

『極性細胞の病態生理解明に向けた 多角的アプローチ』

2010 年 11 月 4 日(木)～11 月 5 日(金)

自然科学研究機構 生理学研究所(明大寺地区) 1 階会議室

代表者: 富山大学大学院医学薬学研究部 酒井秀紀

所内対応者: 生理学研究所生体恒常機能発達機構 鍋倉淳一

プログラム・抄録集



生理研研究会

『極性細胞の病態生理解明に向けた多角的アプローチ』

日時：2010 年 11 月 4 日（木）～11 月 5 日（金）

場所：自然科学研究機構生理学研究所（明大寺地区）1 階会議室

代表者：富山大学大学院医学薬学研究部 酒井秀紀

世話人：生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門 鍋倉淳一

（発表 20 分， 質疑応答 10 分）

11 月 4 日（木） 1 日目	
受付	
13:00	開会の挨拶
Session 1	座長 丸中良典（京都府立大学）
13:05	膵導管細胞の重炭酸イオン分泌における CFTR と SLC26A6 の役割 ○石黒 洋、Song Ying、山口 誠、山本明子、Martin Steward、相馬義郎 名古屋大学大学院健康栄養医学、マンチェスター大学生命科学、慶應義塾大学薬理学
13:35	グラミシジン穿孔パッチクランプ法による唾液腺イオン輸送機構の解析 ○杉田 誠、広野 力 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻病態探究医科学講座（口腔生理学）
14:05	尿酸輸送体過剰発現マウスを用いた高尿酸血症起因輸送体の同定とその極性発現 ○木村徹 ¹ 、安西尚彦 ¹ 、Sirirat Amonpatumrat ¹ 、金井好克 ² 、河原克雅 ³ 、櫻井裕之 ¹ 杏林大学医学部薬理学 ¹ 、大阪大学大学院生体システム薬理学 ² 、北里大学医学部生理学 ³
14:35	コーヒーブレイク
Session 2	座長 櫻井裕之（杏林大学）
14:50	メタボロミクスを用いた新規有機アニオントランスポーターOatn1 の生体内における機能の解析 ○永森収志 ¹ 、平田拓 ² 、何新 ² 、Pattama Wiriyasermkul ¹ 、石川貴正 ³ 、曾我朋義 ⁴ 、金井好克 ¹ ¹ 大阪大院・医・生体システム薬理、 ² 杏林大・医、 ³ HMT、 ⁴ 慶応大・先端生命研
15:20	ヒト及びラット大腸における匂い物質の受容と分泌作用 ○加治いずみ 唐木晋一郎 桑原厚和 静岡県立大学大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室
15:50	MAP kinases・MAPK phosphatases による腎上皮細胞での Na⁺再吸収制御機構 ○新里 直美、丸中良典 京都府立医科大学・細胞生理学
16:20	コーヒーブレイク
Session 3	座長 桑原厚和（静岡県立大学）
16:35	マウス腎集合管バソプレシン V1aR-AQP2 軸：実験的アシドーシスの影響 ○安岡有紀子、小林瑞佳*、河原克雅 北里大学医学部生理学、麻酔科学*
17:05	核膜イオンチャネル ○丸山芳夫 東北大学大学院医学研究科 細胞生理
17:35	コーヒーブレイク
特別講演	座長 金井好克（大阪大学）
17:45	神経細胞内 Cl⁻ 濃度調節機構と生体機能 鍋倉 淳一 生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門
18:50	懇親会 於 生理学研究所（明大寺地区）5 階 談話室

11月5日（金） 2日目

Session 4 座長 酒井秀紀（富山大学）

8:40 TMEM16F の電気生理学的性質

○清水貴浩¹、家原貴大¹、藤井拓人¹、竹口紀晃¹、岡田泰伸²、酒井秀紀¹
¹富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物生理学
²生理学研究所・機能協関

9:10 Na⁺依存性グルコース吸収におけるタイト結合部の役割

○林久由¹、鈴木裕一¹、田村淳²、月田早智子²
¹静岡県立大学 食品栄養科学部 生理学研究室
²大阪大学大学院 生命機能研究科

9:40 熱ショック転写因子群による細胞内タンパク質恒常性の維持

譚克、新川豊英、林田直樹、瀧井良祐、Ramachandran Prakasam、藤本充章、○中井 彰
山口大学大学院医学系研究科医化学分野

10:10 コーヒーブレイク

Session 5 座長 河原克雅（北里大学）

10:25 胃潰瘍副作用の少ない NSAIDs の開発

○水島 徹（熊本大学）
熊本大学

10:55 Beta-2 agonist によるマウス末梢気道線毛運動の活性化

○中張 隆司（大阪医科大学）
大阪医科大学

11:25 肝がん細胞の細胞外 ATP 分解能に対するクルクミンの効果

○藤井拓人、皆川拓磨、清水貴浩、竹口紀晃、酒井秀紀
富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学

11:55 閉会の挨拶

膵導管細胞の重炭酸イオン分泌における CFTR と SLC26A6 の役割

名古屋大学大学院健康栄養医学、マンチェスター大学生命科学、慶應義塾大学薬理学

石黒 洋、Song Ying、山口 誠、山本明子、Martin Steward、相馬義郎

ヒトの膵臓は、消化酵素と 140 mM もの高濃度の HCO_3^- を含む等張の膵液を一日に約 2 L 分泌する。 HCO_3^- と水は、末梢の細い膵管の上皮細胞(膵導管細胞)から分泌される。膵導管細胞の Apical membrane は 6~7 倍の濃度勾配に逆らって HCO_3^- を輸送するが、嚢胞性線維症の原因分子である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) アニオンチャネルと SLC26A6 アニオン輸送体がこれを担っている。

Slc26a6 ノックアウトマウスから単離した小葉間膵管(直径~100 μm)を用いて、Slc26a6 による Cl^- - HCO_3^- exchange の stoichiometry を調べた。一昼夜培養して両端が閉じた単離膵管の管腔内を、細胞膜透過性のない pH 感受性色素である BCECF-dextran を含む 149 mM Cl^- -0 mM HCO_3^- 溶液で満たし、表層を同じ溶液で 37°C で灌流した。Forskolin の刺激下に表層灌流液を 124 mM Cl^- -25 mM HCO_3^- 溶液に切り替えた。管腔内 pH と管腔容積の変化から net の Cl^- flux と HCO_3^- flux を算出した。ワイルドタイプの膵管における Cl^- absorption/ HCO_3^- secretion 比は約 0.7、Slc26a6 null の膵管における Cl^- absorption/ HCO_3^- secretion 比は約 2.2 であった。マウス膵管の Slc26a6 は、 Cl^- -n HCO_3^- exchange を担うと考えられた。

高濃度 HCO_3^- 分泌における SLC26A6 Cl^- -n HCO_3^- exchange の役割を調べるために、MATLAB/Simulink を用いて単一膵導管細胞のシミュレーションモデルを作成した。Basolateral membrane に Na^+ - K^+ pump、 K^+ conductance、 Na^+ -2 HCO_3^- cotransport、 Na^+ - H^+ exchange、1 Cl^- -1 HCO_3^- exchange を、Apical membrane に CFTR (HCO_3^- / Cl^- 透過性比:0.4) と 1 Cl^- -2 HCO_3^- exchange あるいは 1 Cl^- -1 HCO_3^- exchange を組み込んだ。管腔内のアニオン組成が 24 mM Cl^- -125 mM HCO_3^- の条件において、1 Cl^- -2 HCO_3^- exchange は HCO_3^- 分泌方向に働いたが、1 Cl^- -1 HCO_3^- exchange は HCO_3^- 吸収方向に働いた。分泌液と同量の膵液を管腔外へ流出させて管腔の容積を一定とし、分泌液と膵液のイオン組成が等しくなった時点で定常状態となるモデルを作成した。Apical membrane に 1 Cl^- -2 HCO_3^- exchange を組み込んだ膵導管細胞は、~140 mM の HCO_3^- を含む膵液を 1-2 $\text{nl min}^{-1} \text{mm}^{-2}$ (単位上皮表面積当り) の速度で分泌した。

グラミシジン穿孔パッチクランプ法による唾液腺イオン輸送機構の解析

杉田 誠、 広野 力

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻病態探究医科学講座（口腔生理学）

唾液腺の腺房細胞と導管細胞では副交感神経刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、水分分泌もしくは再吸収を駆動するアニオン輸送が引き起こされる。本研究ではグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用い、腺房細胞と導管細胞における Ca^{2+} 依存性のアニオン輸送の律速分子活性およびアニオン輸送機構を明らかにすることを目的とする。ホールセルパッチクランプ法に比較し、一価のカチオンを選択的に透過するグラミシジンを適用したグラミシジン穿孔パッチクランプ法では、細胞内の Cl^- を含むアニオン濃度は、細胞膜に発現するチャネル・トランスポーターにより調節され、生理的組成に近い状態で維持される。グラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いることにより、活発なアニオン輸送を行う上皮系細胞において、いかなるトランスポーター活性等により細胞内に供給されたアニオンが、いかなるチャネル等を通して細胞外へ分泌されるか、それらの過程を単一細胞レベルで高い時間分解能で解析することが可能となる。唾液腺の腺房細胞において、副交感神経性作働薬 carbachol 刺激時には、 Ca^{2+} 依存性の振動性 Cl^- 電流が観察される。本 Cl^- 電流は $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体の阻害剤である bumetanide により顕著に抑制されることより、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体により細胞内に供給された Cl^- が Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルを介して腺腔側に分泌されることが示唆される。NPPB による Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルの部分的阻害は carbachol により誘発される Cl^- 電流量に影響を与えないが、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体のさらなる活性化は Cl^- 電流量を増大させることより、腺房細胞では、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体活性が Ca^{2+} 依存性の振動性 Cl^- 分泌の律速過程を支配することが示唆された。一方、導管細胞においては、副交感神経性作働薬 carbachol 刺激時に、非振動性のアニオン電流が観察され、本アニオン電流は炭酸脱水酵素阻害剤 methazolamide の添加により抑制された。導管細胞では、炭酸脱水酵素により細胞内で産生された HCO_3^- が DPC 感受性で DIDS 非感受性のアニオンチャネルを通して分泌されることが示唆された。

尿酸輸送体過剰発現マウスを用いた高尿酸血症起因輸送体の同定とその極性発現

木村徹¹、安西尚彦¹、Sirirat Amonpatumrat¹、金井好克²、河原克雅³、櫻井裕之¹

杏林大学医学部薬理学¹、大阪大学大学院生体システム薬理学²、北里大学医学部生理学³

【目的】尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物であり、主に腎臓から排泄される。我々は、腎近位尿細管において管腔側の URAT1 と基底膜側の URATv1 の両輸送体がタンデムに働き、尿酸の経細胞輸送を行っていることを示した。しかし、この2つのトランスポーターが高尿酸血症の発症にいかに関わっているのか明らかではない。そこで、それぞれの輸送体過剰発現マウス(Tg マウス)を用いて、尿酸値調節機構の検討を行った。また、ヒト腎臓における URATv1 の発現部位を明らかにし、さらに *in vitro* での極性発現機構の解析を行った。

【方法】URAT1 プロモーターを用いて URAT1、URATv1 を腎近位尿細管に発現させ、これらマウスの尿酸値測定を行った。URATv1 には異なった N 末端を持つ2種類のスプライスバリエント(URATv1-S および URATv1-L)が存在するが、それぞれを認識する抗体を用いてヒト腎組織切片の染色を行った。*In vitro* での極性発現はイヌ腎臓由来細胞の MDCK 細胞を用いて観察した。

【結果】Tg マウス腎臓の免疫染色により、過剰発現させた URAT1、URATv1 がそれぞれ腎近位尿細管の管腔側、基底膜側に発現していることを確認した。URAT1 過剰発現マウスでは、血中および尿中尿酸値に変化は見られなかった。これに対し URATv1 過剰発現マウスでは、尿中尿酸排泄の減少が見られた。よって、近位尿細管の管腔側での尿酸取り込みの過程より、基底膜側から血流へ排出する過程の方がより高尿酸血症発症に対する寄与が大きいことが示唆された。ヒト腎組織切片の染色から、URATv1-S は主に遠位尿細管の管腔側に、URATv1-L は主に近位尿細管の血管側(基底側)にその発現が見られた。URATv1-S および URATv1-L を MDCK 細胞に発現させると URATv1-S は管腔側と基底側の両方に、URATv1-L は基底側のみに発現が見られた。したがって、スプライスバリエント間で異なる N 末端部位に細胞内の極性輸送に関わるシグナルが存在することが示唆された。現在、この部位の欠損体や変異体を用いた詳しい解析を行っている。

メタボロミクスを用いた新規有機アニオントランスポーターOatn1の生体内における機能の解析

○永森收志¹⁾、平田拓²⁾、何新²⁾、Pattama Wiriyasermkul¹⁾、石川貴正³⁾、曾我朋義⁴⁾、金井好克¹⁾

¹⁾大阪大院・医・生体システム薬理、²⁾杏林大・医、³⁾HMT、⁴⁾慶応大・先端生命研

生体における物質の膜透過の多くは、複数膜貫通タンパク質であるトランスポーターによって担われている。トランスポーターが輸送する物質（基質）は、培養細胞、アフリカツメガエル卵母細胞や膜小胞などを用いた *in vitro* 実験系によって非常に良く研究されており、これまでに多数のトランスポーターの輸送基質が同定されている。一方で、それらの物質が生体内における本来の基質であるかどうかは定かではない。そこで本研究では、新規に遺伝子が単離された有機アニオントランスポーターOatn1の生理的な基質を、CE-MS（キャピラリー電気泳動質量分析計）を用いたメタボロミクスにより同定することを試みた。

Oatn1 は Slc22 ファミリーに属する新規有機アニオントランスポーターとして同定された。

しかしながら、同ファミリーに属するほとんどのトランスポーターとの相同性はアミノ酸で30%前後と比較的低いため、相同性に基づいた機能の推測も困難であった。Oatn1 の mRNA は腎臓のみに発現が見られ、なかでも近位尿細管に強く発現しており、さらに免疫染色により管腔側に局在していた。この局在情報に基づき、Oatn1 欠損の影響が尿中の物質組成に反映すると考え、*oatn1* ノックアウト (KO) マウスと野生型の尿を CE-MS によって比較解析した。その結果、 β -ヒドロキシ酪酸、乳酸やホモバニリン酸が *oatn1* KO マウスの尿に多く見られたことから、これらが Oatn1 の輸送基質であると考えた。培養細胞や卵母細胞を用いた *in vitro* の実験系でもこれらが輸送されることが示され、さらに KO マウスと野生型マウスを比べた *in vivo* の実験で Oatn1 が β -ヒドロキシ酪酸を輸送していることが確認された。 β -ヒドロキシ酪酸は飢餓や糖尿病時において存在量が上昇することが知られている。糖尿病モデルマウスを作成すると *oatn1* KO マウスで尿中の β -ヒドロキシ酪酸が増加していた。一方で、*in vitro* での実験において輸送基質となるパラアミノヒプル酸、ニコチン酸や α ケトグルタル酸は、メタボロミクス解析においては尿中における顕著な変化が見られなかった。以上より、 β -ヒドロキシ酪酸が Oatn1 の生理的基質であることが明らかになり、メタボロミクスを用いた解析の有効性が示された。

ヒト及びラット大腸における匂い物質の受容と分泌作用

加治いずみ 唐木晋一郎 桑原厚和

静岡県立大学大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室

消化管管腔内は口と肛門によって外界と連続しており、生体にとって外部環境であるとも考えられる。一層の細胞から構成されている消化管粘膜上皮は、栄養素や水の吸収を行いながら、管腔からの細菌の侵入や過増殖を阻止する防御機構も兼ね備えている。このような複雑な腸管の生理機能の調節には、粘膜上皮における管腔内の化学的情報の受容が必須であると考えられる。

近年、味覚や嗅覚に関わる化学受容体が次々に同定され、同じ受容体が消化管粘膜でも機能している可能性が報告され始めた。特に、危険物を感知し忌避するための苦味や嗅覚受容機構は、下部消化管においても生体防御機構に寄与しているのではないかと考えられる。我々は、ヒト及びラット大腸組織において、複数の苦味受容体 **Taste receptor type 2** ファミリーの発現と、そのリガンドである **6-n-propylthiouracil** の起電的陰イオン分泌作用を報告した (*Am J Physiol.*, 296: G971-981, 2009)。今回は、香気成分として古くから利用され、嗅覚受容体のリガンドとして同定された **thymol** について、ヒト及びラットの結腸粘膜における組織レベルでの作用を検討した。

Ussing chamber に装着した結腸粘膜・粘膜下組織標本の管腔側に **thymol** を投与すると、濃度依存的な起電的陰イオン分泌による一過性の短絡電流 (I_{sc}) 増加が観察された。この反応はヒト及びラットどちらの組織においても、**tetrodotoxin** 及び **piroxicam** (**cyclooxygenase** 阻害薬) では抑制されないことから、神経活動やプロスタグランジン産生は関与しないことが示唆された。また、1 mM 以上の **thymol** 投与によって膜コンダクタンス (G_t) は大きく増加した。さらに、**FITC-dextran** (平均分子量 4kDa) の管腔側→血管側透過量を経時的に測定したところ、**thymol** 投与によって **dextran** 透過性が有意に上昇した。

嗅覚受容体 (**Olfactory receptor; Odorant receptor; OR**) は、マウスで 1068、ヒトで 347 個の機能遺伝子を含む G 蛋白質共役型受容体ファミリーである。リガンド選択性が低い各 **OR** が協調して応答することにより、多種多様な外来物質を識別している。**Thymol** は、陸生動物に特異的なクラス II に分類される **OR1G1** を強く活性化し、魚類の **OR** と相同性が高いクラス I の **OR52D1** は活性化しないことが報告されている。本研究では、ヒト及びラット結腸組織より粘膜層を単離し、**RT-PCR** 法を用いて **OR1G1** の発現を確認した。

本研究の結果より、下部消化管においても粘膜に嗅覚受容体が存在し、機能していることが示唆された。また、そのリガンドである香気成分が起電的な陰イオン分泌を引き起こし、さらに結腸上皮膜の透過性にも影響することが明らかになった。

MAP kinases・MAPK phosphatases による 腎上皮細胞での Na⁺再吸収制御機構

新里直美・丸中良典
京都府立医科大学・細胞生理学

腎遠位尿細管・集合管における上皮型 Na⁺ チャネル (ENaC) を介する Na⁺ 再吸収は、体液浸透圧・体液量および血圧調節にとって重要な生理機能を有し、ホルモンや血漿浸透圧、プロテアーゼなど様々な因子により緻密に調節されている。我々はこれまでに浸透圧低下という刺激が、腎遠位尿細管・集合管上皮モデル細胞 (A6 細胞) で、時間的に異なる 2 つのメカニズムによって Na⁺ 再吸収を亢進することを見出してきた。早期には、EGFR-JNK-PI3K 依存的に ENaC の管腔側膜への局在を促進するメカニズム (Am J Physiol Renal Physiol 293:F128-138, 2007) により、後期には p38 依存的に beta- and gamma-ENaC の遺伝子発現を亢進する (Am J Physiol Renal Physiol 294:F177-286, 2008, Biochem Biophys Res Commun 358:819-24, 2007) ことにより、Na⁺ 再吸収を亢進し、体液浸透圧を正常に回復させると考えた。一方で、A6 細胞において、浸透圧低下は細胞容積増大依存的に、JNK, p38 (Biochem Biophys Res Commun 266:547-550, 1999) 以外にも ERK を活性化させることを我々は報告しているが、ERK の浸透圧低下による Na⁺ 再吸収亢進への関与については知られていない。そこで、本研究では、ERK の Na⁺ 再吸収亢進メカニズムへの関与について検討したところ、以下のような結果を得た。浸透圧低下時、1) ERK は負の制御因子として Na⁺ 再吸収亢進メカニズムに関与していること、2) p38 は、MAPK phosphatase の発現制御を介して ERK による負の制御を解除する役割を担うこと、3) 3 種類の MAP kinases は時間的・空間的に協調し、緻密な Na⁺ 再吸収制御に関わること。

マウス腎集合管バソプレシン V1aR-AQP2 軸：実験的アシドーシスの影響

○安岡有紀子、小林瑞佳*、河原克雅

北里大学医学部生理学、麻酔科学*

腎集合管主細胞管腔膜の水透過性は、(1) V2R-PKA シグナル伝達系による管腔膜水チャネル (AQP2) の活性化/発現量増加と、(2) V1aR-PKC 系による拮抗作用により調節されている。一方、アシドーシス(MA)時の多尿は、「V1aR を介した細胞内 Ca^{2+} 増加による AQP2 の膜への移行阻害」と理解されているが、AQP2 の膜への組込みに関与する分子群は未だ不明である。我々は、V1aR KO マウスを使い、MA 時における AQP2 の管腔膜/細胞内局在を調べ、AQP2 の膜移行における V1aR-PKC シグナルの役割を調べた。

【方法】V1aR KO マウス、WT マウス (10 週齢) を代謝ケージに入れ、(1) 標準食飼育群、(2) 2.5% NH_4Cl 食負荷群 (MA 誘発後 6 日目) の採尿・採血を行い、pH、 pCO_2 、 HCO_3^- 、電解質および AVP 濃度等を測定した。さらに、免疫組織染色法により AQP2 の細胞内/膜局在、Western blot 法により尿中 AQP2 排泄量、TSA-ISH 法により集合管の V2R mRNA 発現量変化の解析を行った。

【結果】標準食飼育時の主要な血漿・尿データは、V1aR KO と WT 間に有意な差はなかった。MA 誘導後、V1aR KO は WT より血漿 pH、 pCO_2 、 HCO_3^- が低く、尿 pH は高かった。血漿・尿 AVP は KO の方が有意に高かったが、MA 誘導により変化しなかった。腎集合管 AQP2 の発現量は MA 誘導により KO、WT 共に増加した。AQP2 の細胞内局在は、WT では細胞質内に限局していたが、KO では管腔膜側に多く存在していた。尿中 AQP2 は、MA 誘導時に WT は激減し (2%)、KO は 20% に減少した (v.s. コントロール)。MA 誘導時の尿中 AQP2 量は、KO の方が WT より多かった。V2R mRNA の発現量は、KO では有意に低下していた。MA 誘導により WT、KO 共に増加しなかった。

【結論】(1) 腎集合管の V1aR シグナルは、MA 誘発時の酸分泌亢進に必要である。(2) V1aR は、V2R の基礎発現とアシドーシス時の AQP2 管腔膜移行に影響した。このため、MA 時の尿濃縮能低下の一因は V1aR 系シグナルが関与していると考えられる。

核膜イオンチャネル

東北大学大学院医学研究科 細胞生理
丸山芳夫

膵腺腺房細胞からの核小胞体標本作製を意図し、さまざま作成法を試みた。低浸透圧マニトール溶液中で単一化した膵腺細胞を処理し、次いで、さらなる低浸透圧溶液にて細胞膜を破砕することで、パッチクランプ電流測定法に適した核膜小胞体標本を得た。以下のような各種イオンチャネルを膵腺腺房細胞の外側核膜において同定した：1) 200 pS Maxi-K channel, 2) 80 pS K-channel, 3) 30pS cation-channel, 4) 7 pS Cl-channel, 6) 55 pS cADPR or NAADP-dependent channel。そのうち、200 pS Maxi-K チャネルの発現は動物（マウス）の週年齢に依存し、おおよそ 8 週令より機能的発現が始まり、18 週ではほぼ定常化した。

膵腺腺房細胞からの核小胞体標本において、その構造維持に果たすイオンチャネルの役割を形態構造との連関において調べた。ノマルスキー画像計測を行った結果、細胞質側の K イオンと Cl イオンをチャネル不透過イオンに置き換えると可逆的に標本が縮小することがわかった。いっぽう、低浸透圧溶液に暴露すると標本は可逆的に膨張した。これらの結果は、水チャネルの存在とともに、核小胞体構造の維持に果たす K イオンと Cl イオンチャネルの役割を示唆している。

内側核膜は核質に接し、核へ向けての信号伝達を担っている。外側核膜を除去し内側核膜にアプローチすることを試みた。膵腺腺房細胞からの核小胞体標本を、低張クエン酸ナトリウム溶液（10 mM Na-citrate）で 30 分処理し、管腔構造の無い一葉の核膜を持つ標本が得られた。パッチ-クランプ inside/out 法を適用して、核質側よりイノシトール 3 リン酸 (IP3) 刺激を試みると、特有のサブステートを持つ 93 pS Na 電流が得られた。膵腺腺房細胞には IP₃-受容体タイプ 2 と 3 が存在する。タイプ 3 は通常 150 pS 程の単一電流コンダクタンスを示す。よって、内側核膜に存在するこの IP₃-受容体電流はタイプ 2 によると結論できる。

膵腺腺房細胞からの核小胞体標本に膜容量測定法を適用し、核膜空間の構造維持機構を調べた。小胞体内腔カルシウムイオン濃度の増加は核膜小胞体標本の膜容量を増加させた。また、膜容量のステップ状「ゆらぎ」が膜局所（パッチ膜）で観察された。膜容量は膜表面積に比例する指標であり、小胞体内腔カルシウムによる小胞体空間制御機序の存在が示唆された。

神経細胞内 Cl 濃度調節機構と生体機能

鍋倉 淳一

生理学研究所 生体恒常機能発達機構研究部門

成熟脳における代表的な抑制性伝達物質である GABA は神経細胞膜に発現している GABA_A 受容体を活性化し、内蔵する Cl⁻ チャンネル開口する。GABA の作用は未熟期には脱分極性（しばしば神経細胞興奮性）から、発達とともに抑制性（過分極性）にスイッチする。これは、細胞内 Cl⁻ 濃度が未熟期には高く、発達とともに減少することに起因する。神経細胞内 Cl⁻ 濃度は主に 2 種類のカチオン-Cl⁻ 共役担体（K⁺-Cl⁻ cotransporter : KCC と Na⁺,K⁺-Cl⁻ cotransporter : NKCC）によって制御されている。その中でも KCC2 と NKCC1 が神経細胞内 Cl⁻ 濃度調節に強く係わっており、発達に伴う細胞内 Cl⁻ 濃度変化は、Cl⁻ イオンくみ出し分子 KCC2 の蛋白および機能発現増強と、Cl⁻ 取り込み分子 NKCC1 の機能低下に起因している。

KCC2 のアミノ酸配列の C 末端近くに 1 カ所のチロシンリン酸化部位が存在する。チロシンリン酸化酵素阻害薬やリン酸化部位の変異によって、その機能は大きく抑制される。KCC2 はリン酸化によって、細胞膜の lipid raft で oligomer を形成し、その機能を発現していることが判明した。細胞障害時には、KCC2 の急速な脱リン酸化により、declustering、その後、蛋白発現自体の低下により GABA 作用の平衡電位は脱分極シフトする。このように、GABA は障害後には急速に脱分極作用を獲得する。

未熟期の脳における GABA 脱分極作用の生理学的な意義の例として、2 光子励起顕微鏡を用いて、未熟期マウス(VGAT-Venus マウス : GABA ニューロンに蛍光蛋白 venus が発現)の 大脳 marginal zone における GABA 作動性細胞の移動について検討した。この時期の GABA ニューロンでは細胞内 Cl⁻ 濃度が高く、GABA は細胞興奮性として作用する。GABA ニューロンの移動速度は GABA_A 受容体阻害薬や NKCC1 の阻害薬である bumetanide 投与によって減少した。この結果から、未熟期の GABA 細胞は細胞外 GABA による GABA_A 受容体の活性化により細胞移動が促進されていることが示唆される。

TMEM16F の電気生理学的性質

清水貴浩¹、家原貴大¹、藤井拓人¹、竹口紀晃¹、岡田泰伸²、酒井秀紀¹

¹ 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物生理学

² 生理学研究所・機能協関

Ca²⁺賦活化 Cl⁻チャネル (CaCC) は、経上皮イオン吸収や分泌などの生理機能に重要な役割を果たしていることが知られている。最近、8 回膜貫通蛋白質であり、第 5 と第 6 膜貫通領域の間にポア領域が存在すると示唆されている Transmembrane protein (TMEM) 16 ファミリーが同定され、その機能解析により TMEM16A と 16B が CaCC であることが報告されている。それ故に、これら TMEM16 ファミリーが新規 Cl⁻チャネルファミリーであることが示唆されているが、16A および 16B 以外のアイソフォームの機能に関してはほとんど知られていない。本研究では、普遍的に発現していると考えられている TMEM16F をクローニングし、ヒト胎児腎臓 HEK293T 細胞に強制発現後、ホールセルパッチクランプ法を用いて TMEM16F 蛋白質の機能解析を行った。TMEM16F が CaCC である可能性を検討するために、細胞内 Ca²⁺感受性について調べた。TMEM16F 発現細胞において細胞外溶液へ Ca²⁺イオノフォアである ionomycin を添加することで細胞内に Ca²⁺を流入させたところ、一過性にホールセル電流が増加した。この電流は外向き整流性を示すとともに時間依存性も示した。すなわち脱分極側で活性化、過分極側では不活性化する電流であった。一方で、mock 細胞においては、ionomycin を添加しても電流にはほとんど変化はなかったことから、TMEM16F が細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により活性化する Cl⁻チャネル (CaCC) であることが示唆された。さらに、異なる細胞内 Ca²⁺濃度を含んだピペット溶液を用いて細胞内 Ca²⁺に対する濃度依存性を調べたところ、TMEM16F は 16A や 16B と比較してより高い細胞内 Ca²⁺上昇が生じる際に活性化することが明らかとなった。これらの結果から、TMEM16F は細胞内 Ca²⁺に対する感受性が低い Cl⁻チャネルであることが示唆された。

Na⁺依存性グルコース吸収におけるタイト結合部の役割

林久由、鈴木裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部 生理学研究室）

田村淳、月田早智子（大阪大学大学院 生命機能研究科）

多くの栄養素は、Na⁺と共輸送されることにより、濃度勾配に逆い小腸細胞内に上り坂輸送される。しかし小腸が栄養素吸収に必要な多量の Na⁺を、どのような機構で供給しているのかは研究されていない。小腸タイト結合部を構成する蛋白の一つであるクロージン 15 は、イオンの透過路としての役割があることが推測されている。このため本研究では、クロージン 15 欠損マウス(Cldn15KO)を用い、小腸でのグルコース吸収に対するタイト結合部のイオン透過路の役割を検討した。Cldn15KO より摘出した小腸を、Ussing チャンバーに装着しコンダクタンスを測定するとコンダクタンスは低下していた。また Na⁺と Cl⁻の透過性の比(PNa/PCl)は、Cldn15KO では低下していた。小腸内容物のグルコース総量を測定すると、Cldn15KO では野生型に比べ 10 倍以上貯留しており、内容物中の Na⁺濃度は約 5mM と、野生型に比べ低下していた。腸管灌流実験では野生型マウスではグルコース吸収に伴う、Na⁺吸収速度の増加は観察されなかったが、Cldn15KO ではグルコース吸収に伴う Na⁺吸収速度の増加が観察された。以上の結果は、グルコース吸収に伴い吸収された Na⁺はクロージン 15 により形成される陽イオン選択制のチャネル構造を介し、管腔側にリサイクルしグルコース吸収を維持していることを示唆している。

熱ショック転写因子群による細胞内タンパク質恒常性の維持

譚克、新川豊英、林田直樹、瀧井良祐、Ramachandran Prakasam、藤本充章、中井 彰

山口大学大学院医学系研究科医化学分野

上皮細胞を含むすべての細胞にとって、タンパク質恒常性の維持は細胞機能の発現に重要である。その維持システムの中で、タンパク質の成熟の過程に重要な役割を演じているのが、古くから知られている熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, HSP) の誘導を特徴とする熱ショック応答である。この応答は、熱ショック因子 1 (Heat shock factor 1, HSF1) を介した転写制御による細胞の適応機構であり、HSP によるタンパク質のフォールディングだけでなく、非 HSP による分解を促進することでタンパク質恒常性を維持することが最近の研究から明らかとなってきた。

4 つの熱ショック因子 HSF (HSF1-4) のうち、哺乳動物細胞では HSF1 が、ニワトリ細胞では HSF3 が HSP の誘導を導く。HSF1 を含む HSF 群が、マウス生殖器、脳、感覚器等の発生過程に必須の役割を担うことが分かってきたが、HSF1 以外の細胞での役割は不明であった。今回、高等動物細胞の HSF2 が細胞のタンパク質恒常性の維持に必要であることを初めて明らかにしたので報告する。

我々は、ニワトリ B リンパ球系 DT40 細胞の HSF2 が温熱ストレスで活性化されることを明らかにした。HSF2 欠損細胞を作成したところ、温和な温熱ストレスでも HSP が誘導され、その誘導を担う HSF3 が活性化していた。さらに、HSF2 欠損細胞は、温熱ストレス、亜ヒ酸やプロテアソーム阻害剤の処理に感受性が高いことが分かった。これらの結果は、HSF2 欠損により異常タンパク質に対する適応機構に問題があることを示唆しており、実際に HSF2 をノックダウンしたニワトリ胎児線維芽細胞にポリグルタミン (polyQ) タンパク質を発現すると、凝集体を形成しやすいことが分かった。マウス胎児線維芽細胞でも同様の結果が得られると同時に、HSF2 欠損ハンチントン病モデルマウスの脳神経細胞の polyQ 凝集体形成が亢進することが明らかとなった。以上の結果は、HSF2 が、HSP の発現とは無関係に、タンパク質恒常性の維持に極めて重要な役割を担っていることを明らかにし、進化の過程で HSF 群が異なる経路を介してタンパク質恒常性を制御するようになったことを示唆している。

NSAID 潰瘍発症機構の解明と、胃潰瘍副作用の少ない NSAID の開発

熊本大学大学院医学薬学研究部・創薬研究センター 水島 徹

非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）の副作用である胃潰瘍、NSAIDs 潰瘍が臨床現場で大きな問題になっています。NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ（COX）を阻害し、プロスタグランジン（PG）を低下させることにより、抗炎症作用を発揮します。一方、PG は胃粘膜を保護していますので、これまで NSAIDs は胃粘膜の PG を低下させることにより胃潰瘍を起こすと考えられてきました。しかし PG を低下させるだけでは胃潰瘍が起こらないことから我々は、NSAIDs が胃潰瘍を起こすためには、COX 非依存的な別の作用も必要であると考えました。そして最近、NSAIDs が膜傷害性を持ち、これにより胃粘膜細胞死を起こすことも、PG 低下作用と共に、NSAIDs 潰瘍の発症に必要であることを証明しました。我々は既存の NSAIDs の中で最も膜傷害性の弱かったロキソプロフェンを修飾し、ほとんど膜傷害性を持たないフッ素誘導体、F-LOX を得ました。ラットを用いて F-LOX の胃潰瘍副作用をロキソプロフェンと比較したところ、ロキソプロフェンが胃潰瘍を起こす条件で、F-LOX はほとんど胃潰瘍を起こしませんでした。また F-LOX の抗炎症作用はロキソプロフェンと同程度でした。このように F-LOX は胃に安全な NSAID です。我々は F-LOX の医薬品としての開発を進めています。

β_2 -agonist によるマウス末梢気道線毛運動の活性化

大阪医科大学 生理学

中張隆司

粘液線毛クリアランスは、末梢気道で捉えた吸入異物を中枢気道へ輸送している肺の宿主防御機構である。このシステムにおいて線毛運動は気道ベルトコンベアーのエンジンとも言えるものである。これまで線毛運動の研究は中枢気道を対象として行われ、末梢気道はほとんど研究がなされてこなかった。

今回、マウス末梢気道線毛細胞を高速度カメラ（500Hz）で観察し、末梢気道線毛運動に対するプロカテロール（ β_2 刺激薬）の効果について検討した。

プロカテロールは濃度依存性に線毛運動周波数（CBF）を増加させた。最大刺激では CBF は約 180% に増加した。同時に、ビデオ画像の解析から、プロカテロールは線毛運動の振幅（CBA）も増加させていることが明らかとなった。このプロカテロールの効果は、cAMP/PKA シグナルを介したものであった。さらに CBF と CBA の濃度依存性を調べた結果、CBA の濃度依存性が CBF に比較して低濃度側へシフトしていた。

一方で、肺のスライス標本を用いて、末梢気道に負荷したラテックスビーズ（1 μm 径）の輸送を観察した結果は、10 pM プロカテロールによる CBA の増加がラテックスビーズの輸送を活性化していることが明らかとなった。これらの結果は、粘液線毛クリアランスの活性化には CBF のみならず、CBA も重要であることが明らかとなった。

肝がん細胞の細胞外 ATP 分解能に対するクルクミンの効果

藤井拓人、皆川拓磨、清水貴浩、竹口紀晃、酒井秀紀

富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学

細胞外に放出された ATP は、様々な細胞活動に関与する細胞外情報伝達物質として機能することが知られている。Ecto-ATPase は、細胞膜に存在する ecto-nucleotidase の一つであり、細胞外 ATP を分解することで、細胞外 ATP および adenosine 濃度の調節を行っている。本研究では、肝細胞癌由来 HepG2 細胞の ecto-ATPase 活性について検討した。HepG2 細胞の ecto-ATPase 活性は、EDTA (10 mM)、DIDS (500 μ M)、スラミン (1 mM)、塩化亜鉛 (500 μ M)、オルトバナデート (1 mM) により有意に抑制された。

クルクミンは、抗酸化作用、抗アミロイド作用、抗炎症作用など様々な生理活性を持つポリフェノールで、近年肝がんを含めた種々のがんに対して抗腫瘍作用を持つことが報告されている。しかし、プリン作動性シグナルに対する効果はこれまで報告されていない。そこで、HepG2 細胞における ecto-ATPase 活性に対するクルクミンの効果を検討した。クルクミンは、ecto-ATPase 活性を低濃度 ($IC_{50}=6.2 \mu$ M) で阻害した。これは、これまで ecto-ATPase を阻害すると報告されているどの化合物よりも低濃度であった。他方、クルクミンは ecto-ADPase (ADP $\rightarrow$ AMP) 活性および ecto-5'-nucleotidase (AMP $\rightarrow$ adenosine) 活性に対しては、30 μ M でも阻害効果を示さなかった。

以上より、クルクミンは、ecto-ATPase 活性に対して強力な阻害作用を持ち、クルクミンの肝がん細胞の増殖抑制には、ecto-ATPase 活性の阻害によるプリン作動性シグナルの変化が関与している可能性が示唆された。現在、P2X 受容体のチャネル電流に対するクルクミンの効果も検討している。