

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06778

研究課題名(和文) バソプレシンの分泌調節を担う浸透圧検知性イオンチャネルの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of osmosensitive ion channels responsible for the regulation of vasopressin secretion.

研究代表者

沼田 かのり (佐藤かのり) (Kaori, Sato)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60614196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低浸透圧条件下において、タウリンによるバソプレシンニューロンの膜脱分極と自発的発火活動の抑制に関与する可能性のある膜タンパク質の発現を検討した結果、GABAA受容体の α 、 β 、 γ 型が確認された。低浸透圧刺激によるバソプレシンニューロンの容積膨張後に活性化する容積感受性アニオンチャネルVSORは、LRRC8Aをコアとした8B-8Eの組合せによる六量体を構成していることが知られている。それらの組合せにおいて、遺伝子ノックダウン細胞と過剰発現細胞を用いてパッチクランプ法と断面積測定法により解析した結果、8Aだけでなく、8Dも低浸透圧による細胞膨張後の容積回復機構に重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、これまで未解明であったAVP分泌調節メカニズムの初動装置としての浸透圧検知性イオンチャネルの分子同定と機能解明を世界に先駆けて行う点にある。これによって解明されるAVPニューロン独自の細胞容積調節メカニズムや分泌調節メカニズムが、今後OXTニューロンを含む多くの分泌細胞における容積調節メカニズムや分泌調節メカニズムの研究の発展にも貢献できる。更には、本研究課題により同定されたイオンチャネルは、指定難病である下垂体性ADH分泌異常症の新たな治療法開発のターゲットを与えることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The expression of membrane proteins that may be involved in taurine-induced membrane depolarization and inhibition of spontaneous firing activity in vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions has identified α , β and γ forms of GABAA receptors. The volume-sensitive anion channel VSOR, which is activated following volume expansion of vasopressin neurons by hypoosmotic stimulation, is known to be composed of a hexamer of 8B-8E combinations with a core of LRRC8A. Analysis of these combinations using patch-clamp and cross-sectional area measurements in gene-knockdown and overexpressing cells suggested that not only 8A but also 8D plays an important role in the volume recovery mechanism after cell expansion due to hypoosmotic pressure.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャネル アニオンチャネル LRRC8ファミリー

1. 研究開始当初の背景

抗利尿ホルモン・アルギニンバソプレシン(AVP)を産生・分泌する AVP ニューロンは、血漿中の浸透圧変化を検知して持続的発火の頻度を増減することで軸索終末が局在する脳下垂体後葉から血液へと分泌される AVP 量を調節し、血漿浸透圧の恒常性を維持するという重要な役割を担っている(Dunn et al. 1973, *J Clin Invest*)。血中への AVP 分泌量が不足すると中枢性尿崩症、過剰になると ADH 不適合分泌症候群を発症するが、これらは下垂体性 ADH 分泌異常症という指定難病に該当している。現在は、飲水量の制限やデスモプレシンの補給による対症療法が行われているが、原因療法の開発が強く望まれている。投薬や遺伝子操作などで AVP 分泌量を制御するためには、そのターゲットとなるイオンチャネルを介した AVP 分泌メカニズムが明確にされる必要がある。

多くの動物細胞は、浸透圧刺激により細胞容積が変化した後、元の大きさに回復する容積調節能を保持している。しかし、AVP ニューロンは、低浸透圧刺激による容積縮小後の回復(Regulatory Volume Increase: RVI)が観察されない(Naeni et al. 2006 *Nature Neurosci*)。しかし申請者らは、AVP ニューロンは低浸透圧時に他の細胞と同様に低浸透圧刺激性細胞膨張後の容積回復が観察されることを明らかにし、その機構に容積感受性アニオンチャネル VSOR が関与していることを報告し、これまでの定説を覆した(Sato et al. 2011, *Sci Signal*)。AVP 分泌調節メカニズムは低浸透圧刺激によりアストロサイトから分泌されたタウリンを感知した AVP ニューロンのグリシン受容体(GlyR)アニオンチャネルが、Cl⁻の流入を促して膜を過分極させる結果、自発的発火活動を抑制するとする「タウリン-GlyR 説」なる分泌抑制メカニズムが有力説とされてきた。しかし、これまでこの説を支持するような結果は報告されていない。しかし、AVP ニューロンの細胞内 Cl⁻が膜電位平衡値より高濃度であることが最近報告され(Haam et al. 2012, *J Neurosci*)、GlyR の活性化は Cl⁻流出を引き起こして膜脱分極をもたらすことが判明し、AVP 分泌抑制メカニズムとしての「タウリン-GlyR 説」にも矛盾が生じた。これらの矛盾の原因は、AVP ニューロンと同じ大細胞性ニューロン群に属するオキシトシン(OXT)ニューロンも同じ領域に局在するため、過去の研究では性質の異なる両者をひとまとめにして扱われてきた点にあり、AVP ニューロンと OXT ニューロンを厳密に区別して研究をやり直す必要が生じている。

そこで本研究では、「AVP ニューロンの血漿浸透圧変化に応答する分泌調節機構の初動装置は？」を「問い」として設定し、AVP ニューロンを OXT ニューロンと峻別した上で取り組む。

2. 研究の目的

本研究は、『AVP ニューロンの浸透圧検知性イオンチャネルの同定と機能解析』に取り組むことを「目的」とした。

3. 研究の方法

本研究では、低浸透圧時における浸透圧検知性イオンチャネル候補である、タウリン感受性イオンチャネルと、浸透圧減を直接検知するタウリン非感受性イオンチャネルの同定と機能解析を行った。

静止膜電位と自発的発火活動に影響を与えるタウリン感受性イオンチャネルの同定

タウリン存在下における膜脱分極と自発的発火活動の抑制には、GlyR と GABA_A 受容体の関与を示唆する薬理的データを既に得ている。

- 1) AVP ニューロンにおける GlyR と GABA_A 受容体の発現を確認した。
- 2) GlyR または GABA_A 受容体をノックダウンした培養 AVP ニューロンを用いて、タウリン投与の静止膜電位と自発的発火活動への影響を検討した。

低浸透圧検知性イオンチャネルの同定

低浸透圧刺激により電流活性が変化するイオンチャネル、容積感受性アニオンチャネル (VSOR) が 2014 年に LRRC8A をコアとした分子実体であることが明らかになった。VSOR は六量体を形成していることが結晶構造解析より明らかになっているが、その組みあわせについては未だ不明である。そこで、浸透圧検知性イオンチャネルの詳細を明らかにするために、LRRC8A-8E の様々な組合せについて、過剰発現させた HEK 細胞やノックダウンした HeLa 細胞を用いて解析した。

血漿浸透圧減による AVP 分泌抑制への本イオンチャネルの体内での関与の検討

カニューレシオン法により脳視床下部にある AVP ニューロンの局在領域にカニューレを挿入したラットを用いて、同定したイオンチャネル阻害剤の投与・非投与効果を生体内で比較検討する。

- 1) 血漿浸透圧減による血中への AVP 分泌亢進について ELISA 法を用いて測定し、比較検討した。
- 2) 血漿浸透圧減による尿量の変化について尿量測定法を用いて測定し、比較検討した。

4. 研究成果

低浸透圧条件下では、AVP(バソプレシン)ニューロンに隣接したアストロサイトから分泌されたタウリンが、AVP ニューロンに発現するタウリン感受性イオンチャネルを活性化し、Cl⁻の流入が起こることが報告されている。これまでの研究により、タウリン存在下では、AVP ニューロンが脱分極し、自発的発火活動が抑制されることを明らかにしている。グリシン受容体(GlyR)またはGABA_A受容体の阻害剤存在下では、タウリン存在下によるこれらの脱分極・抑制現象が起こらないことから、タウリンによる膜脱分極と自発的発火活動の抑制には、グリシン受容体(GlyR)とGABA_A受容体の関与が示唆された。そこで本年度は、まずAVPニューロンにおけるGlyRとGABA_A受容体の発現について、AVPニューロンのみを10個集めたサンプルを用い、RT-PCR法により確認した。その結果、AVPニューロンにおいて、GABA_A受容体の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ タイプが確認された。rhoタイプの発現は、AVPニューロンが局在している視索上核領野のサンプルでは確認できたが、AVPニューロンだけのサンプルでは確認できなかった。GlyRについては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 共に発現が確認できた。

低浸透圧を検知するアニオンチャネルVSORは、2014年にLRRC8AをコアとしたLRRC8ファミリーの組合せにより形成されることが報告された(Voss et al., 2014 Science; Qui et al., 2014 Cell)。しかし、その組み合わせについては、現在も不明なままである。本研究では、5種類あるLRRC8ファミリーの遺伝子をノックダウン、または過剰発現した細胞を用いて、VSORへの影響を検討した。その結果、LRRC8Aだけでなく、LRRC8Dにおいても、低浸透圧条件下における容積調節に重要な役割を担っていることを明らかにした。

VSORは、アポトーシス刺激によって活性化されていることが知られているが、アポトーシス死を誘導せずにVSORを活性化させるアゴニストはまだ見つかっていない。HEK293T細胞に発現するVSORに様々な試薬をかけて検証した結果、漢方薬の1つである防己黄耆湯がVSORのアゴニストである可能性が示唆された。防己黄耆湯には、6つの生薬が含まれており、VSORのアゴニストとして機能している生薬がどれであるのかについてはまだ不明である。今後の課題として引き続き解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okada Yasunobu, Sabirov Ravshan Z., Merzlyak Petr G., Numata Tomohiro, Sato-Numata Kaori	4. 巻 12
2. 論文標題 Properties, Structures, and Physiological Roles of Three Types of Anion Channels Molecularly Identified in the 2010's	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 805148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.805148	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 該当する
1. 著者名 Okada Yasunobu, Numata Tomohiro, Sabirov Ravshan Z., Kashio Makiko, Merzlyak Peter G., Sato-Numata Kaori	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell death induction and protection by activation of ubiquitously expressed anion/cation channels. Part 3: the roles and properties of TRPM2 and TRPM7	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1246955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1246955	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 該当する
1. 著者名 Tagashira Hideaki, Abe Fumiha, Sato-Numata Kaori, Aizawa Karen, Hirasawa Kei, Kure Yoshinobu, Iwata Daiki, Numata Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardioprotective effects of Moku-boi-to and its impact on AngII-induced cardiomyocyte hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1264076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1264076	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 -
1. 著者名 Numata Tomohiro, Sato-Numata Kaori, Yoshino Masami	4. 巻 2
2. 論文標題 Intermediate conductance Ca ²⁺ -activated potassium channels are activated by functional coupling with stretch-activated nonselective cation channels in cricket myocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Insect Science	6. 最初と最後の頁 1100671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/finsc.2022.1100671	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13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木太郎、佐藤(沼田)かお理、酒井彩子、森俊太郎、沼田朋大
2. 発表標題 LRRC8Dチャネルの細胞容積調節能における役割の解明
3. 学会等名 第54回東北生理談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤 遥菜、佐藤(沼田)かお理、沼田朋大
2. 発表標題 防己黄耆湯による水分分泌機構の解明
3. 学会等名 第54回東北生理談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Suzuki, Haruna Saito, Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata
2. 発表標題 Elucidation of the water secretion mechanism of Boui-ougi-to and its application to cancer therapeutic agents
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaori Sato-Numata, Taro Suzuki ¹ , Ayako Sakai, Shuntaro Mori, Yasunobu Okada, Tomohiro Numata
2. 発表標題 The role of LRRC8D in the regulatory volume decrease in human epithelial cells
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaori Sato-Numata, Tomohiro Numata, Yasunobu Okada
2. 発表標題 Search for intracellular signals affecting the activity of acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR)
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊俊介、酒井 彩子、佐藤(沼田)かお理、沼田朋大
2. 発表標題 八味地黄丸による水分分泌機構の解明
3. 学会等名 第55回 東北談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木太郎、齊藤遥菜、酒井彩子、佐藤(沼田)かお理、沼田朋大
2. 発表標題 防己黄耆湯のCl ⁻ - 排出機構と細胞死への影響の解明
3. 学会等名 第55回 東北談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田龍馬、小藪賢太郎、青山碧透、菅原弘乃、酒井 彩子
2. 発表標題 ヒスタミン誘発性細胞縮小に対する小青竜湯と柴胡桂枝湯の効果
3. 学会等名 第55回 東北談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤(沼田)かお理, 沼田朋大
2. 発表標題 パッチクランプ法を用いた2種のアニオンチャネルの薬理的分別
3. 学会等名 電気化学会第91大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤(沼田)かお理、高山遼、石川慶達、菅原弘乃、酒井 彩子、沼田朋大
2. 発表標題 副交感神経様PC12細胞の5-HTによる活性機序の解明と半夏瀉心湯の影響
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青山碧透、小薮賢太郎、岡田龍馬、菅原弘乃、酒井 彩子、佐藤(沼田)かお理、沼田朋大
2. 発表標題 U937細胞のヒスタミン誘発性細胞縮小における分子メカニズムと小青竜湯、柴胡桂枝湯の効果
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木太郎、齊藤遥菜、酒井彩子、佐藤(沼田)かお理、沼田朋大
2. 発表標題 防己黄耆湯の水排出効果におけるK ⁺ チャネルとCl ⁻ チャネルの関与
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 酒井 彩子、佐藤(沼田)かお理、吉野正巳、沼田朋大
2. 発表標題 輸卵管筋細胞における機械刺激感受性チャネルとIKチャネルの協調的なゲーティング
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田大学大学院医学系研究科 器官・統合生理学講座
<https://www.med.akita-u.ac.jp/~seiri2/index.html>

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
研究協力者	沼田 朋大 (Numata Tomohiro)		
研究協力者	岡田 泰伸 (Okada Yasunobu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------