

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 研究会 （生理学研究所）

上皮膜機能活性化物質と上皮膜防御の最前線

日時 2007 年 11 月 1 日 13 : 00- 2 日 12 : 00

場所 生理学研究所 一階 会議室

プログラム

11月1日

開会挨拶 (12:50-13:00)

[Cl⁻]_i 電位による細胞機能の修飾 (座長 杉田 誠 先生)

1. (13:00 - 13:15)

[Cl⁻]_i 減少による胃幽門線粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出の増強

大阪医科大学 生理学

中張隆司

2. (13:15 - 13:30)

骨芽細胞におけるクロライド依存的な細胞周期調節

宮崎裕明¹、牧昌弘^{1, 2}、新里直美¹、丸中良典¹

京都府立医科大学大学院¹ 生理機能制御学、²運動機能再生外科学

3. (13:30 - 13:45) 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体の役割

中島謙一、宮崎裕明、新里直美、丸中良典

京都府立医科大学大学院 生理機能制御学

4. (13:45 - 14:00) 低浸透圧刺激による上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) の機能制御

樽野陽幸、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

5. (14:00 - 14:20)

アルドステロンにより促進されるナトリウム再吸収のクロライドイオン依存的な制御

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

6. (14:20 - 14:50)

電位依存性ホスファターゼ VSP は、ホヤ、ゼブラフィッシュの消化管上皮細胞に発現する

岡村康司¹⁾²⁾³⁾、Mohammad I. Hossain¹⁾²⁾、木村有希子¹⁾²⁾、東島眞一¹⁾²⁾³⁾、小笠原道生⁴⁾

1 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター、2 生理学研究所、3 総合研究大学院大学、4 千葉大学理学系研究科

細胞のストレス応答 (座長 細井和雄 先生)

7. (15:00 - 16:00)

熱ショック転写因子による細胞の生と死の決定の機構

林田直樹、藤本充章、高木栄一、大島功、王倍倍、井上幸江、中井 彰

山口大学大学院医学系研究科医化学分野

アニオントランスポーター (座長 河原 克雅 先生)

8. (16:20 - 16:50)

嚢胞性線維症原因遺伝子CFTRの成熟化・分解を制御する分子機構

杉田 誠

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）

9. (15:50 - 17:20)

新規有機アニオントランスポーター分子の同定:内因性有機酸の輸送特性および生理機能における重要性

安西尚彦¹、金井好克²、遠藤 仁^{1,3}

¹杏林大学医学部薬理学教室、²大阪大学医学部情報薬理学教室、³ジェイファーマ株式会社

表皮バリアー機能 1

10. (17:30 - 18:00)

毛包幹細胞領域は、表皮・毛包・末梢神経と血管網の再生を行う表皮バリアー再生のための最前線基地として働いている

天羽 康之¹、狩野 真帆¹、勝岡 憲生¹、河原 克雅²

¹北里大学医学部皮膚科学教室 ²北里大学医学部生理学教室

11月2日

表皮バリアー機能 2 (座長 林久由 先生)

11. (9:00 - 9:20)

浸透圧、静水圧とタイトジャンクションの機能調節

徳田深作 中島謙一 宮崎裕明 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

12. (9:20 - 9:50)

クローディン15ノックアウトマウスにおける小腸肥大化の解析

田村淳¹、北野由香²、秦正樹³、勝野達也¹、森脇一将⁴、佐々木博之⁵、林久由⁶、鈴木裕一⁶、野田哲生⁷、古瀬幹夫⁴、月田承一郎²、月田早智子¹

¹大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科分子生体情報学 ²京都大学大学院医学研究科分子生体情報学 ³兵庫医科大学病理学 ⁴神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学 ⁵慈恵医科大学DNA医学研究所分子細胞生物学 ⁶静岡県立大学食品栄養科学部栄養学科生理学研究室 ⁷癌研究会癌研究所細胞生物学

上皮膜輸送 (座長 丸中 良典 先生)

13. (10:00-10:30)

食事性フラボノイドの吸収経路に関する検討

室田佳恵子、寺尾純二

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野

14. (10:30-11:00)

唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation とそのシグナル伝達経路

姚 陳娟、細井和雄

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子生理学分野

15. (11:00 - 11:30)

マウス膵導管細胞における $\text{slc26a6 Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger

石黒 洋、山本明子

名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学

16. (11:30 - 12:00)

2つの異なる胃酸分泌最終段階における胃プロトンポンプ複合体

酒井秀紀、藤井拓人、高橋佑司、森井孫俊、竹口紀晃

富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学

1. $[\text{Cl}^-]_i$ 減少による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強

大阪医科大学 生理学

中張隆司

細胞容積の減少は胃幽門線粘液細胞の Ca^{2+} 調節性開口放出を増強する。細胞容積減少を増強する bumetanide あるいは Cl^- -free solution は Ca^{2+} 調節性開口放出をさらに増強した。また、 Cl^- -free solution による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強は、 $[\text{Cl}^-]_o$ の増加に従い濃度依存性に抑制された。一方、NPPB は細胞容積減少を抑制し、 Ca^{2+} 調節性開口放出をわずかに減少させた、さらに、bumetanide あるいは Cl^- -free solution による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強を完全に抑制した。MQAE を用いた $[\text{Cl}^-]_i$ の測定は、ACh 刺激は $[\text{Cl}^-]_i$ を減少させ、bumetanide あるいは Cl^- -free solution は ACh 刺激による $[\text{Cl}^-]_i$ 減少を増強すると同時に、それ自身が $[\text{Cl}^-]_i$ 減少を引き起こした。さらに、bumetanide あるいは Cl^- -free solution は単独で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させた。また、 Ca^{2+} 調節性開口放出の最終段階の ATP-dependent priming 反応が $[\text{Cl}^-]_i$ 減少により修飾され、 Ca^{2+} 調節性開口放出が増強されることが明らかとなった。これらの結果から、 $[\text{Cl}^-]_i$ の減少が Ca^{2+} 調節性開口放出を活性化することが示された。

2. 骨芽細胞におけるクロライド依存的な細胞周期調節

宮崎裕明¹、牧昌弘^{1, 2}、新里直美¹、丸中良典¹

京都府立医科大学大学院¹生理機能制御学、²運動機能再生外科学

近年、Cl⁻チャネルや輸送体の発現・活性調節を介した細胞内 Cl⁻濃度変化が、細胞増殖のシグナルとして重要であることが示唆されるが、その詳細なメカニズムは現在も不明のままである。そこで本研究では、Cl⁻が MC3T3-E1 骨芽細胞の細胞増殖に対する影響を検討した。MC3T3-E1 細胞の増殖は、培養液中の Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_o) の減少に伴って有意に抑制された。また、[Cl⁻]_o の減少は、細胞周期の G₀/G₁ 期と G₂/M 期における細胞数を増加させることが明らかとなった。G₀/G₁ 期の進行を亢進させる Rb と、G₂/M 期の進行を亢進させる cdc2 の活性と発現レベルの変化を調べたところ、[Cl⁻]_o を減少させると Rb のリン酸化、cdc2 の発現レベルが共に減少し、細胞周期の進行を抑制することが明らかになった。また、[Cl⁻]_o の減少によって引き起こされる細胞増殖抑制と Rb と cdc2 の活性・発現レベルの低下は、2 mM のグルタミンの存在下では影響を受けなかった。従って、Cl⁻とグルタミンは、相同なメカニズムによって細胞増殖をコントロールしている可能性が示唆された。

3. 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体の役割

中島謙一、宮崎裕明、新里直美、丸中良典

京都府立医科大学大学院 生理機能制御学

神経細胞における神経突起伸長には、微小管をはじめとする細胞骨格系の再構築が深く関わっていることが知られている。一方、細胞内 Cl^- 濃度変化は、細胞増殖や細胞骨格系再構築を含む様々な細胞機能制御に関与していることが、近年の研究より明らかになってきた。本研究では、 Cl^- 輸送体として $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC1) に着目し、神経突起伸長に対する NKCC1 の役割、および神経突起伸長の Cl^- 要求性を調べた。

ラット副腎由来 PC12D 細胞は、神経成長因子 NGF 処理により神経突起を伸長する。PC12D 細胞を NGF 処理する際に、NKCC1 阻害剤 bumetanide を同時に作用させ、伸長した神経突起の長さを測定した。また、 Cl^- 濃度が低い培養液中で NGF 処理を行い、同様に突起の長さを測定した。さらに、RNAi 法を用いて NKCC1 をノックダウンした際の突起の長さを測定した。

Bumetanide 処理、低 Cl^- 濃度の培養液、および RNAi 法による NKCC1 のノックダウンにより、神経突起の伸長が有意に抑制された。NGF 処理により、NKCC1 の発現量増加が見られた。また、間接蛍光抗体法および GFP 標識法による観察より、NKCC1 は神経突起先端に多く存在していた。これらの結果から、NKCC1 を介した細胞内への Cl^- の取り込みにより神経突起の伸長が促進するという結論を得た。

低浸透圧刺激による上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) の機能制御

樽野陽幸、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

アフリカツメガエル由来の腎尿細管モデル細胞である A6 細胞において、血管側の低浸透圧刺激が ENaC を介した経上皮 Na⁺再吸収を亢進させる現象が、我々の研究室を含めた多くの研究室から報告されている。さらに、我々の先行報告により、この Na⁺再吸収の亢進には 2 つのメカニズムが関与していることが明らかにされている。一つはチロシンキナーゼ依存的な管腔側への ENaC トラフィッキングであり、これは刺激後 10 分以内に引き起こされる急性の反応である。もう一方は遺伝子発現 (α ENaC サブユニットと SGK1) に依存した反応で、刺激後 1 時間以降に始まる亜急性の反応である。しかし、これらの反応に関わる細胞内シグナルの詳細については不明であった。今回、我々は、電気生理学的手法と生化学的手法を用いて、低浸透圧刺激による ENaC の機能制御に関わるこの 2 つの細胞内シグナル経路の同定を試みた。その結果、急性の ENaC トラフィッキングにおいては EGFR-JNK-PI3K カスケードが関与することを明らかにし、亜急性の遺伝子発現を介した反応には細胞内 Ca²⁺シグナルが関与することを明らかにしたので、その詳細について報告する。

5. アルドステロンにより促進されるナトリウム再吸収のクロライドイオン依存的な制御

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

アルドステロンが Na^+ 再吸収を亢進するメカニズムとして、genomic な作用と non-genomic な作用が知られている：1) genomic な作用は、核内レセプター依存的な遺伝子発現を介して、ナトリウム再吸収に寄与する上皮型 Na^+ チャネル (ENaC) や Na^+/K^+ ポンプなどを新たに産生するもの；2) non-genomic な作用は、多様なシグナル分子が ENaC の局在や活性制御に関与することが示唆されている。我々は、これまでに細胞内クロライド濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) がシグナル分子としての役割を担っており、 Na^+ 再吸収制御にも深く関わっていることを報告してきた。アルドステロンを腎尿細管由来上皮細胞である A6 細胞に作用させる際、クロライドチャネル阻害剤や $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter を活性化するフラボノイドを添加すると、 $[\text{Cl}^-]_i$ 上昇を介して、 Na^+ 再吸収阻害を引き起こすことを見出した。さらに、我々は、 $[\text{Cl}^-]_i$ の低下がアルドステロンによる Na^+ 再吸収の亢進をさらに増強することを見出した。これらの研究成果を基盤として、 $[\text{Cl}^-]_i$ がアルドステロンによる Na^+ 再吸収亢進機構の制御因子として機能している可能性について報告する。

6. 電位依存性ホスファターゼ VSP は、ホヤ、ゼブラフィッシュの消化管上皮細胞に発現する

岡村康司¹⁾²⁾³⁾、Mohammad I. Hossain¹⁾²⁾、木村有希子¹⁾²⁾、東島真一¹⁾²⁾³⁾、小笠原道生⁴⁾

1 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター、2 生理学研究所、3 総合研究大学院大学、4 千葉大学理学系研究科

バイオインフォマティクスにより見出された Ci-VSP (Ciona intestinalis Voltage-Sensing Phosphatase) は、電位依存性チャネルの電位センサーと PTEN 様ホスファターゼの構造を併せ持つ膜蛋白分子であり、細胞膜の脱分極によりイノシトールリン脂質の PI (4, 5) P₂ を脱リン酸化する性質を有する(文献 1)。この分子は、イオンチャネル以外で、膜電位感知機能をもつことが明らかになった初めての分子であり、膜電位シグナルがこれまで考えられてきた以上の幅広い生物機能に関わることを示唆している。

しかし、VSP がどのような生理機能において機能しているのかについては、いまだに不明な点が多い。我々は VSP の生理機能を理解する初歩として、現在様々な動物種での VSP の発現様式を調べている。最初に VSP が同定されたカタユレイボヤにおいて in situ hybridization 法により発現を調べたところ、これまでに発現が確認されていた testis 以外に、血液系細胞と消化管上皮細胞に発現が見られることがわかった。さらに、分子遺伝学的なアプローチが可能なゼブラフィッシュからオルソログ分子のクローニングを行った(文献 2)。ゼブラフィッシュの VSP (Dr-VSP) は、Ci-VSP と高い相同性(アミノ酸配列で 31%)を示し、発現系細胞での電気生理学的計測で顕著なゲート電流を示すことから Ci-VSP と同じように膜電位感知機能をもつことがわかった。更に細胞内ドメインのホスファターゼは、大腸菌において GST 融合蛋白として合成すると、in vitro で PI (4, 5) P₂ および PI (3, 4, 5) P₃ を基質として脱リン酸化能をもつことがわかった。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験から、この酵素活性は脱分極により活性化することが示された。次に、この Dr-VSP がホヤの場合と同様に消化管系に発現しているかどうかを確認するため in

situ hybridization を行ったところ、受精後 3 日胚から消化管での発現が確認された。パラフィンセクションを作成したところ、上皮細胞での遺伝子発現が見られた。現在ゼブラフィッシュ VSP に対する抗体を作成し、その発現を蛋白レベルで解析中である。

これらの知見は、上皮細胞の形成や機能に、膜電位に応じたイノシトールリン脂質代謝の変化が関与している可能性を示唆している。

1. Murata, Iwasaki, Sasaki, Inaba & Okamura. (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435 (7046):1239-43.
2. Hossain, Iwasaki, Higashijima, Nagayama & Okamura. Enzyme state affects the movement of the voltage sensor in voltage-sensing phosphatases. Under revision.

7. 熱ショック転写因子による細胞の生と死の決定の機構

林田直樹、藤本充章、高木栄一、大島功、王倍倍、井上幸江、中井 彰

山口大学大学院医学系研究科医化学分野

すべての生物にとって、温度変化に適応する能力はその生存のために必須のものである。細胞が高温にさらされることで最も有害な影響は蛋白質の変性である。この蛋白質の変性を抑制するために、分子シャペロンとして働く一群の熱ショック蛋白質（Hsp）が誘導される。この応答が熱ショック応答であり、進化の過程で保存された、普遍的な生体防御機構である。この応答を制御するのが熱ショック転写因子 HSF1 である。HSF1 は、Hsp の構成的ならびに誘導性の発現を制御することで、温熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性の獲得に働いている。また、Hsp 以外のターゲット遺伝子の発現を介して細胞生存に働くことも強く示唆されている。一方、HSF1 が細胞死を導く働きがあることが示唆されてきた。その分子機構を明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いた HSF1 のターゲット遺伝子の検索を行った。その中で、細胞死促進因子 TDAG51（T-cell death associated gene 51）を同定した。蛋白質変性にともなう細胞運命の決定は、ともに HSF1 によって制御される Hsp と TDAG51 の発現のバランスによることが示唆された。以上の結果をもとに、ストレスを受けた細胞の生存と死の制御の意義について議論する。

8. 嚢胞性線維症原因遺伝子CFTRの成熟化・分解を制御する分子機構

杉田 誠

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）

CFTR の遺伝的機能不全症（嚢胞性線維症）は、全身性外分泌腺機能障害・呼吸器感染を誘発する致死率の高い疾患である。嚢胞性線維症を引き起こす CFTR 変異の 70% は、508 番目の一アミノ酸欠損（ $\Delta F508$ ）であり、その変異型 CFTR を有する患者においては、細胞内の ER で CFTR が異常分解され、結果として粘膜上皮細胞の腺腔側細胞膜に CFTR Cl^- チャンネルが存在しないために疾患が誘発される。本研究においては、ER で翻訳された CFTR の成熟型コンフォメーションへの移行および分解を制御する分子基盤を解明することを目的とした。上皮系培養細胞での成熟型 CFTR の生成は、butyrate の添加により顕著に促進された。しかし R ドメインを欠損する CFTR においては butyrate の効果は微弱であった。Butyrate は ERK/MAPK の活性化レベルに依存して、CFTR の R ドメインを介して成熟型 CFTR の生成を促進し、その促進には butyrate により発現制御・機能制御される未知分子が関与することが示唆された。Yeast two-hybrid system により R ドメインに接着する分子を検出し、その結合分子に関して分子複合体の構築様式および細胞内局在制御様式を解析した。さらに R ドメインに対する結合分子およびその変異体を過剰発現させた際、および siRNA を用いて結合分子の発現を低下させた際に生じる成熟型 CFTR の生成量の変化を比較解析した。

9. 新規有機アニオントランスポーター分子の同定：内因性有機酸の輸送特性および生理機能における重要性

安西尚彦¹、金井好克²、遠藤 仁^{1,3}

¹杏林大学医学部薬理学教室、²大阪大学医学部情報薬理学教室、³ジェイファーマ株式会社

SLC22 に分類される有機アニオントランスポーターOATs は主として腎尿細管に存在し、薬物や毒素など生体異物の解毒・排泄に関与するだけでなく、抗酸化作用を持つ尿酸などの内因性物質の再吸収等を介して生体の防御に重要な役割を果たしている。最近我々は新規有機アニオントランスポーターOAT7, Oat8, OATN1 の分子同定を行った。OAT7 は肝臓 sinusoidal membrane に局在し、エストロン硫酸や DHEA 硫酸などの硫酸抱合体を輸送する。OAT7 による硫酸抱合体取込みは、細胞内の短鎖脂肪酸により増強され、特に炭素数 4 の酪酸と交換輸送が行われることを明らかにした。OAT7 は腸管から門脈を介し肝臓へと到達した短鎖脂肪酸の肝臓でのクリアランスへの関与が推測される。Oat8 は腎臓の集合管に発現を示し、TCA サイクル中間代謝体である α ケトグルタル酸との交換輸送を行う。Oat8 は α 間在細胞の管腔側膜と β 間在細胞の基底側膜に存在し、体内での酸塩基平衡の変動と連動した何らかの腎臓の生理機能に関与することが推測される。OATN1 は PAH などの典型的な有機アニオンではなく、ニコチン酸、サリチル酸、プロスタグランジンなどを運ぶことから OAT の novel type として名付けられた。この OATN1 のノックアウトマウスを作成し、野生型との間でのマウス尿中の化合物のメタボローム解析を行うことにより、ケトン体の β -hydroxybutyrate の排泄量が異なることを見出し、さらに同物質が OATN1 の輸送基質となることを明らかにし、ケトン体の腎臓での再吸収を担うと考えられる。

10. 毛包幹細胞領域は、表皮・毛包・末梢神経と血管網の再生を行う表皮バリア再生のための最前線基地として働いている

天羽 康之¹，狩野 真帆¹，勝岡 憲生¹，河原 克雅²

¹ 北里大学医学部皮膚科学教室 ² 北里大学医学部生理学教室

ネスチンは神経系幹細胞に発現する class VI の中間径フィラメント（神経前駆細胞のマーカー）である。我々は、ネスチン遺伝子の second intron に GFP を組み込んだトランスジェニック (ND-GFP-Tg) マウスを用い、毛包幹細胞とそれに連結する真皮の血管網がネスチンを発現しており、さらに、ネスチンを発現する毛包幹細胞が多分化能を有していることを報告した (PNAS 101, 2004, PNAS 102, 2005 ほか)。近年、創傷治癒における毛包幹細胞の役割が注目されている。我々は ND-GFP-Tg マウスを用いて、移植皮膚生着や創傷治癒におけるネスチンを発現する真皮血管網の役割を検討した。ND-GFP-Tg マウスの休止期毛包を有する背部皮膚をヌードマウスに移植すると、移植皮膚の毛包が成長期に移行するのに伴ってネスチンを発現する真皮血管網は増殖を始め、18 日後までには移植片下床のヌードマウスの血管網と再結合して血管網を再構築した。また、ND-GFP-Tg マウスに 2 mm biopsy punch で皮膚欠損を作ると、bulge area の毛包幹細胞に連結するネスチンを発現する真皮血管網は、創傷部位へ向かって増殖を始め、15 日後までには血管網を再構築した。[結論] 毛包幹細胞に連結するネスチンを発現する真皮血管網は、創傷治癒や移植皮膚の生着のために重要である。

11. 浸透圧、静水圧とタイトジャンクションの機能調節

徳田深作 中島謙一 宮崎裕明 新里直美 丸中良典

京都府立医科大学大学院 医学研究科 生理機能制御学

細胞間隙はイオンなどの物質を選択的に透過させることが知られており、その透過性は主にタイトジャンクションによって調節されている (barrier function)。腎遠位尿細管におけるイオン輸送は、体内のイオン環境・血圧維持にとって重要な役割を果たしており、特に細胞経由イオン輸送は浸透圧による調節を受けることが知られている。しかし、浸透圧変化の細胞間隙イオン輸送に対する影響については不明である。そこで、我々は、浸透圧の細胞間隙コンダクタンスに対する影響についての検討を行った。その結果、血管側・管腔側間に浸透圧勾配を与えることにより、イオン選択的な細胞間隙コンダクタンスが増大することを見出した。さらに、血管側の静水圧増加が細胞間隙コンダクタンスの上昇およびタイトジャンクション構成タンパク質である claudin-1 の局在変化をもたらすことも明らかとなった。これらの結果より、タイトジャンクションが有する barrier function は、血管側・管腔側間の浸透圧および静水圧の勾配により、claudin-1 局在変化を伴うダイナミックな制御を受けることが判明した。

12. クローディン 15 ノックアウトマウスにおける小腸肥大化の解析

田村淳 1、北野由香2、秦正樹3、勝野達也 1、森脇一将4、佐々木博之5、林久由6、
鈴木裕一6、野田哲生7、古瀬幹夫4、月田承一郎2、月田早智子 1

1 大阪大学大学院医学系研究科／生命機能研究科分子生体情報学 2 京都大学大学院医学研究科分子生体情報学 3 兵庫医科大学病理学 4 神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学
5 慈恵医科大学DNA医学研究所分子細胞生物学 6 静岡県立大学食品栄養科学部栄養学科生理学研究室 7 癌研究会癌研究所細胞生物学)

上皮細胞は多細胞生物において体内のコンパートメントを形成し、体内のホメオスタシスを維持するという重要な役割を担っている。そのためには、上皮細胞間に形成されるタイトジャンクション (TJ) によるバリアー機能が必須である。TJ を構成する主要なタンパク質であるクローディンは少なくとも 24 種からなるファミリーを形成し、これらの発現の組み合わせでバリアー機能の特性が規定されと考えられているが、分子レベルでの詳細は明らかではない。

今回我々は、クローディン 15 のノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った。クローディン 15 は、多種類の臓器に発現するクローディンの 1 つである。このマウスは外観上正常な成長を示したが、離乳後に腸管とくに小腸の肥大化が認められた。この肥大化は、陰窩と絨毛の伸長を伴っていた。ポリープが形成されたり癌化することではなく、正常な小腸細胞の増殖が促進しているように思われた。フリーズフラクチャー法によると、ノックアウトマウスでは TJ スtrand が量的に顕著に減少しており、またその性状もより曲線状で、ところどころ途切れた部分が認められた。この所見からは、バリアー機能の障害が予測されたが、ビオチン(約 400Da) やデキストラン(4kD, 20kD) 透過試験では、変化は認められなかった。一方、電気生理学的な試験では、conductance の低下が認められた。

13. 食事性フラボノイドの吸収経路に関する検討

室田佳恵子、寺尾純二

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野

食事性フラボノイドは摂食後、小腸および肝臓で抱合代謝を受け、血中には第二相抱合代謝物として存在している。これまでに、フラボノイドは摂取後糖鎖が加水分解され生じたアグリコンが腸管細胞へ取り込まれて最初の代謝過程を経て門脈へと輸送され、肝臓でさらに代謝されて胆汁中へ排出されるか、あるいは血中へと移行する経路が知られている。一般的にフラボノイドは水相と脂質相の界面に局在しやすく両親媒性物質として知られている。すなわち、フラボノイドは実質的に水難溶性物質であり、そのような分子が小腸管腔溶液から循環系へ至る経路としては、腸管からのリンパ輸送がある。我々はこれまでに、胸管リンパカニューレションラットを用いて、代表的なフラボノイドであるケルセチンおよびゲニステインを胃あるいは十二指腸へ投与すると一部がリンパへと輸送されることを明らかにした。末梢血濃度に比較してリンパ液中の濃度は 1/4 程度であった。フラボノイドのリンパ輸送経路の存在は、高脂肪食とともにケルセチンを摂取すると吸収が促進されることや、ラットにおけるケルセチンの生体内局在を調べると肺に比較的多量のケルセチンの蓄積が見出されるなどの他の研究グループの報告によっても支持されるものである。本研究会ではこれまでに得られた成果を報告するとともに、フラボノイドの腸管上皮細胞内輸送経路について考察したい。

14. 唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation とそのシグナル伝達経路

姚 陳娟、細井和雄

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子生理学分野

口腔は生体の防御系における最初の関門であり、その中で唾液・唾液腺は重要な働きを担っている。唾液腺の外分泌活動に関しては、外分泌腺型水チャネル蛋白質、アクアポリン5の働きが重要である。本研究では内毒素、LPS による唾液腺 AQP5 発現制御を雄性 C3H/HeN マウス及びその TLR4 変異型、C3H/HeJ マウスを実験動物として調べた。まず、RT-PCR および Western blotting によって解析し、LPS 腹腔投与後 6-24 時間後、C3H/HeN マウス耳下腺において AQP5 と AQP1 の mRNA 及び蛋白質は減少すること (down-regulation) を見出した。LPS による AQP5 mRNA の down-regulation は培養耳下腺において、NF- κ B 経路の阻害剤である PDTC、MG132、および MAPK 下流の ERK1/2 ならびに JNK の阻害剤である AG126 および SP600125 (それぞれ c-fos および c-Jun のりん酸化阻害) により完全に解除された。上記 down-regulation は p38MAPK 阻害剤である SB203580 によっては部分的にのみ解除された。他方、AQP1 mRNA の LPS による down-regulation は AG126 と SP600125 によってのみ、しかも部分的にのみ解除された。Gel shift 解析結果から、NF- κ B は AQP5 プロモーターの 2 種の NF- κ B 応答配列へ結合し、そのレベルは LPS 刺激により上昇した。AQP5 の転写活性はこれにより抑制されたと考えられた。更に、Western blot 解析および免疫組織化学により、NF- κ B の subunit、p65 および p-c-Jun ならびに c-fos は LPS 刺激により増幅され、核へ移行することが確認された。

結論として、LPS による AQP5 mRNA の down-regulation には NF- κ B 及び MAPK 経路が関与し、NF- κ B および AP-1 がクロスカップリングする可能性が考えられた。一方、AQP1 mRNA の down-regulation には MAPK 系が部分的に関与していると推定された

15. マウス膵導管細胞における slc26a6 Cl^- - HCO_3^- exchanger

石黒 洋、山本明子

名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学

膵臓の導管系は、高濃度の HCO_3^- を含む等張液を分泌する。管腔膜を介する HCO_3^- 分泌は、CFTR の HCO_3^- コンダクタンスと、SLC26 family 輸送体による Cl^- - HCO_3^- 交換が担っているとされている。 slc26a6 ノックアウトマウスの膵から小葉間膵管を単離し、管腔内に BCECF-dextran を注入して、溶液分泌速度（管腔容積の変化率）とともに管腔内の pH（ HCO_3^- 濃度）を測定した。表層、管腔内とも HCO_3^- -free、150 mM Cl^- の条件で測定を開始した。forskolin 刺激下に、表層灌流液を 25 mM HCO_3^- -5% CO_2 -125 mM Cl^- 溶液に切り替えると、管腔内 pH は一時的に低下（ CO_2 の流入による）した後上昇した。その時、ワイルドタイプでは一過性の溶液分泌の増加が見られたが、 slc26a6 (-/-) では逆に一過性の吸収が半数以上の膵管に見られた。 HCO_3^- 濃度と Cl^- 濃度の和が常に 150 mM であると仮定し、管腔膜を介する HCO_3^- および Cl^- 輸送を算出したところ、 slc26a6 は 1 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons 2 \text{HCO}_3^-$ 交換を担っていると推定された。

16. 2つの異なる胃酸分泌最終段階における胃プロトンポンプ複合体

酒井秀紀、藤井拓人、高橋佑司、森井孫俊、竹口紀晃

富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学

胃酸分泌細胞において酸分泌休止状態では、胃プロトンポンプに富む細管小胞は細胞内に存在しているが、刺激に伴い細管小胞は分泌膜につながりプロトンポンプが活性化され管腔へ胃酸が分泌される。我々は、分泌膜の基礎胃酸分泌（休止時）と、細管小胞膜の胃酸分泌（刺激時）におけるトランスポーターの役割について検討した。

ブタ胃より細管小胞膜由来のベシクル（TV）と分泌膜由来のベシクル（SA）を調製した。TV および SA における胃プロトンポンプの機能について比較すると、特異的阻害剤（SCH 28080）感受性は TV のプロトンポンプが有意に高く、コンフォメーションの K^+ 感受性（E1→E2K）も TV のプロトンポンプが高かった。TV には CLC-5 が選択的に、SA には KCC4 が選択的に発現しており、いずれも胃プロトンポンプと分子会合していることがわかった。胃ベシクルおよび細胞株において、これらのタンパク質とプロトンポンプが機能的に関連していた。したがって TV と SA にはそれぞれ異なった胃プロトンポンプ複合体が存在しており、胃プロトンポンプは2つの異なる機構により調節されていることが示唆された。