OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Induction of divalent cation permeability by heterologous expression of a voltage sensor domain
Author(s)	有馬, 大貴
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69383
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）有馬　大貴

	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主　査	大阪大学教授	岡村康司
副　査	大阪大学教授	金井好克
副　査	大阪大学教授	平川正人

論文審査の結果の要旨

電位センサードメインは電位依存性イオンチャネルに特徴的に見られるタンパク質ドメインであり膜電位変化に応じてイオン透過路の開閉を制御する。これまでに電位センサードメインそのものがイオン透過性を示す例が知られてきた。ナトリウムやプロトンなどの一価イオンの透過性を持つ電位センサードメインについては既にいくつか報告されてきたが、二価の陽イオンに対する透過性を持つものは知られて来なかった。申請者は、本研究において主に発現系細胞を用いた電気生理学計測と蛍光計測を行い、精子由来電位依存性イオンチャネルの電位センサードメインがカルシウム透過性をもつことを世界で初めて示すことに成功した。このカルシウムイオン透過性を持つ電位センサードメインは既知のイオン透過機構とは異なるメカニズムでイオン輸送を行っている可能性があり、今後詳細な研究を行うことで新しいイオン透過機構の解明や分子ツールの開発につながることが期待される。

実験は再現性を厳密に検討され、必要且つ十分な対照群の実験も行われ、実験結果についての議論も慎重かつ正当になされている。統計学的数値の扱いについても問題がない。

以上より申請者の論文は、学位に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	有馬　大貴
論文題名 Title	Induction of divalent cation permeability by heterologous expression of a voltage sensor domain (電位センサードメインの発現による細胞膜への二価カチオン透過性の誘導)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

電位依存性イオンチャネルは膜電位変化を感知する電位センサードメインと、イオン透過路を形成するポアドメインにより構成されるタンパク質であり、神経細胞などにおける活動電位の発生など様々な生理現象において重要な働きをしている。電位センサードメインは、膜電位変化に応じて構造変化を起こすことでポアの開閉を制御することが主な機能であるが、近年の研究によりイオン透過性を持つ電位センサードメインが存在することが明らかとなった。また、電位センサードメインと蛍光タンパク質を組み合わせた、膜電位変化を蛍光シグナル変化として検出するプローブの作製にも利用されている。

我々は優れた膜電位プローブの作製に取り組んでいた際、カタユウレイボヤ（Ciona intestinalis）由来の精巣特異的カチオンチャネル（CatSper）の電位センサードメインを培養細胞などに発現させると、膜電位が過分極したときにイオン電流が流れることを発見した。CatSperとは、精子に特異的に発現しているカチオンチャネルであり、KOマウスを用いた研究から受精に必須なタンパク質であることが知られている。しかし、発現系での機能解析に成功した研究が無いため、イオンチャネルとしての詳しい機能は明らかにされていない。そこで本研究では、電気生理学的手法および蛍光プローブを用いたイメージングによる解析を行い、CatSperチャネルの電位センサードメインがどのような機能・性質を有しているかを明らかにすることを試みた。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

カタユウレイボヤ由来のCatSperチャネルの一つのサブユニットであるCi-CatSper3の電位センサードメイン（CiCS3 VSD）をアフリカツメガエルの卵母細胞およびHEK293T細胞に発現させ、膜電位固定法による電流の測定を行った。その結果、細胞膜が過分極したときに内向き電流が記録された。記録された電流がCiCS3 VSDそのものを通るイオン電流であるかどうかを調べるため、膜電位変化を感知するために重要なS4領域の塩基性アミノ酸をグルタミンに置換し、その影響を調べた。その結果、S4領域の変異体を発現させた細胞では過分極時にイオン電流が記録されなかった。細胞膜表面での発現量を調べたところ野生型と変異体で大きな違いが見られなかったため、S4領域に変異を導入することでイオン透過性が失われたと考えられる。また、細胞外領域にヒスチジン残基を導入することで、細胞外亜鉛イオンによるイオン透過阻害が引き起こされるかどうかを検討したところ、S1-S2リンカー領域およびS3-S4リンカー領域にヒスチジンを導入した変異体を発現させた細胞では、過分極時のイオン電流が細胞外亜鉛イオンにより阻害された。これらの結果から、CiCS3 VSDそのものがイオン透過路として機能していることが示唆された。

また、CatSperチャネルは精子細胞内へのカルシウムイオン流入に必要であることが知られているため、CiCS3 VSDがカルシウムイオン透過性を持つかどうかについてカルシウム感受性蛍光色素を用いて検討した。その結果、細胞外にカルシウムイオンが存在するときにのみ、CiCS3 VSDを活性化させることで細胞内カルシウム濃度が上昇したため、CiCS3 VSDを発現させた細胞において過分極時に細胞外からカルシウムイオンが流入することが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、CatSperチャネルの電位センサードメインがカルシウムイオン透過性を持つことが示唆された。電位センサードメインを二価のカチオンが透過することが示されたのは世界で初めてであるため、電位センサードメインの新たな機能の解明へとつながることが期待される。