

論文の内容の要旨

論文題目： ホスファチジルイノシトールが胃でのプロトン輸送に關与する
K⁺透過性の必須の決定因子であることの解明

氏名 尾見 法昭

[序]

壁細胞における胃酸分泌は、H⁺K⁺-ATPase が管腔側の K⁺と細胞内の H⁺を交換し、独立して Cl⁻が放出され塩酸(HCl)が出ることにより起こる。管腔側に K⁺が放出される必要性があり、H⁺K⁺-ATPase の活性化は H⁺K⁺-ATPase 自体の修飾ではなく K⁺チャネルの活性化によるものと考えられている。

近年 Cl⁻チャネルについては壁細胞由来の cDNA ライブラリーより候補がクローニングされており、また当研究室においても西澤らが parchorin を Cl⁻チャネルに關与する蛋白としてクローニングしたが、分泌に必須の K⁺透過性を与える実体についてはいくつかの候補が挙げられているが同定にはいたっていない。それは生理的な酸分泌活性化機構と結びつくような特性が示されていないからである。酸分泌が cAMP に依存していることから、A-kinase によるリン酸化で活性化される K⁺チャネルが存在すると推定されていた。これは分泌刺激した胃粘膜の分泌側膜を Mg²⁺処理すると K⁺透過性が減少し、非特異的ホスファタ

一ゼ阻害薬であるピロリン酸によって K⁺透過性の減少が阻害されるという報告によって裏付けられていた。私は修士課程において、これを再検討したところ Mg²⁺処置による K⁺透過性の減少はタンパクの脱リン酸化によるものではないということを明らかにした。その結果を受けて、本研究では胃でのプロトン輸送に関与する K⁺チャネルがホスファチジルイノシトールリン酸が必須であることを明らかにするとともに、K⁺チャネルの候補を提出する。

1. 酸分泌に関与する K⁺チャネルは PIP₂ を要求する

食餌及びヒスタミン投与により酸分泌を刺激したウサギ胃粘膜ホモジネートの低速遠心分画を Ficoll 密度勾配遠心により精製し、分泌側膜小胞を得た。H⁺K⁺-ATPase 依存性のプロトン輸送は、acridine orange quenching 法により測定した。この膜標品は ATP, KCl 存在下にプロトン輸送を行い、KCl 透過性が高いと考えられた。この膜を 5mM

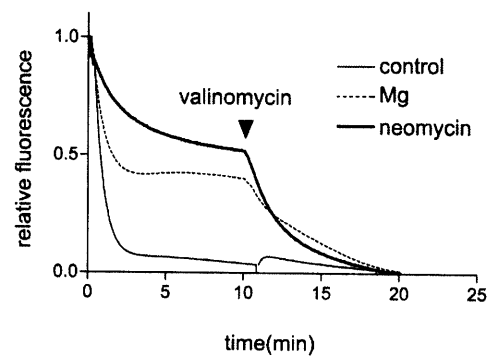


Fig. 1 Mg, neomycin 前処置を行うと K⁺透過性が減少する

Mg²⁺存在下で 37°C 10 分間前処理すると、プロトン輸送が抑制されたが、これは K⁺-ionophore である valinomycin によって完全に回復した。しかし、Mg²⁺による K⁺透過性の減弱はプロテインホスファターゼ阻害薬 calyculinA などによって影響を受けなかった。これらのことから、蛋白のリン酸化脱リン酸化以外のものがこの K⁺透過性に影響を与えている可能性が考えられた。PLC 阻害薬である neomycin 150 μM 存在下 37°C 10 分間の前処置すると K⁺透過性が減少した (Fig. 1)。この K⁺透過性の減少には 37°C 10 分間の前処置が必要であったので Mg²⁺と同様に何らかの代謝反応が介在していることが考えられた。また、neomycin の PLC 阻害の作用が基質である PIP₂ に結合することによるものだということが知られているので、PIP₂ を加えたところ neomycin により低下した K⁺透過性が回復した。また、PIP₂ は Mg²⁺処理による K⁺透過性の減少をも回復させた (Fig. 2)、しかし PI や

PIP では K⁺透過性の回復は見られなかった。当研究室において赤木らは P1TP が酸分泌において必須の因子であることを報告している。P1TP を PI とプレインキュベートし加えると PIP₂ と同様に K⁺透過性を回復させた。これは、膜上に存在するホスファチジルイノシトールリン酸化酵素により PIP₂ や PIP₃ が産生しているものと考えられた。しかし、PIP₂, PIP₃ は

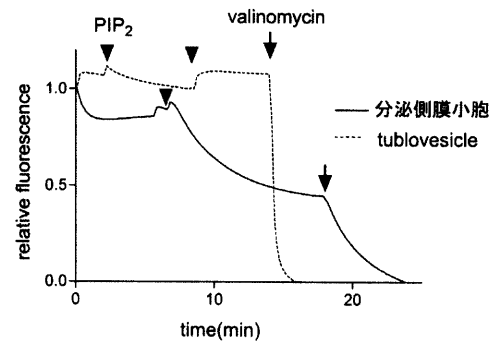


Fig. 2 PIP₂ による K⁺透過性の回復

休止胃粘膜由来マイクロソームに K⁺透過性を与えることはなかった(Fig. 2)。以上より、K⁺チャネルは H⁺K⁺-ATPase と同じ tubulovesicle 上には存在しないか、tubulovesicle 上では PIP₂ による活性化を受けない状態で存在していることが考えられた。

2.K⁺透過性の測定

前述の acridine orange quenching 法では H⁺K⁺-ATPase に依存した酸集積能から K⁺透過性を評価しているため、膜の K⁺透過性を別の方法で評価した。分泌側膜小胞への ⁸⁶Rb⁺の取り込み能を測定したところ、0.5mM neomycin 処置とコントロールにおいて 1 分以内での取り込み能に差がみられた。さらに、K⁺透過性を H⁺の受動的拡散を指標として測定を行った。protonophore 存在下で vesicle を pH=4 に平衡化を行った後に vesicle 外の pH を

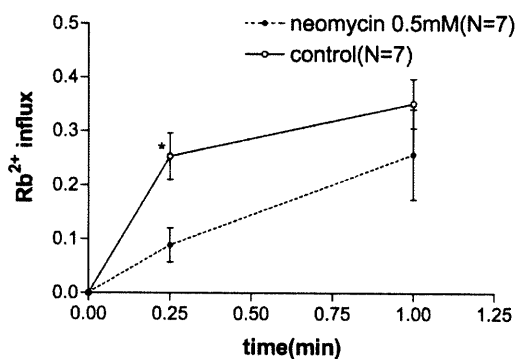


Fig. 3 Rb⁺influx の速度は neomycin 処置により減少する

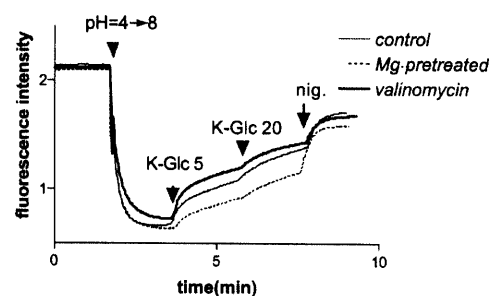


Fig. 4 Mg²⁺処置により vesicle からの H⁺のリークは遅くなる

8 に変化させることにより pH の勾配を作成し、vesicle 内の pH の変化を acridine orange

を用いて測定を行った。その際 counter cation として K⁺のみを存在させることによって、K⁺透過性の指標として pH の変化を見られるようにした。その結果、Mg²⁺前処置による K⁺透過性の抑制が観察された(Fig. 4)。以上より、Mg²⁺,または neomycin 処置により分泌側膜小胞の K⁺透過性が減弱していることが確認できた。

3.膜内ホスファチジルイノシトール量の測定

PIP₂ が Mg²⁺によって減少しているかどうかを TLC を用いて測定を行った。vesicle を [γ -³²P]ATP 存在下で 30° C 1 分間処置して ³²P ラベルを行い、その後 Mg²⁺, neomycin 存在、非存在下で 37° C 20 分間処置することによる変化を観察した。その結果、Mg²⁺処置により PIP₂ および PIP₃ の量がコントロールに比べ減少していることが見られた。また、neomycin 処置では PIP₂ 量はかえって増加した。恐らく Mg²⁺はホスファターゼを促進することで膜内の PIP₂, PIP₃ を減少させ、neomycin は PIP₂ と結合することにより膜内の PI 代謝に影響を与えていると考えられた。

4.ROMK のクローニング

現在までに知られている PIP₂ 感受性の K⁺チャネルとして内向き整流性 K⁺チャネルファミリーがあり、酸分泌に関与する可能性が考えられたので壁細胞において ROMK(Kir1.1) が存在するかどうか確認を行った。ウサギ ROMK はクローニングされていなかったため、ウサギ胃底腺または壁細胞の mRNA よりヒト,ラット,マウスの共通配列部で RT-PCR を行った。その結果 ROMK が存在し、そのスプライシングバリエーションである ROMK2 および ROMK6 と相同性の高いものが存在することがわかった(Fig. 5)。さらに、ROMK が共通配

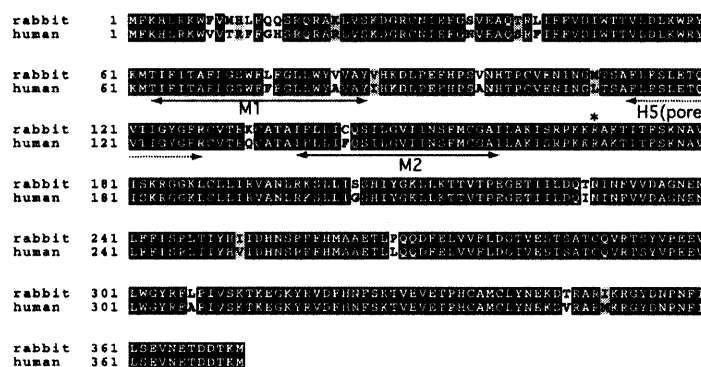


Fig. 5
human ROMK2 と rabbit ROMK のアミノ酸配列の比較(M1, M2-膜貫通領域 H5-pore region *-putative PIP₂ binding site)

列として持っている putative PIP₂ binding site を含む 20 アミノ酸からなる peptide を作成し、Fig. 2 と同様の実験においてこれを加えると Mg²⁺処置を行った分泌側膜小胞への PIP₂ の回復効果が阻害された。以上の結果より、ROMK が胃におけるプロトン輸送に關与する必須な K⁺チャンネルであることが示唆された。

[まとめ]

本研究では私は、胃酸分泌の最終的な調節因子である K⁺チャンネルがイノシトールリン脂質要求性であることを初めて示した。壁細胞の分泌側膜においてこのイノシトールリン脂質は PIP₂ により供給される PI から膜上で生成されることが示唆された。K⁺チャンネルの本体としてイノシトールリン脂質要求性のチャンネルが考えられ、ROMK を候補として提唱した。

[参考文献]

Omi, N., Nagao, T. and Urushidani, T., (2001) *Am. J. Physiol.* **281**,G786-G797.