

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659111

研究課題名(和文)活動する細胞の酸化還元状態を可視化する

研究課題名(英文)Visualization of the redox condition in activating cells

研究代表者

藤原 祐一郎 (FUJIWARA, YUICHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：酸化反応はパイ菌に対抗するための重要な生体防御反応である一方、毒性も有するため、厳格にコントロールされる必要があります。好中球の貪食作用において、電位依存性H⁺チャネルは活性酸素の産生を調節する鍵となる分子です。本研究において、我々は、電位依存性H⁺チャネルの細胞内コイルドコイルドメインの結晶構造を酸化状態、還元状態で解くことに成功しました。生化学実験により、電位依存性H⁺チャネルは細胞内に酸化還元センサーを持つことを明らかにしました。さらに、我々はコイルドコイルを用いて細胞の酸化還元状態をモニターすることを試みました。

研究成果の概要(英文)：Oxidation is an important biochemical defense mechanism, but it also elicits toxicity; therefore, oxidation must be under strict control. In phagocytotic events in neutrophils, the voltage-gated H⁺ channel is a key regulator of the production of reactive oxygen species against invading bacteria. In this study, we solved the crystal structure of the cytoplasmic coiled-coil domain of the voltage-gated H⁺ channel in reduced, oxidized and mutated (Cys to Ser) states. The crystal structures indicated that a pair of Cys residues in the dimeric coiled-coil forms an intersubunit disulfide bond dependent on the redox conditions. Circular dichroism spectroscopy revealed that the disulfide bond increased the thermal stability of the coiled-coil protein. Thus, we revealed that the voltage-gated H⁺ channel has a redox-sensor in the cytoplasmic domain. We also tried to monitor the redox condition using the coiled-coil in cells.

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 レドックス 電位依存性チャネル

1. 研究開始当初の背景

我々の体内では酸化還元シグナルを利用し種々の生体反応が生じている。酸化ストレスは、ガンや動脈硬化、神経変性疾患など様々な病気に深く関与することが示唆されている。酸化還元と関わりのある生体反応として、免疫システムにおける貪食細胞の活性酸素による異物の消化や、脳内ミクログリアによる酸化ストレスからの神経細胞保護が有名である。しかしながら、これまで化合物性の酸化還元指示薬は存在するものの、細胞に遺伝子導入するかたちで用いる酸化還元分子に実用的なものがないために、活動する生きた細胞の酸化還元状況をリアルタイムに観測する事は不可能であった。申請者は貪食細胞に発現する電位依存性 H⁺チャネルの細胞内領域に存在するコイルドコイル2量体化ドメインの X 線結晶構造解析を行い、近接する一対の Cys 残基が存在し、酸化還元に応答する可能性があることを見いだした。酸化還元に応答して結合解離するこれほどまでに小さく単純な分子はこれまで報告がなく、このユニークなコイルドコイルの酸化還元特性を利用する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(全体構想) 本研究は、免疫系やストレス応答、脳神経機能において重要な働きを持つ酸化還元状態を可視化し、酸化還元シグナルが種々の臓器・細胞において果たす役割を解明します。

(具体的目的)：好中球、マクロファージにおいて活性酸素産生に寄与している電位依存性 H⁺チャネルの細胞内に存在する、一対の Cys 残基の酸化還元特性を、原子構造の視点から詳細に解析する。電位依存性 H⁺チャネルの細胞内コイルドコイルを利用した酸化還元センサーを、高解像度結晶構造を基にデザインします。開発した酸化還元プローブを活動する生きた細胞に発現させ、種々の活動ステージにおける細胞内レドックス状況を観測します。

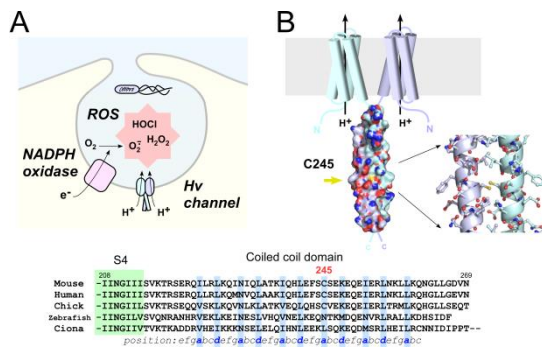
3. 研究の方法

(1) 申請者は貪食細胞に発現する(図 A) 電位依存性 H⁺チャネルの細胞内領域に存在するコイルドコイル2量体化ドメインの X 線結晶構造解析を行い、近接する一対の Cys 残基が存在し、酸化還元に応答する可能性があることを見いだした(図 B)。これを、手がかりに、細胞内コイルドコイルを酸化状態、還元状態、変異体(Cys→Ser)の状態で、構造解析する。X 線結晶構造解析法を用いて高解像度の構造解析を目指す。

(2) 細胞内コイルドコイルの生化学的性質を酸化状態、還元状態にて解析する。円二色性分散計(Circular Dichroism Spectrometry, CD)を用いて、ヘリックスの熱安定性を解析する。

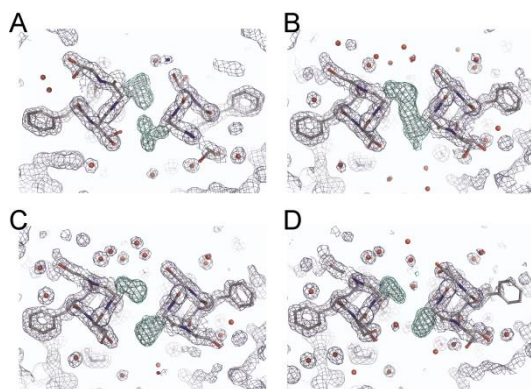
(3) 酸化還元状態が活動する細胞に発現した電位依存性 H⁺チャネル分子に与える影響を解析する。

(4) コイルドコイルに蛍光蛋白を付加したプローブを作成し、細胞に発現させ、活動する細胞の酸化還元状態をモニターする。



4. 研究成果

(1) 電位依存性 H⁺チャネルの細胞内領域のタンパク質(野生型、変異体)を大腸菌を用いてリコンビナントに大量発現することに成功した。発現したタンパク質は FPLC クロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。(2) 精製したタンパク質の結晶を、平常状態(図 A)、酸化状態(図 B)、還元状態(図 C)、変異体(Cys→Ser)(図 D)にて作成し、高解像度(1.38~1.45 Å)での構造解析に成功した。

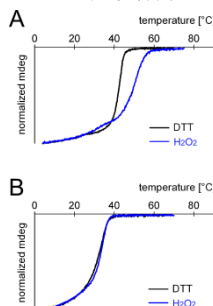


その結果、2量体サブユニット間でのジスルフィド結合が酸化還元状態に応答して形成されることを明らかにした。

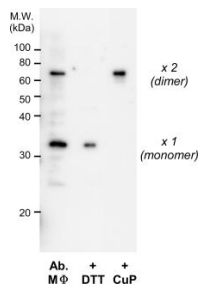
(3) 精製したコイルドコイル蛋白質(野生型および変異体)の熱安定性を CD スペクトラムを用いて解析した。

野生型では、酸化により2量体サブユニット間が架橋され、熱安定性が増強された(図 A)。Cys 残基の欠失した変異体では、架橋が生じないため、酸化による熱安定性の変化は観察されなかった(図 B)。

これらの解析により、H⁺チャネルは細胞内領域に、酸化還元に応答するレドックスセンサーを有することが明らかになった。



(4) マウス腹腔マクロファージを採取し、マクロファージに発現する電位依存性 H⁺チャネルの酸化還元に対する反応を観察した。



採取したマクロファージは通常の状態では、Cys 残基が架橋した状態(図の dimer 約 20%)と、還元された状態(図の monomer)の 2 状態を呈することが明らかになった。また、各状態は、細胞の酸化還元状況に応じて遷移した。

(5) 活動する細胞の酸化還元状態をモニターする目的で、コイルドコイルの C 端に蛍光蛋白 CFY、YFP を付加したコンストラクトを作成し、HEK 細胞、RO 細胞に発現させ、FRET 効率の変化をモニターし酸化還元状態の観測を試みた。

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 6 件)

(1) Takeshita K., Sakata S., Yamashita E., Fujiwara Y., Kawanabe A., Kurokawa T., Okochi Y., Matsuda M., Narita H., Okamura Y., Nakagawa A.

“X-ray Crystal Structure of Voltage-gated Proton Channel”
Nature Structural & Molecular Biology 21 巻 352-357 頁 2014 年、査読あり

(2) Fujiwara Y., Kurokawa T., Okamura Y.,
“Long α -helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H⁺ channel”
Journal of General Physiology、143 巻、377-386 頁、2014 年、査読有り

(3) Fujiwara Y., Nakagawa A., Okamura Y.
“Structure and function of dimeric assembly in voltage-gated H⁺ channel”
Spring-8 Research Frontiers、2012 年度版巻、14-15 頁、2013 年、査読有り

(4) Fujiwara Y., Takeshita K., Nakagawa A., Okamura Y.,
“Structural Characteristics of the Redox Sensing Coiled-coil in the Voltage-gated H⁺ Channel”
Journal of Biological Chemistry、288 巻、17968-17975 頁、2013 年、査読有り

(5) Fujiwara Y., Kurokawa T., Takeshita K., Nakagawa A., Larsson HP., Okamura Y.
“Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H⁺ Channel”
Journal of Physiology、591 巻、627-40 頁、2013 年、査読有り

(6) Fujiwara Y., Takeshita K., Nakagawa A., Okamura Y.

“The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1”
Nature Communications、3 巻、816 頁、2012 年、査読有り

[学会発表] (計 17 件)

(1) 藤原祐一郎、岡村康司
「Voltage Sensing Mechanism in the Voltage-Gated H⁺ Channel」、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 03 月 16 日、鹿児島

(2) 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ネル VSOP/Hv1 の動作原理」、第 91 回日本生理学会大会 (招待講演)、2014 年 03 月 18 日、鹿児島

(3) 藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司
「Long alpha-helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H⁺ Channel」、第 58 回米国生物物理学会大会、2014 年 02 月 19 日、San Francisco (米国)

(4) 竹下浩平、坂田宗平、山下栄樹、藤原祐一郎、川鍋陽、黒川竜紀、大河内善史、松田真、成田宏隆、岡村康司、中川敦史
「X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF VOLTAGE GATED PROTON CHANNEL」、第 58 回米国生物物理学会大会、2014 年 02 月 19 日、San Francisco (米国)

(5) 藤原祐一郎、竹下浩平、中川敦史、岡村康司
「Structural Characteristics of the Redox Sensing Coiled-coil in the Voltage-gated H⁺ Channel」、第 2 回 HD Physiology 国際シンポジウム、2013 年 06 月 28 日～2013 年 06 月 29 日、東京

(6) 藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司
「Continuous α -helices of S4 and coiled-coil form the dimer interface in the voltage-gated H⁺ channel」、第 2 回 HD Physiology 国際シンポジウム、2013 年 06 月 28 日～2013 年 06 月 29 日、東京

(7) 岡村康司、藤原祐一郎、坂田宗平、河合喬文、筒井秀和、大河内善史
「Molecular diversities of voltage sensing: from ion permeation to enzyme」、Neuro2013、2013 年 06 月 20 日、京都

(8) Fujiwara Y., Okamura Y.
「Crystal Structure of AnkyrinG: the Ion

Channel Anchoring Protein」、Neuro2013、2013年06月20日、京都

(9) 藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、小林恵、中川敦史、岡村康司
「Regulatory roles of the dimeric structure in the voltage-gated H⁺ channel」、第90回日本生理学会大会、2013年03月27日、東京

(10) 藤原祐一郎
「電位依存性 H⁺チャネルの二量体化による活性制御とその構造基盤」、第3回神経科学と構造生物学の融合研究(招待講演)、2012年10月04日、大阪

(11) 藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司
「電位依存性 H⁺チャネルのゲーティングと構造基盤」、生理研研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」、2012年09月06日、岡崎

(12) 藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、中川敦史、岡村康司
「電位依存性プロトンチャネルのゲーティングを制御する分子機構」、生理研研究所「温熱生理研究会」(招待講演)、2012年09月04日、岡崎

(13) 藤原祐一郎
「生理学者養成と多分野交流」、第89回日本生理学会大会(招待講演)(招待講演)、2012年3月31日、松本

(14) 藤原祐一郎、黒川竜紀、岡村康司
「3, 4量体型へ人工的にデザインした電位依存性プロトンチャネル」、第89回日本生理学会大会、2012年3月29日、松本

(15) 藤原祐一郎、マルタペレス、黒川竜紀、ピータラルソン、岡村康司
「Gating of Trimerized or Tetramerized Voltage-Gated H⁺ Channels」、第55回生物物理学会大会(米国)、2012年2月29日、サンディエゴ(米国)

(16) 藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、小林恵、中川敦史、岡村康司
「Cytoplasmic Coiled-Coil Mediates the Gating Coupling and the Temperature Sensitivity in the Voltage-gated H⁺ Channel」、HD Physiology 国際シンポジウム、2012年1月21日、東京

(17) 藤原祐一郎、黒川竜紀、竹下浩平、小林恵、中川敦史、岡村康司
「電位依存性プロトンチャネルの2量体会合はチャネルの温度感受性を制御する」、第10回蛋白質科学学会大会(招待講演)(招待講演)、2011年6月9日、大阪

[図書] (計2件)

(1) Fujiwara Y., Okamura Y.
“Temperature sensitive gating of voltage-gated proton channel”、Current Topics in Membranes. vol. 74, “Thermal Sensors” (Edited by León D. Islas and Feng Qin)、Elsevier Inc.、Chapter 8、(掲載予定)、査読有り

(2) 藤原祐一郎、岡村康司
「膜電位センサー」、脳科学辞典、分担執筆電子書籍 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/膜電位センサー>、理化学研究所、2012年、査読有り

[その他]
ホームページ等

(1) <http://physiology.jp/exec/page/page20120517165828/>

(2) <http://physiology.jp/exec/page/stopics84/>

(3) http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/research_highlights/no_67/

(4) http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2012/05/20120509_1

6. 研究組織

(1) 研究代表者
藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 20532980

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: