

脊索動物型電位センサー分子ファミリーの比較解析による脊椎動物生理機能進化の研究

●岡村 康司¹⁾²⁾³⁾ ◆岩崎 広英²⁾³⁾ ◆東島 眞一²⁾³⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科 2) 岡崎統合バイオサイエンスセンター 3) 生理学研究所

<研究の目的と進め方>

カタウレイボヤのゲノム・EST解読の情報から、環境適応に関わるチャンネル群が脊椎動物よりも尾索動物で著明に重複、多様化していることが見いだされた。また、電位センサーをもつ非チャンネルタンパク群を同定し、膜電位シグナル伝達の新しい経路が存在することが明らかになった。これらの分子の電位センサー領域と酵素ドメインは由来する生物種によって分子構造が微妙に異なっており、海水、淡水、陸上の環境でのイオンや温度の違いとの関係をアミノ酸配列レベルで追跡できる可能性がある。またホヤでは鰓、脊椎動物では破骨細胞、中枢神経系といった脊椎動物の起源を探る上で鍵となる器官組織で発現することから、これらの分子群に着目することで、脊椎動物の生理機能のゲノムの変遷に迫れると考えられる。そこで、尾索類を中心に網羅的に電位センサー分子の検索を行い、脊椎動物がもつ生理機能の普遍性と特殊性を明らかにするとともに、前段階の動物での生理機能多様性と脊椎動物の生理機能の進化へのプロセスに迫る。

<研究開始時の研究計画>

脊椎動物（ゼブラフィッシュ、ゼノバス、ラット、ヒト）のVSPホモログ分子をクローニングし、その分子機能と組織発現パターンの比較を行う。カタウレイボヤ以外の尾索類からも相同分子のアミノ酸配列を明らかにし、非チャンネル型電位センサー分子の分子進化について洞察する。更にカタウレイボヤにおける非チャンネル型電位センサー分子の生理的役割を解明するため、in situ hybridization 法などにより、詳細な遺伝子発現プロファイルを明らかにする。また、後口動物無脊椎動物（ヒトデなど）のデータベースから広くスクリーニングして、分子系統学上の位置づけを試みる。

<研究期間の成果>

電位センサーをもつホスファターゼであるVSPの分子特性を詳細に明らかにした（Nature, 2005）。更に、ホヤにおけるVSP遺伝子の発現パターンを明らかにするため、筑波大稲葉教授と共同で、免疫染色法による検討を行った。その結果ホヤの精子の尾部に発現が確認され精子の形成または生理機能に関わる可能性が示唆された（日本動物学会）。これをきっかけとして以下の解析を行ってきた。①Ci-VSPの作動原理を更に詳しく明らかにするため様々なイノシトールリン脂質を基質とする酵素活性の定量を行い、PIP3だけでなくPIP2も基質となることを見出した。②ホモログ分子をゼブラフィッシュからもクローニングし、発現系細胞での電気生理学的測定を行い、ホヤのVSPと同様に電位感受性をもつこと、ホスファターゼ活性が膜電位により制御されることを見出し、VSPの分子機能が無脊椎動物に限定されるものではないことが示された（第82回日本生理学会）。更に、岡崎統合バイオサイエンスセンターの東島助教授の協力を得て、in situ hybridization 法による解析を行い、ホヤと同様に消化管の上皮細胞に発現が見られた。③他の脊椎動物（ゼノバス、トリ、ラッ

ト、ヒト）のVSPホモログ分子の電気生理学的特性を比較解析し、カエル、トリでは明確な膜電位依存性が確認されたのに対して、哺乳類のVSPからはゲート電流確認できず、膜電位依存性が存在しない可能性が考えられた。この生理学実験の知見は、共同研究で行っている斎藤成也先生らによる分子進化解析の結果である「VSPはトリ以降に進化速度が増していること、分子系統樹で、魚、両生類、鳥が哺乳類とは別のグループを作るという結果」と矛盾しない。従ってトリと哺乳類の間で分子機能、生理的役割が大きく変化した可能性が示唆された。④VSPと弱い相同性を示す新たな電位センサー分子を同定し、機能発現実験の結果、これまで免疫系細胞などで機能が知られてきた電位依存性プロトンチャンネルをコードする分子実体であることが示された（投稿中）。⑤ウニ、ホヤでは見つからず硬骨魚類からヒトまで保存されている新規電位センサー蛋白VSOP2を同定した。マウスで神経系に著明に発現（小脳プルキンエ細胞、海馬錐体細胞）するため未知の神経機能を担うと考えられる。免疫染色の結果から近位樹状突起に発現するらしい。two-hybrid法によりCa結合能を有するカルモジュリン様分子が細胞内領域に結合することがわかった。⑥複数の尾索動物種の電位センサー蛋白を解析するため、ウミタル、オタマボヤの採集を行った。またこれまでに分類したカタウレイボヤの電位依存性イオンチャンネルの幼生でのcDNAの発現プロファイルをin situ hybridization法とRT-PCRにより解析した。

<国内外での成果の位置づけ>

膜電位がイオンを介さず細胞内信号として伝達される分子はVSPが最初である。Hvチャンネルはミクログリアや白血球などの活性酸素の生成に重要な経路であり、自然免疫、感染防御機構、脳の発達機構、脳の病態の理解に重要であるがその分子実体はあきらかにされて来なかった。電位センサーはイオンチャンネル固有の分子構造として研究され、3次元結晶化で立体構造が解かれた後も動作原理を巡り大論争が展開しているが、今回見出したVSPとVSOP1は電位センサーの動作原理を構造生物学として理解する上でも重要な視点を提供すると考えられる。また発生過程での左右軸形成における膜電位勾配にこれらの電位センサー膜蛋白が関わる可能性や血管形成、血球分化過程での役割も考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

VSPの分子機能の解析、および動物種間の比較についてはほぼ計画通りに研究が進みつつある。とくに斎藤成也先生らとの共同研究で、分子進化的観点と電気生理学的観点の結果が整合性がみられる点は極めて興味深く、今後の発展が期待される。

VSPと相同性をもつ分子として、電位依存性プロトンチャンネルのcDNAを同定するに到ったことも大きな進歩であった。この発見は、これまで電位センサーとしての機能しか知られていなかった蛋白構造がイオン透過機能をもつという膜蛋白の生物物理

学としても大きな意味をもつ。

分子機能が明確になってきた一方で、各生物種での生理機能との対応はまだまだこれからである。マウスについてはノックアウトマウスの作成に着手しつつある。ゼブラフィッシュのノックダウン実験は人手の問題もあり、あまり進まなかった。また、VSPが最初に発見されたホヤ自体を使った研究は現在まで、発現パターンの解析に留まっている。発現を詳しく調べる実験が落ち着いたら遺伝子のノックダウンなどの解析を開始したい。新しく入学が決まった大学院生が比較ゲノムのアプローチを志向しており各動物種での生理機能を調べる比較生理学研究を軌道に乗せたい。

<今後の課題、展望>

今後の課題は以下の点である。

(1) VSPに関する解析

VSPは今のところ、ホヤでは消化管、精巣、魚では消化管、精巣、神経系、哺乳類ではおもに精巣に発現が認められている。このほか、最近帝京大学の本間光一先生との共同実験によりトリの中樞神経系に顕著な発現が認められた。一方、VSPの分子機能特性も次第に詳細が明らかになり、従来基質として考えられてきたPIP3だけでなくPIP2も脱リン酸化されることが明らかになった。今後は各動物のVSPについて酵素活性の基質特異性を明らかにし、VSPが関わるイノシトールリン脂質代謝経路を明らかにする。更に動物種間の酵素活性、膜電位依存性の違いが、生理機能での使われ方の違い、例えば多精子拒否反応の生物多様性とどのように対応するかを明らかにしたい。

(2) VSOP1 (プロトンチャンネル=Hvチャンネル)の生物機能の解析

VSOP1はホヤからヒトまで保存されている新規電位感受性プロトンチャンネルタンパクであり主として免疫系細胞に発現することがわかってきた。Hvチャンネルは貪食細胞機能に重要であると考えられるが、動物種間で温度依存性や活性化速度は大きく異なる。血球細胞、神経系、生殖細胞、骨形成、鱗の形成など、貪食機能は多様な生理現象に関わっており、生物の生息環境や物理的制約に分子特性は適応していると考えられる。現在、ウニの相同分子を同定するとともに、植物や菌類のゲノムからも類似の遺伝子を見つけており、今後は分子進化的解析を行うとともに、機能発現実験により蛋白の特性の比較を網羅的にやりたい。とくに脊椎動物に固有の組織である骨組織の進化との関連で、破骨細胞でのHvチャンネル機能を明らかにする研究も始めたい。長期的には骨粗鬆症やヒトの遺伝病や感染防御の視点からも捉えていきたい。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

601272002 Okamura Y, Nishino A., Murata Y., Nakajo K., Iwasaki H., Ohtsuka Y., Tanaka-Kunishima M., Takahashi N., Hara Y., Yoshida T., Nishida M., Okado H., Watari H., Meinertzhagen I.A., Satoh N., Takahashi K., Satou Y., Okada Y. & Mori M. Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes, *Physiological Genomics*, 22, 269-282, 2005.

601272039 Brown, E.R., Nishino, A., Bone, Q., Meinertzhagen, I.A. & Okamura, Y. GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva. *European Journal of Neuroscience*, 22, 2541-2548, 2005.

Shirahata E, Iwasaki H, Takagi M, Lin C, Bennett V, Okamura Y, Hayasaka K. Ankyrin-G regulates inactivation gating of the neuronal sodium channel, Nav1.6 *J Neurophysiol*(2006)

Sasaki M, Takagi M, Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science*(2006)

2) 学会発表

岡村康司: Voltage sensor in an enzyme, 第82回日本生理学会シンポジウム「センサー分子内の情報伝達機構」 仙台 2005年5月

村田喜理、岡村康司: Role of linker region in coupling between voltage sensor and phosphatase activity, 第82回日本生理学会 仙台 2005年5月

西野敦雄、東島眞一、岡村康司: ホヤ幼生の遊泳運動機構の研究: 運動パターンと筋細胞の興奮・収縮の関係, 第82回日本生理学会 仙台 2005年5月

Israil Hossain, 東島眞一、岩崎広英、永山国昭、岡村康司: Identification of teleost voltage-sensitive phosphatase (VSP) and its comparison with Ci-VSP, 第82回日本生理学会 仙台 2005年5月

岡村康司、西野敦雄、小笠原道夫、佐藤矩行、岡戸晴生: カタユレイボヤのイオンチャンネル遺伝子データベースの作成, 第82回日本生理学会 仙台 2005年5月

岡村康司: 新しい膜電位依存性タンパクの構造と機能, シンポジウム「バイオ分子センサー: 脳神経機能研究の新潮流」第28回日本神経科学大会 横浜 2005年7月

岩崎広英、東島眞一、岡村康司: 電位センサータンパク質VSOP2の解析, 第28回日本神経科学大会 横浜 2005年7月

中山希世美、岡村康司: 胎生期マウス脊髄におけるGABAの興奮性作用へのK⁺-Cl⁻-cotransporter強発現の効果, 第28回日本神経科学大会 横浜 2005年7月

岡村康司、岩崎広英、佐々木真理、村田喜理、Israil Hossain、東島眞一、新規電位センサー蛋白から見た脊索動物の生理機能の進化, 第77回日本遺伝学会大会 東京2005年9月

藤山秋佐夫、三谷啓志、岡村康司、隅山健太、生命情報学によるゲノム進化の解析, 第77回日本遺伝学会大会ミニシンポジウム 東京 2005年9月

岩崎広英、村田喜理、佐々木真理、稲葉一男、岡村康司、ホヤゲノムから見つかった新規膜電位感受性酵素Ci-VSP, 第76回日本動物学会大会 筑波 平成17年10月6日~8日

木村有希子、岡村康司、東島眞一、ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の発生と回路における機能解析, 第76回日本動物学会 筑波 2005年10月6日~8日

村田喜理、佐々木真理、岡村康司、膜電位感受性酵素 Ci-VSPにおける、酵素活性の膜電位による制御機構: ドメイン間リンカー領域の役割. 第52回中部動物学会支部会 名古屋 2005年9月

Yasushi Okamura, Novel voltage-sensing proteins conserved among chordates. Korea-Japan Joint Seminar, Okazaki, February 9th, 2006

村田喜理、岡村康司、第83回日本生理学会大会 電位センサードメインに存在する負電荷残基の、膜電位感受性酵素Ci-VSPの膜電位感受における役割 ポスター発表 2006年3月28日

Israil Hossain, Mari Sasaki, Yasushi Okamura 第83回日本生理学会大会 Role of cytoplasmic domain in voltage sensor movement of Z-VSP ポスター発表 2006年3月28日

Y. Murata, Y. Okamura, 第50回Biophysical Society Annual Meeting Voltage sensor domain drives modification of

phosphatase activity of the voltage sensor containing phosphatase,
Ci-VSP. ポスター発表 2006年2月22日