

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02444

研究課題名(和文)電気信号を化学信号に変える電位依存性ホスファターゼVSPの動作機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of VSP, a voltage-dependent phosphatase that convert electrical signals into chemical signals

研究代表者

中川 敦史 (Nakagawa, Atsushi)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：20188890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性脱リン酸化酵素VSPの動作機構の解明を目指した研究を進めた。静止状態の構造解析を目指し様々なコンストラクトや結晶化条件を試みた。構造解析には至らなかったが微結晶を得、さらに良質な結晶を得るための条件検討を続けている。クライオ電子顕微鏡単粒子解析は、領域間の揺らぎが大きく原子構造の決定には至らなかった。電気生理学、蛍光測定、構造モデリングを組み合わせ、2つの疎水性残基が電位センサードメインと細胞質酵素領域のカップリングに重要な役割を果たしていること、S4ヘリックスとそれに繋がるリンカーが1本のヘリックスとして動き活性化に関与するというVSPの活性化機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電位センサータンパク質VSPの動作機構の解明を目指した研究を進めた。静止状態の構造解析を目指し様々なコンストラクトや結晶化条件を試みた。構造解析には至らなかったが微結晶を得ることができ、今後の研究につなげることができた。また、電気生理学、蛍光測定、構造モデリングを組み合わせることで、2つの疎水性残基が電位センサードメインと細胞質酵素領域のカップリングに重要な役割を果たしていること、S4ヘリックスとそれに繋がるリンカーが1本のヘリックスとして動き活性化に関与するというVSPの活性化機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We have conducted research to elucidate the molecular mechanism of the voltage-sensing phosphatase VSP. Various constructs and crystallization conditions were tried for crystal structure determination of the resting state of VSP. Although the structural analysis was not achieved, microcrystals were obtained, and we are continuing to investigate conditions for obtaining better crystals for atomic structure determination. Cryo-EM single particle analysis could not determine the atomic structure due to large domain fluctuations. A combination of electrophysiology, fluorescence measurements, and structural modeling revealed that two hydrophobic residues play an important role in coupling the VSD and the cytoplasmic catalytic region and that the S4 helix and its connecting linker exhibit as a single helix and are involved in activation.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜電位 タンパク質 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

神経伝達や心臓の拍動など様々な生命活動は、細胞内外の電位差によって作り出される電気信号に依存している。この電気信号は、細胞膜内外の電位差に対応してイオンの透過性を変える電位依存性イオンチャネルの働きにより作り出され、従来からその動作原理が生理学的あるいは構造生物学的な視点で精力的に研究されてきた。その一方で、ガルバナタキシス(電場依存的細胞移動)や電場依存的組織修復の現象など、通常の電位依存性チャネルの活性では説明ができない電氣的信号の役割も知られてきた。このような中で、2005年に電位依存性イオンチャネルに類似の電位センサードメインを持ち膜電位依存的に酵素活性(脱リン酸化活性)が制御される電位依存性ホスファターゼ VSP が発見されたこと(Murata *et al.*, *Nature*, 2005)を契機に、膜電位依存的に電位センサードメイン内のプロトン透過を制御する電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1 (Sasaki *et al.*, *Science*, 2006; Ramsey *et al.*, *Nature*, 2006)、膜電位変化を受けて分子間相互によりシグナル伝達を行うことが示唆されるニューロン特異的タンパク質 VSOP2/HVRP1/TMEM266 (Kim *et al.*, *PLOS ONE*, 2014; Papp *et al.*, *eLife*, 2019, Kawai *et al.*, 2022)など、従来から知られていた電位依存性イオンチャネルの働きを超えて、酵素活性やプロトンの透過性の制御など、より幅広い電位センサー依存的シグナル伝達を行う分子が存在することが示されてきた。これらの新規の動作原理は、電気信号の新たな情報伝達機構として、生命科学の新しいパラダイムを切り開くものと考えられている。

VSP は、電位センサー領域 (Voltage Sensing Domain: VSD) とそれに続く細胞質酵素領域 (Cytoplasmic Catalytic Region: CCR) から構成されており、VSD の膜貫通領域を形成する 4 本ヘリックスバンドルの 4 番目のヘリックス S4 が膜電位変化を感じて構造変化を起こし、そのシグナルが CCR に伝わって酵素活性を制御すると考えられている。多くの電位依存性イオンチャネルの構造が解けている現状でも、4 つの電位センサーが組み合わさって機能する電位依存性イオンチャネルでは理解が難しく、単一の電位センサーで機能する VSP のカップリング機構の解明は、創薬の重要なターゲットである電位依存性イオンチャネルスーパーファミリー全体の構造活性相関の理解につながることを期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、電位センサーとそれに続く酵素領域を持つ電位依存性ホスファターゼ VSP の構造生物学研究を通して、電位依存性イオンチャネルや電位依存性プロトンチャネルなど、他の電位センサータンパク質との構造比較などから、電位センサーの基本動作原理を明らかにするとともに、VSP の特徴である膜内の電位センサーの構造変化の情報が細胞内側に伝達される機構を解明することを目指した。

さらに VSP の構造情報を基に、VSP の酵素領域と配列類似性の高いガン抑制因子として知られている PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) との比較を通して、これまでに基質との複合体の構造が得られておらず、詳細な基質結合様式が知られていない PTEN の基質認識機構や反応機構を理解する事も目指した。

3. 研究の方法

本研究では、様々な生物種由来の VSP オルソログをスクリーニングし、様々な活性化状態を示す変異体 VSP を作製し、X線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡端粒子解析により構造決定を行う。そして、静止状態の構造決定から膜電位センサータンパク質が電気信号を化学信号

に変わる機構を原子構造に基づいて明らかにすることを目指した。また、変異体解析により、これまで構造情報の得られていない PTEN の基質認識機構に対する知見を得る事も目指した。

4 . 研究成果

ホヤ由来 VSP (Ci-VSP) および結晶化に成功しているキメラ VSP (DrGg-VSP) 対象として研究を進めた。

構造生物学研究

これまでの研究で開発した、発現量が多く、安定性が高く、活性化状態の結晶構造解析に成功しているゼブラフィッシュ由来電位のセンサードメイン (VSD) と、ニワトリ由来の細胞質酵素領域 (CCR) を持つキメラタンパク質 DrGg-VSP をターゲットとして研究を進めた。従来の研究で膜電位を掛けない状態で静止状態を示す野生型 DrGg-VSP およびを活性中心のシステインをアラニンに置換した不活性型 C302S 変異体について、N 末端を削除したコンストラクトを対象として (図 1) 我々の研究室で開発を進めている結晶化タグ (GFPnanobody: Gnb) などを導入したものを含め、発現・精製・結晶化を進めた。表 1 にターゲットとしたコンストラクトのリストを挙げる。

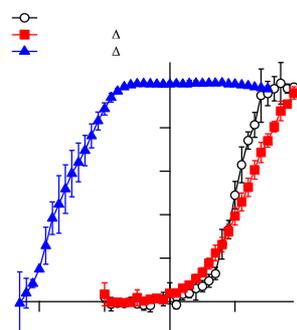


図 1 VSP の野生型 (黒) および結晶構造の得られているコンストラクト (青) の Q-V カーブ

表 1 構造生物学研究の対象としたコンストラクト

DrGgVSP(D270A,30-511)
DrGgVSP(WT,30-511)-Gnb
DrGgVSP(C302S,19-511)-Gnb
DrGgVSP(C302S,30-511)-Gnb
Gnb-DrGgVSP(WT,41-511)
Gnb-DrGgVSP(C302S,41-511)
DrGgVSP(WT,30-511)-MBP
DrGgVSP(WT,30-511)-sfGFP

様々な界面活性剤をスクリーニングした結果、動的光散乱 (DLS) で単分散を示し、ゲルろ過、SDS-PAGE で結晶化に供すことのできる純度であることが確認できる試料調製条件を決定することができた。その中で、Gnb-DrGgVSP(C302S,41-511)と DrGgVSP(C302S,30-511)-Gnb を Decyl maltose neopentyl glycol (DMNG)を用いて精製した試料について、eGFP との複合体を調製し、結晶化スクリーニングを行ったところ、微結晶が得られたため、これらの結晶を用いて SPring-8 の蛋白研ビームライン (BL44XU) で回折実験を行ったが、回折像を観察することはできなかった。

(図 2,3)

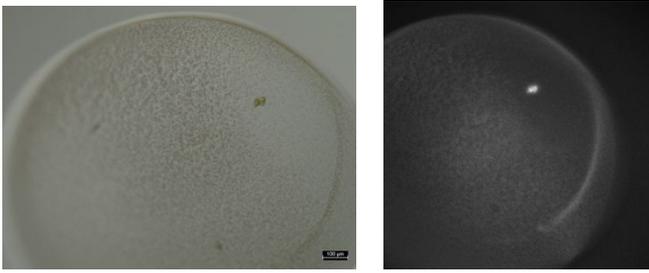


図 2 Gnb-DrGgVSP(C302S,41-511)/eGFP 複合体で得られた微結晶の例(左 : 顕微鏡観察像、右 : UV 顕微鏡観察像)

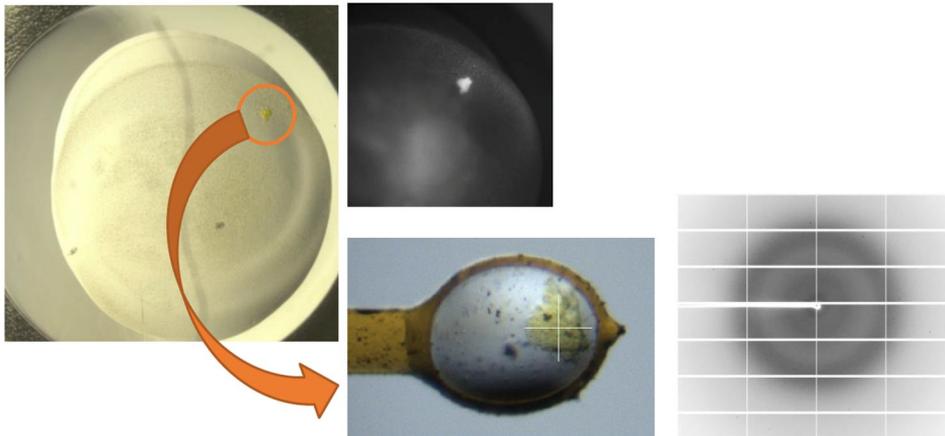


図 3 DrGgVSP(C302S,30-511)-Gnb/eGFP 複合体で得られた微結晶の例(左 : 顕微鏡観察像、中央上 : UV 顕微鏡観察像、中央下 : クライオループ上の結晶、右 : BL44XU で撮影した回折像)

静止状態の VSP の結晶化と並行して、電子顕微鏡による解析も試みた。VSP 単体では分子質量が約 59kDa であり、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析には小さすぎるため、GFPnanobody との融合タンパク質の構造解析を目指した。

DrGgVSP(WT,30-511)-Gnb を glyco-diosgenin (GDN) で可溶化した試料についてネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行ったところ、VSP の 2 つの領域 (VSD, CCR) と GFPnanobody と思われる 3 つのドメインが観察でき、また、VSP が単量体で存在することを確認した

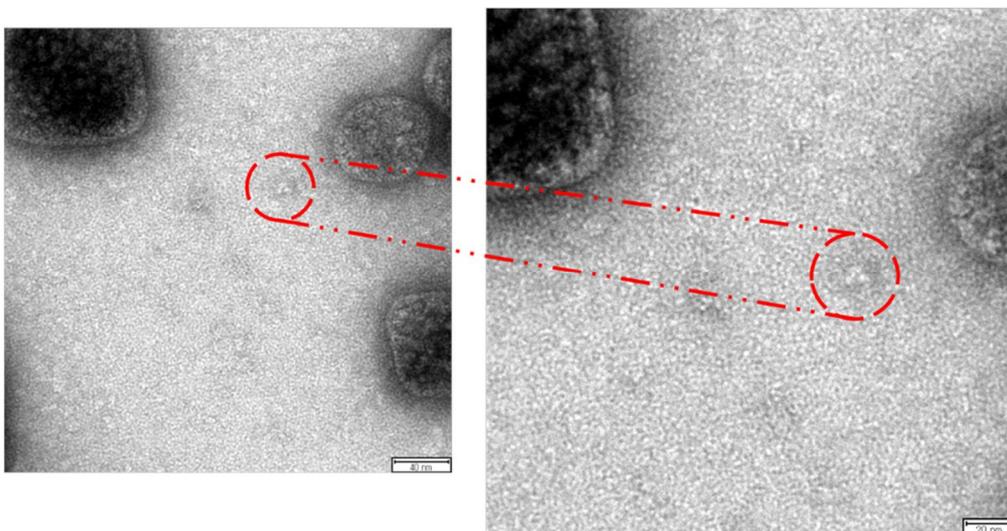


図 4 DrGg-VSP(WT,30-511)-Gnb + sfGFP のネガティブ染色像

左の画像のスケールバーは 40nm を、右の拡大図のスケールバーは 20nm を示す。

続いて、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。Talos Arctica(Themo Fisher Scientific) を用いて撮影した、約 1600 枚の電顕画像から 2 次元クラス平均を行ったところ、細胞質ドメイン、もしくは GFPnonabody 領域、あるいはその両方の揺らぎが大きく、VSD 部分をうまく平均化することができず構造解析には至らなかった(図 5)。

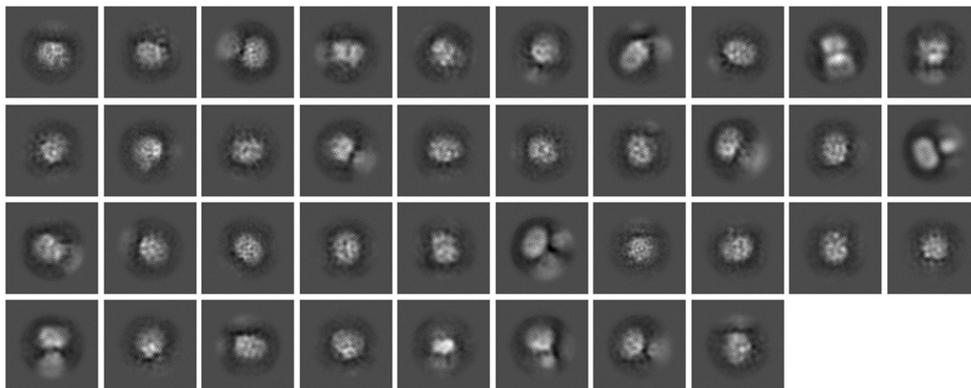


図 5 DrGgVSP(WT,30-511)-Gnb のクライオ電子顕微鏡像の 2 次元クラス平均像

現時点では良質な結晶を得ることができていないが、微結晶の得られた条件を中心にさらに結晶化スクリーニングと試料の最適化を続けている。

機能解析

構造解析と平行して、電気生理学、蛍光測定、構造モデリングを組み合わせたアプローチにより、膜電位変化が酵素活性に与える影響について調べたところ、電位センサードメイン上の S4 の最下流にある 2 つの疎水性残基が、電位センサードメイン (VSD) と細胞質酵素領域 (CCR) のカップリングに重要な役割を果たすことを見いだした。また、Voltage Clamp Fluorometry (VCF) とジスルフィド結合実験により、S4 とその隣のリンカーが 1 本のヘリックス (S4-linker helix) として動き、CCR の hydrophobic spin と呼ばれる領域に近づくことが示された。この結果は、結晶構造解析で得られた活性化状態の構造と一致している。(Mizutani *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2022)

ホヤ由来 VSP (Ci-VSP) の活性中心のシステイン C363 の隣のリシン残基 K364 は種間で高度に保存されているが、タスマニアデビル、コアラ、シカシロアシネズミ由来の VSP ではメチオニンに、オポッサムではロイシンに置換されている。そこで Ci-VSP の 364 位を様々なアミノ酸に変化させた変異体を作製し、電位依存的な脱リン酸化活性を測定したところ、この部位の違いによる電位依存的な酵素活性の変化が明らかになった。これらの結果から、PIP 脱リン酸化酵素の基質選択性を理解することで、新たな分子ツールの設計が期待されると考えている。(Paixao *et al.*, *Biophys. J.*, 2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizutani Natsuki, Kawanabe Akira, Jinno Yuka, Narita Hirotaka, Yonezawa Tomoko, Nakagawa Atsushi, Okamura Yasushi	4. 巻 119
2. 論文標題 Interaction between S4 and the phosphatase domain mediates electrochemical coupling in voltage-sensing phosphatase (VSP)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2200364119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2200364119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawai, T., Narita, H., Konno, K., Akter, S., Andriani, R.T., Iwasaki, H., Nishikawa, S., Yokoi, N., Fukata, Y., Fukata, M., Wiriyaserkul, P., Kongpracha, P., Nagamori, S., Takao, K., Miyakawa, T., Abe, M., Sakimura, K., Watanabe, M., Nakagawa, A., Okamura, Y.	4. 巻 479
2. 論文標題 Insight into the function of a unique voltage-sensor protein (TMEM266) and its short form in mouse cerebellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1127 ~ 1145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20220033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Paixao Ian Costa, Mizutani Natsuki, Matsuda Makoto, Andriani Rizki Tsari, Kawai Takafumi, Nakagawa Atsushi, Okochi Yoshifumi, Okamura Yasushi	4. 巻 122
2. 論文標題 Role of K364 next to the active site cysteine in voltage-dependent phosphatase activity of Ci-VSP	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2267 ~ 2284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2023.01.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Atsushi Nakagawa
2. 発表標題 Structural studies of voltage-sensing phosphatase
3. 学会等名 The 17th conference of Asian Crystallographic Association (AsCA2022)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Nakagawa
2. 発表標題 Structural studies of voltage-sensing phosphatase
3. 学会等名 International Symposium on Structure and Folding of Disease Proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Nakagawa
2. 発表標題 Structural studies of voltage-sensing phosphatase
3. 学会等名 2023 Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Nakagawa
2. 発表標題 Structural studies of voltage-sensing phosphatase
3. 学会等名 26th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷 夏希、川鍋 陽、神野 有香、成田 宏隆、米澤 智子、中川 敦史、岡村 康司
2. 発表標題 電位依存性ホスファターゼVSPは電位センサー・酵素両ドメイン間の直接相互作用により分子内で膜電位情報を酵素活性に変換する
3. 学会等名 生理研研究会「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Nakagawa
2. 発表標題 The atomic structure of voltage sensing phosphatase reveals substrate recognition mechanism
3. 学会等名 The 101th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	米澤 康滋 (Yonezawa Yasushige) (40248753)	近畿大学・先端技術総合研究所・教授 (34419)	
研究分担者	岡村 康司 (Okamura Yasushi) (80201987)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------