

極低温電子顕微鏡で解析されたアセチルコリン受容体の 構造と機能

理化学研究所播磨研究所生体マルチソーム研究チーム 宮澤淳夫、西野有里
京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室 藤吉好則

Structure and function of the acetylcholine receptor revealed by cryo-electron microscopy

Atsuo Miyazawa, Yuri Nishino : Bio-multisome Research Team, RIKEN Harima Institute,
Yoshinori Fujiyoshi : Department of Biophysics, Division of Biological Sciences, Graduate
School of Science, Kyoto University,

The nicotinic acetylcholine (ACh) receptor is a ligand-gated ion channel involved in rapid signal transmission at the neuromuscular junction. The structure of the receptor in the tubular crystal has been investigated by cryo-electron microscopy. The mechanism of activation by ACh binding to the receptor was less clear in detail, and in this study a mechanism of the ligand induced activation was elucidated by the comparison of the structures between the extracellular domain of the receptor and an ACh-binding protein (AChBP) at a putative agonist binding form. Substitution in the 3-dimensional maps of the receptor by AChBP mimics the conformational changes seen on activation. When ACh binds, it leads to an extended conformational change, involving 10 degrees rotations of polypeptide chains on the inner pore-facing parts of the extracellular domain of the α subunits. These conformational changes most likely act as the trigger that opens the gate in the membrane-spanning pore of the receptor. The ACh receptor has four predicted membrane-spanning segments, M1-M4, in each subunit. The pore is shaped by an inner ring of five α -helices (M2), and an outer ring of fifteen α -helices (M1, M3 and M4), which shield the inner ring from the lipids. The gate is a constricting hydrophobic girdle at the middle of the membrane, formed by weak hydrophobic interactions between the neighboring side chains of amino acid residues on the inner helices. When ACh binds the ligand-binding site, it triggers rotations of the extracellular domain of the two α subunits. These rotations are communicated through the inner helices by the direct link between the top of $\beta 1/\beta 2$ loop in the extracellular domain and the end of M2 helix. The M2 rotations destabilize the interactions of the inner helices, that cause to open the channel gate by breaking the girdle apart. The 3-dimensional structure of the ACh receptor is in good agreement with the results obtained from several mutations, and mutagenesis combined with electrophysiological experiments as well.

はじめに

筋肉の動きを制御して複雑な随意運動を支配する運動神経の情報は、神経筋接合部において、神経終末から放出された神経伝達物質 (acetylcholine ; ACh) が、筋肉の細胞膜 (ポストシナプス膜) に存在する受容体に結合することによって素早く伝達される (図1)。この情報伝達を担うのが、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor ; nAChR) と呼ばれる膜タンパク質で、AChが結合することにより分子内で一過性の構造変化を起こし、受容体自身が内包しているイオンチャンネルを開口させる。その結果、細胞内外の電気化学的勾配に従って、細胞膜を貫通した“ポア”を正電荷イオン (cation) が選択的に通り抜けることにより筋細胞膜を脱分極させて、最終的には筋肉を素早く収縮させる。

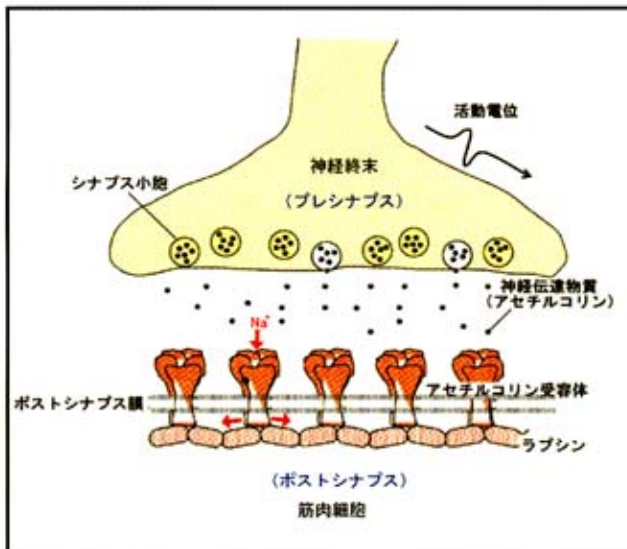


図1：神経筋接合部のモデル図

化学シナプスの1つである神経筋接合部では、活動電位が神経終末に達すると、プレシナプスから神経伝達物質であるAChが放出される。このAChがポストシナプス膜(筋肉の細胞膜)にあるnAChRに結合すると、cation選択性イオンチャンネルが開口する。そして主にNa⁺が細胞内に流入することにより筋細胞膜が脱分極し、さらに電位依存性ナトリウムチャンネル、次いでカルシウムチャンネルが開口して、細胞内に遊離したCa²⁺により筋肉が収縮する。

1つの分子内に受容体とイオンチャンネルの2つの機能を合わせ持つ1群のタンパク質スーパーファミリー、リガンド開閉型イオンチャンネルには、nAChRの他にセロトニン (5-HT₃)、 γ -アミノ酪酸 (GABA_A, GABA_C)、およびグリシンの各受容体がある。特にnAChRは、シビレエイの筋肉由来の電気器官 (図2) に存在することから、比較的容易に大量精製でき、nAChR試料を得ることができる。またnAChRに対する特異的な阻害剤であるヘビ毒 (α -bungarotoxin) が発見されたことにより、タンパク質化学的な解析等が最も進んでいる。これまでにシビレエイ、ウシ、ラット、ヒトを含む動物種においてnAChRの一次構造が決定され、魚類から哺乳類に至るまで高い相同性を持っていることが知られている。さらに受容体の膜貫通領域における一次構造の解析から、疎水性の非常に高い領域が各サブユニットに4カ所ずつ同定された。これらは順にM1からM4と名付けられ、これら4つの領域で各サブユニットは細胞膜を貫通していると考えられている。そして第2番目の膜貫通領域であるM2が、細胞膜の内外をつなぐイオンの通り道 (チャンネルポア) を形成すると共に、イオンチャンネルのゲート部位となっていることが予測されている。これまでに多くの突然変異実験や電気生理学的な解析により、チャンネルのイオン輸送やイオン電荷選択性に関与している個々のアミノ酸残基の役割や、膜貫通領域にお

ける相対的な配置についての情報が蓄積されてきている。しかし、それらの立体配置に関する情報は、nAChRを始め、他のリガンド開閉型イオンチャネルにおいても、未だ明らかにされていなかった。また、AChの結合により引き起こされる細胞外領域での構造変化が、どのようにして膜貫通領域に伝わりイオンチャネルのゲートを開口させるのか、そのアロステリックなしくみについても全く解明されていなかった。

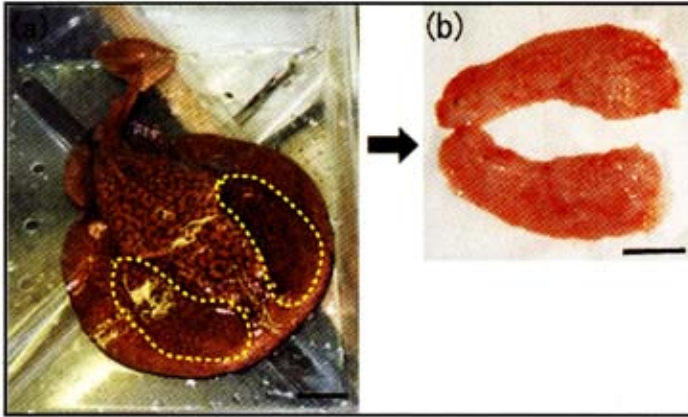


図2：シビレエイとその電気器官

(a) *Torpedo Marmorata* は、ヨーロッパ大西洋沿岸から地中海にかけて生息する。その他に米国カリフォルニア沿岸と日本近海にも同じトルベド類のシビレエイが存在している。(b) 発生学的に筋肉に由来する電気器官は、シビレエイの身体の左右に1つずつあり、最大で約100Vの放電を起こす。(スケールバー:50 mm)。

I. 極低温電子顕微鏡を用いた構造解析

1. チューブ状結晶の調製

nAChRは、神経筋接合部のポストシナプス膜に高密度に存在している。シビレエイの一種 (*Torpedo Marmorata*) の電気器官 (図2 (b)) から nAChR を豊富に含んだポストシナプス膜を調製した。そして、このポストシナプス膜を、100mM カコジル酸ナトリウム、1 mM 塩化カルシウムを含む pH 6.8 のリン酸緩衝液中で数週間インキュベートすることにより、らせん対称性を持った nAChR のチューブ状結晶 (図3 (a)) を作製した¹⁾。この結晶作製法では、高塩濃度の溶液や界面活性剤による処理を全くしておらず、チューブ状結晶中では受容体や脂質分子が生体内にある状態で保たれている。その結果、受容体の異なる機能状態を生理的な状態に近い条件で研究することができるため、これまでも nAChR の静止状態および活性化状態において、低温電子顕微鏡を用いた構造解析が行われてきた^{2~5)}。

2. 電子顕微鏡観察

nAChR のチューブ状結晶を含む水溶液を、銅製のグリッド上に張られたマイクログリッドに載せて、余剰な水溶液をろ紙で吸い取り最適に調整することにより、チューブ状結晶を含む水溶液の薄い層をマイクログリッドの穴の中に形成させる。その直後に液体エタン中に落下させて急速凍結する。このような急速凍結法により水は非晶質構造を保つので、水溶液中のタンパク質は生来の構造を保持した状態で、薄い氷の中に包埋することができる。これを低温ステージを用いて観察すれば、真空になっている電子顕微鏡の中に入れても氷が昇華することはなく、生物試料でも乾燥して変性することはない。電子顕微鏡で生物試料のデータを収集する際の最大の問題点は電子線による試料の損傷で、電子顕微鏡像の分解能は装置の分解能では

なく、この電子線損傷によって制限される。そこで、電子線による生物試料の損傷を抑えるため液体ヘリウムで試料を -269°C に冷却できる極低温高分解能電子顕微鏡を開発し⁶⁾、改良してきた⁷⁾。この電子顕微鏡(図4)を用いて、試料の受ける電子線損傷を最小限に抑えながら、高分解能のチューブ状結晶像を多数収集した。

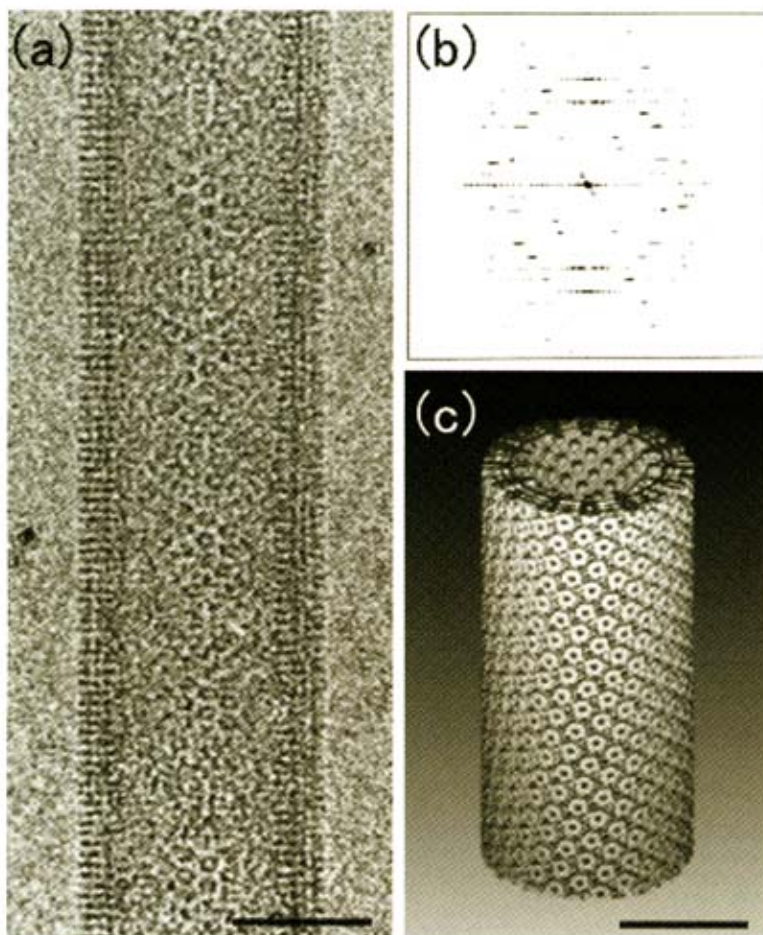


図3：nAChRのチューブ状結晶
(a) 受容体分子は δ サブユニット間のジスルフィド結合により2量体となり、チューブの表面にらせん対称性をもって配置している。そのためチューブ状結晶の中央にはnAChRを上から見た分子の形を、またチューブの縁には横から見た分子の形を見ることができる。(b) 電子顕微鏡像をデジタル化して、チューブ状結晶のイメージを高速フーリエ変換することにより得られた回折パターン。チューブのらせん対称性を反映した、層線状の回折となる。(c) 回折像から得られた位相と振幅から逆フーリエ変換して解析されたチューブ状結晶の三次元再構成像のCGモデル。(スケールバー：50 nm)。

3. 画像解析

nAChRは、その表面格子がp2配置になっているタンパク質と脂質からなるらせん対称性を有するチューブ状の結晶を形成する。様々ならせん対称性をもったチューブ状結晶が存在するが、その中で比較的数量も多く、チューブの直径が770-832 Åの範囲にある4種類のらせん対称性を有するチューブ状結晶を構造解析に使用した。チューブの1本1本には、小さな結晶性のひずみや乱れがあり、これが最終的に構造モデルの分解能を制限している。そこで、こうした結晶性の乱れを三次元的に補正するために、らせん対称性を持つチューブ状結晶の解析プログラムが開発されており⁸⁾、これを用いてチューブの結晶性の補正処理を三次元的に行った。

またチューブ状のらせん構造物のフーリエ回折(図3(b))では、赤道方向の比較的高い分解能のところでは、層線の多くがお互いに重なり合ってしまう。しかし、らせん対称性の異なるチューブ状結晶からは、表面の格子配向のわずかな変化により、層線の重なり方の異なる回折パターンを得ることができた。その結果、層線同士の干渉によるデータエラーは、同じ対称性を持った多くの像を統合した後に、異なる

4つのらせん対称性をもつチューブ状結晶から得られたデータを平均化することにより、かなり除くことができた。



図4：極低温高分解能電子顕微鏡

液体ヘリウムを用いて絶対温度4ケルビン（ -269°C ）に冷却した状態の試料から、2 Å分解能のイメージを撮影できる電子顕微鏡。急速凍結法により非晶質の水に包埋した試料を、凍結したまま空気中の霜等の汚れをつけることなく鏡筒内の極低温ステージへ移送することができるクライオトランスファー装置を備えている。試料を極低温まで冷却すると電子線による試料損傷を桁違いに軽減できるので、生物試料の高分解能イメージを安定して撮影することができる。1986年にプロトタイプが開発され、写真はエネルギーフィルターを搭載した第4世代の装置で、単粒子解析用の第5世代まで開発された。現在、電子線トモグラフィー用の第6世代を開発中である。

4. 構造決定

4つの異なるらせん対称性を持つチューブ状結晶の像から、解析に適した359枚を選び出して解析を行った。チューブ状結晶は小さすぎて電子線回折図形から正確な回折強度を得ることができないので、電子顕微鏡像をフーリエ変換することにより位相情報と同様に回折強度も求めた。同じらせん対称性を持つチューブ状結晶から得られた位相情報および回折強度を積算した後に構造モデル（図3(c))を計算し、それぞれ異なるらせん対称性から計算された4つの構造モデルを実空間で平均化することにより、最終的なnAChRの立体構造モデル（図5(a))を解析した。こうして解析した構造モデルでは、電子顕微鏡像だけを使って解析された構造としては至上最高の4 Åにまで分解能を高めることができた。この構造はnAChRの静止状態（イオンチャンネルが閉じた状態）にある立体構造であり、求めたdensity map（図5(a))に、nAChRの一次構造に従ったポリペプチド鎖をはめ込んで原子構造モデル（図5(b))を作製した^{9, 10)}。

II. nAChRの立体構造

nAChR分子は、5つのサブユニット（ α 、 α 、 β 、 γ または ϵ 、 δ ）からなる5量体で、それらが環状に配置してcation選択性のイオンチャンネルを形成している⁹⁾。分子量約290kDaの糖タンパク質で、外径は約80 Å、膜に垂直方向の長さは約130 Åで、そのうち細胞膜の外側に約70 Åほど突出している。nAChRの立体構造は、

全体的には逆コーン型をしており、構造的にもまた機能的にも、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域の3つの部分に分けることができる(図5(a))。細胞外領域には、2つある α サブユニットとそれぞれ隣接する γ または δ サブユニットとの間にリガンド結合部位が形成されており、両方のリガンド結合部位にAChが1つずつ結合した時にイオンチャンネルが開口する。膜貫通領域のほぼ中央部には、イオンチャンネルのゲート部位が存在している。また細胞内領域には、受容体特異的な結合タンパク質であるラプシン¹¹⁾が結合しており、ポストシナプス膜上でのnAChRの局在化ならびにクラスター形成に関与していると考えられている¹²⁾。

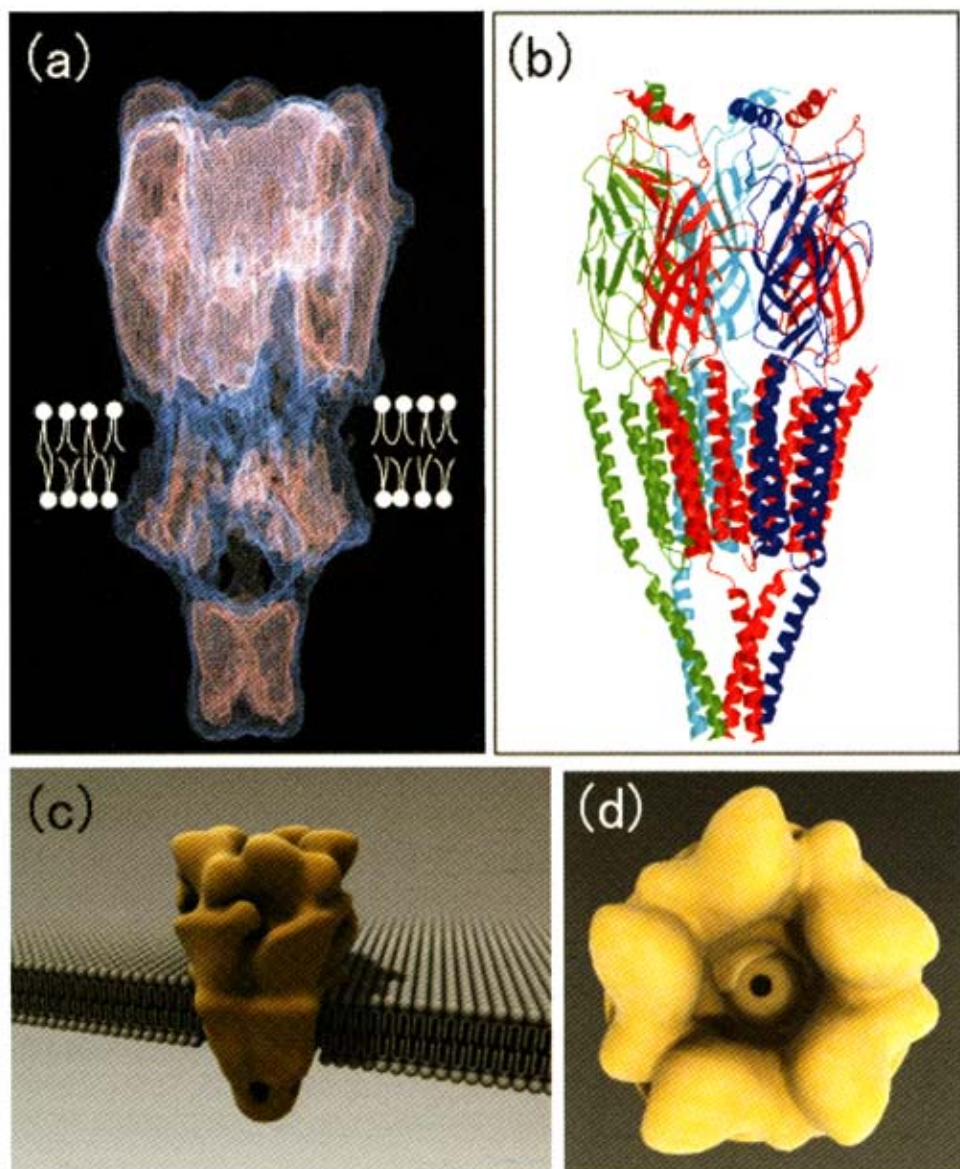


図5：nAChRの全体像

(a) nAChRのdensity map。分解能は4 Å。(b) nAChRの三次元リボン構造モデル。2つの α サブユニット(赤色)と、 β サブユニット(緑色)、 γ サブユニット(紺色)、 δ サブユニット(水色)からなる5量体を形成している。細胞外領域は主に β シート構造からなり、膜貫通領域および細胞内領域は α ヘリックス構造からなる。(c) 原子構造情報を元に作製したnAChRの全体像。(d) シナプス間隙側から(c)を見たnAChRのtop view。

1. 細胞外領域の構造

ある種の巻き貝 (*Lymnaea Stagnails*) は、ACh を結合するタンパク質 (ACh-binding protein ; AChBP) を魚などに注入して麻痺させる。この AChBP の原子構造が X 線結晶構造解析により解明された^{1,3)}。これはホモ 5 量体からなる分子であるが、1つのサブユニットあたり、1本の短い α ヘリックスと、10本の β ストランドを持つ β シート構造 ($\beta 1 \sim \beta 10$) により形成されている。AChBP は nAChR の細胞外領域の相同タンパク質であることから、AChBP の原子構造をテンプレートにして、nAChR の細胞外領域の構造を決定した。nAChR の細胞外領域をシナプス間隙に相当する側から見ると、風車の羽根のような対称的な形に見える (図 6 (a))。1つのサブユニットの β シート構造は、6本の β ストランド ($\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$) からなる“内側 β シート”と、4本の β ストランド ($\beta 4, \beta 7, \beta 9, \beta 10$) からなる“外側 β シート”の2つの部分に分かれており、両者がジスルフィド結合により結ばれた「 β サンドイッチ構造」をしている。リガンドである ACh の結合部位は、 α と γ サブユニット、および α と δ サブユニットの境界にあることが明らかになった。そこは α サブユニット側の3つのループと、 γ および δ サブユニット側の3つのループ、ならびにトリプトファンなどの4つの芳香族アミノ酸残基によって、ACh の結合する空間が2つのサブユニットの間に形成されている。

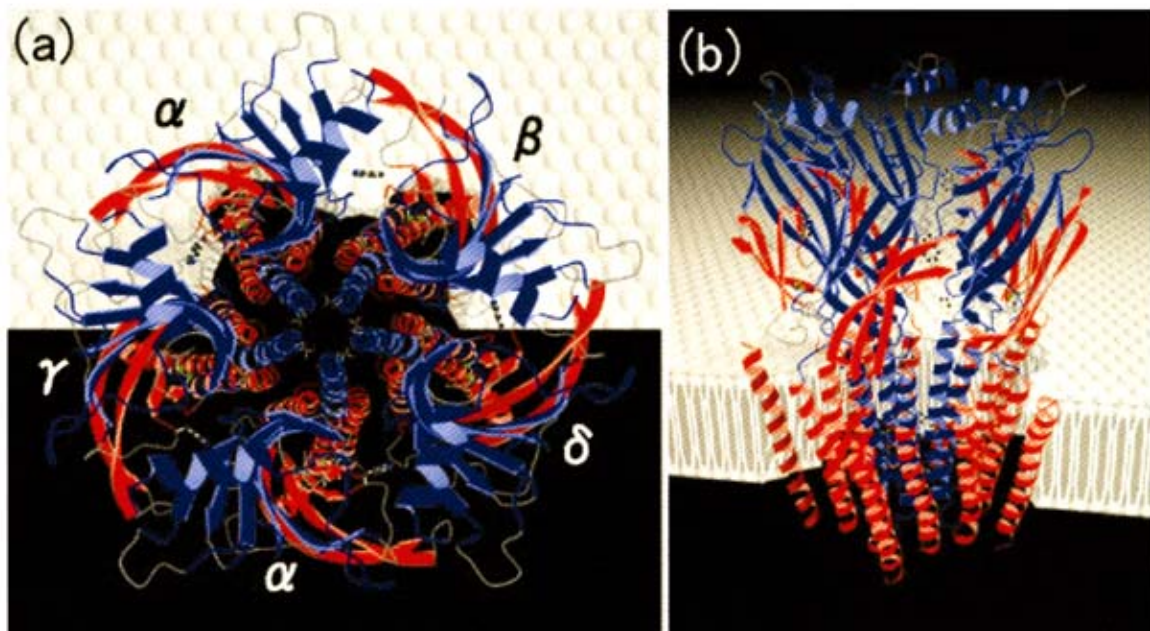


図 6 : nAChR の立体構造

nAChR の三次元リボン構造モデルを、(a) 上から見たものと、(b) 横から見たもの。5量体からなる nAChR の各サブユニットはそれぞれ4本の α ヘリックス (M1~M4) で膜を貫通しており、受容体全体では、膜を貫通している α ヘリックスは合計 20 本になる。膜貫通領域は内側リング (5本のM2ヘリックス) と外側リング (合わせて15本となるM1, M3, M4ヘリックス) から形成されており、内側リングはチャンネル内孔であると共に、イオンチャンネルのゲートとなる。受容体の活性化に伴い α サブユニットで構造変化の起こる細胞外領域の内側 β シートおよび内側リングは青色、受容体の外壁となる不動の細胞外領域の外側 β シートおよび膜貫通領域の外側リングは赤色で表示している。

興味深いことに、AChBP の構造解析は HEPES 緩衝液の中で成長させた結晶を用いて行われたために AChBP にニコチン性のアゴニストである HEPES 分子が結合した状態で構造解析された。それゆえ、AChBP の構造は ACh が結合したものと同一であろうと推測される。AChBP の構造を我々が解析した nAChR の density map に重ねてみると、nAChR の β 、 γ および δ サブユニットにはびたりと重なったが、2つの α サブユニットを重ねるには、上記の内側 β シートを外側 β シートに対して反時計方向におよそ 10° 回転させる必要があった¹⁴⁾。この α サブユニットの構造の違いは、nAChR に ACh が結合した時と、結合していない時との構造変化を反映している。つまり、活性化状態 (AChBP) から静止状態 (nAChR) への細胞外領域の構造変化は、 α サブユニットの内側 β シートが反時計回りに 10° 回転することである。したがって、これとは反対に静止状態の nAChR に ACh が結合して活性化状態になる時には、 α サブユニットの内側 β シートが時計回りに 10° 回転すると考えられる。

2. 膜貫通領域の構造

イオンチャネルとなる膜貫通領域には、シナプス間隙側から見ると、中心に5つのM2ヘリックスが形成するイオンの通り道 (チャネルポア) があり、5つのサブユニットがプロペラの羽根のように配置した、ほぼ完全な5回対称性を持つ α ヘリカルバンドル構造により構成されている (図6(a))。1サブユニットあたりM1からM4と呼ばれている4本の α ヘリックスが細胞膜を貫通している。受容体1分子 (5つのサブユニット) では、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 α ヘリックス (M1、M3、M4) からなる“外側リング”の2つに分割された形状をしている (図7(a), (b))。内側リングはチャネルポアを形成しており、外側リングは細胞膜の脂質から内側リングを隔離する外壁となり、また内側リングがチャネルのゲートの開閉を引き起こすための構造変化ができるように、分子内に空間を確保していると考えられる。

また nAChR の構造から、同じスーパーファミリーに属しているグリシンおよび GABA_A 受容体のアルコールや麻酔薬の結合部位が、膜を貫通している内側リングにあることが推測された¹⁵⁾。これに関与するアミノ酸は、グリシン受容体の第267番目のセリンと GABA_A 受容体の第270番目のセリンで、どちらも α サブユニットのM2ヘリックス上にある¹⁶⁾。nAChR において、これらのアミノ酸残基に相当するのは α サブユニットの第257番目のロイシンで、ここは細胞膜の脂質二重層内ではあるが、受容体の内側リングと外側リングの間にできた空間に面した位置にある。したがって nAChR の構造解析結果から、グリシンや GABA_A 受容体に作用するアルコールや麻酔薬は、これら受容体の分子内にできた空間を通過して細胞膜内にある結合部位に到達していると説明できる。

3. ゲート部位の構造

内側リングの作るチャネルポアは、M2ヘリックス自身の屈曲と大きな疎水性アミノ酸残基の側鎖により膜の中央部で最も狭くなっており、そこでは隣り合う疎水性アミノ酸残基同士の均等な相互作用によって、5回対称的なガードル状構造が形

成されている(図7)。このガードルを形成するアミノ酸残基の相互作用は2つの部位で見られる。1つは、第251番目のロイシン(図9)と隣り合うアラニンまたはセリンの側鎖を含んでいる部分、もう1つは、第255番目のバリン(図9)と隣り合うフェニルアラニンの側鎖を含んでいる部分である。チャンネル内孔の直径は、最も狭くなっている第251番目のロイシンおよび第255番目のバリンのところで約6 Åほどである。

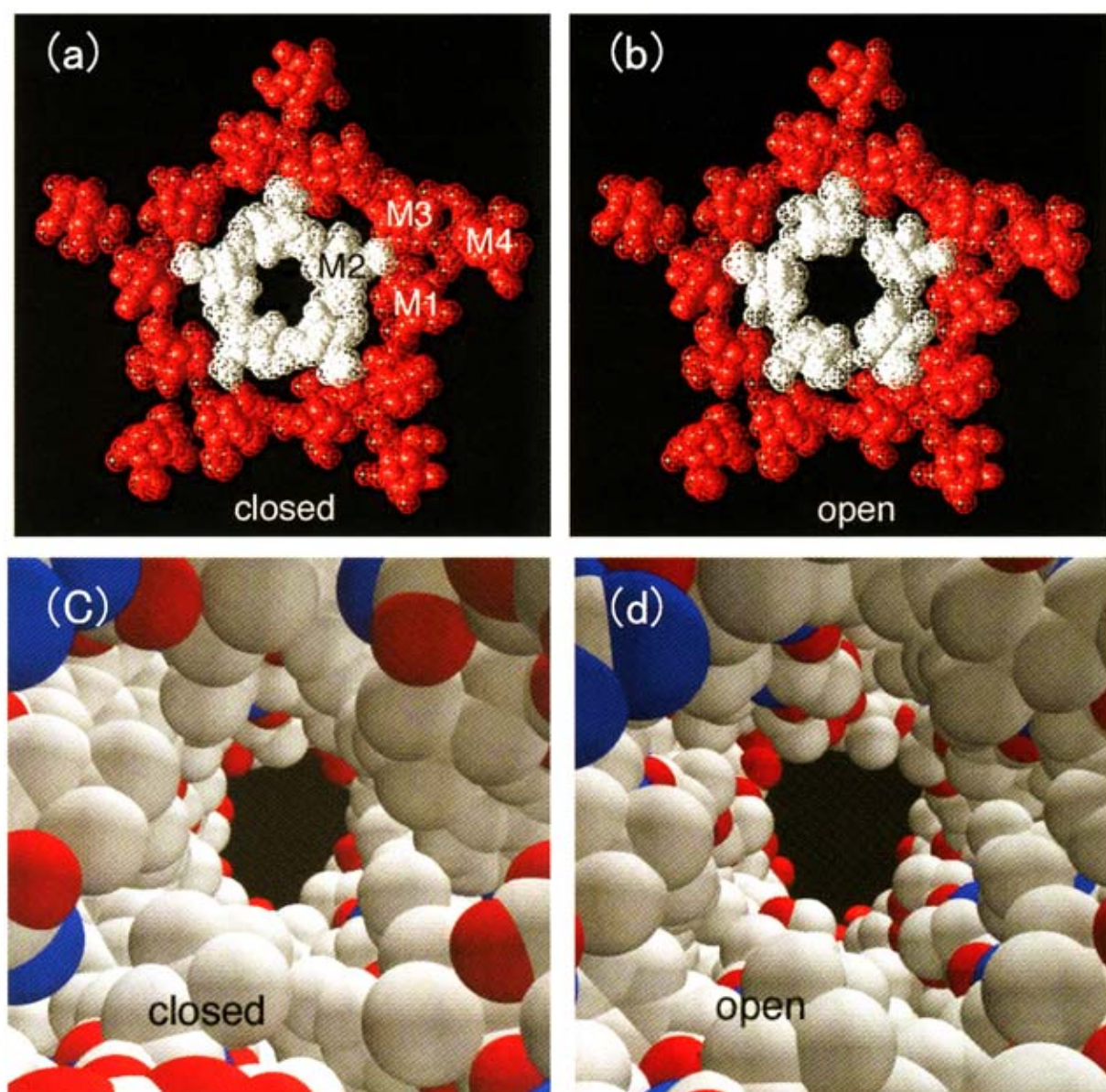


図7：ゲート部位の構造

(a), (b) チャンネルゲート部位のガードル状構造。内側リングを白色、外側リングを赤色で示す。各サブユニットのM2ヘリックスにある疎水性アミノ酸残基が5回対称的に配置し、均等に相互作用している。閉じた状態(a)で直径6 Åだったチャンネルポアが、開いた状態(b)では9 Åに広がる。(c), (d) ゲート部位の立体構造モデル。炭素原子を白色、酸素原子を赤色、窒素原子を青色で示す。チャンネル内孔の表面は、閉じた状態(c)では疎水性アミノ酸に覆われているが、開いた状態(d)になると極性アミノ酸が露出する。

我々が構造解析した水チャネル (aquaporin-1; AQP1) は、いかなるイオンや低分子化合物を通さないのみならず、プロトンさえもブロックしながら、1秒間に20億分子の水を透過する高い水選択性チャネルである¹⁷⁾。このチャネルの最も狭い部分はたった直径3 Åしかない。nAChRの静止状態のチャネル径はその倍の内径(6 Å)を有しているにもかかわらず、イオンを透過しない。これは非常に不思議なことのように思われる。しかし、Na⁺やK⁺などのcationが水和していると、その第1水和殻の外径は最低でも8 Åほどになる。AQP1の場合には2つのアスパラギン残基が水分子の酸素と水素結合して、直径2.8 Åの水が3 Åのチャネルを透過する時のエネルギー障壁を低くしている。nAChRのチャネルにはそのような残基がなく、完全に疎水的な穴となっている。

また、水チャネルと共に2003年のノーベル化学賞の受賞対象となったK⁺チャネルは、1秒間に約1千万個のK⁺を透過させるがNa⁺はほとんど通さない。このチャネルのK⁺選択性は、K⁺チャネル分子内に共通する“selective filter”(直径3.4 Å、長さ12 Åの筒状構造、アミノ酸配列: TVGYG)において、水酸基およびカルボニル基にある酸素が、水和したK⁺の水分子の酸素の代わりとなってK⁺の周りに安定して配位できる構造がもとになっている¹⁸⁾。このselective filter内でのK⁺と酸素との配置はK⁺が水和している時の状態に非常によく似ている^{19, 20)}。そのため、K⁺はselective filterを水の中を移動している拡散速度に近い速度で通り抜けることができる。また、Na⁺(直径約1.9 Å)はK⁺(直径約2.7 Å)よりも直径が小さいにもかかわらず、K⁺チャネルを通過できない。この理由は、selective filter内の酸素配置がK⁺の水和に最適な状態となっているため、Na⁺はチャネル内孔に向かって出ているカルボニル基の酸素との距離が遠くて水和を模した安定な結合状態をとることができず、チャネルからはじき出されてしまうためである。

一方nAChRは、cation選択性ではあるが、K⁺チャネル、Na⁺チャネル、またはCa²⁺チャネルなどに見られる特定のイオンに対する選択性はなく、立体構造上、膜を貫通するイオンの通り道に特別なイオンを選択するフィルター機能もない。膜貫通領域の中央部に見られた疎水性の二重のガードル状構造には、静止状態の構造にもかかわらず直径約6 Åの穴が開いている。しかもそのガードル状構造周辺には、K⁺チャネルのように水に代わる極性残基がないため、水和したイオンはその水和殻をはずすことができない。したがって、第1水和殻の直径が6 Åより大きい水和状態のイオンは、受容体が静止状態にあるチャネルを透過することができない。さらに構造解析の結果を見ると、このガードル状構造の部分がnAChR分子のチャネル経路上にある唯一のバリアーである(図8, 9)。以上のことから、膜貫通ポアの中央部に形成された疎水性の2重のガードル状構造がnAChRのイオンチャネルのゲートになっていると考えられる。イオンが裸の状態でのではなく、水和して水和殻の直径が8 Å程度と大きいcationを、迅速に透過させるために、nAChRでは活性化時に直径約9 Åまでゲートを開口させなければならない。静止状態において、ゲートが完全に閉鎖状態になっていると、チャネルを開口させるために分子内で大きな構造変化が必要となり、またその構造変化に時間がかかってしまう。このため、神経情報に依存した筋肉の素早い運動が実現できないことになる。ゲート領域の疎

水性ガードルと直径約 6 Å の穴は、閉口状態から開口状態に移行する際に、最小の構造変化で、かつ最短の時間で変化するために特化した最適な構造である。

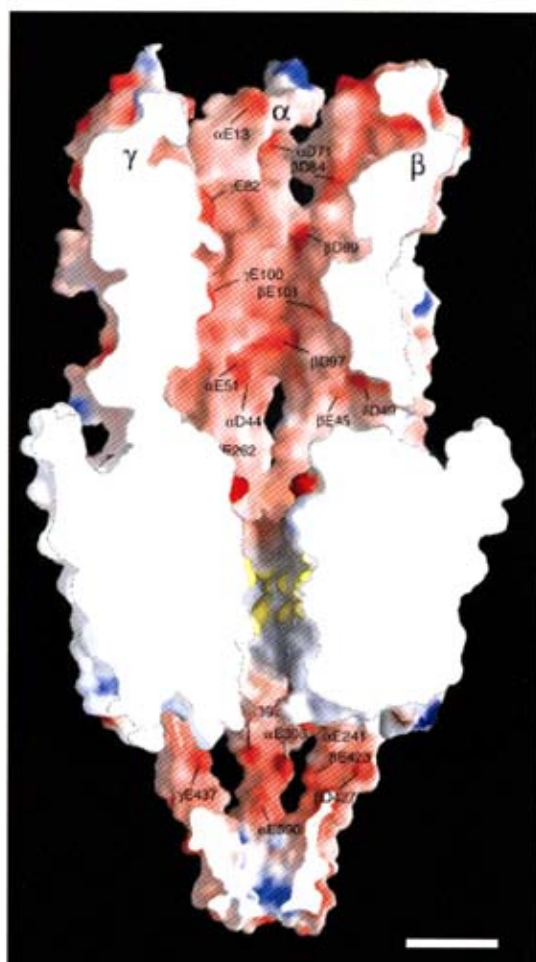


図 8 : チャネル内孔表面の静電ポテンシャル
nAChR の静電ポテンシャルモデルの縦断面図。赤色はマイナスに帯電している部位、青色はプラスに帯電している部位、黄色はゲート部位で疎水的な部分を示す。細胞外領域の広く開いたチャネルポアの入り口部分、および細胞質内へつながるチャネルの出口部分はマイナスに帯電しており、cation 選択性チャネルである nAChR において、効率的な cation の通り道を形成する。これと同時に、細胞内に存在する anion が、ゲート開口時にチャネル内を通過するのを妨げる、イオンフィルターとして機能しているとも考えられている。細胞外から細胞内までの領域を通じて、チャネルポアが最も狭くなっている膜貫通領域の、ほぼ中央部に位置するゲート部位は、チャネルが閉じた状態ではポアの表面が疎水的であり、水和した状態にある cation のチャネル通過を妨げる、唯一のエネルギー障壁となっている。(スケールバー：10 Å)。

4. 細胞内領域の構造

受容体の細胞内領域には、5つのサブユニットの間隙それぞれに、表面が負に帯電していると考えられるスリット状の開口部がある。このスリットの大きさは、最大で幅 10 Å、長さが 15 Å 前後であると思われる(図 8)。nAChR の細胞内領域のチャネルの外壁には、細胞膜に平行な方向に向いている、このスリット状の構造以外に開口部はない。また膜を貫通するイオン経路上には、イオンの選択性に関与すると思われる構造が見あたらない。したがって、このスリット状構造は、チャネル開口時にゲートを通過した cation がチャネル内孔より細胞質内へ出ていくための通路であり、細胞内側の細胞膜直下を横方向に広がるように cation が細胞内に流入していくと考えられる。このとき、開口部の表面が負に帯電していることから、cation のみを選択的に通し、細胞質内に存在する anion が、逆にこのチャネルを通過することを妨げる cation 選択性イオンフィルターの役割を、同時に果たしていると考えられる。興味深いことに、5-HT₃ 受容体の細胞内領域にも、同様なスリット状の開口部の存在が示唆されている²¹⁾。一次構造上、M4 領域の直前にある“HA-stretch”と呼ばれるアミノ酸配列²²⁾に点突然変異を起こすと、イオンチャネルのコンダクタンスに大きく影響することから、HA-stretch がスリット状構造を縁取るように配

置しており、そこを通過するイオンのコントロールを行っていると考えられる。

III. チャネルのゲート開閉メカニズム

nAChR のリガンド結合部位に ACh が結合すると、 α サブユニットの細胞外領域にある内側 β シートが 10° 回転する^{1,4)}。この内側 β シートの最初の 2 つの β ストランドの間 ($\beta 1 / \beta 2$) には短いループ領域があり、このループの先端にある第 46 番目のバリンが、膜表面から 10\AA 程伸びている M2 ヘリックスの末端に接触する様な形になっている (図 9)。

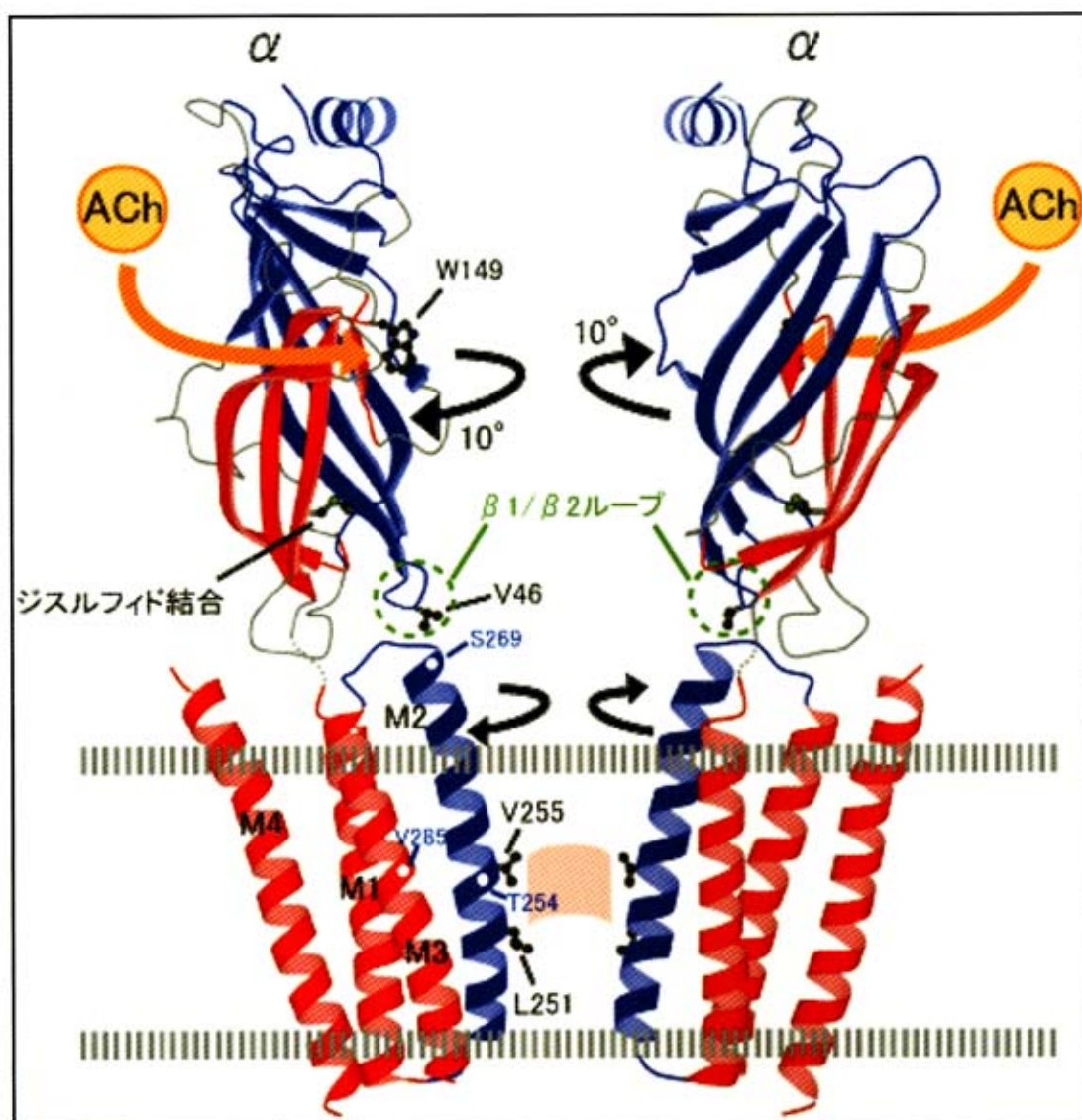


図 9 : ゲート開閉メカニズムのモデル図

nAChR の 2 つの α サブユニットだけを抜き出して描いてある。細胞外領域の内側 β シートおよび膜貫通領域の内側リングは青色、細胞外領域の外側 β シートおよび膜貫通領域の外側リングは赤色で表示している。細胞外領域の内側 β シート構造中にある短いループ部分 ($\beta 1 / \beta 2$ ループ: 緑色で囲われた領域) の先端 (バリン 46) が、M2 ヘリックスの末端にドッキングして回転運動を伝える。2 本の平行破線は脂質二重膜を示す。

この $\beta 1/\beta 2$ ループの先端とM2ヘリックスの末端との間にできた「ピンとソケット」状の相互作用は、2つの動く領域の間にある唯一の直接的な連結である。 α サブユニットの内側 β シートの回転運動は、この連結を介して、チャンネル内孔に面したM2ヘリックスに沿って膜貫通領域の中央部にあるゲート部位に伝えられると考えられる。

それではどのようにして、M2ヘリックスに伝わった回転運動により、ゲートを形成するガードル状構造が、水和イオンが通り抜けられるように広がるのか？nAChRの詳細な立体構造の解析から、この分子メカニズムの説明が可能となった(図9)。すなわち、nAChRの構造変化は、(1)AChの結合により2つの α サブユニットにある内側 β シートの回転が起こる。(2)この内側の β シートの回転が連結しているM2ヘリックスを介して、膜の中央部にあるゲート部位に伝達される。(3)M2ヘリックスに伝えられた“ひねり”の動きが、ガードル状構造を保っていた疎水性アミノ酸残基間の相互作用を弱める。(4)M2ヘリックスは外側リングに向かって崩れ込み、水和したイオンが透過できる大きさ(直径約9 Å)まで内側リングが広がると同時に、膜貫通ポアに面していた疎水性側鎖がずれて、ゲート領域の疎水性が弱められる。こうして水和したイオンが通過できるようになり、すなわちイオンチャンネルが開く、と考えられる。

ゲートとなっているガードル状構造は、それを構成する1つ1つの構成要素が均等に相互作用することによって完全な5回対称性を保っている(図7(a), (b))。このゲートを開口させるには、5回対称性を維持している分子間の均等を乱して、全体構造を瞬時に変えるような協調的な変化を引き起こす必要がある。5量体構造をしたnAChRにおいて、リガンドの結合により回転する領域を持つ2つの α サブユニットが、この変化を起こすのに必要な最低限の数であると思われる。

IV. チャンネルのイオン選択性

nAChRの原子構造から計算された受容体表面の静電ポテンシャルモデルは、細胞外と細胞内ドメインにあるチャンネル内孔の表面に、負電荷が広く分布していることを示している(図8)。こうした負電荷の分布は、膜貫通領域にある狭いチャンネルポアを通り抜けるイオンに影響していると考えられる。これまで、突然変異体を用いた電気生理学的測定により、nAChRのイオン選択性に関わるアミノ酸残基についての検討が行われてきた。例えば、筋肉型のnAChRでは、M2ヘリックスの細胞内末端付近に形成されている“負に帯電したアミノ酸残基のリング”の負電荷を減少させると、受容体のcationコンダクタンスが非常に減少することが示された^{2,3)}。また、 $\alpha 7$ 型nAChRのイオン選択性は、3つの点突然変異(13'位のバリンとスレオニンの置換、-1'位のグルタミン酸とアラニンの置換、-1''位へのプロリンの挿入)により、cation選択性からanion選択性に変化する^{2,4)}。さらに、同様なイオン選択性の変化が、リガンド開閉型イオンチャンネルに属する5-HT_{3A}受容体とグリシン受容体でも報告された。これら2つの受容体で、 $\alpha 7$ 型nAChRの突然変異アミノ酸残基に相当する3つの残基をそれぞれ置換すると、5-HT_{3A}受容体ではcation選択性が

ら anion 選択性に変化し²⁵⁾、逆にグリシン受容体では anion 選択性から cation 選択性に変化した²⁶⁾。これらのことから、それぞれの受容体におけるイオン選択性の決定は、リガンド開閉型イオンチャネルのスーパーファミリーにおいて保存された特徴であると考えられる。そのため、このイオン選択性に関わる一部の領域は、チャネルのイオン電荷選択性フィルターと呼ばれている²⁷⁾。しかしながら、nAChR の静電ポテンシャルモデルでは、チャネル内孔において非常に広範囲にわたり負電荷が分布している。したがって、突然変異実験により同定されたアミノ酸残基ばかりではなく、他の多くのアミノ酸残基も協調的に関与して、効率的な cation 選択性と、その透過に必要とされる静電的な環境を、チャネル内孔に造っていると思われる。

V. nAChR の立体構造と先天性突然変異

nAChR のイオンチャネル内孔の立体構造と、M2 ヘリックスの協調的な回転運動によるチャネルゲートの開閉メカニズムは、いくつかの突然変異実験から得られた解析結果と非常に良く一致する。ゲートの開閉に影響を及ぼすチャネル内孔における突然変異は、その変異導入場所により、(1) M2 ヘリックスと細胞外領域との間の連結に影響する突然変異、(2) M2 ヘリックス間の隣り合うアミノ酸残基同士の相互作用に影響する突然変異、(3) M2 ヘリックス以外の部分にあって、その動きを妨げる突然変異、の3つに分類できる。

まず分類(1)の例の1つに、細胞外領域と直接連結しているM2ヘリックスの末端にある α サブユニットの第269番目のセリン(図9)がイソロイシンに変化した自然突然変異がある。この突然変異は、遺伝性の筋無力症の原因であり、電気生理的な測定の結果から、イオンチャネルの開口時間が長くなっていることが分かった^{28, 29)}。しかし、このチャネルの開口時間の延長は、 α サブユニットではない他の3つのサブユニット(β , δ , ϵ)において、 α サブユニットに相当する場所での同じ突然変異によって全く変化しない²⁹⁾。このことは、他のサブユニットの細胞外領域からの影響を受けずに、ACh結合による細胞外領域の回転運動を膜貫通領域に伝達すると考えられる α サブユニットの持つ特別な役割と良く一致する。

次に、 ϵ サブユニットの第264番目のスレオニンがプロリンに変異したものは、別の遺伝性筋無力症を引き起こす突然変異で、自発的で長く続くイオンチャネルの開口を生じさせる³⁰⁾。この突然変異は、分類(2)の1つの例で、変異したアミノ酸残基が疎水性のガードル状構造またはチャネルゲートを形成するための要素の1つであることによるものである。ゲートとなるM2ヘリックスの一部を本来とは異なる方向に曲げてしまうプロリン残基の挿入は、静止状態におけるゲートの疎水的な相互作用を弱めて、チャネルの閉口状態が不安定になってしまうような平衡状態の移行が起こってしまうと推測される。

さらに、遺伝性筋無力症の突然変異である α サブユニットの第285番目のバリン(図9)のイソロイシンへの変異は、チャネルの開口時間を異常に短くする方向に導くもので³¹⁾、これは分類(3)の1つの例となる。 α サブユニットにおいて、この第285番目のバリンはM3ヘリックス上にあり、M2ヘリックス上の第261番目

のバリンに立体配置的に非常に近い位置にある。もし、この位置にバリンよりも大きいイソロイシンの側鎖がくると、“動かないM3ヘリックス”と“動くM2ヘリックス”の間の相互作用を強める可能性があり、結果としてゲートの開閉の動きを立体化学的に抑制することになり³¹⁾、ゲートの状態を閉口に有利な平衡状態に移していると考えられる。

最後に、ゲートの開閉メカニズムに関して多くの突然変異実験がなされているが、特にチャンネルのゲートとなっているガードル状構造を安定化している特徴的なロイシン残基 (α サブユニットでは第251番目) に最も注目が集まっている。その1つの例として、どのサブユニットにおいてもこの位置にあるロイシンをセリンに置き換えると、イオンチャンネルの開口感受性を上昇させるという結果が報告されている³²⁾。これは、チャンネルゲートの完全な状態を確定するために、ガードル状構造を形成している対称性が重要であるという構造解析の結果と合致する。

VI. nAChR 脱感作状態の解析

nAChR をはじめとするリガンド開閉型イオンチャンネルは、今回、nAChR でチューブ状結晶を作製することができた静止状態以外に、リガンドが結合しチャンネルが開いた活性化状態、リガンドに対して不応答となった脱感作状態を含めた、構造的、機能的に異なる3つの状態をとることが知られている。これまでに、チューブ状結晶から、静止状態と活性化状態における nAChR の全体構造が解明されている。また、膜貫通領域のチャンネルポアに関しては、静止状態におけるアミノ酸主鎖部分の立体構造が決定され、さらに細胞外領域については、受容体においてリガンドが結合した状態と考えられる AChBP の結晶構造と比較することにより、細胞外領域と膜貫通領域とが関連した、静止状態から活性化状態へ構造変化のメカニズムも明らかになっている。

神経系の発達した高等生物において、常に環境に適応しながら恒常性を維持するため、高次脳機能を保持し、その複雑な情報処理の結果として唯一のアウトプットは、運動神経を介した筋肉運動である。このシステムには、nAChR を始めとしたポストシナプス膜上に存在するイオンチャンネルや受容体が重要な役割を果たしている。これらが単なる情報伝達装置にとどまらず、巧妙な情報処理機構に貢献しているのは、イオンチャンネルおよび受容体がプレシナプスからのシグナルに対して、静止状態と活性化状態の間を移行するだけでなく、脱感作状態という受容体自身による調節機構が働くためである。脱感作の機構は、Gタンパク質共役型受容体で解明が進んでいる。Gタンパク質共役型受容体は、リガンドに長期間刺激され続けるとリン酸化されてポストシナプスにある小胞に取り込まれ、ポストシナプス膜上に出現している受容体の数を減少させることによって、刺激伝達が抑制される。また、リガンドが減少することにより受容体は再び脱リン酸化状態となってポストシナプス膜上に戻り、感受性が回復することが知られている。一方、リガンド開閉型イオンチャンネルでは、nAChR に関して電気生理学的に、チャンネルのコンホメーション変化により脱感作の状態が存在することが再構成膜を用いた実験で証明された³³⁾。また、

脱感作状態へのコンホメーション変化はサブユニットの置換により速度が変化することが報告されているが^{3,4)}、立体構造に関する情報は全く得られていない。それは、我々の nAChR の構造研究においては、チューブ状結晶に ACh やカルバコールなどのリガンドを加えると、チューブ状結晶のらせん対称性が壊れてしまい、解析できなかったことが大きな原因である。そこで脱感作状態での構造を解析するためには、チューブ状結晶を形成する前にリガンドを加えるか、結晶型自体を作り変えるなど、根本的な結晶化条件の検討を行う必要がある。

そこで、今まで解析に用いてきたチューブ状結晶とは別に nAChR の二次元結晶化の検討を始めている。現在のところ、チューブ状結晶での解析は 4 Å が分解能の限界であるが、二次元結晶であればさらに高分解能での解析が可能である。そのため、チューブ状結晶では解明できなかったアミノ酸残基側鎖部分の立体構造や、細胞内領域および細胞外領域の詳細な立体構造を解明できるようになることが期待される。また、活性化状態に関しては、1995 年に氷包埋する直前のチューブ状結晶に ACh を吹きかけて nAChR を活性化状態として凍結固定することにより、9 Å 分解能で立体構造が解かれたが⁴⁾、結晶型を変えて活性化状態を再現することができれば、さらに高分解能での構造解析が期待できる。

シビレエイの電気器官から調製した nAChR を豊富に含んだポストシナプス膜は、中性付近の緩衝液で数週間インキュベートすることにより、nAChR がポストシナプス膜中で再配列して容易にチューブ状結晶を形成する。しかし、結晶学的な解釈では、チューブ状結晶は二次元結晶が円柱状に変形したものであると言えることから、チューブ状結晶になるものが二次元にならないとは考えにくい。実際に、当初、チューブ状結晶を用いて解析されていた Ca^{2+} -ATPase は^{3,5)}、リガンドを添加してコンホメーション変化を起こさせることにより結晶型が変化し^{3,6)}、さらに界面活性剤で可溶化したものを再構成することにより、三次元結晶化が可能となった^{3,7)}。そこで nAChR でも、リガンドをあらかじめ添加しておくことで脱感作状態へコンホメーション変化させ、チューブ状結晶と異なる結晶型を形成しやすいコンホメーションにするか、もしくは脂質二重膜のシートが丸まって円柱状に変形するのを阻害する目的で nAChR の細胞質領域もしくは細胞外領域を架橋するようなモノクローナル抗体を二次元結晶化の実験系に混合し二次元結晶への成長を促進する方法などが考えられる。これらのアイデアを含めて、2 種類のシビレエイ (*Torpedo Marmorata*, *Torpedo Californica*) の電気器官を用いて二次元結晶化の検討を行っている。現在までに、チューブ状結晶の作製時と同じ条件で、インキュベーションの初期段階に、いずれのシビレエイからも二次元的に nAChR の並んだ狭い領域が、生じることが分かった (図 10 (a), (b))。また、電子顕微鏡像をフーリエ変換することにより、その配列領域から二次元結晶状の回折点を、低分解能に限定されてはいるが得ることができた (図 10 (c))。チューブ状結晶は数週間インキュベーションした後から出現し始めるが、この二次元的に nAChR の並んだ領域はインキュベーション 1 週間後に最も多く生じ、その後、消失することから非常に不安定で壊れやすいことが予想される。そこで、結晶化の促進および安定化につながる温度コントロールや、結晶成長に対する膜融合剤の添加による効果が期待される。

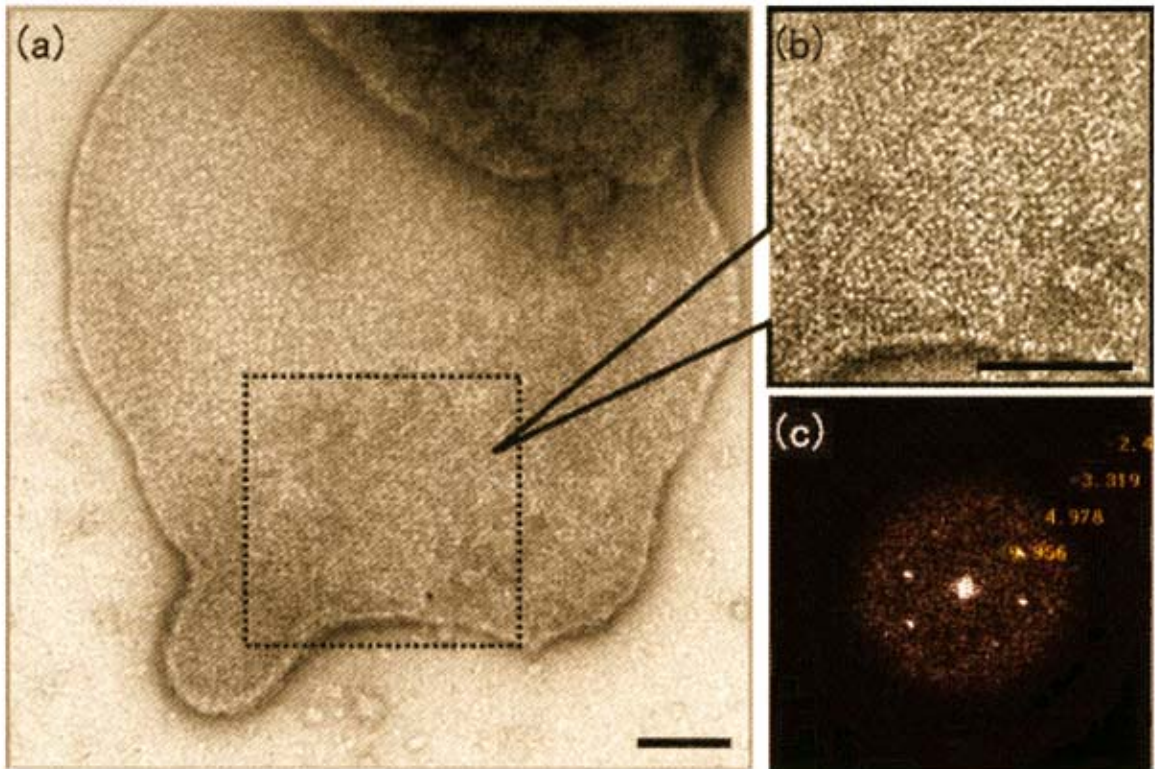


図 10：二次元的に nAChR の並んだ狭い領域

(a) ベジクルの一部に、二次元に nAChR が配置した領域（点線内）が見られる。(b) 点線で囲った領域の拡大写真。(c) 点線内を高速フーリエ変換することにより得られた回折点。

さらに、 Ca^{2+} -ATPase で行われたようにもう 1 つの結晶化法として、nAChR をポストシナプス膜から界面活性剤を用いて可溶化し、カラムを用いて精製した nAChR を脂質二重膜中へ再構成して結晶化する方法も検討する必要がある。前述のような、native なポストシナプス膜をそのまま用いた結晶化法では、界面活性剤などの処理をしないため、受容体や脂質分子を生体内にある状態に保ったまま結晶化することができる。しかし、結晶型に影響を与えられとされる脂質組成や、lipid protein ratio (LPR) を変えることはできない。一方、ポストシナプス膜から精製した nAChR を用いた場合、界面活性剤によるタンパク質の変性が問題になるが、変性を極力抑えながら十分な溶解度が得られる界面活性剤を慎重に選ぶことにより、脂質組成や LPR、再構成の条件などの二次元結晶化のパラメーターを増やすことができる。また、ポストシナプス膜中に混在している他の膜タンパク質を除去することができ、解析後の分解能の向上も期待できる。現在までに、シビレエイの電気器官から Triton X-100 を用いて nAChR を可溶化し、nAChR の合成リガンドを利用したアフィニティーカラムにより、5 量体構造を保持した状態で効率良く精製することに成功している。

おわりに

極低温電子顕微鏡を用いて撮影されたチューブ状結晶のイメージから、らせん対

称性を利用して解析されたこれらの結果は、nAChRの詳細な立体構造を明らかにすると共に、細胞外領域にあるリガンド結合部位にAChが結合した後、どのようにして膜貫通領域のイオンチャンネルが開くのか、そのアロステリックなメカニズムを明らかにしている。おそらく他の神経型イオンチャンネルでも、このガードル状構造をしたゲートとその開閉メカニズムを利用して、細胞膜の内外を流出入するイオンの迅速なコントロールを行っていると思われる。また、nAChRの構造と活性化メカニズムが解明されたことは、神経筋接合部における情報の伝達システムの解明に重要な知見を与えるだけでなく、新たな筋弛緩薬の設計・開発や、受容体の異常に起因する様々な筋疾患の解明に貢献するものと思われる。また、5-HT₃、GABA、およびグリシン受容体の構造と機能メカニズムの解明にも寄与し、これらの受容体に結合するアルコールや麻酔薬の作用機序の解析から、新たな向精神薬の開発にもつながる可能性があると思われる。

一方、リガンド開閉型イオンチャンネルの静止状態または活性化状態からの脱感作状態への移行に関して、残念ながら、そのメカニズムの解明は非常に遅れている。しかし、実はこのメカニズムの異常に起因すると思われる疾患は、決して少なくない。その例として、筋無力症を引き起こす遺伝子異常のうち一部のものはnAChRの脱感作状態への移行を遅らせることが報告されている^{3,8)}。また、近年、異常な驚愕反応、筋緊張亢進を主症状とするStartle病(Hyperekplexia)は、グリシン受容体の点突然変異が原因であるが、この変異のうち一部のものはグリシン受容体の脱感作状態から静止状態への回復を遅延させていることが分かった^{3,9,40)}。今後、リガンド開閉型イオンチャンネルの脱感作の機構が明らかになれば、現在のところ原因不明とされている疾患の中にも、このメカニズムの異常によるものが発見されるかもしれない。脱感作状態との比較・対照研究が可能な静止状態の原子構造がすでに解明されているnAChRは、こうした脱感作メカニズムの解析に最適なりガンド開閉型イオンチャンネルであり、nAChRの脱感作状態の解明は、同じスーパーファミリーに属する他のリガンド開閉型イオンチャンネルの機能メカニズムの解明にも、大いに貢献することが期待される。

今後、シナプスにおいて情報伝達の中核をなす受容体やイオンチャンネルの働きを正しく理解するためには、個々の機能的な膜タンパク質の解析を行うばかりではなく、それぞれの受容体やイオンチャンネルに特異的な結合タンパク質や、相互作用するタンパク質などを含めた生体内における分子複合体を、1つの機能集団として研究していく必要があると思われる。神経筋接合部に存在するnAChRに関して言えば、同じくポストシナプスに存在するラプシン、muscle specific kinase、アグリン、ジストロフィン、ジストログリカン等が、相互作用して複合体を形成する分子として考えられる。しかし、これらの分子複合体を一体として単粒子解析法や電子線トモグラフィーで構造を解析する場合、その中心となるタンパク質の構造が明確でなければ、他の構成要素となるタンパク質分子を複合体内で解析することは困難である。すでに立体構造が得られているnAChRは、分子複合体の中で他者と区別をつけるための指標タンパク質となり得るが、さらに高い分解能における完全な全体構造の解析が求められる。そして、複合体内部での個々の分子の確実な同定のために、

in vivo の状態でタンパク質 1 分子を標識して電子顕微鏡で観察できる、新たな 1 分子標識法の開発が必要であろう。

最後に、アセチルコリン受容体の構造研究は、英国 MRC 分子生物学研究所の Nigel Unwin 博士との共同研究によるものである。ここに心より感謝の意を表する。

参考文献

- 1) Brisson, A., Unwin, P.N.T. : *J. Cell Biol.*, 99, 1202-1211 (1984)
- 2) Toyoshima, C., Unwin, N. : *Nature*, 336, 247-250 (1988)
- 3) Unwin, N. : *J. Mol. Biol.*, 229, 1101-1124 (1993)
- 4) Unwin, N. : *Nature*, 373, 37-43 (1995)
- 5) Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., Unwin, N. : *J. Mol. Biol.*, 288, 765-786 (1999)
- 6) Fujiyoshi, Y., Mizusaki, K., Morikawa, K., Yamagishi, H., Aoki, Y., Kihara, H., Harada, Y. : *Ultramicroscopy*, 38, 241-251 (1991)
- 7) Fujiyoshi, Y. : *Adv. Biophys.*, 35, 25-80 (1998)
- 8) Beroukhi, R., Unwin, N. : *Ultramicroscopy*, 70, 57-81 (1997)
- 9) Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N. : *Nature*, 423, 949-955 (2003)
- 10) Unwin, N. : *J. Mol. Biol.*, 346, 967-989 (2005)
- 11) Karlin, A. : *Nature Rev. Neurosci.*, 3, 102-114 (2002)
- 12) Frail, D.E., Mudd, J., Shah, V., Carr, C., Cohen, J.B., Merlie, J.P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6302-6306 (1987)
- 13) Brejc, K., Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. : *Nature*, 411, 269-276 (2001)
- 14) Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J., Fujiyoshi, Y. : *J. Mol. Biol.*, 319, 1165-1176 (2002)
- 15) Wick, M.J., Mihic, S.J., Ueno, S., Mascia, M.P., Trudell, J.R., Brozowski, S.J., Ye, Q., Harrison, N.L., Harris, R.A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6504-6509 (1998)
- 16) Mascia, M.P., Trudell, J.R., Harris, R.A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9305-9310 (1998)
- 17) Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. : *Nature* 407, 599-605 (2000)
- 18) Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Mackinnon, R. : *Science* 280, 69-77 (1998)
- 19) Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., Mackinnon, R. : *Nature* 414, 37-42 (2001)
- 20) Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., Mackinnon, R. : *Nature* 414, 43-48 (2001)
- 21) Kelley, S.P., Dunlop, J.I., Kirkness, E.F., Lambert, J.J., Peters, J.A. : *Nature*, 424, 321-324 (2003)
- 22) Finer-Moore, J., Stroud, R.M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 155-159 (1984)
- 23) Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori,

- Y., Fukuda, K., Numa, S. : *Nature*, 335, 645-648 (1988)
- 24) Galzi, J.L., Devillers-Thierry, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J.P. : *Nature*, 359, 500-505 (1992)
- 25) Gunthorpe, M.J., Lummis, S.C.R. : *J. Biol. Chem.*, 276, 10977-10983 (2001)
- 26) Keramidas, A., Moorhouse, A.J., French, C.R., Schofield, P.R., Barry, P.H. : *Biophys. J.*, 78, 247-259 (2000)
- 27) Corringer, J.P., Bertrand, S., Galzi, J.L., Devillers-Thierry, A., Changeux, J.P., Bertrand, D. : *Neuron*, 22, 831-843 (1999)
- 28) Croxen, R., Newland, C., Beeson, D., Oosterhuis, H., Chauplannaz, G., Vincent, A., Newsom-Davis, J. : *Hum. Mol. Genet.*, 6, 767-774 (1997)
- 29) Grosman, C., Salamone, F.N., Sine, S.M., Auerbach, A. : *J. Gen. Physiol.*, 116, 327-339 (2000)
- 30) Ohno, K., Hutchinson, D.O., Milone, M., Brengman, J.M., Bouzat, C., Sine, S.M., Engel, A.G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 758-762 (1995)
- 31) Wang, H.-L., Milone, M., Ohno, K., Shen, X.-M., Tsujino, A., Batocchi, A.P., Tonali, P., Brengman, J., Engel, A.G., Sine, S.M. : *Nature Neurosci.*, 2, 226-233 (1999)
- 32) Labarca, C., Nowak, M., Zhang, H., Tang, L., Deshpande, P., Lester, H.A. : *Nature*, 376, 514-516 (1995)
- 33) Tauc, C., Bruner, J. : *Nature*, 198, 33-34 (1963)
- 34) Lopez-Hernandez, G.Y., Sanchez-Padilla, J., Ortiz-Acevedo, A., Lizardi-Ortiz, J., Salas-Vincenty, J., Rojas, L.V., Lasalde-Dominicci, J.A. : *J. Biol. Chem.*, 279, 38007-38015 (2004)
- 35) Dux, L., Martonosi, A. : *J. Biol. Chem.*, 258, 2599-2603 (1983)
- 36) Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beall, H.P., Martonosi, A. : *J. Biol. Chem.*, 260, 11730-11743 (1985)
- 37) Dux, L., Pikula, S., Mullner, N., Martonosi, A. : *J. Biol. Chem.*, 262, 6439-6442 (1987)
- 38) Engel, A.G., Ohno, K., Milone, M., Wang, H.L., Nakano, S., Bouzat, C., Pruitt, J.N., Hutchinson, D.O., Brengman, J.M., Bren, N., Sieb, J.P., Sine, S.M. : *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1217-1227 (1996)
- 39) Saul, B., Kuner, T., Sobetzko, D., Brune, W., Hanefeld, F., Meinck, H.M., Becker, C.M. : *J. Neurosci.*, 19, 869-877 (1999)
- 40) Moorhouse, A.J., Jacques, P., Barry, P.H., Schofield, P.R. : *Mol. Pharm.*, 55, 386-395 (1999)