S1Z06

The role of conformational fluctuations in signal transduction

○ Kalbitzer H. R. (Inst. of Biophys. Phys. Biochem., Univ. of Regensburg)

The reliable prediction of the precise three-dimensional structure of proteins from their amino acid sequence is a major, still unresolved problem in biochemistry. Therefore, a detailed understanding of the physics of the folding process is the aim of many theoretical and experimental studies.

Although pressure is a parameter that controls folding/unfolding transitions of proteins through the volume change dV of the protein-solvent system, its effect on the structural transition has been rarely studied in detail. Ras protein is known to exist in two conformational states 1 and 2 when the nucleotide analog GppNHp is bound in the active site (1). State 2 is known to represent the effector binding state whereas state 1 represents most probably the state interacting with exchange factors (GEFs) such as Sos. By applying pressure we can shift the equilibrium towards state 1 at ambient pressures before the protein starts to unfold. The data indicate that pressure can be used to stabilize functional states of a protein occurring only at lower population at atmospheric pressures. An almost identical conformational state can also be identified in unfolding experiments with chaotropic compounds. This is in line with the observations of Kitahara and Akasaka (2) which showed earlier in the ubiquitin system that pressure can stabilize folding intermediates detectable by $1H/2H$ pulse-labelling experiments.

1. Spoerner, M et al. PNAS 98, 4944-4949 (2001).
2. Kitahara, R. & Akasaka, K. PNAS 100, 3167-3172 (2003).

H. R. Kalbitzer : The role of conformational fluctuations in signal transduction

S1S52

アセチルコリン受容体の構造とゲート開閉機構

○宮澤 淳夫 (理研・播磨・メンブレンダイナミクス)

アセチルコリン受容体は、神経筋接合部に高密度に存在している膜タンパク質で、分子量約290 kDaの五量体構造をしています。シビレイの一種 (トルペド類) には筋肉由来の大きな電気器官があり、ここからアセチルコリン受容体を豊富に含んだポストシナプス膜を調整し、チューブ状結晶を作製して電子顕微鏡を用いた構造解析に使用しました。チューブのイメージは、液体ヘリウムで試料を冷却できる極低温電子顕微鏡を用いて撮影しました。らせん対称性を利用したチューブの解析プログラムを開発・改良しながらコンピュータ処理を行い、イメージのみから得られた立体構造としては最高の4 Åまで分解能を高めました。この静止状態にある受容体の立体構造モデルから膜貫通領域の原子モデルを作製しました。受容体の膜貫通領域は5本のM2ヘリックスからなる内側リングと、15本のヘリックス (M1, M3, M4) からなる外側リングの2つに分割された構造をしていることが分かりました。内側リングは細胞膜を貫通するイオンの通り道を形成しており、外側リングは細胞膜の脂質から内側リングを隔離すると共にゲートの開閉を引き起こす構造変化ができるように保護していると考えられます。ゲートは細胞膜を貫通する内側リングの中間部にあり、隣り合うM2ヘリックス間の相互作用による疎水性のガードル状構造をしています。受容体にアセチルコリンが結合すると、細胞外ドメインにあるβシート構造の回転が起こります。この動きが内側リングのヘリックスを通してゲートに伝わり、その固いガードルが解き放たれイオンチャンネルが開くと考えられます。おそらく他の神経型イオンチャンネルでも、このガードル状ゲート構造とその開閉の法則を利用して、細胞膜の内外を行き来するイオンの正確で迅速なコントロールを行っていると考えられます。

A. Miyazawa : Activation mechanism of nicotinic acetylcholine receptor

S1S51

小胞体のカルシウムチャネル、”IP3 レセプター”の構造と機能

○御子柴 克彦^{1,2,3}、濱田 耕造³、道川 貴章¹、内田 敬子¹、安東 英明²、松浦 徹¹ (¹ 東大医科研・脳神経発生分化、² 理研・脳センター、³ JST・国際共同研究・カルシウム振動プロジェクト)

IP3 レセプターは細胞内にCa2+を貯蔵する小胞体に局在する。我々は以下のことを明らかにした。1) IP3 レセプターは、IP3 依存的Ca2+放出チャネルである。2) IP3 レセプターには3種あり各々が四量体 (ホモあるいはヘテロテトラマー) を形成する。3) 特に細胞表面膜のCa2+チャネルとの大きな違いは細胞内Ca2+振動の産生に関わっていることである。4) 電子顕微鏡 (EM) 観察により、精製IP3 レセプターは風車型及び正方形の二つの状態をとり、風車型の存在比がCa2+により増加する。5) IP3 結合部位内に全体の活性よりも500~1000倍高い活性を持つ配列が含まれ、それが抑制配列によりカバーされている。6) IP3 レセプターはトリプシン等のタンパク質分解酵素により、数カ所に分断されてもIP3 結合活性とCa2+放出活性の両方を有する。7) IP3 レセプターにはIP3 と同じ結合部位に結合している内在性分子 (IRBIT: IP3 receptor binding protein released with inositol trisphosphate) がある。すなわちIP3 レセプターの働きはCa2+放出チャネルとしての役割の他に第三次メッセンジャーとしてのIRBITの放出をする新しい役割をもつ。8) IP3 レセプターは細胞内をダイナミックに動き、細胞表面膜のTrpチャネルとも結合していることなどの従来の教科的な概念とかなり異なるユニークなチャネル分子であることを明らかにした。

Mikoshiba, K : Structure and function of IP3 receptor, Ca2+ channel on the endoplasmic reticulum

S1S53

細胞遊走のシグナリング

○竹縄 忠臣、末次 志郎、及川 司 (東大・医科研・腫瘍分子医学)

我々は細胞内骨格系の再編や遊走に関与する分子としてWASP及びWAVEファミリー蛋白質を探り、アクチン重合への役割を解明してきた。これらの分子は全て、C-末にVCA(verprolin, cofilin-like, acidic)領域を持ちV領域にG-アクチンを結合し、CA領域にArp2/3複合体を結合させアクチンの核化、重合を促進した。一方、N-末側にはこれらの分子を調節する蛋白質が結合するサイトが存在する。N-WASPはWIP, WISH, Cdc42やPIP2と結合し、WAVE2はIRSp53と結合することで、VCA領域が露出する。更にN-WASP, WAVE2とも塩基性アミノ酸の連なった領域を持ち、その部位にイノシトールリン脂質が結合し活性化を調節することを見つけた。N-WASPはPI(4,5)P2と主に結合するのに対し、WAVE2はPI(3,4,5)P3と結合した。WAVE2のPI(3,4,5)P3との結合部位にGFPを融合させた蛋白質を発現させると、葉状仮足への移行がみられた。結合を示さない変異体の発現は内在性のWAVE2の膜への移行を抑制し、葉状仮足形成も抑制した。PI3キナーゼの阻害剤でも同様な現象が見られた。これらの結果はWAVE2はPI3キナーゼによって活性を調節されていることを示す。

T.Takenawa, S.Suetsugu and T. Oikawa : Signaling of cell migration