

学 位 論 文 題 名

ウシ耳下腺腺房細胞における 起電性 $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (NBCe1-B) の 細胞内機能調節機構及び生理的役割に関する研究

学位論文内容の要旨

Na^+ と重炭酸イオン (HCO_3^-) を1:2あるいは1:3の比率で共輸送する起電性NBC (NBCe) は細胞内pHの調節だけでなく上皮細胞における HCO_3^- 輸送に重要な役割を担っている。例えば膵臓導管細胞などの HCO_3^- 分泌上皮細胞において、NBCeの一つであるNBCe1-Bが血管側膜側の HCO_3^- の細胞内への蓄積機構として働いている。高濃度の HCO_3^- を含む唾液を大量に分泌するウシ耳下腺の腺房細胞においてもNBCe1-Bは機能発現し、ホールセルバッチクランプ法で Na^+ と HCO_3^- の共輸送電流 (NBCe1-B電流) という形で輸送活性を測定することができる。本研究ではウシ耳下腺腺房細胞を実験材料として用い、NBCe1-Bの新たな細胞内機能調節因子として細胞内 Mg^{2+} による抑制作用を明らかにし、その作用機序を探る実験を行うと共に、 HCO_3^- 輸送機構への関与の一つの形としてNBCe1-Bが細胞膜電位形成に関与する可能性を示した。

細胞内 Mg^{2+} は形質膜上の様々なイオン輸送タンパク質に対して機能的影響を及ぼす。作用機序としては膜タンパク質へ直接結合するだけでなく、陰性荷電を持った脂質であるホスファチジルイノシトールに電荷を介して結合し、膜タンパク質との相互作用を阻害することも知られている。しかし、細胞内 Mg^{2+} のNBCe機能に対する影響は調べられたことがない。そこで、ホールセルバッチクランプ法をウシ耳下腺腺房細胞に適用して、細胞内 Mg^{2+} 濃度の変化によるNBCe1-B電流への影響を調べた。遊離 Mg^{2+} 濃度を様々に定めたピペット内液を用いることにより、細胞内 Mg^{2+} 濃度を調節した。NBCe1-B電流は細胞内 Mg^{2+} 濃度が 10^{-5} Mでは増加していったが、 $10^{-2.5}$ Mでは増加しなかった。細胞内 Mg^{2+} 濃度を高めていくと、NBCe1-B電流は膜電位非依存性に抑制された。阻害定数 (約1 mM) は生理的細胞内 Mg^{2+} 濃度 (0.5から1.0 mM) の範囲であった。その抑制効果は二価陽イオンキレータの種類に依存せずに認められた。作用機序は不明であるが、 HCO_3^- を含まないピペット内液あるいはpHを低下させたピペット内液 (pH 7.0) を用いることによりNBCe1-B電流の Mg^{2+} 感受性は低下した。NBCe1-B電流は細胞外の Mg^{2+} によっては影響を受けなかった。 Mg^{2+} と同様に多価陽イオン化合物のネオマイシンとスベルミンによってもNBCe1-B電流は抑制された。続いて強制発現系での実験を行った。HEK293細胞あるいはNIH3T3細胞に一過性に発現させたNBCe1-B電流も細胞内の Mg^{2+} 及びネオマイシンにより抑制された。 Mg^{2+} の抑制作用の作用部位を探るため、自己の輸送活性に抑制的に働くと考えられ

ているNBCe1-B特異的細胞内N端領域を取り除いたNBCe1 (Δ Nt-NBCe1) を作製し、 Mg^{2+} 及びネオマイシンの効果を調べた。強制発現させた Δ Nt-NBCe1電流でも Mg^{2+} 及びネオマイシンによる抑制効果は認められたが、野生型NBCe1-B電流に比べて低い感受性であった。以上の結果からNBCe1-Bの新たな機能調節因子として細胞内 Mg^{2+} による機能調節の可能性が示されただけでなく、NBCe1-B特異的細胞内N端領域が細胞内 Mg^{2+} に対する感受性の決定に重要であることも示唆された。生理的には細胞内 Mg^{2+} 濃度は Ca^{2+} 濃度のように大きく変動しないと考えられているが、特異的N端領域が関与する細胞内 Mg^{2+} に対する感受性の変化によって、NBCe1-Bの輸送活性は調節されているかもしれない。また、多価陽イオン化合物も Mg^{2+} と同様に抑制作用を示した結果は、 Mg^{2+} の陽性荷電が重要であることと共に、ホスファチジルイノシトールとNBCe1-Bとの相互作用の可能性も示唆している。しかし、 Mg^{2+} の作用機序を解明するにはさらなる実験が必要である。

続いて、ウシ耳下腺腺房細胞の生理機能への役割としてNBCe1-Bが細胞膜電位に影響を及ぼすかどうか調べた。ウシ耳下腺腺房細胞で実際に測定されたようにNBCe1-Bが Na^+ と HCO_3^- を1:2の比率で輸送している場合には、平衡電位は生理的 Na^+ 及び HCO_3^- 濃度では約-80 mVという深い値となる。よって、NBCe1-Bがウシ耳下腺腺房細胞において細胞膜電位に影響を及ぼすだけの活性を持つ場合には、 K^+ チャネルと共に細胞膜電位を過分極させ、管腔側膜での陰イオンチャネルを介した HCO_3^- の細胞内から細胞外への輸送のための電気的ポテンシャルを与えている可能性がある。細胞膜電位測定方法として、約150 mMの K^+ を含むピペット内液を用いたセルアタッチ法で測定されるシングル K^+ チャネルの逆転電位を測定し、その値の変化から細胞膜電位変化を推測した。細胞膜電位は HCO_3^- 存在下で細胞外液から Na^+ を除去すると脱分極した。 Na^+ 除去による脱分極はNBCe1-Bの阻害薬であるDIDSによって抑制された。 Na^+ 存在下で細胞外液に HCO_3^- を添加すると細胞膜電位は過分極し、その過分極はDIDSで抑制された。この Na^+ 及び HCO_3^- 依存性の膜電位変化が、pHなどの細胞内環境の変化により K^+ コンダクタンスが増減したことに起因する可能性を調べるため、ウシ耳下腺腺房細胞の K^+ チャネルの阻害薬である Ba^{2+} (1 mM) 存在下で同じ実験を行った。 Ba^{2+} 存在下では HCO_3^- 存在下での Na^+ 除去による脱分極と Na^+ 存在下での HCO_3^- 添加による過分極はいずれも Ba^{2+} 非存在下よりもより大きな変化を示したことから、 Ba^{2+} 感受性 K^+ チャネルは Na^+ 及び HCO_3^- 依存性の細胞膜電位変化に関与していないことが示された。これらの結果からウシ耳下腺腺房細胞では K^+ チャネルだけでなくNBCe1-Bも静止膜電位の形成に関与していることが示唆された。

以上、本研究では細胞内 Mg^{2+} による抑制作用というNBCe1-Bの新たな機能調節機構を提唱すると共に、ウシ耳下腺腺房細胞でのNBCe1-Bの生理的役割として静止膜電位形成への関与を示唆した。これらの成果はNBCe1-B研究における新たな展開を引き起こす重要なブレイクスルーになると共に、 HCO_3^- 分泌機構の理解をいっそう深めるものであると思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	葉原芳昭
副査	教授	木村和弘
副査	准教授	太田利男
副査	准教授	石川透

学位論文題名

ウシ耳下腺腺房細胞における 起電性 $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (NBCe1-B) の 細胞内機能調節機構及び生理的役割に関する研究

Na^+ と重炭酸イオン (HCO_3^-) を 1:2 あるいは 1:3 の比率で共輸送する起電性 NBC (NBCe) は細胞内 pH の調節だけではなく上皮細胞における HCO_3^- 輸送にも重要な役割を担っている。高濃度の HCO_3^- を含む唾液を大量に分泌するウシ耳下腺の腺房細胞においても NBCe1-B は機能発現し、ホールセルパッチクランプ法で Na^+ と HCO_3^- の共輸送電流 (NBCe1-B 電流) という形で輸送活性を測定することができる。本研究ではウシ耳下腺腺房細胞を用い、NBCe1-B の新たな細胞内機能調節因子としての細胞内 Mg^{2+} による抑制作用を明らかにし、その作用機序を探ると共に、NBCe1-B が細胞膜電位形成に関与する可能性について検討したものである。

細胞内 Mg^{2+} は形質膜上の様々なイオン輸送蛋白質に対して機能的影響を及ぼす。しかし、細胞内 Mg^{2+} の NBCe 機能に関する報告はない。申請者は、ホールセルパッチクランプ法を適用して、細胞内 Mg^{2+} 濃度の変化による NBCe1-B 電流への影響を調べた。細胞内 Mg^{2+} 濃度が 10^{-5} M では NBCe1-B 電流は増加したが、 $10^{-2.5}$ M では増加しなかった。細胞内 Mg^{2+} 濃度を高めていくと、NBCe1-B 電流は膜電位非依存性に抑制された。阻害定数 (約 1 mM) は生理的細胞内 Mg^{2+} 濃度 (0.5 から 1.0 mM) の範囲内であった。その抑制効果は二価陽イオンキレータの種類に依存せずに認められた。 HCO_3^- を含まないあるいは pH を低下させたピペット内液 (pH 7.0) を用いることにより NBCe1-B 電流の Mg^{2+} 感受性は低下した。NBCe1-B 電流は細胞外の Mg^{2+} によっては影響を受けなかった。 Mg^{2+} と同様に多価陽イオン化合物のネオマイシンとスベルミンによっても NBCe1-B 電流は抑制された。HEK293 細胞あるいは NIH3T3 細胞に一過性に発現させた強制発現系においても NBCe1-B 電流は細胞内の Mg^{2+} 及びネオマイシンにより抑制された。続いて Mg^{2+} の抑制作用の作用部位を探るため、輸送活性に抑制的に働くと考えられている NBCe1-B 特異的細胞内 N 端領域を取り除いた NBCe1 ($\Delta\text{Nt-NBCe1}$) を作製し、 Mg^{2+} 及びネオマイシンの効果を調べた。 $\Delta\text{Nt-NBCe1}$ 電流でも Mg^{2+} 及びネオマイシンによる抑制効果は認められたが、野生型 NBCe1-B 電流に比べて感受性は低かった。以上の結

果から NBCe1-B の新たな機能調節因子として細胞内 Mg^{2+} による機能調節の可能性が示されただけでなく、NBCe1-B 特異的細胞内 N 端領域が細胞内 Mg^{2+} に対する感受性の決定に重要であることも示唆された。また、多価陽イオン化合物も Mg^{2+} と同様に抑制作用を示した結果は、 Mg^{2+} の陽性荷電が重要であることと共に、ホスファチジルイノシトールと NBCe1-B との相互作用の可能性も示唆していると申請者は考えている。

次に、ウシ耳下腺腺房細胞の生理機能的役割として NBCe1-B が細胞膜電位に影響を及ぼすかどうかについての検討が行われた。細胞膜電位は HCO_3^- 存在下で細胞外液から Na^+ を除去すると脱分極した。 Na^+ 除去による脱分極は NBCe1-B の阻害薬である DIDS によって抑制された。 Na^+ 存在下で細胞外液に HCO_3^- を添加すると細胞膜電位は過分極し、その過分極は DIDS で抑制された。この Na^+ 及び HCO_3^- 依存性の膜電位変化が、pH などの細胞内環境の変化により K^+ コンダクタンスが増減したことに起因する可能性を調べるため、ウシ耳下腺腺房細胞の K^+ チャネルの阻害薬である Ba^{2+} (1 mM) 存在下で同様の実験を行った。 Ba^{2+} 存在下では HCO_3^- 存在下での Na^+ 除去による脱分極と Na^+ 存在下での HCO_3^- 添加による過分極はいずれも Ba^{2+} 非存在下よりもより大きな変化を示したことから、 Ba^{2+} 感受性 K^+ チャネルは Na^+ 及び HCO_3^- 依存性の細胞膜電位変化に関与していないことが示された。これらの結果からウシ耳下腺腺房細胞では K^+ チャネルだけでなく NBCe1-B も静止膜電位の形成に関与していると申請者は推測している。

本研究は、細胞内 Mg^{2+} による抑制作用という NBCe1-B の新たな機能調節機構を提唱すると共に、ウシ耳下腺腺房細胞での NBCe1-B の生理的役割として静止膜電位形成への関与を示唆したものである。これらの成果は NBCe1-B 研究における新たな展開を引き起こす重要なブレイクスルーになると共に、 HCO_3^- 分泌機構の理解をいっそう深めるものであると思われ、基礎獣医学領域において重要な知見を提供するものである。

よって、審査員一同は、上記博士論文提出者山口聡一郎氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規程による研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。