

氏 名 清 水 貴 浩

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第477号

学位授与の日付 平成12年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor-mediated regulation of  
volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channels in human epithelial cells

論文審査委員 主 査 教 授 井本 敬二  
教 授 岡田 泰伸  
助 教 授 森 泰生  
助 教 授 矢田 俊彦（鹿児島大学）

Since extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  has been reported to modulate swelling-activated  $\text{Cl}^-$  currents, he examined an involvement of G protein-coupled  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (CaR) in the regulation of the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), immunoblotting and whole-cell patch-clamp techniques, in a human epithelial cell line (Intestine 407).

RT-PCR confirmed that the Intestine 407 cell contains mRNAs coding for the CaR, and expression of the CaR protein was evidenced by immunoblotting analysis. The swelling-activated whole-cell  $\text{Cl}^-$  current was augmented by addition of  $\text{Ca}^{2+}$  to the bathing solution in a concentration-dependent manner. The total  $\text{Ca}^{2+}$  concentration for half-maximal stimulation ( $\text{EC}_{50}$ ) was 6.5 mM. A rise in the extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  concentration also concentration-dependently increased the amplitude of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  currents, though less effective ( $\text{EC}_{50}$  of around 22 mM) than  $\text{Ca}^{2+}$ . In addition, other CaR agonists,  $\text{La}^{3+}$  (3  $\mu\text{M}$ ), neomycin (500  $\mu\text{M}$ ) and spermine (1 mM), significantly augmented the  $\text{Cl}^-$  current. To further confirm an involvement of the CaR in the upregulating effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  current, he examined the effects of GDP  $\beta$  S, which is a G protein inhibitor, and GTP  $\gamma$  S, which is a G protein activator, on the  $\text{Cl}^-$  current. Incorporation of GDP  $\beta$  S in the pipette (intracellular) solution abolished extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced enhancement of the  $\text{Cl}^-$  current. Under  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free conditions, the amplitude of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  currents became increased by the presence of intracellular GTP  $\gamma$  S. Further augmentation was never induced by addition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of intracellular GTP  $\gamma$  S. These results demonstrate that the G protein-coupled CaR mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -induced upregulation of the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel in Intestine 407 cells.

He then investigated the signal transduction pathway of CaR-mediated regulation of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel. The augmenting effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the  $\text{Cl}^-$  current could be abolished neither by application of 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- $\text{N,N,N',N'}$ -tetraacetic acid (BAPTA: 5 mM) to the pipette (intracellular) solution nor by 24 h-pretreatment with pertussis toxin (PTX: 100 ng/ml). When the intracellular cAMP concentration was elevated by application of a cocktail of forskolin (10  $\mu\text{M}$ ), dibutyryl cAMP (1 mM) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX: 400  $\mu\text{M}$ ), the amplitude of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  current was markedly enlarged. Under the cAMP stimulation, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  failed to increase the  $\text{Cl}^-$  current. These results suggest that the CaR is coupled to Gs and modulates the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel via an increase in intracellular cAMP level.

Effects of CaR stimulation on volume sensitivity of swelling-activated whole-cell  $\text{Cl}^-$  current were then assessed. When the whole-cell  $\text{Cl}^-$  current density was plotted against the relative cell surface area measured simultaneously, the data points were well fitted to the Boltzmann function. Elevation of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  shifted the curve to the left and increased the slope. These results indicate that CaR-mediated augmentation of the  $\text{Cl}^-$  channel is due to increased sensitivity of the channel (or its accessory volume sensor) to cell volume expansion.

Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  exhibited an additional effect on the volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  current: facilitation of its depolarization-induced inactivation kinetics. The inactivation time course of the  $\text{Cl}^-$  current at large positive potentials became faster in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ . The

relative half inactivation time at +100 mV was maximally decreased to 60.4 and 40.7% by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , respectively. In contrast to the effects on the  $\text{Cl}^-$  current amplitude,  $\text{EC}_{50}$  of the  $\text{Mg}^{2+}$  effect on the inactivation kinetics (2.1 mM) was smaller than that of the  $\text{Ca}^{2+}$  effect (2.5 mM). In addition, all other CaR agonists examined failed to accelerate the inactivation time course. Furthermore, the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  effect on inactivation kinetics was not affected by GDP  $\beta$  S or GTP  $\gamma$  S. These results indicate that the CaR does not mediate the effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  on the depolarization-induced inactivation kinetics.

Taken together, it is concluded that stimulation of CaR induces upregulation of volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  channels by enhancing the volume expansion sensitivity in human epithelial Intestine 407 cells. The second messenger is likely to be cAMP but not  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol. The accelerating effect of extracellular divalent cations on inactivation time course of the  $\text{Cl}^-$  current is induced by a different mechanism without mediation by the CaR.

## 論文の審査結果の要旨

多くの細胞には、環境の浸透圧変化に応じ細胞容積を調節する機構が備わっている。なかでも容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルは、細胞膨張後の調節性容積減少を担い、浸透圧変化に対する応答で重要な役割を果たしている。その容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルは細胞外 Ca<sup>2+</sup> により調節されるという報告がなされているが詳細は不明であった。申請者は電気生理学的測定に分子生物学的技術を併用し容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルの細胞外 Ca<sup>2+</sup> による調節機構を検討した。

申請者は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> による容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャンネルの調節に、G 蛋白質共役型受容体である Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor (CaR) が関与しているとの仮説を立て、ヒト小腸上皮株 Intestine 407 細胞を用いて実験を行った。まず RT-PCR と ウェスタンブロット法により、Intestine 407 細胞に CaR が発現していることを確認した後、パッチクランプ法を用いて測定を行った。容積感受性 Cl<sup>-</sup> 電流は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> により濃度依存的に増加するばかりではなく、Mg<sup>2+</sup> や CaR アゴニストである La<sup>3+</sup>、neomycin、spermine でも増強した。さらに細胞内 GDPβS で細胞外 Ca<sup>2+</sup> の活性化効果は抑制された。細胞内 GTPγS では細胞外 Ca<sup>2+</sup> 非存在下での容積感受性 Cl<sup>-</sup> 電流の増加が見られたが、細胞外 Ca<sup>2+</sup> による更なる亢進は生じなかった。容積感受性 Cl<sup>-</sup> 電流は、細胞内 Ca<sup>2+</sup> による調節を受けないが、細胞内 cAMP 濃度の上昇により増加した。容積感受性 Cl<sup>-</sup> 電流と細胞直径の同時測定の結果より、Ca<sup>2+</sup> はチャンネルの容積感受性を増強していることが示された。

一方、細胞外 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> は、脱分極電位により生じる不活性化過程の濃度依存的に促進するが、この効果は他の CaR アゴニストでは見られなかった。また細胞内 GDPβS、GTPγS によっても影響を受けなかった。

したがって本研究により、Ca<sup>2+</sup> の容積感受性 Cl<sup>-</sup> 電流に対する効果には、CaR・G 蛋白・cAMP を介する経路とそれ以外の経路が存在することが示された。

本論文は電気生理学的手法に分子生物学的手法をあわせて用い、低浸透圧により惹起される細胞容積調節機構と細胞外 Ca<sup>2+</sup> との関係をも分子レベルで解明したものであり、特に G 蛋白及び cAMP の関与を証明したことにおいて高く評価される。よって申請者の論文は学位論文として十分ふさわしい内容であるものと審査委員会で一致して判定した。

学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容および周辺の知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置付け、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するに十分なレベルにあると判断された。また本論文は平易な英語で書かれており、申請者の語学能力は十分であると判断された。以上、総合的に判断し学位を取得するに足る水準に達しているものと判断した。