

## 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3）

総合研究大学院大学 岡田 泰伸

### VI. 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 VSOR の分子同定から細胞生死スイッチと生体恒常性維持の機構解明へ

Maxi-Cl と並ぶ膜圧センサー・オーガニックシグナル放出アニオンチャネルである容積感受性外向整流性アニオンチャネル VSOR の存在の発見は、ヒト上皮細胞で私達 [24] によって、そしてヒトリンパ球で Cahalan ら (Soc Gen Physiol) によって、いずれも 1988 年に独立して行われた。また、その単一チャネル電流の測定は、1994 年に私達 [105, 106] によってはじめて成功された。その後、私達を含めて多くのグループによって、VSOR はほとんどすべての動物細胞に発現しており、共通した特徴的性質 phenotype を示すことが明らかにされてきた [27, 107-109]。この中で、他のアニオンチャネル種と峻別する上で重要な特徴は、外向整流性にあることは前編で述べた通りである。生理学的に重要な性質として第 1 に挙げなければならないのは、京都から岡崎に助教授として私と共に移動してくれた老木君が発見したものである。それは細胞内遊離  $Mg^{2+}$  に対する感受性と細胞内 ATP に対する非水解的依存性である [83]。また、細胞外 ATP によるオープンチャネルブロック [110] は、ポアの性状を知る上で重要な性質である [27]。即ち、これは VSOR のポアの入口や前庭は ATP のサイズ（半径約 0.6 nm）[62, 71] より大きい、ポア最狭部のサイズは ATP より小さいことを意味している。事実、その後の Sabirov 博士らのポア入口・前庭サイズの計測結果（半径約 0.63 nm）[78] は、それを裏付けている。一方、VSOR が ATP 放出路を与えるとの報告が

あったのに対して、私達は薬理的データに基づいて否定的立場を取ってきた [111] が、ATP が VSOR ポアを通過することは生理的条件のもとでは（ポア最狭部は半径 0.63 nm より小さいことから）殆ど起こり得ないことを、この結果は裏付けるものとなったのである。逆に、ポアサイズより小さいものであれば、有機アニオンでさえ VSOR ポアをよく通過できて、それらの放出路が与えられることが予測されたが、事実、VSOR の活性化によってグルタミン酸 [76, 77] などのアミノ酸のみならずトリペプチドであるグルタチオン [81] の細胞外放出も行われることが明らかにされた。[教訓その 31：ドミノ倒しは研究の世界にも起こり、たった 1 つの観察結果が、予期せず多くのことを明らかにすることがある。]

VSOR の生理学的役割は、前編で述べたように細胞容積調節 RVD 実現のための  $Cl^-$  放出路を与えること [24, 26, 27]、そして中編で述べた通りアポトーシス死誘導初期において不可欠の過程として発生する AVD の実現のための  $Cl^-$  放出路を与えること [32, 38, 39, 52, 112-116]、ネクロトーシス死誘導時における NVI 発生の原因となる  $Cl^-$  流入の通路を与えることもあること [50-53, 115, 116]、その活性欠失が癌細胞の抗癌剤耐性獲得の原因ともなること [40, 60]、グルタミン酸 [76, 77] やタウリン [80] やグルタチオン [81] などのオーガニックシグナルの細胞外放出の通路を与えること、更には後編（その 2）で述べたように脳内オスモセンサーの 1 つとしての役割も果たしていること [98, 100] など、多岐にわたる。そして、局所的な細胞容積変動とその調節を不可避的に伴う細胞

移動過程においても、VSOR は重要な役割を果たしているものと推定される [109]. このように VSOR は、ほぼすべての種類の動物細胞に発現していて、細胞の生存に不可欠のマルチな役割と細胞死誘導にも本質的な役割を果たし、種々の状況と局面でその役割を適宜変化させているのである。それゆえに、VSOR 活性化の制御因子も極めて多種存在し、それらのシグナル群間にも複雑な相互作用が横たわっているものと想像される。その詳細な解明には VSOR それ自体の分子同定が必須となるが、逆にこの VSOR の ubiquitous 性と多シグナル制御性が、長年にわたってその分子同定を阻む原因となってきたのである。[教訓その 32：秘宝ほど、多くのペールによって包まれている.]

VSOR の分子同定は、これまで数奇な運命を辿った。1992年に Valverde らが Nature 誌で発表した P 糖タンパク質 (MDR1) 説は、多剤耐性に関与する薬物の排出ポンプ (トランスポーター) がチャンネルに変身 (スイッチ) するものとして大きな注目を集め、その後多数の支持論文の発表が相次いだ。しかし、私達は MDR1 のアンチセンスオリゴが内在性 VSOR 活性に影響を与えないこと [117], そして P 糖タンパク質欠失細胞やその ATP 非水解性変異体の過剰発現細胞でも内在性 VSOR 活性は維持されていること [118, 119] を明らかにし、P 糖タンパク質説を葬り去ると共に、P 糖タンパク質はその ATP 水解能とは無関係に VSOR の容積感受性を亢進するレギュレータにすぎないことを明らかにした [27, 118, 119]. 一方、同じ 1992年に Paulmichl らによって、細胞内可溶性タンパク質である  $pI_{Cm}$  が形質膜に挿入されて (そのときにヌクレオチド結合部位を細胞外に露出した形で) VSOR を形成するという説が、同じく Nature 誌に発表された。私達は、その  $pI_{Cm}$  強制発現細胞に見られる電流の最大の特徴である細胞外 cAMP や cGMP による抑制が内在性 VSOR 電流では再現されず、むしろ cAMP では逆に亢進され、cGMP では全く影響を受けないという事実 [27, 110] から強い疑義を持っていた。そしてベルギーの Nilius のグループが、その性質は VSOR

とは決定的に異なり、むしろ CIC-6 電流を記録していたものと断定し、 $pI_{Cm}$  説は否定された (J Physiol 1996; J Biol Chem 1997). P 糖タンパク質の“トランスポーター/チャンネル両機能スイッチ説”と同様に、この  $pI_{Cm}$  の“細胞質タンパク質形質膜挿入説”も人を引き付ける魅力的な仮説であり、世界中で多数の研究者が追従してペーパー数を増やすことにかまけるか、真面目にその検証に時間と金を無駄にした。[教訓その 33：週刊誌的なうまい話には気を付けよう.]

数年の後の 1997 年 9 月に私は、VSOR 分子同定には今や fresh start が必要であると国際誌 [27] に訴えかけたところ、同年暮に早速これに応えた手紙を添えて Hume らがこれまた Nature 誌に掲載が受理されたばかりの論文のプレプリントを送って来た。そこには、これこそが VSOR 分子であるという CIC-3 説が提出されていた。その後、この説は新パラダイムとなり、多数の追従論文を生んだが、今や世界でこれを信ずるのは Hume とその弟子達だけとなっている。というのは、CIC-3 ノックアウトマウスを作製し、その肝細胞と膵腺房細胞の VSOR 電流を測定したところ、野生型のものとは差異が見られないことを Jentsch らのグループが発表 (Neuron 2004) したからである。そしてその後、それでも心筋細胞 VSOR は CIC-3 であると固執した Hume らに対し、私達は心筋細胞においてもこの説は正しくないことを、やはりノックアウトマウスを用いて証明したからである [120, 121]. しかし、CIC-3 の未クロニングのアイソホーム CIC-3d が関与する可能性は残されていたが、この可能性も岡田俊昭君 (現生理研特任准教授：私との間に血縁関係はない。念のため。) が最近フルクロニングした上で棄却してくれた [122]. その後、Kunzelmann らのグループが、 $Ca^{2+}$  賦活性  $Cl^{-}$  チャンネル (CaCC) として同定された TMEM16A (ANO1) の同族メンバーである TMEM16F (ANO6) が VSOR を構成すると報告 (J Biol Chem 2009; PNAS 2011) したが、これも正しくないことが富山大に移動していた清水君によって明確に示された [123]. VSOR 発見の 1988 年来、既に 25 年以上にわたってこのチャンネルに携

わって来たので、この研究を共にする数多くの友人を得て来たが、時としてその内の少なくない人々を科学上で敵にまわすことになった。しかし、これと友情とは別物である。[教訓その34：サイエンスでは“敵”も“味方”も仲間達である（はずである！）。]

CIC-3説が崩壊して以来、私達もゲノムワイドに立ち帰っての独自の取り組みを行って来た。その方法を詳しく述べることは今はまだできないが、多数の候補分子を1つ1つ遺伝子サイレンシングとパッチクランプでスクリーニングしていくという膨大な作業と時間と資金を要するものであった。そして、いくつかの有力候補分子を手にしたのが、やっと私の生理研退職が迫る2013年はじめのことである。退職後も引き続きこの中から最終候補を絞る努力をしていた折の、しかも私が総研大学長に就任したばかりでバタバタしていた2014年4月2日に、青天の霹靂のコンフィデンシャルな知らせが2つほぼ同時に届いた。即ち、Patapoutianのグループ (Cell 2014) と Jentschのグループ (Science 2014) から、同じゲノムワイド siRNA スクリーニング法を用いて、これまで機能が不明のタンパク質である LRRC8A が VSOR のエッセンシャルなコンポーネントであるとの報告が、4月10日付で同時にオンライン出版されるというのである（これは単なる偶然なのか?!）。しかし、よく吟味してみると、LRRC8A の強制過剰発現によって内在性 VSOR 電流はかえって抑制され、LRRC8A とそのサブコンポーネントと想定されている他のアイソホーム (LRRC8B/C/D/E) とを共発現させても内在性 VSOR 電流は亢進されず、膜貫通領域にあって細胞外からアクセス可能なポアと予測される領域の中性アミノ酸の陰性荷電アミノ酸や陽性荷電アミノ酸への置換によっても、アニオン選択性に変化が出ないなど、不審な点が多い。少なくとも、LRRC8 メンバー以外のコンポーネントも必要であること、そして LRRC8A そのものがポア形成に関わる証拠は未だ存在しないことは明確であり、私達はすぐさまそれらの点を英文総説で指摘した [109]。更には、LRRC8A ノックアウトマウスは致

死性ではなく、Bリンパ球分化に異常が見られる以外、ほぼ正常である事実 (J Clin Invest 2003 Sawada ら) にも注目する必要がある。確かに私達のグループも、LRRC8A の遺伝子サイレンシングで、内在性 VSOR 活性は抑制されることを確認はしているが、それがポアであるという証拠は得られておらず、むしろそうでない可能性を示唆する事実をいくつか得ている。更に、前述したように LRRC8 以外にも、いくつかの候補分子を手に残している。それゆえ、LRRC8A 説の提出によって VSOR 分子同定は新しい段階に入ったことは確かであるが、それを踏まえての更なる fresh restart が必要である。私達は以前、VSOR 分子同定のクライテリアとして、①その遺伝子のノックダウン又はノックアウトによって内在性 VSOR 電流が減弱・消失すること、②その遺伝子の強制過剰発現で VSOR 特異的性質をすべて兼ね備えた電流が出現・亢進すること、③内在性 VSOR 活性を示す細胞にはその遺伝子とタンパク質が発現していること、④アミノ酸の変異で（特に荷電依存的に）VSOR ポア性状の変化がもたらされること、の4点を提唱した [89]。このクライテリアを満たす分子の同定に向けた取り組みこそが必要である。これまで繰り返されてきた同じ轍を踏んではならないからである。LRRC8A 説の登場によって、この分野の研究は世界で益々活況を迎え、私達は大変嬉しいが、一方で競争も激化することだろう。私達は、はやる心は抑えつつ、競争にもそれなりに心して、王道を駆け抜けなければならない。[教訓その35：「百里を行く者は九十を半ばとす」と言いかけつつも、一里毎に自分の標も残したい、これが研究者根性の矛盾である。] (つづく)

## 文 献

105. Okada Y, Petersen CC, Kubo M, Morishima S & Tominaga M: Osmotic swelling activates intermediate-conductance Cl<sup>-</sup> channels in human intestinal epithelial cells. *Jpn J Physiol* 44: 403-409, 1994
106. Petersen CC, Kubo M, Morishima S, Tominaga M & Okada Y: Single-channel recordings of volume-

- sensitive  $\text{Cl}^-$  channels in human intestinal epithelial cells. *Jpn J Physiol* **44** (Suppl 2): S73–S75, 1994
107. Okada Y, Kubo M, Oiki S, Petersen CC, Tominaga M, Hazama A & Morishima S: Properties of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channels in a human epithelial cell line. *Jpn J Physiol* **44** (Suppl. 2): S31–S35, 1994
  108. Okada Y: Cell volume-sensitive chloride channel: Phenotypic properties and molecular identity. *Contrib Nephrol* **152**: 9–24, 2006
  109. Akita T & Okada Y: Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience* **275**: 211–231, 2014
  110. Tsumura T, Oiki S, Ueda S, Okuma M & Okada Y: Sensitivity of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  conductance in human epithelial cells to extracellular nucleotides. *Am J Physiol* **271**: C1872–C1878, 1996
  111. Okada Y, Hazama A, Abdullaev I, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Sabirov RZ, Hayashi S & Fan H-T: Cell volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel and ATP release. In: *Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels*, Eds. Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y & Wright EM, Elsevier, Amsterdam, pp 261–264, 2000
  112. Ise T, Shimizu T, Lee EL, Inoue H, Kohno K & Okada Y: Roles of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel in cisplatin-induced apoptosis in human epidermoid cancer cells. *J Membr Biol* **205**: 139–145, 2005
  113. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X & Takahashi N: Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* **209**: 21–29, 2006
  114. Okada Y & Maeno E: Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol Part A* **130**: 377–383, 2001
  115. Okada Y, Maeno E & Mori S: Anion channel involved in induction of apoptosis and necrosis. *Adv Exp Med Biol* **559**: 205–209, 2004
  116. Okada Y, Maeno E & Mori S: Essential role of anion channel in induction of apoptotic and necrotic cell death. In: *Ion Channels in the Pulmonary Vasculature*, Yuan JX-J, Ed. Taylor & Francis, Boca Raton, pp 527–544, 2005
  117. Tominaga M, Tominaga T, Miwa A & Okada Y: Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J Biol Chem* **270**: 27887–27893, 1995
  118. Miwa A, Ueda K & Okada Y: Protein kinase C-independent correlation between P-glycoprotein expression and volume sensitivity of  $\text{Cl}^-$  channel. *J Membr Biol* **157**: 63–69, 1997
  119. Okada Y, Oiki S, Tominaga M, Kubo M, Miwa A, Tominaga T, Tsumura T & Ueda K: Volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel in human epithelial cell: Regulation by ATP and relation to P-glycoprotein. *Jpn J Physiol* **47** (Suppl 1): S19–S20, 1997
  120. Gong W, Xu H, Shimizu T, Morishima S, Tanabe S, Tachibe T, Uchida S, Sasaki S & Okada Y: CIC-3-independent, PKC-dependent activity of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel in mouse ventricular cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* **14**: 213–224, 2004
  121. Wang J, Xu H, Morishima S, Tanabe S, Jishage K, Uchida S, Sasaki S, Okada Y & Shimizu T: Single-channel properties of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel in CIC-3-deficient cardiomyocytes. *Jpn J Physiol* **55**: 379–383, 2005
  122. Okada T, Akita T, Sato-Numata K, Islam MR & Okada Y: A newly cloned CIC-3 isoform, CIC-3d, as well as CIC-3a mediates  $\text{Cd}^{2+}$ -sensitive outwardly rectifying anion currents. *Cell Physiol Biochem* **33**: 539–556, 2014
  123. Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H & Okada Y: TMEM16F is a component of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**: C748–C759, 2013