

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700446

研究課題名（和文） 電位依存性ホスファターゼにおける電位センサーと酵素活性の共役メカニズムの解明

研究課題名（英文） The study of the coupling mechanisms between the voltage sensor and the enzymatic activity of voltage-sensing phosphatase, VSP

研究代表者

坂田 宗平（SAKATA SOUHEI）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：40528006

研究成果の概要（和文）：電位依存性ホスファターゼ、VSPは、電位センサー部分で膜電位変化を感知し、細胞内の酵素ドメインが脱リン酸化活性を発揮する。本研究では、電位センサーのどのような動きが VSP の酵素活性に繋がるのか検討を行った。その結果、電位センサーが完全に活性化しなくとも酵素活性を発揮することが分かった。一方、電位依存性イオンチャンネルでは、電位センサーが完全に活性化したときのみ、ポアが開口することが知られている。本研究は電位センサーの新たな性質を明らかにしたと言える。

研究成果の概要（英文）：Voltage-sensing phosphatase, VSP consist of the voltage sensor and the phosphatase domain. In this study, we have investigated how the voltage sensor of VSP regulates its phosphatase activities. Our results indicate that not only full activation but also partial activation of the voltage sensor triggers the phosphatase activity. This means that the mechanisms to regulate the phosphatase domain by the voltage sensor is not consistent with those to regulate the activity of ionic pore by the voltage sensor in conventional voltage-gated ion channels. Our research provided new insight into the nature of voltage sensors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：イオンチャンネル、膜電位、イノシトールリン脂質、電位センサー、ホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の電気的な興奮は、生体において重要なシグナルの一つとして働いている。特にニューロンや心筋において、活動電位の形成と伝搬はその働きの本質である。活動電位の形成と伝搬は電位依存性イオンチャンネル、とくに電位依存性のナトリウムチャンネル、およびカリウムチャンネルによって行われている。これらのイオンチャンネルは細胞膜の電気的な興奮を引き金にして、細胞膜のイオンの透過率を大きく変えることができる。電位依存性

イオンチャンネルは膜電位を感知するドメインである電位センサーと、イオン透過路であるポアドメインから成り立っている。膜電位変化を感知すると、電位センサーが動きポア（穴）を開口させて、細胞膜のイオン透過率を大きく変化させる。これまで電位センサーは C 末端側にはポアドメインを持つタイプしか知られておらず、電位依存性イオンチャンネル固有のドメインであると考えられてきた。しかしながら、申請者が所属するグループは 2005 年と 2006 年に相次ぎ、電位センサ

一の C 末端側にポアドメインを持たない新規のタンパク質を発見した。1つはポアドメインの代わりに脱リン酸化酵素を持ち、電位依存性のホスファターゼとして働くもの (VSP)、もう1つは電位センサーのみでポアドメインを持たないにも関わらず、電位依存性プロトンチャネル(VSOP)として働くタンパク質である。このうち VSP は細胞内のセカンドメッセンジャーとして広く知られているイノシトールリン脂質を電位依存的に脱リン酸化する機能を持つことが分かった(Nature,2005)。つまり VSP のホスファターゼドメインは、電位センサーの動作が引き金になって、酵素活性を発揮するものと考えられる。これまでの研究により、電位センサーを持つタンパク質である電位依存性カリウムチャネルでは、電位センサーが完全に活性化したときのみ、イオンが透過するポア(穴)が開くことが知られている。しかしながら VSP における電位センサーと酵素活性の関係については、未だほとんど研究がなされていない。最近我々は、VSP の電位依存的な酵素活性を定量的に計測することにより、酵素活性の電位依存性と、電位センサーの電位依存性がよく一致することを見出した(Sakata et al., 2011)。このことは VSP は電位センサーが動いた分だけ、酵素活性を発揮する可能性を示唆しており、VSP の電位センサーと酵素活性の関係は、これまでよく研究されてきた電位依存性カリウムチャネルの電位センサーとポアドメインの関係とは異なる可能性が考えられる。しかしながら、どちらのモデルがより正しいのか、今のところ不明である。

2. 研究の目的

これまでの研究により、電位依存性カリウムチャネルでは、電位センサーが完全に活性化しときのみポアが開くことが分かっている。しかしながら最近の我々の研究により、VSP では電位センサーが完全に活性化しなくても、活性化の大きさに応じて酵素活性を発揮している可能性が示唆された。もしこの仮説が正しければ、我々は電位センサーの新たな性質を見出したことになる。そこで、この仮説の真偽を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

一般に電位センサーの状態は、不活性化状態と活性化状態の2状態遷移で説明される。我々はゼブラフィッシュ由来のVSPにおいて、電位センサー部分に2か所変異を導入することにより、不活性化状態から活性化状態に移行する途中に、安定な中間状態を持つ変異体を作成することに成功した (Dr-VSP(DM))。我々はこの変異体の酵素活性を計測するこ

とで、先の仮説の真偽を検討した。つまり不活性化状態から中間状態への電位センサーが移行した際、酵素活性を発揮すれば、電位センサーは完全に活性化しなくても、VSPは酵素活性を発揮できることになり、先の仮説は正しいことになる。

本研究では、酵素活性を計測する前に、電位センサーの動きを詳細に計測し、Dr-VSP(DM)の電位センサーが、安定な中間状態を持っていることを確認した。電位センサーの動きは、以前から行われてきたゲート電流を測定する方法に加え、voltage clamp fluorometry (VCF) の方法で検出した。VCFの方法とは、電位センサーの細胞外側に蛍光色素を部位特異的に取り付け、蛍光強度の変化を利用して電位センサーの動きを検出する方法である (図1)。

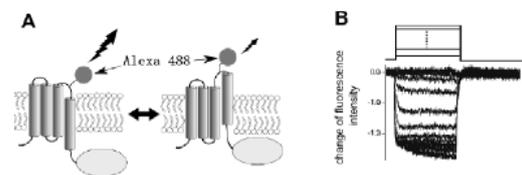


図1. Voltage clamp fluorometry (VCF)

A. Alexa Fluor 488を電位センサー(S3-S4リンカー)に結合させて、蛍光強度の変化を計測する。

B. 膜電位変化に依存した蛍光強度変化

また酵素活性は、内向き整流性カリウムチャネルを用いて、電気生理学的に計測する方法(図2)、およびPI(4,5)P2と特異的に結合

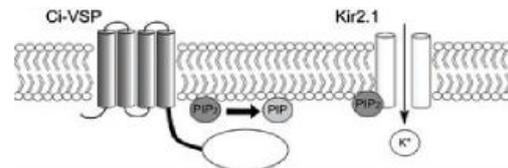


図2. カリウムチャネルを用いたVSPの酵素活性の計測

することが知られている PH domain に GFP を融合させたタンパク質を用いて、細胞表面の PI(4,5)P2 を可視化することで測定した(図3)。

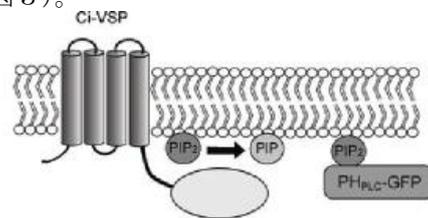


図3. PHD-GFPを用いた酵素活性の計測

カリウムチャネルを使用する方法は、これまで Xenopus の卵母細胞をを発現系として利用して行っていたが、今回は培養細胞を用いた系で初めて酵素活性の計測を行った。なお PH domain を用いた方法は、これまでどおり Xenopus の卵母細胞を利用して行った。

4. 研究成果

まず、今回作成したゼブラフィッシュ由来 VSP の変異体、Dr-VSP (DM) の電位センサーの動きを計測した。ゲート電流の計測を元に、電位センサーの電位依存的な動きを算出したところ、図4に示すとおり、二段階の動きをすることが分かった。これはこの変異体の

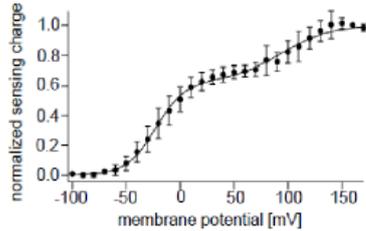


図4. Dr-VSP (DM) の電位センサーの電位依存的な動き
電位センサーは完全に活性化する途中に、安定な中間状態を持つことを示唆している。また計測したゲート電流を詳細に観察すると、100mV より高い電位において、低い電位で見られていた速い成分に加えて遅い成分が出現することが分かった (図5)。kinetics を

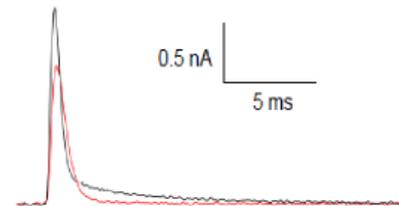


図5. 低い電位では速い成分しか存在しないが、高い電位では速い成分に加えて遅い成分が存在する。
黒; 160 mVに脱分極させたときのゲート電流
赤; 100 mVに脱分極させたときのゲート電流

解析し、電位センサーの電位依存性に重ね書きすると、遅い成分の出現は、電位センサーの二段階目の動き、つまり中間状態から完全な活性化状態に移行する動きが現れる電位と一致することが分かった (図6)。このこ

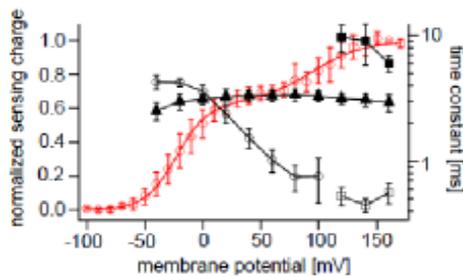


図6. 電位センサーの動きの電位依存性とkineticsの比較。
赤○; 電位センサーの電位依存性。
黒○, ■, □; ゲート電流のkinetics。
電位センサーの二段階目の動きの出現と、ゲート電流の遅い成分の出現のタイミングが同じであることが分かる。とはDr-VSP (DM) の電位センサーは、不活性化状態から中間状態に移行する際は速いものに対し、中間状態から完全な活性化状態への移行は比較的ゆっくりしていることを示している。

さらに Dr-VSP (DM) の電位センサーの動きを蛍光を使用する方法、voltage clamp

fluorometry で検出したところ、電位依存的な蛍光強度の減少が観察された (図7)。ま

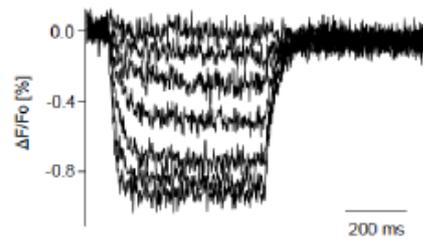


図7. Voltage clamp fluorometryの方法によるDr-VSP (DM) の電位センサーの動きの計測した蛍光が減退する kinetics を解析したところ、低い電位では速い減少しか計測されなかったが、高い電位では速い減少に加えて、ゆっくりとした蛍光の減少が観察された (図8)。遅い蛍光の減少が現れる膜電位はゲー

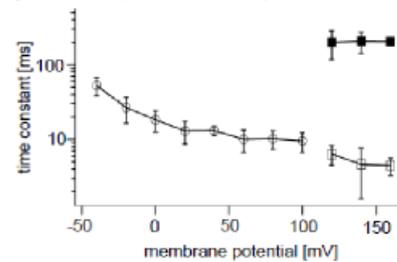


図8. Voltage clamp fluorometryの計測における蛍光の減退のkineticsの解析。
ゲート電流の計測結果と同様に100mV超える電位で、遅いkineticsが出現する。

ト電流において遅い成分が現れる電位とよく一致した。つまり Voltage clamp fluorometry を用いた計測により、Dr-VSP (DM) の電位センサーは2段階の動き方し、最初の動きに比べて、2段階目の動きは遅い動きであることが分かった。また、これは Dr-VSP (DM) は不活性化状態と完全な活性化状態の間に安定な中間状態を持つことも示している。

次に我々は、Dr-VSP (DM) の酵素活性を計測した。PI (4, 5) P2 依存的な活性を持つ内向き整流性チャネルである Kir3.4 (S143T)、および Kir2.1 を使用して計測を行ったところ、電位依存的なチャネル活性の低下が観察された。この結果を Dr-VSP (DM) の電位依存性と重ね書きすると、電位センサーの不活性化状態から中間状態への移行、および中間状態から完全な活性化状態に移行の両方で Dr-VSP (DM) は酵素活性を発揮していること

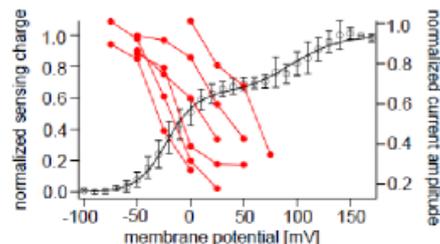


図9. Kir3.4 (S143T) を用いて計測した酵素活性と Dr-VSP (DM) の電位センサーの電位依存性の比較。
黒; 電位センサーの電位依存性
赤; 酵素活性の電位依存性

が分かった (図 9, 10)。

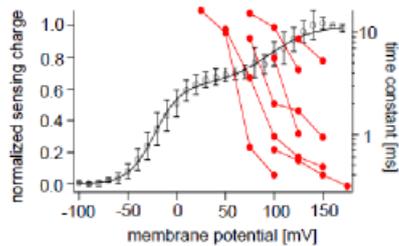


図10. Kir2.1を用いて計測した酵素活性とDr-VSP (DM)の電位センサーの電位依存性の比較。黒; 電位センサーの電位依存性 赤; 酵素活性の電位依存性

以上の結果は、VSPの酵素活性は電位センサーが完全に活性化しなくても発揮されることを示している (図 11)。これまでよく研

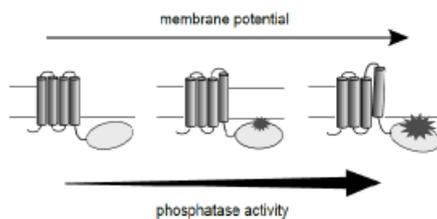


図11. VSPの酵素活性の大きさは、電位センサーが動いた大きさに比例して発揮される。究されてきた電位依存性イオンチャネルでは、電位センサーが完全に活性化されたときのみ、ポアの開口が引き起こされることが分かっている。つまりVSPの電位センサーと酵素活性の共役のメカニズムは、電位依存性イオンチャネルの電位センサーとポアドメインの関係とは異なっており、今回の研究は電位センサーの今まで知られていなかった機能の一端を明らかにしたものと言える。

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3件)

・ Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma, KJ, Sasaki T and Okamura Y.

3' Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P₂] by voltage-sensing phosphatase (VSP).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2012), **19**, 10089-10094. 査読有

・ Matsuda M, Takeshita K, Kurokawa T, Sakata S, Suzuki M, Yamashita E, Okamura Y and Nakagawa A.

Crystal structure of the cytoplasmic phosphatase and tensin homolog

(PTEN)-like region of *Ciona intestinalis* voltage-sensing phosphatase provides insight into substrate specificity and redox regulation of the phosphoinositide phosphatase activity.

J.Biol.Chem. (2011) **286**, 23368-23377. 査読有

・ Sakata S., Hossain MI., and Okamura Y.

Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity.

J.Physiol. (2011) **589**, 2687-2705. 査読有

[学会発表] (計4件)

・ 坂田宗平、岡村康司

電位依存性ホスファターゼVSPの酵素活性は電位センサーの動いた大きさに応じて段階的に発揮される。

第90回日本生理学会大会、東京、船堀
2013年3月28日

・ Souhei Sakata and Yasushi Okamura

Graded tuning of phosphatase activity of VSP coupled with the intermediate state of the voltage sensor.

57th Annual Meeting of Biophysical Society, Philadelphia, USA. Feb. 4th, 2013.

・ 坂田宗平, Md. Israil Hossain, 岡村康司

電位依存性ホスファターゼ(VSP)の電位センサーの変異体における電位依存性酵素活性の計測

第89回日本生理学会大会、長野、松本
2012年3月29日

・ 坂田宗平、岡村康司

PI(4,5)P₂の可視化と数理モデルの適用による電位依存性ホスファターゼCi-VSPの酵素活性の計測

第88回日本生理学会大会、神奈川、横浜
2011年3月28日

[図書] (計1件)

坂田宗平、岡村康司

「電位依存性ナトリウムチャネル」
脳科学辞典 (電子書籍)、理化学研究所、分担執筆

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 宗平 (SAKATA SOUHEI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号: 40528006