The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Interaction between S4 and the phosphatase domain mediates electrochemical coupling in voltage-sensing phosphatase (VSP)
Author(s)	水谷, 夏希
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92019
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	水谷　夏希
論文題名 Title	Interaction between S4 and the phosphatase domain mediates electrochemical coupling in voltage-sensing phosphatase (VSP) （電位依存性ホスファターゼ（VSP）は電位センサードメインと酵素ドメイン間の直接相互作用により電気信号を化学信号に変換する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

細胞膜を伝わる電気信号（膜電位変化）は、神経や筋では電位センサードメインを持つ電位依存性イオンチャネルにより細胞膜を隔てたイオンの流れに変換される。これにより人間をはじめとする生物は思考や行動を可能としている。一方、精子や腸上皮では同様の電位センサードメインを持つ電位依存性ホスファターゼ（VSP）により、電気信号はイノシトールリン脂質PI(4,5)P_2を脱リン酸化する酵素活性に変換される。しかしながら、VSPが電気信号を化学反応に変換する根本的な分子メカニズムは明らかでなかった。本研究では、電気信号を感知した電位センサードメインの構造変化に着目し、酵素活性が誘導される仕組みを解明することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

電位センサードメインのうち膜電位感知に重要な4番ヘリックス（S4）のアミノ酸配列の比較から、種間でC末端に疎水性アミノ酸イソロイシンとフェニルアラニンが保存されていることが明らかとなった。これら部位の役割を調べるため、初めにカタユウレイボヤ由来VSP（Ci-VSP）のI233およびF234のアミノ酸変異体を作出し、アフリカツメガエル卵母細胞に共発現させたPI(4,5)P_2感受性内向き整流性カリウムチャネル（GIRK2）の活性を指標に酵素活性を測定したところ、両アミノ酸部位で側鎖の疎水性度と酵素活性の強さとの間に強い相関が認められた。さらに、親水性アミノ酸を導入したI233QおよびF234Y変異体では、電位センサードメインおよび酵素ドメインの酵素活性誘導に重要な構造変化が見られなくなっていたことから、S4のC末端部位に保存される疎水性アミノ酸が酵素活性の誘導に必須であると示された。

これまでに、酵素ドメインにおいても酵素活性誘導に重要な疎水性アミノ酸部位（Hydrophobic spine）の存在が報告されていることから、電位センサー・酵素両ドメインに存在する疎水性アミノ酸部位が相互作用することで電気化学信号変換が引き起こされると仮説を立てた。相互作用を検証するため、S4のC末端部位に非天然蛍光アミノ酸Anapを導入したCi-VSPをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させVoltage clamp fluorometry法にて電位依存的な蛍光強度変化を観察したところ、Hydrophobic spineをトリプトファンで置換した変異体では蛍光強度の減少、すなわち消光現象が確認された。また、S4のC末端部位とHydrophobic spineをシステインで置換すると、電位依存的に架橋形成が起こりS4の可動性が制限されることも電気生理学的手法を用いて確認した。さらに、AlphaFold2を用いて予測したCi-VSPの全長立体構造において、S4のC末端部位とHydrophobic spineは消光現象および架橋形成を起こし得る距離に位置していた。以上の結果から、膜電位変化を感知した電位センサードメインのS4のC末端部位が酵素ドメインのHydrophobic spineと直接相互作用することで電気化学信号変換が生じ酵素活性が誘導されることが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

電位センサードメインのS4のC末端部位と酵素ドメインHydrophobic spine間の直接相互作用が、VSPの基本動作原理であることが示された。本知見は、種々の疾患に関連する電位依存性イオンチャネルにおいて電位センサードメインがイオンの流れを制御する原理の理解に繋がると期待される。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　水谷　夏希

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	岡村康司
	副　査	大阪大学教授	日比野浩
	副　査	大阪大学教授	金井好克

論文審査の結果の要旨

これまで電位依存性ホスファターゼVSPは、電位センサーとイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素を併せ持ち、生体膜における電気信号を化学信号に変換する膜タンパク質酵素分子として、また、電位センサー動作原理の理解のためのモデルタンパク質として、国内外で研究がされてきたが、電気的信号が化学信号に変換される分子機構、とりわけ膜内の電位センサーの構造変化が細胞質側の酵素領域の構造を変化させる分子機構は不明であった。

本研究では、発現系細胞を用いて丹念なアミノ酸変異導入実験と電気生理学計測を行い、膜貫通領域S4の下部が、電位センサーから酵素領域への共役に重要であることを見出した。更に、非天然蛍光アミノ酸Anapがトリプトファンにより消光する現象を見出し、この現象を用いて生細胞において精密な蛍光分光計測を行い、電位センサー末端の疎水性ヘリックス領域と酵素領域の膜への突出疎水性部位が膜電位の脱分極によって相互作用することを証明した。更に、これらVSPの電位センサーの下部と酵素の相互作用は、PTENのN末端側のヘリックスとPTEN内の酵素との相互作用と類似しており、酵素活性調節が両者のタンパク質間で共通である可能性を示唆した。

これらの知見は膜タンパク質による膜電位化学連関のシグナル伝達機構の詳細を初めて明らかにした研究成果であり、多くのタンパク質において本質的な役割を担うドメイン間の相互作用の新たな原理を提示するものである。研究には独自の創意工夫がなされ、複数の異なるアプローチにより結論が導かれており、論文はさまざまな角度からの深い考察がなされている。以上から、本論文は博士（医学）の学位に値するものであると判断された。