

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18209007

研究課題名 (和文) 膜電位化学連関の新しい生理メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Novel pathways of electro-chemical signals at membrane proteins

研究代表者

岡村 康司 (YASUSHI OKAMURA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80201987

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオンチャネル、酵素、シグナル伝達、生体分子、蛋白質

### 1. 研究計画の概要

電位センサーとホスファターゼを併せ持つ電位センサードメイン蛋白と、電位センサードメインのみから成りプロトンチャネル活性を示す蛋白など新たに同定された電位感受性蛋白による膜電位シグナル伝達のメカニズムと生理的意義を明らかにする

### 2. 研究の進捗状況

VSP の電位センサー領域と酵素領域の特性をほぼ全貌を明らかにした。電位センサーの機能には、これまでの電位依存性イオンチャネルの場合と同様に、S4 の陽性電荷が重要であることが判明した。酵素領域の活性中心部のアミノ酸 365 のグリシンが、PI(4,5)P2 に対して脱リン酸化活性を示すために重要な部位であることが明らかになった。リアルタイムの酵素活性計測法を用いて様々な膜電位での酵素活性の速度を計測した結果、酵素活性が電位センサーのダイナミックレンジに対応して単調増加関係にあることを明らかにした。現在酵素ドメインを PTEN と比較して解析する実験により、ホスファターゼの膜電位依存的制御の分子機構を明らかにしつつある。プロトンチャネル VSOP1 の動作原理については、発現系細胞を用いて電気生理学的測定と、pH イメージング実験、ウェスタンブロットによる解析を行った。VSOP1 はダイマーとして細胞膜で機能するが、基本機能ユニットがモノマーであること、ダイマーになることで活性化速度が遅くなっていること、などを明らかにした。さらにノックアウトマウスを作成して解析した結果、好中球およびマクロファージのプロトン電流が完全に消失することから、VSOP1 は内在性

のプロトン電流の形成に必須であることが明らかになった。また、ノックアウトマウスでは好中球の活性酸素産生レベルが低下することが判明し、VSOP1 が、膜電位の制御または pH の制御を通して NADPH オキシダーゼの活性を制御することが示唆された。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) 当初目的としたように VSP と VSOP1 について動作原理と生理機能の解析が大きく進んだ。特に、VSP の膜電位依存的酵素活性の詳細が明らかになったことで、今後この分子の生体内での生理機能が明らかにできると期待される。また、VSOP1 についてはダイマーとして機能することが判明し、ストイキオメトリーの動態による生理機能の調節という、新たな視点が導入されることとなった。もうひとつのターゲットとしていた VSOP2 については発現系細胞での機能同定に成功しておらず、今後結合蛋白の同定やノックアウトマウスの機能解析が必要である。

### 4. 今後の研究の推進方策

ここまでの研究であらたな視点が求められるようになった。1つは、電位センサードメイン蛋白が神経系以外にも見られることで、これまで電気生理学的測定がなされてこなかった部位での電氣的活動の意義を調べる重要性が高まったこと。2つ目は、電位センサードメイン蛋白の機能は他の蛋白との相互作用が重要であり、膜電位センサー機能を蛋白複合体の一部として捉える必要が生じたことである。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

① Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine, M, Higashijima S, Nagayama K & Okamura Y. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs. *J Biol Chem* 283, 18248-18259. (2008).

② Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y & Larsson HP. Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(26):9111-6. (2008).

③ Iwasaki H, Murata Y, Kim Y, Hossain MI, Worby CA, Dixon JE, McCormack T, Sasaki T & Okamura Y. A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN, dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7970-7975. (2008).

④ Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y & Miyawaki A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8,683-5. (2008).

⑤ Murata Y & Okamura Y. Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP2. *J Physiol*, 583, 875-889. (2007).

⑥ Okamura Y. Biodiversity of voltage sensor domain proteins. (review) *Pflugers Archiv*, 454(3):361-71. (2007)

⑦ Sasaki M, Takagi M & Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science*, 312(5773), 589-92. (2006).

など

[学会発表] (計 33 件)

① VSOP protein lacking the C-terminal half of S4-like segment retains proton permeation. 黒川竜紀、高木正浩、坂田宗平、大河内善史、岡村康司. *Biophysical society meeting*、ポスター (2009.3.3)

② 電位依存性プロトンチャネルの動作機構. 黒川竜紀、コッホハンス、高木正浩、大河内善史、佐々木真理、ラーソンピーター、岡村康司. 第32回日本分子生物学会年

会 第82回日本生化学会大会合同大会 神戸、口頭(2008.12.12)

③ Biochemical characterization of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes. Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Kurokawa T & Okamura Y. 42nd Annual Scientific Meeting of the European Symposium of Clinical Investigation, Geneve, Switzerland. 口頭(2008.3.29)

④ Biochemical characterization of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes. Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Kurokawa T & Okamura Y. 42nd Annual Scientific Meeting of the European Symposium of Clinical Investigation (Geneve, Switzerland). 口頭(2008.3.28)

⑤ Voltage range for tuning of phosphatase of Ci-VSP as measured by two PIP2-sensors. Hossain MI, Sakata S, Murata Y & Okamura Y. 52th Biophysical Society Annual Meeting, (Long Beach, USA). ポスター (2008.2.5)

⑥ Voltage-gated proton channels. Okamura Y. "Voltage-dependent proton channels: come of age", 16th IUPAB International Biophysics Congress, *Biophysical Journal*, vol. 94, issue 2, pp. 587-588 (Long Beach, USA). 口頭 (2008.2.5)

⑦ How do animals utilize signals of membrane potentials? lessons from two voltage-sensing proteins. Okamura Y, Sasaki M, Kurokawa T, Okochi Y, Hossain MI, Iwasaki H, Murata Y & Higashijima S: the 6th Okazaki Biology Conference: "Marine Biology", (Okazaki, Japan). 口頭(2007.12.4)

⑧ Mechanisms of voltage-sensor domain proteins and insights into physiological significance. Okamura Y. Plenary Lecture, Annual Meeting of Neuroscience in Chile (Los Andes, Chile). 口頭(2007.9.27)  
など

[図書] (計 2 件)

① Okamura Y, Handbook of Neurochem. and Mol. Neurobiology 3rd Ed. Volume1 Ed. By Mikoshiba K. (印刷中)

② 標準生理学 第4版 医学書院