

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229003

研究課題名(和文) 電位センサードメイン蛋白群を基盤とする新たな膜電位シグナルの解明

研究課題名(英文) Mechanisms and physiological roles of electro-chemical Coupling mediated by voltage-sensor domain proteins

研究代表者

岡村 康司 (Yasushi, Okamura)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80201987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 113,100,000円、(間接経費) 33,930,000円

研究成果の概要(和文)：電位感受性ホスファターゼVSP、電位依存性プロトンチャンネルVSOP/Hv1などの電位センサードメインタンパクについて、X線結晶構造解析、電気生理、蛍光計測などを行い、モジュール間での共役機構を明らかにした。その知見を利用した膜電位プローブタンパクの創成に成功し、ゼブラフィッシュ個体で心臓の拍動に伴う電気シグナル、マウス聴覚野大脳皮質での興奮伝搬などを可視化可能なツールの開発に成功した。VSOP、VSOP/Hv1、機能未知のVSOP2について、遺伝子改変動物を作成し、個体レベルでの役割を明らかにすることに成功した。これらにより、膜電位シグナル伝達の分子機構と生理的意義の理解を深めた。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms of voltage sensor domain proteins, including voltage-sensing phosphatase and voltage-gated proton channels, were studied by X-ray crystallography, electrophysiology, fluorescence imaging or fluorometry. We also exploited advantages of molecular mechanisms to develop efficient voltage-reporter protein and applied them in zebrafish heart and mouse auditory cortex and were convinced that these probes serve as efficient reporter. Knock out mice were established for VSP, VSOP/Hv1 and VSOP2 and physiological functions of these voltage-signaling molecules have been revealed.

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：生体膜 チャンネル トランスポーター 能動輸送

1. 研究開始当初の背景

これまで膜電位シグナルを担う実体として、電位依存性イオンチャネルの電位センサーが連綿たる研究の対象となってきた。岡村らは、電位センサーをもちポアドメインを持たない複数の新規タンパクを同定し、その一つ Ci-VSPが、がん抑制遺伝子であるPTEN様のホスファターゼドメインを有し脱分極によりイノシトールリン脂質を脱リン酸化するユニークな機能をもつことを明らかにしイオン透過以外の生理機能に電位センサーが動作する初めての例として示した (*Nature* 2005)。更に電位センサードメインのみから成るVSOP/Hv1はポアドメインが無いにも関わらずイオンチャネル特性を示し、長い間血球系細胞での活性酸素産生に関わる因子として注目されていたが分子が未同定であったプロトン選択的イオンチャネル分子であることを明らかにした (Sasaki et al, *Science*, 2006)。VSOP/Hv1と相同性を有するVSOP2は、他のタンパクとの相同性を示さない細胞内領域をもちニューロンに発現する新規膜蛋白として同定した。これら電位センサードメインをもつ蛋白の発見により電位センサーが従来の電位依存性イオンチャネルに限定されるものでなくタンパクモジュールとして多様な分子機能に使われ「電位センサードメインタンパク」という新たな概念が構築されてきた。

2. 研究の目的

電位センサーの「膜電位-化学シグナル共役複合体」での新たなメカニズムと役割を明らかにすることを目的とし、これら電位センサードメインタンパクを発現する細胞や組織から膜電位変化を計測するとともに、電位センサードメインを含むシグナル複合体の構築と機能を明らかにし膜電位-化学シグナルの共役機構と生理的役割を解明する。

(1) 3つの電位センサードメインタンパク (VSP, VSOP/Hv1, VSOP2) と精子に特異的に発現する電位センサータンパク (Na/H交換体 sNHEなど) について電位センサードメインタンパク複合体の分子基盤を解明する。

(2) 電位センサードメインタンパクの動作原理に基づき膜電位感受性蛍光プローブ分子 Mermaidの改良を行い、電位感受性、応答速度、光ブリーチングを改良し、特定の細胞膜コンパートメントにターゲットできるような分子の作成を行う。

(3) 遺伝子改変マウスと膜電位感受性蛍光プローブ分子を利用し、電位センサードメインタンパクの生理機能の解明する。VSOP1/Hv1の免疫における役割を明らかにする。VSP-KOマウスを用いて受精や精子機能などの解析を行う。VSOP2-KOマウスを用いて神経系での機能を解析する。血液細胞、精子 (または精原

母細胞) ニューロンなどから膜電位変化を計測し、電位センサードメインタンパクが関わる生理的文脈を明らかにする。

3. 研究の方法

電位センサーの計測を培養細胞でのパッチクランプ法、卵母細胞発現系での微小電極膜電位固定法、蛍光計測法VCFなどにより行った。膜電位プローブの解析を、電気生理計測とフォトマルを用いた蛍光計測を組み合わせを行った。

分子動作原理の解明には、アミノ酸置換を site directed mutagenesis法を適用した。ノックアウトマウスは研究分担者崎村らが開発してきた手法を駆使して、ES細胞の樹立、キメラマウスの作成、交配を行った。電位センサードメインタンパクの立体構造の解明には、大腸菌や昆虫細胞などの発現系により大量合成、精製、可溶化条件の検討、結晶化スクリーニング等を経て、タンパクの結晶化と構造解析を行った。動物実験は、各機関の大学動物実験規定に従い、各機関の動物実験委員会が審査を受けた状況で行った。ガイドラインに従って生命倫理に基づいた処置、安全対策を講じている。遺伝子組換え実験は、各機関の規定に従い審査を受け、法令等で定められている基準に適合して実験が承認されている。

4. 研究成果

1) 電位センサードメインタンパクおよびそれを含むタンパク複合体の動作原理の解明 2) その知見を利用した膜電位プローブタンパクの創成 3) 遺伝子改変動物および電位センサードメインタンパクを基盤とする分子ツールを用いた生理機能の解明について以下の成果を得た。

(1) 電位センサードメインタンパク群の機能と複合体形成の基盤の解明

電位依存性ホスファターゼVSP: 電位センサードメインと酵素ドメインが共役する分子メカニズムを明らかにした (Sakata et al *J Physiol* 2011, 2013: 後者はPerspective記事として紹介)。Ci-VSPの細胞内領域の構造をX線結晶化によりVSPの基質結合ポケットの形態がPTENとは異なっており、活性中心のアミノ酸であるE411の基質選択性における重要性を明らかにした (Matsuda et al *JBC* 2011)。VSPは、その脱リン酸化活性が、従来の5'活性だけでなくホスホイノシタイダイ P1(3,4)P2に対して3'活性を示し、これが高い膜電位レベルでの刺激により増加することから、電位センサーが酵素活性の大きさだけでなく基質特異性も変化させている可能性が明らかになった (Kurokawa et al *PNAS* 2012)。電位センサーのS4下流の構造変化が生じるだけでなくS1の細胞内側であるN末端側に

も構造変化が生じることが示され (Tsutsui et al Biophys J. 2013)。VSPがN末端側に結合しうるタンパクヘシグナルを伝達するメカニズムの可能性を示した。

電位依存性プロトンチャネルVSOP/Hv1: アミノ酸変異や欠失させたコンストラクトの電気生理学実験、膜トポロジー解析から、S4の細胞内側半分がプロトン透過には必須でないことを見出し、従来のオメガ電流仮説ではプロトン透過が説明できないことを示した (Sakata et al PNAS 2009: Commentaryとして PNAS 2010 Feb 2;107(5):1817-8. ”にも紹介)。コイルドコイル領域がダイマー構造を示し、温度依存的な会合特性が2つのモノマー間での協調的ゲーティングを調節し、S4とコイルドコイルが細胞膜内から細胞質まで一体のらせん構造として機能していることを示した (Nat Communi 2013、J Gen Physiol 2014)。人工的に trimer、tetramer化した分子を設計し特性を比較しダイマーの場合が最も協調的ゲート機構が動作できることを明らかにした (Fujiwara et al J Physiol 2012)。コイルドコイルの酸化還元状態での構造基盤を明らかにし未知の分子がVSOP/Hv1へ酸化還元依存的に結合する可能性が示唆された (Fujiwara et al JBC 2013)。全長タンパクについて、電位センサーとしては初めての静止状態のX線結晶構造解析に成功し、プロトン選択性、ゲーティング機構、亜鉛イオンによる調節など、プロトンチャネルの基本特性だけでなく電位センサータンパクすべてに共通する原理解明への手がかりを得た (Takeshita et al Nat Struct Mol Biol 2014)。

神経系に発現する機能未知の電位センサー関連タンパクVSOP2: VSOP2の特異抗体を科研費包括脳支援班 (北大渡辺教授) のサポートによって作成し、これを用いてマウス脳から免疫沈降実験を行い (生理研深田教授の協力)、結合する可能性のある候補分子を質量分析により複数見いだした。

精子特異的Na/H交換体sNHEおよびカチオンチャネルCatSper: S1-S4とVSPの細胞内ドメインのキメラ体が細胞外液pHに依存したイオン電流を示し電位センサーがVSOP/Hv1様にイオンを透過させる可能性が示された (藤原ら未発表)。精子特異的カチオンチャネルCatSperのカタウレイボヤオルソログ3つ (哺乳類の2~4に相当) をクローニングし発現実験からポアドメインがない状態で電位センサー単独で機能しうることを見いだした (筒井ら)。またホヤ精子CatSper 2および3についてチャネルポアを構成するペプチドに対する抗体が精子の受精を著しく阻害することを見

出した (吉田ら)。

(2) 電位センサードメインの動作原理に基づく膜電位プローブタンパクの改良

蛍光タンパクの組み合わせの変更、様々な動物種のVSPを元にしたキメラ分子作成、蛍光タンパクを融合させる部位の変更により、時間分解能などの、膜電位プローブタンパクの特性を顕著に改善した (Tsutsui et al J Physiol 2013)。細胞外電場の変調を与えて迅速にプローブ特性をスクリーニングする系の構築に成功した (Tsutsui et al BBA 2014)。

(3) 遺伝子改変マウスおよび膜電位プローブを用いた電位センサードメインタンパクの生理機能の解明

VSP、VSOP/Hv1、VSOP2のノックアウトマウスの作成に成功した (崎村ら)。VSPの遺伝子改変マウスは、蛍光蛋白VenusをVSPの電位センサードメインの下流に発現させるノックインマウスとして作成され、これにおいて精巣でのVSP蛋白の発現を確認できた。また微研井川教授らの協力を得て、これらの精子の受精能に異常が見られることを見いだした。VSOP/Hv1に関しては、B6を背景とするfloxマウスをCAGプロモーターCreマウスと掛け合わせ全身ノックアウトマウスを作成した。これらを用いて、VSOP/Hv1ノックアウトマウスの好中球は細胞運動性が低下、細胞接着している時間が長いなど好中球の運動性に異常が生じる (El Chemaly et al J Exp Med 2010)、VSOP-KOマウスの好中球は、次亜塩素酸の産生量が野生型よりも高くアズール顆粒の脱顆粒自体が亢進する (論文改訂中)。自己抗体増加、腎炎などのループス腎炎様の自己免疫疾患症状を呈し、T細胞からのO₂の産生量が減少し活性化T細胞の細胞数が増加する (Sasaki et al Biochem J 2013)。摂食量が亢進し高頻度で肥満を呈する、などを明らかにした。

これらの生理機能で電位センサードメインタンパクが活性化される膜電位変化を解明することを目指し、膜電位感受性蛍光プローブ蛋白を用いた膜電位イメージングを行った。zebrafishの心臓にmermaidを発現させたラインを用い心臓の拍動に伴う興奮の伝搬を可視化した (Tsutsui et al J Physiol 2010)。CAGプロモーターの下流にmermaidを発現させるトランスジェニックマウスを作成し (阪大微研岡部博士、理研宮脇博士の協力) 心臓での拍動に伴う伝搬を記録に成功した。膜電位プローブmerm2をマウス大脳皮質聴覚野のニューロンへ強制発現させ麻酔下で音を聞かせ周波数依存的マップに応じた電気活動を捉えた (Tsutsui et al J Physiol 2013)。VSPの細

胞内領域を改変することにより、細胞内膜に選択的にターゲット可能なプローブの作成に成功した。

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34件)

Tsutsui H, Jinno Y, Tomita A & Okamura Y. (2014). Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838(7):1730-7. doi:

10.1016/j.bbame.2014.03.002.

Takeshita K, Sakata S, Yamashita E,

Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, *Okamura Y & *Nakagawa A (2014). X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* (4):352-7. doi:10.1038/nsmb.2783,

*equal to correspondence

Itsuki K, Imai Y, Hase H, Okamura Y, Inoue R & Mori M. (2014). PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J. Gen. Physiol.*143(2): 183-201.

Sakata S & Okamura Y (2014).

Phosphatase activity of the voltage-sensing phosphatase, VSP, shows graded dependence on the extent of activation of the voltage sensor. *J. Physiol.* 592(Pt 5):899-914. doi:

10.1113/jphysiol.2013.263640.

Kurokawa T & Okamura Y (2013). Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: A study with PEGylation protection. *Biochem. Biophys. Acta.* 1838(1 Pt B):382-7. doi:

10.1016/j.bbame.2013.10.001.

Yamaguchi S, Kurokawa T, Taira I, Aoki N, Sakata S, Okamura Y & Homma KJ. (2013). Potential role of

voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of PI(3,4)P2. *J. Cell Physiol.* 229(4):422-33. doi:

10.1002/jcp.24463.

Tsutsui H, Jinno Y, Tomita A, Niino Y, Yamada Y, Mikoshiba K, Miyawaki A & Okamura Y (2013). Improved detection of electrical activity with a voltage

probe based on a voltage-sensing phosphatase. *J. Physiol.* 591(Pt 18):4427-37. doi:

10.1113/jphysiol.2013.257048. Epub 2013 Jul 8.

Sakata S & Okamura Y (2014).

Phosphatase activity of the voltage-sensing phosphatase, VSP, shows graded dependence on the extent of activation of the voltage sensor. *J. Physiol.* 592(Pt 5):899-914. doi:

10.1113/jphysiol.2013.263640.

Tsutsui H, Jinno Y, Tomita A & Okamura Y. (2013). Optically detected structural change in the N-terminal region of the voltage-sensor domain. *Biophys. J.* 105(1):108-15.

Fujiwara Y, Takeshita K, Nakagawa A & Okamura Y. (2013). Structural characteristics of the redox-sensing coiled coil in the voltage-gated H⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 288(25):17968-75.

Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A & Okamura Y. (2012). The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1. *Nat. Communi.*, 3:816. doi:

10.1038/ncomms1823.

Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M & Okamura Y (2012). Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice. *Biochem. J.*, 450(2):295-301.

Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Nakagawa A, Larsson HP & Okamura Y (2012). Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H⁺ Channel. *J. Physiol.*, 591(Pt 3):627-40.

Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T & Okamura Y. (2012). 3' phosphatase activity toward PI(3,4)P2 by voltage-sensing phosphatase, VSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(25):10089-94. doi:

10.1073/pnas.1203799109.

Matsuda M, Takeshita K, Kurokawa T, Sakata S, Suzuki M, Yamashita E, Okamura Y & Nakagawa A (2011). Crystal structure of the cytoplasmic PTEN-like region of Ci-VSP provides insight into substrate specificity and redox

regulation of the phosphoinositide phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 286(26):23368-77.

Sakata S, Hossain MI & Okamura Y (2011). Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J. Physiol.*, 589(11):2687-705.

Okamura Y & Dixon JE (2011). Voltage-sensing phosphatase: its molecular relationship with PTEN.

Physiology, 26(1):6-13.

Tsutsui H, Higashijima S, Miyawaki A & Okamura Y (2010). Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. *J. Physiol.* 588(12):2017-21.

El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y & Demaurex N (2010). VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification *J. Exp. Med.* 207(1):129-39.

Sakata S, Kurokawa T, Norholm MH, Takagi M, Okochi Y, von Heijne G & Okamura Y (2010). Functionality of the voltage-gated proton channel truncated in S4 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(5):2313-8. doi: 10.1073/pnas.0911868107.

7

[学会発表](計 102件)

岡村康司 藤原祐一郎 川鍋陽 坂田宗平 黒川竜紀 電位依存性プロトンチャンネル VSOP1/H1 の動作原理 第91回日本生理学会大会 鹿児島県鹿児島市 2014/3/18

Okamura Y. Voltage-sensor domain proteins: phosphonositide signal, proton permeation and molecular tools. Biophysical Society 58th Annual Meeting シンポジウム 米国サンフランシスコ 2014/2/17

Sakata S, Okamura Y, Tsutsui H Voltage-sensing phosphatase - it's structure and portability. The 1st Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Sciences Oriented Applications. 兵庫県淡路市 2013/6/17

Okamura Y. How excited to talk with PI?: Lesson from voltage-sensing phosphatase. 日本生理学会第90回大会、東京 2013/3/29

Okamura Y. Secret lives of voltage-sensing phosphatases,

“Bioelectrochemistry”, (ゴードンカンファレンス) (Lucca, Italy)_2012/7/3

Okamura Y. Gating Mechanisms of Voltage-Gated Proton Channels (ゴードンカンファレンス) 米国ベンチュラ 2012/2/20.

[図書](計 3件)

Okamura Y (2009), Voltage-gated ion channels and novel sensing proteins. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms* (Springer): ed. Mikoshiba K.

Okamura Y (2013) Voltage-gated proton channels. *Comprehensive Biophysics* (Elsevier) ed. Montal M.

岡村康司 生物学辞典 第五版 分担執筆及び分担編集 岩波書店 (2013)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計2件)

名称: 電位依存性プロトンチャンネルポリペプチドおよびその利用

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第4887484号

取得年月日: 平成23年12月22日

国内外の別: 国内

名称: 新規イオンチャン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: 同上

種類: 特許

番号: 特許第4802331号

取得年月日: 平成23年8月19日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2014/20140303_1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 康司 (Okamura, Yasushi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80201987

(2) 研究分担者

崎村 建司 (Sakimura, Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 80201987

吉田 学 (Yoshida, Manabu)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号： 60301785

中川 敦史 (Sakimura, Kenji)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号： 20188890

藤原 祐一郎 (Fujiwara, Yuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号： 20532980

筒井 秀和 (Tsutsui, Hidekazu)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号： 30392038

大河内 善史 (Oukouchi, Yoshifumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号： 90435818

(3)連携研究者

宮脇敦史 (Miyawaki, Atsushi)
理化学研究所・細胞機能探索技術開発
チーム・シニア・リーダー
研究者番号： 80251445