

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
 - ・生細胞での実時間計測による VSP の構造活性相関の解析
 - ・VSOP のサブユニット間相互作用の単分子レベルでの検出にむけた解析
 - ・新規機能をもつ膜電位分子ツールの創成

(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

電位センサーファミリー蛋白質として、電位依存性ホスファターゼ VSP、電位依存性プロトンチャネル Hv1/VSOP、新規電位センサー蛋白質 VSOP2 の構造・機能解析, さらに新機能を持つ膜電位分子ツールの創製を進め、それぞれ以下の成果が得られた。

1. 電位依存性ホスファターゼ VSP

電位依存性ホスファターゼ VSP については、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や活性化状態を変える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)との共結晶について、界面活性剤で可溶化した試料を用いた蒸気拡散法による結晶化・構造解析、脂質立方相法を利用した結晶化・構造解析を進めた。また、構造解析の過程で、 Zn^{2+} イオンが細胞質領域に配位することが明らかになった。精製時に Zn^{2+} イオンを添加していないため、培養時に結合し持ち込んだ可能性が高い。これまでに VSP の機能に関して Zn^{2+} イオンの役割について報告されておらず、今後、グループ内で連携して Zn^{2+} イオンの結合が VSP 機能にどのような影響があるのかを明らかにする。

VSP の結晶化の過程で、膜蛋白質の良質な結晶を得るための脂質立方相(LCP)法に適した汎用的なツール開発を目指し、高い結晶化率と分解能を示すプロテインタグの開発を進めた。

平成 28 年度までの研究で重要な機能を持つと考えられた VSP 細胞質内酵素領域の膜界面に存在する特徴的な疎水性領域(hydrophobic spine)と、電位センサードメインと酵素領域の間のリンカー部分に注目して研究を行った。この hydrophobic spine が酵素活性を制御する仕組みを明らかにするため、膜貫通の電位センサー部位および細胞質酵素領域の構造変化の解析を行ったところ、hydrophobic spine の構造が電位センサー部位と酵素領域の連関・カップリングに影響を与えていることを示す結果が得られた。さらに様々な部位に蛍光アミノ酸 Anap を導入し、その蛍光強度変化を追うことで、電位依存的な酵素領域の構造変化や VSD-PD リンカー領域の構造変化を捉えることができた。

2. 電位依存性プロトンチャネル Hv1/VSOP

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 Zn^{2+} イオンによる活性制御機構の解明を目指した。 Zn^{2+} の配位子である配位子候補を含むヒスチジンとカルボン酸変異体について Zn^{2+} や Ni^{2+} とのイオン・分子間相互作用を赤外分光法により詳細に検討した。赤外測定から予測された結合部位の構造情報をもとに、計算シミュレーションを行った結果、プロトン放出側に存在するヒスチジン 2 個、カルボン酸 1 個、及び、水分子 1 個が、4 配位で Zn^{2+} を結合する場合に、観測された赤外振動モードを良く再現することが示された。

3. 新規電位センサー蛋白質 VSOP2

小脳に特異的に発現する新規膜電位センサー蛋白質 VSOP2 については、様々なオルソログの

スクリーニングと精製条件の検討を進め、結晶化に進めることが出来る純度の試料を得る精製条件を決定することができた。

4. 新規機能をもつ膜電位分子ツールの創製

前述した hydrophobic spine の研究により、膜界面での芳香環の存在が酵素活性を増大することが明らかとなった。汎用的にツールとして利用されている培養細胞での発現が良好なゼブラフィッシュ VSP (Dr-VSP)について、hydrophobic spine に変異を入れることで活性増強が可能かを検討した。

5. 新たな電位依存的イオンチャネルの機能解析

これまで電位センサーをイオンを通すタンパク質として電位依存性プロトンチャネルやヒトの筋疾患でのアミノ酸変異をもつ電位依存性 Na⁺チャネルなどが知られてきた。精子特異的カチオンチャネル CatSper は、複数のサブユニットが集合して Ca²⁺チャネルとして機能することが知られてきたが機能発現実験は成功していなかった。この論文では、CatSper の電位センサードメインが Ca²⁺などの二価イオンを透過させる活性があることを明らかにした。CatSper チャネルの機能発現実験の最初の報告であると共に、二価イオンを電位センサーが通すことを示した初めての例であり、今後電位センサーの動作原理を洞察する上での重要な知見である。

代表的原著論文

H. Arima, H. Tsutsui, A. Sakamoto, M. Yoshida, Y. Okamura

Induction of divalent cation permeability by heterologous expression of a voltage sensor domain.

Biochem. Biophys. Acta, 1860(5), 981-990, 2018.