

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077013

研究課題名（和文） 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

研究課題名（英文） Mechanisms and physiological roles of voltage-sensing phosphatase

研究代表者

岡村 康司 (OKAMURA YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80201987

研究成果の概要（和文）：Voltage-Sensing Phosphatase (VSP) は、ホヤからヒトまでの動物に共通に保存されているタンパク分子で、分子内に細胞膜電位センサーとして機能する膜貫通領域と、ホスホイノシチド・ホスファターゼとして機能する酵素を併せ持つ。VSP の動作原理と生理的役割を明らかにするため、電気生理学測定による電位センサー機能の計測、*in vitro*でのホスファターゼ活性の生化学的測定、数理シミュレーション、ホスホイノシチドレベルを推測するための蛍光イメージングを組み合わせた解析を行った。その結果、VSP は、ホスホイノシチドである PI(4,5)P₂と PIP₃のイノシトール環上のリン酸を脱リン酸化する酵素活性をもつこと、またこの活性は幅広い膜電位範囲において脱分極の程度に応じて増加することなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Voltage sensing phosphatase gene is conserved in genomes from sea squirt to human. VSP consists of the voltage sensing domain and the cytoplasmic enzyme region that operates as the phosphoinositide phosphatase. Mechanisms of VSP have been examined by integrative approaches including electrophysiology, *in vitro* phosphatase assay, mathematical modeling analysis and imaging analysis. Results showed that voltage sensor activates PI(4,5)P₂ and PIP₃ phosphatase activity upon depolarization and this coupling occurs over the entire range of voltage sensitivity of the voltage sensor. We also found that the state of enzyme affects the motions of the voltage sensor suggesting the presence of retrograde interaction from enzyme to the voltage sensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,500,000	0	14,500,000
2007年度	14,500,000	0	14,500,000
2008年度	15,400,000	0	15,400,000
2009年度	14,200,000	0	14,200,000
2010年度	14,200,000	0	14,200,000
総計	72,800,000	0	72,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオンチャネル、酵素、シグナル伝達、脂質

1. 研究開始当初の背景

電位依存性ホスファターゼ VSP は、ホヤからヒトまで保存されており、電位依存性チャネ

ルの電位センサー領域とイノシトールリン脂質ホスファターゼ構造を併せ持ち、膜電位依存的にホスホイノシチドの脱リン酸化を

制御するというユニークな特性をもつ。この分子はイオンチャネル以外の生理機能を電位センサーが制御する初めての例となるが、その動作原理と生理機能は明らかでない。

2. 研究の目的

膜電位変化を細胞内化学変化へ直接変換する分子内情報伝達機構を明らかにする。種間や関連分子の比較解析とモジュール間の組み換え実験を行い進化過程で脊索動物の生理機能のモダルシフトを可能にした分子基盤を明らかにする。モジュールの人工的な組み替えにより新たな分子機能が創成される可能性を検討する。

3. 研究の方法

酵素活性の膜電位依存特性を調べるため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いてホスホイノシチド感受性蛍光蛋白の光計測と内向き整流性Kチャネルの電流計測を行い、膜電位依存的な酵素活性を計測した。また、*in vitro* でマラカイトグリーンを用いた脱リン酸化活性の定量を行った。電位センサーの動きは、膜電位固定法によりゲート電流の計測により行った。これらに「Virtual Cell (コネチカット大学)」による数値シミュレーションを適用し、 PIP_2 のセンサー蛋白の拡散とVSPの発現量による影響を考慮して各膜電位での酵素活性を算出した。VSPの細胞内領域を他のタンパクに入れ替えたキメラ体を作成し、電位依存的な機能変化が見られるかどうかを検討した。

4. 研究成果

VSPの動作原理と生理機能について、下記の知見を得た。

(1) Ci-VSPの*in vitro*での酵素活性計測により、VSPはPTENと異なり、 $PI(4,5)P_2$ を基質として、5'のリン酸を脱リン酸化することを明らかにした(秋田大学、佐々木雄彦博士との共同研究)。更に、このPTENとの基質特異性の相違が、Ci-VSPの活性中心にあって、すべてのVSPオルソログ分子間で共通に保存されている365番目のグリシンに依存することを見出した。

(2) Ci-VSPは、脱分極により PIP_3 と $PI(4,5)P_2$ を減少させることから、脱分極でホスファターゼ活性が増加すること、また、電位センサーの動く幅広い膜電位範囲全体で、酵素活性が電位センサーの動く程度に応じて変化することを、蛍光イメージング、電気生理実験、数値シミュレーション(コネチカット大学で作成されたVirtual Cellを用いた解析)により、明らかにした。電位依存性イオンチャネルが4つの電位センサーが協調的に働くことによりシャープな電位依存的なイオン電流を作り出し、いわばデジタル

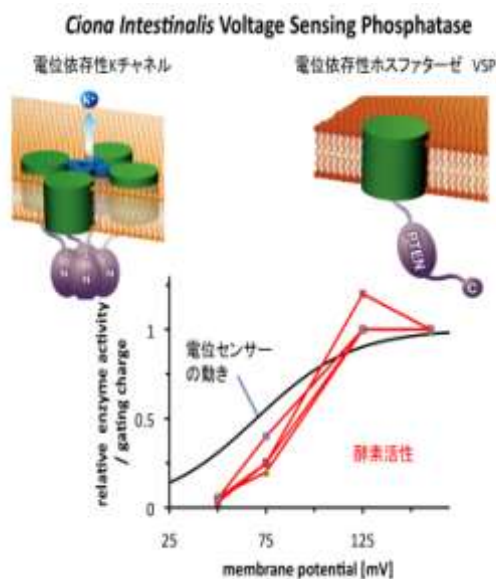
的な信号伝達を効率よく起こす分子デザインであるのに対して、VSPは、ゆるやかな膜電位変化に応じてアナログ的に電気→化学の情報変換を起こして細胞内に信号を伝えるのに適した分子デザインであると考えられた(図を参照)。

(3) 遺伝子発現によってゲート電流が大きく発現することが既に明らかになっていたゼブラフィッシュVSPを、哺乳類培養細胞に遺伝子導入して発現させ、パッチクランプ法によりゲート電流の性質と酵素活性の変化について定量を行った。活性中心のシステインをセリンに置換した変異分子では有意にゲート電流が加速し、ホスファターゼの阻害剤であるバナジン酸の投与でも同様な効果が確認された。この効果は、酵素活性が消失したことで細胞内のホスホイノシチドの環境が変化したためではなかった。このことから、電位センサーの動きにより酵素活性が活性化される一方で、電位センサーの動作の仕方が酵素ドメインの状態により影響を受けることが明らかになった。このことは、この研究期間中にUCバークレーの研究グループから、蛍光シグナルによる電位センサーの動きについての解析がなされ、我々と同様に酵素領域の変異により電位センサーの動きが変化することが示されたことから確認されている。

(4) トリ、カエル、ウニのそれぞれのVSPについてcDNAクローニングを行って、前述と同様の解析を行い、ホヤ、ゼブラフィッシュの特性と比較した。ゲート電流の計測結果の比較から、電位センサーの電位依存性が動物種毎にシフトしており、高等生物になるほど、脱分極側にある傾向があることが明らかになった。また、PLC由来のPHドメインとGFPの融合タンパクを $PI(4,5)P_2$ のセンサーとして用いた計測からトリ由来のVSPおよびカエル由来のVSPでも、ホヤやゼブラフィッシュ由来VSPと同様に $PI(4,5)P_2$ を基質とする酵素活性が保存されていることを確認した。

(5) 酵素領域をサンゴ由来蛍光蛋白に置き換えた分子を構築し、これが、膜電位変化を蛍光信号の変化として検出できるvoltage probeとして利用可能であることを見出した。培養神経細胞、心筋細胞に遺伝子導入を行い2波長での蛍光強度の比を二次元画像として取得して解析することにより、電氣的活動を加算平均なしで取得することに成功した。この分子を心筋特異的に発現させたゼブラフィッシュでは個体レベルで心の拍動に伴う興奮の伝搬が記録できた(理化学研究所宮脇研究室との共同研究)。

図の説明：電位依存性イオンチャネルと電位依存性ホスファターゼの動作原理を比較したもの。電位依存性イオンチャネルが電位センサーを分子内に複数持ち、それらが協調的に働くことでシャープな電位依存的イオン電流の増減を実現しているのに対して、電位依存性ホスファターゼにおいては一つの電位センサーが酵素と共役し、幅広い膜電位範囲で酵素活性を単調増加させる。赤のカーブは、アフリカツメガエル卵母細胞での PIP2 の蛍光イメージングを元に細胞内での拡散などのフィッティングを行い、得られた酵素活性を各膜電位に対して示す (Sakata et al, in press)。黒は、ゲート電流計測から見た電位センサーの動きの量 (電荷) を示す (Murata et al, Nature, 2005 より転用)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

- ① Sakata S, Hossain MI, Okamura Y (2011) Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *The Journal of Physiology*, 589, 2687-705
- ② Okamura Y & Dixon JE (2011) Voltage-sensing phosphatase: its molecular relationship with PTEN. *Physiology*, 26(1), 6-13.
- ③ Ogasawara M, Sasaki M, Nakazawa N, Nishino A & Okamura Y (2010) Gene expression profile of Ci-VSP in juveniles and adult blood cells of ascidian. *Gene Expression Patterns*, 11, 233-8

- ④ Okamura Y, Murata Y & Iwasaki H (2009), Voltage-sensing phosphatase: actions and potentials *J. Physiol. Topical Review*, 587(3) 513-520.
- ⑤ Hossain, M. I. , Iwasaki, H., Okochi, Y., Chahine, M., Higashijima, S., Nagayama K. & Okamura, Y. (2008) Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs *J. Biol. Chem.* 283, 18248-18259.
- ⑥ Iwasaki H, Murata Y, Kim Y, Hossain MI, Worby CA, Dixon JE, McCormack T, Sasaki T & Okamura, Y (2008) A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN, dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7970-7975.
- ⑦ Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y & Miyawaki, A. (2008) Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8, 683-5.
- ⑧ Murata Y & Okamura Y. (2007) Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP2. *J. Physiol.*, 583, 875-889.

[学会発表] (計 73 件)

- ① 岡村康司 電位依存性ホスファターゼ VSP の動作原理 特定領域研究 公開シンポジウム 細胞感覚：セルセンサーのモーダルシフト 2010.12.23 東京
- ② 岡村康司、黒川竜紀、坂田宗平、平郁子、大河内善史、山口真二、小笠原道生、本間光一 電位感受性ホスファターゼの動作原理と役割 第 87 回日本生理学会大会、シンポジウム 2010.5.21 盛岡
- ③ 平郁子、山口 真二、山田マミ、神垣ひろこ、黒川竜紀、岡村康司、本間光一 Avian voltage-sensor containing phosphatase provokes the morphological changes in fibroblasts by its phosphatase activity. 第 82 回日本生化学会 2009.10.24 神戸
- ④ Tsutsui H, Karasawa S, Miyawaki A, Okamura Y, Visualization of electrical activities with a new voltage probe derived from voltage-sensing phosphatase 第 32 回日本神経科学会、シンポジウム、2009.9.17 名古屋
- ⑤ Okamura Y, Mechanisms of physiological roles of voltage sensing proteins without pore structure, Whole Day Symposium, Cell sensors, 36th International Physiological Society Meeting (IUPS), talk, 2009.7.27, Kyoto

- ⑥ Okamura Y, Mechanisms of the voltage-sensor domain proteins. Harbin Conference on Ion Channels in Technology and Drug Discovery, 2009. 7. 15, Harbin, China
- ⑦ Sakata S, Okamura Y, Novel roles of voltage sensor domain discovered from ascidian genome: voltage-sensing phosphatase (VSP) and voltage-gated proton channel (VSOP1/Hv1), 5th International Tunicate Meeting, 2009. 6. 21, Okinawa,
- ⑧ Ratzan WJ, Okamura Y, Jaffe LA. A Voltage Sensitive Phosphatase from *Xenopus Laevis* Testis. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. 3. 4, Boston, USA.
- ⑨ Tsutsui H, Karasawa S, Miyawaki A, Okamura Y. Improved FRET Sensing Of Membrane Voltage With Voltage Sensitive Phosphatase And New Coral Fluorescence Proteins. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. 3. 3, Boston, USA.
- ⑩ 坂田宗平, Hossain MI, 岡村康司 高膜電位における Ci-VSP の電位依存的なホスファターゼ活性の解析. 第 31 回日本神経学会大会 ポスター 2008. 9. 13 東京
- ⑪ 岡村康司, ホヤから見いだされた新規電位センサー蛋白 日本動物学会第 79 回大会シンポジウム「海産動物を用いた基礎生物学エポック研究」、2008. 9. 5 福岡
- ⑫ 岡村康司, Thomas McCormack, 黒川 竜紀, 斎藤成也「電位センサー蛋白の多様性から見た細胞膜電位シグナル伝達機構の進化」、第 10 回日本進化学会シンポジウム 2008. 8. 24 東京
- ⑬ 岡村康司 電位センサードメインの動作原理と生理機能, 第 18 回細胞電気薬理学会 2008. 3. 16, 横浜
- ⑭ Hossain, M. I., Sakata, S., Murata, Y. & Okamura, Y. Voltage range for tuning of phosphatase of Ci-VSP as measured by two PIP2-sensors. 52th Biophysical Society Annual Meeting, poster, 2008. 2. 5, Long Beach (USA)
- ⑮ Okamura Y, Sasaki M, Kurokawa T, Okochi Y, Hossain MI, Iwasaki H, Murata Y & Higashijima S, How do animals utilize signals of membrane potentials? : lessons from two voltage-sensing proteins. the 6th

Okazaki Biology Conference “Marine Biology” 2007. 12. 4 Okazaki, Japan

⑯ Okamura Y, Mechanisms of voltage-sensor domain proteins and insights into physiological significance. Plenary Lecture, Annual Meeting of Neuroscience in Chile 2007. 9. 27 Los Andes, Chile

⑰ Okamura Y, Voltage sensor domain proteins. “Ion channel, structure and function”, European Biophysics Congress, Invited talk 2007. 7. 16 London, UK.

⑱ 村田 喜理, 岡村 康司、電位依存性ホスファターゼ Ci-VSP における、膜電位感知-酵素活性相関の機構 第 84 回日本生理学会大会 Poster 2007. 3. 22 大阪

⑲ Hossain Md I, Higashijima S, Nagayama K, & Okamura Y, Substrate-dependent structural change of the phosphatase domain slows the movement of the voltage sensor in 9 voltage-regulated phosphatases (VSP) Biophys Society meeting, 2007. 3. 3-7 Baltimore, USA

⑳ 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 日本分子生物学フォーラム 2006. 12. 8 名古屋

〔図書〕 (計 3 件)

① 岡村康司 (2010) 膜電位情報をイノシトールリン脂質シグナルへ変換する 膜タンパク質 VSP. 実験医学増刊「脂質生物学」, 100-105.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

①名称: NOVEL ION CHANNEL-LIKE POLYPEPTIDE AND USE THEREOF
 発明者: Noriyuki Satoh, Yasushi Okamura, Hirohide Iwasaki, Yoshimichi Murata
 権利者: 京都大学、自然科学研究機構
 種類: 特許権
 番号: Patent Number 7, 592, 424
 取得年月日: 2009 年 9 月 22 日
 国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 康司 (OKAMURA YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80201987

(2) 研究分担者

東島 眞一 (HIGASHIJIMA SHINICHI)

自然科学研究機構・生理学研究所・准教授

研究者番号：80270479

(H18-H19 まで分担者として参画)

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90435818

岩崎 広英 (IWASAKI HIROHIDE)

自然科学研究機構・生理学研究所・助教

研究者番号：30342752

(H18 まで分担者として参画)