



Title	電位依存性プロトンチャネルに見る膜電位センサーの謎：細胞膜中に存在する電荷
Author(s)	黒川, 竜紀; 岡村, 康司
Citation	生物物理. 2011, 51(2), p. 072-075
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23166
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

総説

電位依存性プロトンチャネルに見る膜電位センサーの謎: 細胞膜中に存在する電荷

黒川竜紀, 岡村康司 大阪大学大学院医学系研究科

The voltage-sensor domain (VSD) is the key module for voltage sensing of transmembrane proteins. Recently, voltage-sensor only protein (VSOP) that contains a single VSD but no pore domain was discovered and functions as the voltage-gated proton channel. The fourth transmembrane segment (S4) of VSOP contains three arginines (R1, R2, R3). We found that VSOP truncated just downstream of R2 retains most channel properties. Two assays, PEGylation-protection assay and membrane insertion assay, showed that S4 inserts into the membrane, even if it is truncated between R2 and R3. These findings provide important clues to the molecular mechanism of voltage-gated proton channel.

voltage sensor / voltage-gated proton channel / topology

1. はじめに

神経細胞や筋の電気活動を司る電位依存性イオンチャネルは、電位センサー（S1-S4）とポア領域（S5-S6）から構成される（図1）。膜電位変化を電位センサーが感知するとそのシグナルがポア領域に伝達され、イオンの透過が制御されると考えられている¹⁾。長い間、この電位センサーをもつ分子は、電位依存性イオンチャネルのみだと考えられてきた。しかし近年、電位センサーをもつがポア領域をもたない新しい電位依存性タンパク質が2つ発見された。1つめは、ポア領域の代わりにホスファターゼをもつ電位感受性ホスファターゼVSPであり、このタンパク質は膜電位の変化に応じて、酵素の働きを調節することができる²⁾。もう1つは電位センサー領域のみをもち、一般的なポア領域をもたない新しいタンパク質voltage sensor only protein (VSOP) であり（図1）、電位依存性プロトンチャネルとして機能する（ヒトの相同遺伝子Hv1も同時に発見された）^{3), 4)}。電位依存性プロトンチャネルは、長い間分子実体は同定されていなかったものの、血球細胞などからの電気生理学的解析によりその性質が詳しく調べられてきた⁵⁾。VSOPが同定された後は、ノックアウトマウスの解析などにより、白血球が侵入した細菌などを殺菌するときの活性酸素種の生産にかかわったり^{6), 7)}、食細胞内側のpHを一定

に保つために重要であること⁸⁾がわかっている。また、VSOPと他のチャネルの電位センサー領域との相同意は高いため、VSOPの動作原理を明らかにすることは、すべての電位依存性イオンチャネルに共通する仕組みを明らかにすることにつながると期待される。本稿では、最近われわれが行った電位依存性プロトンチャネルVSOPの構造的な特徴に関する研究を中心に紹介する。

2. 電位センサーの鍵を握るS4の特徴

電位依存性イオンチャネルに共通する特徴として、電位センサーの第4番目の膜貫通領域（S4 = Segment 4）には、陽性の電荷をもつアミノ酸残基（アルギニン残基かリジン残基）が2つの疎水性アミノ酸残基にはさまれながら規則的に並ぶ構造をもっている

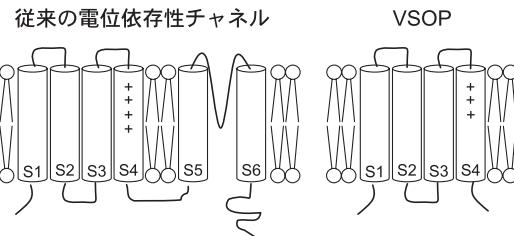


図1
電位依存性タンパク質の構造

Mechanisms of Voltage Sensor Domain and Voltage-Gated Proton Channel

Tatsuki KUROKAWA and Yasushi OKAMURA
Graduate School of Medicine, Osaka University

(図2a). この正電荷の数を減らすと、チャネルの開口の電位依存性が弱くなることなどから⁹⁾、S4は膜電位を感じるのに重要だと考えられている。S4は膜電位を感じた後、構造変化を起こしチャネルのポア(図1のS5からS6にかけての部分)を開くと考えられており、実際に膜電位に応じてS4が動くことが多くの実験で示されている¹⁰⁾⁻¹²⁾。

近年、電位依存性K⁺チャネルの詳細な3次元結晶構造が決定され、S4の正電荷を有するアミノ酸残基が他の膜貫通ヘリックス(S1-S3)の負電荷を有するアミノ酸残基もしくは細胞膜のリン脂質の親水性部分と相互作用することにより、細胞膜内で安定化していることが示された¹³⁾。しかし、解かれた構造は活性化状態の構造であり、具体的に膜電位変化に伴ってどのように構造変化をするのかは、いくつかのモデルが提唱されているが、まだ論争が続いている。

3. VSOPのS4の役割

他の電位依存性イオンチャネルの電位センサーと同じように、VSOPのS4も正電荷をもつアミノ酸残基が規則的に並ぶ特徴的な構造をもっている(マウス由来のVSOPではR201, R204, R207)(図2a)。このアルギニン残基を中性のアミノ酸残基に置換すると、電位依存性が変化することから、これら正電荷のアミノ酸残基は膜電位感知に重要であると考えられる^{3), 4)}。著者らは、S4のどの領域がチャネル活性に重要であるかを調べるために、S4のC末端側から段々と短くする変異体を作製し、ホールセル(全細胞)パッチクランプ法を用いて電流記録を行った(図2)。すると驚いたことに206番目のアラニンまで削った変異体(A206stop)でも、電流を記録することができた(図2b, c)¹⁴⁾。また、ホールセルパッチクランプ法と蛍光pH指示薬を用いて、細胞内pHをイメージングしたところ、脱分極にともない細胞内pHが上昇していた。すなわちA206stopはプロトンチャネル活性を維持していることが確認された。これらから、VSOPのS4において、205番目のバリン残基以降の部分はチャネル活性には必要ないことが示唆された。

4. PEGylation-protection法を用いた膜トポロジー解析

次に、A206stopのS4の残りの部分が膜に挿入されているのかを調べるために、PEGylation-protection法を用いることにした¹⁵⁾。この方法では、AMSとmal-PEGの2種類のシステイン結合試薬を使う。mal-PEGは、

システィンに結合できるmaleimideと分子量が約5kDaのポリエチレングリコール(PEG)が組み合ってきたもので、バンドのシフトを見ることで、特定のアミノ酸への結合が確認できる。AMSは分子量が約500Daの小さい物質で、狭い隙間にも入り込むことができる。この方法では、水溶液中のシステインはAMSに結合できることを利用して、AMSの結合の有無により、目的のシステインが水溶液環境にあるかないかを特定できる。この方法は、既に大腸菌や無細胞タンパク質合成系などで用いられてきたが^{15), 16)}、培養細胞などでは使われたことはなかった。そこで、VSOPを発現させた培養細胞で先行実験を行った(図3)。まずVSOPを発現させた培養細胞にAMSを加える。AMSは溶液環境中のシステイン(P125C, C245)には結合することができるが、細胞膜内など水溶液環境でないシステイン(C103)には結合することができない。その後、強い界面活性剤で可溶化後、mal-PEGを加えると、mal-PEGはAMSが結合していないシステイン、つまり、水溶液環境でないシステインに結合することができるが、すでにAMSが

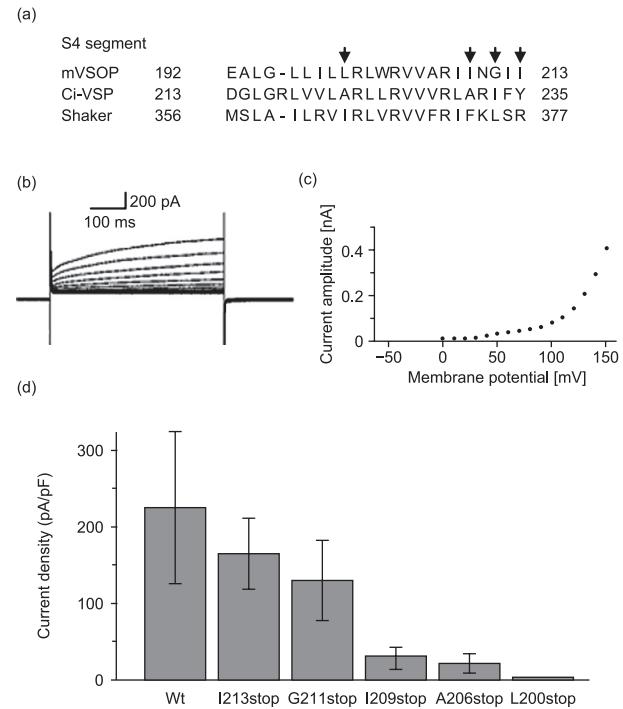


図2

(a) 電位依存性タンパク質のS4のアミノ酸配列比較。mVSOP, Ci-VSP(電位感受性ホスファターゼ), Shaker(ショウジョウバエ)の電位依存性K⁺チャネル。矢印の位置にストップコドンを導入した。(b) A206stopの電流記録。各膜電位のときの電流を重ねている。(c) A206stopの電流量と膜電位をプロットしたもの。(d) S4を削ったVSOPの電流の大きさを示す。縦軸は電流量を膜容量で割った値。膜容量は細胞膜面積に比例する。(文献14より改変して転載)

結合しているシステインには結合できない。ウェスタンプロットを行うと、mal-PEG が結合しているタンパク質は、バンドシフトが起こることにより確認できる。実験系が確立したところで、次にさまざまな部位のアミノ酸残基をシステインに置換したVSOPについて実験を行った(図4)。内在的にあるシステインをセリンに置換したVSOPをもととして、H190から

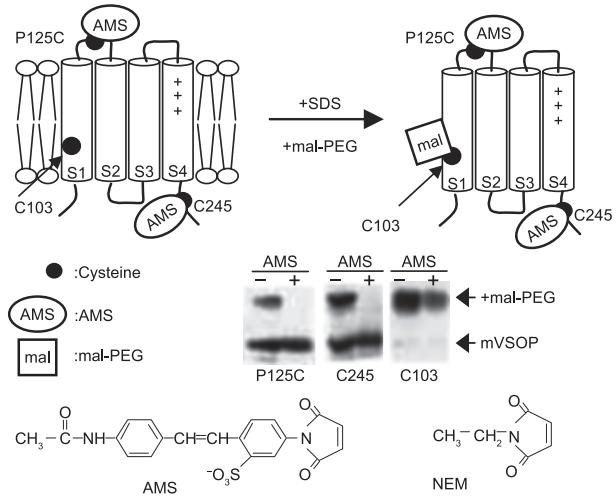


図3
PEGylation-protection法の予備実験。黒丸で示した位置にシステインを導入した。AMSは溶液環境中のシステインのみ(P125C, C245)結合できる。SDSで可溶化後mal-PEGを加えると、AMSが結合していないシステイン(C103)のみ結合する。mal-PEGが結合するとmVSOPの位置から+mal-PEGの位置にシフトする。

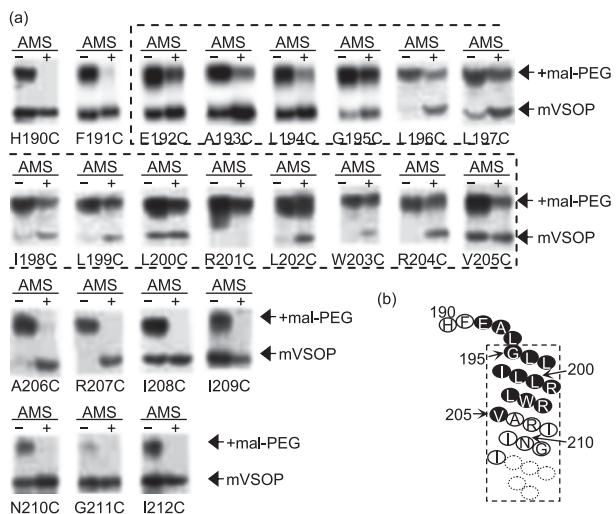


図4
(a) PEGylation-protection法の結果。mal-PEGが結合するとmVSOPの位置から+mal-PEGの位置にシフトする。E192からV205ではAMS添加時に+mal-PEGの位置にバンドがシフトしているのでAMSが結合できない、つまり水溶液環境でないことがわかる。(b) AMSが結合できるシステインを白丸、AMSが結合できない位置を黒丸で示す。点線は推定されるS4の膜貫通領域。(文献14より改変して転載)

I212までのそれぞれの部位にシステインを導入した。H190とF191はバンドシフトが見られなかったことより、AMSが結合していることがわかる。E192からL194では、バンドシフトが起こっているが、シフトしているバンドの強度は薄いことから、この領域ではAMSが結合している状態と結合していない状態が混在しており、AMSが結合している状態の方が多いため、バンドの強度が薄くなっていると考えられる。G195からV205では明確にバンドシフトを起こしている割合が多いため、これらの領域はAMSが結合できない、つまり細胞膜に埋まっている領域である。A206からI212ではバンドシフトが起こらないため、これらの領域ではAMSが結合できる、つまり水環境中に存在する(図4b)。次にA206stop変異体でも同様な実験を行うと、L200からR204についてバンドシフトが確認できたことから、A206stopのS4は膜に組み込まれていることが示された¹⁴⁾。

5. 無細胞タンパク質合成系を用いた膜への組み込み効率の算出

さらに、Stockholm大学のvon Heijneと共同研究を行い、彼らが独自に開発した方法¹⁷⁾を用いてS4の小胞体膜への組み込み効率を求めた¹⁴⁾。この方法では、まず2回膜貫通のモデルタンパク質にVSOPのS4のみを組み込む。このとき、図5aのようにS4が始まる前の部分に2ヵ所の糖鎖修飾部位(G1とG2)を導入する。糖鎖修飾部位が細胞膜から少なくとも14アミノ酸残基離れていないと糖鎖修飾が起こらないの

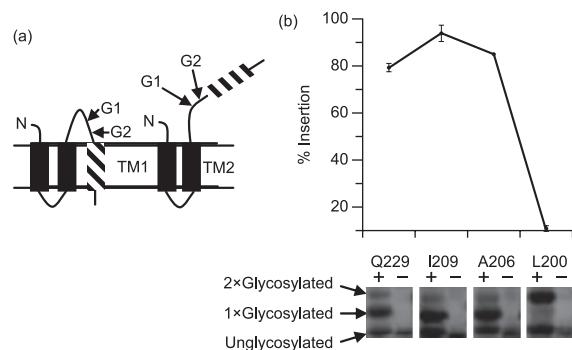


図5
S4における膜への組み込み効率。(a) 糖鎖修飾部位が細胞膜に近すぎると糖鎖修飾は起こらない。S4が膜に埋まるとG1(糖鎖修飾部位)の位置のみ糖鎖が付加されるが、膜に組み込まれないとときは、G1とG2両方とも糖鎖が付加される。(b) 糖鎖の付加をバンドの濃さより比率を求め、組み込み効率を計算した。表示しているアミノ酸残基の位置にストップコドンを導入している。(文献14より改変して転載)

で、S4 が膜に組み込まれている場合は、G2 の位置では糖鎖修飾が起こらない¹⁸⁾。このタンパク質を小胞体存在下で無細胞タンパク質合成系を用いて合成したのち、SDS-PAGE を行うと、糖鎖修飾の数により膜への組み込み効率を算出することができる。この方法で調べた結果、I209stop と A206stop では 80% 以上膜に組み込まれていたが、L200stop は膜に組み込まれていなかった（図 5b）¹⁴⁾。

以上をまとめると、VSOP の S4 の C 末端側がなくてもチャネル活性は見られることが示された。このことは、電位センサーの働きとプロトン透過経路のいずれにも A206 より下流の部分が必須でないことを示している。また、S4 は予想外に細胞膜の中に埋もれている領域は短いことを示しており、脂質 2 重膜の厚みよりかなり薄い厚さに電場がかかることを示す最近の膜電位依存性 K⁺ チャネルでの説とも矛盾しない知見である¹⁹⁾。これらの発見は、今後電位依存性プロトンチャネルにおける膜電位感知やプロトン透過の分子機構の解明に重要な糸口になると考えられる。

6. 今後の展開

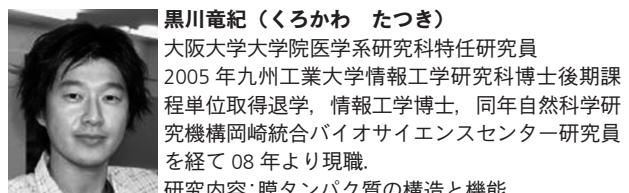
VSOP は、電位依存性イオンチャネルでありながら、一般的なポア領域がないという特徴的な構造だけでなく、機能的な面でも非常に興味深いタンパク質である。近年電位依存性プロトンチャネルに関する論文が多く出てきたが^{6-8), 14, 20)}、まだまだ謎が多い。VSOP は、電位センサーのみで機能すること、動物細胞で効率よく発現すること、分子量が他の電位依存性タンパク質に比べ小さいことなど、電位センサーの謎を解明する優れたモデルになるタンパク質であり、プロトン輸送の分子機構の解明とも合わせてさらなる研究の進展が期待される。また、今回適用した膜トポロジーを調べる手法は、さまざまな膜タンパク質の解析に広く適用できると考えられる。

謝 辞

本稿で紹介した内容は、坂田宗平博士（大阪大学）、高木正浩氏（生理学研究所）、大河内善史博士（大阪大学）、Morten H. H. Nørholm 博士（Stockholm University），Gunnar von Heijne 博士（Stockholm University）との研究で得られたものである。

文 献

- 1) Bezanilla, F. (2000) *Physiol. Rev.* **80**, 555-592.
- 2) Murata, Y. *et al.* (2005) *Nature* **435**, 1239-1243.
- 3) Sasaki, M. *et al.* (2006) *Science* **312**, 589-592.
- 4) Ramsey, I. S. *et al.* (2006) *Nature* **440**, 1213-1216.
- 5) Decoursey, T. E. (2003) *Physiol. Rev.* **83**, 475-579.
- 6) Okochi, Y. *et al.* (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 274-279.
- 7) Ramsey, I. S. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 7642-7647.
- 8) El Chemaly, A. *et al.* (2010) *J. Exp. Med.* **207**, 129-139.
- 9) Aggarwal, S. K., MacKinnon, R. (1996) *Neuron* **16**, 1169-1177.
- 10) Yang, N. *et al.* (1996) *Neuron* **16**, 113-122.
- 11) Mannuzzu, L. M. *et al.* (1996) *Science* **271**, 213-216.
- 12) Horn, R. *et al.* (2000) *J. Gen. Physiol.* **116**, 461-476.
- 13) Long, S. B. *et al.* (2007) *Nature* **450**, 376-382.
- 14) Sakata, S. *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2313-2318.
- 15) Lu, J., Deutsch, C. (2001) *Biochemistry* **40**, 13288-13301.
- 16) Neale, E. J. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 37597-37604.
- 17) Hessa, T. *et al.* (2005) *Nature* **433**, 377-381.
- 18) Nilsson, I. *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* **284**, 1165-1175.
- 19) Chanda, B., Bezanilla, F. (2008) *Neuron* **57**, 345-351.
- 20) Koch, H. P. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9111-9116.



黒川竜紀

黒川竜紀 (くろかわ たつき)

大阪大学大学院医学系研究科特任研究員
2005 年九州工業大学情報工学研究科博士後期課程
単位取得退学、情報工学博士、同年自然科学研究機
構岡崎統合バイオサイエンスセンター研究員
を経て 08 年より現職。

研究内容: 膜タンパク質の構造と機能
連絡先: 〒 567-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
E-mail: tkurokawa@phys2.med.osaka-u.ac.jp
URL: <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/index.html>



岡村康司

岡村康司 (おかむら やすし)

大阪大学大学院医学系研究科教授（生命機能研究科兼任）

東京大学医学部卒、東京大学医学部助手、ニューヨーク州立大学ストーンブルック校客員研究員、産業技術総合研究所主任研究員、岡崎統合バイオサイエンスセンター教授を経て、現職。

研究内容: 電位センサー蛋白の動作原理と生理機能
連絡先: 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
E-mail: yokamura@phys2.med.osaka-u.ac.jp