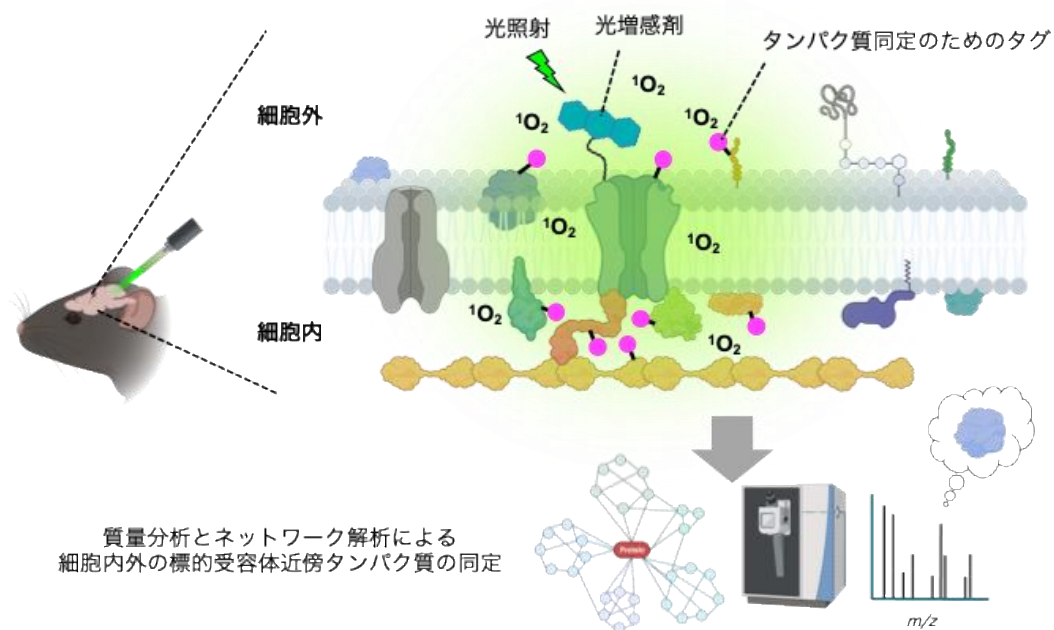


細胞膜を越えてタンパク質ネットワークを捉える新技術を開発

—生きた脳内で細胞内外の受容体近傍タンパク質を同定—

概要

京都大学 大学院工学研究科 浜地 格 教授（研究当時、現：同大学エネルギー理工学研究所 特任教授）、田村 朋則 准教授、Fátima Yuri Tanimura Valor 博士課程学生らは、細胞膜を通過できる一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）^{注1)}に着目し、細胞外側に固定した光増感剤から発生する $^1\text{O}_2$ を利用して、膜タンパク質の細胞内外に近接するタンパク質を同時に標識する新技術「transmembrane PhoxID (tmPhoxID)」を開発しました。tmPhoxIDを生きたマウス脳内の神経伝達物質受容体である GluD2^{注2)}、GABA_AR^{注3)}、mGlu1^{注4)}に適用した結果、それぞれの受容体周辺に存在するタンパク質群を同定することに成功しました。さらに、シナプスを介して神経細胞間をつなぐ分子ネットワークや、これまで知られていなかった GABA_AR と CAMKV の相互作用を発見しました。本技術は、膜タンパク質の細胞内外の分子ネットワークを一挙に解析する新たな研究基盤として、神経科学をはじめ幅広い生命科学研究への応用が期待されます。本研究成果は、2026年10月5日に国際学術誌「*Nature Communications*」にオンライン掲載されました。



質量分析とネットワーク解析による
細胞内外の標的受容体近傍タンパク質の同定

京都大学／田村朋則

1. 背景

膜貫通タンパク質は、脂質二重膜を貫通して細胞内と細胞外の両方の領域にまたがるタンパク質であり、受容体、輸送体、チャネル、酵素、構造タンパク質などとして機能しています。膜貫通タンパク質の機能や局在は、複雑なタンパク質間相互作用ネットワークによって精密に制御されており、細胞膜の内側と外側では、それぞれ異なる特徴を持つ分子複合体を形成しています。そのため、膜貫通タンパク質の細胞内外の相互作用ネットワークを明らかにし、さらに環境刺激や細胞活動によってそれらがどのように変化するかを理解することは、細胞膜上で起こる生命現象の分子機構を解明する上で重要です。

従来、膜貫通タンパク質に関連する分子ネットワーク解析には、免疫沈降と質量分析を組み合わせた IP-MS 法^{注5)}が広く用いられてきました。しかし、この方法では、局所的かつ一過的に起こる相互作用を捉えるために必要な空間・時間分解能が十分ではありません。また、細胞や組織を破碎して解析するため、実際には相互作用していないタンパク質が検出される偽陽性や、本来の相互作用が失われる偽陰性の問題もあります。近年、こうした問題を克服する手法として、近接標識法^{注6)}が広く利用されています。しかし、この手法で用いられる高反応性分子の多くは細胞膜を通過できないため、細胞内外のどちらか一方の側の相互作用タンパク質しか解析できません。そのため、膜貫通タンパク質の細胞内外の相互作用ネットワークを同時に解析することは依然として困難でした。

2. 研究手法・成果

本研究では、研究グループが以前開発した PhoxID^{注7)}を応用し、細胞膜を越えた近接標識を可能にする新手法「transmembrane PhoxID (tmPhoxID)」を確立することで上記の課題を克服しました。tmPhoxID では、まず、低分子抗体（ナノボディ）^{注8)}または小分子プローブを用いて標的膜貫通タンパク質の細胞外領域に光増感剤をターゲティングします（図1）。その後、緑色光（520 nm）を照射し光増感剤を励起することで一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）を発生させます。 $^1\text{O}_2$ は短寿命（半減期は数百ナノ秒程度）かつ拡散性が極めて高く脂質二重膜を越えることができるため、膜貫通タンパク質の細胞内外の近傍タンパク質を選択的に酸化することができます。この酸化されたタンパク質を膜透過性の高いビオチン標識剤によって修飾し、質量分析することで、標的膜貫通タンパク質の細胞内外の近傍タンパク質を網羅的に同定することが可能です。

研究グループは、開発した tmPhoxID を生きたマウス脳に応用し、神経細胞に発現する様々な神経伝達物質受容体の周囲にどのようなタンパク質が集まっているのかを調べました。まず、小脳の興奮性ポストシナプスに局在する GluD2 受容体を対象としました。その結果、GluD2 の細胞外相互作用タンパク質に加えて、GluD2 と特異的に相互作用することが知られている細胞内（ポストシナプス内）タンパク質が検出されました。さらに興味深いことにポストシナプス側だけでなく、プレシナプス側の神経伝達物質の放出に関連する細胞内タンパク質も検出されることがわかりました。この結果から、本手法ではシナプス伝達を効率よく行うための機構として近年提唱されている「トランスシナプティックナノカラム」^{注9)}の構成タンパク質を網羅的に検出できる可能性が示唆されました（図2）。

次に、研究グループは抑制性ポストシナプスに局在する GABA_AR に tmPhoxID を適用しました。その結果、興奮性ポストシナプスに局在する GluD2 を標的とした実験とは異なり、抑制性シナプスに局在する細胞内タンパク質群が検出されたことから、tmPhoxID は、シナプスレベルの空間分解能を有していることが示されました。また、同じ興奮性シナプスの中でも異なる場所に存在する GluD2 と mGlu1 を比較することで、tmPhoxID は非常に近接した場所にあるタンパク質の違いまで識別できることがわかりました。

さらに重要な成果として、GABA_AR の周囲に存在するタンパク質を調べた結果、これまで知られていなかった GABA_AR と CAMKV というタンパク質の相互作用を発見しました（図3）。この相互作用はマウスの脳だけ

でなく、ヒトの死後脳でも確認されました。GABA_AR と CAMKV の相互作用が神経科学的にどのような機能や意義があるのかはいまだ不明であり、今後より詳細な検討を進める予定です。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発した tmPhoxID は、細胞膜を越えて膜タンパク質の周囲に存在するタンパク質を捉えることができるため、これまで解析が困難であった膜タンパク質を中心とした細胞内外の分子ネットワークを、生きた細胞や組織の中で解析するための新たな基盤技術になることが期待されます。特に本研究では、プレシナプスとポストシナプス間で形成されるトランスシナプティックナノカラムの構成タンパク質群を網羅的に同定することに成功しました。今後、今回見つかった未知の候補タンパク質を詳しく解析することで、神経細胞同士が正確かつ効率的に情報を伝える仕組みの解明につながることを期待されます。また、GABA_AR と CAMKV のように、これまで知られていなかったタンパク質間相互作用を生体内で発見できることから、神経疾患に関わる新たな分子メカニズムや治療標的の発見にもつながる可能性があります。さらに、tmPhoxID は神経シナプスに限らず、さまざまな細胞膜タンパク質に応用できる可能性があります。例えば、細胞同士が接触する場所に形成される分子複合体や、細胞内小器官同士が接する領域など、これまで捉えることが難しかった三次元的なタンパク質ネットワークの解析への応用が期待されます。また、薬剤投与や神経活動などの刺激によって膜タンパク質を取り巻く分子環境がどのように変化するかを、生体内で追跡することも可能になると期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

●文部科学省 科学研究費助成事業 特別推進研究

研究課題名：「生体分子夾雑の有機化学の開拓」(研究代表者：浜地 格 京都大学 教授)(課題番号 23H05405)

●科学技術振興機構 (JST) 創発的研究支援事業

研究課題名：「光近傍ラベリングによる in vivo インタラクトーム解析」(研究代表者：田村朋則 京都大学 准教授)(課題番号 JPMJFR230G)

<用語解説>

注 1) 一重項酸素

活性酸素の一種。励起状態にある酸素分子であり高い酸化活性をもつ。生体内で発生した場合、その寿命は数百ナノ秒程度である。

注 2) GluD2

デルタ型グルタミン酸受容体 2。主に小脳のプルキンエ細胞に存在する神経伝達物質受容体の一種で、シナプスの形成や機能の調節に重要な役割を担う。

注 3) GABA_AR

中枢神経系において抑制性神経伝達を担う、5つのサブユニットから構成されるイオンチャネル。神経伝達物質の1種である γ アミノ酪酸 (GABA) を受容することで開口し、塩化物イオン (Cl⁻) を透過させる。

注 4) mGlu1

代謝型グルタミン酸受容体 1。神経伝達物質であるグルタミン酸を受け取る受容体の一種で、特に小脳の神経

回路における情報伝達や可塑性に重要な役割を担う。

注 5) IP-MS 法

抗体や親和性リガンドを修飾したビーズによって標的タンパク質とその相互作用タンパク質をプルダウンし、続く質量分析によって相互作用ネットワークを解析する手法。

注 6) 近傍標識法

標的となるタンパク質の周辺で短寿命活性種を発生させ、これにより近傍に存在するタンパク質をビオチン標識する手法。

注 7) PhoxID

研究グループが開発した光を反応駆動力とする近傍標識法。生きたマウス脳内の内在性神経伝達物質受容体を標的とした近傍標識が可能である。(M. Takato et al., Nat. Chem. Biol., 21, 109–119, 2025)

注 8) 低分子抗体（ナノボディ）

抗体の一部に由来する小さなタンパク質で、特定のタンパク質を選択的に認識して結合する性質を持つ。通常の抗体より小さいため、細胞や組織内の標的分子に近づきやすく、特定のタンパク質に薬剤や機能性分子を届けるターゲティング分子として利用される。

注 9) トランスシナプティックナノカラム

プレシナプス側とポストシナプス側のタンパク質が、神経伝達物質の放出と受容を効率よく行えるように整列して形成される微細な分子構造。神経細胞同士の情報伝達を正確かつ効率的に行うための重要な「分子の足場」と考えられている。

注 10) AlphaFold Multimer

複数のタンパク質が結合してできる複合体の立体構造を、AI で予測する AlphaFold の拡張版。タンパク質同士の相互作用や結合部位の理解に役立ちます。

<研究者のコメント>

このプロジェクトは先行研究の PhoxID の開発を進めていた高遠さんが卒業前に「細胞膜を越えて反応が進行していそう」という予想外の結果を得たことがきっかけでスタートしました。結果の再現を取ることが難しく研究が進まない時期もありましたが、スペインからの留学生の Tanimura さんが粘り強く検討を進め、最適なビオチン化剤を見出してからは研究が一気に加速して無事論文化することができました。¡Felicidades! (田村 朋則)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Transmembrane PhoxID: Photoproximity labelling across the plasma membrane in vivo

(和訳：Transmembrane PhoxID: 生体内における細胞膜を越えた光近接標識)

著 者：Fátima Yuri Tanimura Valor, 高遠 美貴子, 荒木 文音, 坂本 清志, 田村 朋則, 浜地 格

掲 載 誌：Nature Communications

DOI：10.1038/s41467-026-78135-2

< 参考図表 >

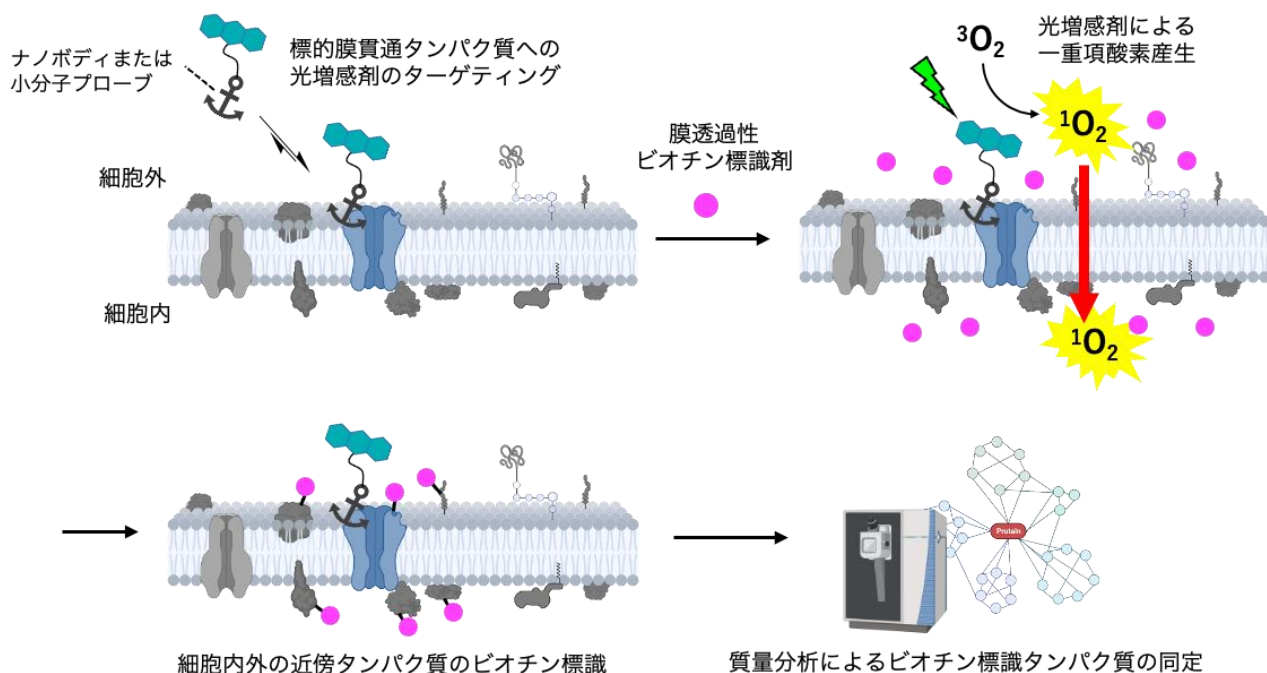


図1 tmPhoxID の原理

初めに、ナノボディまたは小分子プローブを用いて標的膜貫通タンパク質の細胞外領域に光増感剤をターゲティングします。その後、膜透過性ビオチン標識剤存在下で緑色光（520 nm）を照射し光増感剤を励起することで一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）を発生させます。 $^1\text{O}_2$ は脂質二重膜を越えて膜貫通タンパク質の細胞内外の近傍タンパク質を酸化します。この酸化された近傍タンパク質がビオチン標識剤と反応することによってビオチンが修飾されます。ビオチン修飾されたタンパク質をアビジンビーズによって精製・濃縮し、ペプチド断片にした後、質量分析を行うことで近傍タンパク質が同定されます。

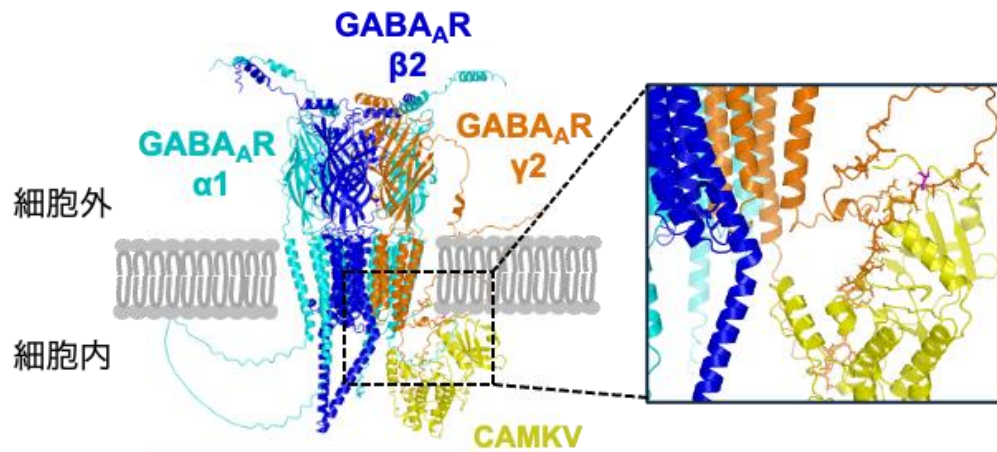


図3 今回新たに同定された GABA_AR-CAMKV 相互作用の予測構造

GABA_AR は α 、 β 、 γ サブユニットからなる 5 量体です。AlphaFold multimer^{注10)} による構造予測から GABA_AR の細胞内領域で CAMKV が相互作用していることが示唆されました。