

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：12702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15028

研究課題名(和文)容積感受性アニオンチャンネルVSORと新規関連タンパク質LRRC8Aの相互作用機構

研究課題名(英文) Mechanisms of interaction between the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel, VSOR, and a novel membrane protein, LRRC8A.

研究代表者

岡田 泰伸 (OKADA, Yasunobu)

総合研究大学院大学・なし・学長

研究者番号：10025661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：LRRC8Aがヒト細胞の容積感受性外向整流性アニオンチャンネルVSORの重要構成分子であることが報告された。本研究では、LRRC8Aは、マウス細胞のVSORにおいても本質的な役割を果たすこと、本分子の関与は、酸感受性外向整流性アニオンチャンネル(ASOR)、マキシアニオンチャンネル(Maxi-Cl)、Ca²⁺賦活性アニオンチャンネル(CaCC)やcAMP賦活性アニオンチャンネル(CFTR)には見られず、VSOR特異的であること、しかし、シスプラチン耐性がん細胞KCP-4のVSOR活性欠乏の原因には、LRRC8AやLRRC8B～Eは関与せず、未知の他分子の関与が不可欠であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, LRRC8A was reported to be the essential component of human volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). In this study, we have elucidated that LRRC8A is also essentially involved in mouse VSOR activity, whereas it is not involved in the activities of 4 other types of anion channels activated by acid, Ca²⁺, patch excision or cAMP, respectively. Also, we have shown that deficiency of VSOR activity in KCP-4 cells is not due to insufficient expression of LRRC8A/B/C/D/E, suggesting an involvement of some other molecule(s) in VSOR activity.

研究分野：生理学一般

キーワード：アニオンチャンネル 細胞容積調節 タンパク質 - タンパク質相互作用 細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

容積感受性外向整流性アニオンチャンネル VSOR (Volume-Sensitive Outwardly Rectifying anion channel)は細胞容積調節、そして(細胞容積変化・調節を不可避免的に伴う)細胞分裂や細胞移動および細胞死誘導に本質的役割を果たすと共に、脳虚血・再灌流時に活性化されたグリア細胞からのグルタミン酸の放出をもたらすことによってグリア-ニューロン間シグナル伝達にも関与する。このように VSOR の生理学的・病態生理学的役割の詳細は主として私達によって明らかにされてきたが、その分子実体は永く不明のままであった。しかし、2014年4月10日に Patapoutian ら (2014 Cell) と Jentsch ら (2014 Science) は、ゲノムワイド siRNA 法によって、新規タンパク質 LPRC8A がヒト細胞の VSOR の本体構成因子であることを、別々に同時発表した。私達はこれに対して、LRRc8A の膜貫通領域にあって細胞外からアクセス可能であることが確証されたアミノ酸(スレオニン 44)を陽荷電アミノ酸(アルギニン)や陰荷電アミノ酸(グルタミン酸)に置換してもアニオン透過性や選択性に大きな変化が見られないという彼らの結果などからすれば、LRRc8A が VSOR のポア本体である可能性にはまだ疑問が残ることを同年6月15日に表明した(Akita & Okada 2014 Neurosci)。また、マウスなどヒト以外の動物細胞の VSOR においても LRRc8A が重要構成分子として働いているのかどうかについては、未確定である。更には、LRRc8A ノックアウトマウスは致死性ではなく、Tリンパ細胞分化に異常が見られる以外、その成長はほぼ正常である事実(Kumar et al. 2014 J Exp Med)は、マウスでは LRRc8A は VSOR の重要構成分子ではなく、補助因子かレギュレーターにすぎない可能性も残されている。また、LRRc8A メンバーが共通して持っているロイシンリッチリピートドメイン(LRRD)は、他のタンパク質との間で結合・相互作用することが知られており、これを介して LRRc8A が他のタンパク質や他のアニオンチャンネルとも相互作用す

る可能性があるなど、まだまだ解明されなければならない点が多く残されている。

2. 研究の目的

上記の未解明の点を明らかにするために、本研究では次の5つの設問に対して実験的に検討し、解答を与えることを目的とする。①LRRc8A は、マウス細胞の VSOR においても本質的な役割を果たすのか? ②LRRc8A は、細胞外酸性条件下で活性化される酸感受性外向整流性アニオンチャンネル(ASOR)、巨大コンダクタンスを持ったマキシアアニオンチャンネル(Maxi-Cl)、細胞内 Ca^{2+} 増で活性化される Ca^{2+} 賦活性アニオンチャンネル(CaCC)や、細胞内 cyclic AMP/A キナーゼで活性化される cAMP 賦活性アニオンチャンネル(CFTR)などの他のアニオンチャンネルにも、それらの構成分子あるいは制御分子として関与するのか? ③他の LRRc8A メンバー(LRRc8B~E)は、VSOR 活性にいかなる役割を示すのか? ④シスプラチン耐性がん細胞 KCP-4 においては VSOR 活性が乏しいことの原因に、LRRc8A や LRRc8B~E の遺伝子発現の欠乏が関与するのか、それとも他の分子の関与を考えなければならないのか? ⑤VSOR 電流の電圧依存性不活性化キネティクスに、LRRc8A メンバーはいかなる影響を与えるのか?

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: 用いた細胞は、ヒト上皮由来の HeLa、Intestine 407、KB、KCP-4 細胞、マウス乳腺由来 C127 細胞、およびその CFTR 強制安定発現 C127/CFTR 細胞であり、Sato-Numata ら(2016 Pflugers Arch)および Okada ら(2017 Channels)で用いた方法で培養した。

(2) 遺伝子サイレンシングと強制発現: LRRc8A~8E の遺伝子特異的 siRNA のトランスフェクションによって遺伝子サイレンシング(ノックダウン)を行い、その効率を GAPDH をコントロールにして、セミ定量的 RT-PCR 法によって評価した。マイクロアレイ解析は細胞か

ら取った全 RNA サンプルを用いて行った。LRRC8A タンパク質の発現はモノクローナル抗体を用いての Western Blot 法で検出し、その細胞内局在は GFP タグをつけた同タンパク質の共焦点顕微鏡観察によって行った。電気生理学的解析のために強制発現させた LRRC8 メンバーの発現細胞確認は、LRRC8 分子と蛍光タンパクである GFP 又は dsRED2 を bicistronic IRES vector を用いて同一細胞内に発現させ、これを蛍光顕微鏡下で観察することで行った。

(3) パッチクランプ全細胞電流記録：VSOR 電流の測定は Ando-Akatsuka ら (2012 J Cell Physiol)、ASOR 電流は Wang ら (2007 Pflugers Arch)、CFTR 電流は Ando-Akatsuka ら (2002 Pflugers Arch)、Maxi-Cl 電流は Islam ら (2012 Am J Physiol)、CaCC 電流は Shimizu ら (2013 Am J Physiol) において用いた方法によって、室温にて行われた。

4. 研究成果

(1) LRRC8A は、マウス細胞の VSOR においても本質的な役割を果たすのか？：マウス C127 細胞に LRRC8A に対する siRNA をトランスフェクションすると、LRRC8A 遺伝子 (*Lrrc8a*) の発現が著しく抑制され (図 1A)、低浸透圧 (244

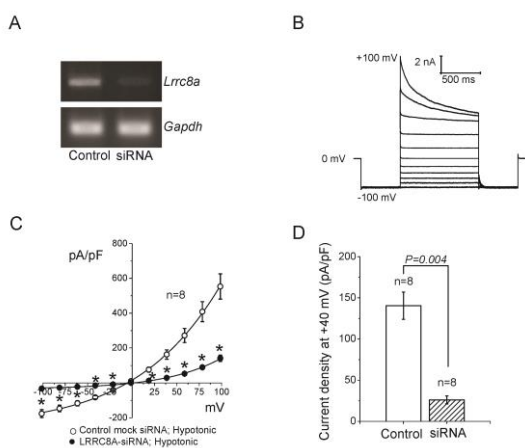


図 1

ミリオスモル) 刺激によって活性化される VSOR 電流 (図 1B) もまた大きく抑制された (図 1C、D)。それゆえ、マウス細胞の VSOR 活

性においても、LRRC8A が重要な役割を果たしていることが結論された。

(2) LRRC8A は、ASOR、Maxi-Cl、CaCC や CFTR アニオンチャネルにも関与するのか、それとも VSOR にも特異的に関与するのか？：C127/CFTR 細胞には、細胞外酸性、パッチ膜単離、細胞内 Ca^{2+} 増、細胞内 cAMP 増によってそれぞれ典型的な ASOR (図 2A)、Maxi-Cl (図 2B)、CaCC (図 2C) および CFTR (図 2D) 電流が活性化された。これらの電流は、LRRC8A ノックダウンによっても何らの影響も受けなかった (図 2A-D)。

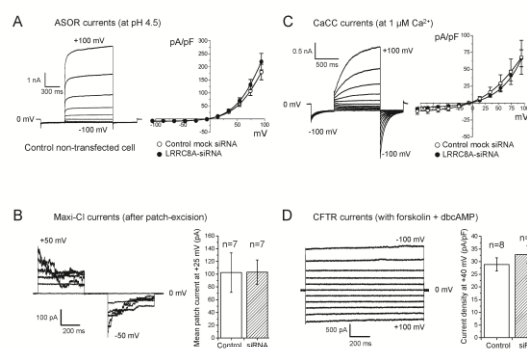


図 2

それゆえ、LRRC8A はこれら 4 種のアニオンチャネル活性の発生や制御に何らの関与もしていないことが結論された。更に、LRRC8A のみならずその他のメンバー (LRRC8B~E) に対するそれぞれの遺伝子サイレンシングを HeLa 細胞において行ったところ、それらの遺伝子発

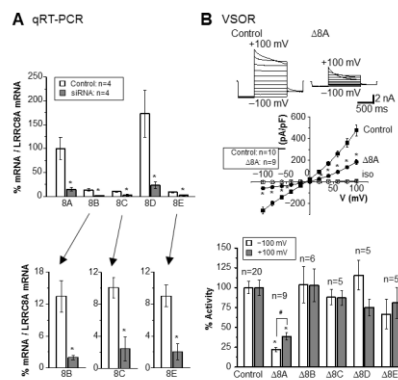


図 3

現は著しく抑制されたが (図 3A)、LRRC8A のノックダウンのみが VSOR 電流を大きく抑制

するのに対して **LRRC8** の他メンバーのノックダウンは有意に影響を与えないことが明らかになった (図 3B)。以上の結果は、**LRRC8A** のみが、**VSOR** 活性に対して特異的かつ不可欠の役割を果たしていることが結論された。

(3) 他の **LRRC8** メンバー (**LRRC8B~E**) は、**VSOR** 活性にいかなる役割を示すのか? :次に、HeLa 細胞に **LRRC8A** シングルノックダウンのみならず複数の他メンバーを同時にノックダウンした時の影響を調べたところ、**LRRC8C** と **LRRC8D** と **LRRC8E** をトリプルノックダウンした場合には、たとえ **LRRC8A** は正常に存在していても、**VSOR** 活性はほとんど完全に抑制されることが明らかになった (図 4)。

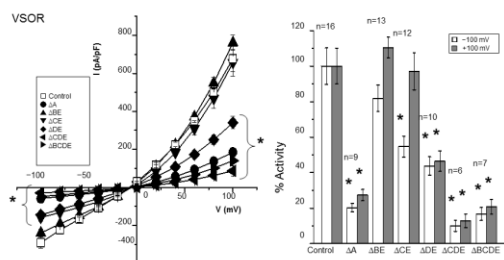


図4

この結果から、**LRRC8A** のみならず、これと **LRRC8C/D/E** のいずれかの組み合わせが **VSOR** の構成に必要であることが結論された。

(4) シスプラチン耐性がん細胞 **KCP-4** において **VSOR** 活性の乏しい原因は、**LRRC8A** や **LRRC8B~E** の遺伝子発現の欠乏によるのか? :シスプラチン耐性・**VSOR** 欠乏性 **KCP4** 細胞とその親細胞であるシスプラチン感受性・**VSOR** 高活性 **KB**

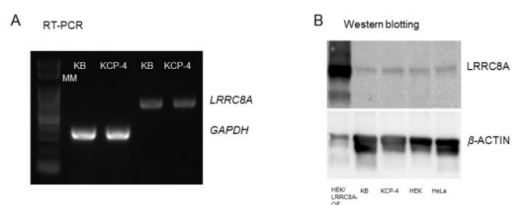


図5

細胞との間において、RT-PCR 法で **LRRC8A** 遺伝子の発現 (図 5A) を、Western Blot 法で **LRRC8A** タンパク質の発現 (図 5B) を比較したところ、両者において共に差はないことが明らかになった。

VSOR 活性を欠乏した **KCP-4** 細胞における全 **LRRC8** メンバーの遺伝子の発現は、**VSOR** 活性の豊富な親細胞 **KB** やヒト上皮系の **HEK293T** 細胞や **HeLa** 細胞に比べて、まったく乏しいという事実は認められないことが、Microarray 法で明らかとなった。(表 1)

Gene_Symbol	Gene_Signal Level	KCP4	KB	HEK293T	HeLa
LRRC8A	Signal (Ratio)	554.73 (1)	443.51 (0.80)	304.35 (0.55)	523.40 (0.94)
LRRC8B	Signal (Ratio)	765.92 (1)	555.64 (0.73)	444.46 (0.58)	348.98 (0.46)
LRRC8C	Signal (Ratio)	432.57 (1)	196.48 (0.45)	338.63 (0.78)	171.28 (0.40)
LRRC8D	Signal (Ratio)	1157.35 (1)	1241.54 (1.07)	1294.62 (1.12)	1325.61 (1.15)
LRRC8E	Signal (Ratio)	99.05 (1)	111.85 (1.13)	77.82 (0.79)	97.86 (0.99)

表1

更には、**KCP-4** 細胞に **LRRC8A** を単独で強制発現 (図 6A) すると、更に **VSOR** 電流は抑制され (図 6B、C)、**LRRC8A** に **LRRC8E** あるいは **LRRC8D** を共強制発現させるとその抑制は回復するが、その親細胞 **KB** の **VSOR** 活性レベルにまでは回復させないことが明らかとなった (図 6D、E)。

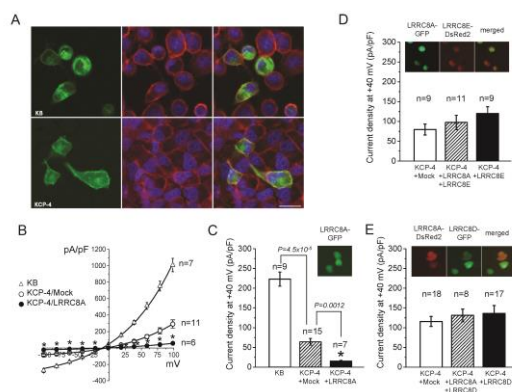


図6

これらの事実は、**KCP-4** 細胞における **VSOR** 活性欠乏は、**LRRC8** では説明できず、**VSOR** チャネルのポア構成には、**LRRC8** メンバー以外

の未知の分子 X の関与が必要であることを意味している (図 8 参照)。

(5) Jentsch グループは HCT116 細胞の VSOR 電流の電圧依存性不活性化キネティクスに LRRRC8E が関与し、減速には LRRRC8C が関与することを報告した (Voss et al. 2014 Science) が、他種細胞でも同様であるかどうかについては不明であった。そこで、今回、HeLa 細胞でこの点を検討したところ、LRRRC8A のノックダウンによって VSOR 電流の電圧依存性不活性化キネティクスは有意に加速され、その他の LRRRC8B ~8E のノックダウンによっては加速も減速もされないことが明らかとなった (図 7)。

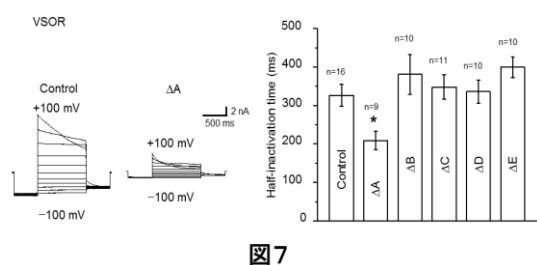


図 7

LRRRC8A のノックダウンではその不活性化キネティクスのパターンにも変化がもたらされ、ノックダウン前の Control の細胞の VSOR 電流不活性化は二重指数関数でしかフィッティングできないのに対して、ノックダウン後では単一指数関数でフィッティングできるように変化した (図 8A, B: 挿入電流トレース)。これらの結果は、不活性化の減速因子 (d) は、LRRRC8A そのものか、あるいは LRRRC8A に結合したサブコンポーネントが担い、加速因子 (a) は LRRRC8A メンバー以外の未知のポア構成分子 X か、それに結合したサブコンポーネントが担うものと推定される。図 8 は、減速・加速因子がサブコンポーネントであると仮定し、更に LRRRC8 は構造的に相似の pannexin と同様に 6 量体をとるものと仮定して VSOR ポア構成を模式的に示したものである。この 6 量体の構成には少なくとも LRRRC8A と LRRRC8C/D/E と X が含まれている。

LRRRC8A ノックダウンによる不活性化の二重指数関数的キネティクスから単一指数関数的キネティクスへの変換は、加速性サブコンポーネント (a) の数には限りがあることを示唆している (図 8)。すなわち、VSOR 電流不活性化キネティクスのこのパターン変化は、VSOR ポアに d のみが結合したものと $a \cdot d$ 両方が結合したものが混在している状態 (図 8A) から、LRRRC8A 数減少 (ノックダウン) 後には $a \cdot d$ 両方が結合したもののみとなる状態 (図 8B) に移るといふモデルでよく説明された。

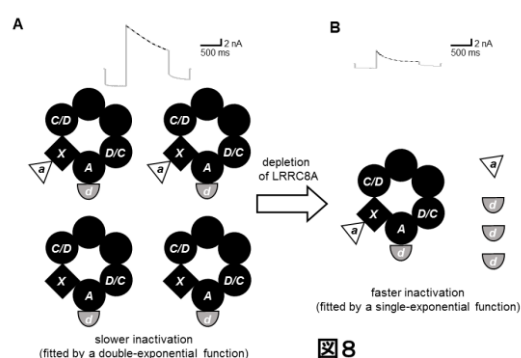


図 8

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. [T. Okada](#), Md.R. Islam, N.A. Tsiferova, [Y. Okada](#) & R.Z. Sabirov (2017) Specific and essential but not sufficient roles of LRRRC8A in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VOSR). *Channels (Austin)* 11, 109–120 doi: 10.1080/19336950.2016.1247133.
2. [K. Sato-Numata](#), T. Numata, R. Inoue, R.Z. Sabirov & [Y. Okada](#) (2017) Distinct contributions of LRRRC8A and its paralogs to the VSOR anion channel from those of the ASOR anion channel. *Channels (Austin)* 11, 167–172 doi: 10.1080/19336950.2016.1230574.
3. [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.

Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 468, 795-803
doi: 10.1007/s00424-015-1786-1.

4. Y. Okada (2016)
Channeling frozen cells to survival after thawing: opening the door to cryo-physiology.
J. Physiol. (London) 594, 1523-1524
doi: 10.1113/JP271842.
5. 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).
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 468, 371-383
doi: 10.1007/s00424-015-1781-6.
6. R.Z. Sabirov, P.G. Merzlyak, Md. R. Islam, T. Okada & Y. Okada (2016)
The properties, functions and pathophysiology of maxi-anion channels.
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 468, 405-420
doi: 10.1007/s00424-015-1774-5.

[学会発表] (計 5 件)

1. 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、3月28-30日、浜松
2. 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
3. 岡田俊昭, Md. Rafiqul Islam, Nargiza A. Tsiferova, Ranokhon S. Kurbannazarova, 岡田泰伸, Ravshan Z. Sabirov (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 11月4-5日、岡崎

4. 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
5. 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 泰伸 (OKADA, Yasunobu)

総合研究大学院大学・その他・学長

研究者番号： 1 0 0 2 5 6 6 1

(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： 0 0 3 7 3 2 8 3

沼田 かお理 (SATO-NUMATA, Kaori)

福岡大学・医学部

・その他 (学振特別研究員)

研究者番号： 6 0 6 1 4 1 9 6

赤塚 結子 (AKATSUKA, Yuko)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号： 9 0 3 2 1 6 1 1