

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18992

研究課題名(和文)カルシニューリンとIP3結合蛋白IRBITが及ぼす膵液重炭酸分泌の新制御機構

研究課題名(英文)Regulation of bicarbonate by calcineurin and IRBIT in pancreas.

研究代表者

山崎 修 (YAMAZAKI, OSAMU)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80757229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓は重炭酸と消化酵素の分泌を司る臓器である。しかしその分泌機構が破綻すると、膵炎を発症し、重症化すると膵臓死のみならず多臓器不全を合併し、慢性化すると膵癌リスクまでも上昇することが知られている。  
我々は膵重炭酸分泌の複雑な調節機構に対しIP3受容体結合蛋白IRBITとcalcineurinに焦点を当てて研究を行った。その結果、ナトリウム重炭酸共輸送体NBCe1の活性化機構に、上記蛋白群がマスターレギュレーターとして作用しているのみならず、新たに見つかったリン酸化部位を介することも証明した。  
この結果を現在Science signaling誌に投稿し、revise中である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic excretion system contributes not only digestive systems but also keeping homeostasis. These system deficiency leads to pancreatitis, multiple organ failure, and pancreatic tumor progression.  
Here we focused on IP3 receptor binding protein (IRBIT) and calcineurin. These protein acts as a master regulator of pancreatic excretion system, especially for sodium-bicarbonate co-transporter (NBCe1). Novel phosphorylation and dephosphorylation sites in NBCe1 coordinate to IRBIT and calcineurin, leads to fully activation of NBCe1 and bicarbonate excretion.  
We submit these novel findings and there are revised in Science Signaling paper.

研究分野：生理学

キーワード：重炭酸 トランスポーター チャネル リン酸化・脱リン酸化 細胞内塩素イオン濃度

1. 研究開始当初の背景

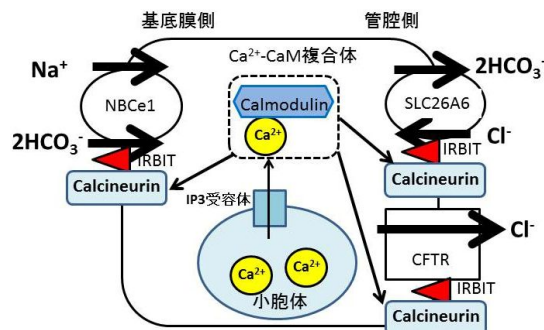
膵臓は重炭酸と消化酵素の分泌を司る臓器である。しかしその分泌機構が破綻すると、膵炎を発症し、重症化すると膵壊死のみならず多臓器不全を合併し、慢性化すると膵癌リスクまでも上昇することが知られている。

申請者らは、最近膵外分泌の主要な要素である IP3 受容体結合蛋白 IRBIT/ナトリウム重炭酸共輸送体(NBCe1)複合体が、細胞内塩素イオン(Cl<sup>-</sup>)濃度によりその輸送活性を制御することを見出した(PNAS 112:E329, 2015)。この知見はNBCe1の重炭酸輸送機能が細胞内電解質濃度により制御を受けることを示唆している。

本研究の目的は、細胞内カルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)制御蛋白 Calcineurin と IRBIT が及ぼす膵液分泌機構の全容を解明し、新規創薬基盤を開発することである。

2. 研究の目的

膵臓は重炭酸と消化酵素の分泌を司る臓器である。しかしその分泌機構が破綻すると、組織が膵消化酵素により自己消化を受け、膵炎を発症し、15~20%は重症化して膵壊死・ショック・腎不全・呼吸不全・DICなどを合併する。更に膵炎が慢性化すると、膵癌発症リスクが6倍に上昇し(NEJM 371:1039, 2014)、未だに致死率が高い疾患である。ここで、近年、小胞体に発現しカルシウムチャンネルとして機能する IP3 受容体に対し、制御因子である IP3 受容体結合蛋白 IRBIT が報告された(J Biol Chem 278: 10602, 2003)。IRBIT は膵臓に発現する重炭酸輸送体の輸送機能を調節する master regulator として注目を集めている(Gastroenterology 145:232, 2013)。更に最近、神経細胞において、IRBIT が主要なカルシウム結合蛋白質である Calmodulin と Calmodulin-dependent kinase II alpha(CaMKII)との結合を抑制することでCaMKII活性を抑制することが示された(PNAS 112:5515, 2015)。この知見は体内に幅広く存在する IRBIT と Ca<sup>2+</sup>を介した制御メカニズムが膵臓にも存在する可能性を示している。



本研究の目的は、こうした知見に基づき、IRBIT と細胞質内 Ca<sup>2+</sup>を制御する蛋白質群に着目し、IRBITの膵重炭酸分泌のマスターレギュレーターとしての機能を解明し、膵重

炭酸外分泌メカニズムの全容を明らかにすることで、膵炎制御の創薬基盤を開発することである。

3. 研究の方法

膵液重炭酸分泌機構における IRBIT と Calcineurin を介する Ca<sup>2+</sup>調節の意義を明らかにするために、培養細胞やアフリカツメカエル卵母細胞を用いた複数の機能解析により、膵重炭酸の主要な輸送体である NBCe1 機能変化を引き起こすかどうか検討を行う。

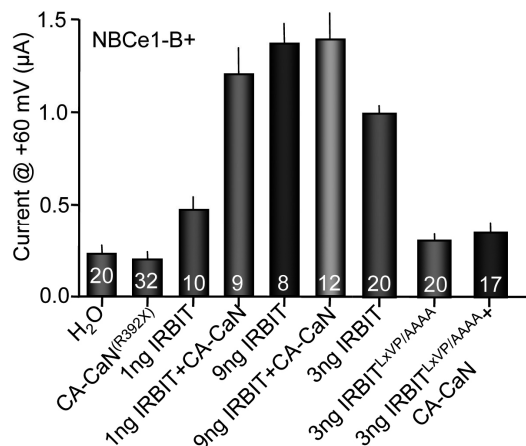
一方、多段階に活性化される複雑なメカニズムに細胞内塩素イオン濃度が関与していることが申請者の研究から明らかになってきたことから、細胞内塩素イオン濃度の違いにより重炭酸分泌能が変化することをパッチクランプ法で確かめた。

その際に、新たなリン酸化部位が多段階活性化に寄与することが分かったため、リン酸化部位の側鎖を変更することで活性化機構が障害されるかどうかをパッチクランプ法・共免疫沈降法を用いて確かめた。

4. 研究成果

【ナトリウム重炭酸共輸送体を制御するカルシニューリンの同定・機能解析】

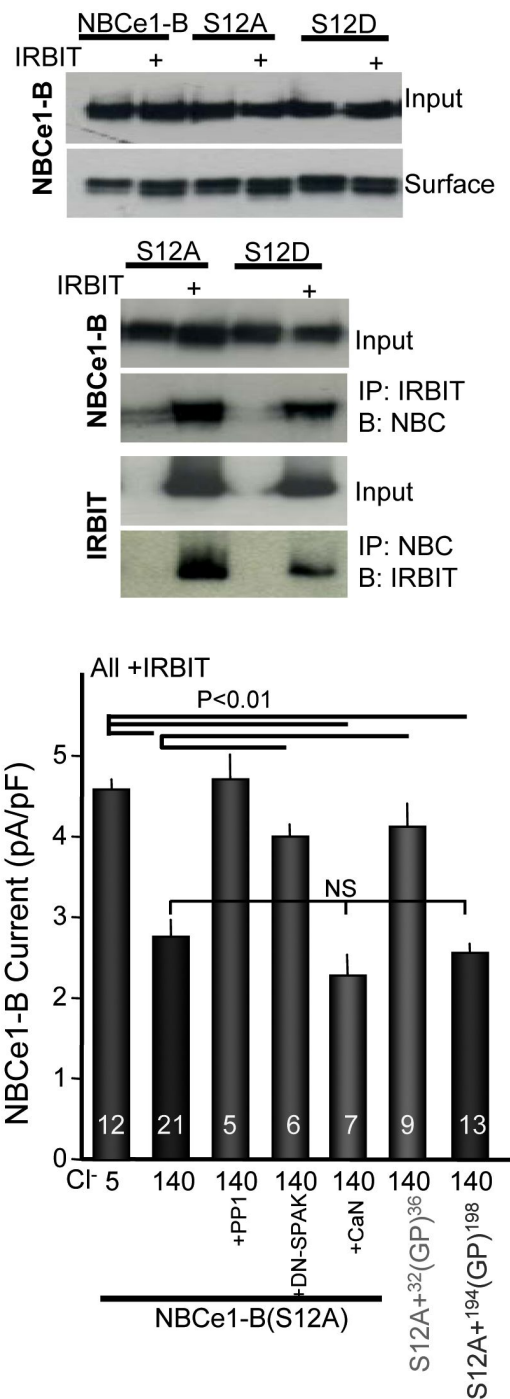
共免疫沈降法を用いてナトリウム重炭酸共輸送体とカルシニューリンの蛋白結合作用を確認した。その上で、パッチクランプ法およびアフリカツメカエル系卵母細胞測定系を用い機能解析を行った。カルシニューリンはナトリウム重炭酸共輸送体-IRBIT複合体の活性化を促進することが認められた。そこで、細胞内塩素イオン濃度の変化により機能活性に影響が出るかを確かめたところ、細胞内高塩素イオン濃度の環境下で、ナトリウム重炭酸共輸送体の機能活性が著明に減弱する事を認めた。



【ナトリウム重炭酸共輸送体の塩素イオン感知部位とカルシニューリンとの関係】

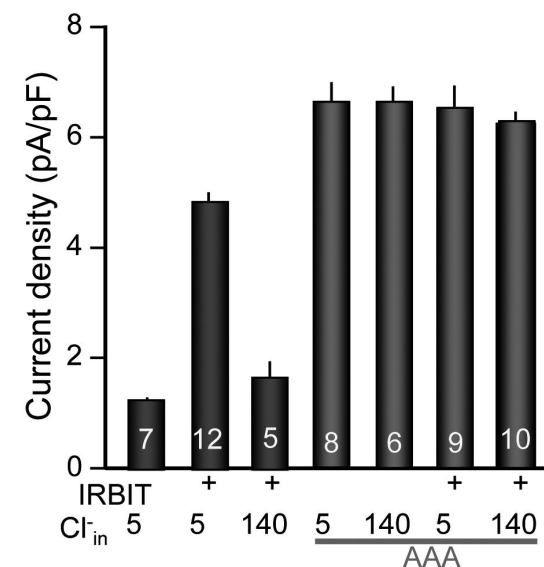
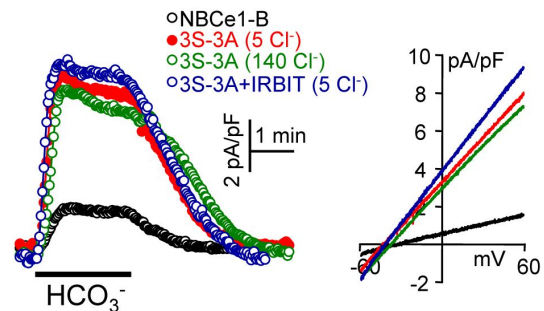
そのためナトリウム重炭酸共輸送体における既知のリン酸化部位との関連、および塩

素イオン感知部位 motif との関連、カルシニューリンの修飾蛋白との関連を調べることとした。カルシニューリンがナトリウム重炭酸共輸送体のアミノ酸 12 番目のセリンをリン酸化することで、アミノ酸 194~198 番目の塩素イオン感知部位 motif を制御することを、パッチクランプ法および共免疫沈降法で確認した。



【新規リン酸化部位の発見とナトリウム重炭酸共輸送体の構造変化】  
この多段階にわたるカルシニューリンの制御により、ナトリウム重炭酸共輸送体のアミ

ノ酸 232, 233, 235 番目のセリンが脱リン酸化され、ナトリウム重炭酸共輸送体の機能活性変化が起きることが分かった。アミノ酸 232, 233, 235 番目のセリンをアラニンに置換した変異体を用いることで、ナトリウム重炭酸共輸送体の機能活性が 100%の完全活性型になったことをパッチクランプ法で確かめた。このことから、同部位の脱リン酸化による立体構造の変化が起きたのではないかと想定した。



【現時点での状況】  
現在上記データを Science Signaling 誌に投稿、現在 revise 中である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

山崎 修、Prof. Shmuel Muallem、関 常司  
重炭酸輸送を介した統合的生体内 pH 調節機構の解明 = 腎臓・上皮細胞から神経系まで = 第 95 回日本生理学会学術大会、2018 年

山崎修、Prof. Shmuel Muallem、関 常司、林 松彦

アップデートシンポジウム 2「上皮膜輸送の  
最新生物学」

発表表題：重炭酸輸送を介した統合的生体内  
pH 調節機構の解明 腎臓・上皮細胞から神  
経系まで

第 59 回歯科基礎医学会、2017 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山崎 修 (YAMAZAKI, Osamu)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教

研究者番号：80757229