

【目的】 好中球やマクロファージなどの免疫細胞では、侵入した病原菌を殺菌するために活性酸素の産生が行われており、その際に必要となるプロトンを供給するのが電位依存性プロトンチャンネル Hv1 である。分子として見た場合の Hv1 は、一般的な電位依存性イオンチャンネルという電位センサー部位のみで構成されるが、“電位を感じる”および“イオンを通す”の基本的機能を備えている。興味深いことに、Hv1 は単量体で機能完結しているにもかかわらず、通常 2 量体を形成し、協調してチャンネルの開閉を制御していることがこれまでの研究で提案されている [Fujiwara et al. (2012) *Nat Commun*]。一方、タンパク質精製におけるゲル濾過クロマトグラフィーの結果などから、Hv1 は 2 量体以上の多量体を形成している可能性も出てきた。また、Hv1 を発現させた細胞を観察した結果さらなる集積があることも示唆された。このように、Hv1 はこれまで想定されていた以上に多量体化・集積化している可能性がある。そこで本研究では、電位依存性プロトンチャンネル Hv1 における多量体形成とそれがイオンチャンネル機能に与える影響の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

【方法】 1. タンパク質精製：浮遊哺乳類培養細胞 Expi293 による培養を行った。マウス由来の Hv1 全長 (mHv1) に His-tag を組み込んだプラスミドを作製した。増殖させた Expi293 に形質転換を行い、3~5 日間巡回培養を行った。回収した細胞を超音波破碎、可溶化し Talon カラム (Co-NTA) で精製した。必要に応じて、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex200) にて精製を行った。発現確認は SDS-PAGE を用いて行い、染色は CBB で行った。混合リン脂質溶液 (POPE : POPC : POPS=6 : 3 : 1) に、重量比 1 : 1,000 になるようにタンパク質を混合した。透析を 1 週間することで脂質への再構成を行った。2. 電気生理学的解析：培養細胞 HEK293T に上述のプラスミドを形質転換した。翌日、3.5 cm ディッシュに撒き直した後、ホールセルパッチクランプ法にて電流を計測した。3. 高速原子間力顕微鏡：可溶化精製および脂質再構成したサンプルをマイカ基板上へ滴下し、3 分間インキュベーションした後、未吸着のサンプルを洗い流し、緩衝溶液中で高速原子間力顕微鏡観察を行った。

【結果】 これまで大量発現が難しかった全長 mHv1 タンパク質を Expi293 で発現した。発現サンプル量は 0.32 mg (培地量 25 mL) であり、培地量からするとかなりの高収率であり、大量発現に成功した。発現の経時変化を確認したところ、形質転換後 2 日程度で発現はプラトー相に達した。本研究で使用したタグ付き mHv1 の機能は電気生理学的解析により確認し、脱分極刺激に伴うプロトン電流が観測されたため基本機能が維持されていることを確かめた。多量体形成の評価を高速原子間力顕微鏡にて実施した。可溶化状態では、2 量体が単量体構造を形成していた。一方で脂質に再構成された mHv1 がリング状の構造を形成していることが判明した。この構造はサイズからすると 6 量体程度と考えられ、他の傍証で得られた結果を支持する多量体形成の有力な証拠となった。

電位依存性プロトンチャンネル Hv1 の多量体形成評価

