

平成 21年 6月 24日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19370065

研究課題名（和文） ロドプシン群の共通構造モチーフの解析

研究課題名（英文） Analyses of common structural motif of rhodopsin family

研究代表者

神山 勉 (Tsutomu Kouyama)

名古屋大学理学研究科・教授

研究者番号：30170210

研究成果の概要：

高度好塩菌の光駆動プロトン輸送体（バクテリオロドプシン、アーキロドプシン）、光駆動塩素イオン輸送体（ハロロドプシン）、無脊椎動物系の視物質（イカロドプシン）など、異なる機能を有するロドプシン群蛋白質（=7回膜貫通型レチナル結合蛋白質）を研究対象とし、それらの立体構造ならびに光誘起構造変化を調べ、ロドプシン群蛋白質の機能発現に必須な構造モチーフについての構造学的情報を得ることを目標として研究を展開した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：結晶構造解析、ロドプシン、プロトンポンプ、ハロロドプシン、視物質、古細菌

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、バクテリオロドプシンをはじめとするレチナルタンパク質を研究対象にし、それらの立体構造を求めるとともに、もう一つの物理的パラメータを掛け合わせてタンパク質の構造を解くこと、すなわち、タンパク質の「4次元」構造解析に挑戦してきた。具体的には、光照射により惹起されるタンパク質の構造変化、pH変化に対する応答、あるいは、生物進化の過程におけるタンパク質の構造変化について調べてきた。バクテリオロドプシンについての一連の研究結果を基に、プロトン輸送は水分子輸送とカップルして起こる、とする「プロトン/水分子・対輸送体説」を提唱した。さらに、アーキロドプシンなどの古細菌ロドプシンとの構造比較から、タンパク質内の空隙の形態変化に着目することも「タンパク質の動く仕組み」を理解するには不可欠であるとの認識に至った。我々の次なる研究目標は、これらの構造解析から考え出された概念がどのくらい

普遍性を持つかを示すことにある。

2. 研究の目的

- 1) バクテリオロドプシンのN中間体についての構造情報を得ることを試みる。
- 2) タンパク質内空隙への希ガスの封入がプロトン輸送系の構造・機能に及ぼす影響を定量的に測定する。
- 3) プロテオロドプシンの結晶化条件の精密化を行い、光化学反応に伴うタンパク質内の水分子の再配置および空隙の形態変化を調べる。
- 4) ハロロドプシンの大量発現および結晶化を試み、「水分子の再配置→塩素イオンの移動を誘導する」という作業仮説を検証するための実験系を構築する。
- 5) 視物質イカロドプシンの結晶構造解析を行う。

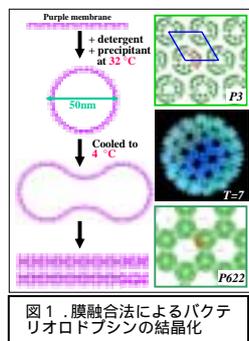
3. 研究の方法

レチナルの異性化→空隙の形態変化→水の移動→重要残基のpKa値の変化→プロトンの移動」という反応スキームを提唱した背景には次のような考えがある。1) プロトンは小さな原子であり、プロトンの動きを機械的な力で制御することは難しい。一方、水分子は適度な大きさを有しており、水分子を汲み上げるための機械仕掛けを構築することで、水分子の一方方向の流れを作りえる。2) 水分子が動けば、蛋白質内部の解離性アミノ酸残基のプロトン・アフィニティが変わる。その結果として、プロトンが一方方向に移動する。3) プロトンポンプが作動するには、空のキャピティが存在して、その形態が秩序正しく変化しなければならない。このスキームではバクテリオロドプシンを「水分子のポンプ」と見なしている。このような見直しを行うと、多くの蛋白質の反応(水分子の移動を伴わない反応は少ない)を新しい見地から捉えることができる。まず、水分子の輸送は、ATP合成酵素やチトクローム酸化酵素などのプロトン輸送体でも観測されるであろうと予言できる。また、プロトン輸送ばかりではなく、他のイオン輸送体の作動機構も同様に論じることができる。たとえば、光駆動塩素イオン輸送体であるハロロドプシンは、バクテリオロドプシンとほとんど同じ構造をしている。違いは、活性部位にあるアスパラギン酸がセリンに置き換わり、空いた空間に塩素イオンが居座っていることである。この塩素イオンは細胞質側方向に輸送されるが、細胞質側の領域は疎水性残基で埋め尽くされている。この領域に塩素イオンを持ってくる仕掛けとして、最初に水分子を疎水領域にあるキャピティに移し、ついで塩素イオンを呼び込む、という可能性を考えることができる。しかし、上述のスキームは作業仮説の域を抜けていない。我々の作業仮説の真偽を明らかにするには、異なる機能を有するロドプシン群の4次元構造解析を行い、たとえば塩素イオンが輸送される様子をスナップショットの形で撮ることが重要である。そのような実験系を構築するのが本研究の狙いである。

4. 研究成果

1) ロドプシン群蛋白質の結晶化

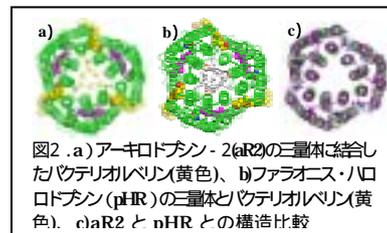
当研究グループでは、7種類の膜蛋白質(バクテリオロドプシン: Takeda et al., 1998、ウシロドプシン: Okada et al., 1999、光捕集クロロフィル複合体: Hino et al., 2004、アーキロドプシン-1: Enami et al., 2006、イカロドプシン: Murakami et al., 2007、アーキロドプシン-2: Yoshimura & Kouyama, 2008、ファラオニス・ハロロドプシン: Kouyama & Takeguchi, 2009)の結晶化を成し遂げてきた。結晶化の試みで意識してきたのは、「如何にして生理的条件に近い状態を



保ちつつ良質の3次元結晶を作成するか」である。そのような考えの下「膜融合法」という新しい結晶化法を開発した(図1)。

膜融合法で作成したバクテリオロドプシンの結晶(空間群P622)は、天然の脂質分子を含み、広いpH範囲にわたって安定である。この安定性ゆえに、プロトン輸送に強く関与するアミノ酸残基のプロトン化状態のpH依存性ならびにそれが立体構造に与える影響を正確に把握することができた。バクテリオロドプシンの反応中間体の構造解析は他の膜蛋白質では追従できない高いレベルで行われているが、構造変化の様子は用いる3次元結晶の種類に依存しており、本質的な構造変化が何かについて、現在、大論争が繰り広げられている。研究代表者らは、バクテリオロドプシンの反応中間体に関する一連の構造解析から、「レチナルの光異性化に伴い活性部位にある水分子が細胞質側に引き釣り上げられ、この水分子が一方方向に移動することにより重要なアミノ酸残基のpKa値が変化し、プロトンの流れの一方方向性が保証される」という斬新なプロトン輸送機構を提唱した(Kouyama et al., 2004)。我々の観測結果は他の手法(赤外分光法や光誘起電流測定)により得られた多くの実験結果により支持される。一方、他の方法で作成された結晶は分解能を稼ぐには利点があるものの、蛋白質脂質間相互作用が乱れており、そのため光反応に伴う構造変化が異常になっている可能性を指摘できる。脂質蛋白質間相互作用の破壊を最小限に抑えつつ結晶を作成するという戦略は、他の膜蛋白質の結晶構造解析にも威力を発揮しはじめている。

本研究課題では、膜融合法を改良してアーキロドプシンの高分解能構造決定を可能ならしめる結晶を作成し、2.1の分解能で構造決定を行い、カロテノイドの一種であるバクテリオルベリンがアーキロドプシン2の三量体構造形成に重要な働きをしていることを



明らかにした(図2a)。バクテリオルベリンの同様な結合様式は、好アルカリ性好塩菌の光駆動塩素イオン輸送体(ファラオニス・ハロロドプシン)でも観測された(図2b)。このような脂質蛋白質間相互作用に関する構造データは、脂質成分を取り除くことなく結晶化する方法によってのみ得られることに注目すべきであろう。これらの例は、蛋白質脂質間相互作用に関する新知見をもたらしたばかりではなく、膜融合法が膜蛋白質脂質複合体の構造を調べるための究極の結晶化法であることを示している。膜蛋白質の機能している状態の構造を調べるのに極めて有効である。

2) バクテリオロドプシンの光誘起構造変化 i) 結晶格子力の影響

膜融合法で作成したバクテリオロドプシンの結晶は、平面膜が積層してできており、広いpH領域で安定であり、また、結晶化後のソーキング液中の結晶析出剤(硫酸)濃度を大きく変動しても結晶構造は壊れない。しかし、バクテリオロドプシンの3次元結晶内における光反応を調べると、反応中間体の一つであるM中間体の寿命が硫酸濃度とともに大きく変動することが見出された(図3)。X線回折データからは、結晶格子定数が硫酸濃度に依存して変化(減少)し、膜間の隙間が高塩濃度で狭くなることが示された。これらの結果を併せて考察すると、蛋白質表面から突き出したループ(EFループ)の動きが抑えられるとM中間体からN中間体への遷移が遅くなることが示唆される。

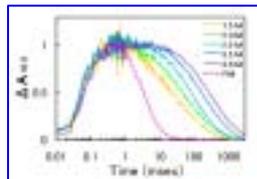


図3. 結晶中でのBRの光反応。Mの寿命が硫酸濃度に対して指数関数的に長くなる。

ii) M中間体の構造のpH依存性

高い硫酸濃度でMの寿命が長くなるという性質を利用して、M中間体の構造のpH依存性を調べた。異なるpHでのMの形成に伴う構造変化の比較から、大部分の領域ではほぼ同じ構造変化(Lys216の主鎖構造の歪み、Arg82の側鎖の動き、ヘリックスGの滑り運動)がどのpHでも起こることが示された。しかし、プロトン放出グループの有力な候補であるGlu194とGlu204のペア構造近傍の構造変化は顕著なpH依存性を示した(図4)。すなわち、プロトン放出グループのpKa (~5.2)より高いpH領域では、Glu194/Glu204のペア構造が完全に破壊されるのに対して、それより低いpHではGlu194/Glu204ペア構造は完全には壊れていない。この果は、BRの研究で長く論争されていたプロトン放出グループの実体を解き明かすのに役立つであろう。

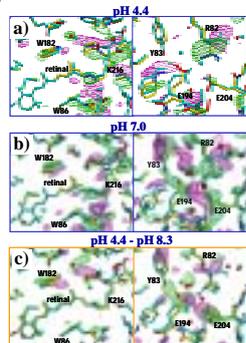


図4. バクテリオロドプシンのM中間体の形成に伴う構造変化のpH依存性。

iii) Leu93→Ala変異体の構造解析

バクテリオロドプシンの中には、空隙が多く認められる。多くは水分子で満たされているが、水分子が存在しない空隙もある。たとえば、L中間体形成時に動くLeu93の傍には空の空隙が存在する。このような空隙が存在するからこそ、Leu93の側鎖が回転し、水分子の移動も可能となる(図3)。ロイシンの側鎖の大きさを見てみると、回転する部分はちょうど水分子一個分に対応している。したがって、ロイシン残基をプロトンチャンネルに沿って配置することで、水分子を秩序正しく移動させることも可能となる。実際に、バクテリオロドプシンの光反応サイクルにおいて、水の再配置を伴う空隙の形態変化が観測されている。空隙の形態をコントロールするということは、水分子の配置を決めることであり、プロトンチャンネルに沿って存在するアミノ酸残基のpKa値を制御することにも繋がる。そして、プロトンの一方の方向の流れを作り出す。そういう仕組みが、BR型プロトンポンプの進

化の過程で構築・維持されてきたのではないかと想像している。

この考えの下、Leu93をAlaに置換したバクテリオロドプシンの変異体を作成し、その立体構造および光反応キネティクスを調べた。2.7分解能の結晶構造解析から、Leu93→Ala置換によりレチナルシッフ塩基の細胞質側の領域に大きな空隙ができ、そこに4個の水分子がクラスターを形成して存在することが明らかにされた。

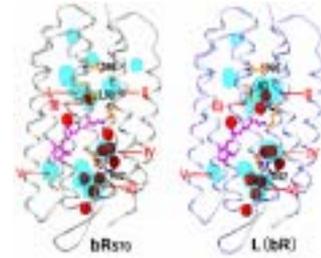


図5. 光反応サイクルにおける蛋白質内空隙の形態変化。L中間体の形成に伴い、空隙-IIIが消え、空隙-IIが大きくなる。

iv) 疎水的空隙へのキセノンの結合とその影響

バクテリオロドプシンの蛋白質内疎水的キャビティへの役割を理解するため、希ガスの圧力結晶構造を調べ、

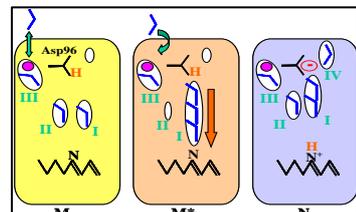


図6. バクテリオロドプシンの光反応における蛋白質内空隙の形態変化と水分子の移動。キセノン原子(紫円)は水分子の蛋白質内への浸入を促す。

晶構造を調べ、i) キセノン原子がヘリックスCとDとの間のプロトン取り込み経路近傍にある疎水的キャビティに結合すること、ii) キセノンの結合により光反応サイクルのM中間体の寿命が顕著に短くなること、iii) キセノンの結合による光反応キネティクスへの影響が水の活性度に依存することを見出した。これらの実験結果を説明するため、「疎水的キャビティに結合したキセノンがプロトン輸送経路への水分子の浸み込みを促進し、レチナルシッフ塩基の細胞質側の領域での水分子クラスターの形成頻度が高くなり、この水分子クラスターを経由して起こるプロトン移動(すなわち、M→N転移)が加速される」とする反応スキーム(図6)を提唱した。

v) バクテリオロドプシンはプロトン/水分子・対輸送体である

バクテリオロドプシンの構造光誘起構造変化に関する一連の実験データを基に「バクテリオロドプシンはプロトン/水分子・対輸送体である」という概念を提唱してきた(図7)。類縁タンパク質であるアーキロドプシン-1および-2の構造データの構造解析の結果も併せてプロトン輸送機構について考察

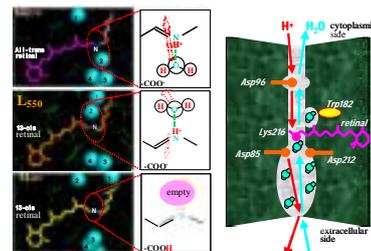


図7. バクテリオロドプシンの反応中間体の構造と光反応サイクルにおける水分子の移動。

すると、ネの発色団の活性化→蛋白質内空隙の形態変化→水再配置→アミノ酸残

基の pKa の変化→プロトン移動」という反応スキームを提唱することができる。

3) 塩素イオンポンプの構造解析

光駆動プロトンポンプの構造解析から明らかになった概念(蛋白質内の水分子の再配置、および空隙の形態変化の重要性)がどのくらい普遍性を持つかを示すため、別種の光駆動イオンポンプの膜蛋白質の構造解析に取り組んだ。まず、高度好塩性好アルカリ性古細菌 *Natronomonas pharaonis* に UV 光を照射することで突然変異を誘導し、ハロロドプシン(pHR)の大量発現株の単離に成功した。単離した株を野生株と比べると、その DNA 塩基配列において、バクテリオロドプシンアクティベーターと呼ばれる蛋白質に変異があることを見出した。これによって、誘導的な発現を示す HR が構成的に発現していることを示した。大量発現株 KM-1 から細胞膜を取り、低イオン強度で処理する事で HR を膜の状態に単離する事が出来た。膜融合法を使って、単斜晶系の結晶を得ることに成功した。

2.5 分解能での構造解析の結果(図8)

ファラオニス・ハロロドプシンがバクテリオロドプシンと極めて似た構造を持つことが明らかにされた。特に、レチナルシッフ塩基から細胞膜表面に至るプロトン取り込み経路の構造が似ている。このことから、ハロロドプシンでもバクテリオロドプシンと同様なプロトン移動

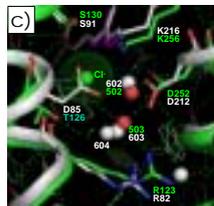


図8・pHRとbRの活性中心の構造比較

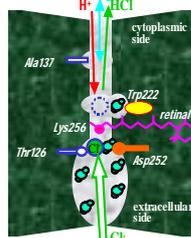


図9・ハロロドプシンの作動機構

が起きている可能性、つまり、「ハロロドプシンはプロトン/HCl 対輸送体である。」という可能性が示唆される(図9)。pHRの大量発現系の確立→良質な結晶作成→立体構造の決定、と順調に研究が進展して来たので、今後、バクテリオロドプシンと同様の4次元X線構造解析を進める予定である。pHRの反応状態の構造解析は、我々の仮説の検証実験となるばかりではなく、生体膜にあるすべての物質輸送系の仕組みについても大きなヒントを与えることになるであろう。

4) イカロドプシンの結晶構造解析

ロドプシンは網膜視細胞に存在する光受容膜蛋白質で、G蛋白質共役型受容体(GPCR)のモデル蛋白質である。ロドプシンが光を吸収すると、分子内に含まれる発色団レチナルが11-シス型から全トランス型へと光異性化し、光反応過程が開始される。脊椎動物のロドプシンではG蛋白質と共役し色団レチナルが外れるのに対し、無脊椎動物のロドプシンではメタ中間体が安定であり、レチナルを結合したまま基底状態へ戻る。また、頭足類のロドプシンは、脊椎動物のロドプシンが網膜に特異的なGt型G蛋白質トランスデューシンと共役するのは異なり、他の多くのGPCRと同様にGq型G蛋白質と共役し普遍的な細胞内情報伝達経路であるIP₃カスケードを活性化する。

我々は、GPCRのG蛋白質活性化機構を明らかにすることを目標として、スルメイカロドプシンの三次元結晶化を試みた。その結

果、良質な結晶を作成することに成功し、2.5 Å 分解能で立体構造を決定した。イカロドプシンは、GPCRに特徴的な7回膜貫通ヘリックス構造を有し、ヘリックスのC末端側に膜面に平行な短い8番目のヘリックスを形成していることが明らかとなった。ヘリックス、が、膜面から約20 Å細胞質側に突き出しており、さらにC末端の短いヘリックスがそれに沿うように伸長していた。この領域には多くの極性アミノ酸残基が露出しており、分子表面の正電荷のアミノ酸と負電荷のアミノ酸の分布に偏りが見られた。ロドプシンの細胞質側表面はG蛋白質との結合サイトを形成している。イカロドプシンでは、特徴的な固い表面構造と電荷分布の偏りによって、Gq型G蛋白質を特異的に認識していると考えられる。膜内の活性部位では、11-cis型レチナルがヘリックスから伸びた

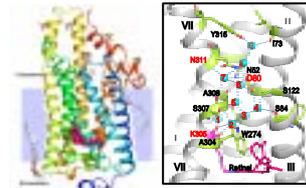


図10・イカロドプシンの結晶構造。

Lys305 側鎖の -アミノ基とシッフ塩基結合によって蛋白質部分に固定されていた。プロトン化シッフ塩基の対イオンは、細胞外側第2ループの

シートにある Glu180 であった。側鎖のカルボキシル基はシッフ塩基から5Å離れているが、Asn185の側鎖が介在する水素結合ネットワークによりシッフ塩基と相互作用をしていた。

6) ロドプシン群蛋白質の構造モチーフ

ロドプシン群に属する膜タンパク質には、バクテリオロドプシンに代表されるI型ロドプシンと、動物の視物質ロドプシンに代表されるII型ロドプシンとに分類される。いずれも、発色団レチナルを含み、7本の膜貫通ヘリックスで特徴付けられる構造を有する。I型ロドプシンとII型ロドプシンと比較すると、レチナルが7番目のヘリックスにあるリジン残基とシッフ塩基結合している点において同じであるが、レチナル結合ポケットの構造が大きく異なり、そのため、レチナルの光異性化の様子が根本的に異なる。すなわち、I型ロドプシンでのレチナル光異性化は全トランス型→13シス型であるのに対して、II型ロドプシンでは11シス型→全トランス型(またはその逆)が基本反応となっている。I型ロドプシンは古細菌型ロドプシンと呼ばれることもあったが、最近の研究によれば、真核生物にも存在することが示されている。進化の過程で、光駆動プロトンポンプ、光駆動塩素

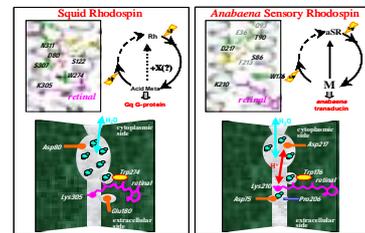


図11・イカロドプシンとアナベナ・センソリーロドプシンの光反応機構の比較。

イオンポンプ、トランスデューシンと共役して働く光センサー、イオンチャネル型光受容体など、多種類の機能を担うべく分化してきた。一方、II型ロドプシンは動物細胞にのみ見つかっており、光センサーとしての役割を

担い、Gタンパク質と共役して働く。II型ロドプシンはGPCRの代表例として見なされることもある。しかし、脊椎動物の視細胞に存在するロドプシンは高度に分化しており、脊椎動物の網膜のみに存在するG_t型Gタンパク質と共役して働く光受容体である。他方、無脊椎動物の視細胞に存在するロドプシンはG_o型Gタンパク質と共役して働く光受容体であり、このGタンパク質は生体内で普遍的な細胞内情報伝達経路であるイノシトール3リン酸(IP₃)カスケードを活性化する。したがって、無脊椎動物のロドプシンはヒト・メラノプシンをはじめとする多くのG_q型GPCRのモデル構造となり得る。

他方、シアノバクテリアで見出された光センサー(アナベナ・センサリーロドプシン)は、I型ロドプシンに分類されるが、その光反応はイカロドプシンの光反応と共通しているところがある(図11)。これらのロドプシン群蛋白質の反応機構を詳細に調べることにより、I型ロドプシンとII型ロドプシンの共通の祖先について議論できるようになるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

神山 勉: 「視物質および古細菌型ロドプシンの結晶化」, 日本結晶学会誌, 51, 107-111 (2009) 査読有り, 5ページ

神山 勉: 「新しい光受容体の作動機構」, パリティ, 24, 68-70 (2009) 査読なし, 3ページ

村上緑, 「イカロドプシンの結晶構造と無脊椎動物の視覚」, 生物物理, 49, 15-16 (2009) 査読なし, 2ページ

R. L. Mancinelli, R. Landheim, C. Sanchez-Porro, M. Dornmayr-Pfaffenhuemer, C. Gruber, A. Legat, A. Ventosa, C. Radax, K. Ihara, M. R. White and H. Stan-Lotter *Haloarobacter chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* in press 査読有り

S. Kurosawa, R. Murakami, K. Onai, M. Morishita, D. Hasegawa, R. Iwase, T. Uzumaki, F. Hayashi, T. Kitajima-Ihara, S. Sakata, M. Murakami, T. Kouyama and M. Ishiura, "Functionally important structural elements of the cyanobacterial clock-related protein Pex," *Genes Cells* 14, 1-16 (2009) 査読有り, 16ページ

N. Hayakawa, T. Kasahara, D. Hasegawa, K. Yoshimura, M. Murakami and T. Kouyama, "Effect of xenon binding to a hydrophobic cavity on the proton pumping cycle in bacteriorhodopsin", *J. Mol. Biol.* 384, 812-823 (2008) 査読有り, 12ページ

村上緑, 神山 勉, 「スルメイカロドプシンのX線結晶構造解析」, 実験医学, 26, 2237-2240 (2008) 査読なし, 4ページ

M. Murakami and T. Kouyama, Crystal structure of squid rhodopsin, *Nature* 453, 363-367 (2008) 査読有り, 5ページ

K. Yoshimura and T. Kouyama: "Structural role of bacterioruberin in the trimeric structure of archaerhodopsin-2", *J. Mol. Biol.* 375, 1267-1281 (2008) 査読有り, 15ページ

K. Ihara, A. Narusawa, K. Maruyama, M. Takeguchi and T. Kouyama: "A halorhodopsin-overproducing mutant isolated from an extremely haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*", *FEBS Lett.* 582, 2931-2936 (2008) 査読有り, 6ページ

T. Kitajima-Ihara, Y. Furutani, D. Suzuki, K. Ihara K, H. Kandori, M. Homma, Y. Sudo *Salinibacter* sensory rhodopsin: sensory rhodopsin I-like protein from a eubacterium. *J. Biol. Chem.* 283:23533-23541 (2008) 査読有り, 9ページ

M. Murakami, R. Kitahara, T. Gotoh, and T. Kouyama: "Crystallization and crystal properties of squid rhodopsin", *Acta Crystallogr.* F63, 475-479 (2007) 査読有り, 3ページ

M. Shibata, M. Yoshitsugu, N. Mizuide, K. Ihara H, Kandori: "Halide binding by the D212N mutant of Bacteriorhodopsin affects hydrogen bonding of water in the active site", *Biochemistry*, 46, 7525-7535 (2007) 査読有り, 11ページ

前田章夫, 神山 勉: 「バクテリオロドプシンのプロトン輸送機構: 蛋白質中のプロトンと水分子の動き」, 蛋白質・核酸・酵素, 9, 52, 1314-1321 (2007) 査読有り, 8ページ

[学会発表](計38件)

T. Kouyama, "Crystal structures of archaeal and invertebrate rhodopsins", Molecular Pharmacology of G Protein-Coupled Receptors 2008, Sydney, 2008 November 15.

M. Murakami, "X-ray structure of squid rhodopsin", International symposium on membrane proteins and high resolution X-ray structural analysis, Hyogo, 2008 September 1.

T. Kouyama, M. Murakami, K. Yoshimura and M. Yamamoto, "Crystallization of visual pigments and archaeal rhodopsins", XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Osaka, 2008 August 29.

M. Murakami and T. Kouyama, "Dimeric structure of squid rhodopsin", 13th International conference of retinal proteins, Barcelona, 2008 June 28.

T. Kouyama, M. Murakami and K. Yoshimura, "Protein-lipid interactions in 3D crystals of squid rhodopsin and archaeal rhodopsins", 13th International conference of retinal proteins, Barcelona, 2008 June 28.

M. Murakami, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin", Gordon Research Conference on "LIGAND RECOGNITION & MOLECULAR GATING", Ventura, CA, 2008 March 6.

T. Kouyama and M. Murakami, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin at 2.5 Å resolution", GPCR symposium - Frontier on Integral Membrane Proteins in Crystal Structure Determination -, Hyogo, 2008 February 26

T. Kouyama, "Crystallographic studies of squid rhodopsin and archaeal rhodopsins", Gordon Research Conference on "PHOTOSENSORY RECEPTORS & SIGNAL TRANSDUCTION", Ventura, CA, 2008 January 29

T. Kouyama, "X-ray crystallographic studies of the reaction intermediates of archaeal proton pumps", Nagoya International Symposium of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30

K. Yoshimura and T. Kouyama, "Trimeric Structure of Archaerhodopsin-2 at 2.1 Å Resolution", Nagoya International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30

N. Hayakawa, M. Murakami, T. Kasahara, D. Hasegawa and T. Kouyama, "Binding of xenon to a hydrophobic cavity in the cytoplasmic half of bacteriorhodopsin & its effect to the absorption kinetics", Nagoya International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30

M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami and T.

Kouyama, "Decay kinetics of the M intermediate of bR in 3D crystals: Influence of the crystal lattice force", Nagoya International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, 2007 November 30

T. Kouyama, "Structures and Dynamics of Archaeal Light-Driven Proton Pumps in 3D Crystals: Effect of Crystal Packing, Lattice Force and Xenon Binding", International Symposium on RETINAL PROTEINS: EXPERIMENTS AND THEORY, Bremen, Germany, 2007 September 24

K. Yoshimura and T. Kouyama, "Trimeric Structure of Archaeorhodopsin-2 at 2.1 Å Resolution", International Symposium on RETINAL PROTEINS: EXPERIMENTS AND THEORY, Bremen, Germany, 2007 September 24

K. Yoshimura and T. Kouyama, "Importance of bacterioruberin for maintaining the trimer in archaeorhodopsin-2", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10

M. Murakami and T. Kouyama, "Crystal Structure of Squid Rhodopsin", International Symposium on RETINAL PROTEINS: EXPERIMENTS AND THEORY, Bremen, Germany, 2007 September 24

N. Hayakawa, M. Murakami, T. Kasahara, D. Hasegawa and T. Kouyama, "Binding of Noble Gases to a Hydrophobic Cavity in the Cytoplasmic Half of Bacteriorhodopsin", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10

M. Murakami and T. Kouyama, "X-ray crystallographic study of squid rhodopsin", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10

M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami and T. Kouyama, "Decay kinetics of the M intermediate of bR in 3D crystals: Influence of the crystal lattice force", 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, Tokyo, 2007 September 10

村上緑、神山勉:「イカロドプシン光反応初期中間体の構造解析」, 第4回日本生物物理学会中部支部討論会、名古屋、2009年3月31日

(21) 村上緑:「イカロドプシン光異性化反応の構造解析」, シンポジウム: 名大の生物物理の生誕50周年、名古屋、2009年3月26日

(22) 竹口優、成澤明洋、井原邦夫、神山勉:「好アルカリ性好塩菌由来 *Natronomonas pharaonis* のハロロドプシンの結晶化」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(23) 神山勉:「古細菌型ロドプシンと無脊椎動物のロドプシンの構造比較」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(24) 山本昌孝、村上緑、神山勉:「バクテリオロドプシンのアルカリ pH での光誘起構造変化」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(25) 村上緑、神山勉:「イカロドプシンの X 線結晶構造解析」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(26) 井原邦夫:「古細菌型ロドプシンを発現した大腸菌の膜生理学」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(27) 柴田幹大、山下隼人、内橋貴之、山田純也、井原邦夫、神取秀樹、安藤敏夫:「バクテリオロドプシン変異体の二次元結晶構造の高速 A F M 観察」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(28) 山田純也、柴田幹大、井原邦夫、神取秀樹:「D85N 変異体を用いて解析したバクテリオロドプシンのシッフ塩基部位の水素結合構造」, 日本生物物理学会第46回年会、福岡、2008年12月3-5日

(29) 神山勉:「無脊椎動物のロドプシンおよび古細菌型ロドプシンの構造」, 第5回 GPCR 研究会、東京、2008年5月9日

(30) 村上緑、神山勉:「スルメイカロドプシンの X 線結晶構造解析」, 第8回日本蛋白質科学会年会、東京、2008年6月10-12日

(31) 吉村恵子、神山勉:「アーキロドプシン-2 の 3 量体におけるバクテリオルベリンの役割」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

(32) 早川直紀、村上緑、神山勉:「バクテリオロドプシンの疎水キャビティに結合する希ガスとその効果」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

(33) 山本昌孝、早川直紀、村上緑、神山勉:「バクテリオロドプシン 3 次元結晶の M 中間体寿命に及ぼす格子力の影響」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

(34) 村上緑、神山勉:「スルメイカロドプシンの X 線結晶構造解析」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月22日

(35) 成澤明洋、丸山恵太、竹口優、井原邦夫、神山勉:「高度好塩性アルカリ古細菌 *Natronomonas pharaonis* におけるハロロドプシンの解析」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

(36) 樋掛雅則、山本昌孝、早川直紀、井原邦夫、神山勉:「バクテリオロドプシンミュータント L93A の結晶構造解析」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

(37) 山川奈津子、真塩海里、山本昌孝、五藤俊明、神山勉:「クライオ原子間力顕微鏡による凍結割断試料の液浸観察」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月23日

(38) 藤井隆道、吉村恵子、村上緑、神山勉:「アーキロドプシン-2 の M 中間体の X 線構造解析」, 日本生物物理学会第45回年会、横浜、2007年12月21日

【図書】(計 1 件)

神山勉: 生物物理学ハンドブック、分担執筆(石渡信一、桂勲、桐野豊、美宅成樹 編)(朝倉書店)(2007)

【産業財産権】

出願状況(計 1 件)

名称: 特許権

発明者: 神山勉、村上緑

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2008-58864

出願年月日: 2008年3月9日

国内外の別: 国内

【その他】

新聞報道:

中日新聞平成 20 年 5 月 15 日朝刊

「新薬開発への鍵のタンパク、立体構造を初解明、名大教授ら、イカ使い成功」

日刊工業新聞平成 20 年 5 月 15 日

「細胞の情報伝達物質、名大、スルメイカで解明」

Nagoya University Topics, No.182, 10-11 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 勉 (Tsutomu Kouyama)

名古屋大学理学研究科・教授

研究者番号: 30170210

(2) 研究分担者

村上 緑 (Midori Murakami)

名古屋大学理学研究科・助教

研究者番号: 9025158

井原邦夫 (Kunio Ihara)

名古屋大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号: 90223297