

中川 敦史

大阪大学蛋白質研究所
教授

新規細胞膜電位シグナルの構造基盤の解明

§ 1. 研究実施体制

(1)「中川」グループ(大阪大学)

- ① 研究代表者:中川 敦史 (大阪大学蛋白質研究所, 教授)
- ② 研究項目
 - ・ 電位依存的酵素活性を有した VSP のX線結晶構造解析
 - ・ VSP と各種基質との複合体の構造解析
 - ・ VSOP2 の結晶構造解析
 - ・ 試料調製

(2)「岡村」グループ(大阪大学)

- ①主たる共同研究者:岡村 康司 (大阪大学大学院医学系研究科, 教授)
- ② 研究項目
 - ・ VSP の細胞内領域の構造変化を検出するための, 非天然アミノ酸蛍光分子導入法を用いた実験系の最適化
 - ・ プロテオリポソームによる単一 H⁺チャネル電流の計測
 - ・ 立体構造に基づいた VSP 分子内相互作用部位の変異体の解析
 - ・ モジュール間連関の解析
 - ・ 新しい分子特性を備えた分子プローブの開発
 - ・ ゲノム情報などからの新規電位センサータンパク質候補の探索

(3)「鷹野」グループ(広島市立大学)

- ①主たる共同研究者:鷹野 優 (広島市立大学大学院情報科学研究科, 教授)
- ② 研究項目

- ・ 高効率な構造変化探索法の開発
- ・ 長時間シミュレーションに耐える分子力場の開発
- ・ 分子動力学シミュレーションによる Hv1/VSOP の構造安定性および構造変化の解析

(4)「神取」グループ(名古屋工業大学)

- ① 主たる共同研究者:神取 秀樹 (名古屋工業大学大学院工学研究科, 教授)
- ② 研究項目
 - ・ 全反射赤外分光法による構造機能相関解析

§ 2. 研究実施の概要

電位依存性ホスファターゼ VSP については、平成 27 年度までに作製した電位センサードメインと細胞質ドメインの間をつなぐリンカーの長さを変えた各種変異体と、様々な基質（ホスファチジルイノシトールリン酸）との共結晶の構造解析を進めた。また、特に電位センサー部分の高分解能構造解析を目指し、立体構造を認識する抗体の作製を進めた。各種基質との結合力を等温型カロリメトリー (ITC) を使って測定し、電位センサードメインと酵素領域をつなぐリンカー領域が基質結合で重要であることを示し、また、この領域が環境変化に応じて構造変化することで基質結合力を変える可能性があることを示した。また、VSP の酵素領域とアミノ酸配列相同性の高いガン抑制タンパク質として知られている PTEN でも同じような結果が得られ、PTEN についても N 末端領域が酵素活性に重要であることを示した(図1)。

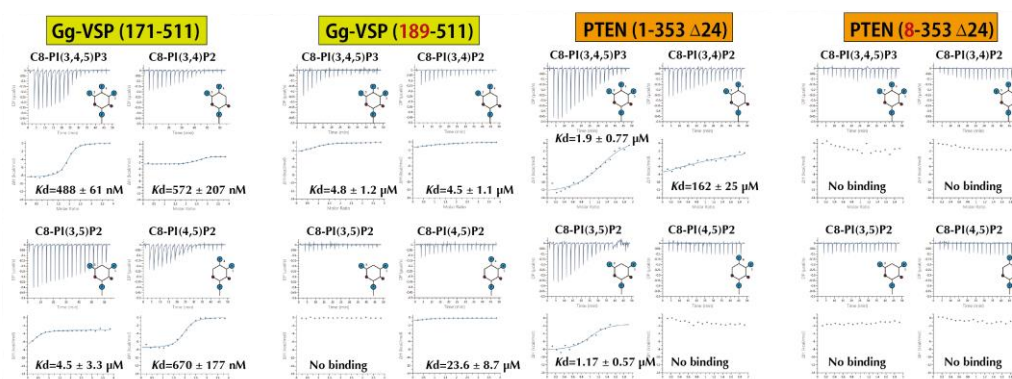


図1 VSP および PTEN と各種 C8-PIP_s との結合実験

電位依存性プロトンチャネルについては、計算機シミュレーションと赤外分光法 (FT-IR) を組み合わせて、チャネルの開閉を制御する重要なアミノ酸やペプチド骨格の構造変化をとらえ、Hv1/VSOP における Zn²⁺ イオンによる活性制御機構の解明を目指した。赤外分光法により Zn²⁺ の配位子である配位子候補のカルボン酸とヒスチジン変異体について金属結合への寄与を詳細に検討した。また、Zn²⁺ 以外の重金属、Ni²⁺ や Co²⁺ 結合による構造変化と比較した結果、結晶構造から推定された配位子 (E115, D119, H136, H189) 以外のヒスチジンとカルボン酸も金属結合に協同し、チャネル閉構造を安定化に寄与することが示唆された(図2)。

小脳に顕著に発現する機能未知電位センサータンパク質 VSOP2 について、細胞質領域の

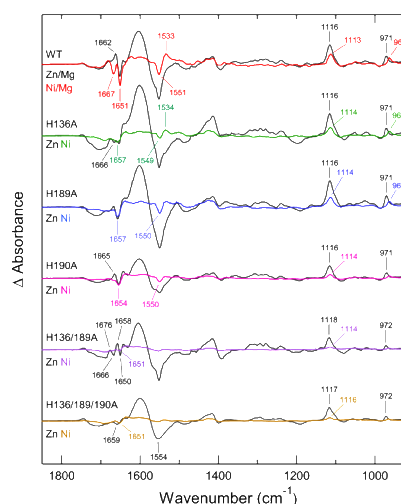


図2 Hv1/VSOP 各種 His 変異体への金属イオン結合による全反射赤外分光差スペクトル

coiled-coil 領域の構造解析に成功した。得られた構造は、緩みのない1本の α -helixを示し、主として分子中央に位置するジスルフィド結合によりホモ二量体構造を形成していた(図3)。しかし、この Cys 残基を境に、N, C 末端側領域の構造的特徴は異なっており、C 末端側領域はコイルドコイル構造に特徴的な2量体形成様式を示す一方で、N 末端側領域にはほぼ分子間相互作用がなく、「広がった」構造を示した。これは VSOP と異なる特徴で、電位センサーの会合状態に影響を与えると推測された。

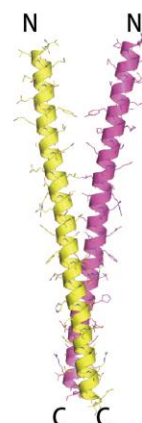


図3 VSOP2 の C 末端側コイルドコイル領域の結晶構造