

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03403

研究課題名（和文）電位依存性H⁺チャンネルが膜電位とpHを感じる仕組みの解明研究課題名（英文）Elucidation of the voltage and pH sensor mechanism of the voltage-gated H⁺ channel

研究代表者

藤原 祐一郎（Fujiwara, Yuichiro）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20532980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：電位依存性H⁺チャンネル（Hvチャンネル）は貪食細胞に存在し、外部環境のpHや膜電位に応じて活性を制御します。Hvチャンネルのセンサー機構の仕組みを詳しく知るために実験を行いました。細胞内外のpHをコントロールした電気生理学的機能解析や電位センサーの電荷の移動を電気生理学的に測定する解析により、Hvチャンネルは細胞内外のpH勾配と膜電位勾配を感知する能力を持っており、その機構は、絶対的pH感知機能が膜電位センサー機能（電位センサーの動き）に影響を与えることで、pH勾配を感知する機能が発揮されることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でHvチャンネルは、細胞内外の絶対的pHが電位センサーの動きを制御することによって、チャンネル活性を制御することが分かった。Hvチャンネルは細胞内外の環境変化を感知し、貪食細胞の機能制御に重要な役割を果たしている。今後の研究では、Hvチャンネルの活性制御メカニズムや関与するシグナル伝達経路の詳細な解明、Hvチャンネルの他のセンサー機能との関連を解明、他の生物学的プロセスや疾患における役割の特定が期待される。この研究は貪食細胞の機能解明や関連疾患の治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Voltage-gated H⁺ channels (Hv channels) are present in phagocytic cells and regulate their activity in response to the pH and membrane potential of the external environment. Experiments were conducted to learn more about the mechanism of the Hv channel sensor mechanism. Electrophysiological functional analysis of controlled intracellular and extracellular pH and electrophysiological measurement of charge transfer in the potential sensor revealed that Hv channels have the ability to sense intracellular and extracellular pH gradients and membrane potential gradients. The mechanism revealed that the absolute pH sensing function influences the membrane potential sensor function (movement of the potential sensor), thereby exerting its ability to sense pH gradients.

研究分野：生理学、生物物理学

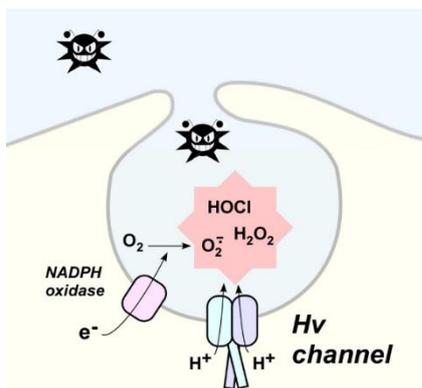
キーワード：イオンチャンネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現する電位依存性 H⁺チャネル (Hv チャネル) は、病原菌を退治する際の活性酸素の産生を担うイオンチャネルとして知られている。活性酸素は時としてアレルギーや自己免疫疾患など様々な疾病を誘発する“毒”ともなりうる分子であり、厳密な制御が必要となる。Hv チャネルは、細胞環境を感知してその活性が制御される貪食細胞のセンサー分子の一つである。膜電位や温度 (体温) はチャネルの駆動力を上げ、炎症性脂質メディエーターのアラキドン酸や細胞膜の伸展による制御機構も報告されている。H⁺を透過す Hv チャネルは細胞内外の相対的 pH 勾配 (Δ pH) を感知し、微小環境での pH 変化を鋭敏に捉え自身の活性を制御する、活性酸素産生におけるフィードバック制御ならびに細胞の pH ホメオスタシスの役割を果たす。本稿では、未解明の重要なセンサー機能の一つである pH 感知機構について取り組んだ本研究の結果を記す。

現在では種々のイオンチャネルの立体構造が解かれ、生命現象をミクロな視点から理解し、創薬・治療法確立に発展させるためにも、構造情報を基にした分子機能の詳細に迫る研究の重要性



がますます増してきている。本研究の Hv チャネルは、Na⁺や Ca²⁺などの金属イオンではなく H⁺が透過する独特の分子構造と機能を有することから、発見当初から世界中の研究者が注目し、生物物理学的観点や医学生理学的観点からの研究が盛んに行われている。K⁺チャネル研究をはじめとした金属イオンの透過機構などは研究が進んでいるが、チャネル蛋白質内部の H⁺移動、環境を感知するセンサー機構や分子の大きな構造変化に伴うチャネルの開閉機構などは理解が不十分で、膜環境を含めた蛋白質の物性やダイナミックな構造変化を観測・検討する必要性が求められている。膜内外の pH 勾配をセンシングする仕組みに迫り、チャネルが膜電位と pH を感知して生じる構造変化の関係性について包括的に説明する必要がある。

2. 研究の目的

好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現する電位依存性 H⁺チャネル (Hv チャネル) は、病原菌を退治する際の活性酸素の産生を担うイオンチャネルとして知られている。H⁺を透過す Hv チャネルは細胞内外の相対的 pH 勾配 (Δ pH) を感知し、微小環境での pH 変化を鋭敏に捉え自身の活性を制御する、活性酸素産生におけるフィードバック制御ならびに細胞の pH ホメオスタシスの役割を果たす。本研究は、従来の概念では説明できない、Hv チャネルが膜電位や pH 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う。立体構造が明らかとなっている今、次なるステップとして動的構造基盤の解明、駆動機構の理解を目的とする。

- ・ゲート電流を発生する変異体 Hv チャネルを利用して、膜電位を感知してから、H⁺が透過するまでの一連の機構をステップごとに分離して検討する。
- ・pH 変化に応答しない変異体を利用して、pH センサーの同定を含めた pH 感知機構の理解、膜電位感知機構との関連を解析する。

3. 研究の方法

・pH 勾配のセンシング機構の解明に向けた電気生理学的解析

電位依存性 H⁺チャネル (Hv チャネル) は細胞内外の pH 勾配をセンシングして開き閉じする。その分子構造基盤を明らかにするため、変異体を作成し電気生理学的解析を行った。変異体は、S4 電位センサーヘリックスに正電荷を持った Arg を導入した (変異を導入したサイトについては図 7 参照)。電気生理学的解析では、HEK293T 細胞に発現させた野生型および変異体 Hv チャネルを、ホールセルパッチクランプ法にて測定した。測定に用いた溶液は、75mM NMDG、180mM pH buffer (HEPES または MES または Tris)、1mM EGTA、3mM MgCl₂、Methanesulfonate を用いて pH = 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に調節した。浸透圧は 300 ± 9 mOsm、Liquid junction potential < 5mV は測定後に補正した。保持電位から +10mV ステップで段階的に脱分極させ発生する H⁺電流の閾値を解析した。

・膜電位のセンシング機構の解明に向けた電気生理学的解析

電位依存性 H⁺チャネル (Hv チャネル) は膜電位 (細胞内外の電位勾配) をセンシングして開き閉じする。S4 ヘリックスに存在する正電荷を持った Arg が膜電位を感知する電位センサーとし

て機能することが知られる。一般的な電位依存性チャネルは膜電位をセンシングする際に S4 正電荷の膜を横切る移動による一過性の電流（ゲート電流と呼ばれる）を発生する。Hv チャネルは不思議なことにはっきりとしたゲート電流を生じない、しかし、変異を導入することでゲート電流を観測することが出来、膜電位に応答した構造変化をモニターできた。電気生理学的解析では、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた野生型および変異体 Hv チャネルを、二本刺し膜電位固定法にて測定した。測定に用いた溶液は、90mM NaCl、20mM pH buffer（HEPES または MES または Tris）、2mM MgCl₂、HCl を用いて pH = 6.0, 7.0, 8.0 に調節した。保持電位から +10mV ステップで段階的に脱分極させ発生する H⁺電流を解析した。

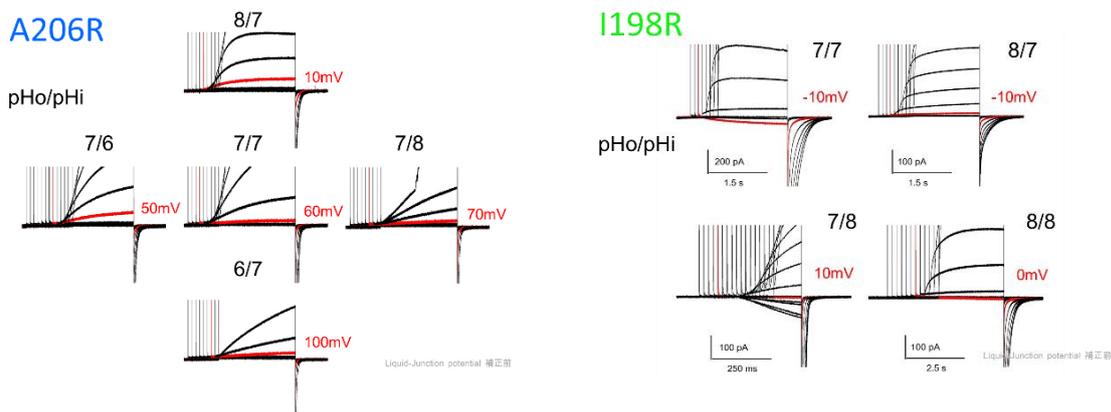
4. 研究成果

1. 野生型 Hv チャネルの pH 勾配のセンシング

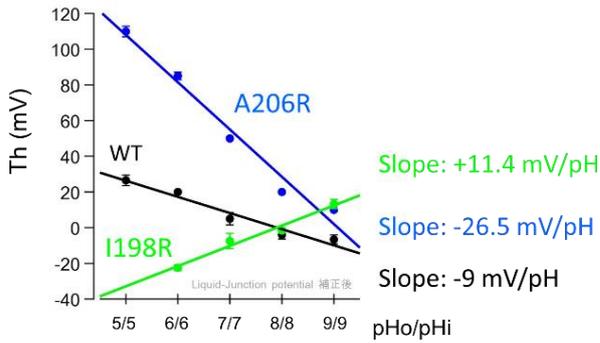
野生型 Hv チャネルを種々の pH 溶液を用いてホールセルパッチクランプ法にて解析した。閾値の値を正確に見積もるため、パルスの長さを膜電位ごとに変え、閾値付近の膜電位刺激において十分長時間の電圧パルスを与える手法を用いた。これまで報告されているように、細胞内外の pH の差 (Δ pH) が 1 変化すると約 40mV の閾値のシフトを観察した。今回、細胞外 pH および細胞内 pH に依存して変化する閾値を解析するため、それぞれを X 軸、閾値を Y 軸としてプロットしたグラフを作成し、傾きを求めたところ、それぞれが \pm 40mV 前後の値となった。これは、Hv チャネルの pH センシングは、細胞外または細胞内 pH の絶対値ではなく、細胞内外の相対的 pH (pH 勾配と表現することもある) をセンシングしていると解釈できる結果となった。

2. 変異体 Hv チャネルの pH 勾配のセンシング

変異体 Hv チャネルを種々の pH 溶液を用いてホールセルパッチクランプ法にて解析した。測定は野生型 Hv チャネルと同様に行い、細胞内/外 pH に対する電圧閾値をプロットした。A206R 変異体では、電流トレースの縦方向に見られるように、細胞内の pH が 7 の時は細胞外 pH に依存して閾値の十分な (40mV-50mV) シフトが見られる。しかしながら大変興味深いことに、電流トレースの横方向に見られるように、細胞外の pH が 7 の時は細胞内 pH に依存する閾値の変化がわずか (約 10mV) しか観察されなかった。閾値のプロットに見られるように、細胞外 pH に依存した閾値の変化は -45mV と野生型と変わらないまたはやや急勾配になったが、細胞内 pH に依存した閾値の勾配が劇的に緩やか (-17mV) になった。全ての pH 領域で観察された。これは、この A206R 変異体では、閾値は Δ pH に依存しないということになり、特に、細胞外 pH への依存性が劇的に減弱した。I198R 変異体では、電流トレースに見られるように、 Δ pH の変化によって閾値に与える影響はわずか (約 10mV) しか観察されなかった。細胞外 pH に依存した閾値の勾配 (-15mV)、細胞内 pH に依存した閾値の勾配 (+25mV) とともに緩やかになった。この減弱した pH 依存的な閾値のシフトは、全ての pH 領域で観察された。

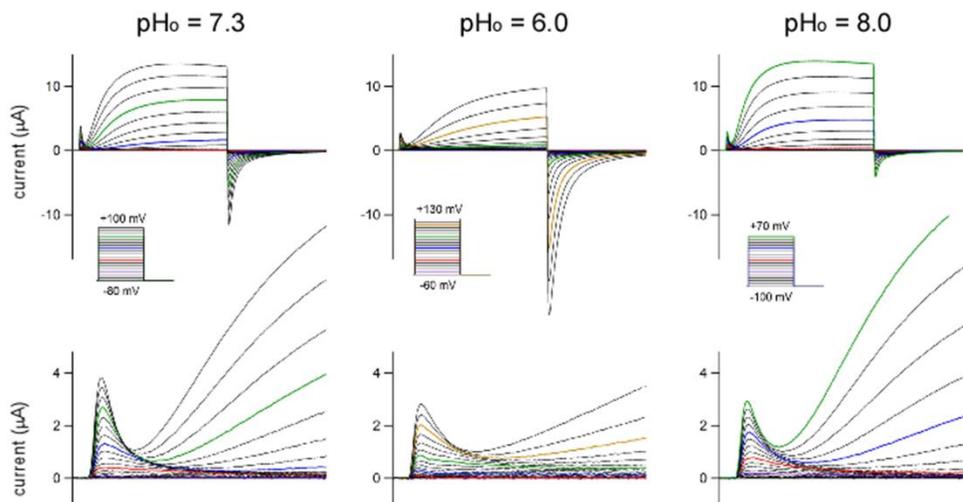


次に、細胞内外に同じ pH 溶液を用いて測定した閾値をプロットした。野生型では、非常に緩やかな (-9mV) 勾配を呈した。この緩やかな勾配が故に、Hv チャネルが細胞内外の pH 勾配 (Δ pH) に依存して閾値がシフトする現象を呈する。また、わずかであるが細胞外 pH に強く依存していることが観察された。A206R 変異体では、強い勾配を呈する (-26.5mV)。このことから Hv チャネルは変異により、もはや Δ pH に依存して閾値がシフトする現象を呈しなくなった。むしろ、細胞外 pH に優位に強く依存していることが観察された。I198R 変異体では、逆の勾配となり、わずかに細胞内 pH に強く依存して閾値が変化することが観察された。

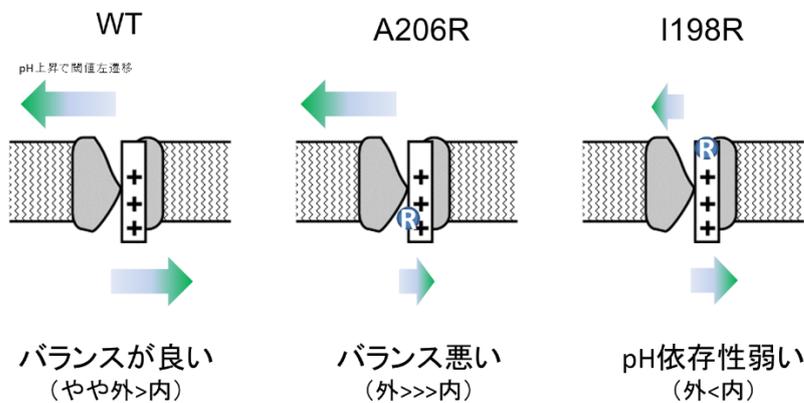


3. ゲート電流（膜電位センシング）の測定

点変異を導入した野生型 Hv チャンネルを卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法にてゲート電流の解析を行った。細胞内の pH は不変（約 pH7.2）、細胞外の pH を変えて測定を行った。pH を変化させると H⁺電流の発生閾値は変化した。pH の変化はゲート電流の発生閾値を変化させた。このことは、溶液の pH の変化は Hv チャンネルの開口ステップに影響を与えるのではなく、膜電位センシングステップに影響を与えることで、閾値を変化させることを示唆する。



実験結果から考察すると、Hv チャンネルが細胞内外の相対的 pH 勾配 (Δ pH) に依存して閾値がシフトするというこれまでの定説には誤謬がある。変異体実験より、Arg 導入により pH センシング機能をかく乱すると、細胞内または細胞外独立に pH 依存性が変化した。これは、pH センシングは細胞内外の pH の絶対値に依存していることを意味する。Hv チャンネルは細胞内外に同程度の能力の pH センサーを有していることが考えられ、細胞内外環境の pH 変化を鋭敏に感知する機構が備わっていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagaki Natsune, Ohta Akane, Ohnishi Kohei, Kawanabe Akira, Minakuchi Yohei, Toyoda Atsushi, Fujiwara Yuichiro, Kuhara Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 The mechanoreceptor DEG 1 regulates cold tolerance in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiya Takunari, Takeshita Kohei, Kawanabe Akira, Fujiwara Yuichiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Intermolecular functional coupling between phosphoinositides and the potassium channel KcsA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102257 - 102257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 神鳥和代、藤原祐一郎
2. 発表標題 Molecular basis of sugar selectivity of sodium-glucose co-transporter SGLT
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Intracellular regulation of the voltage-gated proton channel
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 紀谷拓音、川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Functional coupling between phosphoinositides and KcsA studied by lipid-bilayer recording
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Intracellular molecules affecting voltage-gated proton channel activity
3. 学会等名 生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 紀谷拓音、川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Functional control of KcsA by phosphoinositide
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Cytoplasmic structural changes of voltage-sensing phosphatase detected by patch clamp fluorometry
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 膜近傍の環境を感知する電位依存性H ⁺ チャネルの分子機構
3. 学会等名 生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuyo Kamitori, Yuichiro Fujiwara
2. 発表標題 Structural and molecular basis of Na ⁺ /D-glucose co-transporters hexose specificity
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuyo Kamitori, Yuichiro Fujiwara
2. 発表標題 Sugar specificity and structural analyses of Na ⁺ /D-glucose co-transporters Could rare sugars be transported via SGLTs?
3. 学会等名 7th International Society of Rare Sugars (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 祐一郎
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルがpHと膜電位を感じる機構
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田 麻紀1、竹下 浩平2、川鍋 陽1、藤原 祐一郎1
2. 発表標題 膜の張力と脂質による電位依存性H ⁺ チャネル活性制御機構
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川鍋 陽1、高田 麻紀1、竹下 浩平2、藤原 祐一郎1
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルHv1はATPと直接結合して活性調節を受ける
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 紀谷 拓音1、竹下 浩平2、川鍋 陽1、藤原 祐一郎1
2. 発表標題 Functional regulation and intermolecular interaction of phosphoinositides on potassium channel KcsA
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原 祐一郎1,2、平野 磨生子1、神鳥 和代1,2
2. 発表標題 Creation of Photoswitchable Ion Channels and Measurement of Their Dynamic Structural Changes
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川鍋陽、高田麻紀、藤原祐一郎
2. 発表標題 電位依存性プロトンチャネルHv1のATPによる活性調節 The voltage-gated proton channel is regulated by ATP
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紀谷拓音、竹下浩平、川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 カリウムチャネルとイノシトールリン脂質の分子間相互作用と機能修飾
3. 学会等名 2021(令和3)年度 生理研研究会、細胞の局所コミュニティ研究会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 電位依存性 H ⁺ チャネルの温度感受性ゲーティングの構造基盤
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川鍋陽、藤原祐一郎
2. 発表標題 Patch Clamp fluorometry によるVSP 細胞内構造変化解析に向けて
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原祐一郎
2. 発表標題 膜近傍の環境を感知する電位依存性H ⁺ チャネルの分子機構
3. 学会等名 2020(令和2)年度 生理研研究会、生体コモンスペース研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関