

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（後編その1）

総合研究大学院大学 岡田 泰伸

オーガニックシグナル放出チャネルは、細胞縮小で活性化されるカチオンチャネルのHICCにしても、細胞膨張で活性化されるアニオンチャネルのMaxi-ClやVSORにしても、細胞膜（そのものやその皺 infolding の）伸展度即ち「膜圧」の変化を検知して活性化されるセンサーチャネルである（中編、図6参照）。私達は、それらの活性化メカニズムの分子レベルの解析を可能なかぎり行ってきたが[27, 31-34, 82-88]、これ以上に詳細な解明には分子同定が不可欠となった。これらの「膜圧センサーチャネル」は、生体において体液浸透圧変化や血圧変化や、虚血（・再灌流）負荷組織で発生する細胞内外の浸透圧変化を感知して活性化されるため、これらの状況に対応する生体恒常性維持機構やその破綻に関与することが推定される。その（因果律的）解析には、*in vivo*での（分子をターゲットにした）生理学的実験を避けて通ることができないが、そのためにもこれらの分子同定が必要となった。そこで私達は、研究の多くの時間をそのために振り向けることにした。

幸いなことに、HICCの分子同定には、既に述べたように沼田君とWehner博士との努力によって、比較的早く成功することができたが[87]、これは世界的なTRPチャネル研究旋風を追風にすることが可能だったからである。これに比し、Maxi-ClとVSORの分子同定には長い年月にわたって手こずってきた[27, 60, 79, 89-92]。というのは、次々と現れては消え、また現れる諸外国の研究室からの誤った“分子同定”の報告と、しばらくはそのラインでの迎合論文が続くといった逆風の繰り返しに1つ1つ抗わなければならなかつ

たからである。それは時として友人を敵にまわすような辛い闘いともなった。[教訓その20：世界の研究潮流は追風になることもあれば逆風になることもある。]

IV. 膜圧センサー・オーガニックシグナル放出アニオンチャネル Maxi-Cl の分子同定から生体恒常性維持機構の解明へ

Maxi-Clはパッチクランプ時代が始まってすぐにシュワン細胞(Proc R Soc Lond B 1984)と腎由来A6細胞(J Membr Biol 1984)で発見され、その後胃酸分泌細胞[93]など、極めて多種の細胞に発現していることが知られている([90, 91]参照)。しかし、その単一チャネル・コンダクタンス(300—450pS)の余りにも大きさから、この開口は生理的な細胞内外イオンバランスを即座に破壊しかねないので、(人為的な実験条件によってもたらされたアーティファクトか、あるいは細胞の断末魔の叫びのような状況でのみ活性化される)非生理的なチャネルであるとの意見も多かった。しかし、多くの細胞がこのチャネルによって細胞外へとATPを放出することが私達によって明らかにされ[62, 66-74, 90, 91]、それによってプリン作動性受容体を介してRVDを促進したり[67, 73]、尿管系球体フィードバックのシグナリングを担う[66]など、生理的な役割を果たしていることが明らかとなり、事態は一変した。それに関連して思い出すのは、ダンディー大学において丸山芳夫博士(現東北大学医学部教授)とOle Petersen博士(現カーディフ大生命科学部教授・学部長)がパッチクランプ時代が開けて早々に発見していた

Ca²⁺依存性・非選択性カチオンチャネル (Nature 1982; J Membr Biol 1984) が、当時は非生理的または人為的チャネルと見做されがちであったが、実はこれは TRP チャネルの1つであったことが後になって明らかになったことである。[教訓その 21: 生体に何の役にも立たないチャネルなんぞ、発現はしていないのだ。]

Maxi-Cl の分子実体としては、ミトコンドリア外膜に発現している電位依存性アニオンチャネル VDAC (ポリン) の形質膜発現型のアイソフォーム (pl-VDAC) であるという説 (PNAS 1994 Dermitzel ら) が最近まで広く信じられてきた。しかし、ミトコンドリア VDAC と Maxi-Cl の生物物理学的性質は、一見似ているようにはみえるが、詳しく調べてみると重要な相違がある ([91] 参照)。それゆえ私達は、pl-VDAC 説に強い疑いをもっていった。その後、いくつかの支持論文が発表されたが、いずれもその根拠は傍証的なものであり (後述)、決定的とは思えなかった。そして事実、VDAC の3つのアイソフォームのすべてをノックアウト+ノックダウンした線維芽細胞においても、Maxi-Cl チャネル活性は何らの変化も見られないことを Sabirov 博士が中心になって明らかにし [94]、この pl-VDAC 説を完全に葬り去った。その後、ATP 放出に関与するチャネルとして、2つの細胞の間にギャップジャンクションを形成するコネキシン 43 (Cx43) によって単一の細胞の形質膜上に形成されるヘミチャネルが、ATP 透過性および Gd³⁺ 感受性を示す大型コンダクタンス・アニオンチャネルとして振る舞うことが報告され (J Neurosci 2008 Kang ら)、Maxi-Cl 分子実体との関連が期待された。更に最近では、コネキシン類似タンパク質パネキシン 1 (Panx1) が、Maxi-Cl と類似の性質を示すヘミチャネルを形成し ([73] 参照)、ATP 透過性と膜伸展感受性を示す大型コンダクタンスチャネルとして振る舞うことが報告され (FEBS Lett 2004 Bao ら)、パネキシンこそが ATP 放出路を与えるチャネル、おそらく Max-Cl、の分子実体であると考えられるようになった。しかし、Islam 君らの最新の研究によって、Maxi-Cl は Cx43 と Panx1 とともに、そして他の Cx や Panx

のいずれのアイソフォームとも、異なる分子であることが明らかにされた [73]。一方、鈴木誠博士 (元自治医大助教授) は、ショウジョウバエの Tweety のヒト・ホモログである TTYH1 が細胞膨張によって活性化される大型コンダクタンス・アニオンチャネル活性を示し、これが Maxi-Cl の分子実体であるという考えを発表した (J Biol Chem 2004)。そこで私達は、直ちにこの可能性を鈴木博士との共同研究で検討した。しかし、その結果はこの可能性を棄却せざるをえないものとなってしまい、鈴木博士もいさぎよく共著者となって下さり、その事実を論文発表した [79]。[教訓その 22: 自説の誤ちは自分の手で正すべし。]

これら pl-VDAC 説、Panx1 説、Cx43 説、TTYH1 説の提出において最大の根拠とされた実験結果は、異所性強制発現によって Maxi-Cl チャネル活性が出現したというものであった。pl-VDAC 説の更なる根拠には、その抗体によるチャネル活性阻害と、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるその発現ダウンレギュレーション (ノックダウン) によるチャネル活性減少が加えられていた。しかし、これらはすべて仮説提出の出発点を与えるものではあるが、決定的証拠となるものではない。これらの分子が Maxi-Cl 分子と相互作用を示すレギュレータであっても、それらの結果は説明がつくからである。また、抗体やアンチセンスオリゴの効果は、非特異的なものである可能性もあり、高々強い傍証を与えるものにすぎないのである。多くの細胞に発現していて、細胞の生存にとって最も基本的な役割を果たし、多くのシグナル分子やサブコンポーネントによる制御を受けながら常時働き続けているようなハウスキーピング重要分子の同定には、これまで取られてきた通常のアプローチでは乗り越えることができないような2つの難関があることに気付かされた。まず、第一に、その本体は多くの制御分子によって何重にも被われていて、その露出にはいくつかのアプローチの組合せによる候補分子の発掘が必要であることである。第二には、強制発現やノックダウンは単にスクリーニングの手段を与えるのみであり、それらの陽性結果はゴールではなく、単なる出発点であ

り、(レギュレータでもなくサブコンポーネントでもなく本体であるという)最終同定には更にロバストで直接的なエビデンスが必要であるという点である。これが、全ゲノムが解明され、殆どの遺伝子のクローニングも終了されている現在に、多くのグループが何年にもわたって努力してきたにもかかわらず、Maxi-ClもVSORも未だにその分子同定に到っていない理由と思われる。であるが故に、その分子同定の暁には、一挙にその周辺の制御機構も明るみに出ることが期待されるのである。[教訓その23：人を寄せ付けないが故の“秘宝”も、手にしなければ“至宝”とはならない。]

そこで私達は、原点に立ち帰ってこれまでとは全く異なる複数のアプローチ(その1つは[95]参照)を組み合わせて広い候補分子母群から第一次候補分子群を選定し、強制発現とノックダウンによるスクリーニングを経て多くの候補分子を棄却した上で[96]、数種の第二次候補分子に辿り着き、*in vivo* ノックダウンの効果を確認した上で、更にロバストで直接的なエビデンスを脂質膜再構成法によって得て、最終同定に到達するという独自の戦略を採ることとした。それは、気が遠くなるほどの労力と時間と経費を要するものとなり、しかも(あまりにもハードルの高い実現性という印象によって現在のグラント審査システムでは高評価が得にくく)大型グラントのサポートは得られないままの厳しい戦いとなった。しかし、その結果、多くの雲の中から晴れ間が見え、その同定のゴールに向けての最終コーナを走り始めている。[教訓その24：逆風が続いても、たとえ首は回らなくなっても、“急がば廻れ”だ。]

心臓では種々の生理的・病理的刺激によって間質液中のATPレベルが増大することが古くから知られているが、低酸素条件下においてはそのATPは心筋細胞自身から放出される(J Physiol 1977 ForresterとWilliams)。その心筋細胞のATP放出路は、前にも述べたように、新生児ラット培養心室筋細胞[68]および成熟ラット単離心室筋細胞[69]のいずれにおいてもMaxi-Clで与えられることを私達は明らかにした。虚血又は再灌流初期時に放出されるATPは、プリン作動性

(P2)受容体を介して心筋梗塞障害に対して防御的に働くという多くの報告がある。そのメカニズムの1つに、P2受容体によるCFTRアニオンチャネルの活性化が関与することが考えられる。というのは、虚血・再灌流時のCFTR活性化が心筋梗塞に防御的に働くことを既に私達は明らかにしており[57]、そしてそのCFTRこそがP2受容体刺激下で著しく活性化されるアニオンチャネルであることが証明されていたからである(J Physiol 1999 Duanら)。私達は現在、その可能性の検討をランゲンドルフ灌流心臓標本を用いての松浦博博士(滋賀医大教授)との共同研究によって、手にしはじめているMaxi-Cl分子の関与の検討を含めて、開始しているところである。そのためには、マウスを乗せて岡崎と天津の間を高速道で日帰りドライブをしなければならないが、新しい実験は70を過ぎたこの年になっても心躍るものがあり、疲れを覚えることはない。[教訓その25：新しいチャレンジに、老いてはますます壮なるべし。]

脳においても、種々の刺激下で細胞外へのATP放出が見られ、ニューロンとグリア(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、マイクログリア)と脳血管細胞(内皮細胞、平滑筋細胞)の間や、ニューロン-ニューロン間や、グリア-グリア間におけるプリン作動性シグナル伝達に、放出されたATPが重要な役割を果たすことが広く知られている。そのシグナル伝達の結果、細胞増殖、細胞分化、細胞移動、細胞死誘導、細胞死防御、神経興奮性、シナプス伝達、神経化学受容、血管トーン等、多彩な生理学的・病態生理学的脳内機能が制御されることになる。シナプスでのATP放出は、他の興奮性神経伝達物質と共に、エキソサイトーシスによって放出(小胞性放出)されるが、シナプス外でのATP放出は主として非小胞的に行われる。後者の場合のATP放出は、シナプス間隙のように狭い領域で、ごく短時間の奏効をもたらすばかりではなく、長距離・長時間作動を要するものである。そのためには、エキソサイトーシスやトランスポータを介する放出に比べて、(前にも触れたように)細胞内外のATPの電気化学的勾配

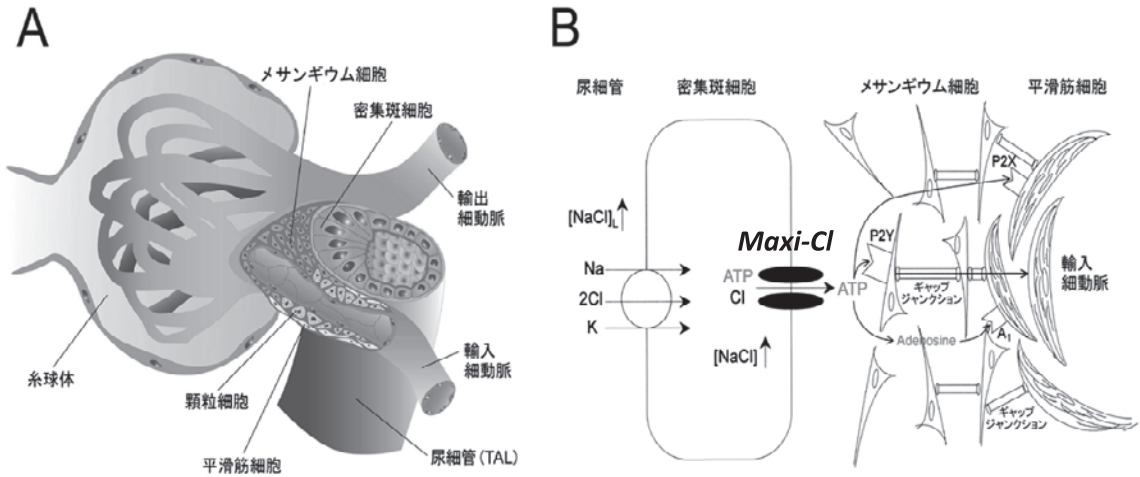


図7. 腎臓傍糸球体装置内マクラデンサ（密集斑）細胞（A）と、その Maxi-Cl からの ATP 放出による尿細管—糸球体フィードバック（TGF）シグナリングの模式図.

を利用することができるが故に、桁違いの放出力を示すことのできるチャンネルを利用するのが最も効率が高い。事実、最近ヘミチャンネルやアニオンチャンネルの関与が次々と報告されている。私達の所では、Liu 君が、アストロサイトからの虚血条件下における ATP 放出 [70] や浸透圧性膨張時の ATP 放出 [74] は、主として Maxi-Cl を通って行われていることを明らかにしている。また、発火時における神経軸索からの非シナプス性・非小胞性 ATP 放出もまた、この Maxi-Cl を介して行われる可能性が高いことが最近報告されている (Sci Signal 2010 Field と Ni)。この場合の ATP 放出性アニオンチャンネル開口の刺激を与えるものは、神経発火時における軸索膨張であると結論されている。昔、故田崎一二博士 (NICHD) が神経興奮性メカニズム研究との関連で発見されていた神経線維膨張応答 (Science 1980 ; Jpn J Physiol 1999) は、その生理的意義への疑問から永く無視されてきたが、現代において復権を果たしたのものとしても感慨深い。[教訓その 26 : 正しい実験的観察結果は不死鳥である。たとえ時を得ずとも発表の労を惜しんではならない。]

私達が Maxi-Cl による ATP 放出を最初に発見したマクラデンサ細胞は、尿細管（ヘンレの太い上行脚：TAL）の管腔液（体液）の NaCl 濃度

($[NaCl]_i$) を検知して糸球体濾過率を制御することによって体液量と体液 NaCl 濃度を一定に保つ“尿細管—糸球体フィードバック (TGF) 機構”を担う腎臓傍糸球体装置 (JG 装置) の一員である (図 7A)。マクラデンサ細胞管腔側膜の $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ コートランスポータ (NKCC) が管腔液 NaCl センサーとして働き、これによる NaCl 流入が細胞膨張 (膜圧増) を引き起こし [75]、側底側膜上の Maxi-Cl の活性化とそれによる ATP 放出をもたらして、これが輸入細動脈平滑筋へ収縮シグナルを送ることになることが TGF のメカニズムである (図 7B) [66]。マクラデンサ細胞側底側膜には (TRP チャンネルの 1 つと思われる) 非選択性カチオンチャンネルも発現していて [97]、その活性化による脱分極と Ca^{2+} 流入も Maxi-Cl 活性化に関与しているものと推定される。このようにして Maxi-Cl は、生体において膜圧増を検知するセンサー (陽圧センサー) としても働くと共に、オーガニックシグナル (ATP) を放出して下流に情報伝達するエフェクターとしても働き続け、TGF を介して体液 NaCl 濃度を一定にコントロールすることによって体液恒常性維持に貢献している (図 8A)。類似の現象は、膀胱充満検知のメカニズムにも見られることが生理研の富永博士の研究室から報告されている (J Biol Chem 2009)。即ち、

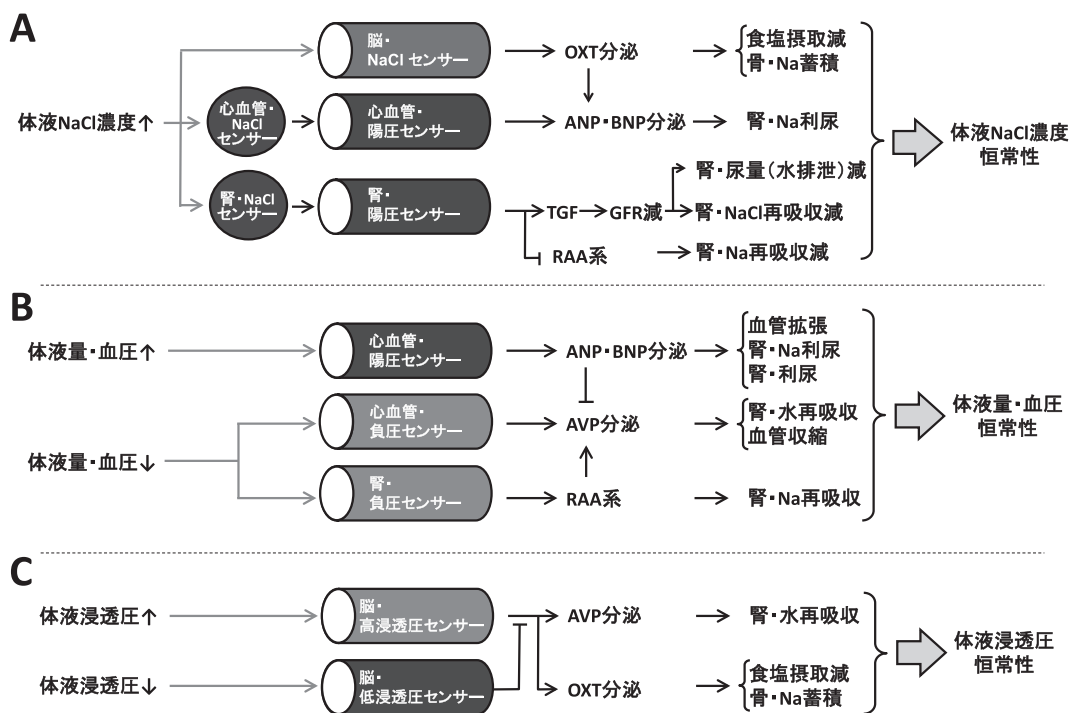


図8. 体液恒常性維持における膜圧（陽圧/陰圧）センサー（圧受容器）、浸透圧センサー（オスモセンサー）およびNaClセンサーが果たす役割の仮説模式図。（円筒形はチャネル、円形はトランスポーターを想定。）TGF：尿細管—糸球体フィードバック，GFR：糸球体濾過率，RAA：レニン—アンジオテンシンII—アルドステロン，AVP：アルギニンバソプレシン，OXT：オキシトシン，ANP：心房性ナトリウム利尿ペプチド，BNP：脳性ナトリウム利尿ペプチド。

膀胱上皮細胞膜上のTRPV4カチオンチャネルが膀胱充満時の膜伸展を検知して細胞内にCa²⁺を流入させるなどして、膀胱上皮細胞からATPを側底側に放出させることによって感覚神経を刺激するというものである。おそらくこのATP放出路にもMaxi-Clが関与するものと推定される。ところで、体液量、即ち血圧、を検知する圧受容器（バロレセプター）は、頸動脈洞や大動脈弓、腎輸入動脈、肺血管壁、心房壁、心室壁などの心血管系に存在することが知られている（図8B）が、この圧受容器の分子実体は未だ不明である。これらの圧受容器からの情報は、一旦液性シグナルに変換されてから伝達されるものと考えられており、頸動脈洞における圧受容器活性は（Maxi-Clのブロッカーである）Gd³⁺によって抑制されることが古くから知られている（Clin Exp Hypertens 1995

Chapleauら）。それゆえ、これらの圧受容メカニズムに、Maxi-Clやそれを介するATP放出が関与する可能性が高い。従って、これらの膜圧センサー・オーガニックシグナル放出チャネルの分子実体を解明することが、圧受容器メカニズムの全容の解明へとつながるものと私は信じている。[教訓その27：生理学研究においても、物理学研究の場合（武谷三段階論）と同様に、機能理解（現象記述）から分子同定（実体解明）を経てはじめてメカニズムの解明（本質把握）に到ることができるのである。]（つづく）

文献

83. Oiki S, Kubo M & Okada Y: Mg²⁺ and ATP-dependence of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells. Jpn J Physiol 44 (Suppl 2):

S77-S79, 1994

84. Morishima S, Shimizu T, Kida H & Okada Y: Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl⁻ channel in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* **50**: 277-280, 2000
85. Shimizu T, Morishima S & Okada Y: Ca²⁺-sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells. *J Physiol (London)* **528**: 457-472, 2000
86. Abdullaev IF, Sabirov RZ & Okada Y: Upregulation of swelling-activated Cl⁻ channel sensitivity to cell volume by activation of EGF receptors in murine mammary cells. *J Physiol (London)* **549**: 749-758, 2003
87. Wehner F, Numata T, Subramaniam M, Takahashi N & Okada Y: Signalling events employed in the hypertonic activation of cation channels in HeLa cells. *Cell Physiol Biochem* **20**: 75-82, 2007
88. Toychiev AH, Sabirov RZ, Takahashi N, Ando-Akatsuka Y, Liu H-T, Shintani T, Noda M & Okada Y: Activation of the maxi-anion channel by protein tyrosine dephosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**: C990-C1000, 2009
89. Okada Y, Oiki S, Hazama A & Morishima S: Criteria for the molecular identification of the volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *J Gen Physiol* **112**: 1-3, 1998
90. Sabirov RZ & Okada Y: ATP-conducting maxi-anion channel: A new player in stress-sensory transduction. *Jpn J Physiol* **54**: 7-14, 2004
91. Sabirov RZ & Okada Y: The maxi-anion channel: A classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J Physiol Sci* **59**: 3-21, 2009
92. Okada Y, Sato K & Numata T: Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol (London)* **587**: 2141-2149, 2009
93. Kajita H, Kotera T, Shirakata Y, Ueda S, Okuma M, Oda-Ohmae K, Takimoto M, Urade Y & Okada Y: A maxi-Cl-channel coupled to endothelin-B receptors in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. *J Physiol (London)* **488**: 65-75, 1995
94. Sabirov RZ, Sheiko T, Liu H-T, Deng D, Okada Y & Craigen WJ: Genetic demonstration that the plasma membrane maxi-anion channel and voltage-dependent anion channels are unrelated proteins. *J Biol Chem* **281**: 1897-1904, 2006
95. Merzlyak P, Okada Y & Sabirov RZ: Maxi-anion channel activity in membrane blebs and after reconstitution in artificial membranes. *J Physiol Sci* **60** (Suppl): S123, 2010
96. Islam MR, Merzlyak P, Okada T, Sabirov RZ & Okada Y: Searching for the molecular basis of maxi-anion channel. *J Physiol Sci* **63** (Suppl 1): S133, 2013
97. Lapointe J-Y, Bell PD, Sabirov RZ & Okada Y: Calcium-activated non-selective cation channel in macula densa cells. *Am J Physiol* **285**: F275-F280, 2003