

平成21年6月11日現在

研究種目：	若手研究 (B)
研究期間：	2007 ~ 2008
課題番号：	19790168
研究課題名 (和文)	CLIC4 チャンネルによる核内クロライド濃度変化を介した細胞増殖メカニズムの解明
研究課題名 (英文)	CLIC4 channel regulates cell proliferation via changes in intranuclear Cl ⁻ concentration
研究代表者	宮崎 裕明 (MIYAZAKI HIROAKI) 京都府立医科大学・医学研究科・助教 研究者番号：30360027

研究成果の概要：

胃ガン由来細胞株である MKN28 細胞を低 Cl⁻濃度培地で培養を行ったところ、細胞周期の G1 期から S 期への進行が抑制されることが明らかとなった。また低 Cl⁻処理は、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化を誘発することで、細胞周期の G1 期から S 期の進行を抑制する p21 タンパクの発現を亢進することが明らかになった。MAPK を介した転写制御は核内で起こることや、p21 などの細胞周期調節タンパク質は細胞の核内で機能していることから、細胞質内の Cl⁻濃度変化が核膜に存在する Cl⁻チャンネル (CLIC4) を介し核内の Cl⁻濃度に対しても大きく影響を与え、その結果核内の細胞周期調節タンパクの活性に影響を与えているものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：核、Cl⁻濃度、CLIC4、細胞増殖、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖はあらゆる生物において普遍的なメカニズムであり、定められた一連の過程(細胞周期)を順序よくたどり、成分を倍加し、その後2つに分裂する。細胞周期は、あらゆる生物が増殖する際の基本的なメカニズムであり、そのメカニズムは厳密に制御されている。細胞周期の過程は、M 期(分裂期)、G1 期(第1 間期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(第

2 間期)の順に進み、再び M 期に進行する。近年の分子生物学的手法の発展により、細胞周期の進行に関与する cyclin や CDK など、正常な細胞周期の進行を制御するチェックポイントにおける調節機構に関与する様々な分子群の同定が進み、そのメカニズムが明らかにされつつある。しかしながら、それぞれの分子がどのように協調しあって正常な細胞周期の進行が制御されるのかにつ

いては、未だに不明な点が多い。近年の我々の研究結果から、細胞質内のイオン環境変化が細胞増殖に大きく影響を与えることが明らかになった。特に、イオン輸送体 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter) の阻害剤や細胞外液の Cl^- 濃度を減少させることで細胞質内の Cl^- 濃度を低下させると、細胞増殖が抑制されることが明らかになった。このように、細胞内 Cl^- 濃度は細胞増殖のコントローラーとして機能している可能性が強く示唆されたが、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

細胞質内の Cl^- 濃度変化が核内に存在する細胞周期調節タンパク質の活性に影響を与えるということから、細胞質内の Cl^- 濃度変化が核内の Cl^- 濃度に対しても大きく影響を与え、その結果核内の細胞周期調節タンパク質の活性に影響を与えているものと考えられることができる。そこで、核内で機能する細胞周期制御タンパク質の核内 Cl^- 濃度に対する影響について検討を行う。近年の研究結果から、核膜では核膜孔を介した物質の輸送は厳密にコントロールされており、核の内部と外部の環境は細胞質とは厳密に区別されていると考えられており、様々なイオン輸送体の発現が明らかにされている。 Cl^- チャンネルに関しては、細胞内発現 Cl^- チャンネル (Chloride Intracellular Channel: CLIC) ファミリーのひとつ、CLIC4 が核膜に発現することが知られている。さらに細胞増殖シグナルにより、CLIC4 の遺伝子発現が増大されるという報告もあることから、細胞増殖シグナルとしての細胞内 Cl^- 濃度変化を核内に伝達する役割を果たしている可能性が示唆されることから、CLIC4 の発現と細胞増殖に与える影響について検討を行う。

3. 研究の方法

まず、細胞外 Cl^- 環境が細胞内 Cl^- 濃度に与える影響について検討を行った。 Cl^- を NO_3^- で置換し Cl^- 濃度を低下させた培養液 (Cl^- 濃度: 121.8 (control), 89.5, 48.9, 27.8, 6.1 mM) を作製し、各 Cl^- 濃度の培養液中で胃癌由来細胞株である MKN28 細胞を培養し、細胞内 Cl^- 濃度を測定した。細胞内 Cl^- 濃度測定には、蛍光 Cl^- indicator である MQAE と cell analyzer Quanta を用いた、高精度測定法を用いた。また同時に、細胞内 Cl^- 環境が細胞増殖に与える影響について検討を行った。次いで、細胞内 Cl^- 環境が細胞周期に与える影響について検討するため、フローサイトメーターによる核内 DNA 量測定による細胞周期解析と、サイクリン、CDK、p53、p21 や pRb といった、細胞周期進行を調節する酵素群について、発現および活性化レベルについて

western blotting 法により検討を行った。さらに、細胞内 Cl^- 濃度が増殖シグナルに与える影響をしらべるため、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の活性化レベルの検討を行った。また、核膜に発現する CLIC4 チャンネルが MKN28 に発現しているのかを確認するため、PCR 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

Cl^- を NO_3^- で置換し Cl^- 濃度を低下させた培養液 (Cl^- 濃度: 121.8 (control), 89.5, 48.9, 27.8, 6.1 mM) を作製し、各 Cl^- 濃度の培養液中で MKN28 細胞を 48 時間培養したところ、細胞内 Cl^- 濃度は培養液中の Cl^- 濃度の減少に伴い減少した (図 1)。

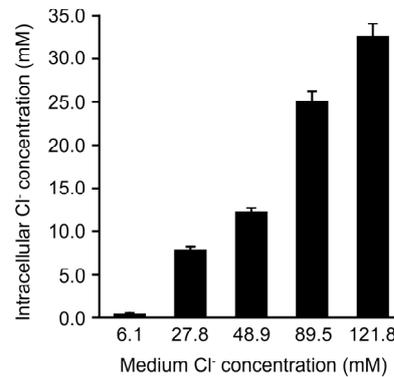


図 1 細胞外 Cl^- 濃度変化時の細胞内 Cl^- 濃度

また細胞増殖も培養液中の Cl^- 濃度低下に伴って有意に抑制された (図 2)。

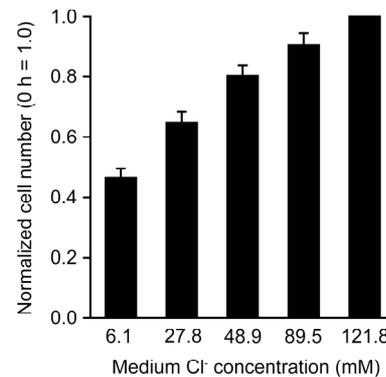


図 2 細胞外 Cl^- 濃度変化時の細胞増殖

低 Cl^- 濃度培養液中における細胞増殖抑制メカニズムの解明のため、低 Cl^- 環境が細胞周期に与える影響について検討した。MKN28 細胞を低 Cl^- 濃度 (Low Cl^- : 6.1 mM) 培養液で 48 時間培養後、フローサイトメーターで細胞周期解析を行った。フローサイトメーターの測定結果から得られたヒストグラムから (図 3)、Low Cl^- 培養液で培養を行った細胞では、通常の培養液 (Normal Cl^-) で培養した細胞に比べ、細胞周期の G1 期のピーク

が増加していることが明らかになった。

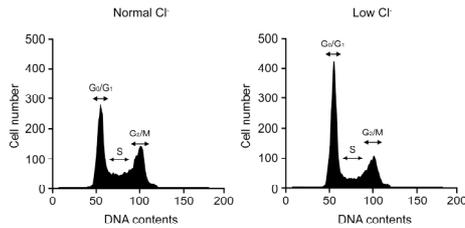


図3 低 Cl 環境の細胞周期への影響

以上のことから、低 Cl 濃度環境下では、細胞周期の G1 期から S 期の進行が遅延を受けている可能性が示唆された。細胞周期は、サイクリンや CDK などの様々な調節因子によりその進行が厳密にコントロールされている。そこで、低 Cl 濃度環境が G1-S 期進行の調節因子に与える影響について検討を行った。

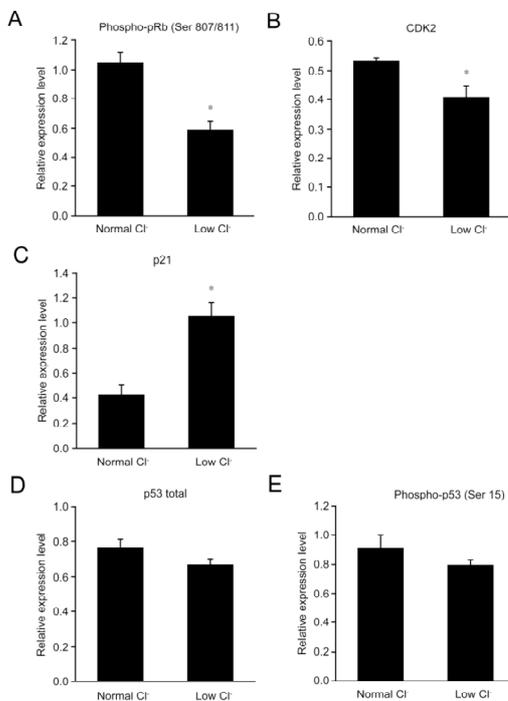


図4 低 Cl 環境の細胞周期への影響

G1-S 期の進行は主に p53-pRb カスケードにより調節を受けている。そこで、low Cl 培養液で培養した MKN28 細胞において p53-pRb カスケードに関与する調節因子の発現および活性について変化が起きているか検討を行った。まず、細胞周期の G1 期から S 期への進行に必須の転写因子 E2F の活性制御に関与している pRb について検討を行った。pRb は E2F との複合体を形成するが、pRb との結合している E2F は転写因子活性を持たない。pRb はリン酸化が亢進すると E2F との結合が弱まり、その結果 E2F が解離することで転写因子活性が回復し、S 期への進

行が亢進する。MKN28 を低 Cl 環境下で培養を行うと、pRb のリン酸化レベルが有意に減少した (図 4A)。また、pRb のリン酸化に関与する CDK の発現レベルを確認したところ、低 Cl 環境下では発現量が有意に減少しており、このことが pRb リン酸化レベル減少のひとつの要因であると考えられた (図 4B)。次いで、低 Cl 環境が pRb のリン酸化に与える影響の詳細について検討するため、CDK の活性阻害効果を有する p21 の発現量を確認した。MKN28 を low Cl 培養液中で培養を行うと、p21 の発現量は有意に増加した (図 4C)。一般的に、p21 の発現量は p53 転写因子によって調節されることが知られているため、p53 の発現レベルおよび活性化レベルについて検討を行った。低 Cl 環境下において MKN28 における p53 の発現量を確認したが、有意な変化は認められなかった。また、p53 の活性化の指標となる Ser 15 残基のリン酸化についても検証を行ったが、低 Cl 環境下において有意な変化は認められなかった (図 4D, 4E)。以上の結果から、細胞内 Cl は p53 非依存的な経路により p21 の発現レベルを調節することで細胞増殖を制御している可能性が強く示唆された。そこで、以前から p53 非依存的な p21 の発現調節に関与しているとの報告のある mitogen-activated protein kinases (MAPKs) が、低 Cl 環境下における p21 発現亢進に関与しているかについて検討を行った。これまでに MAPKs の活性化が p21 発現を亢進するとの報告があることから、まず低 Cl 環境が MAPKs (ERK, p38, JNK) の活性化に影響を与えるかについて検討を行った。

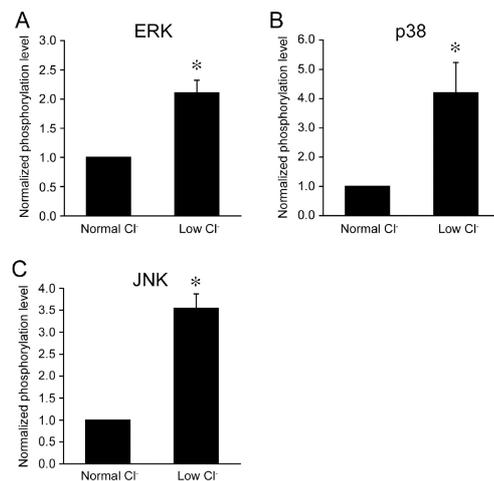


図5 低 Cl 環境の MAPK への影響

MAPKs の活性レベルはそれぞれのリン酸化レベルを指標とした。Normal Cl と Low Cl 培地中で培養した MKN28 細胞の ERK, p38, JNK のリン酸化レベルを、各酵素のリン酸化認識抗体を用いて western blotting により

解析を行った。その結果、ERK (図 5A) , p38 (図 5B) , JNK (図 5C) のすべてにおいて低 Cl⁻環境下においてリン酸化レベルが亢進していることが明らかになった。この低 Cl⁻環境による MAPKs の活性化が、p21 の発現亢進に関与しているかを検証するため、ERK、p38、JNK の各 MAPKs カスケードに特異的な阻害剤 (PD98059: MEK (ERK の上流因子) inhibitor (25 μM), SB202980: p38 inhibitor (10 μM), SP600125: JNK inhibitor (1 μM)) を MKN28 細胞に投与した後、低 Cl⁻環境下で培養を行い、MAPKs のリン酸化レベルおよび p21 の発現レベルへの影響を確認した。MKN28 細胞に MAPK の各阻害剤の処理を行うと、低 Cl⁻環境下における MAPKs のリン酸化亢進が有意に抑制された (図 6A, 6B, 6C)。

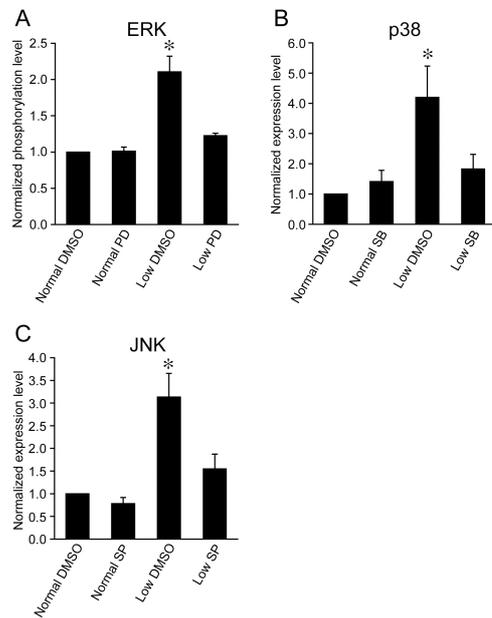


図 6 MAPK 阻害剤の影響

また、MAPK の各阻害剤処理をした MKN28 細胞では、低 Cl⁻環境下における p21 の発現亢進も完全に抑制された (図 7)。これらの結果から、MKN28 細胞における低 Cl⁻環境下での p21 発現亢進は、MAPK 経路を介して誘発されていることが明らかになった。また、MAPK 阻害剤が低 Cl⁻環境下における細胞増殖抑制効果に与える影響についても検討を行った。低 Cl⁻環境下では、MKN28 細胞の細胞増殖は約 50%の阻害を受けるが、各 MAPK の阻害剤処理を行うと増殖抑制効果がほぼ消失した (図 8)。以上の結果から、細胞内 Cl⁻は MAPK 経路により p21 の発現レベルを調節することで細胞増殖を制御している可能性が強く示唆された。次いで、核膜に発現する CLIC4 チャンネルが MKN28 に発現しているかについて確認した。PCR 法を行い CLIC4 の検出を行ったところ、

MKN28 細胞において CLIC4 チャンネルの発現を確認した。

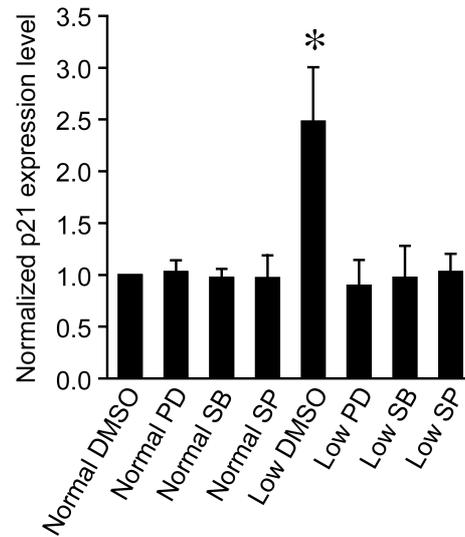


図 7 p21 発現量に対する MAPK 阻害剤の影響

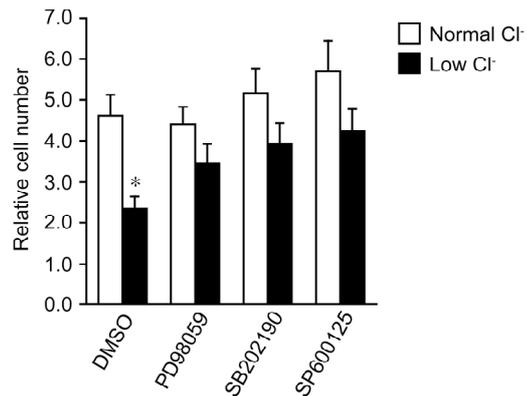


図 8 MAPK 阻害剤の細胞増殖に与える影響

以上の結果から、MAPK を介した転写制御は核内で起こることや、p21 などの細胞周期調節タンパク質は細胞の核内で機能していることから、細胞質内の Cl⁻濃度変化が核膜に存在する Cl⁻チャンネル (CLIC4) を介し核内の Cl⁻濃度に対しても大きく影響を与え、その結果核内の細胞周期調節タンパクの活性に影響を与えているものと考えられた。

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 1 1 件)

- ① Regulation of paracellular Na⁺ and Cl⁻ conductances by hydrostatic pressure., Tokuda, S., Niisato, N., Nagai, T., Taruno, T., Nakajima, K., Miyazaki, H.

- Yamada, T., Hosogi, S., Oha, M., Nishio, K., Iwasaki, Y., and Marunaka, Y., *Cell Biology International*. in press (2009) (査読有)
- ② Quercetin stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium., Asano, J., Niisato, N., Nakajima, K., Miyazaki, H., Yasuda, M., Iwasaki, Y., Hama, T., Dejima, K., Hisa, Y., and Marunaka, Y., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. in press (2009) (査読有)
- ③ Blockers of K^+/Cl^- transporter/channels diminish proliferation of osteoblastic cells., Maki, M., Miyazaki, H., Niisato, N., Morihara, T., Marunaka, Y., and Kubo, T., *Biomedical Research*. 30(2) 137-140 (2009) (査読有)
- ④ Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells., Miyazaki, H., Shiozaki, A., Niisato, N., Ohsawa, R., Itoi, H., Ueda, Y., Yamagishi, H., Iwasaki, Y., Nakano, T., Nakahara, T., and Marunaka, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 366(2) 506-512 (2008) (査読有)
- ⑤ 22, Epithelial Na^+ channel and ion transport in human nasal polyp and paranasal sinus mucosa., Yasuda, M., Niisato, N., Miyazaki, H., Iwasaki, Y., Hama, T., Dejima, K., Hisa, Y., and Marunaka, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362(3) 753-758 (2007) (査読有)
- ⑥ Chloride-dependent acceleration of cell cycle via modulation of Rb and cdc2 in osteoblastic cells., Maki, M., Miyazaki, H., Nakajima, K., Yamane, J., Niisato, N., Morihara, T., Kubo, T., and Marunaka, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 361(4) 1038-1043 (2007) (査読有)
- ⑦ Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth., Nakajima, K., Miyazaki, H., Niisato, N., and Marunaka, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 359(3) 604-610 (2007) (査読有)
- ⑧ An inhaled inducible nitric oxide synthase inhibitor reduces damage of Candida-induced acute lung injury., Ohsugi, S., Iwasaki, Y., Takemura, Y., Nagata, K., Harada, H., Yokomura, I., Hosogi, S., Yuba, T., Niisato, N., Miyazaki, H., Matsubara, H., Fushiki, S., and Marunaka, Y., *Biomedical Research*. 28(2) 91-99 (2007) (査読有)
- ⑨ Abnormal expression of ENaC and SGK1 mRNA induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitively hypertensive rats., Aoi, W., Niisato, N., Sawabe, Y., Miyazaki, H., Tokuda, S., Nishio, K., Yoshikawa, T., and Marunaka, Y., *Cell Biology International*. 31(10) 1288-1291 (2007) (査読有)
- ⑩ Action of neltexine on anion secretion in human airway epithelia., Niisato, N., Hasegawa, I., Tokuda, S., Taruno, A., Nakajima, K., Miyazaki, H., Iwasaki, Y., and Marunaka, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 356(4) 1050-1055 (2007) (査読有)
- ⑪ Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl^- concentration acting as an intracellular signaling., Miyazaki, H., Shiozaki, A., Niisato, N., and Marunaka, Y., *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 292(5) F1411-F1417 (2007) (査読有)
- [学会発表] (計 7 件)
- ① 調節性容積減少 (RVD) によって引き起こされる細胞内 Cl^- 濃度低下は細胞内シグナルとして機能する、宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典、第 46 回生物物理学会年回 (12月3日-5日、福岡) (2008)
- ② ヒト胃癌細胞株において細胞内 Cl^- は細胞周期制御シグナルとして作用する、宮崎裕明, 大澤るみ, 新里直美, 丸中良典、膜シンポジウム 2008 (11月14日-15日、豊中) (2008)
- ③ ヒト胃癌細胞株における細胞内 Cl^- 濃度低下によって引き起こされる G1/S 細胞周期遅延は MAPK を介して調節される、宮崎裕明, 大澤るみ, 新里直美, 丸中良典、第 3 回トランスポーター研究会 (6月7日-8日、京都) (2008)
- ④ Intracellular chloride is a key regulator of the G1/S transition in MKN28 human gastric cancer cell., Miyazaki, H., Ohsawa, R., Shiozaki, A., Niisato, N., and Marunaka, Y., *Beatson International Cancer Conference* (June 15-18, Glasgow, Scotland) (2008)
- ⑤ 調節性容積減少 (RVD) によって引き起こされる細胞内 Cl^- 濃度低下は細胞内シグナルとして機能する、宮崎裕明, 新里直美, 西尾恭介, 丸中良典第 51 回日本腎臓学会学術総会 (5月30日-6月1日、福岡) (2008)
- ⑥ ヒト胃癌細胞株において細胞内 Cl^- 濃度は G1/S 細胞周期チェックポイントを制御する、宮崎裕明, 大澤るみ, 塩崎敦, 新里直美, 丸中良典、第 85 回日本生理学会大会 (3月25日-27日、東京) (2008)

- ⑦ 骨芽細胞におけるクロライド依存的な細胞周期調節、宮崎裕明, 牧昌弘, 中島謙一, 新里直美, 丸中良典、第 100 回近畿生理学談話会 (10 月 19 日-20 日、津) (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 裕明 (MIYAZAKI HIROAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 30360027