

生体膜陽イオン輸送のグアニリン・ ウログアニリン系による制御

—中間報告—

—各種動物赤血球と上皮細胞を用いたNaあるいは Cl輸送測定法の検討—

*Regulation of cation transport by guanylin and uroguanylin in biomembrane
— Measurement of Na and Cl transports in several animal red blood cells and epithelial cells —*

藤瀬 浩, 藤谷英男, 内藤博之

麻布大学大学院獣医学研究科

Hiroshi Fujise, Hideo Fujitani, Hiroyuki Naito

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: To examine regulation system of Na and Cl transport by guanylin and uroguanylin, red blood cells and epithelial cells were used. In dog, bear and northern furseal red blood cells, Na transports by Na/Ca and Na/H exchangers were measured, and regulatory volume decrease and increase by these exchangers were also measured. As the ion and water transport measurement system in epithelial cells, the monolayer cells cultured with the kidney cell line, LLC-PK1, were prepared in bottom filterred well, and transepithelial water transport was measured between apical and basal membrane. Using ussing chamber, Cl short-circuit current in mouse intestinal tract was measured, and the current was changed when uroguanylin was added at the luminal side. In explanation for the rule of guanylin and uroguanylin on these ion transports, the structure and function of these peptides were reviewed shortly.

目 的

細胞膜のNaあるいはCl輸送は、当該電解質輸送のみならず水輸送の制御も行っている。上皮細胞における電解質および水の輸送は重要な生理的機能であり、その破綻は細胞の機能障害ひいては疾病の原

因となる。細胞膜のNaおよびCl輸送系として各イオンチャンネルのほか、共輸送(COT)系トランスポータとしてNa-Cl COT, Na-K-Cl-COT, およびK-Cl COT, あるいは交換輸送(EXC)系トランスポータとしてNa/Ca EXCおよびNa/H EXCなどが知られている [7, 14, 15]。各COTあるいはEXCの活性化

あるいは抑制機構の一部は明らかにされているが、イオン輸送の統合的制御については不明な部分が多い。

それら電解質や水輸送の統合的調節系の1つに、分泌性下痢の原因であるエンテロトキシンの受容体として報告されたグアニル酸サイクラーゼ (GC) 結合C型受容体 (GC-C) を介する系がある [4, 5, 6, 17]。本研究ではGC-C受容体の生理的リガンドである guanylin および uroguanylin [3, 10] による上皮細胞でのNaおよびClの輸送制御を検討することを目的とした。その検討モデルとして、食肉目動物赤血球のNaおよびClの輸送系の再検討を行った。食肉目動物の赤血球はNa, K-ポンプを欠くために細胞内が高Naであり, Na輸送系が特異的である [11]。さらに, 食肉目海獣は海水摂取の機会があるため, NaおよびCl輸送系の特殊性が推察される。このような赤血球モデルを用いたNa, Clあるいは水の輸送解析は, guanylin および uroguanylin の機能解析に有用であると考えた。

今回, 本研究の中間報告として, 各動物赤血球のNaおよびCl輸送系あるいは予備的に検討した上皮細胞での各イオン輸送測定系を報告する。さらに発見後10年あまりが経過した guanylin および uroguanylin 研究の概略を説明する。

方法

1) 赤血球Na輸送測定法

赤血球のNa輸送測定のために, シバイヌ (イヌ), ニホンクロクマ (クマ) あるいはキタオットセイ

(オットセイ) から血液を採取した。赤血球を洗浄後, 各陽イオン輸送活性を既報にしたがい測定した [7, 14, 15]。Naの細胞内取り込みは ^{22}Na をトレーサーとして用い, Na排出は細胞浮遊液中に排出されたNaを蛍光分光光度計で測定した。赤血球容積も既報どおりに測定した [7, 8]。

2) 上皮細胞のイオン輸送測定系

既報にしたがいブタ腎尿管上皮細胞である LLC-PK1 をフィルター底の Transwell 上に単層細胞層として, 経上皮細胞層輸送測定系を調製した [9]。本測定系を用い, トリチウム水の頂側膜側から基底膜側あるいはその逆方向への輸送を測定した。

既報に準じて腸管上皮細胞における uroguanylin の影響測定系として, マウスの腸管を ussing chamber に貼り付け, Clの short-circuit current を測定した [12]。

結果と考察

1) Naの赤血球内から外への輸送は Fig.1 に示すように細胞外液へのNa排出量で求めた。Fig.1Aにはイヌ, クマおよびオットセイ赤血球の, Ca存在溶液中での経時的Na排出量を示した。また, 溶液Ca依存性のNa排出活性を比較したものを Fig.1Bに示した。いずれの動物でもCa依存性のNa排出があり, その排出はNa/Ca EXC阻害剤であるquinidineにより阻害された [8]。このCa依存性Na排出は低張溶液中で亢進し, 細胞容積収縮に寄与することが示唆された。Na/Ca EXCによるNa排出のほかに, Ca非依存性Na排出も総Na排出量の50%前後存在した。このNa排出活性は低張より等張溶液中での活性が高

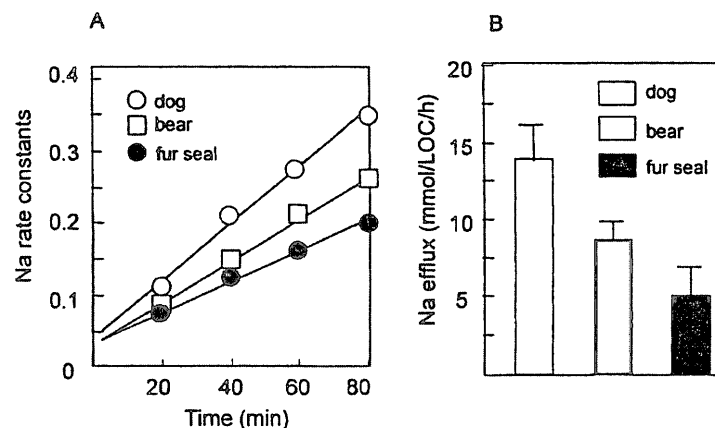


Fig. 1 A, Na rate constant $-\ln(1-\text{medium}[\text{Na}]/[\text{Na}]_{\text{equilibrated}})$ as function of time in dog, bear and fur seal red blood cells. Typical of similar 3 to 4 experiments.
B, Ca-dependent Na efflux in dog, bear and fur seal red blood cells. Means and SD of 3 to 4 experiments.

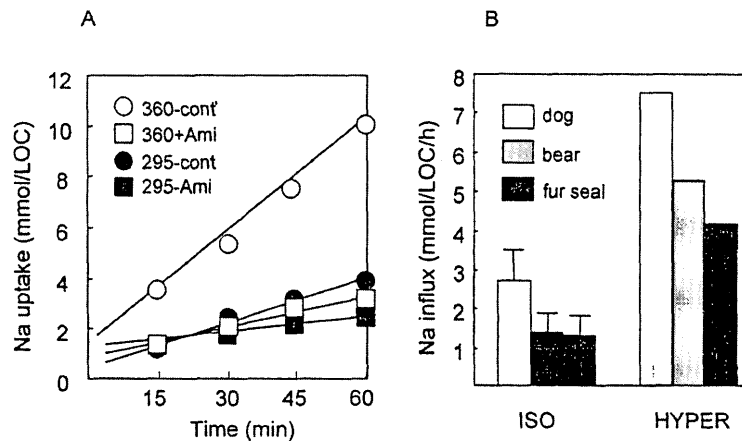


Fig. 2 A, Na uptake as function of time in isosmotic (295) and hyperosmotic (360) medium with (squares) or without (circles) amiloride in dog red blood cells. Typical of similar 2 to 4 experiments. B, Amiloride sensitive Na influx in dog, bear and fur seal red blood cells. Mean and SD of 3 to 4 experiments in isosmotic medium and means of 2 experiments in hyperosmotic medium.

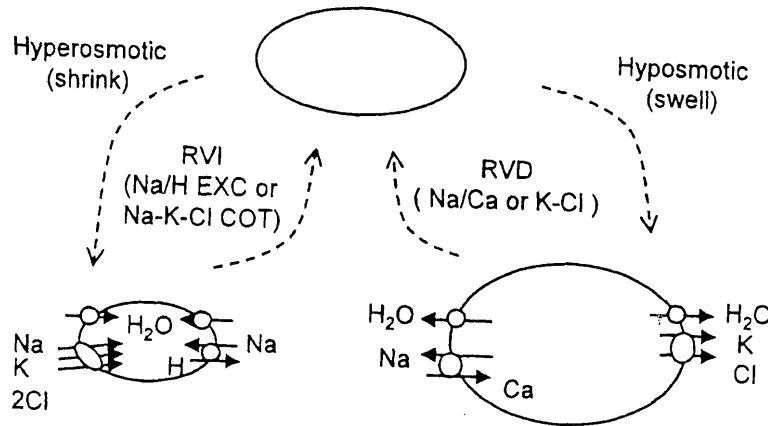


Fig. 3 System for regulatory volume increase (RVI) and regulatory volume decrease (RVD) in red blood cells.

かったが、この輸送系の特定は今後の課題である。Na/Ca EXC による赤血球 RVD への関与を検討するため、イヌ、クマおよびオットセイ赤血球の細胞容積を Ca 存在あるいは非存在の低張溶液中で測定した。Ca 非存在条件では 12% ほど膨潤した赤血球の容積収縮回復はないが、Ca 存在条件では 2 時間目までに容積収縮回復が認められた。すなわち、Na/Ca EXC の機能する条件で RVD が認められた。

Fig.2 に赤血球の Na 取り込みを示した。イヌ赤血球への経時的な Na 取り込み量を Fig.2A に示したが、等張および高張溶液中ともに 1 時間目まで直線的な取り込み増加であった。同様の実験からイヌ、クマおよびオットセイ赤血球の単位時間あたりの Na 取り込み活性を求めたものを Fig.2B に示した。高張溶液中では低張溶液中の 2 倍以上の Na 取り込み活性が

あり、その活性は Na/H EXC 阻害剤の amiloride により阻害された。この結果は Na/H EXC がイヌ赤血球に存在し、それが高張条件で活性化されることを示していた。Na/H EXC が細胞容積収縮時の RVI に貢献する可能性を検討するため、イヌおよびオットセイ赤血球を用いて、高張溶液中での細胞容積変化を測定した。いずれの細胞でも溶液中の陽イオンが Na であるとき、細胞容積は 2 時間目までに膨潤回復した。この回復は溶液中の陽イオンを K に置換すると消失した。したがって、これらの動物赤血球では Na/H EXC が RVI を担うことが強く示唆された。

Fig.3 に赤血球における Na/Ca EXC および Na/H EXC を含むイオン輸送と細胞容積調節系を示した [7, 16, 18]。これらのイオン輸送系のなかに直接あるいは間接的に guanylin および uroguanylin が関与し

ているものがある可能性が存在する。イオン輸送は共存する様々なイオンチャネル、イオントランスポーターおよびイオンポンプの共同あるいは干渉により統合されている。また、特定の目的のために機能していた輸送系が阻害されると、他のレスキュー系の輸送系が機能することもある。したがって、単一のイオン輸送系を測定することは困難な場合もある。赤血球は他の細胞に比べて比較的単純な機能をもつため、これらのイオン輸送系測定も比較的容易である。また、動物種により赤血球イオン輸送系は異なり、目的とする輸送系測定に適した動物赤血球が存在する可能性がある。

2) 上皮細胞の各イオン輸送測定系

LLC-PK1の単層細胞層の反対側への水輸送は双曲線線的に増加し、およそ5分で飽和に達した。頂側膜、基底膜側いずれの方向への輸送も極めて早い。今後、環境イオン条件あるいは guanylin および uroguanylin の影響を検討していく予定である。

ussing chamber 上のマウス腸管の管腔粘膜側に uroguanylin を添加すると、Clの short-circuit current は急激に増加した。漿膜側への uroguanylin 添加では、この増加は認められなかった。このような結果は既に報告があり、エンテロトキシンでも同様な結果が得られている [12]。ussing chamber を用いる uroguanylin のイオン輸送への影響の検討は有効な手段であると判断できる。

直接的な動物体内の無機イオンおよび水収支は上皮細胞を介して行われるが、上皮細胞の細胞膜における各イオン輸送体の局在部位は細胞の極性のため互いに異なる。したがって、本研究で検討した上皮細胞を用いたイオン輸送測定系は guanylin および uroguanylin の作用の検討に有用であると推察される。

3) guanylin および uroguanylin 研究の現状

Fig.4に示すように、現在まで哺乳類ではヒト他の guanylin および uroguanylin のアミノ酸配列が報告されている [3-6, 10, 13]。いずれの動物でも guanylin は 15 アミノ酸残基、uroguanylin は 15 から 24 アミノ酸残基のペプチドであり、両ペプチドの間で 8 残基のアミノ酸が一致していた。また、両ペプチドのアミノ酸配列はエンテロトキシンの同源性も高かった。guanylin および uroguanylin には 2 箇所

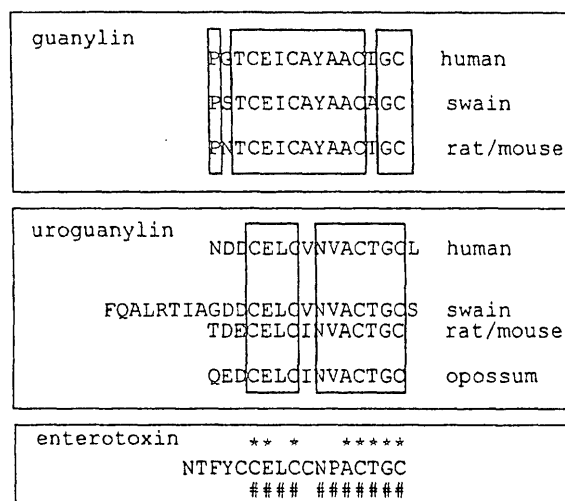


Fig. 4. Comparison of amino acids sequences of guanylin and uroguanylin among species, and also enterotoxin. *, identical with guanylin; #, identical with uroguanylin.

に S-S 結合があることが共通していたが、エンテロトキシンには 3 箇所 S-S 結合が存在していた。

guanylin は主に消化管上皮細胞に存在し、uroguanylin は消化管上皮細胞のほか、腎尿細管などにも存在していた。消化管におけるこれらのペプチドの存在部位には特異性があり、酸性環境である上部消化管では uroguanylin、弱アルカリ性である下部消化管では guanylin が多かった [4, 6]。これらのペプチドの GC 活性は、弱酸性では uroguanylin が、弱アルカリ性では guanylin が高く、環境 pH に応じて両ペプチドが対応していることが示された。また、uroguanylin は高 NaCl による分泌亢進があり、guanylin は低 NaCl により分泌抑制が起こることが示されており、両ペプチドによる NaCl 吸収の制御が考えられる。

GC-C 受容体のリガンドとしては、最初にエンテロトキシンが報告され、この受容体の作用による分泌性下痢の発症機構が説明された [1, 2]。その後の guanylin および uroguanylin 発見により [3, 10]、GC-C の受容体の生理的リガンドはこれらのペプチドであることが判明した。Fig.5 に示すように、経口的に摂取される NaCl の増減により消化管上皮細胞から guanylin および uroguanylin の消化管内分泌が制御される。それがパラクリンにより消化管内腔上皮細胞の GC-C 受容体に結合する。その後は GC 活性化、

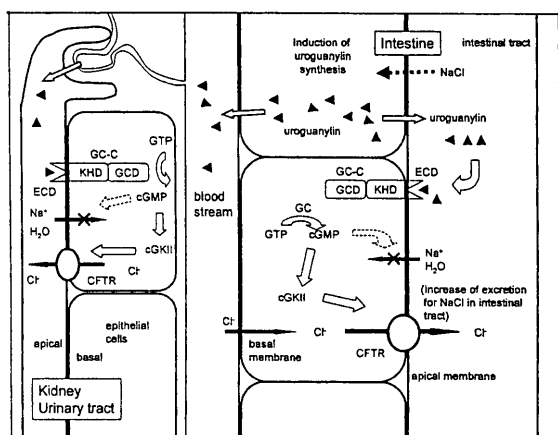


Fig. 5. Scheme for uroguanylin-guanylyl cyclase receptor C (GC-C) system. ECD, extracellular domain; GCD, guanylate cyclase domain; KHD, kinase homology domain; CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator; cGK II, cGMP dependent protein kinase II.

キナーゼ活性亢進などを経て腸管上皮の管腔側の cystic fibrosis transmembrane regulator による Cl の排出、あるいは機序不明であるが Na の流入阻止がもたらされる [1, 2]。その結果、浸透圧により水が消化管内腔に保持される。腸管粘膜上皮細胞で産生された uroguanylin の一部はエンドクリンとして血流により腎へ運ばれ、糸球体ろ過後、腎尿細管上皮細胞で消化管での作用と同じ機構で Na, Cl および水を尿管管腔に留める。uroguanylin は腸管および尿管いずれの場合も Na, Cl および水の体外への排泄を亢進する作用をもたらしている。

要約

guanylin および uroguanylin による Na および Cl 輸送制御測定系の検討のために、赤血球および上皮細胞を用いた。イヌ、クマ、オットセイ赤血球を用いて、Na/Ca および Na/H 交換輸送測定系、ならびにその交換輸送による細胞容積収縮および膨潤調節測定系を確立した。上皮細胞によるイオン輸送測定系として、フィルター底の Transwell 上に腎由来細胞である LLC-PK1 の単層細胞層を調製し、この経上皮細胞層輸送測定系を用いて頂側膜と基底膜間の水輸送を測定した。ussing chamber に装着したマウス腸管の管腔側への uroguanylin 添加により Cl の short-circuit current が変化することを確認した。また、guanylin および uroguanylin のイオン輸送への役割を説明する

ため、研究の現状を紹介した。

謝辞

本研究は文科省大学院教育研究特別経費の助成を受けた。クマおよびオットセイ血液は、それぞれ阿仁クマ牧場および伊豆三津シーパラダイスから提供された。各動物赤血球を用いた実験には麻布大学獣医学部病態生化学研究室学生の中山孝大、岩瀬信子、西木健一郎、福岡智子、安智子、関口夕子、高木晶代が卒論実験として熱心に取り組んだ。

文献

- 1) Chao, A.C., de Sauvage, F.J., Dong, Y.J., Wagner, J.A., Goeddel, D.V. and Gardner, P. *EMBO J.*, 13, 1065-1072 (1994).
- 2) Cuthbert, A.W., Hickman, M.E., MacVinish, L.J., Evans, M.J., Colledge, W.H., Ratcliff, R., Seale, P.W. and Humphrey, P.P.A. *Br. J. Pharmacol.* 112, 31-36 (1994).
- 3) Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L. and Smith, C.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 947-951 (1992).
- 4) 伊達 紫, 中里雅光, 松尾壽之, 日本臨床, 59, 2427-2432 (1998).
- 5) Forte, L.R. *Regulatory Peptides*, 81, 25-39 (1999)
- 6) Forte, L.R. London, R.M., Freeman, R.H. and Krause, W.J. *Am.J. Physiol.* 278, F180-F191 (2000)
- 7) Fujise, H., Yamada, I., Masuda, M., Miyazawa, Y., Ogawa, E. and Takahashi, R. *Am. J. Physiol.* 260, C589-597 (1991).
- 8) Fujise, H., Nakayama, T., Iwase, N., Tsubota, T. and Komatsu, T. *Comp. Clin. Path.* 12, 33-39 (2003).
- 9) Fujise, H., Annoura, T., Sasawatari, S., Ikeda, T. and Ueda, K. *Chemosphere*, 46, 1505-1511 (2002).
- 10) Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.j., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tompkins, J.a., Fok, K.F., Smith, C.e., Duffin, K.L., Siegel, N.R., Currie, M.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10464-10468 (1993).
- 11) Hoffman, J.F. *Am. J. Med.* 41, 666-680 (1966).
- 12) Joo, N.S., London, R.M., Kim, H.D., Forte, L.R. and Clarke, L.L. *Am.J.Physiol.* 274, G633-G644 (1998).
- 13) Magert, H-J., Hill, O., Zuchit, H-D., Martin, S., Meyer, M., Forssmann, W-G. and Adermann, K. *Biochem Biophys Res Commun.* 259, 141-148 (1999).
- 14) Parker, J.C. *J. Gen. Physiol.* 61, 146-157 (1973).
- 15) Parker, J.C. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 90, 539-542

- (1988). *Cell*, 63, 941-948 (1990).
- 16) Parker, J.C. *J.Gen. Physiol.* 84, 379-401 (1984). 18) Willis, J.S., Nelson, R.A., Gordon, C., Vilaro, P. and
17) Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S.T. and Garbers, D.L. Zhao, Z. *Comp Biochem. Physiol. A.* 96, 91-96 (1990).