

P57 吉田典弘¹、芳賀達也^{2,3} (1 東大・医・神経生化、2 学習院・理・生命研、3 CREST・JST)

ムスカリン受容体 M2, M4 サブタイプの細胞内移行

HEK293-tsA201 細胞に発現させた M2, M4 受容体は、アゴニスト依存的に細胞内移行する。M4 受容体の細胞内移行は、GTPase 活性を欠損させた dominant negative dynamin 共発現で抑制されるが、M2 受容体の細胞内移行は抑制されない。dynamin 依存性を決定する領域を同定するため、M2, M4 のキメラ受容体を作製して検討した。その結果、細胞内移行の dynamin 依存性がムスカリン受容体の細胞内第 3 ループによって決定されることが明らかになった。

P58 奥田隆志¹、貝塚千奈²、芳賀達也^{2,3} (1 東大・医・神経生化、2 CREST・JST、3 学習院・理・生命研)

高親和性コリントランスポーター遺伝子の単一塩基多型

コリン作動性神経には高親和性コリン取り込み系が存在しアセチルコリン合成の律速段階となる。最近我々は高親和性コリントランスポーター (CHT1) をクローニングすることに成功した。ヒト CHT1 遺伝子翻訳領域の単一塩基多型を解析した結果、トランスポーターの第 3 膜貫通領域に位置する 89 番目のアミノ酸 Ile から Val への置換 (I89V) に対応する多型を見出した。野生体 (WT) と変異体 (I89V) の CHT1 をそれぞれ COS-7 細胞に発現させたところ、発現量は同程度であったが I89V によるコリン取り込み速度は WT の 40-60 % であった。コリンに対する親和性は同程度であった (K_m ; $3 \mu M$)。生体内でも変異の有無によりアセチルコリン合成量が影響を受ける可能性が考えられる。

P59 小川治夫、豊島 近 (東大・分生研)

ホモロジーモデリングによる NaK-ATPase のイオン結合部位

NaK-ATPase は P 型 ATPase を代表するイオンポンプであり、全ての哺乳類の細胞に存在する。ATP 1 分子の消費に伴い、3 個の Na イオンを細胞外へ、2 個の K イオンを細胞内へ能動輸送を行い、膜内外の電位差を生じさせる。即ち、生命の維持には不可欠な膜蛋白質である。P 型 ATPase ファミリーの原子構造は、長い間明らかにされてこなかったが、昨年我々により筋小胞体 Ca-ATPase の Ca イオンが結合した状態の構造が 2.6 Å 分解能で明らかになった。また、最近当研究室では、Ca イオン非存在下、Mg/F (リン酸アナログ) との複合体の X 線結晶解析に成功した。これら筋小胞体 Ca-ATPase の 2 状態は、それぞれ NaK-ATPase の Na イオン結合状態、K イオン結合状態に相当する。そこで、NaK-ATPase の α サブユニットのホモロジーモデリングを筋小胞体 Ca-ATPase の 2 構造を基に行った。算出されたモデルは、(1) Na イオンと K イオンの輸送される数の違い (Na イオンは 3 個で、K イオンは 2 個)、(2) 2 つのイオンの結合定数が異なること (Na イオンは mM-1 オーダー、K イオンは μM -1 オーダー) を説明できた。また、モデルは多くの変異体データや、生化学的データを説明できるものであった。

P60 濱田季之¹、廣田洋¹、古川浩康²、武藤 裕³、横山茂之^{1,3}、石黒正路⁴、芳賀達也^{2,5}

(1 理研・ゲノム科学総合研究センター、2 CREST・JST、3 東大・理・生化学、4 サントリー・生有研、5 学習院・理・生命研)

ムスカリン性アセチルコリン受容体に結合した低分子リガンド類の構造

我々は、Transferred Nuclear Overhauser Effect (TRNOE) の解析により、ムスカリン受容体に結合した (s)-メタコリンと (+)-ムスカリンの二面角 O-Cb-Ca-N が gauche 型 (約 $+60^\circ$) であることを決定した。この立体配座は、薬理学的知見から予想されていた trans 型 (二面角 O-Cb-Ca-N が約 $+180^\circ$) とは大きく異なっていた。そこで、X 線結晶解析より決定されたロドプシンの構造をもとにして、ムスカリン受容体と (s)-メタコリンの複合体の分子モデルを構築した。その結果、複合体において (s)-メタコリンは、gauche 型の方が trans 型よりエネルギー的に安定であることが分かり、TRNOE 解析の結果が支持された。