

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 6 月 7 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23650210
 研究課題名（和文）電位依存性ホスファターゼに基づく膜タンパク質電位作動性のスクリーニング
 研究課題名（英文）Screening of voltage-sensitive proteins using Voltage-Sensing Phosphatase, VSP

 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

研究成果の概要（和文）：電位感受性ホスファターゼ VSP の細胞内の局所の構造変化によって酵素活性が制御されるという特性を生かし多様な膜タンパクの膜電位感受性を検出する分子ツールを開発することを目指した。膜タンパクの電位依存性スクリーニングに適するホスファターゼ構造を明らかにした。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて各キメラ分子の解析を電気生理学的に行い、C2 ドメインに電位依存的活性をチューニングする部位が存在することを見出した。この部分の改変により酵素活性を正常の酵素より増加させることに成功した。酵素領域を他の VSP の電位センサー領域に融合させた蛋白を作成し電位センサー特性で規定される膜電位依存的酵素活性を得た。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a functional screening system for novel voltage-sensitive membrane protein modules through making a chimeric protein with voltage-sensing phosphatase. First, we identified Ci-VSP as the most suitable among VSP orthologs for developing the system, since readout of PI(4,5)P2 phosphatase activity was most remarkable. Ci-VSP was remodeled into a form in which enzyme activity was more remarkably enhanced by membrane voltage. Other voltage sensors were fused to the cytoplasmic region of Ci-VSP to acquire chimeric voltage sensing phosphatases.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学、生体分子、蛋白質、電位センサー、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

膜電位信号を伝達するタンパクとしては電位センサー構造をもつ電位依存性イオンチャネルが知られてきた。生体膜の膜電位は、1mmの厚みに換算すると5kVもの電圧に相当し、全ての膜タンパクがこの大きな電場に曝されていることを考えると、電位変化に応じて構

造を変化させるタンパクは従来の電位センサータンパク以外にも存在すると予想される。実際、神経伝達物質トランスポーター分子やGタンパク共役型受容体の複数で、脱分極により機能が変化する例が知られてきた

(Mahaut-Smith et al, Trends Pharm. Sci.,29; 2008)。平滑筋では脱分極刺激により muscarinic AChR を活性化することで細胞内 Ca 放出が誘導され (Liu et al, PNAS, 106;2009)、血小板ではP2Y 受容体が脱分極により活性化される。またミトコンドリア膜上のキナーゼPINK1はミトコンドリア膜の電位依存的にタンパク分解から免れ、Perkin タンパクを介するミトコンドリアの除去に繋がる。これ以外にも未知の電位感受性が存在する可能性が考えられ常に膜電位の変動する状況に曝されており、酵素活性が膜電位変化により影響を受ける可能性がある。

2. 研究の目的

これまで膜電位に応じて信号伝達を起こす仕組みとして電位依存性イオンチャネルが知られて来たが、最近GPCR などの膜タンパクが膜電位感知機能をもつことが知られ膜電位変化で作動する膜タンパクが幅広く存在する可能性がある。我々が同定した電位感受性ホスファターゼVSP の細胞内の局所の構造変化によって酵素活性が制御されるという特性を生かし多様な膜タンパクの膜電位感受性を検出する分子ツールを開発することを目指す。

3. 研究の方法

VSP の細胞内領域をさまざまなGPCR やトランスポータータンパクなどの膜タンパクの細胞内側に接続させたキメラ体を作製し、膜電位変化に伴う酵素活性の変化を指標として、膜電位感受性を調べることが可能な系を検討する。

4. 研究成果

(1)膜タンパクの電位依存性スクリーニングに適するホスファターゼ構造を明らかにするため、電位センサーのC末端側にヒトPTEN様ホスファターゼ領域を融合させたキメラを作成し、酵素活性を膜電位依存的に変化されるかを検討した。発現系細胞において PLC-delta-PHドメイン-GFP融合分子または

OSBP-1-PHドメイン-GFP融合分子と共発現させたところ、脱分極に伴う変化を認めたものの、その変化は微弱であった。PTENとVSPの基質結合ポケットの異なるアミノ酸配列を変更し、PTENがPI(4,5)P2を脱リン酸化できるように変更することを試みたところ、この特性は変化しなかった。これらから電位依存的な活性を酵素変化として検出するには、現在明らかになっているVSPの細胞内領域を用いることが最適であることが確認された。

(2) VSPの酵素領域のどの領域に、電位依存的調節を仲介する構造が存在するかを明らかにすることでプローブモジュールを最適化できることを期待し、PTENとVSPとのキメラ分子を作成し、電位依存的な活性の比較を行った。これには、蛋白質研究所中川研究室と共同で解明した細胞内領域のX線結晶構造を元にしてPTENと構造が異なる部位に注目することで解析を行った。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて各キメラ分子の解析を電気生理学的に行い、C2ドメインに電位依存的活性をチューニングする部位が存在することを見出した。更にC2ドメインに様々な部位の変異導入を行った結果C2ドメインのループ構造を構築する部位の基部においてアミノ酸変異させることにより酵素活性を正常の酵素より増加させることに成功した。

(3) 本研究の実施中米国のグループによって Ci-VSPの細胞内領域のX線結晶構造解析により基質結合ポケットの大きさが異なる2つの構造が明らかになり基質結合部位の構造を規定する部分を含むgating loopと呼ばれる構造が電位センサーと酵素間のリンカー部分PBMと相互作用するモデルが提唱された。このモデルではPBMと酵素ドメイン内が特定の構造を形成することで酵素領域が電位センサーの構造変化によって制御される。その場合VSPに固有のS4直下での構造変化でのみ酵素活性

の調節が行われる。どのような電位センサーの構造変化が酵素活性の活性化をもたらすのかを明らかにするため魚類VSPの様々な電位センサーの変異体を作成しS4に2点の変異を導入した分子が二段階で電位センサーが動き、中間状態を示すことを見出した。

(4) ホヤのVSPの電位センサーに、トリのVSPの酵素領域を連結したキメラ分子を作成し、電位依存的酵素活性の電位依存性がホヤVSPの特性で決まることを確認した。

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 11 件)

Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M, Okamura Y. (2012). Autoimmune disorder phenotypes in HVCN1 gene deficient mice. *Biochem. J.*, 450(2):295-301.

Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Nakagawa A, Larsson HP, Okamura Y. (2012). Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H⁺ Channel. *J. Physiol.*, 591:627-40.

Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T & Okamura Y. (2012). 3' phosphatase activity toward PI(3,4)P2 by voltage-sensing phosphatase, VSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(25):10089-94.

Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A & Okamura Y. (2012). The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺

channel Hv1. *Nature Communications*, 3:816. doi: 10.1038/ncomms1823.

Nakajo K, Nishino A, Okamura Y, Kubo Y (2011). KCNQ1 subdomains involved in KCNE modulation revealed by an invertebrate KCNQ1 orthologue. *J. Gen. Physiol.* 138(5):521-35.

Matsuda M, Takeshita K, Kurokawa T, Sakata S, Suzuki M, Yamashita E, Okamura Y, Nakagawa A (2011). Crystal structure of the cytoplasmic PTEN-like region of Ci-VSP provides insight into substrate specificity and redox regulation of the phosphoinositide phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 286(26):23368-77.

Sakata S, Hossain MI, Okamura Y (2011). Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J. Physiol.*, 589(11):2687-705. など

[学会発表] (計 48 件)

Okamura Y (2012.2) Gordon Research Conference "Protons and Membrane Reactions". Invited talk (Ventura, USA).

Okamura Y (2012.7.3) "Secret lives of voltage-sensing phosphatases", Gordon Research Conference "Bio-electro-chemistry", (Lucca, Italy)

Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Nakagawa A, Okamura Y (2013.3.27) Regulatory roles of the dimeric structure in the voltage-gated H⁺ channel. *J. Physiol. Sci.*, 63, Suppl 1, S55.

(日本生理学会第90回大会、2013.3.27-29、東京)

Okamura Y. (2013.3.29) How excited to talk with PI?: Lesson from voltage-sensing phosphatase. *J. Physiol. Sci.*, 63, Suppl 1, S97. (日本生理学会第90回大会、2013.3.27-29、東京)

Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Shigeo H, Homma K, Sasaki T, Okamura Y. (2013.3.28) Substrate specificity of the voltage-sensing phosphatase (VSP) changes with membrane potential. Suppl. S192. (日本生理学会第90回大会、2013.3.27-29、東京)

Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T, Okamura Y, 3' (2012.12.14-16) Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P₂] by voltage-sensing phosphatase (VSP). 日本生化学会 福岡

Sakata S, Okamura Y. (2013) Graded tuning of phosphatase activity of VSP coupled with the intermediate state of the voltage sensor. *Biophys. J.* 104(2) pp.277a.

Loustau T, Legrand C, Berthier C, Okamura Y, Jacquemond V. (2013) Calcium transients in muscle fibers expressing voltage-sensitive phosphoinositide phosphatases. *Biophys. J.* 104(2) pp.291a

Mutua J, Jinno Y, Ueno S, Sakata S, Okochi Y, Tsutsui H, Iwao Y, Jaffe L, Okamura Y.

(2013) Physiological genomics of amphibian VSP: a potential molecular mechanism of electrical block of fertilization in vertebrates. *J. Physiol. Sci.*, 63, Suppl 1, S251. (日本生理学会第90回大会、2013.3.27-29、東京) など

[図書] (計4件)

Okamura Y. (2012) Voltage-gated proton channels., In: Edward H. Egelman, editor: *Comprehensive Biophysics, Vol 6, Channel Proteins*, Montal, M. Oxford: Academic Press, pp.199-222.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/okamura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1) 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

(2) 研究分担者

大河内 善史 (OKOCHI YOSHIFUMI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90435818