

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

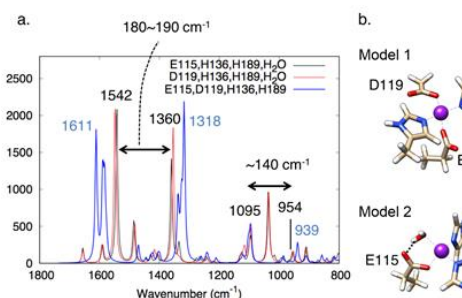
§ 1. 研究実施の概要

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、電位センサードメインと細胞質酵素ドメインを持ち電位依存的酵素活性を有するコンストラクトについて、脂質立方相法を利用して、様々な基質(ホスファチジルイノシトールリン酸)との共結晶の作製を行い、構造解析を行った。また、静止状態、活性化状態、その中間状態を安定化する変異体の電位センサードメインの構造解析や、in vitro phosphatase assay、等温滴定型カロリメトリー (ITC) の結果などと合わせ、電位依存的な活性制御機構モデルの提案、酵素活性制御に重要と考えられる領域の特定、基質認識機構の提案などをおこなった。さらに、細胞での VSP の細胞内領域の構造変化を検出するために、コンストラクトの選別、光学系の測定条件の検討を行った。今後さらに条件の最適化を行い、電位依存的な Anap の蛍光変化の検出力の向上を目指す。

2. 電位依存性プロトンチャネル Hv1/VSOP

Hv1/VSOP は、 Zn^{2+} 存在下でチャネル活性が阻害されることが知られている。これまでの研究で得られた細胞膜外側(プロトン放出側)の領域に Zn^{2+} が結合した静止状態の構造では、この結合領域の揺らぎが大きく、全ての配位子を含む詳細な分子構造は不明であった。全反射赤外分光と計算機シミュレーションを組み合わせることで、1つのカルボン酸を水分子(Wt)に置き換えた構造、EHHWt あるいは DHHWt がより配位構造として相応しいことを明らかにした(右図)。



Zn²⁺結合部位の計算シミュレーション

- 異なる配位モデルでの振動解析
- 計算で得られた配位モデル構造(model 1, E115, D119, H136, H189; model 2, E115, H136, H189, H₂O)

さらに、 Zn^{2+} 以外で活性阻害を示す他の金属イオンについても、同様の研究を進めており、それらの配位残基および配位構造の解析を行って、Hv1/VSOP の金属イオンによる活性制御機構を明らかにすることを目指している。

3. 新規電位センサー蛋白質 VSOP2

従来の昆虫細胞培養系を用いた発現では構造解析に十分な収量が得られず(1 L 培養液あたり 30 μ g 程度)、また、ゲルろ過の結果から、多量体化したものが混在していると考えられた。オルソログの選択と活性化状態を安定化する変異を用いる事で収量が約2倍(1 L 培養液あたり 1mg程度)となり、また、ゲルろ過で分散度が低いことを確認した。現在、この試料を用いて、結晶化条件の検討を進めている。

代表的な原著論文

1. Masayo Iwaki, Kohei Takeshita, Hiroko X. Kondo, Kengo Kinoshita, Yasushi Okamura, Yu Takano, Atsushi Nakagawa and Hideki Kandori, "Zn²⁺-binding to the voltage-gated proton channel Hv1/VSOP" J. Phys. Chem. B vol. 122, pp. 9076-9080, 2018

2. Akira Kawanabe, Masaki Hashimoto, Manami Nishizawa, Kazuhisa Nishizawa, Hirotaka Narita, Tomoko Yonezawa, Yuka Jinno, Souhei Sakata, Atsushi Nakagawa and Yasushi Okamura, "The hydrophobic nature of a novel membrane interface regulates the enzyme activity of a voltage-sensing phosphatase" eLife, vol.7, e41653, 2018

§ 2. 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
 - ・新規膜電位センサータンパク質の構造解析
 - ・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