

新規塩味受容関連分子 TMC4 の組み換えタンパク質の精製と機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任研究員 笠原 洋一

■ 目的

食塩の過剰摂取は心疾患や高血圧のリスクを高めることが報告されている。日本国内では、依然としてWHOが推奨する1日当たりの目標食塩摂取量の約2倍もの食塩を摂取していることが報告されている。食塩の過剰摂取は、超高齢社会に伴う我が国の国内医療費増加を助長する要因の1つであるとも考えられている。このため、低い塩濃度でも強い塩味を感じさせる「塩味増強物質」の開発が求められるが、その検証は官能検査によるものが多く、主観的でスループット性が劣る点で十分とは言えない。本研究では、近年、新たに報告された塩味受容関連分子であるhuman Transmembrane channel-like 4(hTMC4)を用いたスクリーニング系開発の基盤形成を目的とした。

■ 方 法

まず、先行研究と同様に培養細胞であるHEK293T細胞に一過的にhTMC4を過剰発現させる方法を用い、hTMC4タンパク質精製に適した培養条件の検討を行った。hTMC4のN末端、C末端にHaloタグを付けたプラスミドベクターを構築し、Lipofectamine3000を用いてトランスフェクションし、24～72時間CO₂インキュベーター内で静置した。次に培養細胞を回収し、PBSを用いて洗浄した。その後、界面活性剤を用いて細胞を溶解し、超遠心後にカラム精製を行うことでhTMC4タンパク質を得た。精製後のhTMC4タンパク質は、ウエスタンブロットティングを用いて確認した。さらに効率的にhTMC4タンパク質を大量に得るために、上述の予備検討を活用し、昆虫細胞であるSf9および浮遊細胞Expi293Fを用いたhTMC4のタンパク質の発現も試みた。

■ 結果および考察

ウエスタンブロットティングの結果では、HEK293T細胞に一過的にhTMC4を過剰発現させた培養細胞の膜画分からhTMC4特異的なバンドが確認された。トランスフェクション後の培養時間の検討では、24時間の培養が最も効率的であることが示唆された。N末端、C末端のどちらにHaloタグを付加するかでもhTMC4のタンパク質の発現効率が変化し、C末端領域の方が効率的であることが示唆された。一過的発現による方法からも精製度の高いhTMC4タンパク質が得られたが、この方法は一度の培養で取得できる量が少なく、労力の点で現実的ではない。このため効率的にhTMC4タンパク質を大量に得るために浮遊細胞を用いた系の開発も行った。この系でのhTMC4タンパク質は、実際に機能的なhTMC4タンパク質であるか不明であるため、今後、hTMC4を内包するリポソームを作成し脂質膜測定装置などを用いて確認する必要があると考えられる。

■ 結 語

hTMC4を用いたハイスループットなスクリーニング系の構築を目的とし、安定的にhTMC4タンパク質を得られる系の構築に成功した。今後は、この系から分取したタンパク質が機能的なタンパク質であることを確認し、等温滴定カロリメトリーや表面プラズモン法を用いた簡便なスクリーニング系の構築を目指したい。