

平成30年 5月28日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293045

研究課題名(和文)ATP放出性マキシアニオンチャネルの分子同定と心筋虚血・再灌流障害への役割解明

研究課題名(英文)Molecular identification of the ATP-release Maxi-Cl channel and its roles in ischemia-reperfusion cardiac injury

研究代表者

岡田 泰伸 (Okada, Yasunobu)

生理学研究所・名誉教授

研究者番号：10025661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、マキシアニオンチャネルMaxi-Clのポア構成分子実体がSLC02A1であること、C127細胞の浸透圧性細胞膨張時ATP放出にこのSLC02A1が関与すること、マウス摘出心臓において虚血・再灌流直後にピークを示すATP放出が観察され、これにもSLC02A1が関与すること、その際に放出されたATPは心保護効果を示し、アデノシンA1受容体シグナルによって仲介されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellular release of ATP is a key event in purinergic signaling in animal tissues. We showed previously that the ATP release is mediated by Maxi-Cl in many cell types including cardiomyocytes. Here, we have identified SLC02A1, which is known to be a prostaglandin transporter (PGT), as the pore component of Maxi-Cl. Also, we have shown that SLC02A1 is involved in swelling-induced ATP release from Maxi-Cl-rich C127 cells. When Langendorff-perfused mouse hearts were subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD), ATP was released to the coronary effluent upon reperfusion. This OGD-induced heart ATP release was suppressed by in vivo pre-injection of SLC02A1-siRNA or by application of a PGT blocker, indicating a SLC02A1 involvement in the OGD-induced cardiac ATP release. This ATP release was associated with increased left ventricular developed pressure, in a manner sensitive to an adenosine A1 receptor antagonist, suggesting a protective role of released ATP via A1 receptor signaling.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：アニオンチャネル 心臓 ATP放出 虚血・再灌流 左心室発生圧

### 1. 研究開始当初の背景

(1) マキシアニオンチャンネル (Maxi-Cl) は、生体内で多くの組織に存在する大型単一チャンネルコンダクタンス (300 - 600 pS) を示すアニオンチャンネルであり、特に細胞膨張時などにおいてクロライドイオンのみならず ATP などの陰荷電ヌクレオチドも通して、それらを細胞外へと放出する通路を与えることが知られている。しかし、その分子実体は長く不明であった。私達は、質量分析法と siRNA スクリーニング法を駆使してのゲノムワイドアプローチにより、Maxi-Cl に関与する単一遺伝子 *slco2a1* を同定した。この遺伝子産物は、これまでプロスタグランジントランスポーター PGT として知られているので、SLC02A1 が Maxi-Cl のポアそのものを担う分子であるかどうかは定かではなかった。また、SLC02A1 が細胞膨張時 ATP 放出に実際に関与するかどうかについても未解明であった。

(2) 心臓では虚血時に心筋細胞自身から ATP が放出されることが古くから知られていた。私達は、心室筋細胞からの虚血性 ATP 放出は Maxi-Cl を通って行われることを細胞レベルの研究で示してきた。しかし、心臓器官レベルでの虚血・再灌流性 ATP 放出においても Maxi-Cl および SLC02A1 が関与するかどうかについては未知であり、しかもこの放出 ATP が虚血心に障害的に作用するのか、それとも保護的に作用するのかについても不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、第 1 に SLC02A1 が Maxi-Cl のポア構成分子であるかどうかを明らかにし、第 2 に SLC02A1 を内在的に高度に発現する C127 細胞の浸透圧性膨張時の ATP 放出に SLC02A1 が実際に関与するかどうかを明らかにすることである。また、ランゲンドルフ灌流心標本において、酸素・グルコース除去 (oxygen-glucose deprivation: OGD) 後の再酸素・グルコース投与による虚血・再灌流モデル実験系において ATP 放出がもたらされることを確認し、その ATP 放出に SLC02A1 が関与するかどうかを、インビボ siRNA 投与方法によって調べることを第 3 の目的とする。また、この虚血・再灌流性 ATP 放出が心機能に対して障害的に働くのか、保護的に働くのかを決定し、それに至る最初のシグナリング系は何かについて検討することを第 4 の目的とする。

### 3. 研究の方法

実験材料としては、マウス乳腺由来細胞株 C127、ヒト上皮由来細胞株 HEK293T、そしてマウスからの単離心臓を用いた。C127 細胞や SLC02A1 またはその変異体を強制発現した HEK293T 細胞および SLC02A1 またはその変異

体を組み込んで再構成した巨大プロテオリポソームにおけるチャンネル活性は、パッチクランプ法を用いて測定した。ATP 放出は、上記細胞の培養液およびランゲルハンス心灌流液においてルシフェリン・ルシフェラーゼ法を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) マキシアニオンチャンネル Maxi-Cl のポア構成分子の同定

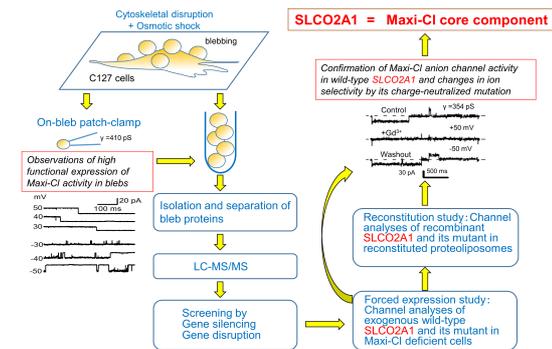


図 1

私達はこれまで、Maxi-Cl を豊富に発現した C127 細胞のブレップ膜の全膜タンパク質を抽出し、それを質量分析にかけて検出した 439 種のタンパク質の中から複数回膜貫通領域を示すタンパク質をプロテオミクスの 15 種選定し、それら一つ一つをノックダウンするという siRNA スクリーニングを行い、内在性 Maxi-Cl 活性を著しく抑制する siRNA から SLC02A1 を同定した (図 1 左半分)。この SLC02A1 は、既に PGT として知られているので、Maxi-Cl チャンネル活性への 3 種の PGT 阻害薬 (BSP, ICG, BCG) の作用を調べたところ、著しい抑制効果を示すことが確認された。また、内在性に Maxi-Cl 活性も SLC02A1 発現も示さない HEK293T 細胞に SLC02A1 を強制発現させたところ、Maxi-Cl 活性が見られるようになることが明らかとなった。更には、リコンビナント遺伝子より作成・精製された SLC02A1 を巨大リポソームに再構成したプロテオリポソーム系においても Maxi-Cl 活性が再現された。以上の 3 点より、SLC02A1 が Maxi-Cl 活性に重要な関与をしていることが判明した。そこで、SLC02A1 が Maxi-Cl チャンネルのポア構成に関与するという Maxi-Cl コア分子であるかどうかについて検討した。まず、PGT の 2 つの遺伝子疾患原因変異体 (G222R, P219L) を HEK293T 細胞に強制発現しても、プロテオリポソームに再構成しても、Maxi-Cl 活性を示さないことを確認し、SLC02A1 が Maxi-Cl チャンネルポアに不可欠であることが示唆された。次に、陽荷電中性化 SLC02A1 変異体 K613G を HEK293T 細胞に強制発現した場合も、プロテオリポソームに再構成した場合

も、チャネル活性のアニオン選択性は無くなり、カチオン透過性を大きく示すように変化した。これらの事実から、SLC02A1はMaxi-Clのアニオン選択性フィルターに関与すること、即ちポアの一部を構成することが証明された(図1右半分)。

### (2) 浸透圧性 ATP 放出路の分子同定

私達はこれまで、多種細胞において浸透圧性細胞膨張時における ATP 放出が Maxi-Cl を介してもたらされることを報告してきた。この Maxi-Cl のコア分子として SLC02A1 が同定されたので、C127 細胞の浸透圧性 ATP 放出に SLC02A1 が実際に関与するかどうかを次に検討した。この ATP 放出は、Maxi-Cl を抑制する PGT 阻害薬 BSP で大きく抑制され、その抑制度は Maxi-Cl チャネルブロッカー  $Gd^{3+}$  の抑制度とほぼ同じであった(図2A左)。また、PGTのサブストレートである PGE2 によってもわずかではあるが有意に抑制された(図2A中)。更には SLC02A1-siRNA によっても  $Gd^{3+}$  と同じレベルにまで抑制された(図2A右)。Maxi-Cl および SLC02A1 を内在的に発現していない HEK293T 細胞は、細胞膨張時にも ATP をごくわずか(C127の1/20以下)しか放出しない(図2B)が、SLC02A1 やその K613G 変異体を強制発現させると ATP 放出量が有意に増加するのに対し、Maxi-Cl 活性を示さない遺伝疾患型変異体 G222R の強制発現では ATP 放出は増加しないことが判明した(図2C)。以上の結果から、SLC02A1 が浸透圧性細胞膨張時の ATP 放出路にも関与することが明らかとなった。

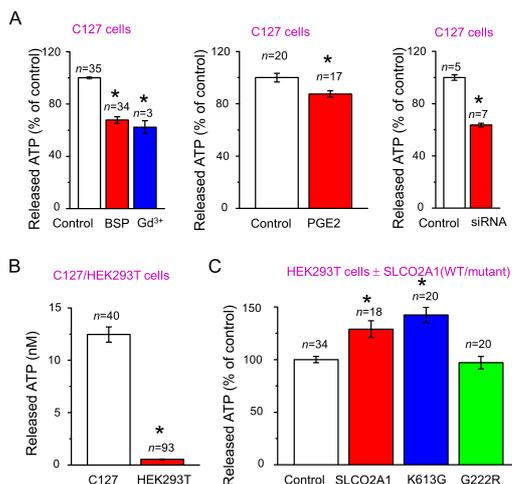


図2

### (3) 虚血・再灌流性心 ATP 放出路の分子同定

ランゲンドルフ灌流心標本の灌流液に、OGD・再灌流直後にピークを示す ATP 放出が見られた(図3B左)。あらかじめマウスの尾静脈から SLC02A1-siRNA をインビボ注入(3日前から1日おきに3回)しておくと、摘出心

臓での *slco2a1* 発現は有意に減少し(図3A)。この虚血・再灌流性心 ATP 放出も大きく抑制されることが明らかとなった(図3B中・右)。また、灌流液への PGT 阻害薬 ICG の添加によっても、この ATP 放出は有意に抑制された(data not shown)。以上から、マウス心臓からの虚血・再灌流性 ATP 放出にも SLC02A1 がその通路を与えるものと結論された。

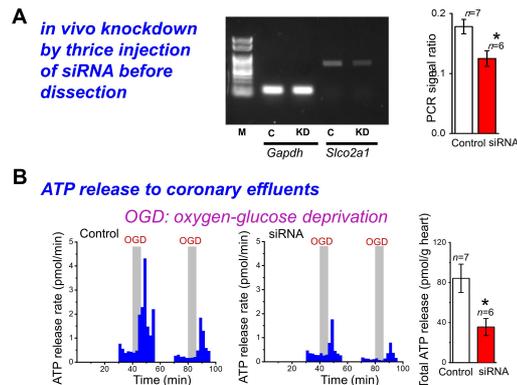


図3

### (4) 虚血・再灌流性心 ATP 放出の役割とシグナルの解明

ランゲンドルフ灌流下のマウス心臓の左心室機能を計測するために、左心房からバルーンカテーテルを挿入して左心室発生圧(LVDP)を測定したところ、正常時には収縮期圧約80 mmHg あったものが、6分間の虚血(OGD)終了時には約60 mmHgにまで低下し、再灌流後に収縮期圧が、たとえば5分後時点で  $84.0 \pm 1.6$  mmHg (n=4)に、回復することが明らかとなった(図4)。一方、灌流液に ATP 分解酵素 Apyrase とアデノシン A1 受容体阻害薬 DPCPX を加えておくと、再灌流後の LVDP 増が、たとえば再灌流後の5分時点で  $61.8 \pm 7.6$  mmHg (n=4)となるなど、抑制されることが明らかになった(data not shown)。この結果から、虚血・再灌流性に放出された ATP は虚血・再灌流障害に対して保護的に働いていることが結論され、この効果は ATP 分解後に生じるアデノシンによってもたらされる A1 受容体シグナリングによって仲介される可能性が高いことが明らかとなった。

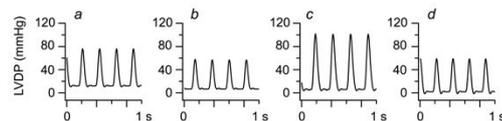
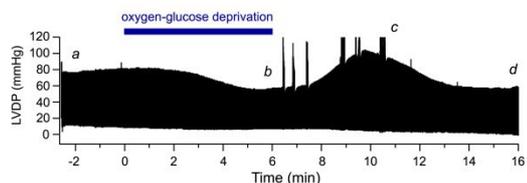


図4

## 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10件)

1. R.Z. Sabirov, P.G. Merzlyak, T. Okada, M.R. Islam, H. Uramoto, T. Mori, Y. Makino, H. Matsuura, Y. Xie & Y. Okada (2017)  
The organic anion transporter SLCO2A1 constitutes the core component of the Maxi-Cl channel. 査読有、  
*The EMBO J.* 36, 3309-3324  
doi: 10.15252/embj.201796685.
2. T. Okada, Md.R. Islam, N.A. Tsiferova, Y. Okada & R.Z. Sabirov (2017)  
Specific and essential but not sufficient roles of LRRC8A in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). 査読有、  
*Channels (Austin)* 11, 109-120  
doi: 10.1080/19336950.2016.1247133.
3. K. Sato-Numata, T. Numata, R. Inoue, R.Z. Sabirov & Y. Okada (2017)  
Distinct contributions of LRRC8A and its paralogs to the VSOR anion channel from those of the ASOR anion channel. 査読有、  
*Channels (Austin)* 11, 167-172  
doi: 10.1080/19336950.2016.1230574.
4. K. Sato-Numata, T. Numata, R. Inoue & Y. Okada (2016)  
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. 査読有、  
*Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 795-803  
doi: 10.1007/s00424-015-1786-1.
5. Y. Okada (2016)  
Channeling frozen cells to survival after thawing: opening the door to cryo-physiology. 査読有、  
*J. Physiol. (London)* 594, 1523-1524  
doi: 10.1113/JP271842.
6. S.F. Pedersen, Y. Okada & B. Nilius (2016)  
Biophysics and physiology of the volume-regulated anion channel (VRAC)/volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). 査読有、  
*Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 371-383  
doi: 10.1007/s00424-015-1781-6.
7. R.Z. Sabirov, P.G. Merzlyak, Md. R. Islam, T. Okada & Y. Okada (2016)  
The properties, functions and pathophysiology of maxi-anion channels. 査読有、  
*Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 405-420  
doi: 10.1007/s00424-015-1774-5.
8. K. Sato-Numata, T. Numata & Y. Okada (2014)  
Temperature sensitivity of acid-sensitive

outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis. 査読有、  
*Channels (Austin)* 8, 1-6  
doi: 10.4161/chan.27748.

9. T. Okada, T. Akita, K. Sato-Numata, M.R. Islam & Y. Okada (2014)  
A newly cloned ClC-3 isoform, ClC-3d, as well as ClC-3a mediates Cd<sup>2+</sup>-sensitive outwardly rectifying anion currents. 査読有、  
*Cell. Physiol. Biochem.* 33, 539-556  
doi: 10.1159/000358633.
10. T. Akita & Y. Okada (2014)  
Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. 査読有、  
*Neuroscience* 275, 211-231  
doi: 10.1016/j.neuroscience.

[学会発表] (計17件)

1. Okada T, Islam Md R, Merzlyak GP, Sabirov RZ, Okada Y (2018)  
SLCO2A1 is a pore-forming component of Maxi-Cl channel.  
第95回 日本生理学会大会、3月28-30日、高松
2. Islam Md R, Okada T, Matsuura H, Uramoto H, Sabirov RZ, Okada Y (2018)  
SLCO2A1 is involved in a pathway for ATP release from cultured cells and Langendorff-perfused hearts.  
第95回 日本生理学会大会、3月28-30日、高松
3. Sato-Numata K, Numata T, Ueda Y, Inoue R, Okada Y (2018)  
Properties and roles of flufenamate-sensitive ion channels stimulated by hyperosmolality in vasopressin neurons.  
第95回 日本生理学会大会、3月28-30日、高松
4. Okada Y, Sabirov RZ, Okada T, Merzlyak PG, Islam Md R, Sato-Numata K, Uramoto H, Ando-Akatsuka Y, Matsuura H (2017)  
Molecular identification of two types of volume-activated anion channels involved in multiple functions controlling cell life.  
第94回 日本生理学会大会、特別講演、3月28-30日、浜松
5. Sato-Numata K, Numata T, Inoue R, Sabirov RZ, Okada Y (2017)  
LRRC8 family is involved in volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR) activity but not in acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR) activity.  
第94回 日本生理学会大会、3月28-30日、浜松
6. Okada T, Sabirov RZ, Merzlyak PG, Islam Md R, Uramoto H, Mori T, Makino Y,

- Okada Y (2017)  
Identification of the key molecule of Maxi-Cl channel by proteomics and genome-wide approaches.  
第94回 日本生理学会大会、3月28-30日、  
浜松
7. Islam Md R, Merzlyak PG, Okada T, Uramoto H, Okada Y, Sabirov RZ (2017)  
Molecular verification for the Maxi-Cl channel molecule as a cellular ATP release pathway.  
第94回 日本生理学会大会、3月28-30日、  
浜松
8. 岡田俊昭, Islam Md R, Tsiferova NA, Kurbannazarova RS, 岡田泰伸, Sabirov RZ (2016)  
シスプラチン耐性細胞株KCP-4におけるLRRC8分子群の役割の検討。  
第63回中部日本生理学会、岡崎
9. Okada T, Sabirov RZ, Ohgaki R, Nagamori S, Kanai Y, Ono K, Uramoto H, Okada Y (2016)  
Involvements of LRRC8A and amino acid transporter SLC proteins in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR).  
第93回 日本生理学会大会、3月22-24日、  
札幌
10. Tsiferova NA, Merzlyak PG, Okada Y, Sabirov RZ (2016)  
Properties of the maxi-anion channel in melanoma cells.  
第93回 日本生理学会大会、3月22-24日、  
札幌
11. Sato-Numata K, Numata T, Inoue R, Okada Y (2016)  
Pharmacological distinction between acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR) and volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR).  
第93回 日本生理学会大会、3月22-24日、  
札幌
12. Islam Md R, Okada T, Merzlyak P, Okada Y, Sabirov RZ (2016)  
Biophysical and pharmacological characterization of the maxi-anion channel and an attempt to its molecular identification.  
The 14<sup>th</sup> EURASIA Conference, Karachi, Dec 2016.
13. Islam Md R, Okada T, Merzlyak P, Sabirov RZ, Okada Y (2015)  
Evidence for a modulatory role of annexin A2 in the maxi-anion channel activity.  
8th Congress of the Federation of The Asia and Oceanian Physiological Societies (FAOPS 2015), November 22-25, Bangkok, Thailand
14. Islam Md R, Okada T, Merzlyak PG, Sabirov RZ, Okada Y (2015)  
Annexin A2 is a modulator of maxi-anion

channel (Maxi-Cl) in mouse mammary C127 cells.

- 第92回 日本生理学会大会、3月21-23日、  
神戸
15. Sato-Numata K, Numata T, Okada Y (2015)  
Exploration of temperature sensitivity and new antagonists of acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR).  
第92回 日本生理学会大会、3月21-23日、  
神戸
16. Okada T, Sato-Numata K, Islam Md R, Sabirov RZ, Okada Y (2015)  
Examination of the role of LRRC8A in the function of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR).  
第92回 日本生理学会大会、3月21-23日、  
神戸
17. Sabirov RZ, Tsiferova NA, Merzlyak PG, Okada Y (2015)  
Volume-sensitive anion channels in melanoma cells before and after tumor formation.  
第92回 日本生理学会大会、3月21-23日、  
神戸

〔図書〕(計1件)

1. 岡田泰伸 (監修者)・佐久間康夫、岡村康司 (監訳者) (2017) “ギャノング生理学” (原書25版) 丸善、東京、898頁

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

なし

取得状況 (計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.nips.ac.jp/release/2017/10/atp\\_2.html](http://www.nips.ac.jp/release/2017/10/atp_2.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 泰伸 (Okada Yasunobu)  
生理学研究所・名誉教授  
研究者番号: 10025661

(2) 研究分担者

岡田 俊昭 (Okada Toshiaki)  
生理学研究所・生体機能調節研究領域・  
特任准教授  
研究者番号: 00373283

松浦 博(Matsuura Hiroshi)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 60238962

沼田（佐藤） かお理  
( SATO-NUMATA, Kaori )  
生理学研究所・細胞器官研究系・NIPS リサ  
ーチフェロー  
研究者番号： 60614196  
(平成 26 年 8 月 15 日まで研究分担者)

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし