

氏 名 Md. Israil Hossain

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1009 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Characterization of Voltage Sensor Containing  
Phosphatase, Z-VSP

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘  
教授 永山 國昭  
教授 岡村 康司  
助教授 吉村 健二郎（筑波大学）

## 論文内容の要旨

A voltage sensor domain (VSD) is a key structure of voltage gated ion channels that play an important role in cell signaling. An ion channel like membrane protein containing the VSD has recently been identified from *Ciona intestinalis*, and was named voltage sensor containing phosphatase (Ci-VSP). VSD of Ci-VSP is homologous to the first four transmembrane segments (S1~S4) of *Shaker* potassium channel that sense membrane voltage. Instead of a pore domain, Ci-VSP contains a long cytoplasmic domain, homologous to PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), which acts as a phosphoinositide phosphatase. However, the detailed operation mechanism of Ci-VSP remains unclear. In addition it remains unknown whether the vertebrate ortholog has similar molecular functions to that of Ci-VSP.

To address these issues, a cDNA encoding a Ci-VSP ortholog has been cloned from zebrafish (called Z-VSP). When expressed in *Xenopus* oocytes and tsA201 cells, Z-VSP showed a robust gating current with a higher threshold than Ci-VSP. The cytoplasmic region of Z-VSP showed a phosphoinositide phosphatase activity like Ci-VSP: Z-VSP( $\Delta$ TM)- glutathione S-transferase (GST) fusion protein dephosphorylates phosphatidylinositol -3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) as detected by *in vitro* malachite green assay.

To test whether the phosphatase activity of Z-VSP is voltage dependent, KCNQ2/3 potassium channel (which is sensitive to intracellular PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> concentration) was co-expressed with Z-VSP in *Xenopus* oocyte and the outward K<sup>+</sup> current was measured with intervals either at hyperpolarizing (-70mV) or at depolarizing (70mV) potentials. The current was drastically decreased when the potential was set at depolarizing 70mV. Therefore, phosphatase activity of Z-VSP is regulated in a voltage dependent manner. These results indicate that Z-VSP shares the basic properties with Ci-VSP.

By taking advantage of robust expression of gating currents of Z-VSP in tsA201 cells, he addressed two questions regarding the mechanisms of the voltage sensing of VSP. First, the role of transmembrane segment-4 (S4) in the voltage sensing was investigated by mutagenesis experiments. In the region of S4 like segments of Z-VSP, 165Ile (I) was replaced by Arg (R). This mutant, I165R, expressed gating current with the kinetics of ON- and OFF current faster than those of wild type (WT). The charge versus voltage (Q-V) curve was shifted leftward compared to the WT and close to that of Ci-VSP. When amino acid sequence of *Shaker* K<sup>+</sup> channel was aligned with that of the Z-VSP, a positively charged residue is present at the site corresponding to T156 of Z-VSP. Replacement of T156 by arginine, the Q-V curve was shifted leftward and kinetics of ON-gating current became faster than that of WT. These results suggested that the S4 like segment of Z-VSP is the voltage sensor and positively charged residues are the key residues in the voltage sensing as in the voltage-gated ion channels.

Secondly, he addressed whether the phosphatase domain affects properties of the VSD. The cytoplasmic domain of Z-VSP has a cysteine in the active site for phosphatase activity. Mutating cysteine to serine eliminates phosphatase activity. This mutant showed faster kinetics of gating current than the WT. A corresponding mutation was introduced into Ci-VSP and consistent results were obtained. He also examined the effect of sodium pervanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_8$ ), an inhibitor of protein tyrosine phosphatase, on gating currents. After application of pervanadate in the external bath solution in patch clamp recording, total carried charge remained unchanged but the kinetics of ON- and OFF-gating current became remarkably faster than before pervanadate treatment. This change of gating currents does not seem due to secondary to distinct sub membrane environment of phosphoinositide caused by phosphatase reaction, since depletion of  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  did not induce acceleration of gating currents. These results indicate that the phosphatase domain is tightly coupled with the voltage sensor and some structural change closely related to phosphatase activity in the phosphatase domain affects the movement of the voltage sensor.

In summary, he showed that the function of the voltage regulated phosphatase is not restricted to ascidians and that Z-VSP will provide a useful model to understand general mechanisms of coupling between the VSD and the effector.

## 論文の審査結果の要旨

膜電位依存性チャネルは、興奮性細胞等の重要な機能素子であり、多数のメンバーを含む。一次構造的には、6つの膜貫通部位を持ち、その中の陽電荷を持ったアミノ酸に富む4番目の部位S4が膜電位センサーとして、S5-S6領域がイオン透過路として、それぞれ機能している。申請者の所属する研究グループは、ユウレイボヤゲノムデータベースの探索によって、S4を含む4つの膜貫通部位のみを持ち、ポア領域を欠くかわりに、細胞内領域に脱リン酸化酵素 PTEN (phosphatase and tensine homologue deleted on chromosome 10) に類似した領域を有する新規遺伝子 Ci-VSP (Ciona voltage sensor containing phosphatase) を見いだした。また、Ci-VSPの脱リン酸化酵素活性が膜電位によって制御されていることを明らかにした。しかし、(1)脊椎動物の類似分子がCi-VSDと同様な機能を持つかどうかは知られておらず、(2) VSPの膜電位感知機構の詳細は未だ明らかでなかった。そこで、申請者ホサイン氏は、本研究において、これら二つの課題に取り組んだ。

第1の点にアプローチするため、ホサイン氏は、まず、ゼブラフィッシュより、Ci-VSPの ortholog Z-VSPの cDNA を単離した。そして、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用いて明確なゲート電流を捕らえ、また、マラカイトグリーンアッセイにより Z-VSPの細胞内領域が脱リン酸化酵素活性を持つことを確認した。さらに、共発現させた、PIP<sub>2</sub>依存性を持つ KCNQ チャネルの活性をモニターすることにより、Z-VSDの脱リン酸化酵素活性が膜電位依存的に調節されていることを観察した。すなわち、ホサイン氏は、VSPがホヤに限定したものではないことをはじめて明らかにした。

第2の点にアプローチするため、ホサイン氏は、高発現系 tsA201 細胞を用いて、Z-VSPの膜電位感知機構についてアプローチした。まず、Ci-VSP および膜電位依存性 K<sup>+</sup>チャネル *Shaker* との比較に基づき、S4領域の変異体 Ile165Arg および Thr156Arg を作成して、そのゲート電流を解析し、野生型に比し、電荷-電圧関係が過分極側にシフトしており、また、その動特性が加速していることを見いだした。これらの結果に基づき、S4領域の陽電荷を持つアミノ酸残基が、VSPの膜電位感知において重要な役割を果たしていることを結論した。さらに、ホサイン氏は、Z-VSPの脱リン酸化酵素活性を失わせる Cys302Ser 変異の導入や、酵素活性阻害剤 pervanadate の投与により、ゲート電流が加速するという、極めて興味深い重要な事実を見だし、脱リン酸化酵素部位が膜電位センサーに機能的に結合しており、酵素活性に関連した構造変化が膜電位センサーの動きを調節していることを明らかにした。

このように、本研究は、VSPが脊椎動物でも存在して機能していること、および、膜電位感知に、S4領域と脱リン酸化酵素部位の両方が重要であることを明らかにした、今後のさらなる発展が強く期待できる優れた研究である。よって、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。