

機関番号：37111

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790210

研究課題名 (和文) 細胞外クロライドイオンによる ENaC 活性制御機構の解明

研究課題名 (英文) Effects of extracellular chloride on regulatory mechanisms of the epithelial sodium channels

研究代表者

山田 敏樹 (YAMADA TOSHIKI)

福岡大学・学長付・助教

研究者番号：10453101

研究成果の概要 (和文)：

細胞外 Cl^- による上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の活性制御機構を明らかにすることを目的とし、アフリカツメガル腎由来の腎皮質集合管上皮モデル細胞 (A6 細胞) において細胞外 Cl^- 濃度の影響を単一チャンネル電流記録法により調べた。細胞外 Cl^- 濃度の低下は、ENaC の開持続時間を減少させ、チャンネル活性を低下させた。本研究から、細胞外 Cl^- は ENaC を介した Na^+ 再吸収制御において重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

To determine regulatory mechanisms of epithelial sodium channels by extracellular chloride, electrophysiological experiments were performed with distal nephron epithelial cells from *Xenopus laevis*, A6 cells. Lowering extracellular Cl^- concentration decreased mean open time and open probability of ENaC. These results suggest that extracellular Cl^- plays a key role in control of the ENaC-mediated Na^+ reabsorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ナトリウム輸送、ENaC、クロライドイオン、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) は、腎臓皮質集合管、大腸、肺などで Na^+ 吸収を行っている。なかでも腎皮質集合管における Na^+ の再吸収は、体内 Na^+ 量を緻密に制御し、体液量、血漿浸透圧および血圧の調節にとって重要である。皮質集合管における Na^+ 吸収は、管腔側細胞膜の ENaC を介した Na^+ 流入と、血管側細胞膜の Na^+ , K^+ -ATPase を介した能動輸送による Na^+ 排出の 2 つの過程からなる。こ

の過程は Na^+ 濃度勾配に従った ENaC による Na^+ 流入が Na^+ 吸収の律速段階となっている。従って、ENaC の制御機構を研究することは、 Na^+ 再吸収機構を明らかにする上で重要である。

ENaC は α -、 β -、 γ -サブユニットから構成され、各サブユニットは細胞内に N 端と C 端を有し、2 つの膜貫通領域とこれらを繋ぐ長いループ状の細胞外領域を有している (Canessa et al., 1994)。ENaC は抗利尿ホル

モンおよびアルドステロンといったホルモンの作用により、細胞膜上のチャネル数を緻密に制御されていることが明らかされている (Garty and Palmer 1997, Marunaka and Eaton 1991)。また、ENaCは細胞外の Na^+ 、 H^+ および Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、といった2価イオンによっても活性が調節され (Cucu et al., 2005, Garty and Palmer 1997, Yu et al., 2007)、細胞外領域には細胞外のイオン環境を感受する機構が存在することが示唆されている。本研究の開始当初、degenerin/ENaC superfamily に属する acid-sensing ion channel の結晶構造が明らかとなり、このチャネルが細胞外領域に Cl^- pocket を持ち Cl^- によって何らかの制御を受ける可能性が報告された (Jasti et al., 2007)。

我々は、短絡電流法によりアフリカツメガエル腎由来の腎皮質集合管上皮モデル細胞 (A6 細胞) において管腔側の細胞外 Cl^- 濃度の低下が抗利尿ホルモンであるバソトシン (AVT) によって促進された Na^+ 輸送を減少させることを報告しており (第85回日本生理学会大会)、ENaC活性が細胞外 Cl^- によって制御される確証を得ていた。

2. 研究の目的

短絡電流法による実験から細胞外 Cl^- 濃度がENaCの活性を制御している可能性が示唆されたことから、ENaCを介した Na^+ 再吸収の細胞外 Cl^- による制御機構を解明することを目的とし、ENaCのチャネル特性に与える細胞外 Cl^- 濃度の影響を単一チャネル記録法により調べた。

3. 研究の方法

単一チャネル記録法 (セルアタッチドパッチクランプ法) によりA6細胞のENaCチャネル特性 (コンダクタンス: イオンの通りやすさおよび開口確率: 単位時間あたりにチャネルが開いている確率) における細胞外 Cl^- 濃度の影響を調べた。A6細胞は透過性フィルター上に培養し管腔および血管側が正常な Cl^- 溶液条件でAVTを処理した後、ピペット内液 (細胞外液) の Cl^- 濃度が120 mM (Normal Cl^- 溶液) および5 mM (Low Cl^- 溶液) の条件において単一チャネル電流を記録した。

4. 研究成果

A6細胞のENaCの単一チャネル電流および開口確率への細胞外 Cl^- 濃度低下の影響をセルアタッチドパッチクランプ法により調べた。A6細胞のENaCは、図1に示すように細胞内への Na^+ の輸送を示す内向き電流が見られ、秒単位で閉状態 (点線) と開状態 (点線から下) を繰り返すというENaCの特徴的な単一チャネル電流を示した。ピペットに-20 mV から+80 mV の電圧を印加した時のENaCの

単一チャネル電流は、各電圧ともピペット内のみをLow Cl^- 溶液にした条件においてNormal Cl^- 溶液条件よりも低い値を示し、電流-電圧曲線は左へとシフトした (図1、2)。Normal Cl^- 溶液およびLow Cl^- 溶液条件におけるコンダクタンスは、それぞれ $4.6 \pm 0.1 \text{ pS}$ ($n=5$) と $4.6 \pm 0.1 \text{ pS}$ ($n=5$) と有意な差は見られなかった。

Low Cl^- 溶液条件における開口確率はセルアタッチドモード形成後から経時的に顕著

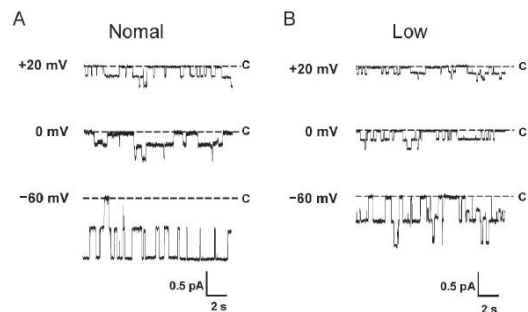


図1 ピペット内Low Cl^- 溶液のENaC電流への影響

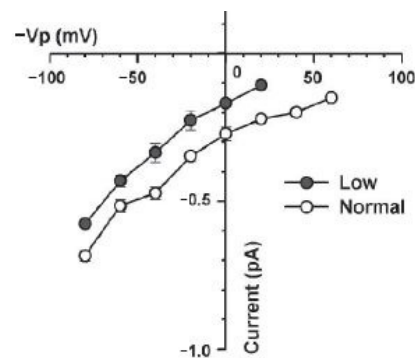


図2 Low Cl^- 溶液のENaC電流-電圧曲線への影響

に低下した。ピペットに+60 mVを印加した時のセルアタッチドモード形成3~5分後のLow Cl^- 溶液条件の開口確率はNormal Cl^- 溶液条件と比較して有意に低い値を示した (図3)。この時に測定されたパッチ膜 (ピペット内の細胞膜) に存在すると推定されるチャネルの数は、Normal Cl^- 溶液条件で 4.4 ± 0.4 ($n=9$)、Low Cl^- 溶液条件で 3.6 ± 0.6 ($n=7$) と有意な差は見られなかった。この結果は、Low Cl^- 溶液条件はチャネル数より単一チャネルの特性に影響し、開口確率を低下させていることを示唆している。

そこで、開口確率の低下の原因を明らかにするため開持続時間および閉持続時間を計算により求めた。Low Cl^- 溶液条件の開持続時間においてNormal Cl^- 溶液条件と比較し有意な低下が見られたが (図4A)、閉持続時間には差が見られなかった (図4B)。

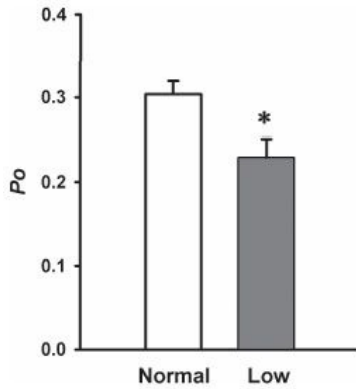


図3 ENaCの開口確率におけるLow Cl⁻溶液の影響

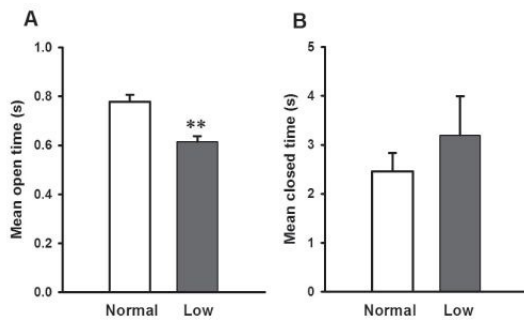


図4 ENaCの開持続時間 (A) および閉持続時間 (B) におけるLow Cl⁻溶液の影響

以上の結果をまとめると、管腔側 Cl⁻濃度低下は電流-電圧曲線の左へシフトさせることおよび開持続時間を減少させることで開口確率を低下させることが示された。管腔側 Cl⁻は ENaC の単一チャネル電流および開口確率を調節し、AVT 促進性の Na⁺輸送を制御することが示唆された。この結果は、ENaC 自身あるいはその近傍に Cl⁻を感知し ENaC 活性を制御する機構が存在することを示唆している。

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7件)

- (1) Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulate paracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010 Mar 12;393(3):390-396 [査読有]
- (2) Yamada T, Kita S, Iyoda T, Yamamoto S, Iwamoto T. The role of sodium, calcium, and magnesium transport in the renal

distal tubule. *Med. Bull. Fukuoka Univ*, 36 (4), 257-262, 2009 [査読有]

- (3) Yamamoto S, Yamada T, Iyoda T, Kita S, Iwamoto T. Role of Cl⁻ channels and transporters in cardiac cell volume homeostasis. *Med. Bull. Fukuoka Univ*, 36 (4), 243-255, 2009 [査読有]
- (4) Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 25;390(4):1315-1321.
- (5) Tokuda S, Niisato N, Nagai T, Taruno A, Nakajima K, Miyazaki H, Yamada T, Hosogi S, Ohta M, Nishio K, Iwasaki Y, Marunaka Y. Regulation of paracellular Na⁺ and Cl⁻ conductances by hydrostatic pressure. *Cell Biol Int*. 2009 Sep;33(9):949-956. [査読有]
- (6) Yamada T, Niisato N, Marunaka Y. Effect of chloride ion on epithelial sodium channels (ENaC) in AVT-stimulated renal epithelial cells. *J Physiol Sci*, 59 Suppl 1 p295, 2009 [査読有]
- (7) Yamada T, Niisato N, Marunaka Y. Effects of extracellular chloride ion on epithelial sodium channel (ENaC) in arginine vasotocin (AVT)-stimulated renal epithelial cells. *Biomed Res*, 2009 Jun;30(3):193-198. [査読有]

[学会発表] (計3件)

- (1) 山田敏樹、内山実、岩本隆宏、2種のカエル腹皮のイオン輸送におけるバソトシンの作用、トランスポーター研究会第3回九州部会、2009年11月21日、鹿児島
- (2) 山田敏樹、新里直美、丸中良典、岩本隆宏、腎上皮細胞の抗利尿ホルモン促進性 Na⁺輸送における細胞外 Cl⁻の影響、TRANSPOTSOME 平成21年度第1回班会議、2009年8月26日、熊本
- (3) Yamada T, Niisato N, Marunaka Y. Effect of chloride ion on epithelial sodium channels (ENaC) in AVT-stimulated renal epithelial cells. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009年7月29日、京都

[図書] (計1件)

- (1) Yamada T, Uchiyama M. Hormonal regulation of ion transports in frog epithelia — Measurements of ion transport in frog epithelium using electrophysiological techniques —

In: Frogs: Biology, Ecology and Uses.
Editor James L. Murray. ISBN:
978-1-61324-667-2 Nova Science
Publishers 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 敏樹 (YAMADA TOSHIKI)

福岡大学・学長付・助教

研究者番号：10453101