

電圧感受性Naチャンネルの3次元構造

3D structure map of the voltage sensitive sodium channel

脳神経情報研究部門
Neuroscience Research Institute

概 要

我々は、アマゾン河の電気うなぎのNaチャンネルを可溶化し、極超低温のHeステージ電子顕微鏡と単粒子解析法を用いて解析した。チャンネルは高さ135Åの鐘に似た形であった。その内部にはいくつかの空洞が観察され、それが細胞外の4つの小さな穴と細胞内の8つの大きな穴につながっている。これらの孔の存在は電圧感受やチャンネルの開閉などの様々な機構を我々に想像させる。また電圧感受性CaチャンネルやKチャンネルは、それぞれ細胞の分泌および膜電位を担っている。その中でもKチャンネルは神経可塑性をも担っていることが海産無脊椎動物アメフラシを用いて示された¹⁾。これらのチャンネルはNaチャンネルとアミノ酸配列上の非常に高い類似性があるため、今回判明した構造と深く関連した立体構造を持つ可能性が高い。

Abstract

The voltage gated sodium channel generates the action potential. This 300 kDa protein has four homologous regions. We isolated sodium channels from *Electrophorus electricus* electroplax by detergent solubilization and immunoaffinity chromatography and studied their structure by the combination of He-stage cryo-electron microscope and single particle analysis at 19 Å resolution. The channel had a bell shaped outer surface of 135 Å heights and 100 Å in side length at the square shaped bottom.

1. まえがき

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イオンチャンネルである。神経細胞は細長い袋状の形をしている。このチャンネルはその袋の部分に相当する細胞膜中に組み込まれて存在する。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。例えばNaイオンチャンネルは、電荷を帯びた特定のNaイオンのみを通す。そして急激に1種類のNa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接したイオンチャンネル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ため、

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。

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て生じる正イオン流入による膜の内外の電位差変化、即ち電圧を感受することにより行われる。この時の開く速度はミリ秒以下の世界である。電圧感受性チャンネルにはNaチャンネル、Kチャンネル、Caチャンネルの3種類が存在する。生きている高等生物の神経細胞内では電気信号を増幅し、伝達し、そして電気信号を新たにつくるために、これらの3種類が協調して働く。その中のNaおよびCaチャンネルは細胞の興奮、神経伝達、筋肉収縮などの多くの機能に深く関係しており、それらは直接人間の病気を引き起こす機構とも深く関わっている。Naチャンネルは分子量300kDaの膜蛋白質であり、神経情報の伝導、増幅を担う。同時に多くの種類の神経毒や、麻酔薬の標的の一つでもある。さらには、近年の研究から、これら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判明してきた¹⁾。共に協調的に情報伝達に働くNaチャンネル、Kチャンネル、Caチャンネルの中で、ある情報によってKチャンネルの状態が変わる。そのため相互の機能のバランスが取れなくなることから、そこからの次の神経細胞への情報伝達物質量が変化する。そして、その変化はリン酸化という形で持続される。

50年以上前のHodgkinとHuxley等によるイオンチャンネルの存在の予言以来、これまで様々な方法がNaチャンネルの構造に関連する情報を得るために用いられてきた。その分子の機能の分子内での大まかな配置と膜貫通の様子は、部位特異的突然変異や抗ペプチド抗体による結合実験により調べられた。部分合成ペプチドから自己形成されたIII-IVリンカー部の構造はNMRで解明された。しかし、その構造はNaチャンネル全体の2.6%の配列により形成されたものに過ぎない。

これに対して我々は、3年前にNaチャンネル全体の構造を初めて電子顕微鏡による負染色像の単粒子解析により低分解能ではあるが決定した²⁾。また電圧感受性チャンネル以外では、バクテリアのKチャンネルKcsAのC末端20%の部分欠失タンパク質の構造がX線結晶学によって解明され³⁾、その2回膜貫通型チャンネルの構造からイオン選択性がどのようにして生じているかが判明した。しかし、電圧感受開閉のメカニズムは未だ謎である。その理解には電圧を感受する6回膜貫通の基本単位を持つチャンネルの全分子の構造解明が不可欠である。

2. 電圧感受性チャンネルの構造

ここでは電圧感受性Naチャンネル分子を電気うなぎの発電器官から免疫吸着クロマトグラフィーによって精製した²⁾。Heステージ電子顕微鏡を用いて薄いバッファー層に凍った状態でタンパク質粒子を閉じ込め、その投影像を無染色で撮影した⁴⁾。その生画像では、元々タンパク質と水との密度差は大きくなくコントラストが低い上に、20%のグリセロールと2MのMgCl₂の存在のせいで背景の密度が上昇し、そのS/N比が低くなっている(図1)。このS/N比を改善するために、薄い凍結溶媒層中でのチャンネル分子の向き、すなわち分子の投影の方向が似た3次元投影方向の画像同士を重ね合わせた(図1、2段目)。分子の投影方向によって、正方形やくさび型に近い投影像が観察される。正方形型の投影像は、密度があ

る程度高い部分を中心に有し、さらにその中にもかすかな低密度部分を有する(図1 a、1と2段目)。くさび型の投影像はさらにバリエーションに富んでおり、周辺および中心に高密度部部分があり、それらは様々な分布パターンを示す(図1 b-d、1と2段目)。

単粒子解析を行うために、我々は電子顕微鏡像をBespaプログラムで表示させながらバックグラウンド以上と認識できる全ての粒子を手動で切り出し、さらにはImagic V programを使って画像解析を行った。拾い上げた全11,991個の粒子は参照画像を使わない方法で回転移動と平行移動を行い、その位置合

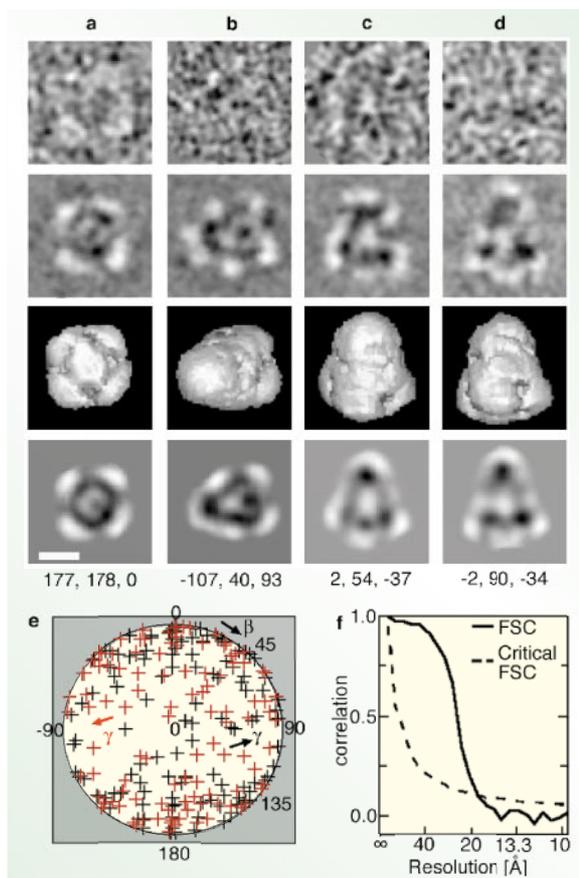


図1 液体Heステージ電子顕微鏡により得られたNaチャンネルの画像とその分解能曲線

a-d:異なったオイラー角での元画像(第1段目)とその2次元平均化像(第2段目)さらには3次元構造での表面構造(第3段目)と3次元構造からの相当する角度への再投影像(第4段目)。e:11,991枚の画像から得られた240のクラス平均像のオイラー角分布。各クラス平均は β と γ の座標系の中の十字で表わされ、さらに球の裏側のものは赤で示した。f:FSC(Fourier shell correlation function)による3次元分解能。交差点は19Åの分解能を示す。スケールバーは50Å。(Nature 409, 1047-1051より転載)

わせを行った。重なり方向に関して位置の合った画像をさらに240のclassに分類し、クラス内で重ねあわせて平均化した。得られた240枚の平均化画像は、再び参照画像として元画像の位置合わせに用いられ、さらに新たな240枚の改善された平均化画像を生み出す。このようなサイクルを10回ほど繰り返した。さらにBespaプログラムによって電子顕微鏡画像のCTFを補正した後、同様にして位置合わせ、重ねあわせによる参照画像の生成が計8回繰り返された。その結果ではチャンネルの軸方向に向かったの投影像は疑似4対称の形をしている(図1 a、2段目)。したがって3次元構造再構成のための2次元画像の初期オイラー角決定は、チャンネル分子が4対称の形であることを仮定した。さらに得られた3次元構造を最適化するために、再投影像を対照として用い、4対称条件を外してオイラー角の微調整を行った。得られた3次元構造から再投影像を作成して、元画像との重ねあわせによる平均化を行いその結果から新たな3次元構造が構築された。ここではこのような画像重ねあわせ、3次元再構成を、構造が安定化するまで繰り返した。

240枚の最終平均化像のオイラー角分布を示したのが図1 eである。その結果、かなり様々の角度の像があり、よく3次元構造全体をカバーしていると言える。データを2つに割ってそれぞれ独自に3次元構造を再構成し、その比較から得られた3次元分解能の結果はおおよそ19Åであった(図1 f)。

再構成により得られた3次元表面構造を図1、3段目に示す。それぞれの表示オイラー角は2段目の2次元平均化像と同じであり、下に示した。さらに4段目は形成された3次元構造からの同じオイラー角への再投影像である。その結果は2段目の実験平均と良く似ている。ここで表面構造を作成するに当たって採用した閾値(しきい値)は、Naチャンネルのペプチド部分の重さの約150%にあたる体積に相当する。この値は糖鎖の全重量を考えると小さい。そのため糖鎖の一部が、その分子ごとの不均一さ、3次元的な動きによって平均化構造では失われていると考えている。ここでの表面構造は密度分布におけるある値の層をつないで作成している。この閾値では、外殻にあたる部分に4つの小さな穴と4つの明確な大きめの穴が開いているのが見える(図1 a-d、3段目)。図2は広いオイラー角に渡ってのチャンネル表面構造である。これらの結果からNaチャンネルはおおよそ底面が4角形よりなる鐘状の形をしており、頂上は半

球に似たすばまった形であることが分かった。

さらに細かくその側表面を見ると(図1 b-d、3段目、図2)おおよそ30Åの幅に渡って穴の空いていない水平なバンド部分が存在することがわかる。この部分は膜貫通領域に相当すると思われる(図2、白いライン)。膜をはさんで各部分の体積計算を行うと、この閾値においては膜の上部の相対体積が24%、膜貫通部が29%、膜の下部が47%と計算される。この膜内外の比率はアミノ酸配列から予測される細胞内外の比率結果(図3 a)と良く一致する。そのため切れ目の無い半球状の上側を細胞外側、明快な4つの穴が4つの不均等なドメインに分けている下側を細胞質側と我々は仮定した(図2 d-f、i)。これら4つのドメインの体積は、左上から時計周りに27、26、25、22%である。

次にNaチャンネルの内部構造を示すために3次元密度マップの断面を図3 b-gに示した。図2で仮定した細胞の外部、内部、細胞膜貫通部はそれぞれ異なった内部構造を有する(図3 b-d)。細胞質側の構造体は低密度領域である一つの中心空洞と4つの周辺空洞

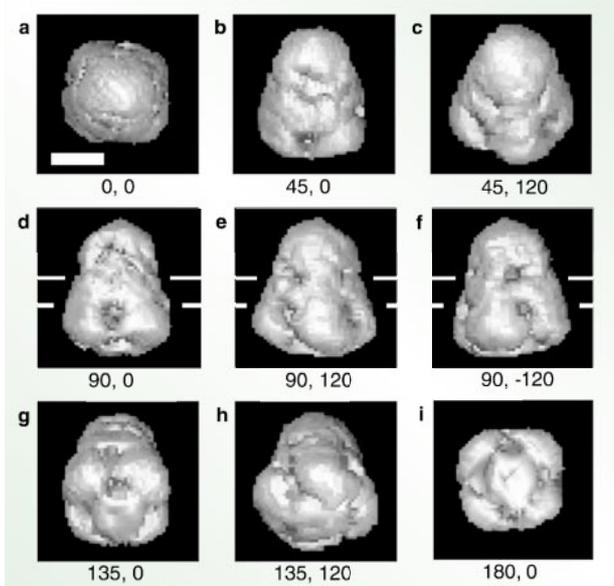


図2 Naチャンネルの表面構造

a: 上から見た図。b: 斜め上から見た図。aから水平軸に対して45度回した。c: bとくらべて垂直軸に対して120度回したもの。d-f: 横から見た図。相互の角度が垂直軸を中心に120度離れている。g: 下から見上げた図。dから水平軸に対して45度回した。h: gとくらべて垂直軸に対して120度回したもの。i: 下から見た図。オイラー角 α は0であり β と γ は下に表示した。白い横棒は膜貫通部位を示す。スケールバーは50。(Nature 409, 1047-1051より転載)

を取り囲む(図3 b-e)、周辺空洞の高さと幅はおよそ15Å程度であり、大きな細胞質側開口部へとつながっている(図2)。細胞外の4つの小さな穴(図1-3)は膜貫通部近くで外殻を貫通しており、その内部の大きな空洞を細胞外液へとつないでいる。

細胞の内側と外側の大きな空洞はその間をつなぐ4つの狭い通路状の低密度領域によってつながれている(図3 e-g)。この細長い空洞はチャンネルの軸を中心として上の断面図(図3 g)と下の断面図(図3 e)では約45度回転しており、ねじれていることがわかる。さらにこの低密度領域には図3 b-dで矢印で示されるように、膜貫通部位内に極端に狭い部分が存在する。また、チャンネル分子の中心部には細長く密度の高い、外殻構造から離れた中心構造が見られる。高

さ約40Å、直径35Åであり、KcsAチャンネルの中心の穴を形成している構造よりも若干小さい³⁾。

さらに分子が細胞外に構造のどちら側を向いているかの仮定を検証するために、C末端の配列(1802-1820残基)に対する抗体を作成して²⁾結合実験を行った。抗体と結合したNaチャンネルは、負染色では角度によっては図4 a、bに示されるようにY字の形の抗体が結合して見え、その際のチャンネル本体の角度は様々である。抗体の結合部位を特定するために、チャンネルの底部をカーボン膜に付けて染色されたものと側部をつけたものに関して、似通ったチャンネル像を重ねあわせ平均化したのが図4 c、eである。その際、Naチャンネルのみでの結果²⁾を参照画像(図4 d、f)として用いた。上向き像(図4 c)の下の角と、

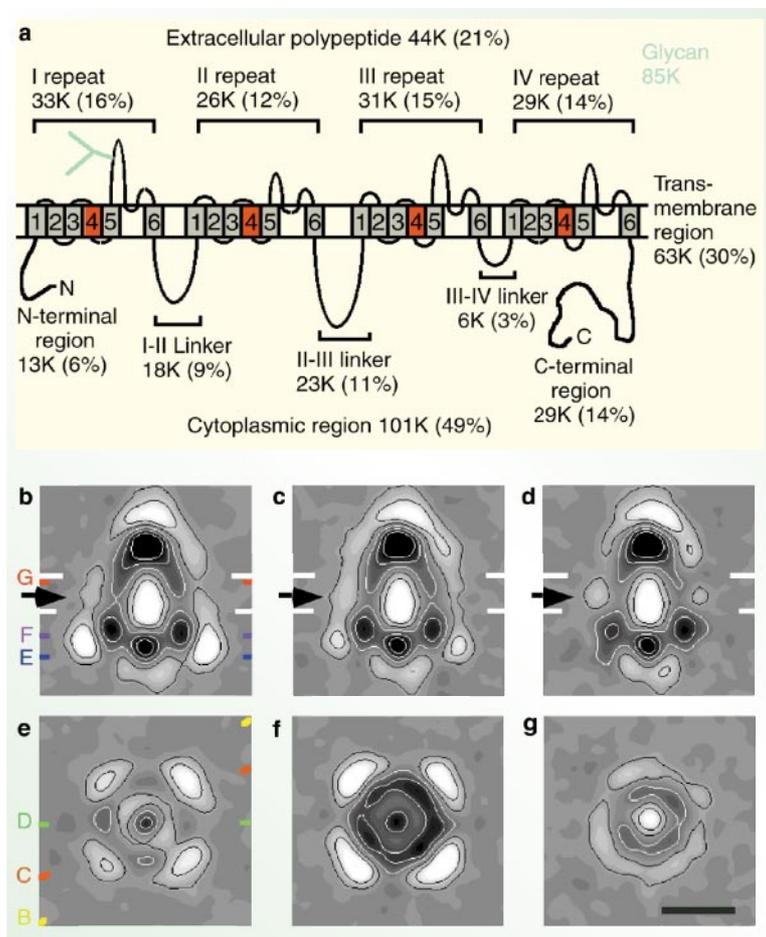


図3 Naチャンネル構造における各ドメインと内部空間、アミノ酸配列から予想された膜貫通の様子

a: Naチャンネルを構成するアミノ酸の疎水性、親水性から推定されたNaチャンネルの膜貫通の様子5-15。その配列は4つの疑似繰り返し単位からなり、それぞれの単位が最低6回の膜貫通部位を持つと考えられている。S4は赤で示した。b-d: 縦の断面図。b: 水平断面図eのBの黄色対角線に沿った切片。c: 図b同様に図eのCの赤ラインでの切片。d: 図b同様に図eのDの緑ラインでの切片。e-g: 水平方向の断面図。断面の場所は図bにそれぞれ青(E)、紫(F)、赤(G)でそれぞれ示してある。白い横棒は膜貫通部位を示す。黒矢印は膜貫通部位内での細胞質と細胞外の空洞の連絡通路が狭まっている位置を示す。スケールバーは50Å。(Nature 409, 1047-1051より転載)

横向き像(図4e)の大きい方の底面左下の角、それぞれに関して抗体のFabの先端と思われる密度が観察された。両画像でFabは結合点から遠ざかるにつれてぼけて行くので、Fabの他端は動くことが可能なので

あろう。よって抗体の結合点はかなり柔軟な構造を有すると考えられる。すでにC末端は細胞質側にあることが判明しているので、大きな4角形の底面は細胞質側にあることが確かめられた。

3. 考察

電圧感受性Kチャンネルは4量体であるのに対して、NaチャンネルとCaチャンネルは内部に疑似4回繰り返し配列を持つ単量体として機能することが知られている。チャンネル種を超えて、それらの膜貫通部位とS5とS6のリンカー部分は良く保存されており、これらのチャンネルが共通の構造を有することを示唆している。また、KcsAの部分構造を今回のNaチャンネルの構造と比較すると、中心部の顕著な細長い構造(図3b-d)はKcsAの中心孔を形成する部分に相当するのかもしれない。電圧感受性Kチャンネルの第6膜貫通部位(S6)とS5とS6のリンカーはKcsAチャンネルとある程度のアミノ酸配列の類似性を有する事実³⁾は、この考え方を支持する。しかし、KcsAで見られた中心部の孔も膜貫通部の中心の空洞も今回の分解能19Åの構造では観察されなかった。以前の負染色によるNaチャンネルの平均化像では4回対称軸上で低密度部分(図4)が観察された。その結果は、一般にUranyl塩は分子内の親水性の孔には入り込みやすい事実を基に、現在のクライオ電子顕微鏡から得られた構造を用いて十分解釈可能である。今回のクライオ像は1.185g/mlという密度の高いバッファーを用いたことで粒子周辺のバックグラウンドが高い。これに比べ、負染色の結果は染色時のカーボン膜上での乾燥による変形、染色の偏り、分解能の低下という要因を常に含み、ここでの負染色像とクライオ像のわずかな違いを容易に説明する。

今回見つかったNaチャンネル分子内の空間や表面の孔は極めて新規で、同時にこの分子に特徴的な構造である。そのため、この構造は電圧感受や開閉の機構に関与している可能性が高いと思われる。これとは対照的に、アセチルコリン受容体チャンネルは、たった一つのロート状の入り口を細胞外部に有する。Naチャンネルのシステインによるscan mutagenesisと親水性のシステインへの作用薬の組み合わせにより、IVリピートの膜貫通予想領域S4(図3a)の中で真に疎水環境にある基は、わずか2~5アミノ酸基であることが判明した。この結果は今回の構造での分子内の空洞による親水性内部環境と良く一致する。一般に電圧感受性チャンネルは膜貫通領域と思

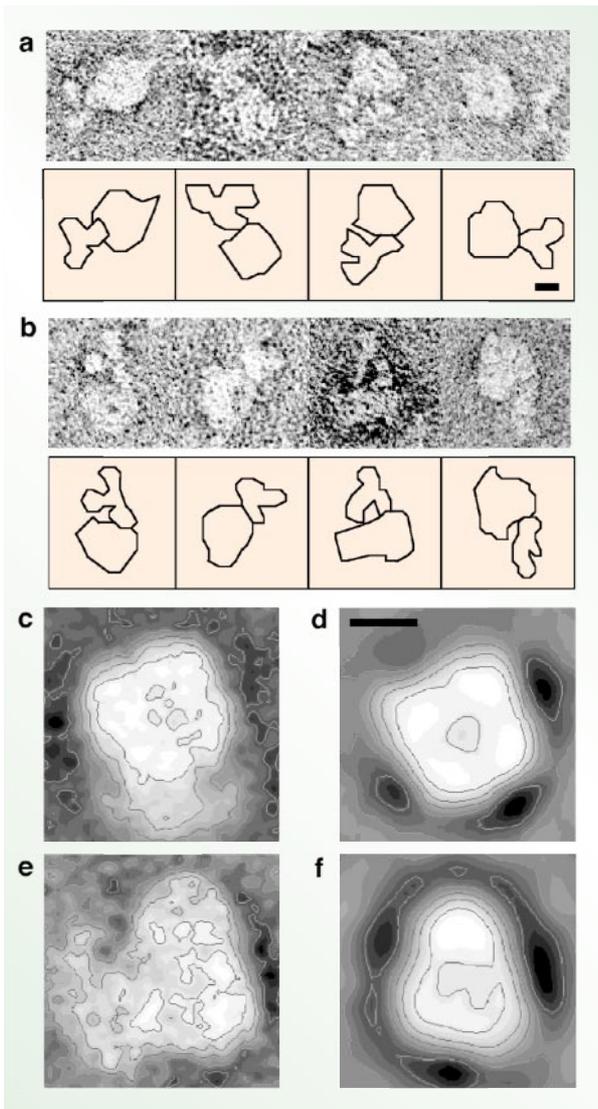


図4 Naチャンネルと抗C末端抗体の複合体の負染色電子顕微鏡像とその平均化像

a, b Y字型のものが抗体であり、それが結合しているベル状のものがNaチャンネルである。a: Naチャンネルをほぼ上方から見た図。b: ほぼ側方から見た図。輪郭線は抗体とNaチャンネルの輪郭を示す。c, e: Naチャンネル抗体複合体の平均化像。c: 上からの像に等高線を入れ込んだ図。142枚の画像重ねあわせ。e: 横からの像(76枚)。d, f: Naチャンネルのみの平均化像。d: 上からの像(196枚)。f: 横からの像(132枚)。タンパクは白く浮き上がるように表示した。スケールバーは50。(Nature 409, 1047-1051より転載)

われる部分に多数の親水性基を良く保存しているという風変わりな特徴を有する。例えば電気うなぎNaチャンネル膜貫通部位では正チャージの基が32個、負チャージの基が22個も存在する。これらの結果は、ここでの穴だらけで同様に親水性の部分が多いと思われる細胞膜貫通部の構造と良く一致する。ここで可溶化されたNaチャンネルは既に膜電位に置かれていないので、この構造はイオンチャンネルがイオンを通さない安定な閉状態であると思われる。先ほど触れたIV S4の非常に短い疎水的環境にある領域は膜電位の変化によって劇的にシフトすることが知られている。また、細胞外側の開閉時期において、S5とS6のリンカー部分の構造が変化することが示唆されている。これらの結果と人為突然変異実験からNaチャンネルのイオンの通り道が一つであるらしいこと、さらには電圧センサーが4つであることを考え合わせると、イオンの通り道は中心部の細長い構造によってつくられるという仮説が考えられる。ここで中心部の構造はS6を含む可能性が高い。中心のイオンの通路は、電圧変化による開口時に中心部の質量がその周辺の4つの空間に向かって動くこ

とでその中心が空き、形成されると考えられる。

我々がここで用いた技術、すなわちHeステージ電子顕微鏡⁴⁾と単粒子解析技術の組み合わせは、これまで不可能だったNaチャンネルの3次元構造を浮き上がらせ、その複雑な内部空洞と穴構造を示した。この複雑な空洞システムとイオン輸送、チャンネル開閉機構を理解するためには、更なる分解能での解析とNaチャンネルが開状態での構造の決定が必須である。

カンデル等による昨年のノーベル医学生理学賞受賞研究の中心分子である電圧感受性チャンネルの構造を世界に先駆けてNature誌に報告したので、ここでその内容と構造結果を中心にAIST Todayに紹介した。

参考文献

- 1) Kandel, E. R. et al., Science 218, 433-443 (1982).
- 2) Sato, C. et al., J Struct Biol 121, 314-325 (1998).
- 3) Doyle, D. A. et al., Science 280, 69-77 (1998).
- 4) Fujiyoshi, Y., Adv, Biophys 35, 25-80 (1998).

佐藤 主税 (Chikara Sato)
e-mail: ti-sato@aist.go.jp

脳神経情報研究部門・構造生理グループ (Neuroscience Research Institute,
Structure-Physiology Group)

原著及び原著者名

The voltage-sensitive Sodium Channel is a bell-shaped molecule with several cavities .Chikara Sato, Yutaka Ueno, Kiyoshi Asai, Katsutoshi Takahashi, Masahiko Sato, Andreas Engel, and Yoshinori Fujiyoshi .Nature 409, 1047-1051 (2001) .

- Nature news and views(2001.2)より-

電位依存性ナトリウムチャンネルは神経細胞の機能によりに何より重大だが、どのように働くのだろうか。低分解能の三次元構造がわかり、興味深い洞察が得られた。