

## 論文の内容の要旨

論文題目 水輸送組織に発現する細胞内塩素イオンチャネル関連蛋白質 *parchorin* の解析

氏名 水川 裕美子

### 【背景】

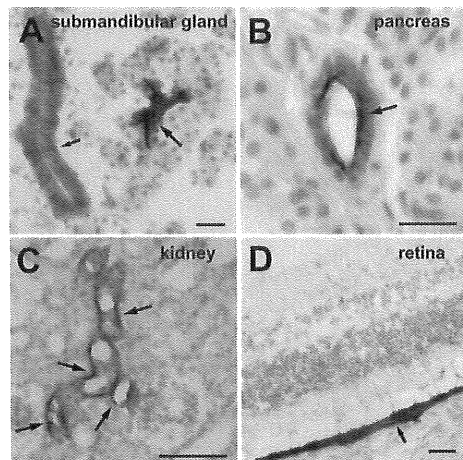
生体では脳脊髄液、尿、消化液など様々な臓器で体液輸送が行われており、恒常性を保つうえで重要な働きをしている。体液輸送では各種のイオン輸送体の関与により形成されたイオン勾配が駆動力となって水が移動するとされている。例えば欧米に多い遺伝病である嚢胞性繊維症は、原因遺伝子である塩素イオン輸送体 CFTR の機能不全により水輸送が破綻することによる。当研究室で近年クローニングされた *parchorin* は胃酸分泌細胞である壁細胞(parietal cell)と脳脊髄液を分泌する脈絡叢(choroid plexus)で最も発現が高く、その他腎臓、涙腺、気道上皮など水輸送を行う組織に発現している。またその C 末端側が細胞内小胞上の Cl<sup>-</sup>チャネルと考えられている chloride intracellular channel (CLIC)ファミリーに高い相同性を持っており、LLC-PK1 細胞に発現させると細胞外 Cl<sup>-</sup>を除去することにより引き起こされる Cl<sup>-</sup>放出を増大させる。これらの特徴から *parchorin* は新たな水輸送調節体として注目されたが、可溶性蛋白質であるためそれ自身チャネルとは考えにくく、機能の詳細は不明であった。そこで私は *parchorin* の生理的役割と機能制御機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

### 【方法と結果】

#### 1. *parchorin* の組織内局在

各組織内での *parchorin* の発現が水輸送に深く関連する細胞に特異的であるかどうかを明らかにするため、免疫組織化学により組織内局在を検討した。循環器系については心臓、

血管共に陽性部分はみられなかった。消化器系では、顎下腺で介在導管に強い発現、他の導管に弱い発現がみられた(Fig. 1A)。膵臓の導管にも強い発現がみられた(Fig. 1B)が介在導管は陰性だった。耳下腺の介在導管、胆嚢上皮にも発現していた。直腸は陰性だった。呼吸器系では、気道上皮とⅡ型肺胞上皮細胞に発現がみられた。腎臓では主に遠位尿細管に発現していた(Fig. 1C)。生殖器系では、前立腺の腺上皮細胞、精巣の導管にあたる精巣網の上皮細胞、乳腺の腺上皮細胞と導管に発現していた。視覚器では眼球の毛様体色素・非色素上皮と網膜色素上皮(Fig. 1D)、涙腺の導管に発現がみられた。内耳のコルチ器官、らせん靭帯、半規管有毛細胞に発現がみられた



**Fig. 1 parchorin の組織内分布.** ウサギ各組織の凍結切片を抗 parchorin モノクローナル抗体で染色し、光学顕微鏡で観察した。陽性部分を矢印で示した。A,B,D: bar=20 μm, C: bar=100 μm

(Table 1)。以上のように、いずれの組織においても parchorin の発現は水輸送の駆動力であるイオン勾配の形成に参与する細胞に局限していることが明らかになり、parchorin が体液輸送に参与している可能性が高まった。また免疫組織化学を行うことによってノザンプロットやウエスタンブロットで検出できなかった膵臓や肺にも parchorin が発現し

**Table 1. parchorin の組織分布と各組織の水輸送**

	tissue	parchorin expression	the water-moving events
circulating system	heart	-	
	vessel	-	
digestive system	gastric parietal cell	+	secretion of gastric acid
	salivary duct	+	secretion of saliva
	pancreatic duct	+	secretion of pancreatic juice
	gallbladder epithelium	+	re-absorption of bile fluid
	rectum	-	
respiratory system	airway epithelia	+	airway fluid re-absorption
	type II alveolar epithelial cell	+	alveolar fluid re-absorption
urinary system	kidney tubule (mainly distal)	+	urinary re-absorption
	urinary bladder	-	
genital organs	glandular epithelia of prostate	+	secretion of prostatic fluid
	epithelium of rete testis	+	secretion of semen
	mammary gland	+	secretion of milk
	placenta	-	secretion of amniotic fluid
sensory organs	ciliary body epithelium, retinal pigment epithelium	+	secretion and transport of aqueous humor
	lacrimal duct	+	secretion of tear
	cochlea and hair cell of semicircular canal	+	homeostatic maintenance of endolymph and perilymph
nervous system	brain (except choroid plexus)	-	
	choroid plexus	+	secretion of cerebrospinal fluid

ていることがわかった。代表的な塩素イオンチャネルである CFTR と CIC ファミリーのうち、CIC-1 (骨格筋)、CIC-K1,2 (腎、蝸牛)、CIC-5 (腎、脳、肝) など組織特異的なタイプがある一方、CFTR や CIC-2 などは分泌上皮を中心に広く発現している。parchorin もイオン輸送を担う上皮細胞に広く存在しているがこれらとは組織分布や組織内分布に違いがあり、重要な水輸送調節体の新たな一員と考えられる。特に外分泌腺の導管への局在は非常に特徴的であり、導管特異的な機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、外分泌腺における分泌能と発現量の関係を明らかにするため、各発達段階の胃粘膜、顎下腺、乳腺についてウエスタンブロットで parchorin 発現量を調べた(Fig. 2)。離乳期まで酸分泌能が低くそれ以降急激に上昇する胃粘膜では胎児、離乳前、成体の順に発現が

増大していた一方、分泌能に大きな変化のない顎下腺では離乳前、成体で発現量の変化はなかった。また乳腺での parchorin 発現は非妊娠成体では確認できず、妊娠中に比較し哺乳期に増大していた。以上により parchorin の発現と分泌能の獲得が深く関連していることが示唆された。

## 2. parchorin の細胞内局在変化とその機構

parchorin は可溶性蛋白質であり、胃壁細胞において一部が酸分泌刺激時に細胞質から分泌側膜分画に移行すること、ブタ腎上皮由来の LLC-PK1 細胞に発現させ細胞外の塩素イオンを除去すると細胞質から細胞膜へ

の局在変化が起こることが示され、刺激を受けて膜移行し機能することが予想されていた。CLIC ファミリーのうち、parchorin は長い親水性の N 末端を持つ可溶性蛋白質という特異な存在である。CLIC 相同性領域より N 末端側をほとんど持たない CLIC1 では大腸菌で発現させて精製し人工膜に導入すると陰イオン電流が測定できることが近年報告され、単独でチャネルを形成できると考えられた。parchorin についてもチャネル活性を持つかどうか検討するためには parchorin が膜局在した状態で電気生理を行う必要がある。そこで私はまず膜移行の機構を明らかにすることを試みた。LLC-PK1 細胞の系は再現性が乏しく、適当なモデルが必要であったが、私はイヌ腎上皮由来の MDCK 細胞を用い、モデル系を構築することに成功した。parchorin の C 末端側 CLIC 領域を発現させると細胞がコンフルエントの時は形質膜に局在した(Fig. 3B)が、細胞密度が低い時は細胞内小胞様の局在を示した。N 末端はいずれの場合も細胞質に一樣に存在した(Fig. 3A)。全長 parchorin を発現させ細胞外 Cl<sup>-</sup>を除去すると細胞がコンフルエントの時のみ細胞質から形質膜に移行するのが認められた(Fig. 3CD)。これらのことから、

parchorin の N 末端側は制御領域、C 末端側がチャネル領域で、刺激により N 末端側に変化が起こると膜局在できるようになると推測した。次に、より生理的な刺激でも膜移行が起こるかどうか検討した。腎尿細管細胞は生理的に大きな浸透圧変化にさらされていることから、浸透圧刺激を検討した。低浸透圧(119 mOsm)では変

化はなかったが、高浸透圧(600 mOsm)で parchorin の膜移行が起こった。また MDCK 細胞において細胞外 ATP が P2Y プリン受容体を介して塩素イオン分泌を促すとされていることが

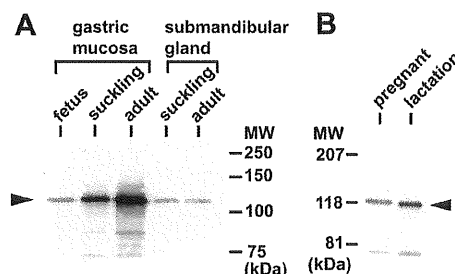


Fig. 2 分泌能と parchorin 発現量の関連. 各時期のウサギの胃粘膜, 顎下腺(A), 乳腺(B)をホモジナイズし 800 x g で遠心した. 上清を 30 µg ずつアブライシ、抗 parchorin でウエスタンブロットした. 矢頭で parchorin を示した.

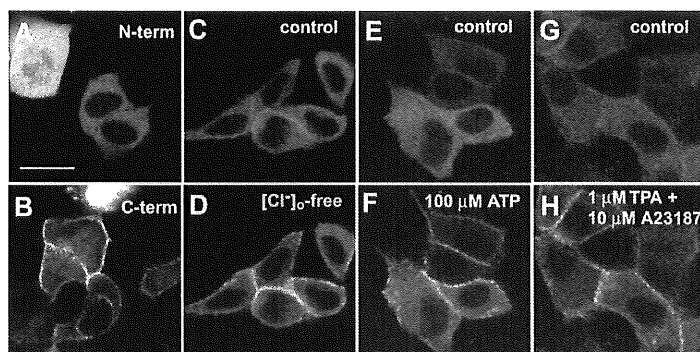


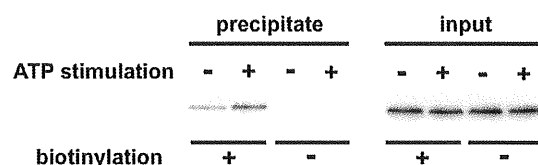
Fig. 3 MDCK 細胞における GFP-parchorin の局在. A,B: parchorin の N 末端側(A), C 末端側(B)の GFP 融合蛋白質を発現させた. C-F:全長を発現させ、各種刺激を行った. Bar=20 µm.

ら、プリン受容体アゴニストを検討した。その結果 ATP (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) (Fig. 3EF), UTP (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M), 2-MeSATP (100  $\mu$ M)などにより GFP-parchorin の膜移行が起こり adenosine (100  $\mu$ M)では起こらなかった。従って ATP は P2 受容体を介して parchorin の膜移行を引き起こすことが示唆された。また bradykinin も膜移行を引き起こすことがわかった。P2Y 受容体, bradykinin B<sub>2</sub> 受容体は主に G<sub>q</sub> と共役し細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇およびプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介してシグナルを伝達する。そこで TPA (1  $\mu$ M) + A23187 (10  $\mu$ M)を適用したところ強く膜移行した(Fig. 3GH)。A23187 単独では膜移行は非常に弱かった。thapsigargin では弱いながらも膜移行が起こった。TPA 単独では膜移行はほとんど起こらなかった。従って ATP, bradykinin による parchorin の膜移行は Ca<sup>2+</sup>/PKC を介することが強く示唆された。どの刺激による膜移行も Ca<sup>2+</sup>シグナルを介しているかどうか明らかにするため細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定を行ったところ, ATP は大きな Ca<sup>2+</sup> 上昇を引き起こしたが細胞外 Cl 除去や高浸透圧では Ca<sup>2+</sup> 上昇はみられなかった。従ってこれらは Ca<sup>2+</sup> を介さずに膜移行を引き起こすことが示唆された。また cAMP 系の関与も検討するため forskolin (100  $\mu$ M) + isobutylmethylxanthine (100  $\mu$ M)を適用したが効果はなかった。細胞骨格系の関与を調べるため cytochalasin D (10  $\mu$ M)と colchicine (10  $\mu$ M)を適用したところ, いずれによっても細胞外 Cl 除去による膜移行が抑制された。以上により, MDCK 細胞における parchorin の膜移行に Ca<sup>2+</sup>, PKC, 細胞骨格が関与していることが示唆された。

parchorin の膜移行を別の方法でも確認するため, 細胞表面のビオチン化アッセイを行った。GFP-parchorin を安定発現する MDCK 細胞を作製し, その細胞表面をビオチン化して可溶化ストレプトアビジンビーズに結合させてウエスタンブロットで検出した。ATP で刺激後ビオチン化を行うとビーズに結合した GFP-parchorin が増加した(Fig. 4)ことから, ATP 刺激により parchorin が細胞膜近傍に集積することが確認できた。

#### 【まとめ】

本研究により私は parchorin の組織内局在を網羅的に明らかにし, イオン輸送を担う上皮細胞に局在していることを示した。また外分泌腺の分泌能と parchorin の発現量の変化が一致していることもわかった。この知見は parchorin の生理的役割の解明に大きく寄与するものであり, parchorin は多くの組織で水輸送の駆動力形成に関与していると考えられた。また私は浸透圧と受容体刺激という生理的刺激に応答して parchorin の膜移行が起こるといふ, 膜移行の機構解析に適したモデル系の構築に成功した。さらに解析を進めることで parchorin の機能制御機構の解明が進展すると共に, 細胞が単離している状態で膜局在させる方法を突き止められればチャネル活性など分子機能の解明にもつながることが期待される。



**Fig. 4 ATP 刺激による GFP-parchorin ビオチン化の増大.** GFP-parchorin を安定発現した MDCK 細胞を 100  $\mu$ M ATP で 5 分間刺激後, ビオチン化反応を行い, 40 mM グリシンで反応停止した。可溶化後ストレプトアビジンビーズと結合させ, 抗 GFP 抗体によるウエスタンブロットで検出した。precipitate: ビーズと結合したもの, input: ビーズに結合させる前の lysate。