

学習院大学生命分子科学研究所 所長・教授

芳賀 達也

「G タンパク質共役受容体の高次構造」

1. 研究実施の概要

本研究は、G タンパク質共役受容体の高次構造を明らかにし、それによって受容体の作用機構を知ると同時に、理論的にリガンドを推定し創薬への道を開くことを主要な目標とした。受容体に結合したリガンドの NMR による構造決定も計画した。同時に、G タンパク質共役受容体の新しいリガンド検索系を構築し、オーファン受容体の内在性リガンドの同定を目指した。また、平成 10 年度からコリントランスポーターの研究をこのプロジェクトに組み入れた。

G タンパク質共役受容体は、ロドプシンを例外として細胞での発現量が少ない。高次構造を決定するには、まず大量発現・精製系の構築が必要である。モデル受容体として、ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプ（ムスカリン受容体）の変異体（不均一性の原因となる糖鎖を除き、タンパク質分解酵素の作用を受けやすい細胞内第三ループ中央部分を除いたもの）を選んだ。種々の発現系を検討し、最終的にバキュロウイルス・昆虫 Sf9 細胞系を用いて毎月 40-60 mg 受容体を発現させ、15-30 mg の精製受容体を調製する系を確立した。

G タンパク質共役受容体はジギトニン中で安定であるが、ジギトニンはミセルサイズが大きく、結晶化に適さない。種々の界面活性剤を検討し、高親和性アンタゴニスト QNB（quinuclidinyl benzylate）を結合させた状態では、アルキルグリコシド中で比較的安定であることを確認した。QNB を結合させた M2 受容体変異体の結晶化を試みた。結晶様構造物が観察されると、中迫雅由氏の協力で、東大分生研、理研、慶応大学、Spring 8 で X 線回折実験を行った。平成 14 年 10 月の時点で、8 Å の回折点を示す結晶が得られている。構造解析には、結晶の質の改善が必要である。

大量に精製したムスカリン受容体を用いて、受容体に結合したアセチルコリンアナログ、特に(S)-methacholine と (2S,4R,5S)-muscarine の立体構造（C₁-C₂ 間の内部回転角）を NMR/TRNOE (Transferred Nuclear Overhauser Effect: 転移核オーバーハウザー効果) で決定した。最初は東大理学部武藤裕氏、後に理化学研究所の廣田洋氏の協力で行った。その結果、受容体結合時のアセチルコリンアナログは、二面角 O-C₂-C₁-N が +60° の *gauche* 型であり、非結合時のリガンドの構造（二面角 : +90°）が、約 30° 回転したものであると結論した。この受容体結合時の立体配座は、内部回転角が固定したアナログを用いた薬理学実験から予想されていた配座（二面角 O-C₂-C₁-N が +180° の *trans* 型）とは大きく異なっていた。リガンドの構造変化と受容体の構造変化が協奏的に起こるという可能性を推測した。

G タンパク質共役受容体のリガンド検索系を種々検討した。受容体と G タンパク質 α サブユニットとの融合タンパク質を発現させた Sf9 細胞膜標品を用いて、簡便にフルアゴニスト、部分アゴニスト、中性アンタゴニスト、インバースアゴニストを区別できることを示した。これらのリガンド添加で、この順に GDP に対する親和性が増加し、それをリガンド依存性 [³⁵S]GTP γ S 結合活性として測定できる。ノシセプチン受容体・G α 融合タンパク

質というモデル受容体を用いて、この系はオーファン受容体のリガンド検索にも応用可能であることを示した。2000年に明らかにされたヒトゲノム塩基配列から、新規Gタンパク質共役受容体342種(匂い、味、内在性リガンドの受容体に相同性を持つものそれぞれ281、11、50種)を同定した。内在性リガンドを持つと考えられる新規受容体(約30種)について、Gタンパク質alphaサブユニット(主にGi1、一部Gs)との融合遺伝子を作成し、そのリガンドを検索した。その中の1種、hGPCR48-Gi1 α に対して、5-oxo-ETE (eicosatetraenoic acid)が数nMでアゴニストとして働くことを見いだした。5-oxo-ETEは好中球や好酸球の走化性を誘起する。その反応が百日咳毒素感受性であることから、Gi/Goに共役した受容体の関与が推測されていたが、受容体は同定されていなかった。HGPCR48は好中球にも検出され、その濃度・応答関係からも、走化性に関与する受容体と考えられる。

コリン作動性神経に特異的に発現し、コリン取り込みを行う分子の存在は30年前から推測されていたが、その分子の実体は不明であった。コリン取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であり生理的に重要な過程である。1998年12月、線虫*C. elegans*のゲノムプロジェクトが発表されたので、その情報を利用して線虫のコリントランスポーターのクローニングを試み、成功した。引き続きラット及びヒトの相同分子(CHT1)をクローニングした。CHT1は神経伝達物質トランスポーターファミリーではなく、Na⁺/グルコーストランスポーターファミリーに属していた。ヒトCHT1を培養細胞に発現させて機能解析を行ったところ、コリンに対する親和性、阻害剤感受性、イオン依存性などの点で、シナプトゾーム画分のコリン取り込み活性と同様の性質をもっていることが確認された。CHT1 mRNAは予想通りコリン作動性神経に特異的に発現していた。都神経研の三澤日出巳氏、杏林大学小林靖氏との共同研究により、抗CHT1抗体を用いた免疫組織化学によりラット、サル、ヒト中枢神経系におけるCHT1発現分布を調べ、コリン作動性神経に限局していることを明らかにした。ヒトCHT1遺伝子の5'上流8kb以内にプロモーター活性が見られたが、この領域のみではコリン作動性神経特異的な発現を決めるのには不十分であった。これらの結果からCHT1は高親和性コリントランスポーターであると結論した。また、ヒトCHT1遺伝子に機能の異なる単一塩基多型(SNP)が存在することを明らかにした。細胞膜貫通部位の1つのアミノ酸がイソロイシンからバリンに変わることにより、コリン取り込み活性が野生型の60%になることが分かった。このSNPの発現頻度は人種間で異なっていたが、アルツハイマー病、レビー小体型痴呆、慢性疲労症候群などの病態との相関は見られなかった。

豊島グループ

G蛋白質結合型受容体の結晶化を支援するため、これ迄に実績のある筋小胞体Ca²⁺-ATPaseを例題として、膜蛋白質の結晶化の諸因子を検討した。特に不安定な膜蛋白質の結晶化を可能にするため、脂質を添加し電子顕微鏡レベルのチューブ状結晶からX線結

晶解析にかかる大きな三次元結晶の作製までを同時に視野にいれた方法の開発を行った。この方法は極めて有効であり例題とした Ca^{2+} -ATPase のみならず、今後の膜蛋白質の結晶化において重要な方法となるであろう。

中迫グループ

ムスカリン受容体の三次元結晶構造解析に向けて、(1)ムスカリン受容体三次元結晶化過程で析出する種々の凝集体についての極低温X線回折実験による評価、(2)低温X線回折実験基盤技術の開発・改善とそれを用いた蛋白質の結晶構造解析、(3)将来の受容体-信号伝達蛋白質間相互作用解析に不可欠な蛋白質水和構造の解析、を実施した。ムスカリン受容体結晶のX線回折の結果は前述した。

武藤グループ・廣田グループ

ムスカリン受容体に結合したアセチルコリンアナログの立体構造 (C1-C2 間の内部回転角) を TRNOE を用いて決定した。実験結果は前述した。

立元グループ

G タンパク質共役受容体のリガンド探索法として、受容体と G タンパク質 G16 の α サブユニット (G16 α) との融合タンパク質を CHO 細胞に発現させて、細胞応答を測定する方法を開発した。さらに、ヒトゲノム情報より得た受容体 THTR (11 種) 及び THTR と高い相同性を持つ受容体 T2R (11 種) について、上記の方法を用いてこれらの受容体に対するリガンドの探索を行った。

若松・窪田グループ

G 蛋白質が受容体によって活性化される機構は従来不明であったが、G 蛋白質 α サブユニットに良く保存されている塩橋を介して C 末端部分の構造変化が GDP 結合部位へと伝達されて、G 蛋白質の活性化が起こることを明らかにした。この活性化機構の解析中にムスカリン M4 性受容体の部分ペプチドが G 蛋白質 (Gi/Go) を特異的かつ強力に活性化することを見いだした。このペプチドは M4 受容体のミメティックとして有望である。また、受容体の NMR による構造解析を行うための基礎となる、脂質二重膜に結合したペプチドの構造解析および bicelle の構造解析を行った。

2. 研究構想

研究開始時に目指した目標・計画は下記の通りである。

「本研究の主眼は G タンパク質を介する遅い伝達系にある。脳内には多数の G タンパク質共役受容体が存在し、知・情・意などの脳機能全般にわたり重要な働きを行っている。個々の受容体の役割を知るためには特異的なリガンドが必要であるが、これらリガンドを

理論的に知るすべは現在はない。だが、もし受容体の高次立体構造がわかれば、その構造から特異的リガンドを推測できる可能性が飛躍的に増大する。そこで我々は、当研究室が研究の最先端にいるムスカリン性アセチルコリン受容体をモデルとし、その大量発現・精製系の確立、2次元結晶及び3次元結晶の作成、電子線結晶学やX線結晶学に基づく高次構造の決定を主目標とする。リガンドは水溶液中と受容体に結合した状態とではその構造が異なっていると推測されている。そこで、NMR/TRNOE(Transferred Nuclear Overhauser Effect)を用い、受容体に結合したリガンドの構造決定を行う。独立したアプローチとして、高感度のリガンドスクリーニングシステムの開発、それを用いたオリゴペプチドライブラリーの検索を行う。そこからムスカリン受容体に対する種々のペプチドの親和性スペクトラムおよび受容体に結合したペプチドの構造を決定し、その結果から特異的リガンドになりうる有機化合物を推論する。」

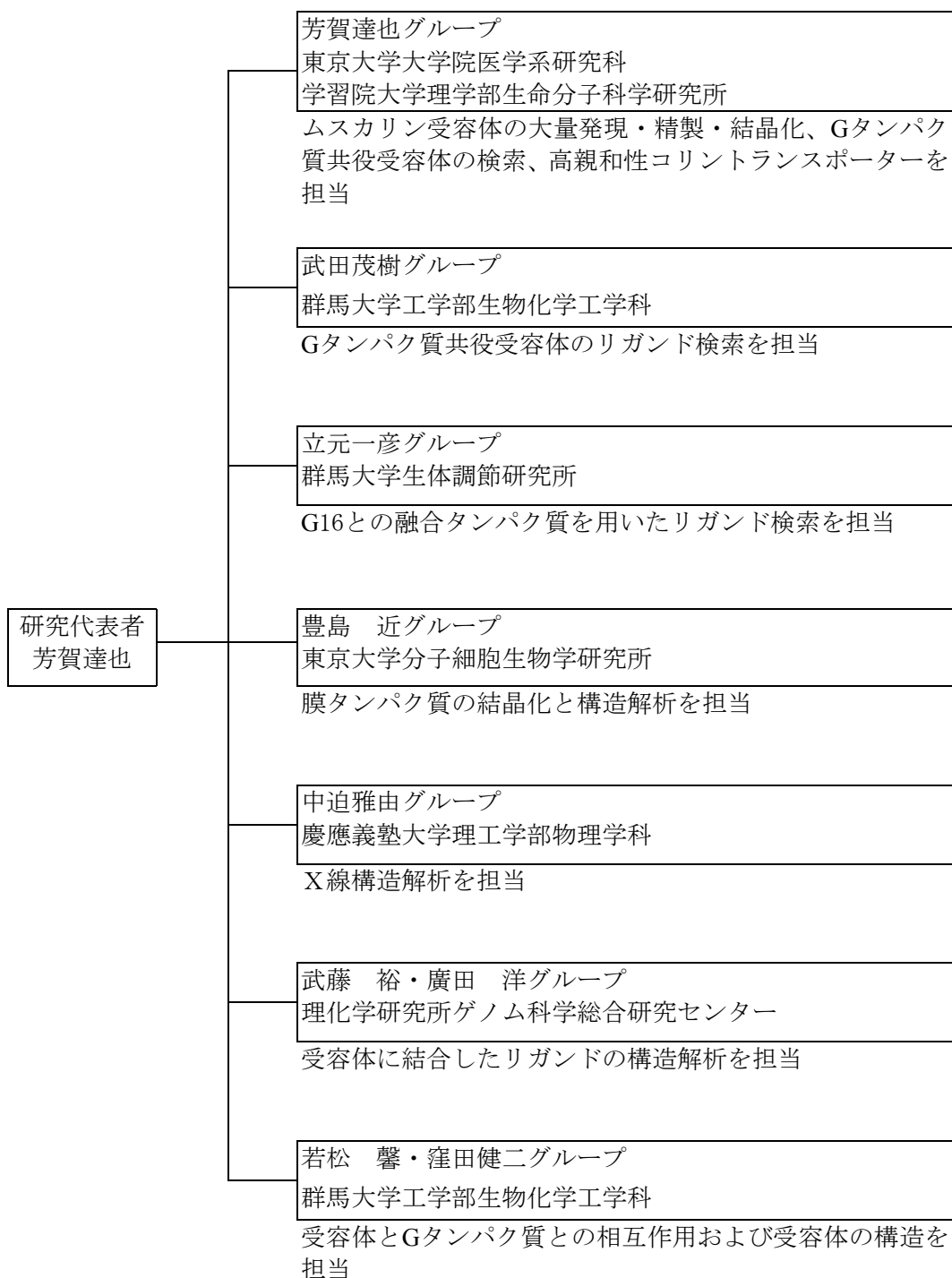
研究はこの計画に沿って進められた。ムスカリン受容体の大量発現・精製系を確立し、二次元結晶の作成には失敗したが、三次元結晶の作成に成功した。X線で回折点が観察されたが構造解析には不十分であり、結晶の質の向上が必要である。TRNOE法を用いてムスカリン受容体に結合したメタコリンとムスカリンの立体構造を決定した。結果は従来の予想と逆であった。この結果の解釈が興味深い。受容体・Gタンパク質複合体に結合したリガンドの構造の決定などが残された課題である。リガンド検索系としては、受容体・G α 融合タンパク質を主として検討した。将来結晶化の標的となることも考えての選択である。ランダムペプチドライブラリーから新規リガンドを見いだす試みは、ファージディスプレイ法で行った。ファージの先端にペプチドを発現した状態では特異的なリガンドと思われるものが見いだされたが、有機合成したペプチドでは活性が検出されなかった。理由は不明である。本研究計画の途中にヒトゲノム塩基配列の発表があった。これを受けて、既知受容体のサブタイプ特異的リガンドを見つける試みから、オーファン受容体の内在性リガンドを見いだす試みへと方針を転換した。ノシセプチン受容体・G α 融合タンパク質をモデル系として用いて、この系で脳抽出物中の内在性リガンド(この場合ノシセプチン)を検出可能なことを確認した。ヒトゲノムからGタンパク質共役受容体を検索する方法を考案した。得られた新規Gタンパク質共役受容体とG α との融合タンパク質を用いて、一つの受容体の内在性リガンドを5 oxo-eicosatetraeic acidと同定した。内在性リガンド同定に受容体・G α 融合タンパク質が有効であることを示している。当初の研究課題から少し離れるが、高親和性コリントランスポーターの同定を本研究課題に加えることのできるを得た。トランスポーターは、受容体と同様、これから立体構造を決定すべき膜タンパク質で、神経系における最重要ターゲットの一つである。線虫のゲノムを利用して同定に成功した。ラット、ヒトのコリントランスポーターも同定した。予想通り、コリン作動性神経に特異的に発現していた。ヒトで、活性が60%の単一塩基変異体(SNP, Single Nucleotide Polymorph)を見いだした。

二次元結晶の作成には豊島近氏の指導を受けた。一度結晶様生成物ができ、光回折で数

個の回折点が観察されたが、この結晶の生成は再現的でなかった。豊島氏は、本研究期間中に、自身のテーマである Ca-ATPase の結晶化に成功した。ムスカリン受容体の結晶様構造物及び結晶の X 線回折は中迫雅由氏にお願いした。武藤裕氏と廣田洋氏には NMR/TRNOE の測定と結果の解釈で協力頂いた。実際の実験は芳賀グループの古川浩康氏と廣田グループの濱田季之氏によって行われた。武田茂樹氏は本研究計画の最初からリガンド検索プロジェクトの主要メンバーである。最後の一年は独立したが、研究は密接な協力の下に行った。立元一彦氏と須賀比奈子氏には最後の一年、受容体・G16 融合タンパク質を細胞に発現する系の構築で協力を頂いた。若松馨氏と窪田健二氏は、ムスカリン受容体が大腸菌で大量に発現させ、G タンパク質と相互作用する受容体中のアミノ酸残基を同定する計画であった。実際は、大腸菌での発現量が不十分で、受容体の部分ペプチドと G タンパク質の相互作用に焦点を絞った研究が行われた。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. ワークショップシンポジウム

実績なし

5. 主な研究成果

(1) 論文発表

芳賀グループ

1. Haga, K., Tsuga, H., Haga, T.: Ca^{2+} -dependent inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 by calmodulin. *Biochemistry*, 36, 1315-1321 (1997)
2. Ebihara, T., Saffen, D.: Muscarinic acetylcholine receptor-mediated induction of zif268 mRNA in PC12D cells requires protein kinase C and the influx of extracellular calcium. *J. Neurochem.*, 68, 1001-1010 (1997)
3. Hayashi, M. K., Haga, T.: Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Arch. Biochem. Biophys.*, 340, 376-382 (1997)
4. Mieda, M., Haga, T., Saffen, D. W.: Expression of the rat m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is regulated by the neuron-restrictive silencer element/repressor element 1. *J. Biol. Chem.*, 272, 5854-5860 (1997)
5. Haga, T. Receptor Biochemistry. In, Meyers, R. A., ed., VCH (1997)
6. Haga, K., Ogawa, H., Haga, T. Murofushi, H.: GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur. J. Biochem.*, 255, 363-368 (1998)
7. Tsuga, H., Okuno, E., Kameyama, K., Haga, T.: Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284, 1218-1226 (1998)
8. Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Honma, T., Lamah, J., Sadee, W.: Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 273, 5323-5330 (1998)
9. Shui, Z., Khan, I. A., Tsuga, H., Haga, T., Boyett, M. R.: Role of receptor kinase in short-term desensitization of cardiac muscarinic K^+ channels expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Physiol.*, 507, 325-334 (1998)
10. Jakubik, J., Haga, T., Tucek, S.: Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-gamma-[35S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/Go protein stoichiometry. *Mol. Pharmacol.*, 54, 899-906 (1998)
11. Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T.: Desensitization of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes is caused by their sequestration/internalization. *J. Biochem. (Tokyo)*, 124, 863-868 (1998)
12. Haga, T., Berstein, G.: G protein-coupled receptors (London, New York, Washington D.C., CRC Press) (1999)
13. Kumahara, E., Ebihara, T., Saffen, D.: Nerve growth factor induces zif268 gene expression via MAPK-dependent and -independent pathways in PC12D cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 125, 541-553 (1999)
14. Saffen, D., Mieda, M., Okamura, M., Haga, T.: Control elements of muscarinic receptor gene

- expression. *Life Sci.*, 64, 479-486 (1999)
15. Ito, K., Haga, T., Lameh, J., Sadee, W.: Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur. J. Biochem.*, 260, 112-119 (1999)
 16. Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, A., Hirono, J., Sato, T., Sakano, H., Haga, T.: Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *PNAS*, 96, 4040-4045 (1999)
 17. Kumahara, E., Ebihara, T., Saffen, D.: Protein kinase inhibitor H7 blocks the induction of immediate-early genes *zif268* and *c-fos* by a mechanism unrelated to inhibition of protein kinase C but possibly related to inhibition of phosphorylation of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 274, 10430-10438 (1999)
 18. Shibasaki, T., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Sakamoto, A., Masaki, T., Ito, K., Haga, T., Kimura, S.: Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47, 569-577 (1999)
 19. Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K., Haga, T.: Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur. J. Biochem.*, 263, 596-602 (1999)
 20. Shiozaki, K., Iseki, E., Uchiyama, H., Watanabe, Y., Haga, T., Kameyama, K., Ikeda, T., Yamamoto, T., Kosaka, K.: Alterations of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in diffuse lewy body disease: relation to Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 67, 209-213 (1999)
 21. Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., Katsura, I.: Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.*, 3, 120-125 (2000)
 22. Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K., Shibasaki, T., Zhou, J., Ishida, J., Fukamizu, A., Haga, T., Sekiya, S., Kimura, S.: RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling. *Int. J. Mol. Med.*, 5, 335-340 (2000)
 23. Furukawa, H., Haga, T.: Expression of functional M2 muscarinic acetylcholine receptor in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 127, 151-161 (2000)
 24. Ogawa, H., Haga, T., Toyoshima, C.: Soluble P-type ATPase from an archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *FEBS Lett.*, 471, 99-102 (2000)
 25. Hirabayashi, T., Saffen, D.: M1 muscarinic acetylcholine receptors activate *zif268* gene expression via small G-protein Rho-dependent and lambda-independent pathways in PC12D cells. *Eur. J. Biochem.*, 267, 2525-2532 (2000)
 26. Okuda, T., Haga, T.: Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.*, 484, 92-97 (2000)
 27. Kassack, M. U., Hogger, P., Gschwend, D. A., Kameyama, K., Haga, T., Graul, R. C., Sadee, W.: Molecular modeling of G-protein coupled receptor kinase 2: docking and biochemical evaluation of inhibitors. *AAPS Pharm.Sci.* 2: E2 (2000)
 28. Shui, Z., Khan, I. A., Haga, T., Benovic, J. L., Boyett, M. R.: Control of the cardiac muscarinic K⁺ channel by beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.*, 276, 11691-11697 (2001)
 29. Furukawa, H., Haga, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Hamada, T., Hirota, H.: Conformation of (S)-methacholine bound to the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Life Sci.*, 68, 22-23

- (2001)
30. Zhang, L., Saffen, D.: Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J. Biol. Chem.*, 276, 13331-13339 (2001)
 31. Guo, Z. D., Suga, H., Okamura, M., Takeda, S., Haga, T.: Receptor-G α fusion proteins as a tool for ligand screening. *Life Sci.*, 68, 2319-2327 (2001)
 32. Guo, F. F., Kumahara, E., Saffen, D.: A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M1 muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J. Biol. Chem.*, 276, 25568-25581 (2001)
 33. Shiina, T., Arai, K., Tanabe, S., Yoshida, N., Haga, T., Nagao, T., Kurose, H.: Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 276, 33019-33026 (2001)
 34. Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Nagao, M., Okuda, T., Haga, T.: Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 105, 87-98 (2001)
 35. Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., Touhara, K.: Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J. Neurosci.*, 21, 6018-6025 (2001)
 36. Haga, T., Haga, K., Kameyama, K., Tsuga, H., Yoshida, N.: Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Methods Enzymol.*, 343, 559-577 (2002)
 37. Kobayashi, Y., Okuda, T., Fujioka, Y., Matsumura, G., Nishimura, Y., Haga, T.: Distribution of the high-affinity choline transporter in the human and macaque monkey spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 317, 25-28 (2002)
 38. Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., Mitaku, S.: Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.*, 520, 97-101 (2002)
 39. Shui, Z., Khan, I. A., Tsuga, H., Dobrzynski, H., Haga, T., Henderson, Z., Boyett, M. R.: Role of receptor kinase in long-term desensitization of the cardiac muscarinic receptor-K⁺ channel system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283, H819-828 (2002)
 40. Tsuga, H., Haga, T., Honma, T.: Effects of toluene exposure on signal transduction: toluene reduced the signaling via stimulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes in CHO cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 89, 282-289 (2002)
 41. Takeda, S., Yamamoto, A., Haga, T.: Identification of G protein-coupled receptor for 5-oxo-eicosatetraenoic acid. *Biomed. Res.*, 23, 101-108 (2002)
 42. Kasahara, T., Okano, T., Haga, T., Fukada, Y.: Opsin-G11-mediated signaling pathway for photic entrainment of the chicken pineal circadian clock. *J. Neurosci.*, 22, 7321-7325 (2002)
 43. Furukawa, H., Hamada, T., Hayashi, M. K., Haga, T., Muto, Y., Hirota, H., Yokoyama, S., Nagasawa, K., Ishiguro, M.: Conformation of ligands bound to the muscarinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.*, 62, 778-787 (2002)
 44. Nakagawa, M., Orii, H., Yoshida, N., Jojima, E., Horie, T., Yoshida, R., Haga, T., Tsuda, M.: Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *Eur. J. Biochem.*, 269, 5112-5118 (2002)

武田グループ

1. Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., Mitaku, S.: Identification of G protein-coupled

- receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.*, **520**, 97-101 (2002)
2. Takeda, S., Yamamoto, A., Haga, T.: Identification of G protein-coupled receptor for 5-oxo-eicosatetraenoic acid. *Biomed. Res.*, **23**, 101-108 (2002)

豊島グループ

1. Toyoshima, C.: Three-dimensional cryo-electron microscopy of calcium ion pump. In *MEMBRANE PROTEINS: structure, function and expression control*, Hamasaki, N., and Mihara, K., eds., Kyushu University Press, pp. 247-255 (1997)
2. Yonekura, K., Stokes, D. L., Sasabe, H., Toyoshima, C.: The ATP-binding site of Ca^{2+} -ATPase revealed by electron image analysis. *Biophys. J.*, **72**, 997-1005 (1997)
3. Toyoshima, C., Ogawa, H.: Cryo-electron microscopy of ion channels and pumps. In *Progress in Cell Research*, Elsevier Science, pp. 63-73(1997)
4. Toyoshima, C., Tani, K.: Electron crystallography of thin protein crystals. In *Electron Microscopy 1998*, Benavides, H. A. C., and Yacamán, M. J., eds. Bristol and Philadelphia, Institute of Physics Publishing, pp. 395-396 (1998)
5. Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M., Stokes, D. L.: Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature*, **392**, 835-839 (1998)
6. Ogawa, H., Stokes, D. L., Sasabe, H., Toyoshima, C.: Structure of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum: a view along the lipid bilayer at 9-Å resolution. *Biophys. J.*, **75**, 41-52 (1998)
7. Mayanagi, K., Ishikawa, T., Toyoshima, C., Inoue, Y., Nakazato, K.: Three-dimensional electron microscopy of the photosystem II core complex. *J. Struct. Biol.*, **123**, 211-224 (1998)
8. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H.: Three-dimensional structural study of Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. In *Na/K-ATPase and Related ATPases*, Taniguchi, K., and Kaya, S., eds., Elsevier, pp. 193-196(2000)
9. Hirose, K., Henningsen, U., Schliwa, M., Toyoshima, C., Shimizu, T., Alonso, M., Cross, R. A., Amos, L. A.: Structural comparison of dimeric Eg5, *Neurospora* kinesin (Nkin) and Ncd head-Nkin neck chimera with conventional kinesin. *EMBO J.*, **19**, 5308-5314 (2000)
10. Inesi, G., Toyoshima, C.: The Ca^{2+} pump of sarco- and endoplasmic reticulum membranes. In *Calcium Homeostasis*, Carafoli, E., and Krebs, J., eds. Berlin, Springer-Verlag, pp. 143-154(2000)
11. Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H., Toyoshima, C.: Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca^{2+} binding and catalytic activation in the Ca^{2+} transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, **39**, 8758-8767 (2000)
12. Hua, S., Inesi, G., and Toyoshima, C. Distinct topologies of mono- and decavanadate binding and photo-oxidative cleavage in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 30546-30550 (2000)
13. Ogawa, H., Haga, T., and Toyoshima, C. Soluble P-type ATPase from an archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *FEBS Lett.*, **471**, 99-102 (2000)
14. Yonekura, K., and Toyoshima, C. Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. III. Solvent flattening. *Ultramicroscopy*, **84**, 29-45 (2000)
15. Yonekura, K., and Toyoshima, C. Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. II. Averaging of tubular crystals of different helical classes. *Ultramicroscopy*, **84**,

15-28 (2000)

16. Toyoshima, C. Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. I. Indexing of diffraction patterns. *Ultramicroscopy*, 84, 1-14 (2000)
17. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H.: Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405, 647-655 (2000)
18. Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G., and Toyoshima, C. The role of the M6-M7 loop (L67) in stabilization of the phosphorylation and Ca²⁺ binding domains of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *J. Biol. Chem.*, 276, 15232-15239 (2001)
19. Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., Toyoshima, C.: ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin. *FEBS Lett.*, 489, 277-282 (2001)
20. Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., Toyoshima, C.: Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in E₁P and E₁ATP states: a limited proteolysis study. *FEBS Lett.*, 505, 129-135 (2001)
21. Moller, J. V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B. S., Champeil, P.: Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Role of the A domain and its C-terminal link with the transmembrane region. *J. Biol. Chem.*, 277, 38647-38659 (2002)
22. Hua, S., Inesi, G., Nomura, H., Toyoshima, C.: Fe²⁺-catalyzed oxidation and cleavage of sarcoplasmic reticulum ATPase reveals Mg²⁺ and Mg²⁺-ATP sites. *Biochemistry*, 41, 11405-11410 (2002)
23. Hua, S., Ma, H., Lewis, D., Inesi, G., Toyoshima, C.: Functional role of “N” (nucleotide) and “P” (phosphorylation) domain interactions in the sarcoplasmic reticulum (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 41, 2264-2272 (2002)
24. Toyoshima, C., Nomura, H.: Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418, 605-611 (2002)

中迫グループ

1. Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., Yohda, M., Kamiya, N., Endo, I.: Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. *Nat. Struct. Biol.*, 5, 347-351 (1998)
2. Nakasako, M., Motoyama, T., Kurahashi, Y., Yamaguchi, I.: Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibition. *Biochemistry*, 37, 9931-9939 (1998)
3. Yamaguchi, I., Motoyama, T., Nakasako, M.: Molecular action mechanism of nonfungicidal anti-blast chemicals. *Reviews in Toxicology*, 2, 225-230 (1998)
4. Nakasako, M., Kimura, M., Yamaguchi, I.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of blasticidin S deaminase from *Aspergillus terreus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55 (Pt 2), 547-548 (1999)
5. Sato, H., Takeda, K., Tani, K., Hino, T., Okada, T., Nakasako, M., Kamiya, N., Kouyama, T.: Specific lipid-protein interactions in a novel honeycomb lattice structure of bacteriorhodopsin.

- Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 55 (Pt 7), 1251-1256 (1999)
6. Nakasako, M.: Large-scale networks of hydration water molecules around bovine beta-trypsin revealed by cryogenic X-ray crystal structure analysis. *J. Mol. Biol.*, 289, 547-564 (1999)
 7. Nakasako, M., Takahashi, H., Shimba, N., Shimada, I., Arata, Y.: The pH-dependent structural variation of complementarity-determining region H3 in the crystal structures of the Fv fragment from an anti-dansyl monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.*, 291, 117-134 (1999)
 8. Nakasako, M., Odaka, M., Yohda, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, N., Endo, I.: Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme. *Biochemistry*, 38, 9887-9898 (1999)
 9. Higuchi, S., Nakasako, M., Kudo, T.: Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of hyperthermostable glutamate dehydrogenase from *Thermococcus profundus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 55, 1917-1919 (1999)
 10. Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Vassilyev, D.V., Sugiura, I., Kuwabara, S., Tateno, M., Nakasako, M., Moras, D., Konno, M., Yokoyama, S.: Functional structures of class-I aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA Biochemistry and Biotechnology*, pp149-158 (1999)
 11. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H.: Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405, 647-655 (2000)
 12. Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H., Toyoshima, C.: Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca²⁺ binding and catalytic activation in the Ca²⁺ transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 39, 8758-8767 (2000)
 13. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H.: Three-dimensional structural study of Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. In *Na/K-ATPase and Related ATPases*, Taniguchi, K., and Kaya, S., eds., Elsevier, pp. 193-196 (2000)
 14. Endo, I., Nojiri, M., Tsujimura, M., Nakasako, M., Nagashima, S., Yohda, M., Odaka, M.: Fe-type nitrile hydratase. *J. Inorg. Biochem.*, 83, 247-253 (2001)
 15. Nakasako, M., Fujisawa, T., Adachi, S., Kudo, T., Higuchi, S.: Large-scale domain movements and hydration structure changes in the active-site cleft of unligated glutamate dehydrogenase from *Thermococcus profundus* studied by cryogenic X-ray crystal structure analysis and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*, 40, 3069-3079 (2001)
 16. Nakasako, M.: Large-scale networks of hydration water molecules around proteins investigated by cryogenic X-ray crystallography. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 47, 767-790 (2001)
 17. Nakasako, M., Sawano, M., Kawamoto, M.: Development of an open-flow cryostat utilizing helium gas. *The Rigaku J.*, 18, 47-53 (2001)
 18. Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H., Toyoshima, C.: Crystal structure analyses of membrane proteins: a case study for calcium pump from sarcoplasmic reticulum. *The Japanese Journal of Pharmacology* 85: Suppl. I, S1-1 (2001)
 19. Motoyama, T., Nakasako, M., Yamaguchi, I.: Crystallization of scytalone dehydratase F162A mutant in the unligated state and a preliminary X-ray diffraction study at 37 K. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58, 148-150 (2002)
 20. Nakasako, M., Sawano, M., Kawamoto, M.: An open-flow helium cryostat for cryogenic X-ray diffraction experiments. *Review of Scientific Instruments*, 73, 1318-1320 (2002)

21. Nakasako, M., Tsuchiya, F., Arata, Y.: Roles of hydration water molecules in molecular packing of the killer toxin from *Pichia farinosa* in its crystalline state investigated by cryogenic X-ray crystallography. *Biophys. Chem.*, 95, 211-225 (2002)
22. Nakasako, M. Structural characteristics in protein hydration investigated by cryogenic X-ray crystal structure analyses. *J. Biol. Phys.*, 28, 129-137 (2002)
23. Higo, J., Nakasako, M.: Hydration structure of human lysozyme investigated by molecular dynamics simulation and cryogenic X-ray crystal structure analyses: On the correlation between crystal water sites, solvent density, and solvent dipole. *J. Comput. Chem.*, 23, 1323-1336 (2002)
24. Joti, Y., Nakasako, M., Kidera, A., Go, N.: Nonlinear temperature dependence of the crystal structure of lysozyme: correlation between coordinate shifts and thermal factors. *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.*, 58, 1421-1432 (2002)

武藤・廣田グループ

1. Kim, I., Muto, Y., Inoue, M., Watanabe, S., Kitamura, A., Yokoyama, S., Hosono, K., Takaku, H., Ono, A., Kainosho, M., Sakamoto, H., Shimura, Y.: NMR analysis of the hydrogen bonding interactions of the RNA-binding domains of the *Drosophila* Sex-lethal protein with target RNA fragments with site-specific [3-15N]uridine substitutions. *Nucleic Acids Res.*, 25, 1565-1569 (1997)
2. Ito, Y., Yamasaki, K., Iwahara, J., Terada, T., Kamiya, A., Shirouzu, M., Muto, Y., Kawai, G., Yokoyama, S., Laue, E. D., Walchli, M., Shibata, T., Nishimura, S., and Miyazawa, T.: Regional polyesterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry*, 36, 9109-9119 (1997)
3. Inoue, M., Muto, Y., Sakamoto, H., Kigawa, T., Takio, K., Shimura, Y., Yokoyama, S.: A characteristic arrangement of aromatic amino acid residues in the solution structure of the amino-terminal RNA-binding domain of *Drosophila* sex-lethal. *J. Mol. Biol.*, 272, 82-94 (1997)
4. Chi, S. W., Muto, Y., Inoue, M., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Yokoyama, S., Choi, B. S., Kim, H.: Chemical shift perturbation studies of the interactions of the second RNA-binding domain of the *Drosophila* sex-lethal protein with the transformer pre-mRNA polyuridine tract and 3' splice-site sequences. *Eur. J. Biochem.*, 260, 649-660 (1999)
5. Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto, Y., Yokoyama, S.: Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature*, 398, 579-585 (1999)
6. Furukawa, H., Haga, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Hamada, T., Hirota, H.: Conformation of (S)-methacholine bound to the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Life Sci.*, 68, 22-23 (2001)
7. Furukawa, H., Hamada, T., Hayashi, M. K., Haga, T., Muto, Y., Hirota, H., Yokoyama, S., Nagasawa, K., Ishiguro, M.: Conformation of ligands bound to the muscarinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.*, 62, 778-787 (2002)

若松・窪田グループ

1. Hara, T., Kodama, H., Kondo, M., Wakamatsu, K., Takeda, A., Tachi, T., Matsuzaki, K.: Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. *Biopolymers*, 58, 437-446 (2001)

2. Wakamatsu, K., Takeda, A., Tachi, T., Matsuzaki, K.: Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles. *Biopolymers*, 64, 314-327 (2002)
3. Taya, K., Kubota, K., Ochiai, K., Wakamatsu, K.: Scattering study of assembled structure of phospholipid and detergent mixture. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 27, 605-608 (2002)

(2) 特許出願 (国内 5 件、海外 1 件)

① 国内

1. 発明者：芳賀達也、奥田隆志
発明の名称：高親和性コリントランスポーター
出願番号：特願平 11-368991
出願日：平成 11 年 12 月 27 日 (優先日平成 11 年 8 月 27 日)
2. 発明者：芳賀達也、武田茂樹、美宅成樹
発明の名称：新規 G タンパク質共役受容体
出願番号：特願 2001-34434
出願日：平成 13 年 2 月 9 日 (優先日平成 12 年 8 月 4 日)
3. 発明者：武田茂樹、芳賀達也
発明の名称：表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置
出願番号：特願 2000-250423 号
出願日：平成 12 年 8 月 22 日
4. 発明者：芳賀達也、須賀比奈子、立元一彦
発明の名称：G タンパク質共役受容体と G16 α との融合タンパク質を用いたリガンド探索法
出願番号：特願 2002-48850 号、
出願日：平成 14 年 2 月 25 日
5. 発明者：芳賀達也、武田茂樹、山本篤史
発明の名称：5-oxo-ETE 受容体タンパク質及びその遺伝子
出願番号：特願 2002-189777
出願日：平成 14 年 6 月 28 日 (優先日平成 14 年 5 月 31 日)

② 海外

1. 発明者：芳賀達也、奥田隆志
発明の名称：高親和性コリントランスポーターCHT1
国際出願番号：PCT/JP00/05545
整理番号：A001-05US (アメリカ)、A011-05CA (カナダ)、A011-05EP (イギリス、ドイツ、フランス、イタリア、スイス、スウェーデン)
出願日：平成 14 年 1 月 31 日