

審査の結果の要旨

氏名 水川 裕美子

水輸送は生体において様々な組織で行われており、厳密な調節を受けている。その機構としては、まず各種イオン輸送体の関与により局所的なイオン勾配が形成され、それが駆動力となって受動的に水が移動するというものである。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チャネル CFTR の機能不全により水輸送が破綻することによって発症し、水輸送の調節における塩素イオンチャネルの重要性を示している。

近年クローニングされた parchorin は胃酸分泌細胞と脳脊髄液を分泌する脈絡叢に高い発現がみられる 65kDa の可溶性蛋白質であり、その C 末端側が細胞内小胞上の塩素イオンチャネル chloride intracellular channel (CLIC)ファミリーに高い相同性を有すること、LLC-PK1 細胞に発現させると細胞外 Cl⁻を除去することにより引き起こされる Cl⁻放出を増大させることなどが明らかになっている。これらの特徴より parchorin は新たな水輸送調節体と予想されたが、可溶性蛋白質であることからイオンチャネルと考えにくく機能の詳細は不明である。そこで水川裕美子は、免疫組織化学および培養細胞への発現系を用いて parchorin の生理的役割および機能制御機構を明らかにすることを目指した。

彼女はまず、免疫組織化学により parchorin の組織内局在を検討した。その結果、parchorin の発現は、外分泌腺の導管（顎下腺・耳下腺・膵臓・涙腺の導管、前立腺の腺上皮、精巣の導管にあたる精巣網の上皮、乳腺の腺上皮細胞と導管）、胆嚢上皮、気道上皮、II 型肺胞上皮細胞、腎遠位尿細管、眼球の毛様体色素・非色素上皮と網膜色素上皮、内耳のコルチ器官、らせん靭帯、半規管有毛細胞などにみられた。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関与する細胞に限局していることが明らかになり、水輸送に関与していることが強く示唆された。また、parchorin の発現パターンは、同様に分泌上皮などに広く発現し水輸送に重要な塩素イオンチャネルである CFTR のそれと違いがみられ、CFTR とは独立の新たな水輸送調節体と考えられた。

また、彼女は各発達段階の胃粘膜、顎下腺、乳腺についてイムノプロットにより parchorin 発現量を比較した。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。以上のことは、parchorin の発現と分泌能の獲得が深く関連していることを示している。

parchorin は可溶性蛋白質であるが、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 を人工膜に導入すると陰イオン電流が測定できることが最近報告され、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。そこで彼女はまず膜移行の機構を明らかにすることを目指し、イヌ腎上皮由来の MDCK 細胞を用いたモデル系の構築に成功した。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様に存在した。また全長 parchorin を発現させ細胞外 Cl⁻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。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された。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、より生理的な刺激として浸透圧刺激を行い、高浸透圧(600 mOsm)で parchorin の膜移行が起こることを明らかにした。また P2Y 受容体, bradykinin B₂ 受容体など G_q と共役する受容体刺激, さらにプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化とカルシウムイオノフォアを合わせることによっても parchorin の膜移行が観察された。また cytochalasin D と colchicine の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, マイクロフィラメントと微小管の重合が必要と考えられた。以上により, MDCK 細胞における parchorin の膜移行に Ca²⁺, PKC, 細胞骨格が関与していることが示唆された。また彼女は GFP-parchorin を安定発現する MDCK 細胞を作製し, ATP 刺激による parchorin の膜移行を細胞表面のビオチン化アッセイによっても証明した。

本研究により彼女は 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すとともに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を示し, parchorin が多くの組織で水輸送の駆動力形成に関与していることを強く示唆した。また, 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。これらの知見は parchorin の機能解明および水輸送の生理学の進展に寄与するところ大であり, 博士(薬学)の学位を受けるに値すると判断した。