

## 審査の結果の要旨

氏名 尾 見 法 昭

壁細胞における胃酸分泌において、プロトンポンプである H,K-ATPase が管腔側の K と細胞内の H<sup>+</sup>を交換し、これと独立して Cl<sup>-</sup>が放出され HCl が生成する。この反応が持続するためには ATP の供給と管腔側への持続的な K 放出が必要である。酸分泌の活性化はプロトンポンプそれ自体の活性化を必要とせず、分泌膜上の K チャネルの活性化が直接の引き金であると考えられている。しかしながらこの K チャネルの実体はまだ解明されておらず、生理的に重要で実在が提唱されているが同定されていない最後のチャネルといわれ、世界中の研究者による激しい競争がつづいている。これは、生理学的興味に加え、理想的な抗分泌薬のターゲットとしての可能性があるからである。

この K チャネルの実体については、幾つか候補が提唱されてきている。中には、その機能を抑制することにより酸分泌が抑制されるという KCNQ1 の様なチャネルも報告されている。しかし、例えば異なる種類の K チャネルサブユニットが 40 種近くも存在する下垂体細胞の例を見ても分かる通り、生体には多種多様なチャネルが存在し、それらが別々の重要な生理的役割を果たしているとするれば、大きなエネルギー消費とイオン環境変化を伴う酸分泌反応で見ている限り、直接分泌活性化に関与するチャネルを同定することは困難である。この目的には、プロトンポンプが働いている場で、直接 K 透過性を修飾するような、生理的に意味のある手段の開発が必須のものとなる。

尾見はこの問題に別の方向からアプローチした。以前次のような実験結果が報告されていた。すなわち、酸分泌を刺激した動物から精製した壁細胞の分泌側膜小胞は K 透過性を示すが、この膜標品を Mg 存在下にインキュベーションすると K 透過性が低下するというものである。この膜標品には Mg 依存性のフォスファターゼ活性があることから、壁細胞の分泌側膜にはリン酸化によって活性化される K チャネルが存在すると解釈されていた。

尾見はこの実験を再現し、Mg の効果は蛋白フォスファターゼによるものではないことを示した。しかし何らかのリン酸基の関与が考えられたため、種々の薬理的プローブを用いて検討した結果、neomycin が Mg の効果を模倣する事をみいだした。この neomycin の効果は phospholipase C の抑制によるものでなく、フォスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP<sub>2</sub>) に結合することによると考えられた。また、分泌側膜小胞の K 透過性が低下するには neomycin, Mg いずれの場合にも、37°C 10 分程度のインキュベーションを必要としたため、これらが膜内でのイノシ

トールリン脂質の代謝に影響を与え、結果として K チャネル活性に必須のイノシトールリン脂質が低下することにより、K透過性が低下したと考えられた。このことは、neomycin や Mg 処理で低下したK透過性が、PIP2 や PIP3 の添加により回復することから支持された。また、膜内の PIP2, PIP3 量が Mg 処理によって実際に減少していることも測定された。

休止状態の壁細胞ではプロトンポンプは小管小胞とよばれる細胞内小胞に存在し、刺激に伴って分泌側膜に融合する。このとき分泌側膜上で K チャネルが活性化するが、休止状態で K チャネルがどこに存在するのかは明らかでない。しかし精製した小管小胞に PIP2 や PIP3 を添加しても K 透過性は出現しなかったため、小管小胞膜上には K チャネルが存在しないか、または PIP2 非感受性の状態で存在していると考えられた。

また、neomycin や Mg 処理で低下した分泌側膜K透過性はフォスファチジルイノシトールの添加では回復しなかったが、これをリコンビナントのフォスファチジルイノシトール輸送蛋白(PITP)に結合させて添加すると、K透過性が回復した。以上のことを、同じ研究室で得られた知見、すなわち透過性細胞を用いた系で、PITP が酸分泌に必須の因子であることを示した実験結果と考え合わせると、次のような機構が推定できた。すなわち、壁細胞が刺激を受けるとプロトンポンプが分泌側膜に移行し、同時に K チャネルが活性化する。この活性は PIP2 またはその誘導体を要求するが、それらは膜内の酵素で合成され、他の膜系からフォスファチジルイノシトールが PITP によって供給されれば維持される。

この K チャネルの本態として、PIP2 依存性のKチャネルである ROMK を考え、これが壁細胞に存在するか否かを検討し、ROMK のスプライシングバリエントである ROMK2 と ROMK 6 のウサギホモログを壁細胞からクローニングした。ROMK が持つ PIP2 結合サイトに対応するペプチドが、低下した分泌側膜K透過性の PIP2 による回復を抑制したことは、今回の仮説を支持するものである。予備的検討で、ROMK 共通配列部分の抗体に反応するが分子量の遙かに大きい新規 ROMK 様蛋白が胃粘膜特異的に存在する可能性が示されたが、残念ながら現在までこれを同定するには至っていない。もしこれが存在すれば、胃特異的に作用する抗分泌薬のターゲットとして有望なものである。

以上、本研究は胃酸分泌の生理学において中心的な謎である分泌側膜の K チャネルの本態に迫る先端的な研究であって、生理学領域ばかりでなく創薬科学にも多大な寄与をするものであり、博士（薬学）に値すると判断した。