

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670103

研究課題名(和文) 燐光偏光に基づく電位センサー回転運動の定量解析

研究課題名(英文) Analysis of rotational motion of voltage sensor domain based on phosphorescence polarization

研究代表者

筒井 秀和 (TSUTSUI, Hidekazu)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：30392038

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)：電位センサードメインの状態遷移機構を調べる事を目的に、燐光色素の偏光を利用したセグメント回転の時系列観測系を構築した。燐光計測に必要な低酸素下では膜が顕著に脆弱になる事、及び、背景光の寄与を正しく見積る事が困難な事、という二つの主要な課題により、信頼性のある定量計測には至らなかった。今後、全反射照明系を用いて背景光を低減させる、より明るい燐光色素や特異性の高いラベル手法を用いる事で対処できる可能性がある。研究最終年度には、環境応答性の非天然アミノ酸を用いて、電位センサーがグローバルな構造変化を行うことを示した。また、電位センサーの二価カチオン透過性に関する諸性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate the transition mechanism of the voltage-sensor domain, an experimental setup for detecting segment rotation using phosphorescence polarization was built. The reliable quantitative measurements were not reached due to the two major problems that the membrane becomes remarkably fragile under the low oxygen condition required for the phosphorescence measurement and that it is difficult to correctly estimate the contribution of non-specific binding of phosphorescence dye to membrane. In the future, there is a possibility that it can be dealt with by using a brighter phosphorescent dye or a highly specific labeling technique that reduces the background light by using a total reflection illumination system. In the final year of the research period, we showed that the potential sensor performs global structural change by using environmentally responsive unnatural amino acid. We also clarified some unique properties of divalent cation permeability of CatSper voltage-sensor.

研究分野：生理学

キーワード：電位センサードメイン 燐光偏光 膜電位固定

### 1. 研究開始当初の背景

「電位センサードメイン」はイオンチャネル等、膜興奮性を担う多くの分子群に備わる四回膜貫通型(S1-S4)の機能モジュールで、膜電位変化を感知して状態遷移を引き起こし、そのエフェクターの機能を制御する。動作原理を分子レベルで理解する上で、状態遷移機構の詳細を解明する事は必須であるが、その分子同定から四半世紀が経つ現在でも、明確な結論は得られていない。重要な点として、4番目のセグメント(S4)あるいは、S4とS3b(第三セグメントのC末端側の約半分)が脱分極時に回転しながら細胞外方向へと変移するという、Helical ScrewもしくはSliding Helixと呼ばれる概念が提唱されている(Catterall, Annu. Rev. Biochem. 55:953-985, 1986; Guy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 508:508-512, 1986; Catterall, Neuron 67:915-928, 2010)。しかしながらこれは間接的な実験結果に基づくもので、回転する様子が直接的に計測された例はない。またこれとは相反するモデルも提唱されている(Jiang et al., Nature 423:42-48, 2003)。申請者は近年、独自の光学的手法により膜貫通セグメントの動きをリアルタイムに観察する実験を行ってきた。その結果、電位センサードメインの状態遷移は、従来考えられていたような局所的なS4領域の動きだけでなく、少なくともS1の細胞質側から細胞外側方向への動きを伴う、よりグローバルな構造変化を行う、ということを見出してきた(Tsutsui et al., Biophys. J. 105:108-115, 2013)。しなしながらこの計測は定性的なものであり、また回転に関する動きは明らかでなかった。そこで、この研究を進展させ、「時間分解燐光偏光計測」という従来にない計測系を構築し、S4やその他のセグメントの細胞膜に対する相対的な回転運動を直接的、且つ、定量的に明らかにする、という着想に至った。

### 2. 研究の目的

(1) 燐光偏光に基づく、電位センサー回転運動の定量計測を行う装置を構築する。~10マイクロ秒の時間分解能、~4度の角度分解能、数ミリ秒の計測時間を達成する測定系の構築を行う。

(2) 電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインを用い、S4回転運動に関する動態を、直接的・定量的に計測する。S1の構造変化についても、定量的な解析を行う。また、非天然燐光アミノ酸ANAPを用いて、状態遷移時の局所構造変化に関する情報を得る。

### 3. 研究の方法

(1) 電位依存性フォスファターゼ電位センサーの興味箇所にシステインを導入し、マレイミド基を介して燐光色素としてエオシンを導入した。ツメガエル卵母細胞に発現させ、

2 電極膜電位固定実験系に、パルスレーザー、回転機構付きの偏光子、時間ゲート付き光電子増倍管モジュール、等を組み込み、燐光の主要偏光面の時間変化を計測した。

(2) 電位依存性フォスファターゼの興味箇所を、Amber サプレッションコドンを用いて非天然燐光アミノ酸(ANAP)でラベルし、膜電位固定燐光計測により時間依存的な燐光強度変化を検出した。

### 4. 研究成果

(1) 光源にはパルス YAG レーザを用いた。パワーアッテネータ用の偏光子、ファイバー、投影レンズを介して倒立顕微鏡(オリンパスIX71)の背面ポートに入射させた。偏光子を介して線偏光状態とした後、対物レンズに入射した。細胞からの燐光は回転機構付き偏光子を介して時間ゲート付き光電子増倍管モジュールに入射させた。十分な燐光強度と燐光寿命を得るために、グルコース、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼを用いて溶存酸素を低下させた。記録チャンパー周辺は自作した容器で覆い窒素フローを行う事により、環境からの酸素取り込みを低減させた。溶存酸素濃度は、ファイバー式プローブを用いて経時的にモニタした。光電子増倍管モジュールへのゲートタイミング信号とそこからの出力電流、偏光子の回転角、パルス光、膜電位のコマンド制御を同時に行うシステムを構築した。ある時刻における燐光の偏光角度依存性をもとにモデル関数によるフィッティングを行い、主要モーメント角を自動追跡するソフトウェアを開発した。以上の方法で、10マイクロ秒の時間分解能、~4度の角度分解能、数ミリ秒にわたって標識領域の回転を追跡する装置を構築した。

この装置を用いた計測実験の結果、次のような課題が明らかとなった。十分な燐光強度と燐光寿命を得るために溶存酸素濃度を低下させ、尚且つ、通常30分程度の繰り返し計測による信号積算が必要である。このような低酸素下での長時間の膜電位固定実験の報告はこれまでほとんどなかったが、多くの細胞で時間とともにリーク電流が増え、膜が顕著なダメージを受けることが分かった。又、エオシンマレイミドでシステイン残基をラベルする際に、無視できない量の非特異的吸着が生じた。これは燐光信号のベースラインとなり偏光回転を見かけ上低下させ、定量計測を難しくしてしまう。画像解析による検討の結果、非特異的吸着の7割以上はビテリン膜との結合であり、細胞膜脂質や膜蛋白質ではないことが分かった。ビテリンの除去は原理的には可能であるものの、前述した低酸素環境下における膜の健全性をさらに悪化させてしまい、計測を困難にした。これらの諸問題により、研究期間内に十分に信頼性のある定量計測を行う事には至らなかったが、より明るい燐光色素や特異性の高いラベル手

法を用いる、全反射照明により背景光を低減させる事などにより適切に対処できる可能性がある。

(2) 電位センサーの状態遷移機構に関して、「S4のみが局所的な構造変化を引き起こす」のか、「センサー全体がよりグローバルな構造変化を引き起こす」という相対するモデルが提唱されている。これはS4の回転運動と同様に本質的な問題として捉えられている。2013年に我々が発表した結果は、電位センサーN末に繋いだ蛋白質の光学レポータから状態遷移に付随する光学信号を検出したもので、後者を支持していた。これに対して2014年にPerozoのグループから発表された電位センサードメイン変異体の結晶構造比較の結果(Li et al., Nat. Struct Mol Biol. 2014)は後者を支持していた。ただし、これらの計測では、蛋白質レポータが電位センサーの機能を干渉する可能性や、非生理的な結晶化条件がもたらす影響が必ずしも明らかではなかった。局所環境応答性の非天然蛍光アミノ酸(ANAP)をアンバーサプレッションコドンを用いて電位センサーの各部位に導入し、膜電位固定実験と組み合わせ、状態遷移時の蛍光変化をミリ秒の時間分解能で光学計測した。その結果、S1等などにおける結晶構造比較では静的であると考えられる残基からもロバストは信号が発生する事を明らかにした。即ち、本研究の結果は、状態遷移はS1を含むよりグローバルな構造変化を伴うとする概念を支持するものであった。

#### 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 8 件)

1. Colline Sanchez, Christine Berthier, Bruno Allard, Jimmy Perrot, Clément Bouvard, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura, and Vincent Jacquemond."Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane voltage in muscle with a FRET biosensor" Journal of General Physiology (2018) in press (査読有)
2. Arima H, Tsutsui H, Okamura Y. Conservation of the Ca<sup>2+</sup>-permeability through the voltage sensor domain of mammalian CatSper subunit channels, Channels (2018) in press (査読有)
3. Arima H, Tsutsui H, Sakamoto A, Yoshida M, Okamura Y. Induction of divalent cation permeability by heterologous expression of a voltage

sensor domain. Biochim Biophys Acta. 2018 May;1860(5):981-990. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.01.004. (査読有)

4. Inagaki S, Tsutsui H, Suzuki K, Agetsuma M, Arai Y, Jinno Y, Bai G, Daniels MJ, Okamura Y, Matsuda T, Nagai T. Genetically encoded bioluminescent voltage indicator for multi-purpose use in wide range of bioimaging. Sci Rep. 2017 Feb 13;7:42398. doi: 10.1038/srep42398. (査読有)
  5. 河合喬文・筒井秀和・岡村康司、電位センサードメインを用いた膜電位プローブの進歩. 生体の科学 Vol68 No5 2017 9-10月号 (査読無し)
  6. Jinno, Y., Shoda, K., Rial-Verde, E., Yuste, R., Miyawaki, A., \*Tsutsui, H. Engineering a genetically-encoded SHG chromophore by electrostatic targeting to the membrane. Front Mol Neurosci. 2014, 7:93. (査読有)
  7. Tsutsui, H., Y. Jinno, A. Tomita, Y. Okamura. Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 2014, 1838, 1730-1737.doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.002. (査読有)
  8. Mutua, J, Jinno, Y, Sakata S, Okochi Y, Ueno S, Tsutsui H, Kawai T, Iwao Y, Okamura Y, Functional diversity of voltage sensing phosphatases in two urodele amphibians, Physiological Reports, 2014, Vol. 2, no. e12061. doi: 10.14814/phy2.12061 (査読有)
- [学会発表](計 12 件)
1. Hidekazu Tsutsui, Artificial photoconvertible proteins: engineering, mechanism and in vivo crystallization, ivMX2018, Synchrotron SOLEIL, France
  2. Hiroki Arima, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura, Identification of Ca<sup>2+</sup>-permeable voltage sensor domain and its possible application to a novel optogenetic tool, 光操作研究会, 2017
  3. Satoshi Kurok , Takamasa Yoshida ,

- Hidekazu Tsutsui ,Takayuki Michikawa , Mizuho Iwama , Atsushi Miyawaki , Shigeyoshi Itoharu, Multisensory integration via optical slow wave in excitatory neuronal networks of association cortex, 第40回日本神経科学学会大会, 2017年7月
4. Yoshifumi Okochi, Tsutsui Hidekazu and Yasushi Okamura, Measurement of membrane potential change in phagosome of phagocytes, 第95日本生理学大会, 2017年
  5. Colline Sanchez, Christine Berthier, Bruno Allard, Jimmy Perrot, Clment Bouvard, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura and Vincent Jacquemond, Targeting a voltage-sensitive fluorescence biosensor to the sarcoplasmic reticulum membrane of skeletal muscle fibers, 45th European Muscle Conference, Montpellier, France, 2016年09月
  6. Hidekazu Tsutsui, Cellular voltage and crystals visualized with fluorescence protein, CFC seminar, KIST, Korea, 2016年10月19日
  7. Hidekazu Tsutsui, Cellular voltage and crystals visualized with fluorescence protein, 3rd Malaysia-Japan Joint Symposium on Nanobiosensors, Universiti Kebangsaan Malaysia, 2016
  8. Hiroki Arima, Hidekazu Tsutsui and Yasushi Okamura, Functional analysis of the calcium-permeable voltage sensor domain, 第94回日本生理学会大会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市) 2017年3月
  9. 筒井・神野・坂田・岡村, 蛍光性非天然アミノ酸 Anap で検出された電位センサーの動き, 第93回日本生理学会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2016年03月
  10. Hiroki Arima, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura, CatSper has a calcium-permeable voltage sensor domain, 5th Spanish Ion Channel Network Meeting (RECI V), Barcelona, Spain, 2015年10月04日
  11. 筒井秀和, 神経細胞の興奮を可視化する, 第23回日本バイオイメーシング学会学術集会(招待講演), 2014年09月04日, 大阪大学(大阪府、吹田市)
  12. 有馬大貴・筒井秀和・岡村康司, 発現系を用いた CatSper チャネルの機能解析, 第120日本解剖学会総会全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市) 2015年03月21日
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 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 0 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  
     筒井 秀和 (TSUTSUI, Hidekazu)  
     北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授:
- 研究者番号: 30392038