

## 電位センサードメイン蛋白群を基盤とする新たな膜電位シグナルの解明

Mechanisms and physiological roles of electro-chemical Coupling mediated by voltage-sensor domain proteins

岡村 康司 (OKAMURA YASUSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



### 研究の概要

蛋白モジュールとしての電位センサーに着目し、電位依存性ホスファターゼや電位依存性プロトンチャネルなどの電位センサードメインを含むシグナル複合体の動作原理を明らかにすると共に、ノックアウト動物を作成して解析を行う。また電位センサードメイン蛋白由来の電位プローブを作成して膜電位変化を計測し、膜電位シグナルをデコードする仕組みを解明する。

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：生体膜、チャネル、トランスポーター、能動輸送

### 1. 研究開始当初の背景

電位センサーは神経や筋などにおいて、電気的興奮を担う電位依存性イオンチャネルの重要な仕組みとして研究されてきた。我々は、これまで電位センサーが従来の電位依存性イオンチャネルに限定されるものでなく蛋白モジュールとして多様な分子機能に使われていることを示し、これにより電位センサーがこれまでの「イオンチャネルの一部」という立場から「膜電位：化学シグナル共役複合体中のセンサー」という広い概念として再考されるようになってきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これら電位センサードメイン蛋白を発現する細胞や組織から膜電位変化を計測するとともに、電位センサードメインを含むシグナル複合体の構築と機能を明らかにする。これにより生体が電気信号と化学信号を変換する仕組みとその生理的役割を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

おもに3つのアプローチにより研究を進める。

(1) 電位センサードメイン蛋白（電位依存性ホスファターゼ VSP= voltage sensing phosphatase、電位依存性プロトンチャネル VSOP1またはHv、機能未定分子VSOP2）などについてタンパク分子の動作機構を、電気生理学、生化学、イメージングなどの手法を駆使して解析する。

(2) Mermaidは、カタウレイボヤ由来電位依存性ホスファターゼVSPの電位センサードメインと珊瑚由来の蛍光蛋白FRETペア分子をつなぎ合わせた人工的な蛋白で、膜電位依存的強度変化を示す膜電位蛍光プローブ蛋白である。電位センサードメイン蛋白の動作原理の解明により得られる知見に基づいて、更にmermaidを改良し、特性の優れた膜電位感受性蛍光プローブ分子の創成を試みる。

(3) 各電位センサードメイン蛋白の遺伝子ノックアウトマウスを作成し、免疫機能、神経機能、生殖機能などでの電位センサードメイン蛋白の生理的役割を明らかにする。また、電位センサードメイン蛋白を元にして設計され、改良された蛍光プローブ分子を用いて、電位センサードメイン蛋白を発現する血液細胞、ニューロンなどから膜電位変化の計測を試みる。

### 4. これまでの成果

VSPについては、生細胞において酵素活性を定量的に推定する手法を確立し、電位センサーと酵素のカップリング様式を明らかにし、電位センサーの可動範囲の膜電位すべてで、酵素活性が漸増することを見出した。酵素領域のX線結晶構造に基づいて、基質特異性の分子機構を明らかにした。PI(3,4)P<sub>2</sub>のイメージングを行ったところ、この基質特異性が、膜電位レベルに応じて変化する可能性が考

えられた。VSPノックアウトマウスを作成した。

VSOP1 については、ダイマー化の分子構造基盤であるコイルドコイル領域のX線立体構造を解明し、協調的ゲーティングの分子機構を明らかにした。プロトン透過機構について、イメージング、電気生理実験、膜トポロジーアッセイを組み合わせて解析し、S4領域の細胞内側半分が、イオン透過には必須ではないことを明らかにし、オメガ電流仮説を支持せず、電位依存性イオンチャネルの電位センサー変異などにより生じることが知られているオメガ電流とは、メカニズムが異なることが示された。また、膜トポロジー解析から、S1のアスパラギン酸が親水性環境にあることを見出した。VSOP1 gene trap ノックアウトマウスを解析し、好中球における活性酸素の産生の調節機構を明らかにした。また、細胞の運動性にも VSOP1 が関わる可能性を示した。VSOP1 loxP マウスを作成し、CAG-Cre マウスと掛け合わせた。

VSOP2 については、単純ノックアウトマウスの作成を行った。

膜電位プローブとして mermaid を用い、ゼブラフィッシュ心筋の電気活動を個体レベルで、リアルタイムで可視化することに成功した。アレルギー薬で、不整脈を来す副作用のため、医療使用が禁止されたアステミゾールを投与した場合の電気興奮の伝搬の異常を明らかにした。

Mermaid の改変を進め、分子特性を向上させることに成功した。

#### 5. 今後の計画

各電位センサードメイン蛋白の分子動作原理の解明を進める。特に VSP の基質特異性に着目し、既に得られた立体構造に基づいた解析を進める。VSOP1 については、プロトン透過と膜電位センサー機能を更に明らかにする。ノックアウト動物を用いた、電位センサードメイン蛋白の生理機能、病態の解析も更に進める。膜電位プローブは、更にイメージング技術への応用を進め、膜電位計測での有用性を確認すると共に、電位センサードメイン蛋白を発現する細胞での、膜電位変化を計測する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A & Okamura Y. The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel Hv1., **Nature Communications**, in press.

Ratzan WJ, Evsikov AV, Okamura Y, Jaffe LA. (2011) Voltage sensitive phosphoinositide phosphatases of Xenopus: their tissue distribution and voltage dependence. **J Cell Physiol.**, 226(11):2740-6.

Matsuda M, Takeshita K, Kurokawa T, Sakata S, Suzuki M, Yamashita E, Okamura Y, Nakagawa A (2011) Crystal structure of the cytoplasmic PTEN-like region of Ci-VSP provides insight into substrate specificity and redox regulation of the phosphoinositide phosphatase activity. **J. Biol. Chem.**, 286(26):23368-77.

Sakata S, Hossain MI, Okamura Y (2011) Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. **J. Physiol.**, 589(11):2687-705.

Okamura Y & Dixon JE (2011) Voltage-sensing phosphatase: its molecular relationship with PTEN. **Physiology**, 26(1):6-13.

El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y & Demaurex N (2010), VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification **J. Exp. Med.** 207(1):129-39.

Tsutsui H, Higashijima S, Miyawaki A & Okamura Y (2010), Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. **J. Physiol.** 588(12):2017-21.

Sakata S, Kurokawa T, Norholm MH, Takagi M, Okochi Y, von Heijne G & Okamura Y (2010), Functionality of the voltage-gated proton channel truncated in S4 **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107(5):2313-8.

ホームページ等

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