

JST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。

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。本研究ではmGluR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、各単量体はその2つのドメイン (LB1およびLB2) の間にグルタミン酸を結合し、ドメイン配置を柔軟に変化させて「open」と「closed」と呼ばれる二つの形状を呈していた。さらに、この受容体にアンタゴニストである(S)-(*S*)-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) を結合させたものと、グルタミン酸とGd³⁺ (ガドリニウムイオン) を結合させたものの二つの結晶構造も解明した。

これらの結晶構造を比較すると、興味深いことにリガンドの非存在下条件において、活性状態を示すアゴニスト (グルタミン酸) 結合型である「closed-open/A」と、不活性状態を示すアンタゴニスト (MCPG) 結合型である「open-open/R」の双方が見られた。これまでの考察より、グルタミン酸の結合がclosed構造のプロトマーを誘起することが受容体の活性化の引き金となり、逆に、2つopen構造のプロトマーを組み合わせた二量体構造により受容体が不活性化すると考えられる。従って、リガンドが存在しない状態では、活性構造に關係するclosed構造と不活性化に必要なopen構造が動的平衡状態にあることが示唆される。このことは、mGluRについてアゴニストの非存在下においてもbasal activityが観測される実験事実を説明する。

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 Gd³⁺. 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共同研究を行った。

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いる。これは、この酵素の構造がビタミンA輸送タンパク質などと類似していることと密接に關係していると思われる。事実、本酵素を生体から精製すると何らかの脂質が内部に結合している。そこで、脂溶性分子の結合に伴う構造の変化を検討した。分子の種類によって構造の変化が異なっている。本酵素は結合する脂質によっては慣性半径が増加することがあり、大きな脂質の結合も可能なフレキシブルな構造を持っていると考えられる。いっぽう、脂質を結合することによって分子の形状がコンパクトになることがあり、これは他の脂質輸送タンパク質における同じように分子内部に脂質が入り込み、induced-fitによって分子がコンパクトな構造を取ったためと考えられる。

口頭発表

井上勝晶、乾隆、裏出良博、八木直人: X線溶液散乱法を用いたプロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) の構造変化に関する研究。第40回日本生物物理学会年会 (2002年11月2日 名古屋) 生物物理 **42** S182 (2002)

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との共同研究を行った。

骨格筋を電気刺激すると、筋小胞体から細胞質にカルシウムイオンが放出される。これが筋肉を収縮されるトリガシグナルとなる。カルシウムイオンは細いフィラメントのトロポニンと結合して細いフィラメントに構造変化を起こし、アクチンとミオシンの相互作用を可能にし、張力発生が生じる。この過程は、骨格筋のX線回折パターンの中で細いフィラメントに由来する層線や子午線反射の強度を測定することで追跡できる。層線の強度は主としてアクチン及びトロポニンからなる二重らせん構造に由来し、子午線反射はトロポニン分子に由来すると考えられている。0.5ミリ秒の時間分解能でこれらの反射強度を電気刺激後に測定したところ、どちらの強度もほぼ同時に、張力発生やミオシン由来の反射よりも早くに変化を開始することが明らかとなった。従来はトロポニン由来の反射強度変化はカルシウム結合によるトロポニン分子の構造変化を示すと考えられていたが、今回の結果により、これも収縮制御機構と関連した細いフィラメント全体の構造変化と関連していることが明らかとなった。カルシウム結合色素を用いた細胞内カルシウム濃度の測定では、トロポニン分子へのカルシウム結合は今回測定された強度変化よりもはるかに

速く生じることが示唆されており、カルシウム結合から若干の時間を置いて細いフィラメント全体が構造を変えてアクチンとミオシンの相互作用を可能にする構造変化を検出しているものと思われる。

また、ケージドATPをYAGレーザーで分解し、ATPがミオシン分子に結合し、構造変化の生じる過程を現在検討している。カルシウム非存在下でケージドATPを硬直状態のウサギグリセリン筋の中で分解すると筋肉は弛緩するが、このときのアクチンフィラメントの構造変化を検討している。

発表論文

N. Yagi : An X-ray Diffraction Study on Early Structural Changes in Skeletal Muscle Contraction. *Biophys. J.* **84** (2003) 1093-1102.

口頭発表

岡俊彦：高時間分解能X線イメージンシファイアおよびCCDカメラ。秋季第63回応用物理学会学術講演会（2002年9月25日 新潟）

八木直人、山口真紀：筋収縮開始時の細いフィラメントの構造変化の時間経過。第40回日本生物物理学会年会（2002年11月2日 名古屋） *生物物理* **42** S101（2002）

若山純一、田村巧、井上勝晶、岡俊彦、八木直人、岩本裕之：Caged ATP光分解にともなう筋収縮タンパク構造変化の超高速時分割X線回折。第40回日本生物物理学会年会（2002年11月2日 名古屋） *生物物理* **42** S187（2002）

利用研究促進部門
生物医学グループ
八木 直人