

氏 名 Abdullaev, Iskandar Fatkhullaevich

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第620号

学位授与の日付 平成14年3月22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 Regulation of volume-sensitive chloride channels by
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
and epidermal growth factor receptor

論文審査委員 主査教授 池中 一裕
教授 岡田 泰伸
教授 重本 隆一
教授 森 泰生
助教授 挾間 章博（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター）

論文内容の要旨

Effectene-mediated transient expression of wild-type (WT) human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in HEK293T cells resulted in a 3- times decrease of the amplitude of steady-state volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) chloride current. Expression of the CFTR Δ F508 mutant, which cannot be translocated to the plasma membrane, failed to mimic the CFTR effect on the VSOR Cl^- current, suggesting that plasma membrane expression of CFTR protein is necessary for its regulatory effect on the VSOR Cl^- channel. Expression of the G1349D mutant of CFTR, which impairs ATP binding to the NBD2 domain of CFTR protein, failed to inhibit VSOR Cl^- currents. D1370N and K1250M mutations in NBD2 domain, which impair ATP hydrolysis, were also ineffective in down-regulating VSOR Cl^- currents. In contrast, expression of G551D mutant, which impairs ATP binding to the NBD1 domain, mimicked the effect of WT-CFTR. Thus, he concludes that plasma membrane expression of an ATP-hydrolysable conformation of the NBD2 domain of CFTR is essential for its down-regulatory action on the volume-sensitive chloride conductance in HEK293T/CFTR cells.

In mouse mammary gland C127 cells, in contrast, VSOR Cl^- currents were up-regulated by stable expression of CFTR mediated by bovine papillomavirus (BPV), a carrier for CFTR gene transfection, by around 3-fold. Also, BPV-mediated expression with CFTR Δ F508 mutant produced a similar up-regulating effect on VSOR Cl^- currents. BPV expression is known to constitutively activate receptors to platelet-derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF). Application of a PDGF peptide or a specific inhibitor of PDGF tyrosine kinase, tyrphostin AG1296, had no effect on VSOR Cl^- currents. In contrast, application of an EGF peptide enhanced VSOR Cl^- currents in C127 cells, but not in C127 cells treated with BPV (C127/BPV cells). A specific inhibitor of EGF-receptor tyrosine kinase, tyrphostin B46, profoundly suppressed VSOR Cl^- currents in C127 and C127/BPV cells. Thus, he concludes that VSOR Cl^- channels are enhanced by an EGF receptor tyrosine kinase signaling and that BPV-induced up-regulation overrides CFTR-induced down-regulation of VSOR Cl^- channels in C127/CFTR cells. Since inhibitors of phospholipase $\text{C}\gamma$ (PLC γ), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and MAP kinase kinase (MEK) failed to affect the VSOR Cl^- channel activity, it might be possible that the VSOR Cl^- channel is regulated by some signaling pathway, other than those involving PLC γ , PI3K and MEK, which is downstream to the EGF receptor tyrosine kinase.

論文の審査結果の要旨

容積感受性外向整流性クロライドチャンネル(VSOR)は細胞の容積調節に重要な役割を果たすクロライドチャンネルである。申請者は電解質のバランスや分泌に必要な種々のイオントランスポート系を制御することが知られている Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) に着目し、CFTR が VSOR をも制御するかどうか検討した。ヒト CFTR-cDNA を HEK293 細胞に導入したところ、VSOR クロライド電流が 1/3 に減少した。そこで、種々の CFTR ミュータント (Δ F508, Δ TRL, G1349D, D1370N, K1250M, G551D)を用いて CFTR のどの部位が VSOR の制御に関与しているのか検討した結果以下のことを示すことができた。

- 1) 形質膜への輸送が行われないミュータントは VSOR を抑制しない。
- 2) CFTR には2カ所の ATP 結合部位(NBD1, NBD2)があるが、NBD2に ATP が結合しなくなるミュータントや ATP が分解されなくなるミュータントは VSOR を抑制しない。
- 3) それに反して、NBD1に ATP が結合しなくなるミュータントは野生型と同様に VSOR を抑制する。
- 4) C末端の PDZドメインを欠損しても野生型同様に VSOR を抑制する。

以上の結果をもとに申請者は CFTR に存在する NBD2ドメインが ATP を分解できるコンフォメーションをとることが VSOR を抑制するのに必須であると結論した。

さらに申請者はマウス乳腺細胞 C127 に牛パピローマウイルス(BPV)ベクターにより CFTR を導入した細胞を用いて VSOR に対する影響を調べたところ、予期に反して VSOR クロライド電流の増加が認められた。そこで上記ミュータントや CFTR 遺伝子を含んでいない空の BPV ベクターを用いて検討した結果、電流の増加は CFTR 遺伝子とは関係なく、BPV ベクターが EGF 受容体を活性化するためであるということを示した。薬理的な解析の結果、EGF 受容体活性化以降の経路はフォスホリパーゼC γ 、フォスファチジルイノシトール-3-キナーゼや MAP-KK を経由しなで、カベオラ形成と連関していることが示唆された。事実 BPV ベクターで処理した細胞はカベオラ形成が増進していた。

本論文は細胞の容積調節に重要な役割を果たしている VSOR の制御が、現在知られているよりさらに多くの段階で行われていることを示した価値の高い論文であり、しかもそれぞれの制御機構に関して有用な知見を得ている。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。