

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

1.

# 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

## 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<sup>1)</sup>. 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<sup>2)</sup>. 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)<sup>3),4)</sup>. 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<sup>5)</sup>. 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<sup>6),7)</sup>, 食細胞内側の pH を一定

Mechanisms of Voltage Sensor Domain and Voltage-Gated Proton Channel Tatsuki KUROKAWA and Yasushi OKAMURA Graduate School of Medicine, Osaka University

に保つために重要であること<sup>8)</sup> 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性は高いため,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

(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<sup>9)</sup>, S4 は膜電 位を感知するのに重要だと考えられている. S4 は膜 電位を感知した後,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<sup>10)-12)</sup>.

近年,電位依存性 K<sup>+</sup> 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 が他の膜貫通へリックス(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<sup>13)</sup>.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.

## VSOP の S4 の役割

3.

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<sup>3),4)</sup>. 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)<sup>14)</sup>. 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,PEGylation-protection法を 用いることにした<sup>15)</sup>.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,

システインに結合できる maleimide と分子量が約 5kDaのポリエチレングリコール (PEG) が組み合わ さったもので、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 500 Da 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<sup>15),16)</sup>,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,水溶液環境中でないシ ステインに結合することができるが、すでに AMS が



#### 凶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<sup>+</sup> 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 ンブロットを行うと, 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<sup>14)</sup>.

# 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<sup>17)</sup>を用いて S4 の小 胞体膜への組み込み効率を求めた<sup>14)</sup>. 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 7 ミノ酸残基離れていないと糖鎖修飾が起こらないの



#### 🗵 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 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<sup>18)</sup>.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)<sup>14)</sup>.

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という最近の膜電 位依存性 K<sup>+</sup> チャネルでの説とも矛盾しない知見であ る<sup>19)</sup>.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.

### 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<sup>6,8,14,20)</sup>、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

6.

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.
- Okochi, Y. et al. (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 274-279.
- 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(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

黒川竜紀



**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)

URL: http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/

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

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ニー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

岡村康司

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