

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770171

研究課題名 (和文) 電位依存性プロトンチャネルにおけるプロトン透過機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of proton permeation mechanism of voltage-gated proton channel

研究代表者

黒川 竜紀 (KUROKAWA TATSUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40527701

研究成果の概要 (和文)：生化学的手法を用いて、電位依存性プロトンチャネルの膜貫通領域 (S1 から S4) についてトポロジー解析を行った。すると、S3 と S4 には水が大きく浸入していた。この構造的特徴は他の電位依存性チャネルでも報告されていることから、膜電位感知に非常に重要であると考えられる。また、S1 と S2 において、局所的に周辺が水環境であるアミノ酸残基があった。これらのアミノ酸残基に変異を導入すると、チャネル活性に大きな影響を与えることから、プロトン透過に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We performed site-directed cysteine scanning using accessibility of maleimide-reagent (AMS or NEM) as detected by Western blotting. When we examined the accessibility of the S4 by using NEM, we found only 6 inaccessible residues. These results suggest that the S4 segment is lined by water-accessible crevices interrupted by a small hydrophobic region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生体膜・受容体・チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性チャネルは、一般的に 6 回膜貫通型構造を基本構造として有している。そのうち最初の 4 つの膜貫通部位 (S1-S4) は、膜電位を感受する「電位センサードメイン」を構成しており、後半の第 5、第 6 膜貫通部位はイオンを通す「ポアドメイン」を構成している。2006 年にマウスの EST 情報より新規の分子が見つけれ、この分子が電位依存性

プロトンチャネルであることが証明された (Sasaki, M. et al.: Science, 312:589-592, 2006)。この分子は、電位センサードメインは持っているが、ポアドメインを持たないタンパク質だったので、Voltage-Sensor Only Protein (VSOP) と名付けられた。これまで電位依存性チャネルの電位センサーが動作するには、ポアドメインとの相互作用が重要であると考えられてき

た。しかし、ポアドメインを持たない VSOP では、電位センサードメインのみでイオンを透過させると考えられるので、この VSOP の動作機構を解明することは、電位センサー機構とイオン透過機構の両方の解明につながると期待される。

## 2. 研究の目的

電位依存性プロトンチャネルの研究は、VSOP が同定される以前までは、マクロファージや好中球などで電気生理学的研究を中心に行われてきた (DeCoursey, T. E. : *Physiol. Rev.*, 83:475-579, 2003)。プロトンが細胞膜を透過する方法としては、単純にポアをプロトンが通る方法や、タンパク質内のアミノ酸側鎖の水素結合ネットワークを介して、バケツリレーのようにプロトンが移動する方法 (HBC: hydrogen-bonded chain) が考えられる。これまでの電位依存性プロトンチャネルの研究から、HBC の方法でプロトンが透過していると考えられている。電位依存性プロトンチャネルである VSOP が同定されている現在、プロトン透過機構の解明など詳細な研究が可能になっている。

今回の課題では、VSOP の透過機構の解明を大きな目標とする。そのために、①膜貫通構造 (トポロジー)、②プロトン透過に重要なアミノ酸残基の同定を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルで用いられている monomethoxypolyethylene glycol maleimide (mal-PEG) を使用する (Neale, E. N. et al. : *J. Biol. Chem.*, 282:37597-37604, 2007)。mal-PEG は、システイン残基に結合できる maleimide と分子量が約 5 kDa の PEG が組み合わさったもので、バンドのシフトを見ることで、特定のアミノ酸残基への結合が確認できる (図1)。AMS は分子量が約 500 Da の小さい物質で、狭い隙間にも入り込むことが出来る。

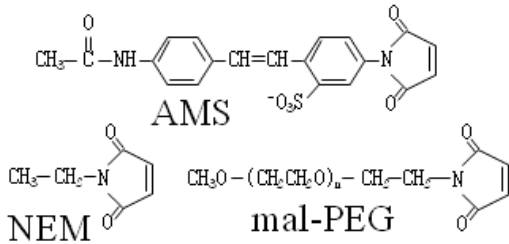


図1 システイン修飾試薬

実験の手順としてはまず、電位依存性プロトンチャネル VSOP を発現させた培養細胞に AMS を加える。AMS は水溶液環境中のシステイン残基 (P125C, C245) には結合することが出来るが、細胞膜内など水溶液環境でないシステイン残基 (C103) には結合することが出来ない (図 2)。その後、強い界面活性剤で可溶化後、mal-PEG を加えると、mal-PEG は AMS が結合していないシステイン残基、つまり、水溶液環境中でないシステイン残基に結合することが出来るが、すでに AMS が結合しているシステイン残基には結合出来ない。ウェスタンブロットを行うと、mal-PEG が結合しているタンパク質は、バンドシフトが起こることにより確認出来る。この様に、AMS の結合の有無を調べることで、システインを導入した位置の水溶液環境を見る方法である。

実際の実験では、まずマウス VSOP (mVSOP) には内在性のシステインが2つ存在するので、このシステインをセリンに置換した Cys-less 変異体を作製する。この変異体の推定される膜貫通領域すべてのアミノ酸に対して、システイン置換体を作製する。それぞれの変異体を動物細胞に発現させ mal-PEG と AMS を反応させ、ウェスタンブロットを行うことにより、トポロジーの推定を行う。

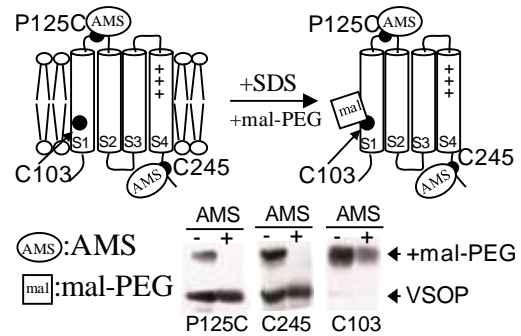


図2 PEGylation-protection法

## 4. 研究成果

まず、電位感知やプロトン透過に重要だと考えられている第4番目の膜貫通領域 (S4) について、生化学的手法を用いて解析を行った。まず、S4 のそれぞれの位置にシステインを導入した変異体を作製し、AMS が結合出来るか否かを指標に、トポロジーを推定した。すると予想される膜貫通領域 (マウス VSOP の195番目のグリシンから217番目のリシン) のうち、206番目のアラニンよりC末

端側は、水に接することが出来る環境であることがわかった (PNAS, 2010)。また、206番目のアラニンから C 末端側を除去したマウス VSOP でもプロトン活性が維持されていることから、VSOP の機能にはこのアラニンより N 末端側が重要であることが分かった。次に AMS より分子量の小さい NEM を使用した。すると、N 末端側の多くのアミノ酸残基も水に接していることがわかった (図 3)。

残りの膜貫通領域 (S1 から S3) についてトポロジー解析を行い、膜貫通領域 (S1 から S4) のトポロジーを決定した。すると、S1 と S2 では大きく水が浸入している部位はなかったが、S3 は S4 と同様に水が大きく浸入していた。電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルでも S3 と S4 には水が大きく浸入している報告があることから、この構造的特徴は電位依存性チャンネルに共通であり、膜電位感知に非常に重要であると考えられる。

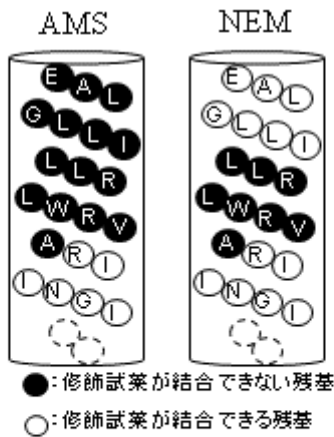


図 3 AMSとNEMにおける結合部位の違い  
図はVSOPのS4 (192番目のグルタミン酸から212番目のイソロイシン) のモデル。N末端側にもNEMは結合しており、NEMはAMSよりさらに奥に浸入していると考えられる。

また、S1 と S2 において、局所的に周辺が水環境であるアミノ酸残基 (アスパラギン酸とグルタミン酸) があつた。これらのアミノ酸残基に変異を導入すると、チャンネル活性に大きな影響を与えることから、これらのアミノ酸残基はプロトン透過に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。本課題により、VSOP のトポロジーが決定された同時にプロトン透過に重要なアミノ酸残基も同定出来た。

今回の成果は、VSOP の動作機構の解明につながると考えられ、今後これらの解明によ

り、電位依存性チャンネル全般の電位センサー機構や、インフルエンザウィルス M2 蛋白質や ATP 合成酵素などプロトン透過する他のタンパク質のプロトン透過機構の解明に繋がると期待される。

#### 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 4 件)

(1) 黒川竜紀、岡村康司  
電位依存性プロトンチャンネルに見る膜電位センサーの謎：細胞膜中に存在する電荷生物物理, Vol 51, 2011, 72-75 査読有

(2) Sakata S, Kurokawa T, Nørholm MH, Takagi M, Okochi Y, von Heijne G, Okamura Y.  
Functionality of the voltage-gated proton channel truncated in S4.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol 107, 2010, 2313-2318 査読有

[学会発表] (計 9 件)

(1) 黒川竜紀、岡村康司  
電位依存性プロトンチャンネルにおける S4 トポロジー解析  
生理学研究所研究会 (招待講演)、2010 年 9 月 16 日、岡崎コンファレンスセンター (愛知)

(2) 黒川竜紀、岡村康司  
電位依存性プロトンチャンネル VSOP のトポロジー解析  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会)、2010 年 9 月 2 日、神戸コンベンションセンター (兵庫)

(3) 黒川竜紀、岡村康司  
電位依存性プロトンチャンネルにおける S4 のトポロジー解析  
第 87 回日本生理学会大会 (招待講演)、2010 年 5 月 20 日、盛岡市民文化ホール (岩手)

(4) Tatsuki Kurokawa, Yoshifumi Okochi, Yasushi Okamura  
The role of C-terminal cytoplasmic regions in dimerization of voltage-gated proton channel  
36th International congress of physiological Sciences, 2009 年 7 月 30 日、京都国際会館 (京都府)

[その他]

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒川 竜紀 (KUROKAWA TATSUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40527701