

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 亀川 亜希子

論文題目 構造に基づいた水チャンネル
アクアポリン4とその阻害剤の研究

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	藤吉	好則
委員	名古屋大学教授	廣明	秀一
委員	名古屋大学准教授	大嶋	篤典

我々の身体は60%~70%程度の水を含んで機能している。細胞表面の脂質膜は水を透過することが出来るが、その速度は速くない。1992年に水を速く透過するチャネルがヒトの赤血球に存在することが確認され、その水チャネルはアクアポリン-1と名付けられた。その後研究が進展して、ヒトにはアクアポリン-0からアクアポリン-12までの13種類の水チャネルが見出されている。一方、我々の脳は80%を超える水を含んで機能していることが知られている。それゆえ、我々の脳などに発現が見られる水チャネル アクアポリン-4 (AQP4) は、重要で興味深い研究課題である。脳におけるこのAQP4の機能は、まだ解明されていないことが多いが、脳の血管を取り巻くアストロサイトのエンドフィート部分や、視床下部のグリアルラメラで温度や浸透圧のセンサーとして機能するとされている部分等での発現が見られている。

アルコールを摂取すると脳でのAQP4の発現量が増えるとされており、飲酒後に頭を強打して損傷を受けるようなことがあると、脳損傷に伴う脳浮腫により突然死する可能性がある。また、視神経脊髄炎 (NMO)の患者の血清中に抗AQP4抗体が検出されており、その病原性が疑われている。実際に、AQP4の阻害によって水中毒や脳虚血、髄膜炎に伴う細胞障害性脳浮腫の発症を抑制することが知られているので、AQP4選択的な水透過阻害剤の研究が進められている。その阻害剤候補として、炭酸脱水酵素阻害剤であるアセタゾールアミド (AZA) がAQP4の水透過を阻害することが明らかになってきた。しかし、AZAはAQP4を阻害しないという報告もあり、AQP4の阻害剤の重要性にも関わらず混乱した状態にあった。申請者は、ラット由来のAQP4とAZAとの複合体の立体構造を解析し、ドッキングシミュレーションの計算も行うことによって、この水チャネルAQP4の細胞外側にAZAが結合し、チャネルを物理的に塞ぐことで水透過を阻害する機構を明らかにして、論文を発表した (Kamegawa et al., *Microscopy*, **65**, 177-184 (2016))。

また、ラット及びヒト由来のAQP4を昆虫細胞で発現し、精製して、脂質膜内に再構成することによってプロテオリポソームを作製し、純粋な測定系を作製した。この様な系を用いて水透過およびその阻害効果を測定することで、AZAによるAQP4の水透過阻害機構を調べた。その結果、AZAはラット由来AQP4の水透過を阻害するが、ヒト由来AQP4の水透過は阻害できないことを解明した。さらに、ヒトとラットのアミノ酸配列の差異に着目し、異なるアミノ酸残基の変異体を作製しAZAによる水透過阻害活性測定を行なうことで、AZAが水透過を阻害する上で関連すると思われる2ヶ所のアミノ酸残基を特定した。これら2つのアミノ酸残基を、そしてそれだけを変異させれば、ヒト型のAQP4をラット型に、ラット型AQP4をヒト型にできることを明らかにした。

さらに、AQP4とAZAの結合構造の詳細を理解するために、より高い分解能での構造解析を行った。このAQP4の構造は、電子線結晶学により解析されているが、この

2次元結晶は AQP4 分子の細胞外側の相互作用によって接着した 2 枚の膜が接着して形成されている結晶である。しかも、その接着力は比較的弱いために、結晶によってはその接着がずれるようなことが生じているために均一な 2 次元結晶ではなく、電子線結晶学による構造解析は容易ではなかった。しかし、電子顕微鏡像と電子回折図形を同じ結晶から収集することで、電子顕微鏡像の解析から均一な結晶だけを選別し、構造解析はその像を与えた 2 次元結晶の電子回折図形から、正確で、高い分解能の振幅の三次元的なデータを収集することに成功した。ところが、この AQP4 の接着力は AZA が結合するとさらに弱くなって、構造解析はさらに困難であった。そのために、非常に多くの結晶を作製し、極めて多くの電子顕微鏡像と電子回折図形を撮影することによって、この様に困難な複合体についても、3 Å 分解能の構造解析に成功した。ところが、この分解能での解析でも、AZA が AQP4 に結合した構造の詳細を決定することができなかった。この 3 Å 分解能での構造解析によって、さらに高い分解能での構造解析が必要であることを明らかにした。それゆえ、分解能の向上を目指して、AQP4 の発現系のコンストラクトから見直しを行い、結晶化条件なども再検討を行った結果、アミノ末端のヒスチジンタグから AQP4 までのリンカー部分の長さを短くすることによって分解能を向上させることに成功した。このような発現系の検討までも含む大幅な見直しを行うことで、2.8 Å 分解能での立体構造解析に成功した。この分解能の向上によって、AQP4 に結合した状態の AZA のコンフォメーションを含めて、詳細に決定することに成功した。すなわち、結合時の AZA は、水溶液中での最も安定なコンフォメーションとは異なって、エネルギー的に不安定なコンフォメーションを形成して結合していることを明らかにした。さらに、AZA のチアジアゾール環にメチル基が結合したメタゾラミド(MZA)が AQP4 の水透過阻害能がないことも、この複合体構造の結合構造から理解できるようになった。

膜タンパク質とその複合体の構造を解析するために、成功確率が数%しかない、極めて困難な電子線結晶学のデータ収集を、極低温電子顕微鏡の操作にも熟達して、やり遂げ、構造解析なしには予測が不可能な、阻害剤 AZA の詳細な結合構造も解明して、これまで混乱した状況にあったこの阻害剤がラット由来の AQP4 には確かに結合して水透過を阻害することを疑う余地なく証明した。さらに、ヒト由来の AQP4 の阻害剤を設計する上で重要で、有用と思われる構造情報を取得することに成功した。上述のように本論文においては、脳の水チャネルとその阻害剤候補化合物との複合体の構造を電子線結晶学を用いて解析して、第 1 著者として論文を発表し、さらに高い分解能の解析も進めた。これらの結果は、脳浮腫や視神経脊髄炎のための創薬にとって重要な構造情報を与えている。従って、当審査委員会は、論文が博士（創薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。