

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 電位依存性プロトンチャネル Hv1 の

### *N*-arachidonoyl ethanolamine による活性化機構の構造生物学的解析

氏名 豊永 翔

#### 【序】

電位依存性プロトンチャネル(Hv1)は、膜電位依存的な H<sup>+</sup>透過を担う 4 回膜貫通型蛋白質である。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, および Ca<sup>2+</sup>に選択的な電位依存性イオンチャネルは、選択的イオン透過を担うポアドメインと膜電位を感受する電位感受性ドメイン(VSD)を有するが、Hv1 はポアドメインを有さず、VSD 単独で電位感受と選択的 H<sup>+</sup>透過を担う。近年、ヒト精子鞭毛運動の超活性化には、Hv1 を介した H<sup>+</sup>流出に伴う精子細胞内のアルカリ化が必要であり、Hv1 の活性化は内因性カンナビノイドの一種である *N*-arachidonoyl ethanolamine (AEA, Fig.1A)が Hv1 の活性化電位を低下させることによるという機構が提唱された(Lishko P *et al.* 2010)。この AEA による Hv1 の活性化は、AEA を内因性リガンドとするカンナビノイド受容体を介さずに起こることが示されているが、AEA と Hv1 が直接相互作用するか否かは不明である。

そこで本研究では、溶液 NMR 法を用いて、AEA と Hv1 の直接の相互作用を実験的に示し、AEA による Hv1 の活性化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法・結果】

AEA は脂溶性が高くほぼ 100 % の分子が膜中に分配するため、膜蛋白質である Hv1 との相互作用解析は脂質二重膜上で行なう必要がある。そこで、当研究室で研究の進んでいる **reconstituted high density lipoprotein (rHDL)**として脂質二重膜中に Hv1 と AEA を再構成し、NMR による相互作用解析に用いることとした。

#### 1. Hv1 および membrane scaffold protein 1 (MSP1) 調製法の確立

本研究ではマウス由来 Hv1 (全長 269 残基)のうち、N, C 末端の細胞質領域を除くとともに、

膜貫通領域に位置する Cys103 を Ser に置換した Hv1 (79-225, C103S) を解析に用いた (以下、このタンパク質を Hv1 と呼ぶ)。大腸菌を用いて発現後、decyl maltoside (DM) を用いて可溶化・精製した。MSP1 の調製は先行報告に従い、大腸菌を用いて発現したものを精製して用いた。

## 2. リポソームを用いた Hv1 の H<sup>+</sup>透過活性の確認、および Hv1-AEA 間相互作用解析

リポソーム内外のイオン濃度差を利用して約 60 mV の膜電位を形成させた際の H<sup>+</sup>の膜透過を、H<sup>+</sup>感受性蛍光色素である ACMA の蛍光消光により観測した。Hv1 を再構成したリポソームは膜電位形成に伴う ACMA の消光を示したことから、調製した Hv1 は電位依存的 H<sup>+</sup>透過活性を保持していることが示された。

次に、この Hv1 の H<sup>+</sup>電流に対して AEA が与える影響を評価した。Hv1 を再構成したリポソームに対し、AEA 溶液を終濃度 100 μM まで添加したところ、AEA 濃度依存的に ACMA の蛍光消光速度が増大した (Fig.1B)。AEA 非添加時には約 60 mV の膜電位により約 40 % の Hv1 が活性化状態に移行することが知られている (Sasaki M *et al.* 2004) が、AEA 添加時により速くリポソーム内に H<sup>+</sup>が流入したことは、約 60 mV の膜電位にて活性化状態にある Hv1 の割合が増大したことを示しており、AEA により Hv1 の活性化電位が低下したことを強く示唆している。一方、AEA のアラキドン酸骨格を不飽和結合を含まないアラキジンサン骨格に置換した *N*-arachidoylethanolamine (arachidoyl EA, Fig.1A) 添加時には ACMA の蛍光消光速度は変化しなかったことから、AEA による Hv1 の活性化にはアラキドン酸骨格中の不飽和結合が寄与していることが示された。また、本再構成系は Hv1 以外の蛋白質を含まないため、AEA は Hv1 と直接相互作用することが示唆された。

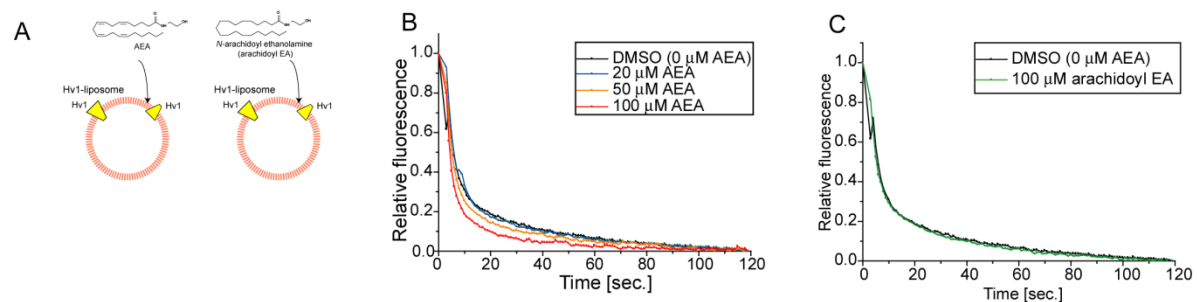


Fig. 1 ACMA の蛍光消光を用いたリポソーム内への H<sup>+</sup>流入の観測

(A) AEA と arachidoyl EA の化学構造。

(B) AEA を 20~100 μM 添加した際の、AEA 濃度依存的な蛍光消光速度の増大。

(C) 100 μM の arachidoyl EA を添加した際の蛍光消光速度

## 3. Hv1-rHDL 調製法の確立と側鎖メチル基の NMR シグナルの帰属

精製後の Hv1 に対し、DM にて可溶化した MSP1 とリン脂質を添加し、DM を除去することで Hv1-rHDL を調製した。調製した Hv1-rHDL は SEC 解析において 10 nm のストークス半径に相当する溶出体積に単分散の溶出プロファイルを示したことから、Hv1-rHDL が正しく調製できたと判断した。

Hv1-rHDL のメチル TROSY スペクトルを Fig.2 に示す。観測対象となる Ile, Ala のメチル基のシグナル (計 24 個) のうち、変異導入により 22 個のシグナルの帰属を得た。その内、他のシグナルと分離して観測された 16 個のシグナルを解析対象とした。

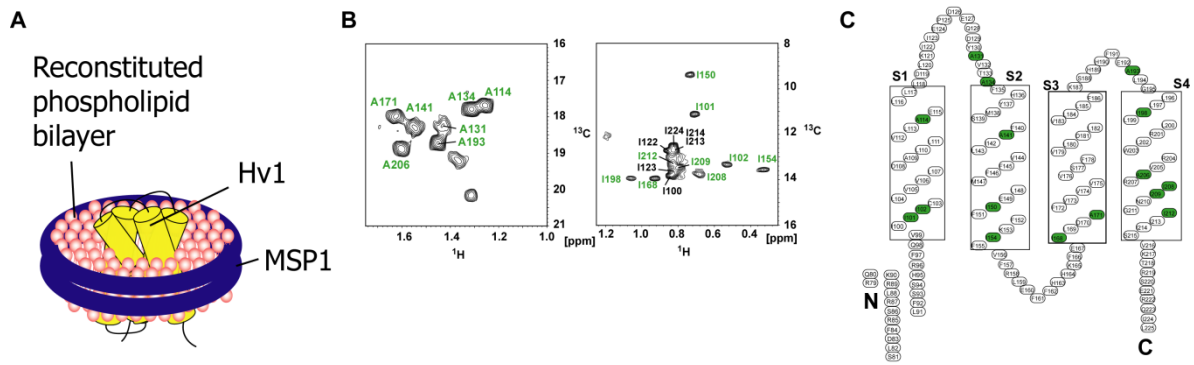


Fig. 2 Hv1-rHDL のメチル TROSY スペクトル

- (A) Hv1-rHDL の模式図。Hv1 と脂質二重膜を MSP1 が取り囲んだディスク状の形状をなす。
- (B) Hv1-rHDL のメチル TROSY スペクトル。左は Ala  $\beta$  メチル基、右は Ile の  $\delta 1$  メチル基
- (C) 本研究で解析対象とした 16 個のシグナルの Hv1 分子における分布

#### 4. NMR による Hv1-AEA 間相互作用の構造生物学的解析

DMSO 溶液として添加した AEA を Hv1-rHDL に再構成できることが NMR を用いて確認できたことから、rHDL の脂質二重膜中にて AEA と Hv1 の相互作用を部位特異的に解析することを目的として、Hv1-rHDL に対する AEA 滴定実験を行なった。

70  $\mu\text{M}$  の Hv1-rHDL に対し、2 当量 (140  $\mu\text{M}$ )、4 当量 (280  $\mu\text{M}$ ) の AEA を添加したところ、いくつかのシグナルに小さいながらも AEA 濃度依存的な化学シフト変化が観測された (Fig. 3 A)。4 当量の AEA 添加時に Hv1 のシグナルに観測された化学シフト変化量を Hv1 の残基番号に対してプロットしたところ、化学シフト変化量には部位特異性が見られた (Fig. 3 B)。特に、0.01 ppm より大きな化学シフト変化が観測されたメチル基を有する I101, I102, I150, I154, I168, A206 は、Hv1 の膜貫通領域の細胞内側に位置していた (Fig. 3 C)。

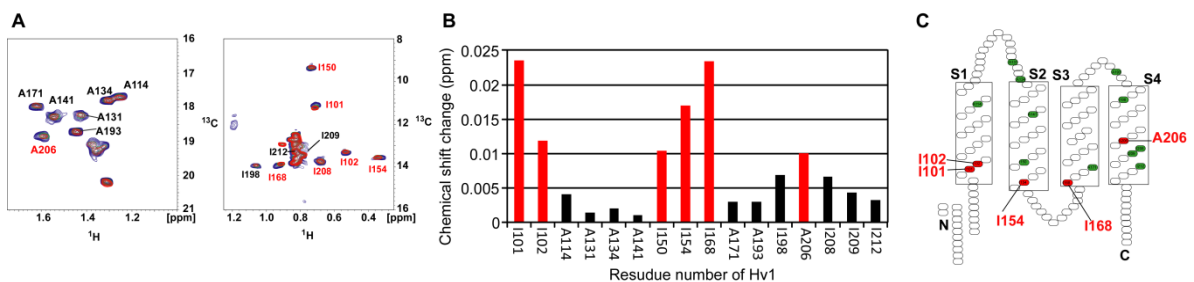


Fig. 3 Hv1-rHDL に対する AEA 滴定実験

- (A) Hv1-rHDL に対する AEA 添加に伴う NMR スペクトル変化

70  $\mu\text{M}$  Hv1-rHDL (青) に対し、2 当量の AEA 添加時 (緑) 4 当量の AEA 添加時 (赤) を重ね合わせて示した。0.01 ppm より大きな化学シフト変化を示したシグナルに赤で残基番号を付した。

- (B) 4 当量の AEA 添加時に観測された化学シフト変化量の Hv1 の残基番号に対するプロット

0.01 ppm より大きな化学シフト変化を示したシグナルを赤い bar で記した

- (C) 4 当量の AEA 添加時に 0.01 ppm より大きな化学シフト変化を示した残基の Hv1 のスネークプロットへのマッピング

均一重水素化 MSP1 とグリセロール基以外のすべての水素が重水素化された 1,2-dimyristoyl(*d54*)-*sn*-glycero-3-phosphocholine-1,1,2,2-*d4*-N,N,N-trimethyl-*d9* (DMPC-*d67*)を用いて調製した Hv1-rHDL に対し AEA を添加し、AEA のオレフィンプロトン、または 7, 10, 13 位の <sup>1</sup>H の磁化を選択的に飽和し、Hv1 の磁化に対する飽和移動実験を行なった。AEA 非添加時のコントロール実験に比べて有意なシグナル強度減少の観測された Hv1 の残基は Hv1 の S1 と S4 の細胞内側と細胞外側に限局されていたことから、Hv1 はこの領域を介して AEA と直接相互作用することが明らかとなった。

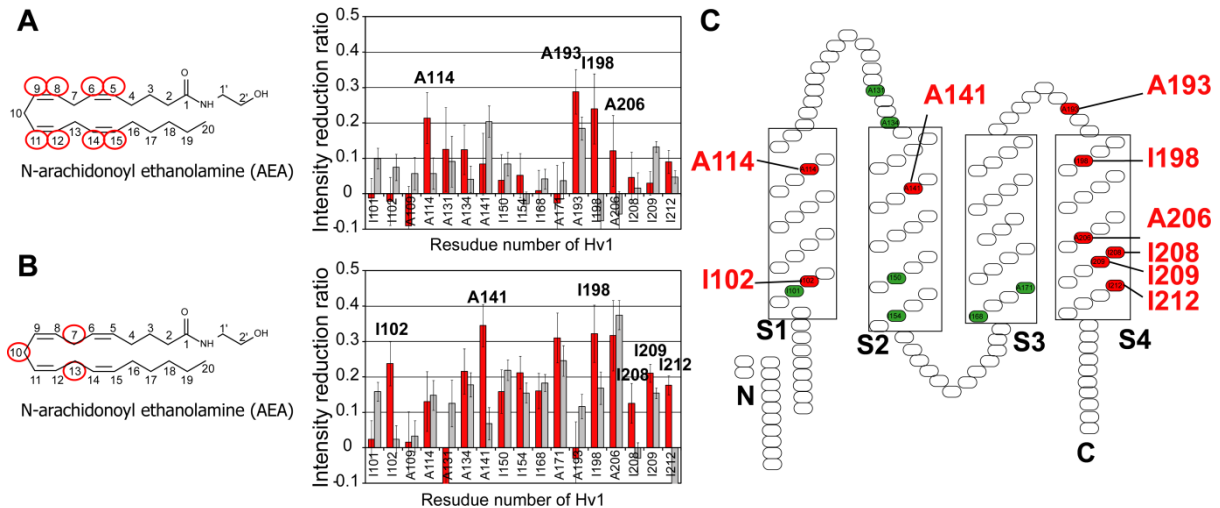


Fig. 4 Hv1-rHDL のメチル TROSY スペクトル

(A) AEA のオレフィンプロトンの磁化を飽和した時のシグナル強度減少率

(B) AEA の 7, 10, 13 位のプロトンの磁化を飽和した時のシグナル強度減少率

左には AEA の化学構造上のラジオ波照射したプロトンに赤い丸を付した。

赤：AEA 添加時のシグナル強度減少率

グレー：AEA 非添加時のシグナル強度減少率（ネガティブコントロール）

コントロール実験と比べて有意に大きな強度減少が観測されたシグナルに残基番号を付した。

(C) AEA 添加時の飽和移動実験において、AEA 非添加時に比べて有意に大きな強度減少が観測された残基の Hv1 のスネークプロット上へのマッピング

#### 【考察】

本研究により、AEA と Hv1 が直接相互作用し、Hv1 の活性化電位が低下することが示された。以下に、Hv1 と AEA の相互作用に伴う Hv1 の活性化電位の低下機構を考察する。

先行研究において、AEA は脂質二重膜中において、エタノールアミン基をリン脂質のグリセロール基と同程度の位置に配し、22 Å 程度の長さを有する伸びた構造にて存在していることが報告されている。したがって、今回の飽和移動の実験において飽和した AEA のオレフィンプロトンの領域は 10 Å 程度の長さを有していると推定できる。

一方で、Hv1 上にて飽和移動の観測された I198 と I212 は S4 ヘリックス上で 20 Å 以上離れているため、これらの残基はそれぞれ別の AEA からの飽和を受けたことが想定される。したがって、

Hv1 上に観測された飽和は inner leaflet と outer leaflet の 2 分子の AEA に由来することが示唆された。このことは、Hv1 は 2 分子の AEA と結合することを示唆している。

また、AEA 添加に伴う化学シフト変化の観測された Hv1 の細胞内側の領域には Hv1 の静止状態の安定化に寄与する Glu 149 と Asp 170、および、S4 で電位を感受するアルギニン残基が存在していた。

したがって、AEA が Hv1 の活性化電位を低下させる機構として、S1 と S4 に 2 分子の AEA が結合し、Hv1 の静止状態の安定化に寄与する膜貫通領域の細胞内側に構造変化を誘起することで Hv1 の静止状態を不安定化するという機構を考えた。

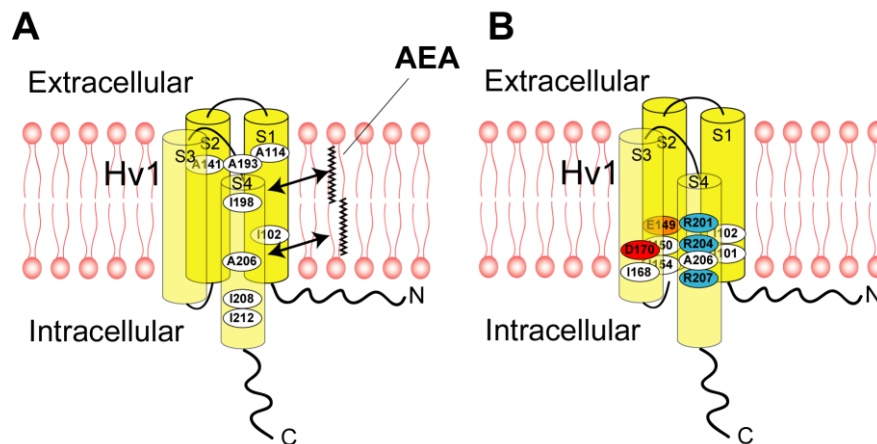


Fig. 5 AEA による Hv1 の活性化電位の低下機構

(A) AEA は Hv1 の S1 と S4 の細胞内側、細胞外側にそれぞれ 1 分子ずつ結合する。

(B) AEA 添加に伴う化学シフト変化の観測された Hv1 の細胞内側の領域には、Hv1 の静止状態の安定化に寄与する Glu 149 と Asp 170、および S4 で電位を感受するアルギニン残基が存在している。

【総括】

AEA が Hv1 の活性化電位を低下させる機構として、S1 と S4 に 2 分子の AEA が結合し、Hv1 の静止状態の安定化に寄与する膜貫通領域の細胞内側に構造変化を誘起することで Hv1 の静止状態を不安定化するという機構を提唱した。このような AEA による Hv1 の活性化機構は、精子鞭毛運動の超活性化の制御機構を説明するものである。

従来の構造生物学的解析では、膜蛋白質は界面活性剤により可溶化された状態にて解析されてきたが、このような状態では脂質二重膜中における分子間相互作用を解析することは困難であった。本研究では rHDL に膜蛋白質と脂質様リガンドをともに再構成することで、脂質二重膜中における分子間相互作用の構造生物学的解析に成功した。本研究にて確立した手法は、脂質二重膜中における膜蛋白質と脂質様リガンドや脂溶性の高い薬剤との相互作用解析に適用可能である。