

平成21年5月30日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390064
 研究課題名（和文） CLC-5とKCC4による胃プロトンポンプ共役型塩素イオン分泌機構の分子生理
 研究課題名（英文） Molecular Physiological Mechanism of Chloride Ion Secretion by CLC-5 and KCC4 associated with Gastric Proton Pump
 研究代表者
 酒井 秀紀（SAKAI HIDEKI）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授
 研究者番号：60242509

研究成果の概要：胃酸（塩酸：HCl）のプロトン（H⁺）を輸送する蛋白質が、胃プロトンポンプ（H⁺, K⁺-ATPase）であることはよく知られているが、塩化物（塩素）イオン（Cl⁻）を輸送する蛋白質については、これまで確定していなかった。本研究で、Cl⁻輸送蛋白質のKCC4とCLC-5が胃酸分泌機構に関与することを見出した。KCC4は胃酸分泌細胞のアピカル膜で、胃プロトンポンプと共に、空腹時（胃酸分泌休止時）の胃酸分泌に主として関与し、CLC-5は細管小胞膜上で、プロトンポンプと共に、摂食時（胃酸分泌刺激時）の胃酸分泌に関与することがわかり、空腹時と摂食時で異なる胃酸分泌機構が機能していることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	7,400,000	2,220,000	9,620,000

研究分野：分子生理学、生物物理化学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：イオン輸送、蛋白質、胃酸分泌、プロトンポンプ、塩化物イオン

1. 研究開始当初の背景

胃酸（HCl）のH⁺は胃プロトンポンプ（H⁺, K⁺-ATPase）により分泌されるが、塩化物（塩素）イオン（Cl⁻）を輸送する分子実体は何なのか？ 研究開始当初は、塩酸分泌の全容が未解明であった。それまでに米国のグループが、胃酸分泌に関わるCl⁻輸送蛋白質の実体がCLC-2塩化物イオンチャネルであると報告してきたが、我々のグループがCLC-2ではないことを当時に論文発表した。実際、胃酸分泌細胞内のCl⁻濃度が分泌側液中よりか

なり低く、分泌側細胞膜内外の電位差が約10mVであるので、Cl⁻チャネルによって塩化物イオンを分泌することは困難であると考えられた。

我々は、それまでに行った実験結果に基づき、Cl⁻分泌を担う分子実体として2種のトランスポーター、CLC-5（Cl⁻/H⁺交換輸送体）およびKCC4（K⁺-Cl⁻共輸送体）が可能性のある候補蛋白質ではないかと考えた。CLC-5であれば、胃プロトンポンプによるH⁺と共役してCl⁻を分泌することが可能であり、KCC4で

れば、プロトンポンプによる K^+ と共役して Cl^- を分泌することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、CLC-5 および KCC4 による胃プロトンポンプ共役型塩化物イオン分泌の分子生理基盤について研究を進め、胃プロトンポンプ、CLC-5、KCC4 の三者連関による新しい生理機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ブタ胃粘膜標本の分別遠心により、胃細管小胞に富む膜画分 (tubulovesicles = TV) およびアピカル膜に富む膜画分 (stimulation-associated vesicles = SAV) をそれぞれ調製した。

(2) 免疫組織染色には、ラット胃を使用した。摘出した胃組織は Tissue-Tek OTC Compound に包埋し、 $-80^{\circ}C$ で凍結させ、クリオスタットを用いて $8 \mu m$ の厚さの切片を作製した。切片はメタノール固定した。

(3) H^+, K^+ -ATPase 特異的阻害薬の SCH28080 ($10 \mu M$) 感受性 K^+ -ATPase 活性を測定し H^+, K^+ -ATPase 活性とした。またウアバイン ($10 \mu M$) 感受性 K^+ -ATPase 活性を測定し Na^+, K^+ -ATPase 活性とした。

(4) TV または SAV への H^+ 取り込みは、アクリジンオレンジの蛍光の消光反応を測定することで評価した。反応は、ATP ($350 \mu M$) を、反応溶液に加えることで開始した。

(5) KCC4 および H^+, K^+ -ATPase 発現細胞における細胞内 pH は、pH 感受性色素 BCECF の蛍光を測定することで評価した。細胞を、 NH_3/NH_4^+ を含む溶液と Na^+ フリーの溶液とで連続して処理することで、細胞内を酸性化し、細胞内酸性化からの回復をモニターした。

4. 研究成果

(1) H^+, K^+ -ATPase は、ブタ胃粘膜由来の胃細管小胞に富むベシクル (TV) およびアピカル膜に富むベシクル (SAV) の両方に高発現する一方、CLC-5 は TV のみに、KCC4 は SAV のみに高発現していた。免疫沈降実験で、KCC4 と CLC-5 は、それぞれ SAV と TV の H^+, K^+ -ATPase と共沈した。したがって CLC-5 と KCC4 はそれぞれ異なる膜で、 H^+, K^+ -ATPase の機能に関与していることが示唆された。

(2) TV および SAV の膜マイクロドメインについて検討した。 H^+, K^+ -ATPase は SAV において、界面活性剤の CHAPS (0.5-1%) に不溶性およ

び可溶性の両方の画分に局在していたが、TV においては、CHAPS に不溶性の画分にほとんどの H^+, K^+ -ATPase が分布していた。したがって H^+, K^+ -ATPase の存在する場合は SAV の場合は少なくとも 2 種類あり、TV の場合は 1 種類であることが示唆された。

(3) ラット胃腺において CLC-5 と KCC4 は共に、酸分泌能の高い頸部の胃酸分泌細胞に高発現し、酸分泌能の低い深部の胃酸分泌細胞にはほとんど発現していなかった。一方 H^+, K^+ -ATPase は頸部および深部の両方に高発現していた。このことから CLC-5 と KCC4 は胃酸分泌機能に深く関与しているものと考えた。

(4) H^+, K^+ -ATPase を安定発現させた HEK293 細胞に、CLC-5 Tet-on system を導入し、免疫沈降実験を行ったところ、 H^+, K^+ -ATPase と CLC-5 は分子会合していたが、内因性 Na^+, K^+ -ATPase と CLC-5 とは分子会合していないことがわかった。また CLC-5 の発現により、 H^+, K^+ -ATPase の酵素活性は有意に上昇したが、 Na^+, K^+ -ATPase の酵素活性は全く影響を受けなかった。

(5) CLC-5 が高発現している TV において $^{36}Cl^-$ 取り込み実験を行ったところ、ATP の存在下のみに観察される Cl^- の輸送が、 H^+, K^+ -ATPase 特異的阻害薬の SCH28080 によって阻害されることを見出した。また H^+, K^+ -ATPase を安定発現させた HEK293 細胞に予め $^{36}Cl^-$ を取り込ませ、SCH28080 感受性の Cl^- 輸送活性を測定したところ、この細胞に CLC-5 を安定発現させた場合に有意に活性が上昇した。これらの結果から CLC-5 は H^+, K^+ -ATPase にカップリングした Cl^-/H^+ 交換輸送体として機能しているものと考えた。

(6) KCC4 阻害薬の DIOA は、SAV のプロトン輸送活性および H^+, K^+ -ATPase 活性を阻害したが、TV における両活性に影響を与えなかった。このことから KCC4 と H^+, K^+ -ATPase の機能はカップリングしており、興味深いことに二次性能動輸送体 (KCC4) が、一次性能動輸送体 (H^+, K^+ -ATPase) の機能を制御していることが示唆された。

(7) H^+, K^+ -ATPase を安定発現させた HEK293 細胞に、KCC4 Tet-on system を導入し、免疫沈降実験を行ったところ、KCC4 と H^+, K^+ -ATPase は共沈した。KCC4 の発現により H^+, K^+ -ATPase の発現量は変わらなかった。KCC4 発現細胞から調製した膜標品において、 H^+, K^+ -ATPase 活性は変化しなかった。しかし、アンモニウムパルスによる細胞内酸性化からの回復速度を、細胞内 pH 変化を指標に測

定すると、KCC4 発現細胞では、未発現細胞に比べて有意に回復速度が上昇した。上昇した回復速度は KCC 阻害薬の DIOA によって未発現細胞と同レベルにまで抑制された。この結果は、KCC4 の発現により H^+, K^+ -ATPase の H^+ 輸送活性が有意に上昇したことを示しており、KCC4 と H^+, K^+ -ATPase のイオン輸送機能が関連していることが明らかになった。

本研究開始以前には、摂食時（胃酸分泌刺激時）には、胃酸分泌細胞内に存在する細管小胞がアピカル膜に融合し管腔側につながり、細管小胞の胃プロトンポンプによって胃酸が分泌されると考えられており、アピカル膜の諸性質については未解明であった。

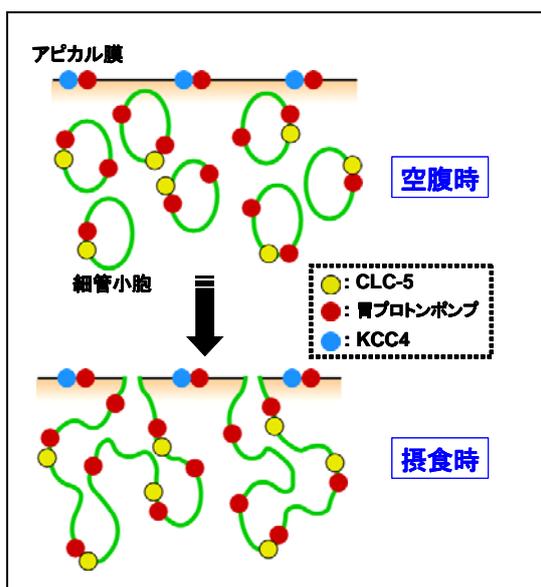


図 1. CLC-5 と KCC4 が関与する胃酸分泌機構のモデル図

本研究により、アピカル膜にも胃プロトンポンプが存在していることが明らかとなり、アピカル膜に胃プロトンポンプと KCC4 の複合体が存在することがわかった（図 1）。一方、細管小胞膜の胃プロトンポンプは CLC-5 と複合体を形成していることがわかった（図 1）。

空腹時（酸分泌休止時）には、細管小胞は細胞内に存在していることから、空腹時の胃酸分泌は、アピカル膜の胃プロトンポンプと KCC4 の複合体により行われていることが示唆される。

現在、消化性潰瘍治療薬としてプロトンポンプ阻害薬（PPI）が使用されているが、PPI は摂食時、空腹時に関係なく胃酸分泌を抑制する。今後、胃の KCC4 を選択的に抑制する薬の開発に向けた研究が進めば、空腹時の胃酸分泌の選択的抑制が可能となることが期待できる。

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）

〔雑誌論文〕（計 18 件）

- ① Fujii T, Takahashi Y, Ikari A, Morii M, Tabuchi Y, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. Functional association between K^+-Cl^- cotransporter-4 and H^+, K^+ -ATPase in the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* 284: 619-629, 2009, 査読有
- ② Watanabe T, Fujii T, Oya T, Horikawa N, Tabuchi Y, Takahashi Y, Morii M, Takeguchi N, Tsukada K, Sakai H. Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells. *J. Physiol. Sci.* 59: 113-122, 2009, 査読有
- ③ Zhou D, Sakai H, et al. (14 名, 8 番目) Synthesis, determination of the absolute stereochemistry, and evaluations at the nicotinic acetylcholine receptors of a hydroxyindolizidine alkaloid from the ant *Myrmecaria melanogaster*. *Heterocycles* 79: 565-571, 2009, 査読有
- ④ Fujii T, Takahashi Y, Itomi Y, Fujita K, Morii M, Tabuchi Y, Asano S, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. K^+-Cl^- cotransporter-3a up-regulates Na^+, K^+ -ATPase in lipid rafts of gastric luminal parietal cells. *J. Biol. Chem.* 283: 6869-6877, 2008, 査読有
- ⑤ Morii M, Yamauchi M, Ichikawa T, Fujii T, Takahashi Y, Asano S, Takeguchi N, Sakai H. Involvement of the $H_3O^+-Lys-164-Gln-161-Glu-345$ charge transfer pathway in proton transport of gastric H^+, K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 283: 16876-16884, 2008, 査読有
- ⑥ Eguchi H, Morii M, Takahashi Y, Sakai H, Nakano M, Ochiai H, Shirahata A, Hara Y, Kawamura M, Takeda K. Functional consequences of various leucine mutations in the M3/M4 loop of the Na^+, K^+ -ATPase α -subunit. *J. Membr. Biol.* 221: 133-140, 2008, 査読有
- ⑦ Ikari A, Sakai H, et al. (10 人, 7 番目) Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphor-protein-mediated pathway. *J. Cell. Physiol.* 214: 221-229, 2008, 査読有

- ⑧ Toyooka N, Sakai H, et al. (14人中6番目) Syntheses of the proposed structures of poison-frog alkaloids 179 and 207E and their inhibitory effects on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Synlett*, 1: 61-64, 2008, 査読有
- ⑨ Fujii T, Ohira Y, Itomi Y, Takahashi Y, Asano S, Morii M, Takeguchi N, Sakai H. Inhibition of P-type ATPases by [(dihydroindenyl)oxy]acetic acid (DIOA), a K^+Cl^- cotransporter inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 560: 123-126, 2007, 査読有
- ⑩ Asano S, Sakai H, et al. (9名, 5番目) L-type amino acid transporter-1 expressed in human astrocytomas, U343MGa. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 415-422, 2007, 査読有
- ⑪ Toyooka N, Sakai H, et al. (11名, 6番目) Synthesis of poison-frog alkaloids 233A, 235U, and 251AA and their inhibitory effects on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 5872-5875, 2007, 査読有
- ⑫ Kobayashi S, Sakai H, et al. (11名, 7番目) Flexible synthesis of poison-frog alkaloids of the 5,8-disubstituted indolizidine-class. II: Synthesis of (-)-209B, (-)-231C, (-)-233D, (-)-235B', (-)-221L, and an epimer of 193E and pharmacological effects at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Beilstein J. Org. Chem.* 3: 30, 2007, 査読有
- ⑬ Sakai H, Suzuki T, Takahashi Y, Ukai M, Tauchi K, Fujii T, Horikawa N, Minamimura T, Tabuchi Y, Morii M, Tsukada K, Takeguchi N. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A_2 . *FEBS Lett.* 580: 3368-3374, 2006, 査読有
- ⑭ Tabuchi Y, Sakai H, et al. (8名, 5番目) Overexpression of Hsp70 partially restores the structural stability and functional defects of temperature-sensitive mutant of large T-antigen at nonpermissive temperature. *Cell Stress Chaperones* 11: 259-267, 2006, 査読有
- ⑮ Tabuchi Y, Sakai H, et al. (6名, 5番目) Genetic networks responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *FEBS Lett.* 580: 3035-3041, 2006,

査読有

[学会発表] (計 68 件)

- ① 森井孫俊, 酒井秀紀: 胃プロトンポンプ阻害剤オメプラゾールとSCH28080は結合ポケットを共有する. 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都府京都市
- ② 藤井拓人, 酒井秀紀: 胃壁細胞アピカル膜の酸分泌機構の分子生理. 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都府京都市
- ③ 藤田恭輔, 酒井秀紀: 酸分泌休止時と刺激時における胃プロトンポンプの性質. 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 京都府京都市
- ④ 酒井秀紀: 胃プロトンポンプの活性調節における膜マイクロドメインの役割. 第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月7日, 北海道札幌市
- ⑤ 降矢裕史, 酒井秀紀: CLC-5 Cl^-/H^+ 交換輸送体と胃プロトンポンプとの機能連関. 第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月7日, 北海道札幌市
- ⑥ 藤井拓人, 酒井秀紀: KCC4が関与する胃酸分泌細胞アピカル膜の K^+ リサイクリング機構. 第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月7日, 北海道札幌市
- ⑦ 高橋佑司, 酒井秀紀: カベオソームとしての胃細管小胞におけるプロトンポンプ活性調節. 第3回トランスポーター研究会年会, 2008年6月7日, 京都府京都市
- ⑧ 森井孫俊, 酒井秀紀: 胃プロトンポンプ電荷異動路の分子動力学シミュレーション. 日本薬学会第128年会, 2008年3月28日, 神奈川県横浜市
- ⑨ Sakai H: Distribution and function of gastric proton pump in tubulovesicle and apical surface membrane of gastric parietal cells. 第85回日本生理学会大会, 2008年3月25日, 東京都新宿区
- ⑩ Fujii T, Sakai H: Functional association of K^+Cl^- cotransporter 4 with gastric H^+, K^+ -ATPase. 第85回日本生理学会大会, 2008年3月25日, 東京都新宿区
- ⑪ Morii M, Yamauchi M, Ichikawa T, Fujii T, Takahashi Y, Asano S, Takeguchi N, Sakai H: Involvement of the H_3O^+ -Lys-164-Gln-161-Glu-345 charge transfer pathway in proton transport of gastric H^+, K^+ -ATPase. 12th International ATPase Conference Na, K-ATPase and Related Transport ATPases of P-type: Structures, Mechanisms, and Roles in Health and Disease, 2008年8月5-10日, Aarhus,

- Denmark
- ⑫ Takahashi Y, Fujii T, Furuya H, Tabuchi Y, Ikari A, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Asano S, Morii M, Takeguchi N, Sakai H: Modulation of Gastric Proton Pump Activity by CLC-5. Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference), 2008年2月22日, Nagoya
- ⑬ 山内理嗣, 酒井秀紀: 胃H⁺, K⁺-ATPaseのプロトン輸送路への変異導入. 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007年11月27日, 宮城県仙台市
- ⑭ 藤井拓人, 酒井秀紀: K⁺-Cl⁻共輸送体KCC4と胃プロトンポンプの機能連関. 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007年11月27日, 宮城県仙台市
- ⑮ 高橋佑司, 酒井秀紀: 胃酸分泌刺激に伴う細管小胞膜の胃プロトンポンプ活性変化のメカニズム. 第54回中部日本生理学会, 2007年10月20日, 三重県津市
- ⑯ 藤井拓人, 酒井秀紀: 胃酸分泌細胞におけるK-Cl共輸送体の発現と生理機能. 日本薬学会第127年会, 2007年3月29日, 富山県富山市
- ⑰ 森井孫俊, 酒井秀紀: 胃プロトンポンプにおける電荷移動と水輸送のカップリング. 日本薬学会第127年会, 2007年3月29日, 富山県富山市
- ⑱ 高橋佑司, 酒井秀紀: 胃プロトンポンプ及びナトリウムポンプに対するCLC-5の機能. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28日, 富山県富山市
- ⑲ Sakai H: Function of K-Cl cotransporters in gastric parietal cells. 第84回日本生理学会大会, 2007年3月20日, 大阪府大阪市
- ⑳ 森井孫俊, 酒井秀紀: 胃プロトンポンプの分子動力学シミュレーション. 第28回生体膜と薬物との相互作用シンポジウム, 2006年11月9日, 静岡県静岡市
- 21 糸見安生, 酒井秀紀: K-Cl共輸送体によるNa, K-ATPase活性の調節機構. 第28回生体膜と薬物との相互作用シンポジウム, 2006年11月9日, 静岡県静岡市
- 22 Morii M, Sakai H: Lumenal gating mechanism of gastric H⁺, K⁺-ATPase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006年6月19日, Kyoto
- 23 Sakai H: Regulation of the gastric H, K-ATPase activity by CLC-5. Molecular Mechanism and Regulation in Cation Transport ATPases and Related Genetic Diseases, 2006年6月18

- 日, Kyoto
- 24 Morii M, Sakai H: Proton pathway of the gastric H⁺, K⁺-ATPase. Molecular Mechanism and Regulation in Cation Transport ATPases and Related Genetic Diseases, 2006年6月16日, Kyoto

〔図書〕(計1件)

- ① 酒井秀紀 (橋本隆男, 佐藤隆司, 豊島聰編), 南江堂, 「疾病と病態生理」改訂第2版, 2006年, 38-41, 45-47頁

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphyl/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 秀紀 (SAKAI HIDEKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号: 60242509

(2) 研究分担者

森井 孫俊 (MORII MAGOTOSHI)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号: 60019130

高橋 佑司 (TAKAHASHI YUJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・助教

研究者番号: 30422629