

岡崎国立共同研究機構生理学研究所 教授

岡田 泰伸

「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

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。浸透圧性膨張後の容積調節は Regulatory Volume Decrease (RVD)、浸透圧性収縮後の容積調節は Regulatory Volume Increase (RVI) と呼ばれる。このような容積調節機構は細胞機能・細胞増殖・細胞生存に不可欠である (Okada ed. 1998 “Cell Volume Regulation” Elsevier)。本研究では (特にその前半期においては)、これらの細胞容積調節の分子メカニズムの解明に取り組んだ。これらの細胞容積調節は、細胞が死へと向かう過程や、虚血などの病的条件下において破綻することが知られている。そこで本研究では (特にその後半期においては)、細胞容積調節の破綻の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

岡田グループ (岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

まず第一に、RVD に関与するチャネル、トランスポーター、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ための研究を行った。その結果、上皮細胞やニューロンの RVD を実現する Cl⁻流出をもたらす Cl⁻チャネルは容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネル (VSOR) であり、その分子実体であると提唱された P 糖蛋白や CIC3 はいずれも正しくないことを明らかにした。上皮細胞の RVD を実現する K⁺流出をもたらす Ca²⁺依存性チャネルは IK1 であることを明らかにした。VSOR は膨張細胞から細胞外に汲み出された Ca²⁺による Ca レセプター (CaR) 刺激によって、IK1 は膨張細胞から流出した ATP による P2 レセプター刺激によって、いずれもオートクリン的に促進されることを明らかにした。またこの ATP 放出路として新たに容積依存性 ATP 伝導性マキシアニオンチャネル (VDAcL) を同定した。また、RVD を最終的に達成する水流出は、アクアポリン水チャネル (AQP3) であることを証明した。

第二に、アポトーシス性細胞死における容積調節破綻とそのメカニズムを解明するための研究を行った。その結果、アポトーシス過程のアポトーシス小体形成以前に発生する細胞縮小化 Apoptotic Volume Decrease (AVD) の進行時には、RVD の異常亢進が伴われること、即ち、容積調節に関与する K⁺チャネル及び Cl⁻チャネルが異常に (細胞膨張なしに) 活性化していることを明らかにした。またこの AVD はカスパーゼ活性化の上流にあり、この AVD を阻止すればアポトーシス死が救済されることをはじめて明らかにした。

第三に、ネクロトーシス性細胞死における容積調節破綻とそのメカニズムを解明するための研究を行った。その結果、ネクロトーシス過程の初期にみられる細胞腫脹化 Necrotic Volume Increase (NVI) は、細胞外からの Na⁺をはじめとする浸透圧性分子の流入によることと、その後の膨張後の容積調節、即ち RVD、の抑制が伴われていることを明らかにした。この RVD の抑制は VSOR の抑制が最大の原因であることを明らかにした。また、乳酸アシドーシス条件下における NVI は、アニオンチャネルの人工的・外来的導入によって完全に消去されることを明らかにした。

第四に、虚血条件下において発生する細胞死に関する研究を行った。その結果、in vivo 虚血を受けた脳で発生する海馬ニューロンのこれまでアポトーシスの一種と推定されてきた遅発性神経細胞死にも事実 AVD が伴われることを明らかにした。更には主としてネクローシスによる虚血性心筋細胞死に対して、CFTR Cl⁻チャンネルが防御的に関与することをはじめて示した。

曾我部グループ (名古屋大学大学・医学部) : 前半期

本研究では 1) アフリカツメガエル腎臓由来の cell line , A6 細胞やイヌ腎臓由来の cell line , MDCK 細胞を用いて、細胞膨張から RVD に至る細胞内シグナリング機構を明らかにすることと、2) 細胞膨張の感知に関与する機械受容体の分子実体を明らかにすることの 2 点を主要な目的とした。その結果、まず第一に A6 上皮細胞の Ca²⁺を中心とする RVD の細胞内シグナリングカスケードを明らかにした。第二には RVD に関する Ca²⁺透過性の機械受容カチオンチャンネル分子の探索を行い、酵母のその遺伝子 mid1 を同定した。

河原グループ (北里大学・医学部) : 前半期

体液浸透圧の恒常性維持のために特異な浸透圧環境におかれている腎臓は、独自の細胞容積調節能を発達させている。腎集合管に発現する Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1), Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)は、高浸透圧による細胞収縮時に Na⁺流入路として元の細胞容積に復することに寄与し、尿素トランスポータ(UT-A1, UT-A2)は、尿細管細胞内外の実質的浸透圧差を緩和する働きを持っていると考えられる。われわれは、ラット腎髄質内層集合管の初代培養細胞を用い、浸透圧に応答する NHE1, NKCC1 や UT-A1, UT-A2 の mRNA 発現量の時間変化を調べた。一方、細胞容積維持に必要なエネルギーの確保のため、虚血時には細胞内 ATP 産生を促進し、消費を減ずる機構が存在すると考えられる。体内のほとんどすべての細胞において静止膜電位の形成に寄与する内向き整流性 K⁺チャンネルは、虚血に応答して発現量が増加することが推定される。われわれは、正常および脳虚血ラットモデルを用い、脳神経細胞内における内向き整流性 K⁺チャンネル Kir6.1 蛋白の発現分布を免疫組織化学法で調べた。

野間グループ (京都大学・医学部) : 前半期

心筋細胞の RVD のメカニズムとについて研究し、細胞膨張時に活性が増大する遅延整流性 K⁺チャンネル(KVLQT)と、βレセプター刺激によって活性化する CFTR Cl⁻チャンネルによって RVD が達成されることを明らかにした。

若林グループ (国立循環器病センター研究所) : 前半期

Na⁺/H⁺ antiporter (NHE)による細胞容積調節機構について研究を行った。NHE は、さまざまな細胞の主要な Na⁺流入経路であり、容積調節に中心的役割を果たす。NHE は高浸透圧

刺激によって活性化され、その結果 Na^+ 流入が亢進し、それに伴って H_2O が細胞内に流入することで RVI が起こる。しかし、その分子メカニズムについては明らかにされていなかった。私達は、NHE 分子内に内蔵されると考えられる“容積センサー”を同定し、NHE による容積変化の感知機構、それによって NHE が活性化される分子機構を明らかにする目的で研究を行った。

古家グループ（京都工芸繊維大学・繊維学部）：前半期

機械刺激の一種でもある浸透圧変化は細胞の容積変化を起こすが、その過程において ATP 放出と ATP 受容体の活性化が働いていることが示唆されている。本研究は機械刺激（低浸透圧刺激）による ATP 放出の機序及び放出 ATP による細胞での受容体の活性化の機序を明らかにすることにより、細胞容積調節における ATP の役割を明らかにすることを目的とした。

西野グループ（名古屋市立大学・医学部）：前半期

コハク酸脱水素酵素を非可逆的に阻害する 3-ニトロプロピオン酸 (3-NPA) をラットに全身投与すると、両側の線条体が特異的に傷害された。急性毒性モデル (3-NPA 20 mg/kg, s.c., 2-3 回) では、NO 代謝の亢進とドパミン代謝の高進により外側線条体動脈が特異的に傷害されて、アストロサイトのネクロシス、血球の浸潤、血漿成分の漏出が起こり、典型的な炎症反応を呈した。慢性毒性モデル (3-NPA 10 mg/kg, s.c., 1-2 ヶ月) では、グルタミン酸毒性によるニューロンのアポトーシスが起った。この 3-NPA 傷害は、線条体出血、肝脳変性疾患、神経免疫障害、神経変性疾患（ハンチントン病）の病態を解析する良いモデルといえる。脳虚血では、虚血コア部位の細胞は細胞死に陥る。このコア部位の一次的な細胞死はなかなか防ぎようがないが、二次的に起こる血液脳関門 (BBB) の破綻及び脳浮腫を如何に制御出来るかが、臨床的予後に大きな意味を持つ。本研究において BBB の破綻及び脳浮腫はアストロサイトの活性化と水チャネル蛋白 (AQP-4) の活性化に大きく依存すること、またメラトニンはアストロサイト細胞死及び脳浮腫の発生を抑制することを明らかにした。

塩田グループ（昭和大学・医学部）：後半期

本研究は、虚血性神経細胞死を細胞容積調節異常の観点から分類し、神経細胞死の機序を新たな切り口で明らかにすること、また、細胞容積調節異常の制御により虚血性神経細胞死の進展を抑制しうるかどうかを目的とし実験・観察を行った。脳虚血性神経細胞死の誘導にはグルタミン酸、サイトカイン、アラキドン酸カスケード、接着分子、フリーラジカルや NO などが関与することが示唆されている。しかし、その詳細な作用機序などはほとんどわかっていない。そこで我々は、炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- α) の遺伝子欠損マウスを用いて実験を行い、虚血性神経細胞死誘導機序を明らかにした。更に虚血時に細

胞容積調節異常が生じているか否かを幼弱マウス前脳虚血により検討した。海馬生細胞スライスを作成し、多光子共焦点レーザー顕微鏡により直接細胞容積を測定したところ細胞容積縮小に伴い細胞死が認められた。これらの結果、脳虚血時には細胞容積調節異常が生じ、神経細胞死が誘導される全く新しい細胞死誘導機構を明らかにした。

稲垣グループ (秋田大学・医学部) : 後半期

ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルは細胞内 ATP レベルを感知して開閉する K^+ チャンネルであり、虚血時に開口し細胞膜を過分極させ細胞興奮を抑制することにより ATP 消費を抑制すると考えられている。一方、従来より脳の黒質網様部に K_{ATP} チャンネルが豊富に発現していること、またこの部位が全身痙攣の発症に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、我々はまず K_{ATP} チャンネルのノックアウト (KO) マウスを用いて、特に黒質網様部に焦点を当てて虚血時における K_{ATP} チャンネルの役割について検討した。その結果、黒質網様部ニューロンには腓 β 細胞型 K_{ATP} チャンネルが発現し、代謝阻害時においてこのチャンネルが開口することによって細胞膜は過分極し細胞活動を抑制することが明らかになった。その結果、虚血時には黒質網様部ニューロンの活動が抑制されることにより、全身痙攣の発症が抑制される可能性が示唆された。さらに、 Cl^- チャンネルについても、 $ClC-2$ が細胞周期 M 期の分裂細胞に特異的に発現し、M 期特異的サイクリン依存性キナーゼによりチャンネル活性が修飾されること、 $ClC-3B$ が $EBP50$ の PDZ ドメインを介して $CFTR$ と空間的にカップリングし、 $CFTR$ の発現を促進することを明らかにした。

坪川グループ (岡崎国立共同研究機構・生理学研究所) : 後半期

てんかん発作など過剰な神経活動に伴って、脳組織の腫脹が起こることが知られている。この容積変化と神経活動との関連を調べてゆくため、海馬スライス標本における細胞容積変化を光学的にイメージするシステムを構築し、CA1 野の細胞容積が増加するメカニズムを解析した。その結果、過剰なシナプス入力によるニューロンの膨張には、グルタミン酸受容体の活性化だけでなく、 $GABA_A$ 受容体の活性化が寄与することが明らかとなった。この膨張は電気刺激終了後 2 分程度で回復しており、細胞には容積の増加を速やかに元に戻すメカニズムが存在すると思われる。容積減少は主に K^+ と Cl^- の流出によると考えられるので、これらを通すイオンチャンネルやトランスポータの薬理的阻害の効果を検討した。その結果、4-AP および TEA 感受性の電位依存性 K^+ チャンネルを介するイオン流出が容積増加の回復に寄与していることが明らかとなった。さらに、2 光子レーザー顕微鏡を用いて単一ニューロンの形態変化を解析したところ、シナプス入力による容積増加は樹状突起の基部で有意に認められた。

2. 研究構想

すべての動物細胞の容積は固有のレベルに保たれており、たとえ異常浸透圧にさらされ

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。本研究では、第一にこれら細胞容積調節の分子メカニズムの解明をめざす。とくに細胞容積調節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。続いてこれを基礎に、病的条件下における容積調節メカニズムの破綻とそれによる細胞死誘導の分子機構の解明をめざす。とくに虚血性細胞死及びプログラム細胞死と細胞容積調節異常の関係を明らかにする。これらによって、病的条件下における容積調節破綻を防御し、細胞死から救済するための分子戦略を確立する道を拓く。

岡田グループ

虚血などの病的条件下において、細胞は死へと向かうが、その死のありかたにはアポトーシス性のものであり、ネクローシス性のものでありの二種類に大別される。アポトーシスには持続性の細胞縮小化が、ネクローシスにはその増大化が伴われることはよく知られている(図1)。

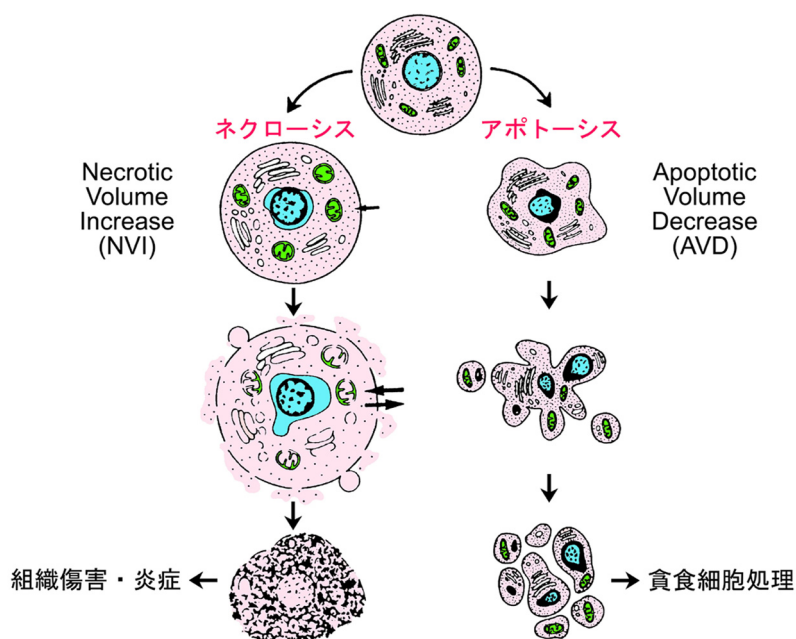


図1. アポトーシス死とネクローシス死の初期相における容積変化(容積調節異常)

一方、殆どどの細胞は正常条件下においてはその容積を調節する能力を持っている。従って、アポトーシス性容積減少(AVD)やネクローシス性容積増加(NVI)にはこれらの容積調節メカニズムが破綻しているものと考えられた。そこで本研究では、まず第一に容積調節、特にRVD、の分子メカニズムの詳細を明らかにし、それを基礎にして虚血条件下や細胞死誘導過程における細胞容積調節の破綻の分子メカニズムを解明するという構想を立てた。これによってその破綻を防御し、病的条件下における細胞死の救済を可能とする

分子戦略を確立する道も拓かれ得ると考えたからである。

曾我部グループ

細胞に低浸透圧刺激を与えると、水の細胞内浸透による受動的膨張に引き続いて、能動的に元の容積に復帰する **regulatory volume decrease (RVD)** が観察される。多くの上皮系細胞では、RVD は細胞からの K^+ と Cl^- の流出と、それに伴う水の流出によることが分かっている。問題は、細胞膜の K^+ と Cl^- の透過性（コンダクタンス）の制御機構である。 K^+ と Cl^- の流出は電気的中性の原理の制約下で移動するので、少なくとも両コンダクタンスは同時に上昇しなければならないが、その制御機構が両者で共通なのか独立なのかは明らかではない。これまでの知見で、 K^+ コンダクタンスの上昇には細胞内 Ca^{2+} の上昇が必要であるが、 Cl^- コンダクタンスの上昇については必ずしも Ca^{2+} 上昇を必要としない例も知られている。細胞によってその制御機構にはバリエーションがあるようである。いずれにせよ上皮細胞では RVD には細胞内 Ca^{2+} の上昇が必要であり、その分子メカニズムの解明が最重要課題の一つである。

河原グループ

多種多様な膜輸送体を発現している動物細胞が、生命活動に必要な物質輸送にかかわらずその固有の容積を維持し破綻しないためには、個々の細胞が容積調節能を持っているなければならない。また、細胞外液のイオン環境や浸透圧変化、虚血等による細胞機能が低下した場合においても、細胞傷害を最小にするためには、環境変化の影響を最小限にするような機能が必要である。われわれは、浸透圧変化に応答するトランスポータの発現量を調べる事により、腎髄質集合管細胞が高浸透圧に耐えられる機構の一部を明らかにできると考えた。また、虚血に弱い脳を用い、正常時の脳内分布や虚血時の発現量変化を調べる事により、内向き整流性 K^+ チャンネル Kir6.1 の機能の解明を試みた。

野間グループ

心血管（冠動脈）の循環不全は狭心症や心筋梗塞をもたらすが、この際、心筋虚血部位では細胞が著しく腫大している。また、心臓移植において保存液中で心筋細胞の腫大が認められている。一方で、細胞の容積が変化すると心筋の収縮が著しく変化することが知られている。これらの細胞反応のメカニズムとして、まず、心筋細胞における容積調節のメカニズムを明らかにすると同時に、容積変化による心筋の膜興奮と収縮の連関、筋収縮の分子メカニズムに対する影響のメカニズムを明らかにする必要がある。我々はまず、心筋の細胞容積調節の中でも、細胞膜を介するイオンやアミノ酸の輸送による速い調節のメカニズムについて研究することにした。

若林グループ

私達の研究の特色は、NHE 分子にさまざまな変異を導入し、その結果起こる容積調節の変化を検討することによって容積調節の分子機構を明らかにすることである。そのためにまず重要なことは、接着細胞の容積変化を測定する系を開発することである。私達はまず、細胞外液に膜不透過性蛍光試薬を加えて、細胞の“影”をコンフォーカル蛍光顕微鏡で観察するという方法で、光退色がまったく問題にならない条件で細胞容積を測定する系を開発した。また、高浸透圧で活性化される NHE1 と活性化されない NHE2 という二種類の NHE アイソフォームを利用し、高浸透圧刺激に対する異なった反応が分子内のどのドメインに帰着して起こるかを明らかにすることによって、推定される“容積センサー”を明らかにしようと試みた。

古家グループ

ATP (その他のヌクレオチドも含め) はエネルギー物質、核酸物質として細胞内で一定に保たれている重要な物質であるが、同時に、現在ほとんどの細胞系、組織に細胞外の ATP や各種ヌクレオチドを感受する ATP リセプターが存在し、また刺激に応じて ATP を放出する機構が存在することことがわかってきた。細胞外では分解酵素によって ATP は速やかに分解、吸収される。即ち ATP はこれらの細胞系あるいは組織において普遍的な細胞外情報伝達分子として働いていると考えられるようになってきた。これは細胞外に豊富にあり細胞内からは排除されている Ca^{2+} が普遍的な細胞内情報伝達物質として働いているのと対照をなしている。私達は乳腺培養細胞などにおいて機械的刺激による ATP 放出とそのパラクリン作用としての細胞間相互作用の存在を明らかにしようとした。

西野グループ

ミトコンドリア呼吸鎖の障害を引き起こす 3-NPA をラットに投与すると、線条体細胞が特異的に障害されハンチントン病様の運動症状を示す。一方、中大脳動脈虚血再開通動物においては、虚血コア部位 (線条体と大脳皮質) の細胞死とその周辺部におけるアストロサイトの活性化が認められる。この2つの実験系をもちいて細胞死が起こるメカニズム、神経細胞及びアストロサイトの容積変化、水チャネル蛋白の発現動態を解析し、脳細胞容積調節機構の分子機構を検討するとともに、それらの破綻が細胞死へつながる過程及びその防御法を開発することを目的とした。この線条体を中心とする脳細胞死のメカニズムが明らかになりその防御法が開発されると臨床的意義は大きいからである。

塩田グループ

本研究は、虚血性神経細胞死を細胞容積調節異常の観点から分類し、神経細胞死の機序を新たな切り口で明らかにすることを目的に行った。炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- α) は神経細胞死誘導への関与が示唆されているもの明確な報告はない。一方、Maeno et al.

(2000) は、*in vitro* の実験で TNF- α 誘導アポトーシスの過程は細胞容積調節の変化に伴い、アニオンチャンネルブロッカーにより抑制されることを見出した。以上の知見に基づき、以下の実験、研究を行なう。1. 炎症性サイトカインが虚血性神経細胞死に対し、関与するか否かを遺伝子欠損マウスを用い証明する。2. 脳虚血時の神経細胞の細胞容積を測定し、神経細胞死誘導時の細胞容積の変化を測定する。そして、上記炎症性サイトカインの神経細胞死誘導機構における細胞容積調節の生理的意義を解明する。

稲垣グループ

神経細胞容積調節の多くのステップは細胞内 ATP に依存する。従って虚血時に細胞内の ATP レベルの維持がその破綻防御に重要である。ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルは細胞内 ATP レベルを感知して開閉する K^+ チャンネルであり、虚血時に開口し細胞膜を過分極させ細胞興奮を抑制することにより ATP 消費を抑制すると考えられる。 K_{ATP} チャンネルが豊富に発現している黒質は痙攣の発症に深く関与することが知られており、 K_{ATP} チャンネルの KO マウスを用いて、虚血による黒質神経細胞の代謝抑制がもたらす痙攣発症への影響を観察し、虚血時における細胞内 ATP 消費の抑制という観点から細胞容積調節破綻の防御のための分子戦略を検討する。さらに容積感受性 Cl^- チャンネルに関しては、これまでにその分子実体が明らかでない。我々は、*yeast two hybrid* 等の手法を用いて CFTR に共役するような Cl^- チャンネル、あるいは $ClC-3$ を活性化するような蛋白質の単離を試みており、神経細胞容積調節の分子基盤を明らかにする。

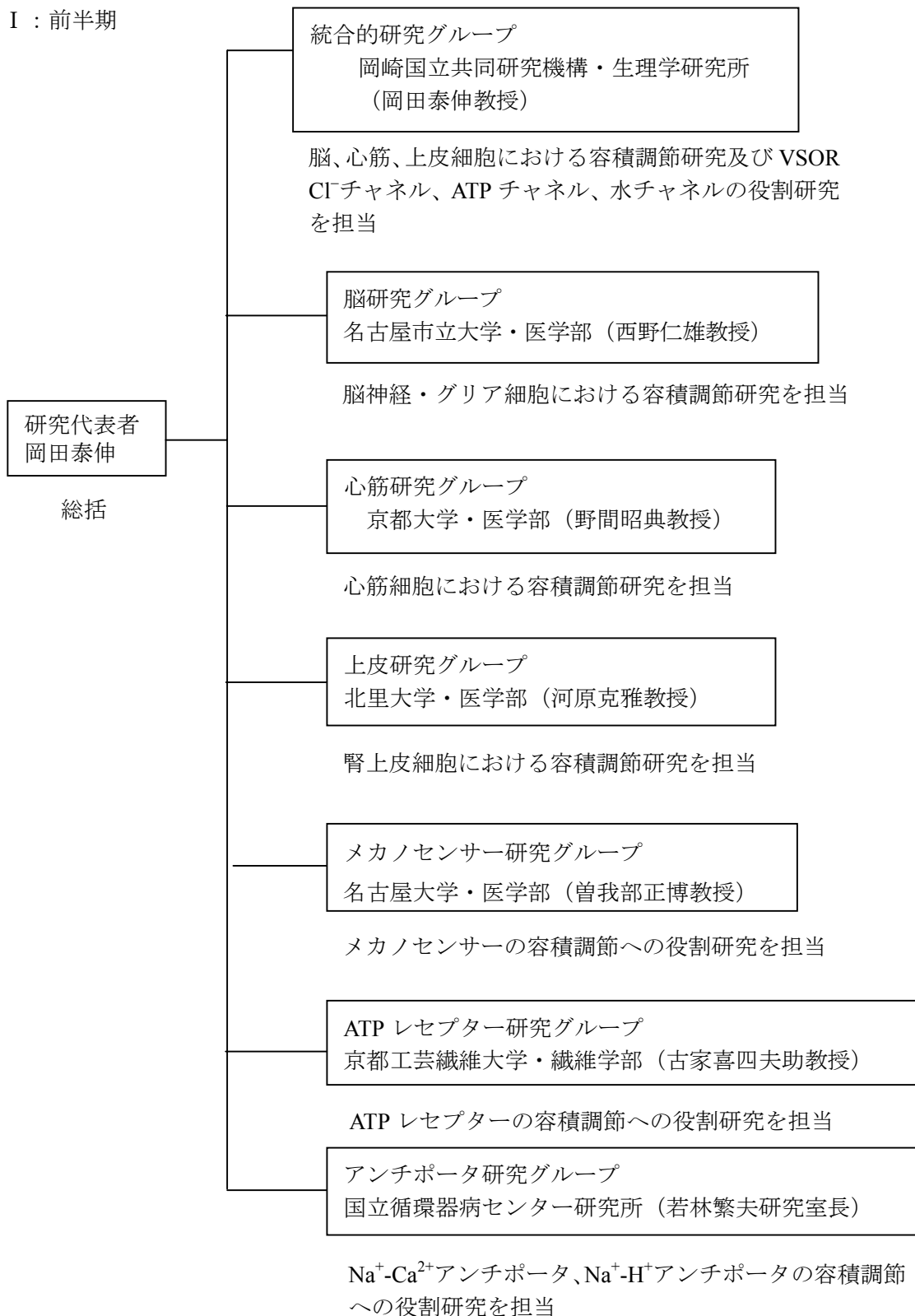
坪川グループ

脳細胞では、てんかん発作、虚血侵襲の急性期などに細胞膨張が見られ、遅発性細胞死やアポトーシスの過程では持続的な容積減少が観察される。しかしながら、これらの容積異常が神経傷害の過程でどのような意味を持つのか不明である。そこで本研究では、種々のニューロン活動の変化と容積変化との関係を解析し、興奮性調節と容積調節の両メカニズムに関与する分子の機能連関を明らかにすると共に、それらの破綻と病態との関連を明らかにすることを目指す。海馬など細胞が高密度に存在する脳内部位では、細胞が容積変化を起こすと、一定体積あたりの細胞と細胞間隙の占有パターンが変わり、それに応じて近赤外光の透過率が変化することが知られている。この性質を利用して、海馬スライス標本から電気生理学的記録を行うと共に、光学シグナルのイメージングを行ない、興奮性変化と容積異常の時間的・空間的特性を解析することが可能であると考えられた。

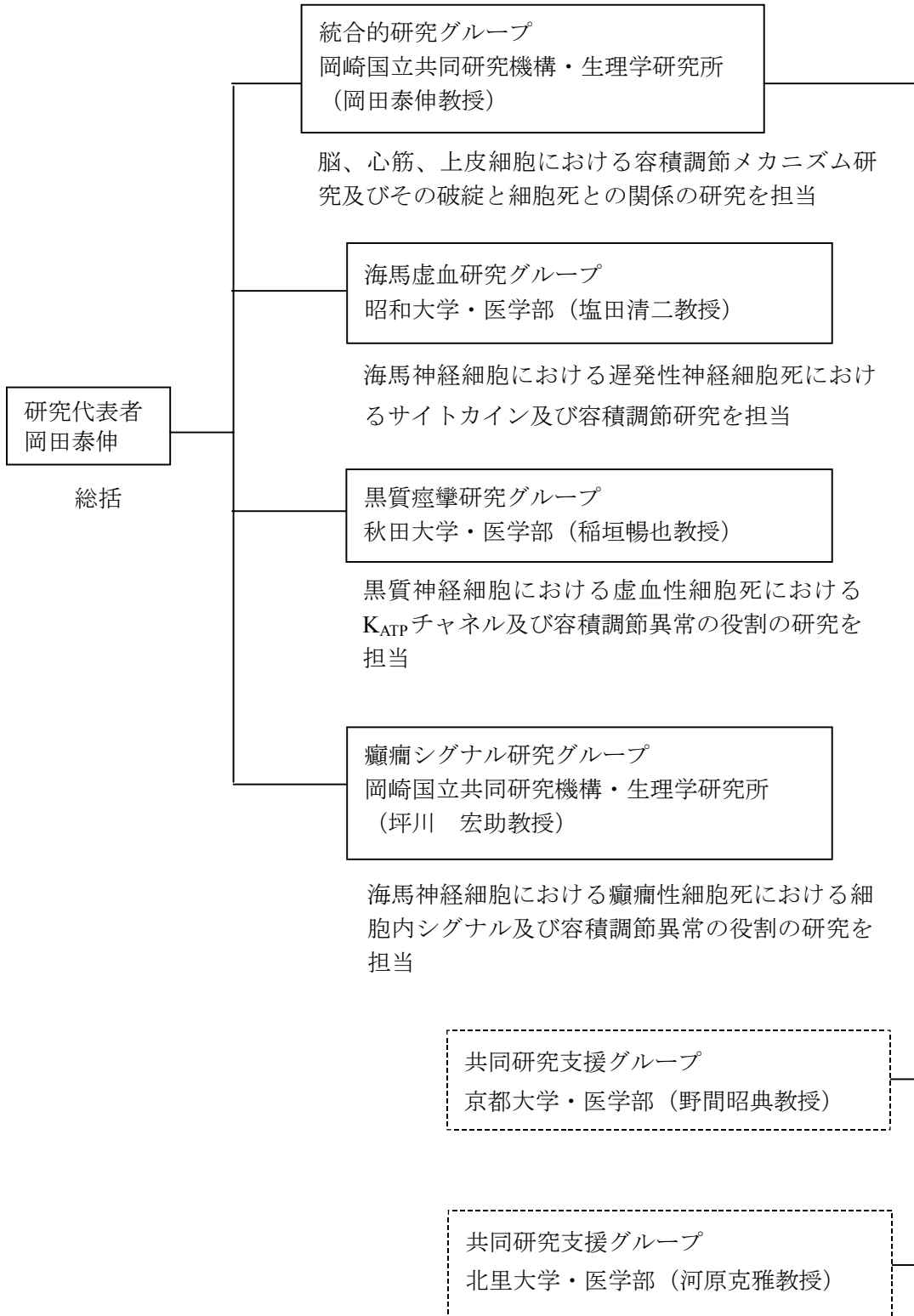
3. 研究実施体制

(1) 体制

I : 前半期



Ⅱ：後半期



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

岡田グループ

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H9. 12. 20	公開シンポジウム 「チャンネルとトランス ポータの構造・機能協関」	アルカディア 市ヶ谷	150 人	重点領域研究公開 シンポ
H10. 10. 14	生理研セミナー	生理学研究所	30 人	カプサイシンレセ プターチャンネル講 演
H10. 10. 15	第 71 回日本生化学会大 会シンポジウム	名古屋国際会議 場	250 人	チャンネル／トラン スポータの構造・機 能・疾病についての シンポジウム
H11. 3. 12-13	第 3 回 ABC 蛋白とイオ ンチャンネルシンポジウム	京大会館	150 人	ABC 蛋白とイオン チャンネルに関する 遺伝子から病気ま でのシンポジウム
H11. 8. 24-28	第 1 回 ICSDT 国際カンフ ァレンス	静岡コンベンシ ョンアーツセン ター	250 人	ナトリウム依存性 輸送蛋白質および イオンチャンネルの 調節と疾病に関す る国際会議
H11. 8. 31	生理研セミナー	生理学研究所	30 人	アラバマ大 Fuller 博士による Ca^{2+} 依 存性 Cl^{-} チャンネル講 演
H12. 2. 14	CREST 成果報告会	生理学研究所	45 人	
H12. 9. 21-24	腎臓学の最前線	湘南村センター	105 人	膜輸送蛋白の調節 についての国際シ ンポ
H12. 11. 20	CREST 成果中間報告会	生理学研究所	25 人	
平 H12. 1. 26-27	第 4 回 ABC 蛋白とイオ ンチャンネルの国際カンフ ァレンス	京都国際会議場	130 人	ABC 蛋白とイオン チャンネルに関する 遺伝子から病気ま でのシンポジウム
H13. 3. 30	第 78 回日本生理学会大 会 シンポジウム	京都同志社大学	250 人	タンパク質相互作 用によるイオンチ ャネルの制御につ いて
H13. 5. 30	第 54 回日本細胞生物学 会大会シンポジウム	岐阜長良川国際 会議場	200 人	アポトーシス誘導 と阻害の分子細胞 生物学的新展開に ついて
H13. 12. 17	CREST 成果中間報告会	生理学研究所	25 人	

塩田グループ

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H12. 3. 31	日本解剖学会シンポジウム	横浜パシフィコ	100人	摂食調節機能形態学
H11. 2. 19-20	第1回オレキシン研究会	筑波大学医学部講堂	150人	
H12. 2. 14	第2回オレキシン研究会	昭和大学講堂	170人	
H13. 2. 23	第3回オレキシン研究会	筑波大学講堂	120人	
H12. 12. 8	Brain Nose and Pituitary international symposium	早稲田大学国際会議場	100人	Recent progress in PACAP research
H13. 5. 7	オーファンレセプター・リガンドの検索と機能解析	品川プリンスホテル	150人	
H13. 3. 30	日本生理学会	同志社大学, 桜町キャンパス	120人	PACAP の多様な生理機能と将来の研究展望
H14. 5. 9	GPCR リガンドの探索と機能解析 –ポストゲノム時代に向けて–	日本科学未来館 7階未来館ホール	170人	

5. 主な研究成果

岡田グループ

(1) 論文発表

1997年

1. A. Miwa, K. Ueda & Y. Okada (1997) Protein kinase C-independent correlation between P-glycoprotein expression and volume sensitivity of Cl⁻ channel. *J. Membrane Biol.* 157, 63-69
2. R. Z. Sabirov, Y. Okada & S. Oiki (1997) Two-sided action of protons on an inward rectifier K⁺ channel. *Pflügers Archiv Eur. J. Physiol.* 433, 428-434
3. S.-S. Zhou, A. Takai & Y. Okada (1997) Phosphatase-mediated enhancement of cardiac cAMP-activated Cl⁻ conductance by a Cl⁻ channel blocker, anthracene-9-carboxylate. *Circul. Res.* 81, 219-228
4. Y. Liu, J. Zhao, Y.-H. Ji, S. Oiki, A. Hazama, S. Morishima, R. Sabirov, S.-S. Zhou, S. Hayashi, T. Tsumura, T. Ito, K. Furuya & Y. Okada (1997) The venom of scorpion *B. martensi* selectively inhibits transient outward K⁺ currents in neonatal rat ventricular cells and Kv⁺ channel currents in NG108-15 cells. *Biomed. Res.* 18, 383-388
5. R. Z. Sabirov, T. Tominaga, A. Miwa, Y. Okada & S. Oiki (1997) A conserved arginine residue in the pore region of an inward rectifier K channel (IRK1) as an external barrier for cationic blockers. *J. Gen. Physiol.* 110, 665-677
6. Y. Okada, S. Oiki, M. Tominaga, M. Kubo, A. Miwa, T. Tominaga, T. Tsumura & K. Ueda (1997) Volume-sensitive Cl⁻ channel in human epithelial cells: Regulation by ATP and relation to P-glycoprotein. *Jpn. J. Physiol.* 47 (Suppl. 1) S19-S20

7. Y. Okada (1997) Volume expansion-sensing outward rectifier Cl channel: A fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* 273, C755-C789

1998 年

8. R. Z. Sabirov, S. Morishima & Y. Okada (1998) Probing the water permeability of ROMK1 and amphotericin B channels using *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 19-26

9. 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

10. 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

11. 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

12. 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

13. 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

14. A. Hazama, S. Hayashi & Y. Okada (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic β cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Archiv Eur. J. Physiol.* 437, 31-35

15. 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

16. Y. Okada. (ed.) (1998) “*Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery*” Elsevier, Amsterdam

17. 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*” (Y. Okada ed.) pp 15 - 22, Elsevier, Amsterdam

18. 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*” (Y. Okada ed.) pp 93 - 98, Elsevier, Amsterdam

19. 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*” (Y. Okada ed.) pp 125-129, Elsevier, Amsterdam

20. 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*” (Y. Okada ed.) pp 209 - 212, Elsevier, Amsterdam

21. Y. Okada (1998) Cell volume-sensitive chloride channel. In, “*Cell Volume Regulation*” (F. Lang ed.) (Contrib. Nephrol. vol. 123) pp 21-33, Karger, Basel

1999 年

22. A. Hazama, T. Shimizu, Y. Ando-Akatsuka, S. Hayashi, S. Tanaka, E. Maeno & Y. Okada

- (1999) Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line. Lack of correlation with volume-sensitive Cl⁻ channels. *J. Gen. Physiol.* 114, 525-533
23. R. Z. Sabirov, R. R. Azimov, Y. Ando-Akatsuka, E. Miyoshi & Y. Okada (1999) Na⁺ sensitivity of ROMK1 K⁺ channel: Role of the Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Membrane Biol.* 172, 67-76
24. Y. Okada (1999) A scaffolding for regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels. *J. Physiol. (London)* 520, 2 [Perspectives]

2000 年

25. A. Hazama, H. Fan, I. Abdullaev, E. Maeno, S. Tanaka, Y. Ando-Akatsuka & Y. Okada (2000) Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl⁻ conductances in C127 cells. *J. Physiol. (London)* 523, 1-11
26. K. Dezaki, T. Tsumura, E. Maeno & Y. Okada (2000) Receptor-Mediated Facilitation of Cell Volume Regulation by Swelling-Induced ATP Release in Human Epithelial Cells. *Jpn. J. Physiol.* 50, 235-241
27. E. Maeno, Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama & Y. Okada (2000) Normotonic cell shrinkage due to disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9487-9492
28. S. Morishima, T. Shimizu, H. Kida & Y. Okada (2000) Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl⁻ channel in human epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.* 50, 277-280
29. Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright (eds.) (2000) "Control and Diseases of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels." Elsevier, Amsterdam
30. Y. Okada, A. Hazama, I. Abdullaev, S. Tanaka, Y. Ando-Akatsuka, T. Shimizu, R. Z. Sabirov, S. Hayashi & H. Fan (2000) Cell volume-sensitive Cl channel and ATP release. In "Control and Diseases of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright eds.) pp261-264, Elsevier, Amsterdam
31. T. Shimizu, S. Morishima & Y. Okada (2000) Effect of extracellular Ca²⁺ on volume sensitivity of the swelling-activated Cl⁻ channel in human epithelial cells. "Control and Diseases of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright eds.) pp271-272, Elsevier, Amsterdam
32. H.-T. Fan, H. Kida, S. Morishima & Y. Okada (2000) Phloretin inhibits a regulatory volume decrease in human epithelial cells. In "Control and Diseases of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright eds.) pp281-282, Elsevier, Amsterdam
33. A. Hazama, Y. Ando-Akatsuka, H. Fan, S. Tanaka & Y. Okada (2000) CFTR-dependent and-independent ATP release induced by osmotic swelling. In "Control and Diseases of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels". (Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright eds.) pp429-431, Elsevier, Amsterdam
34. T. Shimizu, S. Morishima & Y. Okada (2000) Ca²⁺-sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells. *J. Physiol. (London)* 528, 457-472

2001 年

35. H.-T. Fan, S. Morishima, H. Kida & Y. Okada (2001) Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cAMP-activated, but not Ca-activated, Cl⁻ channels. *Br. J. Pharmacol.*

133, 1096-1106

36. R.Z. Sabirov, A.K. Dutta & Y. Okada (2001) Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* 118, 251-266
37. Y. Okada, E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki, J. Wang & S. Morishima (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol. (London)* 532, 3-16 [Topical Review]
38. Y. Okada & E. Maeno (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 130, 377-383
39. Y. Okada, R.Z. Sabirov, K. Dezaki, A. Hazama, H.-T. Fan, I. Abdullaev, T. Shimizu, A.K. Dutta, S. Hayashi, Y. Ando-Akatsuka, T. Tsumura & E. Maeno (2001) The pathway and roles of ATP release from epithelial cells. In, "*Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia*" (eds. A. Dinudum & D.I. Cook) pp 11-13, University of Sydney Printing House, Sydney
40. R.Z. Sabirov, A.K. Dutta & Y. Okada (2001) Swelling-induced maxi-anion channel in murine C127 cells: ATP-block and ATP-permeation. In, "*Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia*" (eds. A. Dinudum & D.I. Cook) pp 145-146, University of Sydney Printing House, Sydney

2002 年

41. Y. Hara, M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto & Y. Mori (2002) LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell* 9, 163-173
42. J. Peti-Peterdi, S. Morishima, P.D. Bell & Y. Okada (2002) Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol.* 283, F197-F201
43. S.-S. Zhou, A. Takai & Y. Okada (2002) Regulation of cardiac CFTR Cl^{-} channel activity by a Mg^{2+} -dependent protein phosphatase. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 444, 327-334
44. A.K. Dutta, Y. Okada & R.Z. Sabirov (2002) Regulation of an ATP-conductive large-conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. *J. Physiol. (London)* 542, 803-816
45. Y. Ando-Akatsuka, I.F. Abdullaev, E.L. Lee, Y. Okada & R.Z. Sabirov (2002) Down-regulation of volume-sensitive Cl^{-} channels by CFTR is mediated by the second nucleotide-binding domain. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* (445, 177-186)
46. S. Mori, S. Morishima, M. Takasaki & Y. Okada (2002) Impaired activity of volume-sensitive anion channel during lactacidosis-induced swelling in neuronally differentiated NG108-15 cells. *Brain Res.* (957, 1-11)

2003 年

47. J. Wang, S. Morishima & Y. Okada (2003) IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am. J. Physiol.* (284, C77-C84)
48. T. Nabekura, S. Morishima, T. L. Cover, S. Mori, H. Kannan, S. Komuno & Y. Okada (2003) Recovery from lactacidosis-induced glial cell swelling with the aid of exogenous anion channels. *GLIA.* (41, 247-259)
49. P.D. Bell, J.-Y. Lapointe, R. Sabirov, S. Hayashi, J. Peti-Peterdi, K. Manabe, G. Kovacs & Y. Okada (2003) Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)

曾我部グループ

(1) 論文発表

1998 年

1. Qi, Z., Sokabe, M. Dynamic properties of individual water molecules in a hydrophobic pore lined with acyl chains: a molecular dynamics study. *Biophys Chem*, 71:35-50 (1998)
2. Naruse, K., Sai, X., Yokoyama, N., Sokabe, M. Uniaxial cyclic stretch induces *c-src* activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation. *FEBS Lett.* 441:111-115 (1998)
3. Naruse, K., Yamada, T., Sokabe, M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol.* 43:H1532--H1538 (1998)
4. Naruse, K., Yamada, T., Hamaguchi, M., Sokabe, M. Stretch dependent tyrosine Phosphorylation regulates morphological response of endothelial cells. *Oncogene*, 17: 455-463 (1998)
5. Sokabe, M., Yu, W., Takemoto, K. Ionic mechanisms of RVD in A6 cells: SA channel, $[Ca^{2+}]_i$, whole cell currents, and RVD. In " Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Okada, Y.), Elsevier Science, BV. Amsterdam, pp71-84 (1998)

1999 年

6. Qi Z, Sokabe M. Accelerated diffusion of Na^+ in a hydrophobic region revealed by molecular dynamic simulations of a synthetic ion channel. *Biophys Chem*, 82: 183-193 (1999)
7. Tatsumi H, Katayama Y, Sokabe, M. Attachment of growth cones on substrate observed by multi-mode light microscopy. *Neurosci Res.* 35(3): 197-206 (1999)
8. Kanzaki M, Nagasawa M, Kojima I, Sato C, Naruse K, Sokabe M, Iida H. Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science*, 285: 882-886 (1999)
9. Sai, X., Naruse, K., Sokabe, M. Activation of pp60src is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. *J Cell Sci*, 112 (9): 1365-1373 (1999)
10. Kawakubo T, Naruse K, Matsubara T, Hotta N, Sokabe M. Characterization of a newly found stretch-activated KCa, ATP channel in cultured chick ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 276:H1827-H1838 (1999)
11. Qi, Z., Sokabe, M., Donowaki, K., Ishida H. A structure-function study on a de novo synthetic hydrophobic ion channel. *Biophys. J.* 76: 631-641 (1999)

2000 年

12. Yamada T, Naruse K, Sokabe M. Stretch-induced morphological changes of human endothelial cells depend on the intracellular level of Ca^{2+} rather than of cAMP. *Life Sci*, 67(21): 2605-2613 (2000)
13. Qi Z, Murase K, Obata S, Sokabe M. Extracellular ATP-dependent activation of plasma membrane Ca^{2+} pump in HEK-293 cells. *Br J Pharmacol*, 131:349-345 (2000)
14. Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J. P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol* ;279(1):H285-H292 (2000).

15. Miyazu, M., Tamimura, T., Sokabe, M. Molecular cloning and characterization of a putative cyclic nucleotide-gated channel from *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* 9:283-292 (2000)

河原グループ

(1) 論文発表

1. Anzai N. and Kawahara K. Renal compensation for body water loss during dehydration in neonatal rats. *Jpn. J. Physiol.* 48: 181-187, 1998
2. Kawahara, K. Anzai, N. and Izumida, I. Molecular machineries of the neonatal rat kidney against osmotic stress. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* 151-158, 1998
3. Anzai, N. and Kawahara, K. Renal compensation for body water loss during dehydration in neonatal rats. *The 1997 Nagano Symposium on Sports Sciences.* 392-396, 1998
4. Suzuk K, Kawahara K, Terada N, Nomura T, Konno A. and Fukuda Y. Effect of ion transport inhibitors and methacholine on short-circuit current of isolated guinea pig nasal epithelium. *Jpn. J. Physiol.* 49: 99-106, 1999
5. Anzai N, Izumida I, Kobayashi Y. and Kawahara K. Roles of vasopressin and hypertonicity in basolateral Na/K/2Cl cotransporter expression in rat kidney inner medullary collecting duct cells. *Jpn. J. Physiol.* 49: 201-206, 1999
6. Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, Ookata K, Kawahara K. and Hirose S. Inwardly rectifying K⁺ channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochem. J.* 342: 329-336, 1999
7. Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai N, Izumida I, Inoue T, Kawahara K, and Abe H. Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uKATP-1) in rat brain. *Mol. Brain. Res.* 74: 15-25, 1999
8. Anzai, N., Suzuki, N., Izumida, I., Saito, J., Wakabayashi, S., Shigekawa, M. and Kawahara, K. Hyperosmolality increases expression of a Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE1, but not NHE4 in cultured rat kidney inner medullary collecting duct cells. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* 129-131, 2000
9. Suzuki, N., Moriguchi, M., Saito, J., Anzai, N. and Kawahara, K. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger activity in rat kidney inner medullary collecting duct cells by hyperosmolality. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* 123-124, 2000
10. Nakamura, N., Suzuki, Y., Sakuta, H., Ookata, K., Kawahara, K. and Hirose, S. Inward rectifier potassium channel Kir7.1 is highly expressed in the ion-transporting epithelial cells: implication for a functional coupling with Na⁺, K⁺-ATPase. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* 39-40, 2000
11. Anzai N, Suzuki Y, Nishikitani M, Izumida-Moriguchi I, Kokubo A, Kawahara K. Development of renal potassium excretion capacity in the neonatal rat. *Jpn J Physiol.* 51:745-752, 2001

野間グループ

(1) 論文発表

1998年

1. Mitsuie, T. and Noma, A. Neural volume regulation of single guinea-pig cardiac myocytes. *Cell Volume Regulation*, Edited by Y. Okada. Elsevier Science. 35-41(1998)
2. Fujioka, Y., Matsuoka, S., Ban, T. and Noma, A. Interaction of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump and $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange via $[\text{Na}^+]_i$ in a restricted space of guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology*509: 457-470(1998)
3. Takano, M., Xie, L.H., Otani, H. and Horie, M. Cytoplasmic terminus domains of Kir6.x confer different nucleotide-dependent gating on the ATP-sensitive K^+ channel. *Journal of Physiology*512: 395-406(1998)

1999年

4. Sasaki, N., Mitsuiye, T., Noma, A. and Powell, T. Sarcomere length during contraction of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Archiv*437: 804-811(1999)
5. Sasaki, N., Takano, M., Mitsuiye, T. and Noma, A. Changes in cell volume induced by ion channel flux in guinea-pig cardiac myocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*26: 698-706(1999)
6. Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.H., Noma, A. and Ohmori, H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *Journal of Biological Chemistry*274: 12835-12839(1999)
7. Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K. and Minato, N. 4F2(CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*274: 3009-3016(1999)
8. Xie, L.H., Takano, M., Kakei, M., Okamura, M. and Noma, A. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels. *Journal of Physiology*514: 655-665(1999)

若林グループ

(1) 論文発表

1998年

1. Iwamoto, T., Wakabayashi, S., Imagawa, T., Shigekawa, M.: $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$ exchanger overexpression impairs calcium signaling in fibroblasts: Inhibition of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise at cell periphery and retardation of cell adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 76: 228-236, 1998.
2. Iwamoto, T., Pan, Y., Nakamura, T. Y., Wakabayashi, S., Shigekawa, M.: Protein kinase C-dependent regulation of $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry* 17230-17238, 1998.
3. Ikeda, T., Iwamoto, T., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M.: Regulation of the $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchanger in fibroblasts overexpressing the $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$ exchanger. *Am. J. Physiol.* C1537-C1544, 1998
4. Wakabayashi, S., Ikeda, T., Kobayashi, Y., Iwamoto, T., and Shigekawa, M.: The $\text{Na}^+\text{/H}^+$

exchanger and volume regulation. In “Cell volume regulation: The molecular mechanism and volume sensing machinery”, edited by Y. Okada, Elsevier Publishers, p.167-171, 1998.

2000 年

5. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., and Shigekawa, M.: Second Mutations Rescue Point Mutant of the Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1 Showing Defective Surface Expression. FEBS letters 487: 257-261, 2000
6. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X., and Shigekawa, M.: A Novel Topology Model of the Human Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1. J. Biol. Chem. 275: 7942-7949, 2000.
7. Kobayashi, Y., Pang, T., Iwamoto, T., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M.: Lithium Activates Mammalian Na⁺/H⁺ Exchangers: Isoform Specificity and Inhibition by Genistein. Pflügers Archiv. 439: 455-462, 2000.
8. Wakabayashi, S., Su, X., Pang, T., Shigekawa, M. Structure-function of the Na⁺/H⁺ exchanger: A novel membrane topology model. In “Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels”, edited by Y. Suketa et al. Elsevier Publishers, p.115-118, 2000.

古家グループ

(1) 論文発表

2000 年

1. Ichikawa J, Furuya K, Miyata S, Nakashima T and Kiyohara T (2000) Developmental changes in capacitative Ca²⁺ entry in mouse mammary epithelial cells. Cell Biochem. Funct. 18:147-150.
2. Ichikawa J, Furuya K, Miyata S, Nakashima T and Kiyohara T (2000) EGF enhances Ca²⁺ mobilization and capacitative Ca²⁺ entry in mouse mammary. Cell Biochem. Funct. 18:215-225

2001 年

3. Okuda A, Furuya K & Kiyohara T (2001) Reactive Blue 2 induces calcium oscillations in HeLa cells. Jpn J Physiol. 51: 389-393.

西野グループ

(1) 論文発表

1998 年

1. S.B. Deshpande & H. Nishino (1998) In vitro protection of 3-nitropropionic acid-induced toxicity of astrocytes by basic fibroblast growth factor and thrombin. *Brain Res.* 783, 28-36
2. H. Nishino, K. Nakajima, M. Kumazaki, A. Fukuda, K. Muramatsu, S.B. Deshpande, T. Inubushi, S. Morikawa, C.V. Borlongan & P.R. Sanberg (1998) Estrogen protects against while testosterone exacerbates vulnerability of the lateral striatal artery to chemical hypoxia by 3-nitropropionic acid. *Neurosci. Res.* 30, 303-312
3. C.V. Bolongan, T. Shimizu, J.Q. Trojanowski, S. Watanabe, V.M.T. Lee, Y. Tajima, D.W. Cahill, T.B. Freeman, H. Nishino & P.R. Sanberg (1998) Animal models of cerebral ischemia : neurodegeneration, behavioral deficits and cell transplantation. In, “ *Cell transplantation for*

neurological disorders” (T.B. Freeman & H. Widner eds.) pp 211-230, Humana Press

4. Fukuda, S.B. Deshpande, Y. Shimano & H. Nishino (1998) Astrocytes are more vulnerable than neurons to cellular Ca^{2+} overload induced by a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 87, 497-507
5. C.V. Borlongan, H. Hida & H. Nishino (1998) Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuro Report* 9, 1-7
6. Fukuda, M. Tanaka, Y. Yamada, K. Muramatsu, Y. Shimano & H. Nishino (1998) Simultaneous optical imaging of intracellular Cl^- in neurons in different layers of rat neocortical slices : Advances and imitations. *Neurosci. Res.* 32, 363-371

1999 年

7. M. Kumazaki, C. Ungsuparkorn, S.B. Deshpande, A. Fukuda & H. Nishino (1999) Mechanisms of action of 3-NPA : dopamine overflow and vulnerability of the lateral striatal artery. In, “*Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders*” (P.R. Sanberg, H. Nishino, C.V. Borlongan eds) pp 157-165, The Humana Press
8. K. Nakajima, Y. Shimano, K. Torii & H. Nishino (1999) Gender related difference of the effect of 3-NPA on striatal artery. In, “*Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders*” (P.R. Sanberg, H. Nishino, C. Borlongan eds) pp121-127, The Humana Press
9. K. Ishida, C. Ungsuparkorn, H. Hida, N. Aihara, K. Ida & H. Nishino (1999) Argyrophilic dark neurons distribute with a different pattern in the brain after over hours treadmill running and swimming in the rat. *Neurosci. Lett.* 277, 149-152

2000 年

10. H. Nishino, H. Hida, M. Kumazaki, Y. Shinano, K. Nakajima, H. Shimizu, T. Ooiwa & H. Baba (2000) The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise : a hypothesis to explain the specific vulnerability. *J. Neurotrauma* 17, 251-260
11. H. Nishino & C.V. Borlongan (2000) Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog. Brain Res.* 127, 461-476
12. C.V. Borlongan, M. Yamamoto, N. Takei, M. Kumazaki, C. Ungsuparkorn, H. Hida, P.R. Sanberg & H. Nishino (2000) Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* 14, 1307-1317

塩田グループ

(1) 論文発表

2001 年

1. Imaizumi Y, Mizushima H, Matsumoto H, Dohi K, Matsumoto K, Ohtaki H, Funahashi H, Matsunaga S, Horai R, Asano M, Iwakura Y and Shioda S. Increased expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus after global cerebral ischemia. *Acta Histochem Cytochem* 34: 357-362 (2001).
2. Zhou CJ, Kikuyama S and Shioda S. Application and modification of in situ RT-PCR for detection and cellular localization of PAC1-R splice variant mRNAs in frozen brain sections. *Biotechnic and Histochemistry* 76: 75-83 (2001).
3. Zhou CJ, Zhao LX, Inagaki N, Guan JL, Nakajo S, Hirabayashi T, Kikuyama S and Shioda S. ATP-binding cassette transporter ABC2/ABCA2 in the rat brain: a novel mammalian

lysosome-associated membrane protein and a specific marker for oligodendrocytes but not for myelin sheath. *J. Neurosci.* 21: 849-857 (2001)

4. Guan JL, Saotome T, Wang QP, Funahashi H, Hori T, Tanaka S and Shioda S. Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport* 12: 547-551 (2001).
5. Zhou CJ, Yada T, Kohno D, Kikuyama S, Suzuki R, Mizushima H and Shioda S. PACAP activates PKA, PKC and Ca²⁺ signaling cascades in rat neuroepithelial cells. *Peptides* 22: 1111-1117 (2001).

2002 年

6. Zhou CJ, Inagaki N, Pleasure SJ, Zhao LX, Kikuyama S, Shioda S. ATP-binding cassette transporter ABCA2 (ABC2) expression in the developing spinal cord and PNS during myelination. *J. Comp. Neurol.* 451: 334-345 (2002).
7. Mizushima H, Zhou CJ, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Hirabayashi T, Arata S, Nakajo S, Takaki A, Ohtaki H, and Shioda S. Reduced Postischemic Apoptosis in the Hippocampus of Mice Deficient in Interleukin-1. *J. Comp. Neurol.* 448:203-216 (2002).
8. Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 321: 157-160 (2002).
9. Satoh K, Ikeda Y, Shioda S, Tobe T, and Yoshikawa T. Edarabone scavenges nitric oxide. *Redox Rep* 7; 219-222 (2002).
10. Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, and Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul. Peptides* (in press).
11. Ohtaki H, Funahashi H, Dohi K, Oguro T, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Yin L, Matsunaga M, Goto N and Shioda S. Suppression of oxidative neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice lacking interleukin-1. *Neurosci. Res.* (in press)
12. Shioda S, and Waschek JA. VIP & PACAP Receptors. In: *Structure and Function of GPCRs in the Nervous System*. Oxford University Press pp.530-550 (2002).
13. Shioda S, Zhou CJ, Ohtaki H, and Yada T. PACAP Receptor Signaling. In: *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*. Kluwer Academic Publications (Massachusetts, USA) (in press).

坪川グループ

(1) 論文発表

1. Takagi, S., Obata, K., and Tsubokawa, H.: GABAergic input contributes to activity-dependent change in cell volume in the hippocampal CA1 region. *Neurosci. Res.* 44: 315-324, 2002.

稲垣グループ

(1) 論文発表

2000年

1. Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito M, Matsuoka H, and Inagaki, N. Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 275: 22278-22283, 2000
2. Zhao, L.-X., Zhou, C.-J., Tanaka, A, Nakata, M., Hirabayashi, T., Amachi, T., Shioda, S, Ueda, K., and Inagaki, N. Cloning, characterization and tissue distribution of the rat ATP-binding cassette (ABC) transporter ABC2/ABCA2. *Biochem. J.* 350: 865-872, 2000

2001年

3. Zhou, C.-J., Zhao, L.-X., Inagaki, N. Guan, J.-L., Hirabayashi, T., Nakajo, S., Kikuyama, S., and Shioda, S. ATP-binding cassette transporter ABC2/ABCA2 in the rat brain: a novel mammalian lysosome-associated membrane protein and a specific marker for oligodendrocytes but not for myelin-sheaths. *J. Neurosci.* 21: 849-857, 2001
4. Yamada, K., Ji, J.-J., Yuan, H., Miki, T., Sato, S., Horimoto, N., Shimizu, T., Seino, S., Inagaki, N. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* 292: 1543-1546, 2001
5. Furukawa, T., Ono, Y., Tsuchiya, H., Katayama, Y., Bang, M.-L., Labeit, D., Labeit, S., Inagaki, N., and Gregorio, C. C. Specific interaction of the potassium channel β -subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system. *J. Mol. Biol.* 313: 775-784, 2001
6. Yamano, G., Funahashi, H., Kawanami, O., Zhao, L.-X., Ban, N., Uchida, Y., Morohoshi, T., Ogawa, J., Shioda, S., and Inagaki, N. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 508: 221-225, 2001
7. Yamada, K. and Inagaki, N. A role for neuronal K_{ATP} channels in metabolic control of the seizure gate. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 601-602, 2001

2002年

8. Furukawa, T., Ogura, T., Zheng Y.-J., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y., and Inagaki, N. Phosphorylation and functional regulation of CIC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *J. Physiol. (Lond.)* 540: 883-893, 2002
9. Ogura, T., Furukawa, T., Toyozaki, T., Yamada, K., Zheng, Y.-J., Katayama, Y., Nakaya, H., and Inagaki, N. CIC-3B, a novel CIC-3 splicing variant that interacts with EBP50 and facilitates functional expression of ORCC. *FASEB J.* 16: 863-865, 2002
10. Zhou, C.-J., Inagaki, N., Pleasure, S. J., Zhao, L.-X., Kikuyama, S., and Shioda, S. ATP-binding cassette transporter ABCA2 (ABC2) expression in the developing spinal cord and PNS during myelination. *J. Comp. Neurol.* 451: 334-345, 2002
11. Zhen, Y.-J., Furukawa, T., Ogura, T., Tajimi K., and Inagaki, N. M-phase specific expression and phosphorylation-dependent ubiquitination of the CIC-2 channel. *J. Biol. Chem.* 277: 32268-32273.
12. Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.-J., Ban, N, Shioda, S., and Inagaki, N. (2002) Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* in press

13. Yamada, K. and Inagaki, N. ATP-sensitive potassium channels in the brain: a sensor of hypoxic conditions. *News Physiol. Sci.* 17: 127-130, 2002
14. Zhou, C.-Z., Shioda, S., Yada, T., Inagaki, N., Pleasure, S.J., and Kikuyama, S. (2002) PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Current Protein and Peptide Science*, in press.

(2) 特許出願 (国内 2 件、海外 1 件)

岡田グループ

1. 発明者 : 挟間章博、岡田泰伸

発明名称 : 「細胞 ATP 放出を抑制するモノクローナル抗体とこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ」

出願番号 : 特願平 10-234687 (国際出願 PCT/JP99/00808)

出願日 : H10.08.20 (国際出願日 H11.02.23)

2. 発明者 : 岡田泰伸、前野恵美

発明名称 : 「細胞死抑制剤」

出願番号 : 特願 2000-192838

出願日 : H12.06.27

(3) 受賞等

岡田グループ

1999 年 3 月 細胞と分子生理の集い・上皮膜研究グループ
平成 10 年度 JJP 優秀論文賞

2001 年 3 月 細胞と分子生理の集い・上皮膜研究グループ
平成 12 年度 JJP 優秀論文賞

2001 年 3 月 日本生理学会平成 12 年度入澤記念優秀論文賞
 (“入澤賞”)

(4) その他の特記事項

- ①岡田グループのアポトーシスに関する論文が PNAS 誌 Commentary 記事として取り上げられた

「細胞容積調節破綻とアポトーシス」に関する研究の成果は、2000 年 8 月 15 日号の Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) 誌に原著論文 (Maeno, Ishizaki, Kanaseki, Hazama & Okada PNAS 97, 9487-9492) として掲載されたが、その内容と意義が神経細胞死の研究で高名な Choi 博士と Yu 博士 (ワシントン大・医) によって同誌の“Commentary”記事 (Yu & Choi PNAS 97, 9360-9362) として取り上げられた。

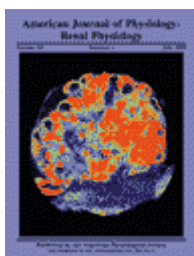
アポトーシスで細胞が死んでいく過程の初期に必ず見られる細胞収縮は、前野らの論文によって AVD (Apoptotic Volume Decrease アポトーシス性容積減少) と名付けられたが、

この AVD がアポトーシスの二次的の結果なのか、それともアポトーシスに不可欠の原因因子の一つであるのかについては不明であった。Choi 博士らは、前野らの論文は AVD を抑制するとアポトーシス死が救済されることを示して後者の証拠を与えた点と、正常条件下では細胞容積を調節して細胞生存を維持するメカニズム（特に膨張した細胞を正常容積にもどす調節性容積減少 RVD に関与する容積調節性 Cl⁻チャネルや K⁺チャネルの働き）がアポトーシス刺激下では細胞死へと導く初期反応 AVD を実行するメカニズムへと変身する可能性を示唆した点で、注目に値すると紹介し、更には前野らの論文で示された考え方に沿って検討して行くことが極めて重要であると結んでいる。

②岡田グループからの英文総説がトップテンに

Journal of Physiology の Topical Review として掲載された総説論文 (Okada, Maeno, Shimizu, Dezaki, Wang & Morishima 2001 J. Physiol. (London), 532, 3-16) が、4 月におけるインターネットでのトップテン（第二位）のアクセスをうけ、高レベルの興味を引いていることについて、同誌エディターから‘祝福の連絡’があった。本論文は、英国の Journal of Physiology 誌からの依頼により、Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれる浸透圧性細胞膨張後の容積調節と、Apoptotic Volume Decrease (AVD) (Maeno et al. 2000 PNAS) と岡田らが名付けたアポトーシス性収縮の分子メカニズムに関する最近の知見をレビューしたものである。本論文では、さらにネクローシス性細胞膨張をあらたに Necrotic Volume Increase (NVI) と命名し、その分子メカニズムについても議論している。細胞容積調節メカニズムの異常がいずれの細胞死にもその初期過程に重要な役割を果たしていることを示唆した点で、広い分野の興味を呼んだ。

③米生理学雑誌の半年間の表紙を、岡田グループの二光子レーザー顕微鏡を用いた研究論文が飾ることに。



米生理学雑誌 American Journal of Physiology (Renal Physiology) の 7 月号に掲載された論文 (Peti-Peterdi, Morishima, Bell & Okada 2002 Am J Physiol Renal Physiol 283: F197-F201) の図が、7 月号より 12 月号まで、本年半期計 6 巻の表紙を飾ることになりました。この論文は、科学技術振興事業団 CREST プロジェクト招聘などにより数回来日したアラバマ大学 Janos Peti-Peterdi 博士（第一著者）や P. Darwin Bell 博士（外国人研究員客員教授として生理研に滞在）と森島 繁、岡田泰伸との共同研究によるもので、すべて実験は生理研の二光子レーザー顕微鏡システムを用いて行われたものです。

本論文の要旨は次の通りである。体液の調節は主に腎臓において行われていることはよく知られているが、中でも傍糸球体装置 (JGA) は遠位尿細管の Na⁺濃度や浸透圧などを検知し、フィードバックコントロールにより糸球体濾過率 (GFR) をコントロールする機能を果たしている大変重要な組織である。しかし、これまでこの組織の厚みおよび

レーザー光の細胞障害性などの問題のため、生きたままでの組織像を得ることはできなかった。この研究では二光子レーザー顕微鏡システムを用いることにより、尿細管や細動脈を灌流しながら JGA の存在する糸球体断面を画像化することに成功し、遠位尿細管灌流液中の NaCl 濃度増や浸透圧増におけるマクラデンサ細胞の容積の膨張や、血管収縮物質であるアンギオテンシン II の輸入細動脈内投与による著明な輸出入細動脈の収縮や Ca^{2+} 濃度の上昇をリアルタイムに明らかにすることに成功した。

④稲垣グループの虚血性ケイレンと K_{ATP} チャネルの関係に関する研究論文が Science 誌に掲載された

稲垣グループは、脳の特には黒質網様部で働くイオンチャネルの一種である ATP 感受性カリウムチャネルが、脳虚血時の全身けいれん抑制に極めて重要であることを解明した。本研究は、けいれん発症のメカニズム解明に重要であるだけでなく、脳血管障害や低酸素、低血糖などの脳虚血に伴う脳障害を軽減する治療に道筋をつける可能性が期待できる効果で、2002年5月25日発行の米国科学雑誌「サイエンス」で発表された。

ATP 感受性カリウムチャネルは、細胞内の ATP 濃度によって開閉が調節されるイオンチャネルであり、細胞内の代謝レベルを細胞活動に反映させる重要な分子である。ATP 感受性カリウムチャネルは、経口糖尿病薬の作用標的でもある。以前から ATP 感受性カリウムチャネルが脳の特には黒質網様部という領域に多量に発現していること、また黒質網様部が様々なけいれん発作の制御に重要な部位であることは知られていた。しかし、黒質網様部における ATP 感受性カリウムチャネルの役割については不明のままであった。

そのため、ATP 感受性カリウムチャネルを欠損したマウスを用い、黒質網様部の ATP 感受性カリウムチャネル役割についての研究を行った。その結果、ATP 感受性カリウムチャネル欠損マウスは、低酸素の条件下では全身けいれんを非常に起こしやすいことが明らかにされた。その原因として、正常なマウスでは低酸素条件下においては細胞内 ATP が枯渇するために、黒質網様部の ATP 感受性カリウムチャネルが開き、その結果、神経細胞の興奮が抑制されるのに対し、欠損マウスではそのような防御機構が働かないためであることが確認できた。

今回の成果は、これまで推定の域で留まっていて厳密に検証できなかった ATP 感受性カリウムチャネルの虚血時における生体防御の役割を初めて解明したもので、この成果は高く評価されている。