—Reviews—

G-CSF 受容体及び代謝型グルタミン酸受容体のリガンド認識機構

森川耿右

Ligand Recognition Mechanism of G-CSF Receptor and Metabotropic Glutamate Receptor

Kosuke MORIKAWA
Department of Structural Biology, Biomolecular Engineering Research Institute (BERI), 6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan

(Received July 29, 2002)

A three-dimensional view of ligand-receptor recognition at the atomic level is crucial to understand the molecular mechanism of receptor activation. This review describes the structure-function relationships of two receptors important for pharmaceutical science. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is the principal growth factor regulating the maturation, proliferation, and differentiation of the precursor cells of neutrophilic granulocytes. We have determined the crystal structure of G-CSF complexed to the BN-BC domains, the principal ligand binding region of the G-CSF receptor. In a novel oligomerization scheme, the two receptor domains complex in a 2 : 2 ratio to the ligand, with a noncrystallographic pseudo-two-fold axis through primarily the interdomain region and secondarily the BC domain. This first structural view of a gp130-type receptor-ligand complex presents a new molecular basis for cytokine-receptor recognition. The metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are key receptors in the modulation of excitatory synaptic transmission in the central nervous system. Three different crystal structures of the extracellular ligand-binding region (LBR) of mGluR1 have been determined, in a complex with glutamate and in two unliganded forms. They all showed disulfide-linked homo-dimers, of which the ''active'' and ''resting'' conformations are modulated through the novel dimeric interface by a packed α-helical structure. The bilobed protomer architectures flexibly change their domain arrangements between an ''open'' or ''closed'' conformation. Glutamate binding stabilizes both the ''active'' dimer and ''closed'' protomer in dynamic equilibrium. Four domain movements within the dimer affect the separation of the transmembrane and intracellular regions and thereby activate the receptor.

Key words——X-ray crystal structure; G-CSF-receptor recognition; metabotropic glutamate receptors-ligand recognition; receptor activation

はじめに

分子生物学的観点からは，どのような複雑で精緻な生命現象もDNAや蛋白質などの分子が主役となる厖大な化学反応の集積に他ならない．したがって，これらの分子の特異的認識機構を原子レベルで視覚化し，その構造的基礎を理解する研究は，薬学において重要な位置を占める．我々は，X線結晶構造解析を主な手段として，これらの問題に取り組み，それらの分子機構について種々の重要な知見を得た．ここでは，特に薬学に関係が深い，細胞表面における2種類の受容体分子とリガンド分子の認識機構の問題に焦点をあてる．具体的には，膜蛋白質である受容体分子がリガンド分子をどのように特異的に認識し，活性化され，シグナルが細胞外から細胞内に伝達されるか，立体構造の観点から，推論も交えて述べることにする．

1. G-CSF 受容体認識機構

我々の体の血液は，赤血球，白血球，結小板といった様々の血液細胞から構成されている．これらの細胞はすべて造血幹細胞と呼ばれる一種の細胞から異なる分化経路を経て作られたものである．生体内では，これらの様々な血液細胞が恒常性を維持できるように，細胞同志が互いに影響を及ぼし合うネットワークシステムが存在する．このネットワークにおけるシグナルの役割を果たす分泌蛋白質がサイト

生物分子工学研究所構造解析研究部（〒565-0874 吹田市古江台 6-2-3）
e-mail: morikawa@beri.or.jp
*本総説は，平成14年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである．

カインと総称される．G-CSF（Granulocyte Colony Stimulating Factor：顆粒球コロニー刺激因子）は好中球への分化を促進するサイトカインである．好中球は全白血球の 50—70％を占め，細菌感染の防御などの重要な役割を担っている．それゆえ，このサイトカインは，白血球の減少を防止する治療薬として注目されている．また，リガンド（G-CSF）と受容体の認識機構の解明は合理的医薬品設計の分子的基礎を確立する上で極めて重要である．この問題に対する直接的解答を得るため，我々は G-CSF と受容体の細胞外領域との複合体を結晶化し，X 線結晶解析によってそれらの認識機構を直接原子レベルで視覚化する研究に取り組んだ．

1-1. クラスⅠサイトカイン受容体ファミリー

サイトカイン及びその受容体は，特に受容体側のアミノ酸配列の相同性や機能ドメインの配置の類似性から，いくつかのクラスに分類される．クラスⅠのサイトカイン受容体ファミリーは，細胞外領域に WSXWS モチーフと，ジスルフィド結合を形成する保存された４つのシステイン残基を含む領域を共通にもっており，この領域はサイトカイン受容体相同領域（Cytokine Receptor Homologous Region）と呼ばれる．主に造血系や免疫系の細胞に作用するサイトカインはこのクラスに所属するが，サイトカイン分子間にアミノ酸配列の相同性はほとんど認められない．しかし，それらの立体構造は，共通して 4 本の α ヘリックスバンドル構造をもつことが知られており，進化論的には類縁の蛋白質と考えられる．G-CSF もこのクラスに所属しており，同じクラスの他のサイトカインと比較して，リガンドと受容体との分子認識機構にどのような共通性と違いがあるのか大きな興味がもたれていた．

我々が研究を始める前に，X 線結晶構造解析によって，約 180 アミノ酸からなる G-CSF は，他のサイトカイン分子と同様に 4 本 α ヘリックスバンドル構造をもつことが明らかとなっていた．[1] 一方，G-CSF 受容体は，分子量約 90 K の同一の膜蛋白質サブユニットが会合したホモ二量体構造を形成する．サブユニットの細胞外領域は，N 末端から免疫グロブリン様（Ig 様）ドメイン，CRH 領域，3 つのフィブロネクチンタイプⅢ様（FNⅢ様）ドメインから構成される．CRH 領域はさらに BN と BC の 2 つのドメインに分けられ，それぞれのドメインは単独で G-CSF を結合する能力をもっている．BN ドメインはクラスⅠサイトカイン受容体ファミリーに保存されている 4 つのシステイン（2 つのジスルフィド結合）を含み，BC ドメインは WSXWS モチーフをもっている．このように一次構造の観点から，CRH 領域はクラスⅠサイトカイン受容体ファミリーを特徴づける領域といえる．G-CSF の CRH 領域（gs-CRH）は，受容体分子の活性化に必要な最小の単位であることが，種々のドメインを欠損させた変異体の活性測定から示されている．さらに注目されることには，IL6 の受容体分子は 2 つの異なるポリペプチド鎖から構成されるヘテロの二量体構造をもつが，そのうちの 1 つの gp130 は一次構造上 G-CSF 受容体に顕著な相同性を示す．したがって，G-CSF と受容体の特異的相互作用は，少なくとも部分的に IL6 とその受容体の分子認識機構を反映しているものと推測される．このように，G-CSF と受容体の相互作用を原子レベルで解明することは薬学，医学また細胞生物学の観点から重要な研究課題となっている．

1-2. G-CSF とその受容体の複合体の結晶構造

G-CSF とその受容体の特異的認識機構を原子レベルで明らかにするため，我々は G-CSF と受容体の細胞外領域との複合体を結晶化し，X 線結晶解析によって原子レベルの分解能で立体構造決定するプロジェクトを開始した．まず，十分な G-CSF に対する結合活性を保持する gs-CRH について昆虫細胞の発現系を構築し，結晶化用組換え体標品を精製した．これを大腸菌発現系から調製されたヒト G-CSF 試料（キリンビール㈱からの供与）と混合し，複合体を調製した．ついで，種々の結晶化条件を検索し，X 線結晶構造解析可能な単結晶を得ることに成功した．[2] こうして，G-CSF と gs-CRH の複合体の立体構造が 2.8 Å 分解能で決定された．[3]

構造解析の結果は，生化学的解析から示唆されていた 2：2 の複合体形成を確認するものであった．G-CSF と gs-CRH の複合体の立体構造の全容を Fig. 1 に示す．gs-CRH を構成する BN と BC の各ドメインは，7 本の β ストランドからなる β サンドイッチ構造をとっている．これらのドメインは一本の主鎖からなる柔軟なヒンジで連結されており，全体的に L 字型構造を形成している．これとは対照的に，G-CSF は 4 本の α ヘリックスバンドル構造

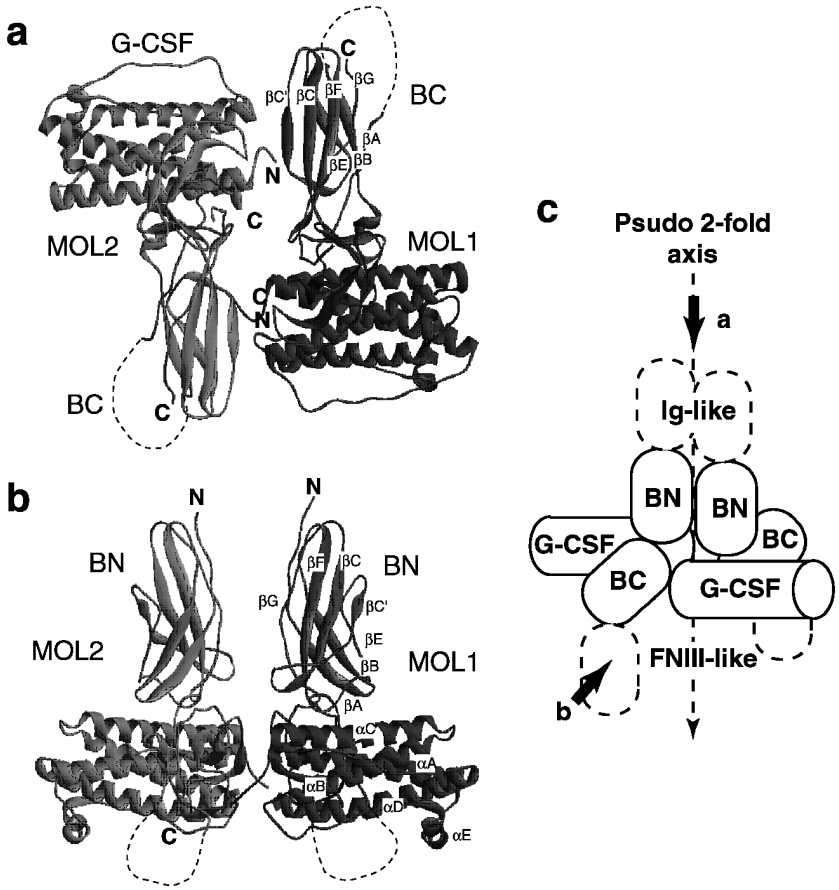

Fig. 1. The G–CSF:gs–CRH Complex

MOL1 and MOL2 are distinguished by dark and light ribbons, respectively. (a) and (b) : Orthogonal views of the 2 : 2 complex. (c) : Schematic drawing of the G–CSF:gs–CRH complex with the (a) and (b) perspectives denoted.

をとっており，この構造は受容体との結合の前後で大きくは違わない．G–CSF はヒンジ領域とその付近の BN と BC ドメインのループと広汎な接触をもっており，2 つのドメインに挟まれるような位置を占めている．この 1：1 複合体の主役となる接触領域は主結合領域（メジャーインターフェース）と命名された．G–CSF と受容体の相互作用はこの領域にだけ限定されている訳ではなく，この 1：1 複合体同志が偽 2 回軸で関係づけられるように会合し，2：2 の複合体を形成している．すなわち，G–CSF の N 末端領域と，別の 1：1 複合体に所属している BC ドメインの β ストランドの 1 つが分子間の β シート様構造を形成し，この相対的に小さな接触を通じて 2 つの 1：1 複合体が会合する．以下，この接触面は副結合領域（マイナーインターフェース）と命名し，2 つの 1：1 複合体分子をそれぞれ MOL1, MOL2 と呼ぶことにする．

マイナーインターフェースは他のサイトカインと受容体の複合体の結晶構造には見いだされてはおらず，G–CSF と受容体の複合体に特徴的である．また，2：2 複合体の形成に伴って，中心の偽 2 回軸に沿って直径約 10 Å のチャネルができる．このチャネル内部では，多数の水分子が水素結合のネットワークを形成しており，これらの水分子が 2：2 の複合体の安定化に一役買っていることは確からしい．これまでに述べてきた 2 つのインターフェースは結晶内の他の接触と比較して大きさにおいて際だっており，また，後述するように，相互作用の構造的様相が MOL1 と MOL2 の間で共通しているので，機能的にも重要なインターフェースであることは間違いない．

1-3. メジャーインターフェース gs–CRH 分子の L 字構造の角には BN と BC ドメインのループが集中する．この領域と G–CSF 分子の 2 つの α

ヘリックスとの間に広汎な分子間相互作用が観察される（Fig. 1）．このメジャーインターフェースの中心付近では水素結合ネットワークが形成されている．例えば，G-CSF のグルタミン 19 が BN ドメインのチロシン 172 及び BC ドメインのアルギニン 287 の両方と水素結合をしており，その他，水分子を介した水素結合も含めてリガンドと受容体分子の会合に重要な役割を果たしている．さらに，チロシン，アルギニン，リシン，グルタミン，グルタミン酸等の大きな側鎖が重なるようにファンデルワールス相互作用している部分が頻繁にみられる．これに類似した相互作用は成長ホルモン（GH）や赤血球の分化に関与するサイトカインのエリスロポイエチン（EPO）とそれらの各受容体との複合体においても観察され，[4,5] サイトカインと受容体間の認識に普遍的な結合様式なのかもしれない．

2 つの 1：1 複合体，MOL1 と MOL2 の立体構造は全体としてはほぼ同じであるが，厳密に検証するために 2 つの構造を重ね合わせてみると，分子の配向が若干異なることが解った．すなわち，G-CSF 分子が一致するように重ねると，BN ドメインはチロシン 172 を中心にして約 10 度，BC ドメインではロイシン 290 を中心にして約 8 度回転している．この回転に伴って，特に BN ドメインと G-CSF 分子との相互作用が MOL1 と MOL2 の間で変化する．また，BN と BC ドメインの相対的配向も約 3 度異なる．メジャーインターフェースでは，10 個の極性的相互作用が G-CSF の 6 残基と受容体の 7 残基の間に形成され，リガンドと受容体の各々 15 残基がファンデルワールス相互作用に関与する．MOL1 と MOL2 の接触面積はそれぞれ 840 Å と 800 Å でほぼ同じである．

1-4. マイナーインターフェース　メジャーインターフェースを通じて形成された 2 つの 1：1 複合体は，マイナーインターフェースによって高次の 2：2 複合体に束ねられる．このインターフェースの面積は 350 Å で，G-CSF の N 末端領域と BC ドメインの 1 つの β ストランドとの間の擬似的な逆平行 β シートの形成がこの接触面の主要な相互作用である．遊離型の G-CSF の結晶構造では，N 末端からセリン 8 までの領域が一定の構造をとっていないが，我々の複合体の結晶構造中ではグリシン 4 以降の構造が明確に観察される．したがって，グリシン 4 からセリン 8 までの領域は G-CSF との結合を通じて明確な構造をもつようになると結論される．これらの主鎖間の結合に加えて，側鎖が関与する水素結合，約 10 個のファンデルワールス相互作用，中央のチャネル中に形成される，水分子の水素結合ネットワークも，この 2：2 複合体の安定化に寄与するものと考えている．

マイナーインターフェースの面積は，結晶内のその他の接触に比べれば際だっているが，それ程大きいものではない〔Fig. 1 (a)〕．この接触が生理学的に意味のあるものか否かの検証が必要である．まず，単離された BC ドメインと G-CSF の溶液中の相互作用が NMR で既に解析されている．この解析ではロイシン 261 の NMR シグナルが G-CSF の添加に伴って大きく変化することが報告されている．[6] この残基はマイナーインターフェース中に位置しており，溶液中でマイナーインターフェースが結合に関与することは明らかである．また，G-CSF のアラニンスキャンニング変異体解析の結果，ロイシン 124 が生理活性に影響を及ぼすことが報告されているが，[7] 実際，このアミノ酸残基はマイナーインターフェース中で結合に寄与する．さらに，我々は別の結晶型の複合体構造も決定したが，マイナーインターフェースの構造的様相は保存されている．したがって，マイナーインターフェースは結晶学的な接触とは考え難く，シグナル伝達において意味のある相互作用であることが結論される．

1-5. 他の受容体構造との差異と類似性　メジャーインターフェースは，IL-4 とその受容体の 1：1 複合体のインターフェースと一致する．[8] GH とその受容体は有名な 1：2 複合体を形成し，2 つのインターフェースを通じて会合するが，相互作用が弱い方が我々のメジャーインターフェースと一致する．[9] また，メジャーインターフェースは，疎水性相互作用と水素結合がほぼ均等に存在し，IL-4 複合体の場合と類似している．対照的に，GH 複合体のインターフェースは中心に疎水性相互作用が存在し，周辺に極性的相互作用が分布している．この差異がどのような機能上の意味をもつかは不明である．

G-CSF 受容体は，一次構造上，IL-6 受容体の 1 つのサブユニットである gp-130 に最も顕著な類似性を示す．gp-130 の BN と BC を含む CRH 領域の

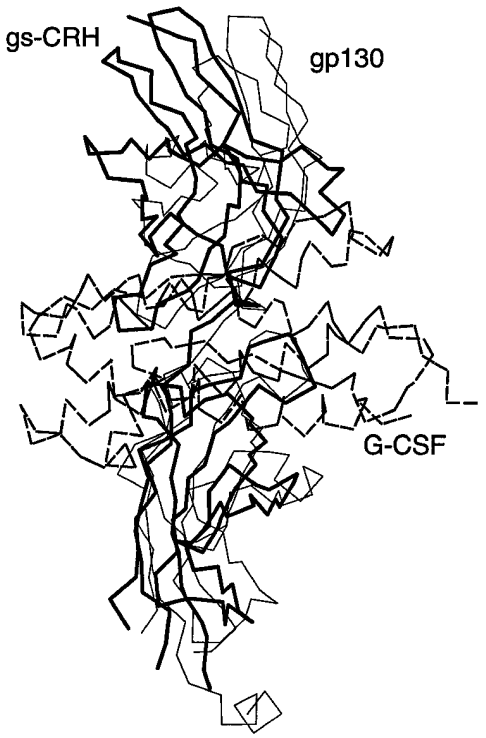

Fig. 2. Structural Comparison of the G-CSF:gs-CRH Complex and Ligand-Free gp130

Superposition of the MOL2 G-CSF:gs-CRH complex (thick solid line: broken line) and gp130 (thin line) after an alignment of the corresponding Ca atoms in the C-terminal domains of the receptors.

結晶構造に関しては，リガンドが結合していない遊離型についてのみ報告されている.[11] BN と BC ドメインの結晶構造を 2 つの受容体の間で比較すると，各ドメイン内部の主鎖構造は互いに類似しているが，2 つのドメイン間の相対的配向が 25 度程度異なっている（Fig. 2）．2 つの受容体の間で BC ドメインを重ね合わせてみると，クラスⅠのサイトカイン受容体ファミリーの指標となる WSXWS モチーフ付近の構造の差異が，ドメインの配向の違いを決定していることが解る．すなわち，gp-130 の場合は，WSXWS モチーフ部分とヒンジ領域にある L ストランドの主鎖同志が水素結合を形成しており，BN と BC ドメイン間の配向の自由度が制限されている．一方，gs-CRH では対応する相互作用は存在しない．さらに，ドメイン間の配向の決定に重要なグリシン 284 とリシン 285 に対応するものが，gs-CRH の場合，それぞれロイシン 290 とプロリン 291 であり，gs-CRH が gp-130 と同じ構造をとるとするならば，この領域に明白な立体障害が生じる．興味深いことには，これら 2 つのアミノ酸は，それぞれの分子種に完全に保存されている．以上の事実から，WSXWS モチーフとその N 末端側のループは CRH 領域のドメイン配向を決定する上で普遍的役割を果たしているように思われる．

1-6. G-CSF 受容体の活性化機構　サイトカインと受容体の分子認識機構については，我々の構造解析の前にもいくつかの重要な論文がある．最初の報告は，GH と受容体の細胞外領域との複合体の X 線結晶構造解析である.[4] この研究結果は非対称な GH 分子が細胞表面上で，同一の受容体サブユニット 2 分子を会合させることを示唆する画期的なものであった．この 1：2 の複合体構造は活性化機構を説明する上で極めて魅力的であり，その後，EPO とその受容体の結晶構造解析の結果も，類似の 1：2 の複合体形成を示したことから,[5]「サイトカイン 1 分子が受容体 2 分子を会合させることが，細胞外から細胞内へのシグナル伝達の本質である」という概念が一人歩きしたきらいがある．しかし，この活性化様式の普遍化が容易でないことは，2 種類以上の異なる蛋白質分子から構成される受容体が存在する事実からも明らかである．実際，G-CSF の受容体分子は，リガンドが存在しない時，ホモ 2 量体を形成し，G-CSF を加えていくと，2：2 あるいは 4：4 の化学量論比の複合体が形成されることが，生化学実験から示されている．

G-CSF やその受容体について，アラニンスキャンニング変異体解析が行われている．すなわち，様々なアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成し，その活性を調べた研究結果が報告されている.[7,10] これらの結果から示唆された活性に重要なアミノ酸を，我々の G-CSF と gs-CRH の複合体の立体構造の上にマップすると極めて興味ある知見が得られる（Fig. 3）．受容体側では，置換によって活性に大きな影響を与えるアミノ酸部位は，予想通りメジャーインターフェース中にマップされる．G-CSF 側では，活性に重要な残基はサイト 1 とサイト 2 と命名された全く別の領域にマップされる（Fig. 3）．サイト 2 はメジャーインターフェースとマイナーインターフェースの両方を含んでおり，結晶構造から得られた分子間相互作用の知見と一致する．驚いたことに，サイト 1 に分類されたアミノ酸残基は，我々の結晶構造の上では全く分子間相互作用に関与していない．サイト 1 に分類された 4 つの

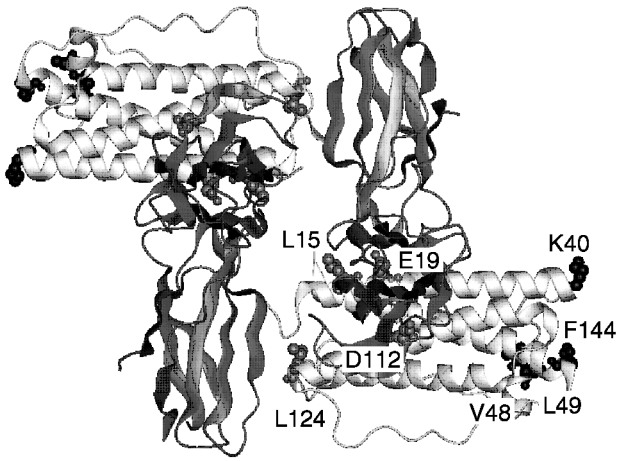

Fig. 3. Mapping of Active Residues on the Three Dimensional Structure of the G-CSF:gs-CRH Complex

The G-CSF and gs-CRH molecules are represented by light and dark ribbons, respectively. The residues, whose replacements by Ala influence activity, are indicated by their side chains. Note that Lys 40, Val 48, Leu 49, and Phe 114 are located in a region far from both of the major and minor interfaces, pointing their side chains to the solvent.

アミノ酸はすべてG-CSF分子の溶媒側に面しており，アラニンに置換することによって，G-CSF分子の立体構造が変形するとは考え難い．特に，その中3つは疎水性のアミノ酸であり，実際，機能的な接触面を構成している可能性は高い．それではこの矛盾はいかに説明されるのであろうか．これまでに報告されている生化学的な機能解析の結果を見直してみると，重要な事実に気がつく．すなわち，G-CSF受容体では，Ig様ドメインやFNⅢ様ドメインもある程度活性に関与しており，特にIg様ドメインの欠損は顕著な活性低下を引き起こすことが知られている.[11] さらに，Ig-BC-BNの3つのドメインからなるフラグメントはG-CSF分子と4：4の複合体を形成するという報告もある.[12] 以上の結果を総合的に考慮すると，以下のような分子認識機構が推測される．すなわち，G-CSF分子が存在しない時，未知のホモ2量体構造をとるであろう．ある濃度比において，G-CSFは我々の結晶構造にみられるような相互作用様式で受容体分子と結合し，受容体分子をかなりの程度活性化するであろう．しかし，実際の活性にはまだ達していない．ところが，Ig様ドメインとFNⅢ様ドメインが加わることによって，構造未知のG-CSFと受容体分子間に本来の十分なシグナル伝達機能をもつ4：4の複合体が形成される．この仮説を実証するためには，G-CSFとIg-BC-BNの3つのドメインを含むフラグメントとの複合体の結晶構造を決定することが必須であるが，これは今後の課題である．いずれにしても，クラスⅠサイトカイン受容体ファミリーに限っても，リガンドの認識様式はこれまで考えられてきた以上に多様であることは間違いないと思われる．

2. 代謝型グルタミン酸受容体・リガンド認識機構

グルタミン酸は高等動物の中枢神経系に作用する最も主要な神経伝達物質である．グルタミン酸受容体は神経細胞の細胞膜に局在する膜蛋白質であり，グルタミン酸の結合によって活性化され，シグナル伝達としての機能を発揮する．グルタミン酸受容体はイオンチャネル型（iGluR）と代謝型受容体（mGluR）に大別される．GluRはリガンド依存性のイオンチャネルであり，興奮性シナプスの伝達において神経細胞の脱分極に直接関与する．一方，mGluRは蛋白質の分類学上，7回膜貫通型G蛋白質共役受容体（GPCR）に所属し，iGluRとは本質的に異なる分子である．mGluRはリガンドに依存して，神経細胞におけるセカンドメッセンジャーであるホスホイノシチドやcAMPの代謝を変化させ，それを通じて興奮性シナプス伝達を調節する．mGluRは，記憶や学習の基礎的機構，脳虚血時の神経細胞死，精神分裂病やてんかん等の病態に深く関係しており，薬学，医学，細胞生物学の観点から最も注目されている膜蛋白質分子である．特に，医薬品設計の重要なターゲットであり，リガンドとmGluRの認識機構の原子レベルでの解明は長い間

待たれていた課題であった．

アミノ酸配列上異なる 8 つの mGluR サブタイプが報告されているが，これらは配列の相同性，アゴニストの選択性，結合するエフェクターの違いに基づいて 3 つのサブグループに分類される．また，mGluR はカルシウム受容体やフェロモン受容体などとアミノ酸配列が類似しており，mGluR ファミリーを形成している．

mGluR 分子はN末端からグルタミン酸を結合する細胞外領域（約 560 残基），7 回膜貫通領域（約 250 残基），及び細胞内領域（約 360 残基）に分けられる．細胞外領域はリガンド結合領域（LBR）と多数のシステインを含んだ約 70 残基の領域に分けられる．我々が結晶構造解析に着手する前に，LBR が大腸菌等原核生物のペリプラズム結合蛋白質（PBP）の 1 種であるロイシン–イソロイシン–バリン結合蛋白質，iGluR の細胞外領域，あるいは GABA 受容体と弱いながらも配列の類似性が認められていた．この一次構造の類似性に基づいて，細胞外ドメインの立体構造も既に多くの解析例があるペリプラズム結合蛋白質に類似していると推測する研究者もいたが，信頼を得るには至っていなかった．[13,14]

我々はサブタイプⅠ（mGluR1）の細胞外領域を可溶性蛋白質として発現，精製し，グルタミン酸等のリガンド分子が全長の mGluR1 蛋白質分子と同程度に結合することを確認した．[15] さらに，システインに富むドメインを欠失させてもこのリガンド結合には影響ないことも確認した．この生化学的研究から，mGluR1 分子は 2 量体を形成している事実も判明した．[16]

mGluR ファミリーは，非常に大きな細胞外領域（LBR）をもっており，膜貫通領域からは遠いこの領域に結合することによって，受容体分子を活性化する．この観点からは，膜貫通領域そのものにリガンド結合部位をもつ従来のロドプシン型 GPCR とは本質的に異なる．グルタミン酸のような低分子の結合が，mGluR 分子に対しどのような立体構造の変化を引き起こすのか大変興味ある問題である．我々はラットの mGluR1 の LBR（m1–LBR）分子を結晶化し，その結晶構造を 3 種の異なる状態で決定した．[17] 以下に，これらの構造をもとに，mGluR 分子の活性化機構について議論する．

2-1. X 線結晶構造解析と分子形状　m1–LBR の 3 種の結晶型の中，2 つはグルタミン酸が結合していない状態で，1 つはグルタミン酸が結合した状態で得られた．まず，2.2 Å 分解能の回折強度データを与えた結合型の構造解析に取り組み，多波長異常分散法を用いて位相を決定した．電子密度にあてはめられたモデルを精密化し，最終的に R 値 19.6％及び freeR 値 22.7％を得た．引き続いて，非結合型の 2 種類の結晶型の構造を，結合型分子の座標を用いる分子置換法によって決定した．精密化した結果，非結合型Ⅰは 3.7 Å 分解能で R 値 24.4％及び freeR 値 28.7％，非結合型Ⅱは 4.0 Å 分解能で R 値 25.4％及び freeR 値 32.8％を得た．このように，非結合型の解析はデータの分解能がやや低いが，ドメインの配置や，α- ヘリックスや β- シートの位置に関しては十分な精度をもっている．

m1–LBR の立体構造は生化学的解析の結果と一致して，二量体構造をとっている．すなわち，3 つの結晶型はどれも非対称単位中に二量体構造を 1 組含んでいる．1 つのプロトマーは多くの PBP 構造にみられるように，2 つのドメインからなる二枚貝状の外形を呈し，2 つのドメインの間の大きなクレフト中にグルタミン酸分子が結合している（Fig. 4）．リガンドの結合に関しては，m1–LBR は PBP と大局的に似ているが，大きな違いは，PBP は単一のプロトマーから構成されているのに対し，m1–LBR は 2 量体構造をとることである．事実，後述するように，この 2 量体構造が機能にとって重要な意味をもつ．興味深いことには，m1–LBR の形状は，プロトマーの内部構造とプロトマー間の構造の組み合わせで表現される（Fig. 4）．すなわち，プロトマー内構造は 2 つのドメイン LB1 と LB2 の相対配置で決定され，open 構造と closed 構造が存在する．一方，プロトマー間の構造は 2 つのプロトマー間の接触面の構造の違いによって決定され，R 構造と A 構造の 2 つの状態が存在する．これらの構造の組み合わせによって，m1–LBR の全体の形状は定まり，結合型は closed–open/A，非結合型Ⅰは open–open/R と表現される．非結合型Ⅱは微細な違いを別にして，結合型と同じ closed–open/A であるが，両方のプロトマー共グルタミン酸分子を全く結合していない．

2-2. 分子構造の概要　結合型及び非結合型の

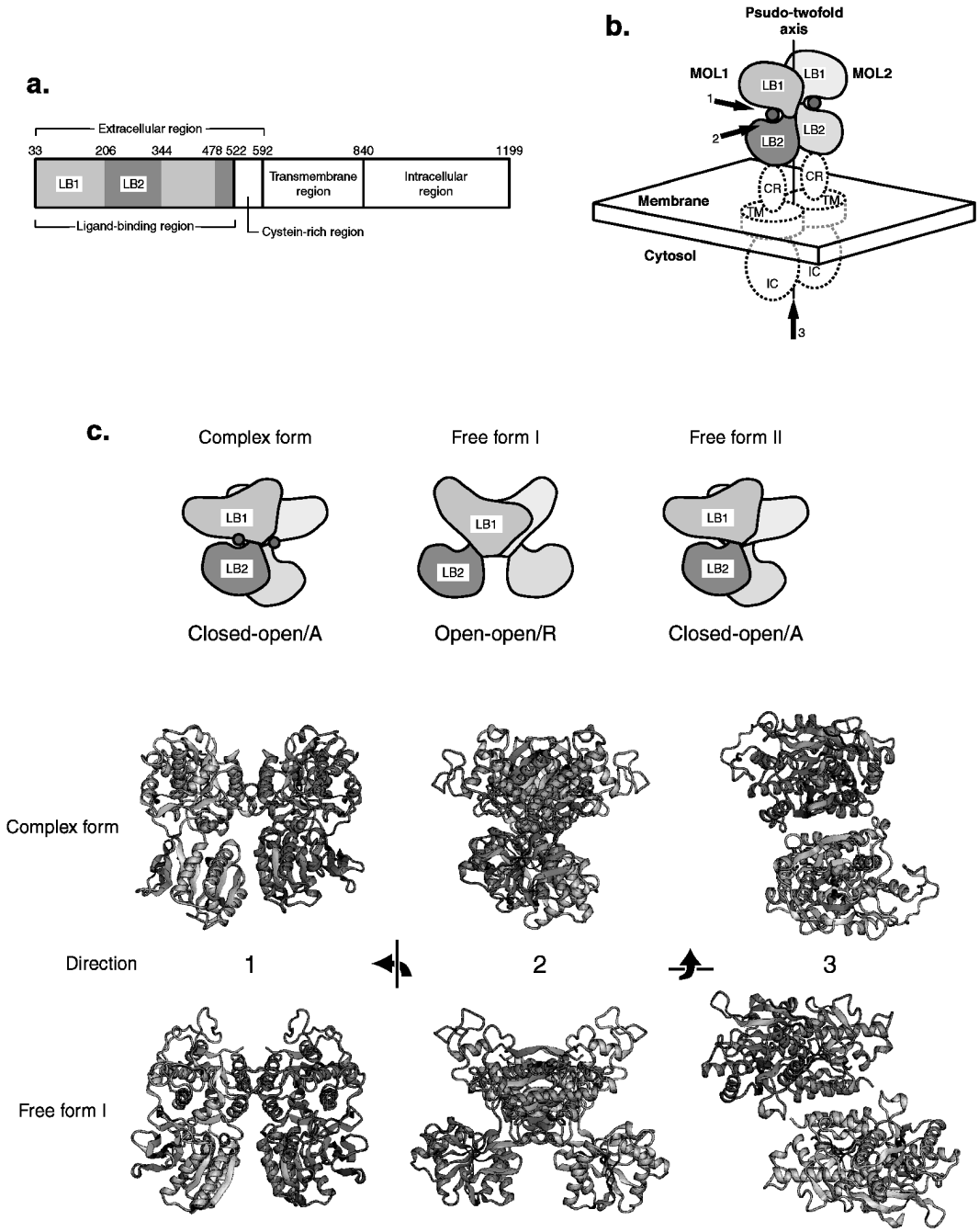

Fig. 4. The Crystal Structures of mGluR1 in the Liganded and Unliganded States

(a) Schematic diagram of full–length mGluR1. Functional regions are boxed. The LB1 and LB2 domains, which constitute a ligand binding region, are colored green and orange. Numerical positions of amino–acid residues are indicated according to the primary amino–acid sequence. Protein regions not determined in this study are indicated by open boxes. (b) Schematic drawing of the spatial arrangements of mGluR1 domains. The MOL1 and MOL2 molecules of the m1–LBR dimer are distinguished by dark and light coloring, respectively. The ligand, glutamate, is shown as yellow spheres. The cysteine–rich, transmembrane and intracellular regions are abbreviated as CR, TM and IC, respectively. (c) Schematic views of the m1–LBR dimer. Note that the molecular shape is determined by the two parameters of the intra–protomer and inter–protomer conformations. (d) Three orthogonal views of the dimer structures of the complex form and the free form I. Perspectives are denoted in (b) as arrows. Bound glutamate molecules are shown as yellow space–filling models. Disordered regions with a potential inter–subunit disulfide bridge are indicated by dotted lines. The B helix, constituting the dimer interface between subunits, is colored blue. Note that the spacing between two LB2 domains is much smaller in the complex form than in the free form.

どちらの結晶型においても，2 量体の接触面は N 末端側の LB1 ドメイン中に存在する．すなわち，LB1–LB1 ドメイン間の 2 量体相互作用のみで R 構造と A 構造の差異が決定される（Fig. 4）．LB2–LB2 ドメイン間に 2 量体相互作用が存在しない事実は，結合型の非対称な立体構造はプロトマー内構

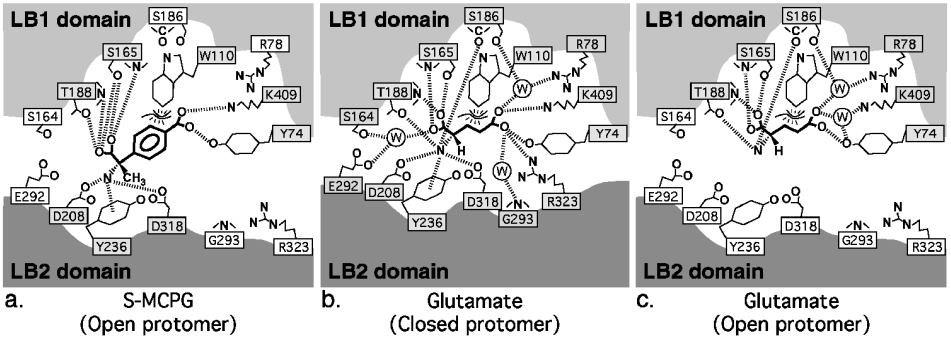

Fig. 5. Schematic Diagrams of the Recognition of S-MCPG (a) and Glutamate, Observed in both the Closed (b) and Open (c) Protomers of the Closed-Open/A Dimer

Yellow and blue boxes represent residues forming direct and water-mediated interactions, respectively, with the corresponding ligand. The bound water molecule is depicted by the circled "W". The recognition of each ligand is established by polar interactions (broken lines), and van der Waals interactions (with W110).

造（open-closed）とプロトマー間構造（R-A）が互いに無関係であることを示唆する．すなわち，結晶化の際，水溶液中には前述の2つのパラメータで規定される様々な立体構造が存在するが，たまたま各結晶型のパッキングに好都合なopen-open/Rやclosed-open/Aが結晶内の分子間相互作用を通じて固定されたと考えられる．

生化学的解析によって，mGluR1, mGluR5，カルシウム受容体のホモ2量体はジスルフィド結合によって架橋されていることが判っている．mGluR1ではCys140が分子間ジスルフィド結合をつくるが，この残基はBヘリックスのC末端側に存在する20残基以上の長い柔軟なループ（結晶中で構造が乱れている）中に位置している．したがって，このジスルフィド結合が構造の安定維持のための役割をもたないことは明らかである．我々は，細胞表面上で2量体の形成は機能に必須であり，そのために適切な実効濃度を維持する戦略ではないかと推測している．また，mGluRの異なるサブタイプ間での2量体形成は機能上不適切であるので，それを防ぐための戦略とも考えられる．

m1-LBRのプロトマー中のLB1とLB2ドメインは共にα/βトポロジーをもち，2つのドメインは3本のループからなるヒンジを通じてつながっている．解析前から予想されたとおり，この立体構造の特徴は，2量体と単量体の違いは別にして，PBPのそれとよく似ている．予期されなかったことは，LB1ドメインには結合したMg^{2+}が見いだされたことである．金属原子がMg^{2+}であることは，AヘリックスとCストランドの間のループに6配位で結合すること，電子密度の高さ，温度因子からまず間違いない．この金属の役割は不明であるが，2量体の接触面にも比較的近いので，その付近の立体構造を安定化する役割をもっているのかもしれない．

2-3. グルタミン酸結合部位　結合型の結晶構造では，グルタミン酸は両方のプロトマーに結合している．しかし，結合状態に著しい違いがある．Closedプロトマーは LB1とLB2の両ドメインがグルタミン酸と結合しているが，openプロトマーはLB1ドメインだけが結合に関与し，LB2ドメインとグルタミン酸との相互作用は全く存在しない〔Figs. 5(b) and 5(c)〕．結合したグルタミン酸の各原子の温度因子は2つのプロトマー間で違わないことから，LB1ドメインとの相互作用が主要な役割を果たしていると推測される．しかし，LB2ドメインにおいて結合に関与するアミノ酸残基はmGluRファミリーの中でよく保存されているので，機能の側面からは何らかの役割を果たしているに違いない．我々の解析前に，リガンドと相互作用するアミノ酸残基を同定するための変異体解析の結果が報告されているが，それらはすべてグルタミン酸と結合しており，矛盾は全くない．リガンドと相互作用する12の極性残基の中7つはmGluRファミリー内で保存されているが，残りの5つはサブグループⅠ内でのみ保存されている．

2-4. プロトマーの構造変換　LB1とLB2間の配向は2つのドメインをつなぐヒンジ領域の主鎖の構造変化と連動して大きく変化する．すなわち，LB1-LB2ドメイン間配置の変化はヒンジを横切る軸の回りの回転とみなすことができる．ここで，2

量体の各プロトマーを命名するため，より closed な構造をもつ方を MOL1，他方を MOL2 と呼ぶことにした．結合型の MOL1 と MOL2 を比較すると，LB1−LB2 ドメイン間の回転角の差異は 31 度である.[18] これは PBP のリガンド結合に伴う回転角よりも少し小さい値である．つぎに，3 つの結晶型中に存在する 2 つの closed プロトマーと 4 つの open プロトマーの構造を比較した．おもしろいことには，open 構造ではドメイン間の方位は 10 度程度まで大きくばらつきを示すが，closed 構造では 1 度以内で構造の差異が非常に小さいことが判った．この事実は，closed 構造はリガンドの結合によらず一定の立体構造を保持することを示している．この closed 構造の恒常性は，リガンド分子との相互作用を介さない LB1 と LB2 ドメイン間の直接的相互作用に依存している．この直接的接触面は，結合型と非結合型Ⅱに共通して MOL1 のリガンド結合部を取り囲むように存在しており，リガンド結合による露出表面積の減少分より大きい接触面積をもつ．我々は，この直接的接触面がリガンドの結合とは無関係に closed 構造のドメイン配置を決定する，と考えているが，その生理学的意義に関しては不明である．

2-5. 2 量体接触面の構造変換 LB1 ドメイン中の 2 量体接触面では，主にヘリックス B 及び C が各プロトマーにおいて層状構造を形成し，それらの面が細密充填するように相互作用している．R−A 構造変換は，この接触面内の 1 点を面に垂直に通る軸の回りの約 70 度の回転とみなすことができる (Fig. 4)．この角度は各面で 2 つのヘリックスがつくるパッキングの角度に対応しており，R−A 構造変換は接触面状での滑り回転だけで説明される．4 本の α ヘリックスが細密充填することによって 1 つの機能ドメインを構成することは蛋白質の世界では頻繁にみられるが，mGluR の場合は，通常のグロビンフォールドや 4 本ヘリックスバンドル等の例とは異なり，パッキングがずっと緩いように思われる．この緩いパッキングは，R−A 構造変換には適切なのかもしれない．また，B ヘリックスの C 末端側は定まった構造ももたない長い領域が隣接しているが，R 構造では B ヘリックスが 2 巻ほど C 末端側に伸びている．この部分は相手のプロトマーの B ヘリックスと相互作用し，R 構造に特有の 2 量体接触面を形成する．グルタミン酸が結合すると，接触面のこの部分は崩壊して乱れた構造に変化する．それと同時に，接触面上での滑り回転が起こって A 構造を形成する．

R 及び A 構造の接触面の面積は，それぞれ 906 Å と 793 Å であり，大差ない．また，ともに A 構造をもつ結合型と非結合型Ⅱにおける LB1 ドメイン間配置を比べると，差異は 3 度以下であり，2 量体接触面はある程度の堅さをもつことが解る．また，2 つの接触面は両方とも，回転の中心付近は疎水性相互作用のコアをもち，それを取り囲むように極性的相互作用が位置している．この疎水性コアを構成する残基は mGluR ファミリー内でよく保存されており，この接触面の普遍性を強く示唆する．

2-6. 2 量体構造の動的平衡 グルタミン酸が結合しているかいないかにかかわらず，ml−LBR が本質的に同じ closed−open/A の立体構造をとることが可能で，また，グルタミン酸が結合していないときには 2 種類の異なる立体構造，closed−open/A と open−open/A の両方を取り得るという事実は，水溶液中においてこれらの構造が動的平衡状態にあることを示唆する．しかも，種々の結晶化条件の検索結果，グルタミン酸存在下では closed−open/A の構造しか得られなかったという事実は，グルタミン酸の結合を通じて，動的平衡が closed−open/A 側に移行することを暗示している．

Open 構造と closed 構造の決定要因となるヒンジ領域とグルタミン酸結合部位は遠い距離にあるので，この構造変換はプロトマー間の R・A 構造変換と直接関係していないように見える．この仮定にたてば，理論上，open−open/R，closed−open/R，closed−closed/R，open−open/A，closed−open/A，closed−closed/A の 6 つの状態を取り得るはずである．実際，これらの構造が可能か否かを調べるため，今回観察された 2 つの構造以外の 4 つの構造についてコンピュータ・グラフィクス上でモデリングを行ったところ，予想通り立体障害なく 2 量体構造のモデルを組み立てることができた（Fig. 6）．この結果は前述の動的平衡仮説を強く支持するものである．

2-7. アンタゴニスト及び Gd・グルタミン酸の結合 我々の動的平衡仮説について更なる実験的根拠を得るため，最近，新たに 2 種の結晶構造を決定した.[19] 一方は，m1−LBR とアンタゴニスト，(S)

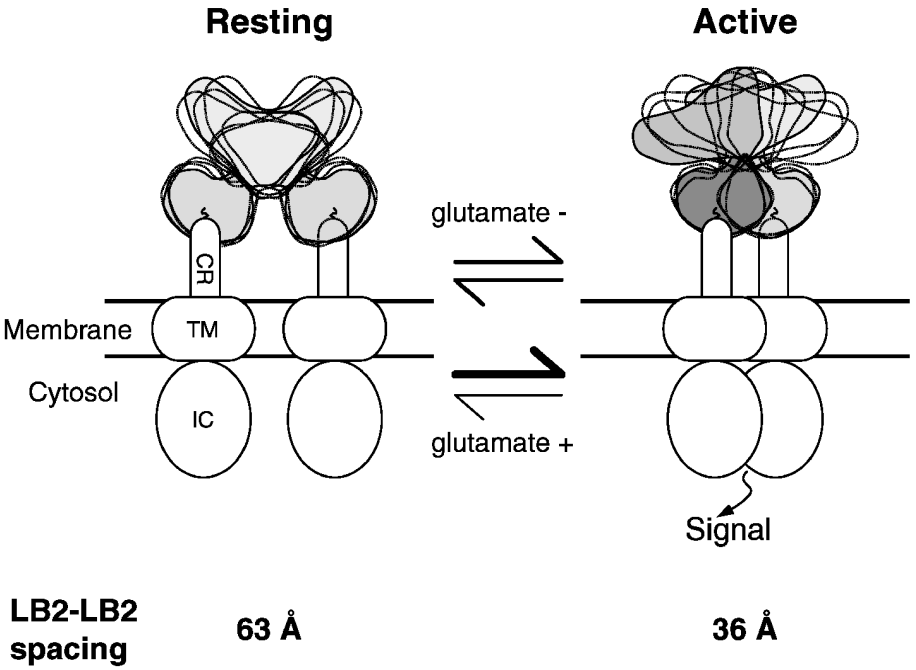

Fig. 6. Dynamic Eequilibrium of Various Conformers
The binding of glutamate increases the population of active states with the reduced LB2–LB2 spacing.

-(a)-methyl-4-carboxyphenyl-glycine (S-MCPG), との複合体の結晶構造で，3.3 Å 分解能データを用いて，R 値 25.7％及び free R 値 31.4％の値まで精密化された．

S-MCPG は立体異性体 R-MCPG が存在するが，R-MCPG は mGluR に結合できず，アンタゴニストとしての活性を全くもっていない．[20—22] 今回の解析によってこの理由も説明されることが期待された．実際には，結晶中の非対称単位中には 2 量体 1 分子が存在し，2 つのプロトマーは正確な非結晶学的 2 回軸で関係づけられていた．各プロトマーは open 構造をとっており，2 量体接触面は R 構造をとっていた．それゆえ，この対称的 2 量体は open-open/R と定義される．このように，アンタゴニストの結合が open-open/R 構造をとることは，我々の仮説から予測されたことであり，動的平衡仮説を支持する結果である．

S-MCPG はグルタミン酸と同様にドメイン間のクレフトに結合する（Fig. 5a）．LB1 ドメイン側ではセリン 156 を除いてグルタミン酸と相互作用する同じ残基が S-MCPG の認識に関与する．しかし，グルタミン酸を結合している open 構造とは違って，LB2 ドメインのアスパラギン酸 208，チロシン 236，アスパラギン酸 318 が S-MCPG と相互作用する．注目されることは，これらの 3 残基は closed 構造においてグルタミン酸の認識に関与していることである．この構造から，アンタゴニストの役割はクレフト中で両方のドメインとの相互作用を通じて，くさびのようにクレフトが閉じるのを妨げ，積極的に open 構造を維持することにある，と解釈できる．さらに，立体異性体 R-MCPG は立体障害なく S-MCPG と同じ位置を占めることはできるが，S-MCPG の場合と同じような相互作用を形成することはできない．それゆえ，mGluR との安定な複合体の形成は不可能と思われる．

もう一方の結晶構造は，グルタミン酸と Gd^{3+} の両方を結合した複合体で，これに関しては 4.0 Å 分解能の強度データを用いて精密化し，R 値 23.7％及び free R 値 25.9％を得た．Gd^{3+} 等の金属イオンを加えると，グルタミン酸による mGluR のシグナル伝達が変調されるとの報告がある．[23—26] それゆえ，Gd^{3+} 結合が活性化機構にどのような影響を及ぼすか，立体構造の観点から考察することは意味がある．m1-LBR の 2 量体は結晶学的 2 回軸で関係づけられており，2 つのプロトマーは全く同一の closed 構造をもつ．したがって，この 2 量体は

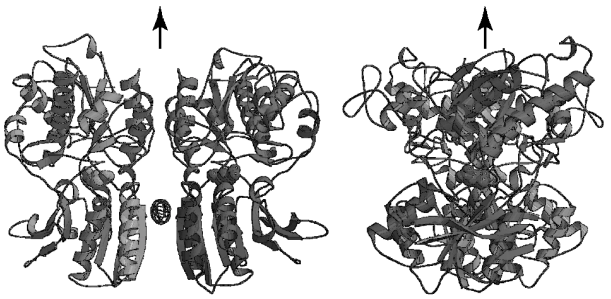

Fig. 7. Structure of m1–LBR Complexed with Glutamate and Gd^{3+} Ion, Viewed from Perpendicular (left) and Parallel (right) Directions to the Dimer Interface, with the Anomalous Difference Fourier Map (green; contoured at 5s)

The domain coloring is the same as in Fig. 4. The purple CPK model represents the bound glutamate. As the asymmetric unit contains one protomer, its symmetry mate, related by a crystallographic two-fold axis (black arrows).

closed–closed/A 構造と定義される（Fig. 6）.

異常分散効果に基づく差フーリエ図は 3 つの Gd^{3+} 部位を示した．この中 2 つはプロトマー間又はドメイン間の配置に影響するような位置ではない．しかし，2 回軸にのっている残りの部位は興味深い．すなわち，この部位付近のアミノ酸は，これまで気づかなかった第二のプロトマー間の接触面を形成していることが判明した（Fig. 7）．我々はこの接触面を LB2 接触面と呼ぶことにした．この接触面には 4 つの酸性アミノ酸が集中しており，そのうち 2 つの側鎖は Gd^{3+} に配位することを通じて，静電的反発力を軽減しているらしい．この事実は，Gd^{3+} が存在しない場合，この接触面の静電的反発力が原因で，**2-6.** 章で述べた 6 種の構造状態のあるものは取り得ない可能性を示唆する．6 種の状態における LB2 接触面の構造を詳細にみると，closed–open/A 構造と closed–closed/A 構造では LB2 接触面の中にリシン 260 が入り込み，静電的反発力を弱めていることが解った．勿論，closed–open/A 構造は，グルタミン酸が結合してさえいれば取り得るが，Gd^{3+} の結合はこの状態をさらに安定化するであろう．

我々は，LB2 接触面の役割をより確かなものとするために，エネルギー計算を行った．すなわち，2 量体各プロトマーについて，2 つのドメイン間の開き角を 5 度間隔で変化させ様々なモデルを組み立てる．このモデルをもとに非結合性エネルギーを静電ポテンシャルエネルギーとファンデルワールスエネルギーに分けて計算した．その結果，open–open/A 構造は closed–open/A 構造や closed–closed/A 構造よりも静電ポテンシャルエネルギーが 30 kcal/mol 程度高いことが判った．この計算結果は，LB2–LB2 接触が予想通り大きな反発力を生み出すことを示している．一方，ファンデルワールスエネルギーはどのモデルでも大きな違いはみられなかった．それゆえ，我々は open–open/A 構造だけが，静電反発力のために動的平衡の要素から排除されるものと考えている．

2-8. mGluR の活性化機構　理論上可能な 6 種の構造（open–open/R，closed–open/R，closed–closed/R，open–open/A，closed–open/A，closed–closed/A）を膜の内側から外側（Fig. 4 では下から上）に向かって眺めると 2 つの LB2 ドメイン間の距離が 63 Å と 36 Å の 2 つのグループに分かれることが判明した（Fig. 6）．不思議なことには，これらの 2 つの距離は，プロトマー内部の open–closed 構造変換には無関係であるが，プロトマー間の構造の違い，すなわち，A 構造か R 構造かに依存していることが解った．グルタミン酸が結合することによって mGluR は活性化されるので，結合状態の構造を A (activated) 構造，他方を R (resting) 構造と命名した．すなわち，活性化状態の A 構造では休止状態の R 構造と比べて，LB2 ドメイン間の距離が 27 Å ほど短くなる．サイトカインの 1 種 EPO による受容体の活性化機構を考えるとき，mGluR の LB2 ドメイン間の間隔の大小は非常に興味深い.[27,28] すなわち，EPO と受容体との複合体，遊離型受容体の X 線結晶構造解析の結果から，リガンドがホモ 2 量体の受容体分子に結合すると，細胞外ドメインの構造変化を通じて 2 つの細胞内ドメインの間隔が減少し，ドメインのリン酸化の効率が変化することが解っている．これがサイトカインの受容体活性化機構として最も受け入れられているモデルである．我々は，詳細は不明であるが，mGluR においても，LB2 ドメイン間の間隔の変化が 7 回膜貫通ドメインを通じて細胞内ドメインに伝わり，これがシグナル伝達の引き金になるものと推測している．

前章で述べたように，open–open/A は動的平衡の要素から排除されるので，活性化の機構の理解は，open–open/R，closed–open/R，closed–closed/R，

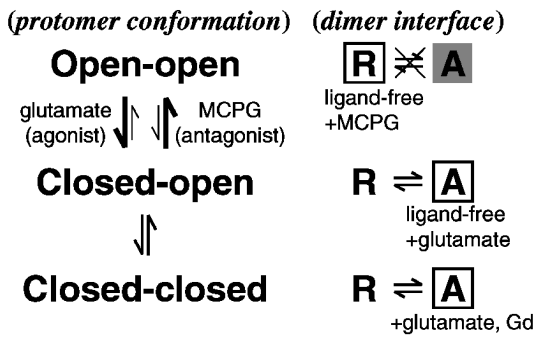

Fig. 8. An Equilibrium Model Proposed for m1–LBR

The open boxes indicate the states for which structures have been determined by X–ray crystallographic analyses. The shaded A conformer in the open–open combination forms an energetically unfavorable structure, due to the electrostatic barrier of the LB2 interface.

closed–open/A，closed–closed/A の 5 つの状態がグルタミン酸の結合に伴ってどのような平衡の移動が生ずるか，を説明することにかかっている．例えば，グルタミン酸のようなアゴニストが mGluR に結合すると，クレフトは閉じて open–open 2 量体の個体数は減少するであろう．open–open/A 構造は排除され，open–open/R 構造だけが許される条件下では，グルタミン酸の結合は open–open/R 構造の個体数を減少させ，相対的には A 構造の個体数が上昇するであろう（Fig. 8）．我々は，この A 構造の個体数の増加が mGluR の活性化に対応していると考えている．

それでは，LB1 接触面から遠く離れているクレフトへのグルタミン酸の結合は，どのようにして結合のシグナルを接触面に伝えるのであろうか？　この問題を調べるために，s–MCPG 複合体の open–open/R 構造をグルタミン酸複合体 closed–open/A 構造と重ねてみた．興味深いことには，LB1 ドメインの全体構造には有意な変化が観察されないが，グルタミン酸の結合に伴って C- ヘリックスが 0.5 Å だけ LB2 ドメインから離れるように移動していることが判った．この値は小さいが，隣接する B- ヘリックスの移動は 0.2 Å なので意味のある構造変化と考えられる．注目すべきことには，LB1 ドメインにおいても LB2 ドメインにおいてもすべての α- ヘリックスが N 末端側をリガンド側に接近させて配向している．長いヘリックスの N 末端側に正電荷が局在することはよく知られている事実であり，リガンドの結合は，LB1 ドメインと LB2 ドメイン中のヘリックスの双極子に由来する反発力を軽減する役割をもっているのかもしれない．

我々が提唱した動的平衡仮説は低分子のリガンドが受容体を活性化する機構として魅力的である．すなわち，サイトカインのように蛋白質分子がリガンドである場合は，受容体との接触面も大きく，相互作用も mGluR に比べてずっと大きいので決定論的な機構でシグナルを細胞外から細胞内に伝えることは可能であろう．しかし，同じ機構は結合定数も相対的に低くサイズも小さいグルタミン酸のような神経伝達物質には適用できない．リガンドの結合が動的平衡にある受容体分子の活性化状態を固定化することによって，相対的に活性化された分子の個体数を増加するという機構は，他の多くの受容体に適用可能と思われる．

謝辞　本研究は，主に生物分子工学研究所の構造解析部門の X 線グループによって行われたものであり，当グループのメンバー一同に感謝したい．また，代謝型グルタミン酸受容体・リガンド認識機構の研究は同研究所・機能解析部門・陣上久人グループとの共同研究であり，関係者に感謝の意を表したい．

REFERENCES

1) Hill C. P., Osslund T. D., Eisenberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5167–5171 (1993).
2) Aritomi M., Kunishima N., Okitsu N., Shimizu M., Ota Y., Morikawa K., *Acta Crystallogr.*, **D56**, 751–753 (2000).
3) Aritomi M., Kunishima N., Okamoto T., Kuroki R., Ota Y., Morikawa K., *Nature*, **401**, 713–717 (1999).
4) de Vos A. M., Ultsch M., Kossiakoff A. A., *Science*, **255**, 306–312 (1992).
5) Syed R. S., Reid S. W., Li C., Cheetham J. C., Aoki K. H., Kiu B., Zhang J., Finer–Moore J., Elliott S., Sitney K., Katz B. A., Matthews D. J., Wendoloski J. J., Egrie J., Stroud R. M., *Nature*, **395**, 511–516 (1998).
6) Yamasaki K., Naito S., Anaguchi H., Ohkubo T., Ota Y., *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 498–504 (1997).
7) Reidhaar–Olson J. F., De Souza–Hart J. A.,

Selick H. E., *Biochemistry*, **35**, 9034–9041 (1996).
8) Hage T., Sebald W., Reinemer P., *Cell*, **97**, 271–281 (1999).
9) Bravo J., Staunton D., Heath J. K., Jones E. Y., *EMBO J.*, **17**, 1665–1674 (1998).
10) Layton J. E., Iaria J., Smith D. K., Treutlein H. R., *J. Biol. Chem.*, **272**, 29735–29741 (1997).
11) Fukunaga R., Ishizaka-Ikeda E., Pan C.-X., Seto Y., Nagata S., *EMBO J.*, **10**, 2855–2865 (1991).
12) Hiraoka O., Anaguchi H., Ota Y., *FEBS Lett.*, **356**, 255–260 (1994).
13) O'Hara P. J., Sheppard P. O., Thorgersen H., Venezia D., Haldeman B. A., MacGrane V., Houamed K. M., Thomsen C., Gilbert T. L., Mulvihill E. R., *Neuron*, **11**, 41–52 (1993).
14) Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor P. J., Bischoff S., Mickel S. J., MaMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestle W., Bettler B., *Nature*, **386**, 239–246 (1997).
15) Okamoto T., Sekiyama N., Otsu M., Shimada Y., Salc. A., Nakanishi S., Jingami H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13089–13096 (1998).
16) Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S., Jingami H., *J. Biol. Chem.*, **275**, 28144–28151 (2000).
17) Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K., *Nature*, **407**, 971–977 (2000).
18) Oh B.-H., Pandit J., Kang C.-H., Nikaido K., Gokcen S., Ames G. F.-L., Kim S.-H., *J. Biol. Chem.*, **268**, 11348–11355 (1993).
19) Tsuchiya D., Kunishima N., Kamiya N., Jingami H., Morikawa K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2660–2665 (2002).
20) Jane D. E., Jones P. L., Pook P. C.-K., Salt T. E., Sunter D. C., Watkins J. C., *Neurophamacology*, **32**, 725–727 (1993).
21) Hayashi Y., Sekiyama N., Nakanishi S., Jane D. E., Sunter D. C., Birse E. F., Udvarhelyi P. M., Watkins J. C., *J. Neurosci.*, **14**, 3370–3377 (1994).
22) Sekiyama N., Hayashi Y., Nakanishi S., Jane D. E., Tse H.-W., Birse E. F., Watkins J. C., *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1493–1503 (1996).
23) Kubo Y., Miyashita T., Murata Y., *Science*, **279**, 1722–1725 (1998).
24) Saunders R., Nahorski S. R., Challiss R. A., *Neuropharmacology*, **37**, 273–276 (1998).
25) Miyashita T., Kubo Y., *Recept. Channels*, **7**, 25–40 (2000).
26) Nash M. S., Saunders R., Young K. W., Challiss R. A., Nahorski S. R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 19286–19293 (2001).
27) Livnah O., Johnson D. L., Stura E. A., Farrell F. X., Barbone P. F., You Y., Liu K. D., Goldsmith M. A., He W., Krause C. D., Pestka S., Jolliffe L. K., Wilson I. A., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 993–1004 (1998).
28) Livnah O., Stura E. A., Middleton S. A., Johnson D. L., Jolliffe L. K., *Science*, **283**, 987–990 (1999).