

## 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（中編）

生理学研究所 岡田 泰伸

細胞死は典型的にアポトーシス apoptosis とネクローシス necrosis に分類される。アポトーシスは、あらかじめ細胞にプログラムされた“自殺”死であり、発生・分化・形態形成の過程で役目を終えて不要になった細胞や、内部的（遺伝子的）に傷ついたり老いてしまった細胞が、ただただその身を縮めながら、他に迷惑をかける（ような傷害因子を撒き散らす）ことなく、最終的には断片化（アポトーシス小体形成）してマクロファージに貪食されて消え去るものである（図3：右枝）。これに対して、ネクローシスは、外敵や外部環境変化・ストレスなどによって物理的・化学的に傷害を受けた細胞が、その容積を増やしていき、遂には破裂して、細胞（特に核）内から周りに傷害・炎症因子を撒き散らして、他細胞に迷惑をかけながら死へと到る“事故”死である（図3：左枝）。但し、アポトーシスも、そのプログラムが順調に進行しえない状態に陥れば、そのごく初期および途中からネクローシスの方に移らざるをえなくなり、それらはそれぞれネクロプトーシス necroptosis およびアポネクローシス aponecrosis（あるいは二次性ネクローシス secondary necrosis）と呼ばれている。そして、アポトーシスも内部的要因で（多くはミトコンドリアを介して）のみ誘導されるわけではなく、そのプログラムが外部刺激によって（多くはデスレセプターを介して）もトリガーされる。それはさておき、いずれにせよアポトーシス時には細胞は縮小し続け、ネクローシス時には膨張し続ける（図3）。私達はこれらをそれぞれ、アポトーシス性容積減少（apoptotic volume decrease：AVD）[38, 39]および、ネクローシス性容

積増加（necrotic volume increase：NVI）[39]と命名し、現在はこの語が広く用いられるようになっている。[教訓その10：一般向け一身の縮む思いの持続は細胞にも体にもよくないし、身の丈に合わず肥え太ることは自身によくはないばかりでなく、周りの細胞やヒトにも迷惑をかける結果となる。自己向け—そのときがきたら、ひたすら身を縮めて、周りに迷惑をかけないで、消え去りたいものだ。]

しかし考えてみると、容積調節能（図1）をもつ細胞において容積減/増が持続することは不思議なことであり、何故かAVDの後にRVIが起らず、NVIの後にRVDが起らないのである（図3）。私は、そこには容積調節メカニズムの破綻が関与するに違いないと考え、1997年に3つの行動を起こした。その1は、大学共同利用機関としての生理学研究所が全国の大学の研究者との共同研究をサポートする一般共同研究に、生化学・分子生物学分野から石崎泰樹博士（現群馬大医学部教授）に応募いただき、この細胞死誘導と細胞容積調節破綻の関連性に関する研究の立ち上げに協力をお願いしたことである。幸いにも、石崎先生から快諾をいただき、大いなる力をいただくこととなった。その2は、「細胞容積調節の分子メカニズムとその破綻防御」という研究課題でJSTのCREST研究領域「生体防御のメカニズム」に応募したことである。これとその後継版グラントによって7年間の研究費サポートをいただけたことはとてもありがたかった。その3は、私達のラボのホームページに、「細胞死誘導メカニズムの生理学的研究を開始するので、それに興味のある大学

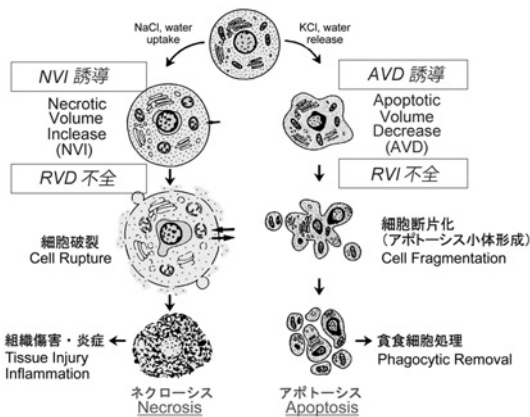


図3. 細胞死過程における細胞容積調節経路.

院生を求む」と広告を出したことである。これに応じて、前野恵美君が三重大・生物資源学研究科（修士課程）から総合研究大学院大学（博士課程）に、分野を越えて入学をしてくれて、アポトーシス誘導メカニズム研究に決定的な役割を果たしてくれた。またこの広告は、私自身がこの研究に不退転の覚悟で臨み、決して逃げないことを自分に言い聞かせ続けるという効果ももたらした。[教訓その11：公言（言葉）によるパラクリン効果はオートクリン効果をも生み出し、実行と成果（言葉）をもたす。]

私が最初に考えた仮説は、細胞では普段、細胞膜での水の出入が釣り合っていて容積が一定に保たれているが、アポトーシス時には水を流入させる経路の方が障害されているというものであり、それをテストするためにアポトーシス刺激を受けた細胞に低浸透圧負荷をかけたときの浸透圧性膨張能の不全をみるという予備実験を、挟間君に石崎先生と前野君の協力を得てやってもらったところ、結果は全くネガティブで、浸透圧性膨張は正常であるが、むしろその後起こるRVDのスピードが正常に比べて速くなるというものであった。この驚きの結果は、私達を当惑させた後に興奮させ、前野君をはじめその後院生として来てくれた清水君など他大学や他国から参加してくれた多くの若い人達が次々と勢力的な研究をしてくれるという流れを生むことになった。これらの研

究の結果、明らかになったメインポイントは次の通りである。AVDはRVDと同じメカニズム、即ち $K^+$ チャネルと $Cl^-$ チャネルの活性化（図4：上枝）、によって誘導される[38]。この $Cl^-$ チャネルとはVSORそのものであり、アポトーシス時には細胞膨張なしに（むしろ細胞縮小中に）ROSなどで活性化される[32]。なお、アポトーシス誘導におけるVSORの重要性は、ある種の癌細胞では抗癌剤シスプラチンによるアポトーシス死から逃れるためにVSORを欠失してまでシスプラチン耐性 cisplatin resistance を獲得していること[40]からもわかる（図4：上枝）。また、このVSORの本質的役割が *in vivo* 系でのアポトーシスにおいても成立することは、早大から院生として来てくれた井上華君（現東京医大助教）が昭和大学の塩田清二教授のグループとの共同研究によって示してくれた[41]。即ち、短時間全脳虚血・再灌流 ischemia-reperfusion の2-3日後に海馬CA1ニューロンで見られる遅発性神経細胞死はアポトーシス死であり、その誘導にはVSORが関与し、その傷害はVSORブロッカー投与で防御されたのである（図4：上枝）。AVDは、エフェクター・カスパーゼ[38]のみならずイニシエータ・カスパーゼ[42]や、ミトコンドリア反応[42]、そしてMAPキナーゼなど[43]、知られているアポトーシス性生化学反応にはるか先行して起こる。更には、AVDをもたす $K^+$ と $Cl^-$ の流出は、アポトーシス実現に不可欠の細胞内 $Ca^{2+}$ 増にも先立って起こることを出崎克也君（現自治医大准教授）が示してくれた[44]。AVDを阻止するとこれらの発生はすべて抑止され、アポトーシス死は救済されるので、AVDはこれらすべての上流の現象であるということになり、信じられないような展開となった。[教訓その12：仮説は、むしろ崩れたときの方がおもしろい。]

次に自ずから、次の2つのクエスチョンが生じた。第1に、AVDの後にRVIが見られずに細胞の縮小化が持続するのは、AVDがRVI能を凌駕するためか、それともRVIが抑制されるためなのか？第2に、果たして持続的細胞縮小のみでアポトーシス死（に至る全反応）がもたらされうるの

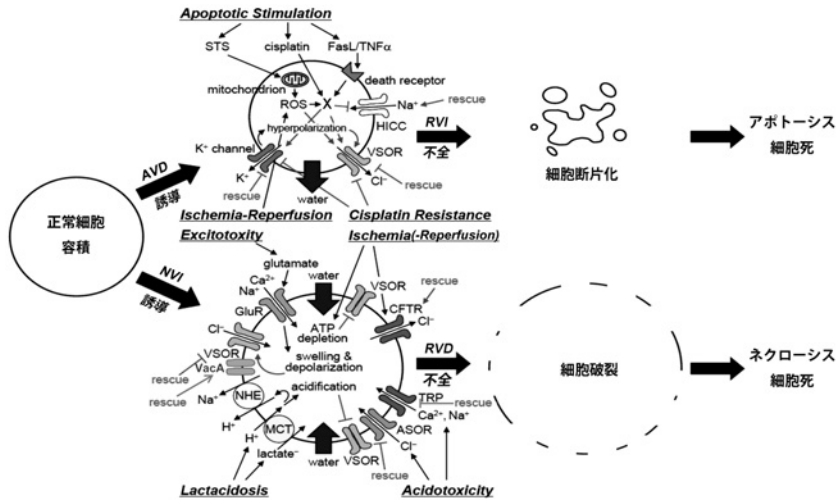


図4. 細胞死誘導・救済におけるイオンチャネルの役割。

か？まず第1点目であるが、答は後者であり、アポトーシス刺激下ではRVIメカニズムが抑制されており[45]、それにはHICCの抑制[46]と、ASK1活性化によるAkt1抑制[47]が関与することが明らかとなった。次に第2点目であるが、答はYesである。と言いきれるのは、RVIを種々の方法でブロックすると高浸透圧負荷のみで（細胞縮小が持続して）アポトーシスが誘導されるようになること[45, 46]、NHE1が欠失していることでRVI能不全を示している細胞にNHE1を強制発現させると（RVI能が回復して）高浸透圧負荷のみではアポトーシスが誘導されなくなること[45]、更には等浸透圧条件下においても、細胞外のCl<sup>-</sup>濃度を下げたり[48]、Na<sup>+</sup>を除去すると[49]、(NaCl流入が無くなるので)持続的細胞縮小が引き起こされる上にRVIもできなくなって、遂にはアポトーシス死に至ること、などの根拠が蓄積しているからである。即ち、AVDはアポトーシス死の必要かつ十分条件であったのである。[教訓その13：生理的・病理的現象に物理的現象が先行する。その物理的現象は更に先行する生理学的過程によってもたらされる。]

ネクローシスについて、よいモデル実験系がないかと探していた時に、森島繁君（元福井医大准教授）が乳酸アシドーシス lactacidosis の際にグ

リア細胞やニューロンは細胞膨張（脳浮腫）の後に死に至ることがよく知られていると教えてくれた。そこで、彼の指導のもとで、宮崎医大から受託していた2名の大学院生に調べてもらい、神経分化型神経芽細胞[50]でもグリア細胞[51]でも、トランスポーターMCTを介する乳酸とプロトンの取り込みとNHEを介するNa<sup>+</sup>の取り込みで膨張する（図4：下枝）が、その後起こるべきRVD能が失われており、それは細胞内プロトン増によるVSORの抑制に原因することが明らかにされた。そして、この細胞膨張の持続はネクローシス死へと導くことも証明された[52]。脳浮腫のもう1つのよく知られた原因に、グルタミン酸による（過）興奮毒性 excitotoxicity（かつて“中華料理症候群”とか“味の素症候群”と俗称された）があるので、この場合にもVSOR抑制が関与するのではないかと想定し、この点についても井上君に大脳皮質ニューロンで調べてもらった。その結果、驚いたことに真逆であり（図4：下枝）、NMDAで刺激すると（NMDA型グルタミン酸レセプター・カチオンチャネルを介しての）Na<sup>+</sup>流入によって細胞体膨張と樹状突起ビーズ状膨張（varicosity）形成が見られるが、そのNVI時にVSORはむしろ活性化し続けていて、Na<sup>+</sup>流入による脱分極がVSORを介して（本来はRVDを生ずるた

めに流出すべき)Cl<sup>-</sup>を流入させて膨張をむしろ亢進させ、その持続がネクローシス死へと導くことが明らかとなった[53]. 更には、強酸性条件下での細胞死をもたらす酸毒性 acidotoxicity の場合には、VSOR ではなく別のアニオンチャネルの関与が明らかになった(図4:下枝). 即ち、強酸性条件下では(VSORとは全く異なる)酸感受性外向整流性アニオンチャネル(ASOR)が活性化されてCl<sup>-</sup>流入による細胞膨張(NVI)が誘導されてネクローシスをもたらすのである[54]. 遅延性神経細胞死の場合のように虚血をごく短い時間で終えて直ちに再灌流した場合[41]や、虚血梗塞巣の辺縁部分の周辺血流から酸素供給のあるペナンプラ領域では、ATP要求性[55]のアポトーシス死が見られるが、虚血が長引いたあとの再灌流や、梗塞巣コア領域では、ATP枯渇によってネクローシス死がもたらされ、その時にはATP要求性[27]のVSORは抑制されることになりRVDもできないことになる(図4). ところで心筋細胞の場合、βレセプター刺激下ではVSORのかわりにCFTRアニオンチャネルがRVDをもたらす役割を果たすことが京大の野間昭典教授(現立命館大学教授)のグループから報告されていた(J Gen Physiol 1997). しかも心筋CFTRの発現は虚血後に亢進することを私達は見ていた[56]ので、心筋梗塞の場合のネクローシス死に対してCFTRは防御的に働くのではないかと考えた. これは実に予想通りであり(図4:下枝), CFTR活性化薬を再灌流開始時に投与することで心筋梗塞は防御され、その効果はCFTR阻害薬投与やCFTRノックアウトで見られなくなることを、*in vivo* 実験で浦本裕美君(現仁愛大講師)が、苦節数年の後に見事に示してくれた[57]. [教訓その14: 仮説通りの結果となったとしても、その道は平坦とは限らない. しかし、その時の喜びはまた格別である.]

アポトーシス死はAVD誘導で始まり、RVI不全による細胞縮小の持続によって最終的にもたらされ、ネクローシス死はNVI誘導に始まり、RVD不全による細胞膨張の持続によってもたらされる(図3, 図4). それらを実現させるのは、(電氣的

中性則に従っての)カチオンとアニオンの並列的同時輸送(による正味の浸透圧物質量の増減)によって駆動された水輸送であり、それらの輸送には多くの(中でも特に細胞容積関連性の)チャネルやトランスポーターが本質的な役割を果たしている(図4). これが因果律的に正しいことは、これらのチャネルやトランスポーターの働きをコントロールすることによって細胞死が救済できることから裏付けられる(裏を取ることができる). K<sup>+</sup>チャネルブロッカーによってAVDを阻止すると各種のアポトーシス誘導刺激によってもたらされるはずのアポトーシス死が救済されることは、私達[38]が最初に示したが、その後多数の論文が他研究室から発表されている. VSORブロッカーでのその救済は、多くの培養株細胞[38]ばかりでなく、初代培養心筋細胞[58,59]でも高橋信之君(現京大農学部助教)や中外製薬からの派遣研究員だった田辺秀博士によって観察されている. また、脳虚血・再灌流性の神経細胞アポトーシスのVSORブロッカーによる救済も*in vivo*系で確認されていることは前述の通りである[41]. 更には、VSOR欠失によって抗癌剤耐性を獲得している癌細胞は、遺伝子発現促進薬投与によるVSOR発現化によって抗癌剤感受性を再獲得して、アポトーシス死を再び示すようになるという米国から院生として来てくれたElbert Lee君(現オークランド小児病院研究所研究員)の実験結果は、裏の裏を取る成果となっている[40,60]. アポトーシス細胞のRVI不全におけるHICC抑制の関与の証拠は、HICCの事前活性化によってRVI能を付与しておく、その後のアポトーシス刺激によるアポトーシス死が救済されるという沼田君とWehner教授との共同研究結果からも裏付けられている[61]. 乳酸アシドーシス時のNVI後のRVD不全によるグリア細胞のネクローシス死は、ピロリ菌毒素による外来性の酸抵抗性アニオンチャネルの導入によって救済される[52]. VSOR活性化とそれによる逆向きCl<sup>-</sup>輸送によるNVI誘導とRVD抑制によってニューロンがネクローシス死する(過)興奮毒性の場合にはVSORブロッカーで救済される[53]. 強酸毒

性時の ASOR 活性化による上皮細胞ネクロシス死は ASOR ブロッカーで救済される [54]。逆に、CFTR 活性化による心筋梗塞時の心筋細胞ネクロシスの救済は、CFTR ノックアウトで見られなくなる [57]。これらの結果は、ネクロシス死においてもアニオンチャンネルが関与するという結論を裏付けるものである。細胞死を生体内で自在にコントロールして、望ましくない細胞死は救済し、望ましい細胞死を促進させることは、医学・生命科学の夢の1つであるが、その前に、VSOR や ASOR の分子同定など、多くのやらなければならないことが残されている。いずれにせよ、図4を見れば、細胞死はすべて、細胞容積調節のための生理学的メカニズムを逆手を取って実現されていることがわかる。そして、多くのイオンチャンネルは、細胞の生死のスイッチングの役割を果たしていることが見てとれる。[教訓その15：時として、細胞の生存維持メカニズム（君子）は豹変して細胞死の誘導・実行メカニズム（殺し屋）となり、生理学的過程は病理学的過程に（横取り）利用される.]

### III. オーガニックシグナル放出チャンネル—イオンチャンネルの新役割の解明

イオンチャンネルは、電圧(膜電位)、温度、細胞容積の変化や機械的ストレスなどの物理的刺激や、種々の化学物質との結合による化学的刺激を検知して開閉応答するセンサーとしての役割を果たしている。と同時に、それを受けて種々の作用をもたらすエフェクターとしての機能も果たしている。まず第1に、活動電位や受容器電位を発生したり、静止膜電位レベルを変化させて、それらを変調するなど電気信号を発生する機能である。それは、チャンネルの開口が、それを伝導させるイオン種の(膜内外の濃度差に基づく)平衡電位へと膜電位をシフトさせることに因る。但し、この場合、チャンネルの開口(透過性・伝導性増大)が実際に正味のイオン輸送をもたらすことを意味しない。そのシフトの結果、電位差と濃度差が釣り合えば、チャンネルポアは開口していてもイオンの正味の輸送は起こらないからである。両者が釣り

合わない(多くは他のイオンチャンネルの開口による別レベルへの膜電位シフトが共存している)とき、イオンはポアを透過して移動するので、イオンチャンネルは第2の機能であるイオン輸送を果たすことになる。但し、このときに注意すべきことは、マクロには電気的中性則に従ってのみ実現されうることであり、陽電荷(例えば $\text{Na}^+$ や $\text{K}^+$ や $\text{H}^+$ )の正味の移動は陰電荷(例えば $\text{Cl}^-$ や $\text{HCO}_3^-$ )の同方向移動か、陽電荷の反対方向移動かが伴われなければならないということである。更に注意すべきことは、同方向に陽イオンと陰イオンが輸送される場合には、浸透圧差を生じて水の輸送を伴うことが多いという点である。例えば、腸管上皮や腺上皮での電解質液の輸送(吸収・分泌)は $\text{NaCl}$ 輸送に駆動された水輸送によってもたらされる。イオンチャンネルによる細胞容積調節(図1、図2)や細胞生死スイッチング(図4)の場合も、イオン輸送に駆動された水輸送によってもたらされることは、既に述べた通りである。各種 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルや多くのTRP型非選択性カチオンチャンネルのように、チャンネルポアが $\text{Ca}^{2+}$ を透過・伝導させる場合には、細胞内外には極めて大きな(5-6桁の)電気化学的勾配(電位差・濃度差)があるので、細胞内セカンドメッセンジャーである $\text{Ca}^{2+}$ を細胞外から流入させることになる。それゆえ、これらの $\text{Ca}^{2+}$ 透過性チャンネルは細胞内カルシウムシグナル伝達というイオンチャンネルの第3の機能を果たすことになる。加えて、私達は細胞容積調節などの研究過程において、これに関係するイオンチャンネルのいくつかは、細胞外セカンドメッセンジャーであるATPやグルタミン酸などの有機溶質を細胞内から放出し、細胞間シグナル伝達を仲介することを、以下に述べるように、見出した。即ち、細胞外オーガニックシグナル放出チャンネルというイオンチャンネルの第4の役割の存在を明らかにしたのである。[教訓その16：生理学の進歩はイオンチャンネルの進化をまだまだもたらさず、イオンチャンネル研究の進歩は生理学の深化を更にもたらさず。]

細胞外でATPはP2レセプター刺激を介してRVDを促進することは前に述べたが、そのATP



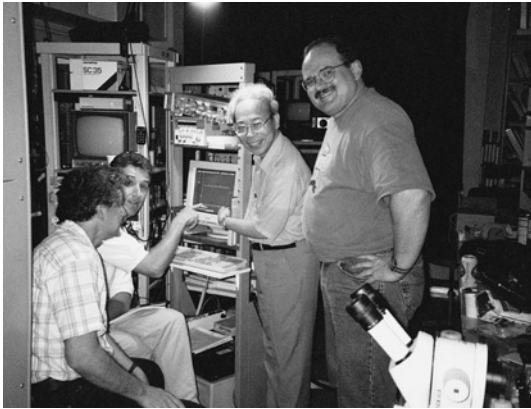


図5. マクラデンサ細胞単一マクシアンイオンチャンネル ATP 電流の世界初の記録とそれを喜ぶ4ヶ国共同研究者。(右より Bell, 岡田, Lapoint, Sabirov.)

は細胞内でしか産生されないもので、何らかのメカニズムで細胞外へと放出されたものである。その細胞外放出ルートには、小胞（エクソサイトーシス）性のもので、そうでないものがあることが知られていた。1990年代の後半から2000年代のはじめにかけて、後者ルートについて諸説があり、コネキシン・ギャップジャンクション・ヘミチャンネルや、ポンプ型 ABC トランスポーターの多剤耐性薬物排出ポンプ MDR1 や、チャンネル型 ABC トランスポーター CFTR および VSOR などのアニオンチャンネルの関与が示唆されていた（[62] 参照）。前者2つは間もなく否定されたが、後者については比較的長く論争の的であった。というのは、ATP は生理的条件である pH 7.4 においてはその90% が4価アニオン、10% がプロトン1つと結合した3価アニオンであり、等濃度の Mg 存在下においては87% がそれと結合した2価アニオン、11% が4価アニオン、2% が3価アニオンであり、細胞内電位が $-60\text{mV}$ の時には、細胞内外では $\text{ATP}^{4-}$ に対しては10桁、 $\text{Mg} \cdot \text{ATP}^{2-}$ に対しては8桁という鋭い電気化学的勾配が存在するので、アニオンチャンネルは絶好の放出路を与えるからである[62]。しかしながら、CFTR/VSOR ブロッカーが ATP 放出に影響を与えず、逆に ATP 放出ブロッカーは両アニオンチャンネル活性に影響を与えないことなど、いくつかの否定的データを示し

た挾間君が中心になって進めてくれた仕事 [63, 64] によって、流れは大きく変わり、その後、他グループからも多くの否定的報告がなされ、現在では両者の生理的条件下での関与を主張する人はもういない。では何が非小胞性放出路を与えるのかと私達も考えあぐねていたところに、全く別の所から陽光が射し込んで来た。同じ頃、ウズベキスタンから文部省外国人留学生として私の研究室に来ていた Ravshan Sabirov 博士（現ウズベキスタン科学アカデミー生物有機化学研究所教授）と老木君とで IRK1 チャンネルの研究をしていたが、その続きとして ROMK1 チャンネルの研究を行い、それが細胞外  $\text{Na}^+$  感受性を示すことを見出した [65]。これが腎臓のマクラデンサ（密集斑又は緻密斑）が担う体液（尿細管腔液） $\text{Na}^+$  レベル検知機能の分子メカニズムではないかと考え、単離マクラデンサの電気生理学研究をしていたモンリオール大学の Jean-Yves Lapoint 博士（当時同大学准教授、現教授）とアラバマ大学バーミングハム校の Darwin Bell 博士（当時同大学教授、現サウスカロライナ医科大教授・研究主幹）に申し入れて4国間国際的共同研究を開始した。その結果、予想に反して ROMK1 の関与は見られず、380pS の巨大単一チャンネルコンダクタンスを示す Maxi-Cl が見られ、それが  $\text{Na}^+$  感受性を示すことを見出した。当時、マクラデンサ細胞からメサンギウム細胞を経て輸入細動脈平滑筋へと伝達される尿細管系球体フィードバックシグナルとして ATP が注目されていたところから、私は Maxi-Cl こそがこの ATP の放出経路を与えるのではないかと思いついた。そして、岡崎—モンリオール—バーミングハムと共同研究セッションの場を何回か移しながら、遂に事実そうであることを示す直接的データを得た [66]。特に、岡崎セッションで初めてピュアな単一チャンネル ATP 電流を見た時の皆で共有した感動（これだから研究は止められない！）は、一生の思い出となっている（図5）。そこで次に Sabirov 博士と私は、Maxi-Cl を高発現している乳腺腫瘍由来の C127 細胞を用いて Maxi-Cl の性質を詳しく調べることになり、その結果、その ATP 放出路としての役割を更に明確

に示すことが出来た[67]. なお, 先に見つけたマクラデンサでの論文 [66] が C127 論文 [67] より出版が遅れたのは, 前者投稿で複数のハイインパクトジャーナルとのタフなやりとりと, それに要する追加実験に4ヶ国から集まる日程が仲々取れないことですっかり時間がかかったためであり, 今も複雑な思いである (が, 両論文ともよく引用されていることで慰めを得ている). RVD から ATP 放出への仕事と, ROMK1 からマクラデンサへの仕事は, 全くインディペンデントに進めていたのだが, 思わぬ形で合流して予想外の発見と新展開をもたらす結果となったことは感慨深い. [教訓その 17: 2つの仕事の併行は非能率的ではあるが, それがクロスする時には, 思いもかけないブレイクスルーが生まれる.]

Maxi-Cl が ATP 放出路を与えることは, 両者の薬理学的性質が同じであることに加えて, 次の5つのデータから確証されている. 第1に C127 細胞やマクラデンサ細胞ばかりでなく, 心筋細胞やグリア細胞においても, Maxi-Cl 単一チャネルは実際に ATP 電流を伝導し, その透過性は体積が約 1/40 の Cl<sup>-</sup> と比べても遜色なく,  $P_{ATP}/P_{Cl}$  は 0.10~0.15 [66-70],  $P_{Mg\cdot ATP}/P_{Cl}$  は 0.16 [68],  $P_{UTP}/P_{Cl}$  は 0.09 [62] である. 第2に, Maxi-Cl チャネルのポア内の ATP 結合サイトは, ポアのほぼ中央にあり, 細胞内外のいずれからでもアクセス可能である [67]. そして第3に, ポア半径はおよそ 1.3 nm であり, ATP や Mg $\cdot$ ATP のサイズ (半径 0.57~0.65nm) に比べてはるかに大きい [71]. 第4に, 成熟心室筋細胞における Maxi-Cl の発現部位は T 管開口部と Z 帯にのみに限局するが, それは ATP 放出路の分布と全くよく一致することを, バングラデシュからの留学生の Amal Dutta 君 (現テキサス大助教授) と Sabirov 博士が明らかにしている [69]. 更に第5に, 同じくバングラデシュ出身の Md. Rafiqul Islam 君 (現 JSPS 外国人特別研究員) が, 最近 ATP 放出路として示唆されはじめたパネキシン・ヘミチャネルのブロッカーやパネキシン (Panx1, Panx2) の遺伝子サイレンシング (ノックダウン) は, Maxi-Cl による ATP 放出に影響を与えないことを明らかにしている

[73]. ところで Maxi-Cl による ATP 放出は, 多種の細胞において低浸透圧刺激による細胞膨張時 [67-70, 72-74] や, 等浸透圧条件下においても NaCl 濃度増 (による NKCC を介しての細胞内 NaCl 取込増) による細胞膨張時 [67, 75] や虚血時 [68, 70] や低酸素時 [68] などの非常事態において見られるので, おそらく緊急アラームシグナルとして, 細胞内エネルギー源として最も大事な ATP を放出しているものと考えられる. [教訓その 18: ヒトも細胞も緊急事態では, 最も大事なものを棄てても, 身の安全を図るべきである.]

ATP と同様に, 陰電荷を持った神経伝達物質であり, 細胞間シグナル伝達物質でもあるグルタミン酸の放出にも, 小胞性経路と非小胞性経路が関与することが知られている. グルタミン酸のサイズ (半径約 0.345nm) は ATP よりははるかに小さいので, Maxi-Cl のポアはもちろん透過 ( $P_{glutamate}/P_{Cl}$  = 0.21~0.23 [66, 67, 76]) 可能である. 実際には, 中国からの留学生だった Hongtao Liu 君 (現中国医科大学教授) は, 虚血又は低浸透圧刺激下におけるアストロサイトからのグルタミン酸放出の大きな成分が, Maxi-Cl からのものであること, そしてそれよりもやや小さいが VSOR のポアを透過 ( $P_{glutamate}/P_{Cl}$  = 0.15) しての放出成分の寄与もあることを示した [76]. 特に, 炎症因子ブラジキニンによって刺激されたアストロサイトからのグルタミン酸の放出は, 細胞膨張ではなく ROS によって活性化された VSOR を介してもたらされ, 隣接ニューロンのグルタミン酸レセプターを刺激してグリアーニューロン間シグナル伝達をもたらす [77]. VSOR のポアのサイズは半径約 0.63nm [78] であるので, グルタミン酸 (半径約 0.35nm) やアスパラギン酸 (半径約 0.34nm) などの小さな有機アニオンのアミノ酸を透過することは至極当然のことである. 実は, VSOR は低浸透圧性膨張時におけるアミノ酸の—しかもアニオン性のグルタミン酸やアスパラギン酸ばかりでなく, 陰陽両電荷をもった中性 (ツピッター) アミノ酸であるタウリンに対しても—放出ルートを与えることを最初に報告したのは, あの懐かしいモントリオール大の Guy Roy 教授であった (Am J Physiol Cell

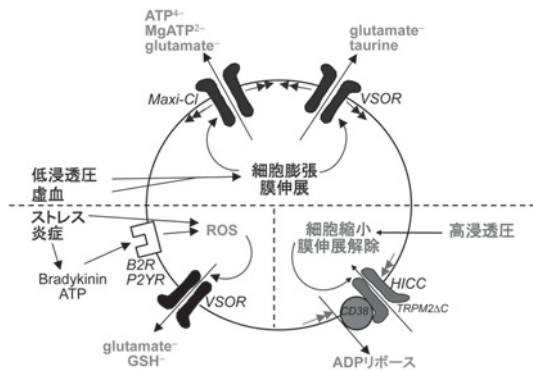


図6. オーガニックシグナル放出チャネル。(二重矢印は膜伸展又はその解除を表す。但し、膜伸展はメカニカルなストレッチを必ずしも意味しない[27].)

Physiol 1992). それを受けて、ハーバード大の Kevin Strange 教授 (現 MDIBL 所長) は VSOR を volume-sensitive organic osmolyte anion channel の略称 VSOAC で呼ぶことを提唱した (Am J Physiol Cell Physiol 1996). しかし、VSOR のみならず Maxi-Cl も organic osmolyte を透過・放出するので、VSOR のみをそう呼ぶのは片手落ちであると私達は主張している [79]. それはさておき、事実 VSOR は、タウリンの放出路を与えて、浸透圧性膨張グリア細胞から AVP ニューロンにシグナル伝達することを東京学芸大から院生として来てくれた佐藤かお理君 (現生理研 NIPS リサーチフェロー) が最近明らかにしている [80]. 更に VSOR は、1 価陰電荷をもったトリペプチドであるグルタチオン (GSH) (半径約 0.55nm) に対する透過性 ( $P_{GSH}/P_{Cl} = 0.1 \sim 0.3$ ) を示し、浸透圧膨張リンパ球からの GSH 放出に主たる通路を与えることを、Sabirov 博士との共同研究で明らかにしている [81]. 有機溶質の放出はアニオンチャネルには限らないらしい。というのは、RVI に重要な役割を果たすカチオンチャネル HICC は、その分子本体は TRPM2 の C 末端領域一部欠失型ヴァリエント (TROM2ΔC) とサイクリック ADP リボース加水分解酵素である CD38 との分子複合体であり、その活性化には CD38 を介する ADP リボース放出が共役することを、沼田君が

Wehner 博士との共同研究で明らかにしているからである [82]. 図 6 で要約したように、Maxi-Cl は  $ATP^{4-}$  や  $Mg \cdot ATP^{2-}$  やグルタミン酸の放出路を、VSOR はグルタミン酸やタウリンや GSH の放出路を、HICC は ADP リボースの放出路を与え、いずれも細胞外シグナル伝達に寄与するので、これらはオーガニックシグナル放出チャネルと総称することができるだろう。[教訓その 18: イオンチャネルは、マルチな機能を果たし、細胞の省エネ化に貢献している.]

バックグラウンドチャネルとして以前は扱われてきた多くのアニオンチャネルや非選択性カチオンチャネルが、センサーの役割を果たすと共に、細胞容積調節や細胞生死スイッチングや細胞内および細胞間シグナル伝達といったすべての細胞種が持っている最も基本的な生理学的過程 (一般生理学過程) においてキーとなるエフェクターとしての役割を果たしていることが判明した。後述するように、これらはまた脳や心臓が果たす生体恒常性維持機能においても極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりはじめています。即ち、今やこれらはフォアグラウンドでプレイするメインキャストとして登場することになったのである。ただ、VSOR、Maxi-Cl や ASOR アニオンチャネルの分子は未同定であり、仮面をかぶったままである。私達は現在、後述するようにその仮面をまさに剥ぎはじめています。眼前に迫っている分子同定の暁には、これらの分子は生命科学研究のフォアフロントに登場することになるに違いない。(つづく)

## 文 献

38. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A & Okada Y: Normotonic cell shrinkage due to disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 9487-9492, 2000
39. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J & Morishima S: Review: Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). J Physiol (London) **532**: 3-16, 2001
40. Lee EL, Shimizu T, Ise T, Numata T, Kohno K & Okada Y: Impaired activity of volume-sensitive



- Cl<sup>-</sup> channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells. *J Cell Physiol* **211**: 513–521, 2007
41. Inoue H, Ohtaki H, Nakamachi T, Shioda S & Okada Y: Anion channel blockers attenuate delayed neuronal cell death induced by transient forebrain ischemia. *J Neurosci Res* **85**: 1427–1435, 2007
  42. Maeno E, Tsubata T & Okada Y: Apoptotic volume decrease (AVD) is independent of mitochondrial dysfunction and initiator caspase activation. *Cells* **1**: 1156–1167, 2012
  43. Hasegawa Y, Shimizu T, Takahashi N & Okada Y: The apoptotic volume decrease is an upstream event of MAP kinase activation during staurosporine-induced apoptosis in HeLa cells. *Int J Mol Sci* **13**: 9363–9379, 2012
  44. Dezaki K, Maeno E, Sato K, Akita T & Okada Y: Early-phase occurrence of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> efflux in addition to Ca<sup>2+</sup> mobilization is a prerequisite to apoptosis in HeLa cells. *Apoptosis* **17**: 821–831, 2012
  45. Maeno E, Takahashi N & Okada Y: Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett* **580**: 6513–6517, 2006
  46. Shimizu T, Wehner F & Okada Y: Inhibition of hypertonicity-induced cation channels sensitizes HeLa cells to shrinkage-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem* **18**: 295–302, 2006
  47. Subramanyam M, Takahashi N, Hasegawa Y, Mohri T & Okada Y: Inhibition of a protein kinase Akt1 by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) is involved in apoptotic inhibition of regulatory volume increase. *J Biol Chem* **285**: 6109–6117, 2010
  48. Maeno E, Shimizu T & Okada Y: Normotonic cell shrinkage induces apoptosis under extracellular low Cl<sup>-</sup> conditions in human lymphoid and epithelial cells. *Acta Physiol* **187**: 217–222, 2006
  49. Nukui M, Shimizu T & Okada Y: Normotonic cell shrinkage induced by Na<sup>+</sup> deprivation results in apoptotic cell death in human epithelial HeLa cells. *J Physiol Sci* **56**: 335–339, 2006
  50. Mori S, Morishima S, Takasaki M & Okada Y: Impaired activity of volume-sensitive anion channel during lactacidosis-induced swelling in neuronally differentiated NG108-15 cells. *Brain Res* **957**: 1–11, 2002
  51. Nabekura T, Morishima S, Cover TL, Mori S, Kannan H, Komune S & Okada Y: Recovery from lactacidosis-induced glial cell swelling with the aid of exogenous anion channels. *Glia* **41**: 247–259, 2003
  52. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Manabe K, Mori S & Nabekura T: Review: Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **448**: 287–295, 2004
  53. Inoue H & Okada Y: Role of volume-sensitive chloride channel in excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci* **27**: 1445–1455, 2007
  54. Wang H-Y, Shimizu T, Numata T & Okada Y: Role of acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in acidosis-induced cell death in human epithelial cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **454**: 223–233, 2007
  55. Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV & Okada Y: Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: A bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ* **12**: 1390–1397, 2005
  56. Uramoto H, Takahashi N, Dutta AK, Sabirov RZ, Ando-Akatsuka Y, Morishima S & Okada Y: Ischemia-induced enhancement of CFTR expression on the plasma membrane in neonatal rat ventricular myocytes. *Jpn J Physiol* **53**: 357–365, 2003
  57. Uramoto H, Okada T & Okada Y: Protective role of cardiac CFTR activation upon early reperfusion against myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem* **30**: 1023–1038, 2012
  58. Tanabe S, Wang X-M, Takahashi N, Uramoto H & Okada Y: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* **579**: 517–522, 2005
  59. Takahashi N, Wang X-M, Tanabe S, Uramoto H, Jishage K, Uchida S, Sasaki S & Okada Y: ClC-3-independent sensitivity of apoptosis to Cl<sup>-</sup> channel blockers in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* **15**: 263–270, 2005
  60. Shimizu T, Lee EL & Okada Y: Review: Volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel as a regulator of acquired cisplatin resistance. *Anticancer Res* **28**: 75–84, 2008
  61. Numata T, Sato K, Okada Y & Wehner F: Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. *Apoptosis* **13**: 895–903, 2008
  62. Sabirov RZ & Okada Y: Review: ATP release via anion channels. *Purinergic Signal* **1**: 311–328, 2005
  63. Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E & Okada Y: Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line. Lack of correlation with volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels. *J Gen Physiol* **114**: 525–533, 1999
  64. Hazama A, Fan H, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y & Okada Y: Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl<sup>-</sup> conductances in C127 cells. *J Physiol (London)* **523**: 1–11, 2000
  65. Sabirov RZ, Azimov RR, Ando-Akatsuka Y, Miyoshi T & Okada Y: Na<sup>+</sup> sensitivity of ROMK1 K<sup>+</sup> channel: Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Membr Biol* **172**:

- 67-76, 1999
66. Bell PD, Lapointe J-Y, Sabirov RZ, Hayashi S, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G & Okada Y: Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4322-4327, 2003
  67. Sabirov RZ, Dutta AK & Okada Y: Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol* **118**: 251-266, 2001
  68. Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H & Okada Y: Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischemic or hypoxic conditions. *J Physiol (London)* **559**: 799-812, 2004
  69. Dutta AK, Korchev YE, Shevchuk AI, Hayashi S, Okada Y & Sabirov RZ: Spatial distribution of maxi-anion channel on cardiomyocytes detected by smart-patch technique. *Biophys J* **94**: 1646-1655, 2008
  70. Liu H-T, Sabirov RZ & Okada Y: Oxygen-glucose deprivation induces ATP release via maxi-anion channels in astrocytes. *Purinergic Signal* **4**: 147-154, 2008
  71. Sabirov RZ & Okada Y: Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J* **87**: 1672-1685, 2004
  72. Dutta AK, Okada Y & Sabirov RZ: Regulation of an ATP-conductive large-conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. *J Physiol (London)* **542**: 803-816, 2002
  73. Islam MR, Uramoto H, Okada T, Sabirov RZ & Okada Y: Maxi-anion channel and pannexin I hemichannel constitute separate pathways for swelling-induced ATP release in murine L929 fibrosarcoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**: C924-C935, 2012
  74. Liu H-T, Toychiev AH, Takahashi N, Sabirov RZ & Okada Y: Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res* **18**: 558-565, 2008
  75. Peti-Peterdi J, Morishima S, Bell PD & Okada Y: Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F197-F201, 2002
  76. Liu H-T, Tashmukhamedov BA, Inoue H, Okada Y & Sabirov RZ: Roles of two types of anion channels in glutamate release from mouse astrocytes under ischemic or osmotic stress. *Glia* **54**: 343-357, 2006
  77. Liu H-T, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ & Okada Y: Bradykinin-induced astrocyte-neuron signaling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol (London)* **587**: 2197-2209, 2009
  78. Ternovsky VI, Okada Y & Sabirov RZ: Nano-sized pore of the volume-sensitive anion channel revealed by differential polymer partitioning. *FEBS Lett* **576**: 433-436, 2004
  79. Okada Y, Sato K, Toychiev AH, Suzuki M, Dutta AK, Inoue H & Sabirov RZ: Review: The puzzles of volume-activated anion channels. In: "Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System. From Molecules to Diseases", Eds. Alvarez-Leefmans FJ & Delpire E, Elsevier, San Diego, pp 283-306, 2009
  80. Sato-Numata K, Ueta Y & Okada Y: Study on the hypoosmolarity sensing mechanism in arginine-vasopressin neurons: Reexamination on the taurine hypothesis. *J Physiol Sci* **63** (Suppl 1): S188, 2013
  81. Sabirov RZ, Kurbannazarova RS, Melanova NR & Okada Y: Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* **8** (1): e55646, 2013
  82. Numata T, Sato K, Christmann J, Marx R, Mori Y, Okada Y & Wehner F: The  $\Delta C$  splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J Physiol (London)* **590**: 1121-1138, 2012