

れている<sup>15)</sup>。このように植物の LysM 型受容体キナーゼが、構造的に類似したリガンドを認識した結果として、根粒菌との共生のように微生物を受け入れる応答を誘導する場合と、病原菌の排除という相反する細胞応答の制御に関わっていることは、大変興味深いことである。これらの受容体群の下流のシグナル伝達系の解析は、病原菌に対する防御系と根粒菌共生系の双方の理解を深める上で重要と考えられる。

### おわりに

2050年には世界の人口は百億人に達するといわれている。また、現在世界の飢餓人口は約10億人であり、全人口のおよそ7人に1人が飢えているとされる。この食糧問題の解決は、世界において最優先で取り組むべき課題の一つである。一方、一年間に世界で生産される作物の約15%が病害によって失われているといわれているが、これは単純計算すると実に8億人分の食糧に匹敵する。筆者らは、MAMPsを介した植物免疫機構の解明と理解が、植物の本来持っている「免疫力」を最大限に増強させることを可能にし、食糧問題の解決と環境や地球に優しい農業の発展に貢献することを期待している。

### 謝辞

本研究は、(独)農業生物資源研究所・西澤洋子博士、南栄一博士、南(石井)尚子博士および東京大学・山根久和教授、岡田憲典博士との共同研究により行ったものである。また、ここで述べた研究の多くは、明治大学農学部・清水健雄博士、新屋友規博士、宮彩子博士、出崎能丈博士をはじめとする多くの環境応答植物学研究室及び環境応答生物学研究室内のメンバーによって行われたものである。あらためて深く感謝する。

- 1) 山田哲治 (2004) 分子レベルからみた植物の耐病性 (島本, 渡辺, 柘植編) pp. 18-22, 秀潤社, 東京.
- 2) 清水健雄, 賀来華江, 渋谷直人 (2010) 植物のシグナル伝達 (柿本, 高山, 福田, 松岡編) pp. 45-51, 共立出版, 東京.
- 3) Zipfel, C. & Felix, G. (2005) *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 353-360.
- 4) Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009) *Plant Physiol.*, 150, 1638-1647.
- 5) Shibuya, N. & Minami, E. (2001) *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59, 223-233.
- 6) Lee, C.G., Da Silva, C.A., Lee, J.Y., Hartl, D., & Elias, J.A. (2008) *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 684-689.
- 7) Ito, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997) *Plant J.*, 12, 347-356.

- 8) Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., & Shibuya, N. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 11086-11091.
- 9) Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., & Shibuya, N. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 19613-19618.
- 10) Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakls, V., Petutschnig, E., Lipka, V., & Rathjen, J.P. (2009) *Curr. Biol.*, 19, 423-429.
- 11) van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, L., de Wit, P.J.G.M., & Thomma, B.P.H.J. (2007) *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20, 1092-1101.
- 12) Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K., & Nishimura, M. (2009) *Mol. Microbiol.*, 73, 553-570.
- 13) Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Dasaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., & Shibuya, N. (2010) *Plant J.*, 64, 204-214.
- 14) Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraiishi, T., Iwabuchi, M., & Narusaka, Y. (2009) *Plant J.*, 60, 218-226.
- 15) Lohmann, G.V., Shimoda, Y., Nielsen, M.W., Jorgensen, F.G., Grossmann, C., Sandal, N., Sorensen, K., Thirup, S., Madsen, L.H., Tabata, S., Sato, S., Stougaard, J., & Radutoiu, S. (2010) *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23, 510-521.

賀来 華江, 渋谷 直人  
(明治大学農学部生命科学科)

### Chitin receptor for plant innate immunity

Hanae Kaku and Naoto Shibuya (Department of Life Sciences, School of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashi-Mita, Tama-ku, Kawasaki 214-8571, Japan)

## ヒト由来ギャップ結合チャネルの構造解析

### 1. はじめに

細胞間情報伝達はわれわれヒトをはじめとする多細胞生物が高度で複雑な生物活動を行うために必須の機能である。発生・分化・免疫反応・神経伝達といった生物機能は細胞間連絡なくしてはなし得ない。これらはいずれも細胞膜を貫通する膜タンパク質あるいは細胞外へと分泌されるシグナル伝達分子によって担われる。ギャップ結合は隣接する細胞質を物質的に直接連結する、非常に特殊な構造体である。電子顕微鏡下では中央に1~2 nmの孔を持った六角柱状のタンパク質複合体が2~4 nmの隙間(ギャップ)を挟んで広範囲に密集している様子が観察される。こ

のタンパク質複合体をギャップ結合チャネル (GJC) といひ、二つの隣接細胞からそれぞれ供与されたコネクソン (ヘミチャネル) と呼ばれる膜タンパク質複合体が細胞外領域で結合したものである<sup>1)</sup>。一つのコネクソンはコネキシン (connexin: Cx) と呼ばれる4回膜貫通型タンパク質が中央の孔を囲んで六量体を形成したものである。したがって一つのコネクソンはコネキシン分子十二量体から成る。Cxはヒトにおいて21種類確認されており、Cxのあとにその単量体分子量を表してCx43, Cx50などと呼ばれる。ギャップ結合はイオン、セカンドメッセンジャー、代謝物質など約1.5kDa以下の低分子を透過させることが知られている。近年ではRNAiを担う短いRNAや免疫応答を担うペプチドをも透過させるという報告もある<sup>2,3)</sup>。これらの生体分子の細胞間透過は組織の恒常性維持や心筋の同期した収縮、細胞分化の際のシグナル伝達などに不可欠である。多様な機能発現の場を反映して、Cx遺伝子の変異の中には発生、心臓の拍動、神経伝達に異常をきたすもの、白内障や難聴といった病気に関連するものが数多く報告されている<sup>4)</sup>。

## 2. ギャップ結合チャネルの構造研究

GJCの構造解析は、この膜タンパク質複合体が天然状態でも擬似二次元結晶を作り出すことから、これまで主として電子顕微鏡によるところが大きかった。1980年代にはUnwinらがラット肝臓より精製したギャップ結合を用いて、低分解能構造ながらCaイオンによるチャネルの開閉メカニズムを提唱した<sup>5)</sup>。1990年代にはUngerらがCx43の細胞内可溶性C末端領域を切除したもの (Cx43 $\Delta$ CT) をBHK細胞に発現させ精製した二次元結晶により、分解能を7.5Åにまで向上させた<sup>6)</sup>。当初のトポロジー予測どおり、ヘミチャネルを構成する24本の $\alpha$ ヘリックスが確認された。2000年代になるとCx43 $\Delta$ CTの分解能は5.4Åにまで向上した<sup>7)</sup>。さらに変異体データベースの解釈などからCx単量体に相当する四つのヘリックスの配置が提案された。しかしながらチャネルポア (孔) を構成するアミノ酸側鎖の決定、開閉機構を担う構造的特徴、細胞外領域での二つのヘミチャネルの結合様式といった、チャネルの機能を司る構造基盤を解明するためにはさらに高い分解能データが必要であった。

こうした構造研究背景のもと、われわれはヒト由来コネキシン26 (hCx26) を対象として2002年に研究に着手した。それまでの電子線結晶構造解析法とは異なり、三次元結晶を用いたX線結晶構造解析法を用いた。研究開始か

ら7年後の2009年に3.5Åでの構造解析に成功し<sup>8)</sup>、GJCの原子構造を初めて明らかにした<sup>9)</sup>。

## 3. ギャップ結合チャネルの立体構造

結晶内で観察された構造は十二量体のGJCの状態であったため、GJCの階層的構造形成基盤、すなわちコネキシン・コネクソン・ギャップ結合チャネルという段階的な相互作用様式を明らかにすることができた (図1)。Cx26単量体は隣り合うヘリックスどうしが逆平行となる4本バンドルを形成しており、これらの間はArg32を中心とした水素結合群、Arg143を中心とした水素結合群、Trp44, Trp77を中心とした疎水性相互作用コア領域などの相互作用によって束ねられている。細胞外領域の二つのループはCxファミリーでよく保存された三つのジスルフィド結合によってつながれ、その構造を保持している。ヘミチャネル内のCx26単量体間は細胞膜/細胞外領域近傍に集中するArg75, Arg184, Glu47, Asp46, Asp50を中心とした複雑な相互作用を形成している。遺伝病と関与することが知られている変異の多くはこの構造形成に障害をきたすものの、チャネルポアに並ぶ残基を変化させてチャネル透過性を変えてしまうもの、後述するN末端によるゲーティングに影響を及ぼすものに大別することができる<sup>10)</sup>。

チャネルポアを構成するアミノ酸側鎖とその配置を特定し、表面電荷計算を行った。その結果、細胞外領域に近い細胞膜近傍に負電荷を持つ酸性残基クラスターがチャネルポアを取り囲んでいることがわかった (図2)。GJCの状態ではこの領域のポア直径は約20Åであり、その機能的役割を推察することは難しい。しかしながら、ヘミチャネルを用いた電気生理実験によってこの領域が細胞外Caイオンによる制御に関わることが示されている<sup>11)</sup>。ヘミチャネル状態ではこの領域はGJCの状態とは異なった構造になり、Caの結合がチャネルの開閉に影響を与えるのであろう。

## 4. ポアファネルによるプラグゲーティング

GJCの構造が明らかになって、その中でも最も興味深いと思われるものが、ファネル (漏斗) 構造である (図2)。ファネルは各単量体から伸びる短いN末端ヘリックスによって孔の入り口付近に形成されている。2007年に京都大学の大嶋らが解析した同じhCx26の電子顕微鏡による低分解能二次元結晶構造ではこの領域にプラグ (栓) 構造が見られ、物理的にチャネルを閉じているように見える<sup>12)</sup>。この解析はチャネル透過性を大幅に落とすことが知

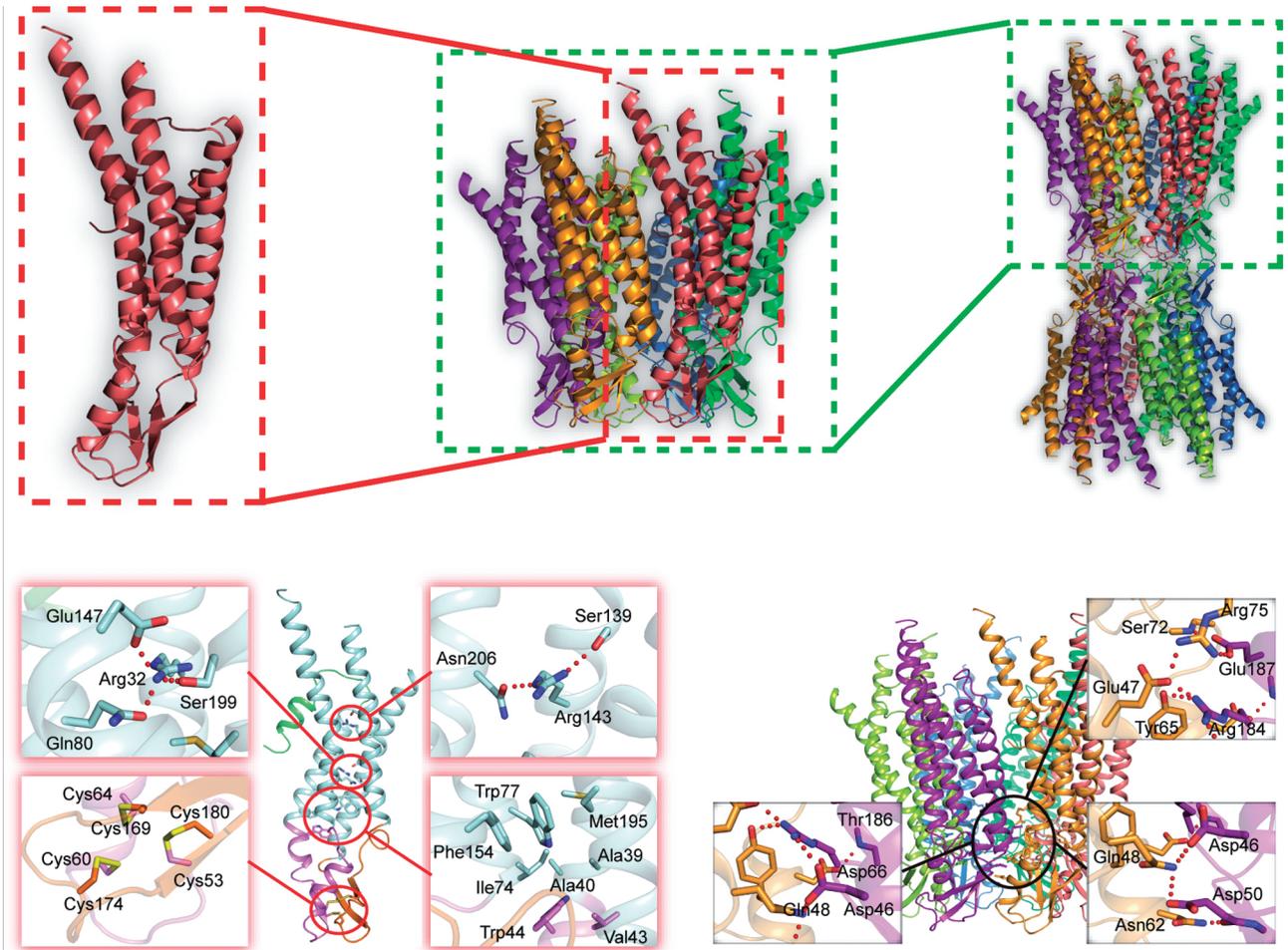


図 1

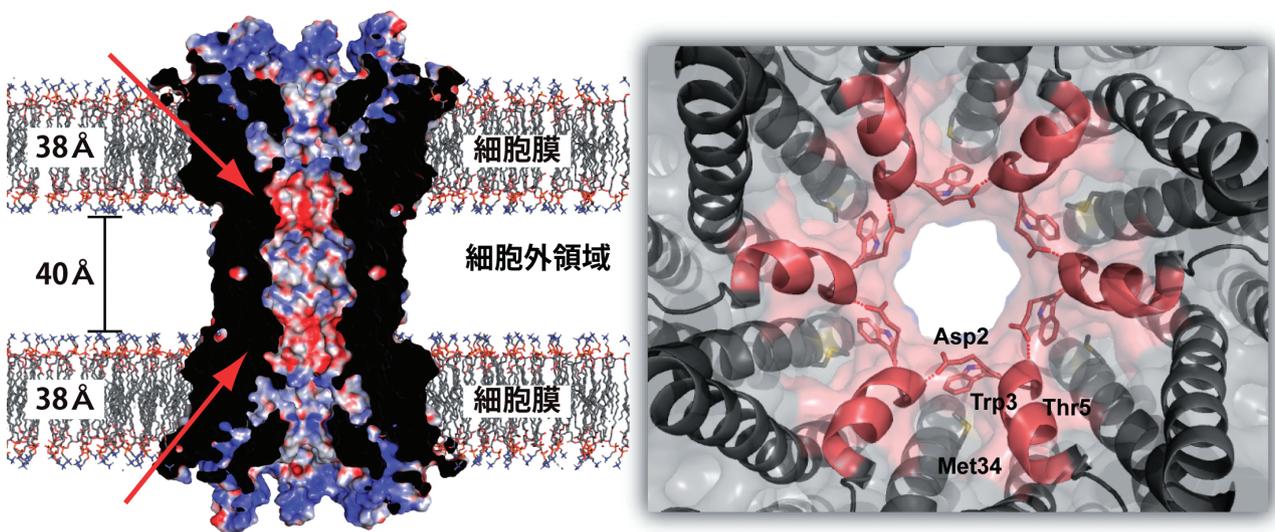


図 2

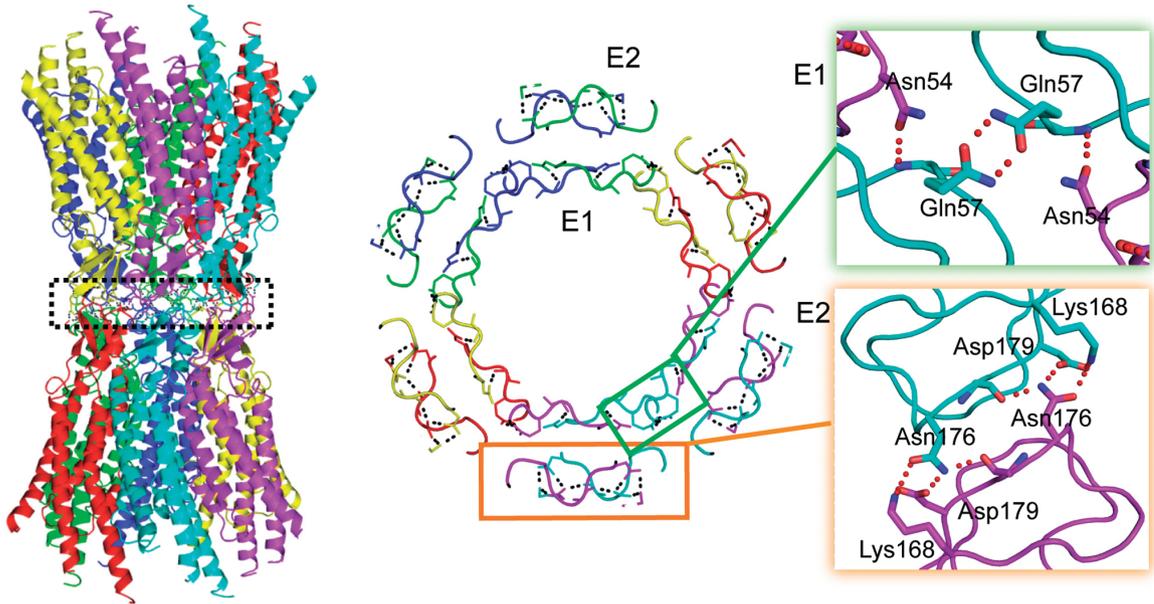
図1 コネキシン 26 ギャップ結合チャネルの構造形成

(上) 単量体から六量体, 十二量体が形成されるまでの相互関係.  
 (左下) 単量体内での構造形成に関わる主な相互作用.  
 (右下) 六量体形成に関わる単量体間での相互作用.

図2 コネキシン 26 ギャップ結合チャネルのポア構造

(左) 表面電荷を計算し, チャネルポアに沿った断面図. 脂質分子で模式的に細胞膜領域を描いている. 膜表面近傍の負電荷クラスターを矢印で示す.  
 (右) チャネルポアを細胞内領域から見たリボン図を表面図に重ねた. 各単量体から伸びるN末端ヘリックスを赤で, それ以外の領域を灰色で示す. ポアファネル構造を形成する相互作用に関わる残基の側鎖をスティック表示してある.

(A)



(B)

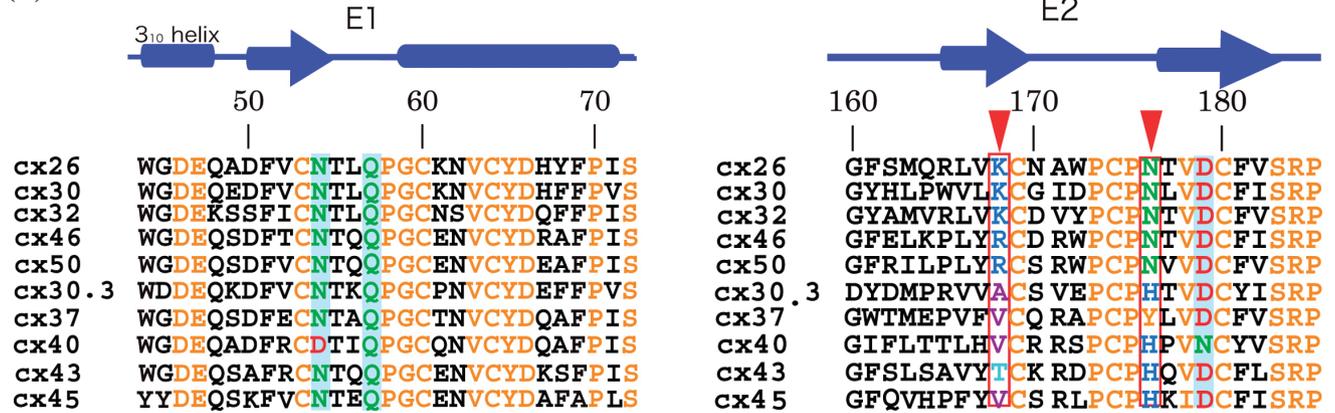


図3 コネキシン 26 ギャップ結合チャネルにおける細胞外相互作用

(上) 細胞外領域での相互作用面を輪切りにしたもの. チャネルポア内部と外部環境とが完全に隔離されている. E1-E1間, E2-E2間における相互作用を拡大図にて示す.  
 (下) 代表的なコネキシンについてのE1およびE2のアミノ酸配列アライメントとコネキシン26における二次構造を上を示す. 細胞外相互作用に関与する残基に影をつけ, アミノ酸の特性ごとに色分けした. 完全に保存されている残基は黄色で示した. ヘミチャネル間での結合特異性に寄与すると示唆される残基を赤枠で示す.

られている Met34Ala 変異体<sup>13)</sup>を用いて行われた。野生型では Trp3 が隣接する単量体の Met34 と疎水性相互作用することでファネル構造がチャンネル内壁に固定されており、Met34Ala 変異体の透過性低下の原因とプラグ形成をよく説明している。ファネル底面部位には負電荷を持った Asp2 が孔内に露出しており、これが細胞間に生じる膜電位差を感知してチャンネルの開閉を引き起こすと考えられる。われわれはこの二つの構造をもとに、N 末端領域の構造変化と会合状態の変化が GJC の開閉を担っているとして、新たなプラグ開閉機構を提唱した。このモデルは GJC において N 末端領域が細胞間に生じる膜電位差を感知して構造変化を起こすことにより開閉を行うという Verselis らによる機能解析の結果<sup>14)</sup>ともよく合致するものである。

### 5. 細胞間接着分子としての特異性

GJC は隣接細胞をつなぐ連絡チャンネルとしての機能を持つだけでなく、細胞間接着分子としての機能も併せ持つ、いわば adhesion 分子 (adhesion と channel とを合わせた造語。京都大学の藤吉らが考案) であると言える。実際に、発生段階の脳における大脳新皮質の層形成にはギャップ結合が放射グリア細胞と神経細胞との間で接着分子として働くことがわかっている<sup>15)</sup>。ギャップ結合は他の細胞間接着分子と同様にヘミチャンネル間でのギャップ結合形成能に特異性を持っている。われわれの構造をもとにして様々なコネクシンの分子モデリングを行い、詳細に解析したところ、この特異性を決定しているのは E2 ループ内のわずかな 2 残基であることを示唆する結果を得た (図 3)。このモデリング結果は実際のギャップ結合形成能を調べた実験結果とも良く合致するものであった。

### 6. おわりに

われわれが構造解析に成功した領域は一次構造、領域ごとのアミノ酸残基数がコネクシンファミリー内で高度に保存されている。したがって Cx26 ギャップ結合チャンネルの構造は、他の Cx チャンネルについても当てはめることができる構造の鋳型となる。この構造が今後のギャップ結合チャンネル研究に活用され、多くの研究者を支援できることを期待したい。

**謝辞:** 本稿で述べた研究成果は兵庫県立大学ピコバイオロジー研究所の月原富武研究室で行ったものである。オレゴン健康科学大学の菅倫寛研究員、大阪大学大学院生の中川

宗君、山下栄樹助教を中心として研究を進めた。この場を借りて関係者の方々に感謝の意を表したい。

- 1) Sosinsky, G.E. & Nicholson, B.J. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, 1711, 99–125.
- 2) Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L., & Neefjes, J. (2005) *Nature*, 434, 83–88.
- 3) Valiunas, V., Polosina, Y.Y., Miller, H., Potapova, I.A., Valiuniene, L., Doronin, S., Mathias, R.T., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Cohen, I.S., & Brink, P.R. (2005) *J. Physiol.*, 568, 459–468.
- 4) Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., & Beyar, E.C. (2003) *Physiol. Rev.*, 83, 1359–1400.
- 5) Unwin, P.N. & Ennis, P.D. (1984) *Nature*, 307, 609–613.
- 6) Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., & Yeager, M. (1999) *Science*, 283, 1176–1180.
- 7) Fleishman, S.J., Unger, V.M., Yeager, M., & Ben-Tal, N. (2004) *Mol. Cell*, 15, 879–888.
- 8) Suga, M., Maeda, S., Nakagawa, S., Yamashita, E., & Tsukihara, T. (2009) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 65, 758–766.
- 9) Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., & Tsukihara, T. (2009) *Nature*, 458, 597–602.
- 10) Laird, D.W. (2006) *Biochem. J.*, 394, 527–543.
- 11) Verselis, V.K., Trelles, M.P., Rubinos, C., Bargiello, T.A., & Srinivas, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 4484–4493.
- 12) Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., & Sosinsky, G.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10034–10039.
- 13) Oshima, A., Doi, T., Mitsuoka, K., Maeda, S., & Fujiyoshi, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 1807–1816.
- 14) Oh, S., Rivkin, S., Tang, Q., Verselis, V.K., & Bargiello, T.A. (2004) *Biophys. J.*, 87, 912–928.
- 15) Elias, L.A., Wang, D.D., & Kriegstein, A.R. (2007) *Nature*, 448, 901–907.

前田 将司

(兵庫県立大学生命理学研究科

(現) Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut)

---

Structure analysis of human gap junction channel  
Shoji Maeda (Department of Life Science, University of Hyogo, 6-2-3 Furuedai, Suita-shi, Osaka 565-0874, Japan; Present Affiliation: Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut, Villigen PSI, Switzerland)