

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15019

研究課題名（和文）受精時の多精拒否におけるTPC3チャネルの役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of the involvement of TPC3 channel for polyspermy

研究代表者

下村 拓史（Shimomura, Takushi）

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教

研究者番号：50635464

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）：卵母細胞に発現するとされる電位依存性Na⁺チャネルであるTwo-pore channel 3（TPC3）について、多精拒否に関与する可能性について調べた。ツメガエル卵母細胞にTPC3を強制発現させ、2電極膜電位固定法により電流測定を行った。薬理学的処理や変異体タンパク質発現による機能阻害実験の結果、TPC3が多精拒否に関わる因子により制御されていることを示唆する結果を得た。また、ツメガエル卵母細胞に内在するTPC3様の活性化様式を示すNa⁺電流が、TPC3と同様にホスホイノシチド感受性であることも見出した。さらに、TPC3の持つこのホスホイノシチド感受性の分子基盤についての解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TPC3はヒト卵母細胞などでの発現と生理的役割が示唆されていたが、その詳細、特に制御分子に関する知見はほとんど得られていなかった。本研究では、TPC3が生理的に実際に機能する場である卵母細胞を用い、多精拒否に関わる分子などの関与を示す結果を得ることができた。また、PI感受性についての詳細な解析の結果は、TPC3も含めてすべてのサブタイプがPI感受性を持つというTPCファミリーの理解に重要な知見を提供するとともに、一般的なPI認識メカニズムの理解を深めることに寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Two-pore channel 3 (TPC3) is a voltage-gated Na⁺ channel thought to be expressed in oocytes. We analyzed TPC3 for the involvement in fertilization and polyspermy, using *Xenopus* oocytes as an expression system and two-electrode voltage clamp technique. The functional analyses with pharmacological treatment and exogenous mutant protein expression suggested that TPC3 is regulated by the factors involved in polyspermy. We also found that the Na⁺ current endogenous in *Xenopus* oocytes, which shows a TPC3-like activation mode, is phosphoinositide-sensitive, as well as TPC3. Furthermore, we analyzed the molecular basis of the phosphoinositide sensitivity of TPC3 and proposed a hypothesis that explains it at the atomic level.

研究分野：電気生理学

キーワード：two-pore channel TPC 電位依存性Na⁺チャネル イオンチャネル 電気生理学 受精

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Two-pore channel (TPC)は膜電位感受性カチオンチャンネルファミリーに属するNa⁺チャンネルである。TPCには3つのサブタイプが存在するが、中でもTPC3は近年になってようやくそのチャンネル活性が明らかにされた比較的新規なサブタイプである。TPC3は卵母細胞に発現し、受精時の多精拒否に関与することが示唆されているが、TPC3の制御について詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。我々のこれまでの研究で、TPC3もTPC1およびTPC2と同様にホスホイノシチド(PI)による活性制御を受けていることが明らかになった。TPC3はツメガエル卵母細胞に発現させると、長時間の脱分極刺激により緩やかに電流量が増大するという特性を持つ。これは卵母細胞に内在する脱分極刺激依存的なPI濃度の増大機構によるものと考えらえたが、この制御機構の詳細な分子メカニズムや卵母細胞における役割も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、イオンチャンネル電流測定系として確立しているツメガエル卵母細胞を用いることで、TPC3が本来機能する細胞系でその機能を解析することを目的とした。特に多精拒否や受精に関与する分子がTPC3の活性に影響するかについて、また、TPC3の持つPI感受性が卵母細胞の機能に関わる可能性について調べることを目的とした。さらに、TPC3の持つユニークなPI感受性についての詳細な分子機構を解明することも目指した。

3. 研究の方法

受精・多精拒否への関与の可能性について複数の手法を用いて検討した。*Xenopus tropicalis*由来のTPC3(XtTPC3)を用い、ツメガエル卵母細胞に強制発現させ二電極膜電位固定法によりその電流を測定した。まず、多精拒否メカニズムに重要な表層顆粒の放出を薬理処理により誘導させ、TPC3の活性が変化するかを調べた。また、表層顆粒放出に必須なミオシン1eの機能を変異体により阻害した場合の影響についても検討した。PI感受性の関与については、PI特異的ホスファターゼの強制発現による影響を調べた。このPIのTPC3への作用については、TPC3の変異体実験によりアミノ酸残基レベルでのその認識メカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1-A) PMA投与による一過的な活性亢進作用

これまでの研究により我々は、プロテインキナーゼCの活性化を誘導するPMA処理により、卵母細胞に発現させたXtTPC3の脱分極刺激による活性亢進が抑制されることを見出していた。ツメガエル卵母細胞の実験において、PMAは表層顆粒の放出を人為的に誘導するためによく用いられているため、この結果はTPC3の活性と表層顆粒放出の関連性を示唆するものであった。詳細な解析の結果、PMAのXtTPC3への作用はより複雑であることが分かった。すなわちPMAは処理直後にはむしろ一過的にXtTPC3由来の電流を増大させるが、最終的には減少に転じさせるような作用を示した。この結果は、ツメガエル卵に内在するNa⁺透過性が受精後に一過的に生じるといふ既存の報告(Peres and Mancinelli, *Pflugers Archiv*, 1985)とよく類似しており、TPC3が受精時の表層顆粒放出時に一過的にその電流量を増大させるNa⁺透過性の実体であり、受精において何らかの生理的意義をもつことを示唆するものである。

(1-B) ミオシン1eの機能阻害によるXtTPC3電流の亢進作用

ミオシン1eは表層顆粒の放出に重要であるとされる。ツメガエル卵母細胞を用いた先行研究において、ミオシン1eの部分ペプチドを強制発現させると、おそらく内在するミオシン1eの機能をドミナントネガティブに阻害するため、表層顆粒の放出が抑えられることが報告されている。この先行研究にしたがい、ミオシン1eのIQTドメインのみの部分ペプチド(myoIQT)をXtTPC3とともに発現させたところ、XtTPC3の活性が顕著に亢進することが解った(図1)。この効果は全長のミオシン1eを発現させた際には確認されなかった。細胞骨格系をなすミオシン1eによって細胞膜上のイオンチャンネルであるXtTPC3の活性が影響を受けるといふ結果は興味深いものであり、XtTPC3がミオシン1eの寄与する表層顆粒放出現象に重要であることを強く示唆するものである。

(1-C) INPP4B による内在性 PI(3,4)P₂ 依存性電流の実証

ツメガエル卵母細胞には長期脱分極刺激により誘導される Na⁺電流が存在することが既存の報告で知られている (Baud et al, *PNAS*, 1982)。これは、1-A にて引用した Na⁺透過性と同一あるいは類似したものと想定されるものであるが、TPC3 の示す特性と非常に似通っており、この内在性電流が TPC3 に由来するものであることが示唆される。(2)で後述するように TPC3 の活性亢進を引き起こす PI は PI(3,4)P₂ であると判明したので、TPC3 との類似性をさらに補強する目的で、この内在性 Na⁺電流の PI(3,4)P₂ 依存性について検証した。INPP4B は PI(3,4)P₂ 特異的なホスファターゼであり、細胞内の PI(3,4)P₂ 量を減少させる。INPP4B と XtTPC3 を共発現させると、想定通り発現させた XtTPC3 の電流増大が顕著に抑えられた。また、INPP4B のみを発現させ、長期脱分極刺激により誘導される内在性 Na⁺電流への影響を調べたところ、この内在性電流の誘導も阻害されることが解った(図2)。すなわち、長期脱分極依存的な内在性 Na⁺電流の誘導は、強制発現させた XtTPC3 と同様に PI(3,4)P₂ 依存性のものであることが示唆された。

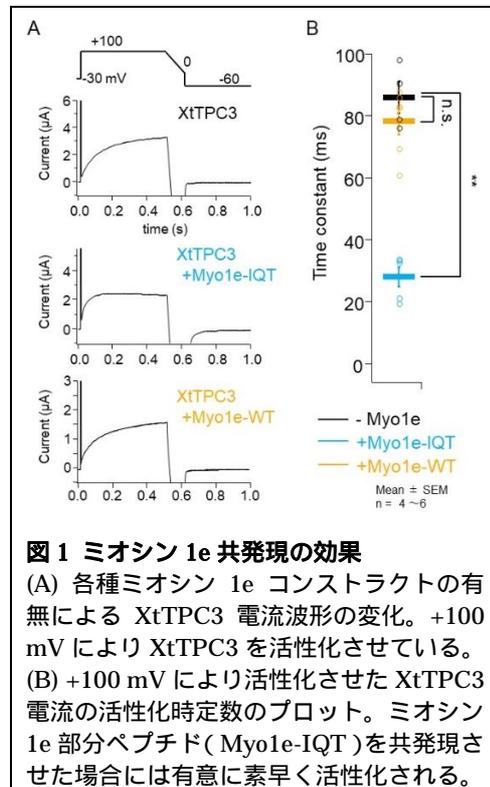


図1 ミオシン 1e 共発現の効果

(A) 各種ミオシン 1e コンストラクトの有無による XtTPC3 電流波形の変化。+100 mV により XtTPC3 を活性化させている。(B) +100 mV により活性化させた XtTPC3 電流の活性化時定数のプロット。ミオシン 1e 部分ペプチド (Myo1e-IQT) を共発現させた場合には有意に素早く活性化される。

(1-D) 蛍光免疫染色による局在の確認

TPC3 と PI(3,4)P₂ の局在の有無を検証するため、卵母細胞の蛍光免疫染色を行った。HA タグを C 末端に付与した XtTPC3 を卵母細胞に発現させ、タグに特異的な抗体で染色したところ、想定通り XtTPC3 は細胞膜近傍に存在することが解った。一方、PI(3,4)P₂ 特異的な抗体で染色した場合は、卵母細胞全体が均一に染色された。PI(3,4)P₂ は形質膜やそのごく近傍の膜小胞に存在するとされるが、我々の染色結果がツメガエル卵母細胞に特徴的なものなのか、あるいは抗体の特異性の問題であるのかまでは明確にすることができず、PI(3,4)P₂ と TPC3 との共局在などについての詳細な情報は得られなかった。今後は、PI(3,4)P₂ の染色について他の細胞を用いた結果と比較して検討したのち、共焦点顕微鏡などを用いて、PI(3,4)P₂ と TPC3 の共局在、また形質膜や細胞内小胞などのいずれの膜成分に存在するかといった、詳細な解析を検討している。

(2) TPC3 の PI(3,4)P₂ 依存性についての解析

研究開始当初は、XtTPC3 が PI(4,5)P₂ あるいは PI(3,4)P₂ によってその活性が亢進すること、またその PI 感受性に重要なアミノ酸残基が S4 ヘリックスと S5 ヘリックスを連結するリンカー近傍にあることを見出していたが、より詳細にその分子機構を明らかにすることを目指した。まず、いずれの PI 種が XtTPC3 を活性化するかを明らかにする目的で、XtTPC3 を発現させた卵母細胞から膜パッチを作成し、インサイドアウト法により細胞内に各種 PI を投与して電流の変化を観察した。PI(4,5)P₂ の投与は影響しなかった一方で、PI(3,4)P₂ の場合は明確な電流量の増大を示した。また、PI(3,4)P₂ のおよび PI(4,5)P₂ のそれぞれに特異的な蛍光センサータンパク質を XtTPC3 と共発現し、XtTPC3 電流と蛍光強度を同時測定したところ、PI(3,4)P₂ センサーを発現させた場合に XtTPC3 電流増減と蛍光強度変化の間に明確な相関が見られた。以上の結果より、PI(3,4)P₂ が XtTPC3 の活性を亢進させる PI であり、ツメガエル卵母細胞において PI(3,4)P₂ の濃度変化が XtTPC3 の電流増減の原因であることを直接的に示すことができた。

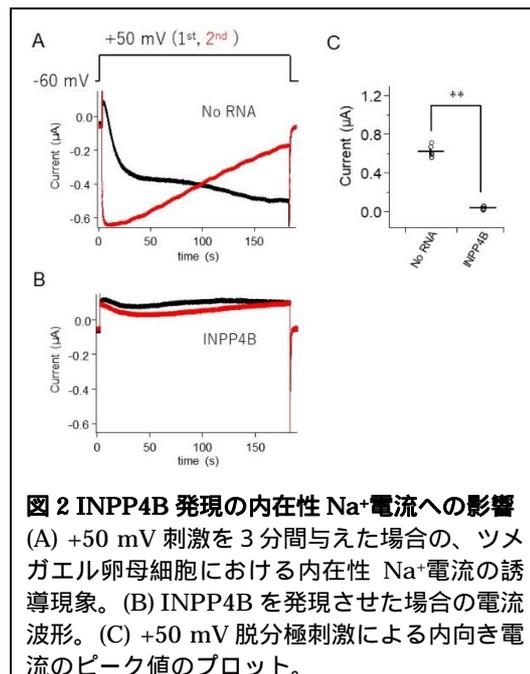


図2 INPP4B 発現の内在性 Na⁺電流への影響

(A) +50 mV 刺激を3分間与えた場合の、ツメガエル卵母細胞における内在性 Na⁺電流の誘導現象。(B) INPP4B を発現させた場合の電流波形。(C) +50 mV 脱分極刺激による内向き電流のピーク値のプロット。

次に、PI(3,4)P₂がTPC3によってどのように認識されるか原子構造モデルをもとに説明することを試みた。すでに原子構造の報告されているマウス TPC1 との相同性をもとに、XtTPC3の原子構造モデルを構築した。XtTPC3の立体構造モデルからは、Arg187がPI(3,4)P₂の3位のリン酸基に最も近い位置にあることがわかる(図3A)。このリン酸基とArg187の間に形成される静電相互作用は、PI(4,5)P₂のような3位のリン酸基を持たないPIを除外することに寄与していると考えられる。また、Asn54は構造モデルではPI(3,4)P₂の5位の水酸基に最も近い位置にあり、おそらくAsn54と5位水酸基間に水素結合が形成されると考えられる(図3C)。これらArg187とAsn54への変異導入はともにXtTPC3の活性亢進に影響することを電流測定により確認した(図3B、D)。以上のようなPI結合領域における最適なアミノ酸配置により、PI(3,4)P₂の選択的な認識が可能になっているものと考えられる。

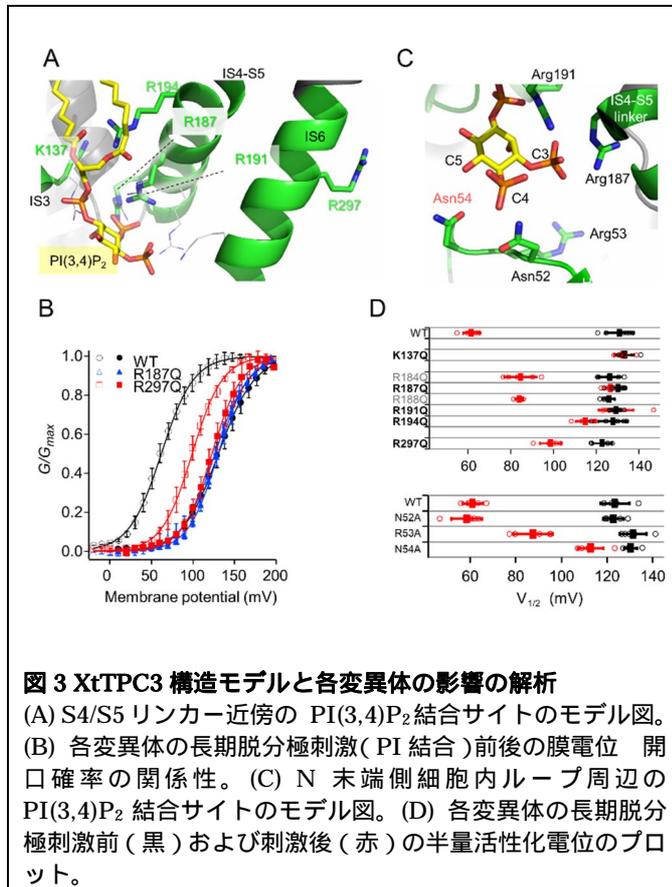


図3 XtTPC3 構造モデルと各変異体の影響の解析

(A) S4/S5 リンカー近傍の PI(3,4)P₂ 結合サイトのモデル図。(B) 各変異体の長期脱分極刺激(PI 結合)前後の膜電位 開口確率の関係性。(C) N 末端側細胞内ループ周辺の PI(3,4)P₂ 結合サイトのモデル図。(D) 各変異体の長期脱分極刺激前(黒)および刺激後(赤)の半量活性化電位のプロット。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimomura Takushi, Kubo Yoshihiro	4. 巻 151
2. 論文標題 Phosphoinositides modulate the voltage dependence of two-pore channel 3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 986 ~ 1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.201812285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Ichiro, Tateyama Michihiro, Shimomura Takushi, Ihara Kunio, Kubo Yoshihiro, Nakano Shunji, Mori Ikue	4. 巻 1
2. 論文標題 SLO potassium channels antagonize premature decision making in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-018-0124-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kume Shinichiro, Shimomura Takushi, Tateyama Michihiro, Kubo Yoshihiro	4. 巻 596
2. 論文標題 Two mutations at different positions in the CNBH domain of the hERG channel accelerate deactivation and impair the interaction with the EAG domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4629 ~ 4650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP276208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 下村拓史、久保義弘
2. 発表標題 Two-Pore Na ⁺ channel 3にみられる長期脱分極刺激依存的な活性亢進の分子メカニズムについての解析
3. 学会等名 第65回中部生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村拓史、久保義弘
2. 発表標題 Phosphoinositides modulate the voltage dependence in Two-Pore Na ⁺ Channel 3 (TPC3)
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村拓史、久保義弘
2. 発表標題 PIP2-dependent modulation of voltage dependence in Two-Pore Na ⁺ Channel 3
3. 学会等名 第8回生理研-霊長研-脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村拓史、久保義弘
2. 発表標題 A key interaction for modulation of voltage dependence by phosphoinositides in Two-pore channel 3
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村拓史
2. 発表標題 Practical Approaches to Protein Structural Information
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura T, Hirazawa K, Kubo Y
2. 発表標題 PI(3,4)P2- and voltage-dependent gating of two-pore Na ⁺ channel 3
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimomura T, Kubo Y
2. 発表標題 PI(3,4)P2-dependent Modulation of the Voltage Dependence in Two-pore Channel 3
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	久保 義弘 (Kubo Yoshihiro)		