浸透圧感受における細胞膜の生理的な役割と ナトリウム再吸収制御

新里直美^{1, 2)*}・丸中良典^{1, 2)}

- 1) 京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学
〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上る梶井町 465
2) 平安女学院大学 日本食育・健康研究所
〒602-8013 京都市上京区烏丸通下立売西入る

Physiological Roles of Plasma Membrane for Sensing Osmotic Stress in the Regulation of ENaC-mediated Na⁺ Reabsorption

Naomi Niisato^{1, 2)*} and Yoshinori Marunaka^{1, 2)}

- 1) Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science, Kyoto
Prefectural University of Medicine
Kyoto 602-8566, Japan
2) Japan Institute for Food Education and Health, Heian Jogakuin (St. Agnes') University
Kyoto 602-8013, Japan

To sense an environmental change such as osmotic stress is crucial for cells to survive and adjust to a new environment. In the epithelium of distal nephron, basolateral hypotonic stress is known to stimulate epithelial Na⁺ channel (ENaC)-mediated Na⁺ reabsorption for recovery of normal plasma osmolality without hormonal regulation. On the other hand, hypotonic stress causes drastic cell volume changes; initial cell swelling followed by regulatory volume decrease (RVD). Recently an increase in membrane tension by the initial cell swelling is considered to play an important role in conversion of extracellular physical stress to intracellular chemical signals. In this review, we focus our study on possible roles of plasma membrane itself and membrane proteins such as mechano-sensitive (MS) ion channels and growth factor receptors in sensing extracellular osmolality (hypotonic stress) and leading to regulation of Na⁺ reabsorption.

Key words : epithelium / MS channel / membrane tension / phosphorylation / hypotonic stress

1. はじめに

生体には、体内環境である血漿の浸透圧・量・組成の恒常性を維持する仕組みが備わっており、血漿

の浸透圧が正常に維持されているのは、主にバソプレッシン分泌と口渴の仕組みによると考えられている。血漿の浸透圧変化は、生体への電解質と水の出入りのバランス変化により生じ、前視床下部に存在する浸透圧受容器によって感知され、血漿浸透圧は、下垂体後葉からのバソプレッシン分泌制御・腎皮質集合管でのNa⁺再吸収制御を介した精巧なフィードバック機構により調節されている。そこで、本総説では、浸透圧感受という物理的な刺激の感受メカニ

* Corresponding author
Tel: 075-251-5311
Fax: 075-251-0295
E-mail: naomi@koto.kpu-m.ac.jp

ズムにおける細胞膜の生理的役割について、皮質集合管での Na^+ 再吸収を介する血漿浸透圧制御を中心に解説するとともに、様々な浸透圧感受メカニズムについても併せて概説する。

2. 多様な浸透圧感受メカニズムにおける膜張力の役割

多細胞生物を構成する細胞から細菌、酵母のような単細胞生物に至るまで、細胞は周囲の環境変化を的確に感受して、応答・適応しなければならない。そこで、多くの生物・細胞は、浸透圧変化を感受する様々な仕組みを備えている。

2.1 細菌の浸透圧感受メカニズム

細菌での高浸透圧感受機構は、“two-component system” と言われている。これらのシステムは、“sensor” と “response-regulator” から構成されており、“sensor” 分子である histidine kinase は高浸透圧刺激を感受して活性化され、分子内の histidine 残基がリン酸化される。このリン酸基は “response-regulator” 分子へ転移されて、最終的には転写の活性化を介して高浸透圧環境適応へのスイッチが入ることになる¹⁾。一方、細菌での低浸透圧感受機構では、機械刺激受容チャネル (mechanosensitive ion channel; MS channel) が重要な役割を果たす。低浸透圧環境に曝された細菌内に水が流入して膨張すると細胞膜の張力が増大し、MS channel が活性化されて開口し、細胞質の構成成分を放出することで浸透圧差を軽減して破壊を回避する。また大腸菌などの MS channel には、小さな浸透圧差で活性化する MscS と大きな浸透圧差で活性化する MscL という少なくとも2つのタイプが存在し、浸透圧差の大きさを認識することができ、浸透圧差に応じて放出する細胞質量を制御すると考えられる²⁾ (Fig. 1)。また MscL の構造解析により、膜の張力を介する gating model が提唱され、形質膜からの張力感受部位も同定されている^{2,3)}。

2.2 酵母の浸透圧感受メカニズム

出芽酵母も浸透圧感受システムとして、原核生物と同じ “two-component system” により浸透圧変化を感受し、HOG MAP キナーゼ経路を活性化することにより、高浸透圧環境に適応する (グリセロールを合成して細胞内に蓄積し、浸透圧差を軽減する)。活性化した Hog1 MAP キナーゼは細胞核に輸送され、高浸透圧応答遺伝子群の転写誘導などを介して細胞の高浸透圧適応を可能にする⁴⁾。HOG 経路には Sho1 と Sln1 の2種の膜タンパク質から活性化シグナルを

Fig. 1 Mechanosensitive (MS) ion channels in bacteria. When bacterial cells are subjected to hypotonic stress, they avoid cell lysis by releasing cytosolic components through opening MscS (mechanosensitive channel of small conductance) and MscL (mechanosensitive channel of large conductance).

伝達する独立した上流支経路 (SHO1 経路と SLN1 経路) が存在する。最近、SHO1 支経路の最上位で働く高浸透圧センサーとして Hkr1, Msb2 という二つの膜タンパク質が見出された。Hkr1/Msb2 は膜貫通ドメインを介して Sho1 と結合し、セリン・トレオニンに富み高度に糖鎖修飾された細胞外ドメインは活性化を負に制御していることから、高浸透圧感知の分子機構として、Hkr1/Msb2 細胞外領域における糖鎖のゲル構造が高浸透圧環境下で変化し、マスクされていた Sho1 との相互作用ドメインが Sho1 と結合して活性化シグナルを細胞内に伝達する、という活性化モデルが提唱されている⁵⁾ (Fig. 2)。

Fig. 2 Adaptive mechanisms to hypertonic stress in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To cope with an increased external osmolarity, yeast synthesize, and intracellularly retain the compatible osmolyte glycerol. These events are governed by the high-osmolarity glycerol (HOG) signaling pathway, whose core element is the Hog1 MAP kinase cascade.

2.3 高等真核細胞での浸透圧感受メカニズム

これまでの研究で、浸透圧刺激は、細胞容積変化を介した膜の張力変化としてMSチャネル・容積感受性チャネルなどに感知され则认为されている。MSチャネルは、浸透圧以外にも伸展刺激や剪断応力などの物理的な刺激を感知する。多くのMSチャネルはカチオン (Ca^{2+}) 透過性チャネルであり、活性化に伴って細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こしてシグナル伝達すると考えられている。このように、MSチャネル・容積感受性チャネルは、センサー分子として機能し、物理的な刺激を細胞内の化学的な分子へ変換させてシグナル伝達すると考えられる。また、MSチャネルは、浸透圧変化に伴う膜の伸展刺激の大きさを感知することができ、細胞膜の伸展力（張力）の大きさに応じてMSチャネル活性（開口確率；open probability； P_o ）が増大し、 Ca^{2+} 流入量の変化として感受する。さらに、細胞膜を裏打ちして細胞の形態や細胞内外の運動に必要な細胞骨格系も伸展刺激を感受するメカニズムとして機能している⁶⁾。例えば、血管内皮細胞は、血圧変化に伴う周期的な血管の伸展刺激の大きさと方向を感知して、刺激方向と垂直方向に細胞が走行する。この細胞応答には細胞骨格系が関与しており、現時点ではコフィリンによるアクチンの脱重合制御が重要であると考えられている⁷⁾。

一方で、容積感受性アニオンチャネルは、細胞容積膨張により活性化される外向き整流性クロライドチャネルとしてパッチクランプ法により同定されており、RVDの過程でのクロライドイオンの放出や細胞内クロライドイオン濃度の制御に関与し、浸透圧変化への適応に貢献すると考えられている。しかし、その分子実体は未だに明らかにされていない。

3. ホルモンによる血漿浸透圧制御

血漿浸透圧が上昇すると、前視床下部に存在する浸透圧受容器によって感知され、下垂体後葉からのバソプレッシン分泌は亢進する。バソプレッシンは、腎臓の皮質集合管主細胞の V_2 受容体に結合してcAMPを産生する。細胞内に貯蔵されているアクアポリンという水チャネルは、cAMP-dependent protein kinase (PKA) によりリン酸化されて管腔側（尿細管内腔）膜上に挿入され、管腔側膜の水の透過性が著しく亢進する⁸⁾。一般に、尿は低張（血漿浸透圧より低い）のため、アクアポリン挿入後に、尿細管内の水は相対的に浸透圧の高い体内に移動し、結果として尿中からの水の再吸収を増大させて血漿浸透圧を正常に戻す。

一方、血漿浸透圧が減少すると、バソプレッシン分泌は抑制され、皮質集合管での水の再吸収を減少させることで正常な血漿浸透圧を回復すると考えられている。しかし、このような消極的なメカニズム以外に、血漿浸透圧物質である Na^+ を取り込む積極的なメカニズムが必要ではないかと考えられる。実際に、皮質集合管主細胞のモデル細胞として Na^+ 再吸収の研究に用いられている *Xenopus laevis* A6細胞の細胞外浸透圧を低下させると、直後より Na^+ 再吸収の亢進は開始され、その後少なくとも24時間以上にわたり、 Na^+ 再吸収の亢進は維持される^{9, 10)}。このように、ホルモン制御なしで Na^+ 再吸収が増大し、細胞自身が血漿浸透圧変化を感受して、その環境変化に応答していることがわかる。

4. 血漿浸透圧低下の感受と Na^+ 再吸収制御

4.1 上皮膜を介する Na^+ 再吸収

皮質集合管の上皮膜を介する Na^+ 再吸収は、バソプレッシンやアルドステロンなどのホルモンによる緻密な制御を受け、生体内環境としての血漿の恒常性維持や血圧調節に重要な役割を果たしていることが知られている。皮質集合管での Na^+ 再吸収をはじめとする上皮膜を経由するイオンの吸収や分泌は、上皮細胞の極性に依存して局在しているイオンチャ

ネルやイオン輸送体・ポンプを介した一方向性のイオン輸送により可能となる。Na⁺再吸収は、管腔側膜に存在するアミロライド感受性上皮型Na⁺チャネル (Epithelial Na⁺ channel; ENaC) を介するNa⁺流入過程と血管側膜上に存在するNa⁺/K⁺ポンプ (Na⁺/K⁺ATPase) を介するNa⁺排出過程から構成されている。一般的には、ENaCを介するNa⁺流入過程が、経上皮Na⁺再吸収の律速段階であると考えられており、バソプレッシン、アルドステロン、細胞外 (血漿) 浸透圧など様々なNa⁺再吸収制御因子の標的とされている。また、ENaCを介するNa⁺流入量は、一定時間内にENaCが開く確率として示されるENaCの活性 (Po) と細胞膜上のENaC数として示される発現量 (N) の積算 (NPo) に依存する。従って、ENaCを介するNa⁺流入量は、個々のENaCの活性制御、及びENaC膜発現量制御により調節される。

4.2 ENaCのtraffickingを介するNa⁺再吸収制御 (早期の制御メカニズム)

浸透圧低下刺激を与えた直後より増大するNa⁺再吸収は、細胞内のタンパク質輸送を阻害剤するbrefeldin A (BFA) により著しく阻害され、パッチクランプ法による測定では、浸透圧低下刺激はENaCの細胞膜上の発現数を7~8倍以上に増大させた。これらの観察事実は、浸透圧低下刺激が、細胞内に貯蔵されていたENaCを細胞膜へ挿入して、Na⁺再吸収の律速段階を担うENaCの細胞膜上の発現数を増大させて、Na⁺再吸収を亢進したと考えることができる。我々の研究により、ENaCのtraffickingには、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) のチロシンリン酸化を介した活性化が重要であることが示され、その下流には、EGFR-JNK (c-jun N-terminal kinase)-PI3 kinaseというシグナルカスケードが関与することが明らかとなった¹⁰⁾ (Fig. 3)。このEGFRの活性化には、細胞外浸透圧低下による細胞容積膨張を介する細胞膜張力の増大が必須であると考えられた。細胞外浸透圧低下による一過性の容積膨張は、一過性のEGFRの活性化を引き起こした。一方、等浸透圧下で薬剤により細胞膜張力を増大させたり、調節性容積減少 (RVD) を抑制して長期的な細胞容積膨張を引き起こすと、EGFRの活性化は長期的に観察され、細胞容積依存的なEGFRの活性化が示唆された。これらのことから、A6細胞は細胞外の浸透圧変化を細胞容積依存的な細胞膜の張力変化として感受し、膜タンパク質として存在しているEGFRの構造変化を介して活性化し、細胞内へのシグナル伝達と細胞応答としてのENaCのtraffickingを引き起こすと考えられる (Fig. 3)。し

Fig. 3 A role of epidermal growth factor receptor (EGFR) for sensing hypotonic stress through cell volume changes. Hypotonic stress causes a transient activation of EGFR depending upon the initial, transient cell swelling. When RVD is prevented by blockade of K⁺/Cl⁻ release with NPPB (a Cl⁻ channel blocker), EGFR activation continues until recovery of the original cell volume. p-EGFR: phosphorylated (active) EGFR, t-EGFR; total-EGFR.

かし、細胞内へ貯蔵されているENaCの量には限度があり、浸透圧低下の刺激が長時間継続されると、新たなENaC産生の必要性が生じると考えられる。実際、浸透圧低下刺激が2時間以上続くと、ENaCを介するNa⁺再吸収は、タンパク合成阻害剤に対する感受性が時間とともに高くなり、新たなENaCが合成されていることが示唆された。

4.3 ENaCの転写制御を介するNa⁺再吸収制御 (後期の制御メカニズム)

浸透圧低下刺激を長時間与えると、2時間を過ぎる頃からENaCを構成する α -, β -, γ -ENaCの3つのサブユニットのmRNA発現レベルが著しく増大し、その後転写の亢進は少なくとも24時間までは維持される¹¹⁾。 β -, γ -ENaCの転写は、p38活性化依存的にMAP kinase phosphatase-1 (MKP-1)の転写を亢進し、MKP-1が負の制御因子であるERKを不活性化

Fig. 4 A scheme of MAPK-dependent hypotonic regulation of ENaC-mediated Na^+ reabsorption in renal epithelial A6 cells. ERK suppresses ENaC gene expression as a negative regulator. Hypotonic stress releases ENaC gene expression from this suppression by induction of MAPK phosphatase-1 via a p38-dependent pathway. In the hypotonic stress, JNK is also activated in the EGFR-dependent pathway that is involved in the translocation of ENaC to the apical membrane. The spatiotemporal regulation of MAPK family such as p38, JNK and ERK enables fine control of ENaC-mediated Na^+ reabsorption in A6 cells.

することで亢進することを見出した¹²⁾ (Fig. 4). 一方, α -ENaCの転写制御は, Ca^{2+} 依存的なシグナルにより転写亢進することも明らかとなった¹³⁾. 浸透圧低下によるp38活性化および Ca^{2+} 流入は, 細胞容積膨張により引き起こされ, ENaCの転写制御に関与する浸透圧感受メカニズムにおいても, 細胞容積膨張による膜張力増大が重要な役割を担うと考えられる. 一方で, 浸透圧低下時に, RVDを阻害してp38活性化やMKP-1転写亢進を恒常的に維持させても, それだけではENaC転写は亢進しない. 実際に, RVDの過程では, 細胞内のクロライドイオン濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) が減少することが明らかとなり¹⁴⁾, この $[\text{Cl}^-]_i$ 減少をフラボノイドやNPPBなどで阻害すると, ENaCの遺伝子発現も阻害された¹⁵⁾ ことから, $[\text{Cl}^-]_i$ 減少もENaC転写亢進に必要であると考えられる. これまでの我々の研究では, $[\text{Cl}^-]_i$ の低下は, タンパク質間の結合親和性を制御する可能性があり, 転写因子の結合性やポリメラーゼなどの酵素と基質との親和性をコントロールすることで, 転写を効率よく進行・維持させていることが想定される. 従って, 浸透圧低下によるENaC転写亢進では, triggerとしてp38の活性化が必要であるが, 同時に $[\text{Cl}^-]_i$ 減少も不可欠な制御因子として機能している可能性が示唆されている.

5. おわりに：浸透圧感受複合体としての細胞膜

これまでの多くの研究から, 浸透圧感受の最初の重要なステップの1つは細胞容積変化を介する細胞膜の張力変化である. 細胞膜には, 受容体・イオンチャネル・トランスポーターなどの様々な膜タンパク質が埋め込まれ, 膜張力変化に伴い, 直接的あるいは間接的に構造変化が引き起こされ, その変化が受容体の活性制御, イオンチャネルの活性変化に結びつくことで浸透圧刺激が細胞内に伝達されると思われる. 従って, 細胞膜は, 浸透圧感受システムを組み込んだ複合体と考えることができる. 細胞膜は, 細胞内外を物理的に隔絶する障壁として存在するとともに, 外界からの物理的な刺激 (浸透圧, 剪断応力, 重力, 伸展力など) を感知するセンサー複合体ととらえることができる. そして, 膜タンパク質が物理的な刺激を細胞内のシグナルへと変換する変換器 (converter) の役割を担っているとも考えられる. この物理的な刺激感受システムは, 刺激の大きさを膜張力の大きさとしてとらえることができるが, さらに, 物理的な刺激感受の感度を向上させるためのシステムとして, 細胞接着と細胞骨格系が存在している. 血管内皮細胞は, 周期的な伸展刺激の大きさと方向性を細胞膜のMSチャネルと細胞骨格系を介して感知し, 伸展方向と垂直に細胞が走行する. このように, 高等な真核細胞では, 刺激の大きさと方向性を感受するシステムが構築され, より繊細で確かな細胞応答を可能にしている. また, これらの物理的な (機械的な) 刺激としての浸透圧刺激が, 細胞膜の張力を介して受容体を活性化し, ENaCの膜への局在を亢進して膜発現量を増大させて, 早期のナトリウム再吸収を亢進させるメカニズムについても本総説で概説した. さらに, 長期的な刺激への対応として, ENaCの遺伝子発現亢進作用発現においては, 1) 一過的な膜の張力は浸透圧変化感受のトリガーとしての役割を担い, さらに2) 浸透圧変化感受における継続的な刺激のシグナルとして $[\text{Cl}^-]_i$ がその働きを担い, 浸透圧低下刺激が解除されるまで, $[\text{Cl}^-]_i$ 低下は維持され, ENaC遺伝子発現亢進も維持される. このように, 時間的な観点から, 刺激の感受を考えると, いくつかの感受システムが複合的に機能して, 各刺激感受情報をリレーし, より繊細で複雑な細胞応答を可能にしていると考えられる.

文 献

- 1) Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN : *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 183 (2000)
- 2) Yoshimura K, Nomura T, Sokabe M : *Biophys. J.*, **86**, 2113 (2004)
- 3) Akitake B, Anishkin A, Sukharev S : *J. Gen. Physiol.*, **124**, 143 (2004)
- 4) Saito H : *Chem. Rev.*, **101**, 2497 (2001)
- 5) Takebayashi K., Tanaka K., Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H : *EMBO J.*, **26**, 3521 (2007)
- 6) Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M : *J. Cell Sci.*, **121**, 496 (2008)
- 7) Ono S : *Int. Rev. Cytol.*, **258**, 1 (2007)
- 8) Moeller HB, Olesen ET, Fenton RA : *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **300**, F1062 (2011)
- 9) Niisato N, Eaton DC, Marunaka Y : *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **287**, F932 (2004)
- 10) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y : *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **293**, F128 (2007)
- 11) Niisato N, Taruno A, Marunaka Y : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 819 (2007)
- 12) Niisato N, Marunaka Y : *J. Physiol. Sci.*, **61** (suppl), S32 (2011)
- 13) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y : *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **294**, F177 (2008).
- 14) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y : *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **292**, F1411 (2007)
- 15) Fujimoto S, Niisato N, Sugimoto T, Marunaka Y : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 401 (2005)

(Received 5 September 2011 ;

Accepted 29 September 2011)

著者略歴

新里 直美 (にいさと なおみ)

1986年 3月 東京理科大学大学院
理工学研究科修士課程修了

1991年 1月 日本大学松戸歯学部

1994年 11月 トロント大学小児病院研究所

2000年 9月 京都府立医科大学
助手

2002年 4月 京都府立医科大学大
学院 講師

2005年 11月 京都府立医科大学大
学院 助教授

2007年 4月 京都府立医科大学大
学院 准教授, 現在
に至る.

丸中 良典 (まるなか よしのり)

1979年 3月 京都府立医科大学
卒業

1979年 5月 滋賀医科大学第二生
理学講座 助手

1985年 6月 医学博士 (京都府立
医科大学)

1986年 6月 米国テキサス大学
ガルベストーン校医学
部生理学・生物物理
学講座 研究員

1986年 9月 米国エモリー大学
医学部生理学講座
研究員

1988年 7月 米国エモリー大学
医学部生理学講座
助教授

1990年 11月 カナダ トロント大
学医科学研究所 助
教授
医学部小児科学講座
呼吸器内科学／小児
病院研究所 助教授

1992年 7月 カナダ トロント大
学医科学研究所 准
教授
医学部小児科学講座
呼吸器内科学／小児
病院研究所 准教授

2000年 2月 京都府立医科大学
第一生理学教室
教授

2003年 4月 京都府立医科大学大
学院医学研究科生理
機能制御学 教授
呼吸器病態制御学
教授
附属脳・血管系老化
研究センター神経化
学・分子遺伝学部門
教授 (～平成19年)
学生部長 (～平成
19年)

2007年 4月 京都府立医科大学大
学院医学研究科細胞
生理学 教授
呼吸器内科学 教授
(～平成22年)
医学教育研究 セン
ター長, 現在に至る

2011年 3月 平安女学院大学日本
食育・健康研究所
所長, 現在に至る