HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット直腸表層細胞に発現するアミロライド感受性上皮性ナトリウムチャネルおよび過分極活性化型内向き整流性塩化物イオンチャネルの機能特性［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	稲垣, 明浩
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6896号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54661
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akihiro_Inagaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称:博士(獣医学)　　氏名:稲垣　明浩

学位論文題名

ラット直腸表層細胞に発現するアミロライド感受性上皮性ナトリウムチャネル
および過分極活性化型内向き整流性塩化物イオンチャネルの機能特性

生体の体重の 60%以上を占めるとも言われる水分量および体液の電解質バランスの調節は生体機能の維持のために非常に重要な機能である。アミロライド感受性上皮性 Na^+チャネル(Epithelial Na Channel, ENaC)はその役割の重要な一端を担っており、腎臓・肺・大腸・汗腺・唾液腺などの吸収上皮細胞管腔側膜に機能発現していることが知られている。Na^+がこれらの組織で吸収される時には、まず管腔側膜に発現している輸送体もしくはイオンチャネルを介して細胞に入り、基底側膜に存在する輸送体によって基底側の間質および血液中に輸送される。ENaC は管腔側膜に発現しており、この経上皮起電性 Na^+輸送の律速段階として働いている。ENaC の管腔側膜への蛋白質発現量の調節には副腎皮質ホルモンであるアルドステロンが関与していることが知られており、アルドステロンはこのチャネルを介して Na^+輸送量、さらには引き続いて起こる水分吸収量及び血圧調節に関与することになる。

遠位結腸及び直腸において重要な役割を果たすチャネルは、アルドステロンによる活性化やアミロライドによる抑制の K_i 値から、Na^+の選択性が高い上皮性 Na^+チャネルと考えられてきた。そしてその遺伝子背景は、ラット大腸からクローニングされた α-, β-, γ-ENaC のヘテロオリゴマーであると考えられてきた。*In situ* ハイブリダイゼーションや免疫組織化学の研究結果もこれらのサブユニットが大腸表層細胞に存在している証拠を提供した。しかし大腸における起電性 Na^+輸送が、α-, β-, γ-ENaC の 3 つのサブユニットが揃った状態でのチャネルの電気生理学的性質と実際に類似しているか否かについての研究成果はなかった。そこで本研究では、大腸表層細胞に発現する上皮性 Na^+チャネルの詳細な電気生理学的性質を明らかにすることを目的とした。その結果、ラットの直腸部位を用いることで、低 Na^+食給餌やアルドステロン投与を行わない状態にも関わらず起電性 Na^+輸送が見られることを、短絡電流測定法及びパッチクランプ法を用いて捉えることに成功した。この起電性 Na^+輸送の機能特性について 1)アミロライド感受性, 2)短絡電流のアルドステロンによる活性化, 3)チャネルポアへのアミロライド結合位置, 4)イオン選択性についての検討を行ったところ、培養細胞などに α-, β-, γ-ENaC の 3 つのサブユニットを同時に発現させた状態で観察されたチャネルの性質と類似していることが明らかになった。また、細胞外 Na^+濃度を変化させた結果から、直腸に発現しているこのチャネルの性質として、細胞外 Na^+濃度についての K_m 値が極めて低いことが分かった。このことは上部消化管で様々な輸送体を介して吸収されて濃度が低下してきた Na^+を、その濃度勾配に逆らって効率良く吸収することに適していると言え、このチャネルが消化管末端部における Na^+吸収に、さらには体内における Na^+および水分量の最終的調節に重要な役割を

果たしていることを示唆している。

一方で、α-, β-, γ-ENaC を介すると考えられるアミロライド感受性 Na^+電流が見られる組織・細胞で同時に過分極活性化 Cl^-電流が捉えられた報告が多数あり、例えば α-, β-, γ-ENaC の発現する唾液腺および大腸で過分極活性化 Cl^-チャネルである ClC-2 が発現していることが知られている。このことから、本研究結果より α-, β-, γ-ENaC が機能発現していることが想定される直腸表層細胞に過分極活性化 Cl^-電流が発現しているか、そのチャネル特性はどのようなものであるか、α-, β-, γ-ENaC と機能的に共存しているか、その過分極活性化 Cl^-電流が α-, β-, γ-ENaC を介した Na^+輸送に対して活性化もしくは抑制的な役割を果たしているかどうかを次の研究の目的とした。その結果、過分極活性化 Cl^-電流はアミロライド感受性 Na^+電流が観察される細胞に発現していることが分かった。そのチャネルの性質についてパッチクランプ法を用いて検討したところ、1）過分極でゆっくりと活性化する，2）イオン選択性の順序は $Cl^- > Br^- > I^- >$ glutamate である，3）Zn^{2+}によって抑制される、という結果が得られ、それは rClC-2 を培養細胞に発現させた報告によるチャネルの性質と類似していた。また、この ClC-2 と類似した過分極活性化 Cl^-電流（ClC-2 様電流）は、細胞内イオン環境を人工的に調節していない状態（セルアタッチパッチ）では静止膜電位よりも少なくとも 40 mV 以上過分極させない限り活性化しないこと、充分にこのチャネルを抑制する濃度の Zn^{2+}を作用させても直腸における起電性 Na^+吸収に対して大きな影響を与えないことも分かった。これらのことからこの ClC-2 様電流は直腸表層細胞において少なくとも通常の状態ではアミロライド感受性起電性 Na^+電流の制御には大きな役割を果たしているとは考えにくい。この ClC-2 様電流の果たす役割の解明のためには更なる研究が必要であろう。