

## 1-3 神経分化

### 岡村 康 司 (教授)

1) 専門領域：生物物理学，神経生物学，生理学

2) 研究課題：

- a) 電位感受性ホスファターゼの動作原理と生理メカニズムの解明
- b) 電位感受性プロトンチャネルの動作原理とプロトンシグナル機構の解明
- c) 神経系電位依存性 Na チャネルの生理機能と進化の解明
- d) 尾索類を用いたイオンチャネル機能の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) Ci-VSP (*Ciona* voltage-sensor containing phosphatase) はイオンチャネルの電位センサードメインとホスファターゼドメインを併せ持ち，膜電位依存的に酵素活性を変化させる。これまでイオンチャネルの中に built-in されイオンの透過に特異的に関わると考えられてきた膜電位センサーが，独立した機能ユニットであり，その役割がイオンの透過に留まらず幅広い生理現象に関わる可能性を初めて示した (Murata et al, 2005)。平成18年度は，この分子の動作原理の解析を進め，PH ドメイン GFP を用いた PIP2 のイメージングと K チャネルの強制発現による電気生理を並行して行い，脱分極で PIP2 のレベルが減少することを明らかにした (Murata & Okamura, under revision)。また，酵素ドメインの基質特異性をマラカイトグリーンアッセイと TLC 解析により行い，これまで明らかになっていた PIP3 だけでなく PIP2 が脱リン酸化されることが明らかになった (Iwasaki et al, in preparation)。これらの結果から，VSP には多くの電位依存性チャネルと同様に(1)脱分極により下流の分子機能を活性化する，(2)膜電位センサーの動きを翻訳して，下流の活性をチューニングできる，という「電位センサー蛋白」に共通する原理があてはまることが示唆された。

さらに，通常蛋白ドメイン間の相互作用は一方方向性ではなく双方向性であることが知られているので，電位センサーの動きが細胞内ドメインの構造変化によりどのように影響を受けるかを検討したところ，活性中心の変異の導入，またはホスファターゼの阻害剤による酵素活性の抑制時に，ゲート電流の動きが有意に速くなる現象を見出した。このことは電位センサードメインが酵素ドメインと強くカップルして構造変化を生じていることを示唆している。

更に VSP がどのような生物現象の文脈での膜電位変化に対応して機能するのか，哺乳類に固有の生理機能の進化とどのような関係があるか，などを明らかにするため各動物のオルソログ分子の発現様式と分子機能を解析している (村田, 岩崎, 佐々木, Hossain, 蒲野, 岡村)。

- b) VSOP は電位センサードメインのみを有しポア領域をもたない (VSOP = voltage sensor-only protein) 分子であるが，電位依存性プロトンチャネル活性をもつ。VSOP はマクロファージなど免疫系の細胞に多く発現し，膜電位を介する活性酸素の産生や細胞内環境の制御に関わっていると考えられる。VSOP は，今後感染防御機構や膠原病，アレルギー，神経疾患などにおける細胞内 pH や膜電位シグナルの役割を解析する上で重要なターゲット分子と考えられる。更に VSOP のシンプルな構造と機能のユニークさから，この分子動作原理の解

析は、今後イオンチャネルの動作原理一般や、様々な生命現象に関わるプロトンの透過機構などを理解する上で、重要な視点を提供すると期待される。平成18年度は、プロトンチャネルが膜電位を感知する機構について明らかにするため、陽電荷をもつ S4 を変異させ膜電位依存性の変化を検討した結果、3つのアミノ酸のうち細胞外側に近いアルギニンである R<sub>i</sub> と R<sub>2</sub> が重要な働きをしていること、またアルギニンを塩基性アミノ酸であるリジンに変化させると大きな膜電位依存性のシフトが起こり、単に静電的な電荷の貢献からは説明できないなどが明らかになった。その機構はこれまで知られてきた電位依存性の電位センシングとは異なる可能性が示唆された。更に、VSOPの生物学的役割を明らかにするため、特異抗体を作成して発現様式を解析したところ、これまでのRNAの発現が検出されていた組織（脾臓など）でシグナルが検出された。現在細胞内局在を明らかにする実験を行っている（大河内、黒川、佐々木、高木、岡村）。

- c) 脊椎動物の有髄神経細胞では、イニシャルセグメントとよばれる細胞体からの軸索起始部と、ランビエ絞輪部に、複数のタイプのイオンチャネルや他の膜蛋白が機能的細胞膜ドメインを構成し、ミエリンの形成とともに、神経細胞の発火特性の基礎を形成している。こうした脊椎動物の神経軸索の構築が進化の過程でどのような変遷で確立されたのかを明らかにすることは有髄軸索構築の分子機構を理解する上で、また脊椎動物固有の神経機構が確立された基盤を理解する上でも重要である。これまでヒト Nav1.6 チャネルの電気生理学的特性を、発現系細胞でのホールセルパッチクランプ法により解析し、アダプター分子アンキリンGの役割を明らかにしてきた。平成18年度には比較ゲノムの立場でペンシルベニア大学Edward Cooper博士との共同研究により、尾索動物を用いてアンキリン分子による電位依存性チャネルの制御を明らかにする研究を始めている（西野、岡村）。
- d) 尾索動物は背側神経索や脊索を有するなど、脊椎動物と類似した体制を示しながら、脊椎動物よりも遙かに少ない細胞構成（運動ニューロン10個程度、筋細胞20-40個程度）で精妙な運動機能を示す。カタユレイボヤのオタマジャクシ幼生は、神経細胞数が100個程度、筋細胞が40個程度しかないにもかかわらず、洗練された遊泳運動を示す。カタユレイボヤの幼生の遊泳運動を可能にする神経/筋肉の生理機構の理解を目指して、分子生物学、運動力学、電気生理学的な研究を行っている。これまで、①遊泳中、様々な強さの屈曲が10-20Hzで連続すること、②神経入力に応じて筋肉の興奮度が変化することを示し、さらにその筋肉のgradedな生理機能の主な素因がアセチルコリン受容体(nAChR)の特性にあると考え、③幼生尾部筋肉に発現するサブユニットを定めた。④nAChRの主要なサブユニットの発現が背側筋肉細胞に局限し、さらに、⑤そのタンパク質が神経筋結合部に局在することを示した。⑥ツメガエル卵母細胞への発現実験により脊椎動物では神経系のクラスであるnon-alphaサブユニットタイプがホヤでは筋細胞に発現すること、脊椎動物の筋のアセチルコリン受容体とは異なり、高いCa透過性を示すことなどを明らかにした。以上のことから、現在、機能的なnAChRからの入力は背側筋肉細胞に限られ、腹側の筋肉細胞の収縮は背側細胞からのギャップ結合を介した活動の伝播に依存することが推定された。また、高いアセチルコリン受容体のCa透過性の性質がこのような特性を可能にしていると予測された。このような膜電位活動の伝播に依存した筋肉帯の収縮機構は、ホヤ幼生の遊泳機能に本質的な意味を担っていると考えられる。また、カタユレイボヤゲノムに予想されたイオンチャネル遺伝子の中で特に幼生の遊泳行動に関与していると期待されるものについても同様な解析を行った。特にGABA(A)受容体、グリシン受容体の発現細胞は、運動神経節中のごく少数の細胞に発現が認められた。それらの発現細胞の遊泳運動に対する本質的な関与が期待され、検討を進めている（西野、岡村）。

4) 学術論文

**M. Sasaki, M. Takagi and Y. Okamura**, “A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel” *Science*, **312**,589-92 (2006).

**E. Shirahata, H. Iwasaki, M. Takagi, L. Changqing, V. Bennett, Y. Okamura and K. Hayasaka**, “Ankyrin-G regulates inactivation gating of the neuronal sodium channel, Nav1.6” *J Neurophysiol*, **96**, 1347-1357 (2006).

**Y. Kimura, Y. Okamura and S. Higashijima**, “alx, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits” *J Neurosci*, **26**(21), 5684-97 (2006).

**Y. Ohtsuka and Y. Okamura**, “Voltage-dependent calcium influx mediates maturation of myofibril arrangement in ascidian larval muscle” *Dev Biol*, 2007 **301**(2):361-73. (2007).

5) 著書, 総説

岡村康司「細胞膜電位センサー, 電位依存性イオンチャネルの新展開」*Bionics*, 26:36-43(2006).

佐々木真理, 高木正浩, 岡村康司, 「電位依存性プロトンチャネルはポア (孔) 構造をもたない分子である」, *実験医学*, 24: 1785-1788 (2006).

Y. Okamura, “Biodiversities of voltage sensor domain proteins” *Pflugers Archiv*, in press.

岡村康司, 佐々木真理「ファゴサイトーシスと膜電位変化」*生化学*, in press.

6) 国際会議発表リスト

**Y. Okamura, T. Kurokawa, M. Takagi, M. Sasaki**, “**Molecular identification of voltage-gated proton channel**”, Gordon Research Conference on Ion Channel, Tilton School (USA), July, 2006.

**Md Israil Hossain, T. Gamano, S. Higashijima, K. Nagayama, Y. Okamura**, “**Substrate-dependent structural change of the phosphatase domain slows the movement of the voltage sensor in voltage-regulated phosphatases (VSP)**”, minisymposium, Biophysical Society meeting, Baltimore (USA), March 2007.

**Md. Israil Hossain, T. Gamano, S. Higashijima, K. Nagayama, Y. Okamura**, “**Voltage-sensor movement of VSP is slowed under activated state of the phosphatase domain**”, SOKENDAI international symposium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

**Y. Okochi, M. Sasaki, H. Iwasaki, T. Kurokawa, Y. Okamura**, “**Expression patterns of a voltage-gated proton channel, VSOP**” SOKENDAI international symposium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

**T. Kurokawa, M. Sasaki, M. Takagi, Y. Okamura**, “**Molecular mechanisms of voltage-gated proton channel that consists only of the voltage-sensor domain**”, SOKENDAI international symposium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

**Y. Murata, H. Iwasaki, T. Gamano, Md Israil Hossain, T. Sasaki, Y. Okamura**, “**VSP is a voltage-activated PI(4,5)P2 phosphatase that is conserved among chordates**”, SOKENDAI international symposium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

**S. Yamaguchi, T. Gamano, T. Kurokawa, H. Kamigaki, T. Takano, Y. Okamura, K. J. Homma**, “**Developmental Expression of Avian VSP (*Gallus gallus* voltage-sensor containing phosphatase )**” SOKENDAI international symposium

sium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

**T. McCormack, Y. Okamura, “Cloning of a voltage-gated proton channel from an echinoderm and a primitive metazoan”** SOKENDAI international symposium, Satellite symposium of Annual meeting of Japan Society of Physiology, Okazaki (Japan), March 2007.

7) 招待講演

**Y. Okamura**, “Mechanisms of voltage sensor domain proteins” Gordon Research Conference on NOX family NADPH oxidases, Les Diablerets, Switzerland, October, 2006.

**Y. Okamura**, “Voltage sensor domain proteins” Breaking News, Gordon Research Conference on Ion Channel, Tilton School (USA), July, 2006.

岡村康司「膜電位シグナルを伝達する新たな膜タンパク質」名古屋, 2006年12月日本分子生物学フォーラム

岡村康司「電位依存性ホスファターゼの動作原理と役割」大阪, 第87回日本生理学会大会2007年3月

大河内善史, 佐々木真理, 黒川竜紀, 岩崎広英, 岡村康司「Roles and mechanisms of voltage-gated proton channel in blood cells」大阪, 第87回日本生理学会大会2007年3月

8) 学会および社会的活動

日本生理学会評議員, 日本神経科学会, 米国生物物理学会

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

大阪大学非常勤講師, 東京大学非常勤講師, 産業技術総合研究所客員研究員

11) 外部獲得資金

科研費特定領域研究(計画), 「新規電位センサー蛋白電位依存性ホスファターゼの作動原理と生理機能の解析」, 岡村康司(代表) (2006年-2010年)

科研費基盤研究(A), 「膜電位化学連関の新しい生理メカニズムの解明」, 岡村康司(代表) (2006年-2009年)

科研費特定領域研究(公募), 「新規膜タンパク群による活動依存的シグナル伝達の解明」, 岡村康司(代表) (2006年-2007年)

科研費萌芽研究「新規電位感受性ホスファターゼの生理機能の解明」岡村康司(代表) (2005年-2006年)

光科学技術研究財団「新規電位感受性タンパクにもとづく遺伝コード可能な膜電位蛍光プローブの開発」岡村康司(代表) (2005年-2006年)

上原記念生命科学財団研究助成金「新規分子による膜電位シグナル伝達の解明」岡村康司(代表) (2006年)