

## ライフサイエンス分野

## 生体の高次機能に関連したタンパク質の構造生物学研究

## 1. シグナル伝達に關与する細胞膜レセプターの構造生物学研究

分子生物学研究所と共同研究を行った。

## (a)代謝型グルタミン酸受容体の結晶構造解析

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は中枢神経系興奮性シナプス伝達の調節において主要な役割を果たす膜蛋白質である。平成12年度に、mGluR1の細胞外リガンド結合領域を単離・結晶化し、グルタミン酸結合体および非結合体を含む3種類の結晶構造を決定した。これらはすべてジスルフィド結合でつながった同種二量体から成り、それらの「活動型」および「静止型」と名付けられた形状は、向かい合ったヘリックス構造から形成される二量体接触面を通じて相互に変換されていた。二枚貝状の単量体は、その2つのドメインの間にグルタミン酸を結合し、また、ドメイン配置を柔軟に変化させて「開いた」あるいは「閉じた」形状を呈していた。今年度は、この受容体にアンタゴニストである(S)-methyl-4-carboxyphenylglycineを結合させたものと、グルタミン酸と $Gd^{3+}$ (ガドリニウムイオン)を結合させたものの2つの結晶構造を解明した。アンタゴニストを結合した受容体は、何も結合しない「開いた」「静止型」の構造をしており、アンタゴニストが受容体を不活性型の構造に固定することを示している。一方グルタミン酸と $Gd^{3+}$ の結合した受容体は二量体の両方が「閉じた」構造を持つ「活動型」のコンフォメーションをとっていた。これらの構造の比較から、グルタミン酸の結合によってドメインが閉じて、二量体間の接触面にある



アンタゴニストを結合した代謝型グルタミン酸受容体の結晶構造

螺旋を動かすことが明らかとなった。これによって、グルタミン酸の結合が受容体にどのように作用するかが明らかとなった。

## 発表論文

D. Tsuchiya, Naoki Kunishima, Narutoshi Kamiya, Hisato Jingami and Kosuke Morikawa. Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and  $Gd^{3+}$ . Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99 (2002) 2660-2665.

## 2. プロスタグランジン D2 合成酵素の構造生物学研究

大阪バイオサイエンス研究所との共同研究を行った。

## (a)ヒト脳型プロスタグランジン D2合成酵素の X 線溶液散乱

SPring-8 の BL40B2 を用いてヒト脳型プロスタグランジン D2合成酵素の X 線溶液散乱実験を行い、溶液中のタンパク質分子構造の検討を行った。本酵素は種々の脂溶性分子を結合することが知られており、脂溶性分子の結合に伴う構造の変化を検討した。データは解析中であるが、分子の種類によって構造の変化が異なっている。

## 3. 放射光のパルス特性を利用した動的構造生物学研究

奈良先端科学技術大学院大学、理化学研究所との共同研究を行った。

## (a)理研小角散乱ビームラインにおける骨格筋 X 線回折実験

SPring-8 の理研小角散乱ビームライン (BL45XU) を用いて、骨格筋の X 線回折実験を行った。架橋剤で細いフィラメントの構造を固定して X 線回折実験を行うことにより、細いフィラメントの構造変化を示す第二層線の強度がミオシンとの相互作用により増強されないことを見出した。これは、従来の生化学的な予想とは異なる結果であり、架橋剤を用いた筋収縮のカルシウム制御の構造・機能研究の可能性を示した。

また、微小な X 線ビームを用いることにより、骨格筋の筋原線維の構造をこれまで以上に詳細に明らかにした。

## (b)理研小角散乱ビームラインにおけるバクテリオロドプシン変異体の時分割実験

バクテリアの光受容膜である紫膜を構成するタンパク質

バクテリオロドプシンの D96N 変異体は、光を照射すると M と NM という二つの光反応中間体を持つ。時分割 X 線回折実験により、MN 中間体ではらせん F が M 中間体に比べてより大きく照射前の位置からはずれていた。このことは、らせん F が M-MN の崩壊の過程で動くことを示している。この段階では光受容体であるレチナルのシッフ基は変化しておらず、らせん F の動きがバクテリオロドプシンの細胞質側の水和を引き起こし、それがシッフ基のプロトン化を引き起こすと考えられる。

#### (c)高フラックスビームラインにおける時分割実験

SPring-8 の高フラックスビームライン (BL40XU) では、マイクロ秒領域の時分割実験を、骨格筋、紫膜、タンパク結晶を対象として行っている。骨格筋においては、試料を X 線照射中に高速で移動することによって X 線が試料の一箇所に集中して照射されることを防いで放射線損傷を軽減した。この結果高速 CCD カメラと低残光 X 線イメージング用シンチファイアを組み合わせることにより、530マイクロ秒の連続時分割実験が可能となった。収縮中の筋肉の長さを急速に変化させたときの X 線回折パターンの変化、および電気刺激時の張力発生前の X 線回折パターンの強度変化を測定することにより、骨格筋内でのミオシン分子の動態やカルシウムイオンの挙動についての知見が得られている。データは現在解析中である。

紫膜では YAG レーザーと高速パルス型 X 線シャッターの組み合わせにより、10マイクロ秒の時間分解能でパルスの露光による回折像を CCD カメラと X 線イメージング用シンチファイアを用いて検出している。短時間の露光によって回折強度の変化を測定するため、実験を多数繰り返す必要があり、データ収集を継続している。

タンパク結晶については、やはり10マイクロ秒程度のパルスの露光でミオグロビン結晶から十分な質の X 線回折パターンが得られ、データ処理の結果通常の単色 X 線法と変わらない精度の電子密度マップが得られた。これによって装置上は十分な性能を持つことが確認された。

#### 発表論文

Hiroyuki Iwamoto, Kazuhiro Oiwa, Takuya Suzuki & Tetsuro Fujisawa. States of thin filament regulatory proteins as revealed by combined cross-linking/X-ray diffraction techniques. *J. Mol. Biol.* 317 (2002) 707-720.

Hiroyuki Iwamoto, Yukihiro Nishikawa, Jun'ichi Wakayama & Tetsuro Fujisawa. Direct visualization of a single hexagonal myofilament lattice in native myofibrils of striated muscle by X-ray diffraction. *Biophys. J.* (in press).

Toshihiko Oka, Naoto Yagi, Fumio Tokunaga, and Mikio Kataoka. Time-Resolved X-Ray Diffraction

Reveals Movement of F Helix of D96N Bacteriorhodopsin during M-MN Transition at Neutral pH. *Biophys. J.* 82 (2002) 2610-2616.

岡 俊彦、井上勝晶、八木直人 SPring-8・BL40XU における時分割 X 線回折測定技術 放射光 384-388. 14 (2001)

利用研究促進部門 八木 直人