

助成番号 0736

浸透圧感受機構としてのクロライドイオンセンサー分子の解明

新里 直美, 丸中 良典

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

概要 1. 研究目的 腎遠位尿細管・集合管上皮組織での Na^+ 再吸収は血圧調節や体液量維持にとって重要な機能であり、血漿浸透圧やホルモンによって厳密に制御されていることが知られているが、依然として細胞外浸透圧変化を感受する細胞内メカニズムやそのセンサー分子は不明である。我々は、低浸透圧刺激時の浸透圧感受機構としてクロライドイオンセンサー分子とその感受メカニズムの解明を目指し、「低浸透圧刺激は、細胞容積変化を介して $[\text{Cl}^-]$ というシグナルへ転換され、センサー分子として Src kinase がその変化を感受して細胞応答である ENaC 遺伝子発現を増大する」という研究仮説を立証することを研究目的とする。

2. 研究結果および考察

2.1 細胞内クロライドイオン濃度変化による src kinase チロシンリン酸化制御

これまでの我々の研究より、低浸透圧刺激は、初期の細胞容積膨張とその後の調節性容積減少という細胞容積変化の過程を経て、細胞内クロライド濃度減少を引き起こすことが明らかとなっている(参考文献 5)。また、低浸透圧刺激が、src kinase を活性化することも見出している。そこで、浸透圧刺激の細胞内シグナルがクロライドイオンであるかどうか検討するために、浸透圧刺激なしに細胞内のクロライドイオン濃度を人為的に変化させて、src kinase のチロシンリン酸化を介する活性化について検討した。一般に、src kinase は触媒部位にある416番目のチロシン残基を自己リン酸化することで活性化することが知られているので、Tyr416 のリン酸化を活性化の指標とした。その結果、src kinase の活性化に關与する Tyr416 のリン酸化は、細胞内クロライド濃度の減少に依存して引き起こされていることが明らかになった。また、この src kinase の活性化は、src kinase の特異的阻害剤である PP2 により顕著に阻害されることから、自己リン酸化によるものであることも明らかとなった。次に、タンパク質のリン酸化レベルはチロシンリン酸化酵素 (PTK) によるリン酸化とチロシン脱リン酸化酵素 (PTP) による脱リン酸化のバランスにより決定されるため、src kinase の活性化に対する PTP の關与について、PTP の阻害剤である vanadate を様々な濃度で用いて検討した。その結果、クロライド濃度が高いときの方が、相対的なリン酸化の増大が著しいことが示された。このことは、クロライド濃度が高いときのほうが、src kinase を脱リン酸化する PTP の酵素活性が高いことを示していると考えられる。従って、細胞内クロライド濃度が低下すると、src kinase は、自己リン酸化能を増大させて自らを活性化するとともに、src kinase を脱リン酸化する PTP の活性が低下するため、リン酸化された後は脱リン酸化され難く、結果として高いチロシンリン酸化レベルが維持されると考えられる。

以上をまとめると、低浸透圧刺激により引き起こされる細胞内クロライド濃度の低下は、浸透圧刺激の細胞内シグナル分子として機能する可能性が示された。そのときのメカニズムとしては、低浸透圧刺激は、細胞容積変化を介して細胞内のクロライド濃度低下を引き起こし、細胞内クロライド濃度低下は、src kinase の自己リン酸化活性を増大させ、src kinase の活性化を引き起こすとともに、PTP の脱リン酸化活性を抑制することによって、より一層 src kinase の活性化亢進・維持を可能にしていると考えられる。

2. 2 Src kinase を介する低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収制御

低浸透圧刺激は、腎臓の遠位尿細管由来の培養細胞である A6 細胞におけるナトリウム再吸収を亢進して、正常な血漿浸透圧を回復する細胞応答を引き起こすことが知られている。そこで、本実験で低浸透圧刺激の細胞内シグナルであるクロライドイオンのセンサー分子の候補として考えられる src kinase がナトリウム再吸収に関与するかどうか検討した。ナトリウム再吸収は、ENaC 特異的阻害剤である benzamil に感受性のある短絡電流として評価し、src kinase の特異的阻害剤である PP2 が低浸透圧刺激により亢進するナトリウム再吸収にどのように影響するかを検討した。PP2 で前処理をしておく、長期的な低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収は著しく阻害されることが明らかとなり、低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収亢進メカニズムに src kinase が関与していることが示された。上皮細胞を経由するナトリウム再吸収は、二つの段階から構成されている。管腔側の ENaC を介するナトリウム流入過程と、血管側のナトリウムポンプを介するナトリウム排出過程である。一般に、ナトリウム吸収の律速段階は、管腔側の ENaC を介するナトリウム流入過程だと考えられており、長期的な低浸透圧刺激は、ENaC の遺伝子発現を介してナトリウム再吸収を亢進することから(参考文献 3, 4)、src kinase の活性化が ENaC の三つのサブユニット(alpha-, beta- and gamma-subunits) 遺伝子発現亢進に関与しているかどうか、PP2 を用いて検討した。ENaC 各サブユニットの mRNA 発現レベルを realtime-PCR によって検出したところ、beta-サブユニットと gamma-サブユニットの mRNA 発現レベルが PP2 処理により有意に抑制されることが示された。但し、低浸透圧刺激下でのナトリウムポンプの活性制御に src kinase 活性化は関与していなかった。

以上をまとめると、低浸透圧刺激は、細胞容積変化を介して細胞内クロライド濃度を減少させて、src kinase を活性化させ、beta- and gamma-ENaC の転写レベルでの発現を亢進してナトリウム再吸収を亢進することが示された。

1. 研究目的

1. 1 研究の背景

腎遠位尿細管・集合管上皮組織での Na^+ 再吸収は血圧調節や体液量維持にとって重要な機能であり、血漿浸透圧やホルモンによって厳密に制御されている。 Na^+ 再吸収は、上皮型ナトリウムチャネル(epithelial Na^+ channel; ENaC)を介する Na^+ の流入過程と Na^+/K^+ ATPase を介する Na^+ の排出過程から構成され、ENaC や Na^+/K^+ ATPase の発現及び活性制御を介してその調節が行われている。我々は、遠位尿細管上皮細胞での低浸透圧刺激は、短期的にはチロシンリン酸化依存的に ENaC の細胞内局在を変化させ、管腔側膜上の ENaC の数を増大させて Na^+ 再吸収を亢進し(参考文献 1, 2)、長期的には ENaC の遺伝子発現を増大させて Na^+ 再吸収を亢進することを明らかにした(参考文献 3, 4)。チロシンリン酸化の増大機構には、これまで低浸透圧刺激による細胞容積変化(膨張)が重要な役割を担っており、細胞膜の張力や構造変化が膜結合型のチロシンリン酸化酵素の活性化に寄与していると考えられてきた。しかし、近年、細胞容積変化だけでなく細胞内イオン環境変化も細胞内情報伝達系の活性制御に深く関わる可能性が考えられている。実際に我々は、低浸透圧刺激時に細胞容積変化に伴って細胞内クロライドイオン

濃度($[\text{Cl}]_i$)が変化することを報告しており(参考文献 5)、さらに長期的な低浸透圧刺激による ENaC の遺伝子発現メカニズムとして $[\text{Cl}]_i$ が重要な役割を担っていることを示唆した(参考文献 3)。従って、低浸透圧刺激の情報伝達系には、 $[\text{Cl}]_i$ 変化を感受するセンサー分子が存在し、 $[\text{Cl}]_i$ により発現・活性制御を受けて、刺激を細胞内に伝達し、ENaC の遺伝子発現を増大して Na^+ 再吸収を亢進すると考えられる。しかし、依然として浸透圧変化を感受する細胞内メカニズムやセンサー分子、ENaC の遺伝子発現制御は不明である。

1. 2 研究目的

我々は、低浸透圧刺激時の浸透圧感受機構としてクロライドイオンセンサー分子とその感受メカニズムの解明を目指し、「低浸透圧刺激は、細胞容積変化を介して $[\text{Cl}]_i$ というシグナルへ転換され、センサー分子として Src kinase がその変化を感受して細胞応答である ENaC 遺伝子発現を増大する」という研究仮説を立証することを研究目的とする。

Src kinase の活性制御は自己リン酸化と脱リン酸化のバランスにより制御されているので、本研究では、クロライドイオンセンサーとして src kinase の自己リン酸化活性と、src kinase の活性制御部位(Tyr416)のチロシン脱リン酸化酵

素の二つの標的を念頭に、クロライドイオン濃度で活性制御が行われる酵素の分子実体と活性制御機構を明らかにする。

1. 3 研究の意義

クロライドイオンを介したタンパク質の機能制御の可能性を試みるもので、全く新しい観点からのクロライドイオンの生理的機能を明らかにするものである。

2. 研究方法

2. 1 細胞培養

本研究で用いる *Xenopus Laevis* 遠位尿細管上皮組織由来の培養細胞である A6 細胞は、NCTC-109 Medium (インビトロジェン) を両生類の培養に適するように培養用の水を加えて浸透圧を下げ (80% 浸透圧)、抗生物質 (ストレプトマイシン, ペニシリン)、10% (v/v) ウシ胎児血清を添加した培養液により、27°C、1.0% CO₂ の環境で細胞を維持している。実際の研究に用いる際には、フラスコで維持した細胞を、0.4 μm のポアサイズの透過性のある膜上 (NUNC filter/NUNC) で 11 日から 14 日培養し、上皮細胞としての極性を獲得した細胞を用いている。

2. 2 ウェスタンブロット法

クロライドイオンによるタンパク質のチロシンリン酸化の変化は、ウェスタンブロットにより抗チロシンリン酸化特異的抗体を用いて検出する。NUNC filter 上で 11 日から 14 日培養した細胞に、様々な条件下で浸透圧刺激を与えた後、Lysis Buffer で細胞を溶解し、超音波破砕して遠心分離後の上清をサンプルとして用いた。サンプルは、SDS-PAGE 用の sample buffer で処理をして適切な濃度のゲルで SDS-PAGE を行う。電気泳動後に、ニトロセルロース膜上に転写し、抗体に応じて 5% BSA あるいは 5% non-fat milk でブロッキングし、一次抗体/二次抗体を適切な条件で反応させ、化学発光により検出する。

2. 3 ENaC 遺伝子の転写レベルでの発現制御の検出:

Realtime-PCR

上皮型ナトリウムチャンネル (epithelial Na⁺ channel: ENaC) 遺伝子の転写レベルでの発現は、Realtime-PCR 法を用いて行う。NUNC filter 上で 11 日から 14 日培養した細胞に、様々な条件下で浸透圧刺激を与えた後、total RNA を QIAGEN 社製の RNeasy RNA extraction kit を用いて抽出する。その後、アプライドバイオシステム社製の cDNA 合

成キットを用いて cDNA を合成する。この cDNA をテンプレートにしてアプライドバイオシステム社製の TaqMan probe とプライマーを用いて Realtime-PCR 法により mRNA の発現を検出した。

2. 4 ナトリウム再吸収の電気生理学的測定

上皮細胞を経由するナトリウム再吸収は、Transwell costar 上で 11 日から 14 日培養した細胞を短絡電流測定用の Ussing chamber にセットして、イオン輸送を側する。ナトリウム再吸収量は、ENaC 特異的阻害剤である benzamil に感受性の短絡電流として測定し、管腔側の ENaC 活性は、benzamil に感受性コンダクタンス変化として測定する。

3. 研究結果

3. 1 細胞内クロライドイオン変化による src kinase チロシンリン酸化制御

これまでの我々の研究より、低浸透圧刺激により細胞膨張とその後の調節性容積減少という細胞容積変化の過程を経て、細胞内クロライド濃度が減少することが明らかとなっている (参考文献 1)。そこで、浸透圧刺激の細胞内シグナルがクロライドイオンであるかどうか検討するために、浸透圧刺激なしに細胞内のクロライドイオン濃度を変化させて、チロシンリン酸化に対する影響に付いて検討した。

NUNC filter 上で 11 日から 14 日培養した細胞に、等浸透圧で様々なクロライド濃度の溶液を nystatin というイオノフォア存在下で作用させて細胞内のクロライド濃度を人為的に変化させ、ウェスタンブロットによりチロシンリン酸化の変化を検出した。その結果、分子量が 60 kDa、120 - 130 kDa のタンパク質のリン酸化変化が、特にクロライド依存的に引き起こされていることが判明した。

そこで、Fig. 1 で示されたように、細胞内クロライド濃度依存的にチロシンリン酸化が変化するタンパク質の同定を行った。タンパク質の同定は、分子量から推定して行ったところ、少なくとも分子量 60 kDa のバンドには src kinase が含まれており、また分子量 120 kDa のバンドには focal adhesion kinase (FAK) が含まれていることが判明した。

次に細胞内クロライドイオン濃度の変化により src kinase のチロシンリン酸化が変化するかどうかを検討した。これまでのサンプルはチロシン脱リン酸化酵素 (PTP) の阻害剤を添加し、チロシンリン酸化酵素 (PTK) の活性だけを検出

する目的で抽出されていたが、実際の細胞内での変化を反映するため PTP 阻害剤を添加しない条件でサンプル抽出を行った。src kinase はいくつかのチロシンリン酸化部位が存在するが、主なリン酸化部位は二カ所である。一つは、416番目のチロシン残基で、この部位がリン酸化されると酵素の活性化が引き起こされる。もう一方のリン酸化部位は、527番目のチロシン残基で、この部位がリン酸化されると酵素の不活性化が引き起こされる。そこで、src kinase の活性化と細胞内クロライド濃度との関連性を明らかにする目的で、様々な細胞内クロライド濃度条件での src kinase の

416 番目チロシン残基のリン酸化の変化を抗リン酸化特異的認識抗体を用いて検出した結果を示したのが Fig. 2 である。

Fig. 2 に示されたように、src kinase の活性化に関するチロシンリン酸化は細胞内クロライド濃度依存的に引き起こされていることが明らかになり、さらに細胞内クロライド濃度依存性は、PTP 阻害剤を添加しない条件では、クロライド濃度が低いほどリン酸化レベルが増大した。この結果により、細胞内クロライド濃度が低下すると、src kinase の活性化が引き起こされ、src kinase の活性化にはクロライド濃度

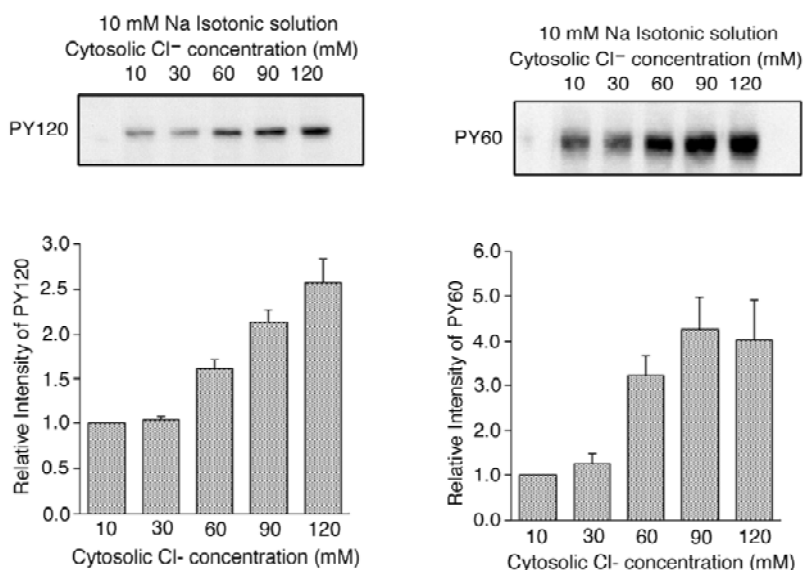


Figure 1. Effects of cytosolic Cl⁻ concentration on tyrosine phosphorylation in multiple proteins detected with anti-phosphotyrosine Ab in renal epithelial A6 monolayers

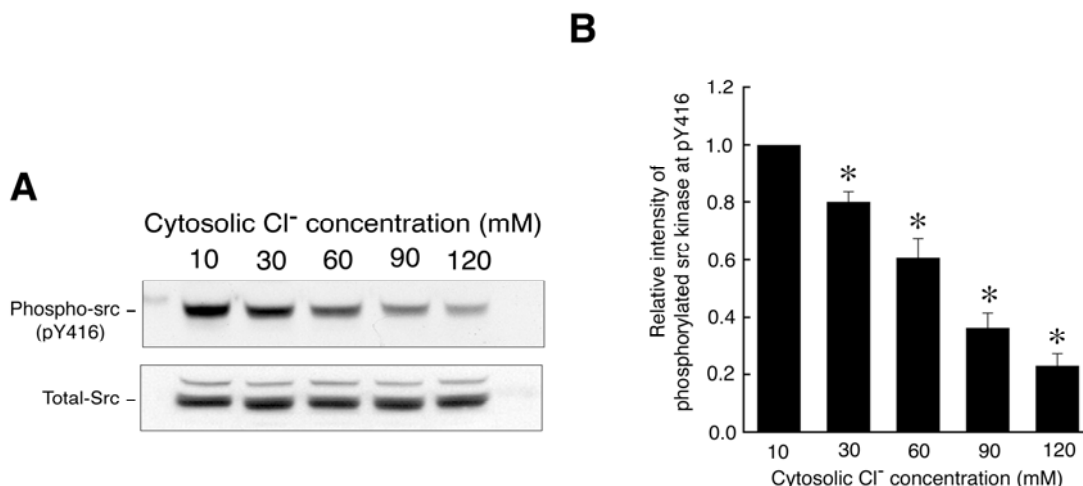


Figure 2. Effects of cytosolic Cl⁻ concentration on tyrosine phosphorylation of src kinase at Y416 in renal epithelial A6 cells

依存的な PTP 活性制御の関与が強く示唆された。

次にクロライド濃度依存的な、src kinase の活性化に対する PTP 活性制御の関与を検討するために、PTP 阻害剤である vanadate の濃度依存的な影響を調べた。

PTP 阻害剤である vanadate の濃度依存的な影響のウェスタンブロットの結果を Fig. 3 に、Fig. 3 と同様な実験結果を統計的にまとめた結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4 では、PTP 阻害剤である vanadate を添加していないときのそれぞれのクロライド濃度におけるリン酸化レベルを 1 として相対的な値としてリン酸化レベルを示してある。それぞれのクロライド濃度において、src kinase のチロシンリン酸化レベルに対する vanadate の効果を比較すると、クロライド濃度が高いときの方がその効果が顕著に大きいこ

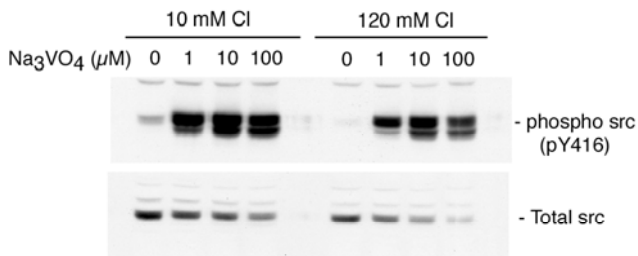


Figure 3. Dose-dependent effects of vanadate (a PTP inhibitor) on cytosolic Cl⁻ dependent tyrosine phosphorylation of src kinase in A6 cells

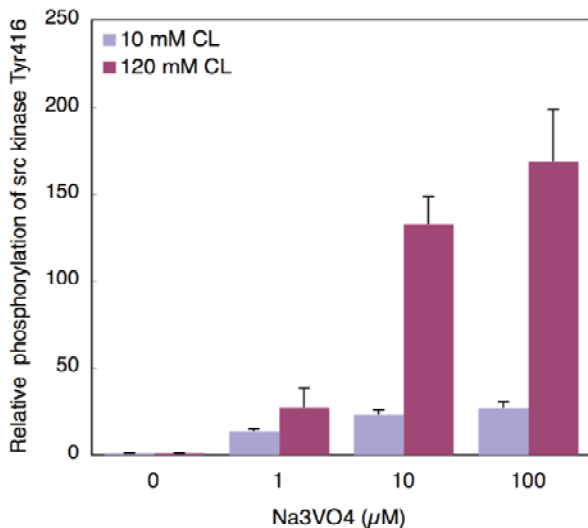


Figure 4. Statistical results of dose-dependent effects of vanadate on tyrosine phosphorylation of src kinase under 10 mM and 120 mM Cl⁻ concentration

とが明らかとなった。このことは、クロライド濃度が高いときに、src kinase のチロシンリン酸化部位を脱リン酸化する PTP の酵素活性が高いことを示していると考えられる。また、高濃度の vanadate を添加し、非常に高いチロシンリン酸化レベルを維持すると、タンパク質自体の安定維持に支障が生じるためか、src kinase 自体のタンパク質が減少していることも明らかとなった。

一方、この、src kinase のチロシンリン酸化(416番目のチロシン残基)は、自己リン酸化によることが知られているので、クロライド依存的なチロシンリン酸化も自己リン酸化によるものであるかどうか、src kinase の特異的阻害剤である PP2 を用いて検証した。その結果を示したのが Fig. 5 である。Fig. 5 で示されたように、クロライド依存的な src kinase 416 番目のチロシン残基のリン酸化は src kinase の自己リン酸化によるものであることが明らかとなった。

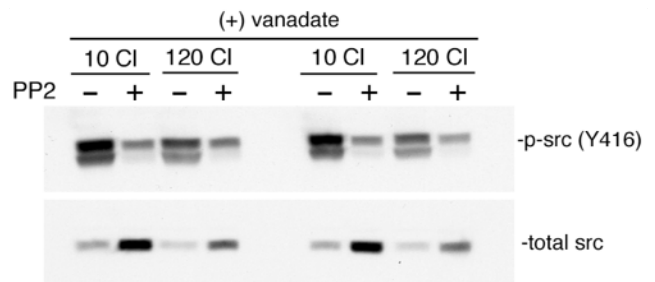


Figure 5. Effects of PP2 (a specific src kinase inhibitor) on Cl⁻ dependent tyrosine phosphorylation of src kinase at Y416

以上をまとめると、低浸透圧刺激により引き起こされる細胞内クロライド濃度の低下は、浸透圧刺激の細胞内シグナル分子として機能する可能性が示された。そのときのメカニズムとしては、低浸透圧刺激は、細胞容積変化を介して細胞内のクロライド濃度低下を引き起こし、細胞内クロライド濃度低下は、src kinase の自己リン酸化活性を増大させ、src kinase の活性化を引き起こした。

3. 2 Src kinase を介する低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収制御

低浸透圧刺激は、腎臓の遠位尿細管由来の培養細胞である A6 細胞におけるナトリウム再吸収を亢進して、正常な血漿浸透圧を回復する細胞応答を引き起こすことが知られている。そこで、本実験で低浸透圧刺激の細胞内シグナルであるクロライドイオンのセンサー分子の候補として考

えられる src kinase がナトリウム再吸収に関与するかどうか検討した。

Src kinase の特異的阻害剤である PP2 が低浸透圧刺激により亢進するナトリウム再吸収にどのように影響するかを、短絡電流を測定して検討した。ナトリウム再吸収は、ENaC 特異的阻害剤である benzamil に感受性のある短絡電流として評価した。

その結果を示したのが、次の Fig. 6 である。

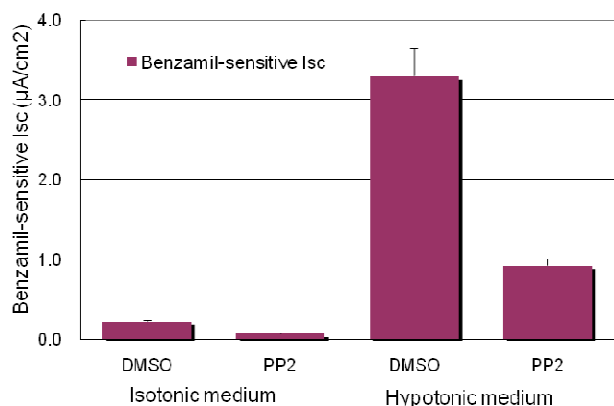


Figure 6. Effects of PP2 (a specific src kinase inhibitor) on hypotonicity-stimulated Na⁺ reabsorption in A6 cells

Fig. 6 で示されているように、src kinase 特異的阻害剤である 10 μM PP2 で前処理をしておく、低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収は著しく阻害されることが明らかとなり、低浸透圧刺激によるナトリウム再吸収亢進メカニズムに src kinase が関与していることが示された。上皮細胞を経由するナトリウム再吸収は、二つの段階から構成されている。管腔側の ENaC を介するナトリウム流入過程と、血管側のナトリウムポンプを介するナトリウム排出過程である。一般に、ナトリウム吸収の律速段階は、管腔側の ENaC を介するナトリウム流入過程だと考えられている。そこで、ナトリウム再吸収を亢進するためには、この律速段階であるナトリウム流入過程を増大させる必要があるため、実際に PP2 がナトリウム流入過程を阻害してナトリウム再吸収を阻害しているかを検討した。ナトリウム流入過程は、benzamil 感受性のコンダクタンスを測定することにより、評価した。

Fig. 7 で示されたように、PP2 がナトリウム流入過程を阻害してナトリウム再吸収を阻害したことが、判明した。これまでの研究から、長期的な低浸透圧刺激は、ENaC の遺伝子発現を介してナトリウム再吸収を亢進することから、src

kinase の活性化が ENaC の遺伝子発現亢進に関与しているかどうか、PP2 を用いて検討した。

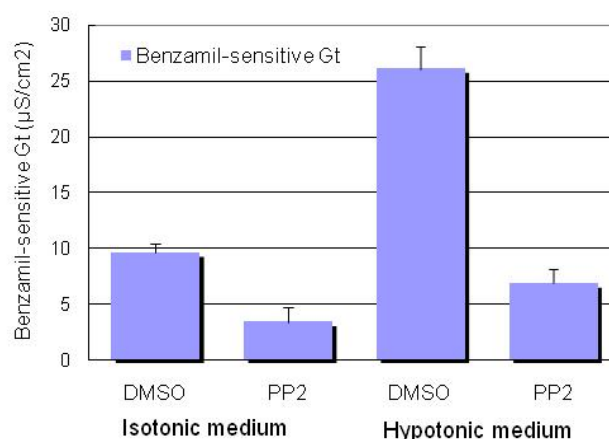


Figure 7. Effects of PP2 on hypotonicity-increased benzamil-sensitive conductance

ENaC は、alpha-subunit, beta-subunit, gamma-subunit の三つのサブユニットが四量体として構成されることが知られている。そこで、低浸透圧刺激を与える際に、PP2 を作用させて、ENaC 各サブユニットの mRNA の発現がどのような影響を受けるか、realtime-PCR によって検出した結果が、Fig. 8 である。この結果から、beta-サブユニットと gamma-サブユニットの mRNA 発現レベルが PP2 処理により有意に抑制されることが示された。

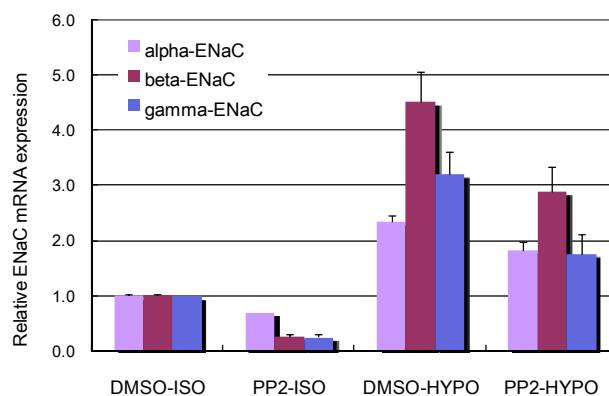


Figure 8. Effects of PP2 on hypotonicity-increased ENaC subunits mRNA expression in A6 cells

また、ナトリウムポンプの活性も律速段階を担っていないが、ナトリウムイオン流入の driving force(駆動力)形成に重要な役割を担っているために、src kinase による制

御の有無を検討した。ナトリウムポンプ活性は、その特異的阻害剤であるウアバイン感受性電流として示した。その結果、低浸透圧刺激下でのナトリウムポンプの活性制御に src kinase 活性化は関与していないことが Fig. 9 により示された。

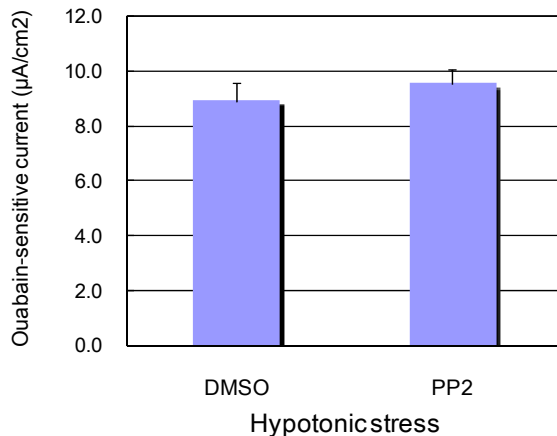


Figure 9. Effects of PP2 on ouabain-sensitive pump current

4. 考 察

本研究では、低浸透圧刺激という物理的な刺激がどのようにして細胞に伝達され、細胞応答を引き起こすかに付いて、細胞内クロライドに注目した研究である。我々のこれまでの研究から、低浸透圧刺激は細胞容積変化を介して細胞内クロライド濃度の低下を引き起こすことを明らかにしていることから、細胞内クロライドが低浸透圧刺激の細胞内シグナルではないかという研究仮説に基づいて研究を開始した。そこで、浸透圧刺激なしに、人為的に細胞内クロライド濃度を変化させると細胞内の主要なシグナル伝達を担うチロシンリン酸化を変化させることを見出した。さらに、その一つが src kinase であることが明らかになり、細胞内シグナルであると考えられるクロライドのセンサー分子である可能性が示唆された。Src kinase は細胞内クロライド濃度低下、さらには実際の低浸透圧刺激により活性化されることが明らかになり、さらに細胞応答としての ENaC 遺伝子発現を介するナトリウム再吸収亢進にも関与していることが示された。但し、細胞内クロライド濃度のセンサー分子と考えられる src kinase の活性化メカニズムには、src kinase の自己活性化能によるメカニズム以外に、活性化部位のチロシン脱リン酸化酵素の活性制御も重要な役割を担っていることが示唆され、単純に src kinase をセンサー分子と断定す

ることができないと考えられる。

5. 今後の課題

Src kinase の活性制御に関するチロシン脱リン酸化酵素の同定をするとともに、その活性制御による src kinase の活性化メカニズムを明らかにし、さらには細胞内クロライドイオンのセンサー分子が、src kinase であるのか、src kinase を脱リン酸化する酵素なのかを明らかにしていく。細胞内シグナルとして重要なタンパク質のリン酸化であるが、これまではリン酸化酵素の活性制御の観点からの研究が多くを占めていたが、実際の細胞内では脱リン酸化酵素の役割も無視できず、積極的な情報伝達に関与している可能性も示唆されている。この脱リン酸化酵素の活性制御に関わるのがクロライドイオンであると考えられ、塩化ナトリウムの構成成分であるクロライドイオンの新たな生理的役割がクローズアップされ、その役割を明らかにすることが今後の課題と考えられる。

参考文献

- 1) **NIISATO N**, Van Driessche W, Liu M, Marunaka Y. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na⁺ transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J Membrane Biol* 175: 63-77, 2000.
- 2) Taruno A, **NIISATO N**, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F128-F138, 2007.
- 3) **NIISATO N**, Eaton DC, Marunaka Y. Involvement of cytosolic Cl⁻ in osmoregulation of alpha-ENaC gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F932-939, 2004.
- 4) **NIISATO N**, Taruno A, Marunaka Y. Involvement of p38 MAPK in hypotonic stress-induced stimulation of β- and γ-ENaC expression in renal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 819-824, 2007.
- 5) Miyazaki H, Shiozaki A, **NIISATO N**, Marunaka Y. Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl⁻ concentration acting as an intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1411-1417, 2007.

No. 0736

Sensing Mechanism of Cytosolic Cl^- as a Signal Molecule in Hypotonic Stress

Naomi Niisato , Yoshinori Marunaka

Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science,
Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

In renal epithelium, plasma hypotonic stress stimulates Na^+ reabsorption to recover normal plasma osmolality. However, it is still under investigation how dose cell sense the changes in extracellular osmolality and stimulate Na^+ reabsorption. We have previously indicated in renal epithelia that: 1) the hypotonic stress causes a biphasic reduction of cytosolic Cl^- concentration ($[\text{Cl}^-]_c$); a decrease in $[\text{Cl}^-]_c$ during initial cell swelling followed by that during a subsequent regulatory volume decrease, and 2) the hypotonic stress modulates tyrosine phosphorylation of src kinase playing a crucial role in signal transduction. Based on these observations, we hypothesized that cytosolic Cl^- acts as a signal molecule to regulate tyrosine phosphorylation in hypotonic stress in renal epithelia. To study if the cytosolic Cl^- acts as a signal molecule for the hypotonic stress, we studied the effects of $[\text{Cl}^-]_c$ on phosphorylation state of src kinase at Tyr416. Generally src kinase autophosphorylates Tyr416 to show its enzymatic activation. A reduction of $[\text{Cl}^-]_c$ increased phosphorylation of src kinase at Tyr416. On the other hand, the treatment of vanadate (a protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor) was more effective to an increase in phosphorylation of src kinase at Tyr416 under high $[\text{Cl}^-]_c$ condition. These observations suggest that: 1) both activities of PTP and src kinase decrease at lowered $[\text{Cl}^-]_c$, and 2) the activity of src kinase is larger than that PTP at lowered $[\text{Cl}^-]_c$. Furthermore, $[\text{Cl}^-]_c$ -dependent activation of src kinase stimulated Na^+ reabsorption through induction of beta- and gamma-ENaC mRNA expression in renal epithelium.