

Gタンパク質共役型受容体の活性化機構

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者名	大嶋, 菜月 一條, 祐太 持丸, 雄太 佐藤, 一裕 戸村, 秀明
発行元	明治大学農学部
巻/号	63巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 103-110
発行年月	2014年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



G タンパク質共役型受容体の活性化機構

大嶋 菜月¹⁾・一條 祐太¹⁾・持丸 雄太¹⁾・佐藤 一裕²⁾・戸村 秀明^{1)2)3)*}

(2013年11月18日受理)

Activation mechanisms of G-protein-coupled receptors

Natsuki OSHIMA, Yuta ICHIJO, Yuta MOCHIMARU,
Kazuhiro SATO and Hideaki TOMURA

Abstract

To maintain homeostasis in the body, the receptors sense internal and external environmental stimuli. G-protein-coupled receptors (GPCRs) which have the seven-transmembrane-domain convert these stimuli, such as photons, ions, chemical substances, neurotransmitters and hormones, into intracellular responses through the activation of heterotrimeric G-proteins. In this review, we discuss the recent progress in understanding the mechanisms of GPCR activation.

要 旨 生物は、体内の恒常性を維持するために、生体内外の環境変化を感知する受容体を発達させてきた。受容体のうち7回膜貫通型受容体であるGタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)は、光、イオン、低分子化合物、神経伝達物質やホルモンなど、多種多様な刺激により特異的に活性化され、三量体Gタンパク質を介して細胞内にその情報を伝える。本稿では最近のGPCR研究に関して、その活性化機構を中心に紹介する。

1. はじめに

ヒトの身体は約60兆個の細胞から構成されている。これらの細胞が協調して働くことで生命活動が維持されている。ヒトに限らずいかなる生命も、周囲の環境に適応して生存していかなければならない。これは、体内における個々の細胞においても同様である。外からの刺激を適切に感知して反応し、体内の恒常性を維持するためには、細胞間での緊密な情報交換が必要となる。そのため多細胞生物は、熱・光・味・匂い・神経伝達物質・ホルモンなどの刺激を感知する受

容体を発達させてきた。

受容体は細胞膜受容体と核内受容体の2種類に主に大別される。このうち細胞膜受容体は、Gタンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)、イオンチャネル型受容体や酵素連結型受容体などに分類される。

GPCRは7回膜を貫通する膜タンパク質であり、三量体Gタンパク質を介して細胞内に情報を伝達するという特徴を有する。ヒトではゲノム解析により約800種類が存在しているとされ、受容体中で最大数のファミリーを形成している。GPCRは、光、イオン、低分子化合物、ペプチドなど、多彩な刺激により活性化されることから、味覚、嗅覚などの感覚、炎症、免疫などの生体の防御応答他、様々な生理、病態

¹⁾ 明治大学大学院農学研究科, ²⁾ 明治大学農学部, ³⁾ 明治大学生殖内
分泌学研究所 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

* E-mail: tomurah@meiji.ac.jp; TEL: 044-934-7825;
FAX: 044-934-7825

生理機能に関与する。この特性から現在使用されている薬の約3割はGPCRがその標的となっている(Overington et al, 2006)。本稿ではGPCR研究の背景と、GPCRの活性化機構を中心に述べたのち、現在私たちが研究を行っているpH感知性GPCRの研究について紹介する。

2. GPCRを介したシグナル伝達様式

GPCRを介したシグナル伝達様式の概略を図1に示す。GPCRは、疎水性アミノ酸クラスターが細胞膜を7回貫通する構造を持つ膜タンパク質であり、そのN末端が細胞外に、C末端が細胞質内に存在する。GPCRはその名前の由来のように、細胞質側で α , β , γ サブユニットからなる三量体Gタンパク質と共役している。GPCRは特異的な刺激、すなわちリガンドが結合すると活性化し、三量体Gタンパク質を介して細胞内にその情報を伝達する。

三量体Gタンパク質は、 α サブユニットのアミノ酸配列の相同性と機能をもとに G_s ・ $G_{i/o}$ ・ $G_{q/11}$ ・ $G_{12/13}$ の4種類に大きく分類される。その α サブユニットの種類により細胞内に伝わるシグナルの種類は異なる。三量体Gタンパク質は通常、 α サブユニットにGDPが結合しており、不活性型である。GPCRがリガンドにより活性化されると、 α サブユニットの構造が変化してGDPを放出し、代わりに、GTPが結合することで活性型となる。活性型となった三量体Gタンパク質は α サブユニットと $\beta\gamma$ 複合体の2つに解離する。解離した α サブユニットと $\beta\gamma$ 複合体はその種類により、アデニル酸シクラーゼ(AC)やphospholipase C (PLC), Rho, イオンチャネルなどのエフェクタータンパク質(効果器)を活性化する。活性化されたエフェクタータンパク質は、cyclic AMP (cAMP)の産生、inositol trisphosphate (IP_3)とdiacylglycerol (DAG)の産生、アクチンの脱重合や、細胞内の各種イオン濃度をそれぞれ調節する(Alberts et al, 2008; Kawanabe et al, 2002)。 IP_3 は小胞体の IP_3 受容体に結合して、小胞体内に貯蔵されている Ca^{2+} を放出させる。cAMPや Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーと呼ばれ、刺激を細胞内へと伝える役割

を果たす。三量体Gタンパク質は活性化状態のまま存在し続けるわけではなく、 α サブユニットに存在するGTPアーゼ活性によりGTPがGDPに分解され、不活性型へと戻る。この不活性型と活性型の変換が緻密に制御されることにより、増殖、遊走(免疫系の細胞が炎症部位に移動する場合などに観察される細胞の移動能力)、ホルモンの分泌などの細胞応答が適切に行われている。図1に示すように、2012年のLefkowitzとKobilkaのGPCRに関する研究以前にも、GPCRを介したシグナル伝達関連の研究に複数のノーベル賞が授与されている。このようにGPCR関連の研究は後述するように、以前から注目を集めてきた分野となっている。

3. GPCRの多様性

3.1. GPCRファミリー

GPCRは酵母からヒトに至るまで、広い生物種で保存されている。植物では現在までに、1種類のGPCRがシロイヌナズナで報告されている(Colucci et al, 2002)。一方、シロイヌナズナのゲノム解析の結果、394個のGPCRの特徴を有する配列が存在するとの報告もある(Moriyama et al, 2006)。今後、植物のGPCR数は増加する可能性がある。ヒトではゲノム解析の結果、約800種類のGPCRが存在するとされており、受容体の中で最大のファミリーを形成している(Fredriksson et al, 2003)。ヒトGPCRは表1に示すように、アミノ酸配列の特徴から、ロドプシンファミリー、セクレチン受容体ファミリー、代謝性グルタミン酸受容体ファミリー、接着因子受容体ファミリー、フリズルド/苦味受容体ファミリー、その他にクラス分けされる(Fredriksson et al, 2003)。このうちロドプシンファミリーは、嗅覚受容体を含む最大数の受容体が含まれている。現在構造が明らかとなっているGPCRのほとんどはこのファミリーに属している。

3.2 分子進化

表1に示すように、約800種類のGPCRのうち約半数は、嗅覚に関与する受容体である(Vassilatis et al, 2003)。一方残り約半数のGPCRは、光、味、ホ

表1 ヒトゲノム中に存在する GPCR の分類 (Fredriksson et al, 2003; Chung et al, 2008)

ファミリー名	種類数	オルファン受容体数
ロドプシンファミリー	約460 (嗅覚に 関与する GPCR)	約100
	241 (嗅覚以外に 関与する GPCR)	
セクレチン受容体ファミリー	15	
代謝性グルタミン酸受容体ファミリー	15	
接着因子受容体ファミリー	24	
フリズルド/苦味受容体ファミリー	24	
その他	23	

ルモン, 神経伝達物質やオータコイド (ホルモンや神経伝達物質以外の, 生体内で作られる微量生理活性物質) などのほか, 細胞の位置や接着状態などの環境を感知することで, 恒常性の維持に関与している。一方, 表1に示すように, GPCR の中には, どのような刺激を受け取るのか未だ明らかとなっていない (リガンドが不明な), オルファン受容体も約100種類ほど存在している (Chung et al, 2008)。オルファン受容体に関する研究は, 新たな恒常性維持機構の解明という基礎的な側面のみならず, 新たな薬の開発という応用面へとつながる可能性を秘めていることから, 現在も活発な研究がつけられている。

4. GPCR の構造

膜タンパク質は脂質二重層の膜に埋まっているため, 水溶性タンパク質に比べその結晶化が困難である。GPCR は7回膜貫通型受容体であること, またその発現量が少ないことから, 結晶化することが困難であった。したがって, その立体構造はなかなか明らかならなかった。ところがここ数年で GPCR の立体構造に関する研究手法が急速に発達した。すなわち, 培養細胞での GPCR の発現量の改良や, 細胞内第3ループを T4 リゾチーム配列に置き換えることによる受容体構造の安定化, さらに脂質キュービックフェーズ法 (Landau & Rosenbusch, 1996) の導入などにより, GPCR を生理的な状態で結晶化することが可能

となった。このような研究手法の進展により, 現在までに10種をこえる GPCR の立体構造が明らかとなっている。

4.1 構造と機能

GPCR の立体構造解析が最初になされたのは, 2000年のウシロドプシンである。ロドプシンは光刺激により活性化する GPCR である。この解析で明らかとなった立体構造が, その後の他の GPCR の立体構造解析の基礎となった (Palczewski et al, 2000)。その後2007年のヒト β_2 アドレナリン受容体 (Cherezov et al, 2007; Rasmussen et al, 2007) の構造解析をかわきりに, トリ β_1 アドレナリン受容体 (Warne et al, 2008), ヒト M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (Haga et al, 2012), ラット M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (Kruse et al, 2012), ヒト H₁ ヒスタミン受容体 (Shimamura et al, 2011), ヒト D3 ドーパミン受容体 (Chien et al, 2010), ヒトアデノシン A_{2A} 受容体 (Jaakola et al, 2008), ヒト CXCR4 受容体 (Wu et al, 2010), ヒト・マウスオピオイド受容体 (Granier et al, 2012; Manglik et al, 2012; Thompson et al, 2012; Wu et al, 2012), ヒト PAR1 (Zhang et al, 2012), ヒト S1P₁ 受容体 (Hanson et al, 2012) と, 次々と GPCR の立体構造が明らかにされてきた。これらの受容体は当初, リガンドが結合していない状態, またはインバースアゴニスト (逆作動薬) やアンタゴニスト (遮断薬) が結合した不活性型としてその結晶化が成功し立体構造解析が行われたため, 活性化した GPCR の立体構造は不明であった。しかしながらその後, アゴニストが結合した活性化型 (または活性化中間体) の立体構造解析が, ウシロドプシン (Choe et al, 2011; Deupi et al, 2012; Scheerer et al, 2008; Standfuss et al, 2011), ヒト β_2 アドレナリン受容体 (Rasmussen et al, 2011a; Rasmussen et al, 2011b), ヒト A_{2a} 受容体 (Lebon et al, 2011; Xu et al, 2011), ラットニューロテンシン1受容体 (White et al, 2012) で成功した。そしてついに2011年に Kobilka のグループにより, 三量体 G タンパク質の一種である Gs タンパク質と共役した, 活性化型の β_2 アドレナリン受容体の立体構造解析が報告された (Ras-

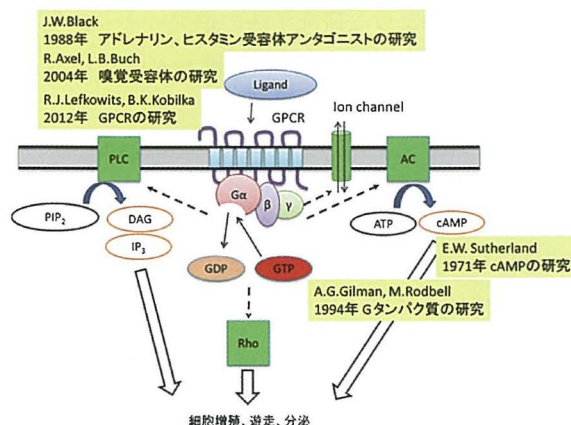


図1 GPCRを介した細胞内情報伝達様式とノーベル賞受賞のGPCR研究
 $G\alpha$: 三量体Gタンパク質 α サブユニット, β : 三量体Gタンパク質 β サブユニット, γ : 三量体Gタンパク質 γ サブユニット, PLC: phospholipase C, AC: adenylyl cyclase, PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, DAG: diacylglycerol, IP₃: phosphatidylinositol 1,4,5-trisphosphate, GTP: guanosine triphosphate, GDP: guanosine diphosphate

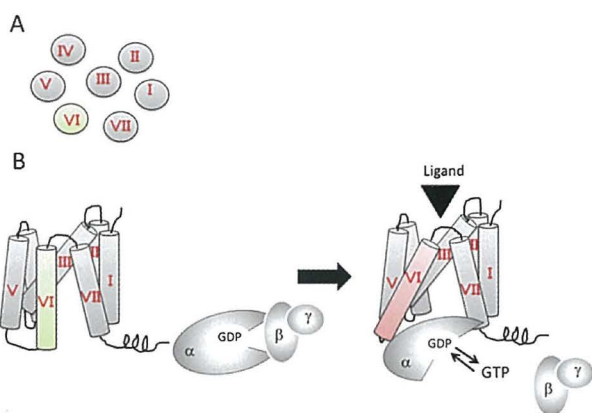


図2 GPCRの構造模式図
 (A) GPCRを細胞外から眺めた図。膜貫通部分のみを丸で示す。ローマ数字は膜貫通部分の番号を表す。(B) GPCRを側面から眺めた図。膜貫通部分を円柱で、膜間領域を線で表す。ローマ数字は、膜貫通部分の番号を表す。

mussen et al, 2011b)。

構造解析の結果、GPCRの構造や活性化に伴う構造変化は、GPCRの種類に係わらず共通性が存在することが明らかとなった。図2は受容体の膜貫通部分の配置を表したものである。細胞外から眺めると、GPCRは図2Aに示すように膜貫通部分が配置されている。またGPCRを側面（細胞膜面）から眺めると図2Bのようになる。リガンドの結合に伴い各膜貫通部分も動くが、共通して6番目の膜貫通部分が外側

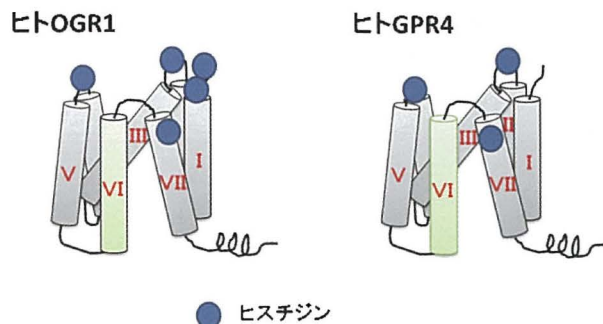


図3 ヒトOGR1, ヒトGPR4の構造模式図
 図2(B)と同様に各GPCRを側面から眺めた図。受容体活性に影響を及ぼすヒスチジン残基を丸で示す。

に大きく変位することが明らかとなった。この第6膜貫通部分の変位により、広がった細胞内領域に三量体Gタンパク質が受容体内部に向かって入り込むと、三量体Gタンパク質の α サブユニットの構造が大きく変化し、サブユニット内部のGDPを放出しGTPを結合するようになる。

5. GPCRのサブタイプ

GPCRには、一つのリガンドに対して複数種のサブタイプが存在する場合がある。ヒスタミンは活性アミンの一種であり、生体内で合成される。抗原刺激などにより、ヒスタミンはヒスタミン産生細胞から細胞外に放出され、炎症やアレルギー反応に関与する。ヒスタミンをリガンドとするヒスタミン受容体はGPCRであり、H1・H2・H3・H4の4種類に分類される。それぞれは異なる三量体Gタンパク質と共役しており、結果として誘導される作用も異なる(Seifert et al, 2013)。たとえばH1受容体は G_q と共役しており、アレルギー反応に関与する。H2受容体は G_s と共役しており、胃酸の分泌に関与する。H3受容体は G_i と共役しており、この受容体自身の活性化が、この受容体発現細胞自身のヒスタミンの合成・分泌を制御する。H4受容体はH3受容体同様に G_i と共役しているが、働きとしてはマスト細胞や好酸球の遊走を誘導する。このようにヒスタミンの作用は多岐にわたることから、薬剤でヒスタミンの合成、分泌を抑えてしまうと上記の生理作用もすべて影響を受け、副作用がでてしまう。そこで受容体サブタイプの作用を特異的

に抑えることができれば、必要な反応のみを特異的に制御し、副作用の少ない薬剤の開発が可能となる。実際、薬剤の開発はこの方向で進められ、H1 受容体の拮抗薬は抗アレルギー薬として、H2 の拮抗薬は胃酸の分泌を抑える薬として、現在利用されている。GPCR が創薬の標的として注目されている理由がこの例からもうかがえる。

GPCR サブタイプの違いが、社会行動を変化させる例も報告されている。ハタネズミには単婚型と乱婚型の近縁種が存在する。GPCR の一種であるバソプレシン受容体サブタイプ (V1a) の発現を変化させると、乱婚型から単婚型に行動が変化することが示され (Lim et al, 2004), GPCR が社会行動にも影響を与えていることが明らかとなった。単婚型のハタネズミが「つがい」となった後は、雄も雌も他の個体とは交尾しない。雄の雌への愛着形成が「つがい」の絆に重要であり、雄はパートナー以外の雌を積極的に攻撃し拒絶する。この愛着の形成と攻撃性に GPCR の一種であるドーパミン受容体サブタイプが関わっている。雄の脳の側坐核にドーパミン D2 受容体の活性化薬を注入すると、雄は雌と交尾できなくても愛着を形成する。逆に側坐核に D2 ブロッカーを注入すると交尾可能な状態下でも愛着の形成が見られない。単婚型の雄のハタネズミは雌と交尾し、つがいを形成すると側坐核のドーパミン D1 受容体の発現が上昇する。これがパートナー以外の雌への攻撃性に繋がっているものと考えられている。実際、オスの側坐核にドーパミン D1 受容体の活性化薬を注入すると、交尾可能な状態下でも愛着を形成しない。また D1 受容体ブロッカーを注入すると、パートナー以外の雌に対する攻撃性は抑制され、まるで独身のように雌に接する (Aragona et al, 2006)。

5.1 相互作用と機能

このように受容体のサブタイプや共役する三量体 G タンパク質の種類によって、引き起こされる細胞応答、生理応答や行動様式が異なるため、GPCR がどのようにして共役する三量体 G タンパク質を選択するのか、そのメカニズムの解明は、重要な問題である。アドレナリン受容体にも α と β という受容体サ

ブタイプが存在する。 α 受容体と β 受容体は、異なる三量体 G タンパク質と共役する。すなわち、 β 受容体には三量体 G タンパク質 α サブユニットうち Gs が、一方 α 受容体には Gq が共役する。残念ながら今回、立体構造が明らかにされた $\beta 2$ 受容体と Gs の複合体の構造解析の結果からは、 $\beta 2$ 受容体がどのようにして Gs を選択しているのかに関する情報は得られなかった。つまり今回得られた結晶構造の情報では、Gs α サブユニットと受容体の結合に関与するアミノ酸は Gs α に特異的なものではなく、G タンパク質 α サブユニットに対して一般的のものであった。どうして選択に関与するアミノ酸が特定できなかったのであろうか？ この理由として以下の可能性が考えられる。タンパク質の構造は結晶化された時点でのスナップショットであり、 $\beta 2$ 受容体が Gs α を認識して刻々と変化する複合体の形成過程を捉えきれていない可能性がある。今回の結晶は、 $\beta 2$ 受容体が Gs α サブユニットを認識する場面を捉えたものではないと理解するのがよいであろう。GPCR がどのように共役する G α サブユニットを認識するかについての問題は、リガンドが結合後、G α サブユニットが結合していく中間段階での構造解析が今後必要となろう。

6. GPCR の多量体形成

GPCR はこれまで単量体 (モノマー) として機能しているものと、考えられてきた。しかしながら近年、GPCR のうち幾種類かが、同一分子同士 (ホモ) または他の GPCR と (ヘテロ) の状態で、多量体 (オリゴマー) を形成して機能するとの報告がなされている。多量体を形成し、その機能が変化する GPCR として、味覚の受容体があげられる。

6.1 多量体形成と機能

「うま味」や「甘味」といった味覚は、舌の味蕾部分に発現する GPCR を介して認識される。これらの味覚には、TIR1, TIR2, TIR3 という 3 種類の GPCR が関与している。TIR3 と呼ばれる GPCR が、TIR1 という他の GPCR とヘテロマーを形成すると、「うま味」を感知する。一方、TIR3 が TIR2 という別の GPCR とヘテロマーを形成すると「甘味」を感知す

るようになる (Chandrashekar et al, 2006)。さらに、味覚受容体に関しては最近、驚くような報告がなされた (Mosinger et al, 2013)。TIR3 と、共役する $G\alpha$ サブユニットを欠失した雄マウスは精子形成不全となり、不妊になるというのである。精巣には TIR2 も発現していることから、TIR3 と TIR2 のヘテロダイマーの形成やどのようなリガンドが精子形成に関与するのかは今後の課題である。

他に多量体形成の例として、代謝性グルタミン酸受容体ファミリーに属する G-アミノ酪酸 (GABA) 受容体の例が報告されている (Kniazef et al, 2011; Maurel et al, 2008; Pin et al, 2009)。GABA はアミノ酸の一種で、抑制性の神経伝達物質として機能している。GABA 受容体には A, B, C が存在する。このうち A と C はイオンチャンネル型の受容体であり、GPCR とは異なる。一方、B 受容体は GPCR である。この GABA_B 受容体が機能するためには、GABA_{B1} と GABA_{B2} がヘテロマーを形成することが必要である (Bettler et al, 2004)。

他にも GPCR が多量体を形成するとの報告はあるが、多量体形成の結果、受容体の特性がどのように変化するのかが、はっきりしないものも多い。また多量体形成を引き起こす受容体の構造はまだ明らかとなっておらず、これからの進展が期待される分野である。

7. pH 感知性 GPCR

これまで述べてきたように GPCR 研究は、単に恒常性維持機構の解明という基礎的な側面のみならず、薬物の開発などを通じて、疾患の克服や生理機能の改善など、人々が望む方向に生体機能を調節するという応用面へとつながる可能性を秘めていることから、現在も活発な研究がつづけられている。

生体内の pH は、少しでも酸性やアルカリ性に傾くと生体機能に重大な影響を及ぼすため、中性付近に厳密に制御されている。一方、胃での食物の消化や骨代謝には塩酸が積極的に用いられること、またガン組織の内部は酸性・低酸素状態となっており、これがガンの進展に関与していることから、生体内には積極的に pH を感知し、制御する仕組みが存在することが予想

されてきた (Tomura et al, 2005)。しかしながらこれまで、生体がどのように pH を感知するのかは、イオンチャンネルの関与が一部の作用に関して報告されているのみで、その実体はながらく不明であった。

我々は、TDAG8 とよばれる GPCR が、細胞外 pH の低下を感知して活性化する pH 感知性 GPCR であることを見出して以来、このファミリーの研究をこれまで行ってきた。この受容体ファミリーはロドプシンファミリーに属しており、現在までに 4 種 (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A) が報告されているが (Tomura et al, 2005)、その立体構造はまだ解明されていない。光エネルギーによりロドプシン内部のレチナールの構造が変化し、ロドプシン受容体が活性化すると同様に、ヒトのプロトン感知性 GPCR は、細胞外プロトンにより受容体内のヒスチジン残基がプロトネーションされ、活性化型に変化するという報告がなされている (Liu et al, 2010; Ludwig et al, 2003)。

図 3 では、ヒト OGR1、ヒト GPR4 の活性化に関与するヒスチジン残基の位置を模式化したものである (Liu et al, 2010; Ludwig et al, 2003)。両受容体間で似た位置に存在するヒスチジン残基が、活性化に関与することが判る。ヒスチジンのプロトネーションにより立体構造が変化し、受容体内の第 6 膜貫通領域が大きく変位し、活性化型に変化するものと予想される。

これまでの解析から、この受容体ファミリーはプロスタグランジンやサイトカインの産生を正または負に制御し、炎症応答などの生体反応に関与することが明らかとなりつつある (Tomura et al, 2010)。発現するプロトン感知性 GPCR の種類により、プロスタグランジンやサイトカインの産生が促進または抑制されるので、同じ酸性条件下でも生じる応答、ひいては生理作用は逆となる。この受容体ファミリーが多量体を形成する可能性に関しては不明であり、今後の進展が望まれる。

8. おわりに

1960年代から Lefkowitz らを中心に進められてきた GPCR の研究は、2011年の Kobilka らによる $\beta 2$ /Gs の結晶構造解析に至り、成熟した感がある。しか

しながら、受容体の三量体 G タンパク質への共役機構、受容体サブタイプの問題、オルファン受容体に対するリガンドの解明、異なる発現組織での生理作用の違いなど、解決すべき問題が、今なお次々と出てきている。これらの問題が一つずつ解き明かされるごとに、生体内の新たな調節系の発見や、その破綻に伴う各種疾病の発症機構が明らかになってゆくと予想される。GPCR 研究は今後も重要な分野として発展し続けると期待している。

参考文献

- Alberts BJ, Alexander, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell: Reference Edition. Garland Science, Vol. 5. 2008.
- Aragona BJ, Liu Y, Yu YJ, Curtis JT, Detwiler JM, Insel TR, Wang Z. Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nat Neurosci* 9: 133–139. 2006.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 84: 835–867. 2004.
- Chandrasekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288–294. 2006.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258–1265. 2007.
- Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 330: 1091–1095. 2010.
- Choe HW, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauss N, Hofmann KP, Scheerer P, Ernst OP. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471: 651–655. 2011.
- Chung S, Funakoshi T, Civelli O. Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S339–346. 2008.
- Colucci G, Apone F, Alyeshmerni N, Chalmers D, Chrispeels MJ. GCR1, the putative Arabidopsis G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4736–4741. 2002.
- Deupi X, Edwards P, Singhal A, Nickle B, Oprian D, Schertler G, Standfuss J. Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 119–124. 2012.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256–1272. 2003.
- Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK. Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485: 400–404. 2012.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482: 547–551. 2012.
- Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, Desale H, Clemons B, Cahalan SM, Schuerer SC, Sanna MG, Han GW, Kuhn P, Rosen H, Stevens RC. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 335: 851–855. 2012.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322: 1211–1217. 2008.
- Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N, Miwa S, Masaki T. Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G proteins using a mutant endothelin(A) receptor. *Mol Pharmacol* 61: 277–284. 2002.
- Kniazeff J, Prezeau L, Rondard P, Pin JP, Goudet C. Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol Ther* 130: 9–25. 2011.
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482: 552–556. 2012.
- Landau EM, Rosenbusch JP. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14532–14535. 1996.
- Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG, Tate CG. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474: 521–525. 2011.
- Lim MM, Wang Z, Olazabal DE, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ. Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429: 754–757. 2004.
- Liu JP, Nakakura T, Tomura H, Tobo M, Mogi C, Wang JQ, He XD, Takano M, Damirin A, Komachi M, Sato K, Okajima F. Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacol Res* 61: 499–505. 2010.
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425: 93–98. 2003.
- Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485: 321–326. 2012.
- Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prezeau L, Trinquet E, Pin JP. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 5: 561–567. 2008.
- Moriyama EN, Strobe PK, Opiyo SO, Chen Z, Jones AM. Mining the Arabidopsis thaliana genome for highly-divergent seven transmembrane receptors. *Genome Biol* 7: R96. 2006.
- Mosinger B, Redding KM, Parker MR, Yevshayeva V, Yee KK, Dyomina K, Li Y, Margolske RF. Genetic loss or pharmacological

- logical blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12319–12324. 2013
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**: 993–996. 2006.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739–745. 2000.
- Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P, Prezeau L. G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J Physiol* **587**: 5337–5344. 2009.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **469**: 175–180. 2011a.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383–387. 2007.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**: 549–555. 2011b.
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP, Ernst OP. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**: 497–502. 2008.
- Seifert R, Strasser A, Schneider EH, Neumann D, Dove S, Buschauer A. Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **34**: 33–58. 2013.
- Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, Liu W, Han GW, Kobayashi T, Stevens RC, Iwata S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **475**: 65–70. 2011.
- Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, Oprian DD, Schertler GF. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* **471**: 656–660. 2011.
- Thompson AA, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E, Huang XP, Trapella C, Guerrini R, Calo G, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* **485**: 395–399. 2012.
- Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* **17**: 1466–1476. 2005.
- Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing G-protein-coupled receptors and their physiological roles. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **135**: 240–244. 2010.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**: 486–491. 2008.
- White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, Gvozdenovic-Jeremic J, Shah P, Shiloach J, Tate CG, Grishammer R. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* **490**: 508–513. 2012.
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**: 1066–1071. 2010.
- Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang XP, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* **485**: 327–332. 2012.
- Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, Cherezov V, Stevens RC. Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**: 322–327. 2011.
- Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, Green HF, Pandey A, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Coughlin SR, Kobilka BK. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **492**: 387–392. 2012.