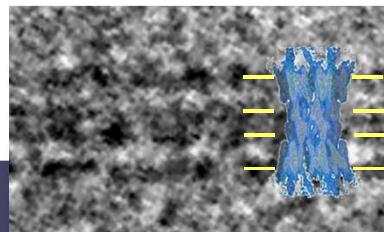
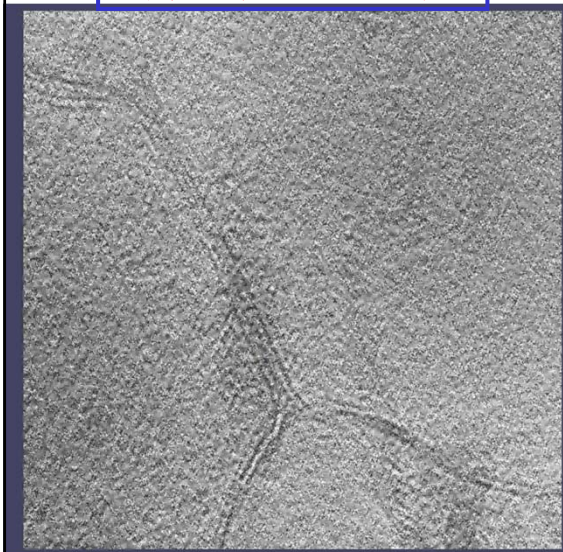
39

Tomography of GJ

Gap Junction from rat Brain

Slice image of cryo-tomography

脂質2重膜を分離して観察



G7極低温電顕



