

論文内容の要旨

水分泌組織特異的に発現する新規リン酸化タンパク質 parchorinに関する研究

西澤 友宏

【背景】

生体では、眼房水や涙、唾液、脳脊髄液、胃酸など様々な水分泌がなされており、生理的に非常に重要な役割を担っている。これら水分泌は、水チャンネルとイオンチャンネルとが有機的に結びつき、緻密な調節のもと行われている。現在、aquaporin を中心とする水チャンネルについては分子生物学的手法の進歩により多くの知見が得られている。一方で、水分泌の調節に関与しているイオンチャンネルにおいては、その実体に関する議論が混沌としており、特に陰イオンチャンネルについては、特異的な薬理学的ツールが存在しないことから解析が進んでおらず、創薬のターゲットとしても未開拓状態である。

私は水分泌現象における分子的メカニズムを解明するため、修士課程の研究において、胃酸分泌時に分泌側膜で強いリン酸化を受けている SDS-PAGE 上 120 kDa のタンパク質に着目し、このタンパク質が、胃壁細胞や脈絡叢など水分泌を起こす組織に発現していること、胃壁細胞においては、多くが細胞質可溶性分画に存在し、胃酸分泌時にその一部が分泌側膜に移行することを報告した。そこで、私はこのタンパク質が、調節を受ける水分泌に重要な役割を果たしているのではないかと考え、タンパク質をコードする完全長 cDNA の単離、組織分布、機能解析を行うことを本研究の目的とした。

【方法及び結果】

完全長cDNAの単離

修士課程の研究において得られた部分長 cDNA をもとに、ウサギ脳 cDNA library のスクリーニング、5'-RACE 法を行うことにより 1914 bp の ORF を持つ完全長 cDNA を得ることができた。一次構造を解析した結果、このタンパク質は 65 kDa の新規タンパク質であり、C 末端約 200 アミノ酸が、細胞内小胞のクロライドチャンネルと考えられている Chloride Intracellular Channel (CLIC) family と高い相同性を持っていた。また、このタンパク質をその組織分布にもとづいて parchorin

(parietal cells, choroid plexus) と命名した。parchorin は N 末側に 15 回の繰返し配列を含む、酸性アミノ酸に富んだ非常に親水性の高い特徴的な配列を有しており、この領域が SDS-PAGE による推定分子量と計算上の分子量との相違や、可溶性分画へのターゲットィングなど、他の CLIC family とは異った性質を parchorin に与えている可能性が示唆された (Fig. 1)。

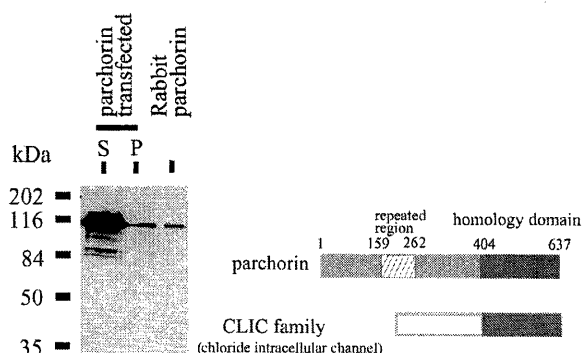


Fig. 1

左) recombinant parchorin を COS-7 細胞に一過性に発現させ、抗 parchorin 抗体でイムノブロットしたもの。S: 10 万 xg 上清、P: 沈渣
右) CLIC family との比較

parchoirnの組織分布

他の CLIC family はユビキタスに存在する事が報告されているが、抗 parchorin 抗体を用いたイムノブロットの結果 parchorin は胃壁細胞や脈絡叢の他に網膜や涙腺、顎下腺、気道上皮など、水分分泌を起こす組織に発現していた (Fig. 2)。

さらに組織内分布を検討するため、抗 parchorin 抗体を用いてウサギ胃底腺、顎下腺を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察した。その結果、parchorin は胃底腺内では胃酸分泌を起こす壁細胞にのみ存在し、また、顎下腺内においては水分分泌を起こす導管 (intercalated ductal cells) にのみ存在していた (Fig. 3)。このように、parchorin は水分分泌を起こす細胞特異的に存在していることが明らかになった。

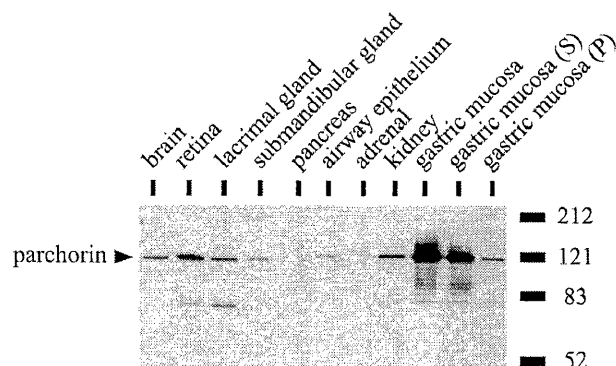


Fig. 2

ウサギ各組織における抗 parchorin 抗体を用いたイムノブロット S: 10 万 xg 上清、P: 沈渣

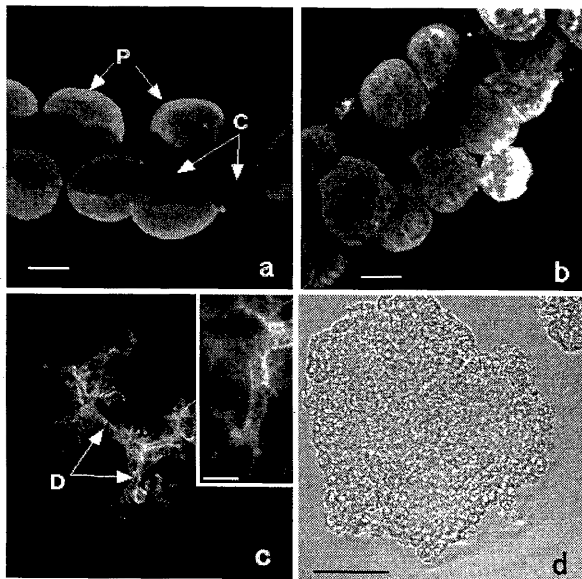


Fig. 3
 parchorinの組織内分布。(a,b)胃底腺における休止時(a)、酸分泌刺激時(b)のparchorin
 (c)顎下腺におけるparchoirn. insetは拡大図(d)顎下腺透過光像
 P:parietal cells, C:chief cells, D:ductal cells
 Bars: a and b, 10 μ m; c and d, 50 μ m; inset to c, 5 μ m

細胞内局在変化の検討

他の CLIC family は細胞内小胞膜に存在しているのに対し、parchorin は細胞質可溶性成分に多く存在し、胃壁細胞においては酸分泌時にその一部が分泌側膜に移行することが示されている (Fig. 3)。そこで、この移行がどのような刺激により起こるのかを検討した。ブタ腎由来 cell line である LLC-PK1 細胞に GFP-parchorin を一過性に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞内から細胞外への Cl^- 流出を促したところ、細胞内に均一に存在していた GFP-parchorin の一部が、細胞形質膜に移行することが観察された (Fig. 4)。このことから、parchorin の局在変化は Cl^- の流出に関連して起こることが示唆された。CLIC family の共通配列である C 末側のみを発現させると細胞内小胞と形質膜に存在したことから parchorin の N 末側の領域が移行の制御に関与していると考えられた。

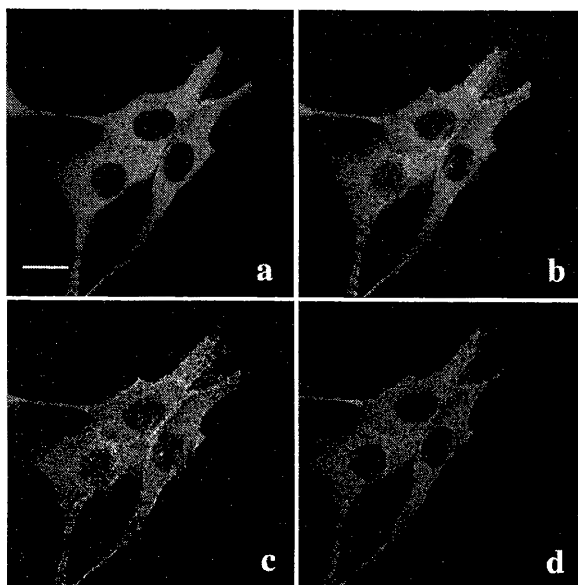


Fig. 4
 LLC-PK1細胞におけるparchorinの細胞内局在変化。細胞外溶液のChlorideイオンをgluconateイオンに置換してから0分(a)、3分(b)、6分(c)後のparchorin。(d)normal bufferに戻して15分後
 Bar, 20 μ m.

parchorinによるCl⁻ effluxの増強

parchorin のC末領域における CLIC family との高い相同性から、LLC-PK1 細胞を用いた前実験条件において parchorin が細胞のクロライド放出活性に影響を与えるかどうか検討した。Cl⁻ efflux を Cl⁻ の蛍光色素である SPQ を用いて測定したところ、parchorin は Cl⁻ efflux を増強することがわかった (Fig. 5)。

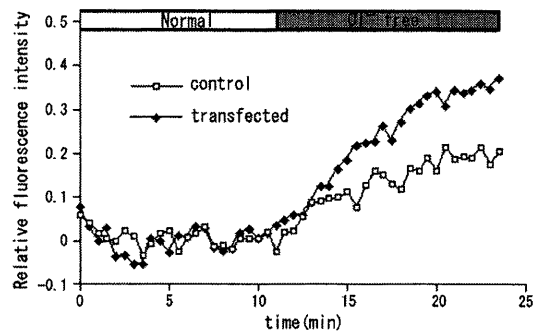


Fig. 5
GFP-parchorin による Cl⁻ efflux 活性の増強

parchorinのリン酸化

parchorin を部分精製すると、parchorin と同じ分画に kinase 活性が存在していた。この kinase 成分はかなり精製を進めても parchorin と共精製されてきたが、hydroxyapatite column を用いて分離することができた。そこで、この kinase の酵素学的性質を検討したところ myelin basic protein 存在下で活性が増強し、genistein で抑制された。しかし、kinase は parchorin のセリン残基をリン酸化しており tyrosine kinase ではないことが示された。また、阻害薬の実験により protein kinase A, C, phosphatidylinositol 3-kinase, Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II である可能性は除外できたものの、既知か未知かを含めて同定には至っていない。また、この kinase は parchorin の CLIC 共通領域を削除した N 末領域をリン酸化する事がわかった。次に、kinase が parchorin の精製過程で共精製されてくることから、kinase と parchorin とが結合しているかどうか検討した。胃底腺可溶性分画における抗 parchorin 抗体による共免沈分画は N 末側リン酸化領域の GST 融合タンパク質をリン酸化したことから、parchorin は胃底腺内で kinase と直接的あるいは間接的に結合していることが示された (Fig. 6)。他の CLIC family とは異なる parchorin の特徴的な性質には N 末側の領域が大きく寄与していると思われる、この kinase が parchorin の機能制御を通して協同的に水分分泌の調節に関与している可能性が考えられた。

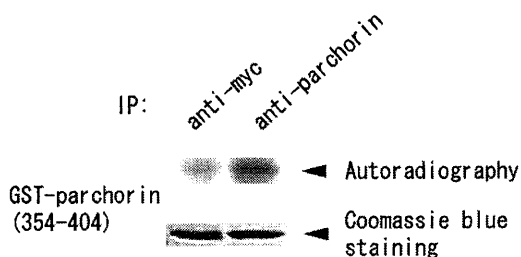


Fig. 6
parchorin と kinase の相互作用。
negative control として抗 myc 抗体を用いた。

【まとめ】

parchorin は水分分泌細胞特異的に存在しており、水分分泌刺激時におこる Cl⁻ 放出に関連して膜移行し、クロライド放出活性を増強して水分分泌を促進していると考えられた。また、これらの性質は kinase など様々なタンパク質が parchorin と有機的に結びつき、その活性を

厳密に調節することで獲得されている可能性が示唆された。他の CLIC ファミリーとは違った parchorin の性質は parchorin 特有の N 末端側に起因しているものと考えられ、この領域が parchorin の活性にどのような影響を与え、ひいては水分泌をどのように修飾しているのかがキナーゼとの関連も含め今後の課題である。

本研究は、水分泌現象における分子的メカニズムに全く新しい知見を与えたばかりでなく、parchorin をターゲットとした新たな作用メカニズムを持つ水分泌修飾薬開発に向け分子レベルの詳細な基盤を築いたという点で極めて斬新かつ先駆的であるといえる。

【参考文献】

Nishizawa, T., Nagao, T., Iwatsubo, T., Forte, J. G., and Urushidani, T. *J. Biol. Chem.* **275**, 11164-11173 (2000)

