

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08554

研究課題名(和文)細胞生存に係る酸感受性アニオンチャネルの生理的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of physiological roles of acid-sensitive anion channels in cell survival

研究代表者

沼田 かのり (佐藤かのり) (Sato-Numata, Kaori)

福岡大学・医学部・その他

研究者番号：60614196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、酸で活性化するアニオンチャネル(ASOR)の生存に係る生理的役割と、ASORの分子実態を明らかにする事を目的として研究を行った。まず、私たちが絞り込んだ候補分子Aのノックアウト細胞(KO細胞)を作成した。KO細胞と野生株細胞(WT細胞)との比較実験を行った結果、KO細胞の増殖率がWT細胞に比べて低い事、そして、KO細胞の断面積がWT細胞に比べて大きい事を明らかにした。他の研究グループが最近報告した、ASORの候補分子、TMEM206について検証実験を行った結果、TMEM206のノックダウン細胞のASOR電流がコントロール細胞に対して著しく抑制される事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で私たちが作成した候補分子Aのノックアウト細胞(KO細胞)は、細胞増殖率と細胞断面積において、野生株細胞(WT細胞)と比べて明らかに差があることが明らかになった。このKO細胞とWT細胞との比較実験は、ほかにも様々な点において比較検証する必要がある、これらを明らかにすることで候補分子Aの生存に寄与する生理学的役割が新たに明らかになることが期待できる。また、パッチクランプ法により確認されたもう一つの候補分子TMEM206において、候補分子Aとの相互作用については今後の研究課題として残ったが、複雑なASOR分子実態を解明するうえで大きな手掛かりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We performed to reveal the physiological function of the acid-activated anion channel (ASOR), which contribute to survival, and the molecular identity of ASOR. First, we created down candidate molecule A knockout cells (KO cells). As a result of a comparative experiment of KO cells and wild type cells (WT cells), it was revealed that the proliferation rate of KO cells was lower than that of WT cells and the cross-sectional area of KO cells was larger than that of WT cells. Also, we examined whether TMEM206, one of the molecular candidates for ASOR reported in a recent study, is actually candidate for ASOR in human cervix HeLa cells. It was found that the ASOR current of the TMEM206 knockdown HeLa cell was significantly suppressed compared to the ASOR current of the control HeLa cell.

研究分野：細胞生理学

キーワード：アシドーシス アニオンチャネル

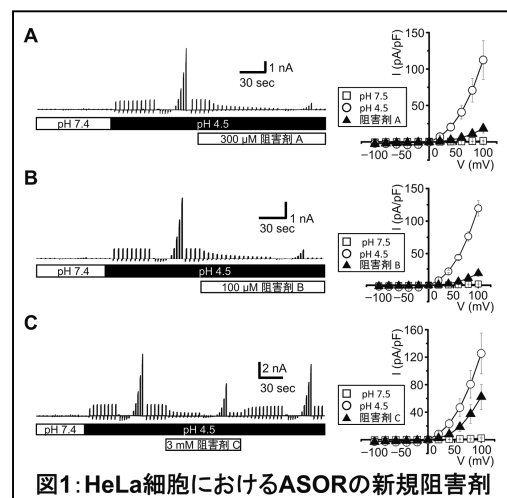
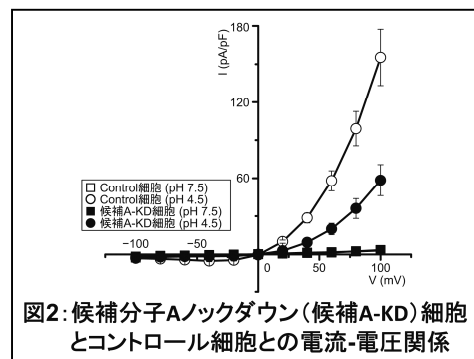
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸感受性外向整流性アニオンチャネル ASOR (acid-sensitive outwardly rectifying anion channel) は、2003年にセルトリ細胞で初めて発見された酸で活性化するアニオンチャネルであり[1]、その後、心臓や大脳皮質神経細胞など、様々な細胞種に発現していることが次々に報告された[2-4]。ASORについて、これまでに私たちの研究グループが世界をリードして研究を進めており、1. ASORは外傷により二次的に引き起こされる強度のアシドーシス条件下で活性化し、細胞を膨張させてネクローシス性細胞死を引き起こす事[3]、2. 子宮頸癌由来 HeLa 細胞に発現する ASOR に温度感受性があり、体温に近い温度で活性が増大すること[5]、3. マウスの大脳皮質神経細胞にも ASOR が発現しており、脳虚血や外傷によって脳神経が受けるネクローシス性細胞死は、ASOR の低温性抑制によって抑制される事[2]などを明らかにした。これまでに明らかになっている ASOR の生理的役割は、細胞のネクローシス性細胞死を引き起こすという、細胞が『死ぬため』に担っている役割だけであり、最近では、『死』のイオンチャネルと捉えられがちになっている現状にある。体内において、教科書的に生命を維持できる pH の範囲は、pH 7.0 ~ pH 7.7 と言われており、ASOR の活性領域である pH 6.0 以下にはなり得ないと考えられている。しかしながら局所的に見ると、分泌顆粒内は pH 5 付近であり、分泌顆粒の開口分泌時にその近傍で pH が一時的に非常に低くなることが推定されているなど、病的な状態に限らず正常状態でも pH は一時的に非常に大きく変動していることが十分予想される。このことから、ASOR は正常状態でも機能していることが推測され、何かしら生存のために重要な役割を担っていると考えられるが、現時点ではほとんど研究がなされていない。

一方、ASOR の分子実体において、これまで多くの研究者が分子同定に挑戦し、塩素イオンチャネルの1つである ClC-3 などの候補分子が報告されている。しかしながら、いずれの分子も私たちの研究グループで ASOR として研究を進めているイオンチャネルではない

事を実験的に明らかにし[5-8]、現在も分子実体が不明のままにある。そのため、ASOR は、主に電気生理学的手法を用いて研究が行われているが、薬理的性質についてもあまり研究が進んでいない現状にある。最近、薬理的に性質が類似している容積感受性外向整流性アニオンチャネル VSOR (volume-sensitive outwardly rectifying anion channel) が、酸性条件下において機能が変化して ASOR になるという説が報告された[9]。しかしながら、私たちは、ASOR の新規阻害剤を明らかにすると共に、VSOR における阻害効果が異なること[6]、VSOR のコア分子である LRRC8A や、そのパラログが、ASOR の活性やキネティクスに参与しないこと[7]から、ASOR が VSOR である説を否定した。その後、さらに ASOR の新規阻害剤を明らかにし(佐藤、未発表: 図1) ASOR の候補の選定を行っている。最近、候補のうち、1つの分子 A を siRNA によりノックダウンして得た候補分子 A のノックダウン(候補 A-KD)細胞とコントロール細胞との電流密度を比較した結果、コントロール細胞に比べて、候補 A-KD 細胞の電流密度が小さい実験結果を予備的に得ることができた(佐藤、未発表: 図2)。



2. 研究の目的

本研究は、上記の学術的背景及び、これまでに得られた研究成果を基に、1. ASOR が『生きるため』に担っている生理的役割、2. ASOR の真の分子実体、の2つについてこの3年間で明らかにする。まず、細胞移動や、細胞が能動的に膨張する事が知られている細胞周期において、アシドーシス条件下における ASOR の関与を、細胞移動測定法、細胞容積測定法、細胞周期モニタリング法を適用して検討する。さらに、最近明らかにした ASOR の候補分子 A についてパッチクランプ法を用いた電気生理学的性質の比較検討だけでなく、PI 染色陽性テストを用いた酸毒性死における比較検討、容積測定法を適用してより詳細な解析を進める。また、ASOR は、細胞の種類によって陰イオンの透過性が異なることや、阻害剤の抑制効果にばらつきがあること[10]が報告されていることから、ASOR が単一の分子のみで構成されているという理論では説明が難しい。そこで、ASOR が複数の分子によって構成されていると推測し、これまでに私たちが明らかにした薬理学的性質から他の候補分子を選定し、候補分子ノックダウン細胞とコントロール細胞による比較実験を行い、候補分子を特定する。

3. 研究の方法

ASOR の生存に係る生理的役割の解明については、細胞移動測定法、細胞容積測定法、細胞周期モニタリング法、行動解析法、パッチクランプ法、PI 染色陽性テストの計 6 種類を適用して行う。また、ASOR の分子実体の解明においては、遺伝子サイレンシング法、遺伝子導入法、PI 染色陽性テスト、細胞容積測定法、パッチクランプ法、PCR 法の計 6 種類を適用して ASOR 候補分子の絞り込みを行う。さらに、ASOR の真の分子による生理的役割をノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、細胞レベルだけではなく、組織や個体など多階層からアプローチし、より詳細な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 酸性条件下における細胞移動測定実験

野生株の HeLa 細胞において、細胞移動測定実験を行った。pH 7.5 の条件下に比べて、pH 5.5 の条件下では、細胞の移動率が高かったが、ASOR の阻害剤存在下においてその影響が ASOR によるものである、と断定できる結果を得ることができなかった。

(2) ノックアウト細胞 (KO 細胞) と野生株細胞 (WT 細胞) との比較実験

私たちがこれまでの研究により絞り込んだ ASOR の候補分子 A について、遺伝子サイレンシング法を用いて、HeLa 細胞を用いて KO 細胞を作成した。試行錯誤を繰り返した結果、ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞とヒト胎児腎細胞由来 HEK 細胞でそれぞれ 3 種ずつ作成することに成功した。KO 細胞と WT 細胞を用いて、増殖率を比較した結果、6 種すべての KO 細胞の増殖率が WT 細胞の増殖率に比べて著しく低いことが明らかになった。細胞の大きさについて、KO 細胞と WT 細胞との細胞断面積を比較した結果、KO 細胞が WT 細胞よりも大きいことが明らかになった。容積についての比較実験は今後の課題とし、ASOR が生きるために担っている生理的役割についてさらに追究する。

(3) 新規 ASOR 分子 TMEM206 における電気生理学的検証実験

2019 年に、ASOR の分子実態が TMEM206 であるという報告が 2 つの研究グループから発表された[11,12]。ASOR は、細胞種によって陰イオンの透過性が異なることや、阻害剤の抑制効果にばらつきがあることから、複数の分子によって構成されていると推測されている。そこで、TMEM206

が ASOR 構成分子のうちの 1 つであるか否かについて、検証実験を行った。HeLa 細胞において、siRNA を用いた遺伝子サイレンシング法により TMEM206 遺伝子の発現を抑制した KD 細胞を作成し、コントロール細胞 (CNT 細胞) と比較実験を行った結果、酸性条件下における KD 細胞の ASOR 電流が、CNT 細胞に比べて著しく抑制されたことが確認された。この 2 種の分子の相互作用等については今後の研究課題となるが、複雑な ASOR 分子実態を解明するうえで大きな手掛かりを得ることができた。

<引用文献>

- 1 Auzanneau C, Thoreau V, Kitzis A, Becq F: A Novel voltage-dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(21):19230-19236. DOI: 10.1074/jbc.M301096200.
- 2 Sato-Numata K, Numata T, Okada Y: Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis. *Channels (Austin, Tex)* 2014;8(3):278-283. DOI: 10.4161/chan.27748.
- 3 Wang HY, Shimizu T, Numata T, Okada Y: Role of acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in acidosis-induced cell death in human epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2007;454(2):223-233. DOI: 10.1007/s00424-006-0193-z.
- 4 Yamamoto S, Ehara T: Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006;290(5):H1905-1914. DOI: 10.1152/ajpheart.00965.2005.
- 5 Sato-Numata K, Numata T, Okada T, Okada Y: Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to temperature and independent of ClC-3. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2013;465(11):1535-1543. DOI: 10.1007/s00424-013-1296-y.
- 6 Sato-Numata K, Numata T, Inoue R, Okada Y: Distinct pharmacological and molecular properties of the acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channel from those of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2016;468(5):795-803. DOI: 10.1007/s00424-015-1786-1.
- 7 Sato-Numata K, Numata T, Inoue R, Sabirov RZ, Okada Y: Distinct contributions of LRRC8A and its paralogs to the VSOR anion channel from those of the ASOR anion channel. *Channels (Austin, Tex)* 2017;11(2):167-172. DOI: 10.1080/19336950.2016.1230574.
- 8 Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y: TMEM16F is a component of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *American journal of physiology Cell physiology* 2013;304(8):C748-759. DOI: 10.1152/ajpcell.00228.2012.
- 9 Nobles M, Higgins CF, Sardini A: Extracellular acidification elicits a chloride

current that shares characteristics with ICI(swell). *American journal of physiology Cell physiology* 2004;287(5):C1426-1435. DOI: 10.1152/ajpcell.00549.2002.

- 10 Capurro V, Gianotti A, Caci E, Ravazzolo R, Galiotta LJ, Zegarra-Moran O: Functional analysis of acid-activated Cl⁻ channels: properties and mechanisms of regulation. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1848(1 Pt A):105-114. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.10.008.
- 11 Ullrich F, Blin S, Lazarow K, Daubitz T, von Kries JP, Jentsch TJ: Identification of TMEM206 proteins as pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride channels. *eLife* 2019;8. DOI: 10.7554/eLife.49187.
- 12 Yang J, Chen J, del Carmen Vitery M, Osei-Owusu J, Chu J, Yu H, Sun S, Qiu Z: PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. *Science* 2019;364(6438):395-399. DOI: 10.1126/science.aav9739.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yasunobu Okada, Toshiaki Okada, Kaori Sato-Numata, Md. Rafiqul Islam, Yuhko Ando-Akatsuka, Tomohiro Numata, Machiko Kubo, Takahiro Shimizu, Ranohon S. Kurbannazarova, Yoshinori Marunaka and Ravshan Z. Sabirov | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Cell volume-activated and volume-correlated anion channels in mammalian cells: their biophysical, molecular, and pharmacological properties. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Pharmacological Review | 6. 最初と最後の頁 49-88 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/pr.118.015917 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Yasunobu Okada, Tomohiro Numata, Kaori Sato-Numata, Ravshan Z. Sabirov, Hongtao Liu, Shin-ichiro Mori, and Shigeru Morishima | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Roles of volume-regulatory anion channels, VSOR and Maxi-Cl, in apoptosis, cisplatin resistance, necrosis, ischemic cell death, stroke and myocardial infarction | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Topics in Membranes | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.ctm.2019.03.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Tomohiro Numata, Kaori Sato-Numata, Yasunobu Okada, Ryuji Inoue | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Cellular mechanism for herbal medicine Junchoto to facilitate intestinal Cl-/water secretion that involves cAMP-dependent activation of CFTR | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-1207-9 | 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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤（沼田）かお理 |
| 2. 発表標題 AVP産生ニューロンからの浸透圧応答性AVP分泌と容積調節メカニズム |
| 3. 学会等名 第3回 イオンチャネル研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kaori Sato-Numata, Naomi Yasui, Tomohiro Numata, Yoichi Ueta, Yasunobu Okada |
| 2. 発表標題 Ionic mechanisms of cell volume regulation under hypo/hyperosmotic conditions in AVP neurons and effects of AVP secretion thereon |
| 3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Yoichi Ueta, Yasunobu Okada |
| 2. 発表標題 Sensitivity of voltage-dependent Ca ²⁺ channels in rat AVP neurons to an anthranilic acid derivative |
| 3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 & 第96回日本生理学会合同大会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大, 上田陽一, 井上隆司, 岡田泰伸 |
| 2. 発表標題 Properties and roles of flufenamate-sensitive ion channels stimulated by hyperosmolality in vasopressin neurons |
| 3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |