様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月　 ２ 日現在

機関番号：３４４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2015
課題番号：２５８６０１６３

研究課題名（和文）電位依存性ホスファターゼが膜電位変化に応じて基質を変える分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the substrate selectivity in Voltage-sensing phosphatase

研究代表者
坂田　宗平（SAKATA, Souhei）

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：４０５２８００６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：電位依存性ホスファターゼは膜電位依存的にイノシトールリン脂質を脱リン酸化する。VSPは種々のイノシトールリン脂質を基質に持つが、最近の我々の研究により、低い膜電位ではPI(3,4,5)P3を脱リン酸化し、高い電位ではPI(3,4)P2を脱リン酸化することが示唆された。しかしながらその分子メカニズムは、全く不明であった。本研究では脱リン酸化に関わっている酵素領域に非天然アミノ酸を利用して蛍光ラベルを導入することで、膜電位と酵素領域の構造変化の関連を調べた。その結果、酵素領域のCα2 loopと呼ばれる部分が基質の選択性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Voltage-sensing phosphatase, VSP, has an activity to dephosphorylate several kinds of phosphoinositides in a voltage-dependent manner. Our recent study has shown that VSP mainly dephosphoryltaes PI(3,4,5)P3 in low membrane voltages but dephosphorylates PI(3,4)P2 in high voltages. However, little is know about the molecular mechanisms how the membrane voltage regulates the substrate specificity of VSP. In this work, I introduced a fluorescent label using the method of the genetic incorporation of a fluorescent unnatural amino acid to reveal the conformational change of the catalytic region which is responsible for the dephosphorylation activity. Results showed that Cα2 loop located in the catalytic region plays key roles in the substrate specificity in VSP.

研究分野：生理学

キーワード：膜電位　イノシトールリン脂質　非天然アミノ酸　電位依存性ホスファターゼ

１．研究開始当初の背景

細胞膜は電気的に興奮し、特に神経細胞や心筋細胞では膜の興奮は情報の伝達に本質的な役割を担っている。細胞膜電位は膜上に発現しているイオンチャネルのイオン透過性が変わることで変化する。中でも電位依存性イオンチャネルは膜電位依存的にイオン透過性を変えるタンパク質であり、活動電位の形成と伝達に必須である。電位依存性イオンチャネルは電位センサーとイオンを透過させるポアドメインから成り立っており、膜電位が変わると電位センサーがそれを感知してポア（穴）の開閉を制御する。しかしながら 2005 年に新規のタンパク質として発見された電位依存性ホスファターゼ（以下 VSP と略す）は、電位依存性イオンチャネルと相同性の高い電位センサー部分を持ちながら、ポアドメインを持たず、代わりに脱リン酸化活性を発揮する酵素領域を持つ。これまでの研究により VSP は膜電位依存的に酵素活性を変化させることが示され、電位依存的な酵素として働くことが分かっている。VSP はイノシトールリン脂質を脱リン酸化する。イノシトールリン脂質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分子であり、生理的に非常に重要な物質である。イノシトール環のリン酸基がつく場所や数により、イノシトールリン脂質は複数の種類が存在する。VSP は種々のイノシトールリン脂質のうち PI(3,4,5)P3, PI(3,4)P2, PI(4,5)P2 を脱リン酸化する。イノシトールリン脂質は個々に役割、および細胞内分布が異なっており、VSP が細胞内で実際どのイノシトール脂質を代謝しているか知ることは、VSP の生理的な意義を知る上で、本質的なことである。最近、我々のグループは個々のイノシトールリン脂質の動態を蛍光で計測する方法を用いて、細胞膜上に発現した VSP の膜電位依存的な酵素活性を計測した(Kurokawa et al.,2012)。その結果、低い電位では PI(3,4)P2 が増大するが高い電位では逆に PI(3,4)P2 が減少することを見出した。これは低い膜電位では VSP は主に PI(3,4,5)P3 を、高い膜電位では PI(3,4)P2 を基質として認識していることを示唆する。酵素領域における基質選択性が、異なるドメインである電位センサーにより制御されるメカニズムは、非常に興味を引くところであるが、これまでのところそのメカニズムは全く分かっていない。

２．研究の目的

上に述べたとおり、VSP は複数のイノシトールリン脂質を脱リン酸化するが、最近、膜電位つまり電位センサーの動きが基質の選択性に関与していることが示唆された。基質選択性は VSP の生理学的意義を考える上で重要であり、また電位センサーの動きがどのように基質選択性に関連した酵素領域の動きを制御しているか明らかにすることは意義深い。そのため本研究では、膜電位に応じてどのように酵素領域がその構造変化させるのか調べることで、電位センサーが VSP の基質の選択性にどのように関わっているのか明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

膜電位依存的な構造変化を検出するには、VSP を細胞膜上に発現させた状態で構造変化を検出する必要がある。これまで細胞膜上に発現させたイオンチャンルの構造変化は、蛍光ラベルを導入することで検出されてきた。しかし従来の方法では、細胞膜の外側に面した部分にしか蛍光ラベルを導入することができず、細胞内ドメインである酵素領域を蛍光ラベルすることはできない。そのため、本研究では蛍光を持つ非天然アミノ酸、Anap を遺伝的な方法で酵素領域に組み込み、Anap の蛍光変化を検出することで構造変化を計測することを試みた。Anap およびそれを遺伝的に組み込む方法は The Scripps Research Institute の Peter Schultz 博士らのグループが開発したものを応用した(Chatterjee et al. 2014)。タンパク質の合成に過程において、まずアミノ酸は tRNA と複合体を形成する（図１）。この複合体がリボソームに移行し tRNA はそのアンチコドンに対応するコドンの部分で mRNA と結合し、アミノ酸がポリペプチドに受け渡され、タンパク質が合成されていく。非天然アミノ酸を遺伝的に挿入する方法では、生物が内在的に持っているこのシステムを利用する。まず非天然アミノ酸および、この非天然アミノ酸を特異的に認識するアミノアシル tRNA 合成酵素（図１）、およびこの酵素に特異的に認識される tRNA の３種類を人工的に作成する。この３者を細胞内に導入すると非天然アミノ酸と tRNA の複合体が形成される。さらにこの tRNA は TAG のコドンを認識するように作成されているため、この３者および非天然アミノ酸を組み込むターゲット部位を TAG に変異させた mRNA を細胞内に導入することで、目的タンパク質の狙った部位に非天然アミノ酸を組み込むことができる（図２）。しかしながら、この方法はまだ新規に開発されたばかりであり、これまでこの方法を使ってタンパク質の構造変化を調べた研究報告はほとんどない。そのためまずこの方法を確立することから本研究課題を遂行した。まず Xenopus oocyte の発現系において、蛍光を持つ非天然アミノ酸 Anap を、VSP に組み込めるかどうか確かめ

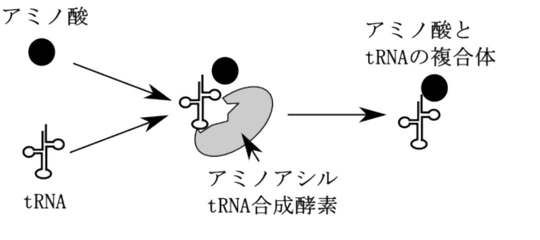

図１．アミノ酸とtRNAの複合体の形成
アミノ酸とtRNAの複合体の形成にはアミノアシル tRNA合成酵素が必要である。

た。VSP では電位センサーの４番目の膜貫通ヘリックスが電位依存的に動くことが知られている。そこでまずこの部分に Anap を導

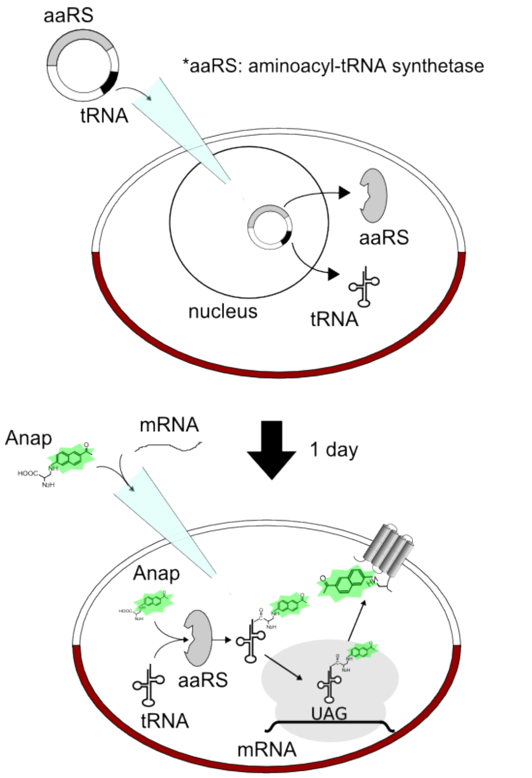

図２．Xenopus oocyteにおける非天然アミノ酸Anapを遺伝的に組み込む方法

入し、電位依存的な蛍光輝度の変化が見えるかどうか試した。試行錯誤の結果、我々は電位依存的な蛍光輝度の変化を検出し、Xenopus oocyte の発現系においてこの方法を適用することに成功した。そこで酵素領域に Anap を組み込んで、本研究の目的である膜電位依存的な酵素領域の構造変化を調べた。

４．研究成果

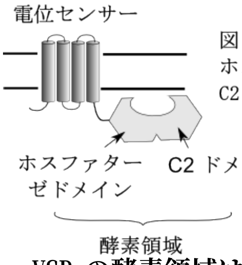

図３．VSPの細胞内酵素領域はホスファターゼドメインとC2ドメインにより形成されている。

VSP の酵素領域は電位センサーに近い方からホスファターゼドメイン、それから C2 ドメインの２つのドメインから形成されている(図３)。最近の研究により、ホスファターゼドメインに存在する gating loop と呼ばれる構造が電位センサーと連動して動く可能性が示された。まずそれが正しいかどうか調べるために gating loop に Anap を組み込んだところ、電位依存的な Anap の蛍光輝度の変化が検出された（図４）。さらに C2 ドメインに存在する 515 loop および Cα2 loop と呼ばれる部分にそれぞれ Anap を組み込んだところ蛍光輝度の変化が検出された。これらは膜電位依存的に VSP の酵素領域が構造変化していることを初めて明瞭に示した実験結果であり、大変意義のある結果だと考えている。

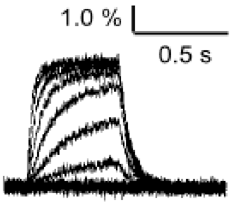

図４．膜電位依存的なAnapの蛍光輝度の変化

また２つのドメインにおいて Anap の蛍光輝度変化の立ち上がりのタイミングを見積もったところ、ホスファターゼドメインと C2 ドメインのいずれに組み込んだ場合においても、脱分極刺激に対して数ミリ秒の遅れがあり、２つのドメイン間で差がなかった。C2 ドメインは電位センサーから離れた場所に位置しているにも関わらず、より電位センサーの近くに位置するホスファターゼドメインと動き出すタイミングが同じであることから、酵素領域を形成する２つのドメインはバラバラに動くのではなく、ほぼ一体となって動くと考えられる。

ここまでの結果は電位センサーが酵素領域の構造変化を誘起することを示している。しかしながらもう一つの可能性として、酵素の基質は細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質であるため、電位センサーが基質が埋まっている細胞膜と酵素領域の距離を変えることで、酵素活性を制御している可能性が考えられる。そこで我々は細胞膜を色素（DPA）で染色し、VSP に組み込んだ Anap と DPA の間で FRRT と呼ばれる現象を観測した。我々の行った FRET の実験では細胞膜と酵素領域の距離が近いと Anap の蛍光輝度が減少し、遠くなると逆に増加する。電位センサーを動かした時に蛍光輝度が変化するかどうかで、酵素領域と細胞膜の距離が変化するかどうか判断した。また同様に電位センサーが動かない変異体でも測定し、電位センサーが通常通り動くものとで比較することで、電位センサーの動作と蛍光輝度変化の相関を明瞭になるようにした。結果として、電位センサーが動くものと動かないもので違いがなかった（図５）。このことから電位セン

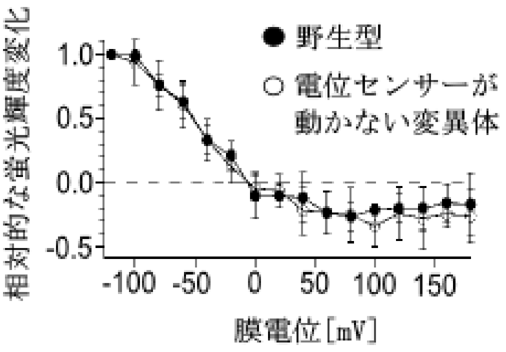

図５．FRET実験における膜電位依存的な蛍光輝度の変化

サーは酵素領域と細胞膜の距離を変えるのではなく、その構造変化を促すことで酵素活性を引き出していることが分かった。

VSP はその活性を発揮すると基質を代謝する。ここまでの研究では、基質の量や代謝活性が構造変化に与える影響を排除し、電性センサーが酵素活性のスイッチを入れるまでの構造変化を調べるために、酵素活性中心に点変異を入れて酵素活性を持たないもので実験してきた。ここまでの研究により構造変化に関する知見が集まったので、次に本研究の主眼である膜電位と基質の選択性を調べた。そのために酵素活性を持つ VSP において、活性を持たないもので行ったのと同様に Anap を様々な場所に組み込み蛍光輝度変化を計測したところ、C2 ドメインの Cα2 loop と呼ばれる場所に Anap を組み込むことで Cα2 loop が２段階の動きをすることが分かった。つまり電位が低い時は蛍光輝度が減少するが、電位が高い場合が逆に蛍光が増加することを見出した（図６）。この蛍光輝度の増減が反転する電位は 50～60mV であり、先行研究で我々が明らかにした基質の選択性が変わる膜電位と同じ電位であった。つまり Cα2 loop が基質の選択性に深く関与している可能性が高いと考えられる。

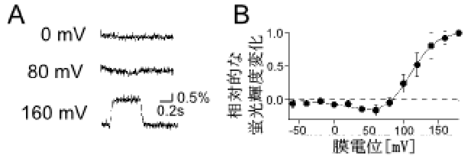

図６. Cα２ loopにおける蛍光輝度変化
A. 0, 80, 160mVの各電位における蛍光輝度変化。
B. 蛍光輝度変化の電位依存性。50mV周辺で一度輝度が減少し、その後増加に転じていることが分かる。

さらに高い電位での蛍光輝度変化の時間経過を詳細に検討すると、脱分極刺激を与えた直後に大きく蛍光輝度が上昇するが、そのすぐ後に比較的ゆっくりと輝度が減少する

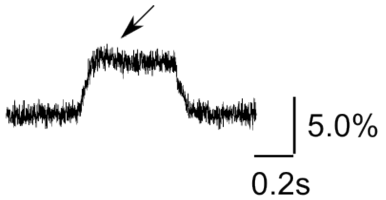

図７. 高い電位における２種類の蛍光輝度の変化。
矢印で示したとおり大きな蛍光の増加の後に緩やかな現象が見られる。

ことがわかった（図７）。この緩やかな輝度の減少は酵素活性を失った変異体では見られなかった。よってこの減少は酵素の活性中心に基質が結合したのちに、実際に基質が脱リン酸化する過程の構造変化を検出していると考えられる。つまり VSP の酵素は電位センサーが動くことで酵素領域の活性中心に基質が入り込み、その後脱リン酸化活性を発揮する過程で、C2 ドメインに存在する Cα2 loop が動作すると考えられる（図８）。VSP において直接脱リン酸化活性に関連した構造変化が明らかにされるのはこれが初めてのことであり、たいへん意義深い。今回の研究により、これまでほとんど注目されていなかった Cα2 loop が、基質の選択性だけでなく、脱リン酸化活性そのものにも大きく関与していることが明らかになった。今後、Cα2 loop の酵素活性における重要性をより詳細に調べて行きたいと考えている。

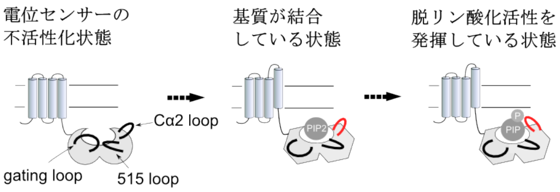

図８. 本研究により明らかになった酵素活性を発揮する際のＣα２ loopの動き

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５件）

１、Okamura Y., Fujiwara Y., <u>Sakata</u> S. **Gating mechanisms of voltage-gated proton channels.** （2015）*Annual Reviews of Biochemistry* 84, 685-709, DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034307 査読有

２、Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, <u>Sakata S</u>, 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 (2014). **A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1.** *Neurology* 82(12): 1058-1064. doi: 10.1212/WNL.0000000000000239 査読有

３、Takeshita K, <u>Sakata S</u>, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y& Nakagawa A (2014). **X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel.** *Nat. Struct. & Mol. Biol.*, 21(4):352-357 doi:10.1038/nsmb.2783 査読有

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

５、Yamaguchi S, Kurokawa T, Taira I, Aoki N, Sakata S, Okamura Y & Homma KJ. (2014). **Potential role of voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of PI(3,4)P2.** *J. Cell Physiol.*, 229(4):422-433.
doi: 10.1002/jcp.24463.　**査読有**

〔学会発表〕（計４件）
１、Souhei Sakata , Meghan Mott, Victor Mari Luna, Kimberly Epley and Fumihito Ono
ゼブラフィッシュの神経筋接合部を用いたシナプスホメオスタシスの分子メカニズムの研究
第９３回日本生理学会大会、北海道、札幌
2016年3月22日

２、坂田宗平、岡村康司
蛍光を持つ非天然アミノ酸を利用した電位依存性ホスファターゼの酵素ドメインの電位依存的な構造変化の検出
第９２回日本生理学会大会、兵庫、神戸
2015年3月２１日

３、坂田宗平、宮脇奈那、黒川竜紀、岡村康司
活性化速度の異なるウニおよびマウスVSOP/Hv1 の比較による電位依存的ゲート機構
第９１回日本生理学会大会、鹿児島、鹿児島
2014年3月16日

４、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、電位センサーの活性化レベルに応じて段階的に発揮される
第１０６回近畿生理談話会、奈良、橿原
2013年11月2日

〔その他〕
日本生理学会、入澤宏・彩記念若手研究奨励賞　（2015年3月22日）

６．研究組織
(1)研究代表者
坂田　宗平（SAKATA SOUHEI）
大阪医科大学医学部・講師
研究者番号：40528006