

ペプチド科学を基盤技術に用いた 膜タンパク質と生体膜の研究

京都大学化学研究所の河野健一と申します。この度、大阪府立大学の中瀬生彦先生からお誘い頂きまして、寄稿させて頂くことになりました。私は、2014年3月に京都大学大学院薬学研究科、松崎勝巳教授指導の下で博士（薬学）の学位を取得しました。卒業後、2014年4月から



河野 健一

同大学ウイルス研究所附属新興ウイルス研究センターで特定助教として1年3ヶ月、2015年7月からは出身研究室（松崎勝巳教授）と同大学物質－細胞統合システム拠点（楠見明弘教授）でそれぞれ3ヶ月間と6ヶ月間、博士研究員として研鑽を積みました。そして、2016年4月から、現職、同大学化学研究所（二木史朗教授）に助教として着任し、現在に至っております。以下に、学生時代から現在まで取り組んでいる研究内容についてご紹介させていただきます。

1. はじめに

細胞膜上に発現する膜タンパク質は、生体でのシグナル伝達やイオン透過などの機能を担っており、生命を維持する上で欠かせない役割を果たしています。その挙動は複雑な脂質組成をもつ膜環境中でダイナミックに変化するため、生体膜中でリアルタイムに測定する手法が望まれています。近年の研究により、膜タンパク質の機能は構造変化だけでなく、会合状態によっても調整され得ると報告されているため、会合状態を明らかにすることは創薬上重要な課題となっています。

現在、タンパク質間の相互作用を研究する上で汎用されている手法は、破壊的測定法と非破壊的測定法に大別することが出来ます。前者の代表例として共免疫沈降法などが挙げられますが、この手法は、本来存在すべき生体膜から膜タンパク質を可溶化しているため、相互作用するはずのないタンパク質との凝集が検出されることもあり、必ずしも膜上の会合状態を反映しているとは限りません。後者の代表例として、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）と生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）があります。FRET法およびBRET法は、これまで目的タンパク質に蛍光発光タンパク質を融合させる手法が汎用されていますが、蛍光発光タンパク質融合体は、1）細胞膜表面だけでなく細胞内に局在するタンパク質からも蛍光が検出されるため細胞内のシグナルが膜上のFRET/BRETシグナルを干渉する恐れがある事、2）ドナー融合体とアクセプター融合体の発現比をコントロールするのは容易ではないため定量性に欠ける事、3）蛍光発光タンパク質そのもののサイズが約27 kDaと非常に大きいために目的タンパク質本来の挙動に悪影響を及ぼす可能性がある事、4）コントロールタンパク質で手法の正確性を確認する論文が少ない事、などの問題点が挙げられます。従って、生体膜中における膜タンパク質の会合状態を正確に解析できる手法が未だに確立されて

いないのが現状です。

本研究では、京大・松崎研究室で開発された小分子蛍光ラベル法（コイルドコイルラベル法¹⁾（図1）で生細胞膜上の膜タンパク質を特異的に蛍光標識し、FRETを用いて膜タンパク質の会合状態を定量的に解析する方法を確立するとともに、会合状態に関して論争のある β_2 アドレナリン受容体（ β_2 AR）や、安定な四量体と考えられているA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の解析を行いました。

2. コイルドコイルラベル法の原理と特徴

図1Aで示すように、コイルドコイルラベル法^{1,2)}は、負電荷ペプチドであるE3（EIAALEK）₃（正味の電荷：-3）と正電荷ペプチドであるK4（KIAALKE）₄（正味の電荷：+4）間で形成される強固で特異的なヘテロ二量体に基づく標識法です。グルタミン酸残基とリシン残基間での静電的相互作用およびロイシン残基とイソロイシン残基間での疎水性相互作用がその駆動力となっています。まず、E3タグを目的タンパク質のN末端に遺伝子導入し、生細胞に発現させます。次に、固相合成したK4ペプチドのN末端を蛍光標識し、外部から生細胞に加えることで簡潔にラベルが完了します。このラベル法の利点として、1）ラベル時間がわずか1分で完了する事、2）帯電したK4プローブは膜非透過性であるため膜表面上の目的タンパク質のみをラベルすることが出来る事（図2A）、3）高い結合力（ $K_d \sim 5$ nM）を有しているため50 nMで90%の目的タンパク質をラベルできる事、4）ドナーとアクセ

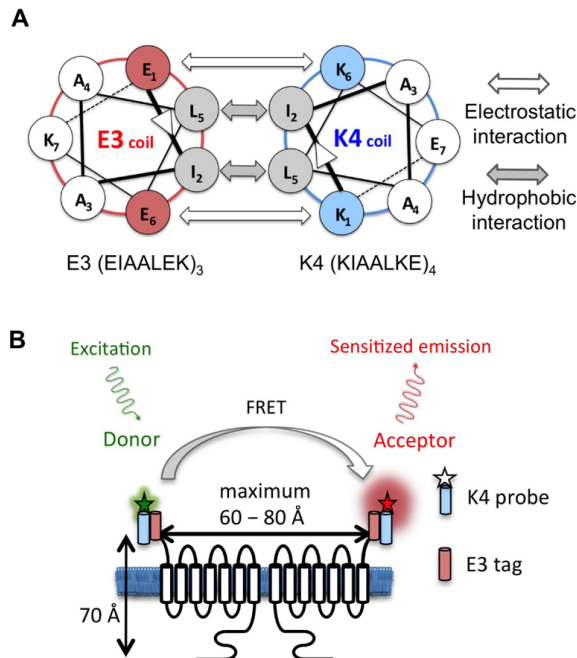


図1 コイルドコイルラベル法と多量体形成タンパク質間FRETの模式図 (A) E3とK4のヘリカルコイル図。EとK間の静電的相互作用とLとI間の疎水性相互作用が駆動力として働く。(B) GPCR二量体形成時のFRET模式図。励起されたドナーからアクセプターへとエネルギー移動が起きる。Alexa568-647ペアはGPCR二量体の最大距離60-80 Åをカバーできる臨界移動距離 R_0 （=82 Å）をもつ。

プターのラベル比率を正確にコントロールすることが可能である事、5）分子量が5-6 kDaと小分子であるため膜タンパク質の機能に悪影響を与えない事、などが挙げられます。特に、4）はFRETを用いた会合状態の定量的な解析法に必要な不可欠な点です。

3. 会合状態の定量的解析法の確立

FRETの蛍光色素ペアとして、臨界移動距離 R_0 （50%のFRET効率を与える距離）が82 Åあるドナー-アクセプターペア（Alexa Fluor 568-647）を用いました。これは、比較的サイズの大きい β_2 AR（単量体：30-40 Å）³⁾が多量体を形成した場合でもFRETを検出できるようにするためです（図1B）。ドナーとアクセプターのK4プローブで膜タンパク質を共染色した後（図2A）、共焦点顕微鏡で観察し、細胞膜部分のスペクトル情報から以下の式に基づいて、見かけ上のFRET効率（ E_{app} ）の実測値を算出しました。

$$E_{app} = \frac{\epsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\epsilon_D(\lambda_D^{ex})} \times \left(\frac{F_{AD} - F_A}{F_A} \right) \quad [\text{式1}]$$

- ・ $\epsilon_A(\lambda_D^{ex})$: ドナー励起波長に於けるアクセプターのモル吸光係数
- ・ $\epsilon_D(\lambda_D^{ex})$: ドナー励起波長に於けるドナーのモル吸光係数
- ・ F_{AD} : ドナー存在下でのアクセプターの蛍光強度
- ・ F_A : ドナー非存在下でのアクセプターの蛍光強度^(注1)

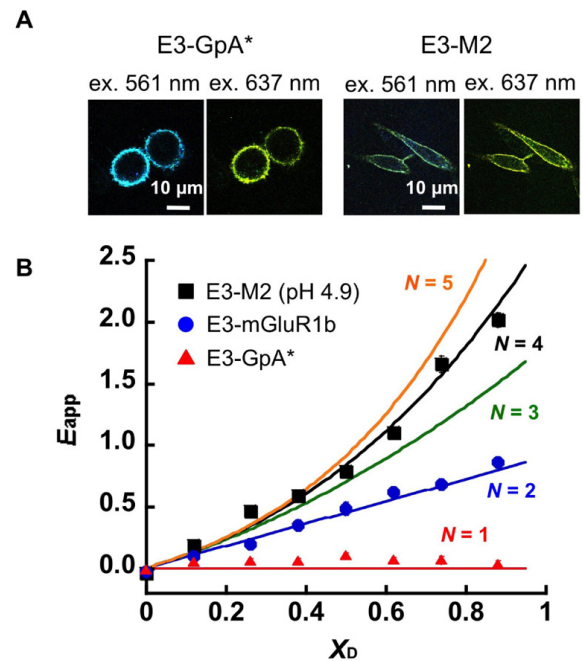


図2 スタンダード膜タンパク質の会合状態と手法の定量的証明 (A) E3-GpA*とE3-M2を一過性発現させたCHO細胞をK4プローブ（ $X_0=0.50$ ）で標識。(B) E_{app} 値の X_0 依存性曲線。単量体（ $N=1$ ）、二量体（ $N=2$ ）、三量体（ $N=3$ ）、四量体（ $N=4$ ）、五量体（ $N=5$ ）の理論曲線を式2より算出。これに対して、実験から求めたE3-GpA*（pH 7.4）、E3-mGluR1b（pH 7.4）、E3-M2（pH 4.9）の E_{app} 実測値（式1）をそれぞれ▲、●、■でプロットした。

会合数の定量的解析は、 E_{app} の実測値〔式1〕と理論値〔式2〕のグラフを比較する事で行いました（図2B）。

$$E_{app} = E \times \frac{X_D}{1 - X_D} \times [1 - \{X_D(1 - X_U') + X_U'\}^{N-1}] \quad \text{〔式2〕}$$

- ・ X_D : ドナーモル分率 (= $[D] / ([D] + [A])$) (注1)
- ・ E : 真の FRET 効率 (= 1.0) (注2)
- ・ X_U' : 非ラベルフラクション (= 0.1) (注3)

(注1) ドナー存在下ではアクセプターの直接励起分 F_A を求めることはできない。そこで、アクセプター単独染色した別サンプルを用いて、561 nm と 637 nm で励起したときのアクセプターの蛍光強度比 ($R_{561/637}$) をとり、共染色した本サンプルを 637 nm で励起したときのアクセプター蛍光強度に $R_{561/637}$ を乗じることで F_A を算出した。

(注2) ドナーとアクセプターの仕込み時の混合比率。実際の膜タンパク質のラベル比率ではない。

(注3) ドナーとアクセプターが十分に近接して100%の FRET 効率が起きると仮定。

(注4) 50 nM で90%の目的タンパク質をラベルできるため。

コイルドコイルラベル法を用いた FRET 測定で膜タンパク質の会合状態を正しく解析できることを証明するために、単量体（グリコフォリン A 変異体：GpA*）、二量体（代謝型グルタミン酸受容体：mGluR1b）、四量体（M2タンパク質：M2（pH 4.9））を形成することが既に報告されている3つのスタンダード膜タンパク質の解析を行ったところ、理論曲線と対応する結果が得られたことから、この手法を用いて受容体の会合状態を正しく解析可能なことが明らかになりました⁴（図2B）。

4. β_2 AR の会合状態

β_2 AR は、創薬の重要なターゲットとされる G タンパク質共役型受容体（GPCR）の典型例でありながら、その会合状態については研究グループ間で論争が続いていました^{5,6}。2種類の細胞株で β_2 AR の会合状態について調べましたところ、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞では、様々な条件下（温度やリガンド刺激、発現方法）において、全く FRET シグナルが検出されませんでした（図3A）。一方、ポジティブコントロールとして抗 β_2 AR 抗体とプロテイン A で β_2 AR をクロスリンクした場合には FRET シグナルの有意な上昇が見られた（図3A, B）ことから、 β_2 AR が多量体を形成していれば FRET シグナルを検出できることを証明しています。また、ヒト胎児腎（HEK293）細胞でもほとんどの条件において FRET シグナルが検出されませんでした。が、 β_2 AR のアゴニスト（isoproterenol）で刺激した時にのみ、細胞膜上でわずかな E_{app} の上昇が見られました（図3B, iso (membrane)）。そこで、会合状態（ E_{app} 値の上昇）とシグナル伝達（cAMP 応答）の経時変化を追ったところ、多量体形成は刺激開始から少なくとも10分以降でしか検出されなかったのに対して、シグナル伝達は刺激開始からわずか5分後には見られたことから（図3C）、多量体形成よりもシグナル伝達や内在化の

方が早く起こることが分かりました⁴。

これらの結果から、 β_2 AR は定常的にホモオリゴマーを形成しておらず、また、シグナル伝達や内在化に多量体形成は必要ではないことが明らかになりました⁴。筆者は、この他にも GPCR の代表例であるドーパミン受容体 D2R やプロスタグランジン受容体 EP1R、ケモカイン受容体 CXCR4 の会合状態について調べましたが、結果は β_2 AR と同様でした（図3D）。これらの詳細に関しては参考文献7をご覧ください。

5. M2タンパク質の会合状態

M2タンパク質は、A 型インフルエンザウイルスのエンベロープに発現するプロトンチャネルであり、ウイルスの増殖に必要な不可欠な役割を果たしています。近年の報告により、ミセルやリポソーム中において M2 のフラグメントペプチドは安定な四量体を形成すると考えられています⁸、実際の生体膜中での会合状態は明らかにされていません。本研究では、生体膜中における全長 M2タンパク質の会合状態を解析すると共に、プロトンチャネル活性との関連性について調べました。

会合状態の解析結果では、生体膜中における M2タンパク質は、酸性 pH では四量体を形成しますが、中性付近の pH では二量体で存在することを明らかにしました（図4A, B）。つまり、M2は既存モデルで提唱されているような安定な四量体ではなく、pH に応じて会合状態が変化して二量体と四量体の平衡状態にあると考えられます。一方、抗ウイルス薬アマンタジン塩酸塩（Am）存在下では四量体形成が完全に阻害されて、酸性条件（< pH 5.5）でも二量体でしか存在できなくなりました（図4B）。

次にプロトンチャネル活性を調べるため、pH 感受性色素 SNARF-4F を細胞内にローディングし、細胞外液を酸性 pH 溶液に交換しました。M2チャネルを通して細胞内に流入した見かけ上の H^+ 濃度（ $[H^+]$ ）をプロットし、以下の一次指数関数を用いて速度定数 k (s^{-1}) を算出しました。

$$[H^+]_{in}(t) = [H^+]_{out}(0) + ([H^+]_{in}(0) - [H^+]_{out}(0))e^{-kt} \quad \text{〔式3〕}$$

- ・ $[H^+]_{in}(t)$: 細胞外液を酸性 pH に交換してから t 秒後の細胞内のプロトン濃度 (M)
- ・ $[H^+]_{in}(0)$: 外液交換後 $t=0$ 秒に於ける細胞内のプロトン濃度 (M)
- ・ $[H^+]_{out}(0)$: 外液交換後 $t=0$ 秒に於ける細胞外のプロトン濃度 (M)

k 値を細胞膜上の M2 発現量で割って得られた値がチャネル活性 γ ($s^{-1} \text{ protein}^{-1}$) です。解析の結果、四量体（pH 4.9）だけでなく二量体（pH 6.0）でもチャネル活性を有することが分かりました（図4C）。コレステロール除去剤（M β CD）により、二量体では顕著にチャネル活性が低下したのに対して、四量体では変化が見られませんでした。一方、Am 存在下では、両方のチャネル活性が阻害されました（図4C）。

以上の結果をまとめると、図4D で示すように、M2タンパク質は pH に応じて会合状態が変化し、四量体でも二量体でもチャネル活性を示します。M2二

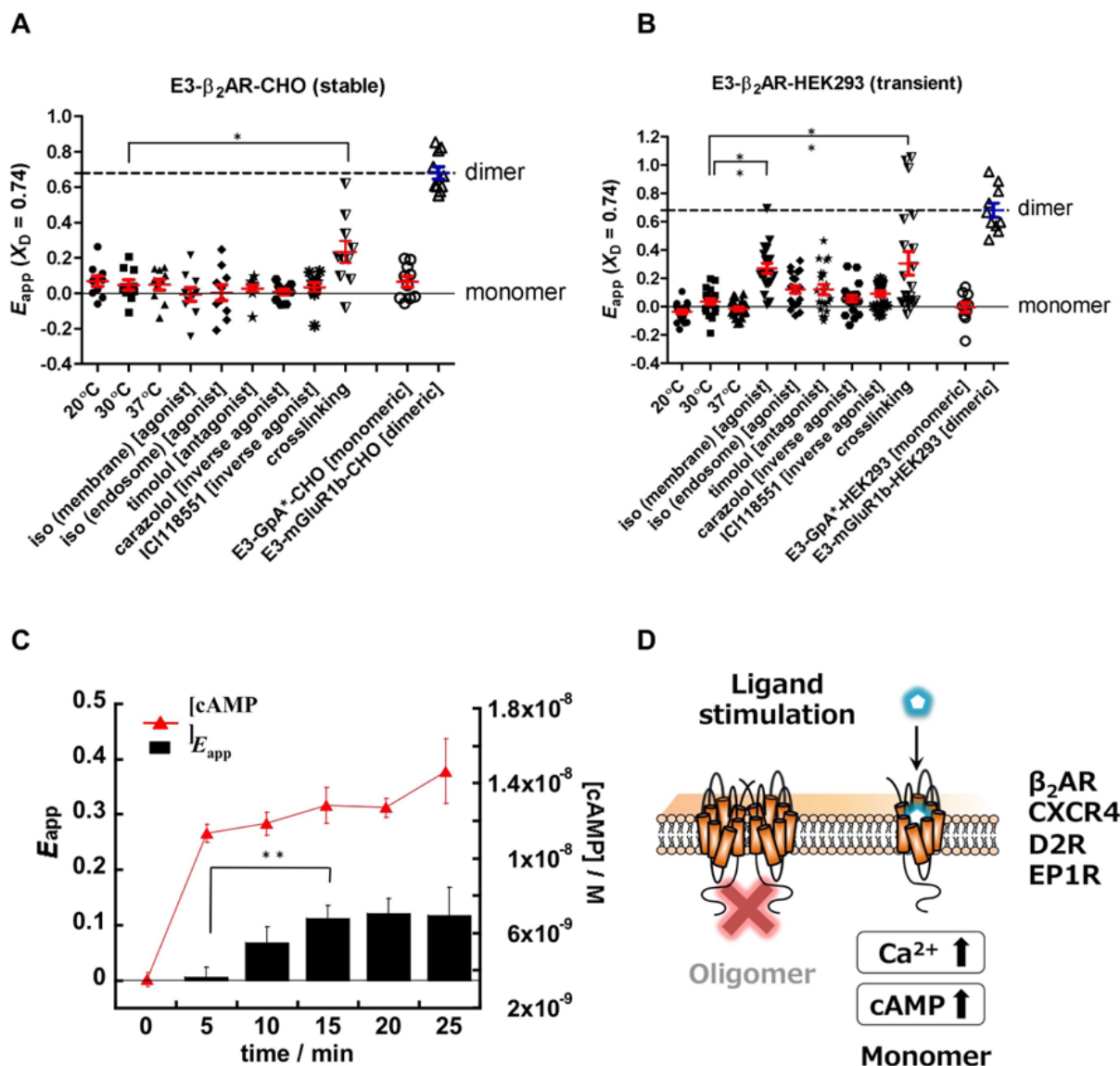


図3 E3-β₂ARの会合状態と機能との関連性 (A) CHO細胞に安定発現させたE3-β₂ARの E_{app} 値の変化。コントロール：E3-GpA*-CHO（一過性発現）とE3-mGluR1b-CHO（一過性発現）。X₀=0.74でラベル。iso: isoproterenol。membraneとendosomeは膜領域とエンドソーム領域の解析結果。ダッシュ線と直線は単量体と100%二量体をそれぞれ形成した時の E_{app} の理論値。(B) HEK293細胞に一過性発現させたE3-β₂ARの E_{app} 値の変化。(C) HEK293細胞に一過性発現させたE3-β₂ARをisoproterenol刺激した時の E_{app} 値とcAMP応答の経時的変化。(D) GPCR会合状態と機能のモデル。

量体はコレステロールと複合体を形成しており、プロトン伝達経路を形成するのにコレステロールが必要不可欠です。一方、四量体は中央部分にポアを有しているため、チャネル活性にコレステロールを必要としません。Amは、M2二量体に結合することで四量体形成とチャネル活性を阻害しています。これらことから、M2チャネルの最小機能単位は二量体であると考えております⁹。

6. おわりに (将来への展望)

筆者は学生時代から、膜タンパク質の会合状態と機能の関連性を研究してきましたが、奥が深く興味の尽きる事はありません。昨年より二木教授と共に生体膜の物性と膜透過ペプチドに関する研究を進めて参りました¹⁰。近年、膜タンパク質の会合や機能は、生体膜の物性（張力や曲率、側方圧など）にも影響されるこ

とが報告されています。生体膜の物性が膜タンパク質の活性化の鍵を握っているのであれば、細胞内外のシグナル伝達にも関与している可能性を示唆しています。将来的に膜物性の観点から細胞機能制御機構を解明し、さらには創薬の種を提案するような研究が出来れば、全く新しい切り口からのアプローチになりますので個人的には面白いと考えております。

References

- Yano, Y.; Yano, A.; Oishi, S.; Sugimoto, Y.; Tsujimoto, G.; Fujii, N.; Matsuzaki, K. ACS Chem Biol 2008, 3, 341-345.
- Yano, Y.; Kawano, K.; Omae, K.; Matsuzaki, K. Methods Enzymol 2012, 504, 355-370.
- Fung, J. J.; Deupi, X.; Pardo, L.; Yao, X. J.; Velez-Ruiz, G. A.; Devree, B. T.; Sunahara, R. K.; Kobilka, B. K. EMBO J 2009, 28, 3315-3328.

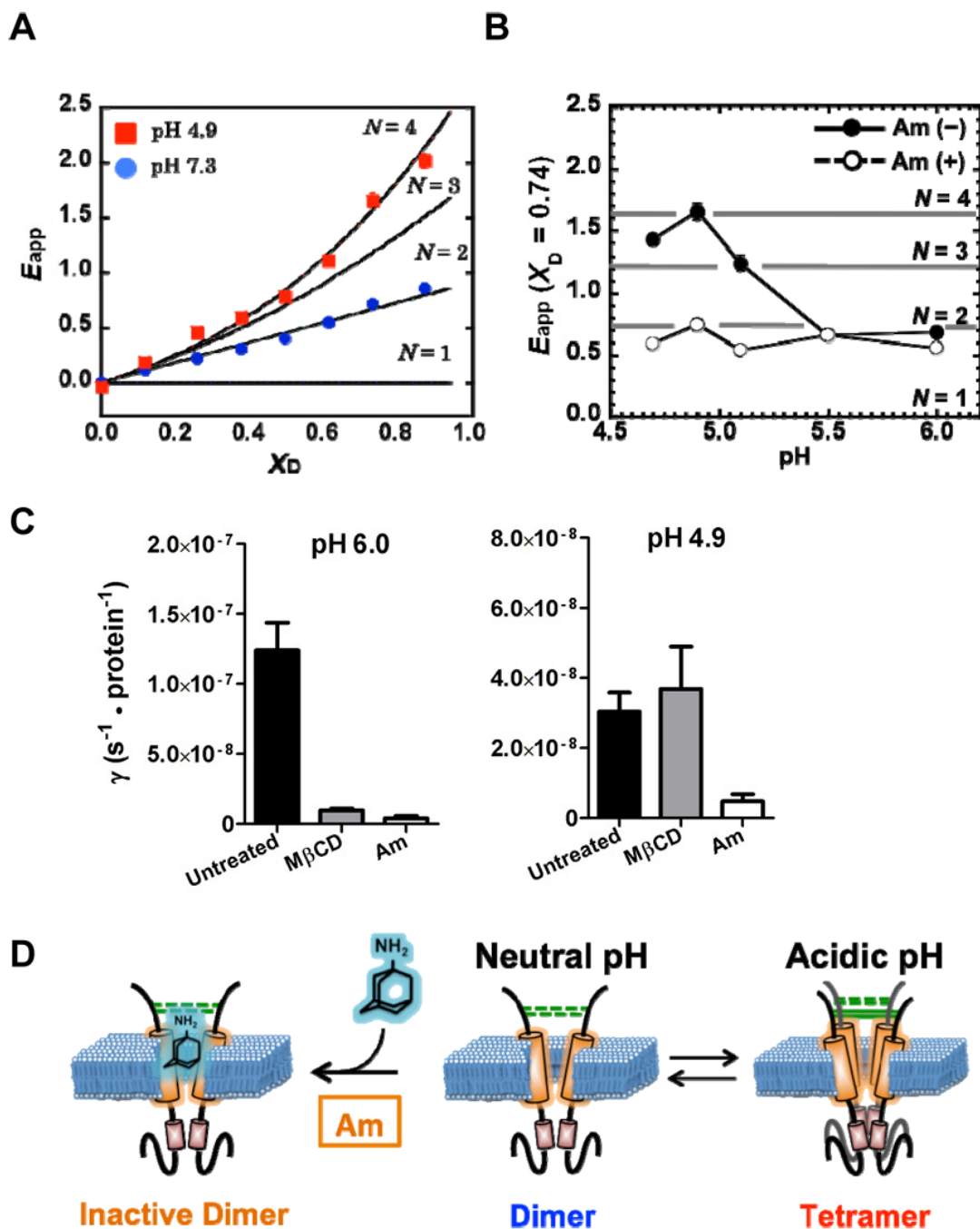


図4 E3-M2の会合状態のpH依存性 (A) pH 4.9と7.3におけるM2の会合状態。Fig. 2Bに同じ。(B) アマンタジン (Am) 存在下と非存在下における E_{app} 値のpH依存性。上の直線から四量体 ($N=4$)、三量体 ($N=3$)、二量体 ($N=2$)、単量体 ($N=1$) の理論値。(C) チャネル活性のpH依存性。コレステロール除去処理 (M β CD) 及びAm添加時の結果。(D) 二量体-四量体平衡モデル。中性pHでは二量体として存在し、酸性pHでは四量体を形成する。Am存在下では四量体形成及びチャネル活性を阻害される。

- Kawano, K.; Yano, Y.; Omae, K.; Matsuzaki, S.; Matsuzaki, K. Anal Chem 2013, 85, 3454–3461.
- Bouvier, M.; Heveker, N.; Jockers, R.; Marullo, S.; Miligan, G. Nat Methods 2007, 4, 3–4; author reply 4.
- Salahpour, A.; Masri, B. Nat Methods, 2007, 4, 599–600; author reply 601.
- Kawano, K.; Yagi, T.; Fukada, N.; Yano, Y.; Matsuzaki, K. J Pept. Sci 2017, 23, 650–658.
- Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Di Costanzo, L.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. F. Nature 2008, 451, 596–599.
- Kawano, K.; Yano, Y.; Matsuzaki, K. J Mol Biol 2014, 426, 2679–2691.
- Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A.S.; Futaki, S. Angew Chem Int Ed 2017, 56, 7644–7647.

かわの けんいち
京都大学化学研究所
kawano.kenichi.2u@kyoto-u.ac.jp