

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15029

研究課題名(和文)細胞の生と死を司るアニオンチャネルの分子実体と制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular components and regulatory mechanism of anion channels controlling the cell homeostasis and death

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の生と死(細胞容積調節とアポトーシス)の両面に関わるvolume-sensitive outward rectifying (VSOR) anion channel (VSORアニオンチャネル)の分子実体の全容を解明するための細胞生理学的・分子生理学的研究を行った。

その結果、VSORチャネルの構成分子として、SSNK-1(仮称)が関与していることを明らかにした。SSNK-1は、原形質膜の膜マイクロドメインにおいて、LRRC8Aと相互作用することでチャネル機能を発揮し、細胞容積調節機構に参与するものと考えられた。一方、SSNK-2とSSNK-3は、チャネル構成分子ではなかった。

研究成果の概要(英文)：Volume-sensitive outward rectifying (VSOR) anion channel contributes to keep cell homeostasis and to trigger cell death such as apoptosis. In this study, we tried to elucidate the molecular components of the VSOR anion channel by using cellular physiological and molecular physiological techniques.

Here, we found that SSNK-1 (tentative name) is one of essential components of the VSOR channel. SSNK-1 may be associated with LRRC8A in the membrane microdomain of plasma membrane, where they elicit the channel activity for the cell volume regulation. In contrast, SSNK-2 and SSNK-3 were not involved in formation of the VSOR anion channel.

研究分野：細胞生理学、分子生理学

キーワード：生理学 細胞・組織 イオンチャネル 生体膜 細胞容積

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の生と死(細胞容積調節とアポトーシス・ネクローシス)の両面に関わる volume-sensitive outward rectifying (VSOR) anion channel (VSOR アニオンチャンネル)は生理学的に極めてユニークなチャンネルであるが、その分子実体については長年にわたる世界中の研究者の多大なる尽力にもかかわらず、未だ確定していない。

最近、LRRC8A (leucine-rich repeat containing 8 family, member A) [Voss et al., Science, 2014; Qiu et al., Cell, 2014] が有力な候補として報告されたが、我々の実験で LRRC8A は、VSOR アニオンチャンネルの重要な構成分子であるものの、LRRC8A のみでは、チャンネル分子の全容を説明できないという結果を得た。

最近、我々は VSOR アニオンチャンネルの特異的阻害剤(DCPIB)の光アフィニティーラベル体による VSOR チャンネル候補蛋白質の単離という独創的手法を駆使して、「SSNK-1」(仮称)を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) VSOR アニオンチャンネルの候補分子「SSNK-1」が、VSOR アニオンチャンネルの分子実体、あるいはチャンネル構成分子として機能することを細胞生理学的および分子生理学的に実証すること、2) SSNK-1 と LRRC8A の相互作用を明らかにすること、3) SSNK のアイソフォームの SSNK-2 および SSNK-3 の VSOR アニオンチャンネルに対する寄与を明らかにすることで、VSOR アニオンチャンネル分子の全容解明につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) VSOR アニオンチャンネル電流の電気生理学的解析

各種細胞に対して、ホールセル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 NMDG-Cl, 5 MgSO<sub>4</sub>, 12 Hepes, 7 Tris, 30 mannitol, pH 7.4 (260 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) であり、標準バス溶液 (340 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) には 80 mM mannitol を付加した。ピペット溶液の組成 (mM) は 110 NMDG-Cl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1 EGTA, 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。

(2) 細胞容積の測定

細胞容積測定は、コールターカウンター法により行った。標準溶液の組成 (mM) は、4.5 KCl, 95 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 Hepes, 105 mannitol, pH 7.3 (310 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) であり、低張溶液の組成 (mM) は、4.5 KCl, 95 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 Hepes, pH 7.3 (205 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) であった。

(3) 脂質ラフト画分の単離

細胞から調製した膜画分を、1% CHAPS で可溶化し、sucrose 不連続密度勾配遠心によって 10 フラクシオンに分画した。脂質ラフト画分は、CHAPS 不溶性のフラクションに検出された。

(4) Proximity Ligation Assay

各種 SSNK と LRRC8A の相互作用は、Duolink In Situ Starter Set RED (SIGMA) を用いて評価した。赤色蛍光の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM780) を使用した。

### 4. 研究成果

(1) SSNK アイソフォームの SSNK-2 および SSNK-3 をクローニングし、それぞれ HEK293T 細胞に過剰発現させた。SSNK-1、SSNK-2 の発現細胞では VSOR アニオンチャンネル電流が増大したが、SSNK-3 発現細胞では電流の増大が見られなかった(図1)。

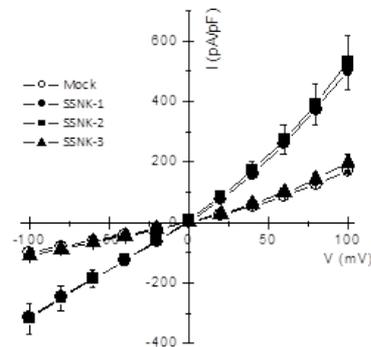


図1. 各種 SSNK 発現細胞における VSOR 電流

(2) SSNK-1 発現細胞を低張溶液で処理すると、多量体を形成する傾向が見られた(図2)。

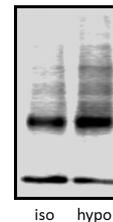


図2. 低張刺激 (hypo) による SSNK-1 の多量体形成

(3) SSNK-1 ノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞において、VSOR チャンネル電流の抑制が観察されたが、

SSNK-2 ノックアウトマウス由来細胞の VSOR チャンネル電流に変化はなかった(図3)。

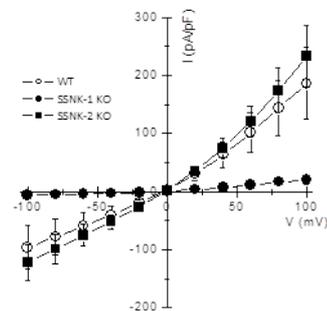


図3. SSNK-1, SSNK-2 ノックアウト細胞における VSOR 電流

(4) 低張条件下で引き起こされる調節性細胞容積減少 (RVD) は、SSNK-1 過剰発現細胞において亢進し、SSNK-1 ノックアウト細胞において抑制された (図 4)。

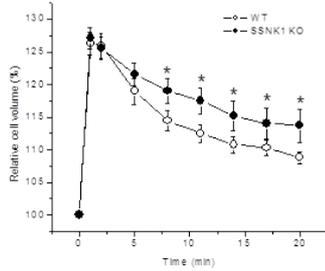


図 4. SSNK-1 ノックアウト細胞における RVD の遅延

(5) VSOR アニオンチャンネルが機能的に発現しているヒト口腔類表皮癌由来 KB 細胞および VSOR チャンネル機能が欠落している KB 細胞由来の KCP-4 細胞において、LRRC8A の発現量は、遺伝子およびタンパク質レベルで有意差がなかった (図 5)。

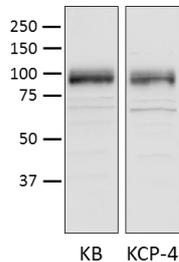


図 5. VSOR チャンネル活性と LRRC8A 発現量は関連しない

(6) SSNK-1 強制発現 HEK293 細胞において、特異的抗体を用いた免疫細胞染色およびピオチン化実験により、SSNK-1 は、細胞内および原形質膜に発現していることが分かった。また、SSNK-1 は、LRRC8A と共に膜マイクロドメインに発現していることが示唆された (図 6)。

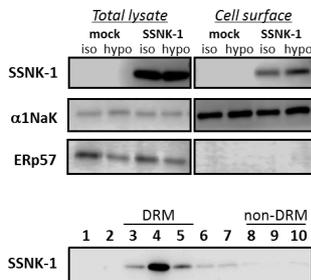


図 6. 原形質膜の膜マイクロドメイン (脂質ラフト) における SSNK-1 の発現

(7) SSNK-1、SSNK-2、SSNK-3 の各強制発現細胞において、低張条件下で引き起こされる調節性細胞容積減少 (RVD) は、SSNK-1 の場合のみ亢進し、SSNK-2、SSNK-3 の発現による亢進は観察されなかった (図 7)。

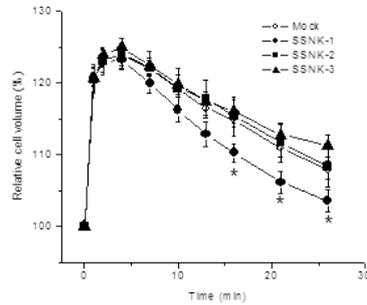


図 7. 各種 SSNK 強制発現細胞における RVD

(8) SSNK-1 ノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞に、SSNK-1 を強制発現させると VSOR チャンネル電流の回復が観察された (図 8)。また、ノックアウト細胞における LRRC8A のタンパク質発現量は、野生型と差がなかった (図 9)。

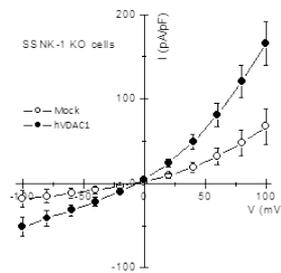


図 8. SSNK-1 ノックアウト細胞への SSNK-1 の発現は VSOR 電流をレスキューする

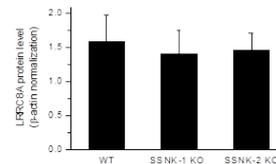


図 9. 各種細胞における LRRC8A の発現量

(9) タンパク質間相互作用の検討のための Proximity Ligation Assay により、LRRC8A と SSNK-1 は近接して存在していることが示唆された (図 10)。一方、SSNK-3 は、LRRC8A と近接して存在しないことがわかった。

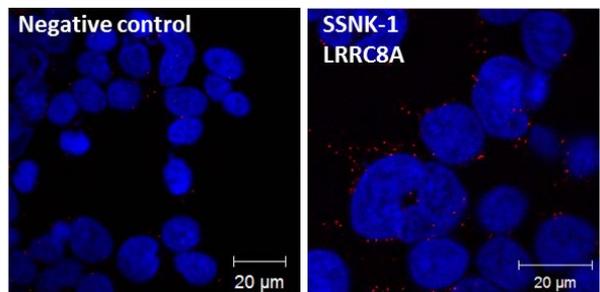


図 10. SSNK-1 と LRRC8A の相互作用 (赤い点が両者が近接している指標となる)

以上の結果から、VSOR アニオンチャネルの構成因子として、LRRC8A に加えて SSNK-1 が関与していることが示唆された。SSNK-1 と LRRC8A は、原形質膜の膜マイクロドメイン（脂質ラフト）において、相互作用することにより、VSOR アニオンチャネルの機能が発揮され、細胞容積調節機構に密接に関与するものと考えられる。

一方、SSNK のアイソフォームの SSNK-2 と SSNK-3 は、VSOR チャネルの構成には関与していないことが示唆された。

本研究で、VSOR チャネルの機能と LRRC8A の発現量に相関性が見られなかったこと、SSNK-1 のノックダウン、ノックアウトにより VSOR チャネル機能が著しく低下することから、SSNK-1 は、VSOR チャネルの機能維持に必須の役割を担っていることが示唆される。

VSOR アニオンチャネルは、アポトーシス性細胞死が寄与する、心筋梗塞や脳卒中などの虚血性疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に関与していることが示唆されている。今後、SSNK-1 を標的とする化合物のスクリーニングにより、これらの疾患に対する有効な治療薬の開発につながる可能性がある。

なお、本研究成果に基づく論文を現在作成中である。

## 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 5 件)

Fujii N, Matsuo Y, Matsunaga T, Endo S, Sakai H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J, Ikari A. (2016) Hypotonic stress-induced down-regulation of claudin-1 and -2 mediated by dephosphorylation and clathrin-dependent endocytosis in renal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 291 (47): 24787-24799. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M116.728196

酒井秀紀, 藤井拓人. (2016) 胃酸分泌における塩素イオントランスポーター複合体の関与. *日本臨牀* 74: 1401-1405. 査読無

Fujii T, Watanabe M, Shimizu T, Takeshima H, Kushiro K., Takai M, Sakai H. (2016) Positive regulation of the enzymatic activity of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by sialylation of its β-subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858 (6): 1228-1235. 査読有 doi: 0.1016/j.bbamem.2016.02.029.

Ikari A, Taga S, Watanabe R, Sato T, Shimobaba S, Sonoki H, Endo S, Matsunaga T, Sakai H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J. (2015) Clathrin-dependent endocytosis of claudin-2 by DFYSP peptide causes lysosomal damage in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848 (10 Pt A): 2326-2336. 査読有 doi: 10.1016/j.bbamem.2015.07.003.

Fujii T, Takahashi Y, Takeshima H, Saitoh C, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. (2015) Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB), an inhibitor of volume-regulated anion channel. *Eur. J. Pharmacol.* 765: 34-41. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.011.

[学会発表](計 21 件)

清水貴浩, 樋口大河, 藤井拓人, Bernd Nilius, 酒井秀紀. The outer pore region of the mouse PKD2L1 channel contributes to voltage-dependent inactivation. 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 28-30 日, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

藤井拓人, 齋藤祐輝, 清水貴浩, 永森收志, 金井好克, 酒井秀紀. マウス ATP13A4 のカチオン輸送機能の解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 東北大学 (宮城県仙台市)

鳥羽俊弘, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. PKD2L1 チャネルに対する香辛料成分の効果. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会, 2016 年 11 月 27 日, 金沢大学 (石川県金沢市)

井上貴斗, 阿波加隼也, 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 田淵圭章, Ursula Seidler, 酒井秀紀. SLC26A7 Cl<sup>-</sup> チャネルは胃酸分泌細胞の細胞防御機構に関与する. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会, 2016 年 11 月 27 日, 金沢大学 (石川県金沢市)

清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀. TMEM16F におけるイオンチャネル機能とリン脂質スクランブラーゼ機能の相関性. 2016 年度生理研研究会「上皮膜輸送調節蛋白の異

常と病態生理学の融合」, 2016年11月24-25日, 岡崎統合バイオサイエンスセンター(愛知県岡崎市)

大野智恵, 藤井拓人, 竹島浩, 齋藤知里, 清水貴浩, 酒井秀紀. 容積感受性アニオンチャンネル阻害剤 DCPIB による胃プロトンポンプ活性阻害. 第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016年11月17-18日, 名古屋市立大学(愛知県名古屋市)

藤井拓人, 清水貴浩, 竹島浩, 久代京一郎, 高井まどか, 酒井秀紀. 胃プロトンポンプ 8 鎖のシアル酸修飾によるポンプ活性制御. 第63回中部日本生理学会大会, 2016年11月4-5日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀. TMEM16F が有するイオンチャンネル機能/リン脂質スクランブラーゼ機能. 第63回中部日本生理学会大会, 2016年11月4-5日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

藤井拓人, 清水貴浩, 高井まどか, 高橋康史, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞の頂端膜界面の構造と機能. 平成28年度生理研研究会「生体界面研究会」, 2016年7月4-5日, 自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県岡崎市)

Fujii T, Shimizu T, Takeshima H, Sakai H. Cardiac glycoside ouabain exerts anti-cancer activity by activation of volume-regulated anion channel. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium), 2016年9月12-13日, 富山国際会議場(富山県富山市)

Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. Butyrate induces apoptosis via activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in mouse colonic epithelial MCE301 cells. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium), 2016年9月12-13日, 富山国際会議場(富山県富山市)

酒井秀紀, 藤井拓人, 久代京一郎, 高井まどか. 胃酸分泌細胞の生体界面において H,K-ATPase $\beta$  鎖のシアル化はプロトンポンプ活性を正に制御する. 第93回日本生理学会大会シンポジウム「異分野融合研究による細胞外液と形質膜との境界相『生体界面』への挑戦」, 2016年3月22-24日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

清水貴浩, 大竹宏尚, 藤井拓人, 岡田泰伸, 酒井秀紀. 細胞骨格による容積感受性アニオンチャンネルの制御が抗癌剤耐性に寄与する. 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22-24日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

藤井拓人, 酒井秀紀. 胃壁細胞分泌膜界面において糖鎖末端のシアル酸はプロトンポンプ活性を正に調節する. 第4回生体界面研究会, 2016年2月1-2日, 新潟大学(新潟県新潟市)

Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. Properties of volume-sensitive anion channel in butyrate-triggered apoptosis of murine colonic epithelial cells. 8th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress, 2015年11月22-25日, Centara Grand and Bangkok Convention Centara at Central World (Bangkok, Thailand)

Fujii T, Shimizu T, Takeshima H, Sakai H. Activation of volume-regulated anion channel by nanomolar concentrations of ouabain in human cancer cells. 8th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress, 2015年11月22-25日, Centara Grand and Bangkok Convention Centre at Central World (Bangkok, Thailand)

Sakai H, Fujii T, Shimizu T. Properties of chloride-transporting proteins in gastric parietal cells. The 21st Kyung Hee Ease-West Pharmaceutical Research Institute Symposium, 2015年11月20日, Kyung Hee University (Seoul, Korea)

山本翔太, 藤井拓人, 清水貴浩, 田淵圭章, 竹島浩, 酒井秀紀. ナトリウムポン

プと容積感受性アニオンチャンネルによる  
癌細胞増殖抑制機構．日本薬学会北陸支  
部第 127 回例会，2015 年 11 月 15 日，  
富山大学杉谷キャンパス(富山県富山市)

鍋島彰太，清水貴浩，藤井拓人，小澤茂喜，  
家原貴大，岡田泰伸，酒井秀紀．  
TMEM16F が有するリン脂質スクラン  
プラーゼ機能．第 62 回中部日本生理学会  
大会，2015 年 11 月 13-14 日，富山大学  
五福キャンパス(富山県富山市)

大野智恵，樋口大河，清水貴浩，藤井拓  
人，Bernd Nilius，酒井秀紀．PKD2L1  
カチオンチャンネルの電位依存的な不活性化  
機構の解析．第 62 回中部日本生理学会大  
会，2015 年 11 月 13-14 日，富山大学五  
福キャンパス(富山県富山市)

- ② 酒井秀紀，藤井拓人，清水貴浩．胃細胞  
の分泌膜界面の構成と機能．平成 27 年度  
生理研研究会「第 3 回生体界面研究会」，  
2015 年 7 月 16-17 日，自然科学研究機構  
生理学研究所(愛知県岡崎市)

〔図書〕(計 2 件)

酒井秀紀．(2016)「疾病と病態生理」改  
訂第 4 版，南江堂；1 消化器疾患 A. 消  
化器系；p.49-66 (総ページ数 508 頁)．

Sakai H, Fujii T, Takeguchi N. (2016)  
Proton-Potassium ( $H^+/K^+$ ) ATPases:  
Properties and Roles in Health and  
Diseases. *Met. Ions Life Sci*. Springer,  
16: 459-483 (総ページ数 628 頁). doi:  
10.1007/978-3-319-217 56-7\_13.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy1/in  
dex-j.html](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： 6 0 2 4 2 5 0 9

### (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： 4 0 3 5 3 4 3 7