

## バックグラウンドからフォアフロントへ： 細胞生死と生体恒常性に関わるセンサーチャネル（前編）

生理学研究所 岡田 泰伸

2013年3月に生理学研究所の所長任期が切れて退職し、1974年4月に京都大学助手となつてからの丸39年間の公職生活を離れることになった。といっても、もちろんサイエンティストであることを止めたわけではない。実は、1970年に京都大学医学部卒業後の4年間も、大学院に入るわけでもなく、もちろん研究職につけるはずもなく、(パートタイム医師として家族(しかもその間に2人も増えた)の生活費と研究費を工面しながら)研究を続けていたわけであるので、今は昔に戻つたようなものであると言える。所長職にあった6年間は、当然のことながら研究に集中できる環境にはなかつたわけであり、今はそれによる遅れをとりもどしたいとの思いが強い。研究者人生にも「起承転結」があつた方がよいとすれば、「転」から「結」に未だ完全には持ち込めていないと思つているからである。その今、これまでの研究を振り返つての一文をとのご依頼に応えるには時期尚早といささか抵抗感があつたが、「起承転」から持ち込みたい「結」を述べる形で、むしろ私なりのサイエンスへの「思い」を伝えることにしたい。

### 序章：生物物理学的雰囲気から生理学の門へ

京大医学部の学生時代、教養課程から医学部専門課程に上がつて最初に聴いた講義に愕然とした。人体を構成するすべての組織や部位の名前をラテン語で覚えることや、現象を何の関連性もなくただ羅列するといった、いわば「枚挙の学問」としかそれは映らなかつたからである。一方、当時の生命科学で若者の心を捉えた「新しい波」は、台頭しはじめた生物物理学であつた。その雰囲気

は、当時知遇を得た京大・医・生理の大学院生で大先輩の神野耕太郎さん(後の東京医科歯科大教授)から大いに伝わり、これに触発された私は、人体で起こっているすべての現象やその異常による症状は、量子生物学的な解析によって、すべてが関連を持つ形で理路整然と解明されるに違いないと考えた。まずそのためには、最新の物理学を学ぶべきであると考え、とりあえず専門課程一回生(大学3年生)を終えた後に休学して、一年間京大理学部物理学科で聴講して勉学することにした。そして再び医学部(の下の学年のクラス)に戻つた後に、医学部をやめて物理学科への転籍をすべきかどうか悩み、当時学生に近いとされた3名の教授に相談に行った。その内のお2人は、あたりさわりもない応待と、軽くあしらわれるような応待をされ、大いなる失望が与えられた。しかし、生理学教室の教授であつた井上章先生は真剣に対応して下さり、「とにかく医学部を卒業して、医師免許を取るだけは取っておきなさい。そのあとは岡田君の好きなようにすればよい」と明確に述べられ、しかも続けて「岡田君は今はこの私の意見を無論理だと批判するかもしれないが、後になってきつと判つてもらえると思う。もし判つてもらえなかつたら、その時に恨んでくれたらよい」とまでおっしゃつた。納得した訳ではなかつたが、「無論理」に対抗できる論理があつたわけでもないので医学部に残ることにした。(悔しいことにこのアドバイスは私にとって2重の意味で正しいものであつたことが後に判ることになる。)[教訓その1：年の功の「無論理」は、若者の直線的論理に、勝利せずとも凌駕する。]

その後、私の興味はやはり脳に移り、しかも意志や情動や記憶のメカニズムを解明したいと漠然と感じるようになり、量子生物学的あるいは生物物理学的なアプローチの前にまず脳研究の現場に触れる必要があると思った。学部学生時代には生理学教室のもう一人の教授であった荒木辰之助先生の所で脊髄神経標本を用いての実験をさせていただき、卒業直後は薬理学教室の中井義尚助手の所で猫の視覚路の実験に加わらせていただくなどした。当時私達は、矛盾の多かった医学部大学院制度の抜本的改善を求めて、とりあえず大学院入学ポイコットのクラス決議をしていたこともあり、ましてや私はその先頭に立っていたこともあり、大学院に入らない形での研究の場を求めていくつかの脳研究室を当たったが、どこからも受け入れていただくことはできなかった。そこで困り果てて、再び井上章先生に相談したところ、「記憶ならリンパ球にもあるよ」と、細胞レベルからのアプローチの可能性の示唆をいただき（騙されて?）、受け入れていただくことになった。そこで、その当時リンパ球に微小電極を刺入して膜電位を測定するという挑戦的な研究をされていた（当時は県立であった）三重大学医学部の病理学教授の伊豆津公作先生の所で技術習得をさせていただくことになり、私より1年先に井上研に入っておられた（後に高知医大や理研で活躍された）小川正晴君と毎週後半、津市の友人宅（高校時代の同級生の小西眞行医師のアパート）に転がり込んで三重大・病理で実験を行った。それは1970年の春から初夏にかけての数ヶ月ではあったが、週の前半は京都、後半は三重、週末は奈良の病院へ、車で大阪の自宅から、4県を股に掛けて走りまわるといふめまぐるしい生活を送った。直径数ミクロンのリンパ球に微小電極（先端直径約0.5 $\mu\text{m}$ ）を刺入することは、先端がいくら細いとはいえ大変なことであった。リンパ球の膜電位は浅いので、微小電極自身の先端電位（tip potential）は極小にする必要があり、先端を細くすれば先端電位が大きくなり、先端を太くすれば細胞への傷害やリーク（喩えれば、人体に電信柱ほどの電極を突き刺すようなもの）が大きくなるという矛盾のせいである。

そこで、とりあえずもう少しサイズの大きな（とはいえ直径は10数ミクロンだが、接着して厚さは数ミクロンしかない）ヒト培養上皮細胞HeLaを用いて練習実験を行い、その膜電位測定から $\text{K}^+$ 透過性を調べて発表し、それが処女論文となった [1]。

パッチ・クランプ法以前の単一細胞レベルでの電気生理学的研究は、微小電極の刺入に依らざるを得ず、小細胞相手で、しかも活動電位のような膜電位の変化ではなく、膜電位の絶対値の測定が必要な場合には、先に述べた先端電位による影響が問題となる。できるだけ細くて、かつ先端電位（3mV以下）の小さい電極を得なければならない。そこで、この先端電位の発生メカニズムを調べ、それを極小にする方法を原理から探ることを京大での最初の仕事とした。

しばらくは来る日も来る日もガラス管を引いて微小電極を作成しては先端電位を種々の条件下で測定する生活を送り、その原因は先端付近のガラス壁の固定陰電荷が、ガラスの水和によって発生・増加することにあることを証明し、このガラスがpH電極ガラスの微小pH電極の場合も解析して、3編の論文にまとめた[2-4]。これによって先端電位を極小にするプラクティカルな方法を得ることができたばかりでなく、この過程で、物理学の枠を越えた物理化学と電気化学を徹底的に独習する機会が持てた。そして、膜電位や膜電流に対する教科書的なゴールドマン・ホジキン・カッツの式（GHK式）が、イオン流束に関する一般的な微分方程式の、膜内電位勾配一定（定電場）という特殊な積分条件下での特殊解にすぎないことを学び、その一般解やより妥当な条件下での特殊解を求めての苦しく満たされない日々を送った結果、一定の納得できる所には辿り着くことができた（この成果の要旨は後の総説論文[5]のAppendixとしてまとめはしたが、その詳説は将来の仕事として、未だ心の中に取り残されている）。

振り返って見れば、それまでのいわば行き当たりばったりの行動は、その後の本格的な研究のための準備となっていた。[教訓その2：青春の彷徨は、飛躍へのジャンプ台を形成しうる。]

## 1. 非興奮性細胞の電気生理学的研究

さて、ぼちぼち培養細胞を一つ一つ直視下で微小電極を刺入するという三重大での仕事の続きを始めたと思ったが、そのためには、倒立顕微鏡とライツのマイクロマニプレータが必要であった。しかし、当時私の手元にあるのはオッシロスコープとプレアンプと実体顕微鏡と、それに上部の回転ドラムをくるくると回すことによって（ドラムを持つ指の動きが直接に電極先端に伝わって機械的振動をもたらさないよう細心の注意をしながら）電極をマイクロオーダーで降下させていく（というかそのような一次元微動しかできない）キャンベラ式のマイクロマニプレータだけであり、これらのみで成し得る実験、しかも上記の経緯で興味を持ちはじめた膜の輸送現象に関する実験は何かを考えた。

当時行われていた輸送現象の生理学的研究で、電位変化を伴う点で私の興味を引いたものは、海外では Stanley Schultz 教授、国内では星猛教授らが中心的に研究されていた小腸の糖やアミノ酸の吸収時に発生する sugar/amino acid-evoked potential と呼ばれる経上皮輸送電位であった。私はこの時に小腸吸収細胞の細胞内電位がどのように変化して、それがどのように経上皮輸送電位の形成に関与するのかを見たいと考えた。ラットの十二指腸、空腸、回腸を切り出して水平に拡げ、これを Ussing チェンバーに挟んで、酸素をバブリングしたリンゲル液に浸して 37°C に保ち、両側に電極を置いて経上皮電位を測定しつつ、上から微小電極をブラインド刺入した。平滑筋の自動収縮運動によって安定的刺入が阻まれて苦労したが、ある時ミスで組織の下に入った（チェンバーの下窓の大きさに丁度よくフィットする）酸素の気泡が、浮力でその運動を止めることが判り、その測定に世界で初めて成功することができた。その結果、小腸上皮を経細胞経路と傍細胞（シャント）経路の2つに分けて電氣的等価回路を書くときに、経細胞経路を更に小腸上皮細胞の管腔側膜と基底（・側壁）側膜の2つに分けて解析することができて、組織レベルにおける糖・アミノ酸輸送電位の成因（前者における Na<sup>+</sup>流入による脱分極と後者

の起電性 Na ポンプ刺激による過分極）を細胞膜レベルで解析できると共に、傍細胞経路のみのイオン透過性を定量的にも求めることもできることを示し、これらの成果を6報の論文にまとめて報告した[6-11]。なお、本研究は、途中から興味を持って（あるいは教授命令で？）参加して下さった入交昭彦先生（当時助手で後の高知医大教授）の大いなるサポートを得て進められた。この時は、卒業したてのわけのわからない者が一人で何かやっていて、しかも高価な（当時、高級自動車一台分相当の）ライツ社製マイクロマニプレータを買ってくれとわめいているとしてしか教授にはおそらく映っていなかったと思われる。そのような私の状況を一変させたのは、教授への入交先生による進行状況（監視結果？）の報告のおかげであるものと今では推察している。即ち、とうとう位相差倒立顕微鏡とライツ・マイクロマニプレータを買い与えていただけたのである。[教訓その3：他者との協働は、共同研究以上の成果をもたらす。]

こうして可能となった培養細胞の仕事を始めるために、お向かいの建物の放射線基礎医学教室の土井田幸郎先生（当時助手で後の滋賀医大教授）からマウス線維芽L細胞をいただくと共に、（当時クリーンベンチはまだないので、UV照射による無菌箱を用いた）細胞培養技術を教えていただいた。このL細胞に微小電極を刺入して膜電位を測定したところ、驚いたことに浅い静止電位（-15~-20mV）から深いピーク過分極レベル（-60~-80mV）へと数サイクルで周期的に振動していた。そのような現象は聞いたこともなく、測定装置の誤作動に違いないと色々チェックしたがそうではなかった。そこで、電極の刺入によるリークなどのアーティファクトを次に疑ったが、X線照射やポリエチレングリコール処理によって細胞融合させて得た巨大L細胞においても全く同様であり、その可能性も排除された。種々の検討を経て、膜電位振動現象を世界で初めて報告した[12]。かねてより、私の処女論文を読まれたモントリオール大学の Guy Roy（フランス語でギ・ロワ）教授から、単一培養細胞の電気生理技術を学

ぶためにサバティカル研究を（当時まだ助手でもなかった）私のもとで行いたいとの便りが届いていたが、やっと来ていただく条件が整い、お呼びした。（後に、そのお返しとしてモントリオール大学に留学するように呼んでくれて、私はそこで培養細胞の電気生理実験の装置を立ち上げると共に、人工脂質実験法を学んだ。）彼との京大での約半年の共同研究によって、膜電位振動が周期的な $K^+$ コンダクタンスの上昇によること、しかもそれには細胞内 $Ca^{2+}$ が関与していることを明らかにした [13-16]。そこで、細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度を測定すべきであると考え、 $Ca^{2+}$ 選択性微小電極法を適用したところ、実際に周期的 $K^+$ コンダクタンス増と一致して、周期的な細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を示すことを確認することができた [17, 18]。この仕事には、内科から来てくれた上田俊二医師（現富田病院長）と麻酔科からの老木成稔医師（現福井医大教授）の多大な苦勞を伴う貢献があった。なお、この細胞内 $Ca^{2+}$ オッシレーションの報告は、fura-2 開発後の 1990 年代の $Ca^{2+}$ オッシレーション研究の一大ブームにはるかに先駆けた、世界最初のものとも期せずしてなったのである。但し、早すぎたせいか、私達がこの研究を継続しなかったせいか、無視されがちなのは遺憾である。[教訓その 4：早すぎた一過性蜂起は殲滅され、歴史の肥やしとなる。]

こうして、それまでの生理的研究における、神経・筋などの興奮性に関する華々しい展開に対して、研究対象としても無視又は回避されがちであった「非興奮性」細胞も、過分極性ではあるが自動的興奮性を立派に示すことを明らかにすることにもなった。そして、この過分極性興奮や細胞内 $Ca^{2+}$ 振動は、食作用や飲作用や細胞移動などのすべての細胞が持つ一般的生理機能に重要な役割を果たすことを明らかにした [19-23]。この一連の仕事には、私のもとで最初の大学院生となった土屋和興君（残念ながら早世）が大きな貢献をしてくれた。私の所にその後大学院生として来てくれた矢田俊彦君（現自治医大教授）とは小腸上皮由来培養細胞株における細胞内 $Ca^{2+}$ 振動や小腸分泌刺激に対する膜応答について、そして大

野一少作隆子君（現金沢大学教授）とは電氣的細胞融合のメカニズム、特にその $Ca^{2+}$ 依存性についての研究を行って多数の論文を発表した。そして、上田俊二君や富山医大の竹口紀見教授や酒井秀紀大学院生（現富山大教授）との共同で、胃酸分泌細胞についても電気生理学的研究を行った。英国のヨーク大学から Andy James 博士（現ブリストル大学准教授）がポスドクとして来てくれて、卵管上皮細胞にパッチ・クランプ法を適用してマキシ $K^+$ チャネルを見出す成果も得ている。この時期は、丁度パッチ・クランプ法を私達の実験系に導入して、微小電極法からそれへの移行を図った転換期にあたる。新しいパッチ・クランプ法の導入によって、その後、続々と臨床医学教室から多くの若い先生方が私のラボで実験をしに来られるようになり、それぞれよい論文に仕上げられた。その中には堀江稔博士（現滋賀医大教授）や富永真琴医師（現岡崎統合バイオ教授）も居られたので、非興奮性細胞に加えて興奮性の心筋細胞や膵 $\beta$ 細胞が、私達の一般生理学的・細胞生理学的研究の守備範囲に加えられることとなった。

この頃、工学部出身の大学院生（現在は生理学の大教授と云えばお名前が判ってしまうかな！）が、ある細胞への分泌刺激物質としてVIPを投与して、非常に大きな膜電位応答があると報告してくれた。私もそれを確認して大発見と大いに興奮して、細胞の様子を観察したところ、それにはすばやく膨張して元に戻るというドラスティックな形態変化が伴っていた。そこで、VIPは何に溶かして投与したの？と尋ねたところ、勿論VIPは重要だから2回蒸留水に溶かして与えたとの回答であった。ナノモルオーダーの（浸透圧調整されていない）VIP液なので、これは実質的には水を与えたための応答ではないか？と疑い、実際に水を局所投与したところ全く同じ反応が観察され、これは「水応答」の発見だと、大爆笑してその場は収まった。（但し、この後にリングル液に溶かしたVIPも大きさとは異なるが立派な過分極と細胞内 $Ca^{2+}$ 増の応答をもたらすことを証明し、論文発表にも到ったことを、ご当人の名誉のためにも、付記しておく。）

その後のあるとき、夜中夢うつつに、あの「水応答」というアーティファクツ的「発見」は何を意味するのか？とふと思い、細胞容積の低浸透圧応答（浸透圧性膨張）という物理学的事象に膜コンダクタンスの変化という生理学的反応が伴われていることにそれとなく気付いて、枕許のメモ帳に「水応答—生理的？」と書きなぐっておいた。翌日、そのメモに心引かれ、じっくり考えた後に、細胞容積の変化とそのあとの容積調節に、イオンチャンネルが関与するものと確信するに到った。今から考えると不思議なことであるが、そのことが、その後の私の研究ベクトルを決定することになった。[教訓その5：アーティファクツ的観察は、時として新しい展開と新発見の芽を孕む。]

因みに夜半の思いつきは、朝起きてすっかり忘れ去っているか、何か思いついたように思うがそれが何であったか思い出せないことが多いので、メモをしておくべきである。ただ、その暗闇で書かれたメモが乱筆すぎて何と書いたのかが解らないことも往々にしてあるが、その時はそれほど重要なことではなかったんだろうと諦めるより他ない。[教訓その6：枕許にはいつもメモ帳を。]

## II. 細胞容積調節と細胞生死スイッチングのチャンネルメカニズムの解明

文献的に調べたところ、動物細胞は、細胞壁という強靱な防具を持つ植物細胞とは異なり、浸透圧負荷の持続下で膨張または縮小を物理的に強いられることになるが、そののち比較的短時間のうちに元の容積に戻る能力を持っており、それらはそれぞれ調節性容積減少（regulatory volume decrease：RVD）、調節性容積増加（regulatory volume increase：RVI）と呼ばれていた。動物細胞が浸透圧負荷下での容積調節のために採用した戦略は非常にシンプルであり、細胞内浸透圧を細胞外のそれと等しくするために、細胞内よりKClを流出させるか、細胞外よりNaClを流入させて、水の移動を駆動するというものである。その当時までの細胞容積調節メカニズムの研究は、主として入手が安価で容易な赤血球細胞を用いて行われてきたために、RVD時のKClの輸送は、電気的中性型

のトランスポータによって担われるものとされていた（図1：下枝の下半分）。「水応答」を見た私達は、これに対して起電性のチャンネル輸送の関与の可能性を想定したわけである。丁度この時に、京大・医を卒業してすぐに大学院に入って私達のグループに参加してくれた挟間章博君（現福島医大教授）に、細胞融合によって巨大化したヒト上皮細胞に二本刺の微小電極による電圧固定法を適用して、この仮説を検討してもらったところ、浸透圧性膨張にはK<sup>+</sup>電流とCl<sup>-</sup>電流の並列的活性化が伴われることが初めて示され、しかも前者は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増依存性を示すのに対して、後者はそれを示さないことが明らかとなった[24]。そして、このことは巨大化していない通常の上皮細胞においても同様であることを、パッチ・クランプ法によって証明した。こうして私達は、（赤血球以外の殆どの動物細胞で）RVDはK<sup>+</sup>チャンネルとCl<sup>-</sup>チャンネルの同時的開口（によるKCl流出）によってもたらされることを、世界に先駆けて明らかにしたのである[25]。その後、そのCl<sup>-</sup>チャンネルは、殆どすべての細胞において外向整流性電流-電圧特性などの特徴的な性質を共有する、新規の容積感受性外向整流性（volume-sensitive outwardly rectifying）Cl<sup>-</sup>チャンネル（VSOR）であることを明らかにして行った[26,27]。

因みに、このVSORという私達によるネーミング[27]は、当時、細胞膨張によって活性化されるCl<sup>-</sup>チャンネルにもう1つ内向整流性電流-電圧特性を示すClC-2アニオンチャンネルが知られていたもので、それと峻別するために選ばれた。現在では、このVSORチャンネルをvolume-regulated（-related）anion channel（VRAC）と呼ぶ人もいるが、それではClC-2との区別ができない。更に現在では、直線的な電流-電圧特性を示すマキシ・アニオンチャンネル（Maxi-Cl）も、S字状電流-電圧特性を示すショウジョウバエのbestrophinアニオンチャンネル（dBest1）もまた、細胞容積増で活性化されることが知られており、これらすべてがVRACに含まれることになるのに対して、VSORは他のいずれのVRACとも異なる電流-電位特性を体現している。[教訓その7：名は（他意を含ま

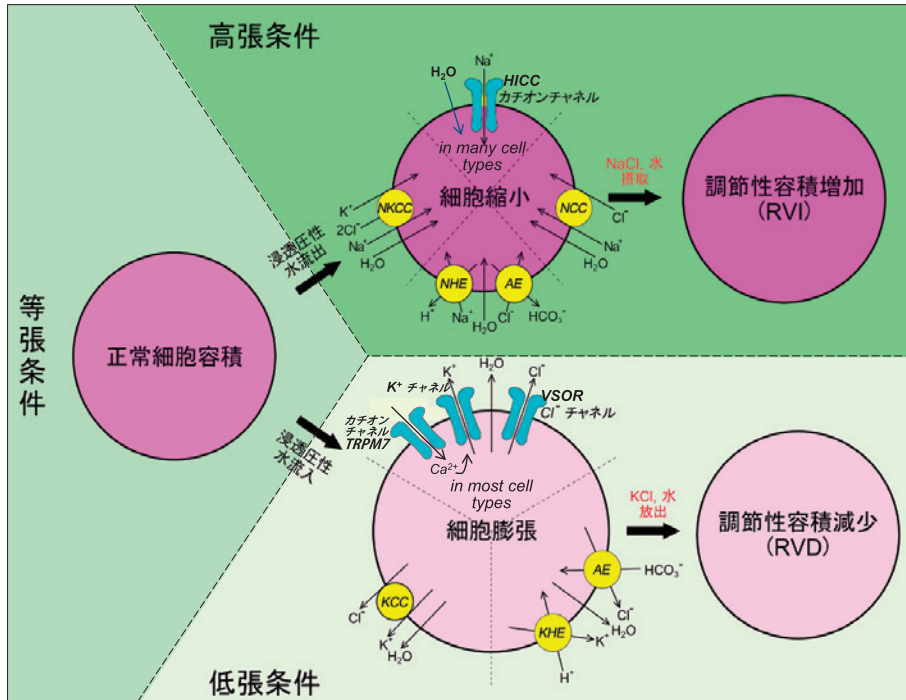


図1. 細胞容積調節のチャネルメカニズム.

詳細は本文参照. トランスポーターメカニズムに関与するものは:  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  コトランスポーター (NKCC);  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  コトランスポーター (NCC);  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  エクスチェンジャー (NHE); アニオン ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) エクスチェンジャー (AE);  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  コトランスポーター (KCC);  $\text{K}^+\text{/H}^+$  エクスチェンジャー (KHE).

ず) 体を現すことが望ましい.]

私は、ちょうどその頃、京都から岡崎へと研究拠点を移し、臨床からの多数の若手医師の参加が望めない状況を踏まえて、分散がちであった研究テーマを、細胞容積調節の分子メカニズムとその一般生理学的意義の解明へと徐々に絞って行くこととした。幸い、岡崎では諸外国からの博士研究員や他分野から総合研究大学院大学へ入学の若手研究者を得ることができ、新しい方向への研究の展開には絶好であった。こうして、その後、VSORと同時開口する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルの分子実体は、上皮細胞では IK1 であることを中国からの王軍さん (現首都医科大学 (北京) 准教授) が示し [28]、そのための  $\text{Ca}^{2+}$  を最初に流入させて供給するのは、細胞膨張時の膜伸展を検知して開口する非選択性カチオンチャネル TRPM7 であること

を東京学芸大から大学院進学 of 沼田朋大君 (現京大地球環境学助教) が示してくれた [29]。これら3つのチャネルによってもたらされた KCl 流出は、水チャネル AQP3 を介する水流出 [30] を駆動して、最終的に RVD を実現させること、更にはこの浸透圧性細胞膨張という緊急事態に対応して、迅速に RVD を実現するために、細胞はその内外で多くのシグナルを動員することも多くの共同研究者の力を得て明らかにすることができた (図 2)。

では細胞膨張がどのようにして VSOR 活性化をもたらすのか? これが次のクエスチョンとなるが、多くはその分子同定の後の課題として残されている。しかし、分子未同定という困難な状況下にあっても、安藤-赤塚結子君 (現鈴鹿医療科学大准教授) は、RVD や VSOR の細胞骨格系依存性が

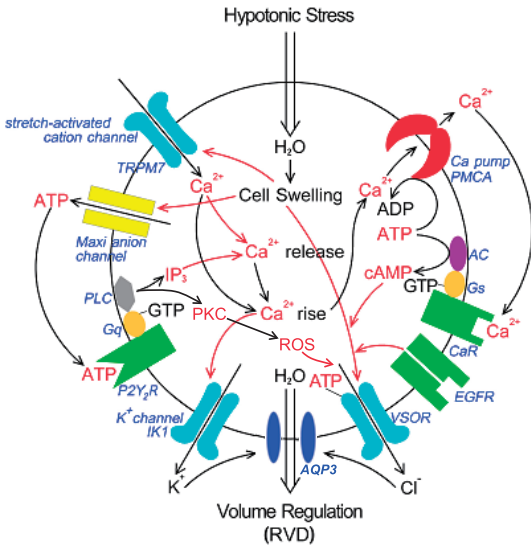


図2. RVDの分子メカニズムとその促進シグナル。Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release (CICR) の役割, Ca<sup>2+</sup>レセプター (CaR) の役割, そしてEGFレセプター (EGFR) の役割については, それぞれ次の論文を参照: Hazama & Okada 1990 BBRC **167**, 287; Shimizu et al. 2000 J Physiol **528**, 457; Abdullaev et al. 2003 J Physiol **549**, 749. その他は, 本文参照。

ら関与するアクチン結合タンパク質をサーチしてαアクチン4 (ACTN4) を同定し, 次にACTN4と相互作用する細胞質ABCタンパク質ABCF2を同定し, 細胞膨張時にはABCF2がVSORから離れてACTN4と結合することがVSOR活性化をもたらすメカニズムであることを示してくれた[31]. なお, このVSORの活性化は細胞膨張がないときにも起こり, それはアポトーシス刺激下で活性酸素種ROSに仲介されてもたらされることを清水貴浩君 (現富山大准教授) が示し[32], ブラディキニンによるB2レセプター刺激やATPによるP2レセプター刺激によっても, 同じくROSを介してもたらされ, この場合には細胞膜のごく近傍 (20ナノメートル以内) のナノドメインCa<sup>2+</sup>増が重要な役割を果たすことを秋田天平君 (現浜松医科大准教授) が最近明らかにしてくれた[33, 34]. それゆえ, RVD促進に対するP2レセプター刺激効果は, IP<sub>3</sub>と細胞内Ca<sup>2+</sup>増を介してのCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>チャンネル刺激[35]と, PKCとNOX

とROS産成を介してのVSOR活性化の二重に原因することになる (図2).

一方, 浸透圧性縮小後の容積調節RVIについても, 電気的中性トランスポーターによるNaCl流入 (図1: 上枝の下半分) ばかりではなく, 起電性のNa<sup>+</sup>透過性チャンネルの関与の可能性を, 高浸透圧刺激時にNa<sup>+</sup>電流の活性化が起こることを根拠にして, 早くから示唆していた[36]. 後にこのチャンネルが実際に存在することが証明されて, hypertonicity-induced cation channel (HICC)と命名され, この活性化が, (赤血球以外の) 殆どの動物細胞におけるRVI達成のための細胞外からのNa<sup>+</sup>流入に不可欠の役割を果たすことを, マックス・プランク研究所のFrank Wehner教授との共同研究によって, 初めて示した[37].

これら一連の研究から, 細胞容積調節のチャンネルメカニズムをほぼ解明をすることができたと考えている. 但し, RVI時にHICCと同時に発生するはずの起電性Cl<sup>-</sup>流入の経路には, 浸透圧性細胞縮小時には完全に抑制されるVSORは関与することができず, その他のアニオンチャンネルの関与が考えられるが, その同定は今後の課題として残されている. (その同定の暁には新たな“飛躍”がもたらされるだろうから, HIAC (hypertonicity-induced anion channel) とでも名付けてはどうだろうかと思いつめがらせている). それはさておき, イオンチャンネルには種々の生理学的な役割が知られているが, 新たに細胞容積調節への役割が付け加わり, 「容積調節性イオンチャンネル」という概念を提出できたと考えている. [教訓その8: 生理学者は何はさておき, 新しい概念の提唱に命をかけ (自己満足し) がちである.]

因みに, これらの容積調節性イオンチャンネルの活性化をクリアに見るために, 時として2倍近い浸透圧負荷をかけた実験が行われるが, これは体内では (虚血など病的ならいざしらず) 生理的には起こりえない条件であるとのクレームがしばしば付されるが, 事実はどうでもないことを付言しておく. 例えば, 食後すぐの小腸上皮においては, 吸収細胞内の浸透圧は (流入した糖やアミノ酸やNa<sup>+</sup>などによって) 約1.5倍に増加するので,

この細胞には1.5倍の低浸透圧負荷がかかることになる。また、その直下の非常に狭い小腸粘膜固有層の間質浸透圧は約4倍に増加するし、腎臓の髄質の間質浸透圧は正常の約4倍であり、そこで細胞は4倍の高浸透圧に、そしてそこから通過して正常浸透圧環境に出た細胞には4倍の低浸透圧負荷がかかることになるからである。[教訓その9:(生理学的) 事実“小説”よりも奇なり.]

細胞容積調節能は、容積変化を不可避的に伴う細胞分裂・増殖や細胞移動などの最も基本的な細胞機能とカップルしており、細胞生存に不可欠なものである。そうすると、これらの容積調節性イオンチャネルは、細胞死にも関係するのではないだろうか、考えを飛躍させた。事実、その予想は当たっており、これまで神経・筋を中心とする生理学研究においてバックグラウンドチャネルとして扱われてきたアニオンチャネルや非選択性カチオンチャネルが、細胞の生存に、そして生体恒常性維持にも関わる重要なキープレイヤーとして生命科学のフォアグラウンドに登場すべきものであることが、この後に明らかとなるのである。(つづく)

## 文 献

1. Okada Y, Ogawa M, Aoki N & Izutsu K: The effect of  $K^+$  on the membrane potential in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* **291**: 116-126, 1973
2. Okada Y & Inouye A: Tip potential and fixed charges on the glass wall of microelectrode. *Experientia* **31**: 545-546, 1975
3. Okada Y & Inouye A: Studies on the origin of the tip potential of glass microelectrode. *Biophys Struct Mechanism* **2**: 31-42, 1976
4. Okada Y & Inouye A: pH-sensitive glass microelectrodes and intracellular pH measurements. *Biophys Struct Mechanism* **2**: 21-30, 1976
5. Okada Y: Electrophysiological studies on ion transport in intestinal epithelia in vitro. (with Appendix: Liquid junction potential and membrane potential). In: *Topics in General Physiology and Biophysics*, Ed. The Committee for Publication in Honor of Prof Inouye A, Ed. Kitami Shobo Publ, Tokyo, pp 52-65, 1980
6. Okada Y, Irimajiri A & Inouye A: Permeability properties and intracellular ion concentrations of epithelial cells in rat duodenum. *Biochim Biophys Acta* **436**: 15-24, 1976
7. Okada Y, Irimajiri A & Inouye A: Intracellular ion concentrations of epithelial cells in rat small intestine. Effects of external potassium ions and uphill transports of glucose and glycine. *Jpn J Physiol* **26**: 427-440, 1976
8. Okada Y, Tsuchiya W, Irimajiri A & Inouye A: Electrical properties and active solute transport in rat small intestine. I. Potential profile changes associated with sugar and amino acid transports. *J Membrane Biol* **31**: 205-219, 1977
9. Okada Y, Irimajiri A & Inouye A: Electrical properties and active solute transport in rat small intestine. II. Conductive properties of transepithelial routes. *J Membrane Biol* **31**: 221-232, 1977
10. Okada Y, Irimajiri A, Tsuchiya W & Inouye A: Contribution of an electrogenic sodium pump to the membrane potential in the intestinal epithelial cell. *Jpn J Physiol* **28**: 511-525, 1978
11. Okada Y: Solute transport process in intestinal epithelial cells. (with Appendix: Carrier model and energy sources for  $Na^+$ -dependent organic solute transport.). *Membrane Biochem* **2**: 339-365, 1979
12. Okada Y, Doida Y, Roy G, Tsuchiya W & Inouye A: Oscillations of membrane potential in L cells. I. Basic characteristics. *J Membrane Biol* **35**: 319-335, 1977
13. Okada Y, Roy G, Tsuchiya W, Doida Y & Inouye A: Oscillations of membrane potential in L cells. II. Effect of monovalent ion concentrations and conductance changes associated with oscillations. *J Membrane Biol* **35**: 337-350, 1977
14. Roy G & Okada Y: Oscillations of membrane potential in L cells. III.  $K^+$  current-voltage curves. *J Membrane Biol* **38**: 347-357, 1978
15. Okada Y, Tsuchiya W & Inouye A: Oscillations of membrane potential in L cells. IV. Role of intracellular  $Ca^{2+}$  in hyperpolarizing excitability. *J Membrane Biol* **47**: 357-376, 1979
16. Okada Y, Tsuchiya W & Yada T: Calcium channel and calcium pump involved in oscillatory hyperpolarizing responses of L-strain mouse fibroblasts. *J Physiol (London)* **327**: 449-461, 1982
17. Ueda S, Oiki S & Okada Y: Cyclic changes in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  during membrane potential oscillations in fibroblasts. *Biomed Res* **4**: 231-234, 1983
18. Ueda S, Oiki S & Okada Y: Oscillations of cytoplasmic concentrations of  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  in fused L cells. *J Membrane Biol* **91**: 65-72, 1986
19. Okada Y, Tsuchiya W, Yada T, Yano J & Yawo H: Phagocytic activity and hyperpolarizing responses in L-strain fibroblasts. *J Physiol (London)* **313**: 101-119, 1981



20. Tsuchiya W, Okada Y, Yano J, Inouye A, Sasaki S & Doida Y: Effects of cytochalasin B and local anesthetics on electrical and morphological properties in L cells. *Exp Cell Res* **133**: 83–92, 1981
21. Tsuchiya W, Okada Y, Yano J, Murai A, Miyahara T & Tanaka T: Membrane potential changes associated with pinocytosis of serum lipoproteins in L cells. *Exp Cell Res* **136**: 271–278, 1981
22. Okada Y, Yada T, Ohno-Shosaku T, Oiki S, Ueda S & Machida K: Exogenous ATP induces electrical membrane responses in fibroblasts. *Exp Cell Res* **152**: 552–557, 1984
23. Oiki S & Okada Y: Cl<sub>q</sub> induces chemotaxis and K<sup>+</sup> conductance activation coupled to increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> in mouse fibroblasts. *J Immunol* **141**: 3177–3185, 1988
24. Hazama A & Okada Y: Ca<sup>2+</sup> sensitivity of volume-regulatory K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol (London)* **402**: 687–702, 1988
25. Okada Y & Hazama A: Review: Volume-regulatory ion channels in epithelial cells. *News Physiol Sci* **4**: 238–242, 1989
26. Kubo M & Okada Y: Volume-regulatory Cl<sup>-</sup> channel currents in cultured human epithelial cells. *J Physiol (London)* **456**: 351–371, 1992
27. Okada Y: Review: Volume expansion-sensing outward rectifier Cl channel: A fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol Cell Physiol* **273**: C755–C789, 1997
28. Wang J, Morishima S & Okada Y: IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C77–C84, 2003
29. Numata T, Shimizu T & Okada Y: TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C460–C467, 2007
30. Kida H, Miyoshi T, Manabe K, Takahashi N, Konno T, Ueda S, Chiba T, Shimizu T, Okada Y & Morishima S: Roles of aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line. *J Membrane Biol* **208**: 55–64, 2005
31. Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Numata T & Okada Y: Involvements of the ABC protein ABCF2 and  $\alpha$ -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells. *J Cell Physiol* **227**: 3498–3510, 2012
32. Shimizu T, Numata T & Okada Y: A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6770–6773, 2004
33. Akita T & Okada Y: Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca<sup>2+</sup> nanodomains in mouse astrocytes. *J Physiol (London)* **589**: 3909–3927, 2011
34. Akita T, Fedorovich SV & Okada Y: Ca<sup>2+</sup> nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cell Physiol Biochem* **28**: 1181–1190, 2011
35. Dezaki K, Tsumura T, Maeno E & Okada Y: Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* **50**: 235–241, 2000
36. Okada Y, Hazama A & Yuan W-L: Stretch-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channels is involved in the volume regulation of hypotonically swollen epithelial cells. *Neurosci Res* **12**: S5–S13, 1990
37. Wehner F, Shimizu T, Sabirov R & Okada Y: Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett* **551**: 20–24, 2003