

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「新規細胞膜電位シグナルの構造基盤の
解明」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：中川敦史
(大阪大学蛋白質研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

細胞膜電位シグナルを利用して働く、電位依存性ホスファターゼ VSP、電位依存性プロトンチャンネル VSOP/Hv1、小脳に特異的に発現する機能未知タンパク質 VSOP2 の構造機能解明を目指した研究を進めた。

電位依存性ホスファターゼ VSP については、電位センサー領域と酵素領域のカップリングによる電位依存的な活性制御機構の解明と基質認識機構解明を目指した。プロジェクト開始当初、VSD と細胞質酵素領域を持つコンストラクトについて、界面活性剤により可溶化した試料を用いて、蒸気拡散法を用いて結晶化・構造解析を行ったが、膜貫通領域である電位センサードメイン(VSD)の揺らぎが大きく、VSD 領域のモデル作製が困難であった。しかし、LCP 法による結晶化を行うことで、VSD 領域も含めた WT の活性型の全体構造を得ることに成功した。特に、リンカー領域3残基欠損体と各種基質複合体について、最高 2.2Å 分解能で、かつ VSD も含めて揺らぎの少ない明瞭な電子密度に基づく構造を得ることができ、基質結合・非結合状態の詳細な全体構造を明らかにすることができた。さらに、岡村グループによる電気生理実験の結果から同定された、活性化状態が異なると考えられる変異体について構造解析を行い電位依存的な構造変化を捉えることを目指したが、静止状態を示す変異体全長については、結晶を得ることができなかった。そこで、VSD について、静止状態、活性化状態、中間状態の 3 状態を示す変異体の構造解析を行い、電位依存的な活性化機構に関する構造情報を得た。これら変異体については、岡村グループにより蛍光アミノ酸を導入したタンパク質を細胞で発現して電位依存的な動きを観測し、他の電気生理実験や構造解析の結果と合わせることで、VSP の電位依存的な活性制御機構を提案した。また、岡村グループにより蛍光 ANAP を導入した変異体を用いて、電位センサードメインと細胞質酵素領域のカップリングに重要な領域(Hydrophobic spine)が同定されたが、この領域は中川グループによる構造解析の結果と一致しており、原子構造からも、この領域が基質認識に重要な領域である事を示した。

VSP の細胞質領域は、ガン抑制因子 PTEN と高い一次構造相同性を示す一方、PTEN が基質(イノシトールリン酸)の3位のリン酸基のみを認識するのに対して、VSP は3位および5位のリン酸を認識する。本研究で得られた、VSP と各種基質との複合体の構造に基づいて、VSP の多様な基質を認識する「あいまいな」基質認識機構と、VSP と PTEN の基質認識の特異性に関しての理解が得られた。PTEN はヒト悪性腫瘍において高頻度に遺伝子変異が認められ、その重要性が知られているが、これまで基質との複合体の構造は得られていなかった。今回得られた VSP 基質複合体の構造から得られた PTEN の基質認識に関する知見は、PTEN をターゲットとした治療薬につながる重要な情報であると考えられる。

電位依存性プロトンチャンネル VSOP については、プロジェクト開始前に中川グループにより得られた静止状態の構造では揺らぎが大きく詳細な構造がわからなかった亜鉛の結合様式を、神取グループによる ATR-FTIR 実験と鷹野グループによる計算シミュレーションを組み合わせることで、2個のヒスチジン側鎖とアスパラギン酸 and/or グルタミン酸が緩い認識で配位することで、静止状態が安定化されること、亜鉛イオンに配位する側鎖の長さが変わると主鎖構造が変化する事がわかり、グルタミン酸(E115)あるいはアスパラギン酸(D119)のいずれか、水1分子、ヒスチジンが配位する構造を提案した。また、この結果は、岡村グループによる電気生理実験で支持された。

小脳に特異的に発現する機能未知タンパク質 VSOP2 については、中川グループによりC末端側のコイルドコイル領域について結晶構造解析に成功し、VSOP とは異なる二量体会合構造をとる可能性を示唆する構造が得られた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

電位依存性ホスファターゼ VSP について、膜電位と酵素活性という、異なる物理化学信号を変換する機構を、原子構造に基づいて理解することができた。さらに、ホスファターゼ領域と相同性の高いがん抑制因子である PTEN と比較して、基質特異性のゆるい VSP の基質認識機構が原子構造から明らかになった。

2.

概要:

VSP の構造を明らかにしたことで、電位センサータンパク質全般に共通の基本原理の解明に迫ることができる。VSP において明らかにされた、S4 から細胞質側に連続する α ヘリックスを核とした膜貫通領域、リンカー領域、酵素領域が協調して酵素の基質をくわえ込む構造は、S4 から下流に連続して膜内ヘリックスの運動を引き起こしてポアを開ける電位依存性イオンチャネルとの比較で、対照的なアウトカムをもたらす原理の解明に繋がる。これが解明されれば電位依存性イオンチャネルでの過分極で活性化する心筋のペースメーカー機能を担う HCN チャネルが電位依存性 K^+ チャネルなどと同様に S4 構造から細胞内側に連続するヘリックス構造を示すにも関わらずなぜ脱分極ではなく過分極で開口するのか、という長年のパラドックスにも迫ることができる。

3.

概要:

低分解能のX線結晶構造解析では決定することのできなかった、VSOP における亜鉛イオンの結合様式と静止状態の安定化機構を、ATR-FTIR と計算シミュレーションを組み合わせることで、理解することができた。具体的には、ヒスチジンとカルボン酸の側鎖が亜鉛に配位し、主鎖の構造変化を伴うことでチャネル機能に阻害作用を及ぼすメカニズムを明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

VSP のノックアウトマウスが精子運動性に異常を示す事から、VSP の構造の解明と動作原理の解明は精子の生理機能の解明につながり、男性不妊の解明や不妊薬の開発に繋がる可能性がある。膜電位レポーター作製の材料としてロドプシンと並んで頻繁に使われる VSP の構造情報、動作原理の情報をもとに、今後脳科学分野で有用な膜電位レポーター分子の構築に繋がると期待される。VSOP のゲーティングや Zn^{2+} による抑制機構の解明は、VSOP が発現する血球細胞や精子や肝臓や脳などをターゲットとする創薬に繋がる可能性がある。また電位センサーのシグナル伝達の原理の解明は、疼痛、血圧、てんかん、心疾患などの疾病の原因となる多種の電位依存性イオンチャネルを標的とした創薬に貢献できる。

2.

概要:

従来は電位センサータンパク質として、独立した電位センサーとチャネル領域を持つ電位依存性イオンチャネルのみが知られていたが、本プロジェクトで得られた VSP の構造は、これまで知られていた電位センサータンパク質と異なる分子メカニズムに基づいており、電位センサーと機能領域のカップリングという、多種のイオンチャネルを含む電位センサーファミリータンパク質の基本的な機構の解明に繋がると考えられる。

3.

概要:

VSP の構造解析によるイノシトールリン脂質の基質特異性の分子基盤の解明は、がん抑制遺

伝子として重要な PTEN 活性の制御の基本機構の理解に繋がり、PTEN 変異によるがんの悪性化機構の解明に繋がるのが期待される。

<代表的な論文>

1. Masayo Iwaki, Kohei Takeshita, Hiroko X. Kondo, Kengo Kinoshita, Yasushi Okamura, Yu Takano, Atsushi Nakagawa and Hdeki 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
3. Yuichiro Fujiwara, Hiroko X. Kondo, Matsuyuki Shiota, Megumi Kobayashi, Kohei Takeshita, Atsushi Nakagawa, Yasushi Okamura and Kengo Kinoshita, “Structural basis for the membrane association of ankyrinG via palmitoylation”, Sci. Rep.6, 23981, 2016

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「中川」グループ

研究代表者: 中川 敦史 (大阪大学蛋白質研究所、教授)

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

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)

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

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)

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

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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

色々な機会にセミナー、ワークショップ、研究会などを開催し、国内外の関連研究者とのネットワーク形成を進めた。