

# 研究報告書

## 「細胞の電気的信号を様々な生理活性へ変換する膜電位センサーの作動機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 竹下 浩平

### 1. 研究のねらい

細胞内は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase によって  $\text{K}^+$  が多く分布し、同時に、 $\text{K}^+$  漏洩チャネルが細胞外へ少量の  $\text{K}^+$  を流すことで、細胞膜近傍に膜電位という電位差を生じている。細胞が興奮すると、静止膜電位が正に変化し「脱分極状態」となる。この「膜電位形成」と「膜電位の変化」は、神経伝達といった細胞間の情報伝達を可能にし、生命に重要な役割を担っている。

膜電位の変化を感受しイオンを透過する電位依存性イオンチャネルは、膜電位センサーとイオンポアで構成される。イオンポアの開閉は膜電位依存的な膜電位センサーの構造変化によって制御される。膜電位センサーは電位依存性イオンチャネルに特有のドメインであると考えられてきたが、大阪大学の岡村らによって、電位センサー型脱リン酸化酵素と、本研究課題の対象分子である電位依存性プロトンチャネル(VSOP)が同定されたことをきっかけに、膜電位センサーは、「細胞の膜電位変化という電気的信号を様々な生理活性へ変換するモジュール型のドメイン」と考えられるようになった。しかし、膜電位センサーの活性化過程には謎が多い。その要因は、既知の膜電位センサーの原子構造が全て活性型であり、活性化前の非活性型(静的状態とも呼ぶ)の構造が不明であることがあげられる。2014 年に研究代表者が明らかにした VSOP の結晶構造は、膜電位センサー内の膜電位を感受する正電荷を帯びた第四番目の膜貫通ヘリックス(S4)が細胞膜内側へシフトしていたこと、さらに、VSOP のプロトンチャネル活性を阻害する亜鉛イオンが電位センサーに結合していたことが決定打となり、これまで良く分かっていなかった非活性型の膜電位センサー構造を示すに至った (Takeshita et al., *NSMB*, 2014)。

その研究成果をもとに、本研究課題では VSOP の活性型、非活性型の高解像度原子構造解析、1分子ダイナミクス研究、電気生理学実験手法等をシームレスに繋ぐ構造生命科学研究を展開することで、「細胞の電気的信号を様々な生理活性へ変換する膜電位センサーの作動機構の解明」を目指した。VSOP はその膜電位センサー内をプロトンが透過するため、S4 の位置という曖昧な膜電位センサーの状態を、プロトン透過経路の有無で判断でき、膜電位センサーの状態をより明確に議論できると期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

膜電位センサー作動機構の解明のため、本研究では非活性型と活性型 VSOP の結晶構造決定、電気生理学実験を用いた機能解析、構造と機能の相関的理解を深めるための膜電位依存的な VSOP ダイナミクス計測、を組み合わせた構造生命科学研究を展開した。

非活性型 VSOP の構造は既に報告しているが、分解能が  $3.5\text{\AA}$  程で、アミノ酸側鎖や水分子といった詳細構造は不明である。非活性型 VSOP の高分解能構造は、電位センサーが膜

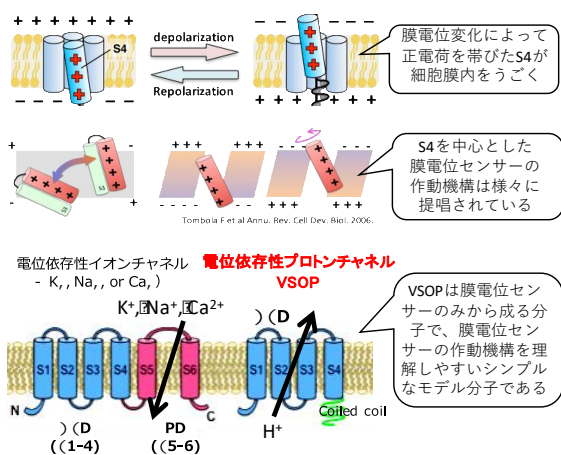
電位変化を感受するための構造状態を理解するために重要である。そこで VSOP の膜貫通領域(TMR)を Lipidic cubic phase(LCP)法により結晶化し構造決定することを目指した。LCP 法はモノオレイン脂質(MO)の脂質立方相に膜タンパク質を埋め込み結晶化する方法であるが、モノオレインと膜タンパク質の混合溶液は乾燥しやすく脂質立方相の崩壊を招き結晶化を困難にする。事実、TMR の LCP 結晶化には成功しなかった。そこで、MO とグリセロール混合系脂質を用いたLCPG法を開発し、非活性化状態の VSOP(TMR)結晶化を成功させ、3.5Å の X 線回折データから構造解析中である。次に、活性型 VSOP の結晶構造決定のためには、細胞膜から抽出したときに活性型を示す試料の調製が必須である。蛋白質科学、電気生理学といった多方面からの変異体探索や試料調製の条件検討の結果、活性型 VSOP の結晶化試料を調製するためには、完全体の2量体 VSOP を用いることが必須であることが判明した。さらに野生型2量体 VSOP の調製は困難であったため、Native 様の2量体 VSOP をデザインし、その調製法を確立した。これにより高品質な活性型 VSOP の調製が可能となり、現在、結晶化スクリーニングが可能となっている。一方で、活性型 VSOP の構造決定を目的とした取り組みにより、Native 様 VSOP の高純度調製も可能となった。これらを用いて、膜電位センサーの動きを可視化するための、1分子ダイナミクス計測を試みた。現時点で高速 AFM 計測にて画像の取得に成功しており、他の1分子ダイナミクス計測系でも必要になる基板への固定化法や観測プローブ付加法がみえつつある。これらの VSOP をモデル分子とした膜電位センサーの作動機構の解明に向けた研究は着実に進展しており、未決着の膜電位センサーの作動機構や活性化過程が明らかになると考えられる。

## (2) 詳細

膜電位センサーは、細胞膜の膜電位変化を感受する分子モジュールの1つである。膜電位センサーを持つ分子には、6回膜貫通型の電位依存性イオンチャネル、脱リン酸化酵素と連結したもの、また、イオン透過性をもつ膜電位センサーとして機能するものなど、多様な分子が知られている。つまり、膜電位センサーは、膜電位という電気信号を様々な生理活性に変換可能であると言え、様々な生理機能をコントロールする膜電位センサーの作動機構を理解することができれば、生命現象の理解や疾患克服につながると期待される。本さがけ研究では、電位センサーのみからなる膜電位変化に応じてプロトン透過するチャネル分子である VSOP をモデル分子として、電位センサーの作動機構を明らかにするために、以下の3つのテーマについて研究を行った。

### 研究テーマ A: VSOP の非活性型構造の高分解能構造解析

#### 膜電位センサーの作動機構解明 VSOPの構造生命科学研究



膜電位センサーの作動機構解明に重要な1つの要素として、膜電位変化を感受可能な静的状態(非活性型)のVSOPの高分解能構造情報が必要である。これは膜電位センサーの活性化過程の初期状態を意味し、その構造情報なしでは膜電位センサーの作動機構の理解は難しい。そこで本テーマではVSOPの膜貫通領域(TMR)の結晶化のために、ハンドリングが容易なハンディタイプLCP結晶化分注器(図1)の開発と、LCP法で用いるモノオレイン脂質(MO)と膜タンパク質の混合溶液の乾燥による結晶化阻害を克服したLCPG法を駆使する



図1:ハンディタイプLCP結晶化分注器。LCP脂質分注の操作性を考慮し、マイクロインジェクターの手元にボタンスイッチを施した。50nlの分注も可能である。

ことで、通常のLCP法では結晶を得ることが困難であったVSOPのTMRの結晶化に成功した(図2)。TMRの結晶はおよそ20-30micronの斜方結晶であった。得られた結晶のX線回折実験は大型放射光施設SPring-8のBL32XUビームラインにて実施することで、微小結晶からの49,600枚の回折イメージデータをマージすることで回折フルデータの収集に成功した。空間群は $P2_1$ であり、格子定数は $a=82.9$ ,  $b=96.5$ ,  $c=109.6(\text{\AA})$ であった。現在、分子置換法を中心として構造解析中である。また、他の条件での結晶も得られており、今後、これらの結晶化条件も含めて最適化することで、非活性型VSOPとしての、高分解能のTMRの構造決定を目指す。

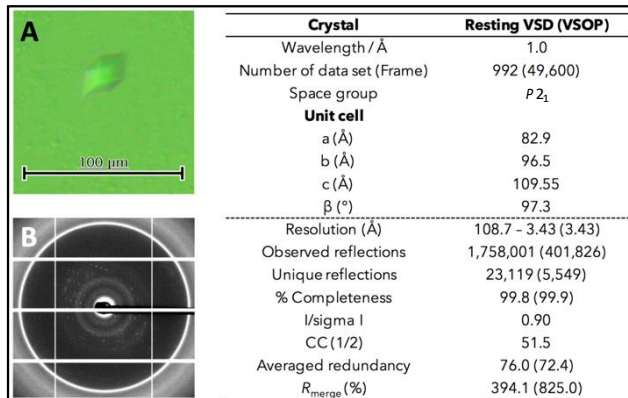


図2: LCPG法により得られた非活性型VSOPの結晶(A)とそのX線回折イメージ(B)。回折データの統計処理値より最高分解能は3.43 $\text{\AA}$ であった。

### 研究テーマB: VSOPの活性化型構造解析

VSOPは膜電位が0mVでは完全にClosed状態(非活性型もしくは静的状態)である。活性化型VSOPの構造決定のためには、細胞膜からの抽出時、すなわち膜電位0mVで、VSOPが活性化状態をとりうる結晶化試料の調製が必須となる。まず、マウスとヒト由来のTMRとNativeな2量体VSOPに対して、0mVでOpen状態をとる変異体(第3番目膜貫通領域上のアスパラギン酸のアラニン変異体; ヒトではD174, マウスではD170)をHEK293細胞に発現させ、パッチクランプ法により、膜電位0mVでのチャネル開口率を計測した。ヒトVSOP D174A変異体では、既に

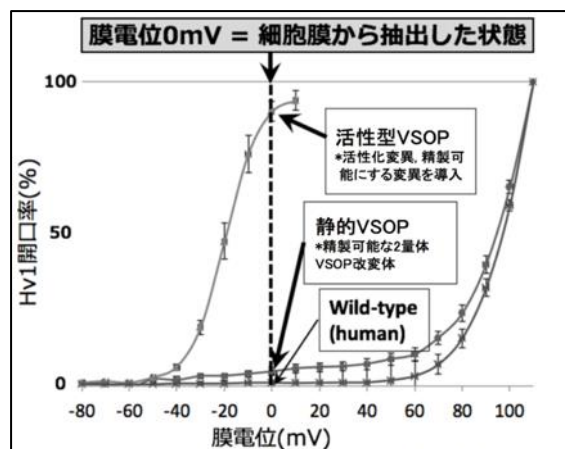


図3: 高純度精製可能な活性化型VSOP変異体は、細胞膜から抽出した、膜電位0mVにおいて、ほぼ完全にOpen状態をとる。



論文が報告されているように膜電位 0mV でほぼ100%の開口率を示し、一方で、TMR やマウス VSOP の D170A 変異体では 0mV で 50%未満の開口率であった(Data not shown)。この結果から、活性型 VSOP の構造解析にはヒト VSOP を用いる必要が示唆された。さらに、Native な VSOP はリコンビナント蛋白質として強制発現させることは可能であるが、界面活性剤を用いた細胞膜からの抽出効率が極めて低く、高品質試料を精製することが困難であった。そこで、高品質精製可能な VSOP (VSOP $\epsilon$ 、VSOP $\epsilon$ )を設計し、野生型と遜色ないプロトンチャネル活性を確認することに成功した。この VSOP $\epsilon$  の活性型 VSOP $\epsilon$  (VSOP $\epsilon$ )を設計し、0mV でほぼ 100%の開口率を示すことも確認できた(図3)。さらに、VSOP $\epsilon$  リコンビナント試料の調製にも成功し(図4)、現在、結晶化スクリーニング中である。

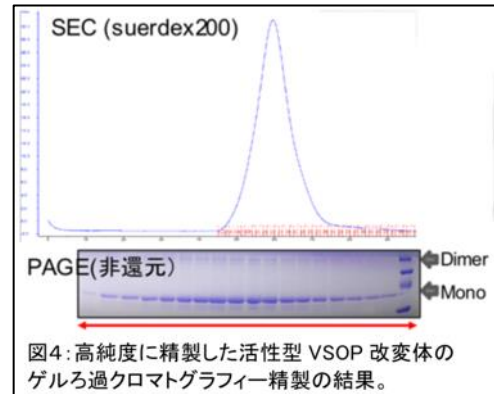


図4: 高純度に精製した活性型 VSOP 変体のゲルろ過クロマトグラフィー精製の結果。

#### 研究テーマ C: VSOP の1分子ダイナミクス計測

活性型 VSOP の構造解析への取り組みにより、高純度精製可能な Native 様 VSOP である VSOP $\epsilon$  のデザインにも成功し、LCP 法や本研究課題で開発した LCPG 法を用いた結晶化スクリーニングの結果、微結晶を得るに至っている(図5)。VSOP は生体内において、活性酸素種の産生、精子鞭毛運動の制御、心筋細胞での pH 制御による正常な心拍運動への関与といった重要な役割を担う。また、虚血性脳障害時や転移性乳がん等で高発現しており疾患関連分子でもある。よって、生体膜上での2量体 VSOP の構造情報を、VSOP $\epsilon$  の結晶構造から得られれば、VSOP が関わる生命現象の理解や創薬研究へと応用できると考えられる。

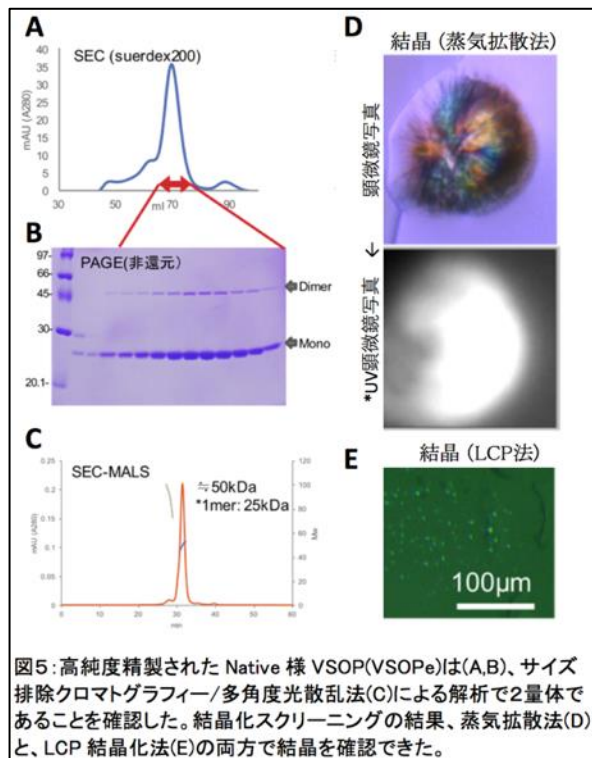


図5: 高純度精製された Native 様 VSOP(VSOP $\epsilon$ )は(A,B)、サイズ排除クロマトグラフィー/多角度光散乱法(C)による解析で2量体であることを確認した。結晶化スクリーニングの結果、蒸気拡散法(D)と、LCP 結晶化法(E)の両方で結晶を確認できた。

一方で、膜電位 0mV で 100%開口する VSOP 変異体を調製するためには、2量体 VSOP を用いることが必要であることや、本研究課題において VSOP の TMR をターゲット分子として Diffracted X-ray Tracking (DXT)法により電位センサーの動きを捉える実験を試みた際に、基板への分子固定化や分子の動きを見るための目印(プローブ)を付加するには、ほぼ膜貫通領域のみである TMR は不向きであることが示唆された。最終的に1分子ダイナミクス計測には2量体 VSOP が望ましいと判断し

た。そして、プローブを必要とせず VSOP の 1 分子ダイナミクス計測が可能高速 AFM 計測にて、脂質二重膜中での VSOP の画像取得を試みた。VSOP の C 末端側の細胞質コイルドコイルの先端にポリヒスチジンタグを付加した VSOP<sub>e</sub> を、ニッケルコートしたマイカ基板へ固定化し、高速 AFM 計測を行ったところ、約 8-10nm の均一な粒子を計測した。さらに脂質二重膜に埋め込んだ状態での高速 AFM 計測も行い、脂質二重膜へ組み込まれた VSOP の計測を行った。VSOP は 2 量体で 5nm 弱と考えられ計測された粒子径はその倍ほどであったため、更に高精度な計測条件の検討が必要である。また、今回の高速 AFM 計測の経験は、今後、他の 1 分子ダイナミクス計測系でも必要になる基板への固定化法や観測プローブ付加法の初期条件として応用できる可能性も見えてきた。

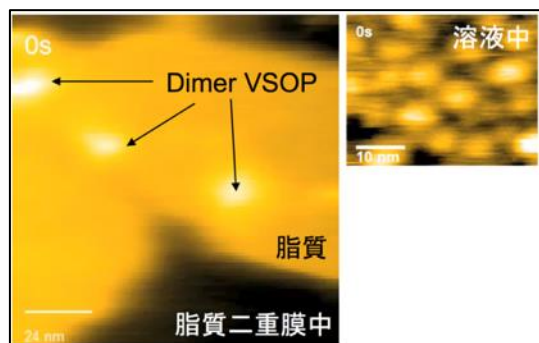


図6: VSOP の高速 AFM 計測画像  
脂質二重膜中の VSOP(左)と溶液ミセル中の VSOP(右)

### 3. 今後の展開

本さきがけ研究を実施することで、未だ議論が残る電位センサーの作動機構を理解するための実験基礎基盤が確立したと考えられる。研究代表者が 2014 年に VSOP の結晶構造を報告してから、今までに他研究者からの VSOP の構造決定に関する論文の報告はない。このことは、VSOP の構造決定に向けた試料調製が容易ではないことを裏付けている可能性がある。一方で、研究代表者は本さきがけ研究において膜貫通領域のみの VSOP の結晶化や構造決定 (unpublished data) に成功しており、また、Native な 2 量体 VSOP の高品質試料調製や、活性型 VSOP の試料調製にも成功しており、今後、VSOP の構造生命研究を進める上で有利に働くと考えられる。近年、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による原子分解能での膜タンパク質の構造決定も可能となっている。VSOP は 2 量体でも 50kDa 未満とコンパクトな膜タンパク質であり、クライオ電子顕微鏡を用いた原子分解能の構造決定を行うためには工夫が必要であるが、結晶構造解析と平行して、積極的に取り組む必要がある。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

電位依存性プロトンチャネルの構造機能相関研究を通して、膜電位センサーの作動機構の解明を目指し研究を進めてきた。主軸となる X 線結晶構造解析では、電位センサーの活性化前となる非活性型(静的状態)VSOP の結晶化ならびに 3.43Å の回折データの取得に成功した。当初、結晶化は脂質立法相法(LCP 法)により作成を試みたが、通常のモノオレイン脂質を用いた LCP 法では結晶が得られず、グリセロール-モノオレイン脂質混合系の LCP 結晶化(LCPG 法)により結晶を得ることに成功した。さらに、LCP 結晶化の操作性を考慮したハンディータイプの結晶化分注器を開発できたことも評価できると考えられる。また、活性型 VSOP の結晶構造を決定するために、細胞膜から抽出した状態で活性化状態をとる VSOP 変異体を電気生理学実験であるパッチクランプ法により探索し、さらに高純度精製可能な Native 様 VSOP をデザインし、その変異を適応させることで、活性型 VSOP の結晶化試料の調製に成功した。研究室に

てパッチクランプ実験を立ち上げ、様々なデザインした VSOP のリコンビナント蛋白質発現系構築と精製実験と並行してプロトンチャネル活性を計測し、活性化状態の評価を実施できる研究環境を配備したことが、活性型 VSOP の試料調製法の確立に繋がった。しかし、当初予定していた計画よりも活性型 VSOP の調製法の確立に時間を要し、結晶化スクリーニングまでしか進んでいない点は反省すべきである。結晶構造という静的な原子構造から電位センサーのダイナミクスを理解するために、1分子計測実験にも挑戦した。当初は Diffracted X-ray Tracking (DXT)法にてVSOPの電位センサーの動きを計測する計画であったが、計測のためのVSOPの基板への固定化や金ナノ結晶プローブの付加効率が悪く、ダイナミック計測を行うことは出来なかった。その理由は VSOP が非常にコンパクトであり、基板固定化ならびにプローブ付加の箇所が限られていたことにあると考えられる。しかし、最終的には高速 AFM 計測にて VSOP 分子の観測に成功した。今後も、高速 AFM 計測を続け、将来的には膜電位を印加したときの電位センサーの動きを観測したいと考えている。総合的に見て、研究期間内に結晶構造の決定までに至らなかったことを反省すべきであるが、一部、低分解能ながら静止膜電位状態に近い環境での結晶構造解析に成功しており、それらも含め研究を継続し早急な論文化を目指す。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

高分解能のX線データの取得を目標としていたが、活性型 VSOP の結晶化試料を調製するためには、完全体の2量体 VSOP を用いることが必須であることが判明した。さらに野生型2量体 VSOP の調製は困難であったため、Native 様の2量体 VSOP をデザインし、その調製法を確立した。これにより高品質な活性型 VSOP の調製が可能となり、現在、結晶化スクリーニングが可能となっている。同時に、活性型 VSOP の構造決定を目的とした取り組みにより、Native 様 VSOP の高純度調製も可能となった。これらを用いて、膜電位センサーの動きを可視化するための、1分子ダイナミクス計測を試みた。現時点で高速 AFM 計測にて画像の取得に成功しており、他の1分子ダイナミクス計測系でも必要になる基板への固定化法や観測プローブ付加法がみえつつあるとのことで、今後に期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物

「Crystal Structure of voltage-gated proton channel」, Takeshita K, Okamura Y, Nakagawa A, *SPring-8 Research Frontier* 2014, 1 August 2015.

「Structural insight into the regulation mechanism of proton leakage based on crystal structure



of voltage-gated proton channel (VSOP)., Takeshita K, Okamura Y, Nakagawa A, Seikagaku. *The Journal of Japanese Biochemical Society* (ISSN: 0037-1017). Volume 87, Issue 5 2015.

主要な学会発表・招待講演

(口頭)

「Structural & Functional Studies on Voltage-Gated Proton Channel.」 Kohei Takeshita, IPR/RSC Symposium, IPR, Osaka University, 5 December 2017

「電位依存性プロトンチャネルの結晶構造」竹下浩平, 第1回イオンチャネル研究会, 福岡大学医学部, 7 July 2016.

「Structural and Function of Voltage-Gated Proton Channel」 Kohei Takeshita, International Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins -Bilateral Symposium between SNU and IPR, Seoul University in Korea, 5 December 2015.

「Structural insight into proton conduction pathway via voltage-gated proton channel.」 Kohei Takeshita, Symposium: Proton permeation mechanism across membrane. The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. (Kanazawa University in Japan) 13 September 2015.

「電位依存性プロトンチャネルの結晶構造と膜電位センサーの作動機構」竹下浩平, 第87回日本生化学会大会シンポジウム「複雑な生命機能を理解するための構造解析の最先端」(京都国際会議場) 5 October 2014.

(ポスター)

「X線結晶構造解析を目指した精製二量体 VSOP の特性に関する研究」  
持田理子, 後藤優介, 山本旭麻, 渋村里美, 岡村康司, 中川敦史, 竹下浩平  
第55回日本生物物理学会年会, (熊本) 2017年9月19-21日

「電位依存性プロトンチャネルの脂質メソフェーズ法を用いた結晶化」  
山本旭麻, 渋村里美, 中川敦史, 竹下浩平  
第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台) 2017年6月21-23日

「膜電位非印加状態で開状態をとる VSOP/Hv1 変異体から見る二量体協調性」  
木村仁美, 持田理子, 渋村里美, 中川敦史, 岡村康司, 竹下浩平  
第39回日本分子生物学会年会(横浜) 2017年11月30-12月2日

「X-ray Crystal Structure of Voltage-Gated Proton Channel, VSOP」

Kohei Takeshita

IPR & ACSMB, Leeds University Joint Symposium “Integrative Structural Biology for Protein



Science” (Osaka) 5 November, 2015.

「X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel」

TAKESHITA K., Sakata S., Yamashita E., Fujiwara Y., Okamura Y., Nakagawa A.

第 92 回日本生理学会大会(神戸)2015 年 3 月 21 日～23 日

受賞

平成 27 年度 大阪大学総長奨励賞