

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18678

研究課題名(和文)脂質性分子によるオルガネラ膜イオン輸送体の活性化機構の解析と高感度解析技術の構築

研究課題名(英文)Modulation of organelle localized ion transporter by lipid molecule.

研究代表者

浜本 晋 (Hamamoto, Shin)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：10533812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母TRPチャネルTRPY1の活性調節機構の解明を行なった。TRPY1は高浸透圧ストレスによって活性化して液胞から細胞質にCa<sup>2+</sup>を放出し、PI(3,5)P<sub>2</sub>合成酵素欠損株ではこの高浸透圧応答が消失する。この知見から、TRPY1の高浸透圧応答にPI(3,5)P<sub>2</sub>が必要もしくはPI(3)Pの蓄積によってTRPY1が抑制される可能性が推察される。本課題を明らかにするためにPI(3)P処理した酵母液胞膜を用いて電気生理学的測定であるパッチクランプ法を用いた活性測定を行なったところ、TRPY1活性の低下を見出した。このことより、PI(3)PによってTRPY1が抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TRPY1 is a major cation channel localized in yeast vacuole membrane. We have applied the patch-clamp technique using enlarged yeast cells to elucidate the regulatory mechanisms of the TRPY1 activity. We have identified the Cys crucial for the functional property of the TRPY1 channel in the presence of reducing agent. Next we examined the effect of phosphatidylinositol phosphate on TRPY1 function since there are several reports on the involvement of PI(3,5)P<sub>2</sub> in hyperosmotic stress induced Ca<sup>2+</sup> release from organelle. We assessed whether other phosphatidylinositol phosphates (PIPs) affect to the TRPY1 activity, which is monitored as aequorin-mediated luminescence in yeast mutants defective in phosphorylation and dephosphorylation of PIPs. One of mutant of PIP phosphatase showed decreased activity in hyperosmotic stress induced Ca<sup>2+</sup> release. Furthermore, the patch-clamp analysis revealed that addition of PI(3)P to the cytoplasmic side reduced the whole-vacuole currents of TRPY1.

研究分野：生化学、電気生理学

キーワード：イオンチャネル 出芽酵母 液胞 カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

脂質二重層の生体膜は細胞の内外もしくは細胞質とオルガネラを区画するのみではなく、膜タンパク質分子の機能を最大化させるための環境を整える生体因子としての役割を担っている。オルガネラ膜を構成する脂質の種類は環境変化に応じてダイナミックに変化することやホスファチジルイノシトール (PI) やホスホイノシチド (PIs) によるイオンチャネルの活性制御機構が近年注目されている。真核生物に広く存在するホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) は、イノシトール 3 リン酸やジアシルグリセロールの原料脂質としてのみならず、脂質結合ドメインを介して様々なタンパク質と相互作用することが報告されている。特に、イオンチャネルと相互作用して活性を制御する脂質性シグナル分子としての役割が注目されている。これまでに、幾つかの細胞膜に局在するイオンチャネルが PIP<sub>2</sub> によって制御されていることが報告されてきた。一方で、オルガネラ膜に局在するイオンチャネルと PIP<sub>2</sub> の相互作用が示唆されているが、それらの制御機構や生理的役割の知見はいまだ少ない。オルガネラ膜はそのサイズが小さく、イオンチャネルの活性を保持したまま単離・精製する操作が煩雑であるため、イオン輸送体の機能解析に効果的であるパッチクランプ法の適用が困難であったこと主な要因である。そのため、脂質分子との相互作用による輸送体活性の制御をオルガネラ膜に局在するイオンチャネルの直接的計測が可能な新規のイオンチャネル測定技術の開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

PI や PIs によるイオンチャネルの活性制御機構が近年注目されている。しかし、イオンチャネル活性を保持したままオルガネラ膜を単離・精製することは困難であるため、PI の制御下にあるオルガネラ膜局在性イオンチャネルの機能解析は未踏領域である。本研究では、酵母の巨大化と細胞内小器官パッチクランプ法の併用により、酵母液胞膜に局在する動物 TRP チャネルホモログの TRPY1 チャネルの PI や PIs による活性制御機構を明らかにする。この成果は、生物種に関係なく普遍的なイオンチャネルの機能解析法を示し、疾病や生存維持に関わる動植物輸送体の解明の加速化に貢献する。

(1) ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PI(3)P) による TRPY1 活性抑制機構の解析  
出芽酵母では、液胞膜に発現するリン酸化酵素 Fab1 が PI(3)P の 5 位のリン酸化によって PI(3,5)P<sub>2</sub> を生合成している。国外の研究グループが *fab1* 欠損株では TRPY1 依存的な高浸透圧ストレス誘導性の液胞から細胞質への Ca<sup>2+</sup>流入が消失することを報告している。

しかし、このことは PI(3,5)P<sub>2</sub> の欠失によって TRPY1 が活性化しないためか PI(3)P によって TRPY1 の活性が抑制されるためか未解明であった。そのため、本研究では電気生理学的手法の一つであるパッチクランプ法を用いて TRPY1 の陽イオン透過活性に PI(3)P と PI(3,5)P<sub>2</sub> が影響するか検討する。

### (2) 脂質分子を介した TRPY1 チャネルによる高浸透圧感知機構の解明

これまでに、酵母を高浸透圧環境に晒すことによって一分以内に酵母液胞膜局在性 TRPY1 チャネルが活性化して液胞内から細胞質へ Ca<sup>2+</sup>が流入することを確認している。また、細胞質への Ca<sup>2+</sup>の流入には Fab1 が必須であることを国外の研究グループが報告している。浸透圧処理後の TRPY1 の活性化速度は非常に早いため、細胞膜から TRPY1 への信号伝達の様式は二成分制御系やセカンドメッセンジャーによる信号伝達様式とは異なり、細胞膜と TRPY1 もしくは液胞膜の間を直接架橋する分子が信号伝達を担っていると考えられる。酵母の細胞膜内側から細胞内に伸びるアクチンの重合体は、アクチンと PIP<sub>2</sub> が静電的に結合することによって形成される。さらに、脂質と結合する PH (Pleckstrin Homology) ドメインが TRPY1 の細胞質に露出した領域に保存されている。以上より、アクチン繊維は液胞膜に含まれる PI(3,5)P<sub>2</sub>、もしくは TRPY1 と結合することによって信号を伝達していることが予想される。本研究において、細胞外の環境変化をオルガネラに伝える新規の信号伝達様式の解明をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) 一倍体出芽酵母の細胞壁を細胞壁分解酵素を用いて除去し、浸透圧を調整した培地を用いて酵母を巨大化培養した。24 時間培養後、酵母を低浸透圧バッファーで処理して細胞を破裂させて液胞を細胞外に露出させた。取り出した液胞を用いてパッチクランプ測定を行った。

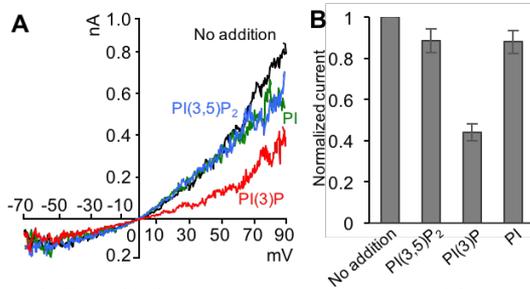
(2) 出芽酵母では、高浸透圧処理によって TRPY1 が活性化して液胞から細胞質に Ca<sup>2+</sup>が放出されることが報告されている。Ca<sup>2+</sup>と結合して発光タンパク質であるイクオリンを酵母に導入することにより、高浸透圧応答性の TRPY1 の活性化を検討する。

(3) PI(3,5)P<sub>2</sub> はアクチンと静電的に結合することによりアクチン重合を促進していることと、高浸透圧ストレスへの応答速度が早いことを踏まえると、細胞骨格分子による直接的なシグナル伝達が推察される。本実験では、Ca<sup>2+</sup>と特異的な結合により発光するイクオリタンパク質を発現した酵母細胞の培養液にアクチン繊維の脱重合剤である Cytochalasin-D を添加する。続いて 1M Sorbitol を加えることによって高浸透圧ストレスを誘導し、細胞質への Ca<sup>2+</sup>流入の検出を行う。

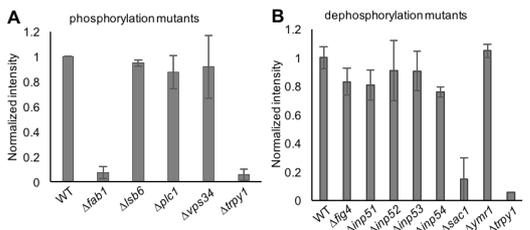
#### 4. 研究成果

##### (1) 脂質制御パッチクランプと欠損株

PI や PIs による TRPY1 の活性制御機構を明らかにするため、巨大化した出芽酵母の液胞膜を用いたパッチクランプ実験による TRPY1 の活性測定を行った。PI、PI(3,5)P<sub>2</sub> は TRPY1 のチャネル活性に影響を示さなかったが、PI(3)P 処理によって TRPY1 の活性が約 50% 程度抑制された (Fig. 1A,B)。次に、PI や PIs のリン酸化酵素欠損株と脱リン酸化酵素欠損株にイクオリンを導入して高浸透圧応答性を検討したところ、リン酸化酵素欠損株 *fab1* と脱リン酸化酵素欠損株 *sac1* において高浸透圧応答性の Ca<sup>2+</sup> の濃度の上昇が消失した (Fig. 2A,B)。以上より、TRPY1 は PI(3)P によって活性が抑制されることが示され、*fab1* 欠損株において Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が消失したのは PI(3,5)P<sub>2</sub> が減少したからではなく、PI(3)P が蓄積したためであることが示唆された。



( Fig. 1 ) PI(3)P による TRPY1 の抑制

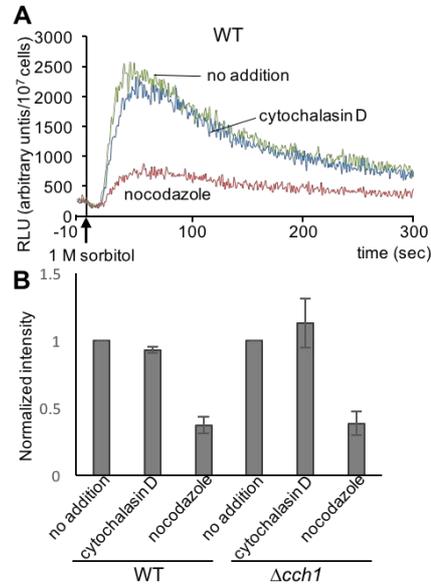


( Fig. 2 ) PtdIns のリン酸化酵素欠損株と脱リン酸化酵素欠損株における高浸透圧応答性の細胞質 Ca<sup>2+</sup> 流入の検討

##### (2) 微小管アクチン イクオリン

出芽酵母において高浸透圧ストレスにตอบสนองして液胞から細胞質に Ca<sup>2+</sup> が放出されることが以前から知られていたが、高浸透圧ストレスに晒された出芽酵母がどのような分子機構によってそのシグナルを TRPY1 に伝達しているか未解明であった。高浸透圧ストレスに晒されてから 1 分以内に Ca<sup>2+</sup> の放出が生じるため遺伝子発現やリン酸化などではなく、機械的な刺激が TRPY1 を活性化していることが推察された。そのため、本研究では微小管の重合阻害剤であるノコダゾールまたはアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D で処理した出芽酵母を用いて細胞質からの Ca<sup>2+</sup> 放出を検討した。その結果、ノコダゾール処理した出芽酵母では細胞質 Ca<sup>2+</sup> の上昇が減少したことから高浸透圧ストレスシグナルはアクチン線維を介して TRPY1 に伝達され

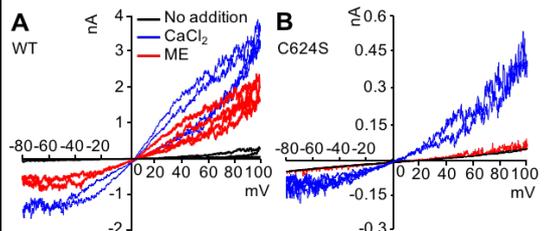
ていることが示唆された (Fig. 3)。



( Fig. 3 ) 微小管とアクチンの重合阻害剤による高浸透圧応答性の Ca<sup>2+</sup> 流入への影響の検討

##### (3) C624S whole vacuole と single channel

TRPY1 は、細胞質の還元剤によって活性化することが報告されているが、その分子機構はまだ明らかになっていない。本研究では、細胞質に露出する TRPY1 の N 末端領域と C 末端領域に存在する 9 つの各 Cys を Ser に置換した変異チャネルを用いて還元剤であるメルカプトエタノール (ME) による TRPY1 の活性化機構を検討した。その結果、C 末端領域



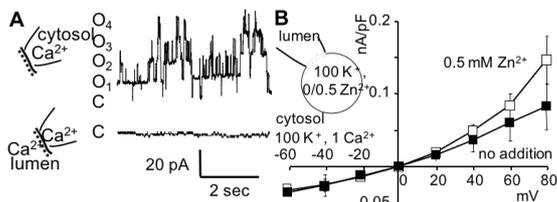
( Fig. 4 ) 還元剤による TRPY1 活性化機構の検討

の Cys を置換した C624S チャネルは、細胞質の Ca<sup>2+</sup> による活性化は維持されたが、還元剤の添加による活性化は消失した。TRPY1 の輸送活性は酸化還元に依存して調節されることが示された (Fig. 4)。さらに、野生型 TRPY1 と C624S チャネルのシングルチャネルコンダクタンスの記録を行ったところ、いずれのチャネルも 295 pS のコンダクタンスを示した。このことより、還元剤による活性化はチャネルコンダクタンスには影響を与えず、チャネル開確率に作用していることが推察された。

##### (4) 液胞内の Ca<sup>2+</sup> による活性抑制と Zn<sup>2+</sup> による外向き整流性の活性化

TRPY1 は、細胞質の Ca<sup>2+</sup>、還元剤、高浸透ストレスによって活性化するが、液胞内の制御因子に関する知見は報告されていない。そのため、液胞内の Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> による影響を検討

した。その結果、液胞内の mM オーダーの  $\text{Ca}^{2+}$ 、  
 によって TRPY1 が抑制されることを見出した。  
 また、 $\text{Zn}^{2+}$ によって細胞質から液胞内への陽  
 イオンの透過が増加した(Fig.5)。



( Fig.5 ) 液胞内  $\text{Ca}^{2+}$ による抑制と  $\text{Zn}^{2+}$ による  
 外向き整流性の活性化

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
 は下線)

[雑誌論文](計 1件)

1. Hamamoto, S., Mori, Y., Yabe, I. and Uozumi, N.

In vitro and in vivo characterization of  
 modulation of the vacuolar cation channel  
 TRPY1 from *Saccharomyces cerevisiae*  
 FEBS J. 1146-1161, 285 (2018)

[学会発表](計 6件)

1. 柴田あすか, 上原千央, 星直美, 浜本晋,  
魚住信之  
 酵母における新規  $\text{Ca}^{2+}$ 輸送タンパク質の局  
 在性と遺伝子発現の解析  
 第12回トランスポーター研究会, 平成29年  
 7月8-9日, 仙台市

2. 上原千央, 浜本晋, 星直美, 魚住信之  
 出芽酵母の新規  $\text{Ca}^{2+}$ 輸送体の機能解析  
 第12回トランスポーター研究会, 平成29年  
 7月8-9日, 仙台市

3. 魚住信之, 浜本晋  
 酵母液胞 TRP の機能と役割とオルガネラ輸送  
 体の大腸菌を用いた解析  
 第13回 TRP チャンネル研究会, 平成29年6月  
 22-23日, 生理学研究所 岡崎市

4. 上原千央, 星直美, 浜本晋, 魚住信之  
 出芽酵母のストレス応答に関わる新規4つ  
 の陽イオンチャンネルの機能解析  
 日本農芸化学会2017年度大会, 平成29年3  
 月18-20日, 京都市

5. 浜本晋, 矢部勇, 森泰生, 魚住信之  
 ホスファチジルイノシトールリン酸による  
 酵母液胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル TRPY1 の活性調節機  
 構の解析  
 第89回日本生化学会大会, 平成28年9月  
 25-27日, 仙台市

6. Hamamoto, S., Yabe, I. and Uozumi, N.

C-terminal cytosolic region of YVC1 is  
 involved in regulation of calcium channel  
 activity in yeast vacuolar membrane  
 International workshop on Plant Membrane  
 Biology. June 5-10, 2016, Annapolis USA

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
 出願状況(計 0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年:  
 国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年:  
 取得年:  
 国内外の別:

[その他]  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

浜本 晋 (Hamamoto Shin)  
 東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 10533812

(2)研究分担者  
 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
 ( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
 ( )