

新しい膜容量・膜電流同時測定システムによる胃酸分泌機構の研究

Study of gastric acid secretion mechanism by a novel method for simultaneous recordings of the membrane capacity and currents

代表研究者 岡崎国立共同研究機構生理学研究所教授 岡田 泰 伸
Professor, National Institute for Physiological Sciences
Yasunobu OKADA

協同研究者 京都大学医学部助手 上 田 俊 二
Res. Assoc., Faculty of Medicine, Kyoto Univ.
Shunji UEDA

岡崎国立共同研究機構生理学研究所助手 狭 間 章 博
Res. Assoc., National Institute for Physiological Sciences
Akihiro HAZAMA

Since there is an elaboration of the apical membranes at the expense of the intracellular tubulovesicular membrane, fusion of the tubulovesicles to the apical membrane has been put forward as the mechanism for formation of the apical secretory membrane. Biochemical studies with subcellular membrane vesicles have also suggested that stimulation with acid secretagogues induces insertion of intracellular membranes, which convey H, K-ATPase, into the apical membrane. However, direct evidence supporting the fusion hypothesis has been lacking.

In the present study, a real-time increase in the membrane capacitance at the single parietal cell level was, for the first time, detected after stimulation with histamine and dibutyryl cyclic AMP.

By applying a time-resolved phase-sensitive detection method to singly isolated parietal cell of guinea pig, a real-time increase in the membrane capacitance was detected within several min after stimulation with histamine. The membrane current, simultaneously monitored, did not change significantly. An H₂-blocker, cimetidine, but not an H₁-blocker, pyrilamine, inhibited the histamine response. Dibutyryl cyclic AMP mimicked the histamine effect. The capacitance response to histamine was sensitive to cytosolic calcium ions, temperature and *N*-ethylmaleimide. The histamine response was inhibited by intracellular application of a non-hydrolyzable ATP analog, AMP-PNP, and an isoquinolinesulfonamide derivative inhibitor of protein kinase A, H-8. These results indicate that elevation of intracellular cyclic AMP induces exocytotic insertion of intracellular membranes to the plasma membrane by activating protein kinase A in guinea pig parietal cells.

研究目的

哺乳動物の胃酸分泌は壁細胞の管腔側膜における HCl 分泌機能分子である H, K 交換ポンプ (H, K-ATPase) 及び Cl⁻ チャネルによって行われる。ヒスタミン, ガストリン, アセチルコリンなどの酸分泌刺激物質に対する壁細胞血管側膜レセプター刺激により細胞内サイクリック AMP や

Ca²⁺ 濃度の増加が起こり, その結果として管腔側膜への分泌機能分子の動員と活性化がもたらされるものと考えられている。しかしその動員・活性化のメカニズムの詳細はこれまで不明であった。

分泌刺激前には細胞内に多くの管状小胞を有する壁細胞が, 刺激後にはこれらの多くが消失して

管腔側膜は陥凹して多くの微絨毛を持つようになることが電子顕微鏡的に観察されている。生化学的研究の結果、 H^+ 分泌を担う H, K-ATPase は低比重膜分画から高比重膜分画へと移行することが分かっている。これらの事実から、H, K-ATPase をのせた細胞内小胞膜が分泌刺激後に管腔側膜へ融合することによってこの H^+ 分泌機能分子を動員するものと推定されている。しかし、この直接的証明はこれまで行われておらず、これを世界に先駆けて行おうとするのが本研究の第一の目的である。そして、その融合がいかなる分子機構でもたらされるのかを明らかにするのが本研究の第二の目的である。一方、 Cl^- 分泌を担う Cl^- チャネルの管腔側膜での同定はおこなわれたが、この Cl^- チャネルもまた細胞内小胞膜より H, K-ATPase とともに動員されるのかどうかについては不明であり、この点を明らかにするのが本研究の第三の目的である。そのために、Neher らが開発した位相感受性膜容量測定法を改良して、膜電位変化が伴われる状況下においても膜容量のみならず膜電流をもリアルタイムで同時に定量的に測定しうる新しい計測システムを開発・適用することが第四の目的である。

研究経過

私達はこれまで胃酸分泌細胞の K^+ チャネル (Pflugers Arch. '89; J. Membr. Biol. '91: 発表論文 1) および Cl^- チャネル (Pflugers Arch. '89; J. Physiol. '92: 発表論文 2) の研究を行ってきた。そしてこれらのチャネル活性の制御機構と細胞内 Ca^{2+} 動員との関係 (Biochim. Biophys. Acta '89; J. Membrane Biol. '91: 発表論文 1) やアラキドン酸代謝産物との関係 (J. Physiol. '92: 発表論文 2) を明らかにしてきた。この過程で、 H^+ 分泌を直接担う H, K-ATPase (H, K ポンプ) の動員機構、及びそれとイオンチャネル活性化との関係の解明の必要性に直面した。

私達は細胞容積調節機構についても研究しており、低浸透圧条件下での細胞膨張時に容積調節性イオンチャネルが活性化することを見だし (J. Physiol. '88; News Physiol. Sci. '89; Neurosci. Res. '90; Pflugers Arch. '90; J. Physiol. '92), こ

れらのイオンチャネルが細胞内小胞膜からエキソサイトシスで細胞膨張時に動員されるのかどうかを検討するために、膜電位変化時にも膜容量と膜電位を同時に測定しうるシステムの開発に迫られた。そして、このシステムの開発とその壁細胞への適用が、H, K ポンプ動員が管状小胞膜融合によってもたらされるという仮説を証明し、この動員過程とイオンチャネル活性化過程の相関を見る最良・最短の道であることに気付いた。

研究成果

1. 膜容量・膜電流同時測定システムの開発 (発表論文 3)

Neher と Marty (1982) はパッチクランプ全細胞電流記録法によって膜容量の測定を可能とするいわゆる phase-sensitive detection method を開発した。これは、パッチピペット電極より細胞内に高周波サイン波電圧を印加したときのアドミッタンスより、コンダクタンスと容量を 90° の位相のずれから分離検出できることを原理としている。しかしながら、現実にはピペット電極抵抗が回路に加わるのでアドミッタンスはきわめて複雑な関数となり、単なる直交成分による分離法は適用できない。そこで、二位相ロックインアンプのお互い 90° だけ位相がずれた二つの電流出力から容量とコンダクタンスを直接マイクロコンピュータで独立計算させる試みがなされてきた (Lindau & Neher, 1988)。しかしながら、この方法では膜電位が常に一定であるという条件下でしか適用できなかった。そこで今回我々は、さらに低周波矩形波電圧を印加して、それによる電流応答を同時に測定する回路とローパスフィルターとハイパスフィルターを組み込んで、膜電位変化時にも膜コンダクタンス・膜電流・膜容量がリアルタイムに同時にモニターできることを可能ならしめた。

2. 酸分泌刺激下における壁細胞膜容量・膜電流変化の観測 (発表論文 4)

モルモット胃より単離した壁細胞をパッチクランプ下に置き上記の改良位相感受性膜容量検出法を適用した。静止時の膜容量は $25^\circ C$ では、10 から 32 pF のレンジにあり、その 113 例の平均値

は 17.3 pF であった。ヒスタミン 0.1 mM を投与すると 1-2 分の後に膜容量は次第に増加し始め、5-20 分後にはピーク値を示した。そのピーク値の 10 例の平均は 20.2 pF であった。このヒスタミンに対する膜容量増応答はヒスタミン H2 レセプターの阻害剤 cimetidine や famotidine で抑制されたが、H1 レセプター阻害剤 pyrilamine では影響されなかった。

このヒスタミンに対する膜容量増応答は、パッチピペットより細胞内に強力な Ca キレーターである BAPTA を 5 mM 与えて細胞内 Ca^{2+} 濃度を 10^{-8} M にクランプしても消失しないが、 10^{-10} M 以下に下げると消失した。温度を 30°C に上昇させると膜容量増応答は (平均値 22.1 pF にまで) 亢進した。細胞内に *N*-ethylmaleimide (NEM, 0.2 mM) を投与することによってこのヒスタミン応答は阻止された。エキソサイトシスは細胞内 Ca^{2+} や NEM, そして温度に感受性を持つことがよく知られている。それ故、このヒスタミン刺激による膜容量増応答は細胞内小胞膜の形質膜への融合によってもたらされることが証明された。

この膜容量増応答時に同時に膜電流を測定したところなんらの変化も認められなかった。それ故、胃酸分泌に関与する Cl^{-} チャネルや K^{+} チャネルの活性化はこのエキソサイトシス応答に並行せず、チャネル活性化機構とは独立であることが明らかとなった。

3. 酸分泌過程における膜容量増の分子機構 (発表論文 4)

ヒスタミン応答は H2 レセプターを介することから、サイクリック AMP の関与が示唆された。事実、サイクリック AMP の細胞膜透過性アナログである dibutyryl cyclic AMP によって同様の膜容量増応答 (平均値 20.4 pF) が引き起こされることが明らかとなった。これに対して、dibutyryl cyclic GMP は無効であった。蛋白キナーゼ G や蛋白キナーゼ A の阻害剤である H-8 は 5 μ M でヒスタミンによる膜容量増応答を阻害した。蛋白キナーゼ G の阻害剤である H-9 や、蛋白キナーゼ C の阻害剤である polymyxin B は無効

であった。細胞内に非水解性 ATP アナログである AMP-PNP を 3 mM 投与すると、ヒスタミン応答は消失した。これらの結果から、ヒスタミン刺激下でのエキソサイトシス・新膜融合反応には蛋白キナーゼ A による磷酸化反応が不可欠であることが明らかとなった。

今後の課題と発展

一般にエキソサイトシス過程には低分子量 GTP 結合タンパクが重要な役割を果たすことが知られているが、具体的にはその過程のどのステップで如何なる G タンパクが関与するかについては不明のままである。また、胃酸分泌過程における G タンパクの関与の証明も未だ得られていない。我々の実験システムでは、容易に細胞内に種々の物質を投与しながらエキソサイトシス過程の最終ステップである分泌小胞膜-形質膜融合をリアルタイムでモニターすることが可能であるので、各種の分離・純化したところの低分子量 GTP 結合タンパクを細胞内に投与してこの点を解明することが可能と思われる。今後の課題である。

今回の研究によって、胃酸分泌機構に直接関与する二つの機能分子、H, K-ATPase と Cl^{-} チャネル、が同時に細胞内より動員・活性化されるものとは考えられないことが明らかになったので、 Cl^{-} チャネルの動員・活性化のメカニズムの解明が今後の課題として残された。

発表論文

- 1) T. Kotera, A. Hashimoto, S. Ueda and Y. Okada: Whole-cell K^{+} current activation in response to voltages and carbachol in gastric parietal cells isolated from guinea pig. *J. Membrane Biol.*, 124, 43-52 (1991).
- 2) H. Sakai, Y. Okada, M. Morii and N. Takeguchi: Arachidonic acid and prostaglandin E_2 activate small-conductance Cl^{-} channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells. *J. Physiol.*, 448, 293-306 (1992).
- 3) Y. Okada, A. Hazama, A. Hashimoto, Y. Maruyama and M. Kubo: Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cell. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1107, 201-205 (1992).
- 4) A. Hashimoto, A. Hazama, T. Kotera, S. Ueda and Y. Okada: Membrane capacitance increases induced by histamine and cyclic AMP in single gastric acid-secreting cells of guinea pig. *Pflugers Arch.*, 422, 84-86 (1992).