

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291030

研究課題名(和文) 分子が膜電位を感知する基本原理の理解

研究課題名(英文) Basic principles of voltage sensing

研究代表者

藤原 祐一郎 (Fujiwara, Yuichiro)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20532980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の拍動や脳の活動に代表される生体の電気活動を発生させ制御する中心的な役割を担う電位依存性チャンネルが膜電位を感知する仕組みを知ることを目的として行った。最小単位の電位依存性チャンネルであるH⁺チャンネルを対象に、膜電位センサーが膜電位を感知して動く様子、そしてチャンネルが開くまでの分子の構造変化をダイナミックに解析し、電位依存性チャンネルが膜電位を感じとるメカニズムを分子構造のレベルから明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify voltage-sensing mechanism of the voltage-gated channels which generate and regulate bioelectronic signals as represented by the heartbeat and brain functions. We focused on the voltage-gated H⁺ channel consisting of a minimum voltage-sensor unit, and analyzed the voltage-sensor movement by membrane voltage and the structural rearrangement toward the channel opening. We demonstrated the molecular basis of the voltage-sensing mechanism.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

心臓の拍動や脳の活動に代表されるように、細胞膜を介した電気的シグナリングは我々の生命活動にとって重要な役割を果たしています。その電気活動を発生させ制御する中心的な役割を担う分子が電位依存性イオンチャンネルです。

生体の電気活動の発生と制御を担う分子として電位依存性イオンチャンネルは最も精力的に研究が行われており、時代背景と共に解析手法の変遷を経ながら生物物理学の特性が記述されてきた。膜タンパク質である電位依存性イオンチャンネルの分子構造は、イオンが透過するイオン透過ドメイン(ポアドメイン)と膜電位を感知する電位センサードメインに大別される。電位依存性チャンネルが膜電位に応答してイオンを透す仕組みとして、電位センサードメインにあるプラスに帯電したアミノ酸残基が電位センサーとして膜電位変化に応答して動き、その構造変化がポアドメインに伝わりゲートが開閉する機構がよく知られている(図左)。電位センサーが動く際に、絶縁体である細胞膜を乗り越える電荷の移動が発生する、この電荷の移動はゲート開閉と連動しているところからゲート電流と称され電気生理学的に観測される。この電位センサーの動きに伴う電荷の移動が発生することこそ、イオンチャンネルが膜電位に応答して機能していることの反応速度論的な証明となる。

近年クローニングされた電位依存性 H⁺チャンネルは、電位センサードメインからのみなる膜タンパク質で、H⁺は電位センサードメインそのものをすり抜ける形で透過する(図右)。最も不思議な特徴は分子内に電荷を帯びたアミノ酸残基が存在し、膜電位依存的なチャンネル開閉が起こるにもかかわらず、膜電位変化に伴う電荷の移動(ゲート電流)が観測されない点にある。このことは、イオンチャンネルの膜電位感知機構の基本原則を根拠から考え直さなければならない現象であり、この電位依存性 H⁺チャンネルを詳しく研究することが、電位依存性チャンネル一般の膜電位感知機構を正しく理解することにつながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、この電位依存性 H⁺チャンネルの電位センサーの特性に焦点を当て、電位センサーの構造ダイナミクス、ゲート電流と H⁺電流の関係を解析することで、従来の概念では説明しきれない電位依存性チャンネルが膜電位を感知するメカニズムを明らかにすることを目的として行われる。

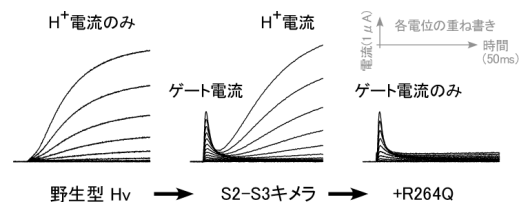
3. 研究の方法

イオンチャンネルが膜電位を感知する原理を理解するために、膜電位変化に伴う電荷の移動が観測されないにもかかわらず電位依存的な出力を発揮する電位依存性 H⁺チャネ

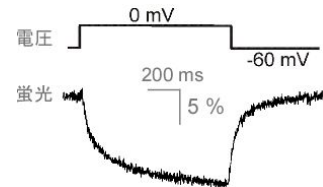
ル(Hv)を詳細に解析する。変異導入により電荷の移動が観測された変異体 Hv チャンネルをベースに、膜電位入力から構造変化、電荷の移動、ゲートの開口から H⁺電流出力に至る一連の過程を、電気生理学的手法、光学的観測手法を用いてステップごとに解析する。Hv チャンネルの生理的修飾因子である細胞内外 pH 勾配や亜鉛イオンが膜電位を感知する機構に与える影響を解析する。2量体化する Hv の各サブユニット間の膜電位感知機構の共同性を解析する。構造科学、計算機科学を用いてチャンネルの膜電位感知機構を視覚的に理解する。

4. 研究成果

電位依存性 H⁺チャンネル(Hv)は、他の電位依存性チャンネルの電位センサーに相同性の高い4回膜貫通タンパク質である。H⁺は4本のヘリックスの間をすり抜けて透過すると考えられている。一般的な電位依存性チャンネルの電位センサードメインでは H⁺が漏れ出たりすることはなく、Hv チャンネルの電位センサーのユニークな点である。申請者は、本研究の準備段階の実験として Hv チャンネルの電位センサードメインに変異を導入することにより H⁺透過性を保持しながらゲート電流を観測出来る変異体を作成することに成功した。さらに点変異を導入したところ、H⁺電流が消えゲート電流のみを生じる変異体を得ることに成功した。



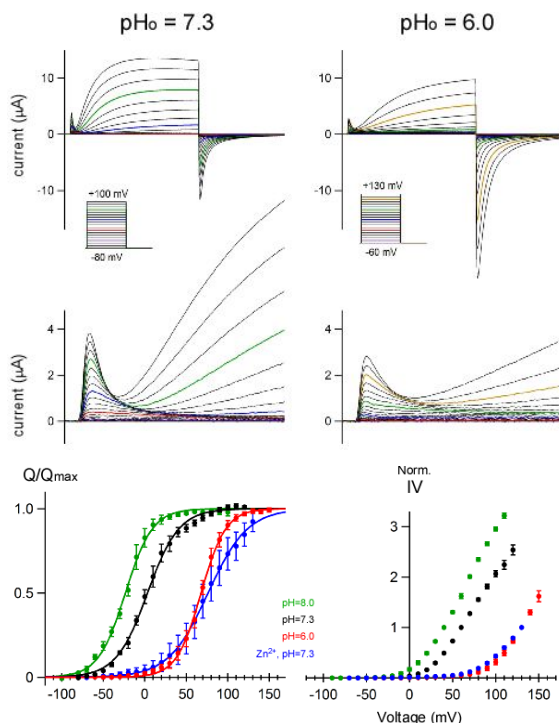
野生型 Hv および変異体 Hv に対して、電位センサーに点変異で Cys 残基を導入しツメガエル卵母細胞に発現させ、Alexa488-maleimide 試薬を Cys 架橋により結合させ、二本刺し膜電位固定法による膜電位コントロール下に電位センサーの動きを Alexa488 から発せられる蛍光シグナルの変化により測定し、定量的に解析した。



Hv チャンネルは細胞内外の pH 勾配に応じて、電流-電圧関係がシフト(閾値が変化)することが知られている。また、細胞外 Zn²⁺により活性化閾値が高くなりチャンネル電流が阻害される。これらの性質は、生体防御における活性酸素産生、射精後の精子の運動開始において、有効に働く生理的な Hv チャンネルの修飾機構である。

野生型 Hv および変異体 Hv に対して二本刺し膜電位固定法により細胞外の pH をコント

ロールした条件下で、ゲート電流、H⁺電流の電気生理学的パラメータを解析した。

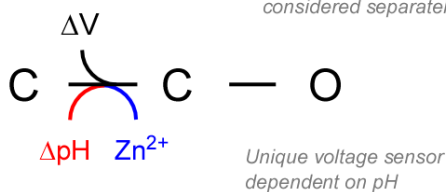


Hv チャネルの膜貫通領域(電位センサードメイン)の構造解析は低解像度ながらヘリックスの配置など明らかになりつつあり、構造を考える上での鋳型となる。その情報を基に、分子動力学的手法を用いて、2量体間の機能的連携をシミュレーションした。

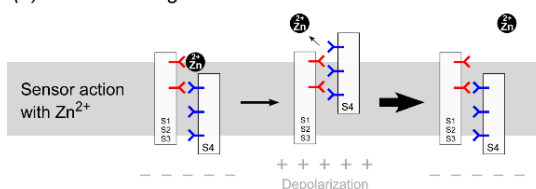
以上の実験結果から以下のチャネル開閉モデルを構築した。

(1) Kinetic Model

Voltage sensing and H⁺ permeation can be considered separately



(2) Zn²⁺ blocking model



Extracellular Zn²⁺ inhibits the voltage sensor activation.

Hv チャネルの開閉において、膜電位感知ステップと開閉ステップは分離でき、pH や Zn²⁺ は膜電位感知ステップに作用する。Zn²⁺ は電位センサーが下がった状態に結合し、上昇に伴いチャネルから分離する。再び下がるチャネルが閉じる遷移には影響を与えない。

本研究で得られた膜電位感知の概念は広く一般の蛋白質に応用できる期待が持てる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 12 件)

Fujiwara Y., Temperature-Sensitive Gating of Voltage-Gated H⁺ Channels, Journal of Physiological Sciences, Supplement1, 査読無、67 巻、2017、S61

Kondo XH, Fujiwara Y., Shirota M., Kinoshita K., A study of dynamics of palmitoylated Ankyrin-G around a lipid bilayer by coarse-grained simulations, Journal of Physiological Sciences, Supplement1, 査読無、67 巻、2017、S43

Kasuya G, Fujiwara Y., Tsukamoto H, Morinaga S, Ryu S, Touhara K, Ishitani R, Furutani Y, Hattori M, Nureki O., Structural insights into the nucleotide base specificity of P2X receptors., Sci Rep., 査読有、7 巻、2017、45208
DOI: 10.1038/srep45208.

Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y., Igarashi S, Suzuki EI, Nureki O, Hattori M, Ueda T, Shimada I., Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region., Proc Natl Acad Sci U S A., 査読有、113 巻、2016、4741 - 4746
DOI: 10.1073/pnas.1600519113

Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, zkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y., Okamura Y., Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating., Biochim Biophys Acta., 査読有、1858 巻、2016、2972-2983
DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.09.008.

Kasuya G, Hiraizumi M, Maturana AD, Kumazaki K, Fujiwara Y., Liu K, Nakada-Nakura Y, Iwata S, Tsukada K, Komori T, Uemura S, Goto Y, Nakane T, Takemoto M, Kato HE, Yamashita K, Wada M, Ito K, Ishitani R, Hattori M, Nureki O., Crystal structures of the TRIC trimeric intracellular cation channel orthologues, Cell Res., 査読有、26 巻、2016、1288-1301
DOI: 10.1038/cr.2016.140.

Fujiwara Y., Kondo HX, Shiota M, Kobayashi M, Takeshita K, Nakagawa A, Okamura Y, Kinoshita K., Structural basis for the membrane association of ankyrinG via palmitoylation., Sci Rep., 査読有、6巻、2016、23981
DOI: 10.1038/srep23981.

Okuda H, Yonezawa Y, Takano Y, Okamura Y, Fujiwara Y., Direct Interaction between the Voltage-sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H⁺ Channel Dimers., J BIOL CHEM, 査読有、291巻、2016、5935-5947
DOI: 10.1074/jbc.M115.666834.

Kasuya G, Fujiwara Y., Takemoto M, Dohmae N, Nakada-Nakura Y, Ishitani R, Hattori M, Nureki O., Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels., CELL REP, 査読有、14巻、2016、932-944
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.087.

Okamura Y, Fujiwara Y., Sakata S., Gating mechanisms of voltage-gated proton channels., Annu Rev Biochem., 査読有、84巻、2015、685-709
DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034307.

Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y., Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A., X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel., Nat Struct Mol Biol., 査読有、21巻、2014、352-357
DOI: 10.1038/nsmb.2783

Fujiwara Y., Okamura Y., Temperature-sensitive gating of voltage-gated proton channels., Curr Top Membr., 査読有、74巻、2014、259-292
DOI: 10.1016/B978-0-12-800181-3.00010-5.

[学会発表](計14件)

藤原 祐一郎, Approaches to structural dynamics of the voltage-gated H⁺ channel gating., 第95回日本生理学会大会(招待講演) 2018年

藤原 祐一郎, 電気生理で蛋白質を解析する, 第66回NCVC研究者交流会(招待講演) 2017年

藤原 祐一郎, 電位依存性プロトンチャ

ネルの温度感受性ゲーティング, 第94回日本生理学会大会(招待講演) 2017年03月29日、浜松

近藤寛子, 藤原祐一郎, 城田松之, 木下賢吾, 粗視化シミュレーションによるアンキリンGの細胞膜周辺での動態の解析, 第94回日本生理学会大会(招待講演) 2017年03月28日、浜松

藤原 祐一郎, 電位依存性 H⁺チャンネルのゲーティングとその構造基盤, Advanced Biological Chemistry Seminar 2017(招待講演) 2017年02月07日、京都

藤原祐一郎, 糟谷豪, 服部素之, 濡木理, ATP受容体(P2X)の2価イオンによる修飾とリガンド選択性の構造基盤, 第93回日本生理学会大会(招待講演) 2016年03月24日、札幌

藤原 祐一郎, 神経軸索でイオンチャンネルを裏打ちする蛋白質アンキリンの膜接着機構, 蛋白質研究会「第6回神経科学と構造生物学の融合研究会」(招待講演) 2015年11月26日、岡崎

藤原 祐一郎, Electrophysiological approaches to structural dynamics of the voltage-gated H⁺ channel, 第53回日本生物物理学会年会(招待講演) 2015年09月15日、金沢

竹下 浩平, 坂田 宗平, 山下 栄樹, 藤原 祐一郎, 岡村 康司, 中川 敦史, 電位依存性プロトンチャンネルの結晶構造, 第120回日本解剖学会総会・学術集会第92回日本生理学会大会合同大会, 2015年03月21日、神戸

奥田 裕子, 米澤 康滋, 鷹野 優, 岡村 康司, 藤原 祐一郎, 電位依存性H⁺チャンネルS4領域のトリプトファン残基が2量体間で協同し脱活性化のキネティクスを遅くする, 第120回日本解剖学会総会・学術集会第92回日本生理学会大会合同大会, 2015年03月21日、神戸

Yuichiro Fujiwara, Yasushi Okamura, Voltage-gated H⁺ channel dimer: from molecular structure to physiological function, 「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」領域終了記念シンポジウム, 2015年03月06日、大阪

藤原 祐一郎, 岡村 康司, 電位依存性 H⁺チャンネルのゲート電流, 第52回日本生物物理学会年会, 2014年09月25日、札幌

藤原 祐一郎、城田松之、小林恵、竹下浩平、中川敦史、岡村 康司、木下賢吾、イオンチャネルアンカー蛋白質(アンキリン G)の細胞膜接着機構の構造基盤、第37回日本神経科学大会、2014年09月11日、横浜

藤原 祐一郎、電位依存性 H⁺チャネル2量体の構造と機能、第3回若手研究フォーラム(招待講演)、2014年07月30日、大阪

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：20532980

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()