

戦略的創造研究推進事業

研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「ロドプシンをモデルとした

G蛋白質共役型受容体の構造・機能解析」

研究終了報告書

七田 芳則

(京都大学、教授)

1. 研究実施の概要

基本構想

生体に広く存在する細胞内情報変換モチーフの一つは「受容体⇒G 蛋白質⇒酵素」である。これに関与する受容体はG 蛋白質共役型受容体 (GPCR) と総称され、ヒトゲノム上にも 1000 種程度が存在する。GPCR から情報を受け取る G 蛋白質の種類は高々20 程度なので、GPCR のG 蛋白質活性化メカニズムには共通性があり、また、特定のG 蛋白質サブタイプに情報を伝えるための特異性を生み出すメカニズムがあると考えられる。本研究では、GPCR の中で特に研究の進んでいるロドプシンのG 蛋白質活性化に至る構造変化の機構やG 蛋白質サブタイプに対する共役特異性の機構を原子レベルで解析することにより、GPCR 機能の基本的な理解を目指した。また、GPCR 一般の構造・機能解析にロドプシンをモデルとした研究を展開し、GPCR の機能発現機構の一般性と多様性を理解することを目指した。さらに、GPCR の機能多様性がどのような分子メカニズムで生じるのか、また、GPCR そのものの分子的な性質が生体内でどのように発現するのかをモデルマウスの作製などにより検討した。具体的には下記の3つの研究計画のもとに研究を行った。

1. ロドプシンのG 蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析
2. ロドプシンと他の GPCR との比較解析
3. ロドプシン類の機能多様性を起因とする視覚機能の多様性

本研究ではロドプシン機能の原子レベルの解析のために、X線立体構造解析、フーリエ変換赤外分光法、可視吸収スペクトル法を用いた。また、培養細胞系で発現させたロドプシン類の各種変異体や、ロドプシン類とは異なる GPCR ファミリーに属する代謝型グルタミン酸受容体を実験材料とした。さらに、ロドプシン変異体や錐体視物質を発現するノックインマウスの作製も行い、GPCR の分子特性や生理機能を総合的に解析することを試みた。以下にその成果を報告する。

研究成果

1. ロドプシンのG 蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析

ロドプシンは眼の視細胞に存在する膜蛋白質で、分子進化の過程で光を受容する能力を獲得した GPCR である。拡散性の化学物質をアゴニストとする多くの GPCR では、リガンドを結合していない状態では不活性状態と活性状態の熱平衡にあり、アゴニストが結合すると活性状態に、インバーサアゴニストが結合すると不活性状態に平衡がシフトする。ロドプシンの場合にはインバーサアゴニストからアゴニストへの変換を光で制御できるため、一般の GPCR では熱的に起こる蛋白質の構造変化を光で一方向に起こすことができる。そのため、時間分解能の高い分光学的方法が適用でき、構造変化を詳細に検討できる。これまでの研究から、光を吸収したロドプシン中では発色団のシス-トランス異性化反応が起こり（つまり、リガンドがインバーサアゴニストからアゴニストに変換され）、その後数種類の間状態を経て、G 蛋白質を活性化する中間状態になることが知られていた。

1.1 X線解析によるロドプシンのG 蛋白質活性化機構の解析

岡田グループはX線回折によるウシロドプシンの立体構造を 2.6 Å で決定し、ロドプシン中に存在する水分子の同定に成功した。また、その分解能を 2.2 Å にまで改善するとともに、ロドプシンの初期中間体であるバソおよびルミロドプシンの立体構造モデルの構築に成功した。以上の結果、ロドプシンの基底状態から光を吸収して活性状態に至る構造変化の絶対座標が確定し、これまでの各種分光法による相対座標の上での議論が統合されることになった。このことにより、ロドプシン研究に質的な転換をも

たらし、さらに、今後のG蛋白質を活性化する中間体の構造解析に向けての大きなステップとなった。なお、依然として立体構造が解析されたGPCRがロドプシンだけであることから、本研究は多くのGPCRの最新モデルを提供することになり、その波及効果は甚大である。

1.2 分光法を用いたロドプシンのG蛋白質活性化機構の解析

神取グループはフーリエ変換赤外分光法（FTIR法）を駆使して、光吸収後のロドプシンで起こる構造変化を解析した。まずFTIR法がミリÅの構造変化に対応できることを利用して、ロドプシン発色団のシッフ塩基近傍に水分子が配位しているかについてのX線回折法と固体NMR法での相違点を検討した。その結果、X線回折法による発色団シッフ塩基と対イオンとの相互作用の仕方がより正しいことを証明した。一方、ロドプシンが光を吸収して生成する中間体に特異的な振動バンドの変化を同定し、バソロドプシンとルミロドプシンについての構造変化の違いを明らかにした。また、ルミロドプシンはメタロドプシンIに比べるときわめて限定的な構造変化を起こし、メタロドプシンIではより広がった蛋白質の構造変化が起こっていることを明らかにした、さらに、神取ら自身が開発した新しい振動数領域におけるスペクトル解析の結果、重水で置換されるヘリックス構造がメタロドプシンIの段階で、さらに、シート構造がメタロドプシンIIの段階で構造変化することを明らかにした。神取グループはまた、GPCRとしての機能を果たすロドプシンだけでなく、同じ7回膜貫通型蛋白質でレチナール分子を発色団としながらG蛋白質活性化能をもたないレチノクロム（無脊椎動物の光異性化酵素）や古細菌ロドプシンに対しても詳細な構造・機能解析を行い、機能発現に至る蛋白質の本質的な構造変化を同定することに成功した。

2. ロドプシンと他のGPCRとの比較解析

2.1 ロドプシンとG蛋白質との2段階相互作用機構の解析

脊椎動物のロドプシンでは長い間、G蛋白質を結合・活性化する中間体はメタロドプシンIIと考えられていた。しかしこれまでの研究から、この中間状態以外に、G蛋白質と相互作用する新たな中間状態を発見し、メタロドプシンIbと命名していた。本研究において、この中間状態が生理的条件下でGDPを結合したG蛋白質と最初に結合する状態であることを新たに見いだした。また、G蛋白質のメタロドプシンIbあるいはメタロドプシンIIと相互作用する領域が違うことをアミノ酸残基のレベルで明らかにした。細胞内でのG蛋白質はGDPを結合した状態で存在し、GPCRと結合するとGDPが遊離した状態になることがわかっている。したがって、GDP結合型のG蛋白質との結合状態を新たに同定したことにより、G蛋白質活性化に至る相互作用過程の本質的理解に迫ることが可能となった。

2.2 アゴニスト結合能を示すロドプシンの発見

すでに述べたように、一般のGPCRがアゴニストと呼ばれる外来性のリガンドを結合して活性状態になるのとは異なり、ロドプシン類では、蛋白質部分（オプシン）にインバースアゴニスト（11シス型レチナール）が結合しており、光を受容してそれをアゴニスト（全トランス型レチナール）に変換して活性状態になる。これまでのロドプシン研究の主な対象であった脊椎動物のロドプシンは、アゴニストと直接結合する能力はなく、光受容によってのみ活性状態になる。したがって、ロドプシンをモデルとして一般のGPCRのリガンド結合機構を解析するため、当初我々はロドプシンのリガンド結合サイトを改変してアゴニストと直接結合するロドプシンを作製することを計画した。しかし、その後のロドプシン類の多様性解析の中で、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物の1つである頭索動物ナメクジウオに含まれるロドプシンがアゴニスト（全トランス型レチナール）と直接結合して活性状態になることを発見した。そこで、このロドプシンを実験材料として網羅的な変異体解析によるリガンド結合サイトの性質を検討

した。その結果、アゴニストとインバースアゴニストの結合能が1つのアミノ酸残基（Trp265）によって制御されていることがわかった。また、脊椎動物ロドプシンがアゴニストを結合できないのは、分子進化の過程で対イオンの変位が起こったことが原因である可能性が示唆された。以上の実験の結果、GPCRのリガンド結合サイトの基本的な性質について、ロドプシンをモデルとして、立体構造を基礎とした詳細な検討が可能となった。

2.3 ロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体とのG蛋白質活性化メカニズムの比較解析

これまでの研究から、GPCRはお互いにアミノ酸配列の相同性のないいくつかのグループに分類されることがわかっている。アミノ酸配列の相同性のないGPCRも共通の構造（7回膜貫通 α ヘリックス構造）と機能（G蛋白質の活性化）を有するので、単なるアミノ酸配列の比較では解析できない共通の機能発現メカニズムがあると想像される。そこでロドプシンとアミノ酸配列の相同性はないが、神経伝達の調節に重要な役割を果たしている代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）を第二のモデルとして選び、アミノ酸配列によらない機能探索の方法を検討した。その結果、mGluRでも細胞質ループの2カ所に、置換により刺激非依存的に活性化能が上昇する残基（CAMサイト）のあることを同定し、CAMサイトの近くのアミノ酸残基をシステインに置換してジスルフィド結合で固定するとG蛋白質を活性化しなくなることを発見した。つまり、「CAMサイトの同定とジスルフィド結合によるヘリックス構造変化の阻害」という方法が、ロドプシンを含むファミリー1以外のGPCRのG蛋白質活性化機構の解析にも有用であることを発見した。また、mGluRではロドプシンとは違ってヘリックスIIとIVの構造変化により活性状態に変化することを発見し、ロドプシン、mGluRそれぞれは先祖型の分子構築を保ちながら細胞表面に存在するG蛋白質を活性化するための共通の活性化メカニズムを発達させたことがわかった。

3. ロドプシン類の機能多様性を起因とする視覚機能の多様性解析

分子進化の過程でのGPCRの多様化がどのような機能の獲得を導くかは、生物の多様化の戦略を解析する上でも重要である。そこで、本研究ではロドプシン類の場合についてその多様化のメカニズムを分子レベルで解析することを試みた。

3.1 ロドプシン類の分子進化における対イオンの変位の解析

ロドプシン類は脊椎・無脊椎動物にわたって広範に存在する。そこで、ロドプシン類のアミノ酸配列の比較解析と変異体解析を駆使することにより、ロドプシンが可視光を受容するのに必須の役割を果たすアミノ酸（対イオン）が脊椎動物のロドプシンの分子進化の過程で蛋白質の中で位置の変位を起こしたことを発見した。また、この変位によって、脊椎動物のロドプシンは高効率なG蛋白質活性化機構を獲得したことも見いだした。さらに、この変位により、脊椎動物のロドプシンでヘリックスIIIとVIIとの間に塩結合が形成され、アゴニストの結合が完全に阻害されている可能性が示唆された。

3.2 動物の体内時計への入力に関わる光センサー細胞の解析

哺乳類の体内時計の光センサー細胞（光感受性神経節細胞）が無脊椎動物の感桿型視細胞と起源を同じにすることを、それぞれに存在する光受容蛋白質の性質の検討から明らかにした。つまり、ヒトを含む哺乳類の目の中には、視覚を司る視細胞の他に無脊椎動物の視細胞タイプの細胞が形態を変化させて体内時計の調節のために同居していることを発見した。

3.3 ノックインマウスを用いた視物質・GPCRの機能解析

多くの脊椎動物の網膜には2種類の視細胞、桿体と錐体が存在し、それぞれ薄明視、昼間視（色覚）を担っている。我々は、両視細胞の応答特性とそれらに含まれている視物質の反応特性との相関を検討した。in vitro での変異体解析により、ロドプシンと錐体視物質の反応速度の違いを決定しているのは

N 末端から数えて 122 番目と 189 番目に位置するアミノ酸残基であることを発見し、そのうち 122 番目の残基を入れ換えたロドプシンを桿体視細胞に発現するマウス（ノックインマウス）を作製し、視物質の分子的性質と桿体視細胞応答との相関を中谷グループと共同して検討した。その結果、視物質の光感度や波長感受性が視細胞の感度や波長感受性に直に影響するのは当然であるが、視細胞の応答の回復速度が、ロドプシンのメタⅠ-メタⅡの平衡のシフトによって変化すること、また、強い光を受けた後応答が回復する過程はメタⅢ中間体の崩壊速度と一致することを明らかにした。一方、応答速度が異なる錐体視細胞に含まれる視物質を桿体視細胞にノックインすることにより、桿体と錐体でのシグナル増幅の違い（約 6 倍）のうちの半分が視物質の分子的性質の違いに由来することが明らかになった。また、本来 2 つの波長感受性の異なる錐体視物質しか持たないマウスに 3 つめの錐体視物質を導入することにより、我々ヒトを含む霊長類の 3 色性色覚成立機構の解明のためのモデルマウスの作製に成功した。

以上の研究の結果、ロドプシン類を取り上げても GPCR の多様化が生物の生存に必須な感覚の多様化と密接に関連しており、進化過程における機能獲得を分子の言葉で解析できることが示された。

2. 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 (七田グループ)

研究実施項目：ロドプシンをモデルとした GPCR の機能発現・多様性解析

概要：①ロドプシンや他の GPCR の G 蛋白質活性化機構について、それらを分光学的・生化学的・分子生物学的に比較解析する。また、リガンド結合能を持つロドプシンや変異体を検索する。

②GPCR のアミノ酸変異による生理機能の多様化について、ロドプシン類を例として解析する。そのため、錐体視物質の性質を示す変異ロドプシンや錐体視物質を桿体視細胞にノックインしたマウスモデルの機能解析を行う。また、ロドプシン類の多様化の分子メカニズムを探索する。

産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター (岡田グループ)

研究実施項目：X線解析法によるロドプシン類の機能解析

概要：ロドプシンの 3 次元結晶を作製し、この結晶を種々の温度下で光照射して G 蛋白質活性化に至る中間状態をトラップし、それらの立体構造を X 線解析の手法で決定する。また、培養細胞系でのロドプシン類およびロドプシン変異体の結晶化を試みる。

名古屋工業大学 大学院工学研究科 物質工学専攻 (神取グループ)

研究実施項目：分光法によるロドプシン類の機能解析

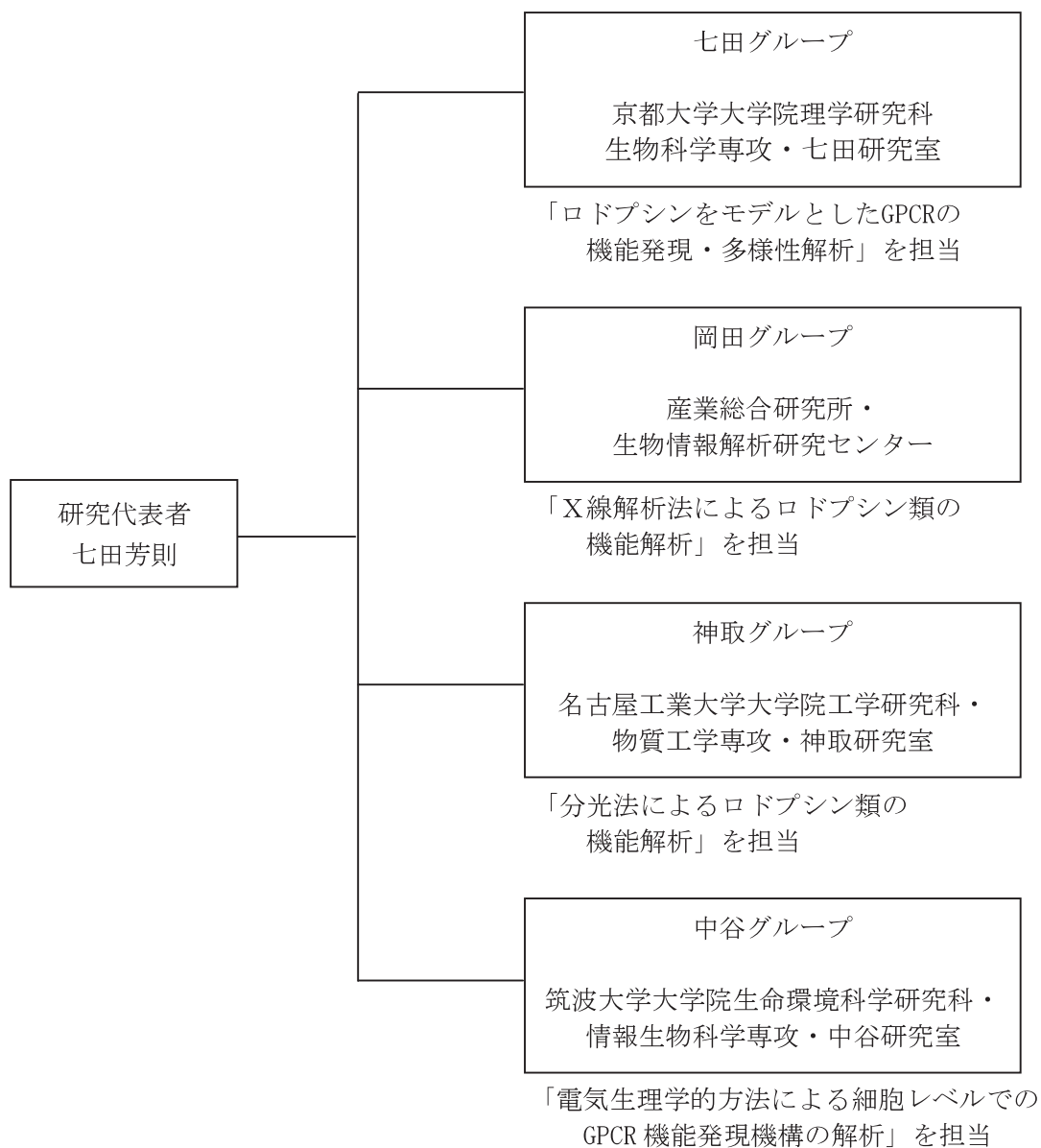
概要：主に振動分光法（フーリエ変換赤外吸収スペクトル法）を駆使して、ロドプシンおよびその中間体の変化過程をミリ Å の分解能で解析する。また、GPCR の解析モデルとしての種々のレチナール蛋白質の機能発現に関与する蛋白質の構造変化について解析する。

筑波大学 大学院生命環境科学研究科 情報生物学専攻 (中谷グループ)

研究実施項目：細胞レベルでの GPCR 機能発現機構の解析

概要：七田グループで作製したノックインマウスなどの電気生理学的測定を行うことにより、視覚機能における GPCR の変異と細胞の応答特性の比較を行う。また、他の感覚、特に嗅覚における GPCR の発現様式と細胞の応答特性変化を比較検討する。

(2) 実施体制



3. 研究実施内容及び成果

ロドプシンは眼の視細胞に存在する膜蛋白質で、分子進化の過程で光を受容する能力を獲得したG蛋白質共役型受容体（GPCR）である。拡散性のアゴニストによって活性化される多くの GPCR とは違って、ロドプシンは分子内に発色団として 11 シス型レチナール（インバースアゴニスト）を含み、光を吸収することによりそれを全トランス型レチナール（アゴニスト）に変換して活性状態になる。ロドプシンの研究では光照射によって大量の活性状態を一斉に生成させることができ、また、その活性化過程の解析に時間分解能の高い分光学的手法が適用できる。また、2000 年には GPCR として初めてその 3 次元構造が X 線回折の手法を用いて解明された。以上のことから、ロドプシンが活性状態に至る蛋白質部分の構造変化過程の解析は他の GPCR に比べて非常に進んでいる（図 1）。本研究ではこのロドプシン研究をさらに進展させて原子レベルでの機能解析を行うとともに、ロドプシン類の研究をいかにして GPCR 一般の G 蛋白質活性化に展開していくかについて検討した。

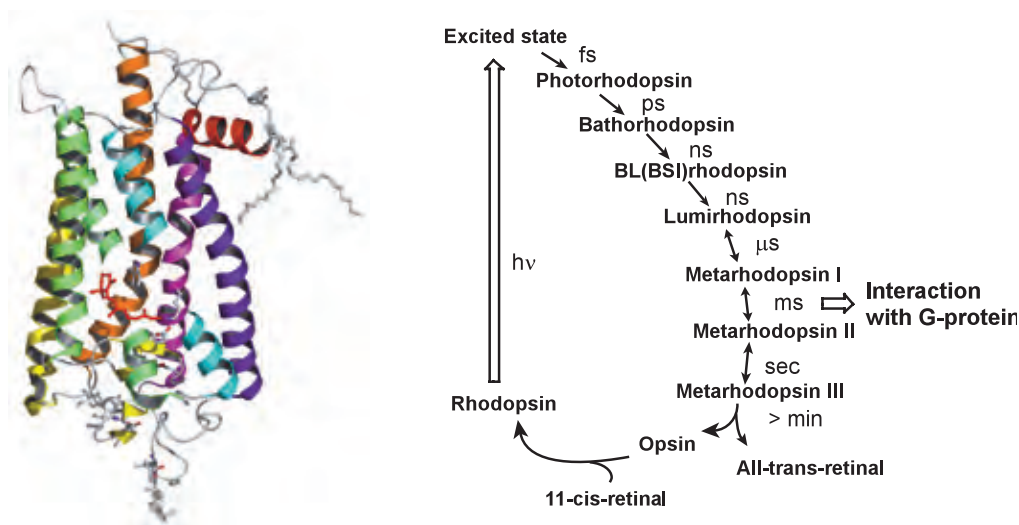


図 1 ロドプシンの立体構造と光反応過程

3.1 X線解析によるロドプシンのG蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析

（産業技術総合研究所 岡田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

本研究課題では、ロドプシン活性化過程で生成することが知られている一連の光反応中間体（バソロドプシン、ルミロドプシン、メタロドプシン I、メタロドプシン II など）の X 線結晶構造解析を行うことを計画した。この研究のスタートに当たり重要と考えられたことは、出来るだけ X 線回折が高分解能に到達するために既知の条件からの 3 次元結晶の質的な向上及びその再現性を高めることであった。特に、既に予備的な実験を開始していた光反応初期中間体（バソ、ルミ）の解析を行う場合には、基底状態（不活性状態）からの蛋白質部分の大きな構造変化は予想されないため、X 線回折データの分解能が低い場合には確実な結論が得られない可能性が考えられた。また、それらの初期中間体における発色団レチナール及びその近傍のアミノ酸の変化と高度な視覚受容機能との関連について議論するためには、蛋白質内部の水分子も含めた基底状態の構造モデルをより精密化しておくことが不可欠であると考えた。

(A) 基底状態の構造モデルの精密化

ウシ網膜視細胞由来のロドプシン 3 次元結晶の X 線回折能を再現性よく高めるために様々な条件を

検索・最適化して、本課題研究の開始当時に 2.8 Å で決定していた基底状態の構造モデルをより高い分解能で精密解析することを試みた。その結果、若干の分解能向上 (2.6 Å) と回折能の再現性を高めることに成功し、ロドプシンの膜貫通 7 本ヘリックス領域中に 7 個の機能的な水分子が存在することを発見した。そのうち 3 つについてはクラスター状の配置をしており、周囲の極性アミノ酸側鎖やペプチド主鎖と水素結合を形成して、複数のヘリックス間相互作用に重要な役割を担っていることが推測された (図 2 左)。これらのアミノ酸部位は、ロドプシンファミリーの G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) で保存されているものが多いことや、一部の受容体ではナトリウムなどのイオン結合が示唆されている位置であることなどから、リガンド結合特性と活性発現の両方を制御するという重要な機能に関与していることが考えられる。

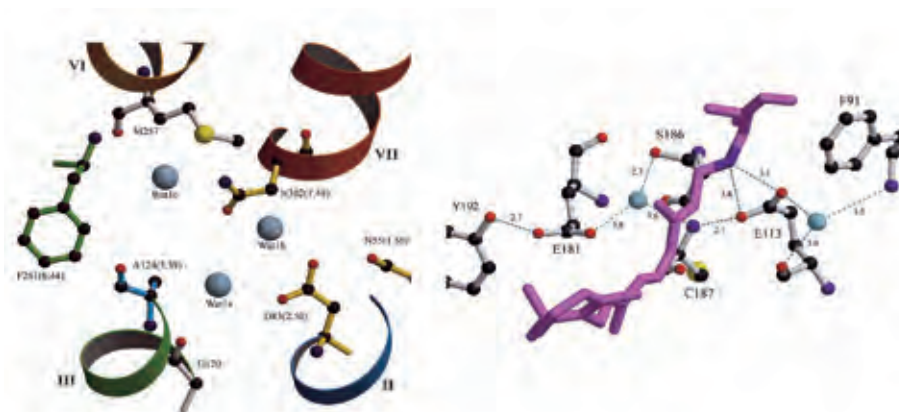


図2 膜貫通ヘリックス(左)及び発色団近傍(右)における水分子の同定
水分子は薄水色の球で示している。左図のローマ数字はヘリックス番号
右図の点線近傍の数値は考えられる水素結合形成原子間距離 (Å)
ピンク色のレチナール及び Lys296 の間のシッフ塩基窒素原子は青で示す

一方、特に興味深いのは発色団 11 シス型レチナールプロトン化シッフ塩基近傍に存在する水分子で、その水分子は従来から分光測定などにより推測されていたシッフ塩基と対イオン (Glu113) の間にあるのではなく、対イオンのカルボキシル基とペプチド結合のカルボニル基との間に位置していることがわかった (図 2 右)。この水分子は対イオンのカルボキシル基の電荷を減じる役目を果たし、結果としてシッフ塩基上のプロトンの存在を安定化していることが推定された。また、より広範囲にわたる水素結合ネットワークに寄与して吸収波長制御に関与すると思われる水分子の位置も明らかになり、色覚視物質などの関連光受容体の機能を理解する上でも貴重な成果が得られたといえる (Okada et al., 2002)。

この段階までの解析では、GPCR のモデル構造であるロドプシン基底状態のポリペプチド鎖のうち細胞質側に、電子密度が不明瞭なために一部未同定の部分があり、そのため G 蛋白質やアレスチンなどとの相互作用部位に関する情報が欠けていた。この点について、その後新たに取得した 2.2 Å のデータセットを用いた構造精密化を行い、モデルを完全なものにすることが出来た (図 3 左)。また、膜貫通領域のみならず、細胞外側表面ループの β シート構造近傍に分布する水分子についても、数多くを同定することができた。また、この大幅な分解能の向上により、発色団である 11 シス型レチナール自身の構造やその結合部位の詳細がいつそう明確になり、分子動力学計算等の手法による理論的な検証に耐えうる精度に近づくことができたといえる。具体的には、2.2 Å 分解能結晶構造で明らかになった発色団の局所的な歪み、特に C11=C12 二重結合回りがあらかじめ回転方向を規定するような向きに振れていることが理論的にも証明され、光異性化反応に重要な意味を持つことが示された (図 3 右)。また、水分子を介した水素結合ネットワーク及びその機能的役割に関しても、理論と実験との比較から貴重な知見が

得られた。因みに、この大幅に向上した分解能は、主に精製段階で使用する界面活性剤ミセル成分を変更したことにより得ることが出来たと考えられる。これとともに、結晶析出に要する沈殿剤（硫酸アンモニウム）濃度も大きく減少した。また、結晶の不完全性の1種である内在的な双晶の問題も解析上の支障となっていたが、これについてもほぼゼロに近い結晶を得ることが出来た（Okada et al., 2004）。

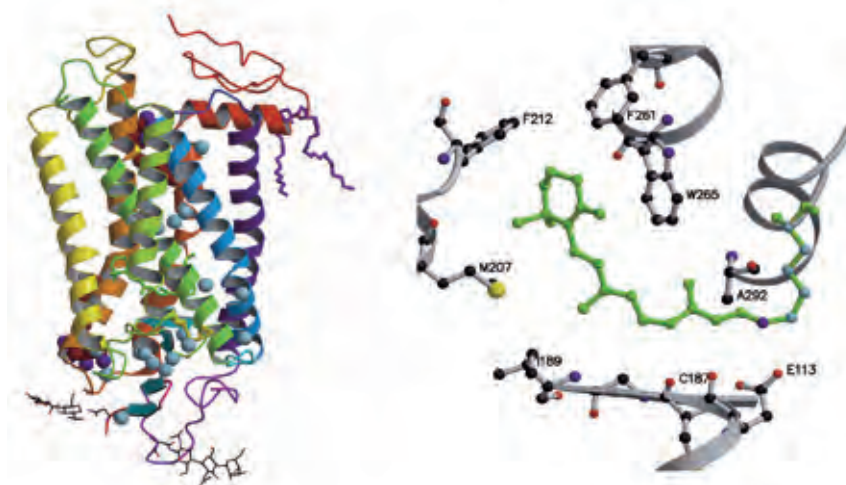


図3 2.2 Åでの精密化による全体構造(左)及び発色団結合部位(右)
レチナール及びリジン残基 Lys296 を緑で示している。

(B) 3次元結晶の顕微分光測定

結晶中でのロドプシンの光反応が溶液中のものとほぼ同様であることを明らかにするためには、顕微分光測定による詳細な紫外・可視分光測定が必須である。その測定に用いた装置の概観を図4に示す。結晶は、X線回折測定に用いるのと同様のナイロンループに拘り取り、直ちに液体窒素により凍結したものを保存しておき、測定時に顕微分光装置のゴニオメーターヘッドに、冷却窒素気流で冷却した状態ですばやく装着した。そこで、幅広い光反応条件において3次元結晶からの分光測定データを蓄積し、溶液中の場合との詳細な比較検討を行った。

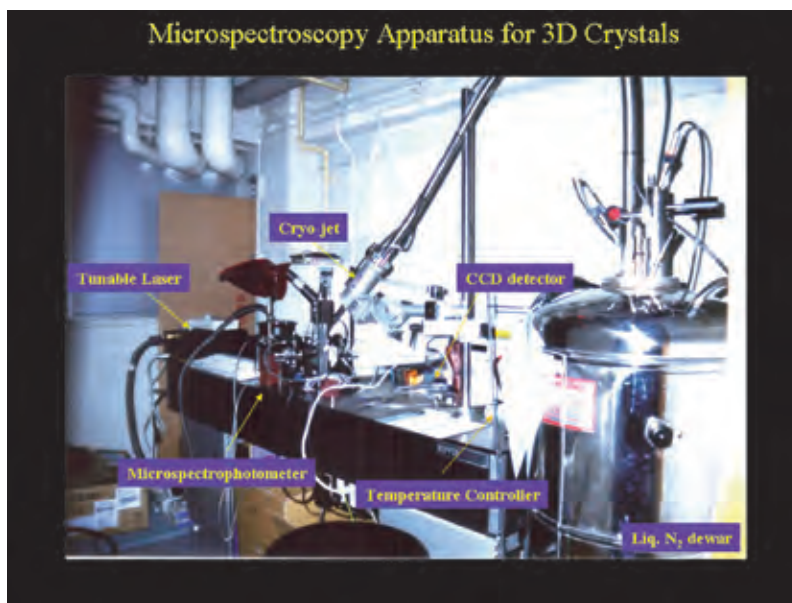


図4 顕微分光測定装置

顕微分光装置本体(microspectrophotometer)、光源(tunable laser)
CCD検出器(CCD detector)、クライオ冷却吹き付け装置(cryo-jet)
等

まず結晶の位置での温度を熱電対でモニターし、一定の温度に安定した段階で、暗赤色光 (>650nm) の下で基底状態のスペクトルを測定した。更に、波長可変レーザーからの一定の単色励起光を偏光解消版を通して結晶に照射した後に経時的な変化を記録した。様々な条件化でそのような測定を行った結果、ロドプシン活性化過程で生成する一連の光反応中間体（バソ、ルミ、メタⅠ、メタⅡ）を、温度依存的に結晶中に確認することが出来た。また、それらの遷移温度も、既知の溶液状態での値と同様であることが確認された。

(C) 光反応初期過程の解析

ロドプシン光反応の第一段階は、発色団レチナールの 11 シス型→トランス型異性化反応である。この光による強制的な内在性リガンド構造の変化は、一般的な創薬標的 GPCR の場合に当てはめるとインバースアゴニストからアゴニストへの瞬時の変換と考えることができるであろう。従って、その詳細な構造変化過程を原子レベルで解き明かすことは、リガンドー蛋白質相互作用変化と活性化との関係を直接的かつ時系列的に明らかにする上で非常に重要である。上述のように、我々は液体窒素温度近傍（100K）に維持したロドプシン 3 次元結晶について顕微分光測定および大型放射光施設における X 線回折測定を繰り返し行うことにより、光反応中間体（バソ）をトラップする実験条件を精密化した結果、ロドプシンとの差電子密度を再現性良く検出することに成功し、更にその中間体構造モデルを 2.6 Å 分解能で構築することができた。その結果は、インバースアゴニスト結合状態にほぼ固定された蛋白質環境の中でのレチナールの容量保存的な異性化反応により、非常に振れたアゴニスト（全トランス型レチナール）が生成することを明確に提示している（図 5）。即ち、レチナールの共役系ポリエン鎖は 9 位のメチル基を支点としたシーソー様の動きを伴って湾曲構造へと移行し、その際に蛋白質部分との僅かなスペースを極めて有効に利用していることが明らかになった。これらの知見は、生理的な条件での超高速異性化反応や高い光反応量子収率・エネルギー蓄積を理解する大きな手がかりとなるものと考えられる（Nakamichi & Okada, 2006）。

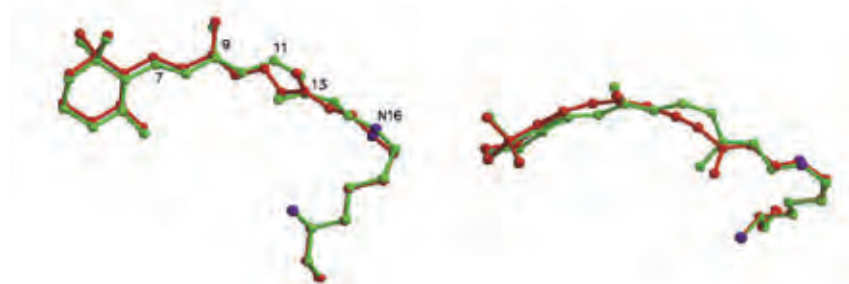


図5 左右ともロドプシン(緑)及びバソロドプシン(赤)の発色団モデル(リジン残基 Lys296 にシッフ塩基結合したレチナール)を重ねて示している

更に、この光反応初期中間体（バソ）の構造モデルに基づいて、密度汎関数法による量子力学計算を行い、視覚初期過程を担う分子メカニズムとして非常に重要なレチナール発色団構造及びその環境について理論的な検証・結晶構造との比較解析を行った。その結果、湾曲したポリエン構造を特徴付ける各々の炭素間結合長、結合角度、二面角角度は、量子論的最適化の前後で良く保存されており、発色団の形状も安定であることが確認された（表 1）。また、これまでの実験報告から知られている可視吸収・振動モード・円偏光二色性などの様々な分光特性等のメカニズムが明らかになるとともに、活性化に必要な光エネルギー蓄積に関しても貴重な知見を得ることができた。具体的には、バソという名称の由来である可視吸収のバソクロミック（長波長）シフト、旋光強度の増加と符号の反転などが良く再現される

とともに、特徴的な水素面外変角運動に由来する振動スペクトルピークについても分光測定結果とよく一致する計算値が得られることが明らかになった。即ち、差電子密度に基づいて構築された中間体の結晶構造モデルは理論的側面からも支持され、高度な視覚初期過程をよく説明できるものであることが示された (Schreiber et al., 2006)。

Structure	State	$E_{\text{chrom}}^{[a]}$	$f^{[b]}$	$R^{[c]}$
11- <i>cis</i> -retinal pSb ^[d]	S_0	-870.7110		
	S_1	1.88 (659)	0.93	0.16
Rhodopsin ^[e]	S_0	-1136.3419		
	S_1	2.52 (492)	0.82	0.29
Bathorhodopsin ^[e]	S_0	-1136.3217		
	S_1	2.35 (528)	0.81	-0.39

表1 結晶構造モデルを用いて理論計算された最適構造の特性パラメータ

[a] S_0 energies [au]; S_1 energies [eV] relative to S_0 (values in parentheses are given in nm). [b] Oscillator strength. [c] Rotatory strength [au]. [d] The chromophore without counterion; pSb=protonated Schiff base. [e] Chromophore including glutamate (counterion) and wat2b (water)

(D) 蛋白質動的变化過程の解析

以上の研究成果を踏まえて、更に光活性化に伴う発色団・蛋白質双方の構造変化について明らかにするために、150K 以上の温度における光照射前後の X 線回折データ収集・結晶構造変化解析を行った。特に、温度上昇に由来する X 線損傷によってデータが損なわれることのないように実験条件を検討し、再現性のある差電子密度を得ることが出来た。そのシグナルは、明らかに 100K で観測されたものよりも広範囲にわたっており、構造変化が発色団結合部位から広がっていることが確認された。更に、それらのデータに基づいて、バソから熱的に生成する中間体ルミの構造モデルを 2.8 Å 分解能で作成することが出来た (図 6)。その結果から、バソで見られた発色団ポリエン鎖の湾曲した捩れ構造がレチナールの β イオノン環の変位を伴って緩和し、ほぼ完全な全トランス型レチナール構造へと変化していることが明らかになった。更に、それに伴って発色団結合部位を形成する周辺アミノ酸にも影響が及び、特に膜貫通ヘリックスⅢの中央部においては、ペプチド骨格主鎖が最大で 1 Å 程度外向きに移動しているという予想外の知見を得ることが出来た。このような局所的な蛋白質構造の歪みが、ロドプシンにおいて蓄積された光エネルギーを変換するメカニズムにおいて重要なステップとなっていることが強く示唆された。重要なことに、最も大きな変位が見られた Gly120 の近傍では、上述の水分子クラスター及びロドプシンファミリーの GPCR で保存性の高いアミノ酸残基 (ヘリックスⅠの Asn55、ヘリックスⅡの Asp83、ヘリックスⅥの Trp265、ヘリックスⅦの Asn302 など) が水素結合ネットワークを介して不活性状態でのヘリックス間相互作用に関与している。即ち、ルミで見られたヘリックスⅢ中央部の外向き折れ曲がり運動はこれらの相互作用を弱めることになると考えられ、更に次のメタⅠ、メタⅡにおいて大きな構造変化を引き起こす要因として重要なものであると考えられる。一方、過去の報告によると、活性化に伴って大きく変化すると推測されているヘリックスⅥについては、特に顕著な電子密度変化が見られなかったが、これは最近報告された 2 次元結晶を用いたメタⅠの電子顕微鏡解析結果とも矛盾しないものである。

本研究結果から推測されるロドプシンファミリーの GPCR における活性化メカニズムは、まず光 (リガンド) 依存的にいくつかの重要な分子内ヘリックス間水素結合 (Ⅰ～Ⅴ、Ⅶ) が弱められ、その結果として主に疎水性相互作用で規定されている構造部位 (ヘリックスⅥ) 及び細胞質側ループにおける変化を引き起こすというものである。これらの貴重な情報を基にして、更に後続の大きな構造変化を検出

あるいは予測するという目的へ向けて大きく前進することが出来たといえる (Nakamichi & Okada, 2006)。

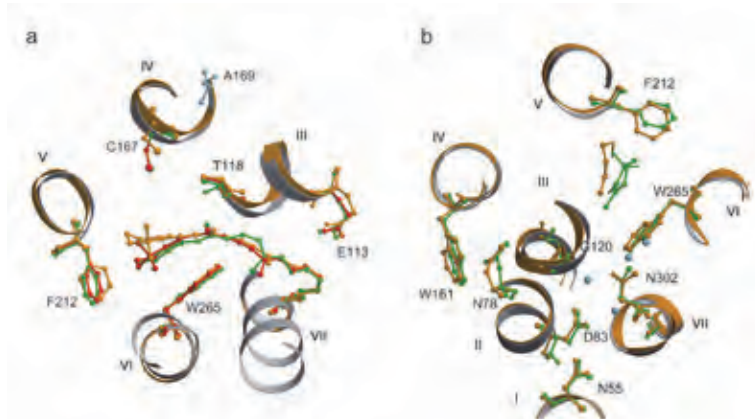


図6 左右とも、膜貫通ヘリックス領域中央部の断面図
ロドプシン(緑)パゾ(赤)ルミ(橙)の構造モデルを重ねて示す。水分子は薄青球
で示している。

(E) 強制発現系を用いた研究

培養細胞系で強制発現させたロドプシン及びその変異体を含めた関連蛋白質の結晶構造解析システムを確立することは、一般の創薬標的 GPCR をターゲットとする構造研究のモデルとしても重要である。本研究では、HEK293S 細胞系での培養条件及び膜試料調製方法を詳細に検討した結果、野生型ロドプシンの安定発現細胞株 1 L からは 2 ～ 3 mg 以上の試料が定常的に得られることとなった。また重要なことに、網膜由来の視細胞膜について確立された選択的可溶化現象を利用したシングルステップの精製手法は、培養細胞由来の膜試料についても適用可能であることが確認された。具体的には、一定量の膜：界面活性剤比率において、顕著な膜間相互作用に由来すると考えられる不溶性混合物の比重の増加と膜蛋白質成分の分離が起こり、短時間の低速遠心分離により目的とする高濃度の上清が得られるというものである。また、この可溶化段階で脱糖鎖酵素である PNGase を作用させることにより、効率的な糖鎖成分の除去を行うことができるという貴重な知見を得ることもできた。

これらの精製ロドプシン試料を用いてスモールスケールでのスクリーニングを行ったところ、X線回折測定に十分なサイズの両錐型結晶及び棒状結晶を得ることに成功した。この棒状結晶は高分解能回折を与える網膜由来のものと外観的には同様であることから、更に様々な実験条件を精密化することにより高分解能構造解析が可能であると考えられる。また、光に依存しない構成的活性を有するロドプシン変異体についても、実験条件を整えることによって両錐型結晶を得ることが出来た。これらの結晶化はサブミリグラムのサンプル量でのスクリーニングにより行っており、今後更に多様なターゲットを効率的に結晶構造解析へと進める体制が確立されたと言える。

(F) 発色団置換型ロドプシンを用いた研究

ロドプシンにおける発色団結合部位の構造や活性化過程の分子メカニズムを理解するために、様々なレチナール異性体や類縁体を用いた研究が行われてきた。しかし、それらが結合することによって実際にどのような構造的な効果が生じているのかということに関しては、推測の域を出るものではなかった。これまでにロドプシンポリペプチドと結合することが知られているレチナールアナログは 100 種を超え、その結合効率や安定性は様々であるが、その X 線結晶構造解析に関しては前例がないため、本研究では比較的扱いが容易と考えられる 9 シス型レチナールを結合させたアナログロドプシンをモデルとして結晶作成から構造決定までの簡便なプロセス確立を行った。

まず、ウシ視細胞外節部の膜試料を調製後に、一旦完全にロドプシンを光退色させることにより、発色団を全トランス型レチナールオキシムへと変換する。その退色膜試料へロドプシンとのモル比で等量以上の 9 シス型レチナールを加え、結合反応が飽和レベルに達するのを確認後に、未反応の過剰な 9 シス型レチナールをオキシムに変換する。この段階で、9 シスロドプシン+（全トランス型+9 シス型）レチナールオキシムを含む膜試料について、選択的可溶化法を適用することにより大部分のオキシムが除かれ、十分な純度の結晶化試料を調製することが出来た。そのような試料から得られた 9 シスロドプシンの 3 次元結晶について大型放射光施設において X 線回折データを収集し、構造解析を行った。その空間群及び格子定数はロドプシン結晶と同様であることが確認されたが、発色団近傍をモデルから除いて計算したオミットマップは、発色団が 11 シス型ではなく 9 シス型でなければ説明できないことを明確に示していた（図 7）。このデータは検索した量的には限られた数の結晶から得られたもので、分解能的にあまり高いものではない（2.9 Å）ながら、非常に似通った発色団構造を判別することが出来たことから、更に多様なロドプシンアナログの原子レベルでの研究をハイスループットの行う道が開けたということが出来るであろう（Nakamichi & Okada, in press）。

また、9 シスロドプシン、ロドプシン及びバソロドプシンの 3 成分は、液体窒素温度近傍で光定常状態を形成することから構造的な光互換性のあることが知られている。従って、これらの精密化した構造モデルを比較し、更に理論計算等を行うことにより、光異性化反応の量子収率等に関する貴重な知見が得られるものと考えられる。

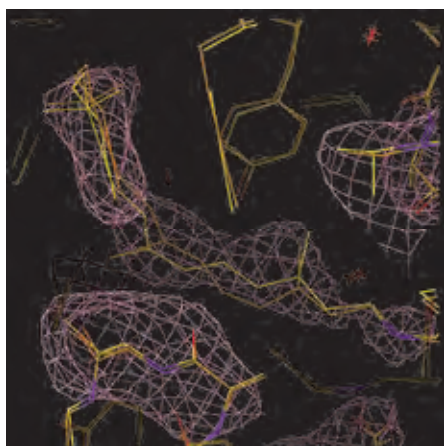


図7 9 シスロドプシン結晶から得られた 2.9 Å までの X 線回折データを用いて計算した発色団近傍のオミットマップ
ロドプシン(オレンジ)と 9 シスロドプシン(黄色)の構造モデルを重ねて示す

(2) 研究成果の今後期待される効果

神経伝達・生理活性物質などの拡散性分子が、GPCR へと結合することにより、細胞レベルでの応答を引き起こすメカニズムを分子・原子レベルで理解するうえで、本研究成果は最新の構造情報を提供してきたといえる。既に、多くのモデリング・実験デザインが、創薬標的 GPCR の研究において展開されており、今後一層の応用・発展が期待される。

GPCR の構造状態は、従来のコンセプト以上に複雑な活性発現メカニズムにより理解しなければならない可能性が、様々な報告から示唆されてきているが、本研究から得られた予想外の局所的な構造変化もそのような考え方と矛盾しないものであろう。従って、“活性型”という一意的な状態を捕捉しようとする戦略に加えて、多様な活性制御因子の存在下での構造状態を原子レベルで明らかにすることが、光刺激と拡散性リガンドとに共通する真の活性化メカニズムの理解に必要であろう。

本研究課題開始当初と同様、依然としてロドプシン以外の GPCR に関する実験的構造解析の成功例が出ておらず、強制発現系に依存しなければならない研究の困難さが改めて浮き彫りになっている。今後

更に本課題で積み上げられた研究を進めて、受容体中の修飾基や特異的・非特異的相互作用の影響などを明確にすること等により、広範なインパクトのある方法論的な知見が得られると期待される。

3.2 分光法を用いたロドプシンのG蛋白質活性化機構の原子レベルでの解析

(名古屋工業大学 神取グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究課題では、ロドプシンの光反応中間体における構造変化過程を振動分光学的手法により詳細に検討し、X線やNMRといった他の手法では得られない原子レベルの情報を得ることを目指した。

G蛋白質共役型受容体 (GPCR) の中で最も研究の進んでいるロドプシン (図8) のリガンド結合機構や情報伝達のための蛋白質の構造変化機構、さらにはG蛋白質活性化機構を原子レベルで解析するため、振動分光学はきわめて有効な手法である。特に、岡田グループにより、最初の GPCR としてウシロドプシンの結晶構造が解明されたことで、ロドプシンの研究は新しいステージに入った。なぜならば我々のグループが行っている赤外分光解析は、構造の変化についてきわめて詳細な情報 (例えばミリオングストローム程度の水素結合変化を解析可能) を提供できる一方で、個々の原子の位置情報を決定することはできない。しかしながら、X線結晶構造解析によるウシロドプシンの構造情報と組み合わせることにより、ロドプシンが活性化される前には蛋白質内部でどのような相互作用があったものが、光の情報によりそれが蛋白質の内部でどのように変化し、それがどのようにしてG蛋白質を活性化させるのか、といった問題を真に原子レベルで解析することができるためである。

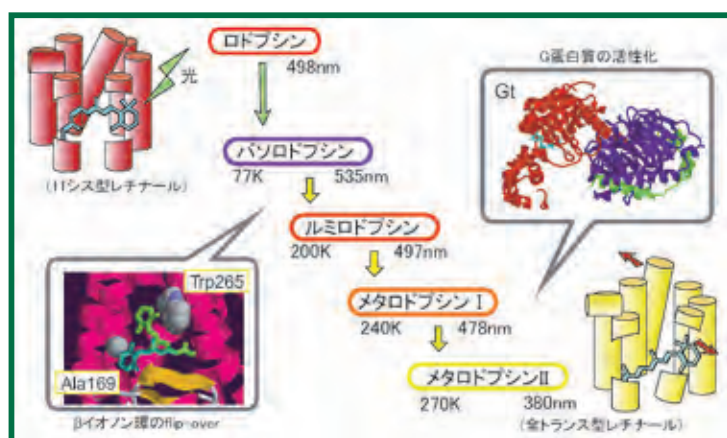


図8 ロドプシンの光反応過程

実際の研究においては、G蛋白質を活性化するロドプシン (ウシロドプシンやイカロドプシンなど) だけでなく、同じ7回膜貫通型蛋白質でレチナール分子を発色団としながらG蛋白質活性化能をもたないレチノクロム (無脊椎動物の光異性化酵素) や古細菌ロドプシンに対しても同様の赤外分光解析を行うことで、G蛋白質活性化に本質的な蛋白質の構造変化を抽出できるものと考え、研究を推進した。特に、古細菌の走光性センサーであるフォボロドプシンの場合は、2回膜貫通型トランスデューサー蛋白質と形成した複合体のX線結晶構造解析までもがわかっており、情報変換のための相互作用を原子レベルで調べるのに適した系である。実験では、これらのロドプシン類に対して低温赤外分光法を行い、機能発現のための構造変化に伴う振動バンドを測定した。具体的には、特定の温度で試料に光を照射し、元の状態と中間体との赤外差スペクトルとして、さまざまな振動バンドが与えられる。大腸菌での蛋白質発現が可能な古細菌ロドプシンの場合、振動バンドの帰属には重原子の標識 (同位体ラベル) を、蛋

白質内部での部位の推定にはアミノ酸の変異（変異蛋白質）を用いた。本研究においては、我々のグループが世界で最初に実現した X-H (X-D) 伸縮振動領域での計測を特に重要なものと位置付けた。この振動数領域は水素結合変化の最も直接的なプローブとなるが、試料中に含まれる水分子の大きな吸収のため、過去に全く計測が行われていなかった。我々は試料を含む測定条件を最適化することにより世界で初めてこの領域のスペクトル測定を実現し（図 9）、以下に示す重要な知見を得ることができた。

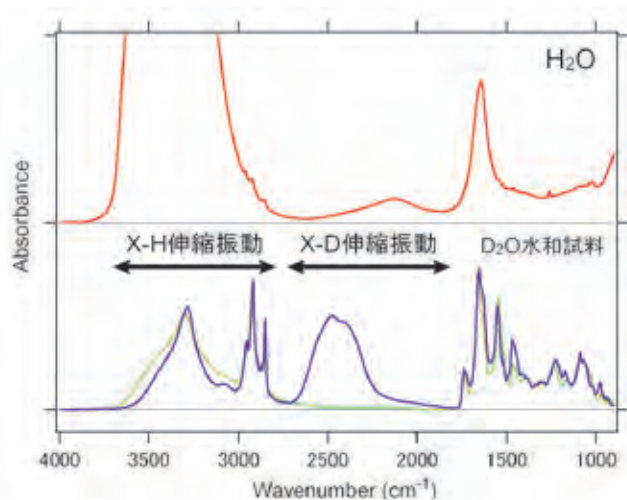


図9 水(上)とロドプシン試料(下)の赤外吸収

以下では、視物質ロドプシン（光異性化酵素であるレチノクロムの研究も含む）と古細菌ロドプシンに分けて、それぞれの研究成果を示したい。

(A) 視物質ロドプシンの赤外分光計測

a. ロドプシンのシッフ塩基部分における水分子を含む水素結合構造

ロドプシンの構造と機能を考えるとき、発色団であるレチナールがリジン残基と結合するシッフ塩基部位は重要である。その理由の1つとして、シッフ塩基がプロトン化することによって可視領域の吸収が実現することが挙げられる。プロトン化シッフ塩基の存在により、我々は多彩な色の世界を楽しむことができるのだ。発色団の正電荷を安定化するため、ロドプシンには負電荷をもった対イオンが存在することが知られている。脊椎動物のロドプシンにおいてこのイオン対構造は、G蛋白質を活性化できる状態（メタII）の形成とともに不安定化し、シッフ塩基から対イオンへのプロトン移動によって中性化する。G蛋白質の活性化は細胞質側で起こるが、膜の反対側に存在するイオン対構造が、G蛋白質を活性化できる状態と協調して変化することになる。GPCRに限らず一般のレセプターにおいて、伝達蛋白質との相互作用とリガンドとの相互作用という膜の反対側で起こる出来事が協調して起こる例が知られているが、ロドプシンの場合のこの例も同様のものと考えられる。

疎水的な蛋白質内部でシッフ塩基と対イオンという電荷対を安定化するため、その領域にはおそらく内部結合水が存在し、極性の高い場をつくっていることが予想される。光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン（古細菌ロドプシンの1つ）の場合、シッフ塩基とアスパラギン酸との間のイオン対構造を安定化するため、両者をブリッジする水分子の存在が明らかになっている。それでは視物質ロドプシンも同様のブリッジ水をもつのであろうか？ ウシロドプシンの場合、シッフ塩基の窒素原子と対イオンである Glu113 の酸素原子との距離が固体 NMR 測定によって 4Å 以上と推定された。これは1個の水がイオン対をブリッジするのに適当な距離である。一方、X線結晶構造解析の結果によれば（Okada et al., 2002）、イオン対の間に水分子の電子密度は観測されなかった（窒素と酸素の距離は 3.1Å）。果

たして、どちらの結果が正しいのだろうか？

この問題を、我々が開拓した振動数領域の低温赤外分光測定によって検討した。図10には、ウシロドプシン(a, b)とバクテリオロドプシン(c)における赤外差スペクトルを示す。実験では、液体窒素温度においてレチナールの光異性化反応に伴う O-D 伸縮振動の領域を、重水中で測定した。赤が D₂O 中、青が D₂¹⁸O 中のスペクトルで、水の同位体効果が示された振動バンドを緑色のタグで示す。灰色の重水のスペクトルと比較して、バクテリオロドプシンが（水素結合の強い）低波数領域に水分子の O-D 伸縮振動をもつことを伸取と七田は 2000 年に発見したのであるが（Kandori & Shichida, 2000）、ウシロドプシンでは高い波数領域にしか水分子の信号が観測されなかった（Furutani et al., 2003）。この図は極低温でのバソ中間体に対する結果であるが、ルミ、メタ I、メタ II といった後期中間体においても水素結合の強い水は現れなかった。従って、古細菌ロドプシンのように正負の電荷対をブリッジする水分子は、ウシなど脊椎動物のロドプシンには存在せず、活性中心でのイオン対構造は異なるメカニズムで安定化されることが示唆された。最新の X 線結晶構造解析によれば、対イオンである Glu113 の近傍にはシッフ塩基を橋渡ししない形で水分子の電子密度が観測されている（Okada et al., 2002）。しかし、この水が Glu113 の負電荷と強い相互作用を形成するのであれば、赤外分光において低波数領域に水の信号が観測されるはずである。視物質ロドプシンの活性中心でイオン対がどのように安定化されているのか、そこに水分子がどのように関与するのかといった問題は、さらに検討を要する課題である。

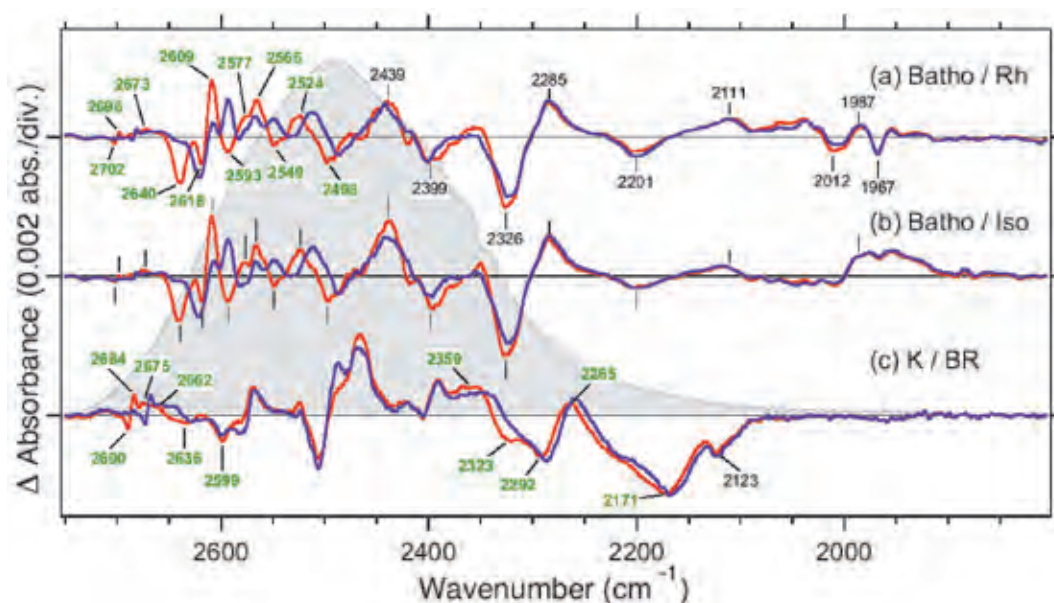


図10 液体窒素温度におけるレチナールの光異性化前後の赤外差スペクトル
(a) バソ中間体とロドプシン、(b) バソ中間体と9シスロドプシン、(c) K中間体とバクテリオロドプシンの差を示す。緑色の数字で示した振動バンドが水分子に由来する。

一方、無脊椎動物のイカロドプシンやレチナール光異性化酵素であるレチノクロムは Glu113 の位置にそれぞれ Tyr および Met を持つため、対イオンは異なる位置にあるのではないかと考えられてきたが、近年になって Glu181 であることが明らかになった（Terakita et al., 2000; Terakita et al., 2004）。脊椎動物と異なる位置に対イオンを持つイカロドプシンとイカレチノクロムのシッフ塩基周辺構造は興味深いものの、結晶構造を含め、構造情報はほとんど得られていないのが現状である。

そこで X-D 伸縮振動領域における低温赤外分光法をイカロドプシンとイカレチノクロムに対して行い、微弱な信号であったものの、シッフ塩基の N-D 伸縮振動および水分子の O-D 伸縮振動を測定することに

成功した。そして、得られたデータから以下の図に示したような構造モデルを提案した (Furutani et al., 2005; Ota et al., 2006)。イカロドプシンにおいてはレチナールの異性化状態に特異的な水分子の O-D 伸縮振動が、バソロドプシン (全トランス型) では 2443cm^{-1} 、アイソロドプシン (9 シス型) では 2382cm^{-1} 、そしてロドプシン (11 シス型) では 2451cm^{-1} に観測されたが、ウシロドプシンではこのような低波数の振動をもつ水分子は存在しない。また、イカレチノクロムでは 2334cm^{-1} に観測され、11 シス型への異性化に伴い 2276cm^{-1} へと低波数シフトした。 2400cm^{-1} 以下の O-D 伸縮振動を示す水分子は強い水素結合環境下にある、レチナールの異性化状態に敏感であることも合わせて、観測された水分子は古細菌ロドプシンと同様に電荷対の間を橋渡しすると解釈した (図 11)。

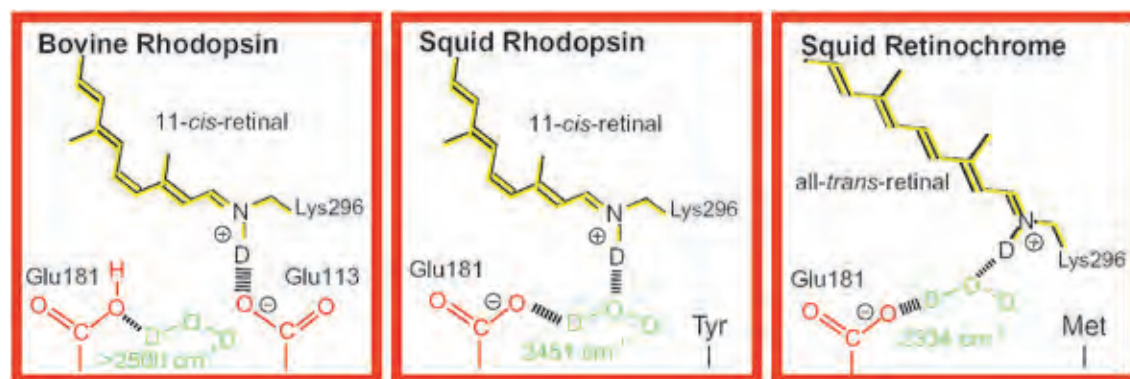


図11 ウシロドプシン(左)、イカロドプシン(中)、イカレチノクロム(右)における Schiff 塩基領域の構造モデル

我々の提案したモデルによると、無脊椎動物のロドプシンやレチノクロムでは Schiff 塩基と対イオンとの間を橋渡しする水分子が存在し、その構造は古細菌ロドプシンと同様である。一方、ウシロドプシンでは橋渡しをする水分子が存在せず、プロトン化 Schiff 塩基は対イオンである Glu113 と直接、相互作用する。脊椎動物のロドプシンは、進化の過程で Glu181 から新たに Glu113 へと対イオンを変換させることにより、赤色錐体視物質での塩化物イオン結合に伴う長波長シフト機構、高効率な G 蛋白質活性化機構を手に入れたと考えられている。

視物質ロドプシンと古細菌ロドプシンにはアミノ酸の相同性はなく、それぞれ別の起源や進化の歴史をもっていると考えられるが、ここで得られた結果はいずれの祖先型ロドプシンも Schiff 塩基と対イオンが水分子を橋渡しして構造を安定化させたことを強く示唆する。一方、脊椎動物のロドプシンは電荷対の安定化にはたらいてきた水分子を、波長制御や活性化機構の調節に使うようになったものと考えることができる。

b. ロドプシンの活性化過程における構造変化

我々が新たに開拓した振動数領域のスペクトルは、Schiff 塩基や水分子の水素結合構造だけでなく、他にも新しい知見を提供することになった。図 12 の $2400\text{--}2200\text{cm}^{-1}$ の振動数領域には水分子に由来しないスペクトル変化が観測されるが、これらは重水置換した N-D 伸縮か O-D 伸縮によるものである

(Furutani et al., 2003)。メタ I、メタ II で大きく変化する信号は、蛋白質骨格のアミド A (N-D 伸縮) に由来すると考えられる。その振動数から、重水で置換されるヘリックス構造がメタ I の段階で、さらにシート構造がメタ II の段階で構造変化することが示唆された。一方、バソヤルミでの構造変化は疎水的な蛋白質内部に限定されるものと解釈できる。

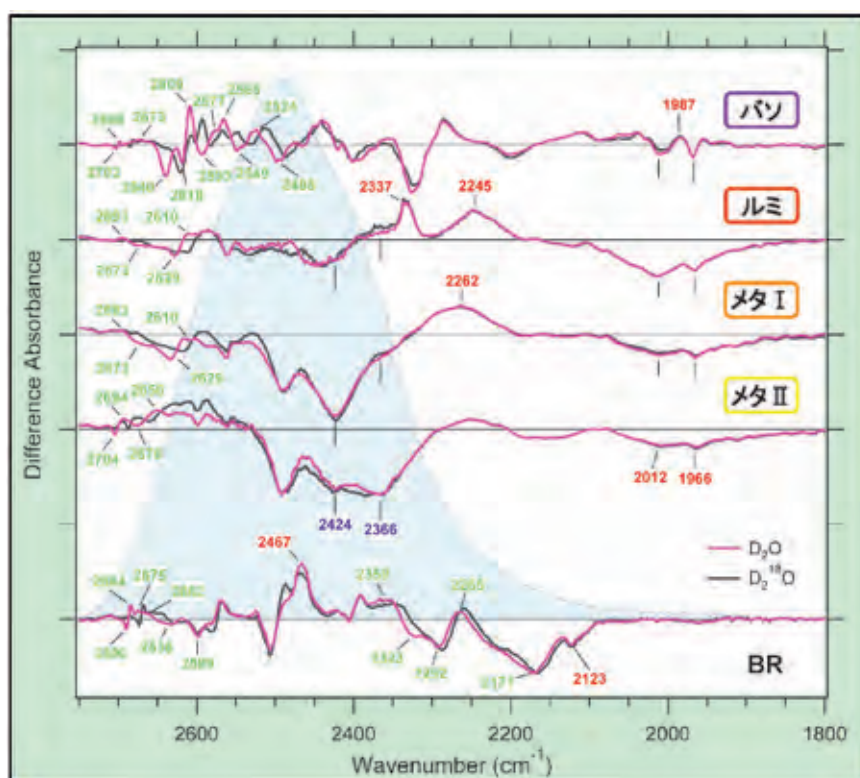


図12 ウシロドプシンの光反応中間体ともの状態との赤外差スペクトル
緑色の数字で示した振動バンドが水分子に由来する。

ルミとメタ I における構造変化の程度の違いは、低温領域で温度変化をさせた赤外分光によっても示すことができた (Furutani et al., 2003)。ルミは 200K、メタ I は 240K において安定化することができる。そこでこれらの温度で生成した中間体を 77K まで冷却し、光照射を行ったところ、ルミはもとのロドプシンに戻すことができた一方、メタ I を戻すことはできず別の光反応産物が生成した。77K においては蛋白質の大域的な構造変化は不可能であると考えられるので、この実験事実はルミからメタ I への遷移過程で、77K の光照射では戻せない程度の構造変化が起こっていることを示す。赤外スペクトルによればヘリックス構造に変化が誘起されるということから、光異性化後の熱緩和過程において、ヘリックス構造の再配置などの変化が起こるものと解釈できる。注目すべき点はこれらが重水置換可能なアミド A (N-H 基) という点である。蛋白質内部のヘリックス構造は一般に重水置換不可能であると考えられるので、外部の水がアクセスできる領域のヘリックス構造に起こる構造変化であろう。

最近、ロドプシンの後期中間体の 1 つであるメタ I において、対イオンがスイッチするという新しいモデルが提案された。活性中間体であるメタ II が生成するとき、発色団レチナールシッフ塩基から解離したプロトンは、対イオンである Glu113 に移動するとこれまで考えられてきた。しかしながら、新しいモデルによれば、メタ I の段階で Glu181 から Glu113 にプロトン移動が起こって Glu181 が対イオンになる。従って、メタ II の生成に伴うプロトン受容体は Glu181 となる。このモデルに従えば、ロドプシンの活性化に伴ってダイナミックな水素結合ネットワークの改変が起こっていることになる。我々はこのモデルを実験的に検討するため、グルタミン酸をアスパラギン酸に改変した変異体を用いた系統的な赤外分光計測を試みた。その結果、メタ I の段階でも Glu113 がプロトン化していないことを示すデータを得ることができた。対イオンスイッチモデルは、少なくとも著者らが主張する形では成り立たないことが明らかになった (Furutani et al., 投稿中)。

ウシロドプシンの場合、Glu113 にせよ Glu181 にせよ、活性中間体であるメタⅡの生成に伴ってレチナールシッフ塩基からプロトンが移動する。このプロトン移動は、蛋白質内部において供与体（ドナー）から受容体（アクセプター）への制御されたものであると考えられる。一方、レチナール光異性化酵素であるレチノクロムの場合、メタレチノクロムの生成に伴ってシッフ塩基からのプロトンの解離が起こるものの（pH = 7.5）、そのプロトンは対イオンである Glu181 には移動しないことが明らかになった（Furutani et al., 2005）。従って、メタレチノクロムの段階ではシッフ塩基領域は外液に露出した環境になることが予想される（図13）。レチノクロムの機能を考えると、光異性化反応によって 11 シス型のレチナールを生成するとすみやかに輸送蛋白質に渡す必要があるが、このような発色団環境の変化が役立っている可能性がある。

視物質ロドプシンの場合、以下に示す古細菌ロドプシン（大腸菌で発現可能）と違って、同位体標識による振動バンドの帰属が困難であり、変異体の赤外分光も信号強度の減少などから測定が限定されるのが事実である。しかしながら、ここに示したとおり、ロドプシンが活性化する過程における蛋白質の構造変化過程を赤外分光計測により捉え、重要な構造情報を得ることができた。

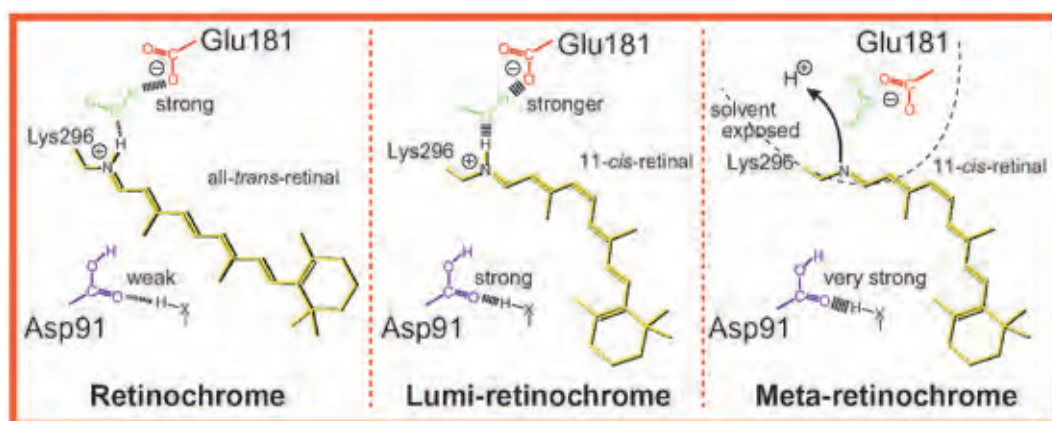


図13 イカロレチノクロムの光反応前(左)、ルミ中間体(中)、メタ中間体(右)における構造モデル

(B) 古細菌ロドプシンの赤外分光計測

膜には外界からの情報を受け取る受容体蛋白質が存在し、光、匂い、味、音などの刺激を受容すると活性化され、細胞内のシグナル伝達経路へと情報を伝える。このような受容体と情報伝達蛋白質との相互作用メカニズム、特に蛋白質の原子レベルでの構造に立脚した研究としては、古細菌の光受容蛋白質であるフォボロドプシンの研究が最も進んでいる。

ファラオニスフォボロドプシン (ppR) は高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* に存在する光センサーであり、図14に示したように膜中において情報伝達蛋白質 pHtrII と 2:2 で複合体を形成している。それが M 中間体および O 中間体形成時において、pHtrII 側に情報を伝達するものと考えられている。そこで、赤外分光法を用いた ppR の研究を北海道大学の加茂研究室との共同研究として 2001 年に開始した (Kandori et al., 2001)。情報伝達蛋白質 pHtrII と複合体を形成しない ppR については、2001 年以来、すでに 11 報の原著論文を報告し、K、M、O 中間体における構造変化や水分子の水素結合変化などを明らかにしている。

一方、2003 年に、両者の相互作用変化をもたらす構造的要因を原子レベルで明らかにすることを目的として、赤外分光法を用いた複合体の解析を開始した。視物質ロドプシンの実験と最も異なる点は、レ

セプターとトランスデューサーが光活性化前の段階ですでに複合体を形成しているという点であり、このことはG蛋白質との結合に細胞内の拡散が必要な視物質ロドプシンと比較して大きな利点となる。さらに、*ppR* と *pHtrII* は別々に大腸菌で発現することから、複合体における片方だけの同位体標識も可能となる。さらに重要な点は、複合体の結晶構造が2002年に報告されたという点であり、真に原子レベルでの光情報変換の解析が可能になった。

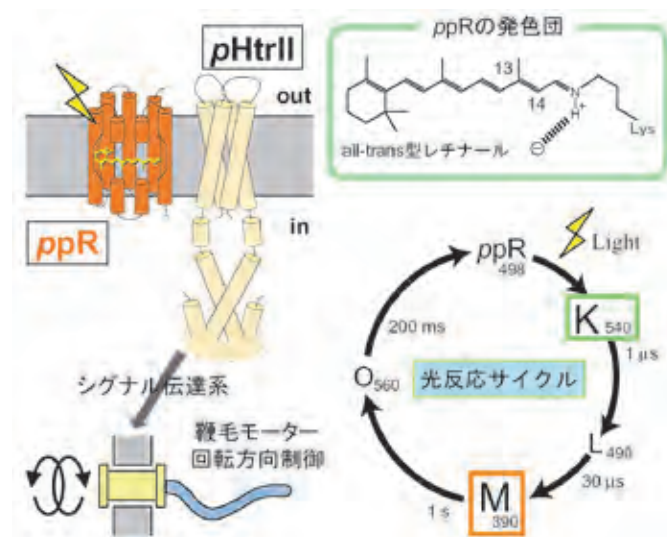


図14 古細菌の光センサーであるフォボロドプシンとその伝達蛋白質

a. レセプター／トランスデューサー複合体の構造変化：光異性化直後のK中間体の構造解析

ppR と *pHtrII* は界面活性剤中でも複合体を形成するので、これを脂質膜に再構成した試料の測定を77Kで行った。その結果、レチナールの異性化による限定された構造変化だけが含まれるK中間体とともとの状態との差スペクトルは、*ppR* 単体と *ppR/pHtrII* 複合体で非常によく似ていたものの、*pHtrII* の有無によって異なる振動バンドを得ることができた (Furutani et al., 2003)。このことはレチナールの異性化によって構造変化する領域は、同時に複合体形成によってもその構造が影響を受けることを示している。特に、我々が開拓した X-H 伸縮振動の領域に、複合体形成時にのみ観測される振動バンドが存在することを発見した。この振動バンドは、重水置換しない X-H 伸縮振動として 3479cm^{-1} に現れ、レチナールが光異性化すると 100cm^{-1} ほど低波数シフトする (=水素結合が強くなる)。

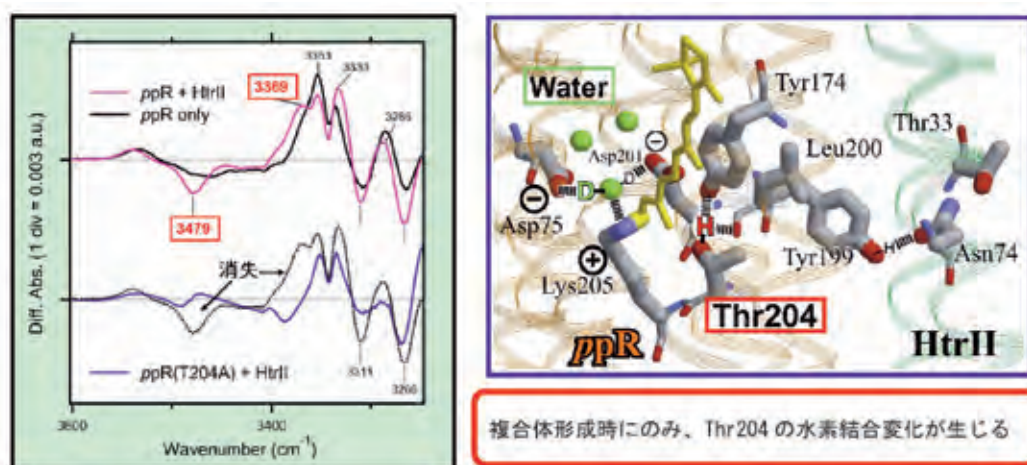


図15 液体窒素温度でのK中間体とフォボロドプシンの赤外差スペクトル(左)とレチナール近傍の構造モデル(右)

次にこの X-H 伸縮振動を帰属するため、変異蛋白質を用いた解析を行った。*ppR/pHtrII* 複合体の結晶構造において *ppR* の Tyr199 は *pHtrII* の Asn74 と水素結合を形成し、かつ複合体形成に重要な残基である。そこで Tyr199 の O-H 基由来である可能性を、変異体を用い検討したが、スペクトルの変化は観測されなかった。次にレチナール近傍に存在する Thr204 に注目し、変異蛋白質の赤外分光実験を行ったところ、T204S 変異体において X-H 伸縮振動バンドのシフトが観測され、T204A 変異体においてバンドの消失が確認された (図 1 5)。このことから複合体時に現れる X-H 伸縮振動は Thr204 の O-H 基に由来すると結論した (Sudo et al., 2003)。*ppR* には、短波長に吸収極大を持つ、フォトサイクルの速度が遅いという特徴がある。Thr204 はこの短波長化に重要な残基であり、また中間体の崩壊速度制御にも影響を与える残基である。さらに今回我々は、複合体形成時の構造変化にも重要であることを明らかにした。

最近、レチナールを系統的に重水素標識した *ppR* 単体の K 中間体において、C14 を標識したときだけ、C-D 伸縮の強度が増大することを発見した (図 1 6) (Sudo et al., 2003)。そしてこの実験事実を、レチナール分子が蛋白質部分と C14 位で特異的に相互作用する結果と解釈した。相互作用する蛋白質側部位の検討はこれからの課題であるが、*ppR* で保存されている Thr204 である可能性が高いと考えている。実際に、走光性を測定した実験によれば、T204S や T204A の変異体で光信号伝達機能が阻害されていることが観測されており (Sudo et al., 2006)、Thr204 は *ppR* が光を信号へと変換する際に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。

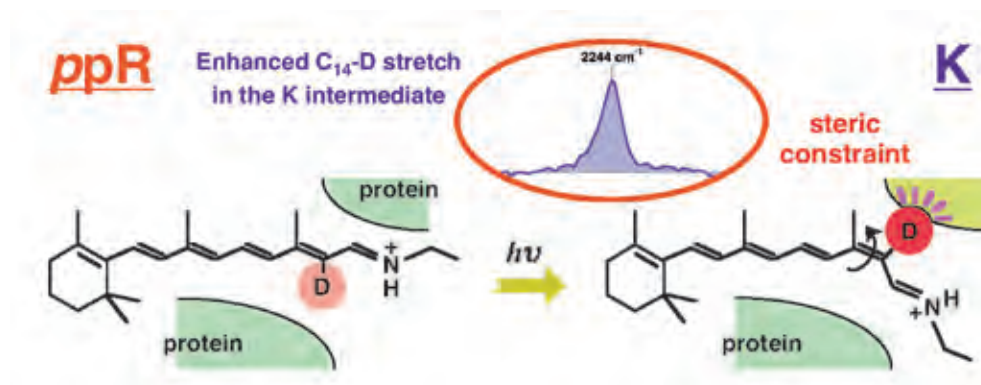


図16 重水素化レチナールを用いた研究により明らかになったC14位と蛋白質部分との光異性化に伴う特異な相互作用

b. レセプター／トランスデューサー複合体の構造変化：活性状態と考えられるM中間体の構造解析

視物質ロドプシンの場合のメタ II に相当する活性中間体は、M 中間体であると考えられる。そこで次に、*ppR/pHtrII* 複合体の M 中間体のスペクトルを 250K において測定し (Furutani et al., 2005)、*ppR* 単体の結果 (Furutani et al., 2002) と比較した。M 中間体は活性中間体であるため、ある程度異なるスペクトルを予想していたが、得られた差スペクトルは *ppR* 単体と *ppR/pHtrII* 複合体において驚くほどよく似ていた。実際に単体と複合体でのスペクトルの差異は、視物質ロドプシンが G 蛋白質と複合体を形成したときのもの (Nishimura et al., 1996) に比較して圧倒的に小さかった。

ppR/pHtrII 複合体の K 中間体で水素結合を強くする Thr204 の O-H 伸縮は、M 中間体の段階では光反応前の強度に戻っていることがわかった。一方、詳細なスペクトルの解析から、*ppR* の Tyr199 と *pHtrII* の Asn74 との水素結合に変化が現れることを明らかにした。具体的には、蛋白質の同位体標識とアミノ酸変異を組み合わせることによってトランスデューサー側の Asn74 の C=O 伸縮振動を帰属した。これは

トランスデューサー側の構造変化を初めて捉えることができた実験と位置付けることができる。さらにこの実験事実、レチナールから Thr204 を経由して Tyr199、さらにはトランスデューサーの Asn74 へと繋がる経路が、*ppR* から *pHtrII* への情報伝達経路の 1 つとなっていることを示した(図 17) (Furutani et al., 2005)。

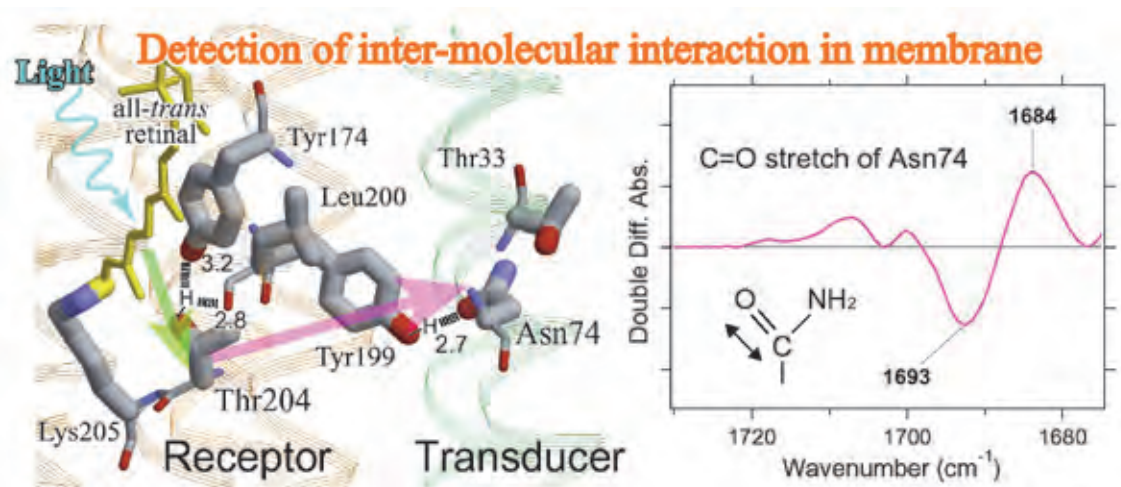


図17 赤外分光により明らかになったセンサーからトランスデューサーへの光信号伝達

一方、前述の通り、250K では *ppR* 単体と *ppR/pHtrII* 複合体のアミド I の信号は重なっていた。ところが、より生理的な温度に近い 293K での赤外分光測定を行い、250K および 273K での測定結果と比較したところ、*ppR* 単体では温度依存的なスペクトル変化は現れないが、*ppR/pHtrII* 複合体では測定温度が高いほどアミド I の変化が小さくなることを見出した (Kamada et al., 2006)。また、 ^{13}C -*ppR/pHtrII* 複合体では低波数シフトし、*ppR/^{13}\text{C-pHtrII}* 複合体において低波数シフトを示さなかったことから、このアミド I の変化を *ppR* に帰属した。一方で、*pHtrII* の Asn74 の水素結合変化は 293K においても 250K と同様に現れることがわかった。このことから複合体におけるアミド I の変化の温度依存性は、脂質二重膜の中心部付近ではなく、膜表面での相互作用による影響と考えられる。また、*pHtrII* の Gly83 を変異させると、*ppR* から *pHtrII* への情報伝達は阻害され、負の走光性が消失することが知られていたが、赤外分光計測においても G83F、G83C 変異 *pHtrII* においてはアミド I の温度依存的な変化が現れなかった。Gly は α ヘリックス構造を不安定にすることから、Gly83 より C 末端側は膜貫通ヘリックスとは分離され、柔軟な構造を持っていることが予想される。G83F、G83C 変異体の結果は、この部位における *ppR* と *pHtrII* との相互作用が情報伝達に必須であることを強く示唆する (図 18)。

ppR のアミド I の変化は F ヘリックスのヒンジ部分に由来すると推測されているが、近年報告された複合体の M 中間体の結晶構造においては F ヘリックスがほとんど動いていないことがわかった。また、結晶に対する赤外分光計測においても、アミド I の変化が小さくなっており、我々のデータと類似している。興味深いのは複合体におけるアミド I の変化が 250K でより大きい点である。これは水分子が凍結するために *pHtrII* 蛋白質の細胞質側領域の運動性が阻害されるためではないかと考えられる。つまり、水中では自由に運動できるため *ppR* の F ヘリックスと相互作用できるが、氷中では動けなくなり相互作用できないためではないかと考えられる。本研究結果は、水分子のダイナミクスが機能に重要な役割を果たしている 1 つの例と捉えることができる。

視物質ロドプシン、古細菌ロドプシンのトランスデューサー蛋白質は、それぞれ水溶性の G 蛋白質、2 回膜貫通型の蛋白質であることから、その活性化機構は基本的に異なるものと予想される。しかしな

がら、古細菌ロドプシンにおける *ppR/pHtrII* 複合体の実験結果が示したことは、細胞質側の水溶性部分（ループ領域）におけるダイナミックな構造変化の重要性であり、このことはループ領域で特異な相互作用を行う GPCR/G 蛋白質に共通であると考えられる。赤外分光計測はロドプシンがどのようにして光を情報へと変換するのか、といった問いに関して、X線やNMRといった一般的な構造生物学の手法では得ることのできない構造変化の情報について、明らかにすることができたものと考えている。

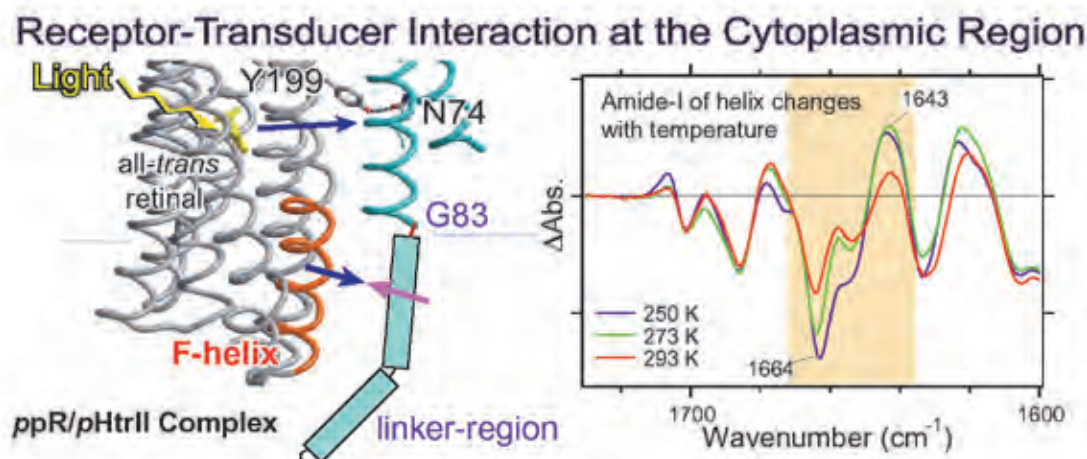


図18 細胞質側領域で起こるセンサーとトランスデューサーの温度依存的な相互作用変化

(C) 成果の位置付けや類似研究との比較

視物質ロドプシンの赤外分光研究においては、ドイツ、オランダ、米国に競合する研究グループがある。古細菌ロドプシンの赤外分光研究においては、ドイツと米国に競合する研究グループがある。これらのグループはいずれも我々のグループと比較して長い研究の歴史をもち、ロドプシンの赤外分光研究におけるパイオニアとして認められている。その一方で、我々の開拓した振動数領域の計測は、蛋白質や水分子の水素結合変化を捉えるのに最も適しており、これはすでに国際的な定評を得ている。現在では当然、競合するグループによる同種の計測も可能であるが、実験計測におけるさまざまなノウハウの蓄積のため、我々が世に出すデータの精度は他を圧倒しているのが現状である。我々のグループは、ロドプシンの赤外分光研究における世界のトップランナーとしてゆるぎない地位を確立しているものと位置付けられる。この事実は、以下の「成果発表等」に記した論文の質や量、招待講演などに反映されているものと考えている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

膜蛋白質を含め立体構造が次々に解明されている生命科学の現状において、次の重要な課題として「蛋白質の構造変化」の研究が挙げられる。蛋白質構造変化の研究は、構造と機能をつなぐきわめて重要なテーマである。構造変化を解明するためには理論まで含めたさまざまな手法が考えられるが、どの程度の構造変化をどのような分解能で解析するのか等、その方法論は確立しているとは言い難い。本研究課題において明らかにした赤外分光法の有用性は、光受容性の蛋白質に留まらず、一般の蛋白質構造変化を研究するツールとなりうるものである。例えば、リガンドに光駆動性のケージ化合物を用いることができれば、レセプターのリガンド結合に伴う構造変化をロドプシンと同様の方法で解析できる。さらに、全反射赤外分光法を用いることにより、溶液状態の試料に対する赤外差スペクトルを測定することが可能であるが、この手法をレセプターとリガンドの結合に伴う構造変化、蛋白質と蛋白質の相互作用

用に伴う構造変化の研究に応用することができる。

赤外分光法は「かゆいところに手の届く」便利な実験手法であると同時に、1個の水分子の水素結合変化を捉える最高精度の構造変化解析も可能なものであり、これらを組み合わせることにより、蛋白質の構造変化を捉えるより一般的な実験ツールへと発展することが期待される。

3.3 ロドプシンと他の GPCR との比較研究（京都大学 七田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

(A) 視細胞外節における G 蛋白質との相互作用

ロドプシンの機能は外界からの光（情報）を効率よく受容し、その情報を後続の G 蛋白質に効率よく伝えることである。光を受容することにより発色団がトランス型に異性化したロドプシンは、その後数種類の間状態を経て、G 蛋白質と結合してそれを活性化する中間体へと変化する（図 1 参照）。従来、脊椎動物のロドプシンで G 蛋白質（Gt）を活性化するのはメタ II と呼ばれる中間体であると考えられてきた。これは以下の実験結果から推定されてきた。

ロドプシンを 0℃ 付近で光照射すると、メタ I、メタ II と呼ばれる中間体の平衡状態が生成する（図 19）。Gt（ α 、 β 、 γ サブユニットの三量体）存在下でロドプシンを光照射すると、この平衡がメタ II にシフトし、見かけ上多くのメタ II が生成する。多く生成したメタ II のことを extra メタ II と呼ぶ。一方、試料中に GTP の難加水分解性アナログである GTP γ S をさらに共存させると、メタ II への平衡のシフトが解消される。これらの結果から、Gt はメタ II と結合し、GTP が存在すると活性化（GDP-GTP 交換反応）されてメタ II から遊離すると考えられてきた。ところが、その後の研究により、GTP γ S のかわりに GDP を加えた試料でもメタ II への平衡のシフトが解消されることが発見された。つまり、メタ II と結合している Gt には GDP が結合していないことが推定された。

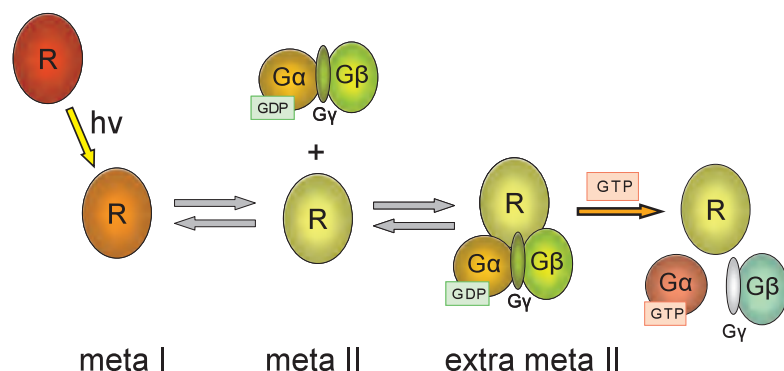
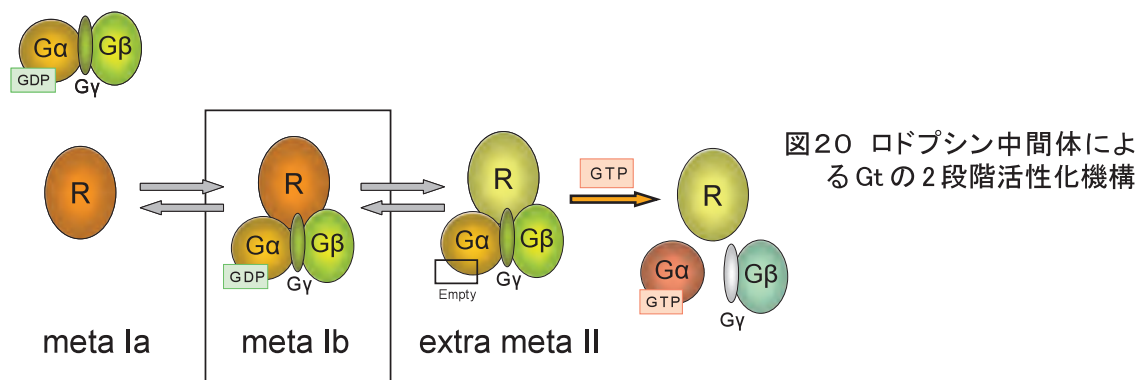


図19 メタ I-メタ II の平衡と Gt 相互作用

視細胞内にかぎらず細胞内の G 蛋白質は GDP を結合した状態で存在し、活性状態になった GPCR と結合すると、GDP が放出された「空」状態（Empty 状態）で結合している。したがって、上記の結果は、G 蛋白質と相互作用するロドプシンの中間体がメタ II のみではなく、GDP 結合型の G 蛋白質と結合する中間体が存在する可能性を示唆していた。この状態はメタ II の前駆体と考えられる。

本研究課題開始前に我々は、時間分解低温分光法でメタ I からメタ II への遷移過程の詳細な解析と、この過程に対する Gt の影響を検討した。その結果、メタ I 中間体が 2 つに分離され、その後期産物であるメタ I b と名付けた中間体が Gt の結合に関わっていることを見いだした。しかしながら、当時は分光光度計の時間分解能やダイナミックレンジが低く、この過程を視細胞外節膜を用いてリアルタイムで計測するには不十分であったため、界面活性剤で可溶化したロドプシン試料を使用し、しかも -20℃ 以下という低温条件で測定していた。一方で、温度や膜の状態などがメタ I やメタ II の挙動に影響を及ぼ

すことが分かっていたため、より生理的な測定条件下で実験を行う必要性を痛感していた (Morizumi et al., 2003)。そこで、微弱光源を用いた高速 CCD カメラ高時間分解分光光度計の開発を行い、天然の桿体視細胞外節膜の断片を用いて、生体内条件において数十ミリ秒で起こるメタ I b からメタ II への遷移過程を追跡した。その結果、視細胞外節膜中においても、確かにメタ I b がメタ II に先立って生成し、Gt と結合していることを見いだした。また、この結合は GTP や GDP の添加によって解消されなかったことから、メタ I b と結合している Gt はまだ GDP を結合した状態にあることが分かった。以上の結果、視細胞外節膜上においても、Gt はまず GDP を結合した状態でメタ I b に結合し、活性化はメタ II の生成後に起こることが明らかとなった (図 20) (Morizumi et al., 2005)。



さらに、このシステムを用いてメタ I b とメタ II で Gt に対する親和性を比較したところ、メタ I b の親和性はメタ II の約 1/2 であることがわかった。この結果は、例えばメタ I b が存在していても Gt 存在下ではメタ II に平衡が偏るという事実と矛盾しない。さらに、Hill 係数はメタ I b とメタ II で共通で約 2 という値を示した。この結果は、メタ I b とメタ II で Gt との相互作用部位自身は大きく変化しないことを示している (Morizumi et al., 2005)。実際に、我々はトランスデューシン α サブユニットの C 末端部位のペプチドを用いてメタ I b の相互作用部位を検討した。その結果、このペプチド中に存在する 2 箇所のロイシン残基の置換はメタ I b とメタ II に対して異なる効果を及ぼし、メタ II の方がより限定された相互作用を必要としていることが見出された。これらの事実から得られたピクチャーは、 α の C 末端を介した Gt とロドプシンとの相互作用には、extra メタ II より弱い初期段階の結合と、extra メタ II という 2 つの結合状態が存在していることを強く示唆している。

(B) アゴニストである全トランス型レチナールの結合能を持つロドプシン

a. ロドプシン類とリガンド結合型 GPCR との比較

一般の GPCR がアゴニストと呼ばれる外来性のリガンドを結合して活性化されるのとは異なり、ロドプシン類では、蛋白質部分であるオプシンは暗状態では 11 シス型レチナールを結合して不活性状態であり、光受容により発色団レチナールの 11 シス型から全トランス型への異性化によりオプシン部分の構造が変化し、G 蛋白質を活性化する。発色団レチナールの異性体型と G 蛋白質の活性化との関係から、ロドプシン類においては、全トランス型レチナールがアゴニストであり 11 シス型レチナールがインバーサアゴニスト (アンタゴニスト) であると考えられている。もしインバーサアゴニスト (11 シス型) よりもアゴニスト (全トランス型) に親和性が高ければ、光刺激とは無関係な全トランス型レチナールの結合が起こり視物質は活性状態になり、視細胞で発生する暗ノイズの原因になると考えられる。したがって、アゴニスト (全トランス型レチナール) よりもインバーサアゴニストまたはアンタゴニスト (11 シス型レチナール) に対して高い親和性が備わったことが、光受容蛋白質の分子進化と関連していると

考えられる。

ヒトを含む脊椎動物の視物質ロドプシンの代表とも言えるウシロドプシンの蛋白質部分（オプシン）を調製し、全トランス型レチナールを添加しても、ロドプシンの光照射により生成するメタ II 中間体と呼ばれる「G 蛋白質を活性化する光産物」と同じ状態は決して形成されない。したがって、ウシロドプシンは分子進化の過程で暗ノイズを発生しないように変化したと考えられる。一方、多様なロドプシン類の解析の過程で、頭索動物ナメクジウオに存在するロドプシンが、光による活性化のみならず、アゴニストである全トランス型レチナールを直接結合して活性状態となる能力も持つことを見いだした (Tsukamoto et al., 2005)。

b. ナメクジウオロドプシンの全トランス型レチナール結合能

ナメクジウオロドプシンの蛋白質部分を培養細胞で発現させ、11 シス型レチナールを添加し、光照射すると光産物が生成する (図 2 1 b)。照射前後のロドプシンの状態変化は、照射前後の差吸収スペクトルにより示されている (図 2 1 b 挿入図)。すなわち、図において下側が照射前、上側が照射後であり、照射により長波長シフトした光産物が生成していることが分かる。一方、全トランス型レチナールを加えた場合も 550nm 付近に吸収極大が認められ (図 2 1 a)、赤色光の照射により、照射前に存在していた長波長成分が減少して、短波長シフトしたことが分かる (図 2 1 a 挿入図)。11 シス型と全トランス型レチナールを加えた場合の差吸収スペクトルを比較すると、鏡像関係にある。すなわち、全トランス型レチナールを加えた時は、分光学的には光産物と全く同じ状態のものが生成することが明らかになった。次に、光産物と全トランス型レチナールの結合産物の G 蛋白質活性化能を比較した。11 シス型レチナールを発色団とするナメクジウオロドプシンは光照射によって G 蛋白質の活性能が増大する。一方、全トランス型レチナールを添加した場合は、暗の中では光産物と全く同じ G 蛋白質の活性化能を示すのに

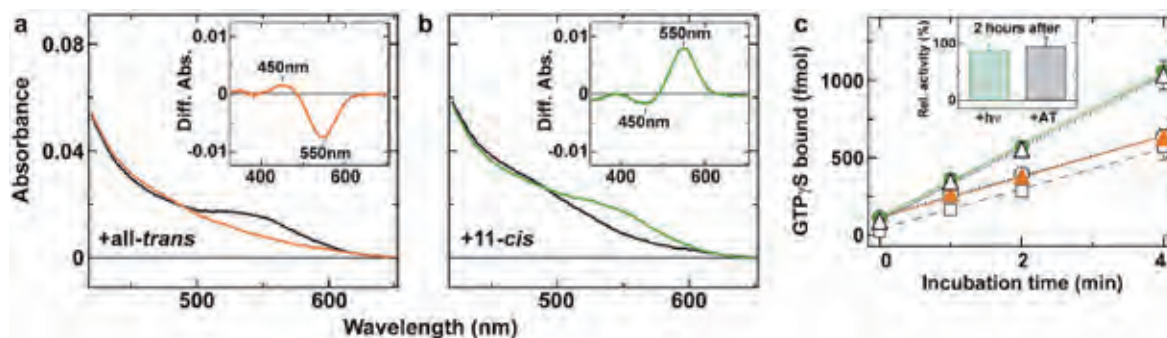


図21 ナメクジウオロドプシンの全トランス型レチナールの結合

(a)全トランス型レチナールを添加し、結合させた未精製ナメクジウオロドプシンの暗状態(黒)と赤色光照射後(赤)の吸収スペクトル。挿入図は、照射後から暗状態を差し引いた差吸収スペクトルを示す。(b) 11 シス型レチナールを添加し、結合させた未精製ナメクジウオロドプシンの暗状態(黒)と緑色光照射後(緑)の吸収スペクトル。挿入図は、照射後から暗状態を差し引いた差吸収スペクトルを示す。(c)全トランス型レチナールまたは11シス型レチナールを添加し結合させたナメクジウオロドプシンによるG蛋白質活性化の経時変化の比較。GTP γ Sの結合により解析。全トランス型レチナールを結合したロドプシンの暗状態(Δ)は、11シス型レチナールを結合したロドプシンの緑色光照射による光産物($\bullet$)と全く同一の活性化能を示す。また、全トランス型レチナールを結合したロドプシンを赤色光照射($\blacktriangle$)すると、活性が11シス型レチナールを結合したロドプシンの暗状態($\circ$)の活性化能と同じレベルまで低下する。G蛋白質のみにおけるGTP γ Sの取り込みも合わせて示されている($\square$)。挿入図は、「全トランス型レチナール結合産物」と「11シス型レチナール結合ロドプシンの光産物」を生成せ、その2時間後におけるそれぞれの産物のG蛋白質活性化能の比較を示す。

対し、赤色光を照射すると G 蛋白質の活性化は認められなかった (図 2 1 c)。また、全トランス型レチナールの結合により生成した産物は、光産物と同じ熱安定性を示すので (図 2 1 c 挿入図)、分光学的にも生化学的にも光産物と同一であることを発見した。

c. 全トランス型レチナールを排除するメカニズム

ナメクジウオロドプシンは、ウシロドプシンとは異なり、全トランス型レチナールを結合できる。しかし、11 シス型への親和性のほうが 50 倍程度高い。どのようなメカニズムで全トランス型レチナールよりも 11 シス型の親和性が高くなっているのだろうか。これを解析するために、まず、ナメクジウオロドプシンとウシロドプシンをアライメントし、ウシロドプシンの 3 次元構造から発色団レチナール (特に β イオノンリング) の周辺のアミノ酸残基を推測した。次に、それらをアラニンに置換することにより、全トランス型レチナールと 11 シス型レチナールへの親和性の変化を解析した。その結果、解析した 8 種類の変異体の中で、ヘリックス VI に存在する 265 番目のトリプトファン (Trp265) を置換した変異体においてのみ、全トランス型レチナールの結合が明らかに増大した。そこで、Trp265 を 19 種類のアミノ酸残基に置換した変異体を作製し、全トランス型レチナールの結合能を調べた。その結果、アミノ酸残基の側鎖の体積が大きいほど全トランス型レチナールの排除効率が高いことがわかった。つまり、嵩高い Trp265 が相互作用することによって、全トランス型レチナールの結合を相対的に低下させていることがわかった。

Trp265 はほとんど全てのロドプシン類で保存されているのみならず、ロドプシンとアミノ酸配列の類似性があるロドプシンスーパーファミリーに属するリガンド結合型の GPCR においても高度に保存されている。したがって、リガンド結合型の GPCR から光受容蛋白質であるロドプシン類への分子進化の過程において、すでに持っていた Trp265 が新たな「アゴニストである全トランス型レチナールを排除する」という機能を担うに至ったと考えられる。

興味深いことに、ウシロドプシンにも Trp265 は保存されている。したがって、ウシロドプシンにおいて全トランスレチナールの結合が完全に阻害されているのは、別の要因があると考えられる。後述するように、多様なロドプシン類の可視光受容に関与する対イオンについて研究した結果、ウシロドプシンは N 端から 113 番目に存在するグルタミン酸が対イオンとしての機能を果たし、ナメクジウオロドプシンでは 181 番目に存在するグルタミン酸が対イオンとしての機能を果たすことがわかった。また、分子系統樹において脊椎動物の視物質グループと近縁であるパラピノプシンは 113 番目の位置にグルタミン酸を持つが、それは対イオンとしては働かず、その光産物においては 181 番目のグルタミン酸が対イオンとして機能する (Terakita et al., 2004)。そこで、パラピノプシンについて全トランス型レチナールとの結合実験を行ったところ、それと結合して光産物と全く同じ状態を生成することがわかった。したがって、ウシロドプシンにおいて全トランス型レチナールが結合しないのは 113 番目の位置のグルタミン酸が対イオンとして働くことが重要であることが推定された。実際、ウシロドプシンの Glu113 を変異させると全トランス型レチナールの結合が見られることが知られている。以上のことから、ロドプシンの進化の過程で、Trp265 が全トランス型レチナールを排除する機能を獲得し、その後、対イオン Glu113 の獲得と関連して全トランス型レチナールの排除能が増大したと推測できる。ただし、Trp265 や Glu113 対イオンがどのようなメカニズムにより全トランス型レチナールの結合を押さえているのか (11 シス型レチナールの結合を促進しているのか) の全貌を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。

d. リガンド結合型 GPCR との比較

一般の GPCR は、外来のリガンド（アゴニスト）を結合し、構造変化し、G 蛋白質を活性化する。GPCR の活性化メカニズムは 2 状態モデルにより説明されるが、ロドプシン類の活性化機構と合わせて、便宜的に図 22 のように示すことができる。アゴニストは GPCR と結合し活性状態をつくり、一方インバーサアゴニストは不活性状態を生成する。ウシロドプシンは、インバーサアゴニストである 11 シス型レチナールのみを結合し、光によってのみ活性状態になりアゴニストを結合することができない。ウシロドプシンは、その結晶構造も明らかになり、今や GPCR のトップランナーとして取り扱われているが、外来のアゴニストを結合し、R*にならないという一般の GPCR とは決定的に異なる「GPCR モデルとしての欠点」をもっている。一方、本稿で紹介したナメクジウオロドプシンは、光により不活性状態と活性状態の平衡をずらせるばかりでなく、アゴニストである全トランス型レチナールを結合し、光産物と同じ状態を作る。これらの 2 点は、GPCR モデルとされてきたウシロドプシンには認められない性質であり、いわばナメクジウオロドプシンは、光受容体の性質と一般の GPCR との性質の両方を兼ね備えているといえる。近年、ヒトゲノムの解明にともない、創薬のターゲット分子のおよそ 50% が GPCR であると言われている。ナメクジウオロドプシンは、これまでに蓄積されて来たウシロドプシンをモデルとした膨大な研究と、GPCR 研究をつなぐ橋渡しの役割を担うものとして、創薬研究の面からも期待される。



図22 ナメクジウオロドプシンの性質
ナメクジウオロドプシンは光受容体により活性化されるとともに、ウシロドプシンとは異なり、全トランス型レチナール（アゴニスト）を結合し G 蛋白質を活性化する。さらに活性状態と不活性状態が光平衡の関係にあり、ナメクジウオロドプシンは光受容体と一般の GPCR との両方の性質を持つと言える。括弧内は一般の GPCR の活性化機構が示されている。

(C) ロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体との活性化メカニズムの比較解析

a. GPCR の多様性

ヒトのゲノムには、約 1,000 種類の G 蛋白質共役型受容体（GPCR）をコードする遺伝子が存在することが知られている。これら受容体はすべて α -ヘリックスが七回膜を貫通する構造を持つと推定されるが、お互いにアミノ酸配列の相同性のないいくつかのグループに分類されている（図 23）。グループが異なればアミノ酸配列に相同性が認められないにも関わらず共通の構造（七回膜貫通型）をとり共通の機能（G 蛋白質の活性化）を有するということは、単なるアミノ酸配列の比較では解らない機能発現に至る共通のメカニズムの存在を示唆している。しかし、GPCR は創薬の重要なターゲットであるにも関わらず、立体構造解析が成功しているのは唯一ウシロドプシンのみである。また近年、様々な受容体において培養細胞での発現および変異体解析の研究が進み、受容体のどの領域（アミノ酸残基）がリガンド結合特異性および G 蛋白質選択性を決定するのかについての知見は集積されてきているが、刺激受容後どのように構造変化するのかについて解析が進んでいる受容体はロドプシンやアドレナリン受容体といったごく少数である。そこで、ロドプシンを含むファミリー 1 とは一次構造の類似性のない GPCR についても機能発現メカニズムを明らかにし、ロドプシンとともにモデル GPCR として位置づける必要があると考え、脳神経におけるシグナル伝達に重要な役割を果たしている代謝型グルタミン酸受容体

(mGluR) を第二のモデル GPCR とし、解析を進めた。



図23 アミノ酸配列の類似性から見たヒトの GPCR の主なグループ

b. G蛋白質活性化メカニズムの普遍性と多様性

本研究課題開始前に、ロドプシンと他の多様な GPCR との間でG蛋白質の直接の結合・活性化に関わる細胞質領域の機能的類似性を探るために、ロドプシンの細胞質領域を他の GPCR のものに置換した変異体を作製し蛋白質を活性化できるのかどうか解析を行った。その結果、ファミリー1のムスカリン受容体やアドレナリン受容体の細胞質第3ループをロドプシンの第3ループの位置に導入するとG蛋白質を効率よく活性化した (Yamashita et al., 2000; Terakita et al. 2002)。さらに驚いたことに、mGluR の場合では、第2ループまたは第3ループをロドプシンの対応する位置に導入した変異体では活性化が認められないが、mGluR の第2ループをロドプシンの第3ループの位置に導入すると高効率でG蛋白質を活性化した (Yamashita et al., 2001)。この結果は、ロドプシンを含むファミリー1とmGluRでは分子構築の違いは見られるが、G蛋白質を活性化するループ領域をよく似たメカニズムで構造変化させることが考えられた。

この研究を発展させることを考え、本研究課題では、分子構築の異なる GPCR において細胞質ループ領域の構造変化およびそれを導く膜貫通ヘリックス領域の構造変化を解析し、G蛋白質活性化に至るメカニズムの類似性を明らかにすることを目的とした。これまでに、ファミリー1のロドプシンやアドレナリン受容体、ムスカリン受容体では、細胞質領域をジスルフィド結合などで人工的に架橋した変異体を解析することにより、ヘリックスIIIとVIの細胞質領域の動きが活性化には重要であることが報告されている。また、ファミリー1の受容体では、1アミノ酸の置換により刺激非依存的に活性化が大きく上昇する構成的活性化変異 (constitutively active mutation; CAM) サイトがこれらのヘリックスの細胞質側に集中して存在する。つまり、構造変化する領域とCAMサイトとは関連があると考えられる。そこで、我々はCAMサイトの発見および分子内架橋法を利用して、mGluRの細胞質領域の構造変化を誘起する膜貫通ヘリックスの動きの解析を進めた。

Gi/Go 共役型 mGluR8 を培養細胞において発現させ、その受容体を含む膜画分を利用して生化学的アッセイ系の構築を行った。そして、mGluRの細胞質側において網羅的に変異を施し、細胞質側の構造変化のキーになるアミノ酸残基を探索した。その結果、ヘリックスIIとIVの細胞質側にmGluRでは初めてCAMを同定した (Leu621 および Gln695) (Yamashita et al., 2004)。この発見は、これらのヘリックスがmGluRの構造変化にとって重要な働きをする強い可能性を示すものである (図24)。そこで、これらの領域の構造変化をより直接的に観測するために、ヘリックスIIとIVとの間で分子内架橋を施し、活性状態または不活性状態に固定することができるかどうか検討を行った。方法としては、それぞれのCAMサイト近傍にシステイン残基を導入した変異体をいくつか作製し、酸化剤処理によってジスルフィド結合

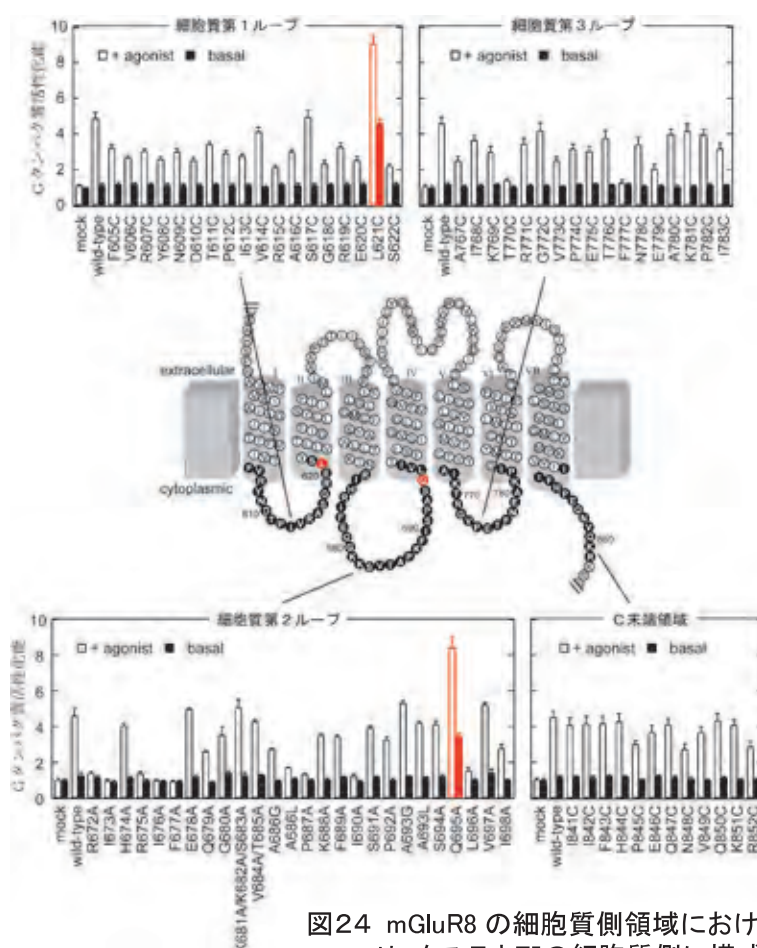


図24 mGluR8 の細胞質側領域における網羅的変異体の解析
ヘリックス II と IV の細胞質側に構成的活性化変異部位を同定した

を形成させた際に G 蛋白質活性化能に変化が生じる変異体を探索した。その結果、ある変異体において酸化剤処理によって有意に活性化能が減少することを見いだした (図 2 5)。つまり、酸化剤処理によるジスルフィド結合のためヘリックス II と IV の動きが制限され、活性状態形成が妨げられたと考えられる。次に、mGluR は二量体で存在することが知られているため、構造変化を阻害するジスルフィド結合が二量体の二分子間で形成されているのかそれとも二量体のそれぞれの分子内で形成されているのかを明らかにするために、ヘリックス II または IV それぞれにシステイン残基を導入した 2 つの変異体を共発現させ酸化剤の効果測定した。その結果、酸化剤処理による活性化の低下は認められなかったため、ジスルフィド結合は二量体のそれぞれの分子内で形成されていると考えられた。

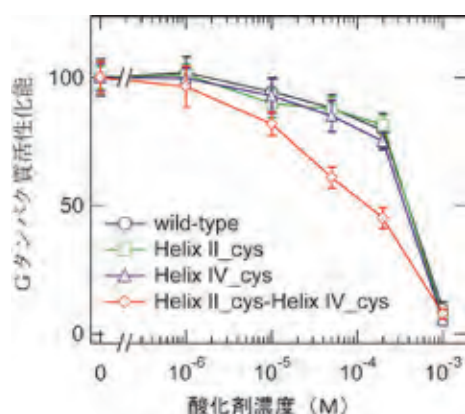


図25 ヘリックス II および IV にシステインを導入した変異体の活性に対する酸化剤の効果 どちらかのヘリックスだけにシステインを導入しても効果はないが、両方のヘリックスに導入すると活性に低下が認められた

mGluR8 で発見した CAM サイトが他の mGluR サブタイプでも CAM サイトになっているかどうかは、全て

の mGluR サブタイプにおける活性化メカニズムの共通性を考える上で重要である。そこで、Gq 共役型 mGluR1 において、対応する残基が CAM サイトになるかどうか検討した。その結果、ヘリックス II と IV ともに対応する残基を置換すると刺激非依存的に活性化能が上昇することがわかった。また、mGluR1 には本来のリガンド結合部位である N 末端の細胞外領域以外に、膜貫通ヘリックス領域にもリガンドが結合することが知られている。そこで、このアロステリックリガンド (negative modulator) が構成的活性化変異体の活性に対しても効果があるかどうか検討したところ、2 つの構成的活性化変異体両方においてアゴニスト依存的・非依存的活性化能ともに低下した。これは、アロステリックリガンドの結合により膜貫通ヘリックス領域の構造変化、おそらくヘリックス II および IV を含む動きが抑制され、不活性化状態が安定化されたためであろうと考えられた。

以上の結果から、CAM サイトの同定および人工的分子内架橋の形成を行うことにより、mGluR において G 蛋白質活性化に関わる膜貫通ヘリックスの構造変化を初めて明らかにした。mGluR のこの構造変化と先に述べたロドプシンを含むファミリー 1 で重要性が指摘されているヘリックス III と VI の構造変化と比較すると、動くヘリックス領域は異なっているが、細胞質側の G 蛋白質相互作用部位を露出するメカニズムはお互いに似ていると考えられた (図 26) (Yamashita et al., 投稿中)。

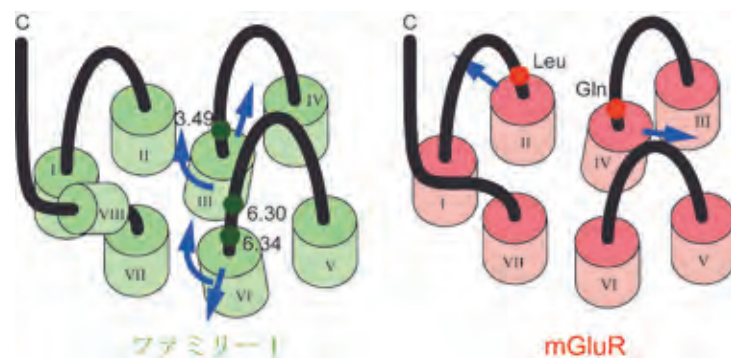


図26 ファミリー1(ロドプシンを含む)と mGluR とにおける、CAM サイトおよび予想される構造変化の比較

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究項目において、これまでロドプシンの研究で得られた知見を GPCR 一般の機能解析に拡張して行くために、今後ロドプシンについて何を明らかにし、また、ロドプシンをモデル GPCR とするためにどのように改変する必要があるのかを考えながら研究計画を立てた。というのも、ロドプシンの研究は他の GPCR の研究に比べて格段に進んでいるが、光を受容して活性状態になるという「特殊性」のために、他の GPCR とは「本質的」に異なる蛋白質であるとする研究者も多かったからである。特に、ロドプシンが一般の GPCR のようにアゴニストと結合して活性状態 (G 蛋白質を活性化する状態) にならないことから、光を受容して生成したロドプシンの活性状態についての知見を他の GPCR の活性状態の解析に適用できるかどうか議論的であった。したがって、本研究の大きな目的は、遺伝子操作によってロドプシン蛋白質を改変し、一般の GPCR のようにアゴニストと直接結合して活性状態になるロドプシンを作製すること、また、このロドプシンから生成した活性状態が光を受容して生成する活性状態と同じ性質を示すかを検討することであった。幸い研究の初期の段階で、多様なロドプシン類の中にアゴニストと直接結合して活性状態になるものを発見し、このロドプシンにおいて、アゴニストを結合して生成した活性状態と光を受容して生成した活性状態が生化学的・分光学的に全く同じ状態であることを証明することができた。また、アゴニストとの結合を示さない脊椎動物のロドプシンについて、分子進化の過程でどのような変異が起こったのかを明らかにすることができた。これら一連の研究成果により、本研究当初に考えられていた困難が解消され、名実ともにロドプシンをモデルとした GPCR 研究の

進展を図ることが可能となった。

上記の結果はまた、特殊だと考えられていた GPCR（ロドプシン）にも特殊性を排除すると GPCR に共通する性質を持っていることを示している。そこで、我々はこのコンセプトをさらに拡張し、アミノ酸配列の相同性のない GPCR ファミリーの研究にもロドプシンで得られた知見を適用してそれらの活性化に至る構造変化を解析することを計画した。そして最終的に、「CAM サイトの同定とジスルフィド結合によるヘリックス構造変化の阻害」という方法が、ロドプシンを含むファミリー 1 以外の GPCR の G 蛋白質活性化機構の解析にも有用であることを証明することができた。

以上のように、GPCR の研究にロドプシンをモデルとした研究の有用性が確認され、逆に特殊性を排除すると、ロドプシン以外の GPCR で得られた知見も統合できることが示された。したがって、今後は本研究で得られた知見をさらに発展させることにより GPCR 全体に広げた新たな研究領域の体系的解明を目指すことができると期待される。

3.3 ロドプシン類の機能多様性を起因とする視覚機能の多様性解析（京都大学 七田グループ）

(A) ロドプシンの分子設計とその多様性

a. ロドプシン類の構造と多様性

視覚の光受容分子であるロドプシンは、G 蛋白質共役受容体（GPCR）の一種で、7 回膜貫通構造を持つ（図 2 7）。多くのロドプシンの中でウシロドプシンは、高分解能の結晶構造が岡田らにより報告されている等、構造・機能の解析がもっとも進んでいる GPCR と位置づけられる。GPCR は、アミノ酸配列の一致度からいくつかのグループに分類され、ロドプシンと類似性のある GPCR はロドプシンスーパーファミリーとしてまとめられる。ロドプシンは、蛋白質部分（オプシン）と発色団レチナールとからなる（図 2 7）。光受容にともなう発色団の 11 シス型から全トランス型への異性化が引き金となり、蛋白質部分が G 蛋白質を活性化する構造へと変化する。

ロドプシンおよびその類似蛋白質（以後ロドプシン類と呼ぶ）はこれまでに 1000 種以上が同定され、大きく 5 つのサブクラスに分けられる（図 2 8 a）。これらの中には、脊椎動物や無脊椎動物の眼に存在し視覚機能をはたすロドプシン類や、松果体や脳内などの眼外に存在するものも含まれる。5 つの中には、Gt（トランスデューシン）、Gq、Go 型 G 蛋白質とそれぞれ共役する 3 つのサブクラスがあり（Gt ロドプシン、Gq ロドプシン、Go ロドプシン）、また残りの 2 つのサブクラス（ペロプシン、光異性化酵素）は、先の 3 つのサブクラス（発色団は 11 シス型）とは異なり全トランス型レチナールを発色団とする。GPCR の G 蛋白質活性化メカニズムの一般性と多様性を理解するために、対イオンと呼ばれるロドプシン類の機能発現において重要なアミノ酸残基とロドプシン類の多様化との連関を解析した。

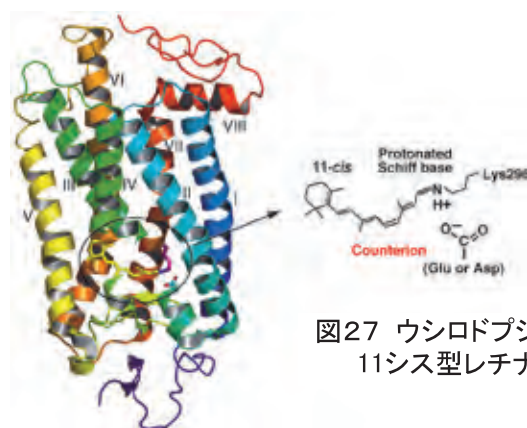


図27 ウシロドプシンの結晶構造(左)と
11シス型レチナール Schiff 塩基結合(右)

b. ロドプシン類の分子進化における対イオンの進化

ロドプシン類において、発色団レチナールは、ヘリックスVIIのN端から数えて296番目のリジン残基 (Lys296) とシッフ塩基結合を形成している (図27)。このシッフ塩基がプロトン化あるいは脱プロトン化するかによって吸収極大が大きく異なり、前者は可視部にあるのに対し、後者ではUV領域にある。可視光を受容するロドプシン類ではシッフ塩基結合がプロトン化しているが、シッフ塩基上のプロトン (正電荷) は単独では不安定であるので、このプロトンを安定化する“対イオン (counterion)”と呼ばれる負電荷を持つアミノ酸残基が近くに存在する。1989-90年に、ウシロドプシンのヘリックスIIIに存在する113番目のグルタミン酸 (Glu113) をグルタミンに置換した変異体 (E113Q) では、野生型と比較して、可視部の吸収がなくなり、かわりに380nm付近の吸収が増加することから、ウシロドプシンの対イオンが、Glu113であることが示された (図28b参考)。さらに興味深いことに、解離したGlu113対イオン (COO^-) は、G蛋白質活性化状態 (メタ II) の生成にともないプロトンの受容体として働き、プロトン化シッフ塩基 (NH^+) からプロトンを受け取ることが見いだされた。つまり、Glu113のプロトン化 ($\text{COO}^- \rightarrow \text{COOH}$) がメタ II の生成を引き起こすマイクロスイッチとして働く。したがって、ロドプシンの機能において、Glu113対イオンは入力部分である可視光受容のみならず、出力であるG蛋白質の活性化過程においても重要な役割を果たしていることが知られていた。

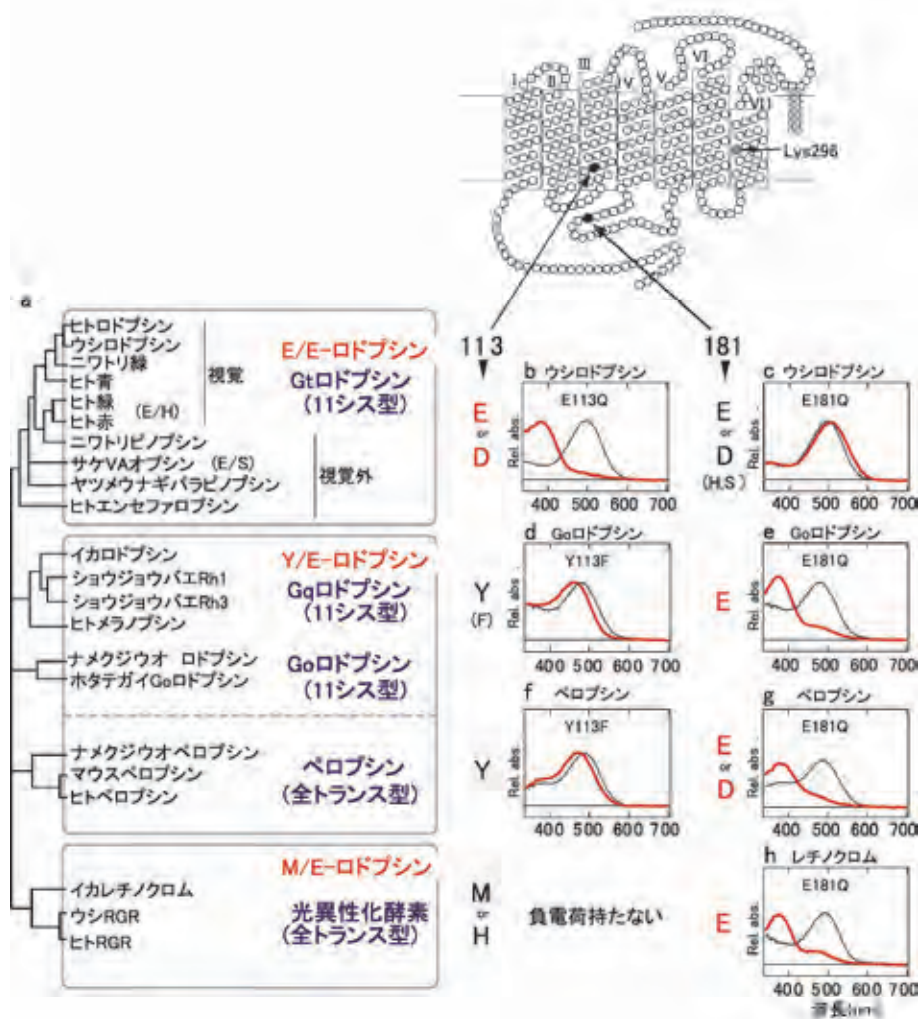


図28 ロドプシン類の対イオンと分子系統関係

(a)ロドプシン類の分子系統樹の模式図と分類 ロドプシン類は、対イオンに関わる113番目と181番目のアミノ酸残基に基づき、E/E-、Y/E-、M/E-ロドプシン類(113/181)の3種類に分類できる。発色団レチナールの異性体型がカッコ内に示されている。(b-h)113位置と181位置の変異体(太線)と野生型(細線)の吸収スペクトル。図中の大文字D,Eは対イオンを示す。

Glu113 は、脊椎動物の視物質をはじめとする Gt ロドプシンにおいて高度に保存されているので、Gt ロドプシンの対イオンは Glu113 であると結論された。しかし、これ以外の多様なロドプシン類は、113 番目のアミノ酸残基の位置にグルタミン酸を持たない (図 2 8)。したがって、他のロドプシン類の対イオンを決定することは重要な課題であった。私たちは多様なロドプシン類の発現に取り組み図 2 8 に示すように網羅的な変異体解析に成功した。その結果、無脊椎動物の G 蛋白質共役ロドプシンとペロプシンを含み、113 位にチロシン (またはフェニルアラニン) を持つロドプシン類や 113 位にメチオニンを持つレチノクロム類の対イオンは、113 番目のアミノ酸残基が位置するヘリックスⅢには存在せず、細胞外第 2 ループ (IV-V ループ) に存在する Glu181 であることを発見した (図 2 8 b-h) (Terakita et al., 2004)。一方、ウシロドプシンなどの Gt ロドプシンでは、E181Q 変異体を用いた実験から、Glu181 は対イオンとしては働いていない (図 2 8 c)。以上のことから、ロドプシンファミリーの中の 5 つの中の 4 つのサブクラスでは、Glu181 が対イオンとして機能していることがわかった。Glu181 はほとんど全てのロドプシン類に保存 (例外は後述) されているので、脊椎動物ロドプシン類は分子進化の過程で Glu113 を対イオンとして新規に獲得し、その後 Glu181 の対イオンとしての役割が弱まって行った、すなわち対イオンの変位が起こったと考えられた。

c. 光産物と対イオン

Go ロドプシンの G 蛋白質を活性化する光産物は、イカ・タコやショウジョウバエなどの Gq ロドプシンの場合と同様に可視部に吸収極大を持つ。一方、ウシロドプシンなどの Gt ロドプシンの G 蛋白質を活性化する光産物 (メタⅡ 中間体) は UV 域に吸収極大をもつ。これらの分光学的性質の違いは、対イオンの違いに起因すると考えられる。すなわち、Go ロドプシンの対イオンである Glu181 は、光産物においても対イオンとして働き、シッフ塩基上のプロトンを安定化するので、Go ロドプシンの光産物は可視部に吸収極大を示す。一方、ウシロドプシンの場合には、基底状態 (暗状態) の対イオンである Glu113 が、光産物 (メタⅡ) ではプロトン受容体として働き、中性付近でもシッフ塩基の脱プロトン化が起こる。そのために、光産物 (メタⅡ) は UV 領域に吸収極大をもつ。

Go ロドプシンや Gq ロドプシンなどの Glu181 を対イオンとするロドプシン類の光産物では、外液の pH を変化させるとシッフ塩基が滴定されるので、酸性条件でプロトン化が促進され (可視部に吸収極大)、アルカリ条件で脱プロトン化型 (UV 吸収型) となる (図 2 9)。ところが、ウシロドプシンの光産物の場合は全く逆の pH 依存性を示し、アルカリ条件でシッフ塩基がプロトン化し、酸性条件で脱プロトン化する。この特徴的な pH 依存性を生み出すメカニズムとして、Glu113 とそれにつながる水分子を含む水素結合ネットワークの関与が考えられる。興味深いことに、ウシロドプシンと同じ Glu113 と Glu181 を持つ Go ロドプシンの変異体 (Y113E) は、図 3 0 中に示す野生型とほとんど同じ pH 依存性を示した。このことは、分子進化の過程において、新規に獲得された Glu113 対イオンがすぐにプロトン受容体として機能したのではなく、Glu113 が獲得された後に、その周辺に構造的な変化 (おそらく水素結合系の形成) が起こり、Glu113 がプロトン受容体として機能するに至ったことを示唆している。我々は、さらなる解析の結果この仮説を支持する結果を得た。ヤツメウナギの眼外で機能し、脊椎動物視物質と同じグループに属し Glu113 と Glu181 の両方を持つパラピノプシン (図 2 8 分子系統樹参照) は UV 色素であるが、その光産物は吸収極大を 500nm に示し退色しない (Koyanagi et al., 2004)。E113Q と E181Q 変異体を解析した結果、Glu181 が光産物の対イオンとして機能していた。そこで、光産物の pH 依存性を測定し、Glu113 がプロトン受容体として働くことができるのかを調べた。その結果、パラピノプシンの光産物の pH 依存性は無脊椎動物の Go や Gq ロドプシンのものと類似しており、ウシロドプシンとは

全く逆であった（図 2 9）。すなわち、パラピノプシンは、ウシロドプシンと同様に両方の位置にグルタミン酸を持っているが、Glu113 はプロトン受容体としては働かず、その光産物は無脊椎動物ロドプシンの光産物と似た構造を持つ進化的中間状態であることを見いだした。このことから、「Glu113 対イオンが、G 蛋白質活性化状態の生成において、プロトン受容体として機能するための特徴的な構造は、113 番目のアミノ酸残基に対イオンを獲得した後に形成された」と考えられる(Terakita et al., 2004)。

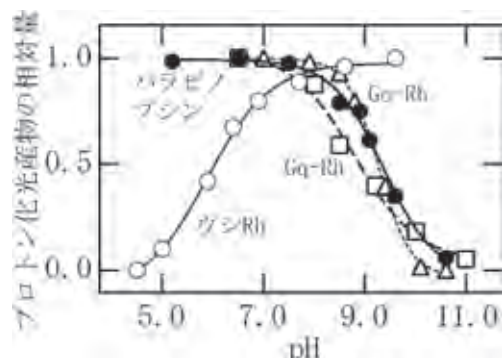


図29 多様なロドプシン類の光産物のpH依存性

d. 対イオンの変位とロドプシン類の多様性

一般に、機能発現に必須なアミノ酸残基は、分子進化の過程において置換されにくい。対イオンはロドプシン類の機能発現に必須なアミノ酸残基であるが、Glu181 から Glu113 へと変位した。その結果、対イオンとしての役割がなくなった「元対イオン」と「新対イオン」の2つの残基によってもたらされたと考えられた（図 3 0 a）。

祖先型視物質において、獲得された新対イオン Glu113 は、“暗状態”における Glu181 の可視光受容のための対イオンとしての役割を引き継ぎ、そして Glu113 と Glu181 周辺の構造の再構築をさらに促進したと考えられる。具体的には、Ser186 や水分子を介して Glu113 と Glu181 が水素結合系で結ばれ、Glu181 が対イオンとして働かない構造に再構築が起こったと考えられる。その水素結合ネットワークを形成した結果、G 蛋白質を活性化する“光産物”においてシッフ塩基から Glu113 へのプロトン移動の経路が作られ、G 蛋白質の高効率な活性化をもたらす分子内マイクロスイッチとして Glu113 が機能するに至ったと推測できる。実際、ウシロドプシンのG 蛋白質活性化能は、Go ロドプシンよりも約 50 倍、パラピノプシンよりも約 20 倍高い（図 3 0 b）。ウシロドプシンのG 蛋白質との結合部位を Go ロドプシンのものと入れ換えても、これほど大きな活性の低下は認められないので（Terakita et al., 2002）、これらの生化学的な結果は、Glu113 の分子内マイクロスイッチとしての働きが、脊椎動物ロドプシンのG 蛋白質活性化効率を増大させたことを示唆している。

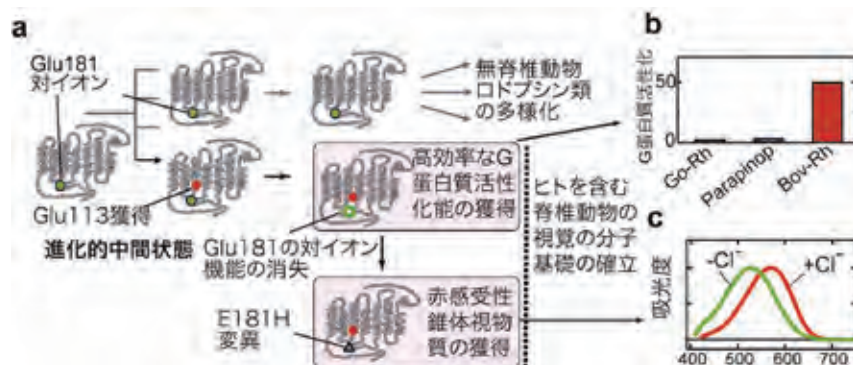


図30 対イオンの変位がもたらした脊椎動物視物質の分子進化(a)と機能多様性(b,c)
(b)G蛋白質活性可能な比較 (c)赤感受性錐体視物質におけるHis181の役割

さらに、分子進化の過程において、“暗状態”における Glu181 の対イオンとしての役割が弱まったこ

とにより、Glu181 の他のアミノ酸残基への置換が起こり、より新しい機能の形成につながったと考えられる。最も興味深い置換は、赤感受性錐体視物質における“元対イオン”である Glu181 のヒスチジンへの置換である（図 2 8 a）。このヒスチジンは、吸収極大が“赤色”にシフトするために必須である塩素イオン結合サイトの一部分として働いている（図 3 0 c）。したがって、新しい対イオン Glu113 の獲得は、脊椎動物視細胞での効率よい G 蛋白質の活性化機構のみならず、色覚色素の出現にも不可欠な置換であったと言える（図 3 0 a）。言い換えれば、対イオンとしての Glu113 の獲得はヒトを含めた脊椎動物の視覚の分子レベルでの第一歩であったと言えよう。

Glu181 は、高度に保存されている残基であるので、アミノ酸残基の比較からはその機能は予測できなかった。多様なロドプシン類の変異蛋白質の解析による本研究により、対イオンの変位が引き金となったロドプシン類の多様化が初めて明らかになった。

ロドプシンの多様化の道筋から GPCR 一般の多様化のメカニズムについても考察できる。ロドプシンスーパーファミリーの様々な受容体には、それぞれサブタイプが複数存在している。これまで、この多様性は、リガンド結合能（リガンド結合部位の構造）の違いや G 蛋白質共役特異性の違いとして説明されてきた。つまり、前者は入力部位に関わる多様化で、後者は出力部位に関わる多様化である。本稿で述べた結果は、ロドプシン類のサブタイプ間で G 蛋白質の活性化効率が大きく異なることを示している。つまり、G 蛋白質の活性化効率の違いを生み出す「入力と出力を結ぶ分子内情報伝達系の多様化」がロドプシン類の多様化の 1 つの要因であると言える。多くの GPCR において、同じ G 蛋白質と共役する複数のサブタイプが存在する。これらのサブタイプの存在は、多様化により G 蛋白質の活性化効率の違いがもたらされた結果かもしれない。

(B) 多様なロドプシン類解析から得られた進化的知見:

哺乳類の体内時計の光センサー細胞の進化的起源の解明

光センサーの機能を持つ細胞は、構造的な特徴に基づき 2 種類に分けられ、1 つはヒトをはじめとする脊椎動物の視細胞に代表される“繊毛型光受容細胞”であり、もう 1 つは無脊椎動物の視細胞に一般的な“感桿型光受容細胞”である。繊毛型光受容細胞は脊椎動物にも無脊椎動物にも存在するが、感桿型光受容細胞は脊椎動物には認められない。我々は、本研究において、脊椎動物の祖先型無脊椎動物である脊索動物のナメクジウオが、“視覚以外”の光受容を担うと考えられている感桿型光受容細胞を持っていることに着目し、そこで光をキャッチする蛋白質と光情報を伝達する蛋白質を解析した。その結

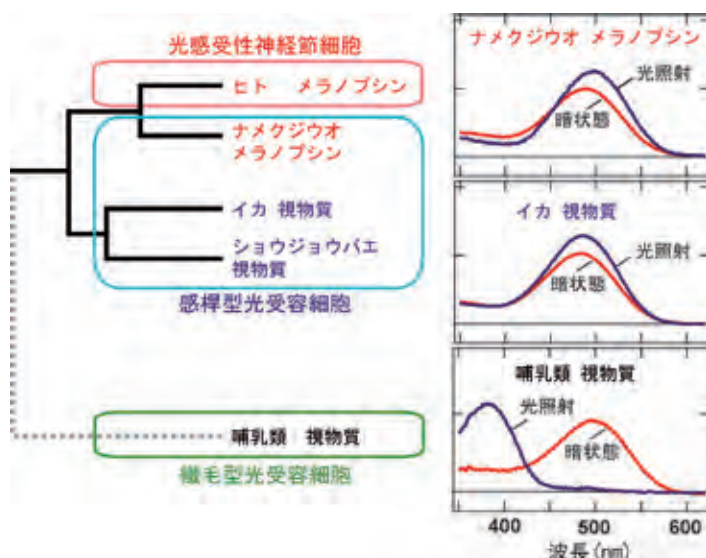
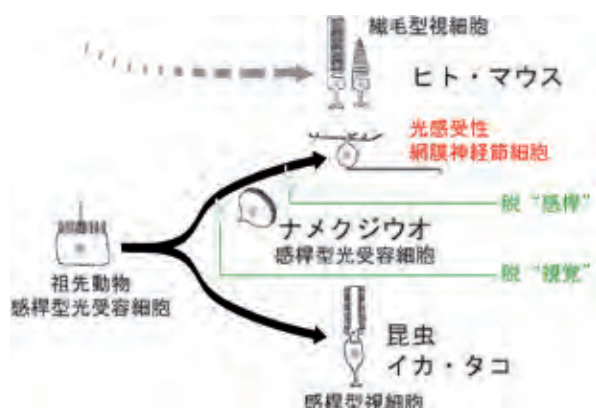


図31 メラノプシンと無脊椎動物視物質との進化的関係と分子特性の比較 メラノプシンは、無脊椎動物視物質と近縁であるばかりでなく（左）、分光学的特性や光反応特性も無脊椎動物視物質と酷似している（右）。

果、光をキャッチする光受容蛋白質が哺乳動物の光受容神経節細胞で機能しているメラノプシンであることを明らかにした。



(C) ノックインマウス視細胞を用いたロドプシンの機能解析

これまでに、ニワトリ網膜から分離精製した蛋白質溶液を用いて、ロドプシンと錐体視物質の間に様々な反応速度の違いがあることを見出していた。また、培養細胞において発現した部位特異的変異蛋白質の解析により、N末端から 122 番目のアミノ酸残基がこれらの反応速度の違いのいくつかに関わっていることを明らかにしていた (Imai et al., 1997)。そこでまず、このような反応速度の違いが生体内でも保存されているのか、また、それ以外の性質は試験管内と生体内で異なるのか否かを検討するため、ロドプシンの 122 番目のアミノ酸残基を錐体視物質型に置換したロドプシン E122Q ノックインマウスを作製し (図 3 3)、蛋白質が本来存在している視細胞外節画分においてどのような性質を示すのか検討した。

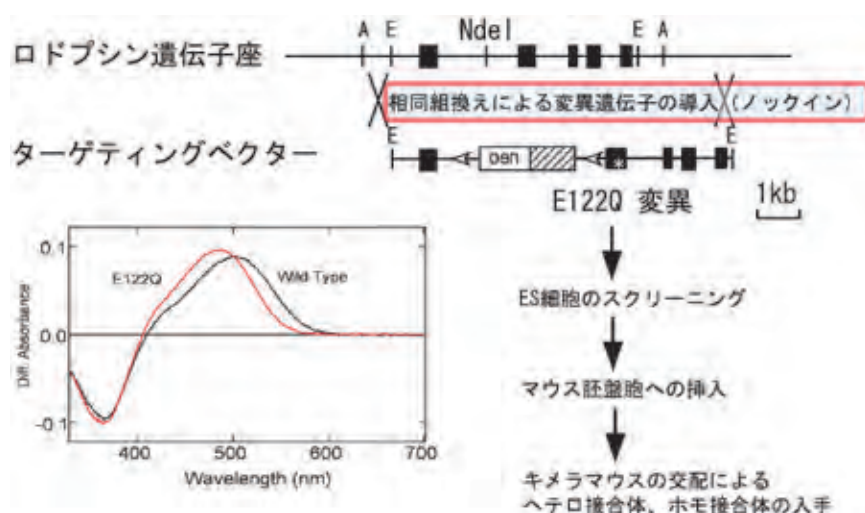


図33 E122Q 変異マウス作製の模式図

視細胞では、発現しているロドプシンの量が過剰・過小どちらの状態になっても細胞や組織の変性を引き起こすことが知られている。そこでまず、発現した蛋白質の量を野生型と比較したところ、遺伝子座にマーカー遺伝子が入っているときは野生型よりも若干発現量が少なかったが、マーカー遺伝子を Cre リコンビナーゼで取り除いた後は、野生型とほぼ同程度の発現量が得られることがわかった。さらに、組織切片の形態を比較したところ、ヘテロ接合体、ホモ接合体とも野生型とほぼ同様の形態を示すことがわかった。これらの結果から、ノックインした遺伝子の産物である蛋白質は正常に発現して視物質を形成し、視細胞や網膜の形態に異常を与えることもないことがわかった。

次に、発現した蛋白質を視細胞外節画分として単離し、吸収スペクトルの特徴を野生型と比較した。その結果、野生型が 496nm に吸収極大を示すのに対して、変異体は 480nm に吸収極大を示し、分子吸光係数も野生型より若干高くなることがわかった。等濃度の視物質を用いて両者の吸収スペクトルを並べたものが図 33 のスペクトル図であるが、等吸収点は 500nm に存在することがわかる。また、この 500nm の緑色光に対する光感受性を調べたところ、界面活性剤 (dodecylmaltoside) 可溶化条件では差はないが、外節膜中では野生型の方が変異体よりも若干反応性が高いという結果を得た。さらに、我々が開発した高速 CCD カメラ高時間分解分光光度計を用いることにより、光を照射したときの反応性の違いを調べたところ光反応後に生成するメタ I とメタ II の平衡状態は、野生型よりも変異体の方がメタ I に偏っていることがわかった。これらの結果は、培養細胞系で発現して界面活性剤を用いて精製したウシロドプシン、ニワトリロドプシン、マウスロドプシンと似ており、精製試料で得られた蛋白質の性質は、そのまま視細胞外節膜上でも適用可能であることがわかった。ただし、メタ I とメタ II の平衡状態は精製サンプル (界面活性剤により可溶化) では変異体、野生型ともメタ II に偏ってしまうため、視細胞外節膜上でのみ変異に由来する平衡の移動が観察できた。視細胞外節膜上で変異体蛋白質の性質を検討した例は、世界的に見ても例がないといえる。

光照射後の吸収スペクトル変化によると、野生型では遷移時定数 95 秒でメタ II がメタ III に遷移するのに対して、変異型では遷移時定数が著しく早くなり、時定数は 7.7 秒であった。平衡がメタ I に偏る (メタ II が少なくなる) ことと、反応速度が大きいことから、変異型では野生型に比べてメタ II の熱安定性が低下していると言える。水溶液中での反応速度に比べると若干差は小さくなるが、この現象は、培養細胞で発現した試料 (Imai et al., 2005) と同様であるため、122 番目のアミノ酸残基の置換によりメタ II の熱安定性が低下するという現象は、視細胞外節膜上でも普遍的な現象であるといえる。さらに、メタ III の崩壊速度も野生型の 18 分に比べると変異型では若干早くなり、122

番目のアミノ酸残基はこの速度にも影響を与えていると考えられる。これらの結果の上に立ち、さらにこのような性質をもつロドプシンが視細胞の応答特性にどのような影響を与えるのか電気生理学的方法を用いて調べることにした。

まず、網膜電位図 (ElectroRetinoGram) 装置を構築し (Kassai et al., 2005; Ueda et al., 2006)、非侵襲的条件下で網膜全体の電気生理学的応答がノックインマウスと野生型で異なるかどうかを比較検討した。白色光を用いて様々な光強度で視細胞に由来する a 波、ON 型双極細胞に由来する b 波の波形を比較した結果、それぞれの波形はほとんど変化しないが、刺激光に対する a 波の強度変化は、野生型よりも若干小さいことが示唆された。ただ、ERG は非侵襲的方法ではあるが個体差やノイズなどが大きいいため、更に視細胞 1 細胞レベルで蛋白質の置換による応答変化を測定することを試みた。

視細胞は、外節が非常に長いという形態的特徴と、光が入射していない暗時に外節と内節の間で電流が流れるという特徴を持った神経細胞である。そのため、光が入射した際の細胞応答を評価する際、外節部を電極内に吸引した吸引電極法により非常に高い定量性を保ちながら応答記録をすることが可能である。当然、視細胞は一光子でも反応が起こってしまうため、実験環境は完全暗状態、操作光も赤外光のみという状況で実験をする必要がある。このような実験設備は当計画が発足した当初は国内に存在しなかったため、まず、米国 Johns Hopkins 大学の King-Wai Yau 研究室との共同研究により、ノックインマウスの単一細胞記録を始めた。当該研究室でもノックインマウスの単一細胞記録ははじめての試みであったが、ポスドクの Vladimir Kefalov の協力により、ノックインマウスの記録を得ることができた。まず、様々な光強度の単色光 (500nm) を照射した際に生じる電気応答の光感受性は、変異型 (ホモ接合体) は野生型の 0.72 倍であった。また、波形については若干ピークに達する時間やベースラインまで回復する時間が遅かった。これらの現象は、中間体の平衡が野生型よりもメタ I に偏っていることから説明することができる。すなわち、平衡がメタ I に偏った結果、活性状態であるメタ II の割合は減少し、単位時間あたり活性化できる Gt の量が減った結果、ピークに至る時間が遅くなる。また、不活性化機構であるリン酸化反応もメタ II 状態で起こることが示唆されているが、この反応もメタ II 量の減少により減速され、結果的に反応の停止は遅くなると考えれば説明がつく。言い換えると、今回観察された反応停止の遅れは、リン酸化反応がメタ II で起こっていることを示唆しているともいえる。これらの結果は、中間体の平衡状態の変化により、視細胞の応答プロファイルまでもが変化することを初めて実証したと言える。

平衡状態の変化は応答プロファイルを変化させたが、蛋白質レベルで観察されたもう一つの性質、中間体の崩壊速度はどのような影響を与えているのだろうか？変異型マウスのメタ II の崩壊時定数は 6 秒で、1 秒前後で終結する応答のプロファイルに与える影響はほとんど無いと考えられる。そこで、より視細胞内の電位変化を遅らせて変異体置換による効果を観測するために、ノックインマウスをさらにアレスチンノックアウトマウスと交配した。活性化したロドプシンの活性化停止は、メタ II の自発的崩壊以外に、リン酸化によるトランスデューシンとの相互作用部位変化と、それに続くアレスチンの結合による完全停止が知られている。アレスチンノックアウトマウスでは、リン酸化は起こるがアレスチンの結合が起こらないために応答の完全停止が極端に遅くなる (約 1 秒→約 100 秒) ことが報告されていた。この時定数は、ちょうど ROS 中で測定したメタ II の崩壊速度と対応している。そこで E122Q ロドプシンとアレスチンノックアウトの二重変異マウスでこの完全停止速度を測定してみると、応答の完全停止が有意に速くなり、時定数約 3.7 秒で応答が終結した。すなわち、アレスチンノックアウトマウスで観測された応答の完全停止はメタ II の崩壊に対応することが実証できた。

最後に、変異マウスで野生型よりも 2 倍程度遅いメタ III の崩壊と対応する成分が観測できるかどうか

か検討した。視細胞の暗電流を完全に停止させるほど強い光（視細胞中のロドプシンの約 20%を退色させる程度）を照射すると、視細胞はしばらく飽和電位を保った後、徐々に暗時の電位に回復する。この一種の暗順応の時定数は約 14 分で、メタ III の崩壊時定数に近い。そこで、この速度を E122Q 変異マウス視細胞で測定してみた。その結果、変異マウス視細胞では回復速度は約 6.7 分であり、こちらもメタ III の崩壊速度に近かった。これらの結果は、飽和状態からの回復速度はメタ III の崩壊速度と相関があることを示しているため、今まで生理学的な存在意義が同定されていなかったメタ III の役割について、モデルを提唱することができた。すなわち、リン酸化反応やアレスチンの結合が追いつかないような大量のロドプシン反応条件では、メタ III が直接またはメタ II と平衡にあることで間接的に Gt を活性化し、その結果、飽和状態からの回復がメタ III の崩壊に依存すると考えることができる。メタ III の生理学的意義については未だ決着はついていないが、錐体視物質のメタ III 崩壊速度がロドプシンの約 700 倍速い（次項参照）ことにも何か意味があるのかもしれない。

(D) メタ中間体の反応速度を制御するアミノ酸残基

今までの研究により、122 番目のアミノ酸残基がメタ中間体の崩壊速度の制御に大きく関わっていることがわかっているが、この残基の置換単独では、ロドプシンと錐体視物質の反応速度の差は完全には説明できない。そこで、さらにこれらの性質の違いに関わっているアミノ酸残基を同定することにより、反応速度制御の分子機構を解明することを試みた。

脊椎動物の錐体視物質は、波長特異性やアミノ酸残基の相同性から 4 つのグループに分類される。これまでに、すべてのタイプの錐体視物質でメタ中間体の反応速度がロドプシンよりも速いことを見出していた。そこで、すべての錐体視物質で保存されているアミノ酸残基に注目し、この部位がロドプシンと異なる場合を蛋白質の性質を制御するアミノ酸残基の候補とした。上記の基準に該当する部位は、77 番目、144 番目、189 番目の 3 カ所であったため、これらの部位特異的変異錐体視物質を発現し、その性質をロドプシンと比較した。具体的には、ロドプシンに最も性質に近いニワトリの緑色感受性錐体視物質（ニワトリ緑：cG）の変異体をそれぞれ培養細胞により発現した。

発現した蛋白質に光を照射して光照射後の中間体の生成・崩壊速度を比較した。その結果この実験系では、野生型（cG-WT）のメタ II 中間体の崩壊がニワトリロドプシン野生型（cRh-WT）よりも約 70 倍速いことがわかった。変異体を順に見ていくとまず、V77L、G144S 変異体のメタ II 中間体の崩壊速度は野生型と比べてほとんど変化がなかった。一方、189 番目の残基をロドプシン型に置換した cG-P189I 変異体は cG-WT と比べて約 26 倍メタ II 中間体の崩壊が遅くなった。この実験系では、cG-Q122E のメタ II 中間体の崩壊は cG-WT に比べて約 2.6 倍遅い。このことから、ニワトリ緑においては、122 番目の残基よりも、189 番目の残基の方がよりメタ II 中間体の寿命を決めるのに大きな影響を与えることが分かった。さらに、これら 2 残基を両方ロドプシンタイプに置換した cG-Q122E/P189I 変異体は、cG-P189I 変異体よりもさらにメタ II 中間体の崩壊が遅くなり、cRh-WT とほぼ同じ崩壊速度を取ることが分かった。このことから、ニワトリ緑のメタ II 中間体の崩壊が“速い”性質を決定づけているのはほぼこの 2 残基であることが分かった。次に、ロドプシンとその変異体について逆方向の解析を行った。ロドプシンにおいて 189、122 番目の残基をニワトリ緑タイプに置換した変異体ではメタ II 中間体崩壊が速まり、ニワトリ緑の性質に近づくことを期待した。実際、cRh-I189P 変異体ではメタ II 崩壊がロドプシン野生型に比べて約 2 倍速まり、さらに cRh-E122Q 変異体では約 8 倍速まった。さらに、両残基を置換した二重変異体（cRh-I189P/E122Q）は約 20 倍速いメタ II の崩壊速度を示した。興味深いことに、ロドプシンではニワトリ緑とは逆に、189 の変異よりも 122 の変異の方の効果が大きい。このことから、ニワト

リ緑とは違い、ロドプシンでは189番目よりも122番目の残基の方がよりメタ II 中間体の崩壊速度を決めるのに重要な働きをしていると言える（図34）（Kuwayama et al., 2002）。

これまでの結果から、ニワトリ緑、ロドプシンのメタ II 崩壊速度の違いを決めているのは主に122、189番目のアミノ酸残基であることが分かった。それでは、これらの残基はニワトリ緑、ロドプシンのその他の性質の違いについて何らかの役割を果たしているのだろうか。前章において視細胞中ではE122Q変異ロドプシンがメタ III 中間体の崩壊速度を変化させ、その違いが暗順応速度の違いと並行していることを見出した。そこで、メタ III 中間体の崩壊速度が122、189番目の残基によってどのように変化するかを、発現蛋白質を用いて検討した（Kuwayama et al., 2005）。

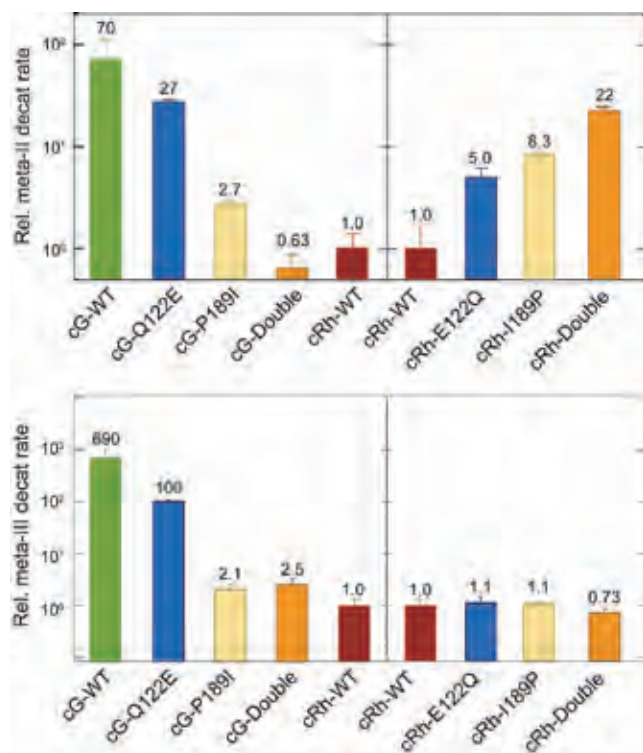


図34: 様々な視物質変異体のメタ II (上) とメタ III (下) の崩壊速度
ロドプシン野生型(cRh-WT)の速度を1としてそれに対する比を示した。

まず、ニワトリ緑とロドプシンのメタ III の崩壊速度を比較したところ、約700倍異なることが分かった。そこでさらに、ニワトリ緑、ロドプシンにおいて122、189番目の残基をそれぞれの持つアミノ酸残基に置き換えた変異体でメタ III 中間体の崩壊速度を検討した。その結果、ニワトリ緑の122、189番目の残基をロドプシントypeに置換することでメタ III 崩壊は遅くなり、ロドプシン野生型に近づいていることが分かった。ロドプシン野生型を1とすると崩壊速度比は、Q122E、P189I、Q122E/P189I変異体はそれぞれニワトリ緑野生型に比べて6.8、320、280倍メタ III 崩壊が遅くなった。このことから、ニワトリ緑ではメタ II 中間体の場合と同様、122、189番目の残基がメタ III の崩壊速度を制御し、また189番目の残基の方が122番目の残基よりも効果が大きいことが分かった。

それでは、ロドプシン変異体ではどのような挙動の変化を示すのであろうか。興味深いことに、ロドプシン変異体はニワトリ緑の場合と異なり、メタ III 崩壊速度の変化を殆ど示さなかった。これはまた、メタ II 崩壊が122、189番目の残基の変異により速まったという結果とも異なる。すなわち、ロドプシンにおいてメタ III 中間体の崩壊速度を制御するアミノ酸残基は122、189番目以外に存在することを示している。

そこでさらに、ニワトリロドプシンにおけるメタ III 崩壊速度の制御部位を探索するため、ニワトリ緑とロドプシンからなるキメラ変異体を用いて解析を行った。ウシロドプシンとオオヤモリ青（ニワトリ緑と同じグループに属する）からなるキメラ変異体を用いた以前の研究から、ロドプシンのメタ III 崩壊速度を制御する部位は細胞外第 2 ループから C 末端側に存在することが示唆されている (Kojima et al., 1996)。この結果に基づき、N 末端からヘリックス IV、V、VI、VII までをそれぞれニワトリ緑に置換したキメラロドプシンを作製し、その挙動を検討した。その結果、N 端からヘリックス IV までをニワトリ緑に置換したキメラ変異体は以前の結果と同様にロドプシンとほぼ同じメタ III 崩壊速度を示した。それに対し、N 端からヘリックス V、VI、VII までをニワトリ緑に置換したキメラ変異体ではメタ III 崩壊が徐々に速まることが分かった。これらの結果は、ロドプシンにおいてメタ III 中間体崩壊速度を制御するアミノ酸残基は細胞外第 2 ループからヘリックス VII までの領域に複数存在することを示している。興味深いことに、ヘリックス V、VI、VII を単独でニワトリ緑タイプに置換したキメラロドプシンのメタ III 崩壊は速くならなかった。

以上の結果、メタ II の安定性は主に 122、189 の両残基で決定されているが、メタ III については蛋白質全体、特に C 末端側のヘリックスが協調的に作用していることが示された。これらの実験については、培養細胞系を用いて発現・精製した蛋白質変異体を用いているため、実際の視細胞中での反応については対応しない部分もあると考えられる。実際、ロドプシンの E122Q 変異体は視細胞中では有意な反応速度の変化を見せたが、発現・精製した蛋白質では野生型との差は見られなかった。そこで、更に視細胞中での錐体視物質の反応性を見る必要があると考え、錐体視物質のノックインマウスを作製した。

(E) 錐体オプシンなどの GPCR ノックインマウスの作製

これまで見てきたように、例え 122 番目、189 番目のアミノ酸残基のように視物質のある性質に影響を与える残基が同定されても、それが蛋白質の他の性質に与える影響は限られている。桿体と錐体の差については、最終的に見たいのはロドプシンと錐体視物質の差が視細胞の性質に与える影響である。そこで、この目的のために錐体視物質などの遺伝子そのものをロドプシンの遺伝子座にノックインすることにより、桿体視細胞内での受容体の置換そのものの効果を検討することを目指した。ノックインに用いるベクターは、相同領域が長い方が相同組み換えの起こる確率が高いため、我々は外来の非相同領域をなるべく短くして cDNA を導入することにした。また、導入する遺伝子としては、ロドプシンと吸収波長帯が近いために解析が行いやすいニワトリの緑色感受性錐体視物質 (cG) と、マウスの錐体と比較するためにマウスの緑色感受性錐体視物質 (mG) を導入することを試みた (Sakurai et al., 投稿中)。また、他の GPCR が桿体内部で外節に輸送されるかどうかを検討するために、エンドセリン B 受容体 (ETBR) をノックインすることも試みた (Kodama et al., 2005)。

E S 細胞への遺伝子導入とスクリーニング、その後胚盤胞に組み換え E S 細胞を導入した結果、それぞれのラインで遺伝子としてはノックインされたモデル動物を得ることができた。しかしながら、それぞれのラインで転写産物の量や発現蛋白質量は異なっていた。マウス緑ノックインマウスでは、mRNA 量が野生型の 60%、視物質量は 10% であった。これだけ発現量が少ないと、細胞の形態に影響を与える可能性がある。実際、5 週齢以降のホモ接合体では外節の変性が観察され、また、10 週齢に至ると網膜自身が変性を始めた。しかし、4 週齢以前では視細胞の形態は比較的正常であったため、4 週齢までの視細胞を用いて以後の実験を行うことにした。視細胞内における局在を調べたのが、図 35 である。野生型の視細胞では桿体外節部にロドプシンが、錐体外節部にマウス緑が局在しているが、ヘテロ接合体では桿体外節部にもマウス緑に由来する蛍光が観察される。また、ホモ接合体では、桿体外節にはロドプ

シンに由来するシグナルは見られず、マウス緑に由来する蛍光だけが観察された。この傾向は、ニワトリ緑や ETBR でも同様であった。

これらの結果から、マウス緑およびニワトリ緑ノックインマウスを用いることにより、桿体視細胞内における錐体光受容蛋白質のノックイン効果を研究することができると期待された。実際、ERG によりマウス眼球内での視細胞応答に由来する a 波の光感受性は野生型の約 32 分の 1 であった。以後の電気生理学的解析については、筑波大学にて独自のシステムを構築し、吸引電極法により単一細胞記録を行うことにより、より詳細な解析を行うことにした（中谷グループの報告参照）。その結果、野生型に比べて錐体視物質ノックインマウスでは、単一細胞レベルでも光感受性が 3～4 倍低下していることがわかった。

この感度低下の原因としては、Gt の濃度低下（約 1/2）が挙げられるが、それだけでは説明できない。そこで、ノックインマウスの視細胞外節画分を分離し、Gt の活性化能を測定した。その結果、生体内条件（37℃）では初速が野生型の約 1/2 であることがわかった。すなわち、Gt の濃度低下（約 1/2）と初速の低下（約 1/2）の相乗効果により、最大 1/4 の感度低下が説明できる。なお、温度条件を 0℃にすると同じ条件で Gt の活性化能は野生型とほぼ同様であることから、活性化能の違いは中間体の平衡状態や崩壊などの温度に依存した現象であることが示唆される。中間体の崩壊速度についての分光学的な解析は、サンプル量の問題から不可能であったが、この事実は視細胞外節膜上かつ温度も生体に近い条件で蛋白質の機能解析を行うことが、生理学的機能を考察する上で重要であることを示している。

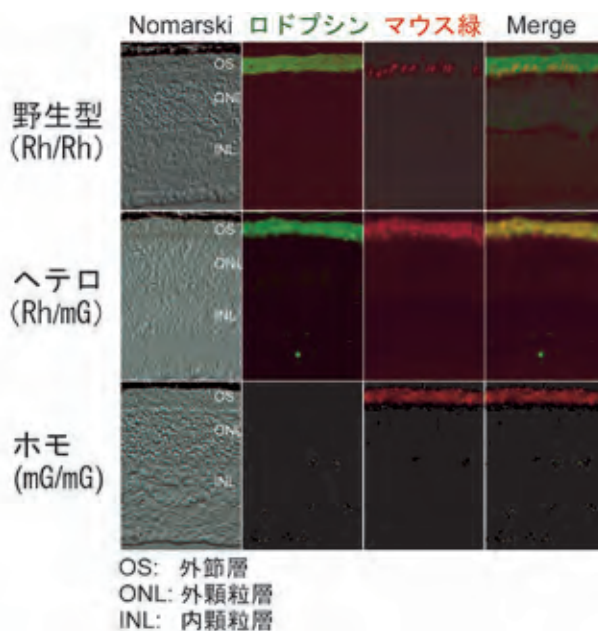


図35 マウス緑ノックインマウスにおける視物質の局在
ロドプシン(緑)、マウス緑(赤)の局在をそれぞれに対する抗体を用いて可視化した。

(F) 錐体光受容蛋白質のノックインによる色覚機構の解析

視物質が視覚的機能を果たす上で一つの大きな役割は、光の波長を見分けること、すなわち色覚が挙げられる。マウスは桿体視物質ロドプシン以外に紫外線感受性、緑色感受性の二種類の錐体視物質を網膜内で錐体視細胞に発現している。一方、霊長類では緑色感受性錐体視物質から派生した赤色感受性錐体視物質の存在により、三色性の色覚が存在することが知られている。霊長類が進化の過程で、もともと2種類の視物質遺伝子から3種類の視物質を獲得し、その結果他の哺乳類には観察できない3色性を獲得したのだとしたら、人工的にこの進化の過程をなぞることはできないだろうか。我々は錐体視物質の性質を精査していると同時にノックインという手法を手に入れたため、3番目の錐体視物質のノック

インにより、3色性マウスの作製を試みることにした (Onishi et al., 2005)。

マウスの緑色感受性錐体視物質では、赤色感受性 308 番目の位置がセリンであることが大きな特徴であり、ロドプシンも含めてこの位置にある残基がセリンであるかアラニンであるかによって吸収波長が短波長または長波長に変化する (Sugawara et al., 2005)。そこで、緑色感受性錐体視物質の部位特異的変異 (S308A) により波長感受性のみを変換した視物質をノックインしたマウスモデルを作製した (図 36)。これまでに述べた通常の手法でマウスモデルを作製した後、それぞれの視物質が排他的に錐体に発現していなければならないため、in situ hybridization により確認を行った。その結果、確かにノックインしたマウス緑 S308A 変異体は野生型と排他的に発現していることがわかった。また、アミノ酸置換によって視物質の他の性質が変化する場合もあるため、光受容能や G 蛋白質活性化能などの生化学的なパラメータを確認した。その結果、中間体の生成・崩壊速度の他に分子吸光係数・光感受性などに大きな違いがないことを確認した。これらの実験の結果、このマウスは確かに波長感受性のみが異なる 3 種類の錐体視物質を発現していることが確認できた。

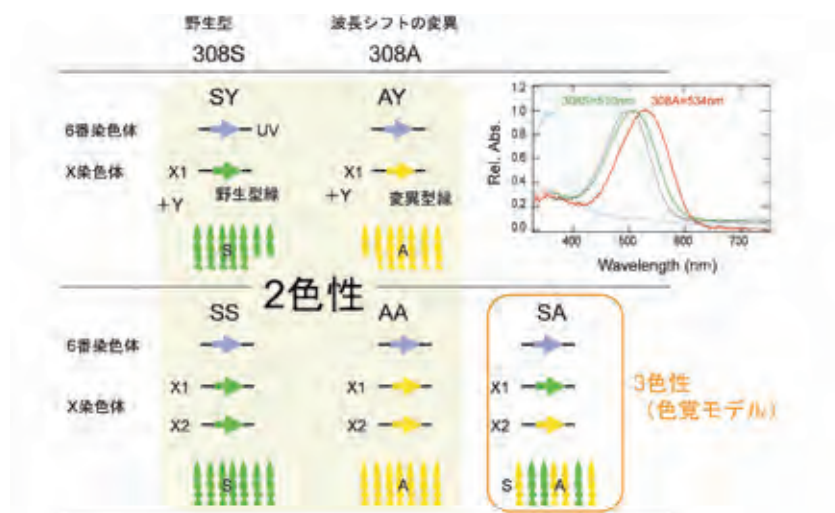


図36 三色性マウス作製の模式図

次に、新たにノックインした赤色感受性視細胞に由来する波長感受性が、視細胞以下の神経細胞（双極細胞、神経節細胞）でも表在するかどうかについて、電気生理学的解析を行った。ERG の b 波を解析した結果、双極細胞レベルでも波長感受性の違いは保存されていることがわかった。また、神経節細胞レベルにおいても波長感受性の違いは保存され、ヘテロマウスにおいては両視物質からの加算的な入力が行われていることが判明した。これらの結果、ノックインにより波長感受性を変化させたマウスは確かに入力の変化が行われていることが判明した。これらの波長情報がどのようにして色情報に変換されているかについては、今後の解析を待たなければならないが、蛋白質の性質を生体内で精査する手段としてノックインマウスを用いる方法は確立したといつて良いと考えている。このような遺伝子工学的・蛋白質工学的的方法と、今まで共同研究により展開してきた色覚の電気生理学的・心理物理学的研究

(Onishi et al., 2002; Ueyama et al., 2002; Terao et al., 2005) を融合することにより、色覚のようなより高次の生命現象が分子レベルで解き明かすことができる糸口を見つけることができた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

以前にニワトリの網膜から 4 つの色を見る視物質（錐体視物質）をクローニングし、ヒトを含めた視物質の分子系統樹の解析から脊椎動物の先祖型の視物質はまず 4 つの色を見る視物質に分歧し、その後

に薄暗がり働くロドプシン（桿体視物質）が分岐してきたことを示した（Okano et al., 1992）。そして、これらの分岐が視細胞の機能多様化とどのように関連しているかに興味を持って研究を進めた。ロドプシンと錐体視物質の分子的性質を比較検討した結果、両者の反応性や安定性が大きく異なっており、さらに、その違いは少数のアミノ酸の変異に由来することがわかった（Shichida & Imai, 1998）。そこで、本研究により、この性質の違いが桿体・錐体の光応答の違いと関連しているかどうかを、ノックインマウスを作製して検討した訳である。

実験の結果、視物質の性質の違いで、応答の速度や感度に変化することが証明され、分子の多様化に伴う分子の反応性やG蛋白質活性化効率の変化が直接生物の機能多様化（桿体と錐体の多様化）に関連することが示唆された。一方、分子的性質の違いのうち、ある性質は生理機能に直接影響するが、他の性質は分子の性質としては大きくても生理機能に直接の影響がないことも明らかになった。本研究ではさらに無脊椎動物を含むロドプシン類全体の多様化について検討し、特に、多様化を生み出す分子メカニズムに重点を置いて検討した。その結果、機能多様化に必須なアミノ酸置換や変位やそれによる分子自身の性質の変化を発見することができた。重要なことは、これらの結果から GPCR 等の機能性蛋白質の多様化についての新しいメカニズムを提唱できたことである。

GPCR にはそれぞれのサブタイプが複数存在している。これまで、この多様化はリガンド結合能（リガンド結合部位の構造）の違いやG蛋白質共役特異性の違いとして説明されてきた。つまり、前者は入力部位に関わる多様化で、後者は出力部位に関わる多様化である。本研究ではロドプシン類での安定性や反応性の違い、また、サブタイプ間でG蛋白質の活性化効率により生理機能の多様化が起こる可能性が示唆された。つまり、「入力と出力を結ぶ分子内情報伝達系（分子の構造変化）の多様化」がロドプシン類の多様化の1つの要因と考えられる。ロドプシン類のこの結果を他の GPCR に適用すると、同じG蛋白質と共役する複数のサブタイプが存在するのは、この多様化によりG蛋白質の活性化効率の違いがもたらされた結果かも知れない。今後、この「第3の多様化のメカニズム」がどれほどの一般性を持つのかに興味のある研究課題である。

3.5 電気生理学的方法による細胞レベルでの GPCR 機能発現機構の解析（筑波大学 中谷グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

(A) ノックインマウスを用いた光受容蛋白質の細胞内機能解析

GPCR の変化による細胞機能発現機構を明らかにする目的で、七田グループで作製したノックインマウスの視細胞の光応答について電気生理学的方法（吸引電極法、パッチクランプ法）を用いて測定し、光受容蛋白質（GPCR）の変異による光応答特性の変化を解析した。GPCR 分子を異所的発現したノックインマウス視細胞の電気生理学的測定を行うことにより、視覚機能における GPCR の変異と細胞の応答特性の関連を調べた。

多くの脊椎動物の網膜には二種類の視細胞、桿体と錐体が存在し、それぞれ薄明視と昼間視（色覚）を担っている。それぞれの機能に応じて視細胞自身の応答特性も異なり、桿体は高感度で反応が遅く、錐体は低感度で反応が速い特性を示す。桿体・錐体共に細胞中における光情報伝達のモチーフは、光受容蛋白質（GPCR）→G蛋白質（Gt）→cGMP 分解酵素（PDE）→cGMP 依存性カチオンチャネル（CNGC）の連鎖で共通である（図3-7）が、それぞれのサブタイプが視細胞によって異なるため、細胞の応答特性の違いに蛋白質の機能が与える影響を調べることは、視細胞の応答特性の違いの原因を解明する上で重要な課題である。

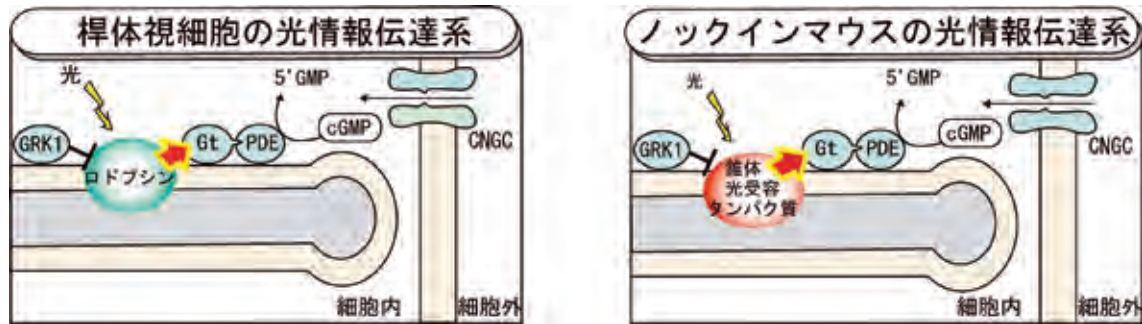


図37 野生型(左)とノックインマウス(右)の視細胞内光情報伝達過程

ロドプシンをはじめとする光受容蛋白質は多くの GPCR と同様に膜貫通型であるので、視細胞内での機能を精査しようとする際には、単純な溶液交換や遺伝子導入（トランスジェニック）では細胞の構造や他の蛋白質との相互作用に不都合をきたすため、細心の注意を要する。我々は、七田グループと共同でノックインマウスを用いて視細胞内で蛋白質の性質そのものを変化させることを試みてきた。具体的には、本来ロドプシンが発現する桿体視細胞に、ロドプシン変異体（吸収波長や反応速度を変化させる E122Q 変異体）や錐体光受容蛋白質（マウスの緑色感受性錐体光受容蛋白質）を発現するノックインマウスを作製した。

そこで、生化学的手法により細胞の形態や蛋白質の発現量・発現部位などを確認した後に、視細胞応答を電気生理学的（吸引電極測定、パッチクランプ測定）に測定し、光受容蛋白質の変異による視細胞応答特性の変化を解析した。視細胞の生理応答特性を解析する手段として網膜全体の応答を記録する網膜電位図（Electroretinogram; ERG）も挙げられるが、特に、吸引電極法は視細胞の単一細胞応答を記録するため光受容蛋白質の特性を知るのに非常に有効な方法である。国内において初めてこのシステムを構築し、蛋白質の機能解析に有効であることを示すことができた（図38）。他の脊椎動物に比してマウス視細胞の光受容部（外節）が小さく電気生理学的解析には不向きなものにもかかわらず、ノックインマウスを用いる研究の利点は、他の遺伝子改変などとの組み合わせにより様々な分子レベルの解析が可能であることである。

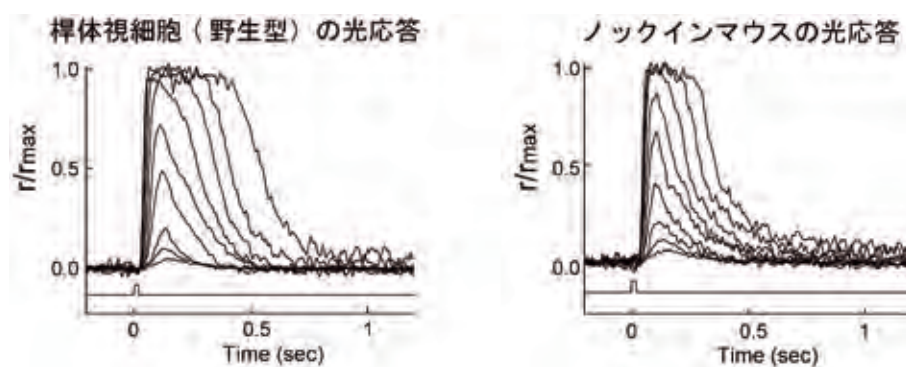


図38 吸引電極法により得られた野生型(左)とマウス緑ノックインマウス(左)の単一視細胞応答

実際に得られたマウス緑色感受性錐体光受容蛋白質ノックインマウスの応答は、野生型よりも刺激光に対する感度が低いことがわかった。一方、応答の速度は野生型とほぼ同様であり、光受容蛋白質の置換の影響は視細胞の感度に表れることがわかった。マウス緑色感受性錐体光受容蛋白質ノックインマウスについては、細胞の形態や蛋白質の発現量にも異所的発現の影響が観察されたため、吸収波長帯がシフトしたロドプシン変異体（E122Q）ノックインマウスとのヘテロマウスを用いることにより、より詳

細な解析を行うことができた。具体的には、同一細胞に発現しているが吸収波長が異なる二種類の光受容蛋白質に由来する光応答を数学的に解析することにより、それぞれの一光子反応の大きさを見積もることができた。この結果がマウス緑色感受性錐体光受容蛋白質ノックインマウス単独の結果と一致していたため、確かに光受容蛋白質そのものの影響が視細胞の感度に影響を与えていることが示された。

さらに、視細胞の生理機能を考える上での重要な光受容蛋白質の特性として、暗時における熱安定性が上げられる。光受容蛋白質は光の吸収によって活性化するだけでなく、暗時において熱エネルギーによっても自発的に活性化される。光受容蛋白質が熱によって活性化される時定数は年単位であり生化学的な測定下では測定不可能なほど低頻度な事象である。しかし一つの細胞あたり光受容蛋白質が $10^7 \sim 10^9$ 分子存在する視細胞の生理的環境下においては蛋白質の熱による活性化が視覚情報に及ぼす影響は顕著となる。なぜなら、光により蛋白質が活性化された結果生じる応答と熱エネルギーにより自発的に活性化された結果生じる応答は区別できないため、熱による自発的活性化の応答は擬陽性シグナルとなるからである。従って、ロドプシンと錐体光受容蛋白質の熱安定性は視細胞の感度に影響を及ぼす重要な要因となると考えられるが、これまでロドプシンの熱安定性に関しては詳細な実験がなされているのに対し、錐体光受容蛋白質に関しては錐体細胞自体が解析に不向きなため知見に乏しい。そこで、錐体光受容蛋白質が桿体視細胞に異所発現するノックインマウスを用い電気生理学的解析から錐体光受容蛋白質の熱安定性を定量的に見積った。その結果錐体光受容蛋白質はロドプシンに対して約 1000 倍熱的に不安定であることが分かり、光受容蛋白質の熱安定性自体が視細胞の生理機能に果たす役割が明らかとなった (Sakurai et al., 投稿中)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

網膜の神経細胞の電気生理学的研究において、日本は世界的にも優れた研究が多い。しかし、網膜でさえも多くの種類の神経細胞が存在することから、それらの解析には遺伝子操作を含めた分子生物学的手法の導入が期待されている。本研究で得られた結果は、当初米国の研究者との共同研究として遂行する予定であった。しかし、研究の詳細にわたる検討のためには、遺伝子操作を行える研究者が生化学の実験と同時に電気生理学的手法を用いた実験も行うことが必須である。そこで、七田グループと中谷グループが共同で電気生理学のシステムを立ち上げ、研究期限内に十分な結果を出すことができた。

本研究により、GPCR ロドプシン類の分子特性の違い（分子構造変化の違い）によって、細胞応答の違いが生じることが示され、新規な機能多様化のメカニズムが明らかになった。しかし、現在のところ、メカニズムの特定にまでは至っておらず、詳細な検討はこれからの問題である。強調すべきことは、本研究により、分光学・生化学・分子生物学・電気生理学の垣根が取り払われ、総合的にメカニズムの解析が行われる環境と人材の育成に成功したことである。したがって、今後は分子に基礎をおいた電気生理学的研究の進展が期待されるとともに、視覚以外の感覚や GPCR が関与する種々の生理機能についての研究の進展が期待される。

4. 研究参加者

① 七田芳則グループ（ロドプシンをモデルとした GPCR の機能発現・多様性解析）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
七田 芳則	京都大学大学院 理学研究科	教授	研究の全体的な総括	平成 13 年 12 月～ 19 年 3 月
寺北 明久	京都大学大学院 理学研究科	助教授	ロドプシンをモデルとした GPCR の機能発現解析	平成 13 年 12 月～ 18 年 3 月
今井 啓雄	京都大学大学院 理学研究科	助手	ロドプシン類の多様性と 視覚機能の多様性の解析	平成 13 年 12 月～ 17 年 12 月
山下 高廣	京都大学大学院 理学研究科	助手	mGluR をモデルとした GPCR の機能発現解析	平成 13 年 12 月～ 19 年 3 月
小柳 光正	京都大学大学院 理学研究科	学振特別研究員	ロドプシン類の構造・機能 多様性の解析	平成 13 年 12 月～ 16 年 3 月
大西 暁士	京都大学大学院 理学研究科	学振特別研究員	3 色性マウスの作製と解析	平成 13 年 12 月～ 18 年 3 月
森住 威文	京都大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	ロドプシンと G 蛋白質との 相互作用解析	平成 13 年 12 月～ 19 年 3 月
塚本 寿夫	京都大学大学院 理学研究科	京大フェロー	新規ロドプシン類の機能解析	平成 13 年 12 月～ 19 年 3 月
桑山 成樹	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	桿体と錐体の分子機構の解析	平成 13 年 12 月～ 17 年 3 月
伊藤 進士	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ロドプシン類の構造・機能 多様性の解析	平成 13 年 12 月～ 15 年 3 月
桜井 啓輔	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ノックインマウスの作製と 機能解析	平成 13 年 12 月～ 19 年 3 月
中道 仁	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ロドプシン類の機能解析	平成 14 年 4 月～ 16 年 9 月
甲斐 敏裕	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	GPCR の多様性解析	平成 14 年 4 月～ 16 年 3 月
丹光 範智	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ノックアウトマウスの 機能解析	平成 15 年 4 月～ 17 年 3 月
兵地 梓	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ロドプシン類の構造・機能 多様性の解析	平成 16 年 4 月～ 19 年 3 月
筒井 圭	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	桿体と錐体の分子機構	平成 17 年 4 月～ 19 年 3 月
松山武 オジョス	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	ロドプシン類の構造・機能 多様性の解析	平成 18 年 4 月～ 19 年 3 月
柳川 正隆	京都大学大学院 理学研究科	大学院生	GPCR の多様性解析	平成 18 年 4 月～ 19 年 3 月
岡田 加奈	京都大学大学院 理学研究科	CREST 技術員	研究補助	平成 14 年 4 月～ 18 年 3 月
酒井 佳寿美	京都大学大学院 理学研究科	CREST 技術員	研究補助	平成 14 年 5 月～ 18 年 3 月
千草 由香	京都大学大学院 理学研究科	CREST 技術員	研究補助	平成 15 年 4 月～ 17 年 3 月
野田 美江	京都大学大学院 理学研究科	CREST 事務員	事務一般	平成 14 年 2 月～ 14 年 8 月
中川 千裕	京都大学大学院 理学研究科	CREST 事務員	事務一般	平成 14 年 10 月～ 15 年 2 月
中村 友美	京都大学大学院 理学研究科	CREST 事務員	事務一般	平成 17 年 4 月～ 18 年 3 月
竹村 房子	京都大学大学院 理学研究科	CREST 事務員	事務一般	平成 18 年 4 月～ 19 年 3 月

② 岡田哲二グループ（X線解析法によるロドプシン類の機能解析）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岡田 哲二	産業技術 総合研究所	主任研究員	ロドプシンのG蛋白質活性化 機構の原子レベルでの解析	平成13年12月～ 19年3月
西澤 恵美子	産業技術 総合研究所	CREST 研究員	ロドプシン類の結晶作用 ・分析	平成14年2月～ 15年8月
大澤 未帆	産業技術 総合研究所	CREST 研究員	ロドプシン類の結晶作用 ・解析	平成16年5月～ 18年7月

③ 神取秀樹グループ（分光法によるロドプシン類の機能解析）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
神取 秀樹	名古屋工業大学 大学院 工学研究科	教授	ロドプシンのFTIR 分光	平成14年4月～ 19年3月
古谷 祐詞	名古屋工業大学 大学院 工学研究科	助手	ロドプシンのFTIR 分光	平成13年12月～ 19年3月

④ 中谷敬グループ（細胞レベルでのGPCR 機能発現機構の解析）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中谷 敬	筑波大学大学院 生命環境科学 研究科	助教授	GPCR 研究モデル動物の 電気生理測定	平成16年4月～ 19年3月
鈴木 啓明	筑波大学大学院 生命環境科学 研究科	大学院生	GPCR 研究モデル動物の 電気生理測定	平成17年5月～ 19年3月
鈴木 むつみ	筑波大学大学院 生命環境科学 研究科	大学院生	GPCR 研究モデル動物の 電気生理測定	平成17年5月～ 19年3月

5. 招聘した研究者等

なし

6. 研究業績

(1) 原著論文発表(国内誌 0 件、国際誌 63 件)

1. A. Terakita, T. Yamashita, N. Nimbari, D. Kojima and Y. Shichida (2002) Functional interaction between bovine rhodopsin and G protein transducin. *J. Biol. Chem.* 277, 40-46.
2. A. Onishi, S. Koike, M. Ida-Hosonuma, H. Imai, Y. Shichida, O. Takenaka, A. Hanazawa, H. Komatsu, A. Mikami, S. Goto, B. Surybroto, A. Farajallah, P. Varavudhi, K. Kitahara and T. Yamamori (2002) Variations in long- and middle-wavelength-sensitive opsin gene loci in crab-eating monkeys. *Vision Res.* 42, 281-292.
3. T. Nagata, T. Oura, A. Terakita, H. Kandori and Y. Shichida (2002) Isomer-specific interaction of the retinal chromophore with threonine-118 in rhodopsin. *J. Phys. Chem.* 106, 1969-1975.
4. T. Hirano, I.T. Lim, D. M. Kim, X.-G. Zheng, K. Yoshihara, Y. Oyama, H. Imai, Y. Shichida and M. Ishiguro (2002) Constraints of opsin structure on the ligand binding site: studies with ring-fused retinals. *Photochem. Photobiol.* 76, 606-615.
5. H. Ueyama, S. Kuwayama, H. Imai, S. Tanabe, S. Oda, Y. Nishida, A. Wada, Y. Shichida, and S. Yamade (2002) Novel missense mutations in red/green opsin genes in congenital color-vision deficiencies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 205-209.
6. S. Kuwayama, H. Imai, T. Hirano, A. Terakita and Y. Shichida (2002) Conserved proline residue at position 189 in cone visual pigments as a determinant of molecular properties different from rhodopsin. *Biochemistry* 41, 15245-15252.
7. M. Koyanagi, A. Terakita, K. Kubokawa and Y. Shichida (2002) Amphioxus homologs of Go-coupled rhodopsin and peropsin having 11-cis- and all-trans-retinals as their chromophores. *FEBS Lett.* 531, 525-528.
8. T. Okada, Y. Fujiyoshi, M. Silow, J. Navarro, E. M. Landau and Y. Shichida (2002) Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5982-5987
9. H. Kandori, K. Shimono, Y. Shichida, and N. Kamo (2002) Interaction of Asn105 with the retinal chromophore during photoisomerization of pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry* 41, 4554-4559.
10. K. Shimono, Y. Furutani, H. Kandori and N. Kamo (2002) A pharaonis phoborhodopsin mutant with the same retinal binding site residues as in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 41, 6504-6509.
11. M. Iwamoto, Y. Furutani, Y. Sudo, K. Shimono, H. Kandori and N. Kamo (2002) Role of Asp193 in chromophore-protein interaction of pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Biophys. J.* 83, 1130-1135
12. Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori (2002) FTIR spectroscopy of the M photointermediate in pharaonis phoborhodopsin. *Biophys. J.* 83, 3482-3489.
13. Y. Nakashima, T. Kusakabe, R. Kusakabe, A. Terakita, Y. Shichida, and M. Tsuda (2003) Origin of the vertebrate visual cycle: genes encoding retinal photoisomerase and two putative visual cycle proteins are expressed in whole brain of a primitive chordate. *J. Comp. Neurol.* 460, 180-190.

14. Y. Furutani, H. Kandori, and Y. Shichida (2003) Structural changes in lumirhodopsin and metarhodopsin I studied by their photoreactions at 77 K. *Biochemistry* 42, 8494–8500.
15. Y. Furutani, Y. Shichida, and H. Kandori (2003) Structural changes of water molecules during the photoactivation processes in bovine rhodopsin. *Biochemistry* 42, 9619–9625.
16. T. Hirano, H. Imai and Y. Shichida (2003) Effect of anion binding on the thermal reverse reaction of bathorhodopsin: anion stabilizes two forms of rhodopsin. *Biochemistry* 42, 12700–12707.
17. T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida (2003) Two-step interaction mechanism of rhodopsin intermediates with C-terminal region of transducin α -subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 259–267.
18. Y. Kyogoku, Y. Fujiyoshi, I. Shimada, H. Nakamura, T. Tsukihara, H. Akutsu, T. Odahara, T. Okada and N. Nomura (2003) Structural genomics of membrane proteins. *Accounts. Chem. Res.* 36, 199–206.
19. M. Iwamoto, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori (2003) Proton transfer reactions in the F86D and F86E mutants of pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Biochemistry*. 42, 2790–2796
20. Y. Furutani, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori (2003) FTIR Spectroscopy of the complex between pharaonis phoborhodopsin and its transducer protein. *Biochemistry* 42, 4837–4842.
21. K. Shimono, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori (2003) Vibrational models of the protonated Schiff base in pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry* 42, 7801–7806.
22. Y. Sudo, Y. Furutani, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori (2003) Hydrogen bonding alteration of Thr-204 in the complex between pharaonis phoborhodopsin and its transducer protein. *Biochemistry* 42, 14166–14172.
23. A. Terakita, M. Koyanagi, H. Tsukamoto, T. Yamashita, T. Miyata, and Y. Shichida (2004) Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 284–289.
24. M. Koyanagi, E. Kawano, Y. Kinugawa, T. Oishi, Y. Shichida, S. Tamotsu, and A. Terakita (2004) Bistable UV pigment in the lamprey pineal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6687–6691
25. T. Yamashita, T. Kai, A. Terakita, and Y. Shichida (2004) A novel constitutively active mutation in the second cytoplasmic loop of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurochem.* 91, 484–492.
26. K. Terao, A. Mikami, Y. Saito, S. Ito, H. Ogawa, O. Takenaka, T. Sakai, A. Onishi, M. Teramoto, T. Udono, Y. Emi, H. Kobayashi, H. Imai, T. Doi, Y. Shichida and S. Koike (2004) Identification of a protanomalous chimpanzee by molecular genetic and electroretinogram analyses, *Vision Res.* 45, 1225–1235
27. T. Okada and H. Nakamichi (2004) X-ray crystallography of rhodopsin. *Phase Transitions* 77, 21–29.
28. T. Okada, M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, and V. Buss (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J. Mol. Biol.* 342, 571–583

29. T. Okada (2004) X-ray crystallographic studies for ligand-protein interaction changes in rhodopsin. *Biochem. Soc. Transact. (Germany)* 32, 738-741
30. Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, A. Wada, M. Ito, N. Kamo, and H. Kandori (2004) FTIR spectroscopy of the O photointermediate in pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry*. 43, 5204-5212.
31. Y. Furutani, A. G. Bezerra Jr., S. Waschuk, M. Sumii, L. S. Brown and H. Kandori (2004) FTIR spectroscopy of the K photointermediate of neurospora rhodopsin: structural changes of the retinal, protein, and water molecules after photoisomerization. *Biochemistry*, 43, 9636-9646.
32. T. Sugawara, Y. Terai, H. Imai, G.F. Turner, S. Koblumuller, C. Sturmabauer, Y. Shichida and N. Okada (2005) Parallelism of amino acid changes at the RH1 affecting spectral sensitivity among deep-water cichlids from Lakes Tanganyika and Malawi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5448-5453.
33. H. Tsukamoto, A. Terakita and Y. Shichida (2005) A rhodopsin exhibiting binding ability to agonist all-trans-retinal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6303-6308.
34. H. Imai, S. Kuwayama, A. Onishi, T. Morizumi, O. Chisaka and Y. Shichida (2005) Molecular properties of rod and cone visual pigments from purified chicken cone pigments to mouse rhodopsin in situ. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 667-674.
35. M. Koyanagi, K. Kubokawa, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita (2005) Cephalochordate melanopsin: Evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Curr. Biol.* 15, 1065-1069.
36. T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida (2005) Direct observation of the complex formation of GDP-bound transducin with protonated intermediate of rhodopsin in rod outer segments membranes. *Biochemistry* 44, 9936-9943.
37. H. Kassai, A. Aiba, K. Nakao, K. Nakamura, M. Katsuki, W. H. Xiong, K. W. Yau, H. Imai, Y. Shichida, Y. Satomi, T. Takao, T. Okano and Y. Fukada (2005) Farnesylation of retinal transducin underlies its translocation during light adaptation. *Neuron* 47, 529-539.
38. T. Kodama, H. Imai, T. Doi, O. Chisaka, Y. Shichida and Y. Fujiyoshi (2005) Expression and localization of an exogenous G protein-coupled receptor fused with the rhodopsin C-terminal sequence in the retinal rod cells of knockin mice. *Exp. Eye Res.* 80, 859-869.
39. A. Onishi, J. Hasegawa, H. Imai, O. Chisaka, Y. Ueda, Y. Honda, M. Tachibana and Y. Shichida (2005) Generation of knock-in mice carrying third cones with spectral sensitivity different from S and L cones. *Zool. Sci.* 22, 1145-1156.
40. Y. Ueda, N. Tammitu, H. Imai, Y. Honda and Y. Shichida (2005) Recovery of rod-mediated a-wave during light-adaptation in mGluR6-deficient mice. *Vision Res.* 46, 1655-1664.
41. Y. Furutani, A. Kawanabe, K. -H. Jung and H. Kandori (2005) FTIR spectroscopy of the all-trans form of anabaena sensory rhodopsin at 77K: hydrogen bond of a water between the Schiff base and Asp75. *Biochemistry* 44, 7988-7997.
42. M. Sumii, Y. Furutani, S. A. Waschuk, L. S. Brown and H. Kandori (2005) Strongly hydrogen-bonded water molecule present near the retinal chromophore of leptosphaeria rhodopsin, the bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Biochemistry* 44,

15159–15166.

43. Y. Furutani, A. Terakita, Y. Shichida and H. Kandori (2005) FTIR Studies of the photoactivation processes in squid retinochrome. *Biochemistry* 44, 12287–12296.
44. Y. Sudo, Y. Furutani, A. Wada, M. Ito, N. Kamo and H. Kandori (2005) Steric constraint in the primary photoproduct of an archaeal rhodopsin from regiospecific perturbation of C–D stretching vibration of the retinyl chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 16036–16037.
45. T. Hirano, N. Fujioka, H. Imai, H. Kandori, A. Wada, M. Ito and Y. Shichida (2006) Assignment of the vibrational modes of the chromophores of iodopsin and bathiodopsin: low-temperature fourier transform infrared spectroscopy of ^{13}C - and ^2H -labeled iodopsins. *Biochemistry* 45, 1285–1294.
46. C. Y. Su, D. G. Luo, A. Terakita, Y. Shichida, H. W. Liao, M. A. Kazmi, T. P. Sakmar and K. W. Yau (2006) Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* 311, 1617–1621.
47. H. Nakamichi and T. Okada (2006) Crystallographic analysis of primary visual photochemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 4270–4273
48. M. Schreiber, M. Sugihara, T. Okada and V. Buss (2006) Quantum mechanical studies on the crystallographic model of bathorhodopsin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 4274–4277
49. H. Nakamichi and T. Okada (2006) Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12729–12734
50. H. Nakamichi and T. Okada (2006) X-ray crystallographic analysis of 9-cis-rhodopsin, a model analogue visual pigment. *Photochem. Photobiol.* in press.
51. T. Ota, Y. Furutani, A. Terakita, Y. Shichida and H. Kandori (2006) Structural changes in the Schiff base region of squid rhodopsin upon photoisomerization studied by low-temperature FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 45, 2845–2851.
52. A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori (2006) FTIR study of the photoisomerization processes in the 13-cis and all-trans forms of anabaena sensory rhodopsin at 77 K. *Biochemistry* 45, 4362–4370.
53. K. Kamada, Y. Furutani, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori (2006) Temperature-dependent interactions between photoactivated pharaonis phoborhodopsin and its transducer. *Biochemistry* 45, 4859–4866.
54. V.A. Lorenz-Fonfria and H. Kandori (2006) Transformation of time-resolved spectra to lifetime-resolved spectra by maximum entropy inversion of the laplace transform. *Appl. Spectrosc.* 60, 407–417.
55. N. Muneda, M. Shibata, M. Demura and H. Kandori (2006) Internal water molecules of the proton-pumping halorhodopsin in the presence of azide. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6294–6295.
56. Y. Furutani, D. Ikeda, M. Shibata and H. Kandori (2006) Strongly hydrogen-bonded water molecule is observed only in the alkaline form of proteorhodopsin. *Chem. Phys.* 324, 705–708.
57. M. Shibata, K. Ihara and H. Kandori (2006) Hydrogen-bonding interaction of the protonated Schiff base with halides in a chloride-pumping bacteriorhodopsin mutant. *Biochemistry* 45, 10633–10640.

58. N. Mizuide, M. Shibata, N. Friedman, M. Sheves, M. Belenky, J. Herzfeld and H. Kandori (2006) Structural changes in bacteriorhodopsin following retinal photoisomerization from the 13-cis form. *Biochemistry* 45, 10674-10681.
59. K. Zikihara, T. Iwata, D. Matsuoka, H. Kandori, T. Todo and S. Tokutomi (2006) Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy. *Biochemistry* 45, 10828-10837.
60. Y. Furutani, Y. Sudo, A. Wada, M. Ito, K. Shimono, N. Kamo and H. Kandori (2006) Assignment of the Hydrogen-Out-Of-Plane and In-Plane vibrations of the retinal chromophore in the K intermediate of pharaonis phoborhodopsin. *Biochemistry* 45, 11836-11843.
61. Y. Terai, O. Seehausen, T. Sasaki, K. Takahashi, S. Mizoiri, T. Sugawara, T. Sato, M. Watanabe, N. Konijnendijk, H.D.J. Mrosso, H. Tachida, H. Imai, Y. Shichida, and N. Okada (2006) Divergent selection on opsins drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids, *PLoS Biol.*, in press.
62. H. Imai, V. Kefalov, K. Sakurai, O. Chisaka, Y. Ueda, A. Onishi, T. Morizumi, Y. Fu, K. Ichikawa, K. Nakatani, Y. Honda, J. Chen, K.-W. Yau, and Y. Shichida (2006) Molecular properties of rhodopsin and rod function, *J. Biol. Chem.*, in press.
63. M. Imafuku, I. Shimizu, H. Imai and Y. Shichida (2007) Sexual difference of color sense in a lycaenid butterfly, *Narathura japonica*, *Zool. Sci.*, in press

(2) その他の著作物（総説、書籍など）

1. 岡田哲二、寺北明久、七田芳則（2002）「ロドプシンの結晶構造からみるG蛋白質共役型受容体の構造・機能関連」 蛋白質核酸酵素 47, 1123-1130.
2. Y. Furutani and H. Kandori (2002) Internal water molecules of archaeal rhodopsins. *Mol. Membr. Biol.* 19, 257-265.
3. 神取秀樹（2002）「光駆動プロトンポンプの方向性を決める反応」 化学 57, 58-59.
4. 神取秀樹（2002）「バクテリオロドプシンのプロトンポンプ機構」 酵素工学ニュース 47, 17-22.
5. 神取秀樹、加茂直樹（2002）「フォボロドプシンの結晶構造と波長制御・光情報伝達機構」 蛋白質核酸酵素 47, 620-625.
6. T. Yamashita and Y. Shichida (2003) Diversity of visual pigment from the viewpoint of G protein activation—comparison with other G protein-coupled receptors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 1237-1246.
7. 七田芳則（2003）「受容体」 生物物理学とはなにか 日本生物物理学会編 共立出版.
8. 七田芳則、大西暁士（2003）「色覚の分子機構」 脳 21 16, 369-373.
9. T. Okada (2003) Crystallization of bovine rhodopsin, a G protein-coupled receptor. Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins. (Iwata S. eds.) International University Line pp253-262.
10. 西澤恵美子、岡田哲二（2003）「Gタンパク質共役型受容体ロドプシンの構造と機能」 遺伝子医学 7, 29-33.
11. M. Iwamoto, H. Kandori and N. Kamo (2003) Photochemical properties of pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Recent Res. Devel. Chem.* 1, 15-30.

12. 神取秀樹 (2003) 「視覚の初期過程における光化学反応」 レーザー研究 31, 184-189.
13. 神取秀樹 (2003) 「ロドプシンを究める」 日本化学会生体機能関連化学部会 News Letter 17, 10-13.
14. 寺北明久 (2004) 「ロドプシン類の分子進化と多様性」 比較生理生化学 21, 22-29.
15. 寺北明久 (2004) 「脊椎動物の視覚と視物質の分子進化」 生体の科学 55, 211-216.
16. H. Kandori (2004) Hydration switch model for the proton transfer in the Schiff base region of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 72-79.
17. Y. Sudo, H. Kandori and N. Kamo (2004) Molecular mechanism of protein-protein interaction of pharaonis phoborhodopsin/transducer and photo-signal transfer reaction by complex. *Recent Res. Devel. Biophys.* 3, 1-16.
18. 柴田幹大, 神取秀樹 (2004) 「バクテリオロドプシンにおける内部結合水の振動解析」 生物物理 44, 113-117.
19. 今井啓雄、森住威文、七田芳則 (2005) 「視細胞外節膜におけるロドプシンとG蛋白質との相互作用」 蛋白質核酸酵素 50, 1220-1225.
20. A. Terakita (2005) The opsins. *Genome Biology* 6, 213.
21. T. Okada, R. Tsujimoto M. Muraoka and C. Funamoto (2005) Methods and results in x-ray crystallography of bovine rhodopsin. In G protein-coupled receptors, Structure, Function, and Ligand Screening (Haga T and Takeda S eds.) CRC press, pp. 245-261.
22. Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori (2005) Strongly hydrogen-bonded water molecules in the Schiff base region of rhodopsins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 661-666.
23. T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori (2005) Mechanism of photoactivation in the LOV2 domain of *Adiantum* phytochrome3. *Recent Res. Devel. Biochem.* 6, 1-26.
24. 神取秀樹 (2005) 「イオンポンプの機能にかかわる蛋白質内部の水分子」 現代化学 414, 51-57.
25. 神取秀樹 (2005) 「イオンポンプ」 細胞生物学事典 pp. 36-37 (朝倉書店) .
26. 神取秀樹 (2005) 「古細菌型ロドプシンによる光エネルギー・情報変換」 光科学研究の最前線 pp. 7-8.
27. Y. Shichida and T. Morizumi (2006) Mechanism of G-protein activation by rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* in press.
28. 塚本寿夫、寺北明久、七田芳則 (2006) 「視物質の分子進化」 生体の科学 57, 500-501.
29. T. Iwata and H. Kandori (2006) Photochemistry in phototropin, a blue light sensor protein in plants. *J. Chinese Chem. Soc.* 53, 67-73.
30. D. Matsuoka, T. Iwata, K. Zikihara, H. Kandori and S. Tokutomi (2006) Primary processes during the light-signal transduction of phototropin. *Photochem. Photobiol. Sci.* in press.
31. H. Kandori (2006) Retinal binding proteins in cis-trans Isomerization in Biochemistry. Dugave, C., ed. in press, Wiley-VCH Freiburg.
32. 神取秀樹 (2006) 「分子ポンプの謎に迫る」 東海化学工業会 249, 8-12.
33. 神取秀樹 (2006) 「エントロピーを減少させる光駆動プロトンポンプのしくみ」 Bionics 21, 56-58.
34. 神取秀樹 (2006) 「光駆動ポンプ、バクテリオロドプシンの構造・機能」 生物物理学ハンドブック (石渡信一, 桂勲, 桐野豊, 美宅成樹 編) (朝倉書店) 印刷中
35. 古谷祐詞、神取秀樹 (2006) 「赤外・ラマン分光法」 生物物理学ハンドブック (石渡信一, 桂勲,

桐野豊, 美宅成樹 編) (朝倉書店) 印刷中.

36. 寺北明久、七田芳則 (2006) 「視覚の初期過程」 21 世紀の動物科学「動物感覚とリズム」 (培風館) 印刷中

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 68 件、国際会議 46 件)

1. 神取秀樹: 「一方向のプロトン輸送をもたらすバクテリオロドプシン内の疎水結合と水素結合」 科研費特定研究 A「強相関ソフトマテリアルの動的制御」公開シンポジウム 名古屋 (2002, 1st, Jan)
2. 神取秀樹: 「分子ポンプの方向性を決めるもの: 蛋白質はやわらかいかかたいか?」 生理学研究 所研究会「生体分子ダイナミクス及びプリオン機構研究会」 岡崎 (2002, 8th, Feb)
3. 神取秀樹: 「ロドプシンの光情報変換に関する最近の話題」 北陸先端科学技術大学院大学 材料科 学研究所科フォーラム「バイオセンシングの新潮流-生命機能の解析から応用まで-」 辰口 (2002, 7th, Mar)
4. 七田芳則: 「ロドプシンの G 蛋白質活性化機構: 光でインバースアゴニストをアゴニストに変換 する」 日本薬理学会第 75 回年会 熊本 (2002, 14th, Mar)
5. 神取秀樹: 「古細菌ロドプシンの光シグナル伝達機構」 東北大学 多元物質科学研究所バイオ系シ ンポジウム「シグナル伝達分子の構造と制御メカニズム」 仙台 (2002, 14th, Mar)
6. H. Kandori: “Proton-Pump Mechanism in Bacteriorhodopsin”, XIV International Biophysics Congress, Buenos Aires (Argentina) (2002, 29th, Apr)
7. 神取秀樹: 「ロドプシンにおける内部結合水の役割」 分子科学研究所研究会「水と生体分子が織 り成す生命現象の化学」 岡崎 (2002, 15th, May)
8. 神取秀樹: 「レチナールの光受容からプロトンポンプまでの動的過程」 科研費特定研究 A「生物 現象鍵物質」公開シンポジウム 大阪 (2002, 2nd, May)
9. 神取秀樹: 「生物の光センサー機能はどこまでわかったのか?」 生理学研究 所研究会「バイオ分 子センサー研究会」 岡崎 (2002, 27th, May)
10. 神取秀樹: 「ロドプシンの超高速反応」 第 5 回超高速エレクトロニクス研究会 東京 (2002, 4th, Jun)
11. A. Terakita: “Insight into diversity in rhodopsin family: Functional and mutational analyses on vertebrate and invertebrate rhodopsins” 1st Asian Conference on Photobiology, Hyogo (Japan) (2002, 27th, Jun)
12. H. Kandori: “Low-Temperature FTIR Spectroscopy of Bacteriorhodopsin and Phoborhodopsin” 1st Asian Conference on Photobiology, Hyogo (Japan) (2002, 27th, Jun)
13. 今井啓雄: 「ノックインマウスを用いて機能進化を分子レベルで検証する」 日本比較生理生化学会 第 13 回大会 茨城 (2002, 6th, Aug.)
14. A. Terakita: “Comparative study on the diversity in rhodopsin family” 10th International Conference on Retinal proteins, Seattle (U.S.A) (2002, 22nd, Aug)
15. 岡田哲二: 「G 蛋白質に共役したロドプシンの原子構造と機構」 特定領域研究 B シンポジウム 生 体膜輸送蛋白質の構造と作動機構 京都 (2002, 13th, Oct)
16. 岡田哲二、七田芳則: 「ロドプシンの X 線結晶構造解析」 J B I C 2002 シンポジウム 東京

(2002, 7th, Nov)

17. H. Kandori : “Internal Water Molecules of Rhodopsins At Work” , COE International Conference on Dynamical Structures and Molecular Design of Metalloproteins, Okazaki (Japan) (2002, 20th, Nov)
18. T. Okada, Javier Navarro, Ehud M. Landau and Y. Shichida : “X-ray Crystallographic Studies on Rhodopsin” 産総研国際シンポジウム Tokyo (Japan) (2002, 8th, Nov)
19. T. Okada : “X-ray crystallographic studies on bovine rhodopsin” シンポジウム「Structure and Dynamics of Heterogeneous Systems」 Duisburg (Germany) (2002, 28th, Nov)
20. 神取秀樹 : 「タンパク質分子ポンプのダイナミズムの現状と展望」 大阪電通大学エレクトロニクス基礎研究所第10回シンポジウム「原子分子レベルの材料創製とキャラクタリゼーション：ナノテクノロジーの現状と展望」 寝屋川 (2002, 6th, Dec)
21. 寺北明久 : 「ロドプシン類の構造、機能関連と多様性」 生物マシーナリー蛋白研合同シンポジウム「膜蛋白質、生体超分子構造研究最前線」 大阪 (2003, 8th, Jan)
22. 七田芳則 : 「光受容体の多様性と進化」 日本視覚学会 2003 年冬季大会 東京 (2003, 21st, Jan)
23. 岡田哲二 : 「ロドプシン、関連体結晶化の基礎研究」 産業技術総合研究所「生体高分子立体構造情報解析」事業 14 年度第3回委員会 東京 (2003, 5th, Mar.)
24. 七田芳則 : 「ロドプシンをモデルとした GPCR 研究」 公開シンポジウム「GPCR 研究の未来」(21 世紀 COE プログラムの援助による) 京都 (2003, 6th, Mar)
25. 岡田哲二 : 「ロドプシン結晶構造解析の現状」 公開シンポジウム「GPCR 研究の未来」(21 世紀 COE プログラムの援助による) 京都 (2003, 6th, Mar)
26. 神取秀樹 : 「ロドプシンの構造変化ダイナミクス」 公開シンポジウム「GPCR 研究の未来」(21 世紀 COE プログラムの援助による) 京都 (2003, 6th, Mar)
27. 神取秀樹 : 「フラビンを発色団とする光センサー蛋白質の構造変化ダイナミクス」 生理学研究所研究会「生体分子ダイナミクス」 岡崎 (2003, 10th, Mar)
28. 神取秀樹 : 「ロドプシンを究める」 科学技術交流財団研究会「ナノ反応場とバイオエレクトロニクスインターフェイス制御研究会」 岡崎 (2003, 11th, Mar)
29. H. Kandori : “Light-Energy and Light-Signal Conversions in Rhodopsins” Universitat Autònoma de Barcelona, Biophysics Seminar, Barcelona (Spain) (2003, 14th, May)
30. H. Kandori : “Internal Water Molecules of Rhodopsins” , International Symposium on Infrared Spectroscopy of Proteins: A Critical Evaluation of Structural and Functional Spectroscopy, Freiburg (Germany) (2003, 17th, May)
31. H. Kandori : “Proton-Pump Mechanism in Bacteriorhodopsin” , The First International Congress on Bio-Nanointerface, Tokyo (Japan) (2003, 22nd, May)
32. 森住威文、今井啓雄、七田芳則 : 「ロドプシン、G 蛋白質間相互作用の分光学的解析」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの分子科学」 岡崎 (2003, 30th, May)
33. 古谷祐詞、七田芳則、神取秀樹 : 「FTIR 分光法によるロドプシン活性化機構の解明」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの分子科学」 岡崎 (2003, 30th, May)
34. 岡田哲二 : 「ロドプシンの高分解能構造解析」 第3回日本蛋白質科学会年会ワークショップ 横浜 (2003, 23rd, Jun)
35. H. Kandori : “Protein-Protein Interactions in Biological Light Signal Transduction”

Symposium on Molecular Structural Basis in Creation and Transfer of Information, Tokyo (Japan) (2003, 25th, Jun)

36. H. Kandori: "Low-Temperature FTIR Spectroscopy of Rhodopsins", XXIst International Conference on Photochemistry, Nara (Japan) (2003, 28th, Jul)
37. 神取秀樹: 「一方向のプロトン輸送をもたらすバクテリオロドプシン内の疎水結合と水素結合」 科研費特定研究A「強相関ソフトマテリアルの動的制御」公開シンポジウム 京都 (2003, 29th, Jul)
38. 寺北明久: 「蛋白質からみたロドプシン類、光シグナル伝達系の多様性」日本進化学会福岡大会福岡 (2003, 2nd, Aug)
39. 岡田哲二: 「視覚をモデルとしたG蛋白質共役系の構造、機能解析」「生体高分子立体構造情報解析」事業 15年度第1回委員会 東京 (2003, 19th, Aug)
40. 神取秀樹: 「精密分光実験で観るロドプシン光受容蛋白質機能のメカニズム」第41回日本生物物理学会年会シンポジウム 新潟 (2003, 23rd, Sep)
41. 神取秀樹: "Does bacteriorhodopsin pump a proton, or a hydroxide ion?" 第76回日本生化学会大会シンポジウム 横浜 (2003, 16th, Oct)
42. 七田芳則: "Structure of rhodopsin and its functional diversity" 第76回日本生化学会大会シンポジウム 横浜 (2003, 17th, Oct)
43. 岡田哲二: "Ligand-Protein Interaction in Rhodopsin Revealed by High-Resolution X-ray Crystallography" 第76回日本生化学会大会シンポジウム 横浜 (2003, 18th, Oct)
44. 岡田哲二: 「視覚初期過程における光異性化反応のX線結晶構造解析」生物情報解析研究センター、シンポジウム 東京 (2003, 23rd, Oct)
45. 神取秀樹: "FTIR Studies of the Receptor-Transducer Complex in Archaeal Light-Signal Transduction" 北海道大学21世紀COEシンポジウム「膜タンパク質複合体による機能発現: フアラオニスフォボロドプシンによる光受容を例として」札幌 (2003, 17th, Nov)
46. 七田芳則: 「色識別と視物質の色」平成15年度科学研究費補助金研究成果公開発表 (B) 補助事業 公開シンポジウム「物理学が拓くバイオナノサイエンスの新展開」大阪 (2003, 29th, Nov)
47. Y. Shichida: "Functional Diversity of Rhodopsins" 国際シンポジウム「Molecular Bases of Organismal Diversity and Evolution」Kyoto (Japan) (2004, 27th, Feb)
48. 七田芳則、寺北明久: 「ロドプシンの機能多様性」大阪大学蛋白質研究所セミナー「感覚機能を司る蛋白質とその調節メカニズム」吹田 (2004, 9th, Mar)
49. A. Terakita: "Comparative investigation of G protein activation mechanisms between rhodopsin and mGluR" The 1st Pacific-Rim Intl. Conf. on Protein Sci., Yokohama (Japan) (2004, 15th, Apr)
50. T. Okada: "Ligand-Protein Interaction Changes in Rhodopsin Reveal by X-Ray Crystallography" The 1st Pacific-Rim Intl. Conf. on Protein Sci., Yokohama (Japan) (2004, 15th, Apr)
51. A. Terakita: "Counterion displacement during the molecular evolution and bistable pigment in the vertebrate rhodopsin family" 14th International Congress on Photobiology, Cheju (Korea) (2004, 11th, Jun)
52. H. Imai: "Correlation between the Intermediate States of Visual Pigments and Response of

- Photoreceptor Cells Revealed by Rhodopsin Mutant Knock-in Mouse” , 14th International Congress on Photobiology, Cheju (Korea) (2004, 11th, Jun)
53. H. Kandori : “Internal Water Molecules of Bacteriorhodopsin” , 14th International Congress on Photobiology, Cheju (Korea) (2004, 11th, Jun)
 54. Y. Shichida : “Functional Diversity of Rhodopsins” , 11th International Conference on Retinal Proteins, Frauenchiemsee (Germany) (2004, 22nd, Jun)
 55. H. Kandori : “Proton Transfer Reactions in Rhodopsins Studied by Low-Temperature FTIR Spectroscopy” , 11th International Conference on Retinal Proteins, Frauenchiemsee (Germany) (2004, 22nd, Jun)
 56. 寺北明久 : 「Bleaching pigment と Bistable pigment」 第 7 回光生物シンポジウム 浜松 (2004, 17th, Jul)
 57. 小柳光正、寺北明久、七田芳則、窪川かおる : 「無脊椎動物と脊椎動物をつなぐ光シグナル伝達系」 第 7 回光生物シンポジウム 浜松 (2004, 17th, Jul)
 58. 塚本寿夫 : 「無脊椎動物型視物質における発色団レチナールとアミノ酸残基の相互作用」 第 7 回光生物シンポジウム 浜松 (2004, 17th, Jul)
 59. 七田芳則 : 「赤感受性錐体視物質について」 第 7 回光生物シンポジウム 浜松 (2004, 17th, Jul)
 60. T. Okada : “X-ray crystallographic studies on ligand-protein interaction changes in rhodopsin” BioScience2004, Glasgow (U.K.) (2004, 19th, Jul)
 61. H. Kandori : “Role of Internal Water Molecules in the Proton Conduction of Bacteriorhodopsin” , 13th European Bioenergetics Conference (PlenarySession), Pisa (Italy) (2004, 25th, Aug)
 62. 寺北明久 : 「脊椎動物の視覚と視物質の分子進化」 日本動物学会第 75 回大会シンポジウム 神戸 (2004, 10th, Sep)
 63. 神取秀樹「ロドプシン内で光はどのように機能へと変換されるのか？」理論化学シンポジウム 近江舞子 (2004, 12th, Sep)
 64. H. Kandori : “Low-Temperature FTIR Studies of Rhodopsins” , International Symposium on Retinal Proteins, Heidelberg (Germany) (2004, 21st, Sep)
 65. 神取秀樹 : 「生物における光情報変換の分子科学」 分子科学研究所研究会「生体金属分子科学の展望」 名古屋 (2004, 2nd, Oct)
 66. 岡田哲二 : 「2つの中間体解析によるロドプシンの構造変化」 JBIC]2004 シンポジウム 東京 (2004, 4th, Oct)
 67. T. Okada, M. Sugihara, A.-N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss : ” Modeling of the rhodopsin chromophore with QM/MM based on a new 2.2 Å crystal structure” International Symposium on retinal proteins: experiments and theory. Heidelberg (Germany) (2004, 19th, Oct)
 68. 神取秀樹 : 「PYP と LOV ドメイン」 「自然が創ったナノ実験室 : イエロープロテインの科学」 研究会 名古屋 (2004, 28th, Oct)
 69. 神取秀樹 : 「ロドプシンを究める」 名古屋大学 21 世紀 COE プログラム「物質科学の拠点形成 : 分子機能の解明と創造」 第 1 回物理化学若手研究会「若手が見習うべき教育、研究者達」 名古屋 (2004, 2nd, Nov)
 70. 岡田哲二 : 「ロドプシンのリガンドー蛋白質相互作用変化」 東京大学薬学系研究科 COE「戦略的基

礎創薬科学」第2回国際シンポジウム 東京 (2004, 10th, Nov)

71. H. Kandori: “Mechanism of Biological light-signal Conversion”, The 3rd Indonesian Biotechnology Conference 2004/An International Conference and Exhibition “Recent Advances in Biotechnology for Human Health and Food Sustainability”, Bali (Indonesia) (2004, 2nd, Dec)
72. 神取秀樹: 「光受容蛋白質研究の現状と展望」 日本機械学会バイオエンジニアリング部門「生体機能の解明とその応用に関する研究会」 名古屋 (2004, 10th, Dec)
73. 七田芳則、寺北明久、今井啓雄、山下高廣、塚本寿夫、岡田哲二、神取秀樹、古谷祐嗣: 「ロドプシンをモデルとしたG蛋白質共役型受容体の構造、機能解析」 2004年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム 東京 (2004, 22nd, Dec)
74. 岡田哲二: 「ロドプシンたんぱく質－発色団相互作用の実験、理論研究」 生体高分子立体構造情報解析事業 16年度第2回委員会 東京 (2004, 23rd, Dec)
75. H. Kandori: “Photochemistry of Blue-Light Sensor Proteins in Plants: Biological Signal Transduction Initiated by A Non-Isomerizable Chromophore”, 4th Asian Photochemistry Conference, Taipei (Taiwan) (2005, 6th, Jan)
76. H. Kandori: “Vectorial Transport Mechanism of Protons and Chloride Ions in Archaeal Rhodopsins”, The 1st International Symposium on “Molecule-Based Information Transmission and Reception: Application of membrane protein biofunction”, Okazaki (Japan) (2005, 4th, Mar)
77. H. Kandori: “Internal Water Molecules of Light-Driven Ion Pump Proteins in Action”, 2nd International Workshop on “Water and Biomolecules”, Tokyo (Japan) (2005, 18th, Mar)
78. 寺北明久: 「ナメクジウオメラノプシン: 無脊椎動物感桿型視細胞と脊椎動物光感受性網膜神経節細胞の進化的関連」 第8回光生物シンポジウム 隠岐 (2005, 28th, Apr)
79. 今井啓雄、大西暁士、桜井啓輔、七田芳則: 「視物質ノックインマウスの生理応答」 第82回日本生理学会大会 仙台 (2005, 19th, May)
80. 今井啓雄: 「ノックインマウスを用いた光情報伝達の解析」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」 岡崎 (2005, 15th, Jun)
81. 古谷祐嗣、寺北明久、七田芳則、神取秀樹: 「赤外分光法による視物質ロドプシンの情報伝達過程におけるタンパク質の構造変化解析」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」 岡崎 (2005, 15th, Jun)
82. 寺北明久: 「ロドプシンファミリーの多様性: アゴニストとして全トランス型レチナールの結合能を持つロドプシン類」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」 岡崎 (2005, 16th, Jun)
83. 神取秀樹: 「古細菌ロドプシンの赤外分光」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」 岡崎 (2005, 17th, Jun)
84. 須藤雄気: 「膜蛋白質複合体の分子間認識機構: 古細菌型ロドプシンと情報 伝達蛋白質との相互作用」 分子科学研究所研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」 岡崎 (2005, 17th, Jun)
85. 七田芳則: 「視覚系における光情報変換の分子機構」 第7回分子ダイナミック分光ワークショップ 浜松 (2005, 8th, Jul)
86. H. Kandori: “Rhodopsin Chromophore in Proteins and Clay Interlayers: Mechanism of Color Tuning and Photoisomerization”, 13th International Clay Conference, Tokyo (Japan)

(2005, 23rd, Aug)

87. 寺北明久：「オプシンと光受容細胞の進化、多様性」第7回日本進化学会仙台大会 仙台 (2005, 28th, Aug)
88. 神取秀樹：「レチナールの色と反応を制御するロドプシンという蛋白質場の不思議」研究会「分子系の構造と電子状態」 播磨 (2005, 8th, Sep)
89. 古谷祐詞、柴田幹大、神取秀樹：「赤外分光法による古細菌型ロドプシンの水素結合ネットワーク解析」第43回日本生物物理学会年会シンポジウム 札幌 (2005, 23rd, Nov)
90. 岩田達也、徳富哲、神取秀樹：「植物の青色光タンパク質フォトリポピンのPASドメインの情報伝達機構」第43回日本生物物理学会年会シンポジウム 札幌 (2005, 24th, Nov)
91. H. Kandori： “Photoisomerization in Rhodopsins” Pacificchem2005, Honolulu (USA) (2005, 18th, Dec)
92. Y. Shichida： “Chromophore-opsin interaction responsible for high photosensitivity of rhodopsin” Pacificchem2005, Honolulu (USA) (2005, 19th, Dec)
93. H. Kandori： “Mechanism of Light-Driven Ion Pumps” , Sanken International Symposium 2006 on “Advanced Science and Technology for Materials, Biology, and Information by Quantum Beams” Osaka (Japan) (2006, 8th, Feb)
94. 神取秀樹：「光を情報とエネルギーに振り分ける古細菌型ロドプシンのメカニズム」第47回日本植物生理学会シンポジウム筑波 (2006, 19th, Mar)
95. 神取秀樹：「光駆動イオンポンプにおける水分子の役割」日本蛋白質科学会シンポジウム 京都 (2006, 24th, Apr)
96. H. Kandori： “FTIR Study of Archaeal Rhodopsins” , Gordon Research Conference on “Photosensory Receptors & Signal Transduction”, Il Ciocco (Italy) (2006, 3rd, May)
97. A. Terakita： “Characterization of melanopsin: Insight into evolutionary linkage between vertebrate circadian and invertebrate visual pigments” 10th Meeting Society for Research on Biological Rhythms, Florida (USA) (2006, 25th, May)
98. A. Terakita： “Expression and characterization of diverged bistable pigments in rhodopsin family” , 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 6th, Jun)
99. H. Kandori： “Structure-Function Relationship in Archaeal Rhodopsins from Archaea, Eubacteria and Eucaryotes” , 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 6th, Jun)
100. T. Okada： “X-ray crystallography of tetragonal crystal of bovine rhodopsin” 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 8th, Jun)
101. Y. Shichida： “Multi-step activation mechanism of G-protein by rhodopsin” 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 8th, Jun)
102. Y. Furutani： “Hydrogen-bonding network around the Schiff base region of rhodopsins revealed by low-temperature FTIR spectroscopy” 12th ICRP Satellite Meeting in Nagoya, Nagoya (Japan) (2006, 12th, Jun)
103. H. Kandori： “FTIR Studies of Light Sensor Proteins in Action” , International Symposium on Biochemistry and Molecular Biology of Sensor Enzymes and Proteins, Sendai (Japan) (2006, 16th, Jun)

104. 神取秀樹：「生物の中で光はどのようにエネルギーや情報へと変換されるのか？」名古屋工業大学医学工学先導研究講演会 名古屋（2006, 23rd, Jun）
105. 七田芳則：「ロドプシンの機能発現における分子ダイナミクス」第33回生体分子科学討論会 名古屋（2006, 15th, Jul）
106. T. Iwata, H. Kandori： “Photochemistry in a blue light sensor protein in plants” , 16th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers & IUPAC 2nd International Symposium on Novel Materials and Synthesis, Lanzhou (China) (2006, 26th, Jul)
107. Y. Shichida： “Evolution of Cone Visual Pigments and Their Diversity” The 4th Asian Conference on Vision, Matsue (Japan) (2006, 31st, Jul)
108. H. Kandori： “Vibrational analysis of internal water molecules of archaeal rhodopsins” , International Workshop on “Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy” Kobe (Japan) (2006, 19th, Aug)
109. Y. Shichida： “Difference in molecular properties between rod and cone visual pigments” European Conference on Visual Perception, St. Petersburg (Russia) (2006, 23rd, Aug)
110. 七田芳則：「多様なロドプシン構造から推定される高等真核生物のロドプシンの進化」日本進化学会第8回大会 東京（2006, 30th, Aug）
111. 山下高廣：「代謝型グルタミン酸受容体の活性化における細胞質ドメインの構造変化～ロドプシンとの類似点、相違点～」第9回光生物シンポジウム奈良（2006, 8th, Oct）
112. T. Yamashita, A. Terakita and Y. Shichida： “Comparative analysis of the movement of the cytoplasmic domains between rhodopsin and metabotropic glutamate receptor”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 13th, Nov)
113. Y. Shichida： “Functional Diversity of Rhodopsins”, The 3rd Asian and Oceanian Conference on Photobiology, Beijing (China) (2006, 18th, Nov)
114. 七田芳則：「視覚と嗅覚：信号情報処理に関わる分子特性と応答ダイナミクス」第84回日本生理学会大会 大阪（2007, 20th, Mar）

② 口頭発表（国内会議 46 件、国際会議 11 件）

1. 塚本寿夫、寺北明久、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「新規ナメクジウオオプシンの性質、機能の解析」日本動物学会近畿支部研究発表会 京都（2002, 18th, May）
2. J. Sasaki, R. Komaya, M. Kannaka, F. Tokunaga and H. Kandori： “FTIR Spectroscopy of the Two-Photon Product of Sensory Rhodopsin I” 1st Asian Conference on Photobiology, Hyogo (Japan) (2002, 27th, Jun)
3. 古谷祐詞、神取秀樹、七田芳則：「低温赤外分光法を用いた視物質ロドプシンの構造変化過程の解析」第29回生体分子科学討論会 愛知（2002, 12th, Jul）
4. 寺北明久、塚本寿夫、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「光産物が長波長シフトする新規ナメクジウオロドプシンの発現とその性質」日本比較生理生化学会第13回大会 茨城（2002, 5th, Aug）
5. 小柳光正、寺北明久、七田芳則：「ヤツメウナギ松果体のUVレセプターの同定と機能解析」日本比較生理生化学会第13回大会 茨城（2002, 5th, Aug）
6. A. Onishi, K. Terao, O. Takenaka, A. Mikami, S. Gotoh, H. Imai, Y. Shichida and S. Koike:

“Polymorphic variations in long- and middle-wavelength-sensitive opsin gene loci in crab-eating monkey” The 12th Keio University International Symposium for Life Science and Medicine, The Neural Bases of Early Vision, Tokyo (Japan) (2002, 1st, Sep)

7. 今井啓雄、桑山成樹、森住威文、七田芳則：「マウス視細胞外節膜中におけるロドプシンの光退色過程と再生反応」日本生物物理学会第40回年会 名古屋 (2002, 2nd, Nov)
8. 森住威文、今井啓雄、七田芳則：「ロドプシン中間体と Gt の二段階相互作用の分光学的解析」日本生物物理学会第40回年会 名古屋 (2002, 2nd, Nov)
9. 桑山成樹、今井啓雄、七田芳則：「視細胞の光回復過程に関与する桿体および錐体視物質の性質の違い」日本生物物理学会第40回年会 名古屋 (2002, 2nd, Nov)
10. 甲斐敏裕、山下高廣、寺北明久、七田芳則：「キメラ変異体を用いたロドプシンと代謝型グルタミン酸受容体とにおける G 蛋白質活性化機構の比較解析」日本生物物理学会第40回年会 名古屋 (2002, 2nd, Nov)
11. 古谷祐詞、七田芳則、神取秀樹：「視物質ロドプシンの活性化過程における水分子の水素結合変化」日本生物物理学会第40回年会 名古屋 (2002, 2nd, Nov)
12. 古谷祐詞、須藤雄気、加茂直樹、神取秀樹：「フォボロドプシンと伝達蛋白質が形成する複合体の赤外分光」第40回日本生物物理学会 名古屋 (2002, 4th, Nov)
13. Y. Furutani, Y. Shichida and H. Kanndori: Hydrogen bonding strength changes of internal water molecules in bovine rhodopsin. The 2002 COE Conference of IMS “Dynamical Structures and Molecular Design of Metalloproteins. Aichi (Japan) (2002, 18th~21st, Nov)
14. T. Yamashita, T. Kai, A. Terakita and Y. Shichida: ” Comparative analysis of G protein activation mechanism between rhodopsin and metabotropic glutamate receptor” 第4回受容体、シグナリング、薬物作用国際シンポジウム Fukui (Japan) (2003, 23rd, May)
15. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、七田芳則、千坂修：「マウスの桿体視物質ロドプシンを緑錐体視物質へ置換する試み」日本動物学会近畿支部研究発表会 大阪 (2003, 31st, May)
16. 古谷祐詞、江寄壮哉、池浦夕香子、岩本真幸、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「光センサータンパク質フォボロドプシンにおける水素結合ネットワークを介した活性化状態の制御」第30回生体分子科学討論会 京都 (2003, 29th, Jun)
17. 桑山成樹、今井啓雄、平野貴弘、寺北明久、七田芳則：「アミノ酸変異による視物質の機能変化」日本光生物学協会講演会 奈良 (2003, 4th, Jul)
18. 寺北明久、塚本寿夫、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「GPCR 研究のためのナメクジウオロドプシン発現蛋白質の解析」日本光生物学協会講演会 奈良 (2003, 4th, Jul)
19. 寺北明久、小柳光正、七田芳則、川野絵美、衣川嘉、大石正、保智己：「ヤツメウナギ松果体で機能する UV 感受性光受容蛋白質」比較生理生化学会第25回大会 仙台 (2003, 18th, Jul)
20. 大西暁士、今井啓雄、千坂修、植田良樹、本田孔士、七田芳則：「3 色性ノックインマウスの作製と解析」 「視覚科学フォーラム」第7回研究会 大阪 (2003, 29th, Jul)
21. 今井啓雄、大西暁士、七田芳則、千坂修、本田孔士、植田良樹、Vladimir Kefalov、Yingbin Fu、King-Wai Yau：「ロドプシンノックインマウスを用いた視細胞応答特性と視物質機能の解析」 「視覚科学フォーラム」第7回研究会 大阪 (2003, 29th, Jul)
22. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、七田芳則：「緑錐体視物質を発現する桿体をもつマウスモデルの作製」日本動物学会第74回大会 函館 (2003, 18th, Sep)

23. 寺北明久、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「ロドプシン類の多様化における対イオンの変位」日本動物学会第74回大会 函館（2003, 18th, Sep）
24. 小柳光正、小柳光正、寺北明久、七田芳則、川野絵美、衣川嘉、大石正、保智己：「ヤツメウナギ松果体のUVレセプターの機能解析」日本動物学会第74回大会 函館（2003, 18th, Sep）
25. 山下高廣、甲斐敏裕、寺北明久、七田芳則：「代謝型グルタミン酸受容体のG蛋白質相互作用部位におけるアラニン置換変異体の解析」日本動物学会第74回大会 函館（2003, 18th, Sep）
26. 今井啓雄、森住威文、大西暁士、七田芳則、千坂修、本田孔士、植田良樹、Vladimir Kefalov、Yingbin Fu、King-Wai Yau：「ロドプシンノックインマウスを用いた視細胞応答と光受容蛋白質反応過程の関係の速度論的解明」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
27. 岩本真幸、古谷祐詞、加茂直樹、神取秀樹：「光受容蛋白質ファラオニスフォボロドプシンF86D、E変異体の分子内プロトン移動解析」日本生物物理学会第41回年会 新潟（2003, 24th, Sep）
28. S. Kuwayama, H. Imai, T. Morizumi and Y. Shichida：” The conversion of molecular properties of rod and cone visual pigments by the replacement of amino acid residues” 4th International Symposium on Photobiophysics. Nara (Japan) (2004, 25th, Mar)
29. 古谷祐詞、Arandi G. Bezerra Jr, Stephen Waschuk、住井昌代、Leonid S. Brown、神取秀樹：「真核生物で発見された古細菌型ロドプシンの赤外分光測定」第31回生体分子科学討論会 茨城（2004, 2nd, Jul）
30. 小柳光正、寺北明久、七田芳則、窪川かおる：「ナメクジウオで機能する光受容蛋白質とその光情報伝達系」日本比較生理生化学会第26回大会 神戸（2004, 29th, Jul）
31. 寺北明久、塚本寿夫、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「ロドプシンファミリーの分子進化における対イオンの変位と性質、機能の多様化」日本比較生理生化学会第26回大会 神戸（2004, 30th, Jul）
32. 丹光範智、植田良樹、今井啓雄、中西重忠、七田芳則：「mGluR6 ノックアウトマウスのERG a波を用いた生体内における視細胞応答の解析」第8回視覚科学フォーラム 米子（2004, 30th, Jul）
33. 大西暁士、長谷川淳、丹光範智、今井啓雄、千坂修、植田良樹、本田孔士、立花政夫、七田芳則：「3色性ノックインマウスの生理応答」第8回視覚科学フォーラム 米子（2004, 30th, Jul）
34. 古谷祐詞、神取秀樹：「赤外分光法によるフォボロドプシンと情報伝達タンパク質との相互作用および構造変化の解析」分子研研究会 岡崎（2004, 20th, Dec）
35. 古谷祐詞、鎌田健太郎、須藤雄気、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの情報伝達過程における水素結合強度変化の解析」第1回日本生物物理学会中部支部討論会 名古屋（2005, 29th, Mar）
36. 寺北明久、小柳光正、窪川かおる、塚本寿夫、七田芳則：「ナメクジウオメラノプシン：無脊椎動物感桿型光受容細胞と脊椎動物の網膜光感受性神経節細胞の進化的関連」日本動物学会近畿支部研究発表会 豊中（2005, 28th, May）
37. 川鍋陽、古谷祐詞、K.-H. Jung、神取秀樹：「低温赤外分光法による Anabaena Sensory Rhodopsin のシッフ塩基近傍の構造解析」第32回生体分子科学討論会 神戸（2005, 25th, Jun）
38. 森住威文、今井啓雄、七田芳則：「CCD 分光光度計による光レセプターと GDP 結合型 G 蛋白質との相互作用観測」第7回分子ダイナミック分光ワークショップ 浜松（2005, 8th, Jul）
39. 須藤雄気、古谷祐詞、鎌田健太郎、児嶋長次郎、加茂直樹、神取秀樹：「フォボロドプシンから共役蛋白質への光情報伝達過程における結合親和性低下の要因」第12回日本光生物学協会年会 京

都 (2005, 5th, Aug)

40. 平野貴弘、今井啓雄、七田芳則、藤岡直子、和田昭盛、伊藤允好、神取秀樹：「アイオドプシン、バソアイオドプシンの発色団振動モードの帰属」第12回日本光生物学協会年会 京都 (2005, 6th, Aug)
41. 森住威文、今井啓雄、七田芳則：「赤色感受性視物質アイオドプシンに結合するアニオン、水分子の物性と機能の解明」特定領域研究「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」2005年度合同班会議 長野 (2005, 9th, Aug)
42. 寺北明久、塚本寿夫、七田芳則：「アゴニスト全トランス型レチナールを結合するナメクジウオロドプシン」日本比較生理生化学会第27回大会 東京 (2005, 6th, Aug)
43. 古谷祐詞、須藤雄気、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの情報伝達過程での構造変化および相互作用変化の解析」分子構造総合討論会 東京 (2005, 30th, Sep)
44. 大森昌浩、中谷敬：「ウシガエル味細胞の形態的特徴および味物質に対する応答の解析」日本動物学会関東支部第58回大会 東京 (2006, 19th, Mar)
45. 川鍋陽、古谷祐詞、K.-H. Jung、神取秀樹：「光反応サイクルでなくフォトクロミズムを示す古細菌型ロドプシン *Anabaena* sensory rhodopsin のフォトサイクル研究」日本生物物理学会中部支部討論会 名古屋 (2006, 24th, Mar)
46. 塚本寿夫、寺北明久、七田芳則：「ロドプシン類の性質多様性：脊椎動物ロドプシンとナメクジウオロドプシンの比較解析」2006年度日本動物学会近畿支部発表会 奈良 (2006, 20th, May)
47. T. Horie, T. Kusakabe, A. Terakita, Y. Shichida, H. Otsuki and M. Tsuda: "Origin of vertebrate retina I: Three distinct photoreceptor cells characterized with opsin antibody in the ascidian larva" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 6th, Jun)
48. Y. Furutani, K. Kamada, Y. Sudo, N. Kamo H. and Kandori: "Temperature Dependent Interactions between M Intermediate of pharaonis Phoborhodopsin and its Cognate Transducer Detected by FT-IR Spectroscopy" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 6th, Jun)
49. T. Yamashita, A. Terakita and Y. Shichida: "Key Amino Acid Residues on the Cytoplasmic Surface Responsible for G Protein Activation of Metabotropic Glutamate Receptor" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 8th, Jun)
50. A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung, H. Kandori: "FTIR Study of the Photoisomerization Processes in the 13-cis and all-trans forms of *Anabaena* sensory rhodopsin at 77K" 12th ICRP Satellite Meeting in Nagoya "Structure, Function & Evolution of Rhodopsins: Mechanisms of Proton Transfer and Color Tuning" Nagoya (Japan) (2006, 12th, Jun)
51. Y. Sudo, H. Kandori and John. L. Spudich: "Functional Importance of a Hydrogen Bond between Thr204 and Tyr174 of Sensory Rhodopsin II and its Alteration during the Functional Signaling Process" 12th ICRP Satellite Meeting in Nagoya "Structure, Function & Evolution of Rhodopsins: Mechanisms of Proton Transfer and Color Tuning", Nagoya (Japan) (2006, 12th, Jun)
52. A. Kawanabe, Y. Furutani, K. H. Jung and H. Kandori: "FTIR Study of the Photoisomerization Processes in the 13-cis and all-trans forms of *Anabaena* sensory rhodopsin at 77K" 12th ICRP

Satellite Meeting in Nagoya "Structure, Function & Evolution of Rhodopsins: Mechanisms of Proton Transfer and Color Tuning", Nagoya (Japan) (2006, 12th, Jun)

53. 寺北明久、小柳光正、七田芳則：「脊椎動物の視覚以外の光受容に関わるパラピノプシンの機能多様性」日本比較生理生化学会第28回大会 浜松 (2006, 29th, Jul)
54. 古谷祐詞、住井昌代、L. S. Brown、S. A. Waschuck、Arandi G. Bezzera Jr.、神取秀樹：「真核生物由来の古細菌型ロドプシンにおけるプロトンポンプ活性と内部結合水の水素結合強度との相関について」分子構造総合討論会 2006 静岡 静岡 (2006, 21st, Sep)
55. 寺北明久、小柳光正、塚本寿夫、七田芳則：「光受容蛋白質メラノプシンの培養細胞系での発現と無脊椎動物視物質との性質の比較解析」日本動物学会第77回大会 松江 (2006, 22nd, Sep)
56. 小柳光正、寺北明久、塚本寿夫、七田芳則：「下等脊椎動物の眼外光受容蛋白質パラピノプシンの機能多様性」日本動物学会第77回大会 松江 (2006, 22nd, Sep)
57. 増富康亮, Y. Koutalos, 中谷敬：「カエル桿体細胞における All-trans レチナールの光酸化作用」日本動物学会第77回大会 松江 (2006, 22nd, Sep)

③ ポスター発表 (国内会議 57 件、国際会議 41 件)

1. J. Sasaki, M. Kannaka, F. Tokunaga and H. Kandori: "Structure of the Near-UV Signaling State of Sensory Rhodopsin I From *Halobacterium salinarum* as Detected by FT-IR Spectroscopy" Gordon Research Conference on Photosensory Receptors & Signal Transduction, Ciocco (Italy) (2002, 20th, May)
2. M. Iwamoto, Y. Furutani, Y. Sudo, K. Shimono, H. Kandori and N. Kamo: "Role of Asp193 in Chromophore-Protein Interaction of pharaonis Phoborhodopsin" 1st Asian Conference on Photobiology, Hyogo (Japan) (2002, 27th, Jun)
3. 桑山成樹、今井啓雄、七田芳則：「錐体と桿体の視物質の性質の違いを司るアミノ酸残基の進化的意義」日本進化学会第4回大会 東京 (2002, 2nd, Aug)
4. 寺北明久、塚本寿夫、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「対イオンから見たロドプシンの分子進化」日本進化学会第4回大会 東京 (2002, 3rd, Aug)
5. T. Hirano, I T. Lim, D M. Kim, Z X-Guo, K. Yoshihara, R. Tanaka, H. Imai and Y. Shichida: "Photochemical and structural properties of the ring fused isorhodopsin analogs" 10th International Conference on Retinal Proteins, Seattle (U.S.A) (2002, 22nd, Aug)
6. Y. Yamazaki, T. Nagata, A. Terakita, H. Kandori and Y. Shichida: "Rhodopsin structural changes in early and late states of photolysis detected by vibrational changes of cysteine" 10th International Conference on Retinal proteins, Seattle (U.S.A) (2002, 22nd, Aug)
7. Y. Furutani, H. Kandori and Y. Shichida: "Structural changes in lumirhodopsin and metarhodopsin I studied by their photoreactions at 78K" 10th International Conference on Retinal proteins, Seattle (U.S.A) (2002, 22nd, Aug)
8. S. Kuwayama, H. Imai, T. Hirano, A. Terakita and Y. Shichida: "The difference in molecular properties between rod and cone visual pigments" 10th International Conference on Retinal proteins, Seattle (U.S.A) (2002, 22nd, Aug)
9. 寺北明久、塚本寿夫、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「変異蛋白質を用いた様々なロドプシン類における対イオンの比較解析」日本動物学会第73回大会 石川 (2002, 27th, Sep)

10. 塚本寿夫、寺北明久、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「新規ナメクジウオロドプシンの発現蛋白質の解析」日本動物学会第73回大会 石川（2002, 27th, Sep）
11. 山下高廣、寺北明久、七田芳則：” The Second Cytoplasmic Loop of Metabotropic Glutamate Receptor Functions at the Third Loop Position of Rhodopsin” 日本生化学会第75回大会 京都（2002, 15th, Oct）
12. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、七田芳則、千坂修：「ロドプシンの遺伝子座に緑錐体オプシン遺伝子をノックインしたマウス作製の試み」日本分子生物学会第25回年会 横浜（2002, 11th, Dec）
13. 今井啓雄、大西暁士、七田芳則、千坂修、本田孔士、植田良樹：「変異ロドプシンをノックインしたマウスモデルの作製」日本分子生物学会第25回年会 横浜（2002, 11th, Dec）
14. T. Morizumi, H. Imai and Y. Shichida: “Two-step interaction mechanism of rhodopsin intermediate with C-terminal region of transducin alpha-subunit” 2003 FASEB Summer Research Conferences “The Biology and Chemistry of Vision” Tucson (U. S. A) (2003, 23rd, Jun)
15. 山下高廣、甲斐敏裕、寺北明久、七田芳則：「システイン導入変異体を用いた、代謝型グルタミン酸受容体における構造変化解析の試み」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
16. 森住威文、今井啓雄、七田芳則：「ロドプシンと GDP 結合型トランスデューシンとの相互作用」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
17. 桑山成樹、今井啓雄、森住威文、七田芳則：「錐体と桿体の視物質における中間体の崩壊速度、オプシンの生成速度、及び再生速度の比較解析」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
18. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、七田芳則：「桿体視細胞のロドプシンを緑錐体視物質に置換したマウスモデルの構築」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
19. 塚本寿夫、寺北明久、小柳光正、宮田隆、七田芳則：「ロドプシンにおいてアゴニストである全トランス型レチナールと相互作用するアミノ酸残基の解析」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
20. 甲斐敏裕、山下高廣、寺北明久、七田芳則：「代謝型グルタミン酸受容体の細胞質領域におけるアラニン置換変異体の解析」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
21. 丹光範智、植田良樹、今井啓雄、七田芳則：「視物質機能の解析に向けた mGluR6 ノックアウトマウスの ERG a 波の解析」日本生物物理学会第41回大会 新潟（2003, 23rd, Sep）
22. 須藤雄気、古谷祐詞、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「光受容、変換蛋白質複合体の光情報伝達機構：複合体形成体により影響を受ける振動バンドの帰属」日本生物物理学会第41回年会 新潟（2003, 24th, Sep）
23. 下野和実、古谷祐詞、加茂直樹、神取秀樹：「ファラオニスフォボロドプシンにおけるシッフ塩基の振動モードの解析」日本生物物理学会第41回年会 新潟（2003, 24th, Sep）
24. 古谷祐詞、岩本真幸、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「赤外分光法によるファラオニスフォボロドプシンの反応サイクルにおける構造変化の解析」日本生物物理学会第41回年会 新潟（2003, 24th, Sep）
25. J. J. Robert, B. R. Sutton, J. Navarro, V. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, D. Raman, T. Okada: ” High-resolution crystal structure of cone arrestin from salamander” Biophysical Society 48th Annual Meeting, Baltimore (U. S. A) (2004, 17th, Feb)
26. S. Kuwayama, H. Imai, T. Morizumi and Y. Shichida: ” The Conversion of Molecular Properties

- of Rod and Cone Visual Pigments by the Replacement of Amino Acid Residues” 14th International Congress on Photobiology, Cheju (Korea) (2004, 11th, Jun)
27. M. Koyanagi, A. Terakita, Y. Shichida, E. Kawano, Y. Kinugawa, T. Oishi and T. Tamotsu : ” Bistable UV Pigment in the Lamprey Pineal” 11th International Conference on Retinal Proteins, Frauenchiemsee (Germany) (2004, 20th, Jun)
 28. Y. Furutani, M. Iwamoto, K. Shimono, A. Wada, M. Ito, N. Kamo and H. Kandori : ” FTIR Spectroscopy of the O Photointermediate in pharaonis Phoborhodopsin” 11th International Conference on Retinal Proteins, Frauenchiemsee (Germany) (2004, 20th, Jun)
 29. M. Sugihara, T. Okada, A.-N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss : ” QM/MM modeling of the rhodopsin chromophore based on a new 2.2 Å crystal structure” 11th International Conference on Retinal Proteins. Frauenchiemsee (Germany) (2004, 21st, Jun)
 30. A. Onishi, J. Hasegawa, H. Imai, O. Chisaka, Y. Ueda, Y. Honda, M. Tachibana and Y. Shichida : ” Wiring potentials of retinal circuit neurons of genetically trichromatic mice” FASEB Summer Research Conference, Saxton River (U.S.A) (2004, 17th, Jul)
 31. 小柳光正、寺北明久、七田芳則、川野絵美、衣川嘉、大石正、保智己 : 「脊椎動物の新規 UV 視物質の発見と機能解析」日本進化学会第 6 回大会 東京 (2004, 4th, Aug)
 32. 寺北明久、小柳光正、窪川かおる、七田芳則 : 「ナメクジウオにおけるロドプシン類の分光学的性質と光情報伝達系」日本動物学会第 75 回大会 神戸 (2004, 10th, Sep)
 33. 山下高廣、甲斐敏裕、寺北明久、七田芳則 : 「代謝型グルタミン酸受容体の細胞質領域における構成的活性化変異の同定」第 77 回日本生化学会大会 横浜 (2004, 13th, Oct)
 34. 今井啓雄、桑山成樹、大西暁士、森住威文、千坂修、七田芳則 : 「ノックインマウス視細胞外節膜におけるロドプシンのメタ中間体の崩壊とオプシンの生成過程」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 35. 塚本寿夫、寺北明久、小柳光正、七田芳則 : 「アゴニスト結合能を持つ無脊椎動物型ロドプシンにおけるレチナール、オプシン相互作用の解析」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 36. 寺北明久、塚本寿夫、七田芳則 : 「変異蛋白質を用いた多様なロドプシン類の活性化状態の pH 依存性の比較解析」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 37. 山下高廣、寺北明久、甲斐敏裕、七田芳則 : 「代謝型グルタミン酸受容体の G 蛋白質活性化領域における新規構成的活性化変異の同定」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 38. 森住威文、桑山成樹、大西暁士、今井啓雄、七田芳則 : 「長波長感受性錐体視物質における塩素イオンの結合と解離」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 39. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、千坂修、七田芳則 : 「桿体視細胞のロドプシンを緑錐体視物質に置換したノックインマウスの解析」日本生物物理学会第 42 回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 40. 宮川裕樹、篠田渉、岡田哲二、肥後順一、櫻井実 : 「分子動力学計算によるロドプシンの基底状態および光反応中間体の動的構造」第 42 回日本生物物理学会年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 41. 櫻井実、斉藤紫野、宮川裕樹、岡田哲二 : 「レチナール蛋白質の吸収波長制御に関する量子力学的研究」第 42 回日本生物物理学会年会 京都 (2004, 13th, Dec)
 42. 住井昌代、古谷祐詞、Arandi G. Bezerra Jr., Stephen Waschuk, Leonid S. Brown、神取秀樹 : 「低温赤外分光法による Neurospora Rhodopsin の光反応機構解析」日本生物物理学会第 42 回年会

会 京都 (2004, 13th, Dec)

43. 古谷祐詞、寺北明久、七田芳則、神取秀樹：「レチノクロムの光反応に伴うタンパク質の構造変化」日本生物物理学会第42回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
44. 太田徹、古谷祐詞、寺北明久、七田芳則、神取秀樹：「低温赤外分光法によるイカロドプシンの構造解析」日本生物物理学会第42回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
45. 川鍋陽、古谷祐詞、Kwang-Hwan Jung、神取秀樹：「低温赤外分光法を用いた Anabaena sensory rhodopsin の構造変化の追跡」日本生物物理学会第42回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
46. 鎌田健太郎、古谷祐詞、須藤雄気、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「赤外分光法によるフォボロドプシンと情報伝達蛋白質との相互作用解析」日本生物物理学会第42回年会 京都 (2004, 13th, Dec)
47. A. Kawanabe, Y. Furutani, K.H. Jung and H. Kandori : " FTIR Spectroscopy of the K Photointermediate of Abana Sensory Rhodopsin: Hydrogen-bonding Strength of Water Molecules around the Schiff base" Molecule-Based Information Transmission and Reception -Application of Membrane Protein Biofunction- (MB-ITR2005) Okazaki (Japan) (2005, 3rd, Mar)
48. 塚本寿夫、寺北明久、七田芳則：「オールトランスレチナールをアゴニストとして結合するロドプシン」分子研研究会「ロドプシンの仲間、G蛋白質共役型レセプターの機能と構造 岡崎 (2005, 16th, Jun)
49. 塚本寿夫、寺北明久、七田芳則：「ロドプシン類におけるアゴニストの結合」第12回日本光生物学協会年会 京都 (2005, 6th, Aug)
50. 桜井啓輔、今井啓雄、大西暁士、千坂修、中谷敬、七田芳則：「ロドプシンを緑錐体視物質に置換したノックインマウスの単一視細胞応答の解析」日本動物学会第76回大会 筑波 (2005, 7th, Oct)
51. 山下高廣、寺北明久、七田芳則：「代謝型グルタミン酸受容体の活性状態形成に重要な細胞質領域のアミノ酸残基の同定」第78回日本生化学会大会 神戸 (2005, 20th, Oct)
52. 今井啓雄、桜井啓輔、大西暁士、千坂修、七田芳則：「ノックインマウスを利用した視物質の in vivo 解析に向けた取り組み」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
53. 山下高廣、寺北明久、七田芳則：「人工的分子内架橋による代謝型グルタミン酸受容体の細胞質領域における構造変化解析」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
54. 森住威文、今井啓雄、大西暁士、七田芳則：「グループL視物質の光反応過程における Cl⁻効果」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
55. 塚本寿夫、寺北明久、七田芳則：「変異蛋白質を用いたロドプシンの活性化機構の比較解析」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
56. 筒井圭、今井啓雄、七田芳則：「視物質の発色団異性化の量子収率に対するシッフ塩基プロトン化の影響」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
57. 川鍋陽、K.-H. Jung、古谷祐詞、神取秀樹：「低温赤外分光法を用いた all-trans 型及び 13-cis 型 Anabaena sensory rhodopsin の構造変化の比較」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
58. 住井昌代、古谷祐詞、S. A. Waschuck、L. S. Brown、神取秀樹：「プロトンポンプ活性をもった真核生物ロドプシン Leptosphaeria Rhodopsin の構造解析」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)

59. 太田徹、古谷祐詞、神取秀樹、寺北明久、七田芳則：「赤外分光法によるウシロドプシンの対イオンスイッチ説の検証」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
60. 鎌田健太郎、古谷祐詞、須藤雄気、下野和実、加茂直樹、神取秀樹：「フォボロドプシンと情報伝達蛋白質との温度依存的な相互作用変化の解析」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
61. 古谷祐詞、須藤雄気、和田昭盛、伊藤允好、加茂直樹、神取秀樹：「重水素化レチナールを用いて帰属したファラオニスフォボロドプシン初期異性化産物の水素面外変角振動」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
62. 池田大亮、古谷祐詞、柴田幹大、神取秀樹：「プロテオロドプシンの pH 依存的な内部結合水の構造」日本生物物理学会第43回年会 札幌 (2005, 24th, Nov)
63. 辻本瑠美、岡田哲二：「構造解析を目的とした培養細胞膜からの選択的可溶化法」第28回日本分子生物学会年会 福岡 (2005, 9th, Dec)
64. Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori : " Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecules Observed in the FTIR Spectra of Archaeal Rhodopsins upon Retinal Photoisomerization" ,
Pacifichem2005, Honolulu (USA) (2005, 19th, Dec)
65. M. Shibata and H. Kandori : " Complete Assignment of the O-D Stretching Vibrations of Internal Water Molecules in the K Minus Bacteriorhodopsin Difference Infrared Spectra"
Pacifichem2005, Honolulu (USA) (2005, 19th, Dec)
66. A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori : " Structural changes in the all-trans and 13-cis forms of Anabaena sensory rhodopsin upon the retinal isomerization studied by FTIR spectroscopy" Pacifichem2005 Honolulu (USA) (2005, 19th, Dec)
67. A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori : " Structural changes of Anabaena sensory rhodopsin upon retinal photoisomerization" 特定領域研究「水と生体分子」公開ワークショップ 岡崎 (2006, 7th, Jan)
68. Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori : " Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecules Observed In the FTIR Spectra of Archaeal Rhodopsins" 特定領域研究「水と生体分子」公開ワークショップ 岡崎 (2006, 7th, Jan)
69. M. Shibata and H. Kandori : " Structural Analysis of Internal Water Molecules of Bacteriorhodopsin by Low-Temperature FTIR Spectroscopy" 特定領域研究「水と生体分子」公開ワークショップ 岡崎 (2006, 7th, Jan)
70. 山本渥史、岩田達也、徳富哲、神取秀樹：「ホウライシダ Phytochrome3LOV2 ドメインにおける光誘起的構造変化の水和量依存性」第47回日本植物生理学会年会 筑波 (2006, 29th, Mar)
71. 増富康亮、中谷敬：「カエル桿体細胞における All-trans レチナールの光酸化作用」日本生理学会 前橋 (2006, 29th, Mar)
72. K. Sakurai, H. Imai, A. Onishi, O. Chisaka, Y. Ueda, J. Usukura, K. Nakatani and Y. Shichida : " The generation of knock-in mice having green cone pigments in rod photoreceptor cells" 2006 ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale (USA) (2006, 2nd, May)
73. M. Koyanagi, K. Kubokawa, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita : " Cephalochordate Melanopsin: Evolutionary Linkage between vertebrate circadian photopigment and invertebrate visual pigment" 10th Meeting Society for Research on Biological Rhythms,

Florida (U.S.A) (2006, 22nd, May)

74. H. Tsukamoto, A. Terakita and Y. Shichida : " Mutational analyses of a rhodopsin exhibiting binding ability to agonist all-trans-retinal" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 5th, Jun)
75. M. Koyanagi, K. Kubokawa, H. Tsukamoto, Y. Shichida and A. Terakita : " Cephalochordate Melanopsin: Evolutionary Linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 5th, Jun)
76. T. Morizumi, H. Imai, A. Onishi and Y. Shichida : " Mutational analysis of the chloride binding site in long-wavelength-sensitive cone visual pigment" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 6th, Jun)
77. A. Kawanabe, Y. Furutani, K. -H. Jung and H. Kandori : " Structural changes of Anabaena sensory rhodopsin studied by low-temperature FTIR" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
78. V. A. Lorenz Fonfria, and H. Kandori : " Room-temperature FTIR spectroscopy of active internal water molecules in the bacteriorhodopsin photocycle" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
79. M. Shibata, K. Ihara H. and Kandori : " FTIR Studies of the Hydrogen-Bonding Interaction of the Protonated Schiff Base with Halides in a Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Mutant" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
80. D. Ikeda, Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori : "Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecule only Present in the Alkaline Form of Proteorhodopsin", 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
81. M. Ito, Y. Sudo, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori : "FTIR Study of a pharaonis Halorhodopsin Mutant That Has Specific Hydrogen Bonds with pharaonis HtrII Protein", 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
82. K. Ido, Y. Furutani, M. Sasaki, M. Ogawa and H. Kandori : "Clay Acts as a Novel Matrix to Mimic Visible Absorption Spectra of the Protonated Retinal Schiff Base in Rhodopsin", 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
83. M. Yoshitsugu, M. Shibata, N. Mizuide, K. Ihara and H. Kandori : "Halide-bound D212N mutant protein of Bacteriorhodopsin", 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 7th, Jun)
84. K. Tsutsui, H. Imai and Y. Shichida: "Effect of Schiff Base Protonation on the Quantum Yield of Visual Pigments" 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 8th, Jun)
85. K. Sakurai, H. Imai, A. Onishi, O. Chisaka, Y. Ueda, J. Usukura, K. Nakatani and Y. Shichida: " Photoresponses of Rod Photoreceptor Cells in Cone Pigment Knock-in Mice, 12th International Conference on Retinal Proteins, Awaji (Japan) (2006, 8th, Jun)
86. Y. Furutani, K. Kamada, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori : " Temperature Dependent Interactions between M Intermediate of pharaonis Phoborhodopsin and its Cognate Transducer Detected by

- FT-IR Spectroscopy” International Workshop on “Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy”, Kobe (Japan) (2006, 18th, Aug)
87. V. A. Lorenz Fonfria, H. Kandori : ” Room-temperature FTIR spectroscopy of active internal water molecules in the bacteriorhodopsin photocycle” International Workshop on “Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy”, Kobe (Japan) (2006, 18th, Aug)
 88. M. Shibata, K. Ihara and H. Kandori : ” FTIR Studies of the Hydrogen-Bonding Interaction of the Protonated Schiff Base with Halides in a Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Mutant” International Workshop on “Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy” Kobe (Japan) (2006, 18th, Aug)
 89. 小柳光正、寺北明久、七田芳則 : 「松果体の光受容タンパク質パラピノプシンの分子進化」 日本進化学会第 8 回大会 東京 (2006, 30th, Aug)
 90. 高田英一郎、横野博久、小柳光正、寺北明久、徳永史生 : 「ハマダラカに存在する機能未知光受容タンパク質、エンセファロプシンの単離と機能解析」 日本進化学会第 8 回大会 東京 (2006, 30th, Aug)
 91. 高野浩輔、小柳光正、大津浩三、寺北明久、徳永史生 : 「腔腸動物の光受容タンパク質の同定とオプシン遺伝子族の分子進化」 日本進化学会第 8 回大会 東京 (2006, 30th, Aug)
 92. K. Tsutsui, H. Imai, and Y. Shichida : ”Regulation of the photoisomerization efficiency in visible and UV-absorbing visual pigments”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 13th, Nov)
 93. M. Yanagawa, T. Yamashita, A. Terakita and Y. Shichida : ”Identification of amino acid residues responsible for the helical movement of metabotropic glutamate receptor in the activation process”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 13th, Nov)
 94. T. Matsuyama H., H. Imai and Y. Shichida : ”Insights into the role of the covalent bond between rhodopsin and the chromophore”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 13th, Nov)
 95. A. Terakita, M. Koyanagi, H. Tsukamoto and Y. Shichida : ”Expression and characterization of melanopsin”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 15th, Nov)
 96. H. Tsukamoto, A. Terakita, M. Koyanagi and Y. Shichida : ”Mutational analyses of active state of bistable rhodopsins”, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan) (2006, 15th, Nov)
 97. K. Tsutsui, H. Imai, and Y. Shichida : ”Photoisomerization efficiency in UV-absorbing visual pigments”, The 3rd Asian and Oceanian Conference on Photobiology, Beijing (China) (2006, 19th, Nov)
 98. T. Morizumi, H. Imai, and Y. Shichida : ”Complex Formation of GDP-bound transducin with Rhodopsin Intermediate”, The 3rd Asian and Oceanian Conference on Photobiology, Beijing (China) (2006, 19th, Nov)

(4) 特許出願

① 国内出願

なし

② 海外出願

なし

(5) 受賞等

① 受賞

岡田哲二：トムソンサイエンティフィックより「リサーチフロント」をリードする研究者として受賞
(2004. 11. 2.)

② 新聞報道

1. 日刊工業新聞 (2005. 4. 26.) 「光受容体ロドプシン 化学物質にも反応 京大が新タイプ発見」
2. 化学工業日報 (2005. 4. 28.) 「光受容体ロドプシン 化学物質も受容 J S Tが脊索動物で発見 創薬研究、一段加速へ」
3. 科学新聞 (2005. 5. 13.) 「化学物質まで受容するロドプシン発見 七田・京大教授ら
4. 毎日新聞 (2005. 6. 7.) 「体内時計の秘密 無脊椎動物にアリ 視細胞から進化」
5. 日本経済新聞 (2005. 6. 7.) 「ヒトの体内時計の源流 無脊椎動物の目に？」
6. 京都新聞 (2005. 6. 7.) 「体内時計用光センサー 無脊椎動物の「目」と同起源？」
7. 産経新聞 (2005. 6. 7.) 「視覚細胞→光センサー細胞 哺乳類体内時計の進化解明」
8. 日刊工業新聞 (2005. 6. 7.) 「ほ乳類の光センサー細胞の起源 脊椎動物の視細胞と同じ」
9. 化学工業日報 (2005. 6. 7.) 「ほ乳類の光感受性神経細胞 無脊椎動物視細胞に源 京大・ヒト体内時計解明に道」
10. 科学新聞 (2005. 6. 10.) 「メラノプシンの機能解析 進化的な起源解明 七田・京大教授ら」

③ その他

なし

(6) その他特記事項

なし

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006. 6. 8	第12回レチナール 蛋白質国際会議に おけるシンポジウム 「Signal transduction in visual pigments」	淡路夢舞台 国際会議場 (淡路島)	約 200 人	ロドプシンの構造変化過程を種々の手法で解析した成果について発表を行い、ロドプシンを含む GPCR の構造・機能相関に関する議論を行った。講演者は、研究代表者以外にアメリカから2人とドイツから2人の計5人であった。

8. 結び

本研究の基本構想では、ともすれば特殊な GPCR と考えられていた光受容体ロドプシンをモデルとして、一般の GPCR の構造・機能解析を進めることを提案した。研究の開始当初から、ロドプシンの研究が他の GPCR に比べて格段に進んでいることは誰も疑わないが、逆に本当にロドプシンの構造・機能解析で得られた知見が一般の GPCR の解析に適用できるかという疑問が大きかったと想像される。したがって、本研究では世界的にもトップレベルにあるロドプシンの構造・機能解析について共同研究者を中心に精力的に進めるとともに、いかにしてロドプシンと一般の GPCR の溝を埋めることができるかについて腐心した。その最も大きな難問は、当時研究対象にしていた脊椎動物ウシのロドプシンが、いわゆる「アゴニスト」と結合して活性状態にならないことであった。創薬のターゲットとして GPCR を考える場合、いわゆるアゴニスト・アンタゴニストに代表されるリガンド結合様式の改変が最も注目される。ところが、ロドプシンではアゴニスト（全トランス型レチナール）はわかっているが、それと直接結合しないのが特徴である。この難問は、網羅的な遺伝子改変ではなく分子進化の多様性の考察から解決されることになった。つまり、ロドプシンを含むファミリー1の GPCR の分子系統樹を書くと、ロドプシンはリガンド結合を起こす多くの GPCR の中から多様化してきたことがわかり、ロドプシン類の中には先祖型の性質（つまりアゴニスト結合能）を持つロドプシンがある可能性があった。そこで、その当時（現在でも）わかっていた5つのグループに属するロドプシンそれぞれについて、培養細胞系での発現系を確立して検討した結果、アゴニスト結合を起こすロドプシンを発見することができた。この発見のお陰で、ロドプシンをモデルとする「特殊性」が解消された。

もう一つの大きな問題は、GPCR にはアミノ酸配列の相同性のない数種類のファミリーがあり、そのため、例えばG蛋白質との結合モチーフとか活性化モチーフというものを想像できないところにあった。この問題に答えを得るために、我々は敢えてロドプシンとはアミノ酸配列の相同性のない mGluR を研究材料として選び、5年間の研究期間をフルに使い、最終的にはロドプシンで解明された活性化に至る構造変化の様式を利用して mGluR での活性化に至る構造変化についての情報を得ることができた。アミノ酸配列の相同性のない場合に機能の類似性からメカニズムを探る試みとして注目に値すると考えている。

本研究期間の間に多くの研究者が育った。実際、研究期間の間に2名が教授に昇進し、1名が助教授に、3名が助手として研究者の道に入った。また、この5年間に学位を取得した学生が世界の舞台で活躍始めていることも、今後の発展が期待される。ロドプシン研究を GPCR 研究に引き上げるために、手厚いサポートをしていただいたことに、改めて科学技術振興機構／科学技術振興事業団の皆様、歴代

の技術参事と事務参事の皆様、事業所の皆様、そして領域代表とアドバイザーの先生方に厚くお礼申し上げます。



七田グループ
(2002 年のメンバーの一部)



七田グループ
(2005 年のメンバーの一部)



神取グループ
(2006 年のメンバーの一部)



岡田哲二博士
(2004 年「リサーチフロント」を
リードする研究者として表彰)



中谷グループ
(2006 年のメンバーの一部)