

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05709

研究課題名（和文）無細胞合成イオンチャネルアレイを用いた脂質平面膜電位測定技術の高度化

研究課題名（英文）Improvement of planar bilayer lipid membrane system for ion channels activity recordings using cell-free synthesized ion channel protein array.

研究代表者

竹田 浩之（TAKEDA, HIROYUKI）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40609393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、無細胞膜タンパク質合成技術を用いて250種のヒトチャネルタンパク質の合成を試み、238種のチャネルの合成に成功した。その中には200 kDaを超える大きな分子量や複雑な構造を持つチャネルも含まれる。47種の電位依存性カリウムチャネルを脂質平面膜法を用いて解析し、およそ8割が電圧刺激により開口することを示した。さらに、リポソーム上でヘテロチャネル複合体が形成されることも明らかにした。これらの結果は無細胞タンパク質合成技術を用いて多様なチャネルタンパク質を合成し、機能解析や薬剤評価、バイオセンサーの開発に用いることができる可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では無細胞膜タンパク質合成技術を利用して、大規模かつ多様なヒトチャネルタンパク質の試験管内合成に成功した。本研究により、ヒトチャネルタンパク質を効率よく、大規模に合成し、その電気生理学的特性を直接評価できる新たな手法が示された。この技術は、新しいチャネルタンパク質の機能解析や薬物評価、さらにはチャネルを利用したバイオセンサーなどの開発に寄与する可能性がある。また本研究では非常に巨大なチャネルやヘテロチャネル複合体も無細胞合成できることを実証した。これにより、これまでは発現や解析が困難であった多種多様なチャネルの機能解析や医療分野における応用可能性が広がった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to synthesize 250 human channel proteins using cell-free membrane protein synthesis technology and succeeded in synthesizing 238 channels, including channels with large molecular weights exceeding 200 kDa and complex structures. Forty-seven voltage-gated potassium channels were analyzed using the lipid planar membrane method, and approximately 80% of them were shown to open upon voltage change. Furthermore, we showed that heteromeric channel complex was formed on liposomes. These results indicate that cell-free protein synthesis technology can be used to synthesize a variety of channel proteins, and help overcome limitations of sample preparation for channel studies.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：チャネル 無細胞タンパク質合成 膜タンパク質 脂質平面膜 複合体

## 1. 研究開始当初の背景

イオンチャネルは、不整脈、てんかん、疼痛、免疫疾患といった多種多様な疾病との関連性から、創薬における重要な標的と認識されている。だが、2000年以降に承認されたイオンチャネル標的薬は全体のわずか1割に過ぎない(1)。これはイオンチャネル創薬が困難であることを示している。その理由の一つは、主にイオンチャネルの生産や評価方法に関する技術的な課題に起因している。

イオンチャネルは膜タンパク質であり、その構造は非常に複雑である。例えば、4回膜貫通タンパク質の2量体、6回膜貫通タンパク質の4量体、24回膜貫通タンパク質の単量体などのチャネルが知られている。これらの複雑で巨大な膜タンパク質を、細胞発現系を用いて安定的に発現させ、精製し、再構成することは極めて困難である。

また、イオンチャネルの特性評価(リガンド、電位、イオン、温度依存特性など)や阻害剤探索・評価には膜電位測定技術が必須である。従来、膜電位の解析には細胞を用いたホールセルパッチクランプが主流であるが、この手法は非常に高度な技術と経験を必要とし、製薬企業の熟練の研究者でさえ1日あたり3点から10点のデータ取得が限界とされる。さらに、標的イオンチャネルの発現細胞の調製には長期間と大量の労力が必要であり、原理的に細胞内在のイオンチャネルの影響が無視できないという問題もある。また、細胞膜以外に局在するチャネルの解析ができないという課題も存在している。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は無細胞タンパク質合成技術を用いた膜タンパク質の生産手法を開発してきた(2)。この手法を用いてGPCRや血液脳関門バリアタンパク質などを生産し、機能解析、抗体作製、相互作用解析などを行った。これらの結果を踏まえ、次なる研究対象として、我々はGPCRに次ぐ創薬標的の重要性を持つイオンチャネルの創薬技術開発に取り組むことにした。

無細胞合成したイオンチャネルの評価のために、我々は脂質平面膜法(planar lipid bilayer)に注目した。この手法は、直径50～150nmの微小電極上に張られた脂質平面膜の膜電位を鋭敏に検出するものである。チャネルを埋包したプロテオリポソームが平面膜に融合し、チャネルが開くと電流シグナルが検出される。電極の直径が小さいため、一つまたは少数のイオンチャネルの電流を解析することが可能で、シングルチャネルの活性や機能の評価に適している。

本研究では、無細胞タンパク質合成技術がチャネルタンパク質に汎用的に適用することができるかどうかを評価するため、200種類を超えるヒトのチャネルタンパク質を収集し、無細胞合成技術を用いてチャネルタンパク質のセットを作製し、評価することを目標とした。チャネルタンパク質の合成の成否と脂質平面膜法によるチャネル活性評価により、チャネルタンパク質の無細胞合成の評価を行う。さらに、無細胞合成プロテオリポソームを用いた膜電位測定系の最適化を進める。

## 3. 研究の方法

### (1) チャネルタンパク質の無細胞合成

かずさDNA研究所から提供を受けたcDNAクローンセットおよびMGCクローンセットからヒトチャネルタンパク質をコードしたcDNAクローンを選抜し、無細胞合成に用いた。重層法または透析重層法(2)を用いて組換えチャネルタンパク質をプロテオリポソーム上

に合成した。無細胞合成したチャンネルの合成量を抗 FLAG タグ抗体と Western blotting を用いて確認した。また、リポソームへのチャンネルの埋包は濃度密度勾配遠心法によって確認した。

#### (2) 脂質平面膜法によるチャンネル活性評価

脂質平面膜法は Orbit mini (Nanion) と MECA 4 Recoding Chip, 100  $\mu\text{m}$  (Ionera) を用いて行った。DPhPC またはアズレクチン脂質からなる平面膜を電極上に張り、無細胞合成プロテオリポソームをバッファー中に添加して、測定を行った。脂質平面膜にプロテオリポソームが膜融合し、脂質平面膜に配置されたチャンネルがイオンを通すと電流が計測される。計測データの解析は Clampfit 10.4 software (Molecular Devices) を用いて行った。

#### (3) チャンネル複合体の無細胞共合成と複合体形成評価

AGIA-FLAG-KCNB1 と FLAG-KCNS3 の mRNA を混合し、透析重層法を用いて無細胞合成した。得られたプロテオリポソームは DDM を用いて可溶化した。抗 AGIA 抗体 (3) を固定化した Dynabeads Protein G (Cytiva) と可溶化したチャンネル液を混合し、免疫沈降を行った。免疫沈降で得られたタンパク質画分を Western blotting にかけて、抗 FLAG 抗体で検出した。

## 4. 研究成果

チャンネルセットの作製と脂質平面膜法を用いたイオンチャンネル活性評価の予備検討として、少数のチャンネルを用いて検討を行った。カリウムチャンネルの検討のために、KCNK2 (K2P2.1, TREK1) など 3 種類の K2P チャンネルと KCNH2 (hERG1, Kv11.1) など 5 種類の Kv チャンネルを無細胞合成した。濃度密度勾配を用いた分画操作により、無細胞合成したチャンネルは良好にリポソーム上に存在しており、凝集していないことが確認された (図 1)。また、脂質平面膜法を用いて評価を行ったところ、全てのチャンネル試料で電圧刺激により電流シグナルが計測された。KCNK2 は、電圧刺激に加えて温度変化によっても開口することが知られている。無細胞で合成した KCNK2 のコンダクタンスを 25°C と 37°C で比較した。どちらの温度条件でも、パルスの周波数と電流振幅は電圧によって変化した。温度を 25°C から 37°C に上げると、チャンネルの平均コンダクタンスは 93.1 pS から 112.4 pS に増加した (図 2)。25°C でのコンダクタンスは、単細胞パッチクランプを用いて得られたマウス TREK-1a チャンネルの既報結果と一致した。これらの結果から、我々が開発した無細胞膜タ

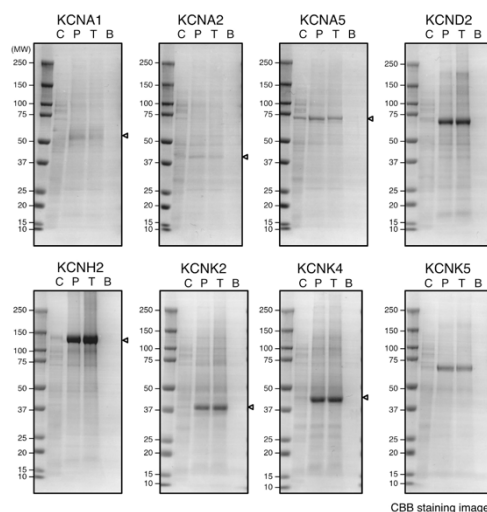


図1. 無細胞合成した K2P チャンネルおよび Kv チャンネル。C, 未精製試料; P, 遠心粗精製プロテオリポソーム; T, 濃度密度勾配遠心上層; B, 濃度密度勾配遠心下層。

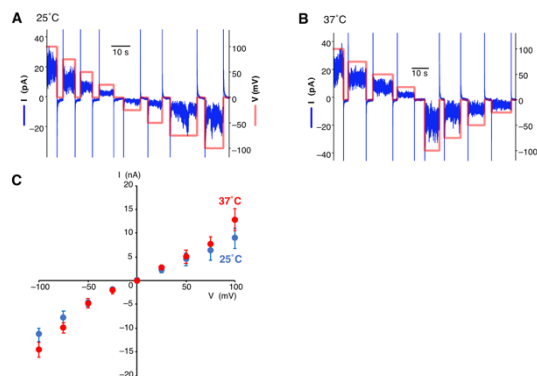


図2. 無細胞合成 KCNK2 チャンネルの電位および温度依存的開口。A, B, 脂質平面膜法で解析した電流シグナル。C, I-Vプロット。

ンパク質合成技術を用いて、活性を持ったチャンネルを生産できる可能性が高いと考えた。

無細胞膜タンパク質合成技術が様々な種類のチャンネルを合成できることを証明するため、可能な限り多くのチャンネルタンパク質を無細胞合成することにした。かずさ DNA 研究所の cDNA リソースと MGC クローンセットからヒトのチャンネル遺伝子を収集し、250 クローンのヒトチャンネルを無細胞合成した。内訳はカリウムイオンチャンネルの  $\alpha$  サブユニット (他の 72 クローン)、カチオンチャンネル (45 クローン)、陰イオンチャンネル (29 クローン) などが主で、他にもギャップジャンクションタンパク質やポリリン、調節サブユニットなども含む。これらは Guide to PHAR-MACOLOGY データベースのに掲載されている 279 のイオンチャンネルのうち、78%にあたる。合成したすべてのチャンネルを Western blotting にかけたところ、238 個 (95.2%) のチャンネルが予想に近いサイズで検出された (図 3)。驚くべきことに、ITPR3 (294.8 kDa, 6 TM), CACNA1G (262.5 kDa, 24 TM), SCN5A (222.7 kDa, 24 TM), CACNA1S (212.3 kDa, 24 TM) など分子量が大きく、多数の膜貫通ヘリックスを持つチャンネルのバンドも確認された。この結果から、大きなサイズや複雑な構造を持つチャンネルタンパク質を含む、多種多様なヒトチャンネルタンパク質が無細胞系で合成できることが示された。

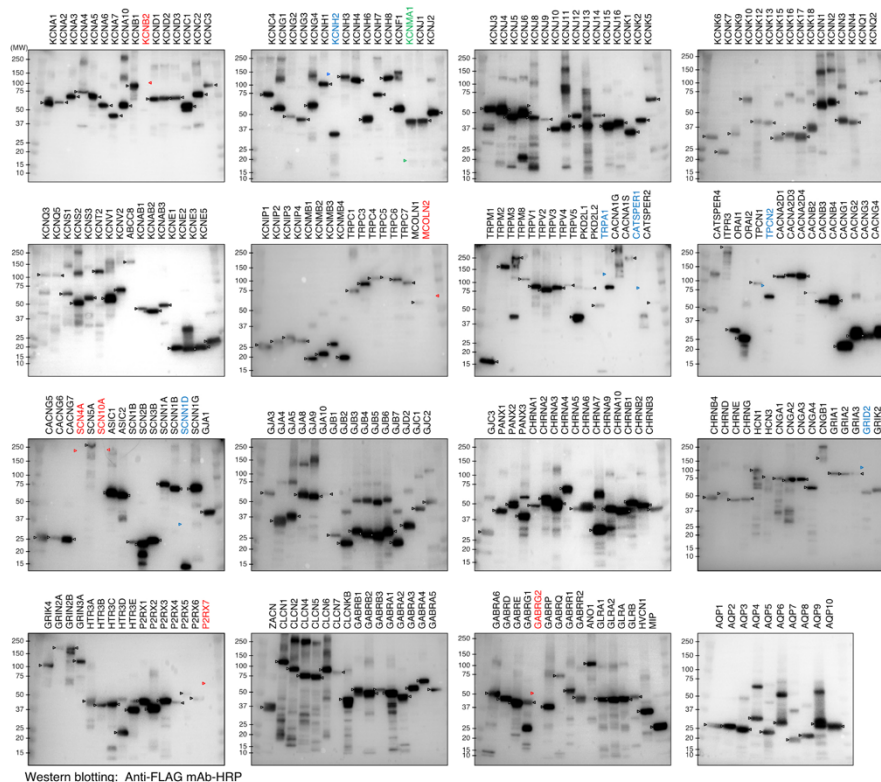


図3. 250 種のヒトチャンネルの合成確認. 抗 FLAG 抗体で検出.

さらに我々は、合成したチャンネルセットから、47 種の電位依存性カリウムチャンネルを選び、チャンネル活性を脂質平面膜法で評価した。およそ半分にあたる 23 個のチャンネルにおいて、2 種類の脂質膜を持ちいた 4 回の試行で電位依存的で安定した電流シグナルが検出された (図 4)。さらに 13 個のチャンネルでも不正規ではあるが電流シグナルが検出された。これらの結果から、無細胞で合成された 47 個の電位依存性カリウムイオンチャンネルの大部分

は、膜上で2量体または4量体のホモチャンネル複合体を形成し、チャンネルポアを形成していることが確認された。不正規な電流が検出されたチャンネルについても、脂質組成などの諸条件を制御することで、安定した開口が促せる可能性はある。また、カリウムイオンチャンネルだけでなく、他のファミリーのチャンネルについても、無細胞合成した組換えチャンネルを用いて機能解析を試みることは有意義であると思われる。

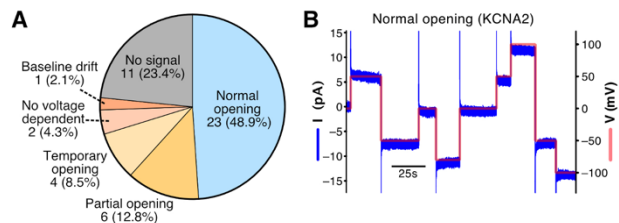


図4. 47種の電位依存性カリウムチャンネルのPLB解析。

また、無細胞合成されたチャンネルがホモ複合体だけではなく、ヘテロ複合体を形成しうることを実証するため、既知のヘテロ複合体の組み合わせとして **KCNB1** と **KCNS3** の共合成を試みた。**KCNB1** と **KCNS3** のmRNAを予め混合し、同じ試験管内で無細胞合成した。得られたプロテオリポソームを界面活性剤で可溶化し、**KCNB1**に融合したタグで免疫沈降した。免疫沈降したタンパク質を解析した結果、**KCNB1**と**KCNS3**の両方が検出された。この結果は、これらのチャンネルがリポソーム膜上で複合体を形成していることを強く示唆しており、無細胞系を用いて様々な組み合わせのヘテロマーチャンネル複合体を合成し、機能解析できる可能性が示された。

以上のとおり、本研究では無細胞膜タンパク質合成技術を利用して、大規模かつ多様なヒトチャンネルタンパク質の試験管内合成に成功した。本研究により、ヒトチャンネルタンパク質を効率よく、大規模に合成し、その電気生理学的特性を直接評価できる新たな手法が示された。この技術は、新しいチャンネルタンパク質の機能解析や薬物評価、さらにはチャンネルを利用したバイオセンサーなどの開発に寄与する可能性がある。また本研究では非常に巨大なチャンネルやヘテロチャンネル複合体も無細胞合成できることを実証した。これにより、これまでは発現や解析が困難であった多種多様なチャンネルの機能解析や医療分野における応用可能性が広がった。

以上の成果の大部分は論文にまとめ、**Membranes** 誌に掲載された(4)。

#### <引用文献>

1. R Santos; O Ursu; A Gaulton; AP Bento; RS Donadi; CG Bologna; A Karlsson; B Al-Lazikani; A Hersey; TI Oprea; JP Overington. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16, 19–34 (2017)
2. W Zhou; H Takeda. Cell-Free Production of Proteoliposomes for Functional Analysis and Antibody Development Targeting Membrane Proteins. *J Vis Exp* 163, e61871 (2020)
3. T Yano; H Takeda; A Uematsu; S Yamanaka; S Nomura; K Nemoto; T Iwasaki; H Takahashi; T Sawasaki. AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS ONE* 11, e0156716 (2016)
4. R Nishiguchi; T Tanaka; J Hayashida; T Nakagita; W Zhou; H Takeda. Evaluation of Cell-Free Synthesized Human Channel Proteins for In Vitro Channel Research. *Membr* 13, 48 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhou Wei, Takeda Hiroyuki	4. 巻 163
2. 論文標題 Cell-Free Production of Proteoliposomes for Functional Analysis and Antibody Development Targeting Membrane Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 10.3791/61871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiguchi Rei, Tanaka Toyohisa, Hayashida Jun, Nakagita Tomoya, Zhou Wei, Takeda Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of Cell-Free Synthesized Human Channel Proteins for In Vitro Channel Research	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 48 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes13010048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中響久、中北智哉、西口黎、山川央、竹田浩之
2. 発表標題 無細胞合成チャネルプロテインアレイの作製と活性評価
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西口黎、中北智哉、今井祐記、竹田浩之
2. 発表標題 コムギ無細胞合成系を用いたイオンチャネルKCNB1阻害抗体の開発
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 竹田浩之
2. 発表標題 ヒトプロテインアレイとHTSを基盤とした創薬支援技術
3. 学会等名 第5回医薬品開発研究センターシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹田浩之
2. 発表標題 えひめ・かずさプロテインアレイの整備とスクリーニング技術高度化
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田浩之
2. 発表標題 ヒトプロテインアレイを用いた相互作用スクリーニング
3. 学会等名 第2回蛋白質科学会若手の会研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西口黎、中北智哉、今井祐記、竹田浩之
2. 発表標題 コムギ無細胞合成系を活用したイオンチャネルKCNB1阻害抗体の開発
3. 学会等名 第1回日本抗体学会設立記念 学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Comprehensive interaction analysis using human protein array with 28,000 recombinant proteins
3. 学会等名 The 20th Protein Island Matsuyama International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 スクリーニング学研究会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 374
3. 書名 創薬研究のためのスクリーニング学実践テキスト	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	バーミンガム大		