

反芻動物耳下腺が消化共生により獲得した唾液分泌機構解明

石川 透 [北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座/助教授]

背景・目的

ウシやヒツジなどの反芻動物は第一胃内でルーメン発酵と呼ばれる微生物との共生関係を利用した特徴的な食物の消化吸収機構を備えている。このルーメンの連続発酵システムに重要な役割を果たしている組織として耳下腺が挙げられる。反芻動物耳下腺は採食時や反芻時のみならず安静時においても、重炭酸イオンに富む唾液を大量に分泌する事ができる。本研究は反芻動物耳下腺の特殊機能である「大量の重炭酸イオンに富む唾液分泌」と「自発性重炭酸イオン分泌」を担うKイオンチャネルの蛋白遺伝子同定およびその機能特性を明らかにすることを目的とした。

内容・方法

- (1) 反芻動物耳下腺腺房細胞に存在する内向き整流性K⁺チャネル(Kir)分子クローニング: 反芻動物耳下腺に特徴的に機能発現する内向き整流性K⁺チャネル(Kir)の分子基盤の同定を試みた。ウシおよびヒツジ耳下腺細胞のKirの特性はこれまで報告されているKir2.1の性質に類似していることから、ウシ耳下腺細胞からmRNAを抽出後、RT-PCR法を用いてKir2.1発現を確認した後、ウシKir2.1(bKir2.1)遺伝子のクローニングを行った。さらにbKir2.1をHEK293細胞に安定型強制発現させ、パッチクランプ法によりbKir2.1の電気生理学的性質を調べ、ウシ耳下腺腺房細胞で観察されるKir電流の性質と比較した。Kir2.1のC端(392~410)のペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学的手法によりKir2.1蛋白が実際にウシ耳下腺腺房細胞に存在するか否かについて調べた。
- (2) Ca²⁺依存性K⁺チャネル(K_{Ca})の機能特性と分子同定: 副交感神経刺激時(またはアセチルコリン刺激時)に認められる重炭酸イオンに富む唾液分泌に関与するK⁺チャネルの機能特性をパッチクランプ法を用いて明らかにし、RT-PCR法によりその分子基盤の同定を試みた。

結果・成果

反芻動物耳下腺腺房細胞に存在する内向き整流性K⁺チャネル(Kir)分子クローニング:

RT-PCR法によりウシ耳下腺細胞にKir2.1のtranscriptが存在する事が確認された。ウシ耳下腺細胞に発現するbKir2.1は1284bpのスクレオチド、427アミノ酸からなることが示された。bKir2.1は腺房細胞および介在部導管に蛋白レベルで発現していたが、線条導管部には全く認められなかっ

た。クローニングしたbKir2.1を強制発現させたHEK293細胞を用いて、bKir2.1のホールセル電流の性質を調べた。クローニングbKir2.1電流の内向き整流性は非常に強く、一価の陽イオン選択性はK⁺>>Rb⁺=Na⁺であった。またクローニングbKir2.1電流は細胞外Ba²⁺およびCs⁺投与により抑制された。さらにCell-attachedパッチモードでの内向き電流の单一チャネルコンダクタンスはピペット内150mM K⁺存在下で27pSであった。これらの性質はウシ耳下腺腺房細胞に発現するKir電流の性質と一致していた。以上の研究結果は反芻動物耳下腺細胞に特徴的に機能発現するKirがKir2.1である可能性を強く示唆する。

Ca²⁺依存性K⁺チャネル(K_{Ca})の機能特性と分子同定:

これまでの我々の研究でアセチルコリンにより誘発されるK⁺輸送には、テトラエチルアンモニウム(TEA)非感受性、Ca²⁺依存性K⁺チャネルが重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。さらにウシ耳下腺腺房細胞には、TEA非感受性、Ca²⁺依存性K⁺チャネル(K_{Ca})電流が存在する事が示されている。そこで、このTEA非感受性K_{Ca}チャネルの性質をマクロパッチ法を用いて詳しく調べた。inside-outパッチモードでTEA非感受性K_{Ca}電流は灌流液の遊離Ca²⁺濃度を上げる事により誘発され、そのKd値は0.43μMであった。outside-outパッチモードで1μM Ca²⁺により誘発されるTEA非感受性K_{Ca}電流は灌流液中にアバミン(100nM)またはd-ツボクラリン(100μM)を投与しても全く抑制されなかつたが、クロトリマゾール(0.1または1μM)およびカリブドトキシン(100nM)投与で強く抑制された。inside-outパッチモードでの実験でTEA非感受性K_{Ca}電流のCa²⁺濃度依存性は細胞内1-EBIO(100μM)により低濃度側にシフトしたが、最大反応は変化しなかった。Ca²⁺/カルモジュリン系の阻害薬であるトリフルオペラジン(100μM)、カルミダゾリウム(10μM)、W-7(50μM)はTEA非感受性K_{Ca}電流を抑制した。これらTEA非感受性K_{Ca}電流の性質はIK1/SK4遺伝子ファミリーに属するK⁺チャネルのものに類似していた。さらに、RT-PCR法により実際にウシ耳下腺細胞にラットおよびヒトで知られているIK1/SK4に非常に相同意の高い分子の存在が確認された。

今後の展望

本研究によりウシ耳下腺からの唾液分泌に重要な役割を果たす可能性の高い2種類のK⁺チャネルの分子実態が明らかになってきた。今後これらのK⁺チャネルの細胞内調節機構および発現機構を明らかにするだけでなく、これらK⁺チャネルとともに反芻動物の特徴的な唾液分泌を可能にする他のイオン輸送蛋白の機能および分子同定を行いたいと考えている。また反芻動物耳下腺の持つ多くの特殊機能を分子レベルで解明することにより、畜産学のみならず医学領域にも応用できる基礎研究領域を開拓したいと考えている。