

氏 名 平澤 輝一

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2253 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of the regulatory mechanism of Two-pore channel 3  
by membrane voltage and phosphoinositide

論文審査委員 主 査 深田 正紀  
生理科学専攻 教授  
久保 義弘  
生理科学専攻 教授  
古瀬 幹夫  
生理科学専攻 教授  
老木 成稔  
福井大学 高エネルギー医学研究センター  
特命教授

(様式3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Hirazawa, Ki-ichi

Title Analysis of the regulatory mechanism of Two-pore channel 3  
by membrane voltage and phosphoinositide

Two-pore channel (TPC) is a voltage-gated cation channel. A single polypeptide of TPC has 2 repeats of the canonical motif of voltage-gated cation channel, composed of the voltage sensor domain (VSD) and the pore domain (PD). The 4<sup>th</sup> helix in the VSD (S4) moves voltage dependently to open the gate of the channel. It is known that the 2<sup>nd</sup> VSD of TPC3 is responsible for the voltage sensing, whereas the 1<sup>st</sup> repeat has a phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>) binding site to potentiate the voltage dependence of TPC3.

This study aims to demonstrate the regulation of the voltage dependence of the 2<sup>nd</sup> S4 by the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding to the 1<sup>st</sup> repeat in TPC3 from the point of view of the dynamic structural rearrangements.

Two approaches were used in this study, the cysteine (Cys)-accessibility analysis and the voltage clamp fluorometry (VCF) of *Xenopus tropicalis* TPC3 heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocyte. In Cys-accessibility analysis, aspartate 511 at the extracellular side of the 2<sup>nd</sup> S4 was mutated to Cys (D511C-TPC3). The current of D511C-TPC3 was recorded using two-electrode voltage clamp, and sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate (MTSES), a Cys modifying reagent, was applied during the recording. The modification rate by MTSES was analyzed based on the MTSES-evoked current changes of D511C-TPC3, which reflects the movement of the 2<sup>nd</sup> S4. The effect of PI(3,4)P<sub>2</sub> binding on the modification rate was analyzed using a PI(3,4)P<sub>2</sub> binding deficient mutant (R187Q&D511C-TPC3) and a degradation enzyme

of PI(3,4)P<sub>2</sub> (inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B). In VCF, specific residues in the 2<sup>nd</sup> S4 of TPC3 were labeled by fluorescent molecules to detect its movement based on the change of the fluorescent intensity (F change). The labeling at the extracellular side of the 2<sup>nd</sup> S4 was achieved using Cys-mutation and Cys-reactive Alexa Fluor™ 488 C5 Maleimide. The labeling at the intracellular side of the 2<sup>nd</sup> S4 was achieved using a genetic method for the incorporation of a fluorescent unnatural amino acid, 3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid (Anap). The current and fluorescent intensity of TPC3 were recorded simultaneously using two-electrode voltage clamp and fluorescent microscope, and the effect of PI(3,4)P<sub>2</sub> binding on the F change was analyzed.

In the Cys-accessibility analysis, the MTSES-modification rate of D511C-TPC3 increased in depolarized condition due to the movement of the 2<sup>nd</sup> S4. The MTSES-modification rate of D511C-TPC3 was larger than that of R187Q&D511C-TPC3. In addition, the modification rate of D511C-TPC3 was larger than that of D511C-TPC3 co-expressed with INPP4B. In VCF analysis, glutamine 507 was mutated to Cys (Q507C-TPC3) and labeled with the Alexa 488 fluorescent molecule. Q507C-TPC3 showed voltage dependent F change, but the amplitude of the F change was small (~0.6% at +180 mV). Serine 527 at the intracellular side of the 2<sup>nd</sup> S4 was mutated to Anap in S527Anap-TPC3. The construct showed larger voltage dependent F changes (~1.0% at +180 mV) compared to that of Q507C-TPC3, which enabled to examine the effect of PI(3,4)P<sub>2</sub> binding. The fluorescent intensity of S527Anap-TPC3 was decreased upon depolarization, and its F change was enhanced by the presence of PI(3,4)P<sub>2</sub>. In addition, co-expression and activation of an exogenous voltage sensitive phosphatase (VSP), which transiently increases and then decreases the PI(3,4)P<sub>2</sub> level upon depolarization, caused a biphasic F change of S527Anap-TPC3. The fluorescent intensity was transiently decreased (then increased) during the transient production (then degradation) of PI(3,4)P<sub>2</sub> by VSP which indicated more (then less) depolarized-

conformation of the 2<sup>nd</sup> S4.

As to the Cys-accessibility analysis, the voltage dependence of the MTSES-modification rate of D511C-TPC3 showed the structural rearrangement at around the 511 position upon depolarization. The larger MTSES-modification rate of the D511C-TPC3 bound to PI(3,4)P<sub>2</sub> suggests that the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding to the 1<sup>st</sup> repeat of TPC3 potentiates the structural change of the 2<sup>nd</sup> S4 to the activated state. As to the VCF analysis, the small F change of Q507C-TPC3 labeled with the Alexa 488 suggests that the structural change at around the 507 position might be minor. The enhancement of the F change of S527Anap-TPC3 by the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding showed the potentiation of the structural change of the 2<sup>nd</sup> S4.

The effect of the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding on the 2<sup>nd</sup> S4 was revealed through the analyses of the extracellular side (Cys-accessibility analysis) and the intracellular side (VCF) of the 2<sup>nd</sup> S4. Taken together, it was demonstrated that the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding potentiates the structural rearrangements of the 2<sup>nd</sup> S4 and that the 2<sup>nd</sup> S4 of TPC3 integrates the information of the membrane voltage and the PI(3,4)P<sub>2</sub> binding to the 1<sup>st</sup> repeat to regulate the gating of the channel.

## 博士論文審査結果

Name in Full 氏名 平澤 輝一

Title 論文題目 Analysis of the regulatory mechanism of Two-pore channel 3 by membrane voltage and phosphoinositide

本論文は、「電位依存性陽イオンチャネルファミリーに属する Two-pore channel 3 (TPC3) の活性制御機構」を、TPC3 分子の動的構造機能連関の観点から明らかにしたものである。

TPC3 チャネルは、膜電位変化とホスホイノシチド PI(3,4)P<sub>2</sub> によって制御されるナトリウムチャネルで、受精の進行等の生理現象において重要な役割を果たす。TPC3 は 1 つのポリペプチド鎖に膜電位センサードメイン (VSD) とポアドメインからなる基本ユニットを 2 つ連結した 2 リピート構造を有し、それが 2 量体を形成することでイオンチャネルとして機能する。これまでに、出願者が所属する研究室にて、TPC3 の第 1 リピートにホスホイノシチド PI(3,4)P<sub>2</sub> が結合することにより、第 2 リピートの VSD 中の第 4 膜貫通部位 (S4) を介する膜電位依存的活性化が増強することが示されていた。しかし、TPC3 の第 1 リピートへの PI(3,4)P<sub>2</sub> の結合が、第 2 S4 の膜電位依存的な構造変化そのものを制御しているかは不明であった。出願者は、熱帯ツメガエル TPC3 をアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させ、cysteine-accessibility 解析と voltage clamp fluorometry (VCF) 法という 2 つの手法を駆使して TPC3 分子の動的構造変化を検討した。

まず、cysteine-accessibility 解析において、出願者は、TPC3 の第 2 S4 の細胞外領域に位置する 511 番目のアスパラギン酸をシステインに置換した変異体 D511C-TPC3 を作製し、その電流を 2 電極膜電位固定法により測定した。そして、記録中にシステイン修飾薬剤 MTSES を細胞外液に投与することで、D511C-TPC3 の電流量が増加することを見出した。D511C-TPC3 の MTSES 修飾速度は脱分極刺激により増加し、第 2 S4 の膜電位依存的な動きを反映することが示された。出願者は、この実験系において、1) PI(3,4)P<sub>2</sub> 結合能を欠損する、187 番目のアルギニンのグルタミンへの変異を併せ持つ R187Q&D511C-TPC3 では MTSES 修飾速度が低いこと、2) PI(3,4)P<sub>2</sub> 分解酵素 INPP4B の共発現において MTSES 修飾速度が低いことを見出し、TPC3 の第 1 リピートへの PI(3,4)P<sub>2</sub> の結合の有無が、第 2 S4 の 511 番目のアスパラギン酸周辺の膜電位依存的構造変化に影響を与えることを明らかにした。

次に、出願者は、VCF 法による蛍光輝度変化と電気生理学的測定を同時に行うことで、TPC3 分子の動的構造変化を検討した。まず、TPC3 分子の第 2 S4 の細胞外領域に網羅的にシステインへの変異を導入し、そのシステインを蛍光ラベルすることで第 2 S4 の動き

を蛍光輝度変化を指標に検討した。様々なシステイン変異の中で、507番目のアスパラギン酸残基をシステインに置換した変異体において膜電位依存的な蛍光輝度変化を見出した。一方、第1 S4の細胞外領域周辺へのシステイン変異導入では、このような輝度変化は認められず、第1 S4は顕著な膜電位依存的構造変化を示さないことが示唆された。次に非天然蛍光アミノ酸 Anap を TPC3 に導入することにより、第2 S4の細胞内領域の動きを VCF 法により検討した。出願者は、527番目のセリンを Anap に置換した S527Anap-TPC3 において、脱分極による蛍光輝度の変化を見出し、PI(3,4)P<sub>2</sub> 存在下にて、蛍光変化が増強することを見出した。さらに、電位依存性脱リン酸化酵素 VSP の共発現により、細胞内の PI(3,4)P<sub>2</sub> レベルを一過的に変化させた際に、それに追従して蛍光輝度が変化することを明らかにした。

以上、出願者は、TPC3の第2 S4の膜電位依存的な構造変化を、511番目のアスパラギン酸周辺の細胞外領域の動きと527番目のセリン周辺の細胞内領域の動きとして検出した。そして、第1リピートへのPI(3,4)P<sub>2</sub>の結合による膜電位依存的活性化の増強の基盤として、第2 S4の膜電位依存的な動きそのものが増強することを明らかにした。本研究は、TPC3チャンネルの、ホスホイノシチドと膜電位の相乗的ゲート機構について、イオンチャンネルの構造機能連関の観点から明らかにした研究であり、イオンチャンネル分子が動的に作動する際の姿を理解する上で、極めて優れた論文である。生体タンパク質の機能時の姿に迫ることは、現在の生命科学の重要課題の一つであり、本研究はこの命題に対し、大きく貢献する論文であると考えられる。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。