

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590219

研究課題名（和文）容積感受性クロライドチャンネル活性化の分子レベルでの解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of activation mechanism of volume-sensitive chloride channel

研究代表者 高橋 信之(TAKAHASHI NOBUYUKI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50370135

## 研究成果の概要：

生理的な細胞機能の発現に必須である細胞容積制御機構に関与する容積感受性クロライドチャンネル（VSOR）の活性化メカニズムを明らかにする目的で、VSORの活性を制御する可能性が示唆されている KCNE1、ならびにアポトーシス刺激により活性化されるタンパク質リン酸化酵素の細胞容積制御機構における関与を検討した。その結果、いずれのタンパク質も VSOR 活性化には関与しなかったものの、タンパク質リン酸化酵素である JNK と p38 が VSOR 活性化の下流に位置する細胞内情報伝達系であることが初めて明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞生理学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は常に、細胞内外の浸透圧変化に応じて、その容積を変動させている。しかし細胞は、そのような浸透圧変化に伴う細胞容積変化を感受し、細胞内イオンバランスを変化させることで、ある一定の細胞容積を維持する機能を持っている。例えば、多くの細胞では、低浸透圧条件下に置かれると、細胞内外の浸透圧差により細胞外から水が流入し、細胞容積の増大が起こる。しかし、この容積増大を刺激として、いくつかの K チャンネルと容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネル(VSOR)が活性化され、KCl の排出をもたらす。この KCl 排出に伴う水の流出によって、細胞は元の容積にまで収縮す

る。この現象は、調節性細胞容積減少(RVD; regulatory volume decrease)と呼ばれており、細胞内外の浸透圧変化に対する生理的応答として、細胞の正常な機能発現に極めて重要であることが明らかとなっている。一方、細胞は、浸透圧変化による容積変化なしに、この RVD に関与する VSOR を活性化させることで、等浸透圧条件下で積極的に細胞容積を変化させる機能も保持している。例えば、肝細胞では、血糖値上昇作用を持つグルカゴンにより、VSOR の活性化が起こり、細胞容積が減少する。この容積減少によって肝細胞では、元の大きさまで容積を増大させる必要があるため、浸透圧調節物質(オスモライト)を

増加させて細胞内浸透圧を低下させようとする。その結果、グリコーゲン分解や解糖系亢進といった異化作用の促進が起こる。肝細胞では、調節性細胞容積制御のメカニズムを利用して、等浸透圧条件下における細胞容積の変化によって、細胞内代謝をコントロールしているのである。このような細胞容積変化による細胞機能の調節は、肝細胞に限ったことではなく、他の細胞でも広く観察される現象であると考えられる。

さらに、アポトーシスと呼ばれる細胞死が起こる場合、カスパーゼの活性化や DNA の断片化といった生化学的現象の前に、まずアポトーシス性細胞容積減少(AVD; apoptotic volume decrease)と呼ばれる細胞の萎縮が起こる。これまでに我々の研究グループは、この AVD が、本来、細胞容積が増大した場合に活性化される VSOR の容積増を伴わない活性化を介していること、VSOR に対するブロッカーは AVD だけでなくアポトーシスそのものも抑制できること(上皮・神経・リンパ系細胞 : Maeno et al. PNAS, 97 (2000) 9487-9492, 心筋細胞 : Takahashi et al. Cell Physiol. Biochem., 15 (2005) 263-270)を明らかにしている。つまり細胞は、調節性細胞容積制御機構を積極的に利用して、その容積を減少させることで、自らアポトーシス性細胞死を引き起こすのである。こうした研究結果から、容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネルである VSOR は、正常な細胞機能発現に必要な細胞容積調節(RVD)に重要である一方で、アポトーシス性細胞死に必要な細胞容積変化(AVD)にも関与している極めて重要なイオンチャンネルであると言える。そのため、VSOR の活性化メカニズムについては、詳細な研究が行われており、これまでに我々を含め、多くの研究グループが報告してきた。低浸透圧刺激による VSOR 活性化では、細胞内 ATP の非水解的結合が必要であり、逆に細胞外 ATP によってはブロックされ、細胞内プロトンによっても抑制を受けること、さらにアクチンフィラメントなどの細胞骨格の存在が重要であることなどが電気生理学的解析によって明らかとなっている。このような性質は、分子内に ATP 結合部位やアクチン結合部位など、複数の機能ドメインが存在していることを示唆しているが、それが分子内ドメインであるのか、それぞれの機能ドメインを持つ複数のサブユニットが相互作用することによるのか、という疑問は、電気生理学的検討では解決されなかった。

このような疑問に対して答えるべく、VSOR の分子実体の同定が待たれていたが、これまでに3つの分子が候補として報告されてきた。1992年にP糖タンパクとpl<sub>Cl<sup>-</sup></sub>が発表され、さらに1997年にCIC-3が発表された。しかしこれら候補分子のいずれもが、その後の研

究により否定されることとなった。このことは、VSOR 遺伝子のクローニングが極めて困難であるということを示している。その理由は、大きく2つあると考えられる。一つは、イオンチャンネルタンパク質の精製に利用可能な、高親和性の特異的阻害剤が存在していないことである。もう一つの理由は、VSOR が関与する調節性容積制御が細胞の正常な機能発現に必須であるため、「VSOR を発現していない細胞」が見出されておらず、これまで用いられてきた強力なイオンチャンネル同定方法である発現クローニング法が利用できないことである。このような理由で、現在もなお、VSOR の分子実体は同定されておらず、そのため、VSOR 活性化メカニズムに関する分子レベルの解析は報告されていない。したがって、この VSOR 活性化メカニズムを明らかにすることは、細胞容積制御機構という生理的細胞機能の解明に必須であるだけでなく、VSOR の分子実体を同定するためにもきわめて重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記のような研究背景のもと、本申請課題では、VSOR 活性化の分子メカニズムを明らかにするため、VSOR 活性化に関与する可能性が報告されている KCNE1 変異体を用いた「KCNE1 の調節性容積制御機構における機能解析」並びにその他 VSOR 活性化に関与する調節因子の同定とその機能解析を目的とする。またそれら調節因子を含むことが予想される「容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネル(VSOR)タンパク質複合体の同定とその構成因子の解析」を目的とする。

## 3. 研究の方法

KCNE1 がどのようにして VSOR の活性化に関与しているのか、その分子メカニズムを明らかにするため、まず初めに、KCNE1 の発現レベル変化および各種変異体が VSOR の活性化に与える影響を検討する。発現レベルの変化は、野生型外来性 KCNE1 の過剰発現系ならびに siRNA による内在性 KCNE1 のノックダウン系を用いる。変異体としては、細胞質ドメインを欠失し、細胞膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインだけの変異体や、逆に細胞膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインが別の膜タンパク質で、細胞内ドメインだけが KCNE1 である変異体を用いる。こうした発現レベルの変化や変異体の導入によって、低浸透圧刺激あるいはアポトーシス刺激により誘導される VSOR の活性化がどのような影響を受けるかを、パッチクランプ法を用いた電気生理学的な解析により、また VSOR 活性化の結果、起こる容積変化である RVD や AVD がどのように変化するかを、コーンターカウンターや生細胞長時間観察な

どを用いた細胞容積測定により検討する。これにより、KCNE1が、VSOR活性化において、どのように寄与しているかが明らかとなる。次にKCNE1と相互作用するタンパク質の検索を、KCNE1の免疫沈降実験やKCNE1細胞内ドメインとGSTとの融合タンパク質を使ったプルダウン実験などにより実施する。結合タンパク質は、SDS-PAGEで展開後、ゲル内消化を経て、質量分析装置にて同定を試みる。このようにして同定されたKCNE1結合タンパク質は、細胞内で実際にKCNE1と相互作用しているかどうかの確認を行うと共に、過剰発現系やsiRNAによるノックダウン系などを用いて、低浸透圧刺激やアポトーシス刺激によるVSOR活性化に関与しうかどうかを検討する。

またその他のVSOR活性化調節因子の探索のため、VSORが活性化されるアポトーシス刺激によって同様に活性化される細胞内情報伝達分子、特にタンパク質リン酸化酵素に着目し、アポトーシス刺激によるVSOR活性化にどのような影響を及ぼすか、siRNAや変異体導入により検討する。

#### 4. 研究成果

##### (4. 1) KCNE1の関与について

まずVSOR活性化におけるKCNE1の機能を検討するため、KCNE1に対するsiRNAをHeLa細胞に導入し、低浸透圧条件下での細胞容積減少(RVD)を測定した。siRNAはリポフェクション法によりHeLa細胞に導入し、KCNE1のノックダウンの効率は、RT-PCRにより確認した。siRNAの導入は一過性であるため、実験ごとにsiRNAをHeLa細胞に導入したが、その導入効率は蛍光ラベルされたコントロールsiRNAで検討し、ほぼ一定であることを確認した。またsiRNAによるKCNE1ノックダウンは、HeLa細胞におけるKCNE1の発現レベルが低かったものの、RT-PCRレベルで約30~40%と十分な効率であった。

HeLa細胞を210mOsm(約60%の低浸透圧)で刺激すると、コントロールsiRNA導入細胞で通常のRVDが観察された。同一条件でsiRNAを導入したKCNE1ノックダウンHeLa細胞のRVDを検討したところ、コントロールsiRNAを導入した細胞と同等のRVDが観察された。KCNE1に対するsiRNAは、異なる配列を持つ2種類を使用した(ノックダウン効率はいずれも30~40%)が、いずれのsiRNA導入HeLa細胞もコントロールと同等のRVDを示した。このKCNE1ノックダウンHeLa細胞の低浸透圧刺激によるVSOR活性化をパッチクランプ法により確認したが、コントロールsiRNA導入細胞と同等のVSOR電流が確認された。

以上の結果より、KCNE1は低浸透圧刺激

によるVSOR活性化には関与しないことが示された。

KCNE1ノックアウトマウス由来の細胞において、低浸透圧条件下でのRVDが抑制されたという報告では、直接、VSORの電流を検討しておらず、本来、KCNE1がKチャンネルのサブユニットであることを考慮すると、低浸透圧刺激によるVSORの活性化ではなく、容積感受性Kチャンネルの活性化に関与している可能性が考えられる。また本研究に用いたHeLa細胞でのKCNE1の発現が低かったことから、HeLa細胞のVSOR複合体にKCNE1が含まれていない可能性もある。いずれの場合も、HeLa細胞におけるVSOR活性化にKCNE1が必要でないことを示している。

##### (4. 2) アポトーシス刺激によるVSOR活性化メカニズムについて

次に、アポトーシス刺激により活性化されるタンパク質リン酸化酵素に着目し、AVDにおけるVSOR活性化に関与する調節因子の同定を試みた。まず、アポトーシス刺激によりHeLa細胞で活性化されるタンパク質リン酸化酵素を検討したところ、ASK1(apoptosis signal kinase-1)およびp38 MAPK、JNKがSTS刺激によるHeLa細胞のアポトーシス誘導で活性化されることが明らかとなった。そこで、p38およびJNKのMAPキナーゼについては、それぞれに特異的な阻害剤を用いて、またASK1については適当な阻害剤がなかったため、siRNAによるノックダウンにより、アポトーシス刺激によるVSOR活性化への各タンパク質リン酸化酵素の関与を検討した。

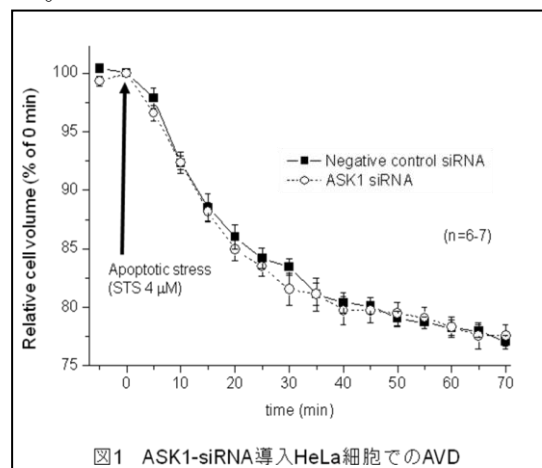


図1 ASK1-siRNA導入HeLa細胞でのAVD

まずASK1に対するsiRNAをHeLa細胞に導入し、スタウロスポリン(STS)によるアポトーシス誘導時に起こるAVDを測定した。siRNAによりASK1をノックダウンしたHeLa細胞では、コントロールsiRNA導入細胞と同様のAVDが観察された(図1)。一方、STSによるカスパーゼ3/7の活性化は、ASK1に対するsiRNA導入により有意に抑制され

た。したがって、ASK1はSTS誘導性アポトーシスには関与するものの、AVDの誘導には影響しないことが示唆された。

次に様々なアポトーシス刺激により活性化されるMAPキナーゼであるJNKおよびp38に対する阻害剤を添加した際のSTS誘導性AVDを検討した。STSに加え、JNKもしくはp38の阻害剤(SP600125もしくはSB203580)を添加し、AVDを70分間にわたり測定したところ、ASK1の場合と同様、コントロールの細胞と同程度のAVDが観察された(図2)。このとき、STSによりJNKおよびp38はリン酸化されており、活性化されている条件下であるため、STSによるJNKの活性化もp38の活性化も、STS誘導性VSOR活性化には関与していないことが示唆された。

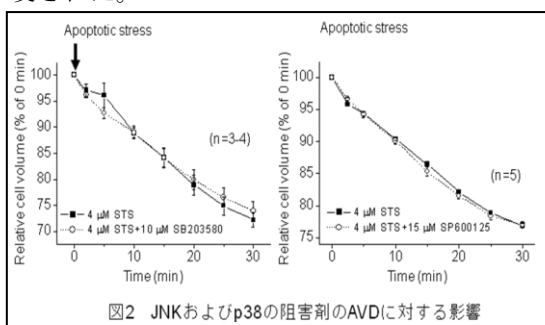


図2 JNKおよびp38の阻害剤のAVDに対する影響

#### (4.3) VSOR活性化の下流シグナルとしてのMAPK活性化の検討

これまで、VSOR活性化に関与するシグナル伝達系が同定されていなかったのと同様に、VSOR活性化の下流に位置するシグナル伝達系の同定も行われていなかった。そこで、上記の実験で検討したタンパク質リン酸化酵素の活性化が、VSOR活性に依存するかどうか、すなわちVSOR活性化の下流に位置するシグナル伝達系であるかどうか検討するため、VSOR阻害剤添加時のSTS誘導性MAPK活性を検討した(図3)。

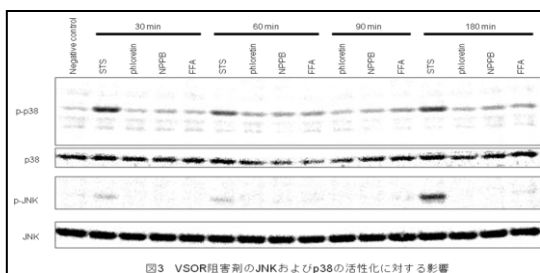


図3 VSOR阻害剤のJNKおよびp38の活性化に対する影響

STSと共にVSOR阻害剤であるNPPBを添加すると、JNKならびにp38のリン酸化、すなわち活性化が有意に抑制された。NPPBと化学構造が異なる別のVSOR阻害剤であるDIDSおよびPhloretinを添加した場合も同様に、JNKならびにp38のリン酸化が抑制された。またJNKもしくはp38に対する阻害剤を添加した場合、STS誘導性のカスパーゼ活性化は阻害されることから、JNKおよびp38の活性化はSTS誘導性アポトーシスに

必須である。したがって、以上の結果は、STSで誘導されるVSOR活性化によるAVDが、STSによるJNKおよびp38の活性化に必要であることを示唆しており、初めてAVDにより調節を受ける細胞内情報伝達系を同定したことになる。

以上の結果より、下記のようなモデルが示唆される(図4)。まずSTSにより誘導されたVSOR活性化でAVDが起こる。その細胞容積の減少の結果、ASK1の活性化が起こり、引き続き、JNKならびにp38の活性化が起こる。これらMAPKの活性化はSTS誘導性アポトーシスに必須であり、VSOR活性化によるアポトーシスに欠くことの出来ない細胞内情報伝達系であることが初めて明らかにされた。

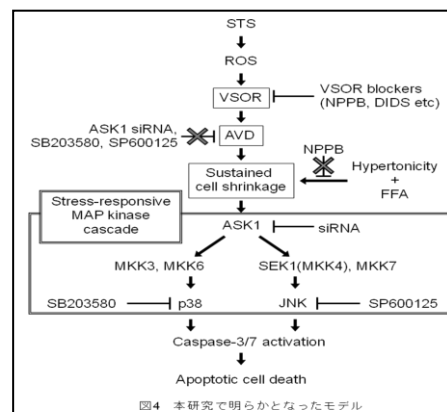


図4 本研究で明らかとなったモデル

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Wehner, F., Numata, T., Subramanyam, M., **Takahashi, N.** and Okada, Y. (2007) Signaling events employed in the hypertonic activation of cation channels in HeLa cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, 20, 75-82. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

**Takahashi, N.**, Subramanian, M., Okada, Y. Mechanism of RVI inhibition by apoptotic stimulations. 2007年度 日本生理学会

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 信之(TAKAHASHI NOBUYUKI)  
京都大学・大学院農学研究科・助教

(2008年1月に生理学研究所・細胞器官研究系・助教より変更)

研究者番号: 50370135

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし