

生理研研究会

『上皮組織における 細胞外環境感受機構』

2009 年 11 月 9 日(月)～11 月 10 日(火)

自然科学研究機構 生理学研究所(明大寺地区) 1 階会議室

代表者:京都府立医科大学 丸中良典

所内対応者:生理学研究所生体恒常機能発達機構 鍋倉淳一

抄録集



『上皮組織における細胞外環境感受機構』

日時：2009 年 11 月 9 日（月）～11 月 10 日（火）

場所：自然科学研究機構生理学研究所（明大寺地区）1 階会議室

代表者：京都府立医科大学大学院医学研究科 丸中良典

世話人：生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門 鍋倉淳一

（発表 20 分， 質疑応答 10 分）

11 月 9 日（月） 1 日目	
	受付
13:00	開会の挨拶
Session 1	座長 河原克雅（北里大学）
13:05	熱ショック転写因子を介するタンパク質恒常性維持の新しい分子機構 林田直樹、藤本充章、新川豊英、Ramachandran Prakasam、譚克、瀧井良祐、○中井 彰 山口大学大学院医学研究系研究科医科学分野
13:35	モルモット卵管上皮線毛運動周波数の卵巣周期中の変化と Estrogen と Progesterone の効果 ○中張 隆司 大阪医科大学生理学
14:05	コーヒーブレイク
Session 2	座長 桑原厚和（静岡県立大学）
14:20	ヒト小腸上皮モデルである Caco-2 細胞におけるフラボノイドの代謝と輸送 ○室田佳恵子、吉田修治、藤倉 温、寺尾純二 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
14:50	神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体 NKCC1 の役割 -フラボノイドによる神経再生の試み- ○中島謙一、新里直美、丸中良典 京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学
15:20	コーヒーブレイク
Session 3	杉田 誠（広島大学）
15:35	ヒト及びラット下部消化管における苦味物質の受容と分泌作用 ○加治いずみ 唐木晋一郎 桑原厚和 静岡県立大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室
16:05	アルドステロンによる Na⁺再吸収亢進は p38 を介する ○太田麻利子、新里直美、丸中良典 京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学
16:35	コーヒーブレイク

Session 4 北村健一郎（熊本大学）	
16:50	Identification of binding proteins for human Nedd4L C2 domain. Naomi Araki, OTomoaki Ishigami, Hisako Ushio, Shintaro Minegishi, Kazuaki Uchino, Satoshi Umemura Yokohama City University Graduate School of Medicine, Department of Cardio-Renal Medicine
17:20	Prostaglandin 輸送体 OAT-PG ノックアウトマウスを用いた腎局所 PGE₂ クリアランス機構の解析 ○波多野 亮 ¹ 、高藤和輝 ¹ 、Kanyarat Promchan ¹ 、Pattama Wiriyasurmkul ¹ 、永森收志 ¹ 、松原光伸 ² 、武藤重明 ³ 、浅野真司 ⁴ 、金井好克 ¹ ¹ 大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学、 ² 東北大学大学院医学系研究科遺伝子医療開発分野、 ³ 自治医科大学医学部腎臓内科、 ⁴ 立命館大学薬学部分子生理学教室
18:00	懇親会 於 生理学研究所（明大寺地区）5階 談話室
11月10日（火） 2日目	
Session 4 座長 金井好克（大阪大学）	
9:00	ループ利尿薬の経上皮細胞性分泌の分子機序：新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター分子 hOATv1 の同定 ○安西尚彦、Promsuk Jutabha、櫻井裕之 杏林大学医学部薬理学教室
9:30	代謝性アシドーシスによる腎集合管 V1a 受容体の発現誘導 ○安岡有紀子 ^{1,2} 、小林瑞佳 ² 、河原克雅 ^{1,2} 北里大学医学部生理学 ¹ 、北里大学大学院医療系研究科 ²
10:00	脂質ラフトが関与する胃酸分泌調節機構 ○酒井 秀紀、藤田恭輔、家原貴大、藤井拓人、清水貴浩、竹口紀晃 富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学
10:30	コーヒーブレイク
Session 5 座長 新里直美（京都府立医科大学）	
10:45	大腸陰イオン輸送における SLC26A3 (DRA) の役割 ○鈴木裕一、林久由 静岡県立大学食品栄養科学部
11:15	肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na⁺-ATPase 活性 ○藤井拓人 ¹ 、渋谷和人 ² 、下田恵理 ¹ 、清水貴浩 ¹ 、竹口紀晃 ¹ 、塚田一博 ² 、酒井秀紀 ¹ 富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学 ¹ 、富山大学大学院医学薬学研究部第二外科学 ²
11:45	閉会の挨拶

熱ショック転写因子を介するタンパク質恒常性維持の新しい分子機構

林田直樹、藤本充章、新川豊英、Ramachandran Prakasam、譚克、瀧井良祐、中井 彰
山口大学大学院医学系研究科医化学分野

上皮細胞を含むすべての細胞にとって、タンパク質恒常性の維持は細胞機能の発現に重要である。その維持システムの中で、タンパク質の合成・成熟の過程に重要な役割を演じているのが熱ショックタンパク質群の誘導を特徴とする熱ショック応答である。この応答は、主に熱ショック転写因子 HSF1 によって制御を受ける。我々は、伸長したポリグルタミン蛋白質 (polyQ) が細胞内で凝集体を形成することで蛋白質毒性を発揮するポリグルタミン病をモデルとして、HSF1 を介する蛋白質ホメオスタシスの維持機構を解析してきた。今回、HSF1 の新たなターゲット分子である転写因子 NFATc2 がタンパク質ホメオスタシスに重要な役割を担うことを明らかにした。

NFATc2 欠損 MEF は野生型に比較して polyQ 凝集体形成が 2 倍に増強し、同時にユビキチン陽性タンパク質の蓄積も増加し、HSF1 欠損 MEF と共通した表現型を示した。また、活性化型 HSF1 は野生型および HSF1 欠損 MEF において polyQ の凝集体形成を強力に抑制したが、NFATc2 欠損 MEF ではその抑制効果が半分に減少した。さらに、ハンチントン病(HD)マウスは HSF1 欠損マウスと交配させることで寿命が顕著に短縮するが、NFATc2 欠損 HD マウスも寿命が顕著に短縮し、神経症状の出現時期も早まった。形態学的にも、HSF1 欠損および NFATc2 欠損 HD マウスは、いずれも脳における polyQ 凝集体形成が野生型の 2 倍に亢進していた。以上の結果から、HSF1 は熱ショックタンパク質だけでなく、少なくとも NFATc2 を介して、蛋白質ホメオスタシスを調節していることが明らかとなった。NFATc2 は細胞内カルシウムの濃度変化により活性の制御を受ける転写因子であり、カルシウム制御とタンパク質恒常性維持について考察する。

モルモット卵管上皮線毛運動周波数の卵巣周期中の変化と **Estrogen** と **Progesterone** の効果

中張隆司
大阪医科大学 生理学

モルモットの卵管上皮線毛細胞の線毛運動周波数 (CBF) を ovarian cycle の各ステージで測定した。卵胞期直前には CBF は 12Hz に減少した。卵胞期では、 β estradiol (βE_2) 濃度の上昇に伴い、CBF は 12Hz から 16 Hz に上昇した。引き続き排卵期では、排卵日には 16Hz と高い CBF が維持されたが、その後 13Hz に減少した。この時、 βE_2 と progesterone (PRG) 濃度はさらに増加した後、急激に減少した。黄体期前期では、 βE_2 は低濃度に保たれ、PRG 濃度は緩やかに上昇した。CBF は 14 Hz から 17 Hz に上昇した。PRG 濃度が最高値に達する黄体期後期には CBF は 12 Hz に急激に減少した。その後、PRG 濃度が減少すると、CBF は再度 15 Hz に増加した。黄体期終了後 CBF は急激に減少した (12Hz)。 βE_2 benzoate (βE_2B) と medroxy PRG (mPRG) 投与による卵管採 CBF 変化を調べた。低濃度の βE_2B ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) では、CBF は 15 Hz に増加し、高濃度の βE_2B ($40 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) では、CBF は 12 Hz に減少した。この βE_2B による CBF 変化は ICI-182,780 (βE_2 受容体阻害剤) により消失した。mPRG ($4 - 40 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) は、CBF は 12 Hz に減少させ、mifepristone (PRG 受容体阻害剤) はこの CBF 変化を消失させた。両阻害剤の投与は、CBF を 18 Hz に増加した。本研究の結果は、モルモット卵管採において、ovarian cycle 中の各ステージの CBF が、 βE_2 と PRG の濃度により決められていることを示している。さらに、 βE_2B ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) と mPRG ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) を同時に投与すると、線毛運動周波数は 17 Hz に増加した。しかし βE_2B ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) 前処理の後、 βE_2B と mPRG を同時に投与した時には、CBF は 15Hz に維持された。反対に、mPRG ($4 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg} \cdot \text{water}^{-1}$) 前処理の後、 βE_2B と mPRG を同時に投与した時には、CBF は 12 Hz に維持された。この結果は、 βE_2 は PRG の効果を、PRG は βE_2 の効果を抑制していることを示している。

ヒト小腸上皮モデルである Caco-2 細胞におけるフラボノイドの代謝と輸送

室田佳恵子、吉田修治、藤倉温、寺尾純二
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

フラボノイドは植物性食品に含まれる機能性成分であり、抗酸化性などに由来した疾病予防効果が期待されている。植物中では主に配糖体として存在しているフラボノイドは、大部分が腸管管腔にて粘膜酵素や腸内細菌による消化により糖が脱離したアグリコンとなって吸収される。小腸上皮はフラボノイド代謝を司る主要な組織の一つであり、細胞内で第二相解毒酵素群によりグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に変換されたフラボノイドは、小腸上皮細胞の刷子縁側あるいは基底膜側に存在する抱合体排出ポンプによって細胞外へと放出される。刷子縁側への放出、すなわち腸腸循環を阻害すると生体内フラボノイド量が増加することが報告されており、腸管細胞におけるフラボノイドの輸送方向は生体利用性に大きな影響をもたらすといえる。そこで、我々はヒト小腸上皮細胞のモデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて、代表的なフラボノイドの一つであるケルセチンの細胞内代謝およびそこで産生される代謝物の輸送方向について検討している。今回は、ヒトがケルセチンを摂取した後血漿中に見出されるケルセチン代謝物と Caco-2 細胞産生代謝物との比較を行い、小腸上皮における輸送方向と生体吸収性について考察したい。

神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体 NKCC1 の役割 -フラボノイドによる神経再生の試み-

中島謙一、新里直美、丸中良典
京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学

学習や記憶等の高度な脳機能を可能にしているのは、多数の神経細胞が神経突起を伸長し、シナプス形成により構築される神経回路による。一方、細胞内 Cl^- 濃度変化は、細胞増殖や細胞骨格系再構築を含む様々な細胞機能制御に関与していることが、近年の研究より明らかになってきた。

近年、我々はラット副腎髄質由来 PC12D 細胞 (PC12 細胞の亜株) において、神経成長因子 (NGF) 処理により $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC isoform 1: NKCC1) の発現が増加すること、および NGF による神経突起伸長には NKCC1 が必須であることを明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 359:604-610, 2007)。PC12 細胞および PC12D 細胞における神経突起伸長は、細胞外のクロライドイオン濃度を低下させることで (Cl^- を NO_3^- または gluconate に置換) 有意に抑制された。PC12D 細胞は PC12 細胞よりも、より敏速に神経突起を伸長する。PC12 細胞と PC12D 細胞における NKCC1 の発現量を比較すると、PC12D 細胞の方が NKCC1 の発現量は高かった。これは、NKCC1 を介した細胞内へのクロライドイオンの取り込みが、神経突起伸長に対して促進的に働くことを示唆している。また、我々は以前よりある種のフラボノイドが、NKCC を始めとしたイオン輸送体やイオンチャネルの活性を調節していることを報告してきた (Am J Resp Cell Mol Biol (in press); Biochem Biophys Res Commun 336: 401-407, 2005; Biochem Biophys Res Commun 332:1042-1052, 2005; Biochem Pharmacol 67:795-801, 2004; Am J Physiol Renal Physiol 287:F932-F939, 2004)。今回、PC12 細胞を NGF 処理する際に、フラボノイド (ケルセチン) を同時に作用させておくことにより、NKCC1 活性が亢進し、それを介して神経突起伸長が促進するという興味深い結果を得たので、その詳細について報告する。

ヒト及びラット下部消化管における苦味物質の受容と分泌作用

加治いずみ 唐木晋一郎 桑原厚和
静岡県立大学院・環境科学研究所 環境生理学研究室

消化管管腔内は、口と肛門によって外界と連続しているため、生体にとって外部環境であるとも考えられる。一層の細胞から構成されている消化管粘膜上皮は、栄養素や水の吸収を維持しながら、管腔からの細菌の侵入や過増殖を阻止する防御機構も兼ね備えている。このような複雑な腸管の生理機能の調節には、粘膜上皮における管腔内の化学的情報の感受も関与していると考えられる。しかし、下部消化管での化学受容体の発現と機能については、ほとんど明らかになっていない。

近年、味覚や嗅覚に関わる化学受容体が次々に同定され、同じものが消化管粘膜でも機能している可能性が示された。特に、危険物を感知し排除するための苦味受容機構が、下部消化管においても生体防御機構に寄与しているのではないかと考えられる。そこで我々は、ヒト及びラットの大腸粘膜において、苦味受容体 (Taste receptor type 2: T2R) ファミリーの発現と、組織レベルでの応答を検討した。また、T2R 特異的アゴニストとして、6-n-propylthiouracil (6-PTU)を用いた。

1. 6-PTU をリガンドとする T2R ファミリーメンバーは、ヒトとげっ歯類の遺伝子間で最もよく保存されている (humanT2R-1, -4, -38 は ratT2R-1, -16, -26 と相同)。ヒト及びラット大腸組織から剥離した粘膜で RT-PCR を行い、これらの mRNA レベルでの発現を確認した。

2. 6-PTU は、Ussing chamber に装着したヒト及びラット大腸の粘膜-粘膜下組織において、濃度依存的に短絡電流 (Isc) の増加を伴う起電的な陰イオン分泌を惹起した。また、粘膜下神経を電気刺激した際の Cl⁻分泌は、粘膜側の 6-PTU 存在下で 1.5 倍にまで亢進した。しかし、6-PTU が惹起する陰イオン分泌は tetrodotoxin 及び ω -conotoxin によっては阻害されなかった。そこで、粘膜下神経においてシナプス後神経の活動を促進し、粘膜上皮細胞の Cl⁻分泌を誘起するプロスタグランジン (PG) との関連を検討した。非選択的 cyclooxygenase (COX) 阻害薬 piroxicam 及び、選択的 COX-2 阻害薬 NS-398 によって 6-PTU の反応はほとんど抑制されたが、COX-1 阻害薬 SC-560 によっては阻害されなかった。さらに、内因性 PG 合成を阻害した組織に PGE₂ を投与し、6-PTU を作用させると、PGE₂ の濃度に依存して 6-PTU の反応が促進することが明らかとなった。

以上の結果より、ヒト及びラットの下部消化管粘膜において苦味受容体が発現し、管腔側の刺激により tetrodotoxin 感受性の神経伝達を介さずに陰イオン分泌が引き起こされることが明らかとなった。この応答は、消化管組織のプロスタグランジン濃度によって促進され、非生理的 (侵襲や炎症など) 状態においては下痢を誘発するような多量の水分泌を引き起こす可能性が示された。消化管管腔内の環境を監視し、生理機能の調節に関与する下部消化管の化学受容機構の解明は、生体防御の観点からも今後重要であると考えられる。

アルドステロンによる Na^+ 再吸収亢進は p38 を介する

太田麻利子、新里直美、丸中良典

京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学

アルドステロン (ALD) はアミロライド感受性上皮型ナトリウムチャネル (Epithelial Na^+ channel; ENaC) の転写制御および細胞内局在制御により、 Na^+ 再吸収を亢進することが知られている。*Xenopus laevis* 腎遠位尿細管 (皮質集合管) 上皮モデル培養細胞 (A6 細胞) において、我々は ALD が p38 を一過性に活性化することを見出した。そこで本研究では、ALD の ENaC 介在性 Na^+ 再吸収亢進作用における p38 の生理的役割について検討した。

ALD 刺激時に、ENaC を介する Na^+ 再吸収と ENaC mRNA 発現亢進に p38 の活性化が関与するかどうか検討するために、p38 の特異的阻害剤である SB202190 の効果について調べた。SB202190 は、ALD による Na^+ 再吸収亢進および β -ENaC mRNA の発現亢進を著しく抑制した。しかし、SB202190 は、 Na^+ 再吸収をほぼ完全に抑制したのに対し、 β -ENaC mRNA の発現抑制は部分的であった。そこで、転写制御以外に、局在制御にも関与すると考えられたため、局在制御に対する影響についても検討した。ENaC の管腔側膜上の発現量は、膜への挿入と膜からの回収のバランスにより成り立っている。まず、膜への挿入過程への影響を検討するために、細胞内タンパク質輸送阻害剤である brefeldin A (BFA) と SB202190 の効果について調べたところ、BFA と SB202190 は相加的な阻害効果を示した。この結果は、BFA と SB202190 は異なる標的を阻害していることを示唆する。一方、膜からの回収過程について検討するために、プロテアソーム阻害剤である MG132 と SB202190 の影響について調べたところ、MG132 により SB202190 の阻害効果はほぼ回復した。この結果は、p38 が ENaC の膜からの回収および分解過程を遅延させ、 Na^+ 再吸収を亢進したことを示唆している。以上の結果より、ALD による p38 活性化の生理的役割は、 β -ENaC mRNA の発現を亢進するとともに、ENaC の膜からの回収過程を抑制することにより、管腔側膜上の発現量を増大させ、 Na^+ 再吸収を亢進させることであると考えられる。

Identification of binding proteins for human Nedd4L C2 domain.

Naomi Araki, ○Tomoaki Ishigami, Hisako Ushio, Shintaro Minegishi, Kazuaki Uchino, Satoshi Umemura

Yokohama City University Graduate School of Medicine,
Department of Cardio-Renal Medicine

Objectives: Human Nedd4L gene is thought to be one of the candidate genes for essential hypertension because of its pivotal role for downregulating ENaC expression from the apical membrane of urinary tubular cells. To understand further molecular dissections for ENaC-Nedd4L system, we performed yeast-two hybrid cloning to elucidate binding proteins for human Nedd4L C2 domain.

Methods and Materials: We synthesized both isoform I and isoform II C2 domain for bait vector by subcloning, then we performed yeast-two hybrid cloning using human kidney cDNA prey library. After sequencing for prey vector from positive yeast clones, subsequently we used Matchmaker Chemiluminescent Co-Immunoprecipitation system (Clontech) to confirm protein-protein interaction in mammalian cells (HEK293T).

Results: Total one hundred and two positive yeast clones were found for isoform I, and two hundreds and two positive yeast clones were found for isoform II, respectively. All of the isolated prey vectors were sequenced using fluorescence technology. Finally, multiple clones were found repeatedly and thought to be candidate genes such as, metallothionein2A, Na/K ATPase transporting β 1 polypeptide, et al. Among five clones commonly found for two isoforms, Niemann-Pick disease type C protein (NPC) showed the strongest chemiluminescence reactions.

Conclusions: Human Nedd4L protein might catalyze ubiquitinations for ENaC through binding the NPC with the N terminal C2 domain.

Prostaglandin 輸送体 OAT-PG ノックアウトマウスを用いた 腎局所 PGE₂ クリアランス機構の解析

波多野亮¹、高藤和輝¹、Kanyarat Promchan¹、Pattama Wiriyasurmkul¹、永森収志¹、
松原光伸²、武藤重明³、浅野真司⁴、金井好克¹

¹大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学、²東北大学大学院医学系研究科遺伝子医療開発分野、³自治医科大学医学部腎臓内科、⁴立命館大学薬学部分子生理学教室

PGE₂は腎臓においてレニン分泌調節の重要な情報伝達物質であり、尿細管-糸球体フィードバック機構を媒介するメディエーターの一つとして、尿細管の電解質流量の変化を即時的に輸入細動脈に伝達する役割を果たしている。しかし、PGE₂は細胞外において安定に存在することから、このような情報伝達機構を維持するためには、局所におけるPGE₂除去機構が必要であると想定される。この機構は中枢神経におけるシナプスとグリア細胞の関係性と類似しており、生体内において局所における情報伝達の即時性の維持にはこのような合成/分泌、受容、代謝の三位一体のシステムが存在することが必要である。

これまで腎皮質におけるPGE₂作用の研究は電解質流量の変化に伴うマクラデンサでのPGE₂合成/分泌と隣接する輸入細動脈に発現するPGE₂受容体を介した情報伝達の二者を中心とした解析が行われてきた。一方で、PGE₂の代謝酵素である15-PGDH (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)は近位尿細管に発現していることが知られていたが、その生理的意義は明らかでなかった。我々はこの代謝に関わる新たな分子としてPG特異的輸送体OAT-PG (Prostaglandin specific Organic anion transporter)を同定した。OAT-PGは近位尿細管側基底膜側に存在し、15-PGDHと共局在していることから、腎皮質局所におけるPG代謝に寄与する分子であると想定された。

本研究においては、この組織局所における生理活性物質のクリアランス機構を明らかにするためにOAT-PG ノックアウト(KO)マウスを作成し、OAT-PG 欠損の局所PGE₂クリアランスに与える影響について解析を試みた。平常時には、野生型マウスとKOマウスの間に違いは見られなかった。しかし、尿細管-糸球体フィードバックの活性化状態において、想定通りKOマウスで有意な腎皮質局所PGE₂クリアランスの障害が見られた。更にこの変化はレニン分泌刺激の過剰応答を引き起こした。現在、全身血圧調節に与えるOAT-PG KOの影響については検討中であるが、これらの結果より、OAT-PGが腎臓においてPGE₂の局所クリアランスに寄与し、尿細管-糸球体フィードバックを媒介する新たなシステムを構築している可能性が示唆された。

更に、OAT-PGは腎機能・血圧調節に関わる分子であると考えられることから、本態性高血圧症を含む様々な疾患の治療標的となる可能性が期待される。

ループ利尿薬の経上皮細胞性分泌の分子機序：新規ヒト電位依存性有機酸トランスporter分子 hOATv1 の同定

安西尚彦、Promsuk Jutabha、櫻井裕之
杏林大学医学部薬理学教室

腎臓は多くの種類の有機酸および有機塩基の排出を担っている。腎臓の有機酸輸送系はアニオン性薬物の排出だけでなく内因性の代謝物質の除去に重要な役割を果たしている。例えば遠位尿細管管腔側膜から作用する $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 2 (NKCC2) 阻害薬であるループ利尿薬は、この腎尿細管の有機酸輸送系が担っていると考えられている。利尿薬は尿細管基底側にある有機酸交換輸送体である OAT1 ないし OAT3 により細胞内に取込まれるが、その管腔側への出口の分子実体は未だ不明のままであった。今回我々は、ブタ電位依存性有機酸トランスporter pOATv1 と相同性をもつヒトクローンの有機酸輸送特性の解析を行い、腎近位尿細管管腔側の有機酸排出路として働く可能性を検討した。pOATv1 と相同性をもつヒト遺伝子(hOATv1)の cRNA を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させてその有機酸輸送活性を調べた。hOATv1 は腎臓の代表的有機酸であるパラアミノ馬尿酸(PAH)の RI 標識体を正常対照群に比し有意に輸送することが確認された。またその輸送駆動力は Na^+ 非依存性で外液中 NaCl の KCl 置換により、有機酸輸送活性が著明に増加することが明らかになり、hOATv1 による有機酸輸送が膜電位依存性である事が示唆された。卵母細胞内に注入した RI 標識 PAH は時間依存性に排出される特性を示し、さらに膜電位固定法による PAH 電流の電位依存性の変化および有機酸輸送阻害薬 Probenecid による抑制を確認できたことから、我々は本分子がヒトの電位依存性有機酸トランスporter hOATv1 であると確認した。hOATv1 による PAH 輸送は、多くのアニオン性化合物、特に Furosemide や bumetanide などのループ利尿薬により強力に抑制されることを見出し、実際に RI 標識 bumetanide が hOATv1 発現卵母細胞にて排出輸送される事を見出した。ヒト OATv1 は腎尿細管管腔側膜にそのタンパク質局在が報告されていることから、hOATv1 は、OAT1/OAT3 が基底側から細胞内に取込んだ有機酸、特にループ利尿薬の管腔側での排出経路の分子実体であることが示唆された。

代謝性アシドーシスによる腎集合管 V1a 受容体の発現誘導

安岡有紀子^{1,2}、小林瑞佳²、河原克雅^{1,2}

北里大学医学部生理学¹、北里大学大学院医療系研究科²

水電解質代謝において重要な働きをするバソプレシン(AVP)は、3つの受容体(V1aR、V1bR、V2R)が同定されており、腎ネフロンにはV1aRとV2Rがセグメント特異的に発現している。V1aRは、腎集合管(主細胞PC)の水チャネル(AQP2)の活性・発現を制御するV2Rの作用を修飾すると言われていたが、アシドーシス時に発現量が増加することが示された(Tashima et al, 2001)。我々は、マウスV1aRのネフロン内局在を調べると共に代謝性アシドーシス誘発時(NH₄Cl溶液負荷時)の尿・血漿電解質濃度/pH/尿中アンモニア排泄量を調べ、腎臓におけるV1aRの役割を明らかにする。【方法】野生型マウス(10-12週令)を代謝ケージに入れ、標準食飼育および2%スクロース+NH₄Cl溶液負荷時の採尿・採血を行った(0、1、3、6日目)。高感度in situ hybridization法(tyramide-ISH法)で、V1aR mRNAのマウス腎ネフロン内局在を調べ、発現量を数値化した。【結果】標準食飼育時のV1aR mRNA発現量は、(中-高)TAL 髄質内層 (ISOM)、CCD、OMCD、IMCD; (低)糸球体、TAL 皮質/髄質外層(OSOM)、DCT; (無) PCT, PST, TL だった。抗 AQP3 抗体(集合管 PC のマーカー)を使った蛍光二重染色法で、V1aR mRNA は PC に発現せず、間在細胞 (IC)にのみ発現していることが分かった。2%スクロース溶液+0.28 M NH₄Cl を6日間飲ませられたアシドーシス群マウスは、平均尿 pH ($\pm$ SEM) が 6.52 ± 0.04 (day 0, n=14) から 5.88 ± 0.03 (day 1, n=5) 、 5.85 ± 0.02 (day 6, n=5) に低下した ($P < 0.001$)。これに対し、血漿 pH は、 7.37 ± 0.02 (day 0, n=5) から 7.17 ± 0.01 (n=5) に低下し (day 1), 6 日後には元のレベル 7.38 ± 0.02 (n=12) に回復した。V1aR mRNA の発現量は、アシドーシス誘導時に次の2セグメント(TAL 髄質内層とOMCDのIC)のみ、有意に ($P < 0.05$) 増加した。【結論】アシドーシスで誘導されるネフロン内V1aRは、尿中H⁺分泌を促進し、酸塩基バランスに貢献している。

脂質ラフトが関与する胃酸分泌調節機構

酒井秀紀、藤田恭輔、家原貴大、藤井拓人、清水貴浩、竹口紀晃

富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学

我々は最近、胃酸分泌細胞において酸分泌休止時および酸分泌刺激時のいずれにおいても、細管小胞膜とアピカル膜は独立しており、両膜が一体化しないことを見出した。さらに細管小胞そのものがカベオソームであること、アピカル膜にはラフト領域と非ラフト領域があることを明らかにした。

本研究では、膜マイクロドメインの脂質ラフトが、胃プロトンポンプ (H^+, K^+ -ATPase) の活性におよぼす効果について検討した。実験には、ブタ胃粘膜から調製した、細胞内胃細管小胞に富むベシクル (TV) およびアピカル膜に富むベシクル (SAV) を用いた。 H^+, K^+ -ATPase の特異的阻害薬として SCH28080 を用いた。胃プロトンポンプ活性は coupled enzyme 法で、小胞へのプロトン取り込みは acridine orange 蛍光の消光を利用して測定した。Detergent-resistant membranes (DRM) および non-DRM はベシクルを CHAPS で処理し一連の密度勾配遠心により調製した。

SAV と TV に含まれるコレステロール量を、methyl- β -cyclodextrin (M β CD) と水溶性コレステロール処理により、外因的に変化させた。SAV と TV の胃プロトンポンプ活性は M β CD 処理し、コレステロールを引き抜くことで、共に顕著に減少し、水溶性コレステロールの添加により元のレベルにまで回復した。SAV と TV のプロトン取り込み活性は、M β CD 処理により共に顕著に抑制され、コレステロールの添加により有意に回復した。SAV において、 H^+, K^+ -ATPase は、DRM と non-DRM の両方の画分に分布している一方、 H^+, K^+ -ATPase と分子会合し Cl^- 輸送に関与している KCC4 は、DRM にのみ分布していた。KCC4 および H^+, K^+ -ATPase を安定共発現させた HEK293 細胞においても、 H^+, K^+ -ATPase は DRM と non-DRM の両方に分布する一方、KCC4 は DRM に分布していた。以上の結果から、SAV において H^+, K^+ -ATPase がラフトに存在する場合に高い活性を有することが示唆され、胃酸分泌細胞のアピカル膜における酸分泌は脂質ラフトによって正に調節されているものと考えられた。

大腸陰イオン輸送における SLC26A3 (DRA) の役割

○鈴木裕一、林久由
静岡県立大学食品栄養科学部

小腸や大腸粘膜上皮の apical membrane には様々な陰イオン/ HCO_3^- 交換輸送体が存在し、 Cl^- などの陰イオンの吸収や、 HOC_3^- 分泌を担っている。腸管には、陰イオン輸送活性を持つ SLC26 ファミリーの輸送体のうち、SLC26A3 (DRA) と SCL26A6 が発現している。動物種により異なる可能性はあるが、小腸では SLC26A3 (DRA) と SLC26A6 の両者が、大腸では主として SLC26A3 (DRA) が発現している。今回、SLC26A3 (DRA) が大腸 Cl^- 吸収および HOC_3^- 分泌にどのような関与しているかを、SLC26A3 (DRA) 欠損マウスを用いて検討した。

【方法】 Ussing chamber を用いた。①短絡条件下で、 $^{22}\text{Na}^+$ および $^{36}\text{Cl}^-$ の J_{ms} (粘膜側→血液側フラックス)及び J_{sm} (血液側→粘膜側フラックス)を測定した。②また、pH スタット法で粘膜側への HOC_3^- 分泌速度を測定した。

【結果と考察】 ①まず回腸以下の腸内容物を採取し、水分含量、pH、電解質組成を測定した。DRA 欠損マウスの大腸(盲腸、近位結腸、中・遠位結腸)の水分含量は、Wild-type(WT)より多く、下痢症状であった。また、pH は回腸末端以下で低かった。 Na^+ 濃度は回腸以下で低くなったが中遠位結腸では WT 差がなかった。 K^+ 濃度は、遠位結腸で低下していた。DRA 欠損マウスでは測定したいずれの部位でも特に Cl^- 濃度が著明に高かった。以上の特性は基本的にクロール下痢症(DRA の異常による常染色体劣性遺伝病)の便組成と一致している。

②大腸各部位(盲腸、近位結腸、遠位結腸)での $^{36}\text{Cl}^-$ および $^{22}\text{Na}^+$ の一方向性フラックスを、DRA 欠損マウスと WT で比較した。 $^{36}\text{Cl}^-$ フラックスは、WT マウスでは盲腸と遠位結腸で $J_{\text{ms}}(^{36}\text{Cl}^-) > J_{\text{sm}}(^{36}\text{Cl}^-)$ で、正味の Cl^- 吸収があったが、近位結腸では両者はほぼひとしく正味の Cl^- 吸収は殆どなかった。それに対し DRA 欠損マウスでは、近位結腸での $^{36}\text{Cl}^-$ フラックスは WT と差がなかったが、盲腸と遠位結腸では $J_{\text{ms}}(^{36}\text{Cl}^-)$ のみならず $J_{\text{sm}}(^{36}\text{Cl}^-)$ も著明に低下し、正味の $^{36}\text{Cl}^-$ 吸収は殆ど消失した(0 ではないものの)。以上の結果より、盲腸と遠位結腸で DRA が機能し、 Cl^- 吸収の大部分を担っていることが示された。さらに、 $J_{\text{sm}}(^{36}\text{Cl}^-)$ も DRA 欠損マウスで低下したことから、DRA による Cl^-/Cl^- 交換輸送活性もあることが示唆された。また、近位結腸では DRA は全く発現していないか、活性がない状態にあることが示唆された。一方 ^{22}Na フラックスは、3つの部位ともに $J_{\text{ms}}(^{22}\text{Na}) > J_{\text{sm}}(^{22}\text{Na})$ で、DRA 欠損マウスと WT で大きな差がなかった。腸管の Na^+ 輸送は Na^+/H^+ 交換輸送を介しており、 $\text{Cl}^-/\text{HOC}_3^-$ 交換輸送と機能的にカップリングしていると考えられているが、DRA 欠損マウスではこの様なカップリングは見られないことが明らかになった。

③管腔側の Cl^- で活性化される HOC_3^- 分泌につき、この活性が大きい盲腸と遠位結腸で、WT と DRA 欠損マウスで比較した。DRA 欠損マウスでは全く消失していた。このことから、DRA は $\text{Cl}^-/\text{HOC}_3^-$ を介して HOC_3^- 分泌も担っていると考えられた。

肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性

藤井拓人¹、渋谷和人²、下田恵理¹、清水貴浩¹、竹口紀晃¹、塚田一博²、酒井秀紀¹

1 富山大学大学院 医学薬学研究部 薬物生理学

2 富山大学大学院 医学薬学研究部 第二外科学

近年、強心配糖体が抗癌作用を持つことが報告され、癌細胞における標的タンパク質としてのナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) の病態生理機能が注目されている。しかし、ヒト肝細胞癌における Na^+, K^+ -ATPase の発現異常や生理機能についてはほとんど報告されていない。

ヒト肝細胞癌と正常肝組織において、 Na^+, K^+ -ATPase α -subunit の各アイソフォーム ($\alpha 1\text{NaK}$ - $\alpha 3\text{NaK}$) の発現量を比較すると、ヒト肝細胞癌において $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量が正常肝組織に比べて有意に増加していたが、 $\alpha 1\text{NaK}$ および $\alpha 2\text{NaK}$ の発現量に有意な変化は見られなかった。次に、ヒト肝細胞癌と正常肝組織の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対するウアバイン感受性を比較したが、両者間で有意な差は見られなかった。しかし、ヒト肝細胞癌においてウアバイン ($10 \mu\text{M}$) 感受性の Na^+, K^+ -ATPase 活性は、近傍の正常肝組織に比べて有意に上昇していた。従って、肝細胞癌において $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量の亢進によりウアバイン感受性の Na^+, K^+ -ATPase 活性が上昇している可能性が示唆された。

また、ヒト正常肝組織および肝細胞癌には極めて高いウアバイン (1 mM) 非感受性 Na^+ -ATPase 活性が存在することを見出した。このウアバイン非感受性 Na^+ -ATPase 活性は、ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞にも存在した。 Na^+ -ATPase 活性の各症例における変化は、肝細胞癌および正常肝組織におけるどの Na^+, K^+ -ATPase α -subunit のアイソフォームの発現量変化とも一致しなかった。従って、ヒト肝細胞における Na^+ -ATPase 活性は、 Na^+, K^+ -ATPase に起因する活性ではなく、別の分子が担っている可能性が示唆された。