

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659094

研究課題名(和文)起電性ナトリウム重炭酸イオン共輸送体の機能多様性をつくりだす分子機構解明に向けて

研究課題名(英文)Towards better understanding of the molecular mechanisms of functional diversity of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter

研究代表者

石川 透 (Ishikawa, Toru)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：70249960

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)：本研究課題では様々な組織や細胞における起電性ナトリウム重炭酸イオン共輸送体(NBCe1-B)機能活性の多様性を作り出す分子機構解明に向けた研究を行った。NBCe1-B分子発現系による実験では、細胞内pHの変動が細胞内Mg²⁺を介するNBCe1-B機能制御機構に影響する可能性が示唆された。またウシ耳下腺腺房細胞に内因性に発現するNBCe1-B調節に関して、細胞外pH環境の変動に連動して変化するようなK⁺電流による膜電位変動やTRPM6/7様陽イオンチャネルなどの関与の可能性を少なくとも否定しない結果が得られた。これらの知見はNBCe1-B機能調節の多様性解明に重要な手掛かりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The main aim of this project was to gain some clues as to the cellular and molecular mechanisms of functional diversity of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1-B observed in various native tissues and cell types. Using a heterologous mammalian expression system, H⁺ was suggested to be a cytosolic factor that might modify the intracellular Mg²⁺-sensitivity of NBCe1-B. Studies on ion channels in bovine parotid acinar cells endogenously expressing NBCe1-B may raise the possibilities that pH-sensitive K⁺ currents and TRPM6/7-like cation channel activity might be involved, at least in part, in regulation of NBCe1-B in these cells. The data obtained in this project will be useful for future studies to better understand regulatory mechanisms of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter activity in intact cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：起電性ナトリウム重炭酸イオン共輸送体 pH マグネシウムイオン カリウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

起電性 $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体(NBCe1)は $1\text{Na}^+:2$ または 3HCO_3^- の輸送比率を持つトランスポーターであり、主要なスプライズバリエーションとして NBCe1-A、-B、-C の存在が知られている。NBCe1 は非常に長い N 末端を細胞内領域に持つが、NBCe1-B(および-C) の N 末端は NBCe1-A と異なる構造をもつ。この NBCe1-B(および-C) 特異的 N 末端($N_{\text{NBCe1-B}}$)領域は“自己機能抑制ドメイン”と呼ばれ、intrinsic な共輸送体活性を抑制していると考えられているが (McAlear *et al.*, 2006)、その抑制機構については未だ不明のままである。一方、NBCe1-B 活性は(1)細胞内 Mg^{2+} 濃度依存性(ATP 非存在下)に抑制され(K_i 値が約 0.01mM、生理的細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度(0.5-1mM) (Romani, 2007) では完全抑制の状態)、(2) $N_{\text{NBCe1-B}}$ 領域を除去すると Mg^{2+} に対する感受性が大きく低下し(K_i 値が約 0.3mM)、(3) Mg^{2+} 抑制効果は電位依存性を示さず、多価陽イオン(ネオマイシン等)により模倣できる (Yamaguchi & Ishikawa, 2008) ことから、細胞内 Mg^{2+} は静電的メカニズムを介して $N_{\text{NBCe1-B}}$ 領域(高感受性領域)および未同定の細胞内領域(低感受性領域)に作用し、直接的または間接的に共輸送体活性を制御している可能性がある。さらに、上記のように異所性に発現させた野生型 NBCe1-B 電流と比べ、単一ウシ耳下腺腺房細胞(以下 BPA 細胞)で観察される内因性 NBCe1-B 電流の細胞内 Mg^{2+} 感受性は非常に低く(K_i 値が約 1mM) (Yamaguchi & Ishikawa, 2008) 生理的な細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度条件下で観察される非常に大きな起電性共輸送活性(200 ~ 300pA at 0mV) (Yamaguchi & Ishikawa, 2005) を良く説明する。また、研究代表者の研究グループは BPA 細胞におけるこの Mg^{2+} 感受性シフトは細胞内蛋白との相互作用により引き起こされている可能性を示唆する研究結果を得ていた(研究開始当初は未発表であったが、その後公表された: Yamaguchi & Ishikawa, 2012、

Yamaguchi & Ishikawa, 2014)。

2. 研究の目的

NBCe1 は腎臓、消化管、外分泌腺を構成する上皮細胞やその他多くの興奮性および非興奮性細胞に広く分布し、細胞内 pH 調節、上皮性 HCO_3^- 輸送および体液の酸塩基バランスに重要な役割を果たしているが、その native 組織・細胞間で認められる共輸送体機能活性の多様性をくりだす分子機構はよく理解されていない。上記のような背景のもとに、本研究代表者は(1)“細胞内 Mg^{2+} 抑制からの回避機構または増強機構の獲得が native 組織・細胞で認められる NBCe1 活性の多様性を決める重要な要因となっている”可能性や(2) BPA 細胞において NBCe1-B が置かれている膜近傍の細胞内外環境およびそれらを作り出す膜輸送蛋白機能に着目することにより、NBCe1-B 機能多様性を作り出す仕組みの一端を明らかにできるかもしれないと考えている。そこで本研究では NBCe1 の細胞内ドメインにその存在が想定される Mg^{2+} 感受性機能制御機構解明の手がかりを得るために、NBCe1-B の Mg^{2+} 感受性に対する細胞内 pH の影響について検討するとともに、BPA 細胞に内因性に発現する NBCe1-B 機能に影響を与える因子、特に膜電位や細胞内 Mg 環境に関与する可能性があるイオンチャネル機能についても検討した。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞を用いた異所性強制発現系による実験

実験には以前の報告 (Yamaguchi & Ishikawa, 2008) と同様に、pIRES2-EGFP にサブクローニングしたウシ耳下腺細胞由来 NBCe1-B (Accession No. AB436382) (Yamaguchi & Ishikawa, 2005) とネガティブコントロールとしてベクター (pIRES2-EGFP) のみをそれぞれ一過性にトランスフェクションした HEK293 細胞を使用

した。NBCe1-B 活性に起因する膜電流の測定には whole-cell パッチクランプ法を用いた。膜電流の測定は Axopatch-1D パッチクランプ増幅器及び Digidata 1200 を使用した。pCLAMP6 ソフトウェアの CLAMPEx を用いて voltage-step-pulse プロトコール、voltage-ramp-pulse プロトコール及びデータの取り込みを制御し、保持電位は -80mV とし、-100mV から +50mV までのコマンド電位に対する応答電流を step-pulse プロトコールまたは ramp-pulse プロトコールを用いて測定した。NBCe1-B 電流の細胞内 Mg^{2+} 依存性に関する実験において、 Mg^{2+} の抑制定数は Hill の式でフィッティングにより求めた。今回の研究では毎回の実験ごとに、遊離 Mg^{2+} 濃度がゼロのピペット溶液で得られた電流値を膜容量で割った電流密度 (pA/pF) を 1 とし、異なる遊離 Mg^{2+} 濃度のピペット溶液で得られた電流密度を標準化し細胞内 Mg^{2+} 感受性を評価した。実験には以下の溶液を使用した。標準細胞外溶液 (mM, pH 7.4: NaOH で適定): NaCl 145, KCl 5, HEPES 10, D-glucose 10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1。NBCe1-B 電流測定時の細胞外液 (mM, pH 7.4: NMDG で適定): Na-glutamate 145 または 120, HEPES 10, $NaHCO_3$ 0 または 25, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1。NBCe1-B 電流測定時に細胞外液 Na^+ 除去の効果を調べる際には Na-glutamate および $NaHCO_3$ をそれぞれ NMDG-glutamate と Choline- HCO_3 で置換した。また、 HCO_3 を含む溶液は 5% CO_2 /95% O_2 で、 HCO_3 を含まない溶液は 100% O_2 でそれぞれ通気し使用した。標準ピペット溶液 (mM, pH7.4: NMDG で適定): Na-glutamate 2, NMDG-glutamate 36 ~ 48, NMDG-Cl 0 ~ 15, BAPTA 10, HEPES 100, EDTA-2Na 4, $CaCl_2$ 0.0439 ~ 0.202, $MgCl_2$ 0 ~ 8.04。アルカリ pH7.8 ピペット溶液 (mM, pH7.8: NMDG で適定): Na-glutamate 2, NMDG-glutamate 36 ~ 43, NMDG-Cl 5 ~ 15, BAPTA 10, HEPES 100, EDTA-2Na 4, $CaCl_2$

0.0494 ~ 0.428, $MgCl_2$ 0 ~ 5.31。遊離 Ca^{2+} および Mg^{2+} は Maxchelator (WEBMAXC STANDARD プログラム) を用いて計算し、 $pCa^{2+} = 9$ 、 $pMg^{2+} = 0 \sim 2.5$ の範囲で設定した。

(2) BPA 細胞を用いた実験

北海道帯広食肉衛生検査所および北海道畜産公社道東事業所十勝工場のご協力により、屠畜されたウシから採取した耳下腺組織を用いて BPA 細胞標本を以前の研究報告 (Yamaguchi & Ishikawa, 2005) と同様に作製した。膜電流と膜電位測定および単一イオンチャンネル電流は EPC7plus パッチクランプ増幅器と powerlab2/26 または Axopatch-1D パッチクランプ増幅器と Digidata 1200 を用いて、whole-cell パッチクランプ法の電圧固定モードと電流固定モードまたは cell-attached モードでの単一チャンネル記録法により測定した。実験に使用した細胞外溶液の組成は以下の通りであった。pH 感受性 K^+ 電流測定: ピペット溶液 (mM, pH7.4): K-glutamate 120, KCl 10, HEPES 10, EGTA 10, $MgCl_2$ 1。標準細胞外溶液 (mM, pH 7.4): NaCl 145, KCl 5, HEPES 10, D-glucose 10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1。細胞外液 (pH 5.5 ~ 8.4: NaOH または H_2SO_4 で適定): Na-glutamate 135, K-glutamate 5, HEPES または MES 10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1, TEACl 10。細胞内 Na^+ 濃度依存性 K^+ 電流測定: ピペット溶液 (mM, pH7.4: KOH で適定): K-glutamate 80, Na-glutamate 0 ~ 50, NMDG-glutamate 50 ~ 0, HEPES 10, EGTA 10, $MgCl_2$ 1。細胞外液 (mM, pH7.4: NaOH で適定): Na-glutamate 145, K-glutamate 5, HEPES 10, D-glucose 10, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1。Cell-attached patch モードにおける膜電位変動測定実験: ピペット溶液 (mM, pH7.4): KCl 130, HEPES 10, EGTA 10, $MgCl_2$ 1 または K-glutamate 120, KCl 10, HEPES 10, EGTA 10, $MgCl_2$ 1。細胞外溶液 (mM, pH 7.4): Na-glutamate 120, K-glutamate 5, $NaHCO_3$ 25, HEPES 10, $MgCl_2$ 0 or 1, $CaCl_2$ 0 or 1, EGTA

0.1 or 0, EDTA 1 or 0 または Na-glutamate 145, K-glutamate 5, HEPES 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, D-glucose 10 or 0. Na 置換実験では Na の代わりに NMDG または choline を用いた。

4. 研究成果

(1) NBCe1-B の細胞内 Mg²⁺感受性に対する細胞内 pH の影響

Mg²⁺を含まないピペット溶液を用いて GFP シグナル陽性細胞を -80mV に電位固定したとき、HCO₃⁻/CO₂ を含まない細胞外液中では step-pulse または ramp-pulse のどちらの電位固定プロトコールによっても明らかな膜電流は観察されなかったが、HCO₃⁻/CO₂ を含む細胞外液に交換すると、ほぼ直線の電流 電圧関係 (I-V 関係) を有する膜電流が観察された。得られた I-V 関係は step-pulse または ramp-pulse のどちらの電位固定プロトコールによっても差はなかった。しかし、無処置の HEK293 細胞、pIRES2-EGFP (ベクターのみ) をトランスフェクションし、GFP シグナルが観察された HEK293 細胞、NBCe1-B/pIRES2-EGFP ベクターをトランスフェクションしたが GFP シグナルが観察されなかった HEK293 細胞では、有意な HCO₃⁻/CO₂ 誘発性膜電流は観察されなかった。また、HCO₃⁻/CO₂ 誘発性膜電流は細胞外 Na⁺除去および細胞外液への DIDS (0.5mM) 添加により大きく抑制されたことから、HCO₃⁻/CO₂ 誘発性膜電流が強制発現させた NBCe1-B 共輸送活性に起因することを確認した。次に細胞内 Mg²⁺による抑制効果を解除した状態 (Mg²⁺を含まないピペット溶液) で、NBCe1-B 共輸送電流に対する細胞内 pH アルカリ化の効果を調べた。異なる細胞の細胞内環境をそれぞれ pH7.4 と pH7.8 のピペット溶液で制御した時、-100mV から +50mV までの ramp-pulse に対する応答電流の電流密度 電圧関係は同様な挙動を示した。また、リーク電流の関与が最低限となる 0mV での NBCe1-B 電流密度の平均値にも差

は認められなかった。次に、ピペット溶液 (pH 7.4、遊離 Mg²⁺濃度 0 ~ 10^{-2.5} M) とピペット溶液 (pH 7.8、遊離 Mg²⁺濃度 0 ~ 10⁻³ M) で得られた HCO₃⁻/CO₂ 誘発性膜電流の細胞内 Mg²⁺感受性を比較したところ、後者の細胞内 Mg²⁺感受性が増加していた。従って、細胞内 pH の変動が NBCe1-B の細胞内 Mg²⁺感受性に影響を与える因子の一つである可能性がある。

(2) BPA 細胞の細胞内外環境変動とリンクした NBCe1-B 機能調節機構の可能性に関する検討

細胞外 pH 感受性バックグラウンド K⁺ (K_{pH}) 電流の存在とその pH 応答性
NBCe1-B を介する細胞内への HCO₃ 流入量は膜電位により影響を受ける。そこで無刺激時の BPA 細胞において K_{pH} 電流が生理的な細胞外 pH で観察されるか否かについて調べるため、K_{pH} 電流の詳細な細胞外 pH 応答性について検討した。無刺激時の細胞内 Ca²⁺環境を模倣する実験条件において、内向き整流性 Kir2.1 様電流と外向き整流性 Maxi-K⁺電流の存在のみがこれまでの研究でわかっている (Hayashi *et al.*, 2004)。今回、Maxi-K⁺電流を TEA により抑制しても観察される外向き K⁺電流の存在を確認した。この外向き電流は KCa3.1 様チャンネルブロッカーであるクロトリマゾールでは抑制されなかった。また、TEA 存在下で観察される外向き電流の pH 感受性を解析するために pH5.5 から 8.4 に調整した細胞外液を用いて膜電流を計測したところ、Kir2.1 電流は pH による影響を受けなかったが、外向き電流は細胞外 pH の酸性化で抑制され、アルカリ化で増強された。これらの結果から、(i) BPA 細胞には細胞外 pH によって変化する K⁺電流が存在すること、(ii) その K⁺電流は生理的な pH の範囲で変化することが明らかとなった。この K_{pH} 電流は細胞外 Ba²⁺に感受性を有していたが、その Ba²⁺感受性は Kir2.1 の Ba²⁺感受性より低かった。さらに、電流固定下で観察される膜電位の維持には

Ba²⁺感受性のK_{pH}電流が関与していることが示唆された。また、これらの結果は cell-attached patch モードにおける Maxi-K⁺チャネルの逆転電位を膜電位プローブとして測定した無刺激時の静止膜電位が細胞外 pH 依存して変化するという結果とも矛盾しない。従って、K_{pH}電流が BPA 細胞における NBCe1-B 活性に影響を与える因子となりうる可能性が残る。

細胞内 Na⁺依存性 K⁺電流の存在の有無に関する検討

NBCe1-B 活性に依存して細胞内（膜近傍）Na⁺変動により誘発される K⁺電流の有無について非刺激時の BPA 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し検討したが、少なくとも適用した実験条件下（K⁺チャネルブロッカー存在下または非存在下）では細胞内 Na⁺濃度の増加に伴う K⁺電流密度の顕著な増加は生理的膜電位の範囲内では観察されなかったことから、非刺激時の BPA 細胞には細胞内 Na⁺濃度増加により誘発されるような K⁺電流は生理的膜電位において存在しない可能性が高く、少なくとも NBCe1-B 活性に影響を与える因子となるとは考えられない。

Mg²⁺および H⁺流入経路としての TRPM6/7 様チャネルを介した NBCe1-B 活性調節の可能性に関する検討

本研究代表者の研究グループによるこれまでの研究により、BPA 細胞に TRPM6 または TRPM 7（TRPM6/7）様非選択的陽イオンチャネルが機能発現している証拠を得ている。一般的に TRPM6/7 様チャネルは Mg²⁺を含む 2 価陽イオン透過性だけでなく、プロトンを含む一価陽イオンに対する透過性を有することが知られているため (Fleig & Chubanov, 2014)、NBCe1-B 共輸送活性に機能的 impact を持つ可能性がある。そこで生理的膜電位且つ細胞外 2 価陽イオン非存在下において、TRPM6/7 様チャネルが Na⁺などの一価陽イオンを透過するという性質 (Fleig & Chubanov,

2014) を利用し、intact な BPA 細胞内環境下における TRPM6/7 様チャネル活性の有無について検討した。上記と同様に cell-attached patch モードで測定した膜電位変化を指標に実験を行ったところ、TRPM6/7 様チャネルまたはそれと同様な性質を有するコンダクタンスが活性を有する可能性を示唆する結果が得られた。従って、BPA 細胞に機能発現する TRPM6/7 様チャネル活性が NBCe1-B 機能を間接的に調節する可能性を否定しない。

今後、これらの研究成果をもとに NBCe1-B 機能多様性の解明に向けてさらなる研究を進めたいと考えている。

引用文献

McAlear SD, Liu X, Williams JB, McNicholas-Bevensee CM, Bevensee MO., *J. Gen Physiol*, 127(6):639-58, 2006

Romani AM., *Arch. Biochem. Biophys.* 458(1):90-102, 2007

Hayashi M, Komazaki S, Ishikawa T., *J. Physiol.* 547(1):255-269, 2004

Yamaguchi S, Ishikawa T., *J. Physiol.* 568(1):181-197, 2005

Yamaguchi S, Ishikawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376(1):100-104, 2008

Yamaguchi S, Ishikawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424(3):433-438, 2012

Yamaguchi S, Ishikawa T., *FEBS Lett.* 588(5):672-677, 2014

Fleig A, Chubanov V., *Handb Exp Pharmacol.* 222:521-546. 2014

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 透 (ISHIKAWA, Toru)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：24659094

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

小寺 明 (KOTERA, Akira)

帯広畜産大学・畜産学部・学生

鎌田 拓郎 (KAMADA, Takuro)

帯広畜産大学・畜産学部・学生

新居 剛 (NII, Takeshi)

帯広畜産大学・畜産学部・学生