

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670102

研究課題名(和文) 遺伝子導入による膜電位律動機能付与のための分子ツールキットの開発

研究課題名(英文) Toward developing a molecular toolkit of membrane potential oscillation based on VSP activity

研究代表者

岡村 康司 (OKAMURA, YASUSHI)

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HCNチャネル(mHCN2のホモテトラマー)のPIP2感受性部位について、ツメガエル卵母細胞を用いた発現系で電気生理解析を行った結果、GVカーブの負の電位へのシフトとコンダクタンスの減少を見だし、VSPを用いてHCNチャネルの活性を制御できることを見いだした。この変化は細胞毎のばらつきが大きく、cAMPに感受性のあるHCNチャネルにおいて細胞毎のcAMP量の違いがこの原因であると予測され、cAMP感受性を失う変異体をVSPと共発現をさせた。cAMP感受性を失った変異体ではHCNチャネルの電流量が小さく、HCNチャネルやVSPクローンの選別、および発現系細胞などの変更を検討する必要が生じた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to explore the possibility of developing a molecular toolkit to confer cell autonomous oscillating property of membrane potential based on the molecular mechanisms of phosphoinositide dependence of a combination of distinct ion channels together with expression of voltage-sensing phosphatase that dephosphorylates phosphoinositides. Mouse HCN2 was coexpressed with Ci-VSP RNA in *Xenopus* oocyte. G-V curve was shifted by 20 mV leftward with reduced conductance upon activities of Ci-VSP in a reversible manner. This clearly shows that VSP activity can regulate HCN channel thus providing a possibility that combination of VSP and HCN channel will serve as a component of an autonomous oscillating molecular tool kit. Since a shift of G-V curve was variable from cell to cell probably dependent on sensitivity of HCN channel to a level of cAMP, it is needed to test with cAMP insensitive mutant of HCN channel.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャネル 膜電位

### 1. 研究開始当初の背景

ペースメーカー細胞は、他の細胞や器官の支配から独立してリズムを生み出す細胞であり、我々の体の様々な部位に存在する。脳においては視床や海馬、腹側被蓋野などに存在し、睡眠や記憶の定着、ホルモンの放出などに関わっている。また心臓では自律的に膜電位変化を生み出して拍動をコントロールしたり、消化管平滑筋では、神経支配から独立した自律的な収縮を生みだせることが知られている。これらの活動にはイオンチャンネルが深く関わっており、とくに海馬や VTA および心臓では、過分極により活性化される hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN チャンネル) が重要な役割を担っている。また最近、HCN チャンネルの電位依存性はイノシトールリン脂質の一種である PI(4,5)P<sub>2</sub> により制御されており、PI(4,5)P<sub>2</sub> が枯渇すると HCN チャンネルの電位依存性が過分極側にシフトすることが知られてきた。また我々が発見した VSP は PI(4,5)P<sub>2</sub> を膜電位依存的に制御できる特性をもち、イオンチャンネルから膜電位変化、膜電位変化から VSP 酵素活性、酵素活性から PI(4,5)P<sub>2</sub> のレベルの変化を介して、イオンチャンネル活性の変更に繋がるサイクルが形成される可能性がある。一方、膜電位を過分極側へ戻す働きがあるカリウムチャンネルについては、PI(4,5)P<sub>2</sub> レベルによる制御機構が、構造生物学レベルで明らかになっており、その感受性を戦略的に変更することも可能になりつつある。

### 2. 研究の目的

HCN チャンネル、K チャンネルの活性が PI(4,5)P<sub>2</sub> により正に制御される性質と、電位依存性ホスファターゼ VSP が PI(4,5)P<sub>2</sub> を脱リン酸化する、2つの性質を利用し、人工的に膜電位のオシレーションを誘導する遺伝子ツールキットが構築できるかどうかを、発現系細胞への遺伝子導入に寄って検討する。また同時に PI(4,5)P<sub>2</sub> による HCN チャンネル活性の制御についても基礎的な知見の集積も目指す。

### 3. 研究の方法

ペースメーカー細胞の創成に向け、まずコンポーネントとなる HCN チャンネルと VSP の特性を最適化する。発現系細胞として、ツメガエル卵母細胞発現系を用い、cRNA を試験管内で合成してこれらを微小注入した細胞から、二本微小電極膜電位固定法を用いて計測を行う。

まず、VSP と HCN チャンネルを共発現させ、膜電位固定法による膜電流の定量を行って、VSP による HCN チャンネル活性の変化の誘導が安定に見られるかどうかを検討する。機能解析は、Ci-VSP を用いて脱分極刺激によって PI(4,5)P<sub>2</sub> を枯渇させ、PI(4,5)P<sub>2</sub> の増

減による HCN チャンネルの活性の変化を電流として計測することで行う。VSP を活性化させて PI(4,5)P<sub>2</sub> のレベルを変更する実験について、様々なパルスプロトコルを試行し、安定的に HCN チャンネル活性を制御できる実験条件を探索する。

また、細胞内 cAMP のレベルに依存する HCN チャンネルの活性の変動が、VSP 共発現時に、問題にならないかどうかを検討する。

VSP と HCN チャンネルの共発現によって、VSP 活性が HCN チャンネル活性を安定に制御できる場合には、さらに、HCN チャンネルについてアミノ酸残基の変異を導入し、PI(4,5)P<sub>2</sub> の枯渇に対する応答が異なる変異体を作成する。電位センサーについては voltage clamp fluorometry の方法を用いて調べる。遺伝子導入した細胞の膜電位は、タンパク性の膜電位プローブである mermaid を使用し、蛍光イメージング法で計測し、簡便に多くの種類のコンストラクトを検証するとともに、パッチクランプ法を適用することを試みる。

### 4. 研究成果

HCN チャンネル (マウス由来クローンである mHCN2 のホモテトラマー) の PIP<sub>2</sub> 感受性について、ツメガエル卵母細胞を用いた発現系で電気生理解析を行った。その結果、HCN チャンネルの電流電圧曲線 (I-V カーブ) が負の電位領域へシフトしていた。また、コンダクタンスの減少を見いだした (図参照)。このことは、VSP を強制発現させることによって、遺伝学的に HCN チャンネルの活性を制御できることを示した。

mouse HCN2 + ci vsp WT

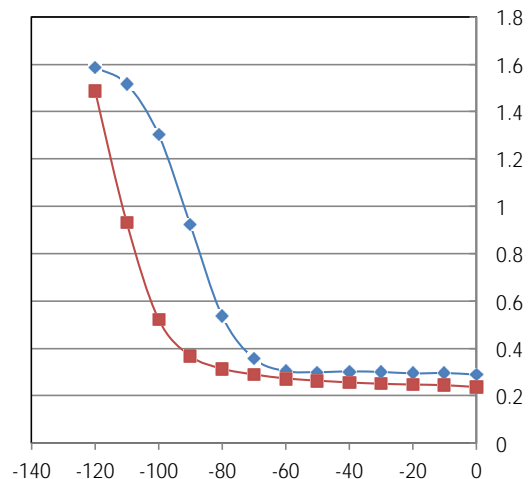


図 1: アフリカツメガエル卵母細胞に、VSP と共発現させた mHCN2 チャンネル電流の、電位依存性の変化を示したものの。四角は、75 mV、1 秒間の脱分極プレパルス刺激により CiVSP の活性を誘導して PIP<sub>2</sub> のレベルを下げた場

合の、HCN チャンネル活性の記録。ダイヤモンドは、脱分極刺激（VSP の活性化）をおこなった場合の記録。HCN チャンネルは、2 秒間の過分極ステップパルスを与え、10 mV おきに過分極ステップを増加させて記録した。

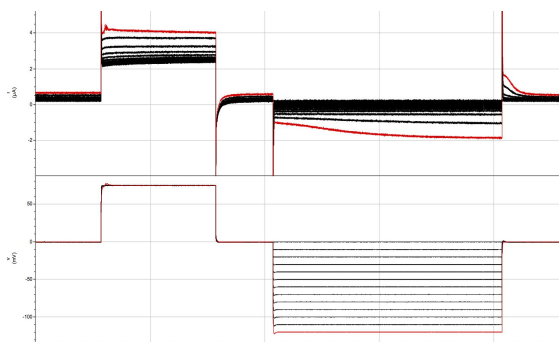


図 2

CiVSP と mHCN2 チャンネルを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞から記録した微小電極膜電位固定法による電流記録。上段が膜電流で外向き電流が上向き。下段が膜電位変化で、下側が過分極。先行する脱分極パルスは、CiVSP の酵素活性を活性化させるために与えている。

この I-V カーブのシフトとコンダクタンスの変化については細胞毎のばらつきが大きく、効率の良い計測が困難であることに直面した。

そこで cAMP による調節能をもつ HCN チャンネルにおいて細胞毎の cAMP 量の違いがこの原因と成っていると予測されたので、cAMP 感受性を失う変異体の cDNA をイタリアの研究グループから供与してもらい、VSP との共発現を試みた。しかし、cAMP 感受性を失った変異体では HCN チャンネル電流量が小さく、VSP の効果の検出が困難であり、HCN チャンネルや VSP クローンの選別、および発現系細胞などの変更を更に検討する必要が生じた。

今後、本研究での目標としていた安定発現細胞株を作成するステージへ進展するには、一過的発現系での詳細な検討が必要であると同時に、数理モデリングなどによる、自律能機能獲得を目指した、戦略的な実験のデザインが必要と考えられる。HCN チャンネル、K チャンネル、VSP の発現量のコントロールと各因子の分子特性を両方勘案して実験を計画することが求められる。これらを再検討しながら、当初の分子ツールキットの創成に向けた次のステップに繋げていく予定である。

## 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 1 件)

Yasushi Okamura, Yuichiro Fujiwara, Sohei Sakata,  
Gating mechanisms of voltage-gated proton channels, *Annu. Rev. Biochem.*, 査読有, 84, 2015, 685-709

[学会発表](計 7 件)

河合喬文、宮田治彦、中西広樹、坂田宗平、有馬大貴、宮脇奈那、大河内善史、渡辺雅彦、崎村建司、佐々木雄彦、伊川正人、岡村康司

マウス精子における電位依存性ホスファターゼの機能、第 93 回日本生理学会大会、2016.3.22-24、北海道札幌市

川鍋 陽、神野 有香、坂田 宗平、岡村康司

膜脂質と相互作用する可能性のある騒動領域による電位依存性ホスファターゼ VSP と PTEN の機能制御、第 93 回日本生理学会大会、2016.3.22-24、北海道札幌市

岡村康司、川鍋陽、坂田宗平、筒井秀和、中川敦史、成田宏隆、鷹野優、神取秀樹  
電位依存性ホスファターゼ VSP の構造基盤の解明、ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術研究領域 CREST 領域会議、2015.11.21、東京都文京区

Yasushi Okamura

How is VSP's enzyme activity activated by intrinsic voltage sensor?, RECI V 5th Spanish Ion Channel Network Meeting, 2015.10.4-6, Barcelona, Spain

Yasushi Okamura,

Molecular mechanisms of voltage sensing phosphatase, VSP, 岡崎統合バイオサイエンスセンター サマースクール 2015 "Development of Biosensing Research", 2015.8.12-13, 愛知県岡崎市

Yasushi Okamura

Fine tuning of neutrophil activities by the voltage-gated proton channel, Hv1, The 5th International Ion Channel Conference, 2015.6.26-28, 中華人民共和国、瀘州

岡村康司

電位センサー機能の多様性と共通原理について、分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」、2015.4.20、愛知県岡崎市

[その他]

ホームページ等

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

## 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