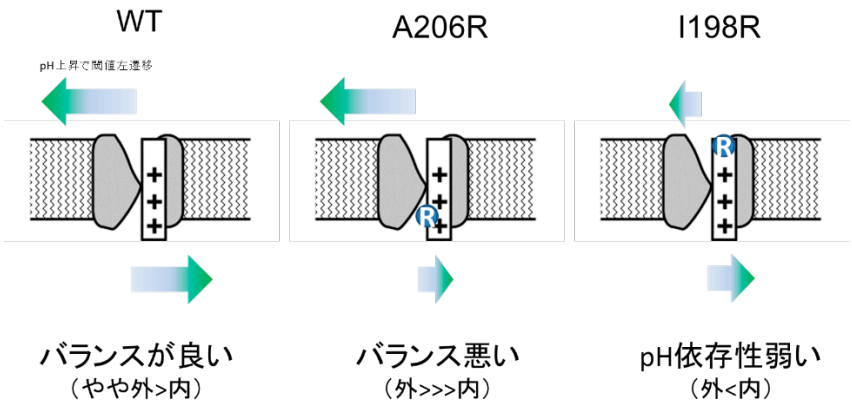
97　プロトンチャネルによるpHホメオスタシスの分子基盤	藤原　祐一郎

【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^+を透す Hv チャネルは細胞内外の相対的 pH 勾配（ΔpH）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、Hv チャネルの未解明の pH センシング機構、特にΔpH を感知する機構を明らかにする目的で行った。

【方法】培養細胞に発現させた野生型および変異体 Hv チャネルに対して、パッチクランプ法を用いて種々の細胞内外の pH 条件のもと、H^+電流の発生する膜電位閾値の解析を行った。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 チャネルに対して、二本刺し膜電位固定法を用いて種々の細胞外 pH 条件のもと、マクロ電流（H^+電流＋ゲート電流）の発生閾値電位の解析を行った。

【結果】野生型 Hv チャネルでは、細胞内 pH の変化に対しても、細胞外 pH の変化に対しても同程度に、H^+電流の発生閾値が約 40 mV/pH シフトした。A206R 変異体では、細胞内 pH の変化に対する閾値のシフトが著しく減弱した。I198R 変異体では、細胞内/外 pH の変化、両方ともに対する閾値のシフト割合が減弱した。pH 変化は H^+電流の発生する膜電位閾値を変化させるばかりではなく、ゲート電流の発生閾値も変化させた。このことは、pH は膜電位センシングに影響を与えることを示唆する。以上の実験から、Hv チャネルは細胞内外の相対的ΔpH に依存して閾値がシフトするというこれまでの概念よりも、細胞内そして細胞外の絶対的 pH に独立して依存する機構を有すると考えるほうが妥当である。Hv チャ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。

細胞内/外の pH 感知機構のモデル



97. プロトンチャネルによる pH ホメオスタシスの分子基盤

藤原　祐一郎

香川大学 医学部 分子生理学

Key words：イオンチャネル，膜電位依存性，プロトン

緒　言

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［1］。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［2］、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^+を透す Hv チャネルは細胞内外の相対的 pH 勾配（ΔpH）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［3］。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 Ca^{2+}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［4］。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。本研究は、H^+チャネルを介した生体防御機構の一端を担う pH センシング機構の分子構造基盤を明らかにする目的で行った。電気生理学的機能解析を駆使して研究を進め、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（図 1）。

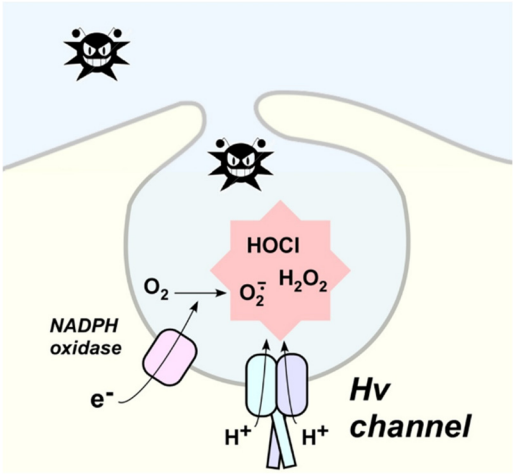


図 1. 白血球で働く電位依存性 H^+チャネル

オキシデースの活性により生じる起電力により開く Hv チャネル。pH など種々の刺激を感知する。

方　法

1.　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、75 mM NMDG、180 mM pH buffer（HEPES または MES または Tris）、1 mM EGTA、3 mM $MgCl_2$、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 <5 mV は測定後に補正した。保持電位から＋10 mV 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。

2.　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、90 mM NaCl、20 mM pH buffer（HEPES または MES または Tris）、2 mM $MgCl_2$、HCl を用いて pH＝6.0、7.0、8.0 に調節した。保持電位から＋10 mV 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。

結　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（ΔpH）が 1 変化すると約 40 mV の閾値のシフトを観察した（図 2 左）。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±40 mV 前後の値となった（図 2 右）。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。

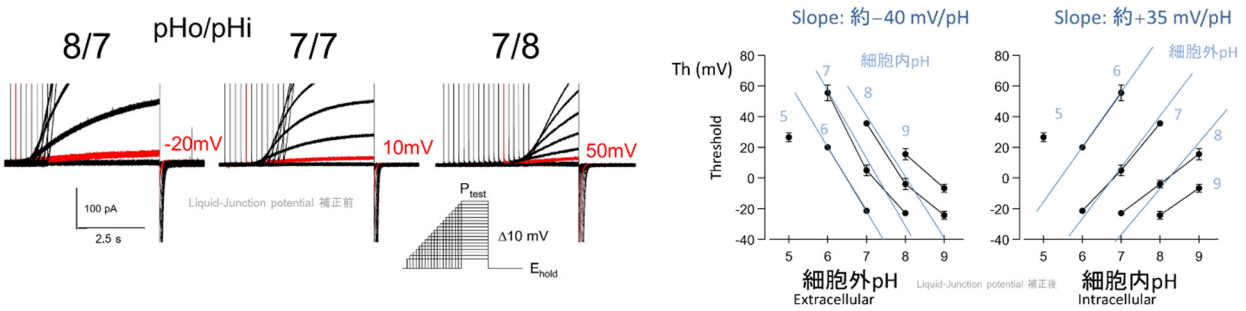


図 2.　野生型 Hv チャネルの pH 依存性ゲーティング

左）代表的なステップパルスにより出現する電流トレース。用いたステップパルスは図中。赤トレース（閾値電圧）。測定溶液（細胞内/外）の pH は図中。

右）細胞内／外 pH vs 閾値電圧（n＝5～8）。直線近似により傾きを算出。

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（図 3 左）、細胞内/外 pH に対する電圧閾値をプロットした（図 3 右）。

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（40 mV～50 mV）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 10 mV）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−45 mV 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（−17 mV）になった（図 3 右）。全ての pH 領域で観察された（図 3 右）。これは、この A206R 変異体では、閾値は ΔpH 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。

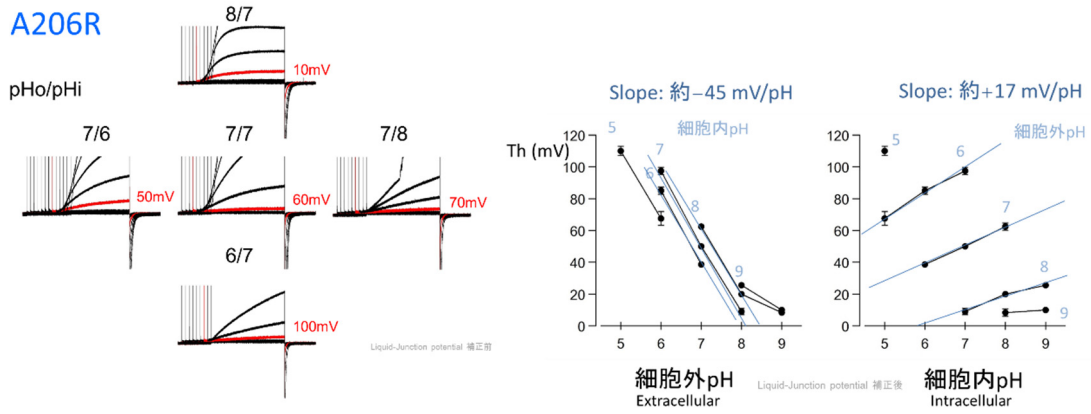


図 3. 変異体（A206R）の pH 依存性ゲーティング

左）代表的なステップパルスにより出現する電流トレース。測定は図 2 と同様。

右）細胞内／外 pH vs 閾値電圧（n=3～6）。

I198R 変異体では、電流トレースに見られるように、ΔpH の変化によって閾値に与える影響はわずか（約 10 mV）しか観察されなかった（図 4 左）。細胞外 pH に依存した閾値の勾配（−15 mV）、細胞内 pH に依存した閾値の勾配（+25 mV）とも緩やかになった（図 4 右）。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（図 4 右）。

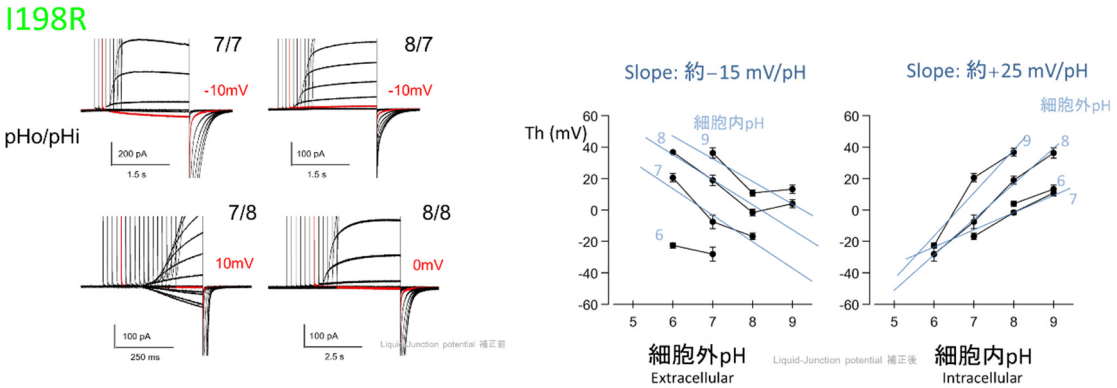


図 4. 変異体（I198R）の pH 依存性ゲーティング

左）代表的なステップパルスにより出現する電流トレース。測定は図 2 と同様。

右）細胞内／外 pH vs 閾値電圧（n=3～6）。

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（図 5）。野生型では、非常に緩やかな（−9 mV）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（ΔpH）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（−26.5 mV）。このことから Hv チャネルは変異により、もはやΔpH 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。

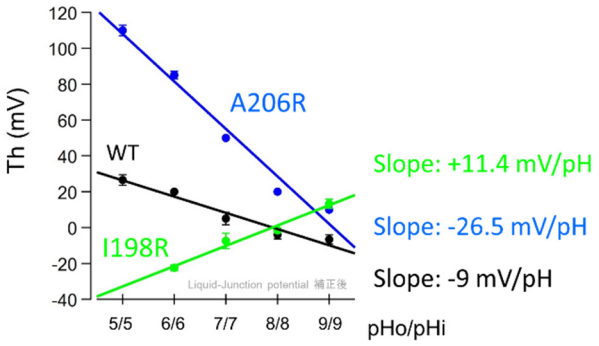


図 5. 細胞内外に同じ pH 溶液を用いて測定した閾値

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（図 6）。細胞内の pH は約 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。

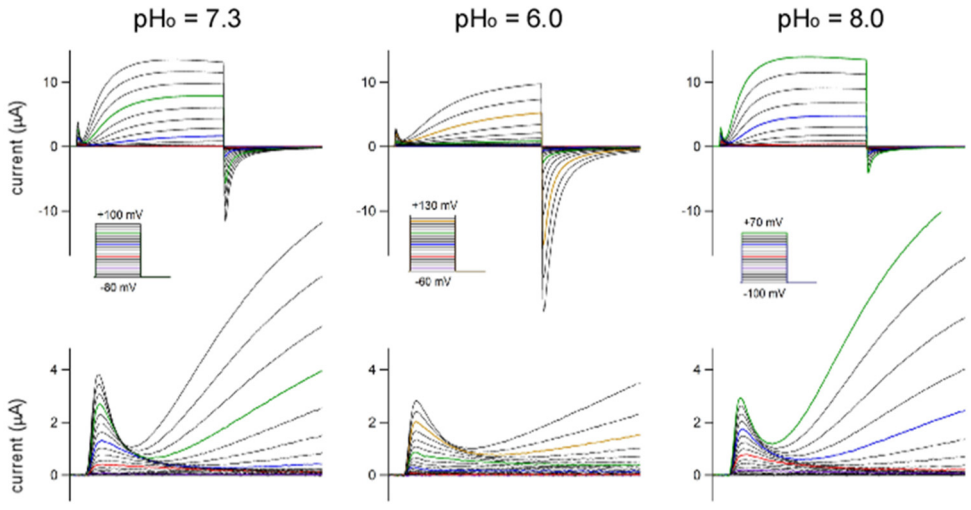


図 6. ゲート電流と pH の関係

上）代表的なマクロ電流トレース。マクロ電流（H^+電流＋ゲート電流）はステップパルス（図中）により測定。

下）ゲート電流部分の拡大。

考　察

実験結果から考察すると、Hv チャネルが細胞内外の相対的 pH 勾配（ΔpH）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。

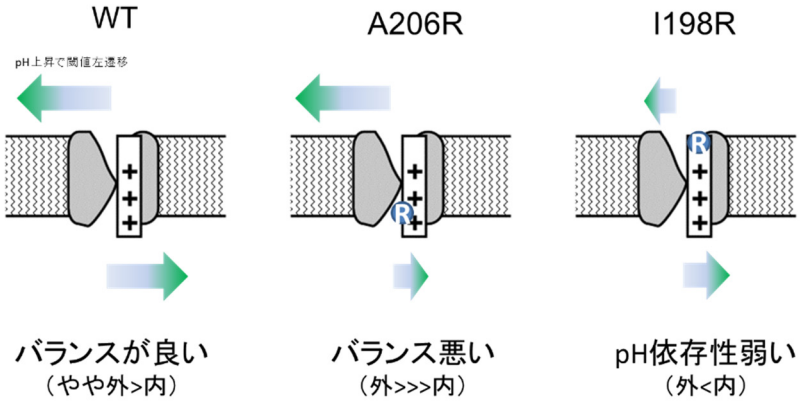


図 7.　細胞内/外の pH 感知機構のモデル
S4 電位センサーヘリックス上に Arg を変異導入した位置を図示した。野生型（WT）では細胞内外の pH センシング能に差がほとんどなく、変異導入によりセンシング能が変化するモデル。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学研究科統合生理学研究室の竹村久美（所属は当時）、香川大学医学部分子生理学講座の髙田麻紀である。

文　献

1)　DeCoursey TE. Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):599-652. doi: 10.1152/physrev.00011.2012.
2)　Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A, Okamura Y. The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H(+) channel Hv1. Nat Commun. 2012 May 8;3:816. doi: 10.1038/ncomms1823.
3)　Cherny VV, Markin VS, DeCoursey TE. The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. J Gen Physiol. 1995 Jun;105(6):861-96. doi: 10.1085/jgp.105.6.861
4)　Okamura Y, Fujiwara Y, Sakata S. Gating mechanisms of voltage-gated proton channels. Annu Rev Biochem. 2015;84:685-709. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034307.