

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253016

研究課題名(和文) 電位センサータンパクにおけるモジュール間共役機構の解明

研究課題名(英文) Domain-to-domain coupling in voltage sensor domain proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,760,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではこれまで我々が蓄積してきた電位センサータンパクに関する構造機能連関の知見を基盤とし電位センサー同士(VSOP/Hv1)または他のモジュールと(VSP)共役する分子機構を明らかにすることで、機能性タンパクのモジュール間共役の共通原理の理解へと繋げることを目指した。VSP内の電位センサーモジュールと酵素モジュールの連関についてはall or noneの二状態間の遷移でなく中間状態を経る形式で共役することを明らかにした。VSOP/Hv1のX線結晶構造解析により詳細な立体構造を明らかにすることに成功し電位センサー同士が相互作用する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Toward understanding general principle of domain-to-domain coupling in membrane proteins, we have exploited advantages of voltage-sensor domain proteins including voltage-gated proton channel (VSOP/Hv1) and voltage-sensing phosphatase. Approach of electrophysiology, voltage clamp fluorometry of cysteine-based method as well as fluorescent unnatural amino acid incorporation based on the genetic method enabled to reveal intermediate state of enzyme coupled to partially activated voltage sensor in VSP. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel was solved at 3.45 angstrom resolution as the zinc bound closed state, showing two S4 helices running straight next to each other within dimer in membrane which formed continuous helix down to the dimer cytoplasmic coiled coil at the C-terminus.

研究分野：分子生理学、神経科学

キーワード：イオンチャネル 酵素 膜電位

1. 研究開始当初の背景

(1)申請者らは電位センサーが分子内にポアドメイン以外のモジュール構造をもつタンパクとして電位依存性ホスファターゼ VSP を同定し、電位センサーモジュールが、膜電位変化により酵素モジュールを制御してイノシトールリン脂質の動態を制御することを明らかにしてきた。また電位センサーのみからなるタンパク VSOP/Hv1 を同定し、これが血球細胞での活性酸素産生を調節する電位依存性プロトンチャンネルの分子実体であり、電位センサードメインが膜電位感知とプロトン透過の二重の働きを持つこと、更にダイマー内で二つの電位センサーが協調的にゲーティングを調節すること等を明らかにした。

(2)これらを通して、従来電位依存性チャンネル中で機能する特殊な構造と考えられてきた電位センサードメインはモジュール組み合わせの様式の違いで多彩な信号伝達が生み出されることを確立した。しかしその詳細な分子メカニズムの解明には到っていなかった。

2. 研究の目的

(1)これまでに申請者らが蓄積してきた電位センサータンパクに関しての構造機能連関の知見を基盤とし、電位センサー同士または電位センサーと他のモジュールと共役する分子機構を明らかにし、機能性タンパクのモジュール間共役の共通原理に迫ることを目指す。

(2)VSP については膜電位の違いによって生じる酵素機能(活性の変化と基質選択性)に着目し、モジュール間共役の機構を解析し、VSOP/Hv1 については構造基盤に基づいた電気生理学的解析や蛍光プローブを用いた解析などを組み合わせ、電位センサーモジュール間が協調する動的仕組みを統合的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)安定した電位センサーの中間状態を示す変異体 T156R/I165R を用いて、電位依存的な基質選択性の変化を、これまでに確立してきた電気生理学的手法と蛍光イメージング手法により計測し定量化した。

(2) tRNA synthetase と amber suppressor tRNA をコードするプラスミド pAnap をアフリカツメガエル卵母細胞に顕微注入し、Ci-VSP の細胞内領域の TAG コドンに対応する部位に蛍光非天然アミノ酸 Anap を遺伝学的に導入した。光電子増幅管を用いた顕微測光により膜電位変化にともなう細胞内領域の構造変化を検出する系を構築し、モジュール局所の構造変化を検出した。

(3)X 線結晶構造解析を VSOP/Hv1 について進めるとともに、電気生理学的解析を密に連携させ、電位センサードメイン間の協調的相互作用の動態とプロトン透過路の構造と動態

を解明した。

4. 研究成果

(1)VSP については、電位センサーの中間状態を経て二段階に動く変異体を用いて電位センサードメインの動きと、PtdIns(4,5)P₂ 依存的 Kir チャネル活性を指標とした酵素活性を定量的に比較した結果、電位センサーの中間状態において中間の酵素活性が出現することを明らかにした。このことから電位センサーの程度に応じた graded な酵素活性調節が行われると結論した。有尾類の比較生理学的解析からカスミサンショウウオの VSP オルソログは C2 ドメインを欠いており、電位依存性酵素活性を失っており、Ci-VSP で同様に C2 ドメインを欠失させると酵素活性が消失したことから、細胞質ドメインで C2 ドメインは酵素活性に必須であることを突きとめた。

(2)ドメイン間共役を明らかにする上で細胞内領域の構造変化を直接検出することは極めて重要である。そこで蛍光性非天然アミノ酸 Anap を遺伝学的に導入する Peter Schultz らの手法をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に導入した。光電子増幅管を用いて膜電位固定下で脱分極に伴う信号をアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させた Anap 導入 VSP タンパク質から記録する実験系を確立した。またノイズシグナル比を上げるための計測プロトコルを確立した(図1)。これらによる Anap 蛍光の電位依存的変化の計測から、これまで構造変化が予測されていたホスファターゼドメインに加えて、従来動くことが想定されていなかった C2 ドメインも構造変化を起こすことを明らかにした。またこの電位センサーの動きにより誘導される C2 ドメインの蛍光変化は、ホスファターゼドメインの動きと同じ程度の膜電位変化からの潜時で生じており、また、基質の存在に依存し蛍光シグナルが変化することが明らかになった。このことは、C2 ドメインがホスファターゼドメインと強く共役して酵素活性の調節に寄与することを示した。

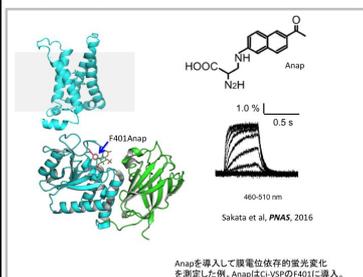


図 1

(3)C2 ドメインに導入した Anap の蛍光シグナルの膜電位依存的変化は低い電位での蛍光減少と高い電位での蛍光増加の 2 相性の様式を示したことから、酵素モジュールは静止状態と活性化状態の中間の状態をとることが明らかになった。また Anap と DPA を FRET のペアとして用いた計測から、電位センサーモジュールの動きにともなう酵素モジュール

と膜との距離には変化が見られなかった。このことから電位センサーモジュールは酵素モジュールの膜との相対的位置を変えるのではなく、酵素の局所構造を変化させることで活性を制御するモデルが支持された(図2)。

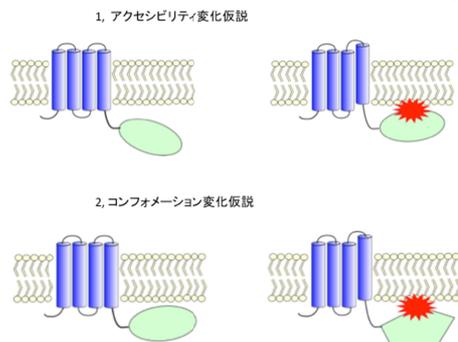
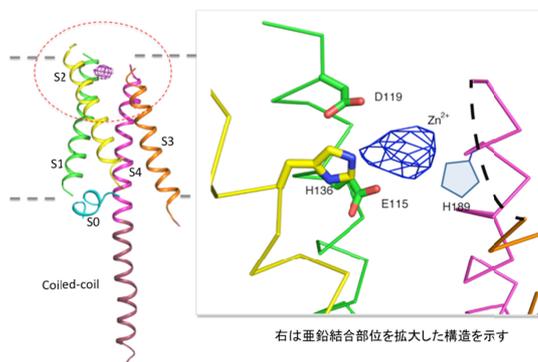


図 2

(4)VSOP/Hv1 については研究分担者中川博士らとともに、VSP および zinc finger タンパク質 GCN4 とのキメラ分子について X 線結晶構造解析を行い、3.45 Å の分解能で構造を解くことに成功した(図3)。



電位依存性プロトンチャネルのX線結晶構造の決定 Takeshita et al, Nat Struct & Mol Biol, 2014

図 3

解かれた構造はゲーティング抑制剤として知られている亜鉛イオンが結合した構造であることが判明した。また水のアクセシビリティのプロファイルを推定したところ、これまでに PEGylation Protection 法により明らかにした 0 mV での親水性分子のアクセスの結果と類似した。また電位感知に重要な構造である S4 中の塩基性アミノ酸の位置は、R2 と R3 が疎水性シールドを形成する S2 のフェニルアラニン (F146) よりも下の位置にあった。これらの知見から、得られた構造は、静止状態の構造であると推定された。この構造では S4 同士が隣接しており、coiled coil 領域と一貫したヘリックス構造をとっており、膜貫通領域間および coiled coil でドメイン間共役が生じている可能性が考えられた。一方、S4 と coiled coil の間のリンカーの長さを一残基ずつ変化させ変異体の活性化速度と協調性の解析を行ったところ、ヘリックスの周期に対応してゲーティングの変化が

周期的に見られた。更にダイマー内の共役機構を変異導入実験と電気生理計測により解析し S4 に存在する tryptophan がモノマー間で直接相互作用することを明らかにした。

(5)VSP と VSOP/Hv1 に共通する仕組みとして、ドメインとドメイン間のリンカー構造が重要な役割を果たす場合とインターフェースを介するドメインドメイン間の非共有結合性の相互作用の両方が重要であることが明らかになった。前者は VSP の電位センサードメインと酵素ドメインの間のリンカー部分の構造変化、VSOP/Hv1 においては電位センサードメインと coiled coil ドメインの間のリンカー部分の構造変化が該当し、後者は VSP の酵素ドメインと C2 ドメイン間、VSOP/Hv1 の 2 つの電位センサードメイン間、の相互作用が該当する。VSP については細胞質領域の局所構造の変化を蛍光変化として検出可能になったことで、今後モジュール間相互作用の詳細な分子機構を明らかにできると期待される。また VSOP/Hv1 は待望の立体構造が得られたことで、今後変異導入実験や計算化学的アプローチを同期させて解析することで、詳細な構造活性相関の知見が得られると期待される。

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 19 件)

Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, Özkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura Y.

Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating. *Biochim Biophys Acta*. 2016 1858(12):2972-2983. 査読有, doi:10.1016/j.bbamem.2016.09.008.

岡村康司, 電位依存性プロトンチャネルにおけるプロトン透過機構について, *生物物理*, 2016 年 5 月, 56(3) 154-158, 査読有 Okuda H, Yonezawa Y, Takano Y, Okamura Y, Fujiwara Y. Direct Interaction between the Voltage Sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H⁺ Channel Dimers. *J Biol Chem*. 2016 291(11):5935-47. 査読有, doi:10.1074/jbc.M115.666834.

Kawanabe A, Okamura Y. Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells. *J Physiol*. 2016 594(3):595-610. 査読有, doi:10.1113/JP271274.

Okochi Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, Okamura Y. The

voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J Leukoc Biol.* 2016 99(1):7-19. 査読有, doi:10.1189/jlb.3HI0814-393R.

竹下浩平, 岡村康司, 中川敦史. 電位依存性プロトンチャネル(VSOP)の結晶構造から考察するプロトン漏洩制御機構、2015, 生化学, 87(5):625-8. 査読有

Okamura Y, Fujiwara Y, Sakata S. Gating mechanisms of voltage-gated proton channels. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:685-709. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034307. 査読有

Berthier C, Kutchukian C, Bouvard C, Okamura Y, Jacquemond V. Depression of voltage-activated Ca²⁺ release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase. *J Gen Physiol.* 2015 145(4):315-30. 査読有, doi:10.1085/jgp.201411309.

Fujiwara Y, Okamura Y. Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels. *Curr Top Membr.* 2014;74:259-92. 査読有, doi:10.1016/B978-0-12-800181-3.00010-5.

Tsutsui H, Jinno Y, Tomita A, Okamura Y. Rapid evaluation of a protein-based voltage probe using a field-induced membrane potential change. *Biochim Biophys Acta.* 2014 1838(7):1730-7, 査読有, doi:10.1016/j.bbamem.2014.03.002.

Mutua J, Jinno Y, Sakata S, Okochi Y, Ueno S, Tsutsui H, Kawai T, Iwao Y, Okamura Y. Functional diversity of voltage-sensing phosphatases in two urodele amphibians. *Physiol Rep.* 2014 2(7). pii:e12061. 査読有, doi:10.14814/phy2.12061.

Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 21(4):352-7. 査読有, doi:10.1038/nsmb.2783.

Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology.* 2014 82(12):1058-64. 査読有, doi:10.1212/WNL.0000000000000239.

Fujiwara Y, Kurokawa T, Okamura Y. Long helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H(+) channel. *J Gen*

Physiol. 2014;143(3):377-86. 査読有, doi:10.1085/jgp.201311082.

Sakata S, Okamura Y. Phosphatase activity of the voltage-sensing phosphatase, VSP, shows graded dependence on the extent of activation of the voltage sensor. *J Physiol.* 2014 592(5):899-914. 査読有, doi:10.1113/jphysiol.2013.263640.

Itsuki K, Imai Y, Hase H, Okamura Y, Inoue R, Mori MX. PLC-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J Gen Physiol.* 2014 143(2):183-201. 査読有, doi:10.1085/jgp.201311033.

Kurokawa T, Okamura Y. Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: a study with PEGylation protection. *Biochim Biophys Acta.* 2014 1838(1PtB):382-7. 査読有, doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.001.

Fujiwara Y, Takeshita K, Nakagawa A, Okamura Y. Structural characteristics of the redox-sensing coiled coil in the voltage-gated H⁺ channel. *J Biol Chem.* 2013 288(25):17968-75. 査読有, doi:10.1074/jbc.M113.459024.

Tsutsui H, Jinno Y, Tomita A, Okamura Y. Optically detected structural change in the N-terminal region of the voltage-sensor domain. *Biophys. J.* 2013 105(1):108-15. 査読有, doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.051.

[学会発表](計57件)

河合喬文、宮田治彦、中西広樹、坂田宗平、有馬大貴、宮脇奈那、大河内善史、渡辺雅彦、崎村建司、佐々木雄彦、伊川正人、岡村康司、マウス精子における電位依存性ホスファターゼの機能、第93回日本生理学会大会、2016.3.22-24、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

川鍋陽、神野有香、坂田宗平、岡村康司、膜脂質と相互作用する可能性のある相同領域による電位依存性ホスファターゼ VSP と PTEN の機能制御、第93回日本生理学会大会、2016.3.22-24、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Okamura Y. How is VSP's enzyme activity activated by intrinsic voltage sensor? RECI V 5th Spanish Ion Channel Network Meeting, 2015.10.4-6, Barcelona (Spain)

岡村康司. 最小イオンチャネル Hv1/VSOP による貪食細胞の活性酸素産生の多重制御、日本バイオイメージング学会シンポジウム、2015.9.28、東京理科大学(東京都葛飾区)

Okamura Y, Molecular mechanisms of voltage sensing phosphatase, VSP、岡崎統合バイオサイエンスセンター サマースクール2015 "Development of Biosensing Research"、2015.8.12-13、岡崎カンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

Okamura Y, Fine tuning of neutrophil activities by the voltage-gated proton channel, Hv1, The 5th International Ion Channel Conference, 2015.6.26-28、瀘州（中華人民共和国）

岡村康司、電位センサー機能の多様性と共通原理について、分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」、2015.4.20、岡崎カンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

岡村康司、電位依存性プロトンチャネル VSOP1/H1 の動作原理、第91回日本生理学会大会、2014.3.18、鹿児島大学 郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）

Okamura Y, Voltage-sensor domain proteins: phosphonositide signal, proton permeation and molecular tools. Symposium Talk, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014.2.17、サンフランシスコ（米国）

など

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 康司 (OKAMURA, Yasushi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80201987

(2) 研究分担者

中川 敦史 (NAKAGAWA, Atsushi)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号：20188890

藤原 祐一郎 (FUJIWARA, Yuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20532980

筒井 秀和 (TSUTSUI, Hidekazu)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：30392038

坂田 宗平 (SAKATA, Souhei)
大阪大学・大学院医学系研究科・
招へい教員
研究者番号：40528006