

分子システムラボ

(Molecular System Lab.)

研究項目：神経・チャンネル機構の分子システム論的研究

研究期間：平成9年度～13年度

1. 当該研究の背景

ヒューマンゲノムプロジェクトの進展は人間の遺伝子の全配列を近日中に決定するところまで来た。しかし、この遺伝子が作成し、生体内の機能分子として実際に働く本体であるタンパク質はそのアミノ酸配列からだけでは極めて少ない情報しか判らない。その最も大きな理由はタンパク質の立体構造がアミノ酸配列からは判らないことが挙げられる。これまではタンパク質立体構造の解明は結晶作成を必要とした。すなわち、タンパク質の結晶化は場合によっては難しく、タンパク質の構造解明が遅々として進まなかった。本研究はイオンチャンネルを材料として用い、結晶を作成せずに電子顕微鏡によって立体構造を解明する技術を開発し生命現象を解明することを目的とする。

本研究では材料として結晶をつくらず、かつ最も面白いタンパク質の一つを選択した。それは細胞の膜上に存在する物質を通す穴の一種である電圧感受性Naチャンネルである。我々は車を運転している時でも、スポーツをしている時でも、目から入っている情報に対して数ミリ秒単位の反応を頻繁に行っている。それを可能にしているのが、神経細胞に存在するチャンネルである。このチャンネルは細長い形状の神経細胞の表面を包む細胞膜中に存在している。細胞を取り囲む細胞膜は通常イオンなどの親水的な物質を通さない。それに対してチャンネルは親水的な物質を通す働きがある。特にイオンチャンネルは電荷を帯びた特定のイオンのみを通す。時には、急激に一種類のイオンのみを通すことで細胞膜の興奮状態を引き起こす。この状態は、通常我々が神経が興奮していると呼んでいる状態である。特に電圧感受性イオンチャンネルは隣が開くと自分自身も開く性質がある。そのことで次から次へと細長い神経細胞上において刺激を伝達する。これが、人間の神経での情報伝達である。その速度が十

分に早いと、痛みや感覚はあっという間に脳に伝わり、さらにそこからの素早い反応が可能になる。この機構のため人間の神経における情報伝達は、電気回路上の電流に例えられ、あたかも電気を伝える電線の様に働いている印象を受ける。しかし、実際には、これまでに述べたように興奮が細胞の外から内へのプラスイオンの流れという形で伝わって行くのである。その結果、後に述べるような短期的な情報(記憶)の蓄積が可能となる。

電圧感受性イオンチャンネルの隣が開くと自分自身が開くという機構は、実際には近くのチャンネルが開いたことによる正イオンの流入による膜の内外の電位差、即ち電圧を感受することにより行う。この時の開く速度はマイクロ秒の世界である。実際には、次から次へと情報は押し寄せて来るのであるから、当然、一度開いた電圧感受性Naチャンネルは直ちに閉じて前の状態に戻り次の刺激に備えなければならない。これも速やかに起こり、実際一度開いたチャンネルは1ミリ秒後には閉じる。さらには、近年の研究から、この電圧感受性チャンネルは、もっと高度な神経の活動に関与しており、記憶の機構と考えられる神経の可塑性と深い関わりを持つことがUSAのカンデル等によって解明されてきた。少なくとも比較的神経組織が単純な生物の短期的な記憶に関しては、電圧感受性イオンチャンネルの燐酸化がその実態であることが知られている。ここでリン酸化されたあるグループの電圧感受性Kチャンネルは興奮が来ても開かなくなり、共に情報伝達に働くNaチャンネルやKチャンネルとのバランスが取れなくなり、そこからの次の神経細胞への情報伝達は過剰になる。

このように、イオンチャンネルはタンパク質分子として非常に魅力的な分子である。実際、その分子の存在の理論的予測、測定法の開発等はノーベル賞をはじめとする様々な賞に輝いている。そのため、遺伝情報を具体的に現すタンパク質の構造の研究系としては

申し分なく思われるが、その構造研究は極めて難しい。と言うのは細胞膜から取り出すと、極めて壊れ易い柔らかい機械であるためである。特に、その中の電圧感受性チャンネルはその素早い動きを可能にするためにより柔軟な構造をとっているのか、生化学的な扱いが難しい。さらに結晶化の成功例が無い。そのため、これまでにその構造を見たものはいない。

2. これまでの研究経過と現状

この電圧感受性チャンネルは、通すイオンの種類からK, Na, Caの3種類に分けられる。では、最初にこのチャンネルの構造研究、ひいてはタンパク質の構造研究にどのような意味があり、その構造研究アプローチにどのような方法があるのかを説明したい。

タンパク質というものは全てアミノ酸が数珠状につながった紐からできている。遺伝子から合成された直後はただの紐であるが、それがアミノ酸の構成によって様々の立体構造をとり、機能を果たす形態へと変化する。

電圧感受性チャンネル3種はシナプスで協調して働き、さらに皆似たアミノ酸配列をもっている。そのアミノ酸の疎水性親水性から判断したチャンネルタンパク質の細胞膜貫通の様子では、少なくとも24回の膜貫通部位を持っていることがわかる。そのため、これらは似た構造と開閉の機構を持っていることが考えられる。

遺伝子操作技術の進歩から、そのアミノ酸配列を一部変化させることが可能になった。正確には、労力は要るが方法論的には完全に確立された。電圧感受性チャンネルはこの様なアミノ酸改変が最も集中的に行われた系と言え、世界中の恐らく100を超える研究室で集中的に行われていると思われる。しかし、そこからの結果は一つの変化がその分子機械全体の挙動を遠大に変えることを示唆するだけであった。どうやら、一つ一つのアミノ酸が全体の構造と機能を大きく変えてしまう場合が頻繁に起こるらしい。ところが構造情報が全く無い現状ではこれらの情報から約2000個のアミノ酸からなるそのマシンとしての機構の解明は不可能に近い。構造情報が得られれば、これまでの膨大な世界中での労力の積み重ねが一気に機構と結びつく。

ではその構造研究にはどのような方法が可能であろうか。以前からNaチャンネルの大きさは、タンパク質の平均密度から球状ならば直径100オングストローム位と考えられていた。もちろん、この大きさなら結晶に対するX線解析が理想であるが、前述の様に現状では結晶作成は非常に困難である。一見分解能だけ考えるならば、この100オングストロームという大きさは電子顕微鏡に向きそうである。しかし、タンパク質は極めて電子線照射に弱い。さらに、実際の電子顕微鏡写真はカーボンベース上で重金属の染色を行っているため、ノイズが多い。そのため、タンパク質分子自身が見える倍率では、短い照射時間のためシグナルが弱く、かつノイズだらけである。これでは普通の大きさのタンパク質の形態を議論するのは無理である。これが最近までは一般的な考えであった。タンパク質の構造は、結晶の作成が成功してから研究しようというのが普通であった。しかし、結晶の作成が可能なタンパク質は限られており、特に膜タンパク質ではむしろ結晶作成が成功したものの方がはるかに少数である。むしろもう一步踏み込んで、結晶が簡単につくれる膜タンパク質は例外的な存在であるとさえ言える。

ところが近年、この積年の問題を部分的に解決する技術が登場した。それが単分子解析である。ノイズだらけの生の電子顕微鏡写真だけでは分子の輪郭すら定かではない。しかし、ノイズはさまざまの場所についているので、元画像が同じ物を判別できれば、平均化によってノイズを平均化し、画像の分解能を上げることが可能である。これを実現するために画像解析技術を駆使して像の分類を可能にし、さらに、ある一つの画像が3次的にどこから見えているかを分類し、さまざまな角度からの像を重ね合わせることによって3次元構造を分析する方法である。最終像は同一方向からの画像を数百枚以上という単位で重ね合わせて平均化することで飛躍的にノイズが減り、タンパク質内の構造が見えるところまで分解能が向上する。

この様な方法はこれまでは主にタンパク質としてはかなり巨大な物に用いられてきた。しかし、ここではこれを小さなNaチャンネルで試みた。さらにNaチャンネルの分子自体の特色は、アミノ酸の他に平均で約30%の糖鎖が結合している点にある。平均でという意味は、かなり糖の長さや形態には分子ごとのばらつきがあるという意味である。Naチャンネルはそれ程糖の含

有量が多く、そのため形態的なばらつきが多い。このようなタンパク質で、この分析が成功した例は今までにない。そのため今回の成功は電圧感受性チャンネルの構造の発見の他に、単分子解析の適用範囲の拡大という意味をも有する。

その方法として電子顕微鏡として世界最高性能の液体He ステージタイプのもを用いた。これは、世界でも初めての試みである。液体He ステージタイプの電子顕微鏡像はその2Kの低温によって電子線照射量を常温の20倍増やすことができる。そのため高電圧下で高分解の像が得られるがコントラストが極めて小さい。平成12年度にはこの問題であった低コントラストでも重ね合わせる条件の開発に成功した。我々はその像の重ね合わせ像から電圧感受性チャンネルの3次元構造の解明に成功し、高分解能単分子解析法への新たな道を拓いた。その結果として、タンパク質の内部構造が見える一桁代のオングストロームの高分解能を得ることができた。

本研究は伊藤ハムおよび興和総合科学研究所、京都大学およびパーゼル大学等との共同研究によって初めて可能となったものである。

3. 研究が及ぼす社会的効果

応用的な側面もこの電圧感受性チャンネルタンパク質は大きい。神経症、筋肉症に対する薬としてこのチャンネルに対する薬は多く開発されている。しかし、構造情報の欠如からこれらの薬の結合部位さえわかっていない。これらの抗電圧感受性チャンネル薬の問題点として、副作用が大きいことが挙げられる。やはり、その理由の一つに薬が結合する相手の構造がわかっていないことが挙げられる。本研究を突破口にした構造研究によってその薬の結合部位の構造が判明すれば、副作用の小さな薬の開発に大きく貢献することが期待される。また、本研究の直接のターゲットであるNaチャンネルはその突然変異が先天性の筋肉症へとつながる例が多く知られている。痙攣や麻痺などが知られており、さらに心筋で働くNaチャンネルに関するものでは突然死の確率が高くなるものも知られている。さらにNaチャンネルは多くの麻酔薬の作用する相手である。その構造研究はこれらの遺伝病の問題の解決、さらには直接安全な麻酔薬の開発へとつながる。

4. 今後の研究展開の方向

これまでの欧米を中心とした単分子解析技術の進展は現在、分子内の一部の構造に変異があることをalphaB-Crystallinで捉えるところまで進んでいるが、未だ分子間相互作用の多状態を捉えるところまでは行っていない。

ここでは世界で初めてのNaチャンネルでの単分子解析法による電圧感受性チャンネルの構造を示した。さらに近年の我々の液体He ステージタイプの電子顕微鏡像での重ね合わせの成功は、単分子解析の世界記録を更新し高分解能単分子解析法への新たな道を拓いた。今後、サンプル数の増加によって5オングストローム程度の極めて良好な結晶並の分解能への向上が見込まれる。さらに本タンパク質を用いて分子の多状態を捉え、動的な機構の解明が期待される。

近年のバイオ研究においては遺伝子の技術も含めた生化学が急速に進歩し、これまでになかった様な機能を持つタンパク質が発見された。さらに、これまで難しく全く扱えなかったタンパク質が扱え、大量に精製できるようになった。その構造研究による機構解明が、基礎科学はもちろんのこと、臨床薬の開発も含めて高く注目を集めるようになってきている。単分子解析法とNaチャンネルの組み合わせは、単分子解析法が如何に柔らかくもろいタンパク質の構造解明に有効かを示した。単分子解析法による研究は、今後さらに増加していくことが確実な、扱いが難しいが故に解明が遅れていたタンパク質の解明に、日々重要性を増してゆくと思われる。実際そのようなタンパク質に創薬に重要なものが極めて多いのである。

参考文献

- 1) Sato, C., Sato, M., Iwasaki, A., Doi, T. and Engel, A. The Na⁺ channel has four domains surrounding a channel, *J. Struct. Biol.*, 121,314-325 (1998).
- 2) Sato, C., and Matsumoto, G. : Sodium channel functioning based on an octagonal structure model, *J. Membrane Biol.*, 147, 45-70 (1995).
- 3) M. Kanzaki, M. Nagasawa, I. Kojima, C. Sato, K. Naruse, M. Sokabe, H. Iida : Molecular identification of Eukaryotic stretch-activated Nonselective cation channel, *Science* 285, 882-886 (1999)

当該研究担当者等

1) ラボ構成員(総数5名)

職員(5名) 佐藤主税* (超分子部), 上野 豊, 浅井 潔 (知能情報部), 近藤哲朗 (超分子部), 守谷哲郎 (大阪 LERC)

2) その他の研究協力者

佐藤雅彦 (伊藤ハム中央研究所), 岩崎昭夫 (興和総合科学研究所), 土肥 武 (興和総合科学研究所), Andreas Enge (Basel大学・スイス), M. Chahine (Laval大学・カナダ), 藤吉好則 (京都大学)

* ラボリーダー