

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390056

研究課題名（和文） 塩素イオンチャネルのSLC26A7と26A9による新規細胞防御機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of properties of chloride channels, SLC26A7 and 26A9, involved in novel cytoprotective mechanism

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（和文）：胃酸分泌細胞は強酸を分泌するが自己は消化しない。このため胃酸分泌細胞には巧妙な細胞防御機構が備わっているものと考えられ、これまでに我々は細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネルが必須の役割を担っていることを見出している。本研究で、SLC26A7 と SLC26A9 の2種の Cl<sup>-</sup>チャネルの分子生理機能についての解析を行い、SLC26A7 は、細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネルの機能発現に必須の分子であり、SLC26A9 は、酸によって活性化され高浸透圧により抑制される Cl<sup>-</sup>チャネルであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The gastric parietal cell secretes strong acid, but the cell is not digested by acid. Therefore, it is thought that the parietal cell possesses the sophisticated cytoprotective mechanism. So far, we found that function of a cytoprotective Cl<sup>-</sup> channel is essential for the mechanism. In this study, we tried to clarify physiological function of two kinds of Cl<sup>-</sup> channels, SLC26A7 and SLC26A9, in the parietal cell. We found that SLC26A7 is an essential molecule for maintaining the function of cytoprotective Cl<sup>-</sup> channel, and that SLC26A9 is activated by acidic pH and inhibited by hyperosmolality.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野：分子生理学、細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：胃酸分泌細胞、細胞防御、ホメオスタシス、イオンチャネル、塩化物イオン

## 1. 研究開始当初の背景

胃酸分泌細胞は、強酸を分泌し食物を消化するが自己は消化しない。胃酸分泌細胞の寿命は約5カ月であり、表面上皮細胞の寿命（約1週間）よりはるかに長い。このため自身が障害を引き起こしても、すぐに他の細胞に置き換わることができない。したがって胃酸分泌細胞には巧妙な細胞防御機構が備わっているものと考えられる。

我々は以前に、胃酸分泌細胞の基底側膜に非常にコンダクタンスの小さい Cl<sup>-</sup>チャネル（0.3 pS）が多数存在することを見出し（1個の細胞あたり約3万個）、このチャネルが細胞防御機能を有するプロスタグランジン E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）によって活性化され、炎症誘発性のインターロイキン-1β（IL-1β）によって抑制されることを見出した。また、この Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化により胃酸分泌細胞がエタ

ノール傷害から保護され、チャネルの阻害により細胞傷害が増大することを見出した (Sakai ら, J. Biol. Chem., 1995; Sakai ら, Eur. J. Pharmacol., 1998; Sakai ら, J. Physiol., 2003)。このような「細胞防御チャネル」はこれまで報告されていなかった。その後の細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネルの分子実体解明に向けた多角的研究にもかかわらず、未だ確定には至っていない。

Solute Carrier 26 (SLC26) ファミリーは、生理機能の観点から3つのグループに分類されている：(1) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>トランスポーター、(2) Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換輸送体、(3) Cl<sup>-</sup>チャネル (Dorwart ら, Physiology, 2008)。このうち Cl<sup>-</sup>チャネルとして機能する分子は、SLC26A7 と SLC26A9 の2種である。興味深いことに SLC26A7 と SLC26A9 はともに胃酸分泌細胞に発現していることが報告されている。SLC26A7 は、我々が見出した「細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネル」と局在 (基底側膜に存在する) や電気生理学的特徴など類似点が多い。SLC26A9 は、SLC26A7 と局在が異なり、胃プロトンポンプの存在する分泌膜に存在する。したがって胃酸分泌機構への直接的関与が考えられる他、pH や浸透圧変化など過酷な周囲の環境変化から細胞を守るホメオスタシス維持機構に関与している可能性が考えられる。

このような研究背景から、胃酸分泌細胞の細胞防御およびホメオスタシス維持機構に、基底側膜の SLC26A7 と分泌膜の SLC26A9 が関与している可能性が高く、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、胃酸分泌細胞に発現が見出された Cl<sup>-</sup>チャネルの SLC26 ファミリーの SLC26A7 と SLC26A9 に着目し、これらのチャネルが関与する新規の細胞防御機能や、胃酸分泌機構におけるチャネルの役割を分子生理学的に解明することを目的とした。特に、SLC26A7 が「細胞防御 Cl<sup>-</sup>チャネル」である可能性について検証し、細胞防御機能に関与するメカニズムについて明らかにすることを目的とした。また、SLC26 ファミリーの多くが Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換輸送体として機能する一方で、SLC26A7 と SLC26A9 がなぜ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を輸送せず、Cl<sup>-</sup>選択的チャネルとして機能するのかについて、その分子メカニズムの解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) SLC26A7 および SLC26A9 のクローニング

SLC26A7 についてはマウス腎臓組織標本より、SLC26A9 についてはマウス胃粘膜組織標

本より cDNA を調製し、pcDNA3.1、pcDNA4/His または pcDNA6/V5-His ベクターに組み込んだ。SLC26A7 cDNA を pcDNA6/V5-His に組み込む際には、終止コドン TGA のうち GA を欠失させた。パッチクランプ実験用として、GFP と共発現可能な pC1Neo/IRES-GFP に SLC26A7 および SLC26A9 を組み込んだ。

### (2) SLC26A7 および SLC26A9 の培養細胞への強制発現

SLC26A7、SLC26A9 を組み込んだベクターを各細胞にトランスフェクションするには、Lipofectamin 2000 を用いたりポフェクション法で行い、24 時間後の細胞を実験に用いた。プロテアソーム阻害のため、リポフェクションより 21 時間後の細胞に 10 μM ラクタシチンを加え、37°C で 3 時間処理した。

### (3) Western blot

pcDNA4/His に組み込んだ SLC26A7、SLC26A9 の検出には抗 Xpress 抗体を 5,000 倍希釈で使用した。pcDNA6/V5-His に組み込んだ SLC26A7 の検出には抗 V5 抗体を 3,500 倍希釈で使用した。抗 SLC26A7 マウスモノクローナル抗体は、1,000 倍希釈で、二次抗体はいずれも 5,000 倍希釈で用いた。

### (4) 免疫蛍光細胞染色

SLC26A7 または SLC26A9 を発現させた培養細胞は氷冷メタノールで 7 分間処理により固定し、0.3% Triton-X 100, 0.1% BSA を含む PBS を用い、室温で 15 分透過処理を行った。1.5% BSA 溶液によりブロッキングした後、100 倍に希釈した 1 次抗体と 4°C で反応させた。二次抗体には Alexa 488 結合抗マウス IgG 抗体を 100 倍希釈で用いた。免疫蛍光染色像は、Zeiss LSM 510 レーザー共焦点顕微鏡を用い観察した。

### (5) ホールセルパッチクランプ実験

SLC26A7、SLC26A9 発現細胞のホールセル記録は、AxoPatch 200B amplifier を用いて行った。パッチ電極には抵抗が 2-5 MΩ のガラス電極を用いた。データ取得、解析のソフトウェアとして pClamp software (Version 9.0.2; Axon Instruments) を用いた。

### (6) マウス胃傷害モデルの作製

SLC26A7 ノックアウトマウス (SLC26A7-KO) および C57BL/6J ワイルドタイプマウス (WT) を 1 日絶食させ、体重測定後エタノール (99.5%) 5 ml/kg を経口投与した。30 分後に安楽死させ、噴門部結紮した胃を摘出し、幽門部より 2%ホルマリン溶液を 700 μl 注入し結紮した。90 分後、大弯部を切断し、傷害スコアを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) SLC26A7発現細胞の構築のため、マウス腎臓よりクローニングしたSLC26A7 cDNAを組み込んだ3種類のベクターをHEK293およびLLC-PK1細胞に導入したが、いずれの場合もSLC26A7タンパク質の発現は確認されなかった。しかし導入細胞をプロテアソーム阻害薬(ラクタシスチン)で処理すると、SLC26A7タンパク質の発現が観察された。一方、Cos-7細胞に導入した場合、SLC26A7タンパク質の発現が観察されたが、原形質膜には存在せず、細胞内オルガネラに分布していた。これらの結果から、SLC26A7の原形質膜発現のために必要なサブユニットまたは細胞内因子の存在が示唆された。これまでの必須分子の探索では、未だ発見に至っておらず、現在も探索を継続中である。

(2) マウス胃粘膜を超高速振動装置に取り付け、非酵素的に胃腺を単離した。単離胃腺中の胃酸分泌細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、基底側膜に発現するCl<sup>-</sup>チャネル電流の性質を検討した。その結果、マウス胃酸分泌細胞において膜電位と時間に依存しないCl<sup>-</sup>チャネル電流が存在し、Cl<sup>-</sup>チャネル阻害薬のNPPBにより抑制されることがわかった。また、Cl<sup>-</sup>電流は細胞内cGMP濃度上昇により増大した。さらに胃酸分泌細胞内外のCl<sup>-</sup>の濃度勾配を消去することにより、静止膜電位は脱分極側にシフトした。これらの薬理学的および電気生理学的性質は、これまで我々が報告しているウサギ、ラット胃酸分泌細胞基底側膜の細胞防御Cl<sup>-</sup>チャネルの性質と酷似していた。SLC26A7はcGMP依存性Cl<sup>-</sup>チャネルであり、静止膜電位形成に関与している可能性が考えられた。

(3) SLC26A7が胃酸分泌細胞基底側膜の細胞防御Cl<sup>-</sup>チャネルの分子実体である可能性を検証するため、SLC26A7ノックアウトマウス(SLC26A7-KO)と野生型マウス(WT)より、胃腺を単離し、胃酸分泌細胞のホールセルCl<sup>-</sup>電流ならびに静止膜電位をパッチクランプ法により測定した。Cl<sup>-</sup>電流は、KOの方がWTより有意に小さく、膜電位はKOがWTに比べて有意に浅かったが、KOの細胞において、Cl<sup>-</sup>由来成分の完全な消失は認められなかった(図1)。したがってSLC26A7は、細胞防御Cl<sup>-</sup>チャネルと関連して機能する調節分子であり、胃酸分泌細胞の細胞防御機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

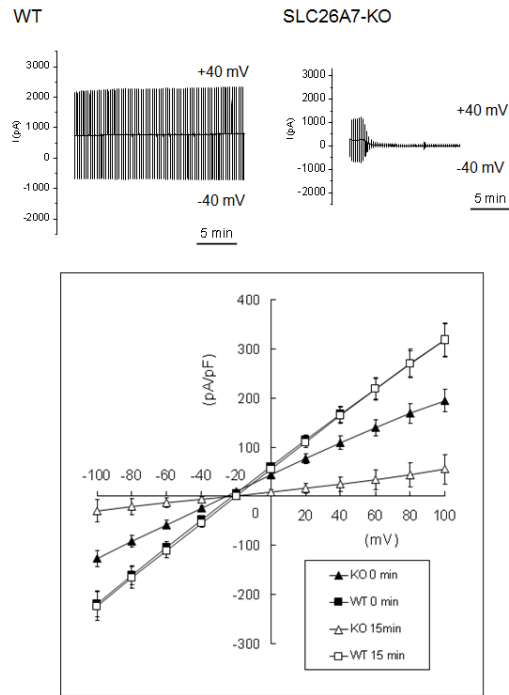


図1. SLC26A7ノックアウトマウス(KO)と野生型マウス(WT)の胃酸分泌細胞のホールセルCl<sup>-</sup>電流の比較

(4) KOおよびWTマウスにエタノールを経口投与し、胃粘膜傷害に対する効果を調べたところ、KOの傷害スコアがWTよりも有意に高かった。組織標本を詳細に顕微鏡観察したところ、KOの細胞傷害の程度はWTに比べ、粘膜深部にまで達しており、多数の胃酸分泌細胞が傷害を受けていた(図2)。

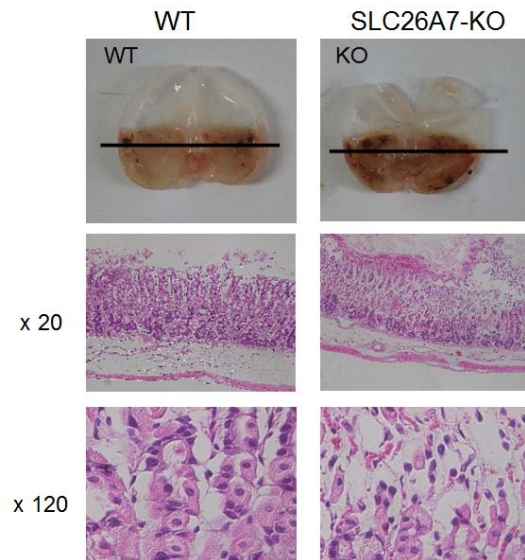


図2. エタノール経口投与によるSLC26A7ノックアウトマウス(KO)と野生型マウス(WT)の胃粘膜傷害の比較

我々はこれまでに、胃酸分泌細胞の細胞防御Cl<sup>-</sup>チャネルの機能を阻害すると、細胞傷害の

程度が有意に増大することを見出していることから、SLC26A7が細胞防御機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) SLC26A9発現細胞構築のため、マウス胃よりクローニングしたSLC26A9 cDNAをLLC-PK1およびCos-7細胞に導入したところ、原形質膜にSLC26A9タンパク質の発現が観察された。ホールセルパッチクランプ法により発現細胞のチャネル電流を測定すると、電流-電圧関係が直線的な膜電流が記録できた。同様な電流は、SLC26A9未発現細胞では見られなかった。低Cl<sup>-</sup>の細胞外溶液を用いると、逆転電位は脱分極側にシフトし、外向き電流も顕著に抑制された。この電流はCl<sup>-</sup>チャネル阻害薬のフルフェナミン酸により有意に抑制された。以上のことから、SLC26A9は電位非依存的なCl<sup>-</sup>チャネルとして機能することがわかった。

(6) SLC26A9発現Cos-7細胞において、細胞外溶液の浸透圧を高張(400-500 mOsm)にすると、SLC26A9由来Cl<sup>-</sup>電流は有意に減少したが、低張(270 mOsm)にしてもCl<sup>-</sup>電流は変化しなかった。このような性質を有するチャネルの報告例はこれまでになく、SLC26A9は胃酸分泌細胞管腔側が高張になった際に、イオン流出を制御し、細胞容積を調節しているものと考えられた。また、細胞外を酸性(pH5-6)にすると、Cl<sup>-</sup>電流の増大が観察されたことから、SLC26A9が胃酸分泌細胞管腔側のpH変化により活性調節を受けている可能性が考えられた。

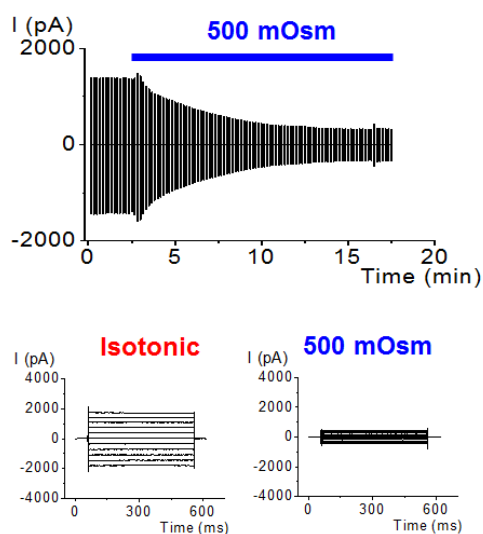


図3. 細胞外高浸透圧によるSLC26A9発現細胞のホールセルCl<sup>-</sup>電流の抑制

(7) H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase安定発現細胞株にSLC26A9のT-RExシステムを導入した細胞において、SLC26A9と胃プロトンポンプ(H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase)が免疫共沈降することを見出した。このことから両者は分子会合しているか近接して存在しているものと考えられた。この細胞で、SLC26A9の発現が胃プロトンポンプ活性に及ぼす効果を検討したが、有意な活性変化は観察されなかった。またH<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseおよびSLC26A7が安定共発現した細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、胃プロトンポンプ特異的阻害薬(SCH28080)の効果を検討したが、SLC26A9電流の有意な変化は観察されなかった。

(8) SLC26A9の各種点変異体を作製し、Cl<sup>-</sup>チャネル機能発現に必須の部位を検討したところ、V397K変異体(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>トランスポーター機能を有するSLC26Aファミリーのアミノ酸残基に置換)において、Cl<sup>-</sup>電流が消失した。したがって397番目のバリン残基が、SLC26Aのチャネルとトランスポーター機能の差異決定に関わる可能性が示唆された。現在、詳細な検討を進めている。

以上のように本研究により、我々は、SLC26A7は、細胞防御Cl<sup>-</sup>チャネルの機能発現に必須の分子であり、SLC26A9は、酸によって活性化され、高浸透圧により抑制されるCl<sup>-</sup>チャネルであることを見出し、胃酸分泌細胞における細胞防御およびホメオスタシス維持機構におけるCl<sup>-</sup>チャネルの新規機能を解明した。

## 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8件)

- ① Fujii T., Minagawa T., Shimizu T., Takeguchi N. and Sakai H.: Inhibition of ecto-ATPase activity by curcumin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Physiol. Sci.* 62: 53-58, 2012, 査読有
- ② Shimizu T., Higuchi T., Fujii T., Nilius B. and Sakai H.: Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 461: 507-513, 2011, 査読有
- ③ Fujii T., Takeguchi N. and Sakai H.: Function of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in

the acid secretory mechanism of gastric parietal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 810-812, 2011, 査読有

- ④ Shibuya K., Fukuoka J., Fujii T., Shimoda E., Shimizu T., Sakai H. and Tsukada K.: Increase in ouabain-sensitive  $K^+$ -ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of  $Na^+, K^+$ -ATPase  $\alpha 3$ -isoform. *Eur. J. Pharmacol.* 638: 42-46, 2010, 査読有
- ⑤ Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takeguchi N. and Sakai H.: The  $NH_2$ -terminus of  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter 3a is essential for up-regulation of  $Na^+, K^+$ -ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399: 683-687, 2010, 査読有
- ⑥ Zhou D., Toyooka N., Nemoto H., Yamaguchi K., Tsuneki H., Wada T., Sasaoka T., Sakai H., Tezuka Y., Kadota S., Jones T.H., Garraffo H.M., Spande T.F. and Daly J.W.: Syntheses, determination of the absolute stereochemistry, and evaluations at the nicotinic acetylcholine receptors of a hydroxyindolizine alkaloid from the ant *Myrmecaria melanogaster*. *Heterocycles* 79: 565-571, 2009, 査読有

[学会発表] (計 48 件)

- ① Sakai H.:  $Cl^-$  transporting mechanisms in gastric acid secretion. 22ème colloque Canaux ioniques Presqu'île de Giens (22nd Ion Channel Meeting), 2011 年 9 月 26 日, Giens, France. (招待講演)
- ② 清水貴浩, 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: SLC26A9  $Cl^-$  チャネルの浸透圧感受性. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011 年 11 月 25 日, 岡山県岡山市.
- ③ 酒井秀紀: 胃酸分泌細胞のトランスポーター. 第 1 回がんイオノミクス研究会, 2011 年 11 月 5 日, 京都府京都市.
- ④ Sakai H.: Transporters and ion channels in gastric acid-secreting cells. Italy/Japan Joint Meeting on Cancer Research, 2011 年 11 月 4 日, Kyoto. (招待講演)
- ⑤ 清水貴浩, 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: SLC26A9  $Cl^-$  チャネルの細胞容積変化による調節. 第 58 回中部日本生理学会大会, 2011 年 11 月 2 日, 福井県福井市.
- ⑥ Fujita K., Shimizu T., Futatsuya A.,

Fujii T., Takeguchi N. and Sakai H.: Electrophysiological properties of  $Cl^-$  channels in the basolateral membrane of parietal cells in isolated gastric glands of mice. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, 2011 年 7 月 31 日, Tokyo.

- ⑦ 藤田恭輔, 清水貴浩, 二谷章大, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞における基底側クロライドチャネルの電気生理学的性質. 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 28 日, 神奈川県横浜市.
- ⑧ 藤田恭輔, 清水貴浩, 二谷章大, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞に発現する SLC26  $Cl^-$  チャネルの電気生理学的性質. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010 年 11 月 30 日, 富山県富山市.
- ⑨ 酒井秀紀, 藤田恭輔, 家原貴大, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃: 胃プロトンポンプと  $K^+$ - $Cl^-$  共輸送体のラフトを介した機能連関. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010 年 11 月 30 日, 富山県富山市.
- ⑩ 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: 非酵素的に単離したマウス胃腺の酸分泌細胞における塩素イオンの膜電位に対する役割. 第 87 回日本生理学会大会, 2010 年 5 月 21 日, 岩手県盛岡市.
- ⑪ 酒井秀紀, 藤田恭輔, 家原貴大, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃: Function of proton pump in the lipid raft of the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2009 年 12 月 1 日, 大阪府吹田市.
- ⑫ 酒井秀紀, 藤田恭輔, 家原貴大, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃: 脂質ラフトが関与する胃酸分泌調節機構. 生理研研究会「上皮組織における細胞外環境感受機構」, 2009 年 11 月 10 日, 愛知県岡崎市.
- ⑬ Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takahashi Y., Tabuchi Y., Morii M., Takeguchi N. and Sakai H.:  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter-4 associated with  $H^+, K^+$ -ATPase is involved in the mechanism of HCl secretion in the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. "Physiology of Anion Transport" and "Cell Volume Regulation" (PAT-CVR 2009), 2009 年 8 月 5 日, Okazaki.
- ⑭ Fujii T., Takahashi Y., Ikari A., Tabuchi Y., Morii M., Takeguchi N.

and Sakai H.: Function of KCC4 in the apical membrane of gastric parietal cells. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009年7月30日, Kyoto.

- ⑮ Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takahashi Y., Tabuchi Y., Morii M., Takeguchi N. and Sakai H.: Gastric proton pump activity is regulated by K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter-4 in the apical canalicular membrane of parietal cells. JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit, 2009年7月24日, Morioka.

[図書] (計3件)

- ① 酒井秀紀: 消化器疾患, 消化器系. 疾病と病態生理, 豊島聰監修, 39-55, 南江堂, 東京, 2012.
- ② 酒井秀紀: 悪性腫瘍, 食道がん, 胃がん, 大腸がん. 疾病と病態生理, 豊島聰監修, 395-405, 南江堂, 東京, 2012.
- ③ 酒井秀紀, 藤井拓人: 胃酸分泌細胞のトランスポートソーム. 「トランスポートソームの世界 - 膜輸送研究の源流から未来へ」, 金井好克, 竹島 浩, 森 泰生, 久保義弘編, 343-350, 京都廣川書店, 東京, 2011.

[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

清水 貴浩 (SHIMIZU TAKAHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
准教授

研究者番号: 40353437

藤井 拓人 (FUJII TAKUTO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教

研究者番号: 50567980

(H22→H23)