平成 21-22 年度 学内グラント終了時報告書

細胞分化に伴う上皮 Na チャネルの発現と 組織内局在を規定する因子の同定

研究代表者 高田 真理(医学部 生理学) 研究分担者 金子 優子¹⁾,青葉(藤牧) 香代¹⁾,穂苅 茂²⁾

緒言

上皮 Na channel (epithelial Na channel: ENaC) は上 皮細胞膜に局在し,電解質,体液調節に関わるイオン チャネルである.例えば腎臓の尿細管,肺の上皮 Na 輸送 (Na 再吸収機構) が有名である.ENaCは感覚器 (味細胞,蝸牛管のReissner 膜等) にも発現している. また,およそNaの再吸収とは無縁とおもわれる哺乳 類皮膚 (表皮細胞) にも発現している¹⁾.表皮における ENaCの機能は定まっていない^{2,3)}.

ENaCは α -, β -, γ -subunitの3種のsubunitからな り2 α + β + γ の4量体で機能すると言われている¹⁾. Amiloride という薬品がありこの薬品はENaCの blockerである.通常,上皮全体を横切る電流(上皮 電流),あるいは細胞膜を横切る電流(膜電流)が amilorideでblockされたとき,活性を持つENaCが存 在しその機能がblockされたとみなされる. Amilorideblockable currentの存在は活性を持つENaCが細胞膜 に局在する証である¹⁾.

人為的に subunitの組み合わせを変えた ENaCを 作成し、その活性を調べた研究では、活性発現には α -subunit (α -ENaC)の存在が必須であると言われ ている. すなわち、 $\alpha\beta$ もしくは $\alpha\gamma$ の組み合わせ は channelとして機能するが (amilorde-blockable Na currentが流れるが)、 $\beta\gamma$ の組み合わせでは機能し ない⁴⁾. Amilorideは α -subunitをblockする⁵⁾.

両生類皮膚は後期胚発生(変態)期にその形態と機能が大幅に変化する.例えばウシガエルでは,幼生 皮膚の形態は頂側にアピカル細胞を有し,魚類型であるが,成体皮膚は頂側が角化層をなし,哺乳類型 である^{6.7}.幼生皮膚にはENaC活性は無いが(幼生皮 膚の上皮電流がamilorideでblockされない),成体皮

1) 医学部 生理学 2) 医学部 生化学 膚には発現している(成体皮膚の上皮電流はamiloride でblockされる).活性を持つENaC(ENaC活性 = amiloride-blockable反応)は変態期に発現する⁸⁻¹⁰.

成体両生類皮膚は体の外側から内側に向けて皮膚を 横切るNa輸送を行っている.このため哺乳類腎尿細 管におけるNa再吸収機構研究のためのモデル上皮と して使われてきた¹¹⁾.両生類皮膚は,1)Na再吸収器官 の観点からENaCの発現,局在,活性調節を,2)哺乳 類型皮膚の観点から皮膚の形成とENaCとの関連,の 両者を明らかにするための格好の素材となろう.

我々はウシガエル幼生皮膚をEDTA処理すること で、表皮が表皮幹細胞である基底細胞のみからなる皮 膚を作成でき、この試料を corticoid 存在下で培養する と形態的にも機能的にも成体皮膚を分化誘導できるこ とを見いだした. すなわち, 表皮の形態は胚芽細胞, 有棘細胞,顆粒細胞,角化細胞からなる成体型となり, 上皮電流はamilorideでblockされた. Corticoidの中で はaldosteroneが最も強力であった¹²⁾. 一方, EDTA 処 理した幼生皮膚をcorticoid + prolactin (PRL) (もし くは growth hormone: GH) で培養すると幼生皮膚を 分化誘導できることを見いだした. すなわち表皮の形 態は基底膜側から、基底細胞(basal cells)、スケイン 細胞(skein cells), アピカル細胞(apical cells)からなる 幼生型をなし、 上皮電流は amilorideで blockされな かった^{13, 14)}. この事実は, 例えば, corticoid 存在下の 培養ではENaCの合成が行われる、しかし、corticoid に加えてPRLが存在するとENaCは合成されない、も しくはENaCは合成されるものの細胞膜への局在に障 害が生じる、の可能性を示す.いずれにせよ、培養条 件を変えることで形態およびENaC 活性の異なる皮膚 を分化誘導できるこの実験系は、本課題を研究するた めの最適の実験系の一つと考えた.

この考えに基づきわれわれは、幼生皮膚、成体皮膚、 EDTA 処理した幼生皮膚を corticoid 存在下で培養した ものとcorticoid + PRL存在下で培養したもの,都合 4 種の皮膚を用い,RT-PCRでENaC mRNAの発現を調 べた.さらに α -ENaCに対する抗体 (anti α -ENaC)を 作成して幼生皮膚と成体皮膚を対象に α -ENaC 蛋白の 発現と局在をwestern blottingと免疫染色で調べた.そ の結果,1) ENaCの3種(α -, β -, γ -subunit)すべて のmRNAは成体皮膚ではもちろんのこと,幼生皮膚, 両培養条件下の皮膚に発現していた(つまり人為的に 成体皮膚/幼生皮膚の分化誘導をおこなったとき,ど ちらにも発現した).2) anti α -ENaCは幼生/成体皮 膚の82 kDaのバンドに反応するとともに,幼生皮膚の アピカル細胞全周,成体皮膚の顆粒細胞の頂側細胞膜 に反応した¹⁵.

上皮Na輸送においてNaは頂側細胞膜のENaCを 通って細胞内に入り、側底側のNa/K pump (Na/ K-ATPase) により側底側に汲み出される. そこで ENaCは上皮の頂側の細胞の、しかも頂側細胞膜に局 在している必要がある. 成体皮膚においてそこは顆粒 細胞の頂側細胞膜である. また幼生皮膚においてそこ はアピカル細胞の頂側細胞膜である. ENaCの機能発 現の見られない (amiloride という薬品で抑制される上 皮電流が見られない) 幼生皮膚でENaC mRNAが発現 していて、α-ENaC蛋白が、たとえ全周とはいえ頂側 細胞の細胞膜に反応していた実験事実に対し、次の疑 念が浮かび上がった. 1) RT-PCRのためのサンプリン グにおいては、幼生皮膚の表皮側をスライドグラス で掻きとることで表皮を集めた. この作業においては 真皮の一部も掻きとられてしまう可能性が高い. そこ でENaC mRNAの発現が表皮を構成する、アピカル細 胞,スケイン細胞,基底細胞のどの細胞に由来するの かが明確でないとともに,真皮の細胞に由来した可能 性も残ってしまう. さらに、ENaC mRNAがアピカル 細胞以外の細胞に由来するとすれば、なんでそんな細 胞に発現する必要があるのか?という新たな別の疑問 も生じる.そこで是非とも、幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在を研究し、アピカル細胞に局在している のかどうかを調べる必要がある.2) anti α-ENaC はJensik et al.¹⁶⁾がクローニングしたウシガエルの α-ENaCのアミノ酸配列の一部を用いて作成した¹⁵⁾. 抗体は抗原のアミノ酸配列を識別するというよりも, 抗原分子に類似の立体構造を識別する可能性が高い. ウシガエルのアミノ酸配列の一部を利用して作成した anti α -ENaCが反応した蛋白は、立体構造が類似の、 α-ENaCとは別の蛋白である可能性もある. もしく は、抗体は真にα-ENaCと反応しているにしても、幼 生皮膚の細胞膜に局在するα-ENaCには、何かの理 由で, amiloride-blockableな反応が見られない様態を 示している可能性がある. こう考えるなら, 作成した anti α -ENaCが反応しているのが (western blotting に せよ免疫染色にせよ),真にENaC蛋白なのかどうか を確定しておく必要がある.

この第一の疑念を解くために、本学内グラント研究 では、*in situ* hybridizationの実験手法を用い、表皮に おけるENaC mRNAの局在を調べた.

材料と方法

材料

ウシガエル(かつてRana catesbeianaと命名され ていたが、現在はLithobates catesbeianusと呼ばれ ている)幼生、成体は動物商から購入した.幼生は MS222存在下の冷却水で麻酔し、その後ピスし、腹部 皮膚を切り出した.成体はウレタンを脊髄腔内に注入 して麻酔し、その後ピスし、腹部皮膚を切り出した. RNAの抽出

成体皮膚の表皮側をスライドグラスで掻き取り 表皮を集めた. 全 RNA (total RNA) もしくはpoly(A)⁺ RNAs (mRNAs) を, 掻き取った表皮から分離した. 全 RNAは Chomczynski and Sacchi¹⁷⁾により分離した. Poly(A)⁺ RNAsの分離にはFastTrack Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた.

RNA probeの作成

ウシガエル成体表皮 Poly(A)⁺ RNAsからRT-PCR 法とTA Cloning 法を用いてウシガエルの α -, β -, γ -ENaC¹⁶⁾とウシガエルの成体ケラチン(RAK; type I keratin: Suzuki et al.¹⁸⁾)を部分クローニング し, RNA probe 作成時のテンプレートとして用いた. Digoxigenin (DIG) 標識 RNA probeの作成にはDIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche Diagnostics)を用い, RNA probeは, quick-spin column (G-50 Sepadex Columns Radiolabeled RNA Purification; Roche Diagnostics)で精製した.

Northern blot

各 DIG 標識 RNA probeの特異性を確認するために northern blotを行った. ウシガエル成体表皮 Poly(A)⁺ RNAs (0.1-0.2 µg/lane)を0.22 mol/Lの formaldehydeを含む1% agarose gelでMOPS buffer 中で泳動分離した. 泳動後, RNAをNytran SuPerCharge membrane (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)に転写した. 転写膜を DIG 標識 RNA probeとhybridizeした. 転写膜は洗浄後, 非特異的シグナルをBlocking Reagent (Roche Diagnostics)でブロックし, アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) を用いた発色反応を行い, probeとRNAとのhybridizationシグナルを検出した.

In situ hybridization

切り出した幼生,成体皮膚は4% paraformaldehyde で固定した.10-20% sucroseで置換した後,O.C.T. compoundに包埋,凍結切片を作成し,スライドグラ スに貼付けた.凍結切片は,Protease K処理後,4% paraformaldehydeで再固定した.その後常法に従い, TEA (triethanolamine)処理等の前処理を行い,DIG 標 識 RNA probeと hybridize した. Hybridize した切片は 洗浄後,RNase 処理で余剰のRNA probeを分解し,さ らに洗浄した後 Blocking Reagent (Roche Diagnostics) で非特異的シグナルをブロックし,アルカリフォス ファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics)と反 応させた.抗体反応後,洗浄し,NBT/BCIP (Roche Diagnostics)を用いた発色反応を行い,光学顕微鏡で probeとmRNAとのhybridizationシグナルの局在を観 察した.

結果

Northern blotting

α-, β-, γ-ENaCのmRNAは それぞれ2281 bp, 2745 bp, 2497 bpである¹⁶⁾. またRAK (Rana adult keratin)のmRNAは1700 bpである¹⁸⁾.

作成したRNA probeの特異性を調べるため、 northern blot解析を行った(図1). α -, β -ENaCと RAKのDIG標識RNA probeを用いたnorthern blot解析 の結果、それぞれ目的の大きさの1本バンドが検出さ れた.この結果は、本研究で用いた α -, β -ENaCおよ びRAKに対するprobeが、各遺伝子に特異的なprobe であることを示している.我々は、 α -, β -ENaCお よびRAKに対するprobeが信頼できると考え、*in situ* hybridization実験に用いた.

一方, γ -ENaCのDIGラベルRNA probeではシグ ナルは検出できなかった. 我々は, γ -ENaCに対する probeを数種作成したが,いずれもシグナルは検出で きなかった (data not shown).

In situ hybridization

In situ hybridization 法で成体ウシガエル皮膚の ENaC mRNAの局在を調べた(図2). α -ENaCのDIG 標識 RNA probeをhybridizeした結果,シグナルは, 成体表皮の顆粒細胞だけでなく,有棘細胞,さらに 一部ではあるが胚芽細胞からも検出された(図2A). β -ENaCのprobeを用いた結果では,hybridizationシ グナルは,顆粒細胞と顆粒細胞に近い有棘細胞の一部 から検出されたが,胚芽細胞では検出されなかった (図2C). RAKのprobeを用いた結果は,Suzuki et al.¹⁸⁾ の結果同様,成体皮膚の胚芽細胞に強いシグナルが 検出され,細胞全体に染色が見られた(図2E).一方, α -, β -ENaCの結果では,シグナルは核付近に集中し ていた(図2A, C).角化細胞と真皮には非特異的シグ ナルのみが見られた.

我々は, y-ENaCについても数種のRNA probeを 用いて*in situ* hybridizationを試みたが, northern blot 解析の結果同様, 特異的なシグナルは検出できな かった (data not shown). さらに我々は、同様の方法でウシガエル幼生皮膚 におけるENaC mRNAの局在を調べた.しかしなが ら、幼生皮膚ではどの遺伝子のprobeを用いても非特 異的シグナルが強くでたため、antisense probeの結果 と sense probeの結果との比較から特異的なシグナル を検出することができなかった.従って、ウシガエ ル幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在は α -、 β -、 y-ENaCのいずれについても判定できなかった.

考察

本研究では*in situ* hybridizationを用いて成体と幼 生ウシガエル皮膚におけるENaC mRNAの局在を調 べた.

成体表皮において、 α -ENaC mRNAは顆粒細胞、有 棘細胞、胚芽細胞に発現していた. β -ENaC mRNA は顆粒細胞と有棘細胞に発現していた. γ -ENaCに ついてはシグナルが検出されず、局在を判別できな かった.今回我々は、 γ -ENaCのRNA probeを数種作 成したが、そのいずれもnorthen blot解析及び*in situ* hybridizationで成体皮膚の γ -ENaC mRNAの存在を捉 えることができなかった. γ -ENaCに対するprobe 作 成のために選んだ配列部位や、長さに問題があった か、あるいは、成体皮膚に発現している γ -ENaC



 \boxtimes **1.** Northern blot analysis of mRNA expressions of ENaC subunits and adult *Rana* keratin (RAK). Lanes contain 0.1-0.2 μg of mRNA from bullfrog epidermis. The membrane was hybridized to DIG-labeled α-ENaC (lane 2), β-ENaC (lane 3), and RAK (lane 4) probes. Marker, RNA ladder.

mRNAの量が,採用した実験手法で捉えるには少なす ぎた可能性がある.

ENaCは表皮の頂側細胞の頂側細胞膜に局在してい てはじめて上皮 Na 輸送に関与できる. それとともに, 頂側細胞の頂側細胞膜に局在していれば他の細胞に 発現している必要は無い. 成体表皮においての最外層 の角化細胞は最終分化をとげ死に至っている細胞で ある. 顆粒細胞こそが生きて生体機能に役割をはたす 頂側の最外層の細胞である. そこでENaC 蛋白は顆粒 細胞に発現しその頂側に局在していれば十分である. Takada et al.¹⁵⁾の免疫染色によれば, anti α-ENaCは顆 粒細胞の頂側細胞膜に反応がみられた. それゆえ成体 皮膚においてはENaC mRNAも顆粒細胞のみに局在し ていると予想していた. しかし, *in situ* hybridization 法を用いた本研究で, α-, β-ENaCのmRNAは顆粒細胞にはもちろんのこと,有棘細胞にも発現していることが明らかになった.さらに,α-ENaC mRNAは胚芽細胞にも発現していることが明らかになった.本研究は,成体皮膚においては,ENaC mRNAはENaC 蛋白の発現に先行し,細胞分化の早い時期から発現することを示した.また,この結果から,上皮 Na 輸送機能に 無関係と思われる有棘細胞/胚芽細胞に発現している ENaC mRNAの役割は何か,という新しい疑問が提示された.

本研究の目的の一つは幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在の解明であった. RT-PCRによる研究で は幼生皮膚において α -, β -, γ -ENaCのmRNAのい ずれも発現していた¹⁵⁾. しかし, *in situ* hybridization



⊠ 2. Localizations of *α* - and *β*-ENaC, and RAK (*Rana* adult keratin) mRNAs in the normal adult bullfrog skin were examined by *in situ* hybridization. Photomicrographs of vertical sections of such skin hybridized with specific RNA probe for *α* - or *β*subunit of ENaC, or RAK. a and b, *α*-ENaC; c and d, *β*-ENaC; e and f, RAK. A, C, and E, antisense probe; B, D, and F, sense probe. Hybridization signal for *α*-ENaC was detected in both the Str. granulosum and the Str. spinosum. In addition, a few cells in the Str. germinativum expressed *α*-ENaC (arrows in a). Hybridization signal for *β*-ENaC was detected in both the Str. granulosum and the upper Str. spinosum. Hybridization signal for RAK was detected in the Str. germinativum. Non-specific staining was observed in the Str. corneum and the dermis (⊠ 2A-F). SC, cornified cells; GC, granular cells; SP, spinosal cells; SG, germinative cells. Bar: 20 µm.

では幼生皮膚において α -, β -, γ -ENaCのmRNAのい ずれの発現も捉えられなかった. RT-PCRではmRNA の存在を増幅して捉える. そこでmRNAの発現量が少 なくても捉えることができた可能性がある. 幼生皮膚 において発現している α -, β -, γ -ENaC mRNAは*in situ* hybridizationでとらえるには少なすぎたのかもし れない. 今後, 少ない発現量のmRNAでもmRNAの存 在をとらえることのできる新たな*in situ* hybridization の方法を開発する必要がある.

anti α -ENaCは幼生表皮の頂側細胞であるアピカル 細胞の細胞膜に反応した¹⁵⁾. それにも関わらず幼生で はENaC 機能 (amiloride-blockable response) が見られ ない^{8-10,19)}. α -ENaC 蛋白がアピカル細胞の全周に局在 することに問題があるのかもしれない. あるいは,幼 生皮膚の α -ENaC 蛋白は修飾され (あるいは修飾を受 けず),本来の機能が見られないのかも知れない. さ らに anti α -ENaC が真に α -ENaC 蛋白と反応している のではなく,幼生皮膚に存在する全く別の蛋白に反応 し,それを α -ENaCの signal と誤解した可能性も残る. anti α -ENaCの反応する蛋白の実体を2次元泳動と Tof/MS 解析で研究する必要がある. これらの解明が ENaC 蛋白の局在調節の今後の検討課題となった.

今後の展開

我々はすでに上記方面の研究を開始した.研究に あたっては2次元泳動後, anti α -ENaCに反応した spotをgelから切り出し解析することになる. Gelの spot位置の信頼性を高めるため, 泳動用のcontrolと してENaC-HA (HA-tagの付いたENaC)を合成し, そ の泳動パターンと比較することにした. University of Southern IllinoisのDr. Jensikから, 彼が作成した α -ENaC-HA constractの供与を受けた. Construct を大腸菌で大量合成し, HEK細胞にtransfectして α -ENaC-HAを合成させた. α -ENaC-HAが合成さ れたかどうかはSDS-PAGE後western blottingし, anti α -ENaCとanti HAとで反応させて確認した. 現 在 α -ENaC-HAの2次元泳動にかかっているところで ある.

さらに、constructをEDTA処理した幼生皮膚に transfectすれば、constructは表皮幹細胞である基底 細胞にtransfectされることになる.それをcorticoid/ cortidoid + PRLで培養すれば、成体皮膚/幼生皮膚を 分化誘導した場合のENaC-HAの発現と局在の挙動の 相違をより的確に捉えることができるはずである.こ の研究も開始した.

これら研究はDr. Jensikとの共同研究として進行中 である.それとともにこの研究が次の学内グラント採 択につながることを願っている.

なおENaC mRNAの*in situ* hybridizationの結果は Acta Histochemicaに印刷中である²⁰⁾.

引用文献

- Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/ degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared stress. Physiol Rev 2002;82: 735-67.
- 2) Brouard M, Casasdo M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N. Epithelial sodium chanel in human epidermal kerationocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. J Cell Sci 1999;112:3343-52.
- Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L, Rassner U, Elias PM, Hummler E. The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation. J Invest Dermat 2002;118:589-94.
- 4) Ishikawa T, Marunaka Y, Rotin D. Electrophysiological characterization of the rat epithelial Na⁺ channel (rENaC) expressed in MDCK cels: *effects of Na⁺ Ca²⁺*. J Gen Physiol 1998;111:825-46.
- 5) Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR. On the interaction between amiloride and its putative *α*-subunit epithelial Na⁺ channel binding site. J Biol Chem 2005;280:26206-15.
- Whitear M. Epidermis. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS, editors. Biology of the integument 2. Berlin: Springer-Verlag; 1986. P. 8-38.
- Robinson DH, Heinzerman MB. Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana* during metamorphosis. Anat Rec 1987;217:305-17.
- Cox TC, Alvarado RH. Electrical and transport characteristics of skin of larval *Rana catesbeiana*. Am J Physiol 1979;237:R74-9.
- 9) Hillyard SD, Zeiske W, Van Driessche W. A fluctuation analysis study of the development of amiloride-sensitive Na⁺ transport in the skin of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Biochim Biophys Acta 1982;692:445-61.
- 10) Takada M. Differentiation of the active sodium transport system during metamorphosis in *Rana catesbeiana* skin in relation to cadmiumand amiloride-induced responses. Jpn J Physiol 1985;35:525-34.
- 11) Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the shortcircuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand 1951;23:110-27.
- 12)Takada M, Yai H, Takayama-Arita K. Corticoidinduced differentiation of amiloride-blockable active Na⁺ transport across larval bullfrog skin in vitro.

Am J Physiol Cell Physiol 1995;268:C218-26.

- 13) Takada M, Yai H, Takayama-Arita K, Komazaki S. Prolactin enables normal development of AChstimulated current in cultured larval bullfrog skin. Am J Physiol 1996;271:C1059-63.
- 14) Takada M, Kasai M. Growth hormone is a weaker candidate than prolactin for the hormone responsible for the development of a larval-type feature in cultured bullfrog skin. J Exp Biol 2003;206:1137-41.
- 15)Takada M, Shimomura T, Hokari S, Jensik PJ, Cox TC. Larval bullfrog skin expresses ENaC despite having no amiloride-blockable transpithelial Na⁺ transport. J Comp Physiol B 2006;176:287-93.
- 16) Jensik PJ, Holbird D, Cox TC. Cloned bullfrog skin sodium (fENaC) and xENaC subunits hybridize to form functional sodium channels. J Comp Physiol B 2002;172:569-76.
- 17) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.
- 18)Suzuki K, Sato K, Katsu K, Hayashita H, Kristensen DB, Yoshizato K. Novel *Rana* keratin

© 2011 The Medical Society of Saitama Medical University

genes and their expression during larval to adult epidermal conversion in bullfrog tadpoles. Differentiation 2001;68:44-54.

- 19) Takada M, Yai H, Komazaki S. In vitro treatment of bullfrog tadpoles with aldosterone potentiates Achreceptor channels, but not amiloride-blockable Na⁺ channels in the skin. Zool Sci 1997;14:883-6.
- 20) Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press) (DOI:10.1016/j.acthis.2011.02.008).

研究成果リスト

学会発表

<u>Kaneko Y</u>, <u>Fujimaki-Aoba K</u>, Watanabe S, <u>Hokari S</u>, <u>Takada M</u>. Expression pattern of ENaC mRNAs in adult bullfrog skin, 第 32 回日本分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月, 横浜

論文

<u>Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K</u>, Watanabe S, <u>Hokari S</u>, <u>Takada M</u>. Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press)

http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/