

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） Operating mechanisms of voltage-sensing phosphatases

研究代表者

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

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：酵素、シグナル伝達、生体分子、生理学、蛋白質

1. 研究計画の概要

電位依存性ホスファターゼ VSP は、電位依存性チャン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から成り、電位依存的に酵素活性を変化させる。2つのモジュールが組み合わさることで、電位依存的酵素活性が生みだされる原理を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

酵素ドメインの構造変化による電位センサー機能の変化のメカニズム

電気生理学的計測とイメージング計測により、VSP が PIP2 を脱分極時に脱リン酸化することを見いだした。ゲート電流の計測が容易なゼブラフィッシュの VSP について酵素ドメインの様々な変異や欠失ミュータントを作成し、酵素活性とゲート電流の両方を計測した両ドメインが強く共役していることを明らかにした。

リンカー領域の構造と役割

リンカー領域を様々に改変した分子を作成し、ゲート電流の計測と酵素活性の計測を行った。リンカー部分 16 アミノ酸の前半 8 アミノ酸のうち、前後 4 つのアミノ酸のいずれを欠失してもカップリングが失われることを明らかにした。

基質特異性の決定機構の解明

PTEN と VSP の基質特異性が異なる分子基盤をマラカイトグリーンアッセイや TLC による解析により明らかにした。VSP の G365 のグリシンが、5' ホスファターゼ活性に必須であることを見だし、PTEN との基質特異性の分子基

盤となっていることを見いだした。

高域値での酵素活性の定量

膜電位センサーモジュールのダイナミックレンジと酵素活性の電位依存性の関係を、PHD-GFP を用いたホスホイノシチドのイメージングとカリウムチャンネルをセンサーとした電流記録により明らかにした。酵素活性は電位センサーの動きと単調増加関係にあり電位センサーとの強い共役が存在することが裏付けられた。このように幅広い電位依存性を有し分子のポテンシャルとして +100 mV を超える非生理的な高電位において酵素活性をチューニングできる特性をもつことが明らかになった。

モジュール組替えによる新規分子機能の発現

酵素領域を蛍光蛋白に置き換えることで、膜電位変化を蛍光信号の変化として検出できる蛋白の創成に成功した（理化学研究所との共同実験）。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

（理由）当初計画した研究のうち、各モジュールの特性を明らかにする部分がほぼ完了した。さらに予想外の進展として、高域値での酵素活性を計測することに成功し、電位センサーの動く程度に相関して酵素活性が変化することが明らかになった。これにより、今後電位センサーと酵素の共役過程を、電位依存性イオンチャンネルにも共通の原理として解明できると期待される。

4. 今後の研究の推進方策

今後、PTEN とのキメラ分子を作成し、電位依存的共役に関わる部位の特定を行って、動作原理の解明に迫る予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

① Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine, M, Higashijima S, Nagayama K & Okamura Y. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs J. Biol. Chem. 283, 18248-18259. (2008).

② Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y & Larsson HP. Multimeric nature of voltage-gated proton channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105(26):9111-6. (2008).

③ Iwasaki H, Murata Y, Kim Y, Hossain MI, Worby CA, Dixon JE, McCormack T, Sasaki T & Okamura Y. 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. (2008).

④ Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y & Miyawaki A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. Nature Methods, 8,683-5. (2008).

⑤ Murata Y & Okamura Y. Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in Xenopus oocytes coexpressing sensors of PIP2. J. Physiol. , 583, 875-889. (2007).

⑥ Okamura Y. Biodiversity of voltage sensor domain proteins. (review) Pflugers Archiv.,454(3):361-71. (2007)

⑦ Sasaki M, Takagi M & Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel, Science, 312(5773), 589-92. (2006).
など

[学会発表] (計 33 件)

① VSOP Protein Lacking the C-terminal Half of S4-like Segment Retains Proton Permeation.黒川竜紀、高木正浩、坂田宗平、大河内善史、岡村康司 Biophysical society meeting、ポスター(2009.3.3)

② 電位依存性プロトンチャネルの動作機構。黒川竜紀、コッホ ハンス、高木正浩、大河内善史、佐々木真理、ラーソン ピーター、岡村康司 第32回日本分子生物学会年会 第82回日本生化学会大会合同大会 神戸、口頭(2008.12.12)

③ Biochemical characterization of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes. Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Kurokawa T & Okamura Y. 42nd Annual Scientific Meeting of the European Symposium of Clinical Investigation, Geneve, Switzerland. 口頭(2008.3.29)

④ Biochemical characterization of voltage-gated proton channel, VSOP, in phagocytes. Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki, Kurokawa T & Okamura Y. 42nd Annual Scientific Meeting of the European Symposium of Clinical Investigation (Geneve, Switzerland). 口頭(2008.3.28)

⑤ Voltage range for tuning of phosphatase of Ci-VSP as measured by two PIP2-sensors. Hossain MI, Sakata S, Murata Y & Okamura Y. 52th Biophysical Society Annual Meeting, (Long Beach, USA).ポスター (2008.2.5)

⑥ Voltage-gated proton channels. Okamura Y. "Voltage-dependent proton channels: come of age", 16th IUPAB International Biophysics Congress, *Biophysical Journal*, vol. 94, issue 2, pp. 587-588 (Long Beach, USA). 口頭 (2008.2.5)

⑦ How do animals utilize signals of membrane potentials? lessons from two voltage-sensing proteins. Okamura Y, Sasaki M, Kurokawa T, Okochi Y, Hossain MI, Iwasaki H, Murata Y & Higashijima S: the 6th Okazaki Biology Conference: "Marine Biology", (Okazaki, Japan). 口頭(2007.12.4)

⑧ Mechanisms of voltage-sensor domain proteins and insights into physiological significance. Okamura Y. Plenary Lecture, Annual Meeting of Neuroscience in Chile (Los Andes, Chile). 口頭(2007.9.27)
など

[図書] (計 2 件)

① Okamura Y., Handbook of Neurochem. and Mol. Neurobiology 3rd Ed. Volume1 Ed. By Mikoshiba K. (印刷中)

② 標準生理学 第4版 医学書院