機能性抗体を用いたアデノシン A_{2A} 受容体の結晶構造解析

鳥取大学大学院工学研究科 日野智也

京都大学大学院医学研究科 岩田 想

千葉大学大学院理学研究科 村田武士

Tomoya HINO, So IWATA and Takeshi MURATA: Crystal Structure Analysis of Adenosine A_{2A} Receptor in Complex with Functional Antibody Fragment

G protein coupled receptors (GPCR) are involved in a wide variety of physiological functions, and thus are the targets for most of today's medicine. Here we report the raising of a monoclonal antibody against human adenosine A_{2A} receptor that works as strong inverse agonist, and describe the crystal structure of the receptor in complex with the antibody fragment. The structure reveals that the antibody specifically recognizes the intracellular surface of the receptor in an inactivated state so as to inhibit the structural changes to the active conformation. Our results suggest a new strategy to modulate the activity of GPCR.

1. はじめに

すべての生物は、外部の環境に依存して生きている。したがって外部環境情報を速やかに感知することは生命の恒常性を維持するうえで必要不可欠である。また、多細胞生物では細胞間の情報のやり取り（コミュニケーション）が整然と行われることにより、細胞の集合体としての組織あるいは個体が1つの生命体として機能している。いずれの場合も、細胞外に存在する情報を正確に細胞内へと伝達することが求められる。生物の基本単位である細胞は生体膜によって、自らと外界を分け隔てており、細胞外部の環境情報、ホルモンや情報伝達物質などによる細胞間コミュニケーションは、生体膜を介して行われなければならない。このような情報伝達において主要な役割を果たすのがGタンパク質共役型受容体（GPCR）である。GPCRは7本の膜貫通 α ヘリックスを基本構造とし、細胞外の情報分子を受容すると、細胞内表面構造の大きな変化を引き起こし、細胞内に存在する三量体型Gタンパク質を活性化することによって細胞内へと情報を伝達する。ヒトゲノムでは約800種のGPCRがコードされていると見積もられており、視覚、味覚、嗅覚、心拍数の調節、平滑筋の弛緩や収縮などきわめて多種多様かつ重要な生理機能にかかわっている。そのため、現在市販されている医薬の約半数がGPCRを標的としており、創薬において最も重要な膜タンパク質となっている。近年、副作用が少なく、効果の高い薬剤の設計・改良のために、医薬標的となるタンパク質の立体構造に基づいた合理的な創薬開発が有効であることが示されている。しかしながらGPCRでは、(1)大きな構造変化が機能に直結しているため熱安定性が低い、(2)大

部分が膜に埋もれており、結晶化のためのタンパク質間相互作用に与る親水性表面が著しく狭い、(3)フレキシブルなループ領域を多数含む、などの理由により膜タンパク質の中でも結晶化がきわめて困難であり、X線結晶構造解析は遅れていた。2007年、B. KobilkaとR. Stevensらはヒト・アドレナリン受容体の細胞内第3ループ(ICL3)にT4リゾチーム(T4L)を融合することにより、受容体を熱安定化させるのと同時に親水性表面を拡張し、キュービク液晶法と呼ばれる方法で結晶化し、X線結晶構造解析に成功した。^{1,2)} それ以降、同様の手法を用いて、アデノシン受容体³⁾ やドーパミン受容体⁴⁾ ケモカイン受容体⁵⁾ ヒスタミン受容体⁶⁾ アセチルコリン受容体^{7,8)} オピオイド受容体⁹⁻¹²⁾ などの結晶構造が続々と得られている。またB. Kobilkaらは、ラマ（ラクダ科）からアドレナリン受容体の立体構造を認識する一本鎖抗体（Nanobody）を作製し、活性型受容体構造を得ることに成功した。¹³⁾ さらに、アドレナリン受容体とGタンパク質との複合体構造を安定化するNanobodyを作製し、その共結晶構造解析に成功した。¹⁴⁾ これらの成果により、2012年のノーベル化学賞はB. Kobilka（とGPCR分子の同定に成功したR. Lefkowitz）に授与された。

一方、筆者らは2006年以来GPCRの結晶化を促進する手段として、親水性表面の大幅な拡張が可能であるマウス抗体Fabフラグメントを用いた結晶化手法に着目し（図1）、従来困難であったGPCRに対する抗体の効率的作製手法の開発を進めてきた。そして、ヒト由来アデノシンA_{2A}受容体を不活性構造に固定する機能性抗体を作製し、受容体-抗体フラグメント（Fab）の共結晶構造解析を明らかにした。¹⁵⁾ 本稿では、抗体を用いた膜タンパク質結晶

表1 抗体を用いて構造解析された膜タンパク質。(List of membrane protein structures which was solved by utilizing an antibody fragment.)

PDB ID	膜タンパク質名	抗体	分解能	由来	膜貫通回数
1EZV	Cytochrome c oxidase	Fv	2.8	<i>P. denitrificans</i>	22
1K4D	Cytochrome bc ₁ complex	Fv	2.3	<i>S. cerevisiae</i>	12
1K4D	KcsA K ⁺ channel	Fab	2.0	<i>S. lividans</i>	2
1OTS	ClC H ⁺ /Cl ⁻ antiporter	Fab	2.5	<i>E. coli</i>	12
1ORQ	KvAP K ⁺ channel, full length	Fab	3.2	<i>A. permix</i>	6
1ORS	KvAP K ⁺ channel, ion channel domain	Fab	1.9	<i>A. permix</i>	4
2A0L	KvAP K ⁺ channel, full length	Fv	3.9	<i>A. permix</i>	6
2R4R	β 2 adrenergic receptor	Fab	3.4	<i>H. sapiens</i>	7
2ZJS	Sec YE translocon	Fab	3.2	<i>T. thermophiles</i>	11
2ZUQ	DsbB Disulfide formation	Fab	3.3	<i>E. coli</i>	4
3EFF	KcsA K ⁺ channel, Full length	Fab	3.8	<i>S. lividans</i>	2*2
3HQK	AdiC Arg/Agmatine antiporter	Fab	3.2	<i>S. enterica</i>	12*2
3GI9	ApcT Amino acid transporter	Fab	2.5	<i>M. janaschii</i>	12
3OOR	Nitric oxide reductase	Fab	2.7	<i>P. aeruginosa</i>	13
3POG	β 2 adrenergic receptor, agonist bound	VHH	3.5	<i>H. sapiens</i>	7
3SN6	β 2 adrenergic receptor, Gs complex	VHH	3.2	<i>H. sapiens</i>	7
3RHW	GluCl Glu gated Cl channel	Fab	3.26	<i>C. elegans</i>	4
3TT1	LeuT Leucine transporter, outward open	Fab	3.1	<i>A. aeolicus</i>	12
3TT3	LeuT Leucine transporter, inward open	Fab	3.22	<i>A. aeolicus</i>	12
3VG9	A _{2A} adenosine receptor	Fab	2.7	<i>H. sapiens</i>	7

図1 抗体を用いたGPCRの結晶化。(Strategy for GPCR crystallization utilizing antibody fragment.)

化の現状や、筆者らが開発したGPCRの結晶性を向上させる抗体の作製法および得られた共結晶構造について紹介する。

2. 抗体を用いた膜タンパク質の結晶化

GPCRをはじめとする膜タンパク質は生体膜に埋もれた形態で機能を発揮する。したがって、膜タンパク質を精製・結晶化するためには、まず界面活性剤を用いて生体膜より可溶化しなければならない。この際、界面活性剤は膜タンパク質の膜貫通領域を覆う形でミセルを形成する。膜タンパク質は、界面活性剤ミセルとの複合体として精製され、そのままの形態を保ちつつ結晶化を行う必要がある。通常、膜タンパク質の可溶化に用いる界面活性剤ミセルの分子量は、その種類にもよるが、およそ30～50 kDaにもなり、小型の膜タンパク質では、タンパク質部分よりも大きな体積を占めることになる。そのため、膜タンパク質—界面活性剤ミセル複合体を結晶化するには、ミセル間の立体障害を生じやすく、結晶化に望ましいタンパク質間相互作用が形成できないという、結晶化における本質的な困難が存在するのである。

この問題を解決する方法の1つとして、本稿の著者の一人である岩田らは構造解析の標的となる膜タンパク質に対し、特異的に結合するモノクローナル抗体を作製し、抗体の可変領域ドメインを膜タンパク質に結合させることで親水性領域を人工的に拡張する手法を開発した(図1)。この方法では、界面活性剤ミセルの大きさをタンパク質部分に対し相対的に減少させ、さらに結晶化が比較的容易な抗体をあたかも糊しろとして用いることが可能なため、膜タンパク質単独での結晶化よりも結晶形成確率が高く、また、結晶の質の向上も期待できる。われわれは、このような抗体について結晶化を促進する配位子という意味で「結晶化リガンド」と呼んでいる。この手法を用いることで、1995年にバクテリア由来の好気呼吸酵素であるチトクロム酸化酵素と抗体Fvフラグメントの共結晶構造解析に成功した¹⁶⁾。この共結晶構造では、膜タンパク質間の相互作用は皆無であり、抗体間での相互作用が結晶格子形成の決定的要因であった。その後、さまざまな研究グループがこの手法を用いてイオンチャネルや膜輸送体など、多くの重要な膜タンパク質での成功例を報告した(表1)。この表からもわかるように、抗体を用いた膜タンパク質の結晶化法は、対象とする膜タンパク質の大きさや構造、生物種や膜貫通回数に制限がなく、原理的にはどのような膜タンパク質にも適用可能な優れた方法である。

しかしながら、膜タンパク質に結合するどのような抗体でも結晶作製が可能となるかといえば、そうではない。例えば、市販されているようなウェスタンブロッティングで使用可能な変性した膜タンパク質に結合する抗体では、N末端やC末端、あるいは特定の構造をもたないフレキシブルなループ領域を認識している。この場合、膜タンパク

質と抗体の間に相対的な揺らぎが存在する可能性が高く、膜タンパク質-抗体複合体が結晶格子を安定して形成するには不向きである。これに対し、膜タンパク質の特定の立体構造を認識して結合する抗体であれば、膜タンパク質-抗体複合体は、全体として揺らぎの少ない親水性領域の大きな膜タンパク質として扱うことが可能となるため、結晶化は容易になると予想される。実際にこれまでに構造決定に成功した抗体のほとんどは、一連のアミノ酸配列を認識する（配列認識抗体）のではなく、とびとびのアミノ酸残基、すなわち立体構造を認識していた（立体構造認識抗体）。このような立体構造を認識して結合する抗体を得ることが、膜タンパク質の結晶化を促進するうえで重要であるが、果たしてどのようにすればそのような結晶化リガンドとして機能する抗体が効率良く得られるのであろうか？

以下に、われわれが開発した GPCR の立体構造認識抗体を効率的に選別するための一連の技術要素を記載した。

3. アデノシン A_{2A} 受容体と機能性抗体の結晶構造解析

3.1 アデノシン A_{2A} 受容体に対する立体構造認識抗体の作製

従来の膜タンパク質に対する抗体作製方法では、抗原として部分オリゴペプチドや界面活性剤によって可溶化した精製標品をマウスなどに免疫する場合がほとんどであった。しかしながらこの方法では、膜タンパク質の結晶化に適した立体構造を認識する抗体を得ることは難しい。なぜなら、部分オリゴペプチド免疫ではその部分に結合する配列認識抗体しか得られないし、精製標品免疫では、血中で界面活性剤が希釈され、精製膜タンパク質はただちに変性してしまうため、得られる抗体は変性した構造を認識するものが大半となる。この難点を回避するために、筆者らは目的膜タンパク質を未変性のままりポソームに高密度で再構成し、それをマウスに免疫する技術（リポソーム免疫法）を開発した。また、自然免疫にかかわる Toll 様受容体 4 に作用し免疫活性を高めるグラム陰性細菌由来の脂質成分である Lipid A をリポソームに加えることや、免疫不全マウスを免疫に用いることにより、免疫寛容も起こらず、効率良くは乳類由来膜タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製することが可能となった。さらに、スクリーニングにおいても、再構成リポソームを用いた ELISA（Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay）法を新たに開発することにより、抗体作製が難しいとされていたヒト由来 GPCR においても、1 匹のマウスから 100 種類を超える陽性クローンを取得できるようになった。

抗体を結晶化リガンドとして活用するためには、立体構造認識抗体を選別することが必要不可欠である。リポソーム ELISA による抗体のスクリーニングでは、リポソーム中で膜タンパク質は立体構造を保っているため立体構造

認識抗体が得られる可能性が高いが、天然構造におけるフレキシブルな領域に結合する抗体も当然含まれている。このうち、後者は配列認識抗体に当たるので、変性した抗原にも結合すると考えられる。そこで、リポソーム ELISA から選抜された抗体に対し、SDS で変性させた膜タンパク質を抗原としたドットブロッキングを行い、リポソーム ELISA のシグナルと比較することで、天然構造は認識するが変性構造には結合しない、すなわち、立体構造認識抗体をスクリーニングする技術を構築した。以上の免疫-スクリーニング技術を組み合わせることで、ヒト由来アデノシン A_{2A} 受容体に対する立体構造認識抗体を 24 クローン得ることができた。

3.2 C2838 抗体はアデノシン A_{2A} 受容体に対する強力な逆作動薬として機能する

立体構造認識抗体は、標的とするタンパク質が機能する際の動きを固定化することにより、その機能を阻害する可能性があることが知られている。今回筆者らが得た抗体についても、アデノシン A_{2A} 受容体に対する機能性評価をラジオリガンド結合アッセイ法により行った。その結果、24 クローンの抗体のうち 8 クローンは、アデノシン A_{2A} 受容体のアンタゴニスト（拮抗薬）である ZM241385 への結合親和性はまったく変化させなかったが、一方で高親和性アゴニスト（作動薬）である NECA の結合親和性を大きく低下させる機能をもつことがわかった。特に、クローン C2838 抗体は NECA の結合を 400 倍以上も低下させた。このことは、C2838 抗体がアデノシン A_{2A} 受容体の強力なインバースアゴニスト（逆作動薬）として機能することを意味する。また、抗体結合時のアデノシン A_{2A} 受容体の熱安定性評価を行ったところ、抗体非存在下と比較して高い熱安定化効果を得られることがわかった。以上のことから、C2838 抗体はアデノシン A_{2A} 受容体の不活性型構造を認識して結合し、その構造を強く安定化させることにより、アゴニストの結合を阻害することが予測された。

3.3 アデノシン A_{2A} 受容体-機能性抗体複合体の結晶化

C2838 抗体を Fab フラグメント化し、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現させたアデノシン A_{2A} 受容体との複合体を調製後、結晶化を行ったが、最初のスクリーニングではまったく結晶は得られなかった。そこで、精製手順やゲルろ過での抗体結合量、界面活性剤の種類の検討などを行ったところ、ゲルろ過を 2 回行うことで結晶が再現性良く得られるようになった。1 度のゲルろ過ではまったく結晶は得られず、また 3 度以上ゲルろ過を行った場合でも結晶は得られるが再現性が低くなることから、精製したアデノシン A_{2A} 受容体に含まれる脂質の量の違いが結晶化に影響を与えたものと予想している。同じように、ラクトース輸送体 LacY では、脂質含量によって結晶系や分解能が大きく異なること¹⁷⁾や、チトクロム b6f 複合体では脂質の添加が必須であったこと¹⁸⁾などからも、

図2 アデノシン A_{2A} 受容体と機能性抗体の複合体結晶.
(Crystals of adenosine A_{2A} receptor in complex with functional antibody fragment.) (a) 最適化前の結晶, (b) OTG を添加した結晶.

図3 アデノシン A_{2A} 受容体と機能性抗体の空間群 C2 結晶中でのパッキング. (Crystal packing of Adenosine A_{2A} receptor-antibody complex in a C2 space group.) c 軸方向からの表示. 単位胞を黒枠で示した.

膜タンパク質の結晶化においては精製した膜タンパク質に結合している脂質の量をコントロールすることが質の良い結晶を得るうえで重要であることがわかる.

しかしながら, この段階では, 得られた結晶の外形は丸みを帯び (図 2a), X 線回折像は強い異方性を示していたため, 構造決定には至らなかった. そこで, さまざまな添加剤を加えて結晶化してみたところ, 比較的小さなミセルを形成する界面活性剤を添加した場合に, 結晶の外形はシャープなエッジを形成するようになり (図 2b), 特にオクチルチオグルコシド (OTG) を用いることで, 比較的良好な結晶を得ることができるようになった.

3.4 アデノシン A_{2A} 受容体-機能性抗体の結晶構造解析

得られた結晶サイズは 50 μm 程度のものから大きなものでは 500 μm 程度まで成長したが, 高分解能を示すのは単結晶のごく一部に限られていた. そこで放射光施設 Diamond Light Source のマイクロフォーカスビーム (I24)

図4 アデノシン A_{2A} 受容体-抗体複合体の全体構造.
(Overall structure of adenosine A_{2A} receptor-antibody fragment complex.)

を用いて Grid Scan することにより良質の回折像のみを回収し, 分解能 2.7 $\text{\AA}$ で構造決定することができた. 結晶中では, アデノシン A_{2A} 受容体は逆平行 2 量体を形成し, この 2 量体が抗体間の相互作用で連結されたパッキングとなっていた (図 3). 予想されたように, 結晶格子形成にかかわる相互作用はその大部分が抗体間によるものであったが, 特に, アデノシン A_{2A} 受容体の細胞外側表面はほかのタンパク質分子との相互作用が皆無であり, 結晶化によるアーティファクトが少ない天然状態を反映する構造と考えられた.

アデノシン A_{2A} 受容体-Fab2838 複合体の全体構造を図 4 に示す. アデノシン A_{2A} 受容体の全体構造は, すでに報告されている T4L 融合アデノシン A_{2A} 受容体と酷似していたが, T4L 融合体には欠損していた G タンパク質との相互作用に重要な寄与をすると予想されている細胞内第 3 ループ (ICL3) の構造を, 今回新たに明瞭な電子密度で解釈することができた (図 5).

GPCR のヘリックス III には, Asp (Glu)-Arg-Tyr からなる D/ERY モチーフが高度に保存されている. 2000 年に報告されたウシのロドプシンの結晶構造¹⁹⁾ から, D/ERY モチーフの Arg は, ヘリックス VI の Glu と Ionic lock と呼ばれる塩橋を形成し, 不活性型構造の安定化に寄与すること

が明らかにされた。一方、これまでに構造決定されたアデノシン A_{2A} 受容体を含む T4L 融合型 GPCR の不活性型構造^{3,7)}では、ドーパミン D3 受容体を除き、Ionic lock の形成は認められなかった。これらに対し、今回筆者らが解明した ICL3 を含むアデノシン A_{2A} 受容体の結晶構造では、Ionic lock に相当する Arg102 と Glu228 は水分子を介して相互作用していた (図6)。この改変型 Ionic lock には抗体の超可変領域の1つである CDR-H3 も水分子を介した相互作用に関与しており、抗体結合によりヘリックス III と VI の相互作用は強く保たれていた。また、最近報告された熱安定化変異を導入したアデノシン A_{2A} 受容体の結晶構造²⁰⁾では、Arg102 と Glu228 の直接的な相互作用が確認されており、筆者らの抗体結合型構造においては、CDR-H3 が ionic lock の近傍に結合することにより、異なった形

図5 細胞内第3ループの電子密度図。(Electron density map of intracellular loop 3 of adenosine A_{2A} receptor.)

図6 水分子と抗体を介した Arg102 と Glu228 の相互作用。(Water mediated interaction between Arg102 and Glu228.) アデノシン A_{2A} 受容体を薄いグレーのリボンモデルで、抗体の CDR H3 を濃いグレーのスティックモデルで示した。

の相互作用が形成されたものと予想される。

抗体フラグメント (Fab2838) はアデノシン A_{2A} 受容体の細胞内側表面を幅広く認識するように結合していた。特に、CDR-H3 は長く伸びた β ヘアピン構造を形成し、アデノシン A_{2A} 受容体の膜貫通ヘリックス II, III, VI, VII で形成されるポケットに突き刺さる特徴的な相互作用を示し、水素結合や van der Waals 結合により強固に結合していた。抗体全体では、すべての CDR ループがアデノシン A_{2A} 受容体と相互作用し、全部で 14 個の水素結合によって非常に安定な複合体を形成していた。

興味深いことに、CDR-H3 は活性型オプシンに結合した G タンパク質 α サブユニットの C 末端ペプチド (G α CT)²⁰⁾ や β 2 アドレナリン受容体の活性型構造を安定化するナノボディ Nb80 の CDR-3¹³⁾ とよく似た位置に結合していた。しかし、Fab2838 では不活性型構造を安定化するのに対し、G α CT と CDR-3 は活性型構造を安定化する。G α CT および CDR-3 はヘリックス II, III, V, VI, VII により形成される大きなポケットにはまり込み、D/ERY モチーフの Arg と相互作用していた。一方、Fab2838 の CDR-H3 はこれらと比較して 6 Å 程度ヘリックス II へ近づき、ヘリックス VI とヘリックス III の相対配置を固定化し、ヘリックス VI の構造変化を阻害することにより不活性型構造を安定化していることが示唆された。

4. 機能性抗体によるアデノシン A_{2A} 受容体の不活性化機構

細胞外側からアゴニストが GPCR に結合することによりヘリックス III, VI, VII などの大きな構造変化が誘起され、これにより細胞内側の G タンパク質結合ポケットが形成され、シグナルが伝わると考えられている。本研究により、細胞内側の構造を不活性型に固定することにより細胞外側からアゴニストが結合できない構造に固定されることが明らかとなった。では、どのようにしてアゴニストが完全に結合できなくなってしまったのだろうか？そこで、アゴニストが結合した活性型 T4L 融合アデノシン A_{2A} 受容体²⁰⁾ と構造を比較した。アゴニスト結合に伴い、活性化のトグルスイッチと呼ばれているヘリックス VI の Trp246 は、細胞内側に移動し、十分なアゴニスト結合ポケットが生じるのに対し、不活性型構造ではこのトグルスイッチとアゴニストの一部であるリボースと立体障害を生ずる位置に存在することが予測された (図7)。つまり、CDR-H3 によりヘリックス III, VI, VII の細胞内側構造が固定化されると、Trp246 を含む細胞外側のリガンド結合部位の構造変化が阻害されてしまうため、立体障害によりアゴニストの結合親和性が著しく低下すると考えられた (図8)。以上の結果から、本抗体はアロステリック逆作動薬 (インバースアゴニスト) 活性をもつ機能性抗体であることが明らかになった。

図7 アデノシン A_{2A} 受容体の不活性型構造とアゴニスト (UK-432097) 結合型構造の重ね合わせ図。(Superimposition of inactivated conformation and agonist bound conformation of adenosine A_{2A} receptor.) 薄いグレーは不活性型構造であり, 濃いグレーはアゴニスト結合型構造である。アゴニストは空間充填モデルで示した。

図8 抗体結合によるアデノシン A_{2A} 受容体不活性化機構。(Schematic diagram of adenosine A_{2A} receptor inactivation induced by binding of functional antibody.) 抗体の結合により細胞内側部分が不活性型構造に固定されると, リガンド結合部位のアゴニスト結合に伴う構造変化が抑制されるため, アゴニストの結合が阻害される。

5. おわりに

今回, 膜タンパク質一般に適用可能な立体構造認識抗体の効率的な作製法を開発することにより, ヒト由来アデノシン A_{2A} 受容体とインバースアゴニスト活性を有する抗体との複合体結晶構造を解くことに成功した。その結果, GPCR の活性化に伴う細胞内側の構造変化を抑制することで, GPCR のアゴニストへの結合親和性を著しく低下さ

せられることが明らかとなった。このことは, リガンド結合部位を含む細胞外表面構造だけでなく, 細胞内表面構造も薬剤標的部として有効であることを示唆する。今後, これまでとはまったく異なる新しい薬剤の開発へと繋がることを期待される。また, 本研究を通して開発した抗体作製技術は, GPCR に限らずさまざまな膜タンパク質の機能を解析するうえできわめて有用なツールとなる可能性がある。例えば, 過渡的な構造変化を捕捉するような抗体を作り出し, その結晶構造を解くことで, 膜タンパク質のダイナミクスに迫ることができるであろう。今まで技術的に困難であった, 膜タンパク質の動的構造解析へと繋がることを期待したい。

文 献

- 1) V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka and R. C. Stevens: *Science* **318**, 1258 (2007).
- 2) D. M. Rosenbaum, V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens and B. K. Kobilka: *Science* **318**, 1266 (2007).
- 3) V. P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman and R. C. Stevens: *Science* **322**, 1211 (2008).
- 4) E. Y. Chien, W. Liu, Q. Zhao, V. Katritch, G. W. Han, M. A. Hanson, L. Shi, A. H. Newman, J. A. Javitch, V. Cherezov and R. C. Stevens: *Science* **330**, 1091 (2010).
- 5) B. Wu, E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov and R. C. Stevens: *Science* **330**, 1066 (2010).
- 6) T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G. W. Han, T. Kobayashi, R. C. Stevens and S. Iwata: *Nature* **475**, 65 (2011).
- 7) K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga and T. Kobayashi: *Nature* **482**, 547 (2012).
- 8) A. C. Kruse, J. Hu, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, J. Wess and B. K. Kobilka: *Nature* **482**, 552 (2012).
- 9) H. Wu, D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, W. Liu, A. A. Thompson, X. P. Huang, F. I. Carroll, S. W. Mascarella, R. B. Westkaemper, P. D. Mosier, B. L. Roth, V. Cherezov and R. C. Stevens: *Nature* **485**, 327 (2012).
- 10) A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka and S. Granier: *Nature* **485**, 321 (2012).
- 11) S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis and B. K. Kobilka: *Nature* **485**, 400 (2012).
- 12) A. A. Thompson, W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X. P. Huang, C. Trapella, R. Guerrini, G. Calo, B. L. Roth, V. Cherezov and R. C. Stevens: *Nature* **485**, 395 (2012).
- 13) S. G. Rasmussen, H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis and B. K. Kobilka: *Nature* **469**, 175 (2011).
- 14) S. G. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H.

- Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara and B. K. Kobilka: *Nature* **477**, 549 (2011).
- 15) T. Hino, T. Arakawa, H. Iwanari, T. Yurugi-Kobayashi, C. Ikeda-Suno, Y. Nakada-Nakura, O. Kusano-Arai, S. Weyand, T. Shimamura, N. Nomura, A.D. Cameron, T. Kobayashi, T. Hamakubo, S. Iwata and T. Murata: *Nature* **482**, 237 (2012).
- 16) S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel: *Nature* **376**, 660 (1995).
- 17) L. Guan, I. N. Smirnova, G. Verner, S. Nagamori and H. R. Kaback: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **103**, 1723 (2006).
- 18) H. Zhang, G. Kurisu, J. L. Smith and W. A. Cramer: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5160 (2003).
- 19) K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano: *Science* **289**, 739 (2000).
- 20) P. Scheerer, J. H. Park, P. W. Hildebrand, Y. J. Kim, N. Krauss, H. W. Choe, K. P. Hofmann and O. P. Ernst: *Nature* **455**, 497 (2008).
- 21) F. Xu, H. Wu, V. Katritch, G. W. Han, K. A. Jacobson, Z. G. Gao, V. Cherezov and R. C. Stevens: *Science* **332**, 322 (2011).

プロフィール

日野智也 Tomoya HINO
鳥取大学大学院工学研究科
Graduate School of Engineering, Tottori University
〒680-8552 鳥取県鳥取市湖山町南4-101
4-101 Koyama-cho minami, Tottori, Tottori 680-8552, Japan
e-mail: t_hino@bio.tottori-u.ac.jp
最終学歴：名古屋大学大学院理学研究科
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：温度受容体のX線結晶構造解析

岩田 想 So IWATA
京都大学大学院医学研究科
Graduate School of Medicine, Kyoto University
〒606-8501 京都府京都市吉田近衛町
Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan
e-mail: s.iwata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp
最終学歴：東京大学大学院農学研究科博士課程修了
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：膜タンパク質の構造生物学
趣味：旅行, 体を動かすこと

村田武士 Takeshi MURATA
千葉大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Chiba University
〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町1-33
1-33 Yayoi-cho, Inage, Chiba 263-8522, Japan
e-mail: t.murata@faculty.chiba-u.jp
専門分野：膜酵素学, 構造生物学
現在の研究テーマ：創薬関連膜タンパク質のX線結晶構造解析