

令和元年6月20日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15552

研究課題名(和文) 乳腺分泌細胞で機能する非選択的陽イオンチャネルの同定とその生理的役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of non-selective cation channels in mammary secretory cells and their physiological roles in lactation

研究代表者

上川 昭博(Kamikawa, Akihiro)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：30581665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：泌乳期マウスから単離した乳腺分泌細胞を用いて電気生理学的解析を行い、複数の一価陽イオンに透過性をもつ陽イオンチャネル(非選択的陽イオンチャネル: NSCC)が機能的に発現することを示した。NSCCを構成することが知られているTRPファミリー分子のうちTRPV2, 4, TRPM4, 7, TRPP2遺伝子が乳腺に発現していた。また、NSCCと共同して機能する可能性があるマウスTMEM16A(Ca²⁺活性化Cl⁻チャネル)の新しい変異体を同定した。これらの分子が乳腺分泌細胞における電解質輸送に関与し、乳量や乳質の制御に影響する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳中には電解質(イオン)が含まれている。乳腺分泌細胞を介した電解質分泌は浸透圧性の水の分泌を伴い、乳量や乳質に影響を与える可能性がある。本研究によりその電解質分泌を担う可能性のあるイオンチャネル機能の一端が明らかになった。泌乳に関わる医学的な問題、例えば母乳量の不足や、出産とは関連しない過剰分泌による腫瘍形成などの原因解明や予防、治療につながることを期待される。また、農学分野においては家畜の乳量や乳質の改良のための新たな手段の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Electrophysiological analyses with isolated mammary secretory cells have suggested the functional expression of non-selective cation channels (NSCC). The gene expression of TRP family proteins, which are known as molecular bases of NSCC, were examined. The expressions of TRPV2 and 4, TRPM4 and 7, and TRPP2 were detected. In addition, the novel variant of mouse TMEM16A (Ca²⁺-activated Cl⁻ channel), which is known to physiologically and physically interact with NSCC, was determined in mammary glands. These ion channels might play important roles in milk production through the ion transport in mammary secretory cells.

研究分野：生理学

キーワード：非選択的陽イオンチャネル TRP family TMEM16A 乳腺 泌乳 電解質輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳腺は授乳期の雌性哺乳動物でのみ機能を発揮する外分泌腺である。唾液腺など他の外分泌腺の上皮細胞では、細胞膜上の電解質輸送体(イオンチャネル、イオントランスポーター)の同定が進んでおり、経上皮電解質輸送が外分泌液の浸透圧や pH、水分量、酵素量などを調節するという分泌メカニズムの概要が理解されつつある。乳腺でも、1970年代に Linzell 博士らが実験動物の血漿中、乳中、細胞質内の電解質濃度と経上皮電位の測定を元に、乳腺分泌細胞の電解質輸送モデルを提示した(引用)。しかし、MS 細胞で機能するイオンチャネルは長い間不明であった。そこで私たちは泌乳期のマウス乳腺やそこから単離した乳腺分泌細胞を用いて、イオンチャネルを介したイオン輸送により生じる膜電流を解析し、乳腺分泌細胞で機能すると考えられるイオンチャネルを明らかにしてきた。例えば、内向き整流性 K⁺チャネル 2.1 (Kir2.1) や、Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネルの一つである Transmembrane protein 16A (TMEM16A) である(引用)。前述の Linzell 博士らにより提唱されているモデルでは、これらのイオンチャネル以外に管腔側膜に非選択的陽イオンチャネルの存在が仮定されている。近年では、非選択的陽イオンチャネルを構成する TRPM ファミリー分子が他の外分泌腺で電解質液分泌に寄与すること、TMEM16A と物理的、機能的に相互作用して細胞機能を制御することなどが、報告されており(引用) 乳汁産生においても非選択的陽イオンチャネルが他のイオンチャネルとの相互作用を介して重要な役割を果たすことが想定された。

2. 研究の目的

乳腺分泌細胞の細胞膜を介する非選択的陽イオン電流を解析し、非選択的陽イオンチャネルの機能的発現を示す。またその性質の解析からそのチャネルの分子種を明らかにする。さらにそのチャネルが乳汁分泌においてどのような役割を果たすか明らかにする。以上を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホールセルパッチクランプ

泌乳期のマウス乳腺をコラゲナーゼとヒアルロニダーゼを含む酵素溶液で処理して、乳腺分泌細胞を単離した。単離した細胞は速やかにホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析に供した。ホールセルパッチクランプ法ではガラス電極(ピペット)を細胞膜に接着させ、細胞膜を破り、細胞内環境をイオン濃度を調製したピペット溶液で置き換えた。さらに細胞外をバス溶液で灌流し、細胞内外のイオン環境を制御した条件下で実験を行なった。細胞膜の膜電位を任意に固定、変化させ、その際に膜を介して流れるイオン電流を計測した。

(2) 遺伝子発現解析

泌乳期マウス乳腺などから分離精製した total RNA から逆転写反応(RT)により cDNA を得て、それを鋳型として PCR 法により目的とする遺伝子を増幅し、その発現の有無を(もしくは寡多を半定量的に)解析した。また遺伝子配列を検討する際は増幅した遺伝子産物をプラスミドにサブクローニングし、その配列をシーケンサーを用いて解析した。TMEM16A mRNA 5' 端配列解析には 5' RACE 法を用いた。また、各変異体から翻訳される TMEM16A タンパク質の特徴を調べるために、HEK293 細胞に遺伝子導入し、一過性強制発現細胞を作成して、解析を行った。

(3) 細胞内 Ca²⁺濃度解析

単離した乳腺分泌細胞に Ca²⁺指示蛍光色素である Fura-2 を取り込ませて、細胞内 Ca²⁺濃度変動を解析した。具体的には Fura-2 導入乳腺分泌細胞を緩衝液で灌流しながら蛍光顕微鏡で観察し、経時的に 340, 380 nm の励起波長を与えて 510nm にピークを持つ蛍光を記録した。遊離 Ca²⁺濃度の上昇は 340nm 励起蛍光(F_{ex340})の増加、380 nm 励起蛍光(F_{ex380})の減少につながる。蛍光強度比(R = F_{ex340}/F_{ex380})を指標として細胞内 Ca²⁺濃度変化を解析した。

(4) 乳中電解質濃度の解析

泌乳期マウスの乳頭直下の乳腺導管にカニューレを採取し、オキシトシン刺激を加えて乳汁を採取した。乳中の電解質濃度を電極法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 泌乳期マウス乳腺における TRP ファミリー分子の発現

泌乳 15 日目マウス乳腺における TRP ファミリー分子 25 種の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した(図 1)。TRPV2, 4, TRPM4, 7, TRPP2 で強い発現を認めた。また、TRPC2, 3, TRPP5 などの分子もわずかに増幅遺伝子産物が検出された。

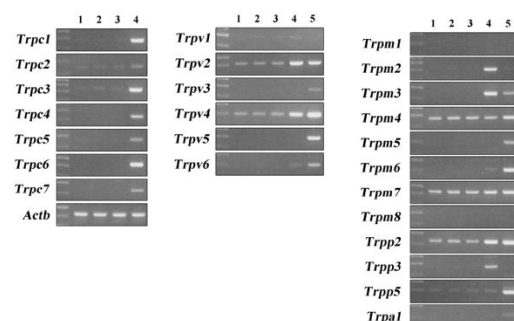


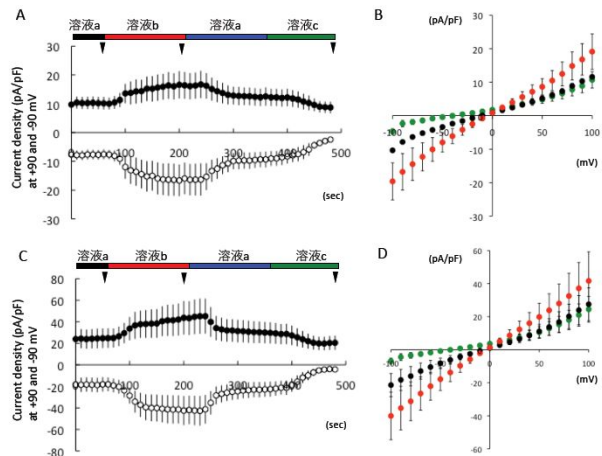
図 1 泌乳期マウス乳腺における TRP ファミリー遺伝子の発現 lane1,2,3 がマウス乳腺、lane4, 5 が陽性対象となる組織

(2) 乳腺分泌細胞の電解質透過性

泌乳期マウスの乳腺分泌細胞を単離し、速やかにホールセルパッチクランプ解析に供した。これまでに私たちは、細胞内を 150 mM の Cs⁺ や 3 μM の遊離 Ca²⁺ を含む HEPES 緩衝液で灌流し、細胞外を 150 mM の一価陽イオン (Na, K, Rb, Cs またその組み合わせ) を含む HEPES 緩衝液で灌流した時に細胞外の一価陽イオン種に関わらず 0 mV 付近に逆転電位を持つ膜電流を検出していった。またこのとき、細胞外の一価陽イオンを一般的にチャンネル透過性が低い高分子一価陽イオン (NMDG⁺) に置き換えると、内向き電流が減弱し、逆転電位が負の方向に移動した。これらの知見は選択性の低い陽イオンチャンネルの機能的発現を示唆したため、その性質をさらに解析した。細胞内を灌流するピペット溶液に 120 mM Cs-glutamate, 20 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ (free Mg²⁺ ≈ 0.5 mM) を含み pH7.4 に調整した緩衝液 (溶液 d) を、細胞外を灌流するバス溶液には 150 mM Cs-glutamate, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ を含み pH7.4 に調整した緩衝液 (溶液 a) を用いた。膜電位を -100 mV から +100 mV まで連続的に変化させると、弱い整流性を示し、0 mV 付近に逆転電位を持つ膜電流が計測された (図 2)。細胞外の一価陽イオンを除くと (溶液 b) 外向き電流、内向き電流がわずかに増強され、整流性が低下した。また細胞外の Cs⁺ を NMDG⁺ に置き換えると (溶液 c)、内向き電流が減弱し、逆転電位が負の方向に移動した。ピペット溶液の Mg²⁺ を除去 (溶液 e) しても同様の結果が得られた (図 2)。このような電気生理学的特徴は NSCC の候補分子種を絞り込むために重要であるが、まだ十分ではなく、今後さらなる検証が必要である。

図 2 乳腺分泌細胞の電解質透過性

A. 乳腺分泌細胞内を溶液 d で灌流し、細胞外灌流液を溶液 a, b, c に置き換えたとき、膜電位 -90 mV と +90 mV で検出された膜電流の経時変化。B. A の矢頭部分で計測される電圧 電流曲線。C. 乳腺分泌細胞内を溶液 e で、細胞外灌流液を溶液 a, b, c で灌流したときの、膜電流の経時変化。D. C の矢頭部分で計測される電圧 電流曲線。B, D のシンボルの色分けは A, C 上部の各溶液を示す色分けと一致している。A, B は 11 例、C, D は 8 例の平均値 ± 標準誤差を示す。なお、ジャンクションポテンシャル等の補正は行っていない。



(3) 乳腺分泌細胞内 Ca²⁺濃度変化の解析

非選択的陽イオンチャンネルの中には一価陽イオンに加え、二価陽イオンに対する透過性を有し、細胞内 Ca²⁺濃度変化としてチャンネル活性を捉えることができるものがある。私たちは泌乳期乳腺組織で遺伝子発現が認められ、他の外分泌腺で重要な役割を果たすことが報告されている (引用) TRPV4 に着目し、乳腺分泌細胞におけるその機能的発現の有無について検討を行った。泌乳期乳腺から分離した乳腺分泌細胞 (またはそれを含む細胞集団) に蛍光指示薬である Fura-2 を導入し、蛍光顕微鏡で観察、撮影しながら、細胞外を 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ を含む緩衝液で灌流した。TRPV4 活性化剤として知られている GSK1016790A (GSK) を添加し、細胞内 Ca²⁺濃度の変化を計測した。細胞集団のうち、細胞体積が大きく主要な細胞である乳腺分泌細胞では、細胞内 Ca²⁺濃度の増加は認められず、乳腺分泌細胞における TRPV4 の機能的発現は示されなかった。一方で、GSK 添加後細胞内 Ca²⁺濃度を増加させる乳腺分泌細胞に付随する小さな細胞を稀に検出した。乳腺上皮細胞は管腔を形成する「管腔上皮細胞」(腺房細胞や導管細胞などの分泌細胞) に加えて、前駆細胞や幹細胞含む「基底上皮細胞」が少数含まれることが知られている。現状では GSK 応答細胞がどのような細胞であるか不明であるが、基底上皮細胞における TRPV4 機能の検証が今後の課題であろう。

(4) 乳中電解質濃度の測定

本研究では単離した新鮮な乳腺分泌細胞を実験に供し生理機能の解析を試みている。本研究では管腔側で機能するであろうイオンチャンネルが研究の対象であるため、管腔側のイオン環境を再現した条件で実験を行う必要がある。乳腺分泌細胞の管腔側とはすなわち乳汁であり、そのイオン組成の解析を行った。まず、泌乳期マウス乳腺導管にカニューレを挿入し、腹腔内または静脈内にオキシトシンを投与して射乳を促し、乳汁を採取する方法を確立した。これまでもマウスの乳中電解質やその他の成分を解析した報告は存在するが、マウスから採取される乳量が少ないため、複数の解析項目のためには、複数乳腺から採取した乳汁を複数個体分ブールして解析する必要があった。私たちが確立した方法では 1 匹の片側の腹部乳腺から 200 μl の乳汁が採取可能なので、複数の電解質濃度を測定することができる。実際に脱脂乳成分を解

析すると、浸透圧は 362 mmol/kgH₂O, Na⁺濃度 20.5 mM, K⁺濃度 61 mM (2 例の平均) であった。乳汁には浸透圧物質としてラクトースが多く含まれるため、一価陽イオン濃度は血中濃度に比べて低値である。また Na/K 比は血中のそれよりも細胞内に近い値をとる。このような電解質組成の形成に研究対象の非選択的陽イオンチャネルが関与しているか、するとすればどのような影響を与えるか、今後さらに検討が必要である。また、将来的には、乳酸生における乳腺分泌細胞イオンチャネルの役割を *in vivo* で証明することが必要になると考えられ、そのためにもここで確立した方法は有用である。

(5)新規 TMEM16A 遺伝子変異体の解析

私たちはこれまでに泌乳期マウスの乳腺分泌細胞に TMEM16A と性質の類似した Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネルが機能していること、TMEM16A タンパク質が分泌細胞の管腔側に局在していることを示した(引用)。近年 TMEM16A は TRP と協調して外分泌腺機能を制御することが報告されている。本研究で研究対象とした非選択的陽イオンチャネルは管腔側での機能が仮定されており、乳腺においても管腔側膜上で機能的にまた物理的に相互作用する可能性がある。興味深いことにマウス乳腺由来の TMEM16A (遺伝子名 Anoctamin1) mRNA の 5' 端配列は既報のいずれのものとも一致しなかった。5' 端の違いは、遺伝子発現誘導に重要なプロモーター配列の違い、また、タンパク質翻訳開始点の違いにつながり、本分子の発現や機能、さらに TRP 分子との相互関係にも影響があると考えられたため、マウス TMEM16A 遺伝子の変異体の解析を実施した。

マウス乳腺由来の TMEM16A 変異体の新規 5' 端配列を同定した (DDBJ, accession No. LC386953)。この変異体は乳腺を含む多くの組織で主要なタイプであり、既知の変異体はオスマウスの精巣など限られた部位でのみ優位な発現を示していた (図 3)。この結果は、TMEM16A が組織特異的な転写調節機構により発現制御を受けていることを示している。また、TMEM16A の新規変異体には既知変異体で知られている翻訳開始点が存在しない。HEK293 細胞を用いて各変異体の強制発現実験を行ったところ、新規変異体や既知変異体の最上流の転写開始点を別のコドンで置換したものは、既知変異体から翻訳されてくる TMEM16A よりも短い N 端構造を有することがわかった (図 3)。

このような組織特異的な発現調節機構や、N 端構造の異なる TMEM16A タンパク質の存在が、乳腺分泌細胞での機能にどのような影響を及ぼすか興味深く、今後さらに検討を進める必要がある。

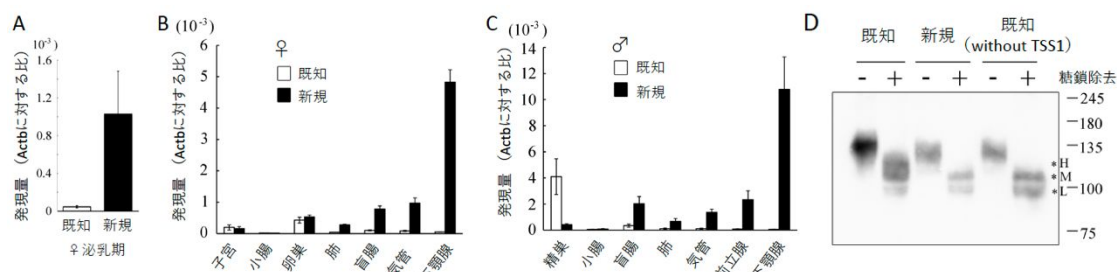


図 3 TMEM16A mRNA 変異体の解析

A. 泌乳期マウスの乳腺における TMEM16A 既知変異体と新規変異体の発現量。B, C. マウス各種組織における TMEM16A 変異体の発現。D TMEM16A 変異体がタンパク質翻訳に及ぼす影響の解析。既知または新規変異体配列を含む発現ベクターを HEK293 細胞に強制発現し、分子量を解析した。糖鎖除去後、既知変異体では H, M, L の 3 つのバンドが認められるが、新規変異体では H バンドが消失している。また既知変異体の最も上流の翻訳開始点 (TSS1) を除去すると、H バンドが消失し、新規変異体と同じパターンのタンパク質発現を示した。

< 引用文献 >

- Linzell JL, Peaker M. Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J Physiol.* 1971;216(3):683-700.
- Kamikawa A, Ishikawa T. Functional expression of a Kir2.1-like inwardly rectifying potassium channel in mouse mammary secretory cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;306(3):C230-40.
- Kamikawa A, Ichii O, Sakazaki J, Ishikawa T. Ca²⁺-activated Cl⁻ channel currents in mammary secretory cells from lactating mouse. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;311(5):C808-C819.
- Derouiche S, Takayama Y, Murakami M, Tominaga M. TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. *FASEB J.* 2018;32(4):1841-1854.

〔雑誌論文〕(計 1件)

Kamikawa, A., Sakazaki, J. and Ichii, O. Tissue-specific variation in 5'-terminal exons of mouse Anoctamin 1 transcript induces N-terminal variation of its protein via alternative translational start sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 503(3): 1710-1715 (2018) DOI:10.1016/j.bbrc.2018.07.103

〔学会発表〕(計 1件)

上川昭博、瀬子純平 マウスを用いた新規 in vivo 実験系によるオキシトシン誘発性射乳反応の解析 (第 161 回日本獣医学会学会 2018 年 9 月)

〔その他〕

DDBJ 塩基配列登録 (accession No. LC386953)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。