

氏 名 范 海 天

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第479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 Effects of Phloretin on Three Types of Chloride

Channels in Epithelial Cells

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 伊 佐 正
教 授 小 幡 邦 彦
教 授 岡 田 泰 伸
教 授 河 原 克 雅 (北里大学)

論文内容の要旨

Phloretin, which is the aglucon of phloridzin, has been widely used as an inhibitor of glucose transporter. Since they have recently found that phloretin inhibits a regulatory volume decrease after osmotic swelling in a human epithelial cell line, in the present study, he investigated the effects of phloretin on volume-sensitive Cl⁻ channels using three different epithelial cell lines by the whole-cell patch-clamp technique. Extracellular application of phloretin (over 10 μM) was found to inhibit, in a concentration-dependent manner (IC₅₀ ~ 20 μM), the volume-sensitive Cl⁻ current activated by a hypotonic challenge in human epithelial T84 and Intestine 407 cells as well as in mouse epithelial C127/CFTR cells. In contrast, at a low concentration (30 μM), phloretin failed to inhibit CFTR Cl⁻ currents activated by cAMP stimulation in T84 and C127/CFTR cells. At a high concentration (300 μM), however, partial inhibition by phloretin was observed in the CFTR Cl⁻ currents in both cell types. At 30 and 300 μM, on the other hand, phloretin showed no inhibitory effect on Ca²⁺-activated Cl⁻ currents induced by ionomycin in human T84 cells but rather reactivated them after inactivation during stimulation with ionomycin. It is concluded that phloretin is a novel inhibitor of volume-sensitive Cl⁻ channel, and that at low concentrations phloretin specifically blocks this channel without inhibiting both cAMP-activated and Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in epithelial cells.

論文の審査結果の要旨

細胞の容積調節機構は、溶質輸送や浸透圧の変化に対する生体の最も基本的な防御機構である。そこには様々なメカニズムが関与するが、中でも容積感受性 Cl⁻ channel は多くの細胞種において容積調節に最も重要な役割を果たす陰イオンチャネルであるとされている。そして、その分子構造が解明されていない現在、その選択的阻害剤を見出すことがこのチャネルによる容積調節機構の研究を進展させるために極めて重要である。

申請者は whole cell patch clamp 法を用いて、グルコーストランスポーターを抑制することが既に知られている phloretin の容積感受性 Cl⁻ channel に対する効果を T84, Intestine 407, C127/CFTR という 3 種類の上皮系細胞株を用いて cAMP-activated CFTR Cl⁻ channel、Ca²⁺-activated Cl⁻ channel に対する効果と比較しながら解析した。

その結果、phloretin は 3 種類全ての細胞において IC₅₀ が 20 μM という低濃度で、低浸透圧刺激によって活性化される容積感受性 Cl⁻ channel を電位依存的、濃度依存的に抑制した。それに対して cAMP-activated CFTR Cl⁻ channel については、T84 細胞と C127/CFTR 細胞において 30 μM の phloretin は抑制することはできなかったが、300 μM という高濃度では、電位依存的に一部抑制することが観察された。また Ca²⁺-activated Cl⁻ channel については、T84 細胞において 30 μM、300 μM のいずれの濃度においてもイオノマイシンによる刺激中に一旦活性化された後に不活性化された同チャネルを再活性化するという現象が観察された。

以上の結果から phloretin は 30 μM という低濃度で上皮細胞において容積感受性 Cl⁻ channel の選択的阻害剤として作用することが明らかになった。

本研究は phloretin による容積感受性 Cl⁻ channel の選択的阻害効果を明らかにしたという点で、細胞の容積調節機構の解明に向けた研究に大きく寄与する重要な研究であり、高く評価できる。従って申請者の論文は学位論文として十分にふさわしいものであると審査委員会は判断した。

学位論文の内容の説明が終わった後に、研究の背景、実験方法、さらに関連する分野についての知識、今後の研究方向などについて質問したが、自身の研究内容だけでなく、研究の背景、生理学的研究の方法論などについて十分な理解があると判断された。また、本論文は明快な英語で論理的に書かれており、申請者の英語の能力が研究者として十分であると判断した。

以上の点から、申請者は学位を取得する水準に達していると審査委員会は判断した。