

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解  
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

## G タンパク質共役型受容体の二量体化による機能制御メカニズム

柳川正隆, 七田芳則

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は七回膜貫通  $\alpha$ -ヘリックス構造をもつ膜タンパク質であり、ヒトゲノム上に約 800 の遺伝子が同定されている。GPCR は細胞外の多様な情報を刺激として受容し、三量体 G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達系を駆動する。多様な情報の受け手としての GPCR は創薬の標的分子としても重要な位置を占めている。近年、GPCR が二量体・多量体を形成し、相互にコミュニケーションを取り合うことが報告されている。本稿では、GPCR の二量体が単量体では成しえない高度な機能制御を行うという最近の知見を概説する。また、二量体化による機能制御がどのように実現しているのかを構造機能相関の観点から概観する。

### 1. はじめに

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、光や匂い、味、神経伝達物質、ホルモンといった細胞外の多様な情報を受容し、三量体 G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達系を駆動する。ヒトゲノム上には約 800 の GPCR の遺伝子が同定されており、様々な疾患に対する創薬の標的分子として注目されている。2006 年の時点で FDA (アメリカ食品医薬品局) 承認薬の約 3 割が GPCR を標的としている<sup>1)</sup>。しかし、未だにリガンドの同定されていないオーファン GPCR が 100 種程度存在するなど<sup>2)</sup>、創薬ターゲットとしての GPCR のポテンシャルは依然として高い。薬の効率的な設計や作用機序の解明のためには GPCR の構造的知見は不可欠であり、これまでも精力的に構造機能連関の解析が進められている。

GPCR はアミノ酸配列の相同性に基づきいくつかのファミリーに分類される。ファミリー間のホモロジーはほとん

どないにもかかわらず、すべての GPCR は七回膜貫通  $\alpha$ -ヘリックス構造という共通の構造モチーフを有し、その細胞質側が G タンパク質と相互作用する。古典的には、GPCR は単量体で機能し、ひとつの受容体がひとつの三量体 G タンパク質と結合して活性化するというモデルが支持されてきた。しかし、実際はより複雑である。その中でも、近年、様々な GPCR が二量体・多量体を形成し、情報調節を行っていることが報告され、新たな創薬ターゲットとして注目されている。本稿では、GPCR の二量体化・多量体化の知見を概説し、GPCR におけるこれらの機能調節メカニズムを構造的な側面から概観していきたい。

### 2. GPCR の機能単位は単量体か多量体か？

光受容体ロドプシンは構造機能連関の解析が最も進んでいる GPCR のひとつである。これまで、ロドプシンは単量体で機能すると考えられてきた<sup>3,4)</sup>。しかし、2003 年にマウス桿体視細胞の原子間力顕微鏡 (AFM) による観察から、ロドプシンが生理的に二量体を形成する可能性が示唆された<sup>5)</sup>。また、界面活性剤の種類を変えてロドプシンを精製・解析することで、ロドプシンの多量体化の程度と G タンパク質活性化能に相関があることが示された<sup>6)</sup>。当時、他の GPCR に関しても二量体化の報告が相次いでいたため、GPCR の生理的な機能単位は二量体であるかもしれないという仮説が話題となった。

京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 (〒606-8502 京都市左京区北白川追分町)

Dimerization of G protein-coupled receptors: molecular mechanism of the interprotomer communication

Masataka Yanagawa and Yoshinori Shichida (Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan)

「GPCRの機能単位は単量体か多量体か」という議論に一応の決着をつけたのがナノディスクを用いたGPCRの単量体精製技術である<sup>7)</sup>。ナノディスクは、リン脂質に埋め込まれた膜タンパク質を片面が疎水性の膜足場タンパク質(MSP)が取り囲んだ構造をしている(図1)。ナノディスクはこれらの成分を界面活性剤で可溶化した後、界面活性剤を除去することによって作製できる。MSPの長さによりナノディスクの径が決まり、一つの円盤に一つのGPCRが入ったナノディスクが作製されている。このようにして作製された単量体のロドプシンを用いて、Gタンパク質の活性化能<sup>8)</sup>・ロドプシンキナーゼ(GRK1)によるリン酸化<sup>9)</sup>・アレスチンとの結合能<sup>10)</sup>が測定された。その結果、ロドプシンは単量体であってもGタンパク質を活性化し、またGRK1・アレスチンによってシャットオフされることが示された。すなわち、ロドプシンは単量体で十分機能でき、二量体化は機能上の必要条件ではないことが

示された。

### 3. GPCRファミリー1における二量体化による機能制御

では、GPCRの二量体化によって新たにどのような機能が付加されるのであろうか。最初に、ロドプシンを含むファミリー1に属するGPCRについての例を紹介する。まず、二量体化の意義が分かりやすいヘテロ二量体の例から見ていこう。

ヘテロ二量体化が機能調節にポジティブに関わる例としてオピオイド受容体(OPR)が挙げられる。 $\kappa$ OPRと $\delta$ OPRはヘテロ二量体を形成するが、 $\kappa$ OPRのアゴニスト(U69563)存在下で $\delta$ OPRのアゴニスト(DPDPE)を添加すると、U69563非存在下に比べてDPDPEに対する親和性が向上する<sup>11)</sup>。この親和性の上昇に伴い、低濃度のアゴニストでGタンパク質活性化が可能になる。この現象は、二量体のプロトマー間相互作用による正のアロステリック制御で説明できる。すなわち、一方のプロトマーがアゴニストと結合して活性状態になると、インターフェース領域を介して他方のプロトマーの構造を変化させ、アゴニストとの親和性を増大させるのである(図2a)。

他の例としては $\mu$ OPRと $\alpha_{2A}$ アドレナリン受容体の系が挙げられる<sup>12)</sup>。両受容体は一次海馬ニューロンの樹状突起に共局在している。いずれか一方の受容体にアゴニストが結合すると、ヘテロ二量体の形成が促進される。アゴニストを結合した受容体の活性状態は二量体化により安定化され、Gタンパク質活性化効率が飛躍的に上昇する。また、両方の受容体にアゴニストが結合すると二量体形成が阻害され、Gタンパク質活性化効率が低下する。すなわち、両方の受容体が単量体として活性化された時よりも、一方の受容体が活性化され二量体を形成している状態の方が高効率にGタンパク質を活性化できるのである(図2b)。このケースでは、アゴニストを結合したプロトマーの活性状態はもう一方のプロトマーが不活性状態の場合にのみ安定化されると考えられる。

二量体化による機能制御の事例はヘテロ二量体だけでなくホモ二量体でも報告されている。セロトニン5HT<sub>2c</sub>受容体においては、二量体の両方のプロトマーにアゴニストが結合したときのGタンパク質活性化効率が片方のプロトマーのみにアゴニストが結合した場合に比べて2倍以上になる<sup>13)</sup>。つまり、アゴニストを結合したプロトマーの間に正のアロステリック効果が生じるのである(図2c)。これは $\kappa$ OPRと $\delta$ OPRのヘテロ二量体で観測された現象と類似している(図2a)。

では、これらの二量体化を通じたGPCRのアロステリックな機能制御の構造的基盤はどのようなものだろうか。

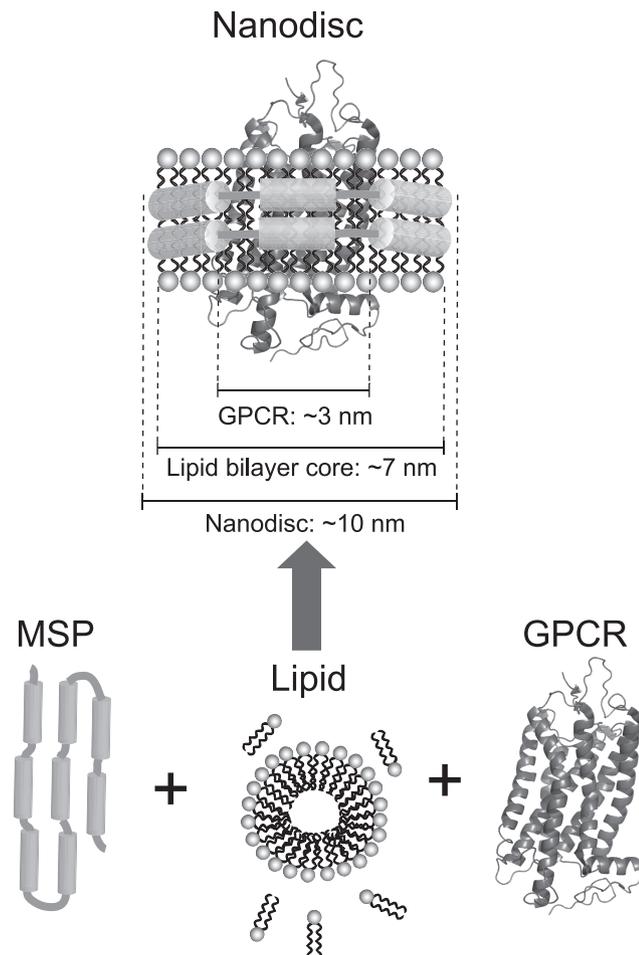


図1 GPCRを再構成したナノディスクの模式図  
MSPの二量体で構成される輪の中に脂質二重膜・GPCRが封入されてナノディスクが形成される。ナノディスクの内径は約7 nm程度であり、3~4 nmの直径を持つGPCRは高々数個しか入ることができない。

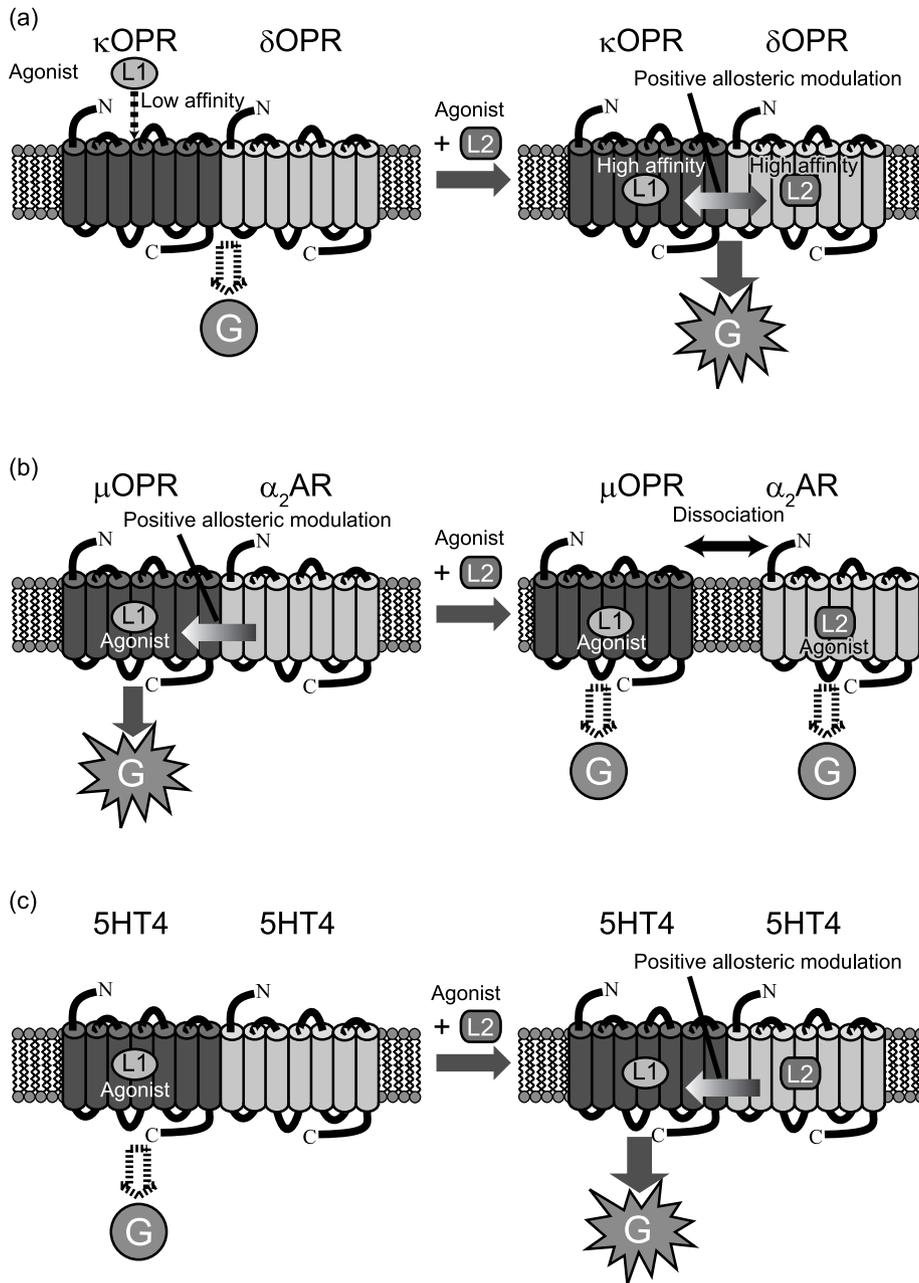


図2 GPCRファミリー1の二量体化によるアロステリック調節の例  
 (a)  $\kappa$ OPRと $\delta$ OPRのヘテロ二量体. 一方の受容体におけるアゴニスト結合が他方の受容体の構造を活性状態に安定化する.  
 (b)  $\mu$ OPRと $\alpha_{2A}$  アドレナリン受容体のヘテロ二量体. 二量体化が一方の受容体の活性状態を安定化するが, 双方の受容体が活性状態をとると二量体化が解消される.  
 (c) 5HT4受容体のホモ二量体. (a)と同様の正のアロステリック調節が確認されている. また, 二量体のうち一方のプロトマーのみがGタンパク質と直接相互作用する.

4. GPCRファミリー1の活性化に伴う単量体の構造変化

GPCRの二量体化による機能制御メカニズムを議論する上で, 単量体をベースとしたGPCRの活性化機構を理解することは重要である. 近年, GPCRファミリー1のX線結晶構造解析が進み, ロドプシン<sup>14)</sup>やアドレナリン受容

体<sup>15,16)</sup>をはじめ複数の受容体で不活性状態の構造が解かれている. また, ウシロドプシンにおいて活性状態を模倣していると考えられるオプシン(ロドプシンのタンパク質部分)の構造が2008年に解明され, 活性化の過程で生じる構造変化の詳細がはじめて可視化された<sup>17,18)</sup>. さらに2011年に入り, ロドプシン<sup>19)</sup>およびアドレナリン受容体<sup>20)</sup>のア

ゴニスト結合型の活性構造が解かれ、遂にはアドレナリン受容体と三量体Gタンパク質との複合体の構造が解き明かされるに至った<sup>21)</sup>。

これらの不活性構造・活性構造を比較すると、七回膜貫通領域の細胞質側において、活性化に伴いヘリックスV、VIに大きな構造変化が生じることが見てとれる(図3a)。受容体が刺激を受けることで、主にヘリックスIII、V、VI、VIIのアミノ酸残基および水分子間に形成されるグローバルな水素結合ネットワークが変化する(図3b)。この一連の水素結合ネットワークの再構築により、ヘリックスVが細胞質側に伸び、ヘリックスIIIに対してヘリックスVIが

外側へ広がる動きが誘起され、膜貫通領域の細胞質側にキャビティが生じる。このキャビティにGタンパク質 $\alpha$ サブユニットのC末端領域が捕捉されると、C末端領域とGDP/GTP結合部位をつなぐ $\alpha 5$ ヘリックスが動き、GDP/GTP交換反応が促進されるのである(図3c)。ファミリー1のGPCRは二量体を形成することで、一方のプロトマーにおける構造変化を他方のプロトマーに伝達し、上述のアロステリックな機能制御を実現していると考えられる。しかしながら、ファミリー1の受容体の二量体化には過渡的なものも多く、二量体化による機能制御の分子メカニズムの詳細は明らかでない。そこで以下では、安定な二量体を形成して機能するGPCRファミリー3に注目し、二量体をベースとしたGPCRの活性化制御機構を概観していきたい。

### 5. 安定な二量体として機能するGPCRファミリー3

GPCRファミリー3には代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)、カルシウム受容体(CaSR)、GABA<sub>B</sub>受容体(GBR)、一部の味覚受容体(T1R)等が含まれる。これらの受容体は七回膜貫通領域のN末端側に大きな細胞外リガンド結合領域を持ち、二つの細胞外領域同士が相互作用して安定な二量体を形成する。このため、ファミリー3はGPCRの二量体化研究のモデルとなってきた。

たとえば、GBRはGBR1/GBR2のヘテロ二量体を形成してはじめて機能することが知られている<sup>22)</sup>。GBR1は生理的アゴニストであるGABAを受容することはできるが、Gタンパク質とは結合できない。一方、GBR2はGタンパク質と結合できるが、GABAを受容できない。したがって、GBR1/GBR2のヘテロ二量体においては、GBR1の細胞外領域がアゴニストを受容し、そのシグナルがGBR2側へと伝わりGBR2の膜貫通領域がGタンパク質と結合してそれを活性化する。この機構はトランス活性化と呼ばれる。細胞にはGBRのヘテロ二量体を選択的に形質膜に輸送する巧妙な仕組みがある<sup>23)</sup>。GBR1のC末端領域には小胞体保留シグナル配列が存在し、GBR1単独では形質膜に輸送されない。一方、GBR2が小胞体に共存すると、GBR2とGBR1のC末端領域同士がコイルドコイルを形成する。そのため、GBR1の小胞体保留シグナル配列がマスクされ、形質膜へと輸送されるようになる。

また、T1R3はT1R1あるいはT1R2とヘテロ二量体を形成する。T1R1/T1R3は旨み受容体として、T1R2/T1R3は甘み受容体として機能する<sup>24)</sup>。

一方、mGluRには8種のサブタイプが同定されているが、これらは基本的にホモ二量体を形成して機能する。mGluRはファミリー3に属する受容体のなかで最初にクローニングされ<sup>25)</sup>、構造機能連関の解析が比較的進んでいる。実際、mGluRの細胞外領域のX線結晶構造が解かれ

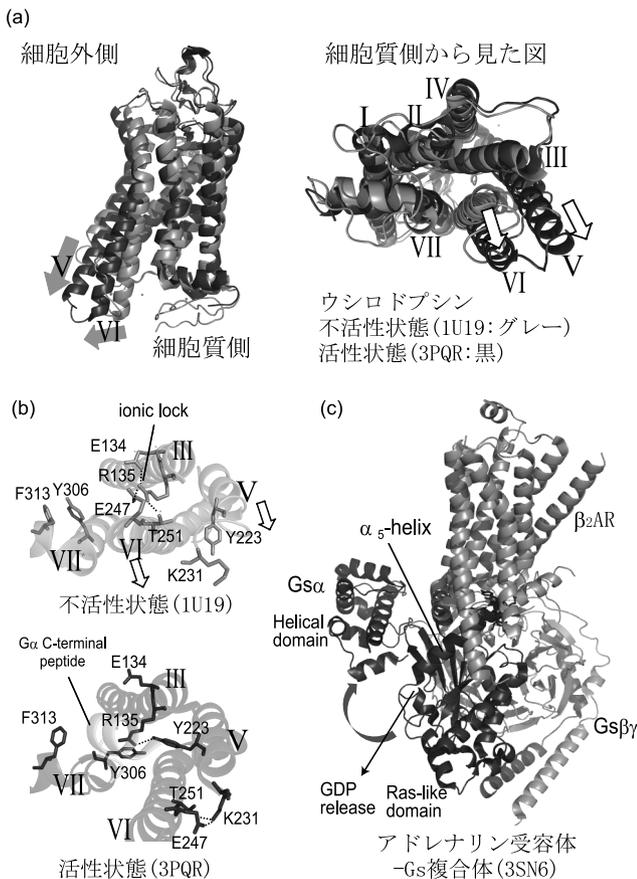


図3 GPCRファミリー1の不活性・活性状態の構造比較

(a) ウシロドプシンの不活性(PDB:1U19)・活性状態(PDB:3PQR)の構造比較。活性化に伴いヘリックスVが細胞質側に延長し、ヘリックスVIがヘリックスIIIに対して外側へ広がる。

(b) ウシロドプシンの活性化に伴う水素・イオン結合ネットワークの変化。不活性状態ではヘリックスIIIのR135がヘリックスVIのE247・T251と相互作用し、不活性状態を安定化している。活性化に伴いヘリックスIII、V、VI、VII間の相互作用が変化し、R135がGタンパク質 $\alpha$ サブユニットのC末端領域と相互作用する。

(c)  $\beta 2$ アドレナリン受容体とGsの複合体の構造(PDB:3SN6)。アドレナリン受容体の細胞質側とGs $\alpha$ サブユニットのC末端領域が相互作用し、 $\alpha 5$ ヘリックスが動くことによりRas様GTPaseドメインとヘリカルドメインが大きく解離、GDPが結合部位から放出される。

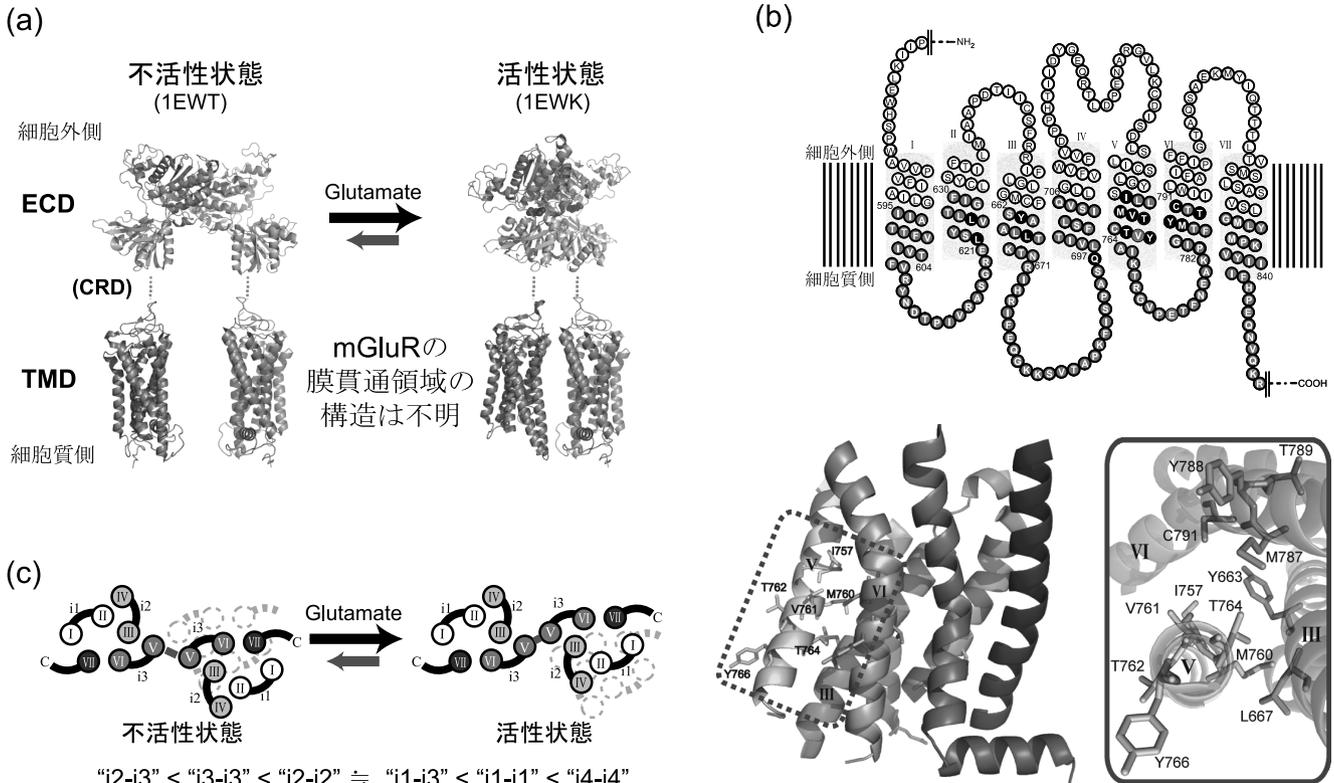


図4 代謝型グルタミン酸受容体の活性化に伴う二量体配置転換

(a) mGluR の細胞外領域 (ECD) の不活性 (PDB: 1EWT), 活性状態 (PDB: 1EWK) の構造比較. グルタミン酸結合に伴い, 二量体の配向変化が生じ, 膜貫通領域につながる領域が互いに近づく.

(b) mGluR8 の膜貫通領域における網羅的な構造的活性化変異 (CAM) 部位の探索. アラニン変異を導入した残基を黒色または灰色に白抜きで mGluR8 の二次構造モデルに示した (上図). 黒色は CAM 部位. 下図はウシロドプシンの構造 (PDB: 1U19) を鋳型として作製した mGluR8 の膜貫通領域の構造モデル<sup>39)</sup>. 上図の CAM 部位のアミノ酸を棒モデル (Stick) で表示した. 特にヘリックス III, V, VI で囲まれた空間に CAM 部位がクラスターを形成して存在することが見て取れる. また, ヘリックス V には脂質二重膜側にも CAM 部位が存在することが確認された.

(c) mGluR の膜貫通領域の二量体配置と, 活性化に伴う再配置のモデル. mGluR の網羅的な FRET 解析から, 二量体の細胞質ループ領域間の距離関係を推定した. その結果, 図の不等式に示す順で, 細胞質ループ領域間距離が短いことが推定された (i1: 細胞質第1ループ, i2: 細胞質第2ループ, i3: 細胞質第3ループ, i4: C末端領域). グルタミン酸非存在下・存在下における FRET 解析の結果を総合すると, ヘリックス V が二量体のインターフェースに関わり, 活性化に伴い二つのプロトマーが互いに近づくことが示唆された.

ており, 活性状態の形成に伴う構造変化が詳細に議論されている<sup>26~28)</sup>. 細胞外領域にグルタミン酸が結合すると, 二量体のプロトマー間に配向変化が生じ, 膜貫通領域につながるリンカー領域 (CRD) が互いに近づく (図 4a). この変化に伴い, 膜貫通領域においてもプロトマー間の配置転換が生じることが蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 解析から示されている<sup>29)</sup>. また, mGluR5 を実験材料に詳細な変異体解析が行われ, このプロトマー間の配置転換がそれぞれのプロトマーが活性状態になる直接の要因となることが示唆された<sup>30)</sup>.

## 6. GPCR のファミリーを越えて類似する膜貫通領域の構造変化

では, mGluR の二量体における膜貫通領域間の配置転換はそれぞれの膜貫通領域内にどのような構造変化を引き

起こすのだろうか. この構造変化はアミノ酸配列の相同性の乏しいファミリー 3 とファミリー 1 の受容体の間でも共通しているのだろうか. 我々はこれらの疑問に答えるべく, mGluR とロドプシンの膜貫通領域の構造変化の類似性を検証してきた.

まず, ロドプシンの細胞質ループ領域 (G タンパク質との相互作用に関わる領域) を mGluR の細胞質ループ領域に置換したキメラ変異体を作製して解析した. その結果, キメラ変異体においても光依存的な G タンパク質活性化が認められ, mGluR のループ領域がロドプシンの分子内でも機能することが見出された<sup>31)</sup>. 次に, mGluR8 の複数の細胞質ループ領域にシステイン残基を導入して架橋することにより, ヘリックスの動きを阻害する実験を行った. その結果, それぞれのプロトマーの構造変化の阻害が G タンパク質活性化能の低下をもたらすことが示された<sup>32)</sup>.

したがって、mGluRにおいても、アゴニスト刺激によって各プロトマー内の構造変化が生じ、Gタンパク質を活性化することが分かった。つまり、活性化機構の大枠はファミリー1の受容体と共通していると推測された。

さらに我々は、mGluRの膜貫通領域において活性化制御に関わる領域を同定することを試みた。そのために、mGluR8の細胞質ループ領域<sup>32,33</sup>および膜貫通領域<sup>34,35</sup>に網羅的に変異を導入して、構成的活性化変異(CAM)の探索を行った。CAMはリガンド非依存的に受容体を活性化させる変異であり、CAM部位は受容体の活性・不活性状態の平衡制御に関わる領域であると考えられている<sup>36</sup>。スクリーニングの結果、計15のCAM部位が同定され、特にヘリックスⅢ、Ⅴ、Ⅵに囲まれる空間にCAM部位がクラスターを形成して存在することが示された(図4b)。これは、ファミリー1の受容体が活性化する際に水素結合ネットワークの変化が生じる領域と類似している<sup>19,20</sup>。同様の事例はGBRにおいても報告されており、変異体解析によってヘリックスⅢ-Ⅵ細胞質側のイオン結合が活性化に重要な役割を果たすことが示されている<sup>37</sup>。以上の結果は、ファミリー3の受容体がファミリー1の受容体と類似した活性化機構を有していることを示唆するものである。

#### 7. GPCRファミリー3の二量体インターフェースを介した活性化制御機構

ファミリー3の受容体においては二量体の配置転換が、それぞれの膜貫通領域内の構造変化を誘起していると推測される。このメカニズムを理解する上で、膜貫通領域における二量体のインターフェースを特定することは重要である。近年、我々は、mGluRの膜貫通領域においてヘリックスⅤが二量体のインターフェースを形成することを突き止めた<sup>35</sup>。この発見の端緒は網羅的なアラニンスキャンにより、ヘリックスⅤにCAM部位のクラスターを同定したことだった。ヘリックスⅤの細胞質側に6残基のCAM部位が集中して同定され、膜貫通領域の内外双方に分布していることが予想された(図4b)。これらのCAM部位は、プロトマー内の構造変化の起点になるとともに、プロトマー間の配置転換の起点にもなると考えられる。そこで、ヘリックスⅤが二量体のインターフェースとして機能する可能性を検証するためにmGluRのFRET解析を行った。mGluRの細胞質ループ領域に2種類の蛍光タンパク質を導入しFRET効率を測定することで、二量体における細胞質ループ領域間の距離関係を網羅的に測定した。その結果、一方のプロトマーの細胞質第3ループが他方の細胞質第2、第3ループと隣接して存在することが示唆された(図4c)。この結果は、ヘリックスⅤが二量体のインターフェースとなっていることを示唆している。また、グルタミン酸結合に伴い、FRET効率の上昇が一様に観測され、

二つのプロトマーが互いに近づくことが推定された。これはアゴニスト結合に伴い細胞外領域と膜貫通領域をつなぐリンカー領域が互いに近づくという構造的知見とよく一致する<sup>28</sup>。

以上の知見を総合すると、mGluRの活性化機構は以下のように考えられる。まず、グルタミン酸結合に伴い二量体の細胞外領域が活性構造に安定化される。つづいて、二量体の膜貫通領域が再配置を起こし、インターフェースを形成するヘリックスⅤに構造変化が生じる。このヘリックスⅤの変化が各プロトマーの内側に伝播し、プロトマー内でヘリックスの再配置が起こる。最終的にGタンパク質と直接相互作用する部位が構造変化を起こし、細胞質側に提示されてGタンパク質の活性化が行われる。

このmGluRの活性化の鍵となるヘリックスⅤの役割は、GPCRファミリー1の二量体化を通じた機能制御にも共通している可能性がある。実際、約700種のGPCRを用いた進化トレース解析の結果、ファミリー1のGPCRにおいても、ヘリックスⅤ及びⅥの外側に機能的に重要な残基が集まっていることが示唆されている<sup>38</sup>。さらに、ロドプシン<sup>39,40</sup>・セロトニン5HT<sub>2c</sub>受容体<sup>41</sup>・ケモカインCXCR4受容体<sup>42</sup>においても、ヘリックスⅤが二量体形成に関与している可能性が様々な実験手法により示されている。

また、mGluR1では二量体配置の違いを利用した高度な機能調節が報告されている。mGluR1はGqだけでなくGsやGi/oといった異なるGタンパク質のサブタイプを活性化する。種々の変異体を組み合わせたFRET解析によって、このサブタイプ選択性が二量体の配置や各プロトマーの構造の違いにより厳密に制御されていることが示された<sup>43,44</sup>。また、我々も、mGluR8に一つのグルタミン酸が結合した状態と二つのグルタミン酸が結合した状態を比較し、二つのグルタミン酸結合が相乗的に二量体の配置転換を引き起こしていることを見出した<sup>35</sup>。mGluRは二量体をベースとした活性化機構を持つことにより、グルタミン酸の濃度変化に対し、高いコントラストで細胞応答を引き起こすことを可能にしている。

ホモ二量体を形成するmGluRとは異なり、ヘテロ二量体を形成するGBRでは異なる活性化機構が報告されている。すなわち、GBRの二つのプロトマーは非対称な二量体配置をとっており、活性化に伴いそれらが互いに離れるというモデルが提案されている<sup>45</sup>。GBRについては細胞外領域の構造が明らかでないため、どのようにしてこの膜貫通領域の二量体配置転換が誘起されるのかは不明である。今後のさらなる解析により、ホモ二量体とヘテロ二量体の間での機能制御メカニズムの違いが明らかになることが期待される。

## 8. おわりに：GPCRの二量体化研究の今後の展開

本稿では、GPCRの二量体化の例を挙げ、二量体化の機能制御メカニズムを概説してきた。それらに共通して言えることは、GPCRは二量体化により相互にコミュニケーションを取り合い、単量体では成しえない高度な機能調節を可能にしていることである。このGPCRの相互コミュニケーションの詳細に関してはまだまだ不明な部分が多く、今後さらなる解析が必要である。

GPCRファミリー1に関しては単量体における膜貫通領域の構造変化がよく理解されてきた。しかし、二量体化は過渡的な過程も多く、二量体化による構造変化を捉えることはほとんど行われていない。近年、全反射蛍光顕微鏡を利用してGPCRの二量体化の生成・解離過程を一分子レベルで捉えることができるようになってきた<sup>46,47</sup>。また、一分子測定技術を利用するとGPCR単量体の不活性・活性状態の遷移をリアルタイムでモニターすることも可能である。過渡的な二量体形成にはそれぞれの単量体での構造変化も連関していると考えられ、一分子測定による詳細な構造変化の解析が期待される。我々はロドプシンを実験材料にして、一分子測定による構造変化の解析を始めた。ロドプシンにおいては従来の分光学的手法により膨大な構造変化情報が蓄積され<sup>4,48</sup>、また、最近のX線結晶解析による構造変化のスナップショットが多く得られている<sup>14,17-19</sup>。さらに、上述のナノディスクを用いた単量体・二量体の精製技術も確立している<sup>8</sup>。したがって、一分子測定により得られる情報を従来の情報と統合することで、二量体化を含めたGPCRの活性化機構を詳細なアニメーションとして理解できることが期待される。

一方、GPCRファミリー3は安定な二量体を形成するため、二量体の機能的役割がよく分かってきた。一方、各プロトマーでの構造変化過程を解析する研究はまだ少ない。今後は、mGluRホモ二量体の全結晶構造の解明が待たれると共に、ひとつのプロトマー内での構造変化を捉える手法の開発が必要となるだろう。また、ヘテロ二量体とホモ二量体との比較解析も重要である。GPCRファミリー3では二量体の配置転換をFRETにより検出する方法が確立している<sup>29,35,43,45</sup>。しかし、バルク（通常の溶液状態）での測定から計算されるFRET効率は多分子のアンサンブルであるため、実際にGPCRが何通りの二量体配置をとりえるかは分からない。この意味でも、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子レベルでのFRET解析は重要になる。mGluRでは二量体での構造変化過程がよく理解されている。一方、ロドプシンでは単量体での知見が集積されている。したがって、両受容体の知見を組み合わせることにより、GPCR一般に共通した機能発現の機微について、理解が深まると期待される。

## 文 献

- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A.L. (2006) *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 993-996.
- Chung, S., Funakoshi, T., & Civelli, O. (2008) *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl. 1, S339-346.
- Cone, R.A. (1972) *Nat. New Biol.*, 236, 39-43.
- Okada, T., Ernst, O.P., Palczewski, K., & Hofmann, K.P. (2001) *Trends Biochem. Sci.*, 26, 318-324.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., & Palczewski, K. (2003) *Nature*, 421, 127-128.
- Palczewski, K., Jastrzebska, B., Fotiadis, D., Jang, G.F., Stenkamp, R.E., & Engel, A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 11917-11922.
- Leitz, A.J., Bayburt, T.H., Barnakov, A.N., & Springer, B.A., & Sligar, S.G. (2006) *Biotechniques*, 40, 601-612.
- Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G., Oprian, D.D., & Sligar, S.G. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 14875-14881.
- Bayburt, T.H., Vishnivetskiy, S.A., McLean, M.A., Morizumi, T., Huang, C.C., Tesmer, J.J., Ernst, O.P., Sligar, S.G., & Gurevich, V.V. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 1420-1428.
- Tsukamoto, H., Sinha, A., DeWitt, M., & Farrens, D.L. (2010) *J. Mol. Biol.*, 399, 501-511.
- Jordan, B.A. & Devi, L.A. (1999) *Nature*, 399, 697-700.
- Jordan, B.A., Gomes, I., Rios, C., Filipovska, J., & Devi, L.A. (2003) *Mol. Pharmacol.*, 64, 1317-1324.
- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Harrigan, T.J., & Mazurkiewicz, J.E. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40144-40151.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000) *Science*, 289, 739-745.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I., & Kobilka, B.K. (2007) *Nature*, 450, 383-387.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., & Kobilka, B.K. (2007) *Science*, 318, 1266-1273.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., & Ernst, O.P. (2008) *Nature*, 454, 183-187.
- Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., & Ernst, O.P. (2008) *Nature*, 455, 497-502.
- Choe, H.W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krauss, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P., & Ernst, O.P. (2011) *Nature*, 471, 651-655.
- Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J.A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Devree, B.T., Sunahara, R.K., Chae, P.S., Gellman, S.H., Dror, R.O., Shaw, D.E., Weis, W.I., Caffrey, M., Gmeiner, P., & Kobilka, B.K. (2011) *Nature*, 469, 236-240.
- Rasmussen, S.G., Devree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., & Kobilka, B.K. (2011) *Nature*, 477, 549-555.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazef, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L., & Pin, J.P. (2001) *Embo J.*, 20, 2152-

- 2159.
- 23) Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., & Jan, L.Y. (2000) *Neuron*, **27**, 97–106.
- 24) Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J., & Zuker, C.S. (2003) *Cell*, **115**, 255–266.
- 25) Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., & Nakanishi, S. (1991) *Nature*, **349**, 760–765.
- 26) Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., & Morikawa, K. (2000) *Nature*, **407**, 971–977.
- 27) Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H., & Morikawa, K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2660–2665.
- 28) Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., & Jingami, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3759–3764.
- 29) Tateyama, M., Abe, H., Nakata, H., Saito, O., & Kubo, Y. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 637–642.
- 30) Brock, C., Oueslati, N., Soler, S., Boudier, L., Rondard, P., & Pin, J.P. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 33000–33008.
- 31) Yamashita, T., Terakita, A., & Shichida, Y. (2001) *J. Biochem.*, **130**, 149–155.
- 32) Yamashita, T., Terakita, A., Kai, T., & Shichida, Y. (2008) *J. Neurochem.*, **106**, 850–859.
- 33) Yamashita, T., Kai, T., Terakita, A., & Shichida, Y. (2004) *J. Neurochem.*, **91**, 484–492.
- 34) Yanagawa, M., Yamashita, T., & Shichida, Y. (2009) *Mol. Pharmacol.*, **76**, 201–207.
- 35) Yanagawa, M., Yamashita, T., & Shichida, Y. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 22971–22981.
- 36) Seifert, R. & Wenzel-Seifert, K. (2002) *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **366**, 381–416.
- 37) Binet, V., Duthey, B., Lecaillon, J., Vol, C., Quoyer, J., Labesse, G., Pin, J.P., & Prezeau, L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12154–12163.
- 38) Dean, M.K., Higgs, C., Smith, R.E., Bywater, R.P., Snell, C.R., Scott, P.D., Upton, G.J., Howe, T.J., & Reynolds, C.A. (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 4595–4614.
- 39) Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., & Engel, A. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 21655–21662.
- 40) Kota, P., Reeves, P.J., Rajbhandary, U.L., & Khorana, H.G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3054–3059.
- 41) Mancia, F., Assur, Z., Herman, A.G., Siegel, R., & Hendrickson, W.A. (2008) *EMBO Rep.*, **9**, 363–369.
- 42) Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., & Stevens, R.C. (2010) *Science*, **330**, 1066–1071.
- 43) Tateyama, M. & Kubo, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1124–1128.
- 44) Tateyama, M. & Kubo, Y. (2011) *Neuropharmacology*, **61**, 832–841.
- 45) Matsushita, S., Nakata, H., Kubo, Y., & Tateyama, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 10291–10299.
- 46) Hern, J.A., Baig, A.H., Mashanov, G.I., Birdsall, B., Corrie, J. E., Lazareno, S., Molloy, J.E., & Birdsall, N.J. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2693–2698.
- 47) Kasai, R.S., Suzuki, K.G., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., & Kusumi, A. (2011) *J. Cell Biol.*, **192**, 463–480.
- 48) Shichida, Y. & Imai, H. (1998) *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 1299–1315.
-