

イオンチャネルの細胞容積調節能における意義と 医療応用を目指した新たな活性制御法の開発

沼田 朋大

秋田大学大学院医学系研究科 器官・統合生理学講座

(accepted 8 April 2022)

Elucidation of the role of ion channels in cell volume regulation and development of new methods for controlling ion channel activity for medical applications

Tomohiro Numata

Department of Integrative Physiology, Graduate School of Medicine, Akita University

Key words : ion channel, cell volume regulation, TRP channel, gold nanoparticle, drug delivery

はじめに

生体は、電気信号で動いている。この電気現象の発見は、帯電させた金属棒がカエルの神経を刺激して脚の筋肉を収縮させることを観察したことから始まる¹⁾。現代においては、その基盤を成すのは、膜を横切るイオンの流れ、すなわちイオンチャネルの活動が起点になることが電気生理学的な現象、クローニング、結晶構造解析、チャネルパシーなど、多くの発見から知られている²⁾。

これまで、筆者は電気生理学を基盤に結晶構造と計算科学解析を合わせて「イオンチャネルそのものの動作原理を理解すること」、生理現象の基盤となる細胞容積調節機構の理解や遺伝子改変動物を用いた分子・組織・器官・個体まで多階層における包括的解析を行うことで「イオンチャネルの体での働きを知ること」、分野を越えた学際研究から生み出された創薬探索や膜

興奮光操作技術開発で「イオンチャネル活性制御をすること」を目指して、研究を行ってきた(図1)。

本稿では、これらの中でイオンチャネルの細胞容積調節能における意義と医療応用を目指した新たな活性制御法の開発について概説する。

イオンチャネル研究の重要性

イオンチャネルは、イオンが細胞膜を通過できるようにする細孔(ポア)を形成する細胞膜上のタンパク質である。その機能は、静止膜電位の形成、活動電位の発生による電気信号の形成、化学伝達物質の放出、ホルモン分泌制御および細胞容積調節にみられる^{3,4)}。ひとたびイオンチャネルの正常な機能が化学物質や遺伝的に妨害されると、人体は正常な機能を発揮できなくなる⁵⁾ ために臨床的に重要な標的となりうる。

イオンチャネルの学術的な重要性は、一連のノーベル賞受賞者の歴史によって確認することができる(図2)。

1950年代に発表されたHodgkinとHuxley(1963年ノーベル医学・生理学賞)による一連のイカの巨大軸索を使った実験⁶⁻¹⁰⁾により、イオンチャネルの存在が示唆された。具体的には細胞膜のナトリウムとカリウムの別々の通り道を仮定して、活動電位が起こる際は、

Corresponding Author : Tomohiro Numata
Department of Integrative Physiology, Akita University
Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : +81-18-884-6272
Fax : +81-18-836-2605
E-mail : numata@med.akita-u.ac.jp
令和4年2月16日 秋田医学会教授就任特別講演

(2)

イオンチャネル生理機能解析と応用技術開発

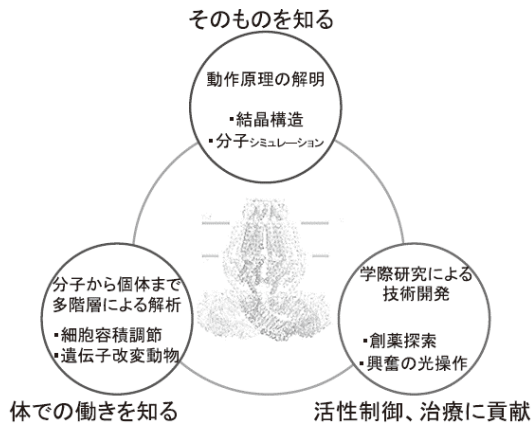


図1. イオンチャネル研究の概念図

イオンチャネルの学術的な重要性

A. L. Hodgkin & A. Huxley (Nobel Prize in Physiology or Medicine 1963) 神経細胞膜のメカニズムの解明	イオンチャネルの 実体予測
Shosaku Numa cDNAライブラリーを作成し、イオンチャネルや受容体のアミノ酸配列を決定	イオンチャネルの一次構造の決定
E. Neher & B. Sakmann (Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991) 細胞膜における単一イオンチャネルの機能測定	イオンチャネルの機能的確定
P. Agre & R. MacKinnon (Nobel Prize in Chemistry 2003) 細胞膜のイオンチャネル観察	イオンチャネルの実体観察
D. Julius & A. Patapoutian (Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021) 温度と圧力センサー分子の発見	イオンチャネルの生体内での役割の解明

イオンチャネルに関連するノーベル賞受賞が続いている

図2. イオンチャネルの学術的な重要性

一過性のナトリウムイオンの内向き透過性が高まりと活動電位が静まる際には定常的なカリウムイオンの外向き透過性が高まることで成り立つことを膜電位固定法と比較的簡単な微分方程式を用いた計算科学によって明らかにした。これにより細胞膜に存在するゲート、イオン選択性を有するイオンチャネルの存在が示唆された。

その後、ゲートに関しては、ポアをイオンが流れる前の電流であるゲート電流の測定¹¹⁾、電流が時間とともに減少する過程を観察した不活性化ゲート¹²⁾の解析が進んだ。

イオン選択性に関しては、細胞内灌流法の開発¹³⁾やNa⁺チャネル選択的阻害剤テトロドトキシンの使用¹⁴⁾によってNa⁺とK⁺の通り道が別々であることが証明された。

1970年代になり、NeherとSakmann(1991年ノーベル医学・生理学賞)は、細胞に細い電極を押し当て、そこで活動する電極の揺らぎを測定するパッチクランプ法を開発した。細胞膜の微小領域で初めて単一チャネル分子を流れるイオンチャネルが観察され¹⁵⁾、実体としてのイオンチャネルの存在が証明された。

1980年代に入り遺伝子クローニングの時代に入ると、沼らのグループを中心にニコチン性アセチルコリン受容体や電位依存性ナトリウムチャネル^{16,17)}、Janらによって電位依存性カリウムチャネル¹⁸⁾のcDNAクローニングを皮切りに次々とタンパク質の一次構造の決定と遺伝子発現系細胞での機能測定が行われた。

1988年になると、イオンチャネルの実体を観察する試みが行われた。豊島(秋田県出身)とUnwinは、電子線結晶構造解析でシビレエイのニコチン性アセチルコリン受容体の構造を明らかにした¹⁹⁾。その後、1998年になるとMacKinnon(2003年ノーベル化学賞)らにより、はじめて、イオンチャネルKcsAのX線結晶構造解析像が明らかにされた²⁰⁾。現在は、取差補正器²¹⁾やnanodisc²²⁾を用いることで観察解像度を改良し、さらに明瞭な像を観察できる。

2021年度は、これまでの分子同定や遺伝子改変技術で行われ、イオンチャネルそのものの性質から、生体内の特に感覚分野における外界からの刺激を電気シグナルに変換する責任分子の役割の解明がJuliusとPatapoutianによってなされた。温度や辛味に反応するTRPV1²³⁻²⁵⁾、低温やメンソールに反応するTRPM8^{26,27)}と触覚や血管、消化管や膀胱の伸展刺激に反応するPiezo²⁸⁻³⁰⁾の役割がイオンチャネルの同定、機能評価とともに生体内での役割が明らかにされた。

このようにイオンチャネルは、何十年にわたって私たちの想像力を掻き立てるとともに臨床分野の標的として注目を集めている。これからも研究者の絶え間ない努力によって、単一のイオンチャネルから、協調して機能する細胞、組織ネットワークを包括的に理解することで生体の生理・病態生理機構が解き明かされていくだろう。

機械刺激感受性イオンチャネルの細胞容積調節能における意義

細胞容積調節能(図3)

生体内では、常に浸透圧変化に曝されている。そのため、細胞は常に細胞膜の受動的な水の移動によって

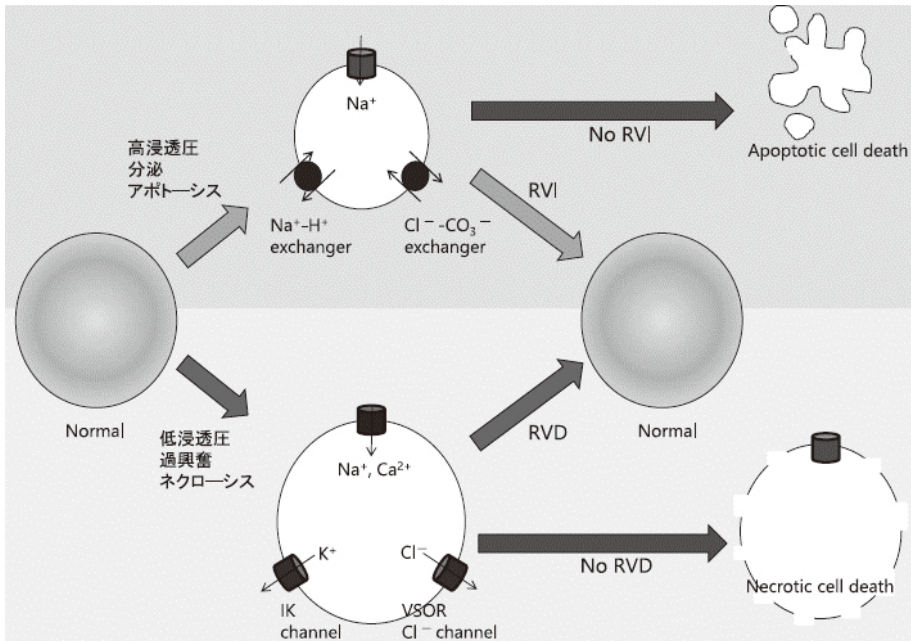


図3. 細胞容積調節能と細胞死

細胞容積変化を強いられるが、細胞容積調節能を發揮することで環境変化に適応している。低浸透圧時の細胞膨大の際には、カリウムイオンとクロライドイオン (KCl) の流出で達成される調節性容積減少 (RVD: Regulatory Volume Decrease)。高浸透圧時の細胞縮小の際には、ナトリウムイオンとクロライドイオン (NaCl) の流入で達成される調節性容積増加 (RVI) によって元の細胞容積へと復帰する³¹⁻³³⁾。多種多様なイオンチャネルやトランスポーターの中で、最も普遍的に発現する陰イオンおよび陽イオンチャネルは、主に細胞容積調節のメカニズムに関与すると考えられる。これは、動物細胞が生存するために、この普遍的な機能が、動物細胞の進化を通じて保存されているためである。普遍的な容積調節イオンチャネルは、容積感受性アニオンチャネル³⁴⁾、膜伸展活性化 TRP カチオンチャネル³⁵⁾、および高浸透圧誘導性カチオンチャネル (HICC) が含まれる³⁶⁾。これらの容積調節イオンチャネルは、浸透圧ストレスによって引き起こされる細胞の傷害や死に対して重要な役割を果たす。実際に、細胞容積調節能が機能しなくなると持続的な細胞収縮、アポトーシス性容積減少 (AVD: Apoptotic Volume Decrease) が起きており、持続的な細胞膨大の際

は、ネクローシス性容積増大 (NVI: Necrotic Volume Increase) が起きる³⁷⁾。したがって、アポトーシスやネクローシスなどの容積変化を伴う細胞死から救済をするためには、細胞容積調節イオンチャネルの分子同定が必須の課題になっていた。

TRPM7 の同定とその生理学的役割³⁸⁾

細胞容積調節機構の RVD を理解する上で、いち早く細胞容積増大を感知してその後の容積調節を可能にするためのトリガーとなる Ca^{2+} 透過性の分子実体の解明が求められていた。

Christensen は、サンショウウオ (Necturus) の上皮細胞で低浸透圧性の細胞膨大による膜伸展活性化カチオンチャネルの活性化によって RVD が誘導されることを最初に示唆した³⁹⁾。さらに、その Ca^{2+} 流入経路は、 Gd^{3+} 感受性を持つことが明らかとなった⁴⁰⁾。その後、20 年近く経ち、2007 年に TRPM7 が RVD のトリガーとして働く伸展活性化イオンチャネルであることを筆者らは報告した³⁸⁾。この発見には、いくつかの幸運が重なったことによって導かれたと考えている。

一つは、筆者がそれまで伸展活性化チャネルについての測定技術を持っていたこと⁴¹⁾、二つは、細胞内外

の刺激で活性化する、センサーとして働く TRP (Transient Receptor Potential) 分子が多く報告されるようになったこと⁴²⁾、三つは、RNAi 技術⁴³⁾ によるスクリーニング方法が適用できるようになり、現象から分子実体を突き止めやすくなったことが挙げられる。

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞において、 $-8 \text{ cmH}_2\text{O}$ という極弱い膜への陰圧刺激を繰り返し負荷し、インサイドアウトモードで単一チャネルの記録を行うと、陰圧刺激に応じて 22 pS のコンダクタンスを持つ単一チャネルの矩形波が観察された。この活性化された単一チャネル電流成分は、細胞外への Mg^{2+} や Gd^{3+} の負荷により、著しい抑制が観察された。ホールセルモードで細胞内外の浸透圧勾配を持たせる条件によって浸透圧性に細胞膨大を行うと、細胞の膨らむ大きさに比例した電流増加が見られた。

これらの結果により、HeLa 細胞には Mg^{2+} と Gd^{3+} 感受性の膜伸展活性化イオンチャネルが機能的に発現していることが分かった。

この分子実体を HeLa 細胞で探索するためにセンサーチャネルとして知られていた TRP チャネル 29 種類の遺伝子発現を RT-PCR 法で確認した。次に発現を確認できた候補遺伝子すべての siRNA を作成し、それぞれノックダウン細胞を作製した。それぞれの細胞で単一チャネルおよびホールセル電流測定にて評価すると、TRPM7-siRNA 処理した細胞の電流が抑制していることがわかった。

最後に RVD における TRPM7 の役割を確かめるために、低浸透圧刺激に応答する細胞容積変化を測定した。蛍光標識した siRNA 処理を行い、陽性細胞を 1 細胞容積測定したところ、RVD 速度の大幅な抑制が見られた。

これらの結果より、長らく不明であった RVD の起点となる伸展活性化イオンチャネルは TRPM7 であることがわかった。

最初に本内容を投稿してから 2 年経過しており、途中で 10 の雑誌に特にコメントや指摘なくリジェクトの返事を受け取り、苦勞の連続であったが、アクセプト後は、TRP チャネルの領域(細胞容積調節機構の研究領域においても)で著名な Nilius 博士など世界の同じ領域の 10 人以上の研究者から賞賛のメールをいただき、発見の価値を客観的に認識できた。

その後、TRPM7 に着目すると酸で活性化するのみならず⁴⁴⁾、プロトン透過させること⁴⁵⁾ などイオンチャネルの性質が明らかになった。次に TRPM7 の生

理的な役割に着目すると TRPM7 の活性は癌増殖や虚血に関連するためにその活性を抑える方法の開発を行った。

2010 年にはナファモスタット (COVID-19 の治療薬候補としても知られる⁴⁶⁾) が TRPM7 活性を抑えることで虚血時の神経細胞死を抑制すること⁴⁷⁾、プロゲステロンが TRPM7 の発現を抑制することで子宮頸がん細胞の増殖を抑制することを明らかにした⁴⁸⁾。

細胞容積調節機構は、一つの分子で成立するメカニズムではなく多くの遺伝子やチャネルタンパクが機能を共創する。最近、TRPM7 と前述した容積感受性アニオンチャネルが共同で機能することではじめて容積感受性アニオンチャネルの活性が見られることを明らかにした⁴⁹⁾。今後は、特定の分子への活性制御剤のみならず分子間の機能協働への制御剤の開発により、より生理現象を制御できる新たな種類の治療薬が開発されるだろう。

医療応用を目指したイオンチャネルの 新たな活性制御法の開発⁵⁰⁾

医学と工学の融合研究は、新しい学際的な科学の創出と技術革新を可能にする。筆者らは、イオンチャネルを活性制御することで生理活性を制御する方法を開発してきた。これまで、細胞の生理活性を制御するためには遺伝的な操作が必要であった⁵¹⁾ が、これを打破するために光応答性材料に着目した。

筆者らが用いた電荷分離分子は、フェロセン、ポルフィリン、フラレンのトライアド (CS 分子) である。光刺激によりポルフィリン励起による電子移動でフラレンとフェロセンが電荷分離状態を作る⁵²⁻⁵⁴⁾。この電荷分離状態が細胞膜の電場へと影響を与える可能性があった。そこで、早速、CS 分子をラット副腎由来 PC12 細胞に添加して、光刺激に应答する脱分極を電気生理学的に評価したが、残念なことに数ミリボルトの膜電位の揺らぎ程度しか観察されなかった。しかし、CS 分子の利用の可能性を信じて、HDL (High Density Lipoprotein) を基本としたドラッグデリバリーシステム⁵⁵⁾ を用いて細胞膜に CS 分子を効率的に局在化する改良を加えると、10 ミリボルトを超える大きな脱分極が観察された^{56,57)}。さらに、この光誘導性膜脱分極法をモデル細胞株のみならずラット生体から単離した海馬ニューロンに適用すると、光刺激に応じて脱分極を発生し、それに続いて活動電位頻度が増加し

た⁵⁸⁾。その後、この光誘導性の脱分極の発生機構は、電位依存性 K^+ チャンネルの抑制と細胞膜の誘電率増加によるリーク電流の発生であることを明らかにしている⁵⁷⁾。

このように、光応答性材料を用いたイオンチャンネルの活性制御は、神経の興奮性を制御できることから生体内で神経伝達が弱っている場所での機能の補助や治療につながる。筆者らは、さらに汎用性を広げるために次に金粒子に着目した。

生体組織を透過させやすい近赤外光波長光照射で、金粒子は表面の強い電界に光を強く吸収・散乱させることで熱を発生させる⁵⁹⁾。この標的となるイオンチャンネル分子は、TRPV1 チャンネルである。TRPV1 チャンネルは 43 度以上の温度で活性化する Ca^{2+} 透過型イオンチャンネルであり²⁵⁾、温熱のセンサー分子として 2021 年度のノーベル医学・生理学賞の対象となった分子として知られる。末梢感覚神経細胞である後根神経節細胞に豊富に発現が見られることから痛みの標的として知られるが⁶⁰⁾、慢性的な活性化は痛みに対して感受性を低下させる。そのため、糖尿病性末しょう神経障害や関節炎に関連する痛みの治療となりうる^{61,62)}。

本研究では、金粒子の 1. 細胞への安全な局在化、2. 細胞膜での光照射誘導性機能、3. 光照射で TRPV1 の活性化、4. 光照射で神経興奮の 4 つの課題を行った。

1. 金粒子は細胞障害性溶剤が使われており、毒性なく正確に細胞膜へ局在するためには、適切な被膜処理が必須となる。筆者らは金粒子にカチオン性化合物である Poly (diallyldimethyl-ammonium chloride) (PDDAC)、Polyethylene imine (PEI)、Poly-L-lysine (PLL) を用いることで、静電相互作用性を付与した。また、これに加え前述の CS 分子の局在の際に用いた HDL にカチオン化処理を施した HDL (cpHDL) を使用した (図 4)。上述 4 種類の修飾を施した金粒子を EGFP で細胞膜標識した HEK293T 細胞に投与し、共焦点レーザー顕微鏡でその局在を確かめた。

いずれの修飾を行った場合にも金粒子の細胞膜局在を確認した。しかし、細胞毒性を LDH (lactate dehydrogenase) 放出アッセイにて測定を行うと、cpHDL 処理の金粒子のみがほぼ毒性を検出しなかった。そのため、本研究では金粒子修飾に cpHDL を用いて行うこととした。

2. 金粒子の光活性化が局所的な温度上昇によって引き起こされたことを確認するために、Rho-PE の蛍光強度の温度依存性⁶³⁾ を利用した。膜表面に局在させた金粒子への光照射は 120 秒以内に 43 度までの温度上昇を引き起こしたが、細胞内のリソソームの温度は、変化しなかった。

これらのデータは、金粒子による光加熱が TRPV1 活性化のトリガーとして機能する可能性を示した。

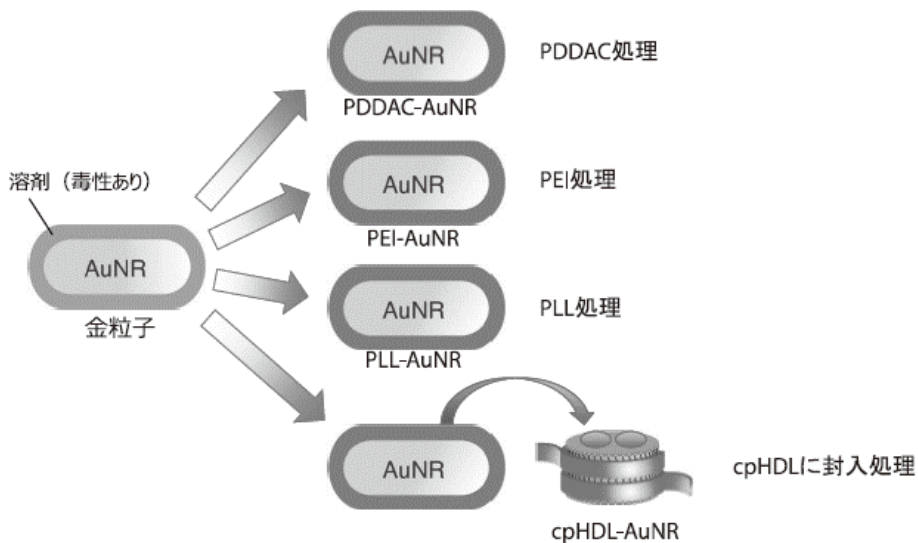


図 4. 金粒子の生体適合性と細胞相互作用に関する修飾試験

(6)

イオンチャネル生理機能解析と応用技術開発

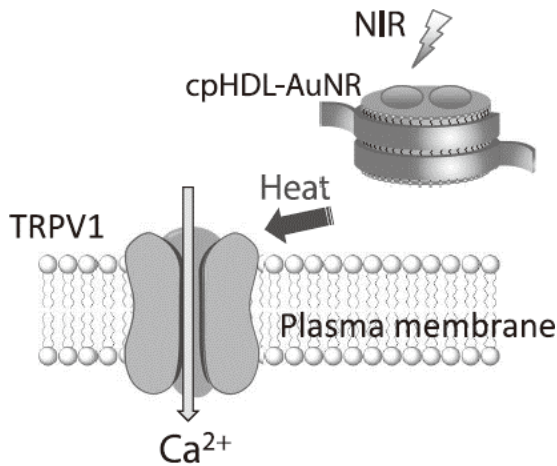


図5. 表面修飾 AuNRs による TRPV1 の安全な光活性化

3. 金粒子による TRPV1 の光活性化は、 Ca^{2+} インドジケーター Fluo3-AM の蛍光検出に基づく蛍光強度変化にて評価した。TRPV1 過剰発現 HEK293T 細胞に 780 nm ($8 \mu\text{W}\mu\text{m}^{-2}$) で照射すると、蛍光強度が増加した。また、TRPV1 の阻害剤である $5 \mu\text{M}$ のカプサゼピンを予めバス液に投与した場合には、増加した蛍光強度が大幅に抑制された。一方で、コントロールとして TRPV1 の発現がない場合には変化がなかった。

これらの結果は、細胞膜に局在化した金粒子が膜を破壊することなく光熱生成によって TRPV1 を光活性化したことを証明している。

4. 最後に、生理学的条件下での TRPV1 光活性化の方法の実現可能性を、野生型 (WT) マウスおよび TRPV1 ノックアウト (KO) マウスの初代培養後根神経節 (DRG) ニューロンで評価した。WT の初代培養 DRG で光刺激を与えると Ca^{2+} 濃度上昇を観察したが、KO マウスの DRG では見られなかった。

これらの結果は、私たちの方法が生理学的条件下で TRPV1 を安全に光活性化することを証明した。

結論として、近赤外光で誘発する金粒子の局所的な光熱加熱を使用して、細胞膜における熱感受性カチオンチャネル活性化方法の開発に成功した (図5)。

最後に

これらに示されるようにイオンチャネルの研究は、その同定、機能評価、実体観察、生体内への役割と着々

と進捗を見せており、人体の機能を理解するうえでも、治療の標的分枝としても重要性を増している。今後、イオンチャネルそのものと体の中での機能の理解、活性制御技術の開発の研究課題のサイクルをバランスよく遂行し、新たな活性制御技術を生み出すことによって臨床応用へと繋げていく必要がある。

文 献

- Galvani, L. (1791) De viribus electricitatis in motu musculari. *Commentarius. De Bonoiensis Scientiarum et Artium Intituo atque Academie Commentarii*, **7**, 363-418.
- Rasband, M. (2010) Ion channels and excitable cells. *Nature Education*, **3**, 41.
- Bertil Hille *Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition*.
- Hille, B. (2001) *Ionic channels of excitable membranes 3rd edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Ashcroft, F.M. (1999) *Ion channels and disease*. Academic press.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.*, **116**, 449-472.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.*, **116**, 473-496.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.*, **116**, 497-506.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, **117**, 500-544.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B. (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.*, **116**, 424-448.
- Armstrong, C.M. and Bezanilla, F. (1973) Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*, **242**, 459-461.
- Bezanilla, F. and Armstrong, C.M. (1977) Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current

- experiments. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 549-566.
- 13) Baker, P.F., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.I. (1962) The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons. *J. Physiol.*, **164**, 355-374.
 - 14) Moore, J.W., Narahashi, T. and Shaw, T.I. (1967) An upper limit to the number of sodium channels in nerve membrane? *J. Physiol.*, **188**, 99-105.
 - 15) Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.
 - 16) Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., *et al.* (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, **312**, 121-127.
 - 17) Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. (1982) Primary structure of alpha-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*, **299**, 793-797.
 - 18) Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, **237**, 770-775.
 - 19) Toyoshima, C. and Unwin, N. (1988) Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature*, **336**, 247-250.
 - 20) Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)*, **280**, 69-77.
 - 21) Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A.L., Bock, L.V., Ficner, R., Rodnina, M.V. and Stark, H. (2015) Structure of the *E. coli* ribosome — EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, **520**, 567-570.
 - 22) Gao, Y., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y. (2016) TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature*, **534**, 347-351.
 - 23) Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
 - 24) Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I. and Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 306-313.
 - 25) Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I. and Julius, D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **21**, 531-543.
 - 26) McKemy, D.D., Neuhauser, W.M. and Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-58.
 - 27) Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., *et al.* (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705-715.
 - 28) Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E. and Patapoutian, A. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 55-60.
 - 29) Ranade, S.S., Woo, S.H., Dubin, A.E., *et al.* (2014) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*, **516**, 121-125.
 - 30) Woo, S.H., Lukacs, V., de Nooij, J.C., Zaytseva, D., Criddle, C.R., Francisco, A., Jessell, T.M., Wilkinson, K.A. and Patapoutian, A. (2015) Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat. Neurosci.*, **18**, 1756-1762.
 - 31) Hoffmann, E.K., Lambert, I.H. and Pedersen, S.F. (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.*, **89**, 193-277.
 - 32) Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, **78**, 247-306.
 - 33) Okada, Y. (2004) Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.*, **41**, 233-258.
 - 34) Okada, Y., Okada, T., Sato-Numata, K., *et al.* (2019) Cell Volume-Activated and Volume-Related Anion Channels in Mammalian Cells: Their Biophysical, Molecular, and Pharmacological Properties. *Pharmacol. Rev.*, **71**, 49-88.

- 35) Liu, C. and Montell, C. (2015) Forcing open TRP channels : Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460**, 22-25.
- 36) Wehner, F., Bondarava, M., ter Veld, F., Endl, E., Nürnberger, H.R. and Li, T. (2006) Hypertonicity-induced cation channels. *Acta Physiol. (Oxford, England)*, **187**, 21-25.
- 37) Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J. and Morishima, S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.*, **532**, 3-16.
- 38) Numata, T., Shimizu, T. and Okada, Y. (2007) TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *American journal of physiology. Cell Physiol.*, **292**, C460-467.
- 39) Christensen, O. (1987) Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. *Nature*, **330**, 66-68.
- 40) Okada, Y., Hazama, A. and Yuan, W.L. (1990) Stretch-induced activation of Ca²⁺ (+)-permeable ion channels is involved in the volume regulation of hypotonically swollen epithelial cells. *Neurosci. Res. Suppl.*, **12**, S5-13.
- 41) Numata, T. and Yoshino, M. (2005) Characterization of stretch-activated calcium permeable cation channels in freshly isolated myocytes of the cricket (*Gryllus bimaculatus*) lateral oviduct. *J. Insect Physiol.*, **51**, 481-488.
- 42) Numata, T., Kozai, D., Takahashi, N., Kato, K., Uriu, Y., Yamamoto, S., Kaneko, T., Shinmoto, T. and Mori, Y. (2009) [Structures and variable functions of TRP channels]. *Seikagaku*, **81**, 962-983.
- 43) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- 44) Numata, T. and Okada, Y. (2008) Molecular determinants of sensitivity and conductivity of human TRPM7 to Mg²⁺ and Ca²⁺. *Channels*, **2**, 283-286.
- 45) Numata, T. and Okada, Y. (2008) Proton Conductivity through the Human TRPM7 Channel and Its Molecular Determinants. *J. Biol. Chem.*, **283**, 15097-15103.
- 46) Yamamoto, M., Kiso, M., Sakai-Tagawa, Y., *et al.* (2020) The Anticoagulant Nafamostat Potently Inhibits SARS-CoV-2 S Protein-Mediated Fusion in a Cell Fusion Assay System and Viral Infection In Vitro in a Cell-Type-Dependent Manner. *Viruses*, **12**.
- 47) Chen, X., Numata, T., Li, M., Mori, Y., Orser, B.A., Jackson, M.F., Xiong, Z.-G. and MacDonald, J.F. (2010) The modulation of TRPM7 currents by nafamostat mesilate depends directly upon extracellular concentrations of divalent cations. *Mol. Brain*, **3**, 38.
- 48) Numata, T., Sato-Numata, K. and Okada, Y. (2019) TRPM7 is involved in acid-induced necrotic cell death in a manner sensitive to progesterone in human cervical cancer cells. *Physiol. Rep.*, **7**, e14157-e14157.
- 49) Numata, T., Sato-Numata, K., Hermosura, M.C., Mori, Y. and Okada, Y. (2021) TRPM7 is an essential regulator for volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *Commun. Biol.*, **4**, 599.
- 50) Nakatsuji, H., Numata, T., Morone, N., Kaneko, S., Mori, Y., Imahori, H. and Murakami, T. (2015) Thermosensitive Ion Channel Activation in Single Neuronal Cells by Using Surface-Engineered Plasmonic Nanoparticles. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)*, **54**, 11725-11729.
- 51) Gorostiza, P. and Isacoff, E.Y. (2008) Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, **322**, 395-399.
- 52) Imahori, H. (2007) Creation of Fullerene-Based Artificial Photosynthetic Systems. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 621-636.
- 53) Imahori, H., Tamaki, K., Guldi, D.M., Luo, C., Fujitsuoka, M., Ito, O., Sakata, Y. and Fukuzumi, S. (2001) Modulating Charge Separation and Charge Recombination Dynamics in Porphyrin — Fullerene Linked Dyads and Triads : Marcus-Normal versus Inverted Region. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2607-2617.
- 54) Imahori, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I. and Sakata, Y. (2000) Vectorial Multistep Electron Transfer at the Gold Electrodes Modified with Self-Assembled Monolayers of Ferrocene — Porphyrin — Fullerene Triads. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 2099-2108.
- 55) Murakami, T., Wijagkanalan, W., Hashida, M. and

- Tsuchida, K. (2010) Intracellular drug delivery by genetically engineered high-density lipoprotein nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, **5**, 867-879.
- 56) Numata, T., Murakami, T., Kawashima, F., Morone, N., Heuser, J.E., Takano, Y., Ohkubo, K., Fukuzumi, S., Mori, Y. and Imahori, H. (2012) Utilization of photoinduced charge-separated state of donor-acceptor-linked molecules for regulation of cell membrane potential and ion transport. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6092-6095.
- 57) Numata, T., Fukuda, R., Hirano, M., Yamaguchi, K., Sato-Numata, K., Imahori, H. and Murakami, T. (2020) Elucidation of the Mechanisms for the Underlying Depolarization and Reversibility by Photoactive Molecule. *Cell. Physiol. Biochem.*, **54**, 899-916.
- 58) Takano, Y., Numata, T., Fujishima, K., *et al.* (2016) Optical control of neuronal firing via photoinduced electron transfer in donor-acceptor conjugates. *Chem. Sci.*, **7**, 3331-3337.
- 59) Huang, X., El-Sayed, I.H., Qian, W. and El-Sayed, M.A. (2006) Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115-2120.
- 60) Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A. and Eid, S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **6**, 357-372.
- 61) Caterina, M.J. and Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 487-517.
- 62) Holzer, P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 143-201.
- 63) Huang, H., Delikanli, S., Zeng, H., Ferkey, D.M. and Pralle, A. (2010) Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 602-606.