

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370066

研究課題名(和文)レチナール蛋白質の高次構造と機能

研究課題名(英文)Higher order structure and function of retinal proteins

研究代表者

神山 勉(kouyama, tsutomu)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30170210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：アーキロドプシン2の新規の3次元結晶を作製し、1.8 Åの高分解能で構造決定を行った。クラックスロドプシンの基底状態の構造を2.1 Å分解能で決定した。デルタロドプシンの基底状態の構造を求めた。ハロロドプシンの主要な光反応中間体(L1, L2, N, N'およびO中間体)の構造データを収集し、光照射後の陰イオンの動きについての情報を得た。アザイド存在下でのハロロドプシンの光誘起構造変化を調べた。H. salinarum由来のフォボロドプシンの変異体の光反応を調べた。イカロドプシンのルミ中間体の構造を2.7 Å分解能で決定した。タコロドプシンの3次元結晶を作製した。

研究成果の概要(英文)：Archaerhodopsin-2 was crystallized and its structure was determined at 1.8 Å resolution. Cruxrhodopsin-3 was crystallized and its structure was determined at 2.1 Å resolution. Deltarhodopsin-3 was crystallized and its trimeric structure was determined at 2.7 Å resolution. The light-driven chloride ion pump halorhodopsin (pHR) from Natronomonas pharonis was crystallized, and the major photoreaction states (L1, L2, N, N' and O states) of pHR-bromide ion complex were determined at 2.2 -2.7 Å resolutions. The crystal structure of an M intermediate of pHR-azide complex was determined at 2.3 Å resolution. Various mutants of phoborhodopsin from Halobacterium salinarum were prepared and their photoreaction kinetics were investigated. The crystal structure of the Lumi state of squid rhodopsin was determined at 2.7 Å resolution. Octopus rhodopsin was crystallized by the membrane fusion method.

研究分野：生物物理

キーワード：レチナールタンパク質 プロトン輸送性ロドプシン 陰イオン輸送性ロドプシン 無脊椎動物系ロドプシン X線結晶構造解析 ハロロドプシン アーキロドプシン 反応中間体

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ロドプシン群タンパク質の静的な構造を求めるとともに、光照射により惹起され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 (BR) など光駆動プロトンポンプについての一連の研究成果を基に、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、また、タンパク質内の空隙の形態変化に着目することも重要であるとの認識に至った。これらの構造解析から導き出された概念 (空隙の形態変化→水分子の移動→機能発現) の普遍性を調べるため、光駆動イオンポンプおよび光情報レセプターとして働くロドプシン群の構造解析に取り組み、塩素イオンポンプであるファラオニス・ハロロドプシン (pHR) については、2.0 Å 分解能の立体構造を求め、プロトン輸送体との構造類似性を根拠にして「pHR = 塩酸/プロトン・対輸送体」という仮説を導いた。視物質イカロドプシンについても 2.5 Å 分解能の構造決定を行い、レチナル結合部位と G タンパク質結合部位とを結ぶ膜貫通ヘリックス間の空隙に水分子クラスターが存在することを明らかにし、ロドプシン群の機能発現におけるタンパク質内の水分子の役割の重要性を示した。一方、我々が独自に開発した膜融合法で結晶化すると、古細菌型ロドプシンの多くが、機能如何を問わず、ほぼ同型の 3 量体構造を形成していることが観測され、結晶構造の解かれたロドプシン群タンパク質の数が増えるにつれ、特殊な脂質成分がタンパク質間の隙間に結合し糊づけの役割を果たすなど、脂質-タンパク質間相互作用がタンパク質の構造 (特に高次構造) に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた。また、膜融合法で作製した BR の結晶中では EF ループにかかる結晶格子力を大きくすると M 中間体の寿命が指数関数的に増大すること、また、pHR の結晶では塩素イオンの放出 (=O 中間体の形成) に伴い結晶格子定数が大きく変動することが観測され、結晶中での構造変化の様子は溶液中とは異なる可能性も示唆された。本研究では、結晶化においてタンパク質の充填具合を自在に制御する方法を開発し、レチナルの光異性化後のタンパク質内ストレスの解放プロセスがタンパク質表面に加わる外力によりどのように影響されるかを調べるとともに、ロドプシン群タンパク質の高次構造形成と機能発現効率との相関を解析する。

2. 研究の目的

当研究グループは、膜融合法という結晶化法を開発し、7種類のロドプシン群タンパク質 (プロトンポンプ4種類、塩素イオンポンプ1種類、視物質2種類) の結晶化を成し遂げ、構造生物学的な観点からロドプシン群の機能分化について研究を進めてきた。本研究では、ロドプシン群タンパク質によるイオン輸送あるいは情報伝達の仕組みをよりよく理解するため、ロドプシン群タンパク質の表面部分に変異を加え、結晶内のタンパク質の充填具合を自在に制御 (=異なる空間群に属する結晶を作製) することを試み、結晶格子力がレチナルの光異性化後のタンパク質内ストレスの解放プロセスに及ぼす影響についての解析を推し進める。同時に、タンパク質の高次構造の光反応に伴う変形について調べ、サブユニット間の協同現象と機能発現効率との相関を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、ロドプシン群タンパク質の高次構造を破壊することなく 3次元結晶を作製する方法を改良し、結晶内でのタンパク質の充填具合を自在に制御できるようにする。結晶格子力の影響 (=大きな光誘起構造変化を抑制する) を軽減させることができれば、生理学的条件で起こっている真の構造変化をより正しく理解できるであろう。このような観点からのアプローチにより、バクテリオロドプシン (光駆動プロトンポンプ)、ハロロドプシン (光駆動塩素イオンポンプ)、および、無脊椎動物系ロドプシン (視物質) の光反応サイクルに現れるすべての反応中間体の構造決定に挑戦する。また、各サブユニットで起こる (比較的小さな) 光誘起構造変化のみならず、高次構造の構造変化 (大きな変形を伴うと想定している) も解析できる装置 (フリーズフラクチャー原子間力顕微鏡) の開発も行う。

4. 研究成果

1-1. **アーキロドプシン-2の構造解析**: アーキロドプシン 2 (aR2) は、好塩菌 *Halorubrum aus-2* の赤紫膜で見つかった唯一のタンパク質で、光駆動プロトンポンプとして機能する。その構造を高分解能で明らかにするため、赤紫膜を連続的に融合することによって新規

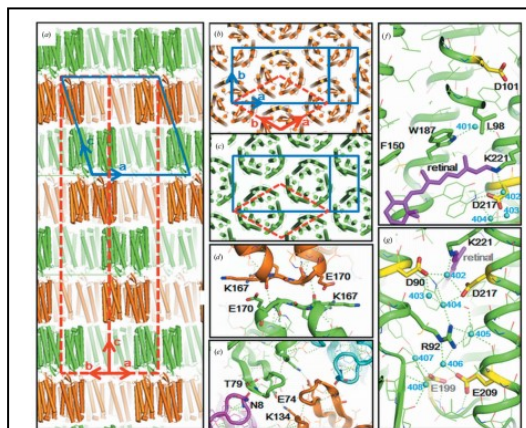


図1. アーキロドプシン-2の結晶構造

の三次元結晶を作製した。この結晶は 1.8 Å 分解能の構造解析を可能にした。解析の結果、赤紫膜が積み重ねられて構成されており、それぞれの膜において aR2 三量体が六方格子状に配置されているものの、aR3 三量体内の脂質分子の分布が完全な三回回転対称性を持たないことが示された。また、機能的に重要な残基に関する正確な構造情報を得ることができた。具体的には、プロトン放出チャネル内の 2 つのグルタミン酸が対構造を形成し、低障壁水素結合によって安定化されていることが示された。このプロトン放出経路の構造は古細菌型プロトン輸送性ロドプシンの間で保存されていると考えられる。その一方で、aR2 は以下の独特の構造的特徴を有することも分かった。i) レチナルの C13 メチル基と接触するトリプトファン残基の運動の自由度が制限されており、これが L 中間体の形成/崩壊速度に影響を及ぼす構造的要因となっている、ii) aR2 の N 末端ポリペプチド

は Ω -ループに折り畳まれ、この部分に存在する複数の疎水性の残基が aR2 の高次構造の形成に重要な役割を果たしている。

1.2. クラックスロドプシン-3 の結晶構造解析

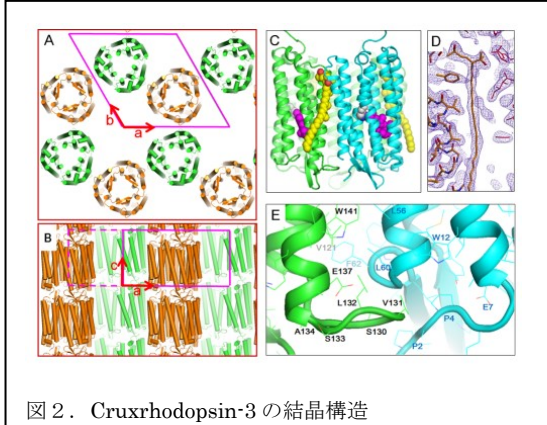


図2. Cruxrhodopsin-3 の結晶構造

Cruxrhodopsin-3 (cR3) は *Haloarcula vallismortis* の赤紫膜に見出されたレチナル・タンパク質で、光駆動プロトンポンプとして機能する。その構造の特徴を明らかにするため、膜融合法適用して空間群 P321 に属する結晶を作製した。2.1Å 分解能の回折データから、cR3 は三量体構造を形成しており、隣接するサブユニット間の隙間にはバクテリオルベリンが結合していることが示された。プロトン放出経路の構造は古細菌型のプロトン輸送性ロドプシンの中で保存されている一方で、cR3 はいくつかの構造的特徴を有していることが示された。すなわち、i) DE ループが隣接するサブユニットと相互作用し、三量体構造を強化するのに寄与してい

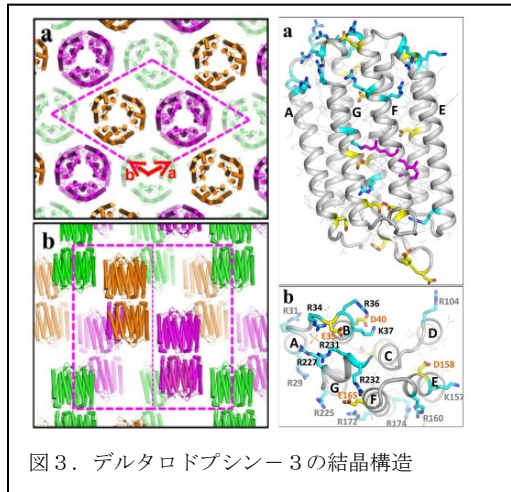


図3. デルタロドプシン-3 の結晶構造

る、ii) ヘリックス F の細胞質側半分には 3 つの正電荷を持つ残基が規則的に存在し、cR3 の高次構造に影響を与えている、iii) レチナルの細胞質側近傍の構造が柔軟性に欠けており、プロトン輸送サイクルの初期反応 (L 中間体の安定度) に影響を与えている。iv) ヘリックス E の細胞質側に突き出た部分が大きく屈曲して、プロトン取り込みプロセスに影響を与えている。また、cR3 の三量体が界面活性剤の過剰量の存在下で単量体に解離されると、レチナルの光退色が顕著となることが観測された。このことから、プロトン輸送性ロドプシンの高次構造の形成は照射下での蛋白質の構造安定性を増

強するのに役立っていると推察された。

1-3. デルタロドプシンの結晶構造解析: デルタロドプシン-3 (dR3) は高熱性好塩菌 *Haloterrigena* に見出されたプロトン輸送性ロドプシンである。膜融合法により dR3 の結晶化を試みたところ、空間群 R32 に属する結晶を作製することができた。2.7Å 分解能の構造解析の結果、dR3 はバクテリオロドプシン (bR) について観察されたように三量体構造を形成していることが示された。bR と dR3 との詳細な構造比較から、いくつかの点で違いがあることが明らかとなった。すなわち、i) 蛋白質の内側部分の構造が強く保存されているのに対して、タンパク質-タンパク質接触領域における構造が変化していて、三量体の直径に差が生じている、ii) bR とは異なり、dR3 は C 末端領域で両親媒性のヘリックスを形成し、AB および EF ループの間の空間を充填している、iii) dR3 の細胞質側表面上に正電荷を持つ残基が高密度で分布していて、この特徴から、dR3 が細胞質中の成分と特異的に相互作用している可能性が示唆された。

2) 光駆動プロトンポンプの構造解析:

2-1. ハロロドプシン-臭素イオン複合体の反応中間体の構造解析:

好アルカリ性好塩菌 *Natronomonas pharaonis* が産出する膜タンパク質ハロロドプシン (pHR) は、光駆動型陰イオンポンプとして機能する。ハロゲン化物イオンの存在下での pHR の光化学反応は $K \rightarrow L1 \rightarrow L2 \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow pHR' \rightarrow pHR$ というスキームにより説明される。この陰イオン輸送のメカニズムを解明するため、膜融合法で作製した空間群 C2 に属する結晶を用いて pHR-臭素イオン複合体の光誘起構造変化を様々な照射条件下で調べた。現在までに 5 つの反応状態の構造データを収集し、これらの構造データと時間分解吸収スペクトル変化に関するデータとを統合的に解析し、pHR の陰イオン輸送サイクルの新しいスキーム (図

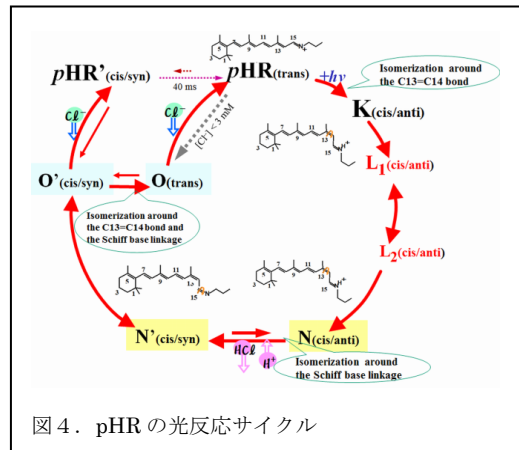
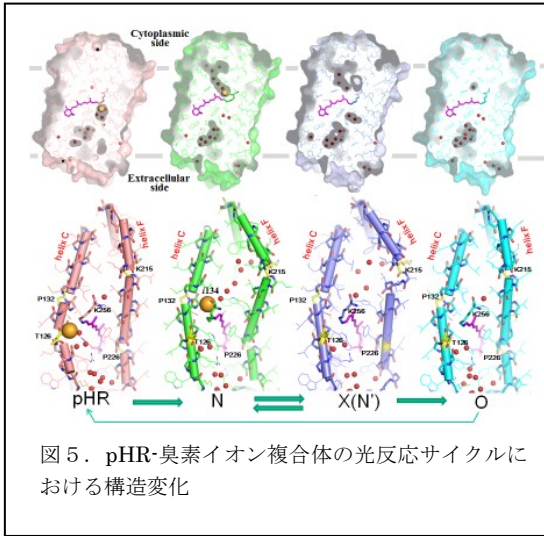


図4. pHR の光反応サイクル

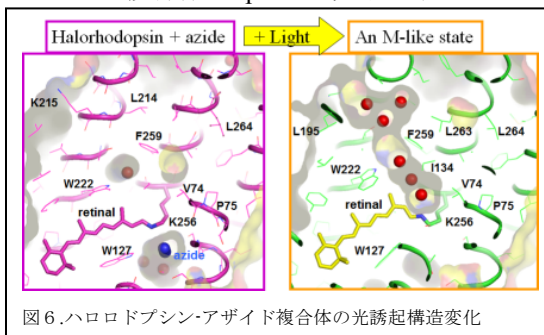
4) を提唱した。さらに、pHR の陰イオン輸送サイクルで起こる構造変化は次のように要約できることを示した (図5)。1) 照射前の静止状態では、ハロゲン化物イオンはレチナル・シッフ塩基と Thr126 の間にある陰イオン結合部位を (サイト I) に結合している。2) レチナルが 13-cis/15-anti へと光異性化した直後の状態 (L1 中間体) では、臭素イオンはサイト I 内に留まり、その重心位置は少し動くだけである。3) L1 \rightarrow L2 転移において、サイト I 内にあった臭素イオンはレチナル・シッフ塩基を横切って移動し、Ser-130 とシッフ塩基の間に形成される空隙

(サイト s130) へと移る。4) L2→N 転移では、サイト s130 にあった臭素イオンはさらに細胞質側に移動し、Ile-134 の側鎖の回転によってできる空隙 (サイト i134) へと移る。同時に、ヘリックス C の細胞外半分が変形し、サイト I が収縮する。これらの動きと連動し



て、または少し遅れて、ヘリックス F の細胞質側半分が変形し、細胞質側のヘリックス間空間に長い水チャネルが形成される。5) 次いで、サイト i134 にある臭素イオンが細胞質側の溶媒中に放出される。これと同期して、レチナルの 13-cis/15-syn 構造への異性化が起こり、プロトン化シッフ塩基は近くのアスパラギン酸 (ASP-252) と相互作用するようになる。この状態 (N' 中間体と命名) では、細胞質のヘリックス間空間はまだ開いたままである。6) N' の減衰過程で、細胞質側のヘリックス間空間が閉じられ、すこし遅れてレチナルが all-trans 構造へと再異性化し、O 中間体へと転移する。7) 反応サイクルの最後のステップ (O→始状態) で、ヘリックス C が元の構造に緩和し、臭素イオンが細胞外表面からサイト I へと取り込まれる。以上の結果を踏まえて、「ヘリックス F の細胞質側半分およびヘリックス C の中央部分がイオンの一方向の輸送に必要とされる異なる 2 種類の弁の役割を果たしている。」という概念を提唱した。

2-2. ハロロドプシン-アザイドイオン複合体の光誘起構造変化の解析：弱酸性陰イオンであるアザイドが結合したハロロドプシンに光照射すると、プロトンが細胞質側から細胞外側へ能動輸送されることが知られていた。このプロトン輸送機構を明らかにするため、アザイドを含む溶液に浸漬した C2 結晶中の pHR の光誘起構造変化を調べた。pHR-アザイド複合体を pH 9 で光照射するとレチ



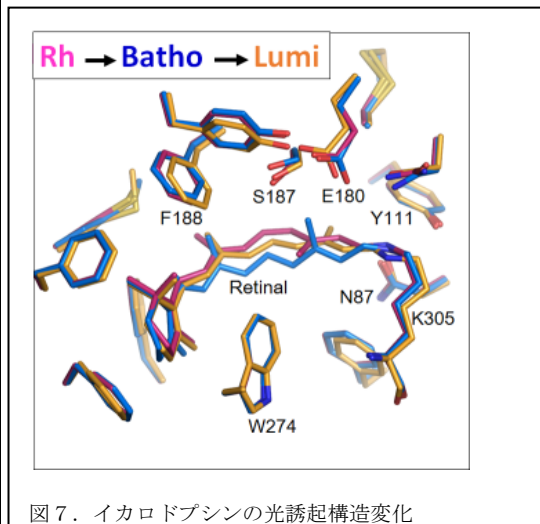
ナル・シッフ塩基が脱プロトン化した M 中間体が蓄積し、この反応状態では、i) ヘリックス F の細胞質半分が外向きに大きく (~4Å) 移動し、ii) レチナル・シッフ塩基と細胞質表面との間を結ぶ長い水チャネルが形成され、それに沿ってプロトン移動が可能になる一方で、iii) ヘリックス C の中央部分は内側向きに移動し、陰イオン結合部位 (サイト I) が収縮し、サイト I 内にあったアザイド分子はタンパク質外に放出される、という構造変化が観測された。この M 中間体の構造は pHR-臭素イオンの N 中間体のそれと極めて類似しており、この類似性から、pHR による陰イオンの細胞質側方向の能動輸送とアザイド存在下でのプロトンの細胞外側への能動輸送が基本的には共通した弁機構を利用していることが示唆された。

3) 古細菌型ロドプシンの構造機能相関の解析

Halobacterium salinarum のフォボロドプシン (spR) は好塩菌が青色光を忌避するための光センサーとして機能する。spR の構造機能相関を調べるため、spR の変異体 (D103N, D103E, T78A) を作製し、それらの光反応を調べた。その結果、spR の M 中間体の崩壊速度が wild-type < D103N < D103E < T78A の順に速くなることが分かり、この結果を基に D103 と T78 の間の水素結合が M 中間体の寿命を制御している構造因子の一つであると結論した。

4) 無脊椎動物系ロドプシンの構造解析

4-1. イカロドプシンのルミ中間体の構造解析：イカロドプシンの P62 の結晶を用いてルミ中間体の結晶構造解析を行った。100 K に保った結晶に青色光を照射することでバソ中間体を蓄積し、さらに結晶を暗中で 170 K まで温めることによりバソ中間体からルミ中間体への緩和を促した。解析の結果、i) バソ状態ではレチナルのポリエーテル鎖が大きくねじれているのに対し、ルミ中間体ではレチナルがより平面的な構造を取り、ii) このレチナルの構造緩和はシッフ塩基の NH 結合の再配向を伴い、その水素結合のパートナーは Asn185 へと切り替わる、ということが明らかになった。ウシロドプシンとは異なり、イカロドプシンの Batho-Lumi 転移においてはレチナルの β イオノン環の位置/姿勢に大きな変化が伴わないことも示された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30件)

1. T. Kouyama, H. Kawaguchi, T. Nakanishi, H. Kubo, and M. Murakami. Crystal structures of the L1, L2, N, and O States of pharaonis halorhodopsin. *Biophys. J.* **108**,2680-2790. (2015) DOI: 10.1016/j.bpj.2015.04.027
2. M. Murakami, and T. Kouyama. Crystallographic study of the LUMI intermediate of squid rhodopsin. *PLoS One* (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0126970
3. 神山勉 「膜タンパク質の立体構造解析の現状」 *パリティ*, 30, No. 01, pp.62-64. (2015) ISSN 0911-4815
4. SK. Chan, T. Kitajima-Ihara R, Fujii T, Gotoh, M. Murakami, K. Ihara, and T. Kouyama. Crystal structure of cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis* *PLoS One* 9, e108362 (2014), DOI: 10.1371/journal.pone.0108362
5. T. Kouyama, R. Fujii, S. Kanada, T. Nakanishi, SK. Chan, and M. Murakami. Structure of archaeorhodopsin-2 at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D* 70, 2692-2701 (2014), DOI: 10.1107/S1399004714017313
6. J. Zhang, K. Mizuno, Y. Murata, H. Koide, M. Murakami, K. Ihara, and T. Kouyama. Crystal structure of deltarhodopsin-3 from *Haloterrigena thermotolerans*. *Proteins* 81, 1585-1592 (2013) DOI: 10.1002/prot.24316
7. T. Nakanishi, S. Kanada, M. Murakami, K. Ihara, and T. Kouyama. Large deformation of helix F during the photoreaction cycle of pharaonis halorhodopsin in complex with azide. *Biophys J.* 104, 377-385 (2013) DOI: 10.1016/j.bpj.2012.12.018
8. J. Zhang, Y. Yamazaki, M. Hikake, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama. Crystal structure of the O intermediate of the Leu93→Ala mutant of bacteriorhodopsin *Proteins* 80, 2384-2396 (2012) DOI: 10.1002/prot.24124.
9. Y. Hiraide, K. Oshima, T. Fujisawa, K. Uesaka, Y. Hirose, R. Tsujimoto, H. Yamamoto, S. Okamoto, Y. Nakamura, K. Terauchi, T. Omata, K. Ihara, M. Hattori, Y. Fujita. Loss of cytochrome cM stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol.* 56:334-45. (2015) DOI: 10.1093/pcp/pcu165.
10. M. Kobayashi, T. Ohno, K. Ihara, A. Murai, M. Kumazawa, H. Hoshino, K. Iwanaga, H. Iwai, Y. Hamana, M. Ito, K. Ohno, and F. Horio. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS One.* 9:e96271. (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0096271.
11. S. Sato, M. Yoshida, H. Hiraide, K. Ihara, and H. Yamamoto. Transcriptome analysis of reaction wood in gymnosperms by next-generation sequencing. *American J. Plant Sci.* 5:18, (2014) DOI: 10.4236/ajps.2014.518295
12. K. Tanisawa, E. Mikami, N. Fuku, Y. Honda, S. Honda, I. Ohsawa, M. Ito, S. Endo, K. Ihara, K. Ohno, Y. Kishimoto, A. Ishigami, N. Maruyama, M. Sawabe, H. Iseki, Y. Okazaki, S. Hasegawa-Ishii, S. Takei, A. Shimada, M. Hosokawa, M. Mori, K. Higuchi, T. Takeda, M. Higuchi, & M. Tanaka. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes *BMC Genomics*, 15;14:248. (2013) DOI: 10.1186/1471-2164-14-248.
13. M. Kitaoka, T. Nishigaki, K. Ihara, N. Nishioka, S. Kojima, M. Homma. A novel dnaJ family gene, sflA, encodes an inhibitor of flagellation in marine *Vibrio* species. *J Bacteriol.* 195:816-22. (2013) DOI: 10.1128/JB.1850-12.
14. R. Aoki, T. Takeda, T. Omata, K. Ihara, Y. Fujita. A MarR-type transcriptional regulator ChlR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in cyanobacteria. *J Biol Chem.* 287:13500-7. (2012) DOI: 10.1074/jbc.M112.346205
15. K. Ogawa, S. Yamada, T. Torigoe, K. Sawada, T. Iwasa, F. Sugiyama, Y. Tada, K. Uesugi, and H. Fukuda. Electrical properties of liquid phase sensor using Rayleigh type surface acoustic wave. *J. Surf. Sci. Soc. Jap.*, 35, 319-323 (2014)
16. H. Sugimoto, N. Umeda, H. Fukuda, T. Iwasa, and K. Sawada., Analysis of the odorant binding properties of the olfactory receptor neurons in the Japanese common newt. *Jap. J. Taste Smell Res.*, 21, 437-440 (2014)
17. X. Li, Wendurige, K. Sawada, and T. Iwasa. The study on the structural changes and ligand binding of Cp-Lip1. *Jap. J. Taste Smell Res.*, 21, 415-418 (2014)
18. Wendurige, X. Li, M. Hojo, M. Ozaki, and T. Iwasa. The structure-function studies on chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*. *Jap. J. Taste Smell Res.*, 21, 419-420 (2014)
19. Yiriletu, S. Watanabe, and T. Iwasa. Magnetic bacteria as a tool for bioremediation of heavy metal ion, *Adv. Mat. Res.* 955-959, 589-592 (2014)
20. G. Dai, Chaoluomeng, and T. Iwasa. Photocatalytic degradation of phenol with bacteriorhodopsin sensitized TiO2 nanoparticles, *Adv. Mat. Res.* 955-959, 415-418 (2014)
21. Y. Kohari, Y. Okuyama, E. Kwon, T. Furuyama, N. Kobayashi, T. Otuki, J. Kumagai, C. Seki, K. Uwai, G. Dai, T. Iwasa, and H. Nakano. Enantioselective diels-alder reaction of 1,2-dihydropyridines with aldehydes using beta-amino alcohol organocatalyst. *J. Organic Chem.* 79, 9500-9511 (2014)
22. X. Li, J. Ohtsuka, K. Sawada, H. Fukuda, Y. Tada, and T. Iwasa. The role of cysteine residues in the odorant-binding proteins found in the Japanese common newt. *Jpn. J. Taste Smell Res.* 20: 351-354 (2013)
23. Y. Sugiura, A. Torii, H. Sugimoto, T. Iwasa, H. Fukuda, and K. Sawada. Odorant-binding function of amino acid residues of the barrel structure of odorant-binding protein Cp-Lip1. *Jpn. J. Taste Smell Res.* 20: 359-362 (2013)
24. R. Suzuki, Y. Sugiura, A. Torii, H. Sugimoto, T. Iwasa, H. Fukuda, and K. Sawada. Role of amino acid residues locating at the entrance of barrel structure of Cp-Lip1 in odorant binding. *Jpn. J. Taste Smell Res.* 20: 355-358. (2013)
25. H. Sugimoto, Y. Sugiura, T. Iwasa, H. Fukuda, and K. Sawada. Effect of Cp-Lip1 on odorant response in the olfactory epithelium of the Japanese common newt. *Jpn J Taste Smell Res.* 20: 373-376. (2013)
26. G. Dai, L. Liu, Q. Ouyang, Chaoluomeng, and T. Iwasa. Isolation and genetic characterization of phenol-degradating bacterium

- from a salt lake in Inner Mongolia. *Advanced Materials Research*, 726-731:396-400. (2013)
27. W. Yu, T. Kuzuya, S. Hirai, Y. Tamada, K. Sawada, and T. Iwasa. Preparation of Ag nanoparticle dispersed silk fibroin compact. *Applied Surface*, 262, 212-217 (2012)
28. CL. Meng, G. Dai, and T. Iwasa. Identification of microbial rhodopsin genes from salt lake in Inner Mongolia. *Advanced Materials Research*, 518-523, 380-383 (2012)
29. Y. Sugiura, H. Sugimoto, T. Takahashi, K. Sawada, and T. Iwasa. Identification of amino acid residue involved in binding with the odorant molecule in Cp-Lip1. *Jpn. J. Taste Smell Res.* 19, 429-432 (2012).
30. H. Sugimoto, K. Sawada, and T. Iwasa. In situ Ca²⁺ imaging of odorant response in the olfactory epithelium of the Japanese common newt. *Jpn. J. Taste Smell Res.* 19, 437-440 (2012)

[学会発表] (計 41 件)

1. S. K. Chan, "Recent crystallographic studies on archaeal light-driven proton pump", IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2015 : Spins in Action, Nagoya, Mar 26-27, 2015
2. 神山勉, "プロトン輸送性ロドプシンにおける低障壁水素結合の役割", 日本物理学会第 70 回年次大会, 東京, 2015 年 3 月 21-24 日
3. 村上緑, 神山勉, "イカロドプシンの光異性化—熱的緩和反応の結晶構造解析", 日本物理学会第 70 回年次大会, 東京, 2015 年 3 月 21-24 日
4. S. K. Chan, T. Kitajima, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "Higher order structure of cruxrhodopsin from *Haloarcula vallismortis* and its photostability", 生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2015 年 3 月 10 日
5. 村上緑, 神山勉, "イカロドプシンの p62 結晶における光異性化から熱緩和までの構造変化", 生物物理学会中部支部会, 岡崎, 2015 年 3 月 10 日
6. T. Kouyama, "Conformational changes in helices C and F of pharaonis halorhodopsin during the ion pumping cycle", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
7. S. Uyama, T. Kitajima-Ihara, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "A chimeric proton-pumping rhodopsin designed for crystallographic analysis of light-induced structural changes", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
8. H. Kawaguchi, T. Nakanishi, M. Murakami, T. Kouyama, "Crystallographic study on the N state of pharaonis halorhodopsin", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
9. S. K. Chan, T. Kitajima-Ihara, M. Murakami, K. Ihara, T. Kouyama, "Crystal structure of cruxrhodopsin-3 from *Haloarcula vallismortis*", 16th International Conference on Retinal Proteins, Nagahama, October 5 - 9, 2014
10. M. Murakami, T. Kouyama, "New crystal forms of squid rhodopsin", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌, 2014 年 9 月 25-27 日
11. 村上緑, 神山勉, "発色団を導入したイカロドプシン結晶の吸光特性", 日本物理学会第 69 回年次大会, 平塚, 2014 年 3 月 27-30 日
12. 村上緑, 神山勉, "Trapping the photoactive form of squid rhodopsin in the P62 crystal", 日本生物物理学会第 51 回年会, 京都, 2013 年 10

- 月 28-30 日
13. 神山勉, "ロドプシン群蛋白質の光誘起構造変化に関する X 線結晶解析", 日本生物物理学会第 51 回年会, 京都, 2013 年 10 月 28-30 日
 14. 村上緑, 神山勉, "X 線結晶構造から観るイカロドプシンの光反応初期過程", 日本物理学会第 68 回年次大会, 広島, 2013 年 3 月 26-29 日
 15. M. Murakami and T. Kouyama, "Crystal structure of the lumi intermediate of squid rhodopsin", 15th International Conference on Retinal Proteins, Ascona, September 30 - October 05, 2012
 16. T. Kouyama, T. Nakanishi, S. Kanada, M. Murakami, K. Ihara, "Crystal structure of an M state of the azide complex of pharaonis halorhodopsin", 15th International Conference on Retinal Proteins, Ascona, September 30 - October 05, 2012
 17. 村上緑, 神山勉, "Photo-activation mechanism of squid rhodopsin", 日本生物物理学会第 50 回年会, 名古屋, 2012 年 9 月 22 日-9 月 24 日
 18. T. Kouyama, "X-ray crystallography of retinal proteins", IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2012, Nagoya, 2012 September 4-5
 19. 他 23 件

[図書] (計 3 件)

1. 井原邦夫, 神山勉: 「光駆動性塩素イオン輸送タンパク質ハロロドプシンの構造」、オプトジェネティクス (光遺伝学) - 光工学と遺伝子による行動制御技術の最前線 - エヌ・ティー・エス (2012)
2. 村上緑: 「多様化するロドプシンの構造と機能、その応用」、日本の結晶学 (II) - その輝かしい発展 -、日本結晶学会「日本の結晶学 (II)」出版編集委員会編, 日本結晶学会, pp.336(2014)
3. 岩佐達郎, 澤田研: 「室蘭工大 未来をひらく技術と研究」北海道新聞社発行「生物に学ぶ においセンサー」 pp.141-148 (2014) 国立大学法人 室蘭工業大学編

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 勉 (KOUYAMA Tsutomu)
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 (MURAKAMI Midori)
名古屋大学・理学研究科・助教
研究者番号: 20324387

井原 邦夫 (IHARA Kunio)
名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授
研究者番号: 90223297

岩佐 達郎 (IWASA Tatsuo)
室蘭工業大学・工学部・教授
研究者番号: 00133926