

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

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 (OKAMURA YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80201987

研究成果の概要：

電位依存性ホスファターゼ VSP および電位依存性プロトンチャネル VSOP1 は、細胞膜電位を感知する電位センサードメインを有する新たな膜蛋白である。これらの蛋白による細胞膜電位シグナルの分子機構を解明するため、生理学的実験、イメージング、生化学実験などを組み合わせて実験を行った結果、（1）VSP の電位センサーがイノシトールリン脂質である PIP2 を分解する酵素活性と、分子内において強く共役すること（2）プロトンチャネル VSOP1 は二分子一体となって細胞膜で機能するが、基本的なチャネル活性は単分子に内包されていること（3）VSOP1 は、好中球の食食機能を維持する働きがあることを、明らかにした。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2007 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
年度			
総計	30,000,000	9,000,000	39,000,000

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. 研究開始当初の背景

電位センサーがイオンチャネル以外で機能する初めての例として VSP が同定され、膜電位シグナルがイオンの出入り以外にも幅

広く使われている可能性が示された。これまでチャネル様構造の酵素様のドメインをもつタンパクとしては、K チャネルの β サブユニットや TRP チャネルなど

が知られてきたが、実際に膜電位変化により酵素活性が変化することは知られていなかった。イオンを介さず膜電位変化によりイノシトールリン脂質の動態が直接制御される分子経路の発見は、細胞の形態や増殖の制御における膜電位の働きを理解する上で重要である。一方、活性酸素の生成や細胞内 pH 調節での重要な生理機能にも関わらず長年分子実体が不明であった Hv チャンネルが我々のグループにより同定され VSOP1 と命名された。Hv チャンネルは軟体動物のニューロンで最初に記載され、哺乳類血球系細胞で発見され、食食過程での呼吸爆発での役割やマイクログリアなどでの細胞内 pH 環境の維持における役割が示されてきたが、分子レベルでの証明はされてこなかった。更に、電位依存性チャンネルが X 線結晶構造として解かれた (Long ら, Science, 2005) ことを背景に、電位センサーをもつ蛋白機能の分子レベルでの動作原理を詳しく解析できる状況になっていた。

2. 研究の目的

新規電位センサータンパク機能の分子基盤を明らかにするとともに、膜電位-化学連関の機構を、電気生理学的測定、イメージング法、ノックアウトマウスの作成などにより解明することを目指す。電位センサードメインの機能多様性の構造基盤を解明するとともに、分子特性の解析新規電位センサータンパクの細胞生理機能を理解する。

3. 研究の方法

おもに、電気生理学、酵素活性の生化学的解析、生細胞蛍光イメージング法、ノックアウトマウスの作成、などの手法を組みあせて研究を行った。

VSP と VSOP1 の、電位センサー領域のアミノ酸について、変異を導入し、パッチクランプ法による電流計測を行い、電位依存性決定に鍵となる部位を同定することを試みた。

VSP の細胞での活性を調べるため、発現系細胞において PIP₂ の蛍光プローブ分子である PH-ドメイン GFP を強制発現させ、膜電位固定法により膜電位を変化させ、共焦点顕微鏡下にて PIP₂ の動態を解析した。

VSOP1 遺伝子の遺伝子トラップ ES 細胞を用いて VSOP1 ノックアウトマウスの作成を行った。キメラマウスの作成は、筑波大において行った。動物実験は、大阪大学と岡崎統合バイオサイエンスセンターにおいて、動物実験委員会の承認のもとに行なった。血液機能については末梢血血球数、骨髄での血球細胞種の分布などを確認した。活性酸素産生能を、サイトクローム C を用いた光計測により調べ、正常マウス由来の細胞と比較した。

4. 研究成果

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ン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 (Iwasaki et al, PNAS, 2008) (図 1)。

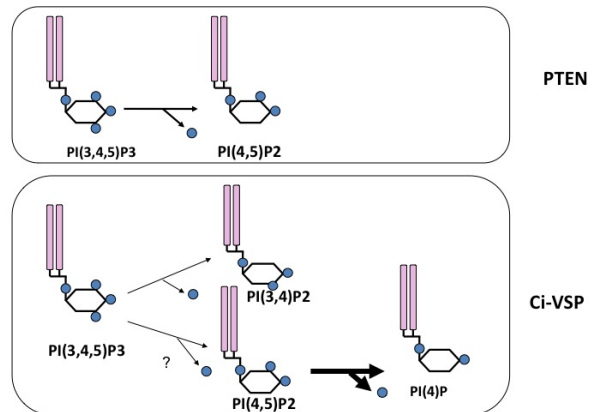


図 1 : P T E N と V S P の酵素活性の違い。P T E N は PIP₃ のイノシトール環の 3 位のリン酸を脱リン酸化するのに対して、V S P は PI(4,5)P₂ のイノシトール環の 5 位のリン酸を脱リン酸化する。さらに PIP₃ も 5 位を脱リン酸化する。

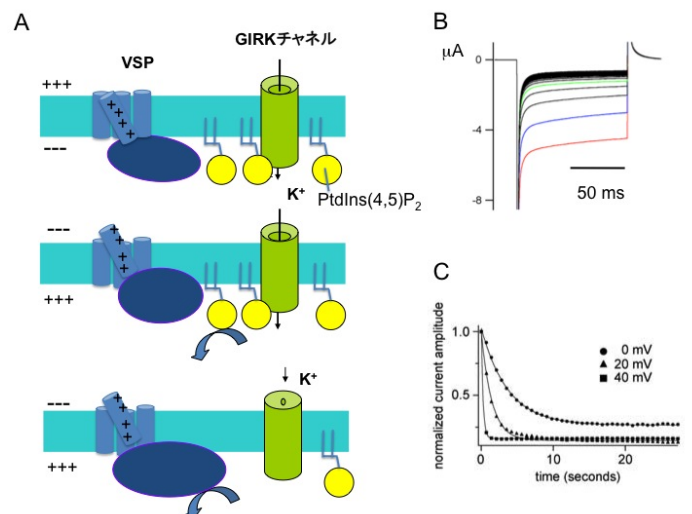
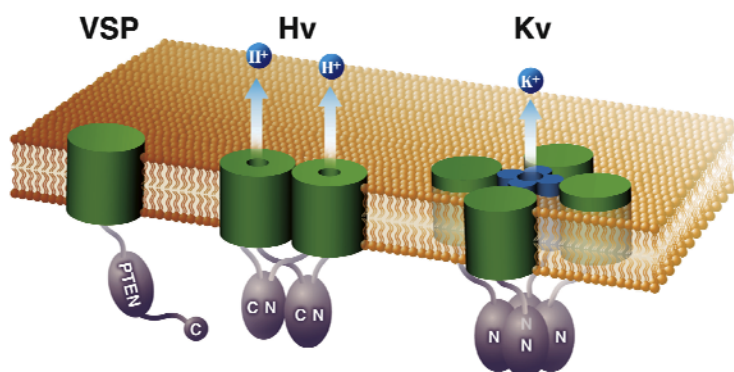


図2: VSPの電位依存的酵素活性を計測した例。A、内向き整流性カリウムチャンネルの一種GIRKチャンネルをアフリカツメガエル卵母細胞にVSPと共発現させて電流計測すると、脱分極により酵素活性が活性化し、PI(4,5)P₂の濃度が減少する(Aの下図)。GIRKチャンネル活性にはPI(4,5)P₂が必要であり、PI(4,5)P₂の枯渇によって、電流減少が生じる。B、20 mVの脱分極パルスを繰り返し与えたときの、GIRKチャンネル活性の減少をみたもの。GIRKチャンネルの活性を見るために200 msの-100 mVへの過分極パルスを与えており、その合間の期間、膜電位を20 mVの脱分極レベルへ保持している。C、Bで調べたGIRKチャンネルの電流量の時間変化を、他の電位の記録と共にプロットしてある。より高い電位ほど速くGIRKチャンネル電流が減少するので、酵素活性が脱分極の程度が大きくなるに従って増加することがわかった。

また、イオンチャンネル活性を用いたリアルタイムの酵素活性計測法により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、幅広い膜電位範囲で酵素活性が変化することを明らかにした(図2)(Murata & Okamura, J. Physiol, 2007)。

これらの結果は、世界に先駆けて同定したVSPの基本的な特性を明らかにしたものであり、膜電位変化によるホスホイノシチドの代謝の制御、という新たな研究分野を確立することとなった。

プロトンチャンネル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(下図)(Koch et al, PNAS, 2008)。

更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(Okochi et al, BBRC, 2009)。

これらの結果は、分子が同定される前に推定されていた電位依存性プロトンチャンネルの生理機能を裏付けることとなったが、分子レベルでの細胞機能を世界に先駆けて明らかにした結果となった。一方、活性酸素の産生の低下は、プロトンチャンネルの阻害薬を用いた場合ほど顕著でなく、プロトンチャンネル以外にイオンの移動が起こっている可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

- ① Okamura Y, Murata Y & Iwasaki H (2009), Voltage-sensing phosphatase: actions and potentials J. Physiol. *Topical Review*, 587(3) 513-520. 査読有
- ② Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Okamura Y (2009), Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes Biochem. Biophys. Res. Commun. 382(2):274-9. 査読有
- ③ 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). 査読有
- ④ Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y & Larsson HP, Multimeric nature of voltage-gated proton channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105(26):9111-6. (2008). 査読有
- ⑤ 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). 査読有

- ⑥ Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y & Miyawaki A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. Nature Methods, 8, 683-5. (2008). 査読有
- ⑦ 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). 査読有
- ⑧ Okamura Y. Biodiversity of voltage sensor domain proteins. (review) Pflugers Archiv., 454(3):361-71. (2007). 査読有
- ⑨ Sasaki M, Takagi M & Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel, Science, 312(5773), 589-92. (2006). 査読有

など

[学会発表] (計 46 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, 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. 2009
- ② 岡村康司、標準生理学 第7版 医学書院 2009 70-108

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 電位依存性プロトンチャネルポリペプチドおよびその利用
発明者: 佐藤矩行、岡村康司
権利者: 京都大学、自然科学研究機構
種類: 国内
番号: 特願 2005-154598
出願年月日: 2005 年 5 月 26 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 新規イオンチャネル様ポリペプチドおよびその利用
発明者: 佐藤矩行、岡村康司、岩崎広英、村田喜理
権利者: 京都大学、自然科学研究機構
種類: 国際特許
番号: U.S. Patent Application No. 11/667.756
取得年月日: 2009-5-20

国内外の別：国外

[その他]

(1) Sasaki, Takagi & Okamura, Science 2006 に関して

読売新聞「新たんぱく質 膠原病リウマチに関連」朝刊2面、平成18年3月24日(金)

日経新聞「免疫細胞調節のたんぱく質特定」朝刊15面(テクノロジー)平成18年3月24日(金)

日刊工業新聞「水素イオンチャネル分子発見」、朝刊33面、平成18年3月24日(金)

Nature Struc Mol Biol, News and Views Science, STKE “Signaling breakthrough of the year”, 2006.

Science, Perspective

Science, Editor's choice

(2) Koch et al., PNAS, 2008 に関して

Toward Designing Medications To Enhance Innate Immunity: A Single VSOP Can Do A 'Proton' Magic! Science Daily, USA - Jun 18, 2008

Medical News Today (press release), UK - Jun 18, 2008

Eureka! Science News, Canada - Jun 16, 2008

PhysOrg.com, VA, USA - Jun 16, 2008

EurekAlert (press release), DC, USA - Jun 16, 2008

日経 BP ホームページ「たんぱく質、構造解明-水素イオン個別に通過」日本経済産業新聞 平成20年7月23日

(3) Iwasaki et al., PNAS, 2008 に関して

時事通信、2008年6月23日

Yahoo ニュース、2008年6月23日

朝日新聞 科学欄 2008年6月25日24面「ホヤたんぱく、がんを抑制？」

日経産業新聞 11面「ホヤ精子のタンパク質、ガン抑制遺伝子に類似」2008年6月23日

(4) Murata & Okamura, J. Physiol., 2007 に関して

日経産業新聞 朝刊9面“がん細胞の酵素電圧で制御も” 2007年10月29日

“The secret lives of voltage sensors”.

C. A. Ahern, Journal of Physiology, 583(3), 813-814. Perspective (2007).

Highlights From The Literature, Physiology, 22, 355-357. (2007).

New insight into the mechanisms of voltage sensing and transduction in biological processes.” (Blackwellにて Press 発表) (2007, Sept 15).

(5) Tsutsui et al., Nature Methods, 2008 に関して

「蛍光たんぱく質組み入れ膜電位プローブ感度上昇」科学新聞、平成20年7月18日第6面

「サンゴ・タンパク質とホヤ由来センサー活用 細胞活動を可視化理研など(配信:フジサンケイビジネスイ) Yahoo News、

研究内容を紹介したホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 康司 (OKAMURA YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 80201987

(2) 研究分担者

東島 眞一 (HIGASHIJIMA SHINICHI)

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号: 80270479

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90435818

岩崎 広英 (IWASAKI HIROHIDE)

現、ハーバード大学 博士研究員

研究者番号: 30342752

佐々木 真理 (SASAKI MARI)

現、日本学術振興会特別研究員

研究者番号: 80435817

藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20532980