

新規小分子ラベル法と in-cell FRET を用いた膜タンパク質の会合状態の定量的解析

河野 健一

Stoichiometric Analysis of Oligomerization of Membrane Proteins Using Coiled-coil Labeling and in-Cell Spectroscopy

Kenichi Kawano

Department of Biophysical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University;
Yoshida-Shimoadachi-cho 46-29, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

(Received May 27, 2014)

Many membrane proteins are responsible for signaling and ionic transport necessary to maintain biological functions *in vivo*. Recently, not only conformational changes but also oligomerization have been proposed to regulate protein activation. Thus, the study of membrane protein oligomerization is crucial for new drug development. The existing destructive methodologies such as immunoprecipitation, however, are not suitable to determine oligomeric states precisely because of the artificial aggregation of proteins after detergent solubilization. In the present study, the coiled-coil tag-probe labeling method and spectral imaging were first combined to establish a new methodology based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for stoichiometric analysis of the oligomeric states of membrane proteins on living cells. After validating the method for mono-, di-, and tetrameric standard membrane proteins, the oligomeric state of β_2 -adrenergic receptors (β_2 ARs) was examined to clarify its functional significance. It was found that β_2 ARs could transduce cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) signals and internalize them upon treatment with ligands without showing any FRET signals. Thus, β_2 ARs do not form constitutive homooligomers, and homooligomerization is not necessary for the receptor function of β_2 ARs. Finally, the oligomeric state of full-length M2 proton-selective channels of influenza A virus was investigated. Although the results of X-ray crystallography and NMR studies using fragment peptides suggested that M2 stably forms a tetrameric channel, the full-length M2 proteins formed proton-conducting dimers at neutral pH and these dimers were converted to tetramers at acidic pH, indicating that the minimal functional unit of the M2 channel is a dimer.

Key words—coiled-coil labeling; fluorescence resonance energy transfer; oligomerization; spectral imaging; β_2 -adrenergic receptor; M2 proton channel

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る。その挙動は複雑な脂質組成を持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る。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、¹⁾ 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る。

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できる。^{2,3)} 前者の代表例として共免疫沈降法などが挙げられる。この手法は、組織や細胞の溶解液に、目的タンパク質特異的な抗体とプロテイン A 標識アガロースビーズを添加して目的タンパク質を沈降させた後、ウェスタンブロットにより相互作用相手を検出するものである。しかしながら、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、かならずしも膜上の会合状態を反映しているとは限らない。後者の代表例として、蛍光共鳴エネルギー移

The author declares no conflict of interest.

京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: kawano.kenichi.2u@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成 25 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (物理系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

動 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) と生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer; BRET) がある。FRET 法及び 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して発現させ、100 Å 以内に近接したときにエネルギー供与体 (ドナー) からエネルギー受容体 (アクセプター) へと起こるエネルギー移動シグナルを会合の指標としている。⁴⁻⁹⁾ しかし、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蛍光が膜上の FRET/BRET シグナルを干渉する恐れがあること、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こと、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こと、などの問題点が挙げられる。したがって、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いまだに確立されていないのが現状である。

本研究では、当研究室で開発した小分子蛍光ラベル法 (コイルドコイルラベル) (Fig. 1)¹⁰⁾ 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、現在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 adrenergic receptor; β_2 AR)^{4-6,11,12)} 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¹³⁻¹⁵⁾ の解析を行った。

2. コイルドコイルラベル法の原理と特徴

Figure 1 (A) で示すように、コイルドコイルラベル法は、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ある。¹⁶⁾ グルタミン酸残基とリシン残基間での静電的相互作用及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る。¹⁷⁾ まず、E3 タグを目的タンパク質の N 末端に遺伝子導入し、生細胞に発現させる。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する [Fig. 1

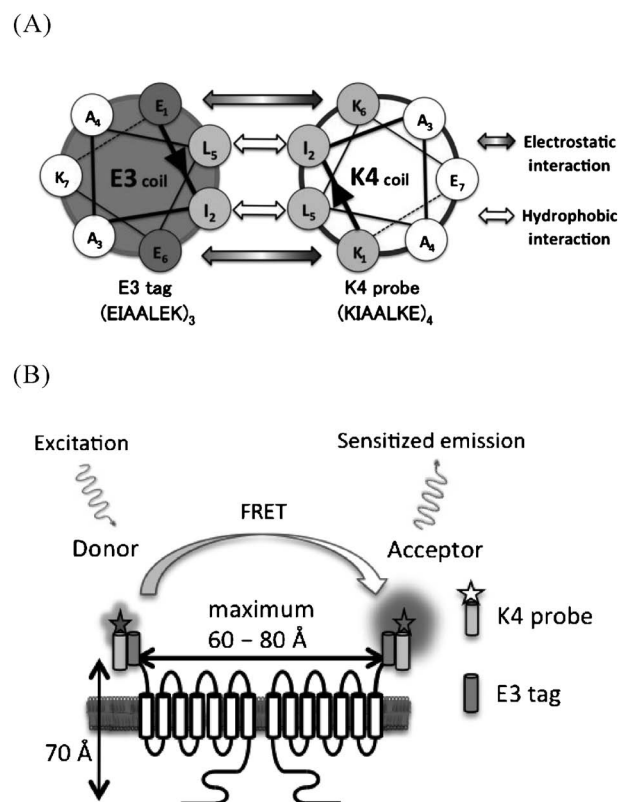


Fig. 1. Coiled-coil Tag-Probe Labeling Method and Schematic Diagram of FRET within Oligomeric Proteins

(A) Helical wheel representation of the E3 and K4 heterodimer. The peptide chains propagate into the page from the N-terminus to the C-terminus. White and graded double-headed arrows show hydrophobic interaction between the side chains of L and I in a “knobs-into-holes” manner and electrostatic interaction between the side chains of E and K, respectively. (B) Schematic diagram of FRET within a GPCR dimer. Unlabeled and star-attached cylinders show E3 tags and K4 probes, respectively. The left and right stars show the energy donor fluorophore (Alexa568) and energy acceptor fluorophore (Alexa647), respectively.

(B)].

このラベル法の利点として、1) ラベル時間がわずか 1 分で完了すること、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できること [Fig. 2 (A)], 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こと、



河野健一

2009 年岡山大学農学部卒業。2011 年京都大学薬学研究科修士課程修了。2014 年京都大学薬学研究科博士後期課程修了、博士号 (薬学) を取得。2014 年現職、京都大学ウイルス研究所附属新興ウイルス研究センター特定助教に就任。膜タンパク質の構造と機能の関連性を追求し、社会貢献できる研究を目指したい。

4) ドナーとアクセ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こと, 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こと, などが挙げられる.^{10,18–20)} 特に, 特徴 4) は FRET を用いた会合状態の定量的解析法に必要な不可欠な点である.

3. 会合状態の定量的解析法の確立¹⁸⁾

FRET の蛍光色素ペアとして, 臨界移動距離 (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–Alexa Fluor 647) を用いた. これは, 比較的サイズの大きい β_2 AR (単量体: 30–40 Å)²¹⁾ 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ある [Fig. 1(B)]. 各々の色素で別々に K4 プロブの N 末端を蛍光標識し, 混合投与して膜タンパク質を共染色した [Fig. 2(A)]. スペクトル検出器を備えた共焦点顕微鏡で観察し, 取得した細胞膜部分のスペクトルデータを各色素の蛍光スペクトル成分にデコンボリューションした. 以下の式 Eq. (1)²²⁾ を用いて FRET 由来のアクセプターの増感蛍光を指標に, 見かけ上の FRET 効率である E_{app} の実測値を算出し, ドナーモル分率 (X_D) 依存性から会合状態の定量的解析を行った.

$$E_{app} = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^0)}{\varepsilon_D(\lambda_D^0)} \times \left(\frac{F_{AD} - F_A}{F_A} \right) \quad (1)$$

Equation (1) において, $\varepsilon_A(\lambda_D^0)$ 及び $\varepsilon_D(\lambda_D^0)$ はそれぞれドナー励起波長 (λ_D^0 : 561 nm) におけるアクセプターとドナーのモル吸光係数, F_{AD} 及び F_A はそれぞれ 561 nm 励起時のドナー存在下及び非存在下でのアクセプターの蛍光強度を表す. しかし, ドナー存在下ではアクセプターの直接励起分 F_A を直接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.

E_{app} の理論値を算出する際は, 以下の式 Eq. (2)²²⁾ を用いた.

$$E_{app} = E \times \frac{X_D}{1 - X_D} \times [1 - \{X_D(1 - X'_U) + X'_U\}^{N-1}] \quad (2)$$

Equation (2) において, E は真の FRET 効率であり, X'_U は非ラベルフラクションを表す. ドナーと

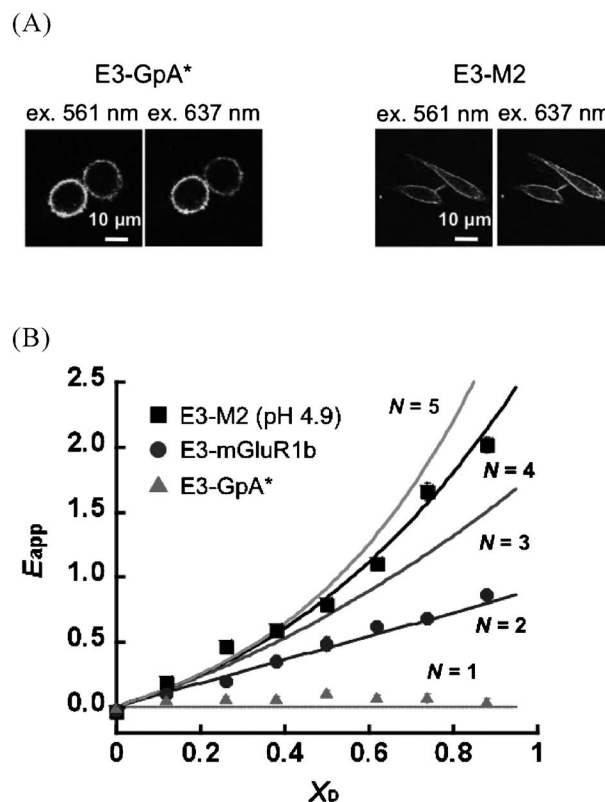


Fig. 2. Detection of the Oligomerization of Standard Membrane Proteins by Coiled-coil Tag-Probe Labeling

(A) Spectral images of E3-GpA* and E3-M2 transiently expressed on CHO cells labeled with K4 probes at $X_D=0.50$. (B) Determination of oligomeric states. The apparent FRET efficiency, E_{app} , is plotted as a function of the donor mole fraction, X_D . The lines from above show theoretical curves calculated by Eq. (2) for the monomer ($N=1$), dimer ($N=2$), trimer ($N=3$), tetramer ($N=4$), and pentamer ($N=5$) as a function of X_D , respectively. Triangle, circle, and square symbols represent the measured E_{app} values calculated by Eq. (1) for E3-GpA* (pH 7.4), E3-mGluR1b (pH 7.4), and E3-M2 (pH 4.9), respectively. Error bars represent the mean $\pm$ S.E.M., $n=10$.

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し, E を 1.0 とおいた. また, 上述したように 50 nm で 90% の目的タンパク質をラベルできることから, X'_U を 0.1 とした.

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*),²³⁾ 二量体 (代謝型グルタミン酸受容体: mGluR1b),²⁴⁾ 四量体 (M2 タンパク質: M2 (pH 4.9))¹³⁾ 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った [Fig. 2(B)].

既存手法では標的膜タンパク質に蛍光若しくは発

光タンパク質を融合して会合状態を調べているが、適切なスタンダードが測定されていないなど定量性に欠けていた。それに対して、本研究では3つのスタンダード膜タンパク質を用いて解析手法の定量性を証明した上で、標的膜タンパク質の会合状態を調べているため、得られたデータの信頼性は高いと言える。

4. β_2 AR の会合状態¹⁸⁾

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 (G protein-coupled receptor; 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る。^{4-6,11,12)} 本研究では E3 タグが付いた β_2 AR が正しくフォールディングし、なおかつ野生型²⁵⁾ と同じ機能 (cAMP 応答の EC_{50} : 3.0×10^{-10} M) を有していることを最初に確認した。

次に、2種類の細胞株で β_2 AR の会合状態について調べた。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で会合状態を解析したところ、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なかった [Fig. 3(A)]。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 を添加し人為的に複数の 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みられた [Figs. 3(A) and (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る。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なかったが、 β_2 AR のアゴニストであるイソプロテレノール (iso) で刺激したときにのみ、細胞膜上でわずかな E_{app} の上昇がみられた [Fig. 3(B), iso (membrane)]。そこで、iso で刺激した際、会合状態とシグナル伝達 (cAMP 応答) 及び受容体の内在化にどのような関連性があるのかを調べるため、経時的変化を追った。その結果、多量体形成 (E_{app} 値の上昇) 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 [Fig. 3(C)] のに対して、cAMP 応答 [Fig. 3(C)] や内在化 [Fig. 3(D)] は刺激開始からわずか 5 分後にはみられたことから、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った。

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った。本研究で得られた結果が、長年続いた論争に終止符を打つことに期待したい。

5. M2 タンパク質の会合状態²⁶⁾

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役割を果たしている。^{27,28)} 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る¹³⁻¹⁵⁾ が、実際の生体膜中での会合状態は明らかにされていない。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ともに、プロトンチャネル活性との関連性について調べた。

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 では四量体を形成するが、中性付近の pH では二量体で存在することを明らかにした [Figs. 4(A) and (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る。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った [Fig. 4(B)]。

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、一次指数関数：

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

を用いたフィッティングにより速度定数 k (s^{-1}) を算出した。ここで、 $[H^+]_{in}(t)$ は細胞外液を酸性 pH に交換してから t 秒後の細胞内のプロトン濃度 (M)、 $[H^+]_{in}(0)$ と $[H^+]_{out}(0)$ はそれぞれ外液交換後 $t=0$ 秒における細胞内及び細胞外のプロトン濃度 (M) を表している。その後、 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 ($s^{-1} \text{ protein}^{-1}$) である。ここで留意すべきは、細胞内には緩衝効果があり、²⁹⁻³¹⁾ 細胞内に流入した大半の H^+ を打ち消してしまうため、得られた γ の値

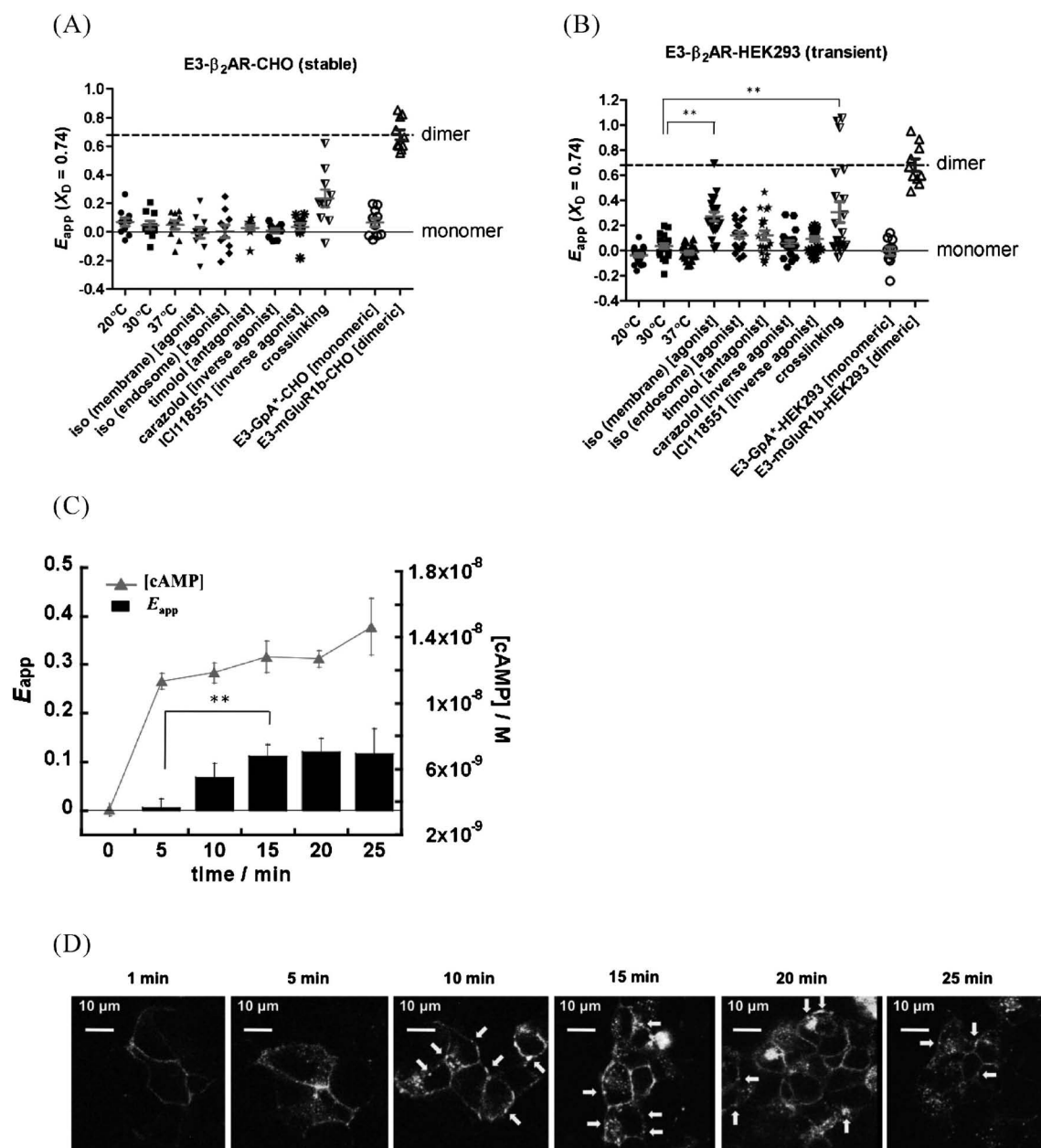


Fig. 3. The Relationship between the Oligomeric State and the Function of E3-β₂AR

(A) The E_{app} values for E3-β₂AR-CHO (stable), E3-GpA*·CHO (transient), and E3-mGluR1b-CHO (transient) labeled with K4 probes at $X_D=0.74$. Iso (membrane) and iso (endosome) denote the E_{app} values on plasma membranes and endosomes after treatment with the agonist isoproterenol, respectively. The antagonist timolol, the inverse agonists carazolol and ICI118551 were also administered and the E_{app} values were determined on plasma membranes. The dotted line shows the average E_{app} value (0.68) for 100% dimers, assuming $E=1.0$. Error bars represent the mean ± S.E.M., $n=10$. * $p<0.05$ (two-tailed Student's t test). (B) The E_{app} values for E3-β₂AR-HEK293 (transient), E3-GpA*·HEK293 (transient), and E3-mGluR1b-HEK293 (transient) labeled at $X_D=0.74$. Similar experiments to Fig. 3(A) were performed using E3-β₂ARs transiently expressed on HEK293 cells. Error bars represent the mean ± S.E.M., $n=20$ (β₂AR) and $n=10$ (GpA*, mGluR1b). ** $p<0.01$ (two-tailed Student's t test). (C) Time course of FRET increase and cAMP production for E3-β₂AR-HEK293 (transient) treated with 10 μM isoproterenol. Error bars represent the mean ± S.E.M., $n=10$ (E_{app}) and $n=3$ (cAMP assay). ** $p<0.01$ (two-tailed Student's t test). (D) The spectral images of internalization of E3-β₂AR-HEK293 (transient) after stimulation with 10 μM isoproterenol.

は絶対値ではなく、あくまで相対的な活性でしかないということである。ただし、初期の細胞内 pH はおよそ 7.0 前後であるため、外液 pH 6.0 と pH 4.9 の条件で測定した初期濃度勾配が受ける緩衝効果は同じと考えることができる。より詳細な議論は、

Reference 26) を参照されたい。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った [Fig. 4(C)]. コレステロール除去剤 (MβCD) 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

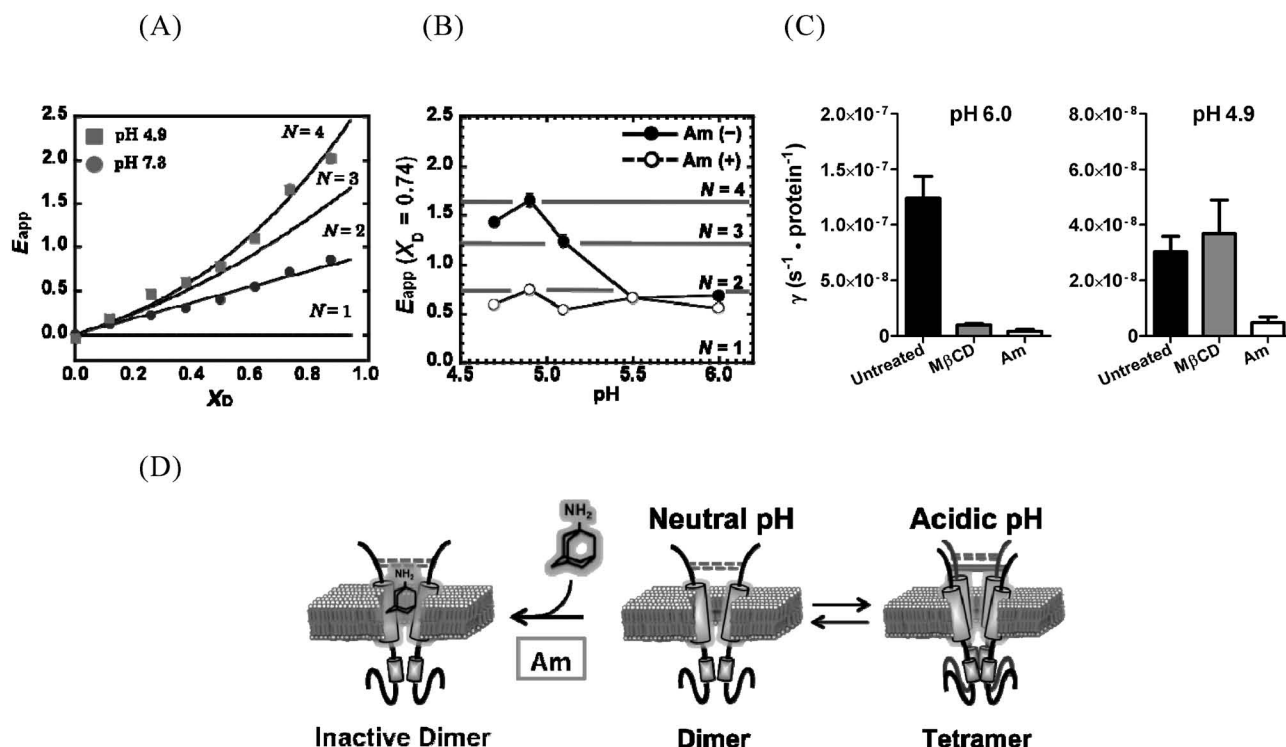


Fig. 4. The Oligomeric States of E3-M2 in a pH-dependent Manner

(A) Determination of the oligomeric states at pH 4.9 and 7.3. The apparent FRET efficiency E_{app} was plotted as a function of the donor mole fraction X_D . Squares and circles indicate the E_{app} values determined by Eq. (1) for E3-M2 at pH 4.9 and 7.3, respectively. The black lines represent the theoretical curves from above for the tetramer ($N=4$), trimer ($N=3$), dimer ($N=2$), and monomer ($N=1$), respectively, calculated by Eq. (2) assuming a true FRET efficiency of 1.0 and an unlabeled fraction of 0.1. Error bars represent the mean $\pm$ S.E.M., $n=10$. (B) The pH dependence of the oligomeric states of E3-M2 and the effect of the Am pretreatment. Closed and open circles indicate the E_{app} values at $X_D=0.74$ in the absence and presence of Am, respectively. Lines denote the theoretical E_{app} values for the tetramer ($N=4$), trimer ($N=3$), dimer ($N=2$), and monomer ($N=1$, overlapped with the abscissa). Error bars represent the mean $\pm$ S.E.M., $n=8$. (C) The influence of cholesterol removal on channel activity at pH 6.0 (left) and 4.9 (right). Black, gray, and white bars express γ ($s^{-1} \text{ protein}^{-1}$) values for untreated, 10 mM M β CD-treated, and 100 μ M Am-treated cells, respectively. Error bars represent the mean $\pm$ S.E.M., $n=8$. (D) The dimer-tetramer equilibrium state in a pH-dependent manner; a drop of pH drives the dimers to form a tetramer, whereas the tetramer dissociates to dimers at a neutral pH. At a neutral pH, Am binds the dimer to induce an inactive state, resulting in the inhibition of tetramerization. Note that the true Am to M2 stoichiometry is not known.

量体では変化がみられなかった [Fig. 4(C)]. 一方, Am 存在下では, 両方のチャネル活性が阻害された [Fig. 4(C)].

以上の結果をまとめると, Fig. 4(D)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す. M2 二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あると思われる. 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ていないと考えられる. 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る. これらことから, M2 チャネルの最小機能単位は, 二量体であると言える.

6. おわりに (将来への展望)

膜タンパク質の会合状態は機能と密接に関連して

いるため, 本来あるべき環境下で会合状態を調べることは, 膜タンパク質の持つ本質的な働きを明らかにするだけでなく, 新たな創薬の発見にもつながる. β_2 AR のように典型的な GPCR でありながら会合状態が不明確な受容体が存在したり, M2 チャネルのように新たな作用機構やリガンド結合部位が発見されたりするなど, 膜タンパク質の研究には未知な領域がまだ数多く残されている. 今後の展望として, 他の GPCR の会合状態に関する研究や, Am 耐性 M2 チャネル (S31N 変異体) の会合状態及び NMR を用いた構造解析を行うとともに, 二量体形成に必要な部位を標的とした新たなチャネル阻害薬の開発に取り組みたいと考えている.

謝辞 本研究を遂行するにあたり, 京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野の松崎勝巳教授, 矢野義明助教, 大前薫修士 (2010 年卒), 松崎

紗矢香学士（2011 年卒）に多大なるご指導・ご協力を頂きました。深く御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Bockaert J., Pin J. P., *EMBO J.*, **18**, 1723–1729 (1999).
- 2) Jordan B. A., Devi L. A., *Nature*, **399**, 697–700 (1999).
- 3) Michineau S., Alhenc-Gelas F., Rajerison R. M., *Biochemistry*, **45**, 2699–2707 (2006).
- 4) Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairat S., Chelsky D., Dennis M., Bouvier M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3684–3689 (2000).
- 5) Mercier J. F., Salahpour A., Angers S., Breit A., Bouvier M., *J. Biol. Chem.*, **277**, 44925–44931 (2002).
- 6) James J. R., Oliveira M. I., Carmo A. M., Iaboni A., Davis S. J., *Nat. Methods*, **3**, 1001–1006 (2006).
- 7) Guo W., Urizar E., Kralikova M., Mobarec J. C., Shi L., Filizola M., Javitch J. A., *EMBO J.*, **27**, 2293–2304 (2008).
- 8) Overton M. C., Blumer K. J., *Curr. Biol.*, **10**, 341–344 (2000).
- 9) Hamatake M., Aoki T., Futahashi Y., Urano E., Yamamoto N., Komano J., *Cancer Sci.*, **100**, 95–102 (2009).
- 10) Yano Y., Yano A., Oishi S., Sugimoto Y., Tsujimoto G., Fujii N., Matsuzaki K., *ACS Chem. Biol.*, **3**, 341–345 (2008).
- 11) Bouvier M., Heveker N., Jockers R., Marullo S., Milligan G., *Nat. Methods*, **4**, 3–4 (2007).
- 12) Salahpour A., Masri B., *Nat. Methods*, **4**, 599–600 (2007).
- 13) 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*, **451**, 596–599 (2008).
- 14) Schnell J. R., Chou J. J., *Nature*, **451**, 591–595 (2008).
- 15) Okada A., Miura T., Takeuchi H., *Biochemistry*, **40**, 6053–6060 (2001).
- 16) Lindhout D. A., Litowski J. R., Mercier P., Hodges R. S., Sykes B. D., *Biopolymers*, **75**, 367–375 (2004).
- 17) Litowski J. R., Hodges R. S., *J. Biol. Chem.*, **277**, 37272–37279 (2002).
- 18) Kawano K., Yano Y., Omae K., Matsuzaki S., Matsuzaki K., *Anal. Chem.*, **85**, 3454–3461 (2013).
- 19) Yano Y., Kawano K., Omae K., Matsuzaki K., *Methods Enzymol.*, **504**, 355–370 (2012).
- 20) Yano Y., Matsuzaki K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 2124–2131 (2009).
- 21) 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.*, **28**, 3315–3328 (2009).
- 22) Meyer B. H., Segura J. M., Martinez K. L., Hovius R., George N., Johnsson K., Vogel H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2138–2143 (2006).
- 23) Duong M. T., Jaszewski T. M., Fleming K. G., MacKenzie K. R., *J. Mol. Biol.*, **371**, 422–434 (2007).
- 24) Doumazane E., Scholler P., Zwier J. M., Trinquet E., Rondard P., Pin J. P., *FASEB J.*, **25**, 66–77 (2011).
- 25) Elster L., Elling C., Heding A., *J. Biomol. Screen.*, **12**, 41–49 (2007).
- 26) Kawano K., Yano Y., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **426**, 2679–2691 (2014).
- 27) Pinto L. H., Holsinger L. J., Lamb R. A., *Cell*, **69**, 517–528 (1992).
- 28) Helenius A., *Cell*, **69**, 577–578 (1992).
- 29) Szalmay G., Varga G., Kajiyama F., Yang X. S., Lang T. F., Case R. M., Steward M. C., *J. Physiol.*, **535**, 795–807 (2001).
- 30) Laurent J., Venn A., Tambutte E., Ganot P., Allemand D., Tambutte S., *FEBS J.*, **281**, 683–695 (2014).
- 31) Danielsen A. A., Parker M. D., Lee S., Boron W. F., Aalkjaer C., Boedtker E., *J. Biol. Chem.*, **288**, 8146–8155 (2013).