

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580135

研究課題名(和文) 酵母の新規イオン輸送体の解析とオルガネラ膜のイオン輸送体測定技術の基盤構築

研究課題名(英文) Characterization of novel yeast transporter and improvement of method for measurement of organelle ion transporter

研究代表者

浜本 晋 (Hamamoto, Shin)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10533812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母の液胞膜に局在性を示す陽イオンチャネルYVC1のチャネル活性の測定を酵母巨大化法とオルガネラ膜を用いたパッチクランプ測定技術の併用によって行った。yvc1欠損酵母の液胞膜に高等生物のオルガネラ膜に発現するイオンチャネルを異種発現させることにより、これまで機能解析が困難であったイオンチャネルの機能解析を行った。本研究によって、YVC1の還元剤による活性制御機構を明らかにした。さらに、yvc1欠損酵母を用いることによってヒトのリソソームに発現するTPC2チャネルの機能解析が可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：YVC1 is a major cation channel localized in yeast vacuole membrane, and it is activated by cytoplasmic Ca²⁺. We have applied the patch-clamp technique using enlarged yeast cells to elucidate the regulatory mechanisms of the YVC1-mediated channel activity. We have tested the addition of reducing agent into the buffer corresponding to the cytosolic side. Moreover, we have identified the cysteine crucial for the functional property of the YVC1 channel in the presence of thiol group chemicals. And also we measured the single-channel conductance of both of the wild-type YVC1 channel and serine substituted YVC1 channel. The both channels have consistent conductance 300 pS, which suggested that substitution to serine did not affect to the channel conductance. We examined the effect of inositol phosphate on TPC2 channel expressed in yeast vacuole membrane.

研究分野：生化学

キーワード：イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母のゲノム研究では、全遺伝子産物の15%が膜輸送タンパク質であり、そのうち50%以上がオルガネラ膜に局在すると推測されている。オルガネラ膜に存在する膜輸送系は、細胞形態の維持、有用物質の貯蔵、有害物質の隔離などといった生体活動の維持やストレス応答に必要な不可欠な分子装置である。しかし、酵母細胞はそのサイズが小さいため、イオン輸送体の機能解析に効果的であるパッチクランプ法の適用が困難であった。そのため、オルガネラ膜に局在するイオン輸送タンパク質の直接的計測が可能な新規のイオン輸送体測定技術の開発が求められている。このような状況の中で、申請者は細胞壁合成阻害と浸透圧調製法による酵母や大腸菌の巨大化に成功し、この巨大化細胞を用いたパッチクランプ法によるイオン輸送体の評価方法を改良した。また、酵母では細胞の巨大化に伴った液胞の巨大化が確認され、植物のタバコ液胞膜に局在する K^+ チャンネル遺伝子を酵母に導入発現後に、巨大化液胞を用いたパッチクランプ測定によりチャンネル活性について報告した。

2. 研究の目的

本研究では、酵母液胞膜に局在する陽イオンチャンネルの機能解析と生理的役割の解明をめざした。また、酵母液胞膜を用いた高等生物のオルガネラ膜に局在するイオン輸送体の測定プラットフォームの構築を目的とした。

(1) 哺乳類に普遍的に保存されているTRP(Transient Receptor Potential)チャンネルの原型である酵母 YVC1 チャンネルの機能解析を行った。これまでに YVC1 チャンネルは細胞質の Ca^{2+} や還元剤によって活性化することが報告されているが、それらの作用機序や活性化に関わるアミノ酸残基などは未同定であった。本研究では、YVC1 の還元剤による活性化機構の解明をめざした。

(2) 動物細胞のリソソームに局在する陽イオンチャンネル TPC2 の過剰発現により、細胞内に多くのオートファゴソームが形成され、さらにリソソーム内に高濃度の Ca^{2+} が蓄積することが報告されている。脂質代謝に異常をきたすニーマンピック病の細胞にも TPC2 過剰発現細胞と同様の表現型が現れることから、TPC2 に異常が生じることによってニーマンピック病を発症することが推察されている。しかし、リソソームは非常に小さな細胞内小器官であるため、従来のパッチクランプ法を適用する事が出来ず、リソソーム膜に局在する TPC2 の分子機構の解析は遅れている。本研究では、yvc1 欠損酵母の液胞膜に TPC2 チャンネルを導入発現し、パッチクランプ解析を行った。

(3) モデル植物であるシロイヌナズナの陰イオン輸送体である CLC ファミリーは全てオルガネラ膜に発現していることが知られて

いる。しかし、多くのオルガネラは直接パッチクランプ法に適用させることが困難であるため植物 CLC チャンネルの機能解析は遅れていた。本研究では出芽酵母に形質導入した CLC チャンネルが酵母液胞膜に発現するか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 一倍体出芽酵母の細胞壁を細胞壁分解酵素を用いて除去し、浸透圧を調整した培地を用いて酵母を巨大化培養した。24 時間培養後、酵母を低浸透圧バッファーで処理して細胞を破裂させて液胞を細胞外に露出させた。取り出した液胞を用いてパッチクランプ測定を行った。

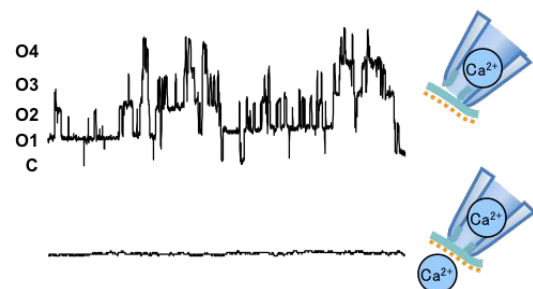
(2) YVC1 の還元剤による活性化機構を明らかにするために、YVC1 に9つ存在するシステイン残基をそれぞれセリンに置換した変異チャンネルを作成し、yvc1 欠損株に導入して発現させた。遺伝子導入した酵母を巨大化させ、液胞を露出させた後、パッチクランプ測定を行った。測定の際に細胞質バッファーに還元剤を添加して YVC1 由来の電流測定を行った。

(3) TPC2 チャンネル遺伝子に GFP 遺伝子を結合させた融合遺伝子を作成して酵母に導入した後に酵母を巨大化処理した。共焦点顕微鏡を用いてチャンネルタンパク質の細胞内局在の解析を行った。さらに、液胞膜を露出させてパッチクランプ実験による機能解析を行った。

(4) CLC チャンネル遺伝子に GFP 遺伝子を結合させた融合遺伝子を作成して酵母に導入した後に細胞内局在を検討した。さらに酵母を巨大化した後に液胞を取り出してパッチクランプ実験を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞質 Ca^{2+} によって YVC1 は活性化するが、液胞内側への Ca^{2+} 添加によって YVC1 の

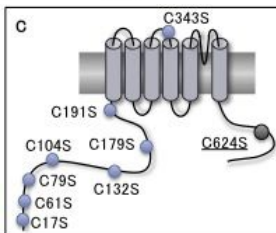
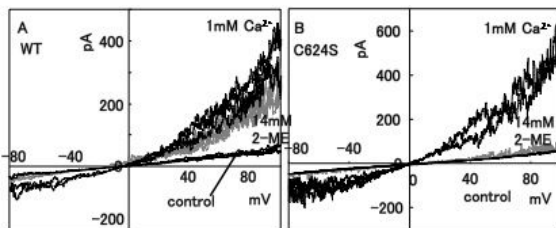


(図1) 液胞内 Ca^{2+} による YVC1 活性の抑制

チャンネル活性は低下した。また、細胞質と液胞の両側への Ca^{2+} 同時添加においてもチャンネルは活性化されなかったことから、液胞内の Ca^{2+} によるチャンネル機能の抑制は細胞質の Ca^{2+} による活性化よりも優位に働くことが判明した(図1)

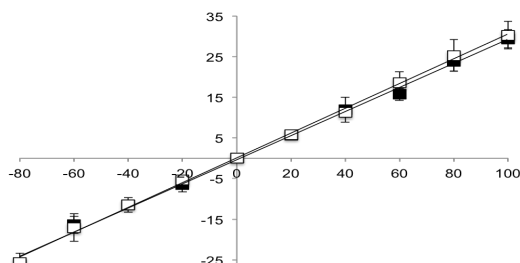
(2) 細胞質に露出する YVC1 の N 末端領域と C 末端領域に存在する 9 つの各 Cys を Ser に置換した変異チャンネルを用いて還元剤に

よる YVC1 の活性化機構を検討した。その結果、C 末端領域の Cys を置換した変異チャネルは、細胞質の Ca^{2+} による活性化は維持されたが、還元剤の添加による活性化は消失した。YVC1 の輸送活性は酸化還元に依存して調節されることが示された (図 2)。



(図 2) 還元剤による YVC1 の活性化機構の解析

野生型 TRPY1 と C 末端のシステインをセリンに置換した変異チャネルのシングルチャネル記録を行ったところ、いずれのチャネルも最大 300pS のコンダクタンスを示した。このことより、還元剤による活性化はチャネルコンダクタンスには影響を与えず、チャネル開確率に作用していることが推察された (図 3)。

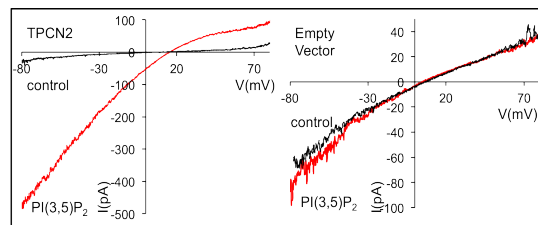


(図 3) 野生型 YVC1 と C 末変異 YVC1 チャネルのシングルチャネルコンダクタンスの比較

(3) シロイヌナズナ CLC-E チャネルは植物細胞においてゴルジ体に局在することが国外の研究グループによってこれまでに報告されている。CLC-E チャネルに GFP タンパク質を融合して酵母に発現させたところ、液胞膜からの GFP シグナルを検出した。この輸送体のチャネル測定を行ったところ本チャネル由来と考えられる陰イオン電流が検出された。

(4) ヒトのリソソームに発現する陽イオンチャネル TPC2 に GFP タンパク質を融合させて酵母に導入したところ、TPC2 チャネルの酵母液胞膜への局在を確認した。次に、TPC2 チャネル活性の解析を巨大化酵母液胞膜を用いて行った。その結果、TPC2 チャネルは K^+ をほとんど透過しなかったが Na^+ と Ca^{2+} に対して高い輸送活性を示した。また、ホスファチジルイノシトールやホスファチジルイノシトールリン酸では活性化しなかった

方でホスファチジルイノシトールニリン酸によって特異的に活性化することが明らかとなった (図 4)。



(図 4) TPC2 チャネルのホスファチジルイノシトールニリン酸による活性化機構の解析

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 2 件)

Boccaccio, A., Scholz-Starke, J., Hamamoto, S., Larisch, N., Festa, M., Gutla, P. V. K., Costa, A., Dietrich, P., Uozumi, N., and Carpaneto, A.

The phosphoinositide PI(3,5)P2 mediates activation of mammalian but not plant TPC proteins: functional expression of endolysosomal channels in yeast and plant cells

Cell. Mol. Life Sci. 査読有, 71, 4275-4283 (2014)

DOI: 10.1007/s00018-014-1623-2

Hamamoto, S., and Uozumi, N.

Organelle-localized potassium transport system in plants

J. Plant Physiol, 査読有, 171, 743-747 (2014)

DOI* 10.1016/j.jplph.2013.09.022

[学会発表](計 6 件)

浜本 晋, 森泰生, 矢部勇, Armando Carpaneto, 魚住信之

酵母の刺激応答性 TRP チャネルと trp 欠損酵母を用いたイオン輸送体測定系の構築

日本農芸化学 2015 年度大会、平成 27 年 3 月 28-30 日、岡山大学 (岡山市)

浜本 晋, 村西敏郎, 齋藤俊也, 馬淵志奈, 矢部勇, Carpaneto, A., 魚住信之

動物・植物のオルガネラ膜イオン輸送体の酵母液胞膜を用いた機能解析

第 66 回日本生物工学会大会、平成 26 年 9 月 9-11 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

Hamamoto, S., Yabe, I., Mori, Y. and Uozumi, N.

Characterization of YVC1 Channel in Yeast Vacuolar Membrane

2012 International Ion Channel Conference,
August 26 (24-27) 2012, Jeju, Korea

Hamamoto, S., Yabe, I., and Uozumi, N.
Characterization of non-selective cation
channel YVC1 in yeast vacuolar membrane
Nagoya Symposium-Frontiers in Structural
Physiology 2013, 1/22-24, Nagoya
University Nagoya, Japan

齋藤俊也、馬淵志奈、浜本晋、矢部勇、魚
住信之
シロイヌナズナ陰イオン輸送体の出芽酵母
を用いた解析系の構築
第 54 回日本生理学会年会、平成 25 年 3 月
21-23 日 岡山大学 (岡山市)

Hamamoto, S., Yabe, I., and Uozumi, N.
Characterization of calcium channel in
yeast vacuolar membrane
International Workshop Plant Membrane
Biology 2013, 3/26-31 Kurashiki
Geibunkan, Kurashiki, Japan

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 晋 (Hamamoto Shin)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：10533812

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：