

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612008

研究課題名(和文)細胞膜伸展により分泌された伝達物質を介する細胞容積感受性アニオンチャネル制御機構

研究課題名(英文)Mechanisms and roles of volume-sensitive anion channel activation mediated by chemical transmitters released in response to cell membrane stretch

研究代表者

秋田 天平(Akita, Tenpei)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00522202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞膜伸展刺激により細胞から分泌された化学伝達物質の作用が誘起する細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル(VSOR)活性化機構と、それによる細胞の容積及び形態変化や移動の制御機構の解明を目的とした。研究の結果、分泌されたATPやグルタミン酸の作用により、個々のカルシウムイオン透過型チャネル蛋白質開口部近傍に形成される高カルシウムイオン濃度領域「カルシウムナノドメイン」を介してVSORが活性化されることが明らかになり、細胞の形態変化の際の1細胞上の局所的な容積制御基盤が解明された。また、胎生脳発達過程においてVSORを通じて放出されたタウリンによる神経細胞移動制御機構も明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at investigating the activation mechanism of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel mediated by chemical transmitters released from cells in response to cell membrane stretch and at elucidating its roles in cell volume regulation, cell shape changes and migration. The study revealed that autocrine actions of ATP and glutamate trigger VSOR channel activation mediated by very high intracellular calcium ion concentration regions in the immediate vicinity of individual open calcium ion-permeable channel proteins, called "calcium nanodomains". This mechanism would provide a basis for the regulation of local cell volume during cell shape changes. The study also uncovered the regulation of the speed of neuronal migration by taurine released through VSOR channels in the developing brain in embryos.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：細胞容積感受性アニオンチャネル 細胞膜伸展 ATP グルタミン酸 タウリン カルシウムナノドメイン 細胞容積調節 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

生体内各組織の細胞は、生理的又は病的要因による細胞外浸透圧や伸展張力の変動に常に晒されうるが、細胞容積調節機構はそのような場面で各細胞が、その大きさや形態を適切に維持ないし変化させる際に働く機構であり、全ての細胞に備わるものである。細胞容積の調節は細胞膜を横切る正味のイオンと水の移動を制御することにより達成されるが、そのうち陰イオン(アニオン)の移動を制御する最も強力なものが、細胞容積感受性外向整流性アニオンチャンネル(VSOR)である。VSOR はほぼ全ての種類の細胞に発現しており、典型的には容積増大を感知して活性化され、主に Cl^- イオンの細胞外への流出を促して容積を元に戻す方向に働く。しかし、VSOR は容積増大がなくとも細胞膜上の種々の受容体刺激を通じて活性化される場合があり、その際には細胞容積の縮小が誘導されうる。この VSOR を介する細胞容積調節機構は、細胞分裂・移動・分化・アポトーシス等、細胞の形態変化を伴うあらゆる細胞機能発現の際に、多種多様な蛋白質群が正常に機能するために必要な駆動力を提供するものと考えられている。また、VSOR はグルタミン酸等のアミノ酸を有意に透過し、その透過したアミノ酸を介して細胞間シグナル伝達にも寄与する。

一方、細胞膜に伸展刺激が加わると、その細胞から ATP やグルタミン酸等、各種化学伝達物質が放出されることが様々な細胞種でよく知られている。また、それらの伝達物質が結合する受容体のうち、VSOR 活性化を誘起しうる Gq 型 G 蛋白質共役型受容体は多くの細胞種で豊富に発現していることも周知の事実である。しかし、膜伸展刺激により細胞から放出された伝達物質が、どの程度その細胞自身の VSOR 活性化に寄与し、それがその細胞や隣接細胞の容積調節、ひいては形態変化や移動をどの程度制御しうるのか、またそれは1細胞上の局所的な形態変化を制御しうるものなのか、その刺激強度や刺激領域依存性等については明確にされていなかった。また、細胞群全体に伸展刺激が加わることで誘導される群全体の形態や配列の変化に、その放出された伝達物質の作用による VSOR 活性化がどの程度関わっているのか、さらには、細胞群中の一部の細胞にのみ伸展刺激が加わった際に、隣接細胞への伝達物質の作用が更なる伝達物質放出を促すことを通じて、細胞群の広範囲(~ 100 μm)に及ぶ細胞間 Ca^{2+} シグナル伝播(Ca^{2+} wave)が誘起されうることもよく知られているが、それに伴って容積制御や形態変化がどの程度伝播しうるのか等についても、明確にされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞膜伸展刺激が加わった際に細胞から分泌される化学伝達物質の作用により誘起される VSOR 活性化機構と、その機構

による細胞容積及び形態の制御、そして細胞群全体への容積制御の波及効果について検討し、種々の物理的ストレスが細胞(群)に加わった際の適応機構を理解するのみならず、細胞の形態変化や移動の基本制御原理の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

初年度と次年度は、主にマウス大脳皮質由来培養アストログリア細胞を用いて、低浸透圧溶液暴露により細胞膜伸展刺激を加えた際に放出され且つその細胞自身に作用しうる伝達物質の種類を同定し、その作用による VSOR 活性化の有無と細胞内 Ca^{2+} シグナルとの相互連関、そしてその活性化により誘起された細胞容積変化の解析を、電気生理学及び分子生物学的手法、細胞粒度分布計測、免疫細胞化学染色、そしてライブセルイメージング手法を用いて行った。

最終年度は、VSOR 活性化の細胞群全体への波及効果について検討するため、マウス胎生期(胎生 14 - 17 日目)の脳の発達過程に注目し、大脳皮質の層構造発達に伴う神経細胞の脳室帯からの放射状移動及び大脳基底核原基から大脳皮質に向かう接線方向移動にあたっての神経細胞での VSOR 活性化の有無について、子宮内電気穿孔法による移動細胞の蛍光蛋白標識と、無酵素処理による急性単離及び脳スライス切片内双方の神経細胞に対する電気生理学的計測を行うことにより検討した。さらに、VSOR 活性化に伴う伝達物質放出の有無を調べるため、免疫組織化学染色と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、細胞外に放出された化学物質の検出とその作用する受容体の同定を行った。なお、これらの検討にあたり、神経伝達物質の1つである GABA の合成酵素 GAD67 の遺伝子が緑色蛍光蛋白 GFP の遺伝子に置き換わった遺伝子改変ノックインマウス(GAD67-GFP マウス)の胎生脳でも同様に比較検討し、GABA 枯渇の細胞移動への影響も調べた。

4. 研究成果

(1) 「 Ca^{2+} ナノドメイン」を介する VSOR 活性化機構の発見：本研究期間の前年度までの研究(若手研究(B)、研究課題番号: 21790216)で、炎症化学伝達物質ブラジキニンのアストログリア細胞への作用により、細胞内 Ca^{2+} ストア上の IP_3 受容体 Ca^{2+} チャンネル及び細胞膜上の TRPC1 チャンネル双方の分子開口部近傍数十 nm 以内に形成される高 Ca^{2+} 濃度領域「 Ca^{2+} ナノドメイン」を通じて VSOR が活性化されることを発見し(図1) その成果を本研究期間の初年度に論文(〔雑誌論文〕)及び招待講演含む学会(〔学会発表〕)にて発表することができた。この新たに発見した VSOR 活性化機構は、例えごく少量の伝達物質が細胞の一部に作用した場合でも、その作用部位近傍に存在する VSOR を選択的且つ確実に活性化することを保障するものであり、

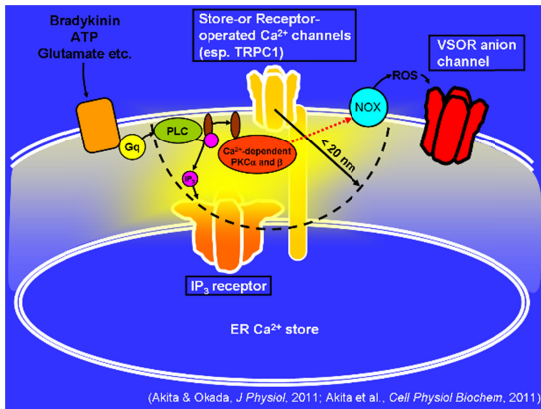


図1 「Ca²⁺ナノドメイン」を介する VSOR 活性化機構の模式図

それが例えば1細胞上の微小突起毎に、容積調節や他細胞へのシグナル伝達を局所的に制御するための基盤となっていることを示唆している。そこで、続いては細胞膜伸展刺激を加えた際に細胞から放出される伝達物質の作用により誘起される VSOR 活性化の有無とその機序についての検討を行った。その結果、アストログリア細胞では低浸透圧刺激により誘起される細胞内 Ca²⁺シグナリングが、その刺激により放出された ATP の細胞自身への作用にほぼ完全に依存していること、またそのシグナリングを担う各種 Ca²⁺透過型イオンチャンネル開口部近傍の Ca²⁺ナノドメインを介して VSOR が活性化されることが明らかになった(図2)。但し、この機序による VSOR 活性化は低浸透圧刺激により誘起された VSOR 活性化全体の3-4割程度であり、残りの6-7割は何らかの別の機序によることが示唆された。しかし、そのATPの作用自体は、VSOR のみならず或る種の K⁺チャンネルを同時に活性化することにより、低浸透圧環境下での細胞容積調節には必要不可欠なものであることが判明した(図2)。このATPの作用によるCa²⁺ナノドメインを介するVSOR活性化、即ち細胞容積調節機構は、細胞膜伸展時の1細胞上の局所的な容積調節をもたらす基盤機序と考えられ、このことは細胞の形態変化や移動の際に1細胞の部分毎に独立した容積変化を誘導する上で必要不可欠である。従って、本研究結果により、細胞の普遍的な基本性質である形態変化・移動の基本制御原理の一端が解明されたということが出来る。本研究結果は初年度内に論文発表(〔雑誌論文〕)及び学会(〔学会発表〕)にて報告した。

また、ATP 以外に膜伸展刺激によりアストログリア細胞から放出されることが知られるグルタミン酸が、ATP と同様な効果を持つか否かについても検討を行ったところ、グルタミン酸も ATP と全く同様に、Ca²⁺透過型イオンチャンネル開口部近傍に形成される Ca²⁺ナノドメインを介して VSOR を活性化することが判明した(図1)。しかし、低浸透圧溶液暴露による膜伸展刺激で放出されたグルタミン酸のアストログリアへの作用は弱く、

同刺激により誘起される細胞内 Ca²⁺シグナリングにはあまり寄与しないことも明らかになった。低浸透圧刺激によるグルタミン酸の放出量は ATP よりもむしろ多いことが知られているが、恐らくアストログリアに発現するグルタミン酸受容体の感受性が比較的低いことから、我々が用いた培養標本では細胞表面上に十分なグルタミン酸濃度が蓄積されなかったことが考えられる。従って、今後は組織標本内のアストログリアで再検討する必要があるだろう。本研究成果は学会(〔学会発表〕)にて報告し、現在論文投稿中である。

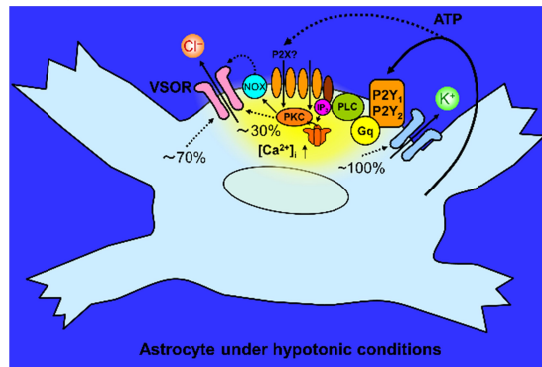


図2 低浸透圧環境下でのアストログリア VSOR 及び K⁺チャンネル活性化機構の模式図

さらに、Ca²⁺ナノドメインを介する VSOR 活性化の中間シグナルである活性酸素種 (ROS) が、低浸透圧暴露による細胞膜伸展刺激でどの程度活性化されるかを、ROS 産生酵素阻害剤を用いて調べたところ、Ca²⁺ナノドメインを介して産生される ROS とは別に、Ca²⁺非依存的に産生される ROS も、VSOR 活性化全体の2割程度を担っていることが明らかになった。本研究結果についても現在論文投稿中である。

(2) 胎生期大脳皮質発達過程における VSOR を介して放出されたタウリンによる神経細胞移動制御機構の発見：最終年度はマウス胎生期脳内での神経細胞の増殖や形態変化及び移動の過程における VSOR 活性化機構とその意義についての検討を行った。胎生脳神経細胞での VSOR 活性化の報告は皆無であったことから、まず胎生脳大脳基底核原基内の神経細胞を急性単離した標本を用いて、低浸透圧環境への暴露により胎生脳神経細胞においても確かに VSOR が活性化されることを確認した。続いて大脳皮質の層構造発達に伴う神経細胞の脳室帯からの放射状移動における VSOR 活性化の有無とその意義について検討したところ、移動中に活性化される VSOR を通じて常時タウリンが細胞外に放出されていることが判明した。タウリンが作用する受容体の一つに GABA_A 受容体があり、胎生脳の発達過程における GABA_A 受容体の豊富な発現とその活性化の重要性がこれまでに示唆されていた。我々が胎生脳での GABA 合成がほぼ消失している GAD67-GFP マウスでの放

放射状移動の様子を調べたところ、通常マウスの場合に比して有意に異なる点は認められなかったが、その放射状移動の過程で GABA_A 受容体の阻害剤を作用させると、通常マウスの場合と同様に移動の加速が認められ、GAD67-GFP マウスにおいても GABA_A 受容体が活性化されていることが示唆された。そこで、母体内のタウリン合成を阻害することで胎仔へのタウリン供給を阻止したところ、GAD67-GFP マウス及び通常マウスの双方で、GABA_A 受容体阻害時と同様な放射状移動の加速が認められた(図3)。以上の結果から、胎生脳の発達過程において GABA_A 受容体に作用しているのは実は GABA ではなく、VSOR を通じて放出されたタウリンであり、そのことが移動の過度の進展を制御して大脳皮質の適切な発達を促すために必須なものであることが明らかになった。この発見は、これまでの常識を大きく覆す新発見となった。これらの研究成果は最終年度に論文発表(〔雑誌論文〕)及び招待講演含む学会(〔学会発表〕)にて報告した。今後は、その放射状移動中の神経細胞の VSOR 活性化が、どのような細胞間相互作用や膜伸展刺激により誘起されているかについて、継続して検討を進める必要がある。

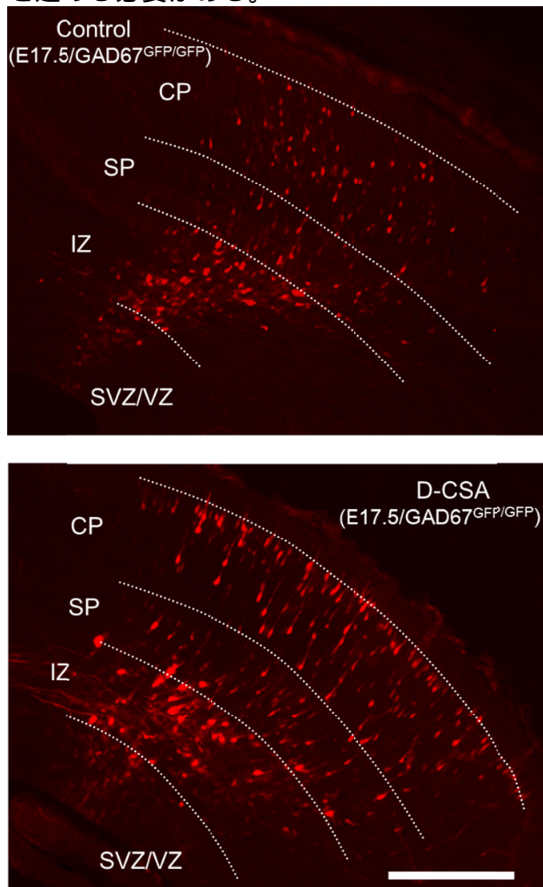


図3 GAD67-GFP マウスにおけるタウリン合成阻害による胎生期(胎生 17.5 日目)大脳皮質神経細胞放射状移動の加速効果。上は通常条件下、下はタウリン合成阻害条件下(〔雑誌論文〕より)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- Furukawa T, Yamada J, Akita T, Matsushima Y, Yanagawa Y, Fukuda A. Roles of taurine-mediated tonic GABA_A receptor activation in radial migration of neurons in the fetal mouse cerebral cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:88, 2014. DOI:10.3389/fncel.2014.00088【査読有】
- Akita T, Fedorovich SV, Okada Y. Ca²⁺ nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28:1181-1190, 2011. DOI:10.1159/000335867【査読有】
- Akita T, Okada Y. Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca²⁺ nanodomains in mouse astrocytes. *The Journal of Physiology* 589(16):3909-27, 2011. DOI:10.1113/jphysiol.2011.208173【査読有】

〔学会発表〕(計12件)

- Akita T, et al. Exploring the role of anion channels in cell volume regulation and intercellular communications in the developing brain. 第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島大学
- Akita T. Exploring the role of local control of cell volume regulation mediated by volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels. The 13th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium, 2013年9月11日、慶北大学医学部(大邱市、韓国)
- Akita T, et al. Volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels in the developing brain. The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences, 2013年9月6日、アクトシティ浜松コンgresセンター
- Akita T. Volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in the developing brain. *Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets and Pharmacological Approaches*, 2013年8月28日、M.V. Lomonosov Moscow State University (Russia)【招待講演】
- Akita T, et al. Autocrine actions of ATP and glutamate activate volume-sensitive outwardly rectifying

(VSOR) anion channels via Ca^{2+} nanodomains in mouse astrocytes. **Purine 2012**, 2012年5月31日、九州大学医学部

Akita T, et al. Ca^{2+} nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel activity in mouse astrocytes. **第89回日本生理学会大会**、2012年3月29日、長野県松本文化会館

秋田 天平 他、アストログリアにおける自己放出されたATPによる細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル(VSOR)の Ca^{2+} 依存的な活性化、**第58回中部日本生理学会**、2011年11月2日、福井県県民ホール

Akita T, et al. Ca^{2+} -mediated augmentation of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel activity triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. **The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS)**, 2011年9月13日、台大醫院國際會議中心(台湾)

Akita T. Ca^{2+} nanodomain-mediated regulation of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channels in mouse astrocytes. **Cell Volume Regulation Meeting 2011: Hydration & Cell Volume Regulation**, 2011年9月4日、Eberhard Karls Universität Tübingen (Germany) 【招待講演】

〔図書〕(計3件)

秋田 天平、熊田 竜郎、福田 敦夫、**脳科学辞典 「塩素チャネル」**、脳科学辞典編集委員会、2013年
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/塩素チャネル>

Akita T, Ohara M, Okada Y. Patch-clamp techniques: general remarks. *In* Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols, ed. Okada Y, pp 21-41, Springer Protocols Handbooks, Springer, 2012.

DOI:10.1007/978-4-431-53993-3

秋田 天平、岡田 泰伸 他、最新パッチクランプ実験技術法(岡田泰伸編)「2章 パッチクランプ法総論」、19-32頁、吉岡書店、2011年

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋田 天平 (AKITA, Tenpei)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00522202

(2)連携研究者

岡田 泰伸 (OKADA, Yasunobu)
生理学研究所・所長
研究者番号：10025661

福田 敦夫 (FUKUDA, Atsuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50254272
(平成25年度より連携研究者)