

【助成 38 -36】

生体の電気素子「イオンチャネル」の電圧感知機構

研究者 香川大学医学部 教授 藤原 祐一郎

共同研究者 香川大学医学部 講師 川鍋 陽

〔研究の概要〕

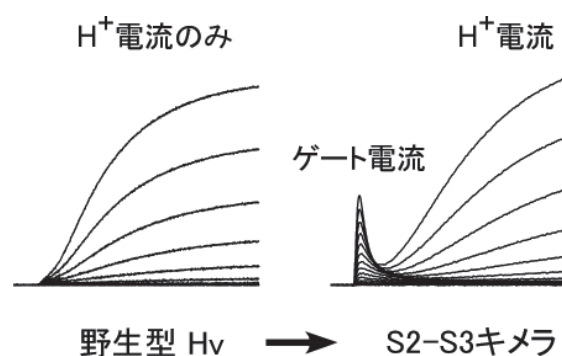
脳や心臓の活動に代表されるように、細胞膜を介した電氣的シグナリングは我々の生命活動にとって重要な役割を果たしている。その電気活動を発生させ制御する中心的な役割を担う分子が電位依存性チャネルである。しかしながら、電位依存性チャネルが膜電位を感受できる分子機構の詳細、特に分子構造の変化は未だに明らかになっていない。本研究は、電気生理学的手法、光学的観測手法を用いて、電位センサーの動きをダイナミックに解析し、電位依存性チャネルが膜電位を感じ取るメカニズムを分子構造のレベルから明らかにすることを目的に行った。最小単位の電位依存性チャネルとして機能する、電位依存性 H⁺チャネル (Hv チャネル)を用いて研究を進め、全ての電位依存性チャネル共通に成り立つ原理の理解を目指した。

〔研究経過および成果〕

イオンチャ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) を詳細に解析した。変異導入により電荷の移動が観測された変異体 Hv チャネルをベースに、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した。Hv チャネルの生理的修飾因子である細胞内外 pH や亜鉛イオン、脂質分子が膜電位を感知する機構に与える影響を解析した。

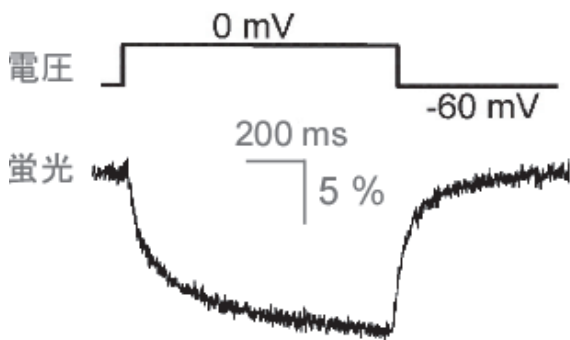
電位依存性 H⁺チャネル (Hv) は、他の電位依存性チャネルの電位センサーに相同性の高い 4 回膜貫通タンパク質である。H⁺は 4 本のヘリックスの間をすり抜けて透過する。一般的な電位依存性チャネルの電位センサードメインでは H⁺が漏れ出たりすることなく、Hv チャネルの電位センサーのユニークな点である。

研究者は、Hv チャ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、アフリカツメガエル卵母細胞二本刺し膜電位固定法および HEK 細胞を用いたパッチクランプ法により解析を行った。さらに点変異を導入して解析を行ったところ、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。



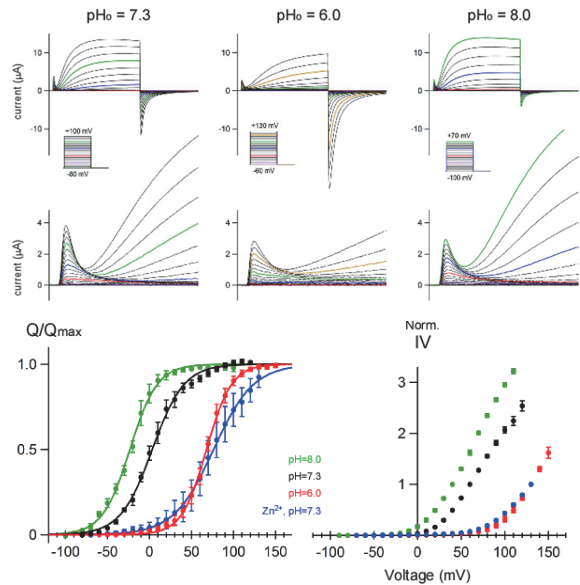
野生型 Hv および変異体 Hv に対して、電位センサーに Cys 残基を導入する点変異体を作成し、アフリカ

ツメガエル卵母細胞に発現させ、蛍光プローブ Alexa488-maleimide 試薬を結合させ、卵母細胞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プローブ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。これにより、ゲート電流を観測することで電位センサーの動きを推定する間接的な解析から脱却し直接電位センサーの構造変化をとらえることに成功した。本手法をさらに発展させ、他の電位センサー分子に付加した蛍光プローブから発せられる蛍光シグナルをパッチクランプ下に解析することに成功した。本研究で得られる電圧感知機構の概念の幅広い応用を可能にすることが期待できる。



Hv チャンネルは細胞内外の pH 濃度に応じて、電流-電圧関係がシフト(膜電位閾値が変化)することが知られている。また、細胞外 Zn^{2+} 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ことが知られている。

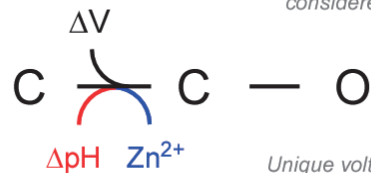
野生型 Hv および変異体 Hv に対してツメガエル卵母細胞二本刺し膜電位固定法により細胞外 pH と細胞外の Zn^{2+} 濃度をコントロールした条件下で、ゲート電流、 H^+ 電流の各種電気生理学的パラメーターを解析した。



Hv チャンネルは炎症性脂質メディエーターにより活性化することが知られている。脂質を投与して膜電位の感受性に与える影響をパッチクランプ法により解析を行い、膜電位感知・チャンネル開口に脂質が結合することの必要性を明らかにした。

(1) Kinetic Model

Voltage sensing and H^+ permeation can be considered separately



Unique voltage sensor dependent on pH

Hv チャンネルの開閉において、膜電位感知ステップと開口ステップは分離でき、pH や Zn^{2+} などの活性化修飾因子は膜電位感知ステップに作用するというモデルが得られた。この膜電位感知機構の概念は広く一般の蛋白質に応用できる期待が持てる。

[発表論文]

1. Kawanabe A., Fujiwara Y., "Cytoplasmic structural changes of voltage-sensing phosphatase detected by patch clamp fluorometry" The Journal of Physiological Sciences, Vol.71 Suppl 1, p140 (2021)