

博士論文

胃プロトンポンプの活性調節機構と
大腸がんに関与するイオン輸送タンパク質の研究

2016 年度

高橋 佑司

【目次】

序論	1
第一部 胃プロトンポンプと ClC-5 クロライド-プロトン交換輸送体の機能カップリング	5
実験方法	8
結果	14
考察	18
図	21
第二部 胃酸分泌細胞に発現する分子シャペロン ERp57 による H ⁺ ,K ⁺ -ATPase 活性の調節	40
実験方法	43
結果	47
考察	50
図	52
第三部 細胞容積調節性アニオンチャネル阻害剤である DCPIB による胃 H ⁺ ,K ⁺ -ATPase の阻害	65
実験方法	68
結果	71
考察	73
図	75
第四部 ヒト結腸・直腸における非胃型プロトンポンプ ATP1A1 の発現	83
実験方法	85
結果考察	87
図	89
第五部 トロンボキサン A ₂ で誘導される大腸がん細胞増殖には Kv7.1 チャネルのアップレギュレーションが関与している	93
実験方法	96
結果	99
考察	101
図	104

総括	110
参考文献	112
本論文に使用した論文リスト	128
謝辞	129

【序論】

胃や腸などの消化管は、浸透圧変化や pH 変化等の激しい外的環境に曝されている。胃では細菌感染防御や食物消化のため、胃酸 (HCl) やペプシンが分泌され、大腸では水分・塩分の吸収が行われており、これら組織においてはイオン輸送タンパク質の機能が重要である。

胃酸は胃酸分泌細胞から胃の内腔に分泌される。胃酸の H⁺分泌を担っているのは胃プロトンポンプ (H⁺,K⁺-ATPase) で、胃酸分泌細胞の頂端膜と細管小胞膜の両方に存在している。酸分泌休止時における基礎胃酸分泌は、頂端膜の H⁺,K⁺-ATPase によって行われている。一方、酸分泌刺激時においては、細胞内の細管小胞が互いに融合し、頂端膜に連結し、細管小胞と頂端膜の両方の H⁺,K⁺-ATPase により大量の胃酸が分泌される。刺激状態でも、細管小胞と頂端膜は、混ざり合わず、互いに独立しているものと考えられている。他方、胃酸の Cl⁻分泌を担う膜輸送タンパク質については、基礎胃酸分泌に関しては頂端膜における KCC4 が、酸分泌刺激時に関しては細管小胞に存在する CFTR、SLC26A9、CLIC-6 などの候補分子が報告されているが、胃酸分泌機構の全容は未だ明らかになっていない (図 I)。

近年、大腸がんの死亡者数は増加の一途にあり、特に女性では、2014 年の死亡率が第一位となっている (図 II)。K⁺チャネルは、がんのバイオマーカー及びがん治療のための標的分子の一つとなり得る可能性が考えられており、大腸がんにおいても、いくつかの電位依存性 K⁺チャネルの病態生理学的な機能が報告されている。

本論文では、胃酸分泌細胞の細管小胞と頂端膜の酸分泌メカニズムの差異に着目して H⁺,K⁺-ATPase の機能に関連するタンパク質の解明を目指し、第一部から第三部の研究を行った。また、第四部と第五部では、新たな大腸がん治療につながる基礎研究として、それぞれ機能未知の非胃型プロトンポンプ ATP1A1 と K⁺チャネルの Kv7.1 (KCNQ1) に着目した研究を行った。

第一部では、胃プロトンポンプ (H⁺,K⁺-ATPase) と Cl⁻/H⁺交換輸送体 ClC-5 が、胃酸分泌細胞の細管小胞において共役し、ClC-5 が胃酸 (HCl) 分泌の Cl⁻輸送タンパク質として機能するとともに、H⁺,K⁺-ATPase 活性を上昇させていることを見出した。

第二部では、分子シャペロン ERp57 が、胃酸分泌細胞の頂端膜において、シャペロン機能とは異なるメカニズムで、胃 H⁺,K⁺-ATPase 活性を上昇させることを見出した。

第三部では、細胞容積調節性アニオンチャネル (VRAC) の特異的阻害剤として知られている DCPIB が、胃 H⁺,K⁺-ATPase 活性を直接的に抑制することを見出した。

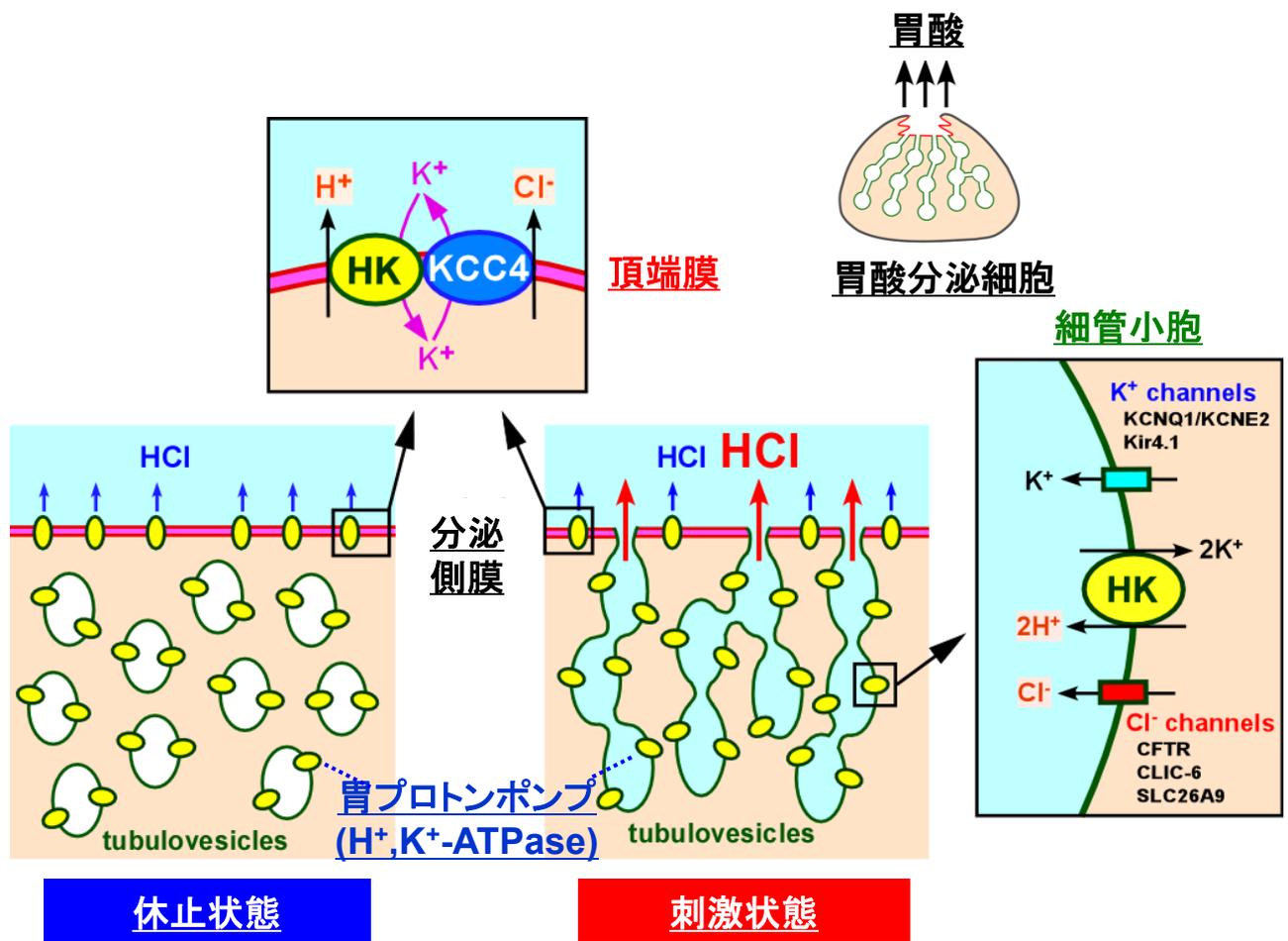
第一部から第三部の結果より、細管小胞膜では ClC-5 が H⁺,K⁺-ATPase と機能連関することで、酸分泌刺激時の酸分泌を担っていること、また、ERp57 が頂端膜において H⁺,K⁺-ATPase と分子会合し、H⁺,K⁺-ATPase 活性を正に調節することで、酸分泌休止時における基礎分泌を制御していることを見出した。これらの研究成果は、細管小胞と頂端膜における異なる酸分泌調節メカニズムを明確に示したものである。

第四部では、胃 H^+,K^+ -ATPase と相同性が約 60%の P 型 ATPase である ATP1AL1 が、大腸がん組織並びに大腸がん細胞において高発現していることを見出した。

第五部では、大腸がん細胞において、トロンボキサン合成酵素が高発現し、トロンボキサン A_2 が細胞増殖を促進することが見出されていたが、このメカニズムの下流に K^+ チャンネルである Kv7.1 (KCNQ1) の過剰発現が関与していることを見出した。

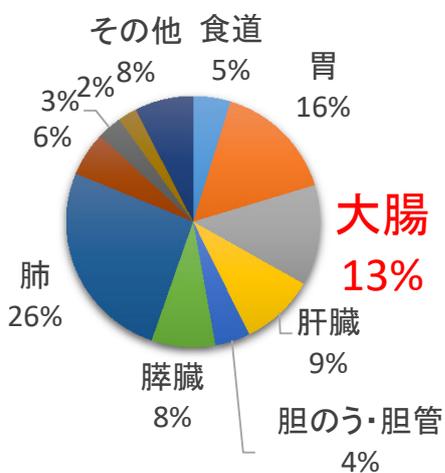
第四部および第五部より、大腸がんにおいて異常に高発現する分子として ATP1AL1 および Kv7.1 を新たに見出した。ATP1AL1 や Kv7.1 は、大腸がんの新たなバイオマーカーもしくは治療標的になる可能性が考えられる。

以下、これらの点について、五部に渡って詳述する。

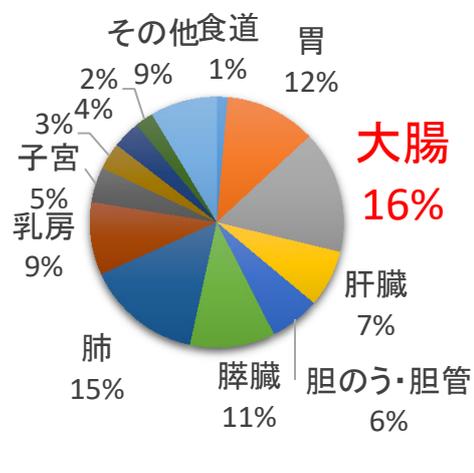


図I 胃酸分泌細胞の形態変化および酸分泌関連タンパク質

男性



女性



図II 日本人のがん部位別死亡割合

2014年における大腸がんによる死者数は、男性では、肺、胃について第3位、女性では、第1位である（日本対がん協会より改）。

第一部

胃プロトンポンプと ClC-5 クロライド-プロトン交換輸送体の 機能カップリング

【要約】

クロライド-プロトン交換輸送体 ClC-5 と液胞型 H⁺-ATPase は、腎近位尿細管におけるエンドソームの酸性化に重要であることが報告されている。本研究では、ClC-5 が胃腺の管腔側において積極的に胃酸分泌を行う胃酸分泌細胞（胃壁細胞）に発現し、胃プロトンポンプ（H⁺,K⁺-ATPase）が豊富に発現している細管小胞に部分的に局在していることを見出した。ClC-5 は、細管小胞のライセートにおいて、H⁺,K⁺-ATPase と免疫共沈降した。小胞への ATP 依存的 ³⁶Cl 取り込みが H⁺,K⁺-ATPase 阻害剤の SCH28080 によって消失したことにより、ClC-5 の機能的発現が示された。ClC-5 のテトラサイクリン発現誘導システムを導入した H⁺,K⁺-ATPase 安定発現 HEK293 細胞において、ClC-5 は H⁺,K⁺-ATPase と免疫共沈降したが、内因的 Na⁺,K⁺-ATPase とは免疫共沈降しなかった。SCH28080 感受性 ³⁶Cl 輸送活性は、ClC-5 発現細胞には見られ、ClC-5 未発現細胞には見られなかった。H⁺輸送能をなくした E211A-ClC-5 変異体は、SCH28080 感受性 ³⁶Cl 輸送活性を持たなかった。一方、ClC-5 と E211A-ClC-5 変異体は、H⁺,K⁺-ATPase 活性を有意に上昇させた。これら結果は、ClC-5 と H⁺,K⁺-ATPase は、機能的に関連し、胃酸分泌に関与している可能性を示している。

【緒言】

ClC-5 は、Cl⁻チャンネルやトランスポーター（ClC-3 や ClC-4）を含む CLC ファミリーに属する（Jentsch et al., 2005; Jentsch, 2008）。ClC-3 や ClC-4 と同様、ClC-5 は、主に細胞内に局在している（Devuyst et al., 1999; Günther et al., 1998）。ClC-5 の機能喪失変異は、低分子量タンパク尿症、高リン酸塩尿症、高カルシウム尿症を特徴とする X 連鎖遺伝病であるデント病を引き起こす（Lloyd et al., 1996; Wrong et al., 1994）。ClC-5 は、主に腎臓に発現しており、近位尿細管において液胞型 H⁺-ATPase（V-ATPase）と共局在している（Günther et al., 1998）。エンドソームに発現する ClC-5 は、近位尿細管でのエンドサイトーシスに必要であることが、デント病のモデルとしての ClC-5 ノックアウトマウスで示されている（Piwon et al., 2000; Wang et al., 2000）。

ClC-5 は以前、早期エンドソームにおいてシャント電流を持つ Cl⁻チャンネルとして、管腔内酸性化を促進することが示唆されていた（Günther et al., 2003; Piwon et al., 2000）。その後、ClC-5 は、Cl⁻チャンネルとしてではなく、電位依存的 Cl⁻/H⁺交換体として機能していることが明らかとなった（Picollo and Pusch, 2005; Scheel et al., 2005; Zifarelli and Pusch, 2009）。ClC-5 は、二次性能動輸送体として、エンドソームの V-ATPase によって作られた小胞内 pH 勾配と Cl⁻勾配を共役させることで、電荷の集積を補正する（Picollo and Pusch, 2005; Scheel et al., 2005）。他方で、ClC-5 はエンドソーム内の Cl⁻を H⁺と交換することで、エンドソームの酸性化に関与しており（Smith and Lippiat, 2010）、エンドソームでは、

CIC-5 の H⁺輸送は、V-ATPase の H⁺輸送とカップリングしていないことが示唆されている。

CIC-5 は、腸組織（十二指腸、空腸、回腸及び結腸）にも発現が報告されているが、発現レベルは腎臓に比べると低い（Vandewalle et al., 2001）。CIC-5 は腸細胞の刷子縁膜直下の小胞に富む領域で V-ATPase と共局在しており、腸上皮細胞のエンドサイトーシス経路において CIC-5 の機能が重要であることが示唆された（Vandewalle et al., 2001）。

これまで、胃における CIC-5 の機能については報告されていない。胃酸分泌細胞は胃酸（HCl）を胃の内腔に分泌する。酸分泌刺激時の胃酸分泌細胞では、胃プロトンポンプ（H⁺,K⁺-ATPase）が豊富に存在する細管小胞が互いに融合し、頂端膜に連結する。刺激状態でも、細管小胞と頂端膜は、混ざり合わず、互いに独立している（Fujii et al., 2009; Nishi et al., 2012）。胃細管小胞において Cl⁻チャネルとして機能する囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）Cl⁻チャネル（Sidani et al., 2007）及び Cl⁻輸送体 solute carrier 26A9（SLC26A9）（Xu et al., 2008）、また頂端膜では K⁺-Cl⁻共輸送体-4（KCC4）（Fujii et al., 2009）が、HCl 分泌における Cl⁻輸送体の候補として報告されている。

本研究では、CIC-5 が胃細管小胞に発現し、CIC-5 と H⁺,K⁺-ATPase が機能的に関連していることを見出した。本研究結果は、胃酸分泌における CIC-5 の新規機能を示している。

【実験方法】

薬品

胃 H^+,K^+ -ATPase α 及び β サブユニット安定発現 HEK293 細胞は前述のように確立された (Kimura et al., 2002)。Ab1024 (Asano et al., 1994) 及び 1H9 (Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya, Japan) は、抗 H^+,K^+ -ATPase α -サブユニット (HK α) 抗体として使用した。他に記載のように、抗 CIC-5 モノクローナル抗体 (SS53 及び SS58) を調製した (Sakamoto et al., 1999)。CIC-5 の C 末端の 730 から 746 (KHIAQMANQDPDSILFN) のアミノ酸残基に対応する合成ペプチドは、Takara Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan) から購入し、抗 CIC-5 抗体の特異性を確認するために使用した。抗 KCC4 抗体は、以前に記載のように調製した (Fujii et al., 2009)。Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity、Lipofectamine 2000、抗 Xpress 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗マウス、抗ウサギ及び抗ヤギ IgG 抗体及び Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ及び抗ラット IgG 抗体は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。抗 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ -サブユニット (NK $\alpha 1$)、抗 AQP4 (H-19) 及び抗 caveolin-1 抗体と protein A/G-agarose beads は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から入手した。Immobilized Protein A 及び sulfo-NHS-ss-biotin は Pierce (Rockford, IL, USA) から入手した。抗 β -actin、抗 Rab5 及び抗 myosin 抗体、avidin 及び SCH28080 は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。抗 clathrin heavy chain (X22) 抗体は、Affinity BioReagents (Golden, CO, USA) から入手した。抗 Rab11 抗体は、Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) から入手した。他の全ての試薬は、分子生物学グレードまたは使用可能な純度の最高グレードを用いた。

ノーザンブロッティング

組織サンプルの Poly A⁺ RNA は、Poly ATtract mRNA isolation system II を用いて調製した (Promega, Madison, WI, USA)。増幅産物を配列決定し、³²P 標識 cDNA プロブを調製するために使用した。ウサギの CIC-5 プロブは、CIC-5 cDNA のヌクレオチド 499 番目から 803 番目に対応する 305 bp を用いた。ウサギ GAPDH プロブは、GAPDH cDNA のヌクレオチド 443 番目から 935 番目に対応する 493 bp を用いた。ノーザンブロット分析のために、各サンプル (2.5 μ g) の Poly A⁺ RNA を 1% agarose/hormardehyde gel 上で分離し、ナイロン膜 (Zeta-probe GT, Bio-Rad) に転写した。膜は、CIC-5 または GAPDH の ³²P 標識 cDNA 断片とハイブリダイズし、6 時間 (GAPDH) または 48 時間 (CIC-5) イメージングプレート (富士フィルム) に露光した。

胃サンプルの調製

動物は富山大学の動物実験委員会によって提示されたガイドラインに従って人道的に死

亡させた。ヒトの胃の標本は、ヘルシンキ宣言の勧告に従い、インフォームドコンセントが得られた日本人の胃癌患者（70歳、男性）から外科的切除により入手した。がん組織から10-20 cm離れた胃粘膜を、正常の胃粘膜として採取した。ブタとヒトの胃細管小胞由来ベシクル (tubulovesicles; TV) (Fujii et al., 2009)、ブタの頂端膜由来ベシクル (stimulation associated vesicles; SAV) (Fujii et al., 2009)、及び H^+,K^+ -ATPase の豊富なウサギ胃の P3 画分 (Hori et al., 2004) は、以前の報告と同様に調製した。

膜画分の調製

HEK293 細胞の膜画分は以下の方法で調製した。ディッシュより剥離した細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin 及び 1 μ g/ml pepstatin A) を添加した低イオン塩バッファー (0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 中で 0°C、10 分間インキュベートした。その後、ダウンズ型ホモジナイザーで 40 ストロークホモジナイズし、そのホモジネートを等体積の 500 mM sucrose 及び 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む溶液で希釈し、さらに 40 ストロークホモジナイズした。均質化された懸濁液を 10 分間、800 \times g で遠心分離した。上清を採取し、90 分間、100,000 \times g で遠心分離し、そのペレットを 250 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) から成る溶液中で懸濁した。

Detergent-resistance membrane (DRM) の単離

膜タンパク質を、1% CHAPS とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む氷冷した MBS バッファー (150 mM NaCl, 25 mM MES-NaOH, pH 6.5) で、15 分間処理した。溶液を、等量の 66% sucrose を含む MBS バッファーと混合し、その混合溶液を超遠心管の底部に配置し、その上に 30% sucrose 及び 5% sucrose 溶液を重層することによって不連続密度勾配を作製した。サンプルを、SW41Ti ローター (Beckman) で 261,000 \times g で 4°C、18 時間遠心分離した。上から 1 ml ずつ 10 フラクションに回収したサンプルを、それぞれアセトン沈殿させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウェスタンブロッティングを行った。DRM 画分には、caveolae マーカーである caveolin-1 が豊富であった (図 3B)。

ウェスタンブロッティング

以前に報告したようにウェスタンブロッティングを行った (Sakai et al., 2004)。シグナルは ECL system (GE Healthcare)、または West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) で可視化した。膜上の化学発光シグナルを定量化するために、FujiFilm LAS-1000 system と Multi Gauge software (Fuji Film) を用いた。抗 HK α 抗体は、1:5,000 希釈 (1H9) 及び 1:3,000 希釈 (Ab1024) で使用した。抗 CIC-5 抗体 (SS53 及び SS58) はそれぞれ 1:2,000 希釈で使用した。ネガティブコントロールとして、抗 CIC-5 抗体に対して、対応するブロッッキングペプチドをその 5 倍量でプレインキュベーションし

た。抗 KCC4、抗 Rab11、抗 β -actin 及び抗 Rab5 抗体は、1 : 1,000 希釈で使用した。抗 caveolin-1 抗体及び抗 clathrin heavy chain 抗体は、1 : 2,000 希釈で使用した。抗 Xpress 抗体及び抗 myosin 抗体は 1 : 5,000 希釈で使用した。抗 NK α 1 抗体は 1 : 10,000 希釈で使用した。また、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて、抗 ClC-5 抗体 (SS58)、抗 Xpress 抗体および抗 HK α 抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識を行った。

免疫組織化学

ブタの胃から単離した胃粘膜を 10 mM sodium periodate, 75 mM lysine, 2% paraformaldehyde を含む PLP (Periodate-Lysine-Paraformaldehyde) で 4°C、12 時間固定した。その後、粘膜を 5% sucrose (4 時間)、10% sucrose (4 時間)、15% sucrose (4 時間)、及び 20% sucrose (12 時間) を含有する一連の PBS 溶液を用いて、4°C でインキュベーションした。粘膜は、optimum cutting temperature compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) に埋め込み、6 μ m に薄切した。抗体の非特異的結合を防止するために、切片を室温で 1 時間 3% BSA (PBS 中) で前処理した。その後、切片を、抗 ClC-5 (SS53; 1:50 希釈)、抗 HK α (Ab1024; 1 : 100 希釈)、抗 Rab5 抗体 (1 : 100 希釈)、抗 NK α 1 抗体 (1 : 100 希釈)、または抗 AQP4 抗体 (1 : 100 希釈) と共に 4°C で 15 時間インキュベーションした。Alexa Fluor 488 標識及び Alexa Fluor 546 標識抗 IgG 抗体 (1 : 100 希釈) を二次抗体として使用した。免疫蛍光画像は、Zeiss LSM 510 レーザー走査共焦点顕微鏡を用いて取得した。

胃細管小胞における ³⁶Cl 輸送の測定

ブタ TV (100 μ g) を 250 mM sucrose, 15 mM KCl, 3 mM MgSO₄, 1 mM ATP, 20 μ M ouabain, 10 μ M *R*-(+)-[(2-*n*-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1*H*-inden-5-yl)oxy] acetic acid (DIOA), 10 μ M furosemide を含む 100 mM PIPES-Tris (pH 7.4) バッファーで 37°C、2 分間インキュベーションした。H⁺,K⁺-ATPase の特異的阻害剤である 10 μ M SCH28080 の有り無しで測定した。その後、5 μ Ci/ml H³⁶Cl 及び 10 μ g/ml valinomycin をサンプルに添加し、それらを 37°C で 5 分間インキュベーションした。サンプルは 0.45 μ m HAWP フィルター (Millipore Co., Bedford, MA, USA) を用いて急速濾過した。TV 及びフィルターにおける H³⁶Cl の非特異的な結合を補正するために、ATP の非存在下でも測定を行った。フィルターは、5 mM KCl, 250 mM sucrose 及び 100 mM PIPES-Tris (pH 7.4) を含む溶液で洗浄した。フィルターをバイアル瓶に移し、ACS II シンチラント 5 ml で溶解し、³⁶Cl の放射能を測定した。

プラスミド構築

ラット ClC-5 の全長 cDNA を、BamHI 及び NotI 制限部位を用いて N 末端側に Xpress

タグ配列を含む pcDNA4/His ベクター (Invitrogen) に挿入した (CIC-5-pcDNA4/His ベクター)。pcDNA4/His 由来の Xpress タグ付きの CIC-5 を、AflIII 及び NotI 制限部位を使用して pcDNA5/TO に導入した (CIC-5-pcDNA5/TO ベクター)。E211A (E211A-CIC-5-pcDNA5/TO ベクター)、E741D (E741D-CIC-5-pcDNA4/His ベクター)、及び I732M/L744M (I732M/L744M-CIC-5-pcDNA4/His ベクター) 変異体を作成するための部位特異的変異導入は、QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) および各プライマー (E211A, sense: gagcctgggtaaagcgggcccctagtgc 及び anti-sense: gcactagggggcccgtttaccaggtc; E741D, sense: tggcaaaccaagaccccgattccattcttcaa 及び anti-sense: ttgaagagaatggaatcgggtcttggttgc; I732M, sense: caaaaaggatgtgttaaagcacatggcgcagatggcaaa 及び anti-sense: tttgccatctgcgccatgtgctttaacacatccttttg; L744M, sense: ccaagaccccgagtccattatgttcaactagaagcatggg 及び anti-sense: cccatgcttctagttgaacataatggactcgggtcttg) を用いた。変異導入した cDNA 配列は、ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

HEK293 細胞における CIC-5 の強制発現

胃 H⁺,K⁺-ATPase α,β -サブユニット安定発現 HEK293 細胞において tetracycline で発現調節可能な CIC-5 発現系を確立するために、CIC-5-pcDNA5/TO または E211A-CIC-5-pcDNA5/TO と pcDNA6/TR ベクター (Invitrogen) を Lipofectamine 2000 を使用して同時トランスフェクションし、10% FBS を添加した D-MEM で 24 時間培養した。トランスフェクションした細胞を 0.4 mg/ml hygromycin B (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、7 μ g/ml blasticidin S (Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)、0.25 mg/ml G418 (Enzo Life Sciences) 及び 0.1 mg/ml zeocin (Invitrogen) 存在下でセレクトションした。CIC-5 の発現を確認するために、各細胞株を、2 μ g/ml の tetracycline (Invitrogen) で 12 時間処理した。CIC-5 の発現は、免疫細胞染色及びウェスタンブロッティングにより確認した。

免疫細胞染色

HEK293 細胞を、室温で 7 分間、氷冷メタノールで固定した。細胞を、0.3% triton X-100 及び 0.1% BSA (PBS 中) を用いて 15 分間処理することで膜透過性を高めた。その後、サンプルを GSDB バッファー [20 mM phosphate buffer (pH 7.4), 450 mM NaCl, 16.7 % goat serum 及び 0.3% Triton X-100] で 30 分間前処理し、抗 Xpress 抗体 (1 : 100 希釈)、及び抗 HK α 抗体 (Ab1024; 1 : 100 希釈) と 25°C で 60 分間インキュベーションした。Alexa Fluor 546 標識 IgG 及び Alexa Fluor 488 標識 IgG を二次抗体として使用した (1 : 100 希釈)。

免疫沈降

ブタ TV (100 µg) と HEK293 細胞の膜画分 (0.5-2 mg) を、0.5% Triton X-100 (TV) または 1% Nonidet P-40 (膜画分) を含有する 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 及び 50 mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液 (0.5-1 ml) 中で、氷上で 1 時間インキュベーションした。溶解物を 4°C、30 分間 100,000×g で遠心分離した。上清を、A/G-agarose beads (TV) または protein A-agarose beads (膜画分) を用いて 4°C で 5 時間プレクリアし、その後、抗 ClC-5 抗体 SS58 (TV) または抗 His タグ抗体 (膜画分) と 4°C で 5 時間反応させた。次いで、試料に A/G-agarose beads (TV) または protein A-agarose beads (膜画分) を加え、4°C で 4-6 時間インキュベーションした。ビーズを洗浄し、8% SDS, 4% glycerol 及び 10% β-mercaptoethanol を添加した 250 mM Tris-HCl (pH 6.8) 中で溶出させた。遠心分離後、上清をウェスタンブロッティングに使用した。

細胞表面ビオチン化

報告されている方法を参考に細胞表面ビオチン化実験を行った (Wang et al., 2005; Morii et al., 2008)。6 ウェルコラーゲンコートプレート上で HEK293 細胞を、4°C で 30 分間、0.5 mg/ml sulfo-NHS-ss-biotin で処理した。その後、細胞を、1% Triton X-100 を含有する 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 及び 50 mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液 500 µl で溶解した。溶解物を 4°C で 20 分間、15,000×g で遠心分離した。上清 (1 mg) を 4°C で 4 時間、40 µl の avidin-agarose beads とインキュベーションした。可溶化タンパク質の 30 µg は、総発現量を検討するために使用した。ビーズを洗浄し、Laemmli sample buffer 中に溶出させた。溶出したサンプルをウェスタンブロッティングに使用した。

ClC-5 Tet-on 及び Tet-off 細胞における ³⁶Cl 輸送の測定

細胞をコラーゲンタイプ I コートした 6 ウェル培養プレート (1.5×10⁶ 細胞/ウェル) に播種し、10% FBS を添加した D-MEM で 12 時間培養し、2 µg/ml tetracycline (Tet-on 細胞) 及び 2 µCi/ml H³⁶Cl を加え、さらに 12 時間培養した。Tet-off 細胞の場合、tetracycline の代わりに溶媒を添加した。その後、³⁶Cl-負荷した細胞を洗浄し、129 mM sodium gluconate, 15 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.5 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 20 µM ouabain, 10 µM DIOA, 10 µM furosemide 及び 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) を含む反応液で、25°C、3 分間インキュベーションした。H⁺,K⁺-ATPase 依存性の Cl⁻輸送を評価するために、10 µM SCH28080 の非存在下及び存在下で実験を行った。その後、細胞を洗浄し、150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 及び 50 mM Tris-HCl (pH7.4) を含む溶液 2 ml で可溶化した。サンプルを ACS II シンチラント 5 ml に溶解し、³⁶Cl-の放射能を測定した。

H⁺,K⁺-ATPase 活性測定

K⁺-活性化型 ATPase (K⁺-ATPase) 活性は、50 µg の膜タンパク質を 3 mM MgCl₂, 1 mM

ATP, 5 mM NaN₃, 2 mM ouabain, 15 mM KCl 及び 40 mM Tris-HCl (pH 6.8) を含む溶液 1ml 中で、50 µM SCH28080 の存在下及び非存在下で測定した。37°C で 30 分間インキュベーションした後、放出された無機リン酸を比色定量した (Yoda and Hokin, 1970; Fujii et al., 2008)。H⁺,K⁺-ATPase 活性は、SCH28080 感受性 K⁺-ATPase 活性として、SCH28080 の存在下及び非存在下における K⁺-ATPase 活性の差分から算出した。

⁸⁶Rb⁺輸送測定

6 ウェルコラーゲンコートプレート上の HEK293 細胞を、144 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM RbCl (3 × 10⁶ cpm ⁸⁶Rb⁺) , 500 µM ouabain, 10 µM furosemide 及び 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 溶液で、37°C、10 分間インキュベートした。⁸⁶Rb⁺輸送活性は、10⁶ 細胞当たりの 1 分間の ⁸⁶Rb⁺の輸送量 (ナノモル) として算出した。H⁺,K⁺-ATPase に特異的な ⁸⁶Rb⁺輸送活性は、50 µM SCH28080 の存在下及び非存在下での活性の差として計算した。反応溶液と 10 分間インキュベーションした後、細胞を洗浄し、1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 及び 50 mM Tris-HCl (pH7.4) からなる lysis buffer 2 ml で可溶化した。その後、サンプルの放射能を測定した。

統計

結果は平均値 ± 標準誤差として表した。グループ間の差は one-way ANOVA によって分析し、多重比較についての補正は、Tukey's 多重比較検定を用いた。2 群間の比較は、Student's *t* test を用いた。統計的有意差は、*P* < 0.05 とした。

【結果】

胃細管小胞における CIC-5 の発現

第一に、ウサギの脳、腎臓、胃での CIC-5 mRNA の発現レベルを調べた (図 1-1)。CIC-5 cDNA プロブを用いたノーザンブロットでは、9.5 kb の単一バンドを得た。これは、報告されているラット腎臓 CIC-5 (9.5 kb) と同サイズであった (Steinmeyer et al., 1995)。胃における CIC-5 mRNA の発現レベルは、腎臓 (図 1-1) より低かった。2 種類の抗 CIC-5 抗体 (SS53、及び SS58) を使用し、CIC-5 タンパク質の発現を検討した。SS53 (Sakamoto et al., 1999) および SS58 (図 1-10A) は、CIC-3 又は CIC-4 に対する交差反応性を有さないことを確認した。SS58 と SS53 抗体を用いたウェスタンブロットティングにおいて、ブタ胃サンプルで 85 kDa の単一バンドが得られた (図 1-2A)。他方、2 種類の抗 H⁺,K⁺-ATPase α サブユニット (HK α) 抗体 (1H9 及び Ab1024) を使用したウェスタンブロットにおいて、このブタ胃サンプルにおいて H⁺,K⁺-ATPase の発現を確認した (図 1-2B)。胃において抗 CIC-5 抗体で検出されたバンドのサイズ (85 kDa) は、ラット腎臓 (83 kDa) (Vandewalle et al., 2001) やマウス腎臓 (85 kDa) (Sakamoto et al., 1999) で観察された CIC-5 タンパク質のサイズに近似していた。抗 CIC-5 抗体で見られた 85-kDa のバンドの特異性は、対応するブロッキングペプチドを用いて消失したことで確認した (図 1-2A)。

CIC-5 タンパク質の有意な発現は、ブタ、ウサギ及びヒトの胃サンプルで観察された (図 1-3A)。胃 H⁺,K⁺-ATPase は、胃酸分泌細胞の細胞内細管小胞および頂端膜の両方に局在している (Fujii et al., 2009)。本研究では、2 種類のブタ胃小胞、細胞内細管小胞 (TV) および頂端膜由来 SAV を用いた。HK α は TV と SAV の両方に高発現していた (図 1-3B)。以前に報告したように (Fujii et al., 2009)、 β -actin は SAV に高発現していた。興味深いことに、TV における CIC-5 の発現レベルは、SAV よりはるかに高かった (図 1-3B)。この CIC-5 の発現パターンは、頂端膜において H⁺,K⁺-ATPase と機能的に関連している KCC4 の発現パターンとは明らかに異なっていた (Fujii et al., 2009) (図 1-3B)。ブタ胃酸分泌細胞において、CIC-5 は、エンドソーム及び TV の両方に発現しており、エンドソームマーカー (Rab5) 陽性及び陰性の両領域 (図 1-4A) に局在していることが観察された。他方、Rab5 の有意な発現は、TV では観察されなかった (図 1-4B)。

胃腺上部に存在する胃酸分泌細胞における CIC-5 の局在

ブタ胃粘膜の免疫組織染色において、CIC-5 の分布パターンは、HK α (図 1-5A-F) の分布パターンとほぼ一致したが、完全には一致しなかった (図 1-5F)。図 1-3 の結果を考慮すると、胃酸分泌細胞内において黄色と赤色で観察されている領域はそれぞれ、細管小胞と頂端膜であると考えられた (図 1-5F)。抗 CIC-5 抗体の免疫染色の特異性は、ブロッキングペプチドを用いて確認した (図 1-5G-I)。他方、CIC-5 の分布は、細胞の基底側膜に発現する Na⁺,K⁺-ATPase α 1 サブユニット (NK α 1) の分布とは明らかに異なっていた (図 1-6A-F)。

胃腺上部に存在する若い胃酸分泌細胞は、下部に存在する古い胃酸分泌細胞よりも、酸分泌能がはるかに高いことが報告されている (Bamberg et al., 1994; Karam et al., 1997; Sachs, 2001)。アクアポリン 4 (AQP4) は、胃腺下部における胃酸分泌細胞の基底側膜に局在している (Carmosino et al., 2001)。興味深いことに、胃粘膜における AQP4 と ClC-5 の免疫二重染色を行ったところ、ClC-5 は、AQP4 が発現する胃腺下部よりも上部に存在する胃酸分泌細胞において高発現していた (図 1-6G-I)。

細管小胞における ClC-5 と H⁺,K⁺-ATPase の関連

ブタ細管小胞において ClC-5 と HK α が関連しているかを調べるために、まず抗 ClC-5 抗体を用いた免疫沈降を行った。抗 ClC-5 及び抗 HK α 抗体を用いた免疫沈降サンプルのウェスタンブロッティングにおいて、ClC-5 (85 kDa) と HK α (95 kDa) の明確なバンドが得られた (図 1-7)。対照的に (ネガティブコントロールとして)、胃酸分泌細胞において細管小胞に存在し、小胞輸送機構に関連している Rab11 (27 kDa) (Calhoun and Goldenring, 1997) は、免疫沈降サンプルには検出されなかった (図 1-7)。これらの結果は、ClC-5 と H⁺,K⁺-ATPase が、細管小胞において近接して存在していることを示唆している。

Caveolae は、低温条件下で Triton X-100 や CHAPS などの界面活性剤に不溶性で、低密度の画分に、detergent-resistance membrane (DRM) を形成することが知られている。本研究では、CHAPS 及びショ糖勾配を使用してブタ細管小胞から caveolae を単離した。Caveolae のマーカーとして caveolin-1 を使用した (Rothberg et al., 1992)。図 1-8 に示すように、ClC-5 と HK α は、主に caveolin-1 を発現している DRM 画分に分布していた。他方、clathrin が発現している非 DRM 画分において、ClC-5 及び HK α の有意な分布は観察されなかった (図 1-8)。

細管小胞の大部分は、inside-out 小胞である (Asano et al., 1987)。すなわち、H⁺,K⁺-ATPase の ATP 結合部位は、小胞の外側に面しており、H⁺ は小胞外部から内部へ輸送される (図 1-9)。次に、カリウムイオノフォアである valinomycin 存在下で TV への ³⁶Cl 取り込みを測定した。図 1-9 において、ATP を添加することにより TV における ³⁶Cl 取り込みが増加した。H⁺,K⁺-ATPase の特異的阻害剤である SCH28080 は、TV における ATP 依存性 ³⁶Cl 取り込みを有意に阻害したが、ATP の非存在下では有意な効果は見られなかった (図 1-9)。これらの結果は、TV には H⁺,K⁺-ATPase にカップリングした二次性能動 Cl 輸送体が存在することを示唆している。これまで、細管小胞で CFTR (Fujii et al., 2009) 及び SLC26A9 (Xu et al., 2008) などの Cl-チャンネルの発現が報告されてきたが、これらのタンパク質は、ATPase とカップリングする二次性能動輸送体ではない。ClC-5 は、H⁺ 輸送を介して H⁺,K⁺-ATPase に機能的に共役することができるので、細管小胞での SCH28080 感受性 ³⁶Cl 取り込みは、少なくとも部分的には ClC-5 により媒介されている可能性が考えられる。一方、SCH28080 非感受性の ³⁶Cl 取り込みも観察された (図 1-9)。この受動的な Cl 輸送は、CFTR や SLC26A9 によって媒介されている可能性が考えられる。

HEK293 細胞における ClC-5 及び H⁺,K⁺-ATPase の安定共発現

本研究で使用した ClC-5 抗体の抗原ペプチドのアミノ酸配列 (KHIAQMANQDPPSILFN) は、ブタ、ウサギ及びヒトにおいて共通して保存されているが、ラット ClC-5 (KHIAQMANQDPESILFN) の対応する領域は、一つのアミノ酸残基 (ラット ClC-5 E741) が異なっている。本研究では、ラットの ClC-5 cDNA をクローニングした。図 1-10A では、ClC-5 抗体 (SS58) は、ラット WT-ClC-5 を発現させた膜サンプルではバンドが見られなかったが、ラットの配列をブタ、ウサギ及びヒトの配列に変異させた E741D-ClC-5 を発現させた膜サンプルにおいてバンドが検出された。また、SS58 抗体が ClC-3 または ClC-4 に反応しないことをチェックするため、エピトープの対応する部分を変異させた I732M-L744M 二重変異体 (I732M/L744M-ClC-5; ClC-3 および ClC-4 の配列) を構築した。SS58 抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、I732M/L744M-ClC-5 を発現させた膜サンプルで有意なバンドは検出されなかった (図 1-10A)。これらの結果から、SS58 抗体の高い特異性が再確認できた。mock トランスフェクション HEK293 細胞では、 β -actin の発現は観察された (図 1-10A 右側) が、内因性のヒト ClC-5 タンパク質の有意な発現は見られなかった (図 1-10 左側)。一方、クローニングした ClC-5 の WT および変異体の N 末端には全て、Xpress 配列がタグ付けされているので、抗 Xpress 抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、WT-、E741D-及び I732M/L744M-ClC-5 を発現させた膜サンプルにおいてバンドが検出された (図 1-10A 中央)。

次に、胃 H⁺,K⁺-ATPase α , β -サブユニット安定発現 HEK293 細胞において、WT-ClC-5 と、H⁺輸送活性を全く有さない E211A-ClC-5 (Picollo and Pusch, 2005) の tetracycline 発現調節システムを構築した。外因的な WT-及び E211A-ClC-5 の発現は、tetracycline で処理した細胞 (Tet-on 細胞) において観察されたが、tetracycline 未処理細胞 (Tet-off 細胞) では観察されなかった (図 1-10B)。Tet-on 細胞における HK α の発現レベルは、Tet-off 細胞のものとは比べて有意な差はなかった (図 1-11)。Tet-on 細胞において、WT-及び E211A-ClC-5 及び HK α は、部分的に細胞膜に局在していた (図 1-12)。TV の場合と同様 (図 1-7) に、Tet-on 細胞において、WT-ClC-5 もしくは E211A-ClC-5 が、H⁺,K⁺-ATPase と、近接して存在しているか検討するために、抗 His タグ抗体 (ClC-5 に結合) を用いて免疫沈降を行った。抗 HK α 抗体によるウェスタンブロットにおいて、免疫沈降サンプルに HK α のバンドが得られたことから、WT-ClC-5 および E211A ClC-5 変異体は、どちらも HK α と分子会合もしくは非常に近接して存在している可能性が示唆された (図 1-13)。他方、抗 NK α 1 抗体では、免疫沈降サンプルにおいて内因性の Na⁺,K⁺-ATPase のバンドは検出されなかった (図 1-13)。

HEK293 細胞での ClC-5 による H⁺,K⁺-ATPase 依存性の Cl⁻輸送

HEK293 細胞における WT-及び E211A-ClC-5 の機能を評価するためには、原形質膜で

の CIC-5 タンパク質の発現レベルを知ることが必要である。そこで、細胞表面ビオチン化実験を、構築した CIC-5 発現細胞を用いて行った。Tet-on 細胞において、WT-CIC-5 と E211A-CIC-5 はどちらもビオチン化サンプルにおいてバンドが検出された (図 1-14) が、WT-CIC-5 と E211A-CIC-5 でビオチン化レベルに有意差は見られなかった (図 1-15A)。また、Tet-on 細胞における HK α のビオチン化レベルは、Tet-off 細胞におけるビオチン化レベルと比べて有意差はなかった (図 1-14 及び 1-15B)。HEK293 細胞において、原形質膜での CIC-5 の発現レベルは、全 CIC-5 の約 15% であると見積もられた。他方、コントロール実験として、細胞質内タンパク質である myosin の発現を検討したが、ビオチン化サンプルにおいて有意な発現は見られなかった (図 1-14)。

次に、WT 及び E211A-CIC-5 の Tet-on と Tet-off 細胞における Cl⁻ の輸送活性を測定した。WT の Tet-on 細胞における SCH28080 感受性 ³⁶Cl 輸送活性は、WT の Tet-off 細胞よりも有意に大きかった (図 1-16)。対照的に、E211A の Tet-on 細胞において有意な SCH28080 感受性 ³⁶Cl 輸送活性は観察されなかった (図 1-16)。また、輸送実験を開始する前に細胞内に取り込まれた ³⁶Cl 量は、Tet-on 細胞と Tet-off 細胞において有意な差は見られなかった (data not shown)。これらの結果は、CIC-5 由来 ³⁶Cl 輸送は、H⁺,K⁺-ATPase 活性に依存的であり、HEK293 細胞において CIC-5 が、H⁺ 輸送を介して胃 H⁺,K⁺-ATPase と機能連関することが可能であることを示唆している。

CIC-5 の共発現による H⁺,K⁺-ATPase 活性のアップレギュレーション

次に、CIC-5 を発現させたことによる H⁺,K⁺-ATPase 活性の変化について検討した。WT-CIC-5-Tet-on 細胞における HK α の総発現レベル (図 1-14) 及びビオチン化レベル (図 1-15B) は、Tet-off 細胞と有意差は見られなかった。しかし、WT-CIC-5-Tet-on 細胞における SCH28080 感受性 K⁺-ATPase 活性 (H⁺,K⁺-ATPase 活性) は、Tet-off 細胞の活性に比べて有意に高かった (図 1-17、中央)。興味深いことに、E211A-CIC-5 の発現も、H⁺,K⁺-ATPase 活性を有意に増大させた (図 1-17、右)。他方、tetracycline 処理は、コントロール HEK293 細胞における H⁺,K⁺-ATPase 活性に有意な効果を及ぼさなかった (図 1-17、左)。また、Tet-on 細胞における H⁺,K⁺-ATPase 活性の上昇効果は、tetracycline 処理時間依存的な CIC-5 の発現レベルと正に相関していた (図 1-18)。さらに、WT-CIC-5-Tet-on 細胞において、SCH28080 感受性 ⁸⁶Rb⁺ 輸送活性も、Tet-off 細胞より有意に上昇していた (図 1-19)。

【考察】

本研究では以下のことを見出した。1) ClC-5 タンパク質は、胃酸分泌細胞において部分的に細胞内細管小胞に発現していた。2) ClC-5 は細管小胞において H⁺,K⁺-ATPase と関連しており、両者は、caveolae に局在していた。3) 細管小胞において、H⁺,K⁺-ATPase 阻害剤が二次性能動体による Cl 輸送を抑制した。4) ClC-5 及び H⁺,K⁺-ATPase を安定発現させた HEK293 細胞において、ClC-5 由来の Cl 輸送は H⁺,K⁺-ATPase 阻害剤によって抑制された。5) ClC-5 及び H⁺,K⁺-ATPase の安定発現細胞の膜面分において、ClC-5 は H⁺,K⁺-ATPase 活性を増大させた。

これまで、ラット胃における ClC-5 mRNA 及びタンパク質の発現は報告されていない。このことは、ClC-5 が腎臓において顕著に発現しているのに対して、胃では発現レベルが低いことが原因であると思われる (Günther et al., 1998; Sakamoto et al., 1996)。実際、胃酸分泌細胞における ClC-5 mRNA の発現レベルは、腎臓に比べて非常に低かった (図 1-1)。アフリカツメガエルの胃においては、少ないが検出可能な ClC-5 mRNA が見出されている (Lindenthal et al., 1997)。

ClC-5 タンパク質は、胃腺下部に比べ上部に存在する胃酸分泌細胞に高発現していた。胃酸分泌細胞は、分化の過程において胃腺上部から下部へ移行する。上部に存在する胃酸分泌細胞は、下部に存在する胃酸分泌細胞に比べて、より活発に胃酸を分泌することが示唆されている (Bamberg et al., 1994; Karam et al., 1997; Sachs, 2001)。ClC-5 は、胃酸分泌のより盛んな上部の胃酸分泌細胞に高発現していたことから、胃酸分泌メカニズムに関与している可能性が示唆される。Fujii ら (2009) は、KCC4 もまた、胃腺上部の胃酸分泌細胞に発現していることを見出している。

胃酸分泌細胞において、細管小胞の機能は酸分泌刺激状態と休止状態の間で劇的に変化する。休止状態の胃酸分泌細胞では、細管小胞は頂端膜直下の細胞内分画に存在している。酸分泌刺激を受けると、細管小胞が互いに連結し、頂端膜とつながる。その結果、大量の胃酸分泌が引き起こされる (Fujii et al., 2009; Nishi et al., 2012)。これまでのところ、CFTR (Sidani et al., 2007)、SLC26A9 (Xu et al., 2008)、CLIC-6 (Nishizawa et al., 2000; Sachs et al., 2007)、KCC4 (Fujii et al., 2009) など、複数の Cl⁻チャネルやトランスポーターが、胃酸 (HCl) 分泌における胃管腔への Cl⁻輸送に関与している候補分子として報告されている。CFTR は、主に細管小胞に局在している (Fujii et al., 2009)。SLC26A9 もまた細管小胞に発現しており、Cl⁻分泌の調節、もしくは胃細管小胞及び分泌細管の形成に影響を与えることによって胃酸分泌において重要な役割を果たしている (Xu et al., 2008)。CLIC-6 は、細胞質全体に分散されている (Nishizawa et al., 2000)。また Fujii ら (2009) は、KCC4 が頂端膜に発現し、休止状態の胃酸分泌細胞における基礎胃酸分泌に寄与している可能性を見出した。本研究は、ClC-5 が胃細管小胞に発現しており、酸分泌刺激時の胃酸分泌細胞における大量の酸分泌に関与している可能性を見出した。将来的には、細管小胞をさらに分

画し、異なるサブタイプが分離可能になった場合、CFTR、SLC26A9及びClC-5が、全ての同一の細管小胞に存在しているのか、もしくはそれぞれ異なる細管小胞に存在しているのかどうかを明確にする必要がある。また、胃酸分泌細胞におけるClC-3やClC-4のような他のClCメンバーの発現及び機能について明らかにすることも重要な課題である。

これまでに、ClC-5欠損マウス及びドント病患者における胃の形態及び機能に焦点を当てた報告はない。これはおそらく、重篤な胃の障害が、これらのマウスや患者に発生していないことを意味している。また、CFTRに関して、野生型マウスとCFTR欠損マウスとの間で胃酸分泌に有意な差が見られなかった(McDaniel et al., 2005)。しかし、Sidaniら(2007)は、CFTR遺伝子の完全な除去は、非CFTR制御型K⁺チャネルのアップレギュレーションのような代償機構の活性化を引き起こされる可能性があることを示唆した。さらに、マウスにおいて、CFTRのΔF508変異(嚢胞性線維症患者で最も多い変異)が胃酸分泌の欠損を引き起こすことを見出した。

ClC-5及びV-ATPaseは、腎臓のエンドソームに存在しており、両タンパク質間の機能連関が議論されている。現在、以下の二つの機構が仮定されている。1) ClC-5は、一つのプロトンと引き換えに小胞の内腔に2Cl⁻を輸送する。このことは、2Cl⁻と1H⁺の交換となり計3つの負電荷が流入することとなり、V-ATPaseによってエンドソーム内にプロトンが輸送されることに対するアニオンシャントとなる(Smith and Lippiat, 2010; Zifarelli and Pusch, 2009)。また、ClC-5がV-ATPaseによって蓄積されたプロトンと交換輸送することで生じるエンドソーム内のCl⁻濃度上昇は、腎臓のエンドサイトーシスにおいて重要である(Novarino et al., 2010)。2) ClC-5は、細胞質の1プロトンに対してエンドソーム内腔の2Cl⁻イオンを交換することで、V-ATPaseと並行して直接エンドソーム内を酸性化することができる。このClC-5のリバーサルモードは、新しく形成されたエンドサイトーシス小胞に限定される。その小胞では、一過性の内部陰性ドナン膜電位により、小胞に取り込まれたCl⁻をClC-5がH⁺と交換輸送することで排出することができるが、その代償的なシャントコンダクタンスはまだ同定されていない(Smith and Lippiat, 2010)。

本研究では、ClC-5とH⁺,K⁺-ATPaseが機能的に関連していることを見出した。胃細管小胞では、SCH28080で阻害されるH⁺,K⁺-ATPase依存性の小胞内へのCl⁻輸送が観察された(図1-9)。さらに、H⁺,K⁺-ATPase依存性のCl⁻輸送は、ClC-5発現細胞において観察されたが、ClC-5未発現細胞及びE211A-ClC-5発現細胞では見られなかった(図1-16)。ClC-5及びH⁺,K⁺-ATPaseは、それぞれ2Cl⁻/H⁺と2H⁺/2K⁺を輸送する。したがって、HClは、両者のH⁺カップリングを介して分泌される可能性が考えられる。

胃酸分泌細胞において、ClC-5が細管小胞のエンドサイトーシスに関与しているかどうかについては現時点では不明である。細管小胞では、Cl⁻/HCO₃⁻交換体のPAT1(SLC26A6)が、胃酸分泌細胞の刺激状態から休止状態に変化した際における、エンドサイトーシスされた小胞内のH⁺の中和およびCl⁻の除去に関与している可能性が示唆されている(Petrovic et al., 2002)。

最近 Fujii ら (2009) は、頂端膜において KCC4 が H⁺,K⁺-ATPase の管腔側表面に効率的に K⁺を供給することにより間接的に H⁺,K⁺-ATPase 活性を増大させることを示した。しかし、KCC4 は、膜断片サンプルにおいて H⁺,K⁺-ATPase 活性を活性化しなかった。これらの知見は、二次能動輸送体 (KCC4) によるイオン輸送により一次性能動ポンプの活性 (H⁺,K⁺-ATPase) がアップレギュレーションされるという観点から興味深いものである。一方、ClC-5 は、KCC4 とは異なり、膜断片サンプルにおいて、H⁺,K⁺-ATPase 活性を増加した。また、E211A-ClC-5 も、H⁺,K⁺-ATPase 活性を増加させた (図 1-17)。これらの結果は、ClC-5 は、これらの 2 つのタンパク質間のイオン輸送を介さず直接 H⁺,K⁺-ATPase をアップレギュレーションしていることを示唆している。今後、ClC-5 が H⁺,K⁺-ATPase と分子会合しているかについて明確にする必要がある。

結論として、ClC-5 は、胃酸分泌細胞の細管小胞に発現し、その Cl⁻輸送は H⁺,K⁺-ATPase により調節されている可能性が示唆された。ClC-5 が、腎臓における V-ATPase と胃における H⁺,K⁺-ATPase といった 2 つのタイプのポンプと機能的に関連していることは興味深い知見である。

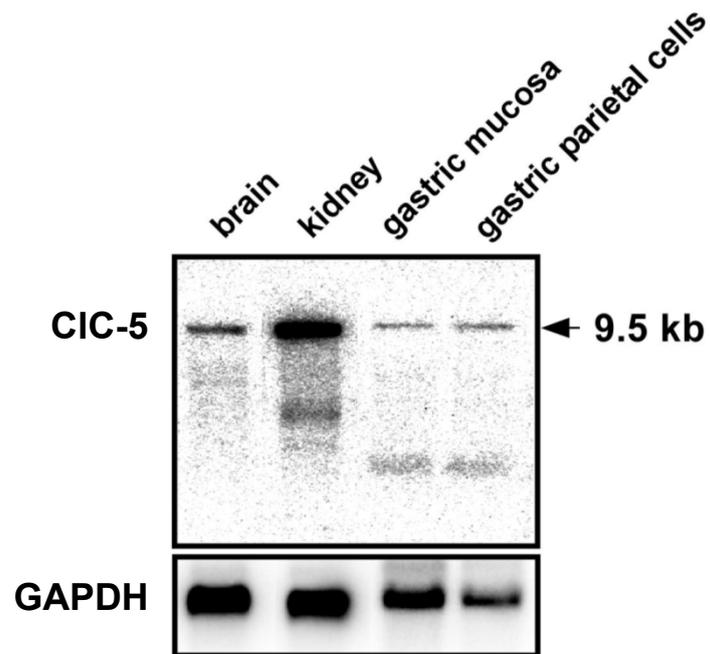


図1-1 胃におけるCIC-5 mRNAの発現

ノーザンブロットは、ウサギの脳、腎臓、胃（gastric mucosa, gastric parietal cells）から調製したpoly A⁺ RNA（2.5 μg/lane）を用いて行った。全てのサンプルにおいて9.5 kbのバンドがCIC-5 cDNAプローブにより検出された。Loading controlとして、GAPDH（1.3 kb）の発現を調べた。

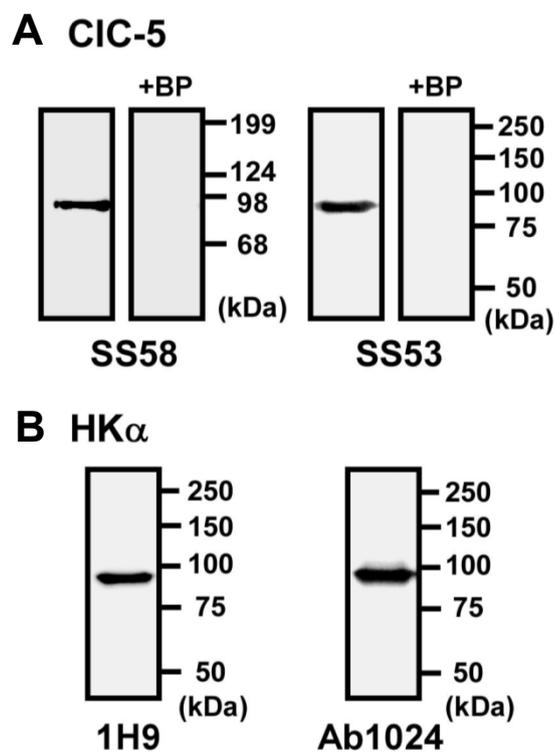


図1-2 抗CIC-5抗体と抗H⁺,K⁺-ATPase α サブユニット (HK α) 抗体の特異性
 抗CIC-5抗体 (SS58とSS53) (A) と抗HK α 抗体 (1H9及びAb1024) (B) を用いた
 ブタ胃細管小胞 (10 μ gのタンパク質) におけるウェスタンブロッティング。それぞれ
 85 kDa (A) または95 kDa (B) のシングルバンドが検出された。CIC-5抗体を、対
 応するブロッキングペプチドとプレインキュベーションすることで、85-kDaのバンド
 が消失した (抗体 : ペプチド = 1 : 5) (+BP; A)。

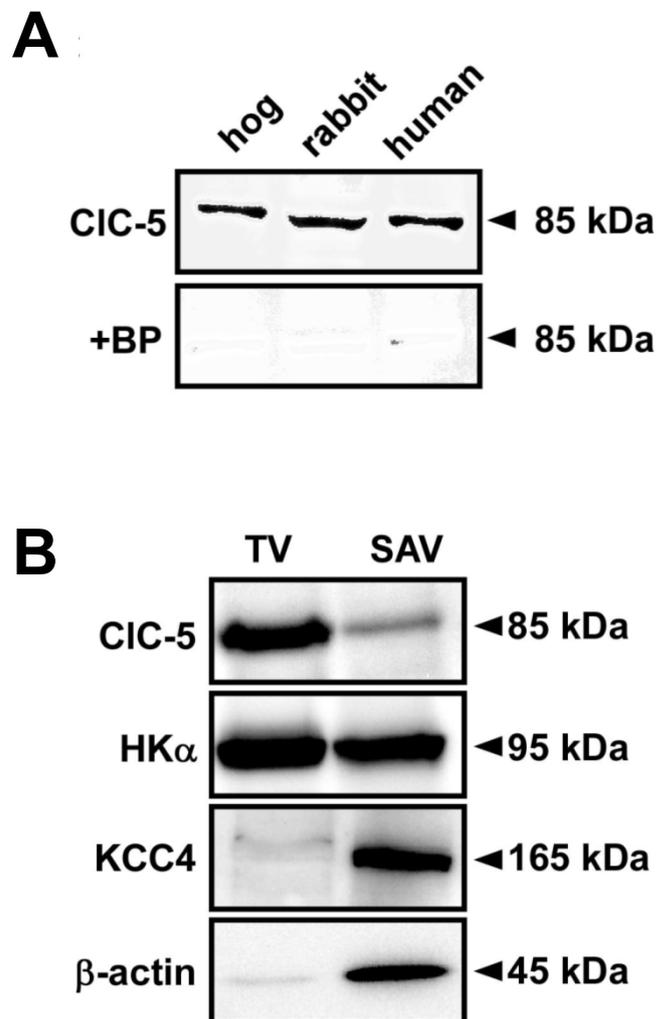


図1-3 胃サンプルにおけるウェスタンブロットティング

(A) 抗ClC-5抗体 (SS58) を使用したブタ及びヒトTV、及びウサギ胃P3画分 (タンパク質はそれぞれ5、50、40 μ gをアプライした) におけるウェスタンブロットティング。全てのサンプルにおいて85 kDaのバンドが検出され (上図)、これらのバンドは、対応するブロッキングペプチドの存在下で消失した (下図)。

(B) 抗ClC-5 (SS58)、抗HK α (1H9)、抗KCC4及び抗 β -actin抗体を用いたTV及びSAV (10 μ gのタンパク質) のウェスタンブロットティング。KCC4 (165 kDa) 及び β -actin (45 kDa) は主にSAVに発現していたが、ClC-5 (85 kDa) は、主にTVに発現していた。HK α (95 kDa) は、TVとSAVの両方に発現していた。

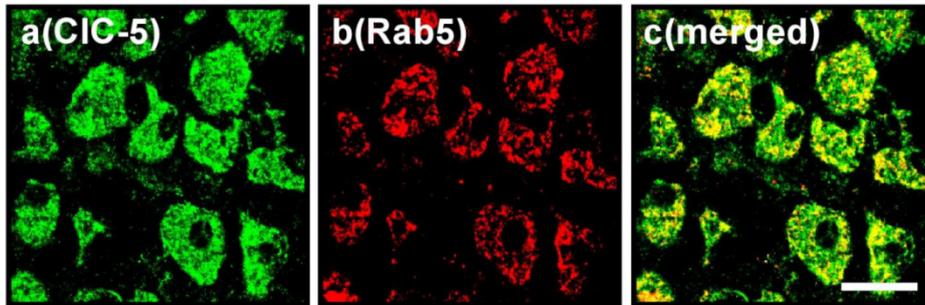
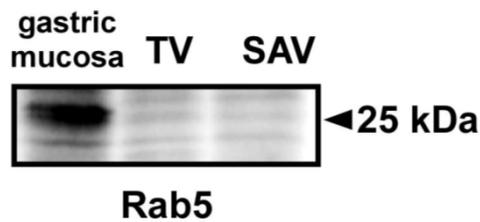
A**B**

図1-4 ブタ胃粘膜におけるCIC-5及びRab5の発現

(A) ブタ胃粘膜における抗CIC-5抗体 (SS53) と抗Rab5抗体を用いた免疫二重染色。aからcは顕微鏡下において同じ組織を示している。対物レンズの倍率：×63、スケールバーは10 μm 。

(B) 抗Rab5抗体を用いたブタ胃粘膜の膜画分、TV及びSAV (それぞれ30 μg をアプライ) のウェスタンブロッティング。Rab5 (25 kDa) は、胃粘膜において顕著な発現が見られた。

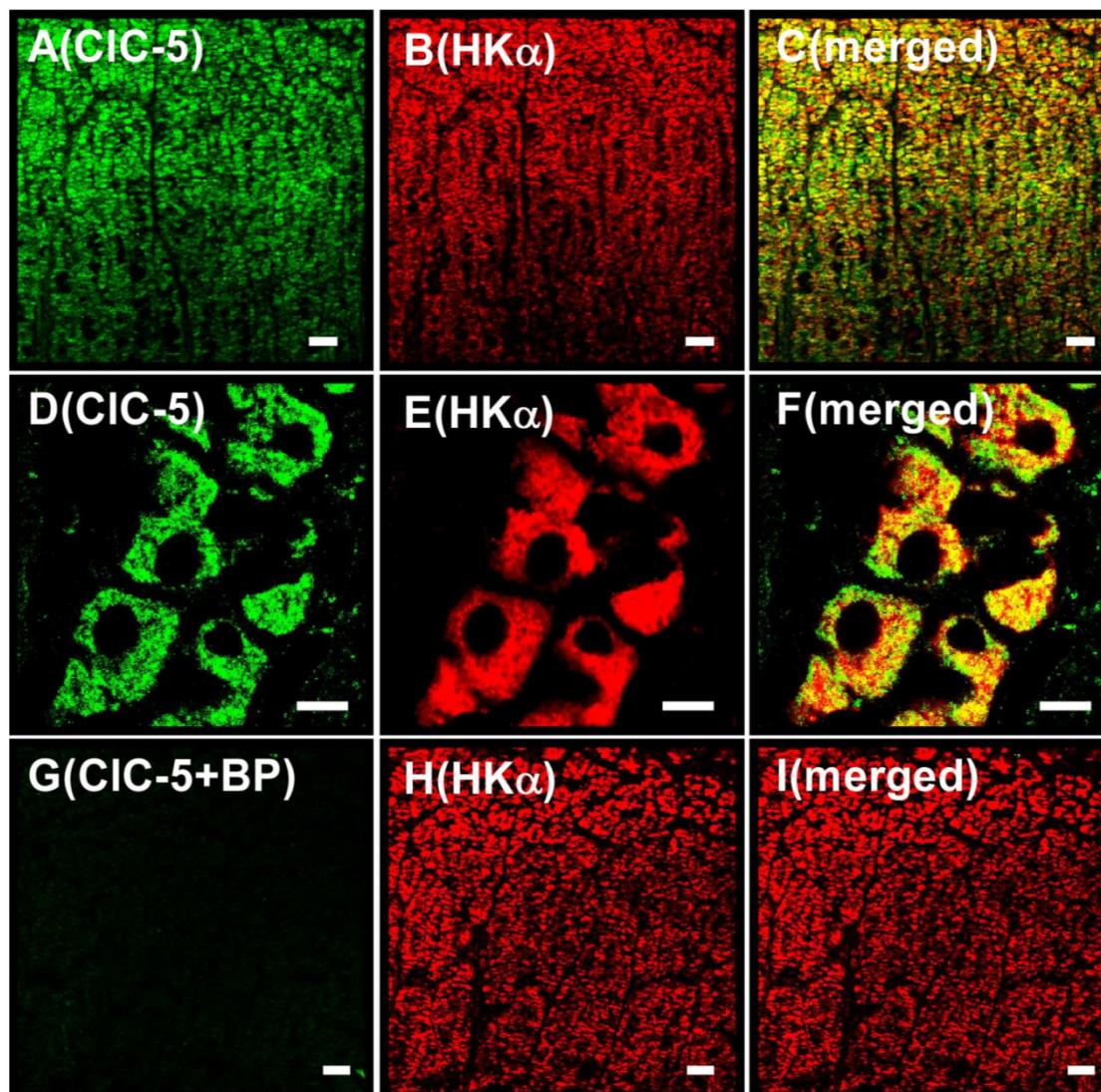


図1-5 単離ブタ胃粘膜におけるCIC-5とHK α の免疫染色

A-Cは (D-F、G-Iも同様) 顕微鏡下での同じ組織を示している。ブタ胃粘膜における免疫二重染色を、抗CIC-5抗体 (SS53) 及び抗HK α 抗体 (1H9) (A-I) を用いて行った。CIC-5 (AとD)、HK α (BとE)、CIC-5とHK α の重ね合わせ画像 (CとF) を示す。

対物レンズ倍率: $\times 20$ (A-C、G-I) 及び $\times 63$ (D-F)。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ (A-C、G-I)、 $10 \mu\text{m}$ (D-F)。

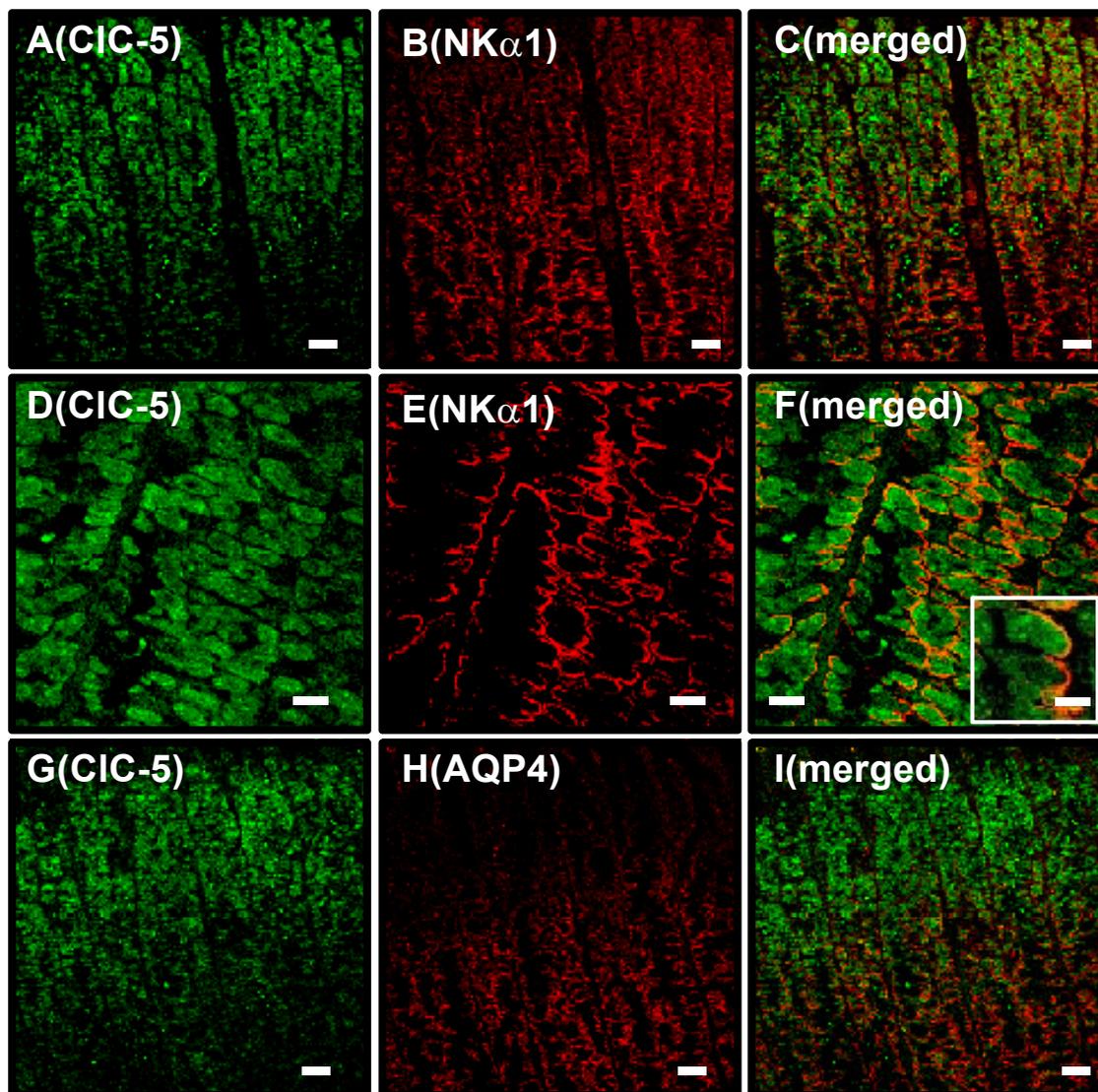


図1-6 ブタ胃粘膜におけるCIC-5、NK α 1及びAQP4の免疫組織染色

A-Cは (D-FやG-Iも同様) 顕微鏡下において同じ組織を示す。ブタ胃粘膜における免疫二重染色を、抗CIC-5抗体 + 抗NK α 1抗体 (A-F)、及び抗CIC-5抗体 + 抗AQP4抗体 (G-I) を用いて行った。CIC-5 (A、D、G)、NK α 1 (BとE)、CIC-5とNK α 1の重ね合わせ画像 (CとF)、AQP4 (H)、CIC-5とAQP4の重ね合わせ画像 (I) を示す。Fの挿入図は胃酸分泌細胞の拡大像を示している。対物レンズ倍率：×20 (A-CとG-I)、×40 (D-F)。スケールバーは50 μ m (A-CとG-I)、10 μ m (Fの挿入図)、20 μ m (D-F)。

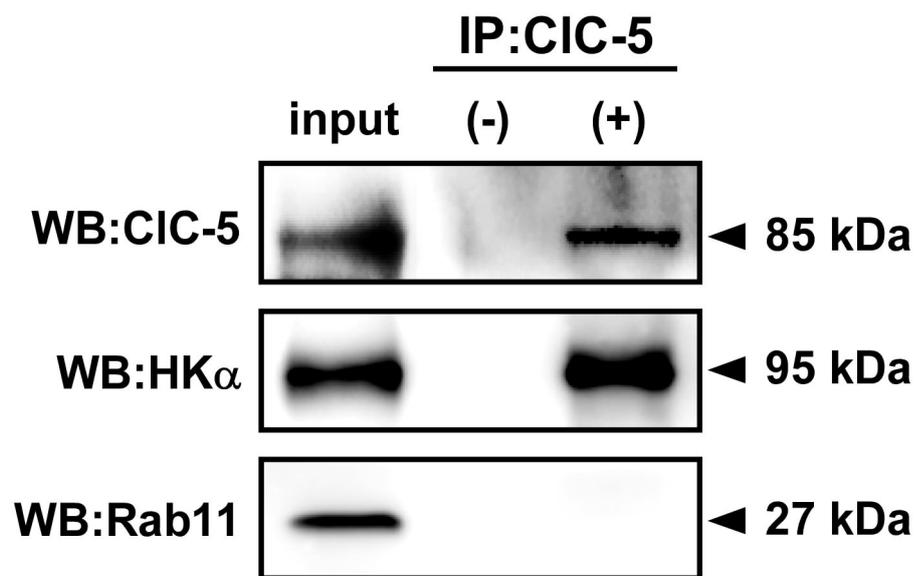


図1-7 ブタ胃細管小胞サンプルにおけるH⁺,K⁺-ATPaseとClC-5の免疫沈降
 抗ClC-5抗体 (SS58) とprotein A/G-agaroseを用いて、ブタTV (100 μg) のライセートより免疫沈降サンプル (IP) を調製した (IP: ClC-5, +)。コントロール実験では、抗体の代わりに免疫前血清を使用した (IP: ClC-5, -)。ライセート及び免疫沈降サンプルを、HK α (1H9)、Rab11及びHRP標識したClC-5 (SS58) を用いたウェスタンブロッティング (WB) によって検出した。免疫沈降実験は、独立して3回行った。

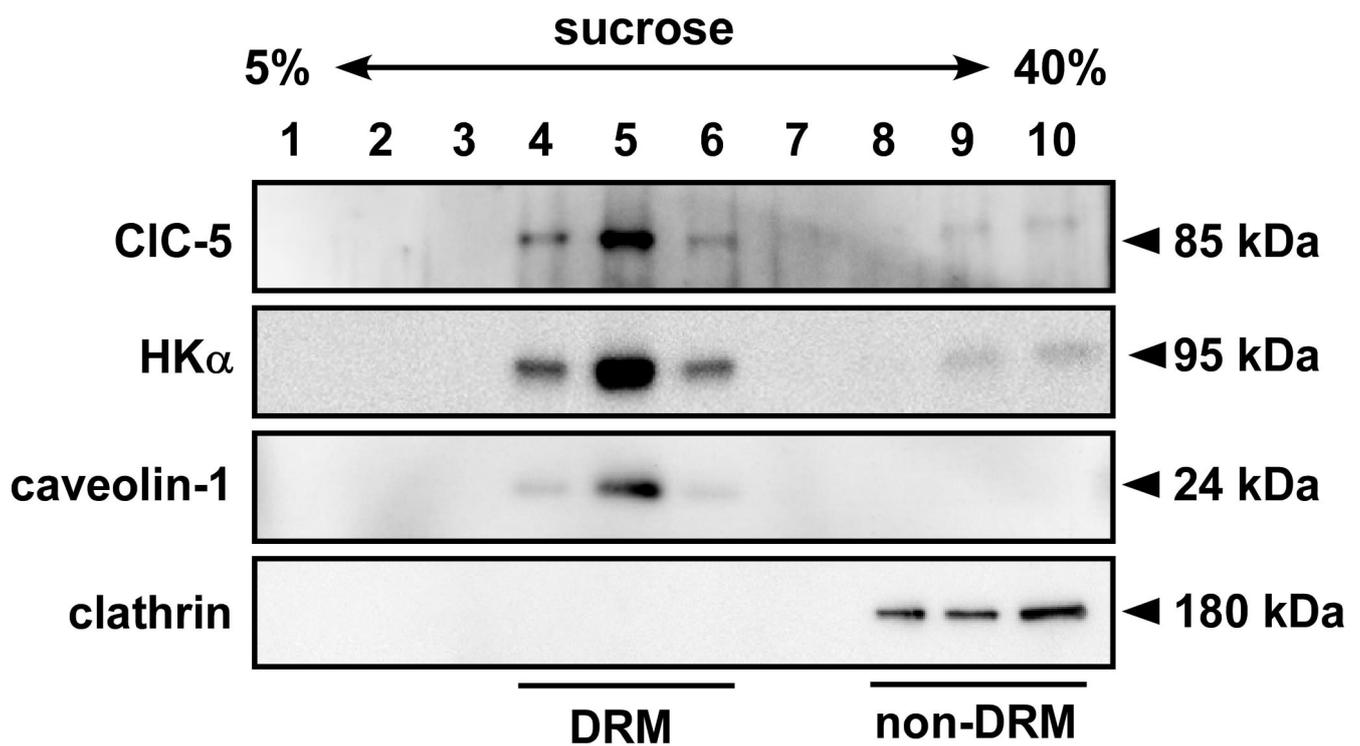


図1-8 Detergent-resistance membrane (DRM) におけるCIC-5とHKαの発現
 DRM画分と非DRM画分をショ糖勾配 (5から40%) を用いてブタ胃細管小胞から単離した。ウェスタブロットィングは、CIC-5 (SS53)、HKα (Ab1024)、caveolin-1 及びclathrin抗体を用いて行った。

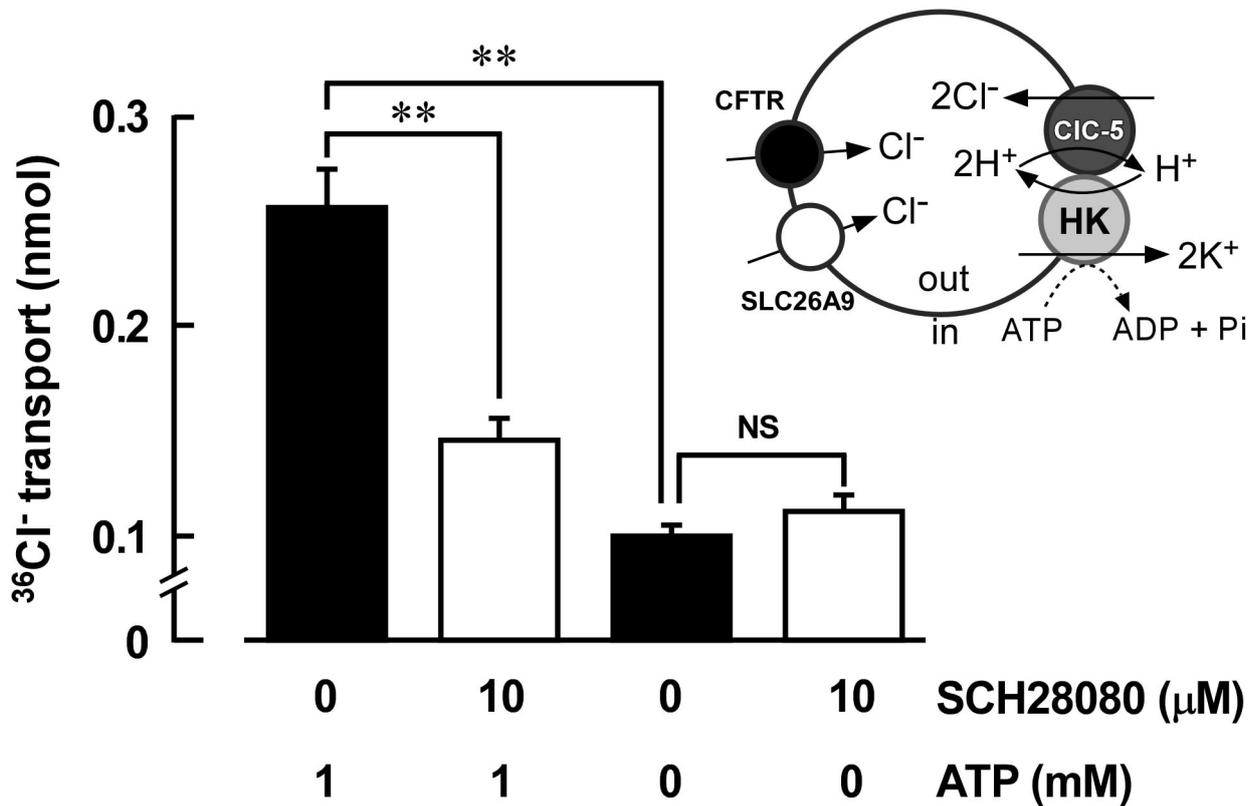


図1-9 H^+, K^+ -ATPaseの阻害剤 (SCH28080) によるTVの $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みの阻害
 TVへの $^{36}\text{Cl}^-$ の取り込みを測定した。 $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みに対する1 mM ATPの効果に10 μM SCH28080の有/無において調べた。コントロールの取り込みは、ATPの非存在下で測定した。n = 10。NS; 有意差なし ($P > 0.05$)。**; 有意差あり ($P < 0.01$)。

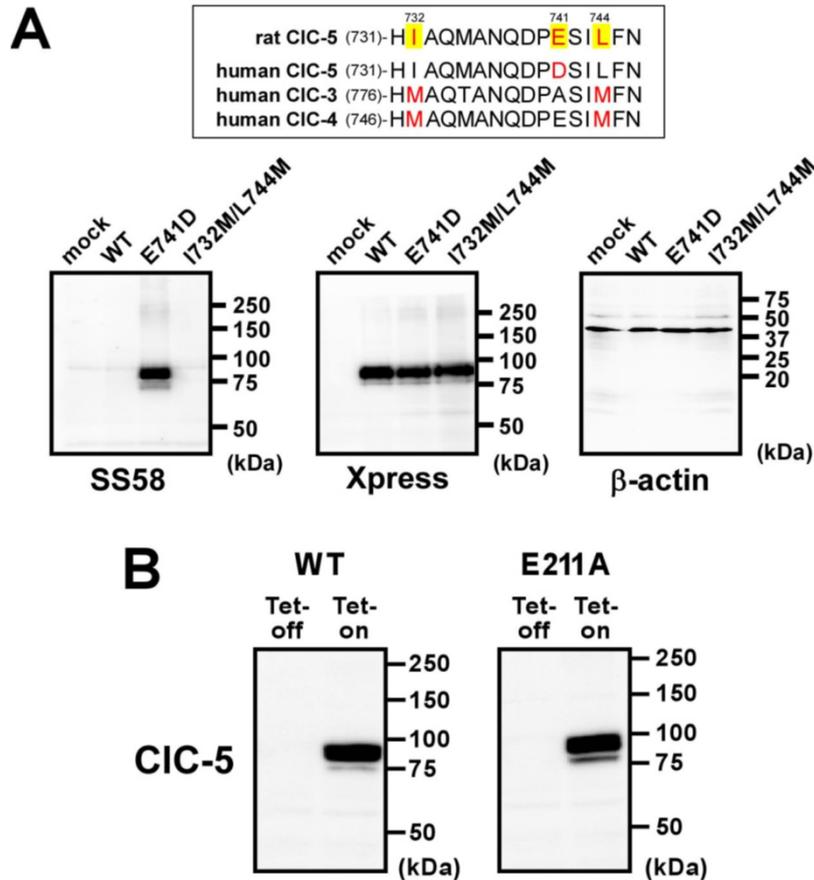


図1-10 胃H⁺,K⁺-ATPase安定発現HEK293細胞におけるCIC-5の tetracyclineによる発現調節

(A) rat CIC-5、human CIC-5、human CIC-3及びhuman CIC-4における抗CIC-5抗体のエピトープ周辺のアラインメントを示している（上図）。WT-CIC-5、E741D-CIC-5及びI732M/L744M-CIC-5を、HEK293細胞に一過性にトランスフェクションした。下図では、抗CIC-5抗体（SS58）（左）、抗Xpress抗体（中央）及び抗β-actin抗体（右）を用いた膜フラクション（50 μgのタンパク質）のウェスタンブロットティングを示した。mockトランスフェクション細胞では、有意なシグナルは観察されなかった。

(B) WT-CIC-5及びE211A-CIC-5の tetracycline調節発現系を、胃H⁺,K⁺-ATPase安定発現HEK293細胞に導入した。2 μg/ml tetracyclineの処理細胞をTet-on、未処理細胞をTet-offと示した。WT-及びE211A-CIC-5の発現は、細胞の膜画分（30 μg）を、抗Xpress抗体を用いたウェスタンブロットティングにおいて確認した。

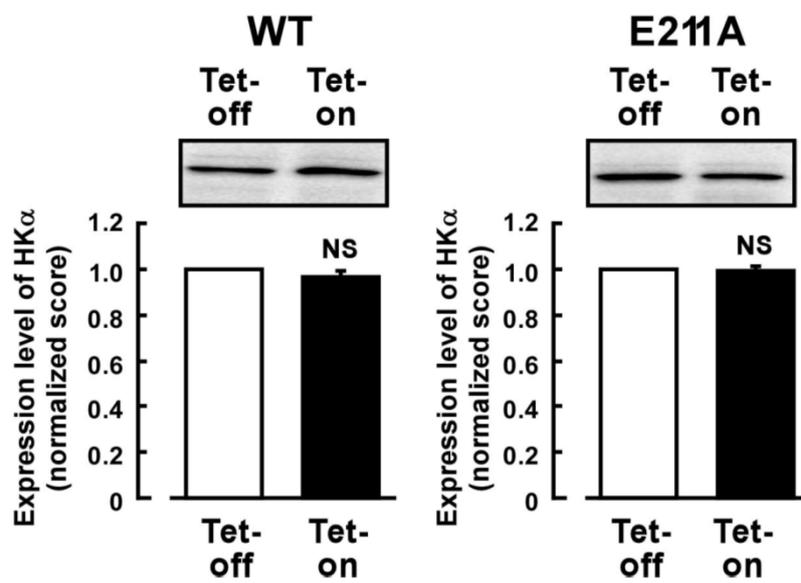


図1-11 HEK293細胞におけるHKαの発現

Tet-on細胞におけるHKαの発現レベルを、Tet-off細胞と比較した。上図では、ウェスタンブロッティングの典型例を示した。下図では、Tet-off細胞のHKαの発現レベルを1として標準化したグラフを示している。n = 6。NS、 $P > 0.05$ 。

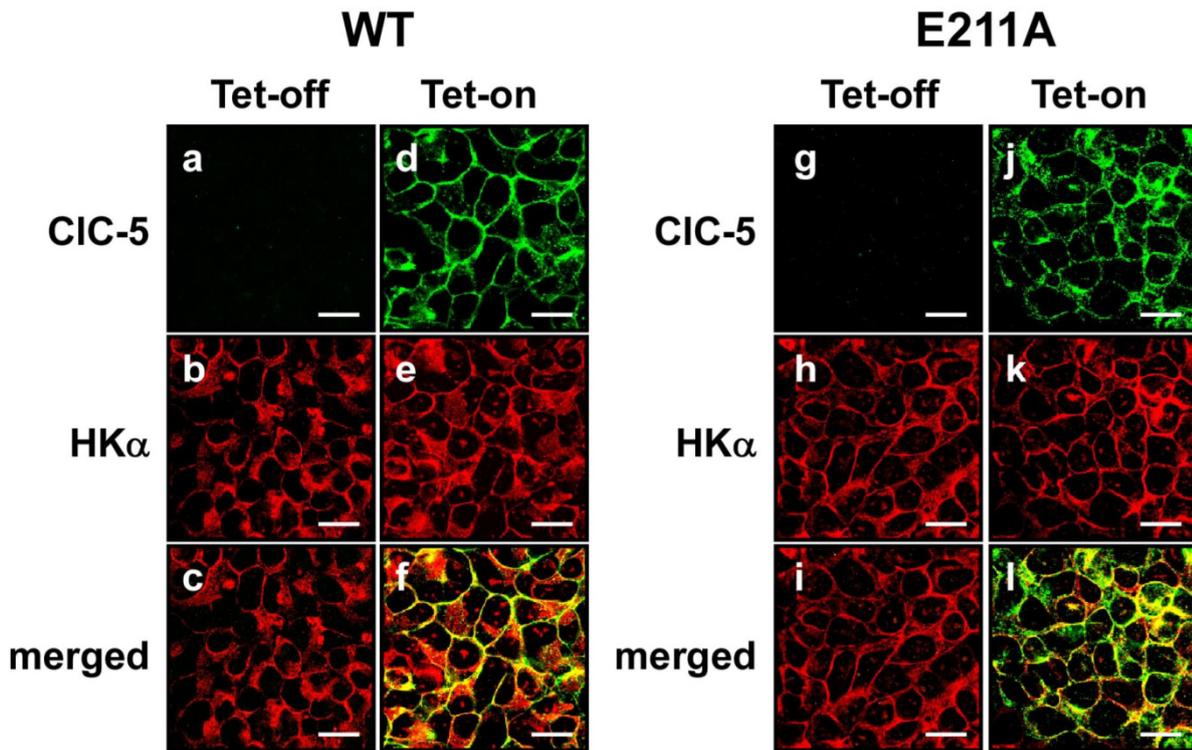


図1-12 HEK293細胞におけるC1C-5とHKαの免疫細胞染色

a-cは、顕微鏡下で同じ細胞を示す (**d-f**、**g-i**、**j-l**も同様)。WT Tet-off細胞 (**a-c**)、WT Tet-on細胞 (**d-f**)、E211A Tet-off細胞 (**g-h**)、E211A Tet-on細胞 (**j-l**) について、抗Xpress抗体 (C1C-5検出用) と抗HKα抗体 (Ab1024) を用いて免疫二重染色を行った。WT-C1C-5 (**a**と**d**)、E211A-C1C-5 (**g**と**j**) とHKα (**b**、**e**、**h**及び**k**)、WT-C1C-5 + HKα (重ね合わせ画像、**c**及び**f**)、及びE211A-C1C-5 + HKα (重ね合わせ画像、**i**及び**l**) の局在を示した。スケールバーは20 μm。

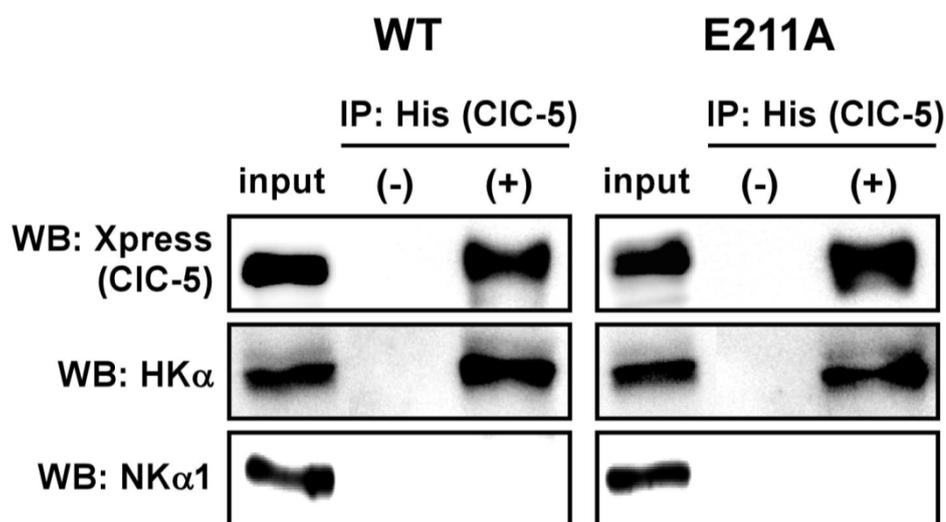


図1-13 HEK293細胞におけるC1C-5とHK α の免疫沈降

WT-C1C-5 (左) 及びE211A-C1C-5 (右) のTet-on細胞のライセートにおいて、抗His-tag抗体 (C1C-5のN末のHisタグを認識) 及びprotein A-agaroseを用いて免疫沈降した。トータルライセート (input)、および抗体の有り (IP: His (C1C-5),+)、無し (IP: His (C1C-5), -) において調製した免疫沈降サンプルを、C1C-5を検出するための抗Xpress抗体 (上)、抗HK α 抗体 (1H9; 中央) 及び抗NK α 1抗体 (下; 100 kDa) を用いたウェスタンブロッティング (WB) で検討した。抗Xpress抗体及び抗HK α 抗体は、HRPで標識したものをを用いた。n = 3。

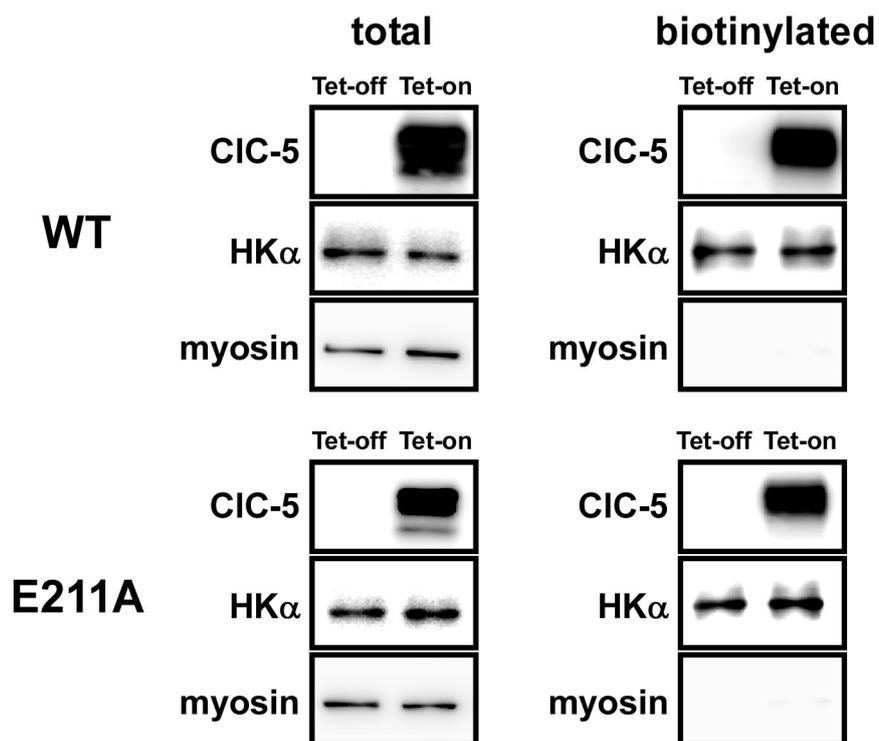


図1-14 HEK293細胞における細胞表面ビオチン化実験

WT-CIC-5（上図）及びE211A-CIC-5（下図）のTet-on細胞及びTet-off細胞において細胞表面ビオチン化実験を行った。WT-CIC-5またはE211A-CIC-5のトータルライゼート（total）（左）とビオチン化サンプル（biotinylated）（右）において、抗Xpress（CIC-5用）、抗HKα（1H9）及び抗myosin（230 kDa）抗体をそれぞれ用いてウェスタンブロッティングを行った。

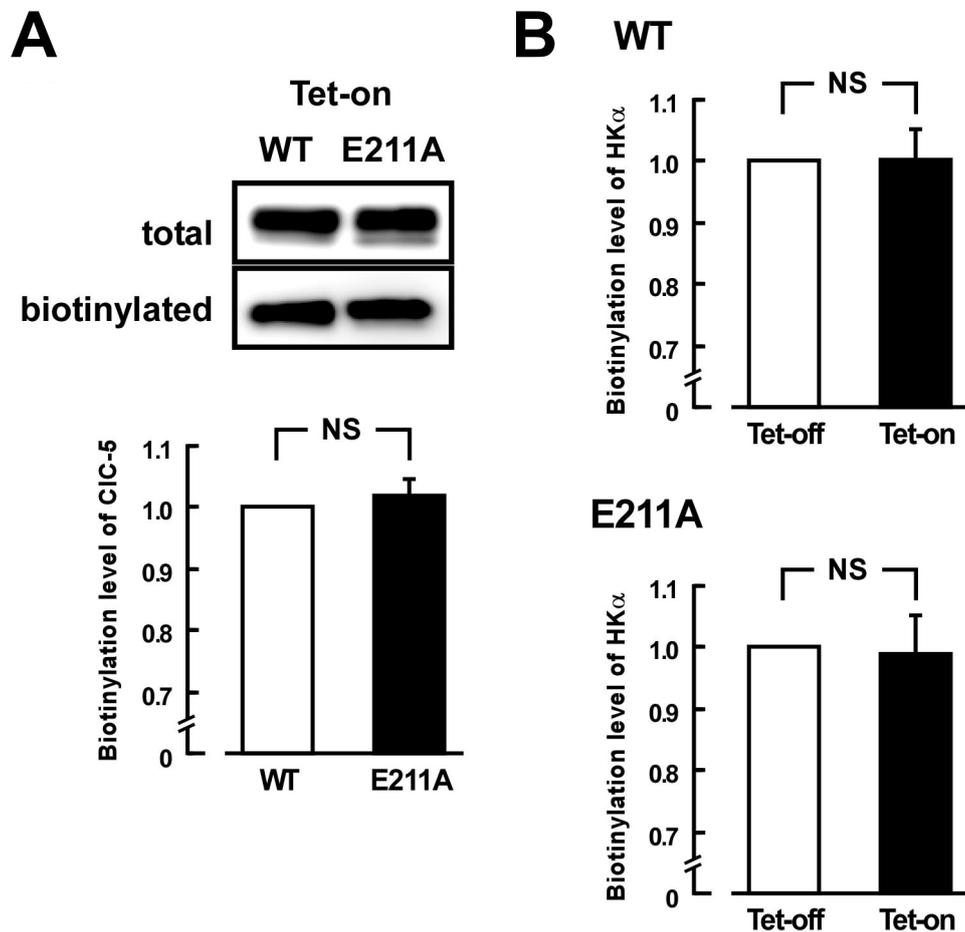


図1-15 HEK293細胞の原形質膜におけるCIC-5の発現

(A) WTのTet-on細胞のビオチン化サンプルにおけるCIC-5の発現量を、E211A変異体のTet-on細胞のビオチン化サンプルにおけるE211A-CIC-5の発現量と比較した。上図は、ウェスタンブロットティングの典型例を表示した。下図は、ビオチン化レベルを次式を用いて評価した。WT-CIC-5 (WT) またはE211A-CIC-5 (E211A) のビオチン化レベル = (ビオチン化サンプルにおけるWT-CIC-5またはE211A-CIC-5の発現量) / (total lysateにおけるWT-CIC-5またはE211A-CIC-5の発現量)。WT-CIC-5細胞のスコアを1に標準化した。n = 6。NS; $P > 0.05$ 。

(B) Tet-on細胞とTet-off細胞におけるビオチン化サンプルにおけるHK α の発現量の比較 (上、WT; 下、E211A)。Tet-off細胞におけるHK α の定量化スコアを1に標準化した。n = 6。NS; $P > 0.05$ 。

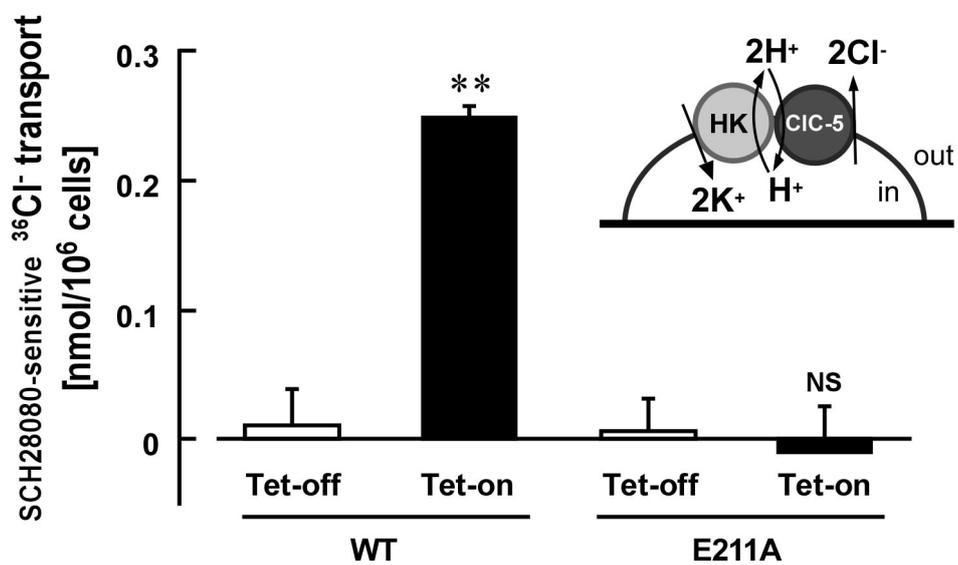


図1-16 HEK293細胞における H^+,K^+ -ATPase依存性 $^{36}Cl^-$ 輸送活性
 $^{36}Cl^-$ を、WT-ClC-5及びE211A-ClC-5のTet-onとTet-off細胞に取り込ませた。細胞外への $^{36}Cl^-$ 輸送活性を10 μ M SCH28080の存在下及び非存在下で測定し、SCH28080感受性 (H^+,K^+ -ATPase依存性) の輸送活性を算出した。n = 4-6。NS; 有意差なし ($P > 0.05$)。**; 有意差あり ($P < 0.01$)。

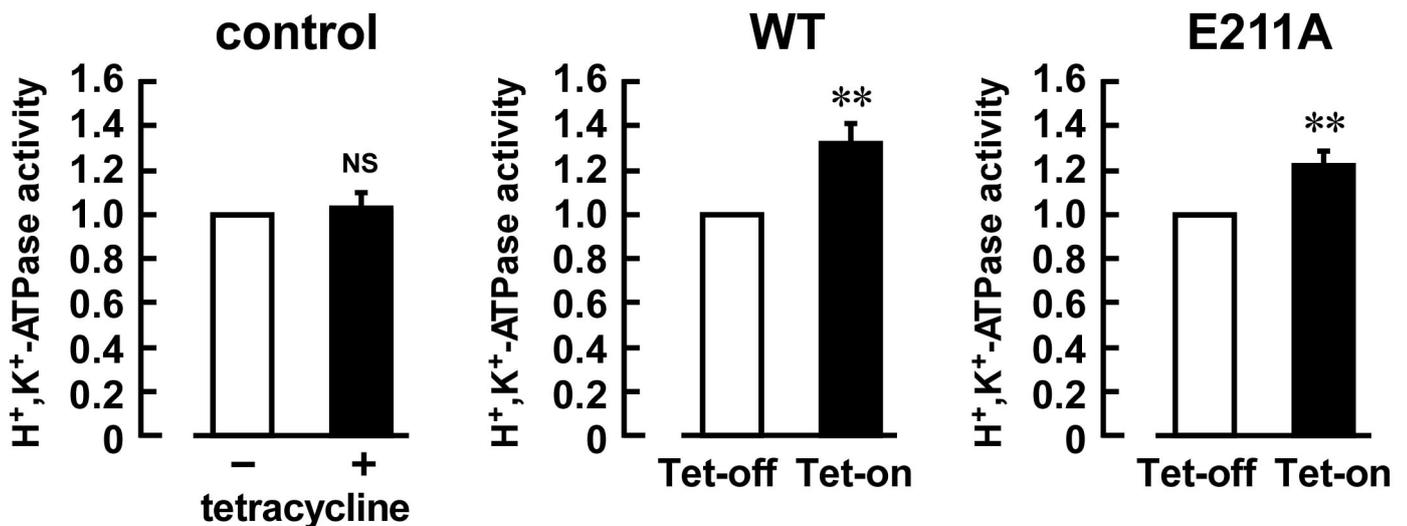


図1-17 ClC-5発現細胞におけるH⁺,K⁺-ATPase活性のアップレギュレーション
 コントロールHEK293細胞 (左; control)、WT-ClC-5のTet-on及びTet-off細胞 (中央; WT) 及びE211A-ClC-5のTet-on及びTet-off細胞 (右; E211A) におけるH⁺,K⁺-ATPase活性をtetracyclineの処理 (+) / 未処理 (-) において測定した。Tet-on細胞は、細胞を2 µg/ml のtetracyclineで12時間処理した。H⁺,K⁺-ATPase活性 = [(Tet-on細胞におけるH⁺,K⁺-ATPase活性) / (Tet-on細胞におけるHKαのタンパク質発現レベル)] / [(Tet-off細胞におけるH⁺,K⁺-ATPase活性) / (Tet-off細胞におけるHKαのタンパク質発現レベル)]。WT及びE211AのTet-off細胞のH⁺,K⁺-ATPase活性は、それぞれ、0.21 ± 0.03及び0.24 ± 0.02 µmol Pi/mg of protein/h (n = 6) であった。Tet-off細胞のH⁺,K⁺-ATPase活性を1として標準化した。n = 6。**; P < 0.01。

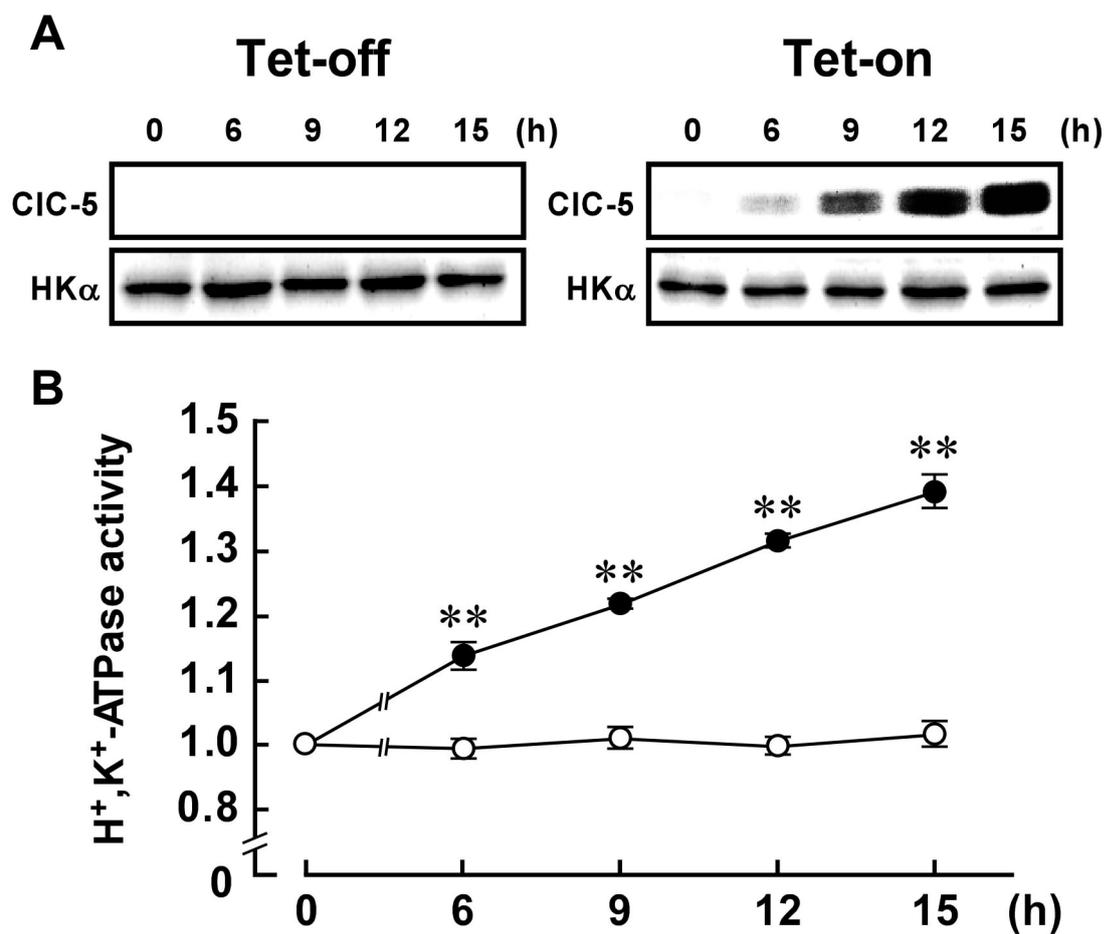


図1-18 WT-CIC-5タンパク質の発現レベルに依存したH⁺,K⁺-ATPase活性の上昇
 2 μ g/ml tetracyclineで処理 (Tet-on) もしくは未処理 (Tet-off) の細胞において、様々な時間 (6、9、12、15時間) におけるH⁺,K⁺-ATPase活性を測定した。Aでは、Tet-on (右) とTet-off (左) でのCIC-5及びHK α タンパク質の発現レベルを示している。Bでは、各試料のH⁺,K⁺-ATPase活性を、図1-17の計算式に従って算出した。データは平均値 \pm 標準誤差として示した。(●、Tet-on ; ○、Tet-off)。n = 6。** ; Tet-offと有意差有り ($P < 0.01$)。

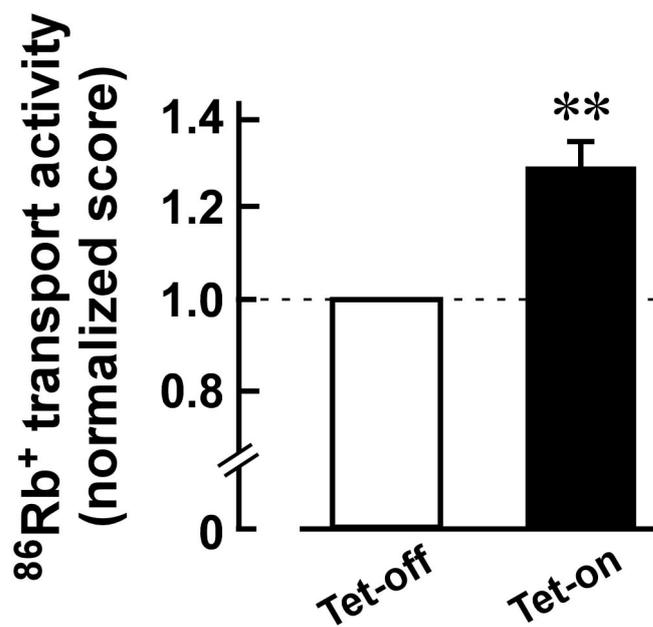


図1-19 WT-C1C-5のTet-on及びTet-off細胞における⁸⁶Rb⁺輸送活性
⁸⁶Rb⁺輸送活性は、50 μM SCH28080の存在下及び非存在下で測定し、SCH28080感受性 (H⁺,K⁺-ATPase依存性) 輸送活性を算出した。スコアは以下の式を用いて算出した。標準化⁸⁶Rb⁺輸送活性 = (Tet-on細胞における活性) / (Tet-off細胞における活性)。Tet-off細胞の⁸⁶Rb⁺輸送活性は、0.34 ± 0.07 nmol ⁸⁶Rb⁺/min/10⁶ cells (n = 5)。Tet-off細胞のスコアを、1に標準化した。n = 5。**: P < 0.01。

第二部

胃酸分泌細胞に発現する分子シャペロン **ERp57** による

H⁺,K⁺-ATPase 活性の調節

【要約】

ERp57 は、ジスルフィドイソメラーゼ活性を有するユビキタス ER シャペロンである。本研究で、ERp57 と H⁺,K⁺-ATPase の両者が、胃酸分泌細胞の頂端膜由来サンプルに発現していることを見出した。H⁺,K⁺-ATPase を安定発現する HEK293 細胞における ERp57 の過剰発現は、H⁺,K⁺-ATPase の発現レベルを変化させることなく、H⁺,K⁺-ATPase 活性を増加させた。興味深いことに、HEK293 細胞における ERp57 の触媒的に不活性な変異体 (C57S / C60S / C406S / C409S) の過剰発現も H⁺,K⁺-ATPase 活性を増加させた。対照的に、H⁺,K⁺-ATPase を発現する細胞において、内因性 ERp57 のノックダウンは、H⁺,K⁺-ATPase の発現レベルを変更することなく、有意に H⁺,K⁺-ATPase 活性を減少させた。ERp57 の過剰発現及びノックダウンは、Na⁺,K⁺-ATPase の発現及び機能には有意な影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ERp57 はそのシャペロン機能とは別に胃 H⁺,K⁺-ATPase 活性を正に調節することが考えられる。

【緒言】

小胞体 (ER) の内腔は、特殊なタンパク質フォールディング環境を保持している。ER には calreticulin, calnexin 及び ERp57 (GRP58, ERp60, ERp61, PDI-Q2, Pdia3, 1,25D₃-MARRS と呼ばれる) などの分子シャペロンが存在している (Bedard et al., 2005; Ni et al., 2007)。ERp57 は、ユビキタスに存在する ER チオール依存性タンパク質ジスルフィドイソメラーゼであり、糖タンパク質のフォールディングにおいてジスルフィド結合の形成を促進する (Freedman et al., 2002; Sitia and Braakman, 2003; Coe and Michalak, 2010)。最近、ERp57 は、細胞表面、細胞質及び核などの ER 以外の細胞内コンパートメントに存在し、様々な細胞内機構に関与していることが報告されている (Turano et al., 2011; Aureli et al., 2013)。例えば、細胞表面において ERp57 はシグナル伝達やタンパク質トラフィッキングに関与している。また、細胞質の ERp57 は、mTOR と相互作用することによってレドックスセンシングタンパク質として働く。核において、ERp57 は、DNA に結合し、STAT3 シグナル伝達の調節に関与することが考えられている。

ERp57 の mRNA は、ヒトのすべての組織において検出されている。しかし、発現レベルは組織間で様々である。ERp57 は肝臓、肺、胎盤、膵臓及び腎臓において多く発現しているが、心臓、骨格筋、及び脳では低レベルで発現している (Koivunen et al., 1997)。胃粘膜には、表面上皮細胞、胃酸分泌細胞、頸部粘液細胞、主細胞及び腸クロム親和性様細胞のような様々な種類の細胞が存在している。これまで、ラット胃粘膜において、ERp57 は主細胞、頸部粘液細胞及び腸クロム親和性細胞様細胞に発現していることが報告されている (Iida et al., 1996)。また、ヒト胃腺がんでは、ERp57 のダウンレギュレーションが観察され、ERp57 の発現レベルの維持は、術後生存率と関連している (Leys et al., 2007)。

胃酸分泌細胞は、胃酸（HCl）を分泌する。また、主細胞は、胃酸によって活性化されるペプシノーゲンを分泌する。胃酸分泌細胞の形態は、酸分泌休止時と刺激時の間で劇的に異なる。休止時の胃酸分泌細胞において、細管小胞は、頂端膜の直下に存在し、網目状構造を形成している。酸分泌刺激を受けると、細管小胞同士が融合し、頂端膜に連結することで、大量の胃酸分泌が引き起こされる（Fujii et al., 2011; Fujii et al., 2009）。胃の H⁺分泌は、Na⁺,K⁺-ATPase や Ca²⁺-ATPase などの P 型 ATPase ファミリーに属するプロトンポンプ（H⁺,K⁺-ATPase）が担っている（Bublitz et al., 2010）。H⁺,K⁺-ATPase は、胃酸分泌細胞の頂端膜及び細管小胞の両方に発現している。本研究では、ERp57 が胃酸分泌細胞の頂端膜において高発現し、H⁺,K⁺-ATPase 活性を調節することを見出した。

【実験方法】

材料

抗 ERp57 マウスモノクローナル抗体は、Stressgen (San Diego, CA, USA) から入手した。胃 H⁺,K⁺-ATPase の発現は、抗 H⁺,K⁺-ATPase α-サブユニット (HKα) ウサギポリクローナル抗体 (Ab1024) (Fujii et al., 2009)、または抗 H⁺,K⁺-ATPase β-サブユニット (HKβ) マウスモノクローナル抗体 (2B6; Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya, Japan) を用いて検討した。抗 Na⁺,K⁺-ATPase α1-サブユニット (NaK α1) マウスモノクローナル抗体 (464.6) 及びポリクローナル抗体 (H300) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。胃 H⁺,K⁺-ATPase の特異的阻害剤である SCH28080、Na⁺,K⁺-ATPase 阻害剤の ouabain、抗β-actin マウスモノクローナル抗体は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から入手した。

ヒト及びブタサンプルの単離

ヒトの胃、肝臓及び大腸はヘルシンキ宣言の勧告及び倫理委員会の承認に従って富山大学病院で日本人患者の外科的切除切片から得た。すべての患者から、インフォームドコンセントを得た。以前に報告したように組織から膜画分を調製した (Sakai et al., 2006)。

ブタの胃は富山食肉センター (Toyama, Japan) から入手した。第一部と同様の方法でブタ胃粘膜から胃細管小胞由来ベシクル (TV) および頂端膜由来ベシクル (SAV) を調製した (Fujii et al., 2009)。

2-D PAGE とプロテインシーケンス

ReadyPrep Rehydration/Sample buffer [8M urea, 4% CHAPS, 50 mM dithiothreitol, 0.2% (w/v) Bio-Lyte 3/10 ampholytes, bromophenol blue, Bio-Rad] で処理したタンパク質サンプルを 7-cm Ready Strip IPG strip (pH 3-10, Bio-Rad) に塗布し、strip を 16 時間受動的に再水和した。strip に添加したタンパク質を、Protean IEF Cell (Bio-Rad) を用いて等電点電気泳動 (IEF) によって分離した。平衡緩衝液 I と II (Bio-Rad) を用いて平衡化した後、タンパク質を、9%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって、2 次元目の電気泳動として分離した。電気泳動後のゲルは、CBB 染色液で染色し、25% methanol、7% acetic acid を含有する溶液で脱色した。ゲルスポットから精製したタンパク質のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサー (PPSQ-21, Shimadzu Co.) により分析した。

ウェスタンブロットティング

第一部【実験方法】に記載した方法と同様にウェスタンブロットティングを行った。シグナルは、ECL plus system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) と Pierce Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) を用いて可視化した。

ERp57 (1 : 1,000 希釈)、HK α (1 : 10,000 希釈)、HK β (1 : 5,000 希釈)、pepsinogen (1 : 2,000 希釈)、 β -actin (1 : 5,000 希釈) および NaK α 1 (464.6; 1 : 5,000 希釈、H300; 1 : 2,000 希釈) 抗体をそれぞれ用いた。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗 IgG 抗体を、二次抗体 (1 : 5,000 希釈) として用いた。

免疫沈降

第一部【実験方法】に記載したように行った。SAV (200 μ g のタンパク質) の膜画分を氷上で 30 分間 lysis buffer 中 (0.5% triton X-100, 0.1% BSA 及び 1 mM EDTA を含む PBS) で可溶化し、90,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、30 分間遠心分離した。Lysate を、protein A/G-agarose beads でプレクリアし、上清を、転倒回転で 4 $^{\circ}$ C、14 時間、抗 ERp57 抗体 (1:50 希釈) の存在及び非存在下でインキュベーションした。サンプルを、転倒回転で 4 $^{\circ}$ C 下 6 時間、protein A/G-agarose beads と共にインキュベーションした。その後、beads を lysis buffer で 3 回洗浄し、SDS sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH6.7), 10% glycerol, 2% SDS 及び 2% mercaptoethanol] に懸濁した。サンプルは、ウェスタンブロッティングに使用した。ブロッティングでは、抗 ERp57 抗体を、Peroxidase Labeling kit-NH₂ (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用い、HRP で標識した。

免疫組織染色

単離したヒト胃粘膜の小片を OCT compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) に包埋し、8 μ m に薄切した。凍結切片を、5 分間氷冷メタノールで固定し、20 mM phosphate buffer (pH 7.4), 450 mM NaCl, 16.7 % goat serum 及び 0.3% Triton X-100 を含む溶液で、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、HK α (1 : 100 希釈)、pepsinogen (1 : 5,000 希釈)、ERp57 (1 : 100 希釈) に対する抗体で、4 $^{\circ}$ C で 14 時間インキュベーションした。Alexa Fluor 488 標識及び 546 標識抗 IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 1 : 100 希釈) を二次抗体として使用した。免疫蛍光画像は、Zeiss LSM 510 レーザー走査共焦点顕微鏡を用いて取得した。また、別に指示している実験において、periodate-lysine- paraformaldehyde (PLP) 固定粘膜を使用した。PLP 固定は第一部【実験方法】と同様の方法で行った。

プラスミド作製

ヒト ERp57 をコードする完全長 cDNA を、EcoRI 及び XbaI 制限部位を使用して pcDNA3.1/zeo (+) ベクター (Invitrogen) に挿入した。不活性型変異体 (ERp57-4C/S 変異体; C57S/C60S/C406S/C409S) を調製するために、QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) と 4 種のプライマー (C57S と C60S 用; センス、ttcggcccctggagtggacacagcaagagacttg、アンチセンス、caagtctcttgctgtgtccactccagggggcgaa; C406S と C409S 用; センス、ttttatgccccttgagtggtcacagtaagaacctggagc、アンチセンス、gctccaggttcttactgtgaccactccaaggggcataaaa) を使用した。変異導入した cDNA 配列は、ABI

PRISM310 シークエンサー (Applied Biosystems) を用いて確認した。

細胞培養と ERp57 の過剰発現

胃 H⁺,K⁺-ATPase α,β -サブユニットを安定発現する HEK293 細胞 (HEK293- $\alpha\beta$ 細胞) (Fujii et al., 2009; Kimura et al., 2002) は、100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 mg/ml G418, 0.2 mg/ml zeocin, 10% FBS を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 中で培養した。ERp57 または ERp57-4C/S 変異体の一過性発現のために、lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、ベクターを細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、12 時間培養した。

siRNA の導入

HEK293- $\alpha\beta$ 細胞に、ERp57 に対する 20 nM の Stealth RNAi siRNA (PDIA3-HSS179018) 及び Stealth RNAi negative control Low GC duplex (Invitrogen) を、lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションし、48 時間培養した。

ATPase 活性の測定

第一部【実験方法】に記載したように、HEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜画分 (30 μ g のタンパク質) の ATP 加水分解活性を測定した。H⁺,K⁺-ATPase と Na⁺,K⁺-ATPase の特異的活性を求めるため、それぞれ 50 μ M SCH28080 もしくは 100 μ M ouabain を用いた。

⁸⁶Rb⁺輸送活性

第一部【実験方法】に記載した方法と同様に行った。6 ウェルコラーゲンコートプレート上の HEK293- $\alpha\beta$ 細胞を、144 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM RbCl (2 \times 10⁶ cpm ⁸⁶Rb⁺) , 500 μ M ouabain, 10 μ M furosemide 及び 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) からなる溶液 1 ml 中で 37°C、10 分間インキュベーションした。H⁺,K⁺-ATPase に特異的な ⁸⁶Rb⁺輸送活性は、50 μ M SCH28080 の存在下及び非存在下における活性差として算出した。10 分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、1% Nonidet P-40, 144 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 及び 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) からなる lysis buffer 1 ml で溶解し、その後、サンプルの放射能を測定した。

細胞表面ビオチン化

第一部【実験方法】に記載した方法と同様に細胞表面のビオチン化実験を行った。6 ウェルコラーゲンコートプレート上で HEK293- $\alpha\beta$ 細胞を、0.5 mg/ml sulfo-NHS-ss-biotin 溶液で 37°C、30 分間処理した。その後、細胞を 1% triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 及び 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液 250 μ l で可溶化した。細胞ライセートを 4°C 下 20 分間、15,000 \times g で遠心分離した。上清 (500 μ g のタンパク質) を 4°C 下 4 時間、

avidin-agarose beads 100 μ l と転倒混和した。

グリコシダーゼ処理

膜画分 (25 μ g のタンパク質) もしくは avidin-agarose beads に捕捉されたビオチン化膜タンパク質を、0.1% SDS, 1% NP-40, 1 M 2-mercaptoethanol, 30 mM EDTA 及び 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2) を含む溶液中で 5 units の PNGase F で 37°C 下 1 時間処理した。

統計

結果は、第一部と同様にして、平均値 \pm 標準誤差として示した。群間の差は、一元配置分散分析によって分析し、多重比較についての補正は、Tukey's multiple comparison test を用いた。両群間の比較は、Student's *t* test を用いた。統計的有意差は、 $P < 0.05$ とした。

【結果】

ERp57は胃酸分泌細胞の頂端膜に高発現している

2-D PAGE を用いたプロテオーム解析を、ブタ胃粘膜から調製した 2 種類の小胞、胃酸分泌細胞の細管小胞由来ベシクル (TV) および頂端膜を含むベシクル (SAV) (Fujii et al., 2009)、において行った。本研究では、TV には存在せず、SAV において検出された約 57 kDa のスポットに注目した (図 2-1)。57-kDa のスポットは、タンパク質配列決定により ERp57 であると解析された。一連のプロテオーム解析において、SAV における ERp57 の発現レベルは、TV においてよりも顕著に高いことが確認された (図 2-2)。この ERp57 の発現パターンは、SAV において高発現する K⁺-Cl⁻-共輸送体 4 (KCC4) 及びβ-actin (Fujii et al., 2009) と同様であった。H⁺,K⁺-ATPase α-サブユニット (HKα) は TV 及び SAV の両方に発現していた (図 2-2)。また、ヒトの胃における ERp57 の発現レベルは、肝臓及び結腸の発現レベルと同等であった (図 2-2B)。

SAV における H⁺,K⁺-ATPase と ERp57 の関連

SAV において ERp57 が HKα と関連しているかどうかを検討するために、抗 ERp57 抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降ペレットのウェスタンブロッティングにおいて、抗 β-actin 抗体では β-actin のバンド (42 kDa) は検出されなかった (ネガティブコントロール)。他方、抗 HKα 抗体では HKα (95 kDa) の明確なバンドが得られた (図 2-3)。これらの結果から、ERp57 と H⁺,K⁺-ATPase は、胃酸分泌細胞の頂端膜において分子会合しているか、もしくは非常に近接して存在していることが考えられた。

胃酸分泌細胞における ERp57 と HKα の共局在

ERp57 と HKα 抗体を用いた二重標識免疫組織染色を、メタノール固定したヒト胃粘膜の凍結切片で行った (図 2-4)。ERp57 の強い発現は、HKα の発現する胃酸分泌細胞において観察された (図 2-4, a-c)。高倍率画像により、胃酸分泌細胞において ERp57 は、HKα と部分的に共局在 (黄色) していることが示された (図 2-4, d-f)。図 2-1 の結果を踏まえると、胃酸分泌細胞中で黄色を示す領域 (図 2-4, f) が、頂端膜であると考えられた。他方、緑と赤色の領域 (図 2-4, f) は、それぞれ細胞内細管小胞及び ER に対応していると考えられる。

次に、抗 ERp57 抗体の免疫反応性が、固定条件によって影響を受けたかどうかを検討した。抗 ERp57 抗体を用いたウェスタンブロッティングにおいて、メタノールで固定したヒト胃粘膜から調製した膜画分では ~57 kDa の単一のバンドが検出されたが、PLP 固定した胃粘膜から調製した膜画分では明瞭なバンドは検出することができなかった (図 2-5A)。抗 ERp57 抗体と抗 HKα 抗体を用いた二重標識免疫組織染色において、ERp57 と HKα の共局在は、メタノール固定したヒト胃粘膜の凍結切片では観察されたが、PLP 固定した粘膜で

は見られなかった (図 2-5B)。これらの結果から、メタノール固定したサンプルでは抗 ERp57 抗体の抗原性は保持されるが、PLP 固定したサンプルでは保持されないことが考えられた。

主細胞における ERp57 の発現レベルの検討

主細胞のマーカーである pepsinogen に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにおいて、ヒト胃粘膜の膜画分に約 38 kDa の単一バンドが得られた (図 2-6, a)。次に、ERp57 と pepsinogen の二重標識免疫組織染色をメタノール固定したヒト胃粘膜の凍結切片で行った。ERp57 は、pepsinogen が存在する胃主細胞において発現レベルが低かった。高倍率画像により、ERp57 の局在は、主細胞において pepsinogen とほとんど重複していないことが示された (図 2-6, e-g)。

ERp57 の過剰発現による H⁺,K⁺-ATPase 活性の亢進

ERp57 が胃酸分泌細胞に局在していることから、ERp57 と H⁺,K⁺-ATPase との機能的な関連性について検討した。ERp57 およびジスルフィドイソメラーゼ活性を持たない ERp57 の変異体 (ERp57-4C/S) (Hirano et al., 1995; Li and Camacho, 2003) を、H⁺,K⁺-ATPase α , β -サブユニット安定発現 HEK293 細胞 (HEK293- $\alpha\beta$ 細胞) において過剰発現させた (図 2-7)。ERp57-及び ERp57-4C/S トランスフェクション細胞における HK α 及び HK β の発現レベルは、mock (空ベクター) トランスフェクション細胞のものと有意差はなかった (図 2-7b 及び c)。細胞表面ビオチン化アッセイにおいて、ERp57 もしくは ERp57-4C/S をトランスフェクションした細胞の原形質膜における HK β のレベルは、mock トランスフェクション細胞における HK β のレベルと有意な差は見られなかった (図 2-8)。従って、HEK293- $\alpha\beta$ 細胞において、ERp57 のジスルフィドイソメラーゼ活性は H⁺,K⁺-ATPase の発現調節に寄与しないことが示唆された。

次に、これらの細胞において、SCH28080 感受性 K⁺-ATPase 活性 (H⁺,K⁺-ATPase 活性) を測定した (図 2-9A)。興味深いことに、ERp57 もしくは ERp57-4C/S トランスフェクション細胞における H⁺,K⁺-ATPase 活性は、mock トランスフェクション細胞よりも有意に増大していた (図 2-9A)。また、ERp57 もしくは ERp57-4C/S トランスフェクション細胞における SCH28080 感受性の ⁸⁶Rb⁺輸送活性 (H⁺,K⁺-ATPase の K⁺輸送活性) も、mock トランスフェクション細胞よりも有意に増大した (図 2-9B)。これらの結果より、ERp57 は、シャペロン機能とは異なる機構で H⁺,K⁺-ATPase 活性を調節することが示唆された。

他方、これらの細胞における Na⁺,K⁺-ATPase の発現及び活性について検討した。ERp57 もしくは ERp57-4C/S トランスフェクション細胞において、内因性 Na⁺,K⁺-ATPase α 1 サブユニット (NaK α 1) の発現量は、mock トランスフェクション細胞と有意な差はなかった (図 2-10A)。また、H⁺,K⁺-ATPase の場合とは異なり、ouabain 感受性 K⁺-ATPase 活性 (Na⁺,K⁺-ATPase 活性) は、ERp57 及び ERp57-4C/S の過剰発現の影響を受けなかった

(図 2-10B)。

HEK293- $\alpha\beta$ 細胞における内因性 ERp57 のノックダウンによる H⁺,K⁺-ATPase 活性の阻害

H⁺,K⁺-ATPase 発現レベルに対する、RNA 干渉 (RNAi) による ERp57 のノックダウン効果を、HEK293- $\alpha\beta$ 細胞で調べた。ERp57 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞 (si-ERp57 細胞) では、ネガティブコントロール siRNA (si-NC 細胞) をトランスフェクションした細胞及びコントロール HEK293- $\alpha\beta$ 細胞 (非トランスフェクション) と比較して、内因性の ERp57 タンパク質の発現レベルが顕著に減少した (図 2-11A)。si-ERp57 細胞における HK α と HK β の発現レベルは、si-NC 及びコントロール細胞と同程度であった (図 2-11A と B、及び図 2-12)。図 2-11C では、H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する ERp57 のノックダウンの効果を検討した。コントロール細胞に比べて、si-ERp57 細胞では SCH28080 感受性 K⁺-ATPase 活性 (H⁺,K⁺-ATPase 活性) の有意な減少が見られたが、si-NC 細胞では見られなかった (図 2-11C)。

次に、HEK293- $\alpha\beta$ 細胞における Na⁺,K⁺-ATPase の発現及び活性における ERp57 のノックダウンの効果を検討した。si-ERp57 細胞における内因性 NaK α 1 の発現レベルは、si-NC またはコントロール細胞での発現レベルと有意な差はなかった (図 2-13A 及び B)。H⁺,K⁺-ATPase の場合とは対照的に、si-ERp57 細胞における ERp57 のノックダウンにより、ouabain 感受性 K⁺-ATPase 活性 (Na⁺,K⁺-ATPase 活性) に有意な変化は見られなかった (図 2-13C)。

【考察】

ERp57 は、ユビキタスに存在する分子シャペロンであることが広く知られている (Freedman et al., 2002; Sitia and Braakman, 2003)。本研究では、新たに以下のことを見出した：(i) ERp57 は、ヒト胃粘膜の胃酸分泌細胞に多く発現していた。(ii) 頂端膜を含むベシクル (SAV) における ERp57 の発現レベルは、細管小胞由来ベシクル (TV) の発現レベルよりはるかに高かった。(iii) SAV において ERp57 は HK α と免疫共沈降した。

(iv) ERp57 の過剰発現及びノックダウンは、H⁺,K⁺-ATPase の発現レベルを変化させずに、H⁺,K⁺-ATPase 活性を有意に変化させた。他方、Na⁺,K⁺-ATPase の発現および活性には影響しなかった。Na⁺,K⁺-ATPase は H⁺,K⁺-ATPase と約 60%の相同性を有している。これらの結果から、ERp57 は、胃酸分泌細胞の頂端膜において H⁺,K⁺-ATPase 活性を調節している可能性が示唆された。これまでに、胃酸分泌細胞における ERp57 の発現及び機能についての報告はない。

ラット胃粘膜において、ERp57 は胃酸分泌細胞には低レベルで、主細胞でより高レベルに発現していることが報告されている (Iida et al., 1996)。しかし、本研究では、ヒト胃粘膜において、胃酸分泌細胞における ERp57 の発現レベルは、主細胞に比べて高いことを見出した。したがって、胃酸分泌細胞と主細胞における ERp57 の発現レベルは、動物種間で異なっている可能性が考えられる。他方、PLP 固定により抗 ERp57 抗体の抗原特異性が妨害されたことは、今後の研究において注意すべき問題である。

HK α はグリコシル化されていないのに対し、HK β は、9 個のシステイン残基を含み、高度にグリコシル化されている。HK β のジスルフィド結合は、HK α のフォールディング、原形質膜における HK α の発現レベルと H⁺,K⁺-ATPase 活性を維持するために必須である (Kimura et al., 2002)。本研究において、ERp57 の過剰発現及びノックダウンは、HK α 及び HK β の発現レベルには影響を与えなかった。また、ジスルフィドイソメラーゼ活性を持たない ERp57 の変異体の過剰発現は、野生型と同様に H⁺,K⁺-ATPase 活性を亢進させた。したがって、ジスルフィドイソメラーゼとしての ERp57 の機能は HK β のグリコシル化に関与していないものと考えられる。

近年、細胞表面においてシャペロン機能以外の ERp57 の予想外の機能が注目されている (Turano et al., 2011)。ニワトリの十二指腸では、ERp57 は、ビタミン D₃の即時反応受容体としての機能や、リン酸輸送に関与している (Nemere et al., 2004)。ヒト肝ガン細胞 Hep3B では、ERp57 が、細胞膜の脂質ラフト画分において STAT3 と共役して、STAT3 シグナル伝達に関与している (Sehgal et al., 2002)。Calreticulin は樹状細胞に対して「eat me signal」として働いているが、ERp57 は、calreticulin の細胞表面への露出を制御することにより、腫瘍細胞死の免疫原性を誘導する (Obeid et al., 2008)。ラット腎皮質では、ERp57 は原形質膜で Na⁺-Cl⁻共輸送体と会合し、トランスポーター機能を調節する (Wyse et al., 2002)。また、ERp57 は、精子の表面に位置し、精子-卵融合に貢献している

(Ellerman et al., 2006)。さらに、血小板の細胞表面 ERp57 は、血小板凝集、密顆粒分泌、フィブリノーゲン結合、カルシウム動員及び動脈条件下で血栓形成に関与している (Holbrook et al., 2012)。本研究では、胃酸分泌細胞の頂端膜に発現する ERp57 の新規な機能を明らかにした。ERp57 は、シャペロン機能とは異なる機構で、グリコシル化された H^+,K^+ -ATPase の活性を正に調節する。

酸分泌休止時では、頂端膜における H^+,K^+ -ATPase は、基礎胃酸分泌に関与している。刺激を受けると、細管小胞と頂端膜の両方に存在している H^+,K^+ -ATPase が、大量の胃酸分泌に関与する。Fujii ら (2009, 2011) は、KCC4 が主に胃酸分泌細胞の頂端膜に発現しており、その K^+-Cl^- 共輸送体が、頂端膜における H^+,K^+ -ATPase 活性と関連していることを見出した。ERp57 も胃酸分泌細胞頂端膜の H^+,K^+ -ATPase と関連しているので、ERp57 と KCC4 間の機能連関については今後の興味深い課題である。

結論として、ERp57 は、胃酸分泌細胞の頂端膜に高発現しており、基礎胃酸分泌に寄与している H^+,K^+ -ATPase 活性を調節している可能性が示唆された。

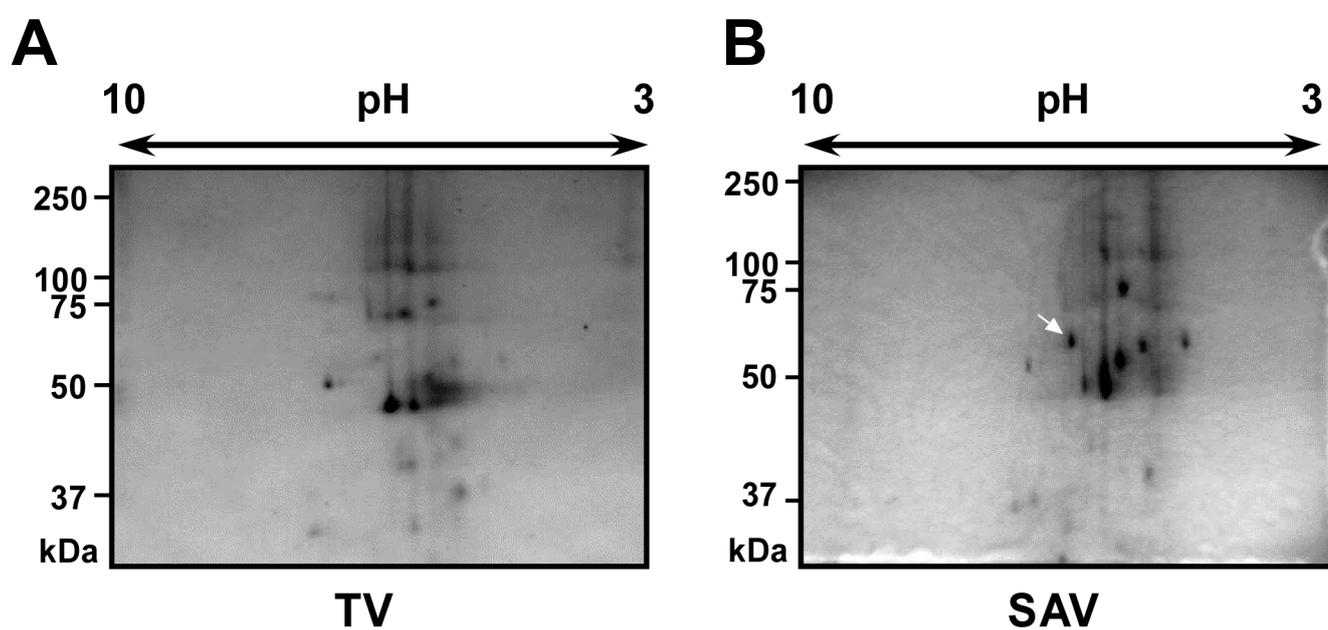


図2-1 TV及びSAVの2D-PAGE分析

(A) はTVについて、(B) はSAVについての2D-PAGE分析の結果を示した。
Bにおいて、矢印はERp57のスポットを示している。

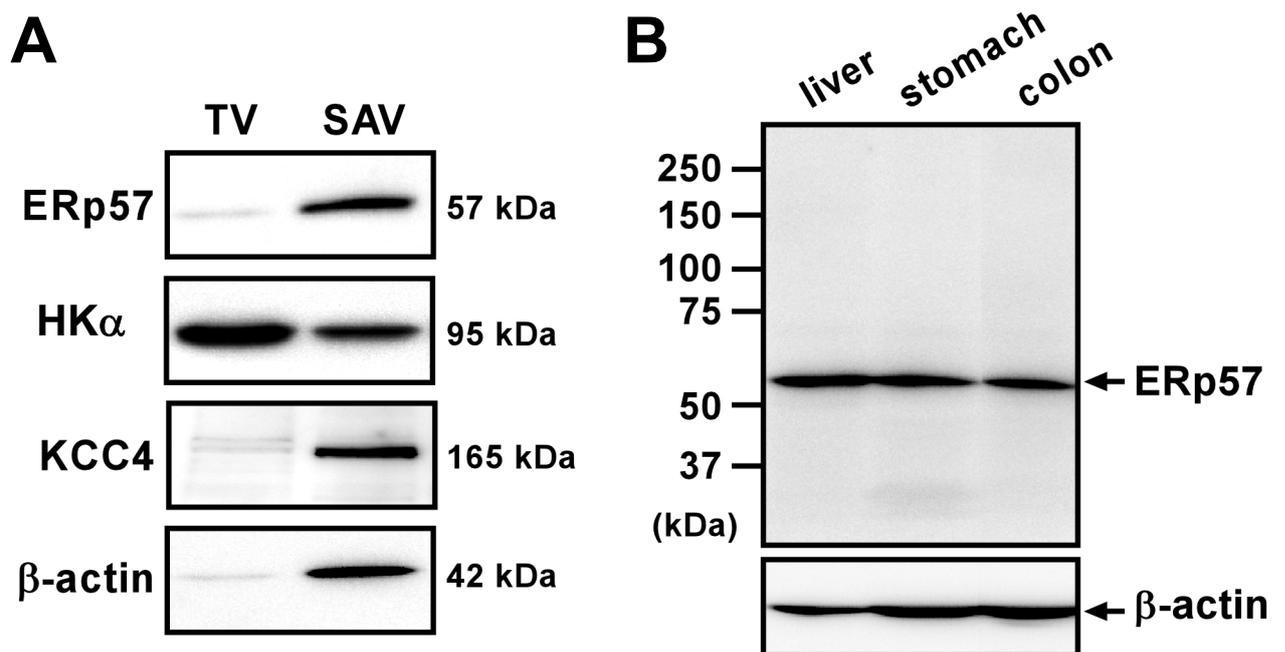


図2-2 ERp57、HKα、KCC4及びβ-actinについてのウェスタンブロッティング

(A) ERp57、HKα、KCC4及びβ-actin抗体を用いたTV及びSAV (30 μg) のウェスタンブロッティング。

(B) ERp57及びβ-actin抗体を用いたヒト肝臓、胃、及び大腸 (60 μg) の膜画分のウェスタンブロッティング。

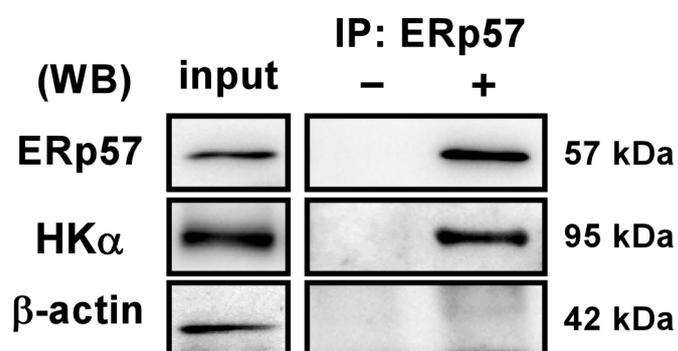


図2-3 SAVにおけるERp57とHKαの免疫沈降

抗ERp57抗体とprotein A/G-agaroseを使用してSAVのライセート（200 μgのタンパク質）から免疫沈降サンプル（IP）を調製した。トータルライセート（input）及び抗体を加えて（ERp57, +）もしくは加えず（ERp57, -）に調製した免疫沈降サンプル（IP）を、抗ERp57、抗β-actin及び抗HKα抗体を用いたウェスタンブロッティング（WB）により検出した。

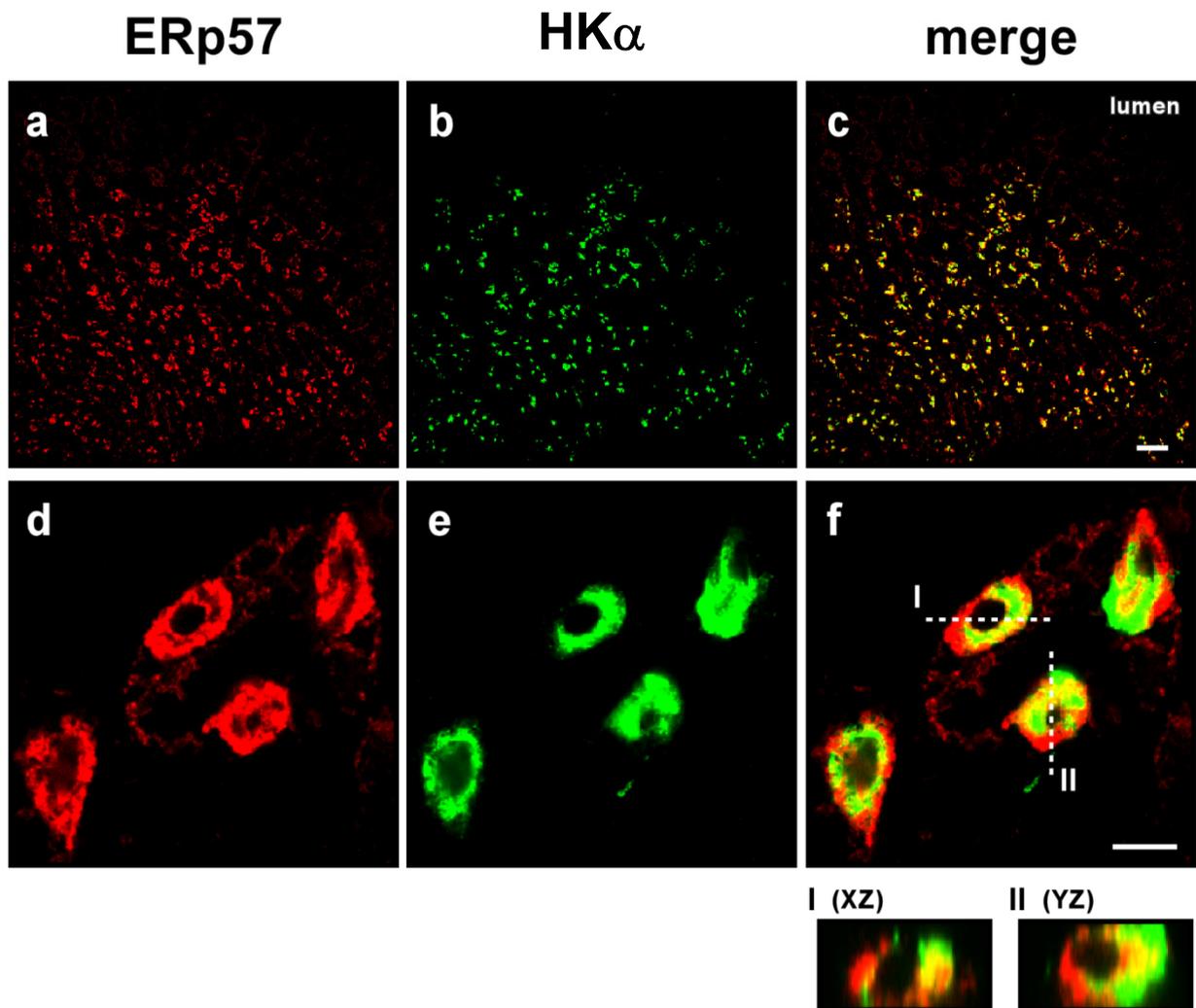


図2-4 ヒト胃粘膜における胃酸分泌細胞内のERp57の発現

(a-f) ヒト胃粘膜において、ERp57 (赤) とHKα (緑) 抗体を用いた免疫二重染色を行った。図は典型例を表示した。対物レンズ倍率は、×5 (a-c) 及び×63 (d-f)。fにおいて、断面図は、破線 (I, XZ断面; II, YZ断面) に沿って取得した。スケールバーは100 μm (a-c) 及び10 μm (d-f)。

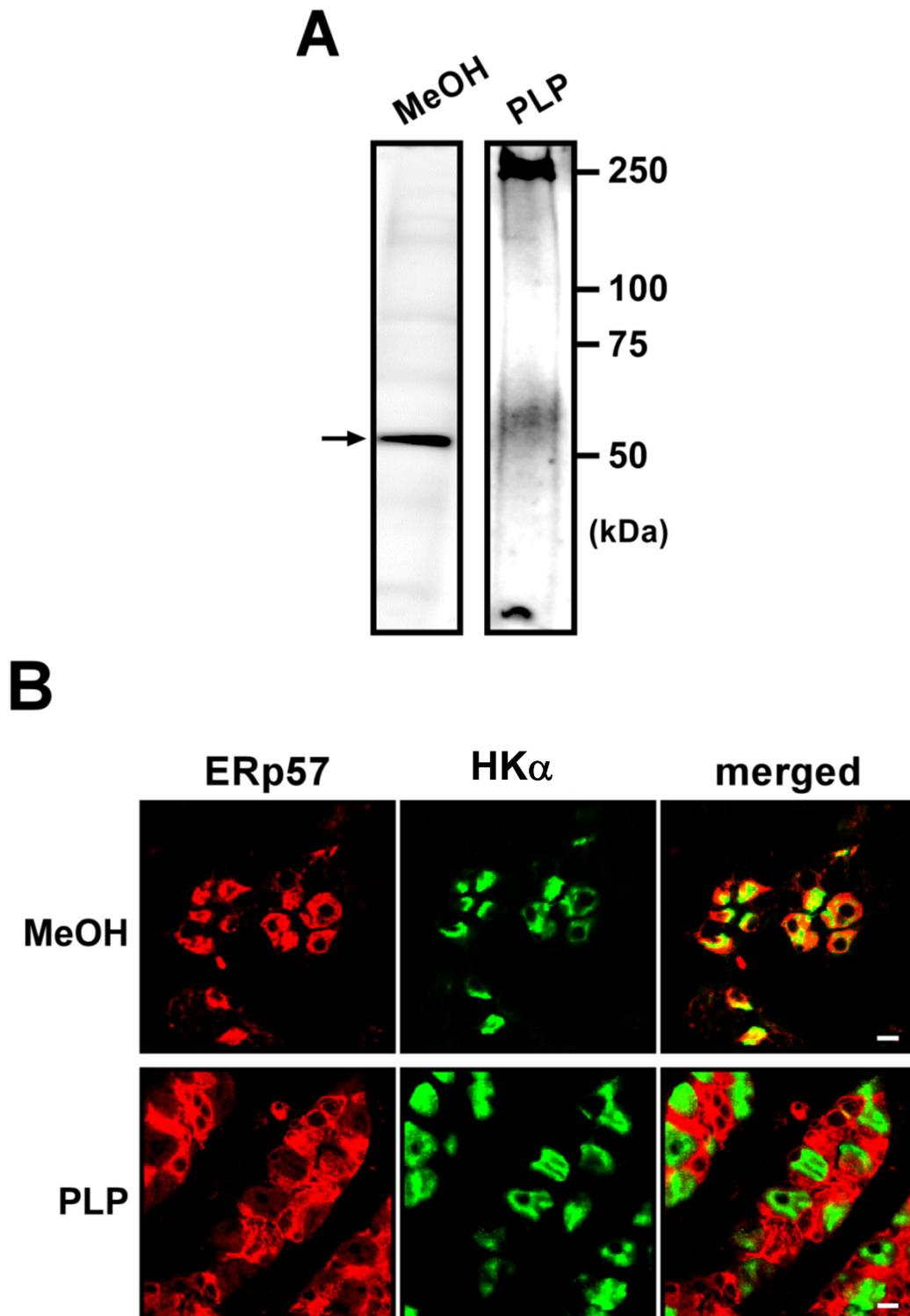


図2-5 メタノールまたはPLP固定したサンプルにおける抗ERp57抗体の免疫反応性
 (A) 抗ERp57抗体を用いてメタノールまたはPLPで固定したヒト胃粘膜 (30 μ gのタンパク質) の膜画分のウェスタンブロッティングを行った。メタノール (MeOH) 固定したサンプルで57 kDaの単一のバンドが観察されたが、PLP-固定サンプルでは見られなかった。
 (B) 抗ERp57 (赤色) 及び抗HK α (緑) 抗体を用いた免疫二重染色を、メタノール (MeOH) またはPLPで固定したヒト胃粘膜で行った。典型例を示した。対物レンズ倍率 \times 40。スケールバーは10 μ m。

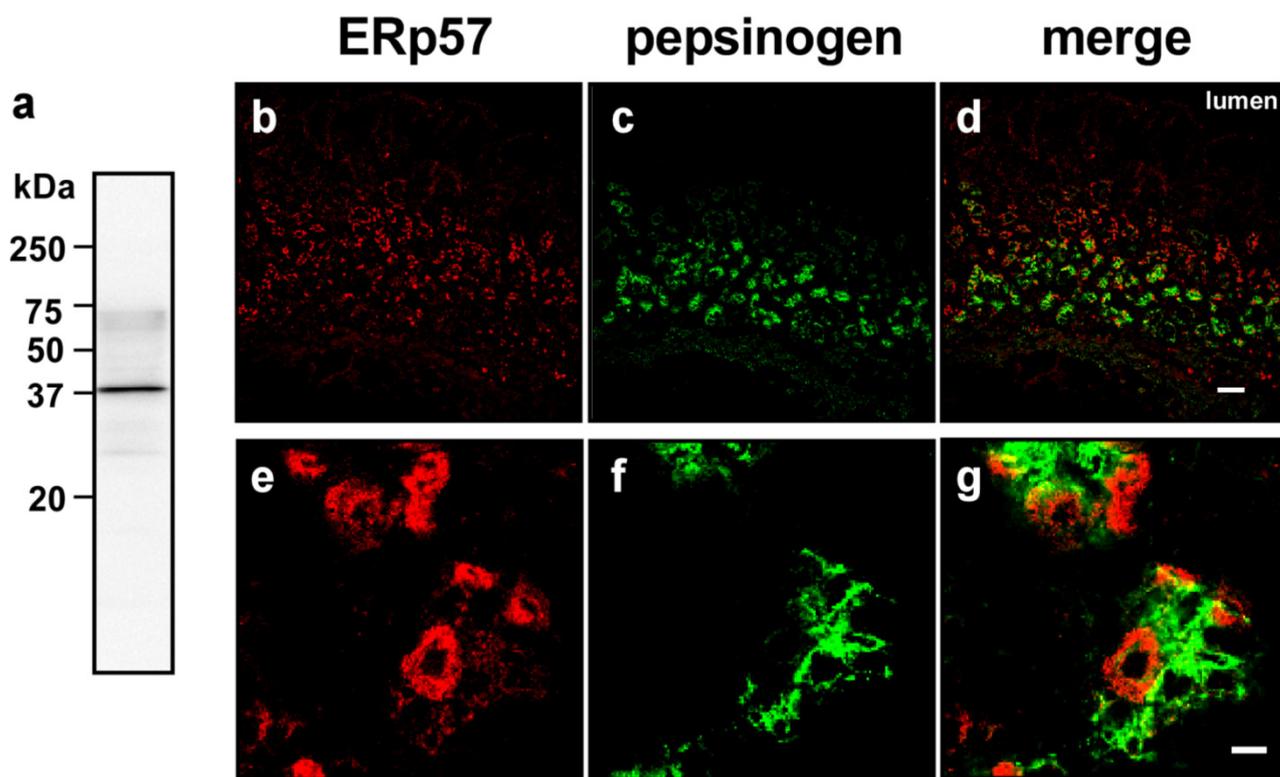


図2-6 主細胞におけるERp57の発現

(a) 抗pepsinogen抗体を用いて、ヒト胃粘膜 (30 μg のタンパク質) 膜画分のウェスタンブロッティングを行った。38 kDaの単一バンドが観察された。(b-g) ERp57 (赤) と pepsinogen (緑) 抗体を使用した免疫二重染色を、単離ヒト胃粘膜において行った。典型例を表示した。対物レンズ倍率は、 $\times 5$ (b-d) 及び $\times 40$ (e-g)。スケールバーは100 μm (b-d) 及び10 μm (e-g)。

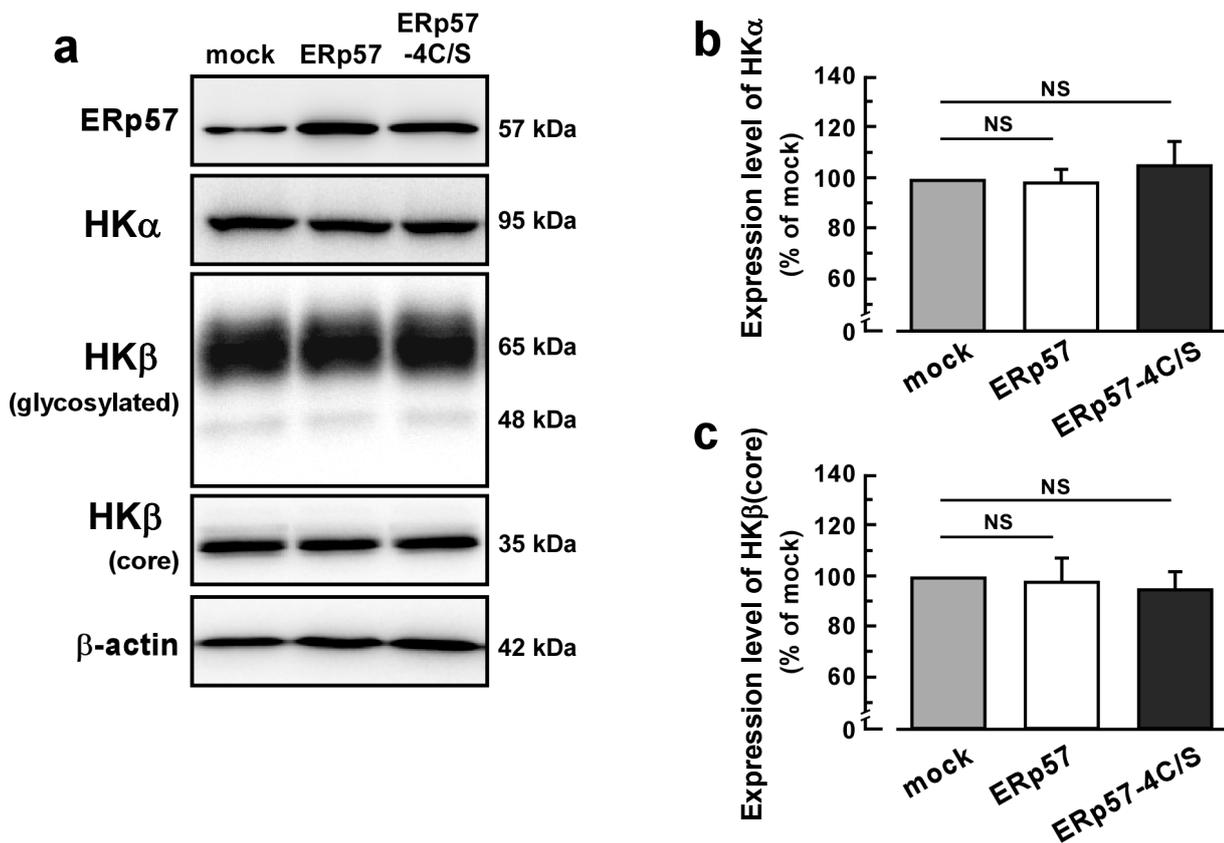


図2-7 HEK293- $\alpha\beta$ 細胞におけるERp57及びERp57-4C/S変異体の過剰発現

(a) pcDNA3.1/zeo (+) ベクター (mock) 及びERp57 cDNA (ERp57) またはERp57-4C/S cDNA (ERp57-4C/S) を含むベクターをトランスフェクションしたHEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜画分 (20 μ gのタンパク質) について、ERp57、HK α 、HK β 及び β -actin抗体を用いたウェスタンブロットティングを行った。HK β はPNGase Fの処理 (core)、未処理 (glycosylated) において行った。

(bとc) H⁺,K⁺-ATPaseの発現レベル。ERp57-及びERp57-4C/Sトランスフェクション細胞におけるHK α / β -actin (b) 及び、HK β (core)、 β -actin (c) の発現レベルを、mockトランスフェクション細胞と比較した。mockトランスフェクション細胞の値を100%として標準化した。n = 6。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

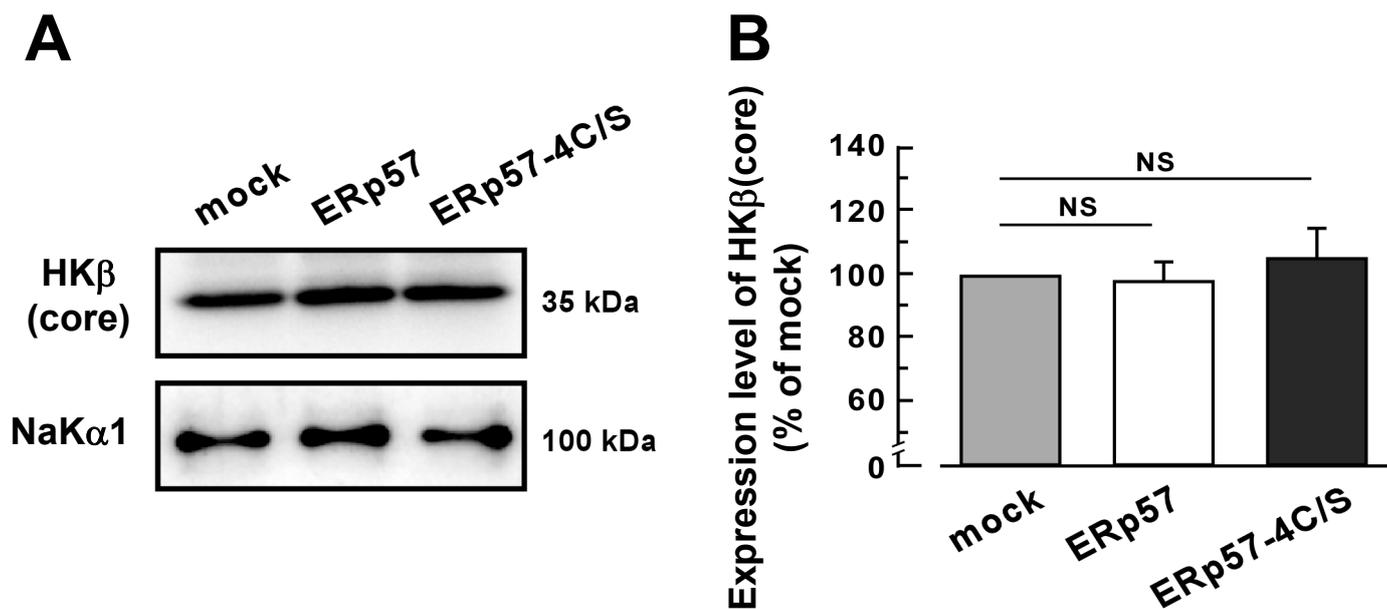


図2-8 原形質膜におけるHKβの発現レベル

(A) pcDNA3.1/zeo (+) ベクター (mock)、及びERp57 cDNA (ERp57) または ERp57-4C/S cDNA (ERp57-4C/S) のベクターをトランスフェクションしたHEK293-αβ細胞からのビオチン化サンプルにおいてHKβとNaKα1の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

(B) ビオチン化サンプルにおけるHKβの発現レベル。ERp57-及びERp57-4C/Sをトランスフェクションした細胞のビオチン化サンプルにおけるHKβ/NaKα1の発現スコアを、mockトランスフェクション細胞のビオチン化サンプルと比較した。mockトランスフェクション細胞の発現スコアを100%とした。n = 5。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

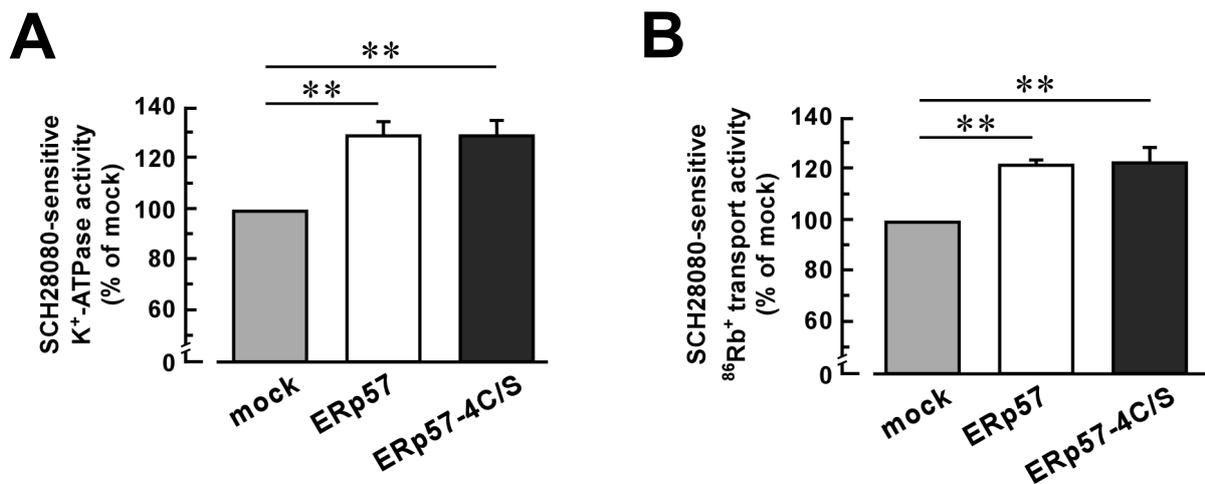


図2-9 mock、ERp57-及びERp57-4C/Sトランスフェクション細胞におけるH⁺,K⁺-ATPase活性

(A) SCH28080感受性K⁺-ATPase活性

(B) ⁸⁶Rb⁺の輸送活性の測定

それぞれの活性を、図2-8で示したHKαの発現レベル (図2-8 B) または全細胞数 (図2-8 C) で補正した。mockトランスフェクション細胞の活性を100%とした。n = 5-6。 ** ; 有意差あり (P < 0.01) 。 NS ; 有意差なし (P > 0.05) 。

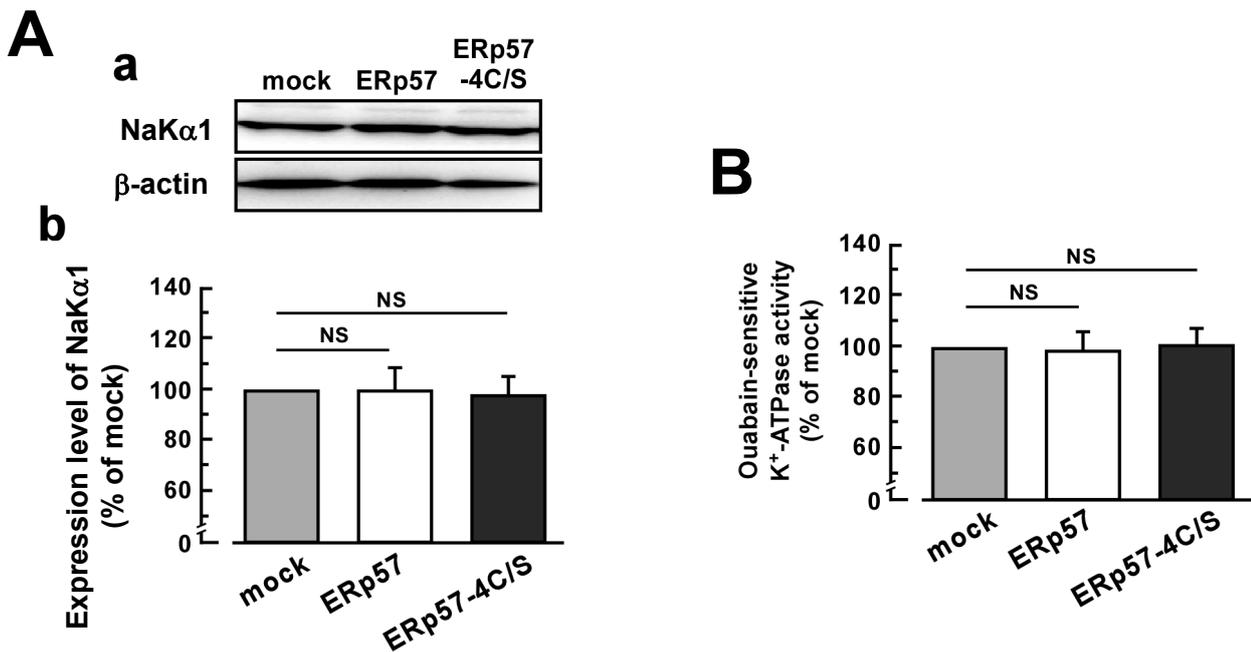


図2-10 HEK293- $\alpha\beta$ 細胞におけるERp57及びERp57-4C/S変異体過剰発現の Na^+, K^+ -ATPaseに対する影響

(A) (a) pcDNA3.1/zeo (+) ベクター (mock) 及びERp57 cDNA (ERp57) またはERp57-4C/S cDNA (ERp57-4C/S) を含むベクターをトランスフェクションしたHEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜画分 (30 μg のタンパク質) においてNaK α 1及び β -actinの抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。(b) Na^+, K^+ -ATPase (NaK α 1) の発現レベル。ERp57-とERp57-4C/Sトランスフェクション細胞におけるNaK α 1/ β -actinの発現スコアを、mockトランスフェクション細胞の発現スコアと比較した。mockトランスフェクション細胞の発現スコアを100%とした。n = 6。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

(B) Ouabain感受性 K^+ -ATPase活性 (Na^+, K^+ -ATPase活性) を、mock、ERp57及びERp57-4C/S-トランスフェクション細胞において測定した。活性は、試料中のNaK α 1の発現レベルによって補正した。mockトランスフェクション細胞の活性を100%とした。n = 6。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

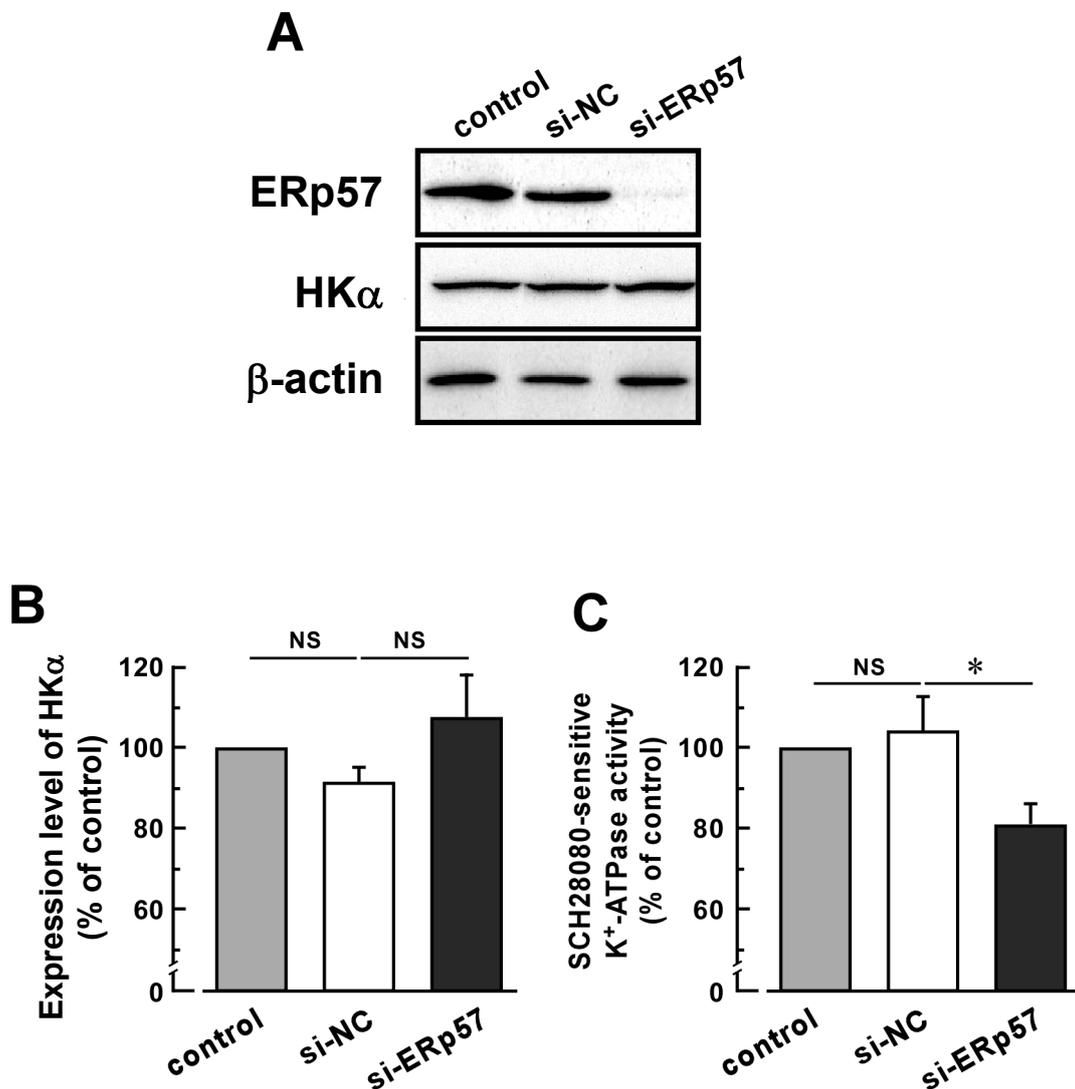


図2-11 内因的ERp57のノックダウンがH⁺,K⁺-ATPase活性に及ぼす効果

(A) ERp57に対するsi-RNA (si-ERp57) またはネガティブコントロールsiRNA (si-NC) をトランスフェクションしたHEK293-αβ細胞の膜画分、及びsiRNAをトランスフェクションしていないHEK293-αβ細胞の膜画分 (control) (20 μgのタンパク質) においてERp57、HKα及びβ-actinの抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

(B) H⁺,K⁺-ATPaseの発現レベル。si-ERp57をトランスフェクションした細胞におけるHKα/β-actinの発現スコアを、si-NCをトランスフェクションした細胞の発現スコアと比較した。control細胞の値を100%とした。n = 6。NS；有意差なし ($P > 0.05$)。

(C) si-ERp57またはsi-NCをトランスフェクションした細胞とcontrol細胞におけるSCH28080感受性K⁺-ATPase活性 (H⁺,K⁺-ATPase活性) を比較した。HKαの発現レベルにて補正した。Control細胞の活性を100%とした。n = 6。*；有意差あり ($P < 0.05$)。NS；有意差なし ($P > 0.05$)。

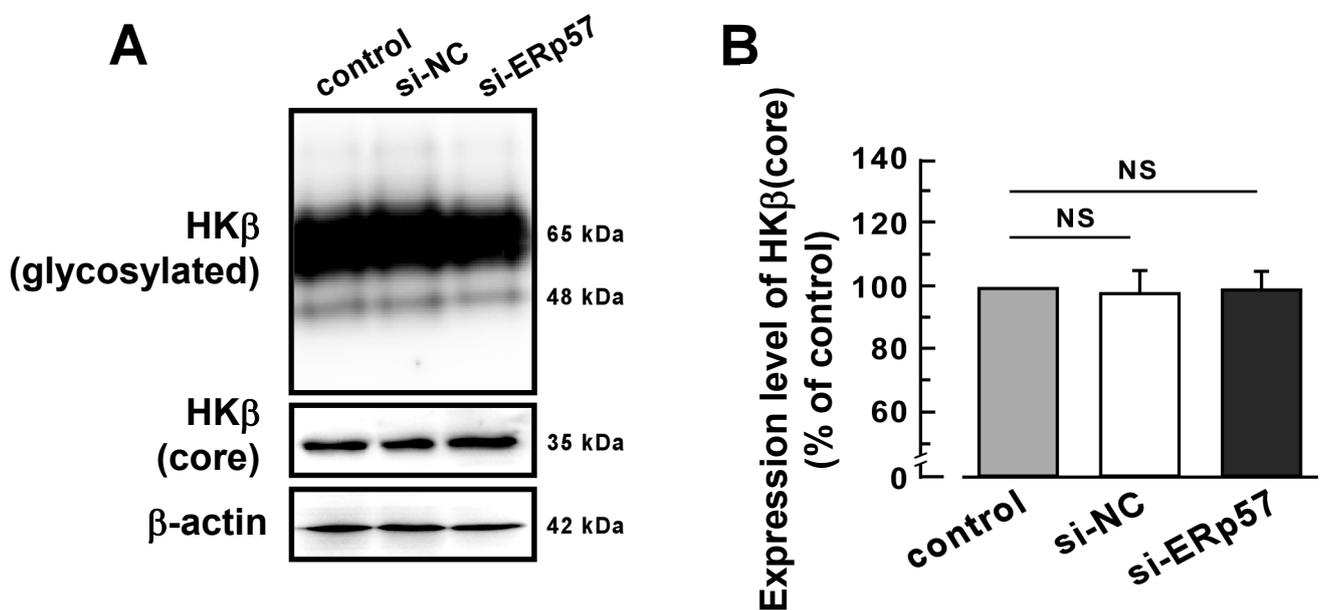


図2-12 siRNAトランスフェクション細胞におけるHKβ (core) の発現レベル

(A) ERp57 siRNA (si-ERp57) またはネガティブコントロールsiRNA (si-NC) をトランスフェクションしたHEK293-αβ細胞、及びsiRNAをトランスフェクションしていないHEK293-αβ細胞 (コントロール) より調製した膜画分 (20 μgのタンパク質) においてHKβ及びβ-actinの抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

(B) si-ERp57トランスフェクションした細胞におけるHKβ/β-actinの発現スコアを、si-NCをトランスフェクションした細胞の発現スコアと比較した。Control細胞の値を100%とした。n = 4。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$) 。

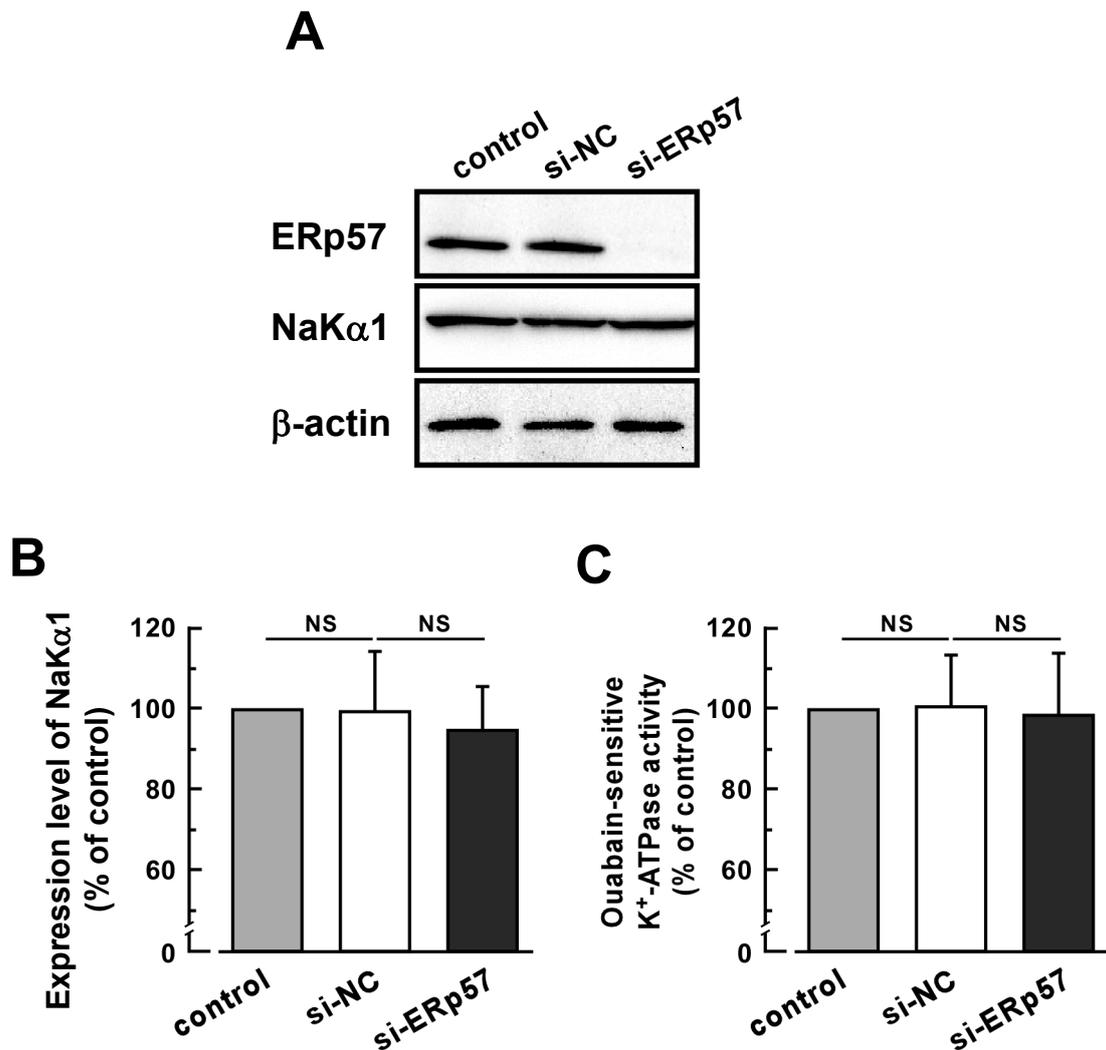


図2-13 内因性ERp57のノックダウンがNa⁺,K⁺-ATPase活性に及ぼす効果

(A) si-ERp57またはsi-NCをトランスフェクションしたHEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜画分、及びどのsiRNAもトランスフェクションしていないHEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜画分(control)においてERp57及びNaK α 1の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

(B) Na⁺,K⁺-ATPaseの発現レベル。si-ERp57をトランスフェクションした細胞におけるNaK α 1/ β -actinの発現スコアは、si-NCの発現スコアと比較した。Control細胞の値を100%とした。n = 6。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

(C) Ouabain感受性K⁺-ATPase活性 (Na⁺,K⁺-ATPase活性) を、si-ERp57またはsi-NCをトランスフェクションした細胞及びcontrol細胞で測定した。活性は、NaK α 1の発現レベルで補正した。control細胞の活性を100%とした。n = 6。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

第三部

細胞容積調節性アニオンチャネル阻害剤である DCPIB による

胃 H^+,K^+ -ATPase の阻害

【要約】

4-(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB) は、ほとんど全ての細胞に発現している細胞容積調節性アニオンチャンネル (VRAC) の阻害剤として使用されている (IC_{50} は約 $4 \mu M$)。本研究では、単離した胃細管小胞及び H^+,K^+ -ATPase を発現細胞の膜サンプルにおける胃プロトンポンプ (H^+,K^+ -ATPase) の活性を DCPIB が有意に阻害 (IC_{50} 値は約 $9 \mu M$) することを見出した。細管小胞では、VRAC の重要な構成分子の一つである leucine rich repeat containing 8 family A (LRRC8A) の有意な発現は認められなかった。DCPIB の阻害効果は、LRRC8A をノックダウンした細胞の膜サンプルにおいても見られた。他方、DCPIB は、 Na^+,K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase の活性に有意な効果を及ぼさなかった。 H^+,K^+ -ATPase 発現細胞において、DCPIB は H^+,K^+ -ATPase の $^{86}Rb^+$ 輸送活性を阻害したが、 Na^+,K^+ -ATPase の $^{86}Rb^+$ 輸送活性は阻害しなかった。DCPIB は、細胞内 VRAC 以外の Cl^- チャンネル活性に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、DCPIB は、 H^+,K^+ -ATPase 活性を直接的に阻害することが示唆された。DCPIB は、*in vitro* において H^+,K^+ -ATPase の機能を研究するための有益なツールになる可能性がある。

【緒言】

細胞容積調節性アニオンチャンネル (VRAC) はユビキタスに発現し、細胞容積の調節において重要な役割を担っている。浸透圧性細胞膨張によって活性化されたアニオンチャンネルは、 Cl^- の流出を介して細胞を元の大きさに戻す (Nilius et al., 1996; Okada, 1997)。また、VRAC の活性化は、アポトーシス及びネクローシスといった細胞死にも関与している。最近、leucine rich repeat containing 8 family A (LRRC8A) (または SWELL1) は、VRAC の重要な構成分子であることが見出された (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014)。4-(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB) は、VRAC の強力な阻害剤である (Decher et al., 2001)。DCPIB は、VRAC の生理学的及び病態生理学的機能を評価するために広く使用されている。

第一部および第二部で述べたように、胃の H^+ 分泌は、 Na^+,K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase を含む P_2 型 ATPase ファミリーに属するプロトンポンプ (H^+,K^+ -ATPase) によって担われる (Munson et al., 2005; Shin et al., 2009)。他方、これまで、CLIC-6 (Nishizawa et al., 2000; Sachs et al., 2007)、CFTR (Sidani et al., 2007) 及び SLC26A9 (Xu et al., 2008) などの Cl^- チャンネル、 Cl^-/H^+ 対向輸送体の CLIC-5 (Takahashi et al., 2014)、及び K^+,Cl^- 共輸送体の KCC4 (Fujii et al., 2009) が、胃酸 (HCl) の分泌に関与する Cl^- 輸送タンパク質であると考えられている。

H^+,K^+ -ATPase は、胃酸分泌の最終段階において重要な分子であり、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、逆流性食道炎、及び Zollinger - Ellison 症候群のような様々な酸関連疾患の治療標的で

ある (Sachs et al., 2007)。Omeprazole、rabeprazole、lansoprazole、及び pantoprazole のようなプロトンポンプ阻害剤 (PPI) は、胃 H^+,K^+ -ATPase の強力な阻害剤であり、一般的に酸関連疾患の治療に使用されている (Shin and Sachs, 2008)。

これまでのところ、VRAC 以外に DCPIB の標的分子は明らかになっていない。本研究では、 H^+,K^+ -ATPase、 Na^+,K^+ -ATPase 及び Ca^{2+} -ATPase に対する DCPIB の効果を検討した。DCPIB は Na^+,K^+ -ATPase 活性または Ca^{2+} -ATPase 活性には全く影響しなかったが、胃 H^+,K^+ -ATPase の活性を有意に阻害することを見出した。

【実験方法】

材料

DCPIB は Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA) から入手した。Niflumic acid、2-methyl-3-cyanomethyl-8-(phenylmethoxy)imidazo[1,2- α]pyridine (SCH28080、胃 H^+ , K^+ -ATPase の阻害剤)、ouabain (Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤)、thapsigargin (SERCA Ca^{2+} -ATPase の阻害剤)、及び抗 β -actin 抗体は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から入手した。5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) は、Research Biochemical International (Natick, MA, USA) から入手した。Diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) 及び A23187 は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。抗 H^+ , K^+ -ATPase α -サブユニットモノクローナル抗体 (1H9) は、Medical and Biological Laboratories (Nagoya, Japan) から入手した。Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から入手した。他の全ての試薬は、分子生物学グレードまたは入手可能な最高グレードの純度のものを使用した。

ブタ胃からの胃粘膜サンプルと細管小胞の調製

第一部【実験方法】参照。TV は小胞膜の透過性を増加させるために、凍結乾燥した。

siRNA の細胞培養及びトランスフェクション

胃 H^+ , K^+ -ATPase α , β -サブユニットを発現しているブタ腎臓の近位尿細管 LLC-PK1 細胞及びヒト胚性腎臓 293 (HEK293) 細胞 (それぞれ LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞) は、10% FBS (Nishirei biosciences, Tokyo, Japan) , 100unit/ml penicillin (Wako) , 100 μ g/ml streptomycin (Wako) , 0.5 mg/ml G418 (Enzo Life Sciences, NY, USA) 及び 0.2 mg/ml zeocin (Invitrogen) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Wako) で維持した (Fujii et al., 2007; Fujii et al., 2013)。HEK293- $\alpha\beta$ 細胞に JetPRIME (Polyplus-transfection, NY, USA) を用いて、100 pmol の siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を 48 時間成長培地で培養した。LRRC8A に対する siRNA (GGUACAACCACAUCGCCUA) (Voss et al., 2014) 及びコントロール siRNA は Nippon Gene から購入した。

培養細胞からの膜サンプルの調製

第一部【実験方法】と同様の方法で、LLC-PK1- $\alpha\beta$ 及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞から膜サンプルを調製した。

胃 H^+ , K^+ -ATPase 活性の測定

第一部【実験方法】と同様の方法で、凍結乾燥 TV (10 μ g のタンパク質) 及び LLC-PK1-

$\alpha\beta$ 細胞及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞の膜サンプル (50 μg のタンパク質) における H^+, K^+ -ATPase 活性を測定した。

Na^+, K^+ -ATPase 活性の測定

第二部【実験方法】と同様の方法で、ブタ腎臓 (10 μg のタンパク質) 及び LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞 (30 μg のタンパク質) の膜サンプルにおける Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定した。

Ca^{2+} -ATPase 活性の測定

横行小管システム (T-細管) /筋小胞体 (SR) 複合体に富むミクロゾーム画分は、ウサギの背中と脚の筋肉から報告されている方法で調製した (Morii et al., 1986)。T-細管/ SR 複合体における Ca^{2+} -ATPase 活性 (2 μg のタンパク質) は、100 mM KCl, 7 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 2 mM EGTA, 1 mM ATP, 1 μM A23187, 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0) を含む溶液 1 ml 中で、5 μM thapsigargin の存在または非存在下で測定した。溶液中のフリーな Ca^{2+} 濃度は 20 μM であると算出された (Ohkusa et al., 1991)。サンプルを 37°C で 10 分間インキュベーションした後、反応物を氷冷停止溶液の添加により停止し、放出された無機リン酸の量を測定した。 Ca^{2+} -ATPase 活性は thapsigargin の存在下及び非存在下での活性差として算出した。

ウェスタンブロッティング

第一部【実験方法】と同様の方法でウェスタンブロッティングを行った。TV (1 μg のタンパク質) と、ブタ胃粘膜 (1 μg のタンパク質)、LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞 (30 μg のタンパク質) 及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞 (30 μg のタンパク質) の膜サンプルを用いて行った。 H^+, K^+ -ATPase (1H9) 及び β -actin に対する抗体を 1 : 5,000 希釈で使用した。抗ヒト LRRC8A ウサギポリクローナル抗体は、ペプチド QRTKSRIEQGIVDRSE に対する KLH 結合ペプチドで作成し (Voss et al., 2014)、1 : 5,000 希釈で使用した。HRP 標識抗マウスまたはウサギ IgG を二次抗体 (1 : 5,000 希釈) として使用した。

免疫細胞染色

LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の免疫細胞染色は、第一部【実験方法】と同様の方法で行った。抗 H^+, K^+ -ATPase (1H9) または抗 NaK α 1 抗体 (1 : 100 希釈) は共に 4°C で一晩インキュベーションし、その後、Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間インキュベーションした (1 : 100 希釈)。免疫蛍光画像は、Zeiss LSM 700 レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて取得した。

$^{86}\text{Rb}^+$ 輸送アッセイ

LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞における胃 H^+, K^+ -ATPase および Na^+, K^+ -ATPase による $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込

み活性は、第一部および第二部の【実験方法】と同様の方法で測定した。

電気生理学実験

ホールセル記録は、室温で EPC-10 パッチクランプアンプ (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany) を用いて実施した。パッチマスター (HEKA Elektronik) を、コマンドパルスコントロール及びデータ収集のために使用した。電流を 2.9 kHz でフィルタリングし、10 kHz でデジタル化した。ピペット溶液で満たされたときのパッチ電極は 2-4 M Ω の抵抗を有していた。アクセス抵抗 (<10 M Ω) は電氣的に電圧誤差を最小にするために 70% まで補正した。電流プロファイルの電圧依存性を観察するために、0 mV の保持電位から、-100 から +100 mV のテスト電位まで、ステップパルスを 20 mV 刻みで与えた。電流振幅は、ステップパルス負荷後 400 ミリ秒測定した。ホールセル Cl⁻ 電流の選択的記録は、NMDG-Cl 塩溶液をピペット (細胞内) 及びバス (外) 溶液に使用した。ピペット溶液の組成は、110 mM NMDG, 110 mM HCl, 2 mM MgSO₄, 1 mM Na₂ATP, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 15 mM Na-HEPES 及び 50 mM mannitol (pH 7.3, 300 mosmol/kg H₂O)、バス液の組成は、110 mM NMDG, 110 mM HCl, 5 mM MgSO₄, 12 mM Hepes, 7 mM Tris 及び 100 mM mannitol (pH 7.5, 330 mosmol/kg H₂O) をそれぞれ用いた。

統計

第一部と同様、結果は平均値 \pm 標準誤差として提示した。群間の差は、一元配置分散分析によって分析し、多重比較についての補正は、Turkey's multiple comparison test を用いた。両群間の比較は、Student's *t* test を用いた。統計的有意差は、 $P < 0.05$ と仮定した。

【結果】

胃細管小胞における H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する DCPIB の阻害効果

H⁺,K⁺-ATPase 抗体を用いたブタ胃 TV のウェスタンブロットイングにおいて、95 kDa の位置に H⁺,K⁺-ATPase の明瞭なバンドが観察された。TV における H⁺,K⁺-ATPase の発現レベルは、胃粘膜に比べて顕著に高かった (図 3-1)。対照的に、VRAC の構成分子である LRRC8A の TV における発現レベルは、胃粘膜に比べてはるかに低かった (図 3-1)。

図 3-2 は、TV における SCH28080 感受性 ATP 加水分解活性 (H⁺,K⁺-ATPase 活性) に対する VRAC 阻害剤 DCPIB の効果を示している。DCPIB は、濃度依存的に H⁺,K⁺-ATPase 活性を阻害し、IC₅₀ 値は 8.2 ± 1.2 μM であった (図 3-2A)。対照的に、NPPB、niflumic acid、及び DPC のような他のアニオンチャンネルブロッカー (30 μM) は、H⁺,K⁺-ATPase 活性に有意な効果を及ぼさなかった (図 3-2B)。

Na⁺,K⁺-ATPase と Ca²⁺-ATPase に対する DCPIB の効果

胃 H⁺,K⁺-ATPase は P₂型 ATPase ファミリーに属している。そこで、他の P₂型 ATPase である Na⁺,K⁺-ATPase や Ca²⁺-ATPase に及ぼす DCPIB の効果を調べた。DCPIB (10 μM) はブタ腎臓の膜サンプルにおいて ouabain 感受性の K⁺-ATPase 活性 (Na⁺,K⁺-ATPase 活性) (図 3-3A)、また、ウサギ SR ベシクルにおける thapsigargin 感受性の ATPase 活性 (Ca²⁺-ATPase 活性) に有意な効果を及ぼさなかった (図 3-3B)。

LLC-PK1-αβ細胞の膜サンプルにおける H⁺,K⁺-ATPase と Na⁺,K⁺-ATPase に及ぼす DCPIB の効果

胃 H⁺,K⁺-ATPase α,β-サブユニットを安定発現している LLC-PK1-αβ細胞では、外因性の H⁺,K⁺-ATPase (図 3-4A) 及び内因性の Na⁺,K⁺-ATPase (図 3-4B) はそれぞれ、頂端膜及び基底側膜に発現している。細胞の膜サンプルにおいて、DCPIB (10 μM) は H⁺,K⁺-ATPase 活性を有意に阻害したが (図 3-4C)、Na⁺,K⁺-ATPase 活性には効果を示さなかった (図 3-4D)。H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する DCPIB の阻害効果は、濃度依存的であり、その IC₅₀ 値は 9.2 ± 1.3 μM であった (図 3-5A)。この IC₅₀ 値は、TV の H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する DCPIB の阻害値と近似していた (図 3-2A)。また、NPPB、niflumic acid、及び DPC のような他の陰イオンチャンネルブロッカー (10 μM) は、LLC-PK1-αβ細胞の膜サンプルにおける H⁺,K⁺-ATPase 活性に有意な効果を及ぼさなかった (図 3-5B)。

LRRC8A ノックダウン細胞の H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する DCPIB の阻害効果

これまで HEK293 細胞において、LRRC8A のノックダウンが低浸透圧誘導性かつ DCPIB 感受性の VRAC 電流を大幅に減少させることが報告されている (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014)。そこで、胃 H⁺,K⁺-ATPase α,β-サブユニット安定発現 HEK293 細胞 (HEK293-

$\alpha\beta$ 細胞)を用いて LRRC8A のノックダウンが、DCPIB による H^+,K^+ -ATPase 活性阻害に影響するかどうかについて検討した。LRRC8A に対する siRNA (si-LRRC8A) をトランスフェクションした HEK293- $\alpha\beta$ 細胞における LRRC8A タンパク質の発現レベルは、ネガティブコントロール siRNA (si-NC) をトランスフェクションした細胞に比べて有意に減少した (図 3-6A 及び B)。しかし、 H^+,K^+ -ATPase の ATP 加水分解活性および発現レベルは、LRRC8A のノックダウンによって有意な変化は見られなかった (図 3-6A 及び B)。また、si-LRRC8A をトランスフェクションした細胞において、DCPIB (10 μ M) は、si-NC をトランスフェクションした細胞と同様に、 H^+,K^+ -ATPase 活性を有意に抑制させた (図 3-6C)。従って、LRRC8A の機能は、 H^+,K^+ -ATPase 活性と関連していないことが示唆された。

生細胞における H^+,K^+ -ATPase と Na^+,K^+ -ATPase による $^{86}Rb^+$ 取り込みに対する DCPIB の効果

次に、培養中の LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞において、細胞表面に存在する H^+,K^+ -ATPase および Na^+,K^+ -ATPase のイオン輸送活性に対する DCPIB の効果を検討した。 H^+,K^+ -ATPase と Na^+,K^+ -ATPase の K^+ 輸送活性は、 K^+ のアナログである $^{86}Rb^+$ を用いて測定した。DCPIB (10 μ M) は、SCH28080 感受性の $^{86}Rb^+$ 取り込みを有意に阻害した (図 3-7A) が、ouabain 感受性の $^{86}Rb^+$ 取り込みには効果を及ぼさなかった (図 3-7B)。

LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞におけるホールセル Cl^- 電流に対する DCPIB の効果

最後に、LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞における Cl^- 電流に対する DCPIB の効果を、ホールセルパッチクランプ記録により調べた。 Cl^- 電流に対する VRAC の寄与を除外するために、わずかに高張のバス溶液を使用した。DCPIB (10 μ M) は、LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞 (図 3-8A 及び B) 及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞 (図 3-8C 及び D) のどちらの Cl^- 電流にも有意な効果を示さなかった。従って、DCPIB は、内因性の Cl^- チャネルの活性を変化させることなく、 H^+,K^+ -ATPase 活性を阻害することが示唆された。

【考察】

非利尿性エタクリン酸誘導体の DCPIB は、ほとんどすべてのタイプの細胞に存在し、細胞容積調節に重要な役割を果たしている VRAC の強力な阻害剤である。VRAC 電流の抑制に対する DCPIB の IC_{50} 値は、2-4 μM であることが報告されている (Best et al., 2004; Decher et al., 2001)。これまで、DCPIB は、VRAC の生理学的特性を評価するため一般的に、10-20 μM の濃度で使用されている。この DCPIB の濃度は、CFTR、ClC-1、ClC-2、ClC-4、ClC-5、ClC-K1、Kv4.3、Kv1.5、HERG そして hminK などの他の Cl⁻チャネルや K⁺チャネルの電流には効果を示さない (Decher et al., 2001)。また、本研究では、DCPIB (10 μM) が、LLC-PK1- $\alpha\beta$ 及び HEK293- $\alpha\beta$ 細胞において VRAC 以外の内因性の Cl⁻チャネルに有意な影響を及ぼさないことを示した。

最近、高濃度の DCPIB は EC_{50} 値が 102 μM で培養したアストロサイトにおける TREK K⁺チャネルを活性化することが報告されている (Minieri et al., 2013)。本研究において、DCPIB はブタ胃細管小胞 (TV) や外因的に胃 H⁺,K⁺-ATPase を発現させた細胞の膜サンプルの H⁺,K⁺-ATPase 活性を濃度依存的に阻害することを見出した ($IC_{50} < 10 \mu M$)。さらに、DCPIB は、培養中の LLC-PK1 細胞において、胃 H⁺,K⁺-ATPase による ⁸⁶Rb⁺取り込みを阻害した。著者の知る限り、VRAC 以外のイオン輸送体に対する、低濃度 DCPIB による阻害効果を示す知見は今回が初めてである。DCPIB と同様に、30 μM の NPPB も HEK293 細胞において VRAC 電流を抑制することが報告されている (Hélix et al., 2003)。しかし、本研究では、NPPB (30 μM) は TV の H⁺,K⁺-ATPase 活性を阻害しなかった。

HEK293- $\alpha\beta$ 細胞において、LRRC8A のノックダウンは、胃 H⁺,K⁺-ATPase 活性に対する DCPIB の阻害効果に影響を及ぼさないことを見出した。また、LRRC8A の発現レベルは、H⁺,K⁺-ATPase に富む TV において非常に低いことを見出した。これらの結果は、DCPIB は、LRRC8A の存在または非存在下に関わらず、H⁺,K⁺-ATPase 活性を直接的に阻害することを示唆している。興味深いことに、DCPIB は Na⁺,K⁺-ATPase や Ca²⁺-ATPase (SERCA) の活性に影響を及ぼさなかった。このことは、DCPIB の作用は、P₂型 ATPase ファミリーのメンバー間で H⁺,K⁺-ATPase に特異的であることを示唆している。胃 H⁺,K⁺-ATPase の触媒サブユニットのアミノ酸配列は、Na⁺,K⁺-ATPase および SERCA Ca²⁺-ATPase と、それぞれ ~60% および ~25% の相同性を有する (Munson et al., 2005)。ヌクレオチド結合ドメイン、触媒リン酸化部位、A-ドメインの TGES モチーフ、及び P-ドメインのホスホリル結合ポケットを含む種々の機能的に重要な領域は、ファミリーの間で高く保存されている。DCPIB は、おそらく胃 H⁺,K⁺-ATPase の他の P₂型 ATPase との非保存領域に結合する可能性が考えられる。

胃 H⁺,K⁺-ATPase は胃粘膜の胃酸分泌細胞に豊富に発現しているが、腎臓 (Bastani et al., 1995; Kraut et al., 1997; Ono et al., 1996)、心臓 (Beisvag et al., 2003)、膵臓 (Novak et al., 2011)、内耳 (Shibata et al., 2006) および肺 (Altman et al., 2007) などの他の組織

においても同定されている。腎臓においては、胃 H^+,K^+ -ATPase は、集合管における間在細胞の頂端膜に局在している。 H^+,K^+ -ATPase 欠損マウスでは、集合管における酸分泌が障害されることから、 H^+,K^+ -ATPase は、集合管の管腔側の酸性化に重要であることが示唆された (Lynch et al., 2008)。心臓において、胃 H^+,K^+ -ATPase は、心筋細胞中の K^+ 及び H^+ の恒常性 (pH 調節) の調節に関与している (Beisvag et al., 2003)。膵臓では、管の膵液分泌に関与している (Novak et al., 2011)。蝸牛において、胃 H^+,K^+ -ATPase は、蝸牛内電位の形成に関与している (Shibata et al., 2006)。従って、胃 H^+,K^+ -ATPase を発現する組織または細胞において、DCPIB により VRAC の機能を評価する際には、 H^+,K^+ -ATPase 活性に対する DCPIB の阻害効果を考慮する必要があるかもしれない。

Omeprazole、rabeprazole、lansoprazole、及び pantoprazole のようなプロトンポンプ阻害剤 (PPI) は、酸性 pH 条件下で活性型に変換され、活性体は、管腔側に位置する H^+,K^+ -ATPase の特定の Cys 残基 (複数可) に結合する (Shin et al., 2004)。ヌクレオチド結合ドメインが外側に向いているタイトな細管小胞を用いた *in vitro* 試験において、PPI は、酸が閉鎖小胞の内腔に蓄積された際にのみ H^+,K^+ -ATPase 活性を阻害する (Beil et al., 1988; Morii et al., 1990; Morii et al., 1993)。他方、SCH28080 のようなカリウムイオン競合型アシッドブロッカー (P-CABs) も、胃 H^+,K^+ -ATPase の阻害剤である (Anderson and Carlsson, 2005)。PPI とは異なり、SCH28080 は、胃小胞中の酸の蓄積なしにポンプ活性を阻害することができるので、 H^+,K^+ -ATPase の機能評価するためのツールとして広く使用されている (Beil et al., 1988)。本研究では、DCPIB が、SCH28080 と同様に、透過性を高めた胃小胞や H^+,K^+ -ATPase 発現細胞の膜断片サンプルにおけるポンプ活性を阻害することを示した。また、興味深いことに、DCPIB は、培養中の生細胞における H^+,K^+ -ATPase の K^+ 輸送も阻害した。

通常、胃 H^+,K^+ -ATPase の活性は、等張条件で測定される。VRAC は低張条件で活性化されるため、等張条件下では DCPIB は VRAC を阻害することなく、 H^+,K^+ -ATPase 活性を阻害する。以上より、DCPIB は、*in vitro* 実験において H^+,K^+ -ATPase の機能を研究するための強力なツールの一つとなり得ると考えられる。

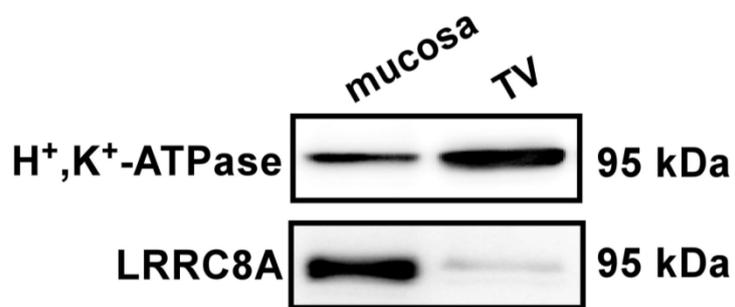


図3-1 TV及び胃粘膜サンプルにおけるH⁺,K⁺-ATPaseとLRRC8Aの発現
 TV及び胃粘膜の膜サンプル (5 µgのタンパク質) のH⁺,K⁺-ATPase α-サブユニット (95 kDa) 抗体及びLRRC8A (95 kDa) 抗体を使用したウェスタンブロットティング。

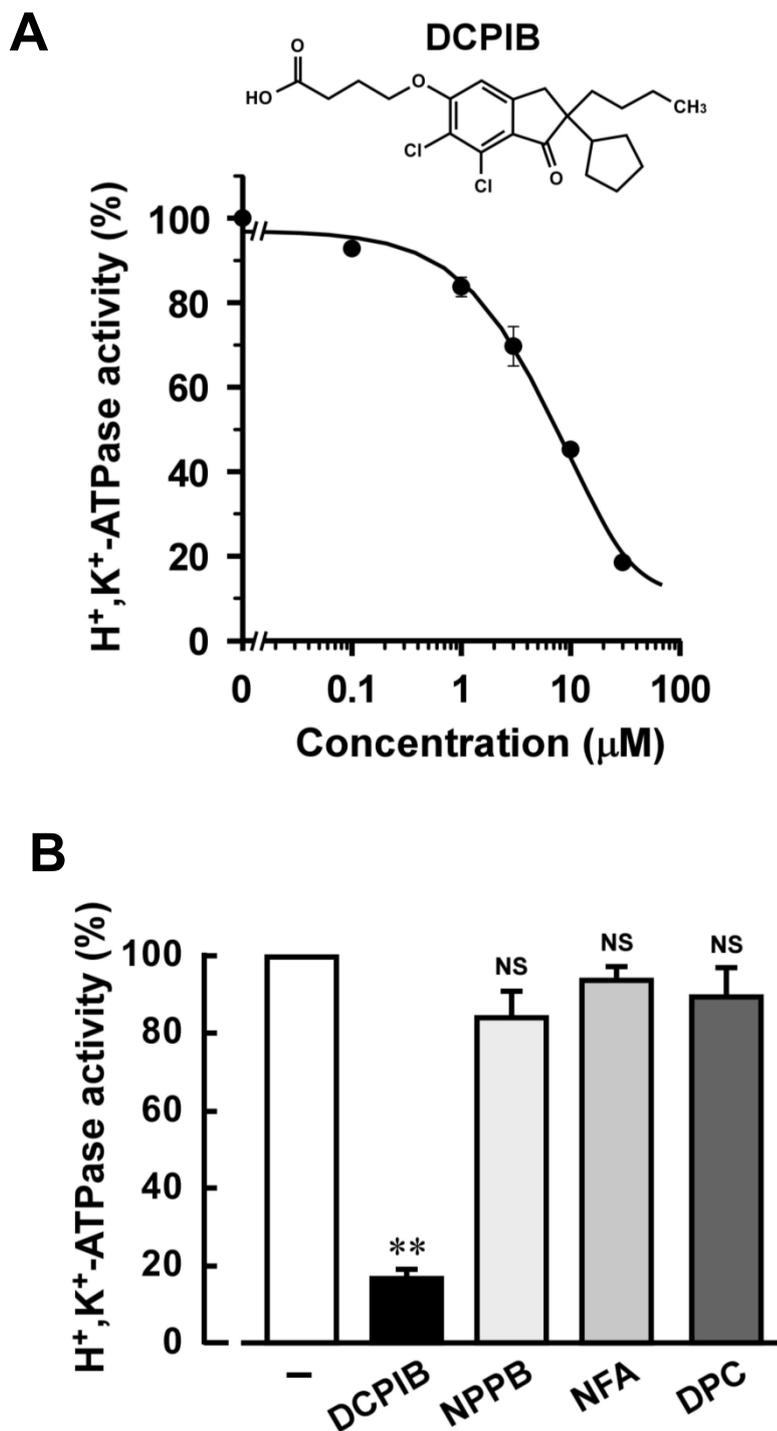


図3-2 TVにおけるH⁺,K⁺-ATPase活性に対する陰イオンチャンネルブロッカーの効果

(A) DCPIBによるH⁺,K⁺-ATPaseの濃度依存的阻害。TVにおけるSCH28080感受性K⁺-ATPase (H⁺,K⁺-ATPase) 活性を種々の濃度のDCPIBを用いて測定した (n = 4-6)。DCPIBの非存在下での活性を100%とした。挿入図に、DCPIBの化学構造を示した。

(B) TVのH⁺,K⁺-ATPase活性に対するDCPIB、NPPB、niflumic acid (NFA)、及びDPC 30 μMの効果 (n = 4-5)。阻害剤非存在下でのコントロール活性 (-) は、95.8 ± 7.5 μmol Pi/mg protein/hであり、これを100%とした。

NS ; 有意差なし (P > 0.05)。 ** ; 有意差あり (P < 0.01)。

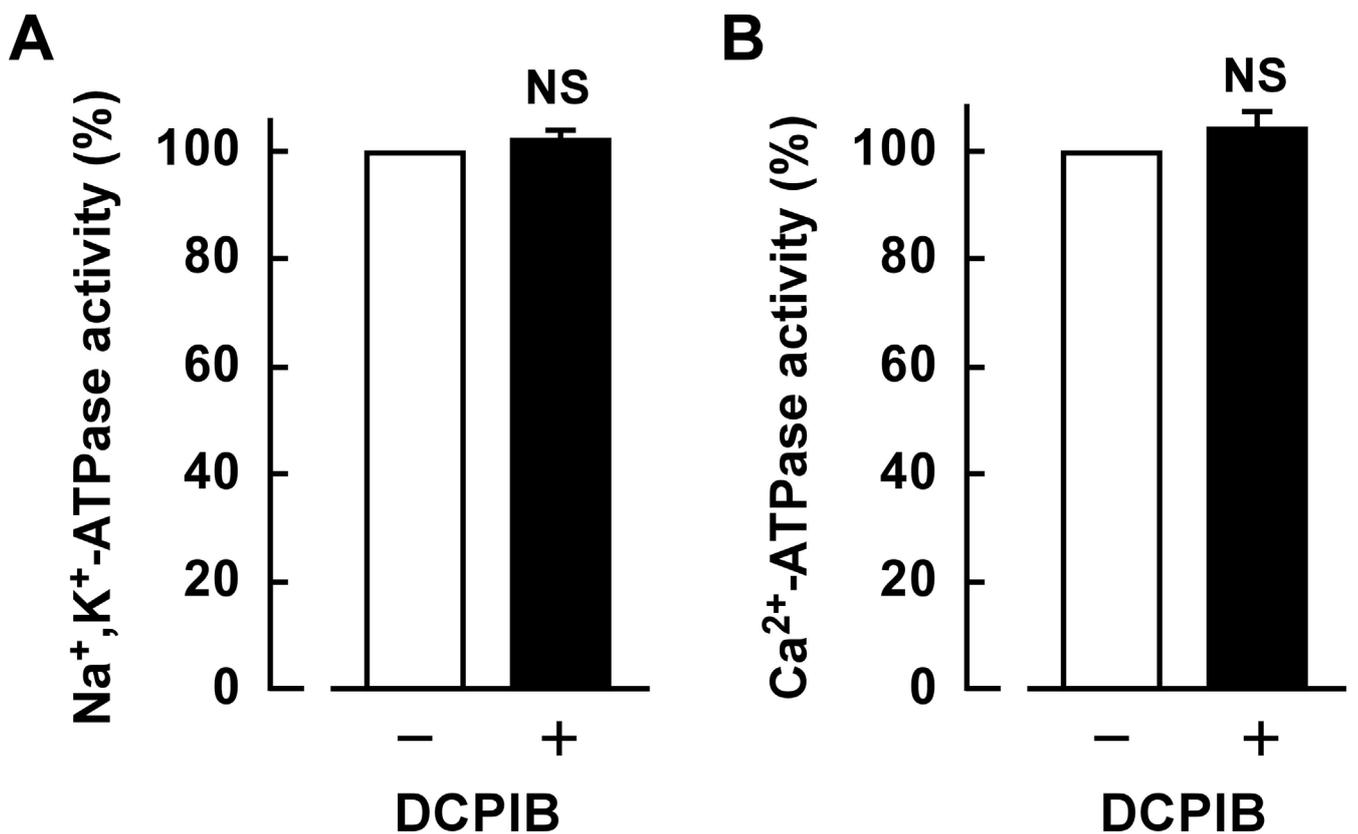


図3-3 Na⁺,K⁺-ATPaseとCa²⁺-ATPaseの活性に対するDCPIBの効果

(A) ブタ腎臓の膜サンプルにおけるouabain感受性K⁺-ATPase (Na⁺,K⁺-ATPase) 活性を10 μM DCPIB存在下 (+) 及び非存在下 (-) で測定した (n = 4)。DCPIB非存在下での活性は、12.6 ± 0.4 μmol Pi/mg protein/hであり、この値を100%とした。NS ; 有意差なし (P > 0.05)。

(B) ウサギSR小胞におけるthapsigargin感受性ATPase (Ca²⁺-ATPase) 活性を10 μM DCPIB存在下 (+) 及び非存在下 (-) で測定した (n = 8)。DCPIB非存在下でのコントロール活性は、78.8 ± 12.0 μmol Pi/mg protein/hであり、この値を100%とした。NS ; 有意差なし (P > 0.05)。

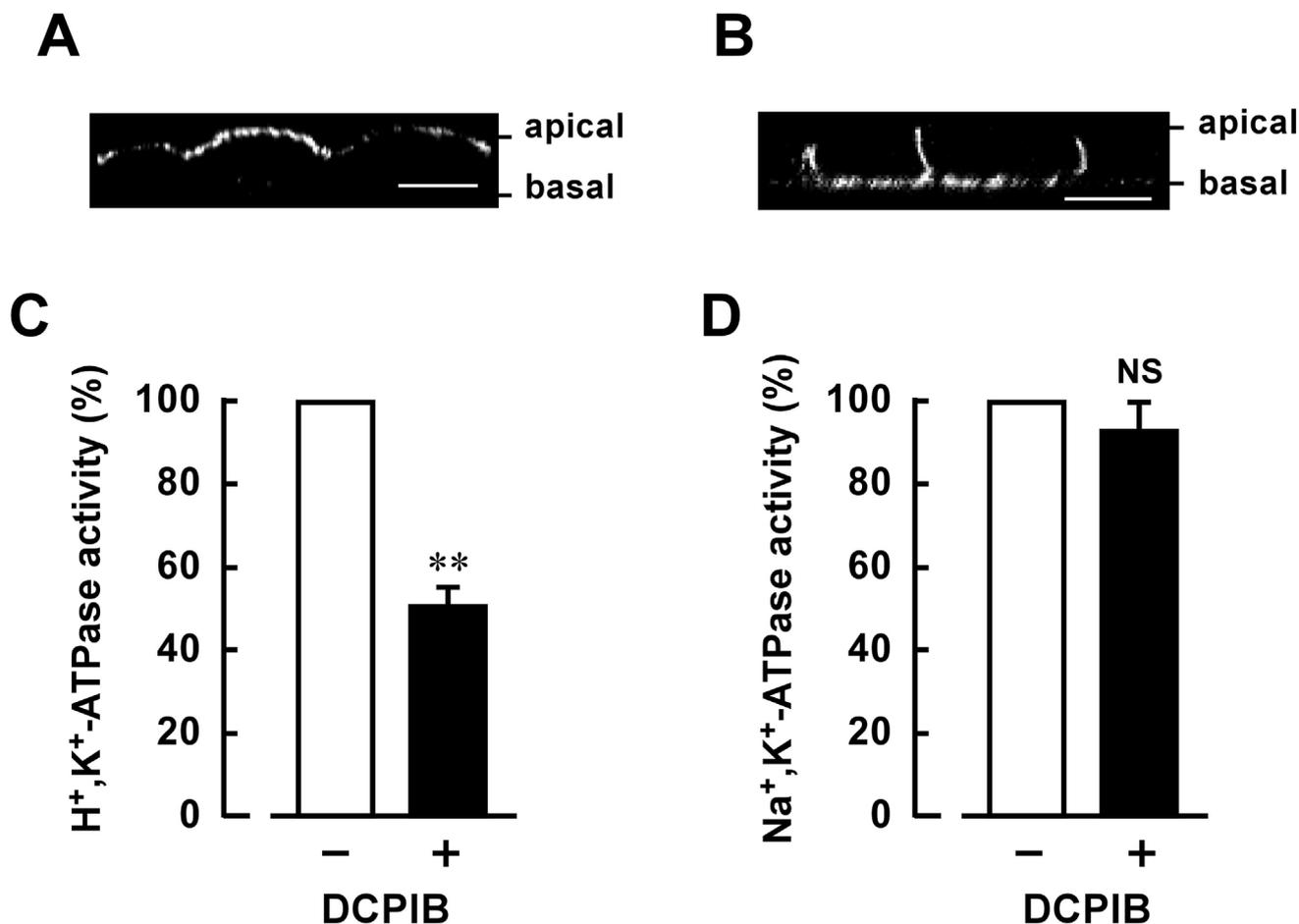


図3-4 LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の膜サンプルにおけるATPase活性に対するDCPIBの効果

(A) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞における抗H⁺,K⁺-ATPase抗体を用いた免疫細胞染色の典型例。

H⁺,K⁺-ATPaseは、細胞の頂端膜に局在していた。スケールバー = 10 μ m。

(B) 細胞における抗NaK α 1抗体を用いた免疫細胞染色の典型例。内因性のNa⁺,K⁺-ATPase α 1サブユニットは、細胞の基底側膜に局在していた。スケールバー = 10 μ m。

(C) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の細胞膜サンプルにおけるH⁺,K⁺-ATPase活性を10 μ M DCPIBの非存在下 (-) 及び存在下 (+) で測定した (n = 5)。DCPIBの非存在下でのH⁺,K⁺-ATPase活性は、 0.47 ± 0.02 μ mol Pi/mg protein/hであり、この値をH⁺,K⁺-ATPase活性の100%とした。** ; 有意差あり ($P < 0.01$)。

(D) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の膜サンプルにおけるNa⁺,K⁺-ATPase活性を、10 μ M DCPIBの非存在下 (-) 及び存在下 (+) で測定した (n = 6)。DCPIBの非存在下でのNa⁺,K⁺-ATPase活性は、 1.01 ± 0.13 μ mol Pi/mg protein/hであり、この値を100%とした。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

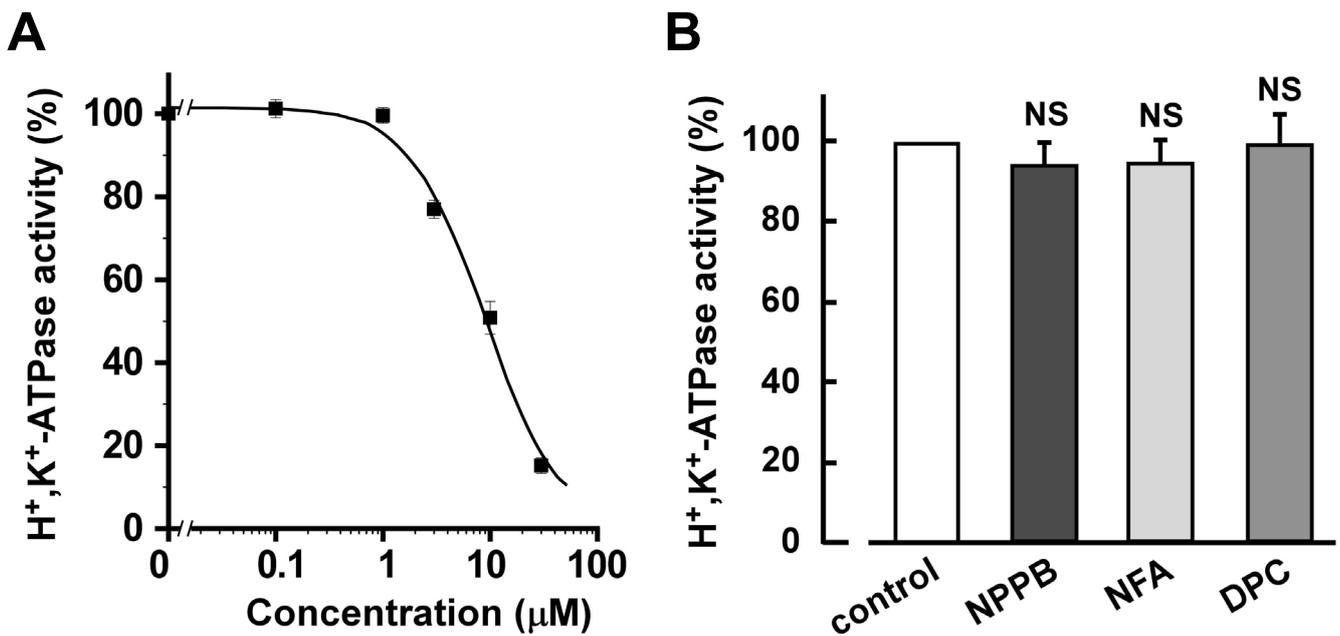


図3-5 LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の膜サンプルにおける H^+,K^+ -ATPase活性に対するDCPIBの効果

(A) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞における H^+,K^+ -ATPase活性を種々の濃度のDCPIB存在下で測定した ($n = 4-5$)。DCPIB非存在下における H^+,K^+ -ATPase活性を100%とした。

(B) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞の膜サンプルにおける H^+,K^+ -ATPase活性に対する10 μ M NPPB、niflumic acid (NFA)、及びDPCの効果 ($n = 4-5$)。阻害剤の非存在下でのコントロール活性 (control) を100%とした。NS；有意差なし ($P > 0.05$)。

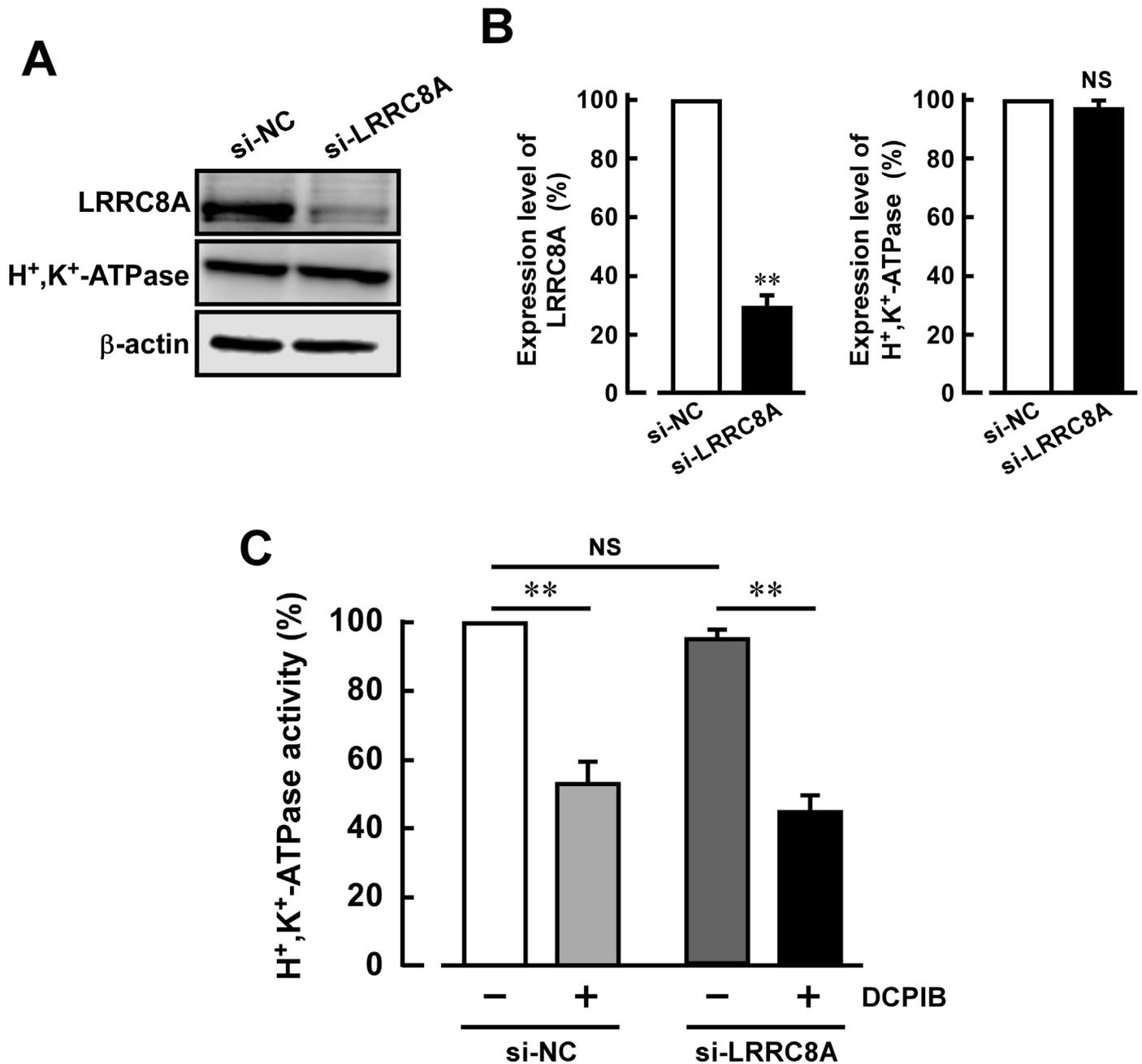


図3-6 LRRC8AノックダウンHEK293-αβ細胞の膜サンプルにおけるH⁺,K⁺-ATPase活性に対するDCPIBの影響

(A) LRRC8AのsiRNA (si-LRRC8A) またはネガティブコントロールsiRNA (si-NC) をトランスフェクションしたHEK293-αβ細胞における、LRRC8A (95 kDa) 及びH⁺,K⁺-ATPase (95 kDa) に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングの典型例。ローディングコントロールとして、β-actin (42 kDa) の発現レベルを確認した。

(B) si-LRRC8AをトランスフェクションしたHEK293-αβ細胞におけるLRRC8A (左) 及びH⁺,K⁺-ATPase (右) の発現レベルを、si-NCをトランスフェクションした細胞のものと比較した (n = 5)。si-NCトランスフェクション細胞におけるLRRC8AまたはH⁺,K⁺-ATPaseの発現レベルを100%とした。NS; 有意差なし (P > 0.05)。** ; 有意差あり (P < 0.01)。

(C) si-LRRC8A-及びsi-NCトランスフェクション細胞の膜サンプルにおけるH⁺,K⁺-ATPase活性に対するDCPIB (10 μM) の効果の検討 (n = 5)。DCPIBの非存在下 (-) でのsi-NCトランスフェクション細胞におけるH⁺,K⁺-ATPase活性は0.47 ± 0.07 μmol Pi/mg protein/hであり、この値を100%とした。NS; 有意差なし (P > 0.05)。** ; 有意差あり (P < 0.01)。

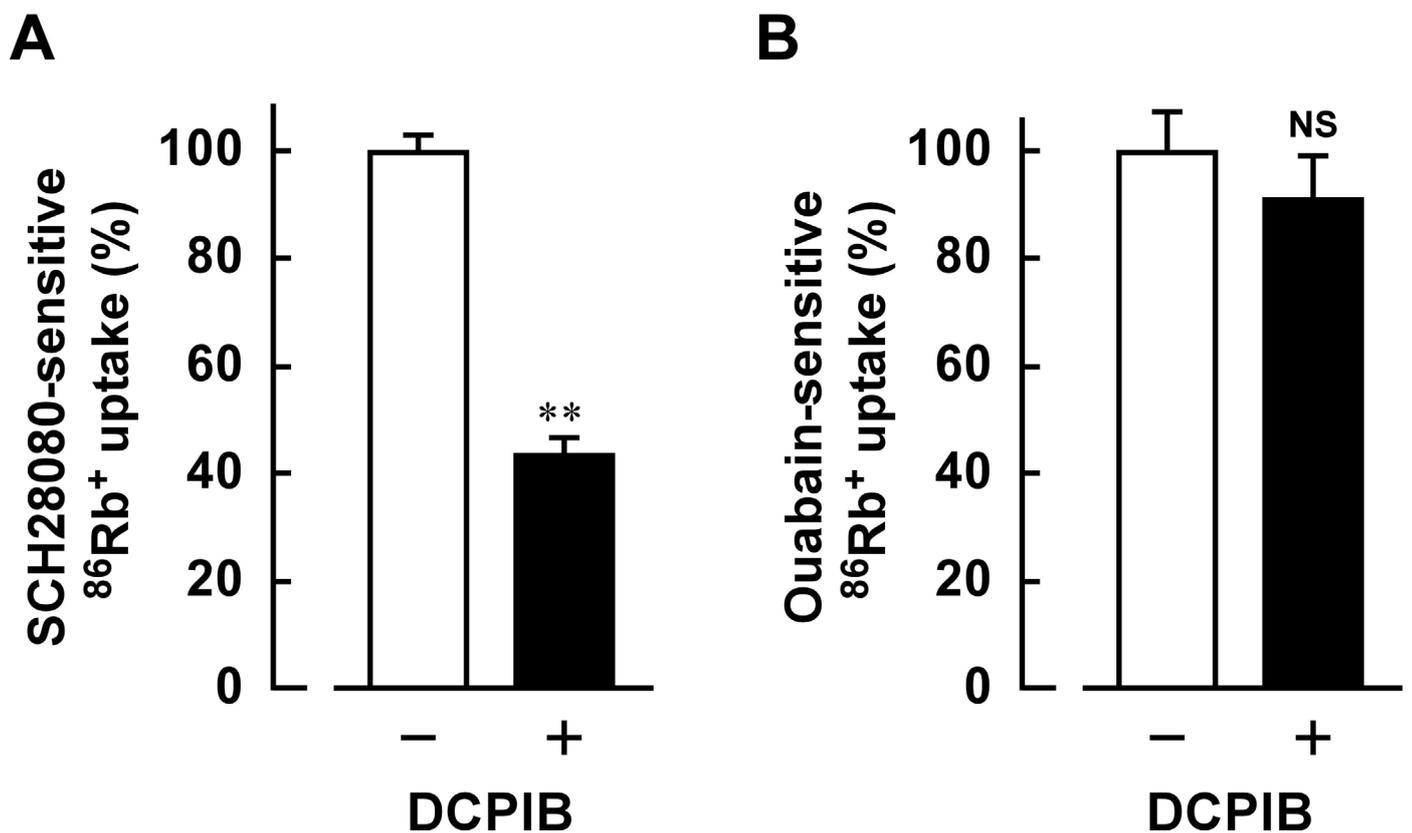


図3-7 LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞における H^+,K^+ -ATPase及び Na^+,K^+ -ATPaseによる $^{86}Rb^+$ 取り込みに対するDCPIBの効果

(A) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞におけるSCH28080感受性 $^{86}Rb^+$ 取り込みに対するDCPIBの効果。DCPIB未処理細胞の活性 (-) を100%とした。** ; 有意差あり ($P < 0.01$)。

(B) LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞におけるouabain感受性 $^{86}Rb^+$ 取り込みに対するDCPIBの効果。DCPIB未処理細胞の活性 (-) を100%とした。NS ; 有意差なし ($P > 0.05$)。

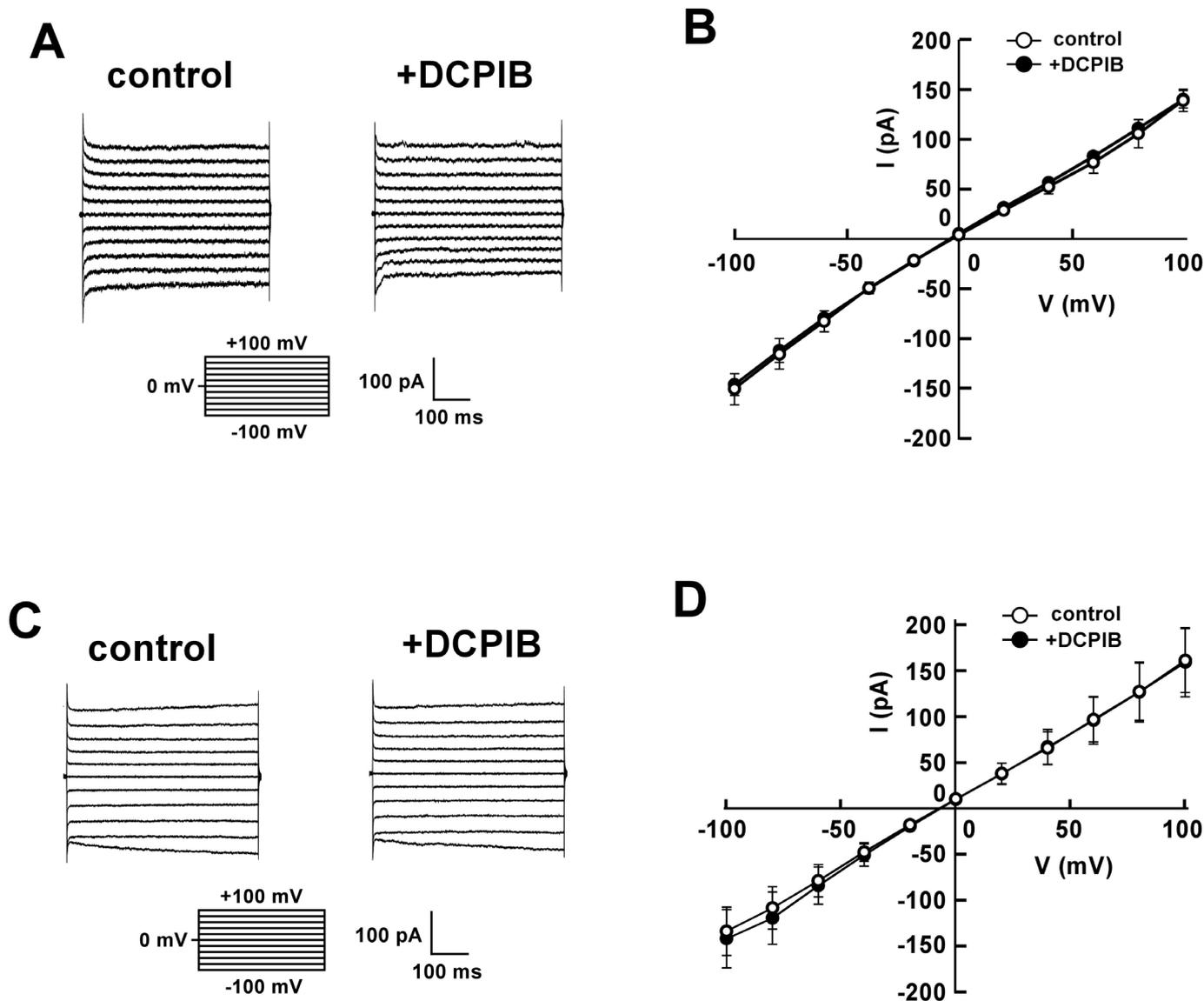


図3-8 LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞及びHEK293- $\alpha\beta$ 細胞におけるホールセルCl⁻電流に対するDCPIBの影響

LLC-PK1- $\alpha\beta$ 細胞 (A, B) 及びHEK293- $\alpha\beta$ 細胞 (C, D) におけるホールセルCl⁻電流を、10 μ M DCPIBの添加10分後 (+ DCPIB) と添加前 (control) において記録した。

(A, C) -100 mVから+100 mV間において20 mV間隔で取得したステップパルスの代表的な電流応答。電圧プロトコルは、電流トレースの下に表示した。

(B, D) DCPIBの非存在下 (白丸) 及び存在下 (黒丸) での平均的な電流-電圧 (I-V) 関係。n = 4。

第四部

ヒト結腸・直腸における非胃型プロトンポンプ ATP1A1 の発現

【要旨】

ヒト非胃型プロトンポンプ (ATP1A1) をコードする mRNA の結腸・直腸における発現を調べた。リアルタイム PCR により、ATP1A1 遺伝子は、ヒト結腸の遠位部及び直腸のみでなく、結腸近位部にも発現していることがわかった。ATP1A1 mRNA は、20 例のヒト結腸・直腸がんのうち 12 例において、近傍の正常粘膜に比べて、過剰発現していた。そのうちの 4 例においては、ノーザンブロットにおいても検出できるほどの著しい過剰発現が観察された。あるがん組織における ATP1A1 mRNA の高発現は、これまでに未解明の特定の病体生理機能に関与している可能性がある。

【緒言】

K⁺ 依存性 ATPase (X⁺,K⁺-ATPase) 遺伝子ファミリーは、3 つのグループに分類される。1 つは細胞のホメオスタシス維持に関与する Na⁺,K⁺-ATPase、2 つ目は胃液の酸性化に関与する H⁺,K⁺-ATPase、3 つ目は非胃型 H⁺,K⁺-ATPase である。非胃型 H⁺,K⁺-ATPase については、その生理機能の同定がまだ研究段階にあり、解明されていない (Jaisser and Beggha, 1999)。これまでに、ラット (Crowson and Shull, 1992)、モルモット (Watanabe et al., 1993)、ウサギ (Campbell et al., 1999)、ヒト (Grishin et al., 1994) といった哺乳類の非胃型 H⁺,K⁺-ATPase の cDNA がクローニングされている。ラット及びモルモットの非胃型 H⁺,K⁺-ATPase は、遠位結腸に高発現しているが、近位結腸にはほとんど発現しておらず (Sangan et al., 1997; Jaisser et al., 1993; Lee et al., 1995; Watanabe et al., 1990)、大腸組織における K⁺濃度の保持機構に関与しているものと考えられている (Meneton et al., 1998; Spicer et al., 2001)。

これまでに、結腸・直腸組織におけるヒト非胃型 H⁺,K⁺-ATPase (ATP1A1) の分布の詳細については明らかにされていない。さらに、ヒト結腸における ATP1A1 の生理機能についても解明されていない。本研究では、ヒト各組織における ATP1A1 mRNA の分布、及び ATP1A1 mRNA の発現と大腸がんとの関連性について検討した。

【実験方法】

ヒト大腸及び胃組織の単離

ヒト結腸・直腸がん標本は、ヘルシンキ宣言の内容を遵守したうえで、富山医科薬科大学医学部第二外科の全面的な協力を得て、日本人患者の手術摘出組織から得た。すべての場合において、当大学附属病院で手術を受ける患者からインフォームドコンセントを得た。がん組織採取の際には、コントロール標本として、がん組織から 5-10 cm 離れた非がん組織（粘膜上皮）も採取した。上皮層は、ハサミとピンセットを使用して注意深く単離した。がん組織周囲の血管を注意深く取り除いた。日本の大腸がん研究会編・大腸がん取扱い規約に基づいた、がん組織の臨床学的・形態学的分類は、3 人の熟練した病理学者によって、独立して行った。ヒト正常胃粘膜は、日本人患者（胃がん）の手術摘出組織から得た。

ラット大腸組織の単離

ラット大腸粘膜は、オスの Sprague-Dawley ラット（体重：200-250 g [7 週齢]、640-690 g [7 ヶ月齢]；静岡動物）より、以前に述べた方法で得た（Sakai et al., 1997; Suzuki et al., 2000）。ラットは、実験当日まで水とエサを自由に与えた。すべての手順は、富山医科薬科大学の動物実験委員会が定めたガイドラインに従って行った。

ノーザンブロッティング

Total RNA は、ヒト及びラットの組織から、以前に述べた方法で調製し（Sakai et al., 1999; Sakai et al., 2001）、10 µg の total RNA を 1% agarose/formamide ゲルで分離し、ナイロンメンブレン（Zeta-probe GT, Bio-Rad）にトランスファーした。作製済みのマルチプル組織ノーザンロット（各レーンに 1 µg poly A⁺）は、Clontech Laboratories から入手した。ATP1AL1 (572 bp: nucleotide positions 1868-2439; 340 bp: nucleotide positions 3033-3372)、Na⁺,K⁺-ATPase (560 bp: nucleotide positions 9-568)、GAPDH (493 bp: nucleotide positions 449-941) の PCR 産物は、サブクローニングし、シークエンシングを行った。³²P ラベルした cDNA プロブを用いたノーザンブロッティングは、以前に述べられた方法（Sakai et al., 1999; Sakai et al., 2001）に従って行った。ラット非胃型 H⁺,K⁺-ATPase を検出するために、メンブレンを ³²P ラベルした 572 bp の ATP1AL1 フラグメント（ラット非胃型 H⁺,K⁺-ATPase と 86% の相同性）でハイブリダイズした。ATP1AL1 の検出のために、メンブレンを 340 bp の ATP1AL1 フラグメント（3' 非コード領域で他の X⁺,K⁺-ATPase mRNA と交差反応しない）でハイブリダイズした。すべてのロットは、Imaging Plate (Fuji Film) を用いて露光した。露光時間は、GAPDH の場合は 6 時間で、ラット非胃型 H⁺,K⁺-ATPase、ATP1AL1、Na⁺,K⁺-ATPase の場合は 2-3 日であった。

リアルタイム定量 PCR

ATP1AL1 の発現量の定量は、ABI PRISM 7700 シーケンス・ディテクターを使用してリアルタイム PCR (TaqMan アッセイ) により行った。アッセイでは、ATP1AL1-specific forward primer (nucleotide positions 1212-1233: 5'-CCATCTGTGGTTCGACAATCAG-3')、reverse primer (nucleotide positions 1324-1347: 5'-CTTGA ACTCTGCTCGGTTACACAA-3')、TaqMan fluorescent probe (nucleotide positions 1244-1271: 5'-CTGACACCAGTGAGGACCATTCAAACCA-3') を使用した。GAPDH 量をコントロールとして測定した。

【結果と考察】

第一に、ノーザンブロット解析により、ラット結腸粘膜における非胃型 H^+,K^+ -ATPase の分布について調べた。ラット結腸粘膜 (12-15 cm の長さ) を、3 つの部分にわけた (それぞれ 4-5 cm の長さで、近位部、中間部、遠位部)。図 4-1A に示したとおり、非胃型 H^+,K^+ -ATPase mRNA (3.8 kb) は、遠位結腸に高発現していたが、近位結腸には非常に弱くしか発現していなかった。実際に、ラット遠位結腸の H^+,K^+ -ATPase 活性は近位結腸の活性に比べてはるかに高いこと (Sangan et al., 1997)、抗-非胃型 H^+,K^+ -ATPase 抗体によるシグナルは、ラット遠位結腸の頂端膜において検出されるが、近位結腸では検出されないこと (Jaisser et al., 1993) が報告されている。図 4-1B の実験から、7 週齢ラットの結腸における非胃型 H^+,K^+ -ATPase mRNA の発現パターンは、7 ヶ月齢ラットの結腸のパターンと本質的に同じであるということがわかった。したがって、加齢は非胃型 H^+,K^+ -ATPase の発現に影響を及ぼさないものと考えられる。

第二に、ノーザンブロット解析により、ヒト組織における ATP1A1 mRNA の分布について調べた。これまでに ATP1A1 mRNA は、RT-PCR によりいくつかの特定の組織や細胞に発現していることが報告されているが (Modyanov et al., 1991; Pestov et al., 1998; Pestov et al., 2002)、ノーザンブロットによる ATP1A1 mRNA のサイズの同定は行われていない。図 4-2 に示したように、ATP1A1 mRNA のサイズは、4.0 kb で、腎臓に有意に発現していた。しかし、結腸の各部を含めて他の組織では、発現が観察されなかった。一方、 Na^+,K^+ -ATPase mRNA (3.9 kb) は、調べたすべての組織において発現していた (図 4-2A)。

さらに、リアルタイム PCR (TaqMan アッセイ) を用いて、結腸・直腸がん患者の手術摘出組織から得た非がん組織 (粘膜) における ATP1A1 mRNA の発現を調べた。ポジティブ及びネガティブコントロールとして、それぞれ腎臓と胃における mRNA の発現を調べた。このようなより高感度の検出方法により、ATP1A1 mRNA の有意な発現が、結腸・直腸及び腎臓において観察された。しかし、胃においては観察されなかった (図 4-2B)。ヒト結腸における ATP1A1 mRNA の分布パターンは、ラット結腸の非胃型 H^+,K^+ -ATPase mRNA のものと明らかに異なっていた (図 4-1)。つまり、ATP1A1 mRNA は、結腸遠位部 (S 状結腸) と直腸に発現しているだけでなく、結腸近位部 (上行結腸) においても発現していた。

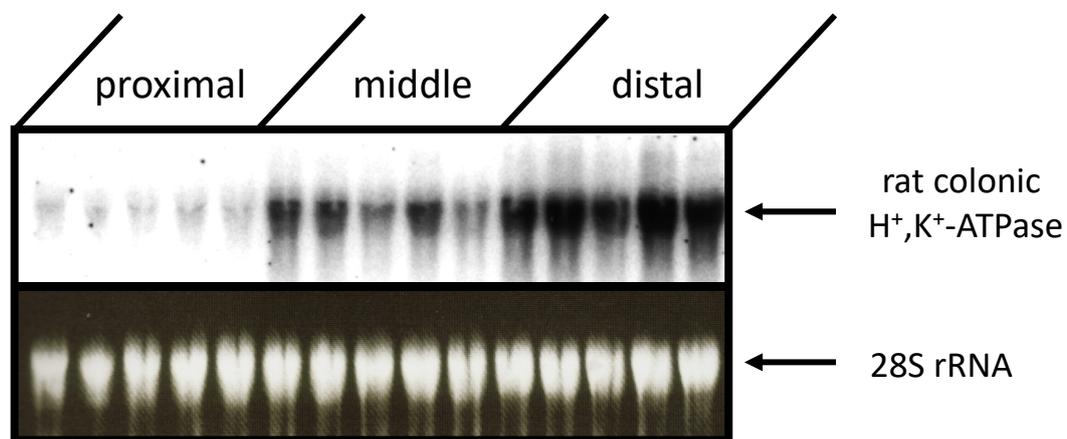
しかし、ヒト結腸の非がん組織 (粘膜) における ATP1A1 mRNA の発現レベルは、ラット非胃型 H^+,K^+ -ATPase mRNA の発現レベル (遠位結腸に多量に発現している) に比べて、顕著ではなかった。したがって ATP1A1 のアミノ酸配列は、ラット非胃型 H^+,K^+ -ATPase と 86% の相同性を有するが (Jaisser and Beggah, 1999)、ATP1A1 はラット非胃型 H^+,K^+ -ATPase のカウンターパートではないものと推察される。

結腸・直腸がん組織における ATP1A1 mRNA の発現量を調べるために、20 人の患者か

ら、高分化腺がん組織と近傍の正常組織を採取し、サンプルを調製した。興味深いことに、リアルタイム PCR により、ATP1AL1 mRNA は、20 症例中 12 例のがん組織において、非がん組織（粘膜）より高発現（過剰発現）していることがわかった（図 4-3A 左と 3B）。いくつかのがん組織においては、ノーザンブロットにおいても検出可能で、ATP1AL1 mRNA (4.0 kb) の明らかなシグナルが観察された（図 4-3C）。ATP1AL1 mRNA の過剰発現は、がん組織において血管新生が促進され、血液細胞が増加したことによるものではないと考えられる。なぜなら末梢白血球や肝臓において ATP1AL1 の有意な発現が観察されなかったからである（図 4-2A）。ATP1AL1 mRNA の発現は、20 症例中 8 例のがん組織において減少していた（図 4-3A 右及び 3B）。ATP1AL1 mRNA レベルの変化（増加または減少）は、患者の年齢や性別、がんの位置やサイズ、臨床的病期とは関連していないようである（表 4-1 及び図 4-3）。

さまざまな結腸・直腸がんにおける、ATP1AL1 の病態生理機能については不明である。今後、がん組織における ATP1AL1 mRNA の増減のメカニズムを明らかにするための研究が必要である。結論として、本研究では、ATP1AL1 mRNA が結腸・直腸のすべての非がん組織（粘膜）において、発現量は多くはないものの、広範囲に分布していることを見出した。いくつかのがん組織においては、非常に高いレベルの ATP1AL1 mRNA の発現が観察されたが、これは、ATP1AL1 ががん組織において未知なる病態生理機能を有する可能性を示唆するものである。

A



B

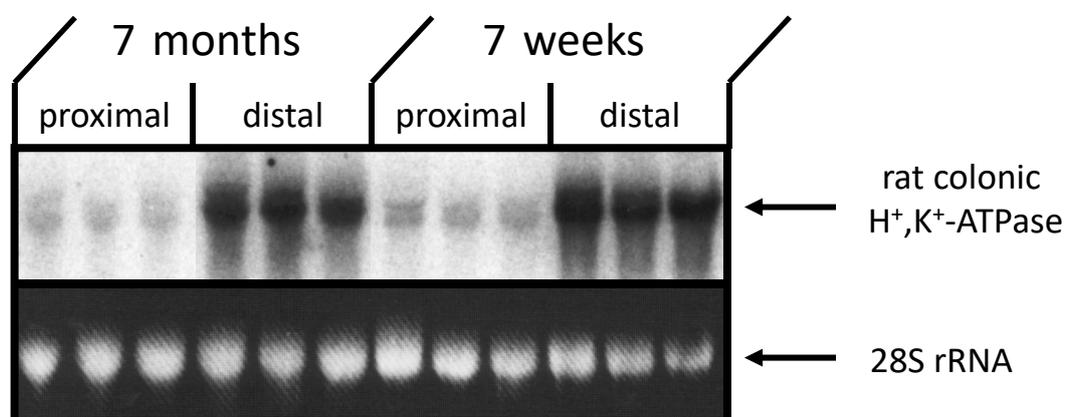


図4-1 ラット結腸における非胃型H⁺,K⁺-ATPaseの発現

(A) ノーザンブロット解析による、結腸の異なる部分から調製したtotal RNA (10 μg/lane) におけるラット非胃型H⁺,K⁺-ATPase mRNAの検出。3.8 kbのシングルバンドが観察された。ローディングコントロールとして、28S rRNAのエチジウムブロマイド染色のパターンを示した。5匹の7週齢ラットを使用した。

(B) 実験プロトコールは、図1 Aの場合と同じである。3匹の7ヶ月齢ラットと3匹の7週齢ラットを使用した。

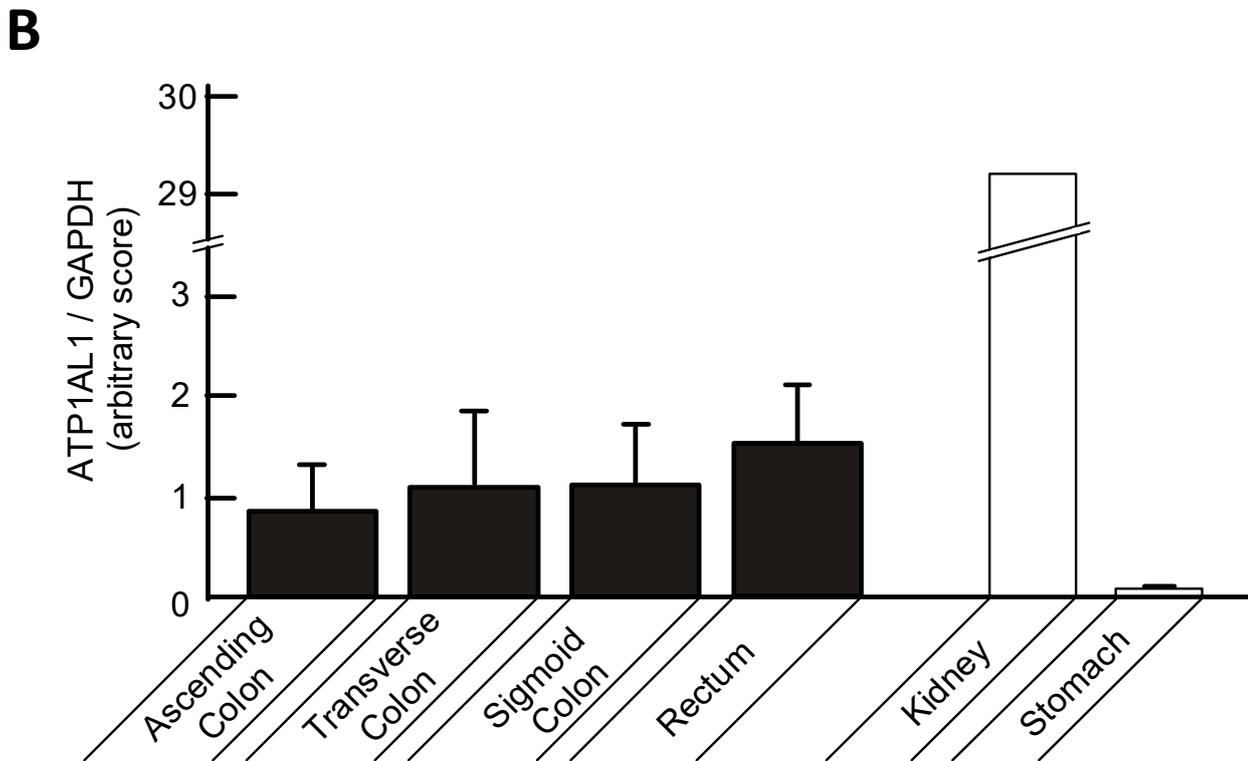
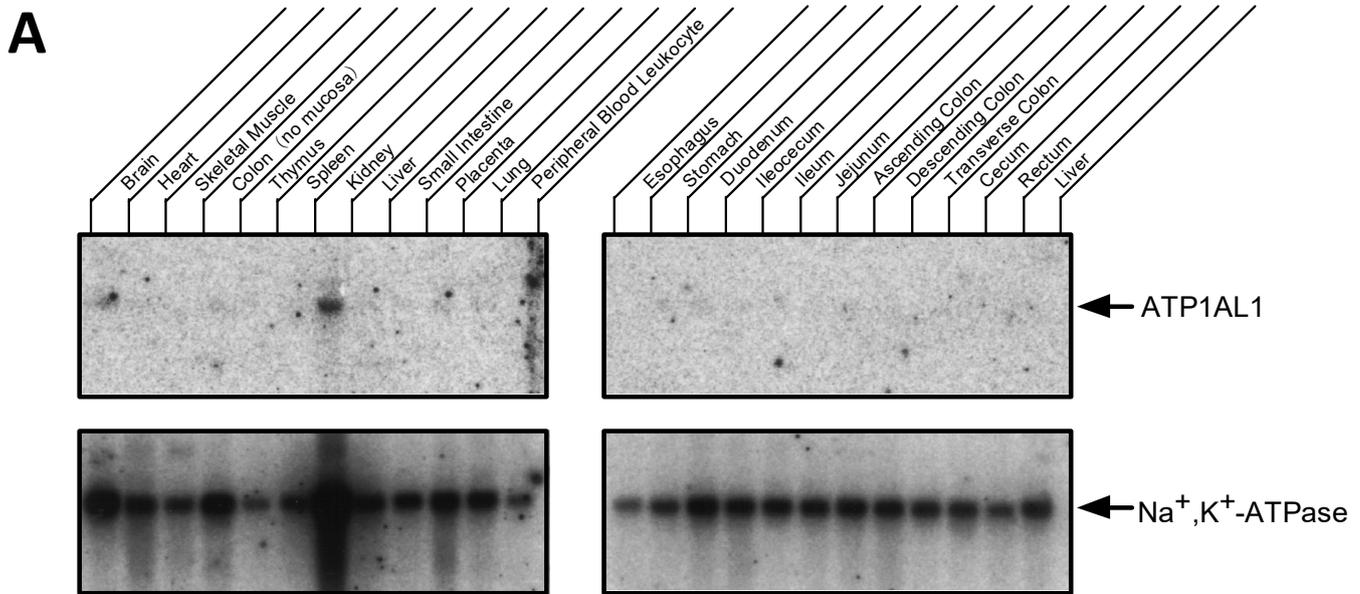


図4-2 ヒト各組織におけるATP1AL1 mRNAの発現

(A) ノーザンブロット解析による、ヒト各組織由来のpoly A⁺ RNA (1 µg/lane) におけるATP1AL1 mRNAの検出。腎臓由来のpoly A⁺ RNAにおいてのみ、4.0 kbのシングルバンドが検出された(上の図)。コントロールとして、メンブレンをNa⁺,K⁺-ATPaseのプロープで再ハイブリダイズさせた(3.9 kbのバンド)(下の図)。

(B) リアルタイムPCR (TaqManアッセイ) によるヒト非がん組織(結腸・直腸粘膜)におけるATP1AL1 mRNAの検出。非がん組織は、実験方法の項で述べたように、結腸・直腸がんの患者の手術摘出組織から得た。患者の年齢(年齢; 平均値 ± 標準誤差)及び性別(M, 男性-F, 女性)は、72 ± 3, 5M-3F (n = 8; 上行結腸)、67 ± 2, 6M-1F (n = 7; 横行結腸)、68 ± 4, 3M-6F (n = 9; S状結腸)、68 ± 3, 8M-6F (n = 14; 直腸)であった。それぞれの場合において、ATP1AL1 mRNAの発現量(arbitrary 値)をGAPDH mRNAの発現量

(arbitrary 値)で割り算した。ネガティブコントロールの実験として、3人の胃がん患者(70 ± 3, 1M-2F)の手術摘出組織から得た非がん組織(胃粘膜)を使用した。ポジティブコントロールとして、ヒト腎臓mRNA(Clontech Laboratories)を使用した。

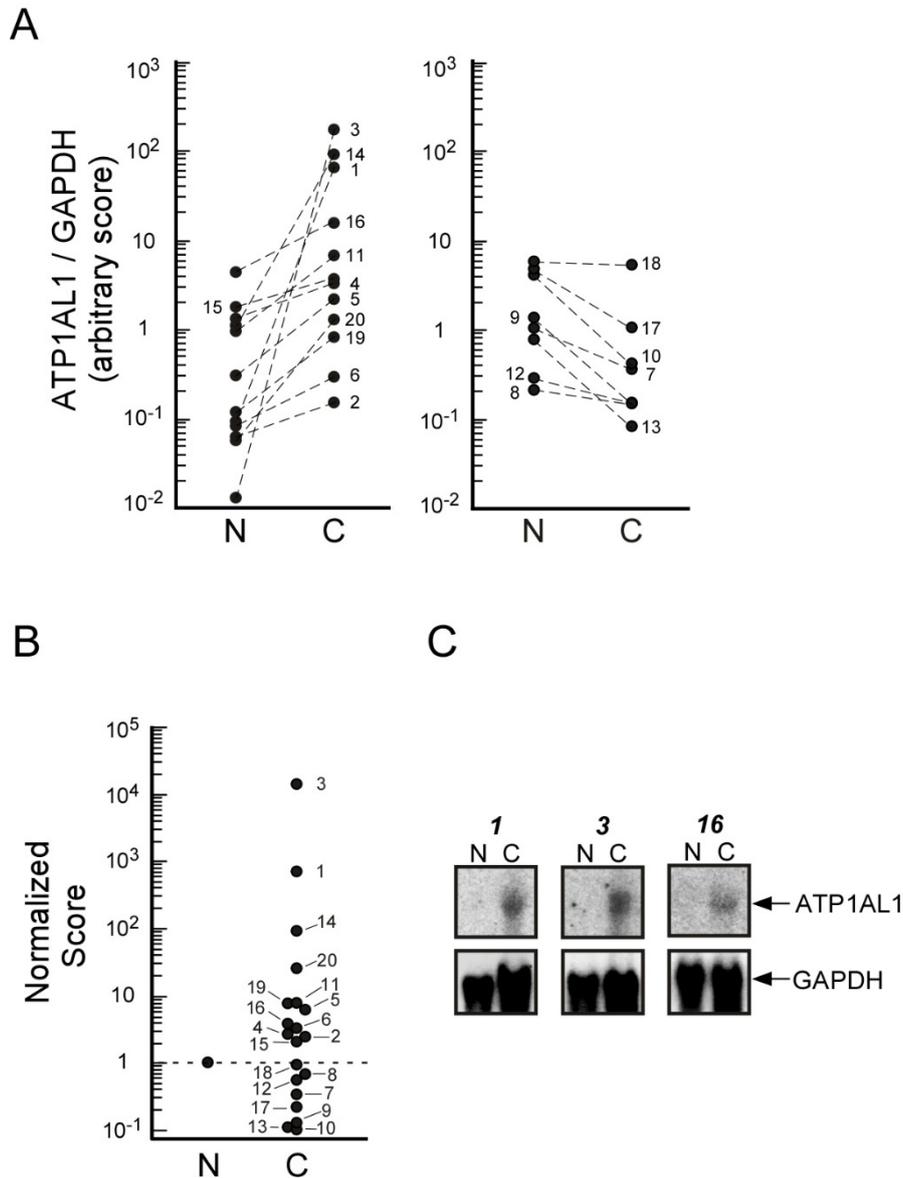


図4-3 ヒト結腸・直腸がん組織におけるATP1AL1 mRNAの発現レベルの変化

(A) リアルタイムPCR (TaqManアッセイ) による、非がん組織「N」と対のがん組織「C」におけるATP1AL1 mRNAの検出。シンボルの横に書かれた番号は、表4-1のデータ番号に対応している。それぞれのケースにおいて、ATP1AL1 mRNAの発現量 (arbitrary 値) をGAPDH mRNAの発現量 (arbitrary 値) で割り算した。

(B) 図4-3Aのデータを標準化した。標準化スコア = [(がん組織におけるATP1AL1 mRNAの発現量) / (がん組織におけるGAPDH mRNAの発現量)] / [(非がん組織におけるATP1AL1 mRNAの発現量) / (非がん組織におけるGAPDH mRNAの発現量)]。したがってそれぞれのケースにおいて、非がん組織のスコアは1に標準化されている。

(C) ノーザンブロット解析による、非がん組織 (N) と対のがん組織 (C) 由来のtotal RNA (10 µg/lane) におけるATP1AL1 mRNAの検出。がん組織由来のRNAにおいて4.0 kbのシングルバンドが観察された (上の図)。サンプル番号は、表4-1の番号に対応している。コントロールとして、メンブレンをGAPDHのプロブで再ハイブリダイズした (1.3 kb, 下の図)。

No.	Age	Sex	Location	Size	Stage	No.	Age	Sex	Location	Size	Stage
1.	85	M	C	5.0x4.5	II	11.	61	F	S	6.4x5.2	II
2.	73	F	C	2.5x1.5	0	12.	83	F	S	2.5x2.5	III
3.	61	M	A	2.8x4.8	0	13.	58	F	R	7.5x4.0	III
4.	59	M	T	3.0x4.0	IV	14.	71	M	R	4.5x2.8	II
5.	68	M	T	4.5x3.5	IV	15.	69	M	R	5.5x3.0	IV
6.	67	F	T	5.5x4.4	IV	16.	69	F	R	6.0x3.8	III
7.	67	M	T	1.4x0.8	I	17.	56	F	R	8.0x6.0	II
8.	75	F	D	5.5x4.0	II	18.	75	M	R	4.1x4.0	II
9.	55	F	S	5.0x2.0	I	19.	64	M	R	3.5x2.5	II
10.	65	F	S	2.5x2.0	II	20.	76	M	R	6.5x5.0	III

表4-1 結腸・直腸の高分化腺がんの臨床情報

患者の年齢（年）及び性別（M, 男性、F, 女性）、がん組織のサイズ（cm x cm）と位置（C, 盲腸；A, 上行結腸；T, 横行結腸；D, 下行結腸；S, S状結腸；R, 直腸）及びIUACによるTNM臨床的分類に基づいたがんのステージを示してある。

第五部

トロンボキサン A₂ で誘導される大腸がん細胞増殖には
Kv7.1 チャンネルのアップレギュレーションが関与している

【要約】

トロンボキサン A₂ (TXA₂) は、大腸がん細胞の増殖を促進することが知られている。しかし、そのメカニズムについては未解明である。本研究では、ヒト結腸直腸がん組織と付随する非がん組織（粘膜）間の Kv7.1 K⁺チャンネルの発現レベルを比較した。Kv7.1 タンパク質は、異なる患者からのがん組織において再現性良くアップレギュレーションされていることがわかった。また、Kv7.1 は、ヒト大腸がん細胞株でも発現していた。TXA₂ の安定アナログ 9,11-epithio-11,12-methano-thromboxane A₂ (STA₂) による大腸がん細胞の処理により、Kv7.1 タンパク質の発現増加と並行して、Kv7.1 チャンネルの阻害剤 chromanol 293B に感受性のホールセル K⁺電流が増加した。対照的に、TXA₂ の不活性代謝物である TXB₂ は、Kv7.1 の発現レベル及び機能には影響を及ぼさなかった。TXA₂ 受容体アンタゴニスト (SQ29548) 及び cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤 (RP-8-BR-MB-cAMP) は、STA₂ による Kv7.1 の発現量の増加、及び STA₂ による chromanol 293B 感受性 K⁺電流の増加を阻害した。興味深いことに、大腸がん細胞の STA₂ による増殖効果は、chromanol 293B によって阻害された。以上の結果は、Kv7.1 チャンネルが TXA₂ 誘導性のがん細胞増殖に寄与し、このアップレギュレーション機構には、TXA₂ 受容体を介する cAMP 経路が関与していることが示唆される。

【緒言】

がん組織において、トロンボキサン A₂ (TXA₂) は、血管新生及び腫瘍転移の進展など様々なアクションを誘発する (Daniel et al., 1999; Nie et al., 2000)。プロスタグランジン H₂ から TXA₂ の変換を触媒するトロンボキサン合成酵素 (TXS) は、甲状腺乳頭がん細胞増殖の調節因子であると報告されている (Kajita et al., 2005)。

Sakai ら (2006) はこれまでに、TXS の過剰発現に付随する TXA₂ の過剰産生は、ヒト大腸の腫瘍増殖に関与していることを示した。実際に、ヒト大腸がん細胞 KM12-L4 において内因性 TXS タンパク質の欠損は、細胞増殖を阻害し、この効果は TXA₂ の安定アナログ 9,11-epithio-11,12-methano-thromboxane A₂ (STA₂) を直接作用させることによって回復した (Sakai et al., 2006)。しかし、TXA₂ によって誘導されるがん細胞増殖のメカニズムは解明されていない。

K⁺チャンネルは、近年、がんバイオマーカー及びがん治療のための標的であると考えられている (D'Amico et al., 2013)。大腸がんでは、いくつかの電位依存性 K⁺チャンネルの病態生理学的な機能が報告されている。Kv1.3 チャンネルの活性化は、結腸がん細胞において細胞増殖を促進することが実証されている (Abdul and Hoosein, 2002)。Kv11.1 の発現は、結腸における腫瘍増殖及び細胞浸潤に重要であることが報告されている (Dolderer et al., 2010; Lastraioli et al., 2004)。また、Kv10.1 発現のアップレギュレーションが結腸がんを

有する患者の生存率減少に関与することが示唆されている (Ousingsawat et al., 2007)。

心臓においてよく研究されている Kv7.1 (または KCNQ1、KvLQT1 と呼ばれる) は、ラットの正常結腸上皮中の K⁺チャネルとしても機能することが実証されているが (Kunzelmann et al., 2001)、ヒト大腸がん細胞における役割はあまり解明されていない。本研究では、ヒト大腸がん組織における Kv7.1 の発現レベルが、付随する非腫瘍粘膜よりも高いことを見出した。そこで、本研究では、Kv7.1 チャネルが TXA₂によって引き起こされるヒト結腸がん細胞の増殖に関与しているかどうかを調べた。

【実験方法】

薬品

STA₂はONO Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan)からご厚意により頂いた。Chromanol 293B及びトロンボキササン B₂ (TXB₂)はWako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から入手した。SQ29548は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)から入手した。8-Bromo-2'-monobutyryladenine-3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer (Rp-8-Br-MB-cAMPS)及び抗β-actin マウスモノクローナル抗体は、Sigma (St. Louis, MO, USA)から入手した。抗ヒト Kv7.1 ヤギポリクローナル抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)から入手した。HRP 標識抗ヤギ及び抗マウス IgG 抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)から入手した。

ヒト大腸がん細胞培養

HT-29 及び T84 細胞を、DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)から入手し、それぞれ、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した McCoy's 5A medium 及び 10% FBS を添加した Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12 (1 : 1 混合) で維持した。WiDr 細胞は、Research Bioresources Cell Bank (Tokyo, Japan)から得て、非必須アミノ酸及び 10% FBS を添加した Earle's minimum essential medium (MEM) 中で維持した。KM12-L4 細胞は、I.Saiki と J.Murata 博士 (Institute of Natural Medicine, Toyama, Japan) のご厚意により頂き、10% FBS を添加した MEM で維持した。これらのすべて培地には、100 U/ml penicillin G (Wako) と 100 µg/ml streptomycin (Wako) を加えた。

組織採取

ヒト大腸がん検体は、ヘルシンキ宣言の勧告に従って富山医科薬科大学の倫理委員会の承認 (第 140 号) のもと、日本人患者から外科的切除によって得た。このプロジェクトでは、インフォームドコンセントは、すべての患者から得られ、その後の取り下げは全くなかった。全ての場合において、コントロールサンプルは、がんから 5-10 cm 離れた付随する非腫瘍粘膜から採取した。がん組織及び非がん組織 (粘膜上皮) を注意深くハサミとピンセットで採取標本から単離した。これらのサンプルは、漿膜と固有筋層を含んでいなかった。組織の周りの血管は慎重に除去した。臨床的及び組織学的分類は、国際対がん連合による TNM 臨床的分類と結腸直腸がん学会編の一般的なルールに従った病理学者の専門家 (Shin Ishizawa 医師と Takeshi Oya 医師) により行われた。

ウェスタンブロッティング

ヒト大腸組織及び大腸がん細胞株を 10 µg/ml phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)、1 µg/ml leupeptin、1 µg/ml pepstatin A 及び 20 µg/ml aprotinin を添加した細胞溶解緩衝

液 (0.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH7.4) 中でホモジナイズした。サンプルを 4°C で 10 分間、800×g で遠心分離した。上清を回収し、4°C で 90 分間 100,000×g で遠心分離した。超遠心分離後、ペレットを 250 mM sucrose 及び 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 を含む溶液中に懸濁し、膜タンパク質として使用した。

ウェスタンブロッティングを行うに当たり、タンパク質 (40 µg) を電気泳動し、その後 PVDF 膜上に転写した。TBS 中に溶解した 4% ブロックエース (DS Pharma Biomedical) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、0.1% Tween 20 を添加した TBS (TBS-T) に一次抗体を懸濁し、膜を 4°C で一晩インキュベートした。結合した抗体を、ECL plus Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) もしくは Pierce Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して、TBS-T 中で HRP 標識二次抗体を用いて検出した。化学発光シグナルを定量化するために、蛍光イメージアナライザ (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) と Multi Gauge software (Fujifilm) を用いた。ヤギ抗 Kv7.1 及びマウス抗β-actin 抗体は、それぞれ、1 : 300 及び 1 : 5,000 希釈で使用した。HRP 標識抗ヤギ及び抗マウス IgG は、1 : 2,500 希釈で使用した。

電気生理学

KM12-L4 細胞を 12 ウェル培養プレートに播種し、0.3% FBS を添加した MEM 中で 2 日間培養した。示された場合には、化学物質を培地に添加し、2 日間処理した。パッチクランプ実験の直前に、細胞をカバーガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) 上にプレーティングした。

ホールセル記録は室温で EPC-10 USB patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) を用いて行った。Patchmaster software (HEKA Elektronik) は、コマンドパルスコントロール及びデータ収集、データ分析のために使用した。電流を 2.9 kHz でフィルタリングし、10 kHz でデジタル化した。パッチ電極は、ピペット溶液で満たされたときに 2-4 MΩ の抵抗を有していた。アクセス抵抗 (<10 MΩ) は電圧誤差を最小にするために 70% まで電氣的に補正した。電流の電位依存性を観察するため、ステップパルス (500 ミリ秒の持続時間) を -60 mV の保持電位で -150 から +30 mV までの 30 mV 単位で与えた。

ホールセル電流は、bath 溶液 : 130 mM Na-gluconate, 15 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH)、ピペット (細胞内) 溶液 : 110 mM K-gluconate, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂-ATP, 10 mM HEPES, ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (pH 7.3 with KOH) を用いて測定した。

細胞増殖アッセイ

KM12-L4 細胞における細胞増殖は、12 ウェル培養プレート中の細胞数を計数することによって評価した。各ウェルに、 1×10^5 細胞を播種し、0.3% FBS を補充した MEM 中で 2 日間培養した。実験は 3 回実施した。示された場合には、薬品を培地に添加し、2 日間処理した。

統計

データは、 n 個の観測の平均値 \pm 標準誤差として示した。データの統計的な差異は、Student's t test または一方向 ANOVA によって評価し、 $P < 0.05$ で有意とみなした。

【結果】

ヒト大腸がん組織及びがん細胞株における Kv7.1 タンパク質の過剰発現

Kv7.1 チャンネルの発現が大腸がんでアップレギュレーションされるかどうかを調べるために、高分化または中分化腺がんを有する患者から摘出されたヒト大腸がん組織と付随する非腫瘍粘膜を使用した。図 5-1a は、各組織からの膜画分に Kv7.1 (70 kDa) を検出したウェスタンブロットティングを示す。興味深いことに、Kv7.1 の発現レベルは、付随する非腫瘍組織と比較して 10 症例中 10 症例のがんにおいて上昇していた。なお、Kv7.1 の発現レベルの増加とがんのステージとの間に明らかな相関は認められなかった (図 5-1a)。図 5-1b に示すように、Kv7.1 は、KM12-L4、T84、HT-29、WiDr などのヒト大腸がん細胞株においても発現していた。しかし、WiDr 細胞における発現レベルは、KM12-L4、T84 または HT-29 細胞よりも低かった。

ヒト大腸がん細胞における TXA₂ による Kv7.1 発現のアップレギュレーション

TXS は、ヒト大腸がんにおいて過剰発現されることが見出されているので (Sakai et al., 2006)、TXA₂ は KM12-L4 細胞における Kv7.1 の発現をアップレギュレーションするか検討した。細胞を TXA₂ の安定アナログである STA₂ (0.1 μM) で処理すると、Kv7.1 タンパク質の発現量が上昇した (図 5-2a)。STA₂ は TXA₂ 受容体に特異的に結合し、結腸における内因性 TXA₂ の効果を模倣することができる (Horikawa et al., 2005; Suzuki et al., 2000)。β-actin (45 kDa) に対して正規化した Kv7.1 発現量の相対レベルを、図 5-2b にまとめた。対照的に、TXA₂ の不活性代謝物である TXB₂ (0.1 μM) は、Kv7.1 の発現量には影響しなかった (図 5-2)。

ヒト大腸がん細胞における、TXA₂ による chromanol 293B 感受性 K⁺電流の増加

次に、KM12-L4 細胞におけるホールセルパッチクランプ記録を行った。コントロール (図 5-3a)、0.1 μM STA₂ 処理 (図 5-3b)、及び 0.1 μM TXB₂ 処理 (図 5-3c) 細胞における、ホールセル電流を Kv7.1 チャンネルの阻害剤である 30 μM chromanol 293B の非存在下及び存在下で測定した。膜電流の逆転電位は STA₂ 処理細胞 (図 5-3b) で chromanol 293B によって著しく右方向にシフトした。STA₂ 処理細胞におけるホールセル電流のゼロ電流電位は、chromanol 293B の適用前と後ではそれぞれ、 -68.3 ± 1.7 mV (n = 13)、 -61.2 ± 1.4 mV (n = 13) であった (図 5-3b)。コントロール及び TXB₂ 処理細胞においても、chromanol 293B 適用により、それぞれ -67.8 ± 3.1 mV (n = 18) から -62.5 ± 1.2 mV (n = 18) へ、及び -64.6 ± 1.7 mV (n = 14) から -61.0 ± 1.0 mV (n = 14) へ、ゼロ電流電位がシフトした (図 5-3a 及び c)。図 5-2 の結果と一致して、STA₂ 処理細胞における、chromanol 293B 感受性で電位非依存性の電流は、コントロールまたは TXB₂ 処理細胞に比べて有意に大きかった (図 5-3d)。STA₂ 処理細胞における chromanol 293B 感受性電流の逆転電位は、現在の実験条件

における K^+ 平衡電位の理論値 (-89 mV) に近い $-78.0 \pm 6.7 \text{ mV}$ ($n = 13$) であった。これらの結果は、 $Kv7.1$ チャネルが $KM12-L4$ 細胞の原形質膜においてチャネル機能を有していることを示唆している。

TXA₂による Kv7.1 チャネルの発現量増加には、TXA₂受容体を介した cAMP 経路が関与する

TXA₂ 受容体が、 $KM12-L4$ 細胞における $Kv7.1$ チャネルの STA₂ 誘因性アップレギュレーションに関与しているかどうかを調べた。細胞を $0.1 \mu\text{M}$ STA₂ と選択的 TXA₂ 受容体アンタゴニストの $1 \mu\text{M}$ SQ29548 で処理した場合、STA₂ 誘発性 $Kv7.1$ タンパク質発現の増加は有意に阻害された (図 5-4a 及び b)。また、STA₂ 適用によって増大した chromanol 293B 感受性電流は、SQ29548 の存在下で減少した (図 5-5a)。

TXA₂ は、ヒト大腸細胞株で TXA₂ 受容体を介して細胞内 cAMP レベルを増加させることが報告されているので (Horikawa et al., 2005)、ここでは、cAMP 経路が、このメカニズムに関与しているかどうかを調べた。細胞を $0.1 \mu\text{M}$ STA₂ と膜透過性 cAMP 依存性プロテインキナーゼの阻害剤である $50 \mu\text{M}$ Rp-8-Br-MB-cAMPS で処理すると、 $Kv7.1$ 発現及び chromanol 293B 感受性電流の両者における STA₂ 誘発性増加は、有意に阻害された (図 5-4c,d 及び図 5-5b)。

ヒト大腸がん細胞の TXA₂による増殖効果は、Kv7.1 チャネル阻害剤により抑制される

Sakai ら (2006) の研究で、TXS の過剰発現及びそれに付随する TXA₂ の過剰産生はヒト大腸の腫瘍増殖に関与し得ることを示唆した。図 5-6 に示すように、 $Kv7.1$ チャネル阻害剤である chromanol 293B は、濃度依存的に STA₂ ($0.1 \mu\text{M}$) に誘発される $KM12-L4$ 細胞の増殖を阻害した。これは $Kv7.1$ チャネルが、 $KM12-L4$ 細胞における外因性 STA₂ によって誘導される細胞増殖を媒介することを示唆している。STA₂ 未処理のコントロール細胞の増殖が chromanol 293B ($100 \mu\text{M}$) によりコントロールの細胞増殖以下に阻害されたことと、chromanol 293B による細胞増殖抑制効率が、STA₂ 処理細胞の場合と同程度だったことは非常に興味深い (図 5-6)。これらの結果は、 $Kv7.1$ チャネルは、内因性 TXA₂ によって誘導される細胞増殖も調節し得ることを示唆している。

【考察】

本研究では、以下のことを見出した：(1) Kv7.1 タンパク質は、ヒト大腸がん組織において過剰発現しており、ヒト大腸がん細胞株でも発現していた。(2) TXA₂ の安定アナログ (STA₂) は、ヒト大腸がん細胞 KM12-L4 において、Kv7.1 発現及び chromanol 293B 感受性で電位非依存性の K⁺電流を増加させた。TXA₂ 不活性代謝物 (TXB₂) にはこれら効果はなかった。(3) 細胞を STA₂ 前処理すると、TXA₂ 受容体の活性化とそれに続く cAMP 経路を介して、chromanol 293B 感受性 K⁺電流が増大した。(4) Chromanol 293B は、STA₂ によって誘導される大腸がん細胞の増殖を減弱させた。

大腸がん組織では、Kv1.3、Kv1.5、Kv3.1、Kv10.1、及び Kv11.1 などの電位依存性 K⁺チャンネルが発現していることが報告されている (Abdul and Hoosein, 2002; Dolderer et al., 2010; Lastraioli et al., 2004; Ousingsawat et al., 2007)。これらは、不活性化型 (Kv1.3)、超高速型 (Kv1.5)、高電位活性化型 (Kv3.1)、非不活性化 (Kv10.1)、及び急速型 (Kv11.1) として、電位依存遅延整流性の K⁺電流を構成していることが知られている (Bijlenga et al., 1998; Hernández et al., 1999; Honoré et al., 1994; Yang et al., 2000)。これらの K⁺チャンネルは KM12-L4 細胞で発現している可能性があるが、我々が観察した chromanol 293B 感受性電流は、これらの遅延整流性 K⁺電流とは異なる特性を有していた。また、Kv11.1 チャンネルは、chromanol 293B (30 μM) に非感受性であることが実証されている (Busch et al., 1996; Yang et al., 2000)。

本研究では Kv7.1 チャンネルの阻害剤として chromanol 293B を使用した。しかし、chromanol 293B はまた、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) の遮断薬であることが報告されている (Bachmann et al., 2001)。本実験条件では、Cl⁻の平衡電位は -1 mV と算出される。従って、本研究で観察された chromanol 293B 感受性電流が Cl⁻に選択的である可能性はほとんどない。一方、chromanol 293B は、一過性の外向き電流及び外向き整流を示す超急速遅延整流 K⁺電流を抑制することが示されている (Bosch et al., 1998; Du et al., 2003)。しかし、chromanol 293B 感受性電流が、KM12-L4 細胞において直線的な電流電圧関係を示すことが示され、これにより一過性の外向き電流及び超急速遅延整流 K⁺チャンネルにほとんど寄与していないものと考えられた。Kv7.1 (KCNQ1) は、KCNE の βサブユニットファミリーのメンバーと電位依存性 K⁺チャンネルを形成することが知られているが、KCNQ1/KCNE チャンネルの電位依存性は KCNE の βサブユニットの種類に依存することが報告されている (Jespersen et al., 2005; Schroeder et al., 2000)。KCNQ1 は KCNE1 と共発現すると、電流は遅い活性化動態及び外向き整流性を示す。これとは対照的に、KCNE3 と KCNQ1 の共発現は、時間依存性活性化を示さず、電圧非依存性電流を生じる。本研究で観察された chromanol 293B 感受性電流の整流性から、KCNQ1/KCNE3 チャンネルが KM12-L4 細胞で発現している可能性がある。この結果は、KCNQ1 が結腸において KCNE3 と関連付けられていることを示す以前の報告と一致している (Dedek and

Waldegger, 2001; Preston et al., 2010; Schroeder et al., 2000)。従って、本研究において、chromanol 293B は結腸 KCNQ1/KCNE3 チャネルを阻害しているものと考えられる。

正常な結腸では、KCNQ1/KCNE3 チャネルは、CFTR を介する Cl⁻分泌のための電気化学的駆動力を増加させることによって経上皮 Cl⁻分泌に寄与することが知られている (Preston et al., 2010; Schroeder et al., 2000)。腫瘍における最も重要な特徴の一つは、細胞増殖が促進されることである。我々の知る限り、CFTR が結腸における腫瘍細胞の増殖に関与していることは報告されていない。対照的に、最近の研究では、多くのがんにおいて細胞増殖及び腫瘍細胞の成長における K⁺チャネルの役割を示唆している (D'Amico et al., 2013; Dolderer et al., 2010; Spitzner et al., 2007; Wang et al., 2004; Yao and Kwan, 1999)。本研究では、KCNQ1/KCNE3 チャネルの過剰発現が、大腸の腫瘍成長に関与し得ることを見出した。

K⁺チャネルによる膜電位と細胞容積の制御は、細胞増殖に重要であることが知られている (Pardo, 2004)。K⁺チャネルの活性化によって誘導される膜過分極は、細胞が有糸分裂の間、G1 から S 期へ遷移するのに必要とされるので (Strobl et al., 1995; Wonderlin and Strobl, 1996)、KM12-L4 細胞において Kv7.1 チャネルが静止膜電位に寄与し、細胞増殖を調節している可能性が考えられる。

一方、細胞は、(特に、G1/S 移行での) 細胞周期の進行中に、その量を倍増するので、細胞増殖の速度が細胞体積の変化に密接に関連していることが考えられる (Rouzaire and Dubois, 1998; Rouzaire et al., 2000)。細胞容積を調節するイオンチャネル活性は、それゆえ、細胞増殖に必須であると考えられている。K⁺チャネル及び浸透圧性膨張後の容積調節 (RVD) に寄与する容積感受性 Cl⁻チャネル (Okada, 1997) は、細胞増殖に関連することが知られている (Pardo, 2004; Shen et al., 2000; Wonderlin and Strobl, 1996)。加えて、高浸透圧誘導性カチオンチャネル (HICCs) は、浸透圧性収縮後の容積調節 (RVI) のために重要であるが (Wehner, 2006; Wehner, 2003)、細胞増殖において重要なプレイヤーでもある (Bondarava et al., 2009; Numata et al., 2012)。興味深いことに、細胞容積調節性の K⁺及び Cl⁻チャネルの阻害は、G1 期での停止を引き起こすが (Shen et al., 2000; Wonderlin and Strobl, 1996)、HICCs の阻害は、G2/M 期での停止を引き起こす (Bondarava et al., 2009)。これらの結果から、細胞周期の進行の各チェックポイントで細胞体積が適切であるかどうかを監視すべきであることを示唆している。DNA 合成が、細胞内 Na⁺濃度の上昇と細胞内 K⁺濃度の減少をもたらす薬剤によって誘発され (Cone and Cone, 1976)、その細胞内 Na⁺と K⁺比は、細胞周期進行における S 期間の DNA 合成のために重要であり得る。現時点では、Kv7.1 チャネルが、どのようなメカニズムを介して、がん細胞の増殖を調節するのかはわからない。将来的には、膜脱分極及び/または細胞体積の変化が、このメカニズムに関与しているかどうかを検討する必要がある。

TXA₂ は、特定の G タンパク質共役型受容体に結合し、シグナル伝達経路につながる (Huang et al., 2004)。これまでの報告では、TXA₂ 受容体は、結腸を含むいくつかの組織

において、cAMP 経路とリンクしていることが示されている (Hirata et al., 1996; Horikawa et al., 2005; Huang et al., 2004)。これらの報告と一致して、本研究の結果は、TXA₂ 誘導性のがん細胞の増殖は、cAMP 経路によって媒介されることを示唆している。

本研究で、TXA₂ 誘発性の Kv7.1 チャンネルのアップレギュレーションが、ヒト大腸がんにおける細胞増殖に関連していることを実証した。著者の知る限り、本研究は、Kv7.1 がヒト大腸がんにおける腫瘍増殖に必須であることを示した最初の報告である。これらの結果は、Kv7.1 チャンネルが、ヒト大腸がん治療のためのバイオマーカー及びターゲット候補の一つになり得ることを示唆している。

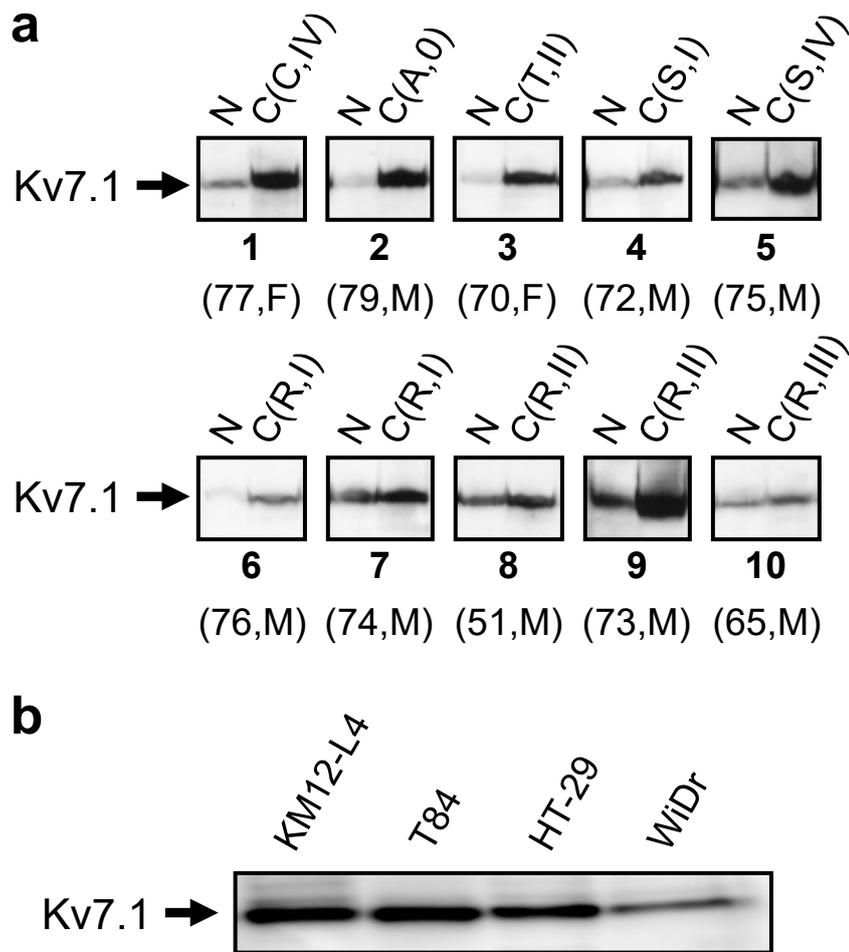


図5-1 ヒト大腸がん及びがん細胞株におけるKv7.1タンパク質の発現

(a) 対の非がん組織(粘膜)(N)とがん(C)におけるKv7.1(70 kDa)タンパク質のウェスタンブロッティング。各がんの位置(C, 盲腸; A, 上行結腸; T, 横行結腸; R, 直腸; S, S状結腸)及び国際対がん連合のTNM臨床分類に従ったがんのステージ(0, I, II, IIIまたはIV)を、上部括弧内に示す。患者の年齢と性別(M, 男性; F, 女性)は、下の括弧内に示す。

(b) KM12-L4, T84, HT-29及びWiDrなどのヒト大腸がん細胞株におけるKv7.1タンパク質のウェスタンブロッティング。

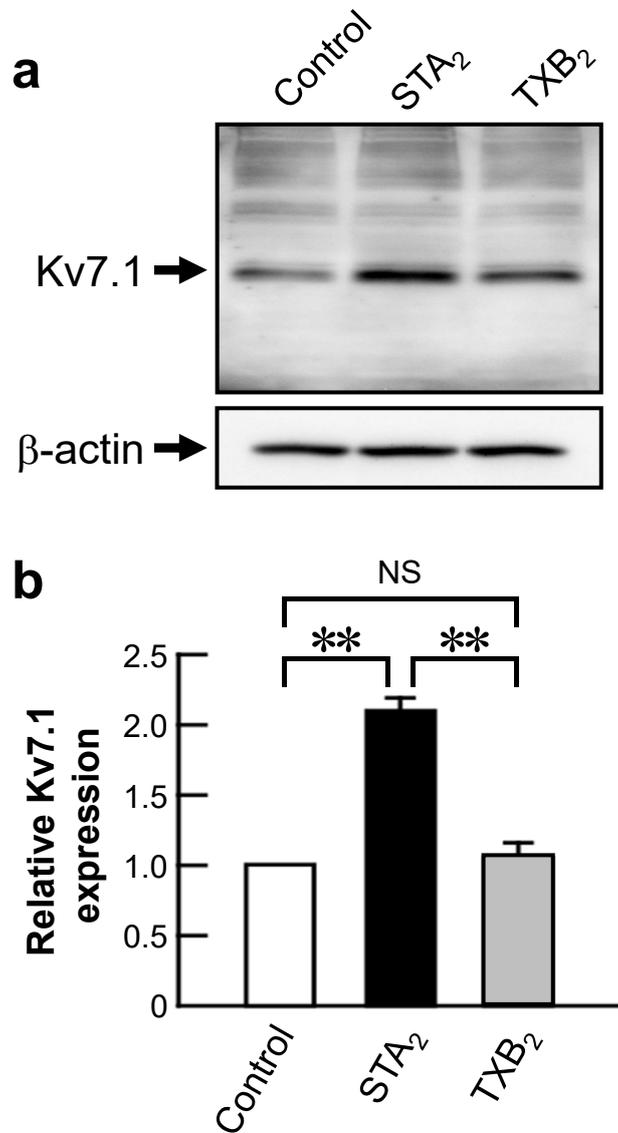


図5-2 KM12-L4細胞における STA_2 処理によるKv7.1発現のアップレギュレーション
 (a) KM12-L4細胞におけるKv7.1 (70 kDa) 及び β -actin (45 kDa) タンパク質のウェスタンブロットティング。細胞は2日間、 STA_2 (0.1 μ M) または TXB_2 (0.1 μ M) で処理した。
 (b) β -actinに対して正規化したKv7.1タンパク質の発現量。各列は、4回の実験の平均値 \pm SE (縦棒) を表す。**、 $P < 0.01$ 。NS、有意差なし ($P > 0.05$)。

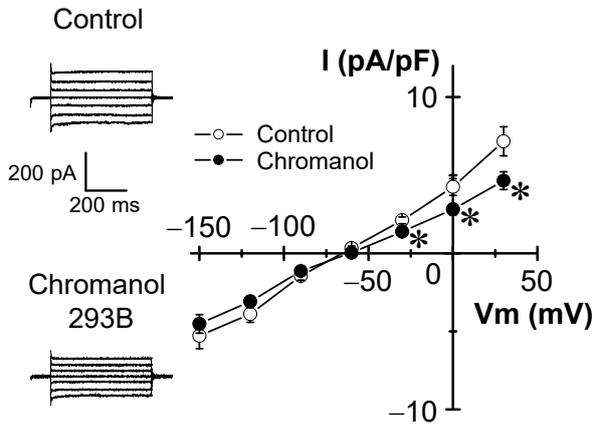
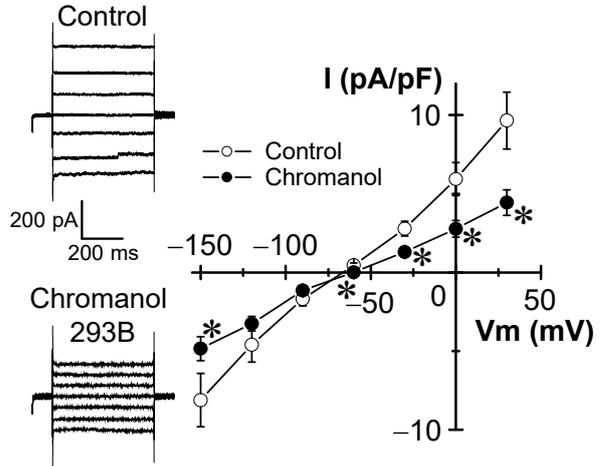
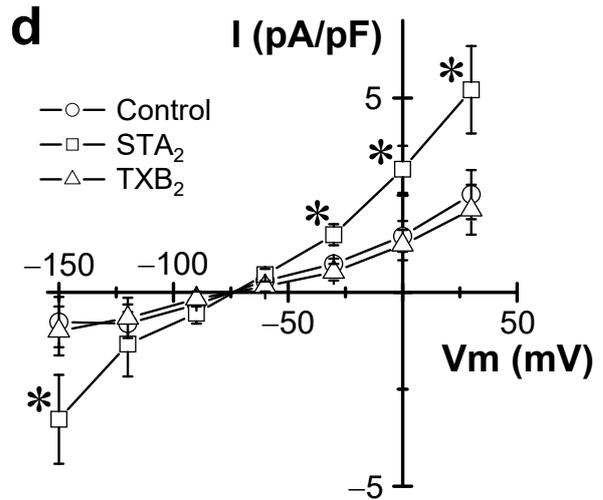
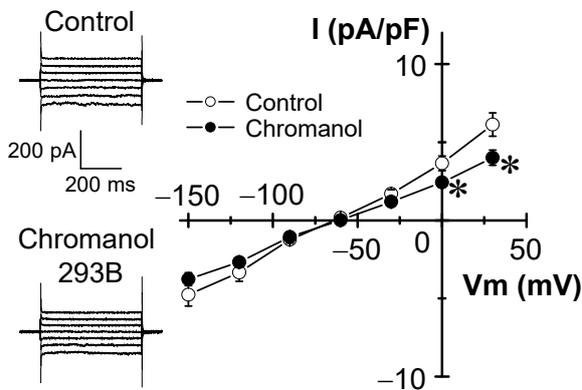
a Control cells**b** STA₂-treated cells**c** TXB₂-treated cells

図5-3 STA₂処理によるKM12-L4細胞におけるchromanol 293B感受性K⁺電流の増強
 KM12-L4細胞におけるコントロール条件下 (Control; **a**) とSTA₂処理下 (0.1 μM; **b**) またはTXB₂処理下 (0.1 μM; **c**) で2日間処理後のホールセル電流。

(**a**) - (**c**) chromanol 293B (30 μM) の非存在下及び存在下で30 mV刻みで-150 mVから30 mVにステップパルスを与えたときの、代表的な電流応答 (左) と定常状態のI-V関係 (右)。各点は、13-18回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。*、*P* < 0.05対Control。

(**d**) コントロール条件下 (Control) とSTA₂またはTXB₂処理下におけるchromanol 293B感受性K⁺電流の比較。データは、a-cに示した結果から算出した。各データ点は、13-18回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。*、*P* < 0.05対Control。

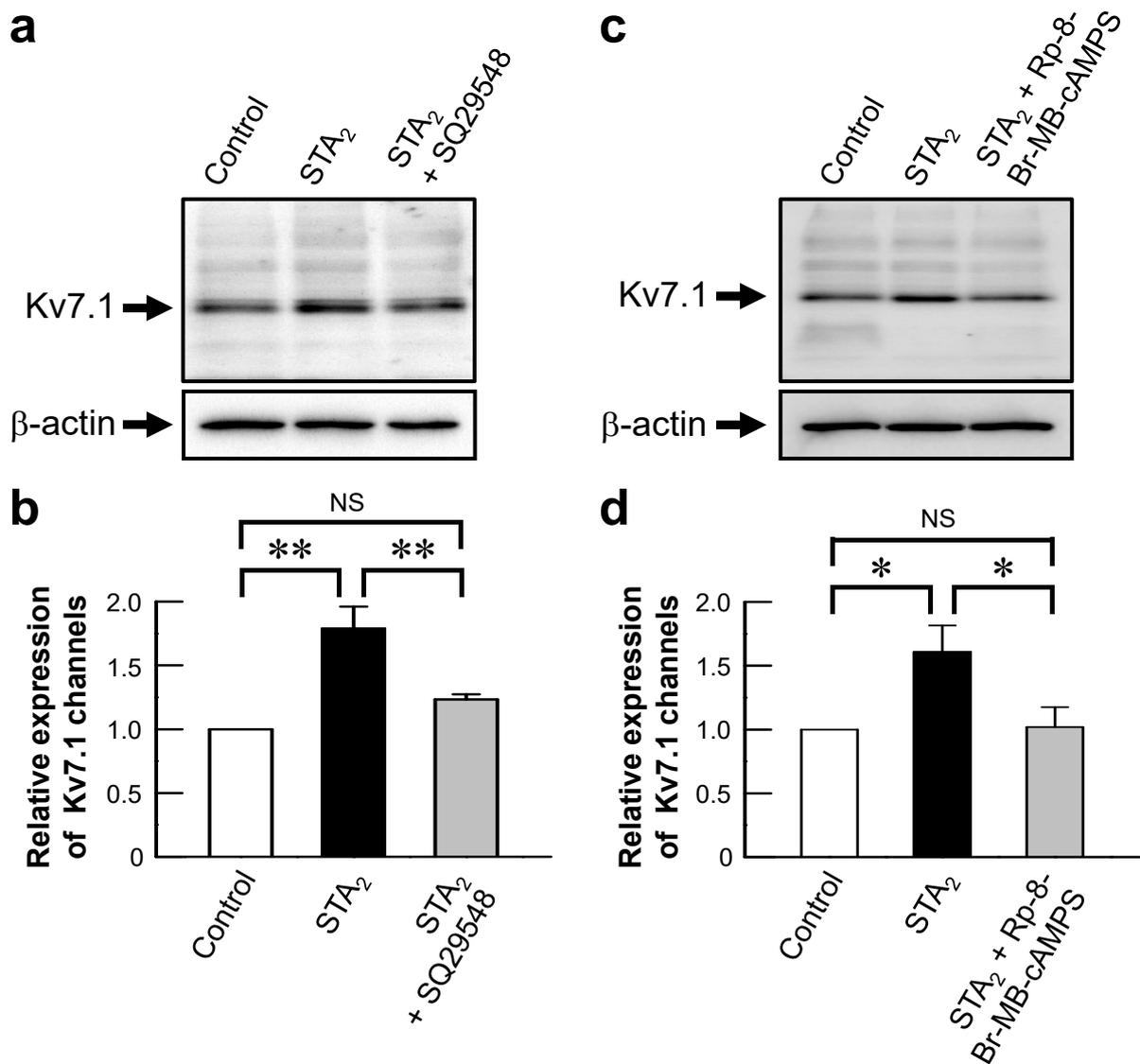


図5-4 TXA₂受容体下流のcAMP経路が関与するSTA₂誘発性Kv7.1発現の増加

(a) KM12-L4細胞をコントロール条件下 (Control) とSTA₂ (0.1 μM) またはSTA₂ (0.1 μM) + SQ29548 (1 μM) で2日間処理したときの、Kv7.1 (70 kDa) 及びβ-actin (45 kDa) タンパク質のウェスタンブロッティング。

(b) β-actinに対して正規化したKv7.1タンパク質の発現量。各列は、7回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。**, $P < 0.01$ 。NS、有意差なし ($P > 0.05$)。

(c) KM12-L4細胞をコントロール条件下 (Control) とSTA₂ (0.1 μM) またはSTA₂ (0.1 μM) + Rp-8-Br-MB-cAMPS (50 μM) で2日間処理したときの、Kv7.1 (70 kDa) 及びβ-actin (45 kDa) タンパク質のウェスタンブロッティング。

(d) β-actinに対して正規化したKv7.1タンパク質の発現量。各列は、3回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。*, $P < 0.05$; NS、有意差なし ($P > 0.05$)。

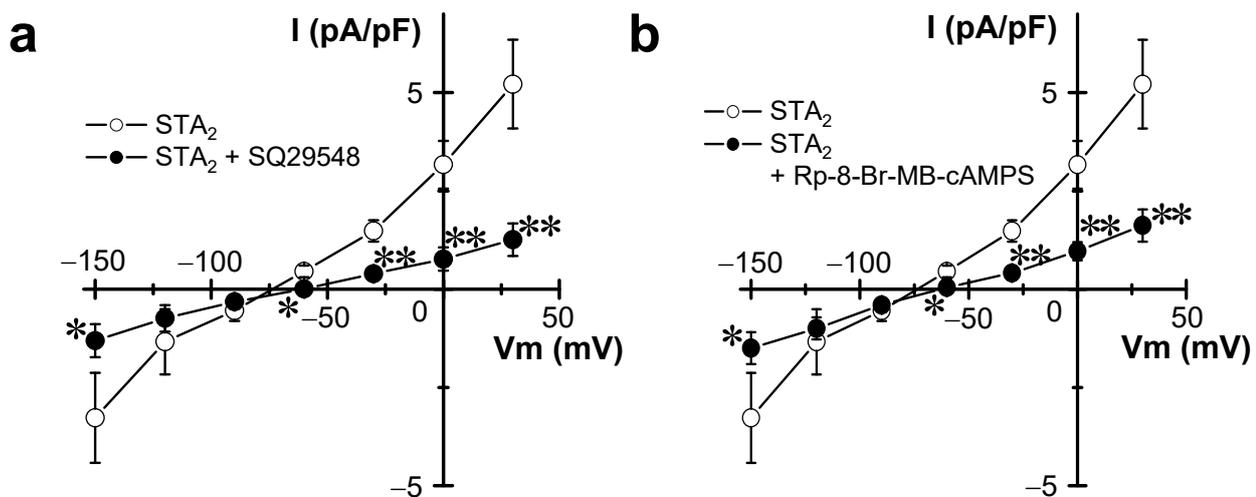


図5-5 KM12-L4細胞におけるchromanol 293B感受性K⁺電流

(a) KM12-L4細胞をSTA₂ (0.1 μM) またはSTA₂ (0.1 μM) + SQ29548 (1 μM) で2日間処理したときのchromanol 293B感受性K⁺電流。各データポイントは12-13回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。*、*P* < 0.05及び**、*P* < 0.01 対STA₂処理細胞。

(b) KM12-L4細胞をSTA₂ (0.1 μM) またはSTA₂ (0.1 μM) + Rp-8-Br-MB-cAMPS (50 μM) で2日間処理したときの、chromanol 293B感受性K⁺電流。各データ点は、13回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。*、*P* < 0.05及び**、*P* < 0.01 対STA₂処理細胞。

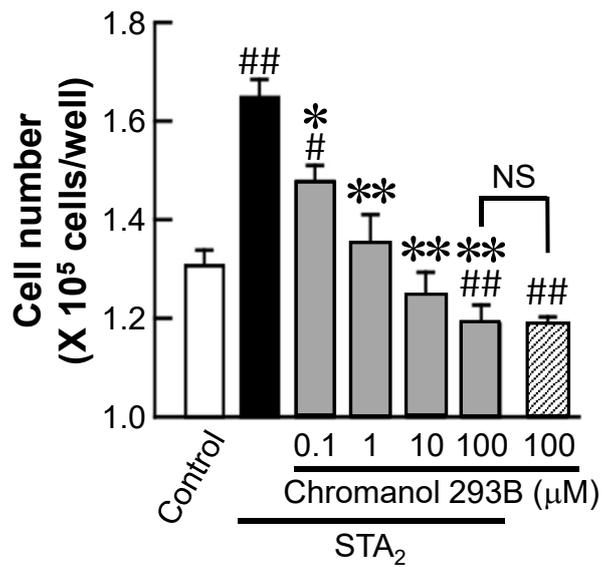


図5-6 KM12-L4大腸がん細胞におけるTXA₂誘発増殖に対するchromanol 293Bの阻害効果

細胞を2日間 STA₂ (0.1 μM) 及び/またはchromanol 293B (0.1 - 100 μM) で処理した。各列は、5-6回の実験の平均値 ± SE (縦棒) を表す。
 *、 $P < 0.05$ 及び **、 $P < 0.01$ 対 chromanol 293B の非在下での STA₂ 処理細胞 (黒棒) ; ##、 $P < 0.01$ 対 Control (白抜き) ; NS、有意差なし ($P > 0.05$)。

【総括】

本論文では、消化管におけるイオン輸送体として、胃酸分泌細胞における胃プロトンポンプおよび **CIC-5**、大腸がんにおける非胃型プロトンポンプ (**ATP1A1**) および **Kv7.1** に着目し行った五部の研究において、以下のことを明らかにした。①胃プロトンポンプ (**H⁺,K⁺-ATPase**) とクロライド/プロトン交換輸送体 **CIC-5** が、胃酸分泌細胞の細管小胞において分子会合し、**CIC-5** が胃酸 (**HCl**) 分泌の **Cl** 輸送タンパク質として機能するとともに、胃プロトンポンプ活性を上昇させる。②分子シャペロン **ERp57** が、シャペロン機能とは異なるメカニズムで胃酸分泌細胞の頂端膜における胃プロトンポンプ活性を上昇させる。③細胞容積調節性アニオンチャンネル (**VRAC**) の特異的阻害剤として知られている **DCPIB** が、胃プロトンポンプと類縁のナトリウムポンプやカルシウムポンプには影響を及ぼさず、胃プロトンポンプ活性を抑制する。④胃プロトンポンプと相同性が約 60% の **P** 型 **ATPase** である **ATP1A1** は機能未知であるが、大腸がん組織並びに大腸がん細胞に高発現している。⑤大腸がん細胞において、トロンボキサン合成酵素が高発現し、トロンボキサン **A₂** が細胞増殖を促進することが見出されていたが、このメカニズムの下流に **K⁺** チャンネルである **Kv7.1** (**KCNQ1**) の過剰発現が関与している。

CIC-5 は、腎臓の近位尿細管においては **V-ATPase** と共役して小胞の酸性化に寄与しているが、胃細管小胞においては胃プロトンポンプと複合体を形成し、胃酸分泌刺激時の食物消化のための胃酸分泌に関与している可能性を明らかにした (第一部)。他方、空腹時の基礎胃酸分泌に関与している胃酸分泌細胞の頂端膜において、胃プロトンポンプは、**CIC-5** ではなく **ERp57** と複合体を形成していることを見出した (第二部)。新規メカニズムの胃酸分泌阻害薬としてカリウムイオン競合型アシッドブロッカー (**P-CABs** : **Potassium-Competitive Acid Blockers**) に分類される **vonoprazan** は、これまでの **H₂** ブロッカーや **PPI** (**proton pump inhibitor**) に比べ胃酸分泌抑制作用が早く表れることや阻害効果が高いことから最近臨床でも用いられることが多くなってきた。実際、ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) の除菌率が **PPI** を使用した場合に比べて高いことが示されている。しかし、原因は不明だが、**PPI** と同様に、長期服用による高ガストリン血症の副作用が報告されている。本研究により明らかにした細管小胞および頂端膜における各胃プロトンポンプ複合体を特異的に制御することのできる化合物もしくは抗体は、従来の胃プロトンポンプ阻害薬とは異なる胃酸分泌制御が可能であると考えられる。従って、本研究は、胃酸分泌刺激時における分泌酸量が減少している低酸症のような疾患においてその機能回復に貢献できる医薬品の開発、および基礎分泌が亢進している種々の酸関連性疾患の治療薬開発の糸口になるかもしれない。また、第三部では **DCPIB** が胃プロトンポンプを阻害することを見出した。阻害様式の解明については今後の課題だが、胃酸分泌メカニズムの全容解明がされていない中、*in vitro* の研究がまだなお必要と考えられる現在において、**DCPIB** のような新たなプロトンポンプ阻害剤の候補が見出された意義は大きいと考えら

れる。

第四部と五部では、日本において、食の欧米化が原因により罹患率や死亡率が増加している大腸がんにおいて、異常に高発現しているイオン輸送体（非胃型プロトンポンプ ATP1AL1 および K⁺チャネル Kv7.1 (KCNQ1)）を見出した。ATP1AL1 はその生理機能がほとんど解明されていない。ATP1AL1 によるプロトン輸送と大腸がんの増殖能、遊走能、浸潤能との関連などは今後の研究課題だが、大腸がんの新たなバイオマーカーおよび創薬ターゲットとなる可能性が考えられる。また、Kv7.1 (KCNQ1) は、心臓でその機能がよく解析されているが、大腸がんにおける病態生理機能についての報告は本論文が初めてである。近年、低用量 aspirin 投与により、大腸がんの発症リスクが低減するという知見が報告されている。Aspirin はシクロオキシゲナーゼ阻害作用を持つことから、その下流の TXA₂ 産生抑制により、大腸がんが抑制される可能性も考えられる。このメカニズムに K⁺チャネルが関連している可能性は十分に考えられ、Kv7.1 (KCNQ1) が新たな治療ターゲットになる可能性がある。このように、本研究により大腸がんにおいて、ATP1AL1 および Kv7.1 が過剰発現していることが明らかになったが、これらのイオン輸送体に付随するタンパク質の同定には至っていない。今後、これらイオン輸送体と大腸がん特異的に発現するタンパク質との関連性が解明できれば、新たな大腸がん治療法の創出に結び付くことが考えられる。

以上、本研究では、消化管における新規のイオン輸送メカニズムおよびイオン輸送体の新たな病態生理機能の一部を明らかにすることが出来た。食物の消化や栄養素の吸収、消化液の分泌や水分の吸収に伴う激しい外的環境変化に曝されている胃や腸の細胞においては、イオン輸送体による恒常性維持機能が重要である。本論文はイオン輸送体ならびに付随タンパク質をターゲットとし、新しい作用メカニズムを有する消化管疾患治療薬の開発に向けた重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

【参考文献】

- Abdul, M., and Hoosein, N. 2002. Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol. Rep.* **9**, 961-964.
- Altman, K.W., Waltonen, J.D., Tarjan, G., Radosevich, J.A., and Haines, G.K. III. 2007. Human lung mucous glands manifest evidence of the H⁺/K⁺-ATPase proton pump. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **116**, 229-234.
- Andersson, K., and Carlsson, E. 2005. Potassium-competitive acid blockade: a new therapeutic strategy in acid-related diseases. *Pharmacol. Ther.* **108**, 294-307.
- Asano, S., Arakawa, S., Hirasawa, M., Sakai, H., Ohta, M., Ohta, K. and Takeguchi, N. 1994. C-terminal topology of gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Biochem. J.* **299**, 59-64.
- Asano, S., Inoie, M. and Takeguchi, N. 1987. The Cl⁻ channel in hog gastric vesicles is part of the function of H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **262**, 13263-13268.
- Aureli, C., Gaucci, E., Arcangeli, V., Grillo, C., Eufemi, M. and Chichiarelli, S. 2013. ERp57/PDIA3 binds specific DNA fragments in a melanoma cell line. *Gene* **524**, 390-395.
- Bachmann, A., Quast, U., and Russ, U. 2001. Chromanol 293B, a blocker of the slow delayed rectifier K⁺ current (I_{Ks}), inhibits the CFTR Cl⁻ current. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **363**, 590-596.
- Bamberg, K., Nylander, S., Helander, K. G., Lundberg, L. G., Sachs, G. and Helander, H. F. 1994. In situ hybridization of mRNA for the gastric H⁺,K⁺-ATPase in rat oxyntic mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **1190**, 355-359.
- Bastani, B. 1995. Colocalization of H-ATPase and H,K-ATPase immunoreactivity in the rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1476-1482.
- Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M. and Opas, M. 2005. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int. Rev. Cytol.* **245**, 91-121.

- Beil, W., Staar, U., Schünemann, P., and Sewing, K.F. 1988. Omeprazole, SCH 28080 and doxepin differ in their characteristics to inhibit H⁺/K⁺-ATPase driven proton accumulation by parietal cell membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4487-4493.
- Beisvag, V., Falck, G., Loennechen, J.P., Qvigstad, G., Jynge, P., Skomedal, T., Osnes, J.B., Sandvik, A.K., and Ellingsen, Ø. 2003. Identification and regulation of the gastric H⁺/K⁺-ATPase in the rat heart. *Acta Physiol. Scand.* **179**, 251-262.
- Best, L., Yates, A.P., Decher, N., Steinmeyer, K., and Nilius, B. 2004. Inhibition of glucose-induced electrical activity in rat pancreatic beta-cells by DCPIB, a selective inhibitor of volume-sensitive anion currents. *Eur. J. Pharmacol.* **489**, 13-19.
- Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Liu, J.H., Bader, C.R., Bernheim, L., and Fischer-Lougheed, J. 1998. An *ether-à-go-go* K⁺ current, I_{h-eag}, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J. Physiol.* **512**, 317-323.
- Bondarava, M., Li, T., Endl, E., and Wehner, F. 2009. α-ENaC is a functional element of the hypertonicity-induced cation channel in HepG2 cells and it mediates proliferation. *Pflügers Arch.* **458**, 675-687.
- Bosch, R.F., Gaspo, R., Busch, A.E., Lang, H.J., Li, G.R., and Nattel, S. 1998. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **38**, 441-450.
- Bublitz, M., Poulsen, H., Morth, J.P. and Nissen, P. 2010. In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 431-439.
- Busch, A.E., Suessbrich, H., Waldegger, S., Sailer, E., Greger, R., Lang, H., Lang, F., Gibson, K.J., and Maylie, J.G. 1996. Inhibition of I_{Ks} in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig I_{sK} channels by the chromanol 293B. *Pflügers Arch.* **432**, 1094-1096.
- Calhoun, B. C. and Goldenring, J. R. 1997. Two Rab proteins, vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs), are present on immunisolated parietal cell tubulovesicles. *Biochem. J.* **325**, 559-564.

- Campbell, W.G., Weiner, I.D., Wingo, C.S., and Cain, B.D. 1999. H-K-ATPase in the RCCT-28A rabbit cortical collecting duct cell line. *Am. J. Physiol.* **276**, F237-F245.
- Carmosino, M., Procino, G., Nicchia, G. P., Mannucci, R., Verbavatz, J. -M., Gobin, R., Svelto, M. and Valenti, G. 2001. Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells. *J. Cell Biol.* **154**, 1235-1243.
- Coe, H. and Michalak, M. 2010. ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 796-799.
- Cone, C.D., and Cone, C.M. 1976. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Science* **192**, 155-158.
- Crowson, M.S., and Shull, G.E. 1992. Isolation and characterization of a cDNA encoding the putative distal colon H⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 13740-13748.
- D'Amico, M., Gasparoli, L., and Arcangeli, A. 2013. Potassium channels: novel emerging biomarkers and targets for therapy in cancer. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **8**, 53-65.
- Daniel, T.O., Liu, H., Morrow, J.D., Crews, B.C., and Marnett, L.J. 1999. Thromboxane A₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* **59**, 4574-4577.
- Decher, N., Lang, H.J., Nilius, B., Brüggemann, A., Busch, A.E., and Steinmeyer, K. 2001. DCPIB is a novel selective blocker of I_{Cl,swell} and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1467-1479.
- Dedek, K., and Waldegger, S. 2001. Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflügers Arch.* **442**, 896-902.
- Devuyst, O., Christie, P. T., Courtoy, P. J., Beauwens, R. and Thakker R. V. 1999. Intrarenal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 247-257.

Dolderer, J.H., Schuldes, H., Bockhorn, H., Altmannsberger, M., Lambers, C., von Zabern, D., Jonas, D., Schwegler, H., Linke, R., and Schröder, U.H. 2010. HERG1 gene expression as a specific tumor marker in colorectal tissues. *Eur. J. Surg. Oncol.* **36**, 72-77.

Du, X-L., Lau, C-P., Chiu, S-W., Tse, H-F., Gerlach, U., and Li, G-R. 2003. Effects of chromanol 293B on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in human atrial myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 293-300.

Ellerman, D.A., Myles, D.G. and Primakoff, P. 2006. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Dev. Cell* **10**, 831-837.

Freedman, R.B., Klappa, P. and Ruddock, L.W. 2002. Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Rep.* **3**, 136-140.

Fujii, T., Awaka, S.Y., Takahashi, Y., Fujita, K., Tsuji, H., Shimizu, T., Gomi, T., Tsukada, K., and Sakai, H. 2013. Modulation of H⁺,K⁺-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* **587**, 3898-3905.

Fujii, T., Ohira, Y., Itomi, Y., Takahashi, Y., Asano, S., Morii, M., Takeguchi, N., and Sakai, H. 2007. Inhibition of P-type ATPases by [(dihydroindenyl)oxy]acetic acid (DIOA), a K⁺-Cl⁻ cotransporter inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **560**, 123-126.

Fujii, T., Takahashi, Y., Itomi, Y., Fujita, K., Morii, M., Tabuchi, Y., Asano, S., Tsukada, K., Takeguchi, N. and Sakai, H. 2008. K⁺-Cl⁻ cotransporter-3a up-regulates Na⁺,K⁺-ATPase in lipid rafts of gastric luminal parietal cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 6869-6877.

Fujii, T., Takahashi, Y., Ikari, A., Morii, M., Tabuchi, Y., Tsukada, K., Takeguchi, N. and Sakai, H. 2009. 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.

Fujii, T., Takeguchi, N. and Sakai, H. 2011. Function of K⁺-Cl⁻ cotransporters in the acid secretory mechanism of gastric parietal cells. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 810-812.

Grishin, A.V., Sverdlov, V.E., Kostina, M.B., and Modyanov, N.N. 1994. Cloning and characterization of the entire cDNA encoded by ATP1AL1- a member of the human Na,K/H,K-ATPase gene family. *FEBS Lett.* **349**, 144-150.

Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and Jentsch T. J. 1998. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8075-8080.

Günther, W., Piwon, N. and Jentsch, T. J. 2003. The ClC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflügers Arch.* **445**, 456-462.

Hélix, N., Strøbaek, D., Dahl, B.H., and Christophersen, P. 2003. Inhibition of the endogenous volume-regulated anion channel (VRAC) in HEK293 cells by acidic di-aryl-ureas. *J. Membr. Biol.* **196**, 83-94.

Hernández-Pineda, R., Chow, A., Amarillo, Y., Moreno, H., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E.C., Hernández-Cruz, A., and Rudy, B. 1999. Kv3.1-Kv3.2 channels underlie a high-voltage-activating component of the delayed rectifier K⁺ current in projecting neurons from the globus pallidus. *J. Neurophysiol.* **82**, 1512-1528.

Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T. and Hirai, H. 1995. Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur. J. Biochem.* **234**, 336-342.

Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., and Narumiya, S. 1996. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J. Clin. Invest.* **97**, 949-956.

Holbrook, L.M., Sasikumar, P., Stanley, R.G., Simmonds, A.D., Bicknell, A.B. and Gibbins, J.M. 2012. The platelet-surface thiol isomerase enzyme ERp57 modulates platelet function. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 278-288.

Honoré, E., Guillemare, E., Lesage, F., Barhanin, J., and Lazdunski, M. 1994. Injection of a K⁺ channel (Kv1.3) cRNA in fertilized eggs leads to functional expression in cultured myotomal muscle cells from *Xenopus* embryos. *FEBS Lett.* **348**, 259-262.

Hori, K., Takahashi, Y., Horikawa, N., Furukawa, T., Tsukada, K., Takeguchi, N. and Sakai, H. 2004. Is the ClC-2 chloride channel involved in the Cl⁻ secretory mechanism of gastric parietal cells? *FEBS Lett.* **575**, 105-108.

Horikawa, N., Suzuki, T., Uchiumi, T., Minamimura, T., Tsukada, K., Takeguchi, N., and Sakai, H. 2005. Cyclic AMP-dependent Cl⁻ secretion induced by thromboxane A₂ in isolated human colon. *J. Physiol.* **562**, 885-897.

Huang, J-S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., and Le Breton, G.C. 2004. Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cell Signal.* **16**, 521-533.

Iida, K.I., Miyaishi, O., Iwata, Y., Kozaki, K.I., Matsuyama, M. and Saga, S. 1996. Distinct distribution of protein disulfide isomerase family proteins in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 751-759.

Jaisser, F., and Beggah, A.T. 1999. The non-gastric H⁺,K⁺-ATPases: molecular and functional properties. *Am. J. Physiol.* **276**, F812-F824.

Jaisser, F., Coutry, N., Farman, N., Binder, H.J., and Rossier, B.C. 1993. A putative H⁺-K⁺-ATPase is selectively expressed in surface epithelial cells of rat distal colon. *Am. J. Physiol.* **265**, C1080-C1089.

Jespersen, T., Grunnet, M., and Olesen, S-P. 2005. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)* **20**, 408-416.

Jentsch, T. J. 2008. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 3-36.

Jentsch, T. J., Poët, M., Fuhrmann, J. C. and Zdebik, A. A. 2005. Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 779-807.

Kajita, S., Ruebel, K.H., Casey, M.B., Nakamura, N., and Lloyd, R.V. 2005. Role of COX-2, thromboxane A₂ synthase, and prostaglandin I₂ synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Mod. Pathol.* **18**, 221-227.

- Karam, S. M., Yao, X. and Forte, J. G. 1997. Functional heterogeneity of parietal cells along the pit-gland axis. *Am. J. Physiol.* **272**, G161-G171.
- Kimura, T., Tabuchi, Y., Takeguchi, N. and Asano, S. 2002. Mutational study on the roles of disulfide bonds in the β -subunit of gastric H^+,K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **277**, 20671-20677.
- Koivunen, P., Horelli-Kuitunen, N., Helaakoski, T., Karvonen, P., Jaakkola, M., Palotie, A. and Kivirikko, K.I. 1997. Structures of the human gene for the protein disulfide isomerase-related polypeptide ERp60 and a processed gene and assignment of these genes to 15q15 and 1q21. *Genomics* **42**, 397-404.
- Kraut, J.A., Hiura, J., Besancon, M., Smolka, A., Sachs, G., and Scott, D. 1997. Effect of hypokalemia on the abundance of $HK_{\alpha 1}$ and $HK_{\alpha 2}$ protein in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **272**, F744-F750.
- Kunzelmann, K., Hübner, M., Schreiber, R., Levy-Holzman, R., Garty, H., Bleich, M., Warth, R., Slavik, M., von Hahn, T., and Greger, R. 2001. Cloning and function of the rat colonic epithelial K^+ channel KvLQT1. *J. Membr. Biol.* **179**, 155-164.
- Lastraioli, E., Guasti, L., Crociani, O., Polvani, S., Hofmann, G., Witchel, H., Bencini, L., Calistri, M., Messerini, L., Scatizzi, M., Moretti, R., Wanke, E., Olivotto, M., Mugnai, G., and Arcangeli, A. 2004. *herg1* gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res.* **64**, 606-611.
- Lee, J., Rajendran, V.M., Mann, A.S., Kashgarian, M., and Binder, H.J. 1995. Functional expression and segmental localization of rat colonic K^+ -adenosine triphosphatase. *J. Clin. Invest.* **96**, 2002-2008.
- Leys, C.M., Nomura, S., LaFleur, B.J., Ferrone, S., Kaminishi, M., Montgomery, E. and Goldenring, J.R. 2007. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* **141**, 41-50.
- Li, Y. and Camacho, P. 2003. Ca^{2+} -dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J. Cell Biol.* **164**, 35-46.

- Lindenthal, S., Schmieder, S., Ehrenfeld, J. and Wills, N. K. 1997. Cloning and functional expression of a ClC Cl⁻ channel from the renal cell line A6. *Am. J. Physiol.* **273**, C1176-C1185.
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S. P., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig, I. W. and Thakker, R. V. 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**, 445-449.
- Lynch, I.J., Rudin, A., Xia, S.L., Stow, L.R., Shull, G.E., Weiner, I.D., Cain, B.D., and Wingo, C.S. 2008. Impaired acid secretion in cortical collecting duct intercalated cells from H-K-ATPase-deficient mice: role of HKα isoforms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F621-F627.
- McDaniel, N., Pace, A. J., Spiegel, S., Engelhardt, R., Koller, B. H., Seidler, U. and Lyttle, C. 2005. Role of Na-K-2Cl cotransporter-1 in gastric secretion of nonacidic fluid and pepsinogen. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G550-G560.
- Meneton, P., Schultheis, P.J., Greeb, J., Nieman, M.L., Liu, L.H., Clarke, L.L., Duffy, J.J., Doetschman, T., Lorenz, J.N., and Shull, G.E. 1998. Increased sensitivity to K⁺ deprivation in colonic H,K-ATPase-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 536-542.
- Minieri, L., Pivonkova, H., Caprini, M., Harantova, L., Anderova, M., and Ferroni, S. 2013. The inhibitor of volume-regulated anion channels DCPIB activates TREK potassium channels in cultured astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 1240-1254.
- Modyanov, N.N., Petrukhin, K.E., Sverdlov, V.E., Grishin, A.V., Orlova, M.Y., Kostina, M.B., Makarevich, O.I., Broude, N.E., Monastyrskaya, G.S., and Sverdlov, E.D. 1991. The family of human Na,K-ATPase genes. *ATP1A1* gene is transcriptionally competent and probably encodes the related ion transport ATPase. *FEBS Lett.* **278**, 91-94.
- Morii, M., Danko, S., Kim, D.H., and Ikemoto, N. 1986. Fluorescence conformational probe study of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**, 2343-2348.

- Morii, M., Takata, H., Fujisaki, H., and Takeguchi, N. 1990. The potency of substituted benzimidazoles such as E3810, omeprazole, Ro 18-5364 to inhibit gastric H⁺, K⁺-ATPase is correlated with the rate of acid-activation of the inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 661-667.
- Morii, M., and Takeguchi, N. 1993. Different biochemical modes of action of two irreversible H⁺,K⁺-ATPase inhibitors, omeprazole and E3810. *J. Biol. Chem.* **268**, 21553-21559.
- Morii, M., Yamauchi, M., Ichikawa, T., Fujii, T., Takahashi, Y., Asano, S., Takeguchi, N. and Sakai, H. 2008. Involvement of the H₃O⁺-Lys-164-Gln-161-Glu-345 charge transfer pathway in proton transport of gastric H⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 16876-16884.
- Munson, K., Garcia, R., and Sachs, G. 2005. Inhibitor and ion binding sites on the gastric H,K-ATPase. *Biochemistry* **44**, 5267-5284.
- Nemere, I., Farach-Carson, M.C., Rohe, B., Sterling, T.M, Norman, A.W., Boyan, B.D. and Safford, S.E. 2004. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 7392-7397.
- Ni, M. and Lee, A.S. 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* **581**, 3641-3651.
- Nie, D., Lamberti, M., Zacharek, A., Li, L., Szekeres, K., Tang, K., Chen, Y., and Honn, K.V. 2000. Thromboxane A₂ regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 245-251.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T. and Droogmans, G. 1996. Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen. Pharmacol.* **27**, 1131-1140.
- Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Van, B., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A. and Takeshima, H. 2012. TRIM50 protein regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 33523-33532.

Nishizawa, T., Nagao, T., Iwatsubo, T., Forte, J. G. and Urushidani, T. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel chloride intracellular channel-related protein, parchorin, expressed in water-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 11164-11173.

Novak, I., Wang, J., Henriksen, K.L., Haanes, K.A., Krabbe, S., Nitschke, R., and Hede, S.E. 2011. Pancreatic bicarbonate secretion involves two proton pumps. *J. Biol. Chem.* **286**, 280-289.

Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G. and Jentsch, T. J. 2010. Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* **328**, 1398-1401.

Numata, T., Sato, K., Christmann, J., Marx, R., Mori, Y., Okada, Y., and Wehner, F. 2012. The ΔC splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J. Physiol.* **590**, 1121-1138.

Obeid, M. 2008. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J. Immunol.* **181**, 2533-2543.

Ohkusa, T., Kang, J.J., Morii, M., and Ikemoto, N. 1991. Conformational change of the foot protein of sarcoplasmic reticulum as an initial event of calcium release. *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 609-615.

Okada, Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* **273**, C755-C789.

Ono, S., Guntupalli, J., and DuBose, T.D. Jr. 1996. Role of H⁺-K⁺-ATPase in pH_i regulation in inner medullary collecting duct cells in culture. *Am. J. Physiol.* **270**, F852-F861.

Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Terracciano, L., Tornillo, L., Bubendorf, L., Kunzelmann, K., and Schreiber, R. 2007. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 824-831.

Pardo, L.A. 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* **19**, 285-292.

Pestov, N.B., Romanova, L.G., Korneenko, T.V., Egorov, M.V., Kostina, M.B., Sverdlov, V.E., Askari, A., Shakhparonov, M.I., and Modyanov, N.N. 1998. Ouabain-sensitive H,K-ATPase: tissue-specific expression of the mammalian genes encoding the catalytic α subunit. *FEBS Lett.* **440**, 320-324.

Pestov, N.B., Korneenko, T.V., Adams, G., Tillekeratne, M., Shakhparonov, M.I., and Modyanov, N.N. 2002. Nongastric H-K-ATPase in rodent prostate: lobe-specific expression and apical localization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C907-C916.

Petrovic, S., Wang, Z., Ma, L., Seidler, U., Forte, J. G., Shull, G. E. and Soleimani, M. 2002. Colocalization of the apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G1207-G1216.

Piccolo, A. and Pusch, M. 2005. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* **436**, 420-423.

Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R. and Jentsch, T. J. 2000. CLC-5 Cl^- channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **408**, 369-373.

Preston, P., Wartosch, L., Günzel, D., Fromm, M., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Barhanin, J., Warth, R., and Jentsch, T.J. 2010. Disruption of the K^+ channel β -subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl^- transport. *J. Biol. Chem.* **285**, 7165-7175.

Qiu, Z., Dubin, A.E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L.J., Reinhardt, J., Orth, A.P., and Patapoutian, A. 2014. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* **157**, 447-458.

Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. -S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. W. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.

Rouzaire-Dubois, B., and Dubois, J.M. 1998. K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J. Physiol.* **510**, 93-102.

Rouzaire-Dubois, B., Milandri, J.B., Bostel, S., and Dubois, J.M. 2000. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Pflügers Arch.* **440**, 881-888.

Sachs, G. 2001. Improving on PPI-based therapy of GORD. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, Suppl. 1, S35-S41.

Sachs, G., Shin, J. M., Vagin, O., Lambrecht, N., Yakubov, I. and Munson, K. 2007. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J. Clin. Gastroenterol.* **41**, S226-S242.

Sakai, H., Sato, T., Hamada, N., Yasue, M., Ikari, A., Kakinoki, B., and Takeguchi, N. 1997. Thromboxane A₂, released by the anti-tumor drug irinotecan, is a novel stimulator of Cl⁻ secretion in isolated rat colon. *J. Physiol. (Lond)*. **505**, 133-144.

Sakai, H., Lingueglia, E., Champigny, G., Mattei, M-G., and Lazdunski, M. 1999. Cloning and functional expression of a novel degenerin-like Na⁺ channel gene in mammals. *J. Physiol. (Lond)*. **519**, 323-333.

Sakai, H., Ukai, M., Ikari, A., Asano, S., and Takeguchi, N. 2001. Is rabbit CLCA1 related to the basolateral Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel of gastric parietal cells? *Jpn. J. Physiol.* **51**, 121-125.

Sakai, H., Suzuki, T., Maeda, M., Takahashi, Y., Horikawa, N., Minamimura, T., Tsukada, K. and Takeguchi, N. 2004. Up-regulation of Na⁺,K⁺-ATPase α 3-isoform and down-regulation of the α 1-isoform in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* **563**, 151-154.

Sakai, H., Suzuki, T., Takahashi, Y., Ukai, M., Tauchi, K., Fujii, T., Horikawa, N., Minamimura, T., Tabuchi, Y., Morii, M., Tsukada, K. and Takeguchi, N. 2006. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A₂. *FEBS Lett.* **580**, 3368-3374.

Sakamoto, H., Kawasaki, M., Uchida, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1996. Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl⁻ channels. *J. Biol. Chem.* **271**, 10210-10216.

Sakamoto, H., Sado, Y., Naito, I., Kwon, T., -H., Inoue, S., Endo, K., Kawasaki, M., Uchida, S., Nielsen, S., Sasaki, S. and Marumo, F. 1999. Cellular and subcellular immunolocalization of ClC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H⁺-ATPase. *Am. J. Physiol.* **277**, F957-F965.

Sangan, P., Rajendran, V.M., Mann, A.S., Kashgarian, M., and Binder, H.J. 1997. Regulation of colonic H-K-ATPase in large intestine and kidney by dietary Na depletion and dietary K depletion. *Am. J. Physiol.* **272**, C685-C696.

Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S. and Jentsch, T. J. 2005. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**, 424-427.

Schroeder, B.C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., and Jentsch, T.J. 2000. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.

Sehgal, P.B., Guo, G.G., Shah, M., Kumar, V. and Patel, K. 2002. Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **277**, 12067-12074.

Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C., and Nilius, B. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J. Physiol.* **529**, 385-394.

Shibata, T., Hibino, H., Doi, K., Suzuki, T., Hisa, Y., and Kurachi, Y. 2006. Gastric type H⁺,K⁺-ATPase in the cochlear lateral wall is critically involved in formation of the endocochlear potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C1038-C1048.

Shin, J.M., Cho, Y.M., and Sachs, G. 2004. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H⁺,K⁺)-ATPase by proton pump inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7800-7811.

Shin, J.M., and Sachs, G. 2008. Pharmacology of proton pump inhibitors. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **10**, 528-534.

- Shin, J.M., Munson, K., Vagin, O., and Sachs, G. 2009. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. *Pflügers Arch.* **457**, 609-622.
- Sidani, S. M., Kirchhoff, P., Socrates, T., Stelter, L., Ferreira, E., Caputo, C., Roberts, K. E., Bell, R. L., Egan, M. E. and Geibel, J. P. 2007. $\Delta F508$ mutation results in impaired gastric acid secretion. *J. Biol. Chem.* **282**, 6068-6074.
- Sitia, R. and Braakman, I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**, 891-894.
- Smith, A. J. and Lippiat, J. D. 2010. Direct endosomal acidification by the outwardly rectifying CLC-5 Cl⁻/H⁺ exchanger. *J. Physiol.* **588**, 2033-2045.
- Spicer, Z., Clarke, L.L., Gawenis, L.R., and Shull, G.E. 2001. Colonic H⁺-K⁺-ATPase in K⁺ conservation and electrogenic Na⁺ absorption during Na⁺ restriction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G1369-G1377.
- Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K., and Schreiber, R. 2007. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J.* **21**, 35-44.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. and Jentsch, T. J. 1995. Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* **270**, 31172-31177.
- Strobl, J.S., Wonderlin, W.F., and Flynn, D.C. 1995. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen. Pharmacol.* **26**, 1643-1649.
- Suzuki, T., Sakai, H., Ikari, A., and Takeguchi, N. 2000. Inhibition of thromboxane A₂-induced Cl⁻ secretion by antidiarrhea drug loperamide in isolated rat colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 233-238.
- Takahashi, Y., Fujii, T., Fujita, K., Shimizu, T., Higuchi, T., Tabuchi, Y., Sakamoto, H., Naito, I., Manabe, K., Uchida, S., Sasaki, S., Ikari, A., Tsukada, K., and Sakai H. 2014. Functional coupling of chloride-proton exchanger CLC-5 to gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Biol. Open* **3**, 12-21.

- Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C. and Chichiarelli, S. 2011. ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol. Biol. Lett.* **16**, 539-563.
- Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Peng, K. -C., Bens, M., Lüchow, A., Günther, W. and Jentsch, T. J. 2001. Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C373-C381.
- Voss, F.K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., von Kries, J.P., Stauber, T., and Jentsch, T.J. 2014. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* **344**, 634-638.
- Wang, Z. 2004. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Arch.* **448**, 274-286.
- Wang, Y., Cai, H., Cebotaru, L., Hryciw, D. H., Weinman, E. J., Donowitz, M., Guggino, S. E. and Guggino, W. B. 2005. ClC-5: role in endocytosis in the proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F850-F862.
- Wang, S. S., Devuyst, O., Courtoy, P. J., Wang, X. -T., Wang, H., Wang, Y., Thakker, R. V., Guggino, S. and Guggino, W. B. 2000. Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2937-2945.
- Watanabe, T., Sato, M., Kaneko, K., Suzuki, T., Yoshida, T., and Suzuki, Y. 1993. Isolation and characterization of cDNA encoding the putative guinea pig distal colon H⁺,K⁺-ATPase α subunit. GenBank no. D21854.
- Watanabe, T., Suzuki, T., and Suzuki, Y. 1990. Ouabain-sensitive K⁺-ATPase in epithelial cells from guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol.* **258**, G506-G511.
- Wehner, F. 2006. Cell volume-regulated cation channels. *Contrib. Nephrol.* **152**, 25-53.
- Wehner, F., Shimizu, T., Sabirov, R., and Okada, Y. 2003. Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett.* **551**, 20-24.

Wonderlin, W.F., and Strobl, J.S. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr. Biol.* **154**, 91-107.

Wrong, O. M., Norden, A. G. W. and Feest, T. G. 1994. Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *Q. J. Med.* **87**, 473-493.

Wyse, B., Ali, N. and Ellison, D.H. 2002. Interaction with grp58 increases activity of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, F424-430.

Xu, J., Song, P., Miller, M. L., Borgese, F., Barone, S., Riederer, B., Wang, Z., Alper, S. L., Forte, J. G., Shull, G. E., Ehrenfeld, J., Seidler, U. and Soleimani, M. 2008. Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17955-17960.

Yang, I.C., Scherz, M.W., Bahinski, A., Bennett, P.B., and Murray, K.T. 2000. Stereoselective interactions of the enantiomers of chromanol 293B with human voltage-gated potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 955-962.

Yao, X., Kwan, and H.Y. 1999. Activity of voltage-gated K⁺ channels is associated with cell proliferation and Ca²⁺ influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci.* **65**, 55-62.

Yoda, A. and Hokin, L. E. 1970. On the reversibility of binding of cardiotonic steroids to a partially purified (Na + K)-activated adenosinetriphosphatase from beef brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 880-886.

Zifarelli, G. and Pusch, M. 2009. Conversion of the 2 Cl⁻/1 H⁺ antiporter ClC-5 in a NO₃⁻/H⁺ antiporter by a single point mutation. *EMBO J.* **28**, 175-182.

【本論文に使用した論文リスト】

1. Takahashi, Y., Fujii, T., Fujita, K., Shimizu, T., Higuchi, T., Tabuchi, Y., Sakamoto, H., Naito, I., Manabe, K., Uchida, S., Sasaki, S., Ikari, A., Tsukada, K., and Sakai H. 2014. Functional coupling of chloride-proton exchanger ClC-5 to gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Biol. Open* **3**, 12-21.
2. Fujii, T., Awaka, S.Y., Takahashi, Y., Fujita, K., Tsuji, H., Shimizu, T., Gomi, T., Tsukada, K., and Sakai, H. 2013. Modulation of H⁺,K⁺-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* **587**, 3898-3905.
3. Fujii, T., Takahashi, Y., Takeshima, H., Saitoh, C., Shimizu, T., Takeguchi, N., and Sakai, H. 2015. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase by 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB), an inhibitor of volume-regulated anion channel. *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 34-41.
4. Takahashi, Y., Sakai, H., Kuragari, M., Suzuki, T., Tauchi, K., Minamimura, T., Tsukada, K., Asano, S., and Takeguchi, N. 2002. Expression of ATP1AL1, a non-gastric proton pump, in human colorectum. *Jpn. J. Physiol.* **52**, 317-321.
5. Shimizu, T., Fujii, T., Takahashi, Y., Takahashi, Y., Suzuki, T., Ukai, M., Tauchi, K., Horikawa, N., Tsukada, K., and Sakai, H. 2014. Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A₂-induced colonic cancer cell proliferation. *Pflügers Arch.* **466**, 541-548.

【謝辞】

本論文を纏めるに当たり、多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）薬物生理学研究室 酒井 秀紀教授に厚く御礼申し上げます。本論文を査読して頂き、貴重なご意見を頂いた富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）構造生物学研究室 水口 峰之教授ならびに富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）薬剤学研究室 細谷 健一教授に厚く御礼申し上げます。本研究を纏めるに際し、終始、ご指導頂いた富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）薬物生理学研究室 藤井 拓人助教、ならびに清水 貴浩准教授に深く感謝致します。

また、本論文に採用させていただくことを了承していただいた参考論文共著者の鵜飼 政志氏、平井（倉狩） 睦子氏、辻 比呂嗣氏、高橋 祐太氏、斉藤 知里氏、阿波加 隼也氏に感謝の意を表します。最後に、本論文を進めるに当たり、多くのご協力をしていただいた富山大学薬学部薬物生理学研究室員の皆さまに感謝致します。