

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659095

研究課題名(和文) 未知なる細胞容積感受性アニオンチャネルの分子構造基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the unidentified molecular structure of the cell volume-sensitive anion channel

研究代表者

酒井 秀紀 (Sakai, Hideki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：60242509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんどすべての細胞は低浸透圧下で膨張しても、元の体積に戻る恒常性維持機構を備えている。この機構に関する重要なタンパク質の一つが、細胞容積感受性アニオンチャネル(VSOR)であるが、その分子実体についてはこれまで不明であった。我々は、VSORの特異的阻害薬(DCP1B)の光アフィニティーラベル体を合成し、ラベリング蛋白質の解析やパッチクランプ法などの様々な手法を駆使し、VC-1(仮称)がVSORを構成する必須の分子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Even if almost all the cells swell under hypotonic condition, they can return to their original sizes. This is because the cell has housekeeping functions for regulating its volume. In the mechanism, the cell volume-sensitive anion channel (VSOR) is one of essential proteins. Molecular structure of VSOR, however, has not been identified yet. Here, we synthesized the photoaffinity probe based on the structure of DCP1B, a specific inhibitor of VSOR. In a series of experiments such as the analysis of labelled proteins and the electrophysiological patch-clamp recording, we found that VC-1 (tentative name) is an essential molecule which constitutes VSOR.

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：生理学 細胞・組織 蛋白質 イオンチャネル 細胞容積 浸透圧

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに世界の多くの研究者が容積感受性アニオンチャンネル (volume-sensitive outwardly rectifying anion channel; VSOR) の分子同定を試み、P 糖タンパク質、ClC-3 などの候補分子を報告してきた (Valverde et al., Nature, 1992; Duan et al., Nature, 1997) が、それらの候補分子は、ノックアウトマウスの作製によりことごとく否定されたため、このチャンネルの分子同定はなされていなかった。他方、VSOR の機能が細胞生存のための細胞容積調節機構だけでなく、アポトーシスおよびネクローシスといった細胞死にも重要な役割を果たしていることが報告された (Okada et al., Pflügers Arch., 2004)。これまでの分子同定の失敗は、多くの細胞に普遍的発現を示す VSOR に発現クローニング法を用いたためであると考えられる。本研究では、VSOR 阻害薬の光アフィニティーラベル体によるタンパク質単離法を導入し、容積感受性アニオンチャンネルの分子同定に挑んだ。

## 2. 研究の目的

VSOR は、「細胞の生死を制御するイオンチャンネル」として現在注目されてきている。このように生理的に重要な機能を果たしているチャンネルであるが、その分子実体は世界中の研究者の多大なる尽力にもかかわらず、明らかとなっていない。したがって本研究では、このアニオンチャンネルの特異的阻害剤である 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-indan-1-on-5-yl) oxobutyric acid (DCPIB) を基盤とした光アフィニティーラベル体を作製し、独創的なタンパク質単離法により、容積感受性アニオンチャンネルの分子実体を世界に先駆けて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) DCPIB 結合タンパク質の同定

VSOR を機能的に発現しているヒト口腔類表皮癌 KB 細胞に DCPIB の光アフィニティープローブを付荷した後、UV 照射し、DCPIB 結合タンパク質にプローブを非可逆的に結合させた。DCPIB 結合タンパク質をビオチン/アビジン反応を利用することで単離した後、LC/MS/MS を用いたショットガン法により DCPIB 結合タンパク質を同定した。

### (2) KB 細胞およびそのシスプラチン耐性株 (KCP-4 細胞) を用いた VSOR 候補タンパク質の探索

KB 細胞および VSOR 機能が観測されない KCP-4 細胞から単離した膜画分を用いて二次元電気泳動を行った。KCP-4 よりも KB 細胞で発現量の多いスポットを MALDI/TOFMS 解析した。

### (3) VC-1, VC-2, VC-3 ノックダウン細胞を用

### いた VSOR の電気生理学的解析

Alexa Fluor 488 タグを付加した siRNA により VC-1, VC-2, VC-3 をノックダウンした各 KB 細胞において、蛍光顕微鏡下でパッチクランプ法を適用し、低浸透圧誘発性アニオン電流 (VSOR 電流) を測定した。低張バス溶液の組成 (mM) は 110 CsCl, 5 MgSO<sub>4</sub>, 12 Hepes, 7 Tris, 40 mannitol, pH 7.3 (270 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) であり、標準バス溶液 (330 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) には 60 mM mannitol を付加した。ピペット溶液の組成 (mM) は 110 CsCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1 Na<sub>2</sub>ATP, 15 Na-Hepes, 10 Hepes, 50 mannitol, pH 7.3 (300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) であった。

### (4) VC-1 ノックアウト細胞を用いた VSOR チャンネルの電気生理学的解析

VC-1 ノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスの胎児から単離した線維芽細胞にパッチクランプ法を適用し、(3) で用いた方法と同様に VSOR 電流を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) DCPIB 結合タンパク質の同定

まず、合成した DCPIB の光アフィニティーラベル体が VSOR の活性を阻害するかについてホールセルパッチクランプ法により検討した。ラベル体は 10 μM の濃度で、VSOR 電流をほぼ完全に、2.5 μM で約 80% 抑制した。ラベリングには、2.5 μM の DCPIB を用いた。

LC/MS/MS を用いたショットガン法により、約 150 種類の DCPIB 結合タンパク質を同定できた。興味深い膜タンパク質として VC-1 (仮称) が検出された。これまでに VC-1 が VSOR の分子実体であるという報告はなされていない。

### (2) KB 細胞および KCP-4 細胞を用いた VSOR 候補タンパク質の探索

これまでに、KB 細胞のシスプラチン耐性株である KCP-4 細胞では、低浸透圧刺激による細胞容積膨張に伴う VSOR 電流が観測されないことが報告されている (Lee et al., J. Cell. Physiol., 2007)。そこで、KB 細胞および KCP-4 細胞から単離した膜画分におけるタンパク質の発現量を比較・検討した。興味深いことに、(1) で同定した VC-1 の発現量が、KCP-4 細胞に比べ、KB 細胞において顕著に多いことが明らかとなった (図 1)。

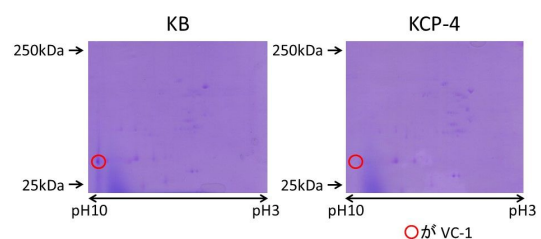


図 1. 二次元電気泳動による VC-1 の検出

### (3) VC-1, VC-2, VC-3 ノックダウン細胞を用いた VSOR の電気生理学的解析

VC-1 およびその関連タンパク質である VC-2, VC-3 (仮称) をノックダウンした KB 細胞における VSOR 電流を測定したところ、コントロールの KB 細胞に比べ、VC-1 ノックダウン細胞 (VC-1-KD) の電流が顕著に減少していた。一方、VC-2 ノックダウン細胞 (VC-2-KD) における VSOR 電流の有意な抑制は観察されなかった (図 2)。また、VC-3 のノックダウンも VSOR 電流に影響を与えなかった。

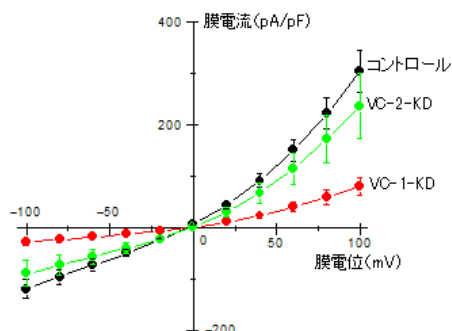


図 2. VC-1, VC-2 ノックダウンによる VSOR 電流の変化

### (4) VC-1 ノックアウト細胞を用いた VSOR チャンネルの電気生理学的解析

VC-1 ノックアウト線維芽細胞 (VC-1-KO) における VSOR 電流を測定したところ、ワイルドタイプ細胞 (WT) に比べ、電流が顕著に減少していた (図 3)。

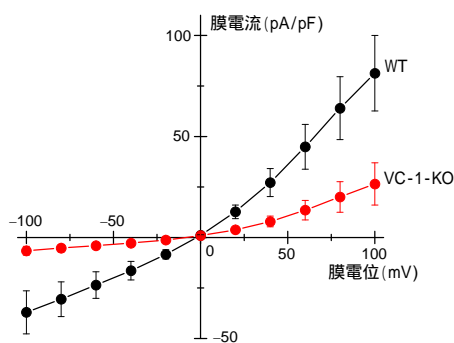


図 3. VC-1 ノックアウトによる VSOR 電流の変化

### (5) VC-1 の細胞における分布の検討

免疫細胞染色により、KB 細胞における VC-1 の局在を検討したところ、VC-1 は原形質膜および細胞内オルガネラに存在し、その量は細胞内の方が多かった。

### (6) 総括

以上の結果から、VC-1 が VSOR の分子実体 (構成サブユニット) もしくは調節タンパク質として機能していることが強く示唆された。また VC-1 は細胞内にプールがあり、

刺激により原形質膜に移行する可能性が示唆された。

つい最近、パネキシンと同様のトポロジーを有する LRRC8A が VSOR の構成分子であるという報告がなされた (Voss et al., Science, 2014; Qiu et al., Cell, 2014)。我々は、VC-1 ノックアウト細胞においても LRRC8A が発現していることを確認しており、少なくとも VC-1 は VSOR の機能発現に必須の分子であるものと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

(1) Ikari A, Tonegawa C, Sanada A, Kimura T, Sakai H, Hayashi H, Hasegawa H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J. (2014) Tight junctional localization of claudin-16 is regulated by syntaxin 8 in renal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 289: 13112-13123. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.541193.

(2) Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. (2014) Functional coupling of chloride-proton exchanger ClC-5 to gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biol. Open* 3: 12-21. 査読有 doi: 10.1242/bio.20136205.

(3) Shimizu T, Fujii T, Takahashi Y, Takahashi Y, Suzuki T, Ukai M, Tauchi K, Horikawa N, Tsukada K, Sakai H. (2014) Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A<sub>2</sub>-induced colonic cancer cell proliferation. *Pflügers Arch.* 466: 541-548. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1341-x.

(4) Fujii T, Awaka SY, Takahashi Y, Fujita K, Tsuji H, Shimizu T, Gomi T, Tsukada K, Sakai H. (2013) Modulation of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* 587: 3898-3905. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.030.

(5) Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y. TMEM16F is a component of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel. (2013) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304: C748-C759. 査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00228.2012.

(6) Fujita K, Fujii T, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. (2012) Role of cholesterol in functional association between  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter-3a and  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424: 136-140. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.089.

(7) Nishi M, Aoyama F, Kisa F, Zhu H, Sun M, Lin P, Ohta H, Van B, Yamamoto S, Kakizawa S, Sakai H, Ma J, Sawaguchi A, Takeshima H. (2012) *J. Biol. Chem.* 287: 33523-33532. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.370551

〔学会発表〕(計 35 件)

(1) 酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩, 塚田一博. 消化器がん細胞におけるポンプとチャネル機能の異常. 日本薬学会第 134 年会一般シンポジウム「生体防御のフロントライン: 上皮膜バリアの病態生理機能研究の新展開」, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 鶴屋百貨店東館(熊本県熊本市)

(2) 清水貴浩, 家原貴大, 佐藤かお里, 藤井拓人, 岡田泰伸, 酒井秀紀. TMEM16F は  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channel として機能する. 日本薬学会第 134 年会一般シンポジウム「腎および肺疾患の標的としての上皮イオンチャネル研究の最前線」, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県熊本市)

(3) 藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. 胃壁細胞頂端膜における ERp57 の機能. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

(4) 酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩. 細胞膜マイクロドメインにおける  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase の機能調節機構. 第 91 回日本生理学会大会シンポジウム「上皮膜の階層的機能形成研究の新展開」, 2014 年 3 月 16 - 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(5) 清水貴浩, 家原貴大, 藤井拓人, 岡田泰伸, 酒井秀紀. TMEM16F は  $Ca^{2+}$ 活性化アニオンチャネルを形成する. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 - 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(6) 樋口大河, 清水貴浩, 藤井拓人, Nilius Bernd, 酒井秀紀. TRPP3 チャネルの電位不活性化に關与する分子構造基盤. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 - 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(7) 藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. ERp57 によるシャペロン機能非依存的な胃  $H^+$ , $K^+$ -ATPase の活性化. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 - 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(8) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 強心配糖体による癌細胞特異的な細胞増殖抑制機構. 生体制御・創薬研究ワークショップ in 鹿児島, 2014 年 3 月 15 日, プラザ N ヴァリエホール(鹿児島県鹿児島市)

(9) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. ウアバインによる癌細胞増殖抑制の早期シグナルとしての容積感受性アニオンチャネル活性化. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2013 年 11 月 21-22 日, 東京大学大学院薬学研究科総合研究棟(東京都文京区)

(10) 清水貴浩, 大竹宏尚, 藤井拓人, 田淵圭章, 酒井秀紀. 酪酸誘導性細胞死における容積感受性  $Cl^-$  チャネルの役割. 第 60 回中部日本生理学会大会, 2013 年 10 月 25-26 日, 岐阜大学医学部記念ホール(岐阜県岐阜市)

(11) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 受容体型ナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャネルの機能連関による癌細胞増殖制御メカニズム. 2013 年度 生理学研究所研究会「上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構」, 2013 年 8 月 26-27 日, 自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市)

(12) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 癌細胞における非イオン輸送型  $Na^+$ , $K^+$ -ATPase と容積感受性外向き整流性アニオンチャネル VSOR との機能連関. 第 8 回トランスポーター研究会年会, 2013 年 6 月 15-16 日, 熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

(13) 酒井秀紀. がん細胞の細胞内ナトリウムポンプの機能と増殖制御. 第 22 回細胞電気薬理研究会(招待講演), 2013 年 3 月 30 日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

(14) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. ナトリウムポンプ阻害剤の抗癌メカニズムにおける容積感受性外向き整流性アニオンチャネル(VSOR)の役割. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(15) 清水貴浩, 高橋祐太, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀. ヒト大腸癌細胞のトロンボキサン  $A_2$  誘導性細胞増殖における  $Kv7.1 K^+$  チャネルの役割. 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27-29 日, タワーホール船堀(東

京都江戸川区)。

(16) 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Ursula Seidler, 酒井秀紀. マウス胃酸分泌細胞における細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネルの分子実体の探索. 生理学研究所研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」, 2012年11月30日-12月1日, 自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市)

(17) 清水貴浩, 家原貴大, 佐藤かおり, 藤井拓人, 竹口紀晃, 岡田泰伸, 酒井秀紀. TMEM16F は Ca<sup>2+</sup>賦活化アニオンチャネルである. 生理学研究所研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」, 2012年11月30日-12月1日, 自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市)

(18) 清水貴浩, 江口悠樹, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀. Transmembrane channel-like protein (TMC) 4 の電気生理学的性質. 第59回中部日本生理学会, 2012年11月16-17日, 自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市)

(19) 藤田恭輔, 藤井拓人, 高橋佑司, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. 2Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 ClC-5 と胃 H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の機能連関. 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012年11月15-16日. 京都大学(京都府京都市)

(20) Sakai H, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Takeguchi N. Association of ClC-5 Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger with H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. The 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC), 2012年10月12-13日. Kyoto Prefectural University (Kyoto)

(21) Fujii T, Funayama K, Fujita K, Shimizu T, Honryo A, Takeguchi N, Sakai H. Association of non-pumping sodium pump with volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in human cancer cells. The 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC), 2012年10月12-13日, Kyoto Prefectural University (Kyoto)

(22) Sakai H. Transporters associated with gastric proton pump. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012, 2012年9月15-16日, Ritsumeikan University (Kusatsu, Shiga)

(23) Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y. TMEM16F is an outwardly-rectifying Cl<sup>-</sup> channel with

distinct Ca<sup>2+</sup> dependency. 2012 International Ion Channel Conference, 2012年8月24-27日, The Shilla Hotel (Jeju, Korea)

〔図書〕(計1件)

(1) 酒井秀紀. (2012) 疾病と病態生理 39-55, 南江堂

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 秀紀 (SAKAI, Hideki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号: 60242509

### (2) 研究分担者

清水 貴浩 (SHIMIZU, Takahiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号: 40353437