助成番号　210707	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	細胞内膜の膜電位の意義の解明		
研究テーマ（英文）	Understanding of physiological roles of endomembrane potentials		
研究期間	2021年 ～ 2023 年	研究機関名　大阪大学医学系研究科	
研究代表者	氏名（漢字）	大河内　善史	
	氏名（カタカナ）	オオコウチ ヨシフミ	
	氏名（英文）	Yoshifumi Okochi	
	所属機関・職名	大阪大学大学院医学系研究科・准教授	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）
近年エンドソームやライソソームで機能するイオンチャネルが次々と同定され、その中には電位依存性を持つイオンチャネルも存在することが明らかになり、細胞内膜の膜電位が動的に変化し細胞機能を制御する可能性が指摘され始めた。しかし、細胞内の膜電位変化を計測する技術が確立されていないため、議論の域を出ない。本研究では細胞内膜、特にファゴソームの膜電位を計測する方法を確立し、その生理的な意義の解明を目指した。
膜電位プローブ Merm2 を安定発現するマクロファージ系の培養細胞 RAW264.7 を作成し、ファゴソーム膜電位のイメージングを行い、貪食前後のファゴソーム膜電位の変化を観察した。その結果、ファゴソーム膜電位が貪食直後に脱分極し、その後再分極することが分かった。貪食時には細胞内カルシウム濃度が高くなることが知られていたため、つぎに、膜電位変化と細胞内カルシウムの変化を同時に計測した。その結果、カルシウム変化と連動して膜電位が変化するタイミングがあることを見出した。そこで、カルシウムによって制御されるイオンチャネルで RAW 細胞に発現し、ファゴソーム膜に局在する分子を同定する目的で、RNA シークエンスおよび単離したファゴソーム膜の質量分析を行った。その結果、カルシウムによって活性化し、膜電位制御に関わる分子を見出した。この結果をもとに、阻害剤を用いた実験を行った。その中でカリウムチャネル阻害剤を用いた場合に、統計的に有意ではなかったが、いくつかのファゴソーム膜電位が阻害剤無しの場合と比べて変化していることに気がついた。そこでカリウムチャネルと同じように膜電位を過分極方向に変化させる役割を持つクロライドチャネルを阻害する薬剤を組み合わせたところ、阻害剤なしと比べて有意に膜電位が変化することが分かった。この結果は、カリウムチャネルとクロライドチャネルの両方がファゴソーム膜電位制御に関与する可能性を示唆する。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）
The recent findings that organelle-specific ion channels show voltage dependency suggest that organelle has its own membrane potential, which might play roles for regulating organelle functions by changing the membrane potential. However, it is still not known whether organelle membrane potential changes and what is the level of membrane potential if changes, because reliable methods measuring membrane potential in living cells are lacking. To overcome this problem, we attempted to establish the method for measuring membrane potential in organelle, especially phagosome. We first established the RAW264.7 cell line stably expressing Merm2, a voltage-sensitive fluorescent probe. Using this cell, we monitored the fluorescent changes before and after phagosome formation. We found that transient depolarized membrane potential in phagosomes were observed after phagosome formation. We next addressed whether the transient membrane potential changes are related to intracellular calcium dynamics. We monitored the intracellular calcium ion using R-GECO, a calcium sensitive florescent probe, with membrane potential. We found that membrane potential changes are occasionally followed by increased intracellular calcium. Taken together, our findings suggest one of mechanisms regulating phagosomal membrane potential; the membrane potential in phagosomes are regulated by intracellular calcium.