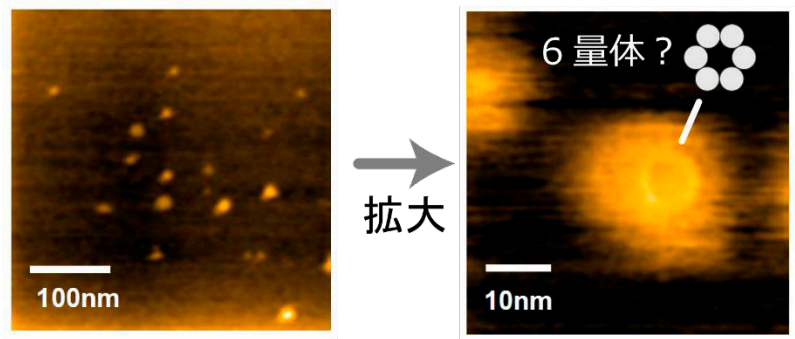
136　免疫に関わる膜蛋白質Hv1の多量体形成の分子基盤解明	川鍋　陽

【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ネルで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関わらず、通常 2 量体を形成し、協調してチャ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ネル Hv1 における多量体形成とそれがイオンチャ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 日間旋回培養を行った。回収した細胞を超音波破砕、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 量体か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ネル Hv1 の多量体形成評価



136. 免疫に関わる膜蛋白質 Hv1 の多量体形成の分子基盤解明

川鍋　陽

香川大学 医学部 分子生理学講座

Key words：電位依存性プロトンチャネル，タンパク質精製，電気生理学，高速原子間力顕微鏡

緒　言

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ネル Hv1 である。我々は、炎症惹起時に発生する遊離脂肪酸（アラキドン酸など）の Hv1 に対する作用を電気生理学的手法で解析し、当該分子には Hv1 の活性化を著しく促進することで迅速なプロトン供給を実現し、活性酸素産生を助けることを解明した［1］。

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ネルでいう電位センサー部位のみで構成されるが、2 つの基本的機能（“電位を感じる”と“イオンを通す”）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関わらず、通常 2 量体を形成し、協調してチャ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［2, 3］。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が、これまでの結果は傍証であるため、その基礎的な分子基盤・機能を明らかにする必要がある。そこで本研究では、電位依存性プロトンチャネル Hv1 における多量体形成とそれがイオンチャ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。

このような生物物理学的研究を実施する上ではターゲットタンパク質の発現・精製が“キー”となる。これまでの Hv1 は全長発現が困難であったため、N 末端および C 末端を短くしたコンストラクトでの実験を続けてきた。本研究では近年急速に進歩を遂げた哺乳類細胞培養系 Expi293 を利用することで、マウス由来の Hv1 全長の大量発現に成功した。続いて高速原子間力顕微鏡 AFM により膜中での Hv1 の動態観察を実施して多量体形成を評価し、6 量体を形成していることを示唆するデータを得た。なお本研究成果は、第 43 回日本分子生物学会年会（2020 年 12 月）にて発表した。

方　法

1. タンパク質発現・精製・脂質への再構成

浮遊培養細胞 Expi293（Thermo Fisher Scientific）による培養を行った。詳しい実験手法は Thermo Fisher Scientific 社のマニュアルを参照。マウス由来の Hv1 全長（mHv1）を改良型 pcDNA3.1（-）ベクター（Invitrogen）に組み込みプラスミドを作製した。C 末端に His-tag を組み込んだ。25 mL 細胞用培地（Expi293 Expression Medium）に培養細胞 Expi293 を入れ、37℃、120 rpm で旋回培養し、細胞を増殖させた。細胞濃度が 3.0×10^{6} になるように調製してから、形質転換を行った（1.0 μg/μL プラスミド 25 μL、Opti-MEM 2.9 mL、ExpiFectamin 293 Reagent80 μL）。翌日、ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1&2 を追加した。その後、3〜5 日間旋回培養を行った。遠心機で細胞を集めた後、上清を捨て、−80℃のディープフリーザーにて精製まで保管した。

常温で解凍したサンプルを 25 mL 破砕 Buffer （20 mM HEPES、500 mM NaCl、Complete, pH7.0）で懸濁し、超音波破砕を行った。10,000 rpm、15 分で遠心し、上清を回収した。超遠心機 35,000 rpm、1 hr で処理し、ペレット

を回収した。25 mL 可溶化 Buffer（20 mM HEPES、500 mMNaCl、pH7.0）に懸濁し、終濃度 1%になるように界面活性剤 DDM を加えた。終夜攪拌した後に、超遠心機 35,000 rpm、1 hr で処理し、上清を回収した。1 mL Talon カラム（Clontech）を装着した AKTA（GE ヘルスケア）により精製した。必要に応じて、ゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex200、GE ヘルスケア）にてさらなる精製を行った。発現確認は SDS-PAGE を用いて行い、染色は CBB で行った。

脂質への再構成は、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。透析膜（Slide-A-Lyzer、Thermo Fisher Scientific）を使い、透析を 1 週間実施した。外液（20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH7.0）は毎日交換した。透析完了後、－80℃のディープフリーザーにて保管した。

2. 電気生理学的解析

培養細胞 HEK293T に上述のプラスミドを PEI Max（コスモ・バイオ）にて形質転換した。6 時間後に培地を交換して、終夜 37℃で培養した。翌日、0.1% Trypsin-EDTA を用いて、細胞をばらばらにし、再度 3.5 cm ディッシュに撒き直した。2 時間以上インキュベーションした後に、測定用 Buffer （180 mM HEPES、75 mM NMDG、3 mM $MgCl_2$、1 mM EGTA、pH7.0）に交換してから、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

上述の方法で準備した可溶化サンプルおよび脂質膜再構成サンプルを、AFM ステージとして使用するマイカ基板上へ滴下し、3 分間インキュベーションし、サンプルの基板への吸着を行った。その後、基板へ未吸着のサンプルを洗い流し、可溶化サンプルは界面活性剤含有 Buffer（20 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% DMNG）中で、脂質膜再構成サンプルは透析で用いた溶液を測定用 Buffer（20 mM HEPES、150 mM NaCl、0.1 mM DTT、0.1 mM EGTA）として溶液中で高速原子間力顕微鏡観察を行った。

結果および考察

1. タンパク質発現・精製

全長 mHv1 タンパク質を Expi293 にて発現した。図 1a は Talon カラム（Co-NTA, His-tag 精製用）で精製した各段階における電気泳動写真である。カラムにアプライする前ですでに顕著なバンドが表れているため（レーン 1）、タンパク質が多量に発現していることが示唆された。カラムに結合させたサンプルを 250 mM イミダゾールで溶出したところ（レーン 11～15）、レーン 1 で観測された位置にバンドが観測された。mHv1 の全長はアミノ酸残基 270 で、約 30 kDa であるので、妥当な位置にバンドが出現したと判断した。一方で、バンド位置が上下 2 つに分かれていることが判明した。mHv1 は 21 番目にも開始コドンに対応するメチオニンがあり、ここから発現した短縮型が下のバンドに対応するのではないかと考えられる。レーン 12 のタンパク質量を紫外－可視吸収分光器で定量したところ、吸光度は 0.113 となり、分子吸光係数（Trp、Tyr、Cys の数から計算）で換算したところ、濃度は 0.162 mg/ml となった。レーン 12 のサンプルは 2.0 mL あることから、発現サンプル量は 0.32 mg と見積もった。培地量（25 mL）から考えると、これはかなりの高収率である。

発現の経時変化を図 1b で検証した。このサンプルは、一定時間ごとにサンプルを 500 μL ずつ採取して、それを超音波破砕、可溶化（1%DDM）し、電気泳動したものである。精製を行っていないので、バックグラウンドのバンドがかなり出現しているが、30 kDa 付近に顕著なバンドが観測された。この結果から、形質転換後 2 日程度で発現はプラトー相に達していることがわかる（メーカーのマニュアルでは膜タンパク質は 3～4 日）。培養時間を延ばしすぎると、死細胞や老廃物が蓄積することで負の影響が出てくるとみられるので、形質転換後 2 日で回収するのが最適であると考えられる。

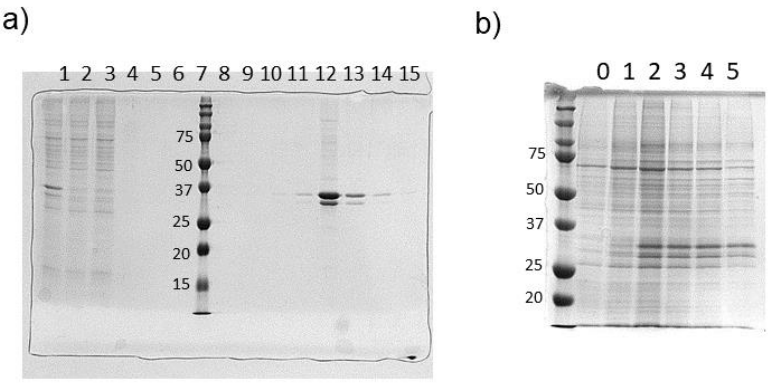


図 1.　mHv1 の発現

Expi293培養細胞を用いたmHv1発現の確認。SDS-PAGEでCBB染色にて確認した。

a）とb）でゲル濃度が違うため、泳動プロファイルに違いが出ている。

a）Talon カラムによる精製段階を順に確認した。レーン 1 : カラムアプライサンプル、レーン 2、3 : フロースルー、レーン 4〜6 : 洗浄、レーン 7 : マーカー（記載されている数字はマーカーサイズ）、レーン 8〜10 : 10 mM イミダゾール（洗浄）、レーン 11〜15 : 250 mM イミダゾール（溶出）。12.5% SDS-PAGE ゲルを使用。

b）培養時間に対する発現確認。2 mL 培養液を超音波破砕、可溶化（1% DDM）し、電気泳動で確認した。レーン 0 : Day 0（形質転換直前）、レーン 1〜5 : 形質転換後の 1〜5 日後に対応。10% SDS-PAGE ゲルを使用。

2. 電気生理学的解析

本研究で使用したプラスミドは哺乳類培養細胞発現用であるので、HEK293T 接着細胞を使えばその機能を簡単に評価することができる（浮遊細胞からの電流計測は難しい）。図 2b で示す通り、脱分極刺激に対して外向きのプロトン電流が観測され、電流の形状、閾値などが過去文献とよく一致したため［2, 3］、この mHv1 発現用コンストラクトは、基本機能に影響がないことが明らかとなった。

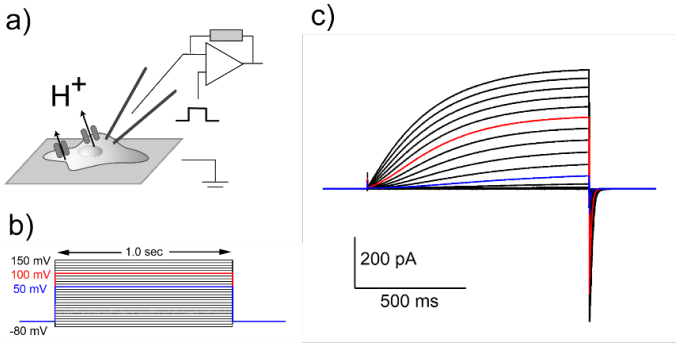


図 2.　mHv1 の機能確認

HEK293T培養細胞を用いたmHv1発現用コンストラクトの機能確認。

a）パッチクランプ法の模式図。

b）膜電位刺激プロファイル。1 秒間の脱分極刺激を与え、電流トレースごとに 10 mV ずつ脱分極の電位を上げていった。

c）計測されたプロトン電流。全ての電流トレースを重ね書きしている。50 mV（青）、100 mV（赤）の電流トレースには色付けしてある。

3. 高速原子間力顕微鏡による解析

Hv1 の多量体形成を評価するために、高速原子間力顕微鏡による膜中と界面活性剤中の構造を観察した（図 3）。サンプルは大腸菌で発現させた mHv1（57～224）と培養細胞で発現させた mHv1 全長である。界面活性剤中で mHv1（57～224）は、単一の球状粒子である単量体とそれらが対を成す 2 量体が混在していることがわかる（図 3a）。形状は均一で、ターゲットのタンパク質を観察していると考えられる。一方で mHv1（全長）は、粒子径が不安定で揺らいでいるが、2 量体と単量体が混在しているように見える（図 3b）。形状が不安定なのは、mHv1 が長い N 末端領域と C 末端領域を持っているからと考えられるが、このサンプルは精製度が低いため、精製度を上げて再度測定していきたい。脂質に再構成した mHv1（57～224）では（図 3c）、リング状の構造が観測された。サイズからすると 6 量体程度と見られ、2 量体が 3 量体を形成する巨大複合体を形成している可能性が示唆された。一方、mHv1（全長）に関しては、再構成したサンプルでデータが得られなかったため、今後の課題である。

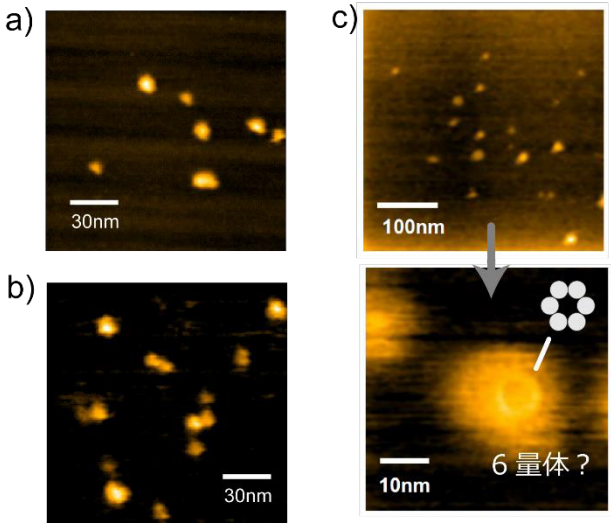


図 3. mHv1 の高速原子間力顕微鏡による解析

a) 可溶化状態 mHv1（57～224）。矢印は球状粒子が対を成す 2 量体を示す。

b) 可溶化状態 mHv1（全長）。矢印は球状粒子が対を成す 2 量体を示す。

c) 脂質に再構成した状態の mHv1（57～224）の像および拡大像（下）。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学基礎工学部の山下隼人助教である。

文　献

1) Kawanabe A, Okamura Y. Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. J Physiol. 2016 Feb 1;594(3):595-610. doi: 10.1113/JP271274. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26563684

2) Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A, Okamura Y. The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H(+) channel Hv1. Nat Commun. 2012 May 8;3:816. doi: 10.1038/ncomms1823. PMID: 22569364

3) Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. Nat Struct Mol Biol. 2014 Apr;21(4):352-7. doi: 10.1038/nsmb.2783. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24584463