

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18516

研究課題名(和文) 1分子計測による電位依存性プロトンチャネルのサブユニット間の協調性の解析

研究課題名(英文) The analysis of the cooperative gating of voltage-gated proton channel

研究代表者

川鍋 陽 (Kawanabe, Akira)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：10707128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性イオンチャネルは複数のサブユニットが協働してはたらくが、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで2量体を形成する電位依存性プロトンチャネルを用いて、その活性化における構造変化を解析することで協働性の実体を明らかにすることを目指した。細胞外側に2種類の環境応答性の蛍光物質を付加し、膜電位存在下で計測を行ったところ、FRETが観測され、かつそのFRET効率が経時的に変化することから活性化時に2段階の構造変化が起きていることが判明した。この構造変化はサブユニット同士が近づくことを示唆していることから、このような動きがイオンチャネルの協働性を担っているものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：Voltage-gated ion channels have multi subunits and cooperative gating. However, the mechanism of the cooperativity is not well understood. Voltage-gated proton channel (Hv1/VSOP) assembles as a dimeric stoichiometry to regulate the cooperative gating. I investigated real-time monitoring of structural changes of Hv1/VSOP to reveal the mechanism of subunit cooperativity. Cy3- or Cy5-labeled Hv1/VSOP induced fluorescent change under depolarizing pulse (Cy3, Cy5: classical environmental-sensitive fluorescent dyes). I obtained the voltage dependent fluorescent change from Cy5 dye by stimulating Cy3 (FRET) when Hv1/VSOP was labeled by both dyes. The kinetics of FRET efficiency was different from the non-FRET fluorescent changes during depolarization, indicating that the channel opening has two or more structural change steps.

研究分野：生物物理学、生理学

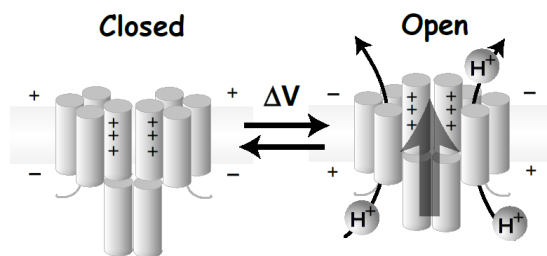
キーワード：電位依存性タンパク質 イオンチャネル 電位依存性プロトンチャネル

1. 研究開始当初の背景

生命活動における筋肉の制御や感覚器官からの情報伝達を司る電気信号の役割は古くから研究されてきた。この電気信号を担う分子実体は、膜内外の電位差 (膜電位) を感じてイオンを通す膜タンパク質である電位依存性イオンチャネルであり、“不整脈” や “てんかん” といった疾患に深く関わっているため、創薬の重要なターゲットとなっている。一般的に、その構造は4本のヘリックスからなる電位センサー部位 (S1-S4) と2本のヘリックスからなるイオン透過部位 (S5-S6) からなり、4量体を形成することで中心部にイオンの通り道を形成する。

本研究実施者が研究対象としている電位依存性プロトンチャネル (Hv1/VSOP) は、一般的な電位依存性イオンチャネルにおける電位センサー部位 (S1-S4) に相同性を持つ膜タンパク質である。Hv1/VSOPはこの4本のヘリックスのみで電位依存性イオンチャネルの2つの基本的機能 “イオンを通す” と “膜電位を感じチャネルを開閉する” を持っているため、これらを解析するには最適なターゲットと言える。興味深いことに、Hv1/VSOPは単量体で機能を果たすにも関わらず、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明らかにされている。しかし、そのメカニズムは未解明のままである。また、Hv1/VSOPに対する薬理効果を持つ亜鉛イオン、阻害剤 2GBI や不飽和脂肪酸がチャネルの開閉にどのように関わっているのかもわかっていなかった。

電位依存性プロトンチャネルの
イオン透過とそのチャネル開閉機構



1. 2量体は協調してはたらくのか？どのように協調しているのか？
2. イオン透過に至る構造変化はどのようなものなのか？
3. 1分子当りのプロトン透過量は？

図1 電位依存性プロトンチャネルイオン透過とチャネルの開閉図および解明されていない点。

最近の本研究実施者の研究により、不飽和脂肪酸の Hv1/VSOP に与える効果の作用メカニズムの一端が明らかとなった。培養細胞に発現させた Hv1/VSOP によるマクロ電流解析の結果、不飽和脂肪酸により活性化を劇的に加速させる作用が明らかとなった(雑誌論文)。この効果は活性化のキネティクスが、時定数にして2桁速くなったこと(数10秒 数100ミリ秒)に起因していることが判明した。また、不飽和脂肪酸誘導体や変異体の解析から、膜中に入り込んだ不飽和脂肪酸が直接効果を発揮することが示唆された。一方で以前チャネルの開閉にどのような影響があるのかは不明である。

2. 研究の目的

イオンチャネルの開閉やサブユニット間の協調性をより詳細に解析するためには、これまでは多数のイオンチャネルの挙動の積算値であるマクロ電流での解析が行われてきたが、さらなる理解には単一のイオンチャネルの動態を解析する必要がある。これを実現するには精製膜タンパク質を用いた系が理想である。本研究実施者はこれまでにイオン輸送タンパク質の生物物理学的手法による構造変化・機能解析や機能創成を行ってきた。これらの経験から得られた膜タンパク質精製・機能解析に関する知見も活用しつつ、Hv1/VSOP に対して単一チャネル電流計測や全反射蛍光顕微鏡 TIRF を用いて1分子計測を行うことを着想した。さらに研究開始直前にわれわれが明らかにした Hv1/VSOP の構造情報 (Takeshita et al. 2014) と組み合わせれば、最終的にイオンチャネル開閉に対する協調性の理解につながると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、電位依存性プロトンチャネル Hv1/VSOP を対象として“サブユニット間のチャネル開閉の協調メカニズム”を明らかにすることを目指している。

(1) **単一チャネル電流計測による解析:** マウス由来 Hv1/VSOP (mHv1/VSOP) を大腸菌により発現・高純度精製した後、人工脂質リポソーム (POPE:POPC:POPS の混合脂質) に透析法を用いて再構成した。電気生理学実験でリポソームを用いる場合、通常 10 μ m 以上の大きさのジャイアントリポソーム (GUV) を作製して使用する。この mHv1/VSOP を埋め込んだリポソームに対して電気生理学的手法 (インサイドアウトパッチクランプ法) によりパッチ電極先端の小さな領域のみからの

単一チャンネル電流を低ノイズ下で観測、2量体によるチャンネル開閉の協調機構を解析する。

(2) 膜電位存在下における構造変化の解析：

これまでも Hv1/VSOP が活性化する際の構造変化は、環境応答性の蛍光物質をラベルしたサンプルからの蛍光強度変化として解析されてきた(Voltage Clamp Fluorometry)。本研究実施者はこれを発展させて全反射蛍光顕微鏡 TIRF を使用し、Hv1/VSOP のチャンネル開閉に伴う構造変化をサブユニットごとに1分子の蛍光変化として観測し、協調性を解析することを目指した。リポソーム膜内外のイオン濃度勾配により発生させた膜電位形成時の、蛍光標識タンパク質の蛍光シグナル変化を指標として、チャンネル開閉の構造変化を解析する。この際、サブユニットごとに異なる蛍光標識をすることで2量体の協調性を解析する。

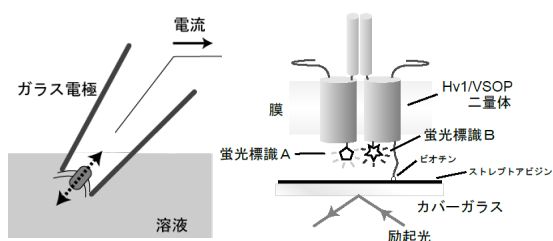


図 2 リポソームを利用した電気生理学的計測および蛍光標識 Hv1/VSOP の蛍光変化観測

左：パッチクランプ法による電流計測図

右：TIRF 観察におけるエパネッセント場付近拡大図

4. 研究成果

(1) 単一チャンネル電流計測による解析

単一チャンネル電流計測実験における肝は安定した巨大サイズの GUV 作製にあるが、その条件検討をいくつか実施した。再構成に使用するリポソームの脂質組成はリポソームの形状に大きな影響を与えることが古くから知られており、当初 mHv1/VSOP に使用する実験では PC:PE:PS:PI:SM の5種類の脂質の混合で行っていた(Lee et al.(2008))。しかし、これらの脂質のうち PI や SM に関しては天然膜由来を使用しており、混入している微量の脂質が活性に影響を与えていることが否定できない。そこで、より純粋な系を構築するために、人工脂質のみでの構成になるようにし、結果として、全て人工脂質である POPE:POPC:POPS の混合膜においてイオンチャンネル活性があることがわかり、この組成を通常使用する構成とした。

次にリポソーム作製法について検討した。これまでは最も穏やかな条件で作製が可能な静置水和法を用いていた。しかし、電気生理に適用可能な $10\mu\text{m}$ 以上のサイズの GUV は1つのシャーレに数個ほど得られないために非常に効率が悪い。そこで、より大量に GUV の作製が可能と考えられる電圧印加法による作製を試みた。これは電気伝導性膜添付スライドガラス (ITO ガラス) 上に脂質膜をはり、もう1枚の ITO ガラスを上被せて密封した状態でガラス間に交流電圧を印加し、顕微鏡下でリポソームの生成過程を観測する手法である。大量の GUV の生成が観測された一方で、その回収が現在の系では難しく、改善中である。

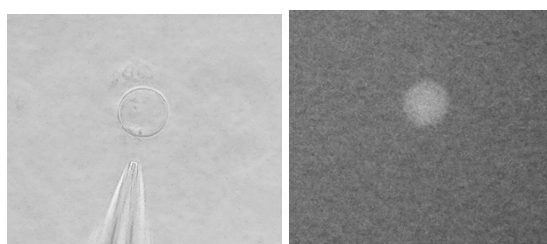


図 3 リポソームへのパッチクランプ法の適用例

左：リポソームの明視野像。パッチピペット先端が見える。

右：同じリポソームの蛍光像(フィルター GFP)。リポソーム作製時に蛍光物質である BCECF を加えることにより蛍光観察可能になっている。

このような条件検討を行いつつ、図3のようにリポソームからのイオンチャンネル電流の計測を試みたが、再現性よく電流をとることが現在のところできていない。そこで単一チャンネル電流計測の実現性を推し量るために、マクロ電流のゆらぎから単一チャンネル電流値を推測するノイズ解析と呼ばれる手法を用いて解析した。その結果、mHv1/VSOP の単一チャンネル電流は $0.1\text{pA}/100\text{mV}$ 程度と評価され、これはパッチクランプで計測できる電流量としてはギリギリの水準であるため、難易度が極めて高いことが判明した。そこで、次項の蛍光変化計測を主体として以降の実験を行った。

(2) 蛍光変化をプローブとした構造変化解析

一分子計測を実施するにあたり、まずは蛍光ラベル位置の最適化をする必要がある。これにはすでに確立している系である VCF を利用しマクロな蛍光変化を検出することで行った。過去の VCF の報告ではホヤ由来 Hv1/VSOP (CiHv1/VSOP) の S242C 変異体

(S3-S4 リンカー上、細胞外側)に Rodamine マレイミドを結合させて、膜電位変化による蛍光変化を観測している。本研究で扱う mHv1/VSOP では Ser188 が対応しておりこの Cys 変異体でマクロナな蛍光変化が観測できるか確認した。通常この計測ではアフリカツメガエル卵母細胞にイオンチャンネルを発現して行うが、哺乳類由来の Hv1/VSOP は発現しないことが問題となってきた。そこでホヤ由来の Hv1/VSOP の N 末端領域を mHv1/VSOP に付加することで問題を解決できないか試みたところ、電位依存的なプロトン電流が確認され発現が確認できた。これに引き続き、Cys 変異体を作製、代表的な蛍光物質である Cy3, Cy5 をそれぞれラベルすることで、構造変化に由来する蛍光変化を検出した。

さらに、Cy3, Cy5 を同時にラベルし、Cy3 の励起光で蛍光計測したところ Cy5 においても蛍光変化が観測されたため、FRET が起きていることが確認された。従って Cy3, Cy5 はごく近接しており、かつ観測した mHv1/VSOP が 2 量体であると言える。また、その FRET 効率の変化も観測され、距離が近くなる方向への変化であることから、Hv1/VSOP はチャンネルが開く際に 2 段階以上の構造変化を起こし、遅い構造変化においてダイマー間のヘリックス同士が近づくことが示唆された(サブユニットごとに開くような動きと見られる)。このような動きが協働性を担っているものと推測されるが、さらなる詳細を検証する必要がある。

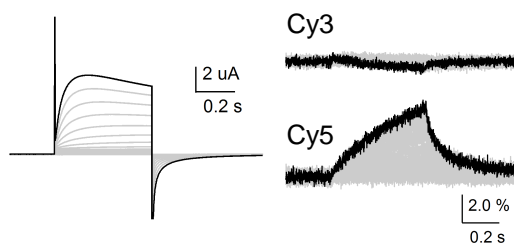


図4 mHv1/VSOP の電流および蛍光変化
Cy3 の励起光で観測した際の電流(左)および
蛍光変化(右)。

(3)全反射蛍光顕微鏡 TIRF のセットアップ

前項で Ser188 へのラベルにより、蛍光変化が観測できることが明らかとなった。TIRF による観察は、当初リポソームに対して適用することを考えていたが、膜電位を変化させることはリポソームを使った実験では困難を極めることが想定された。そこで、本研究実施者は培養細胞からの電気生理の経験が豊富にあることから、TIRF にパッチクランプ

を装備し、培養細胞にイオンチャンネルを発現させての TIRF 観察を行うことを考えた。高倍率なためわずかな振動でも安定した計測ができないために測定系の最適化を行い、現在では膜電位固定下での TIRF 観察が可能となっており、手始めに蛍光タンパク質を融合させた mHv1/VSOP の蛍光変化を観測することができた。しかし、いぜん 1 分子の分解能までの到達はできておらず、今後の課題である。

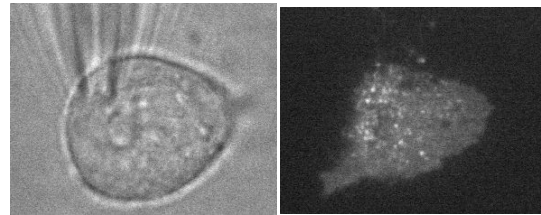


図5 TIRF による観察

左：明視野像。細胞に接触しているパッチピペットの先端が確認できる。

右：TIRF 像。明視野像に対応する細胞からの TIRF 観察。

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 3 件)

Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, Ozkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura Y.(2016) Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating. *Biochem. Biophys. Acta.* 1858(12):2972-2983 査読有

Sakata S, Jinno Y, Kawanabe A, Okamura Y.(2016) Voltage-dependent motion of the catalytic region of voltage-sensing phosphatase monitored by a fluorescent amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(27):7521-7526 査読有

Kawanabe A, Okamura Y. (2016) Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. *J. Physiol.* 594(3):595-610. 査読有

[学会発表](計 7 件)

Akira Kawanabe, Masaki Hashimoto, Tomoko Yonezawa, Yuka Jinno, Souhei Sakata, Yasushi Okamura, “The importance of membrane

interacting region in voltage-sensing phosphatase (VSP)", 第 94 回日本生理学会大会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2017/3/28-30

Akira Kawanabe, "Electrophysiological studies of voltage sensing proteins", 日本化学会 第 97 春季年会, 神奈川県横浜市, 2017/3/16-19

Akira Kawanabe, Masaki Hashimoto, Tomoko Yonezawa, Yuka Jinno, Souhei Sakata, Yasushi Okamura, The role of membrane interacting region of phosphatase domain in voltage-sensing phosphatase (VSP), 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016/11/25-27

Akira Kawanabe, Tomoko Yonezawa, Yuka Jinno, Souhei Sakata, Yasushi Okamura, "The common regulation of phosphatase activity of voltage-sensing phosphatase (VSP) and PTEN by conserved putative membrane interacting region", 仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市), 2016/9/25-27

川鍋陽, 岡村康司, "電位依存性プロトンチャネルの 2 量体と単量体間のゲーティング特性の違いを増大させる変異体の解析", 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015/9/13-15

[その他]

統合生理学教室ホームページ :

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川鍋 陽 (KAWANABE Akira)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)

研究者番号 : 10707128