

「生体防御のメカニズム」

平成9年度採択研究代表者

岡田 泰伸

(岡崎国立共同研究機構生理学研究所 教授)

「細胞容積調節の分子メカニズムとその破綻防御」

1. 研究実施の概要

本研究は、浸透圧性膨張直後の容積調節 (Regulatory Volume Decrease: RVD) の分子メカニズムを解明し、病的条件下におけるその破綻による細胞死のメカニズムを解明し、それを防御するための分子戦略を確立することを目的としている。そのために、RVD に関与するチャネル、トランスポータ、レセプター分子を同定し、その活性化メカニズムを明らかにすること、更には、虚血性細胞死及びプログラム細胞死と RVD 異常の関係を明らかにすることに取組んでいる。

2. 研究実施内容

すべての動物細胞の容積は固有の正常値に調節されており、たとえ異常浸透圧環境下において収縮・膨張が強いられたとしても、その後速やかに正常容積へと復帰する能力を持っている。ところが虚血などの病的条件下ではそのメカニズムが破綻をきたし、細胞膨張の持続から細胞死へと至る。本研究は、脳細胞、心筋細胞、上皮細胞における RVD メカニズムを分子レベルで解明し、心筋細胞、脳神経・グリア細胞及び上皮細胞の病的条件下における RVD 破綻の分子機構を解明し、それを防御するための分子論的戦略を確立するために行われている。

① RVD メカニズムの生理学的解明

二光子レーザー蛍光顕微鏡を用いた三次元的細胞容積計測法を確立することに成功した。これを用いることによって神経のように複雑で不規則な形態の細胞の容積を定量的・経時的に測定することが可能となった。心筋細胞においては、細胞容積測定に加えて筋節長の計測システムを開発し、細胞容積変化時における心筋収縮能変化の定量化を可能とした。ヒト上皮細胞の RVD 過程における水チャネルの関与を、すべてのクライテリアを満たす形で証明した。前年度に細胞膨張時における ATP 放出とそれによる RVD の促進を明らかにした。この放出 ATP の細胞外表面濃度の測定を、我々が開発したバイオ分子センサーを用いて行ったところ、ATP レセプターを刺激するに十分な濃度に上昇することが明らかとなった。

② RVD 機能蛋白の分子論的同定

RVD は細胞からの KCl 流出と、それに駆動された水流出によって達成される。多くの細胞でこの KCl 流出は Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルと容積感受性 Cl^- チャンネル (VSCC) の開口によってもたらされる。この K^+ チャンネル活性化のための Ca^{2+} 動員は、膜伸展感受性メカノセンサーカチオンチャンネル (SA チャンネル) の開口と、細胞内 Ca ストアからの放出によってもたらされる。以上がこれまで私達が明らかにしてきた RVD の分子メカニズムであるが、これに関与する VSCC、SA チャンネル、ATP 放出路の分子実体は未だ不明である。VSCC については ClC3 説が提出されたが、私達はこれに対して同定基準を提出して、その同定は充分でないことを指摘した。ATP 放出路については VSCC や CFTR を介して行われるという説が提出されているが、私達は開発したモノクローナル抗体や特異的阻害剤を使用して、その両者ともそれに該当するものではないことを明らかにした。VSCC、SA チャンネル、ATP 放出路の分子同定に向けて引き続き独自の取り組みを行っている。

③ 虚血性細胞死・プログラム細胞死における RVD 異常

VSCC 活性には細胞内での ATP 結合が不可欠である。虚血条件下での ATP 欠乏は、Na ポンプ活性の低下による細胞膨張をもたらすが、それに対抗する RVD 機能までもが抑制されることになるので、持続性膨張からネクローゼ細胞死をもたらされることになる。事実、ミトコンドリア毒素による脳線条体傷害には、アストロサイトの著しい膨張とネクローゼ死が伴われていることを明らかにした。

一方、アポトーシス過程には持続性細胞収縮が伴われることが知られている。アポトーシスと細胞収縮後の容積調節 (Regulatory Volume Increase: RVI) との関係についてはアメリカにおいて調べられはじめているが、RVD 能との関係についてはこれまで知られていない。そこで私達は、アポトーシスを誘導した神経系、上皮系及びリンパ系細胞において RVI のみならず RVD を観察し、興味深い知見を得はじめている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- R.Z. Sabirov, S. Morishima & Y. Okada. (1998) Probing the water permeability of ROMK1 and amphoteric in B channels using *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 19-26
- T. Nakamura, S. Arii, K. Monden, M. Furutani, Y. Takeda, M. Imamura, M. Tominaga & Y. Okada. (1998) Expression of the Na/Ca exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5389-5394
- Y. Liu, S. Oiki, T. Tsumura, T. Shimizu & Y. Okada. (1998) Glibenclamide

- blocks volume-sensitive Cl⁻ channels by dual mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C343-C351
- Y. Okada, S. Oiki, A. Hazama & S. Morishima. (1998) Criteria for the molecular identification of the volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *J. Gen. Physiol.* 112, 1-3
 - T. Higuchi, S. Suga, T. Tsuchiya, H. Hisada, S. Morishima, Y. Okada & M. Maeshima. (1998) Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isomers of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol.* 39, 905-913
 - T. Tsumura, A. Hazama, T. Miyoshi, S. Ueda & Y. Okada. (1998) Activation of cAMP-dependent Cl⁻ currents in guinea-pig Paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. *J. Physiol. (London)* 512, 765-777
 - A. Hazama, S. Hayashi & Y. Okada. (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic b cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 437, 31-35
 - S.-S. Zhou, A. Hazama & Y. Okada (1998) Tyrosine kinase-independent extracellular action of genistein on the CFTR Cl⁻ channel in guinea pig ventricular myocytes and CFTR-transfected mouse fibroblasts. *Jpn. J. Physiol.* 48, 389-396
 - Y. Okada. (ed.) (1998) "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" Elsevier, Amsterdam
 - Y. Okada, M. Tominaga, T. Tominaga, A. Hazama, T. Tsumura, S. Morishima, S. Oiki, K. Ueda, T. Miyoshi & A. Miwa. (1998) Volume sensor anion channel. In, "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Y. Okada) pp 15 - 22, Elsevier, Amsterdam
 - A. Hazama, A. Miwa, T. Miyoshi, T. Shimizu & Y. Okada. (1998) ATP release from swollen or CFTR-expressing epithelial cells. In, "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Y. Okada) pp 93 - 98, Elsevier, Amsterdam
 - S. Oiki, M. Kubo & Y. Okada. (1998) Electrophysiological properties of volume-regulated Cl⁻ channels in intestinal epithelial cells. In, "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Y. Okada) pp 125-129, Elsevier, Amsterdam
 - S. Morishima, H. Kida, S. Ueda, T. Chiba & Y. Okada. (1998) Water movement during cell volume regulation. In, "Cell Volume Regulation: The Molecular

- Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Y. Okada) pp 209 - 212, Elsevier, Amsterdam
- Y. Okada. (1998) Cell volume-sensitive chloride channel. In, "Cell Volume Regulation" (ed. F. Lang)(Contrib. Nephrol. vol. 123) pp 21-33, Karger, Basel
 - 岡田泰伸、小島 至 (1998) チャネルとトランスポータの構造と疾患. *Molecular Medicine* 35, 4-17
 - 岡田泰伸 (1998) チャネル／トランスポータの構造・機能と疾病. *内分泌学の進歩* 16, 33-35
 - 森島 繁、岡田泰伸 (1998) イオンチャネルの構造と機能. *M e b i o* 15, 12-24
 - 岡田泰伸 (1998) Cl チャネルと細胞容積調節および細胞死. *M e b i o* 15, 61-68
 - 岡田泰伸 (1998) Cl-チャネルの機能・構造と疾患. *神経研究の進歩* 42, 263-278
その他 24 件