

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 小木曾遥香

### 論文題目

A low  $[Ca^{2+}]_i$ -induced enhancement of cAMP-activated ciliary beating by PDE1A inhibition in mouse airway cilia.

### 論文内容の要旨

気道線毛運動は、肺の異物排泄機構において重要な役割を果たしている。気道線毛運動を活性化する薬剤としてプロカテロール ( $\beta_2$ 刺激薬) が知られている。プロカテロール (1 nM) は線毛運動周波数 (ciliary beat frequency, CBF) と、振動角 (ciliary bend angle, CBA) を増加させたが、CBF 増加は、CBA と比べ遅れていた。このことは、CBA と CBF を制御している調節機構が異なることを示している。本研究では、プロカテロール刺激時の CBF と CBA 増加の制御機構について検討した。

実験方法として、雌性マウス (C57BL/6J) の肺気道腔内のエラストナーゼ処理 (37°C, 40 分) により、得られた単離気道上皮線毛細胞を高速度カメラ (500fps) を接続した顕微鏡上のチャンパーに置き、線毛運動を記録した。記録した画像を解析し、CBF と CBA を測定した。

コントロール溶液 ( $Ca^{2+}$ 濃度: 1.5mM) 中では、プロカテロールによる CBF 増加は CBA 増加に比べ遅れていた。しかし、外液中の  $Ca^{2+}$  を EGTA でキレートした  $Ca^{2+}$ -free 溶液中では、CBA は影響を受けなかったが、CBF 増加速度は上昇した。また、プロカテロールによる CBA と CBF 増加は、PKA 阻害剤によって抑制されることから、cAMP 集積を介した反応であることがすでに報告されている。実際、プロカテロール刺激は単離肺細胞内の cAMP 量を増加させていた。この結果から、プロカテロール刺激時の CBF を調節する微小空間の cAMP の濃度が、CBA を調節している微小空間の cAMP 濃度に比べ低い可能性が考えられた。すなわち、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の低下が、CBF を調節している微小空間の cAMP 濃度を増加させた可能性がある。

一方で、phosphodiesterase (PDE) 阻害剤 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 100  $\mu$ M) と、非代謝性 cAMP アナログ (8-Br-cAMP, 100  $\mu$ M) を用いて cAMP 量を増加させると、CBF 増加は CBA 増加に遅れることなく、同じ時間経過で増加した。この結果は、CBA と CBF を調節している PDE サブタイプが異なることを示唆している。EGTA を用いた低  $[Ca^{2+}]_i$  の実験と PDE 阻害剤の実験結果から、 $Ca^{2+}$  依存的に cAMP を分解する PDE (PDE1) が、CBF を調節する微小空間の cAMP 蓄積を制御している可能性を考えた。この仮説を検証するために PDE1 選択的阻害剤 (8-methoxymethyl-IBMX, 8MmIBMX) の効果を検討した。

8MmIBMX (40  $\mu$ M) は単独で CBF と CBA を増加させが、プロカテロールによる CBA と CBF 増加は同じ時間経過を取り差はなかった。この結果は、プロカテロール刺激による CBF 増加の遅れが、PDE1 によって引き起こされたことを示している。

PDE1 は  $Ca^{2+}$ /calmodulin 依存性であるため、BAPTA-AM (50  $\mu$ M,  $Ca^{2+}$ キレート剤) を用いて極端な  $[Ca^{2+}]_i$  低下が CBA と CBF に与える影響について検討した。BAPTA-AM による  $[Ca^{2+}]_i$  の極端な低下は、CBF と CBA を増加させ、さらにプロカテロール刺激による CBA と CBF 増加は同じ時間経過をとった。この結果は、calmodulin 阻害剤 (calmidazolium, 25  $\mu$ M) によっても再現された。さらに、単離肺細胞内の cAMP 量を測定し、 $[Ca^{2+}]_i$  低下、calmodulin の阻害は細胞内に cAMP 集積を起こすことを明らかにした。これらの結果は、 $[Ca^{2+}]_i$  依存的に PDE1 が気道線毛細胞内の cAMP を調節していることを示唆している。

PDE1 は3つのサブタイプ (PDE1A, B, C) がある。免疫蛍光組織染色法により、PDE1A が線毛と細胞質、PDE1C が細胞質のみに局在することを明らかにした。線毛は 9+2 リング構造をとり、内腕ダイニン (IDA) が CBA を、外腕ダイニン (ODA) が CBF を調節することが報告されている。免疫電子顕微鏡法を用いて線毛内 PDE1A の局在を検索した結果、PDE1A は CBF を調節している ODA 周囲に局在していた。

本研究は、プロカテロール刺激時の CBF と CBA 増加の調節機構について検討した。プロカテロールは  $\beta_2$  受容体を刺激し細胞内に cAMP 蓄積をおこす。cAMP は IDA と ODA を活性化し、CBA と CBF を増加させる。しかし、CBF を調節する ODA 周囲に存在する PDE1A が cAMP を分解するため、ODA 周囲では、IDA 周囲と比べて cAMP 蓄積が遅れる。この PDE1A による cAMP 分解によりプロカテロール刺激時の CBF 増加が遅れる。生理学的条件下で、PDE1A は、先に CBA、続いて CBF と段階を踏んで増加させることで、エネルギー効率よく線毛輸送を維持していることが考えられる。