

## &lt;特集「消化管機能の新たな展開」&gt;

胃酸分泌細胞におけるポンプと  
トランスポーターの分子機能連関

藤井 拓人\*, 酒井 秀紀

富山大学大学院医学薬学研究部・薬物生理学

Molecular Association Between Ion Pump  
and Transporter in Gastric Parietal Cells

Takuto Fujii and Hideki Sakai

*Department of Pharmaceutical Physiology,  
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*

## 抄 録

胃酸 (HCl) の  $H^+$  は、胃プロトンポンプ ( $H^+, K^+$ -ATPase) により輸送されることは古くから明らかとなっている。しかし、一方の  $Cl^-$  輸送機構については、数種類の  $Cl^-$  チャネルの関与が示唆されているものの、未だに確定していない。著者らは胃酸分泌における  $Cl^-$  輸送メカニズムを明らかにするため、 $Cl^-$  トランスポーターに着目した研究を行ってきた。これまでに、胃酸分泌細胞において  $K^+-Cl^-$  共輸送体の KCC3a および KCC4, また  $Cl^-/H^+$  対向輸送体の CIC-5 が発現していることを見出した。KCC3a は、胃酸分泌細胞基底側膜の脂質ラフトにおいて  $Na^+, K^+$ -ATPase のポンプ活性を正に制御していた。KCC4 は、アピカル膜に高発現し、その  $KCl$  輸送が  $H^+, K^+$ -ATPase と機能連関していた。また最近、アピカル膜の  $H^+, K^+$ -ATPase 活性は、分子シャペロン ERp57 によってシャペロン機能とは異なる機構により調節されていることも見出した。アピカル膜における  $H^+, K^+$ -ATPase と KCC4 および ERp57 の複合体は、空腹時の基礎胃酸分泌に関与していると考えられる。

他方、細管小胞では、CIC-5 が  $H^+, K^+$ -ATPase と機能連関し  $H^+, K^+$ -ATPase 活性を正に調節していることを見出した。細管小胞の  $H^+, K^+$ -ATPase と CIC5 の複合体は、摂食時における多量の酸分泌に関与している可能性が示唆された。著者らの知見により、胃酸分泌細胞において空間的に離れた3つの膜において3種の「イオンポンプ- $Cl^-$  トランスポーター複合体」が状況依存的に酸分泌に関与しているという新しいメカニズムの存在が示唆された。

キーワード：胃酸分泌, 胃酸分泌細胞, イオンポンプ,  $Cl^-$  トランスポーター。

## Abstract

$H^+$  secretion of gastric acid (HCl) is mediated by proton pump ( $H^+, K^+$ -ATPase) in gastric parietal cells. On the other hand,  $Cl^-$ -secreting molecules for gastric acid secretion have not been well

---

平成27年2月25日受付

\*連絡先 藤井拓人 〒930-0194 富山県富山市杉谷2630

fujitk@pha.u-toyama.ac.jp

established, although several  $\text{Cl}^-$  channels have been reported to be the candidate. In order to uncover the  $\text{Cl}^-$ -secreting mechanism, we examined properties of  $\text{Cl}^-$  transporters expressed in parietal cells. Here, we focused on the  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransporters (KCC3a and KCC4) and the  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  antiporter (CIC-5). KCC3a up-regulates  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase in lipid rafts of basolateral membrane. KCC4 is functionally associated with  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase in the apical membrane. We also found that  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity in the apical membrane is positively regulated by ERp57, a molecular chaperone, independent from its chaperoning function. Therefore, the complex of  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase, KCC4 and ERp57 in the apical membrane may be involved in the basal acid secretion. On the other hand, CIC-5 is expressed in tubulovesicles and functionally associated with  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase. Complex of CIC-5 and  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase in the vesicles may be involved in the massive gastric acid secretion. Our findings suggest a novel mechanism of gastric acid secretion: that is, three complexes of  $\text{Cl}^-$  transporters and ion pumps are directly or indirectly involved in the gastric acid secretion.

**Key Words:** Gastric acid secretion, Parietal cell, Ion pump,  $\text{Cl}^-$  transporter.

## はじめに

胃酸（塩酸：HCl）は、胃粘膜の胃腺に存在する胃酸分泌細胞（胃壁細胞）より分泌される（図1A）。胃酸分泌細胞は、酸分泌時に劇的な形態変化をおこす。酸分泌刺激休止時においては、細管小胞が細胞内に多数存在しているが、刺激時にはこれらの細管小胞が互いに融合しアピカル膜と連結することで、複雑な微絨網構造を形成し、大量の胃酸が分泌される（図1B）。胃酸分泌細胞の管腔側膜（アピカル膜および細管小胞膜）には胃プロトンポンプ（ $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase）、基底側膜にはナトリウムポンプ（ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase）といった2種類のP型ATPase（イオン輸送の反応サイクルの過程で高エネルギーリン酸化中間体を形成するATPaseファミリー）が発現している<sup>1)</sup>。 $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseは、膜を隔てた100万倍以上のプロトン（ $\text{H}^+$ ）濃度勾配に逆らって $\text{H}^+$ を胃管腔（pHは約1）へ分泌する<sup>2)</sup>（図1C）。他方、基底側膜の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseは、起電的な $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 交換輸送により膜電位の形成に寄与しており、基底側膜に存在する種々のトランスポーターの駆動源となっている。

胃酸の $\text{H}^+$ 輸送が $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseにより行われていることは古くからよく知られているが、塩化物イオン（ $\text{Cl}^-$ ）輸送を担う分子については種々議論されており未だに確定していない。現在までCFTR<sup>3)</sup>、SLC26A9<sup>4)</sup>、CLIC-6<sup>2)</sup>などの $\text{Cl}^-$ チャンネルが候補として報告されているが、酸分

泌時の劇的な形態変化や細胞内外の $\text{Cl}^-$ 濃度を考慮すると、管腔側膜での $\text{Cl}^-$ 分泌メカニズムはこれまで考えられているものより複雑であると思われる。また、 $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseによる $\text{H}^+$ 分泌を維持するには、細胞内への $\text{K}^+$ の供給が必要不可欠である<sup>5)</sup>。これまで、管腔側膜における $\text{K}^+$ 供給分子として、主にKCNQ1-KCNE2<sup>6)7)</sup>やKir4.1<sup>8)</sup>の関与が報告されていたが、近年新たにKCNJ15<sup>9)</sup>やROMK (Kir1.1)<sup>10)</sup>の関与も報告され、 $\text{K}^+$ 供給機構についても確定していない。

胃酸分泌における $\text{Cl}^-$ 輸送機構について、 $\text{Cl}^-$ トランスポーターの発現や機能に着目した研究報告はこれまでに無かった。著者らは、 $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ 共輸送体であるKCC3aとKCC4が胃酸分泌細胞の基底側膜とアピカル膜にそれぞれ高発現することを見出した<sup>11)12)</sup>。また最近、胃細管小胞において $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ 交換輸送体CIC-5が高発現していることを見出した<sup>13)</sup>。興味深いことに、これら3つの $\text{Cl}^-$ トランスポーターはそれぞれの膜においてイオンポンプと機能関連していた。KCC3aは、基底側膜において $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseと<sup>11)</sup>、KCC4はアピカル膜において $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseと機能関連していた<sup>12)</sup>。また、アピカル膜の $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseの機能は、分子シャペロンであるERp57によっても調節されていることを見出した<sup>14)</sup>。他方、胃酸分泌細胞の細管小胞において、CIC-5は $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseと機能関連していた<sup>13)</sup>。これら一連の著者らの研究により、胃酸分泌細胞では、空間的に離れた3つの

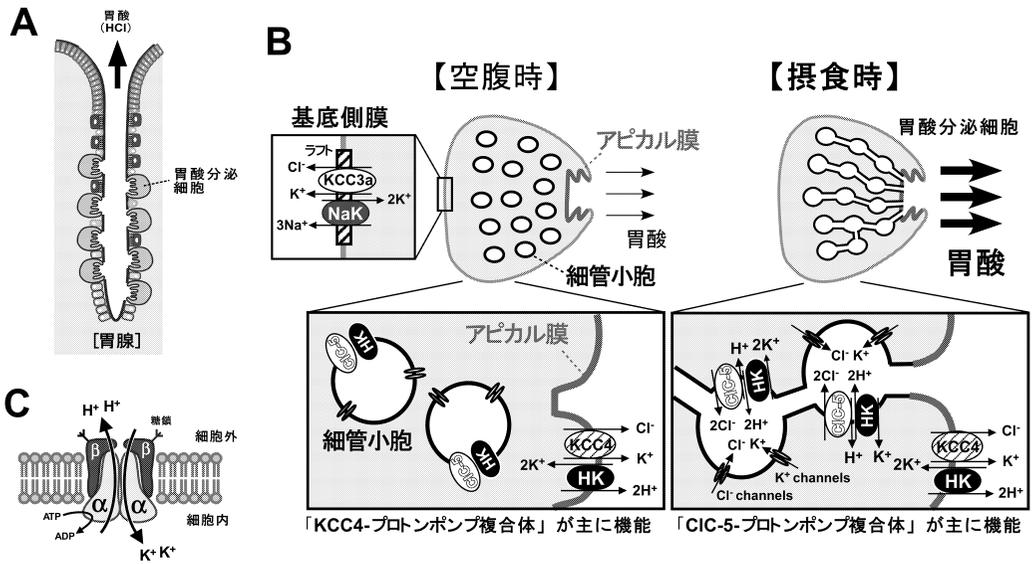


図1 (A) 胃腺の構造。胃酸分泌細胞より胃酸が分泌される。(B) 著者らが明らかにした酸分泌モデルの概略図。アピカル膜、細管小胞、基底側膜においてそれぞれ異なる「イオンポンプ—Cl<sup>-</sup>トランスポーター複合体」が存在している。(C) H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの概略図。触媒鎖であるα鎖と糖タンパク質のβ鎖による複合体を形成している。

膜において3種の「イオンポンプ—Cl<sup>-</sup>トランスポーター複合体」が状況依存的に胃酸分泌に関与しているという新しい酸分泌メカニズムの存在が示唆された(図1B)。本総説では、それぞれの膜におけるポンプトランスポーター複合体機能について概説する。

着目したCl<sup>-</sup>トランスポーターの概説

1. K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体 (KCC)

K<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>を細胞外に共輸送する二次性駆動輸送体であり、上皮細胞において細胞内Cl<sup>-</sup>濃度調節や細胞容積調節などに関与している<sup>15)</sup>。これまでに、KCCには4つのisoform (KCC1-4)が報告されている。またKCC3には、開始エクソンの違いによりKCC3aからKCC3cの3つのsplicing variantが存在する。KCC1はユビキタスに存在し、KCC3aおよびKCC4は、主に上皮細胞に発現している。他方、KCC2は神経細胞に、KCC3bは腎臓にそれぞれ特異的に発現している。

2. ClCファミリー

ヒトにおいて4つのチャネル (ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb)と5つアンチポーター (ClC-3からClC-7)が同定されている<sup>16)</sup>。ClC-5は、主に腎臓の近位尿細管に存在するエンドソームに発現し、Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体としてvacuolar型H<sup>+</sup>-ATPaseによる小胞内の酸性化を促進することが報告されている<sup>17)</sup>。ClC-5の遺伝子異常により、低分子蛋白尿や腎結石を主徴とするDent病が引き起こされる<sup>18)</sup>。

基底側膜の脂質ラフトにおいて  
 KCC3aはNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性を  
 正に制御している

著者らは、KCCならば管腔側膜においてH<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseと機能共役することで、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseへのK<sup>+</sup>供給を行うと同時にCl<sup>-</sup>を胃管腔へ分泌することが可能であると考えた。胃酸分泌細胞においてKCC3aとKCC4が遺伝子レベルで高発現していたことから、まずKCC3aに着目した。当初の予想に反して、KCC3aは胃

酸分泌細胞の基底側膜に発現していた。しかし、興味深いことに KCC3a は、基底側膜に発現する  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -isoform ( $\alpha 1\text{NaK}$ ) と免疫共沈降し、両者は分子会合している可能性が示唆された。さらに、KCC3a と  $\alpha 1\text{NaK}$  は共にコレステロールを豊富に含む膜マイクロドメインである脂質ラフト<sup>19)</sup> に高レベルで分布していた (図 2)。また、KCC 阻害剤の DIOA<sup>20)</sup> 処理により KCC3a の発現する胃腺由来の標品における  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性は抑制されたが、KCC3b が特異的に発現する腎臓由来の標品においては、活性は変化しなかった。

KCC3a 発現細胞を構築したところ、発現系においても KCC3a は基底側膜の脂質ラフトに高レベルで分布しており、内因性の  $\alpha 1\text{NaK}$  と免疫共沈降した。KCC3a を発現させることで、 $\alpha 1\text{NaK}$  の脂質ラフトにおける分布割合が未発現細胞に比べて有意に上昇した。また、KCC3a 発現細胞では、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の酵素活性、 $\text{Na}^+$  輸送活性および ATP 依存性のリン酸化レベルが有意に上昇していた。従って、胃酸分泌細胞の基底側膜において、KCC3a は  $\alpha 1\text{NaK}$  と分子会合し、脂質ラフトへと移行させることで、 $\alpha 1\text{NaK}$  をアップレギュレーションすることが示唆された<sup>11)</sup> (図 2)。さらに、著者らは KCC3a

による  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のアップレギュレーションには脂質ラフトを構成するコレステロールが重要であること<sup>21)</sup>、KCC3a と  $\alpha 1\text{NaK}$  との機能関連には、KCC3a の N 末領域が重要であること<sup>22)</sup> を見出した。

胃酸分泌細胞の基底側膜における KCC3 による  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性上昇は、アピカル膜における  $\text{K}^+$  の電気化学的勾配を上昇させ、管腔側膜における胃酸分泌を促進している可能性が考えられる。

### アピカル膜において KCC4— $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 複合体は 基礎胃酸分泌に関与している

続いて、胃酸分泌細胞における KCC4 の発現および機能について研究を行った。ブタ胃粘膜から細管小胞膜由来ベシクル (tubulovesicles; TV) およびアピカル膜由来ベシクル (stimulation-associated vesicles; SAV) を調製し、KCC4 の分布を検討した。KCC4 は SAV に高発現しており、TV において発現レベルが低かったことから、主として胃酸分泌細胞アピカル膜に発現していることが示唆された。また、SAV において KCC4 は  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と免疫共沈降することから、両者は分子会合している可能性が示唆された。

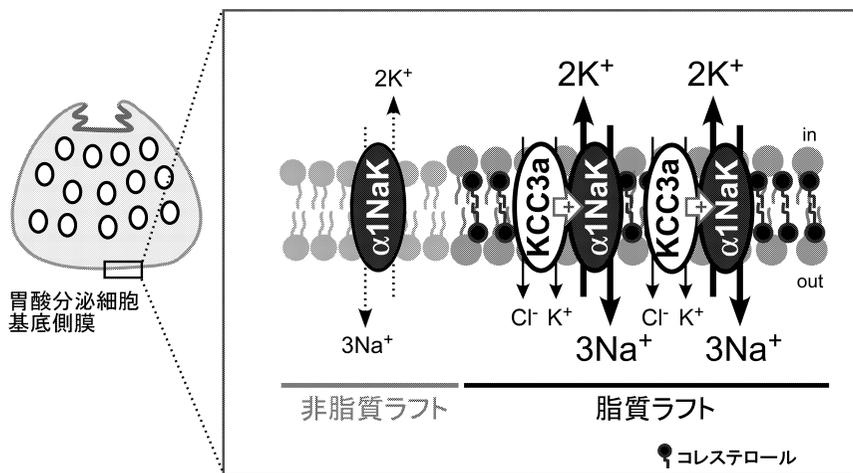


図 2 胃酸分泌細胞基底側膜における KCC3a と  $\alpha 1\text{NaK}$  との機能関連の概略図。KCC3a は  $\alpha 1\text{NaK}$  と分子会合し脂質ラフトに移行させることでポンプ活性を正に調節している。

胃ベシクルを用いた  $\text{Cl}^-$  輸送実験を行ったところ、SAV には  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 特異的阻害薬の SCH28080 により阻害される  $\text{Cl}^-$  輸送活性が存在していた (図 3A)。この活性は、KCC 阻害薬の DIOA 処理においても阻害されることがわかった。SAV には KCC4 以外の KCC isoform の有意な発現は見られなかったことから、この  $\text{Cl}^-$  輸送活性は KCC4 によるものであると考えられた。他方、SAV において DIOA により  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\text{H}^+$  取り込み活性および酵素活性が阻害された (図 3B)。また、この DIOA 感受性の  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性に対するアニオン選択性は、KCC4 の  $\text{K}^+$  輸送に対するアニオン選択性と類似していた。以上より、SAV において KCC4 による  $\text{Cl}^-$  輸送は、 $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase により制御される一方、 $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の活性は、KCC4 の  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  輸送により調節されていることが明らかとなった (図 3C)。さらに、発現系の実験においても、KCC4 は  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  輸送機能により  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\text{H}^+$  輸送活性を上昇させることが示唆された。

以上の結果より、胃酸分泌細胞のアピカル膜において、KCC4 は  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase のための  $\text{K}^+$  供給分子として、また胃酸分泌のための  $\text{Cl}^-$  輸送分子として機能していることが示唆された<sup>12)</sup>

(図 1B)。酸分泌時には、食物が胃内に存在するため、活発に多量の胃酸が分泌される。胃酸分泌休止状態においても、基礎胃酸分泌が行われており、ヒトの胃内は常に強酸性状態が維持されている。休止状態では、細管小胞膜は細胞内に存在していることから、基礎胃酸分泌にはアピカル膜の「KCC4—プロトンポンプ複合体」が関与しているものと考えられる。胃酸分泌細胞のアピカル膜において選択的に発現し機能する  $\text{Cl}^-$  輸送体としては、KCC4 が初めての報告例である。

### アピカル膜の $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性は 分子シャペロン ERp57 により シャペロン機能非依存的に 調節されている

胃酸分泌細胞のアピカル膜において酸分泌関連タンパク質を同定する目的で、SAV に高発現し TV で発現量の低いタンパク質について二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により解析したところ、分子シャペロンである ERp57 が SAV に選択的に発現していることを見出した<sup>14)</sup>。ERp57 は、小胞体 (ER) において糖鎖修飾に関与するジスルフィド結合形成酵素 (PDI) として機能する分子シャペロンである。

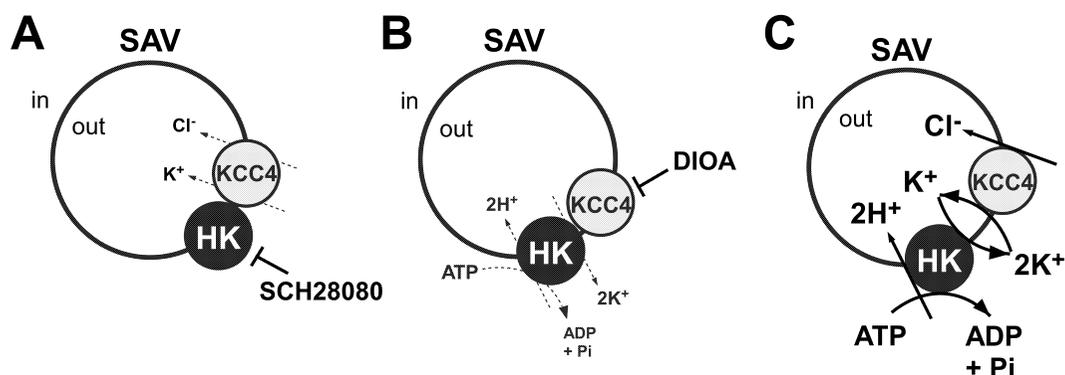


図3 アピカル膜由来ベシクル (SAV) における KCC4 と  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase との機能連関。SAV はベシクル内が細胞外に対応する inside-out ベシクルを形成しており、 $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase は  $\text{H}^+$  を、KCC4 は  $\text{Cl}^-$  をベシクル内に輸送する。 $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の ATP 結合部位はベシクル外に位置する。(A) SCH28080 により  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を阻害することで KCC4 の  $\text{Cl}^-$  輸送が抑制された。(B) DIOA により KCC4 を阻害することで  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\text{H}^+$  輸送活性および酵素活性が抑制された (C) SAV において推定された KCC4 と  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase との機能連関モデル。

しかし、近年 ERp57 は細胞膜や核など ER 以外にも存在し、シャペロン以外の機能を担うことが示唆されている。胃酸分泌細胞における機能についての報告はこれまでになかった。SAV を用いた免疫沈降実験において、ERp57 は  $H^+, K^+$ -ATPase と共沈降したことから、両者は分子会合している可能性が示唆された。そこで、ERp57 過剰発現細胞および siRNA によるノックダウン細胞を用いて両者の機能連関について検討した。ERp57 の発現変化は、糖タンパク質である  $H^+, K^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit の発現量および糖鎖修飾に有意な影響を与えなかったが、興味深いことに ERp57 の発現量変化は  $H^+, K^+$ -ATPase の活性変化と相関することがわかった。また、ERp57 の PDI 機能を消失させた変異体を過剰発現させた細胞においても、 $H^+, K^+$ -ATPase の発現量は変化せず、酵素活性は ERp57 野生型発現細胞と同程度に上昇した。従って、ERp57 は、胃酸分泌細胞アピカル膜において  $H^+, K^+$ -ATPase と分子会合することで、シャペロン機能とは異なるメカニズムで  $H^+, K^+$ -ATPase 活性を正に調節している可能性が示唆された<sup>14)</sup> (図4)。

近年、西らは胃酸分泌細胞のアピカル膜と細管小胞の両膜に発現している新規ユビキチンリガーゼとして TRIM50 を同定した<sup>23)</sup>。ノックアウトマウスを用いた研究より、TRIM50 はアピカル膜と細管小胞膜との連結に重要な役割を担っていることが明らかとなった<sup>23)</sup>。

従来までの胃酸分泌モデルでは、細胞質内に

多量に存在する細管小胞膜が、酸分泌刺激によりアピカル膜と融合することで一体化し、 $H^+, K^+$ -ATPase がアピカル膜に移動するものと考えられてきた。しかし、著者らの KCC4 と ERp57 の知見および西らの研究成果から、アピカル膜と酸細管小胞では独立した酸分泌ユニットが構成されており、酸分泌刺激により細管小胞膜はアピカル膜と結合するが交じり合わずに膜の独立性を維持しているものと考えられる。

### 細管小胞において CIC-5 と $H^+, K^+$ -ATPase は機能連関している

胃酸分泌細胞では、CIC-2 が胃酸分泌に関与していることが報告されていた<sup>24)</sup>。しかし、CIC-2 ノックアウトマウスで胃酸分泌レベルが変化しないことが報告され<sup>25)</sup>、著者らのグループも胃酸分泌細胞に CIC-2 はタンパク質レベルで発現していないことを報告した<sup>26)</sup>。また最近、CIC-7 も胃酸分泌には関与しないことが報告された<sup>27)</sup>。

著者らは、 $Cl^-/H^+$  交換輸送体である CIC-5 が、胃酸分泌細胞に発現し、KCC4 や ERp57 の発現するアピカル膜 (SAV) ではなく、細管小胞 (TV) に高レベルで発現していることを見出した。興味深いことに、TV において CIC-5 は  $H^+, K^+$ -ATPase と免疫共沈降したことから、両者は分子会合している可能性が示唆された。そこで、TV を用いた  $^{36}Cl^-$  輸送実験を行ったところ、TV には ATP 依存的であり SCH28080 によ

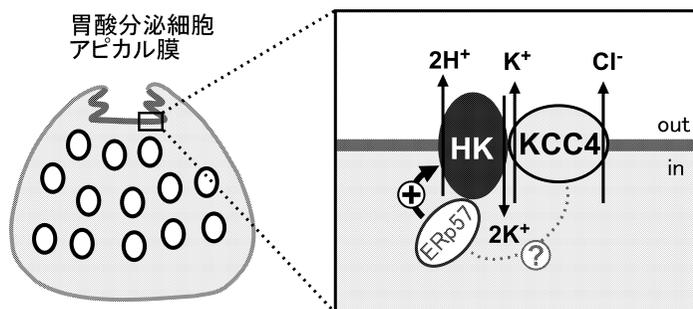


図4 胃酸分泌細胞アピカル膜  $H^+, K^+$ -ATPase 複合体のモデル図。ERp57 は  $H^+, K^+$ -ATPase と分子会合することでポンプ活性を正に調節している可能性が考えられる。

て阻害される  $\text{Cl}^-$  取り込み活性が存在することがわかった (図 5A, B). この活性は,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と共役する二次性能動輸送体に起因しており, これまで報告されている  $\text{Cl}^-$  チャネルに起因するものではないと考えられた.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  交換輸送体として機能する CIC-5 であれば,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\text{H}^+$  輸送と共役することで  $\text{Cl}^-$  をベシクル内に輸送することが可能であり, TV における  $\text{Cl}^-$  取り込み活性に, CIC-5 が部分的に関与している可能性が考えられる.

CIC-5 には特異的阻害剤が存在しないため, 発現系において両者の機能連関について検討した.  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を安定発現させた HEK293 細胞に CIC-5 の T-REx システムを構築した. 発現誘導した CIC-5 は,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と免疫共沈降した. CIC-5 の発現により, ATP 存在下に

における  $^{36}\text{Cl}^-$  取り込み活性が有意に上昇し, TV の場合と同様に, この活性は SCH28080 により阻害された (図 5C). また, CIC-5 の発現細胞の膜画分 (cell-free 条件) における  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 酵素活性は, 未発現細胞の膜画分に比べて有意に上昇していた. 次に, 両者の機能連関に CIC-5 による  $\text{H}^+$  輸送機能が関与しているかを検討するため, CIC-5 の  $\text{H}^+$  輸送活性を消失させる E211A 変異体<sup>28)</sup> の発現細胞を構築した. CIC-5 E211A 変異体も野生型と同様に  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と免疫共沈降した. CIC-5 E211A 変異体発現細胞では, 野生型発現細胞で見られた SCH28080 感受性の  $^{36}\text{Cl}^-$  取り込み活性は消失したが, 興味深いことに, 膜画分における  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 酵素活性は野生型発現細胞と同程度に上昇した (図 5D). これらの結果は, CIC-5 による  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -

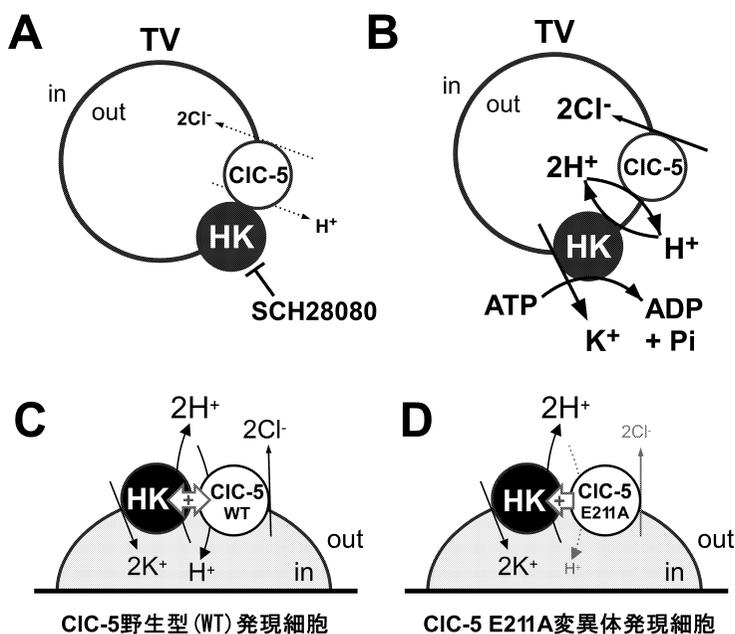


図5 細小胞由来ベシクル (TV) における CIC-5 と  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase との機能連関. TV も inside-out ベシクルを形成している. (A) TV において SCH28080 により  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を阻害することで CIC-5 由来と推定される  $\text{Cl}^-$  取り込み活性が減少した. (B) TV において推定された CIC-5 と  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能連関モデル. (C) CIC-5 野生型 (WT) 発現細胞において, CIC-5-WT と  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase は  $\text{H}^+$  カップリングにより互いの機能を正に調節し合っている. (D) CIC-5 E211A 変異体発現細胞において, CIC-5-E211A は  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能を正に調節するが,  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と連関する  $\text{Cl}^-$  輸送は消失する.

ATPase のアップレギュレーションは、両者の  $H^+$  カップリングに非依存的であるが、CIC-5 の  $Cl^-$  輸送機能は、 $H^+, K^+$ -ATPase との  $H^+$  カップリングに依存的であることを示唆している。CIC-5 による  $H^+, K^+$ -ATPase の活性制御は、会合による  $H^+, K^+$ -ATPase のコンフォメーション変化などが関係しているものと思われる。

以上より、胃酸分泌細胞の細管小胞膜において、CIC-5 は  $H^+, K^+$ -ATPase と複合体を形成し、 $H^+, K^+$ -ATPase のアップレギュレーターとして機能している可能性が示唆された。また、CIC-5 は  $2Cl^-$  と  $H^+$  を交換輸送し、 $H^+, K^+$ -ATPase は  $2H^+$  と  $2K^+$  を交換輸送することから、 $H^+$  輸送で共役することで CIC-5 が胃酸分泌のための  $Cl^-$  輸送に関与している可能性が示唆された<sup>13)</sup>。従って、胃酸分泌刺激状態においては、細管小胞膜に存在する「CIC-5— $H^+, K^+$ -ATPase 複合体」および CFTR や SLC26A9 等の  $Cl^-$  チャネルが機能することで、大量の胃酸分泌が引き起こされているものと考えられる (図 1B)。

著者らは新たに CIC-5 の発現を見出したが、胃細管小胞では、上述したように複数の  $Cl^-$  チャネルや  $K^+$  チャネルが報告されている。なぜ、細管小胞では酸分泌に関与すると考えられる  $Cl^-$  輸送体および  $K^+$  輸送体が複数存在しているのか？全ての輸送体が同じ細管小胞膜上に存在しているのか？著者らは、細管小胞は均一な集団

ではなく、存在するタンパク質や小胞機能に多様性があるのではないかと考えている。細管小胞に存在するタンパク質群の不均一性については不明であり、今後の興味深い研究課題であると思われる。

## おわりに

著者らの一連の研究により、胃酸分泌細胞のアピカル膜、細管小胞膜および基底側膜にはそれぞれ異なる「P型ATPase— $Cl^-$  トランスポーター機能複合体」が存在し、状況依存的に胃酸分泌に関与していることが示唆された。見かけ上は同じ胃酸 (HCl) であっても、空腹時と摂食時では、 $Cl^-$  を分泌するタンパク質が異なる全く別の胃酸分泌ユニットにより分泌されているという新しい概念である。

一日のうちで、空腹である時間は、胃内に食物が存在している時間よりも長い。空腹時における胃酸分泌の異常は、消化性潰瘍や逆流性食道炎など疾患発症に寄与すると考えられる。今後、KCC4 や ERp57 を含めた空腹時の胃酸分泌制御機構に関与するタンパク質を標的とする薬物の研究を進めることにより、空腹時の胃酸分泌を選択的に抑制できる新規の消化管疾患治療薬の開発に繋がる可能性がある。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## 文 献

- 1) Munson K, Garcia R, Sachs G. Inhibitor and ion binding sites on the gastric H,K-ATPase. *Biochemistry* 2005; 44: 5267-5284.
- 2) Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I, Munson K. The gastric H,K-ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 2: S226-S242.
- 3) Sidani SM, Kirchhoff P, Socrates T, Stelter L, Ferreira E, Caputo C, Roberts KE, Bell RL, Egan ME, Geibel JP. DeltaF508 mutation results in impaired gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2007; 282: 6068-6074.
- 4) Xu J, Song P, Miller ML, Borgese F, Barone S, Riederer B, Wang Z, Alper SL, Forte JG, Shull GE, Ehrenfeld J, Seidler U, Soleimani M. Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 17955-17960.
- 5) Heitzmann D, Warth R. No potassium, no acid:  $K^+$  channels and gastric acid secretion. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: 335-341.
- 6) Grahmmer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Gräff A, Wittkindt OH, Nitschke R, Bleich M, Barhanian J, Warth R. The cardiac  $K^+$  channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* 2001; 120:

- 1363-1371.
- 7) Roepke TK, Anantharam A, Kirchoff P, Busque SM, Young JB, Geibel JP, Lerner DJ, Abbott GW. The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2006; 281: 23740-23747.
  - 8) Song P, Groos S, Riederer B, Feng Z, Krabbenhöft A, Manns MP, Smolka A, Hagen SJ, Neusch C, Seidler U. Kir4.1 channel expression is essential for parietal cell control of acid secretion. *J Biol Chem* 2011; 286: 14120-14128.
  - 9) He W, Liu W, Chew CS, Baker SS, Baker RD, Forte JG, Zhu L. Acid secretion-associated translocation of KCNJ15 in gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G591-G600.
  - 10) Vucic E, Alfadda T, MacGregor GG, Dong K, Wang T, Geibel JP.  $K_{ir}1.1$  (ROMK) and  $K_v7.1$  (KCNQ1/KvLQT1) are essential for normal gastric acid secretion: importance of functional  $K_{ir}1.1$ . *Pflugers Arch* 2014; in press.
  - 11) Fujii T, Takahashi Y, Itomi Y, Fujita K, Morii M, Tabuchi Y, Asano S, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H.  $K^+Cl^-$  Cotransporter-3a Up-regulates  $Na^+K^+$ -ATPase in Lipid Rafts of Gastric Luminal Parietal Cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 6869-6877.
  - 12) Fujii T, Takahashi Y, Ikari A, Morii M, Tabuchi Y, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. Functional association between  $K^+Cl^-$  cotransporter-4 and  $H^+K^+$ -ATPase in the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 619-629.
  - 13) Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. Functional coupling of chloride-proton exchanger CIC-5 to gastric  $H^+K^+$ -ATPase. *Biol Open* 2014; 3: 12-21.
  - 14) Fujii T, Awaka SY, Takahashi Y, Fujita K, Tsuji H, Shimizu T, Gomi T, Tsukada K, Sakai H. Modulation of  $H^+K^+$ -ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett* 2013; 587: 3898-3905.
  - 15) Adragna NC, Di Fulvio M, Lauf PK. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J Membr Biol* 2004; 201: 109-137.
  - 16) Stauber T, Weinert S, Jentsch TJ. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Compr Physiol* 2012; 2: 1701-1744.
  - 17) Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8075-8080.
  - 18) Lourdel S, Grand T, Burgos J, González W, Sepulveda FV, Teulon J. CIC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflugers Arch* 2012; 463: 247-256.
  - 19) Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-572.
  - 20) Fujii T, Ohira Y, Itomi Y, Takahashi Y, Asano S, Morii M, Takeguchi N, Sakai H. Inhibition of P-type ATPases by [(dihydroindenyl)oxy]acetic acid (DIOA), a  $K^+Cl^-$  cotransporter inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2007; 560: 123-126.
  - 21) Fujita K, Fujii T, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. Role of cholesterol in functional association between  $K^+Cl^-$  cotransporter-3a and  $Na^+K^+$ -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424: 136-140.
  - 22) Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. The  $NH_2$ -terminus of  $K^+Cl^-$  cotransporter 3a is essential for up-regulation of  $Na^+K^+$ -ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 683-687.
  - 23) Nishi M, Aoyama F, Kisa F, Zhu H, Sun M, Lin P, Ohta H, Van B, Yamamoto S, Kakizawa S, Sakai H, Ma J, Sawaguchi A, Takeshima H. TRIM50 protein regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 33523-33532.
  - 24) Sherry AM, Malinowska DH, Morris RE, Ciralo GM, Cuppoletti J. Localization of CIC-2  $Cl^-$  channels in rabbit gastric mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1599-C1606.
  - 25) Bösl MR, Stein V, Hübner C, Zdebek AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, Jentsch TJ. Male germ cells and hotoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2  $Cl^-$  channel disruption. *EMBO J* 2001; 20: 1289-1299.
  - 26) Hori K, Takahashi Y, Horikawa N, Furukawa T, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. Is the CIC-2 chloride channel involved in the  $Cl^-$  secretory mechanism of gastric parietal cells? *FEBS Lett* 2004; 575: 105-108.
  - 27) Supanchart C, Wartosch L, Schlack C, Kühnisch J, Felsenberg D, Fuhrmann JC, de Vernejoul MC, Jentsch TJ, Kornak U. CIC-7 expression levels critically

regulate bone turnover, but not gastric acid secretion.  
Bone 2014; 58: 92-102.

28) Picollo A, Pusch M. Chloride/proton

antiporter activity of mammalian CLC  
proteins CLC-4 and CLC-5. Nature 2005; 436:  
420-423.

## 著者プロフィール



藤井 拓人 Takuto Fujii

所属・職：富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学・助教

略 歴：2009年3月 富山大学大学院医学薬学教育部博士後期課程生命薬科学専攻  
修了

2009年4月 日本学術振興会特別研究員

2009年9月 富山大学大学院医学薬学研究部助教

専門分野：分子生理学, 消化管生理学

最近興味のあること：癌におけるイオン輸送体の病態生理機能, 胃細管小胞の多様性  
解析, オーフエン ATPase の機能解析

- 主な業績：1. Fujii T, Takahashi Y, Itomi Y, Fujita K, Morii M, Tabuchi Y, Asano S, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H.  $K^+-Cl^-$  cotransporter-3a up-regulates  $Na^+,K^+-ATPase$  in lipid rafts of gastric luminal parietal cells. J Biol Chem 2008; 283: 6869-6877.
2. Fujii T, Takahashi Y, Ikari A, Morii M, Tabuchi Y, Tsukada K, Takeguchi N, Sakai H. Functional association between  $K^+-Cl^-$  cotransporter-4 and  $H^+,K^+-ATPase$  in the apical canalicular membrane of gastric parietal cells. J Biol Chem 2009; 284: 619-629.
3. Fujii T, Awaka S, Takahashi Y, Fujita K, Tsuji H, Shimizu T, Gomi T, Tsukada K, Sakai H. Modulation of  $H^+,K^+-ATPase$  activity by molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. FEBS Lett 2013; 587: 3898-3905.
4. Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. Functional coupling of chloride-proton exchanger CLC-5 to gastric  $H^+,K^+-ATPase$ . Biol Open 2014; 3: 12-21.