

生理研研究会

『上皮膜輸送制御の分子機構 : 体内環境恒常性維持機構解明を目指して』

2008年7月16日(水)～7月17日(木)
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
世話人: 生理学研究所 鍋倉淳一

抄録集

NIPS
NATIONAL INSTITUTE FOR PHYSIOLOGICAL SCIENCES

Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体 SLC26A3 における N結合型糖鎖付加の役割

静岡県立大学 食品栄養科学部 生理学研究室

林 久由、山下 裕香理、鈴木 裕一

SLC26A3 は消化管に発現している Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体であり、Cl⁻吸収を担っていると考えられている。SLC26A3 は糖タンパク質であることが示されているが、糖鎖の役割および付加部位については詳細に研究されていない。このため本研究では糖鎖合成阻害剤、脱糖鎖酵素、並びに N結合型糖鎖付加部位の点変異体の作製により検討した。細胞は SLC26A3 のテトラサイクリン誘導発現系を使用した。Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送活性は pH 感受性蛍光色素である BCECF を用いて測定した。SLC26A3 を発現誘導し経時的にウェスタンブロット並びに免疫染色で SLC26A3 の生合成を解析すると、誘導後 2 時間で 90kDa バンドが観察され、免疫染色では細胞内の局在が主に観察された。誘導後 3 時間以降では 90kDa のバンドに加え、更に 120kDa のバンドの発現が観察された。120kDa のバンドが強く観察される誘導後 24 時間では、免疫染色では細胞膜上での強い発現が観察された。N 結合型糖鎖付加抑制剤であるツニカマイシン存在下で発現誘導すると、高分子側バンドが消失し 85kDa のバンドに収束した。また、SLC26A3 が発現した細胞表面の N型糖鎖を切断する PNGase F で処理すると、高分子側のバンドのみが消失した。更に、ゴルジ体で付加された糖鎖は切断しない Endo H で処理すると、低分子側のみが分解され、これより低分子側のバンドは細胞内に存在することが示唆された。以上のことと SLC26A3 の一次構造より推測される分子量は 84.5kDa であることより、90kDa のバンドは細胞内にあるコア糖鎖が付加した SLC26A3 であり、120kDa のバンドは糖鎖が完全に付加し、細胞膜上にある成熟した SLC26A3 であることが示唆された。ビオチンで細胞膜表面上の SLC26A3 を解析すると、ツニカマイシン処理後にも細胞膜表面への発現が示唆された。さらに詳細に検証するために Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送活性を測定した結果、細胞膜表面への発現が確認された。この条件下で、糖鎖除去された SLC26A3 のイオン輸送機能を評価した。Cl⁻/HCO₃⁻交換活性は低下していたが、陰イオン選択性は糖鎖除去された SLC26A3 では変化は観察されなかった。糖鎖の役割としてタンパク分解酵素からの保護作用が報告されており、SLC26A3 が発現している消化管では多くの消化酵素が存在しているため、糖鎖除去した SLC26A3 のトリプシン感受性を検討したが、糖鎖除去によりトリプシン感受性が亢進した。N結合型糖鎖付加がされるアスパラギン(N)をグルタミンに置換した点変異体作製により N結合型糖鎖付加サイトを検討すると N153、N161、N165 が糖鎖付加される可能性が示唆された。この変異体を CHO 細胞に発現させると、細胞膜と細胞膜直下に発現が観察され、機能を測定すると DIDS 非感受性の Cl⁻/HCO₃⁻交換活性が観察された。上皮細胞である MDCK 細胞では SLC26A3 の野生型は微絨毛に発現していたが、糖鎖付加を受けない変異体は細胞内に主に発現が観察された。

SLC26A3 は N153、N161、N165 が糖鎖付加を受けており、これら糖鎖は陰イオン選択制には影響しないが、上皮細胞では糖鎖は頂側膜へのソーティングに重要であることが示唆された。また消化管では糖鎖は消化酵素より SLC26A3 を保護している可能性が示唆された。

アラキドン酸による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強 : PPAR α /NOS1/cGMP

大阪医科大学 生理学

中張隆司

アラキドン酸 (AA, 2 μ M) は PPAR α を介し胃幽門線粘液細胞の Ca^{2+} 調節性開口放出を増強している。この AA による増強は PPAR α の阻害剤 (MK886)、L-NAME、PKG 阻害薬 (Rp8BrPET-cGMPS) により消失し、PPAR α 刺激薬 (Eicosatetraenoic acid (ETYA), WY14643)、NO donor (NOC12)、8BrcGMP により再現された。また、アセチルコリン (ACh) 刺激により活性化した胃幽門線粘液細胞の開口放出は、MK886、Rp8BrPET-cGMPS、L-NAME より 2/3 に抑制された。AA と PPAR α 刺激薬は $[Ca^{2+}]_i$ の動員には影響を及ぼさなかった。また、胃幽門粘膜では、AA と PPAR α 刺激薬は NO と cGMP の集積を引き起こした。胃幽門腺粘液細胞では、PPAR α および NOS1 対して免疫組織化学的に陽性に染色された。胃幽門線粘液細胞では ACh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を介し AA の集積を引き起こす。この AA が PPAR α を刺激し NOS 1 を活性化、引き続いて NO/cGMP の集積を引き起こし、開口放出を増強していた。

胃酸分泌細胞の膜マイクロドメインの構成と機能

○酒井秀紀、藤井拓人、高橋佑司、森井孫俊、竹口紀晃
(富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学)

胃プロトンポンプ (H^+,K^+ -ATPase) は、胃酸分泌機構の最終段階においてプロトン分泌を担う分子である。これまで胃プロトンポンプは、酸分泌休止時には細胞内の細管小胞膜に局在するが、分泌刺激時には細管小胞膜が分泌膜と融合し管腔につながり、プロトンが分泌されると考えられている。我々は、胃酸分泌機構に関わる膜マイクロドメインの構成と機能を明らかにすることを目的とした。

ブタ胃細管小胞に富むベシクル (TV) および分泌膜に富むベシクル (SA) を CHAPS で処理後、不溶性画分 (DRM) および可溶性画分 (non-DRM) の単離を行った。総リン脂質は、TV では大部分が DRM に分布していたが、SA では DRM、non-DRM に同程度に分布していた。TV では caveolin-1 が高発現しており、SA では flotillin-2 が高発現していた。これらの結果から、TV はカベオソームであり、SA にはラフトおよび非ラフト領域が存在するものと考えられた。胃プロトンポンプは、カベオソーム、ラフト、非ラフトの3種類すべての場に存在していた。TV に高発現している Cl^-/H^+ 対向輸送体の CLC-5 は、胃プロトンポンプと共に DRM に分布し、両者は免疫共沈降した。Methyl- β -cyclodextrin ($M\beta CD$) 処理により、CLC-5 とプロトンポンプは non-DRM に移行し、コレステロール添加により DRM へ再分布した。プロトンポンプ活性は、 $M\beta CD$ 処理により減少し、コレステロール添加により回復した。SA に高発現している K^+-Cl^- 共輸送体の KCC4 は、プロトンポンプと免疫共沈降した。KCC4 阻害剤の DIOA は、SA におけるプロトンポンプの ATP 加水分解活性および H^+ 輸送活性を阻害した。また胃プロトンポンプ阻害薬により KCC4 による Cl^- 輸送活性が抑制された。以上の結果から、胃酸分泌細胞の分泌膜と細管小胞では、胃酸分泌に関わるマイクロドメインの構成が異なっており、それぞれ空腹時と摂食時の胃酸分泌機構に対応しているものと考えられた。

V1aR ノックアウト(KO)マウスの体液量調節機構

小林瑞佳¹、安岡有紀子^{1,2}、田上昭人³、河原克雅^{1,2}

北里大学大学院医療系研究科¹、北里大学医学部生理学²、国立成育医療センター薬剤治療研究部³

バソプレッシン(AVP)は、水電解質代謝ならびに循環血圧維持において重要なホルモンである。現在まで、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が発現している。集合管細胞管腔膜水チャネル(AQP2)の活性・発現を制御し、尿濃縮に寄与するV2Rに比べ、尿細管細胞におけるV1aRの役割には未解明の点が多い。Tanoueらは、V1aR^{-/-}マウスを作製し、血漿レニン活性(PRA)・血漿アルドステロン濃度(PAC)・循環血液量・体血圧が、野生型に比べ有意に低下していることを報告した(Koshimizu T et al, 2006)。我々は、V1aRのネフロン内局在を調べると共に、低Na⁺食で飼育した場合の血漿電解質濃度・尿中排泄量ならびにPRA・PACを調べ、腎臓におけるV1aRの役割を明らかにする。【方法】In situ hybridization法で、V1aR mRNAのネフロン内局在を調べる。野生型マウスとV1aR^{-/-}マウス(8週令)を、標準食(NaCl 0.4%)または低Na食(NaCl 0.04%)で1週間飼育し、代謝ケージを用いて採尿後、体重・血圧を測定する。また、尿・血液検体から、PRA、PAC、血漿AVP濃度、血液・尿の電解質濃度、浸透圧を測定し、両動物間の違いと食餌の影響を解析する。【結果】V1aRは、糸球体と下位ネフロン(MTAL-IMCD)に発現していた(組織発現量: CCD, MD > 糸球体、他セグメント)。WTマウスの尿中Na⁺排泄量は、240.6 μmol/d(標準食, n=3)から127.1(低Na⁺, n=2)に減少したが、KOマウスの尿中Na⁺排泄量は、173.8 μmol/d(標準食, n=2)から112.9(低Na⁺, n=2)に低下した。一方、WTマウスの尿中K⁺排泄量は、382.2 μmol/d(標準食)から261.9(低Na⁺)に減少したが、KOマウスの尿中K⁺排泄量は、369.5 μmol/d(標準食)から388.2(低Na⁺)に微増した。血漿電解質は、食餌、V1aR KOの違いによりあまり変化しなかった。PRAの結果は、既報(Koshimizu T et al, 2006)を確認したが、PAC(KOマウス)は、低Na⁺食で大いに増加した(379 → 1,920 pg/ml)。【結論】標準食で飼育されたマウス(WT)は、V1aRの働きで尿中Na⁺喪失を防止している可能性を確認した。低Na⁺食で飼育されたV1aR^{-/-}マウスのPAC上昇は、Renin-Angiotensin-Aldosterone系以外の体Na⁺量調節系の存在を示唆する。

本態性高血圧症の成因の分子病態生理

尿細管イオントランスポーターの調節因子と分子進化からの考察

横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学 石上 友章

我々は、まず本態性高血圧症の特徴のひとつである、家族集積性、多因子遺伝性に注目し、候補遺伝子アプローチによる分子遺伝学的手法を用いることによって、原因遺伝子・疾患感受性遺伝子を明らかにする方法をとった。遺伝子改変動物によるデータを基に、レニン・アンジオテンシン系を構成する遺伝子—angiotensinogen (AGT), アンジオテンシン変換酵素 (ACE), アンジオテンシン受容体 (ATR)、さらには内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) といった候補遺伝子の一塩基多型 (SNP) に着目した。所期の遺伝学的探索的研究の後、AGT 遺伝子にターゲットを絞って、解析を進めた。当初のマーカー的な SNP から、遺伝学的に連鎖不均衡にある機能的 SNP の探索を行っていく過程で、AGT 遺伝子のプロモーター領域に近接して存在する SNP と本症との関連を明らかにし、量的形質としての血圧が、AGT 遺伝子の転写活性と関連があることを見出した。さらに、AGT 遺伝子の resequencing を行い、新たに 44 の SNP を発見し、構成する haplotype を解析し、高血圧の成因に関与するアレルが、組みかえの少ない、新しい haplotype であることを明らかにした。さらに、同遺伝子の解析を世界 13 民族に対して行い、人類の migration および環境負荷による selection に一致した遺伝子分布の実態を解明した。

その後、①AGT 遺伝子が本症の発症をもたらす、生体における生物学的なメカニズム。②AGT 遺伝子に次ぐ高血圧候補遺伝子。の二つの疑問の解決をめざした。

第一の疑問に対しては、腎臓尿細管における AGT ならびにレニンの発現と調節を *in vivo* で検討することで、尿細管に独立して存在するレニン・アンジオテンシン (RA) 系の異常の可能性を明らかにした。

第二の疑問に対しては、遺伝性家族性高血圧症である Liddle 症候群の遺伝子解析の結果に着目し、アルドステロン感受性遠位性ネフロン (ASDN) に発現する上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) の調節因子であるユビキチンリガーゼ Nedd4L の解析を行った。ヒト Nedd4L 遺伝子に、従来知られていなかった二つの第一エクソンおよび、共通する第二エクソンが存在することをゲノム配列から明らかにした。同時に新規に 38 の SNP を発見し、そのなかから新規の第一エクソンの 3' 端に位置する G/A 変異 (rs4149601) に着目した。この変異が、新規エクソンの splicing が 10 塩基後退する結果、エクソン 2 において、stop codon に終わる、ヒトにおいては、いわば、遺伝子ノックアウトを生ずる機能的変異であることを明らかにした。

現在、①ラットでの Nedd4L 遺伝子の分子多様性を明らかにするとともに、遺伝性食塩感受性ラットにおいて、食塩摂取量による Nedd4L 遺伝子の発現調節が、遺伝性に制御されており、食塩感受性高血圧の発症に関与していることを明らかにし、②本邦人での rs4149601 を使った関連研究によって、G/A 変異の G アレルが本態性高血圧症の発症と有意に関連することを明らかにした。さらに③G アレルにより生ずるヒトの I 型 Nedd4L タンパクの発現と、他の isoform との相互作用を免疫組織、電気生理学的に検討し、antagonistic な効果による昇圧の可能性を明らかにした。この結果から、isoform I を発現する細胞では、ENaC のダウンレギュレーションが抑制され、ナトリウム再吸収が亢進するために、G アレルを持つヒトで、高血圧症を発症するメカニズムを明らかにした。

新規腎特異的プロスタグランジン輸送体 OAT-PG の同定と生理機能の検討

波多野亮¹、平田拓²、安西尚彦²、松原光伸³、武藤重明⁴、永森収志¹、遠藤仁²、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杏林大学医学部薬理学教室、³東北大学
大学院医学系研究科遺伝子医療開発分野、⁴自治医科大学医学部腎臓内科

Prostaglandin(PG)は腎臓において、体液調節や血流調節の維持に関わる重要な生理活性物質である。PG は血液中において安定に存在し、その不活性化には細胞への取込と細胞内に存在する代謝酵素による代謝分解が不可欠である。循環血液中の PG は、肺や肝臓において PG 特異的輸送体 PGT (PG transporter)により細胞へ取り込まれ、PG 代謝酵素である 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)によって不活性化される。一方、腎臓においては 15-PGDH を主に発現する近位尿細管には PGT は発現しておらず、腎臓において重要な役割を果たす他の PG 輸送体が存在すると考えられている。

今回、我々は PGT とは異なる SLC22 ファミリーの有機アニオン輸送体(OAT)のメンバーとして新たな PG 特異的輸送体 OAT-PG (Prostaglandin specific Organic anion transporter)を同定した。OAT-PG はマウスにおいて腎臓の近位尿細管の側基底膜側に特異的に発現し、15-PGDH と共局在していた。また OAT-PG は、腎臓において主要な PG である PGE₂に高い親和性を示すことから、腎皮質における PGE₂の代謝を担う輸送体であると想定された。

腎皮質において、PGE₂は、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。PGE₂は細胞外において安定であることから、このような情報伝達機構を維持するためには、中枢神経におけるグリア細胞による神経伝達物質除去に類似した PGE₂除去機構が必要であると想定される。我々はこのような観点から OAT-PG が腎臓局所における神経伝達物質調節機構様の新たなオータコイド調節機構を構築している可能性を想定し、研究を進めている。これまでに我々は、局在解析や細胞分画により、OAT-PG と 15-PGDH が腎近位尿細管側基底膜において共局在することを示唆する結果を得ており、本研究会では、OAT-PG が PG 代謝酵素との機能共役により、腎臓局所の新たな生理活性物質調節機構を形成している可能性について報告する。

熱ショック転写因子によるレンズの恒常性維持機構

藤本充章、大島功、新川豊英、王倍倍、井上幸江、林田直樹、瀧井良介、中井 彰
山口大学大学院医学系研究科医化学分野

熱ショック応答は熱ショック蛋白質群の誘導を特徴とし、進化の過程で保存された、すべての生物に備わった細胞の蛋白質恒常性維持機構である。従って、この応答は、ほとんどすべての細胞機能制御に関わると考えられる。実際、イオンチャネルの安定化等を含む様々な過程で熱ショック応答が重要であることが知られている。哺乳動物細胞には少なくとも3つの熱ショック転写因子 HSF が存在し、熱ショック応答だけでなく、生殖器、脳、そして感覚器等の発生過程に必須の役割を担っている。そのうち HSF1 が熱ショック応答を制御しているが、HSF2 と HSF4 の役割や、熱ショック応答制御と発生過程での遺伝子発現制御の関連については明らかではない。HSF 群の役割を明らかにするためには、従来の限られた数の熱ショック遺伝子を中心とする遺伝子発現の解析ではなく、半網羅的なターゲット遺伝子の同定とその解析が必要である。私たちは、これまでにレンズと嗅神経上皮などの感覚器の維持に HSF4 が必要であることを明らかにした。特に、レンズは、上皮細胞と線維細胞の2つしかなく、HSF4 は発生の初期からどちらの細胞にも発現する。したがって、レンズ組織は HSF4 のターゲット遺伝子の同定と解析に適していると考えられる。そのような解析から、今回、HSF4 の発生過程と熱ショック応答の遺伝子発現制御におけるユニークな役割が明らかになったので報告する。

食品由来脂溶性成分の腸管吸収に及ぼす共存物質の影響

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野

室田佳恵子、寺尾純二

食品中にはさまざまな脂溶性成分が存在しているが、これらは細胞膜との親和性が強く古くから単純拡散で細胞膜を通過し細胞へ取り込まれると考えられてきた。そのため、脂溶性成分の腸管吸収機構に関しては、水溶性の栄養素である糖やアミノ酸と比べるとあまり研究されていなかった。しかし近年では、脂肪酸やコレステロールに対する膜輸送担体が見出され、脂溶性成分についても細胞膜輸送のためには何らかのタンパク質が介在することが知られるようになり、脂溶性成分の細胞取り込み、さらには腸管吸収機構が見直されつつある。

脂溶性成分の腸管吸収においては、腸管内でのフードマトリックスからの遊離、腸内液（水相）中の輸送、細胞膜通過、カイロミクロン合成とリンパ輸送、といった過程を経る必要があり、それぞれのプロセスにおいて内因性あるいは食事由来の共存する分子の影響を受けることが推測される。そこで本発表では、食品由来油脂および代表的な脂溶性食品成分の一つとしてビタミンEの一種である α -トコフェロールと、両親媒的な性質を持つフラボノイドについて、腸管吸収に及ぼす共存成分の影響について我々がこれまでに得た知見を紹介し、脂溶性食品成分の腸管吸収機構について考察する。

ヒト胃癌細胞株において細胞内 Cl⁻濃度は MAPK を介して G₁/S 細胞周期チェックポイントを制御する

宮崎裕明、大澤るみ、塩崎敦、新里直美、丸中良典
京都府立医科大学大学院 細胞生理学

細胞増殖は細胞の持つ最も基本的かつ重要な機能であり、厳密にコントロールされている。近年、細胞周期の進行に伴って Cl⁻ channel や Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter など Cl⁻ 輸送体の活性・発現が変化することが報告されており、細胞増殖の調節に Cl⁻ 輸送が重要な働きをしていると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。近年の我々の研究結果から、細胞内 Cl⁻ が様々な細胞の生理機能に対する細胞内シグナルとして重要な働きをしていることが明らかになっており、Cl⁻ 輸送体の発現・活性調節を介した細胞内 Cl⁻ 濃度変化が、細胞増殖の調節シグナルとして機能している可能性が強く示唆される。そこで、本研究では胃ガン由来細胞株である MKN28 において細胞内 Cl⁻ 濃度変化による細胞増殖に与える影響について検証した。

MKN28 細胞を、低 Cl⁻ 培地 (Cl⁻ を NO₃⁻ で置換) で培養を行ったところ、細胞増殖は有意に抑制された。細胞周期解析の結果、細胞内 Cl⁻ 濃度の減少は細胞周期の G₁ 期から S 期への進行を遅延させることが明らかになった。また、G₁ 期から S 期への進行を促進する pRb のリン酸化レベルが、低 Cl⁻ 環境下では有意に減少していた。pRb をリン酸化する CDK2 の発現レベルは、低 Cl⁻ 環境下で培養した細胞において有意に減少した。また、CDK の活性阻害効果を持つ p21 の発現量が有意に上昇していた。一般的に、p21 の発現量は p53 転写因子によって調節されることが知られているが、低 Cl⁻ 環境下において p53 の発現量の有意な変化は認められなかった。そこで、p53 非依存的な p21 発現調節経路として報告のある MAPK 経路に対する低 Cl⁻ の影響を検討したところ、低 Cl⁻ 環境下では ERK、p38、JNK すべてのリン酸化レベルが亢進した。また、MAPK 特異的阻害剤の処理により、低 Cl⁻ 環境下における p21 発現亢進および細胞増殖抑制効果が消失した。

以上の結果から、細胞内 Cl⁻ は MAPK 経路を介して p21 の発現レベルを調節することで細胞増殖を制御している可能性が強く示唆された。

セリンプロテアーゼ阻害薬による食塩感受性高血圧症治療の可能性

熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科学分野

實吉 拓、柿添 豊、富田 公夫、北村 健一郎

【背景】

上皮型 Na チャネル(ENaC)は腎集合尿細管細胞に発現し、腎における Na 再吸収に重要な役割を果たしており、血圧や体液量調節に関わっている。私達は膜型セリンプロテアーゼである prostasin がそのプロテアーゼ活性により ENaC を活性化することを報告した。また、prostasin の発現はアルドステロンにより調節を受けており、原発性アルドステロン症患者では尿中 prostasin 排泄量が増加していることも報告している。ENaC は二回膜貫通型の α , β , γ の3つのサブユニットから成る heteromultimer を形成しているが、アルドステロン負荷により ENaC γ サブユニットが 85 から 70kD へ molecular weight shift を生じることが報告された。さらに近年、ENaC γ サブユニットの細胞外ループが furin 及び prostasin の二つのセリンプロテアーゼにより切断されることにより、inhibitory peptides が切離され ENaC が活性化されることが明らかになった。そこで私達は食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl S (DS) rat の高血圧発症メカニズムにおける ENaC の関与を明らかにし、その治療法を検討するために以下の実験を行った。

【方法、結果】

DS rat は高食塩負荷で高血圧、腎機能障害を発症する。この時、DS rat は低アルドステロン血症であるにも関わらず、ENaC の γ サブユニットが 85 から 70kD へ molecular weight が変化していた。すなわち高食塩負荷に対し ENaC は奇異的に活性化状態となることが明らかになった。DS rat に対して ENaC の阻害剤であるアミロライドは降圧、腎保護効果を認めたのに対し、選択的アルドステロン拮抗薬であるエプレレノンはこれを認めなかった。過去の報告では DS rat の高血圧に対してエプレレノンが有効であり、その原因として血中アルドステロン濃度が低下しているにもかかわらず組織中のアルドステロン濃度が上昇していることが示唆されている。今回の我々の検討では腎組織中のアルドステロン濃度は血中濃度同様に低下しており、エプレレノンが無効である一因と考えられた。

次に私達は DS rat におけるセリンプロテアーゼインヒビターの効果について検討した。メシル酸カモスタット (CM) は経口投与可能なセリンプロテアーゼインヒビターである。CM は in vitro でリコンビナント prostasin 蛋白の活性を抑制することを証明した。また、CM はマウス集合尿細管細胞における Na 電流を濃度依存的に抑制した。これらの結果から DS rat における降圧効果を期待し CM の投与を行ったところ、明らかな降圧及び腎保護効果を認めた。また CM 投与群では尿中 Na/K 比が上昇しており Na 利尿が生じていることが示唆された。

【結論】

DS rat における食塩感受性高血圧の発症メカニズムには ENaC の奇異的活性化が関与している可能性が考えられた。また CM は DS rat において prostasin の活性を抑制し ENaC の活性化を抑制することにより降圧、腎保護効果を認めたと考えられた。今後、新規クラス降圧薬としてセリンプロテアーゼインヒビターの臨床応用の可能性が期待される。

ヒト腎臓の経細胞性尿酸輸送分子機序：新規尿酸トランスポーター分子 URATv1

安西尚彦

杏林大学医学部薬理学教室

ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素（ウリカーゼ）を欠損しているため、有機酸である尿酸はプリン代謝の最終代謝産物となり、主に腎臓より排泄される。またヒト腎臓には尿酸の再吸収に働く *urate/anion exchanger* が存在するため、腎臓の尿酸輸送は再吸収優位であり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高いことが知られている。このため尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、腎臓の尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる。これらの病態に尿酸トランスポーターが深く関わっていると考えられていたが、長年その分子実体は明らかでなかった。2002年、Enomotoらは腎近位尿細管管腔側膜に存在する尿酸／有機酸交換輸送体である尿酸トランスポーターURAT1 (*SLC22A12*)を同定したが、URAT1により細胞内に取込まれた尿酸が、どのようにして血管側に送られるのか、その機序は未だ不明である。今回我々は、腎近位尿細管基底側に存在する一つのトランスポーター様分子に注目し、それが腎尿細管の尿酸排出路として働く可能性を検討した。同分子はアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた検討により、RI標識尿酸の時間依存性および濃度依存性取込みを示す事 ($K_m, 365 \mu M$)、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、尿酸輸送活性が著明に増加することから、同分子による尿酸輸送が膜電位依存性である可能性が示された。さらに卵母細胞内に注入したRI標識尿酸は時間依存性に排出される特性を示すことから、我々は同分子を電位依存性尿酸トランスポーターURATv1と命名した。腎性低尿酸血症患者の中で、URAT1 (*SLC22A12*)に遺伝子の変異のない患者を選び、ゲノムDNAのシーケンス解析を行った所、URATv1遺伝子の変異を同定した。以上より、URATv1は生理的に、URAT1が管腔内から細胞内に取込んだ尿酸の、基底側での排出経路となる可能性が示唆された。

「Nek8 (NIMA-related kinase 8) と嚢胞性腎疾患」

東京医科歯科大学腎臓内科 蘇原映誠

多発性嚢胞腎は世界で最も高頻度の遺伝性疾患の1つであり、常染色体優性多発性嚢胞腎は400～1000人に1人が罹患し全世界で2300万人もの患者が苦しんでいる。腎臓に尿細管上皮細胞由来の嚢胞が発生して腎実質を圧迫し、腎機能が障害されるというのが本疾患の主な病像である。しかし、その病態生理についてはまだ多くは解明されていないものの、近年多くの嚢胞性腎疾患に関わる蛋白が繊毛へ局在することが報告されつつある。

Nek8(NIMA-related kinase 8)とはserine/threonine kinaseであり、jckマウスという常染色体劣性多発性嚢胞腎モデルマウスにおける嚢胞発生の原因が、このNek8の変異であることが報告されたが、Nek8の機能についてはよくわかっていない。我々はこのjckマウスを用いて、Nek8の局在や他の嚢胞性腎疾患に関わる蛋白とNek8の関連についての検討を行った(J Am Soc Nephrol 2008)。

腎臓においてNek8は細胞質内のみならず、他の嚢胞性腎疾患の原因蛋白と同様に腎集合管細胞の繊毛に局在し、それも繊毛の近位側に限局していた。事実、jckマウスにおける嚢胞は集合管由来であり、繊毛の嚢胞発生における重要性を示すものであった。

さらに共同免疫沈降によって、Nek8と多発性嚢胞腎の原因蛋白でTRPチャネルファミリーの一員であるPolycystin-2(PC2, TRPP2)との相互作用が確認され、Nek8変異によるjckマウスの嚢胞発生にPC2が関係している可能性が考えられた。そこで、JckマウスにおけるPC2を確認すると、発現増加と過剰なリン酸化を認め、同時に腎臓の免疫染色にてPC2の繊毛への局在が強くなっており、PC2のリン酸化が繊毛への局在に影響している可能性を示唆した。

このNek8の変異が若年性ネフロン瘦という嚢胞性腎疾患において発見され(J Am Soc Nephrol 2008)、我々の検討と本疾患のpathogenesisについて考察を加えて報告する。

特定味覚情報を伝導する神経回路の発生工学的トレーシングと細胞機能の解析

杉田 誠^{1,2}

¹広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座(口腔生理学)

²PRESTO, JST

本研究では特定の味覚情報を伝導するニューロン群の脳内での回路様式を、トランスジェニックマウスの作製を通して可視化することを試みた。マウスにおいて特定味覚受容体を発現する味細胞に、シナプス間を移動するトレーサータンパク質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ、トレーサーにより標識される脳内ニューロンの局在を前頭断連続切片より検出した。そして前頭断連続切片像の三次元立体再構築を行うことにより、特定味覚情報を伝導する脳内神経回路を可視化した。甘味/うま味受容味細胞から輸送された tWGA-DsRed を受けとるニューロン群と、苦味受容味細胞からの入力を受けるニューロン群に分離がみられ、味覚識別をおこなう脳内神経機構の一端が示された。延髄弧束核内において、苦味受容味細胞から移行した tWGA-DsRed を保有する苦味伝導路構成ニューロンは、甘味/うま味受容味細胞から移行した tWGA-DsRed を保有する甘味/うま味伝導路構成ニューロンに比べ、後方に分離して集積した。延髄弧束核領域の脳スライス標本中で tWGA-DsRed により標識されたニューロンに Lucifer Yellow を注入することによりその樹状突起構造を可視化したところ、延髄弧束核内の苦味伝導路構成ニューロン中には、樹状突起を rostral 側に伸張するニューロン、caudal 側に伸張するニューロン、rostral・caudal 両側に伸張するニューロンが分類観察された。延髄弧束核内の tWGA-DsRed 標識ニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した結果、延髄弧束核内の苦味伝導路構成ニューロンは tyrosine hydroxylase を発現するカテコールアミン作動性ニューロンであることが示唆された。

肺癌組織における水チャンネル（アクアポリン）発現の研究

金沢医科大学呼吸機能治療学（呼吸器外科学）佐久間勉

はじめに：アクアポリン（AQP）1は肺血管内皮細胞に、AQP3は肺胞II型上皮細胞と気管支上皮細胞に、AQP5は肺胞I型上皮細胞と円柱細胞に多く発現する。近年AQPは肺水分バランス以外の働きがあることが注目されている。我々は肺癌組織におけるAQPの発現を研究したので報告する。

方法：45症例の切除肺癌を対象とした。組織型は腺癌27例（細気管支肺胞上皮癌14例、高分化腺癌4例、低分化腺癌10例）、扁平上皮癌10例、大細胞癌4例、小細胞癌4例であった。免疫組織学的にAQP1、3、5の発現を測定し、Laser-Capture Microdissection法を用いて採取した肺癌組織でmRNAの発現を測定した。

結果：AQP1は粘液産生性細気管支肺胞上皮癌と高分化腺癌に発現が強かった。AQP3は粘液非産生性細気管支肺胞上皮癌と扁平上皮癌に発現が強かった。AQP5は粘液産生性細気管支肺胞上皮癌と高分化腺癌に発現が強かった。mRNAの発現は免疫組織学的な発現を裏付ける結果であった。

結論：AQP1、3、5の発現は肺癌の病理組織型で違いがある。

マウス耳下腺腺房細胞膜の水透過性の解析

Water permeability of parotid acinar cell membrane of mouse

Y. Seo¹, K. Satoh², Y. Imaizumi¹, M. Yokoi¹, M. Matsuki², H. Sugiya²

¹ Dept. of Regulatory Physiology, Dokkyo University School of Medicine

² Dept. of Physiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

The diffusive water permeability of isolated mouse parotid acinar cells was measured by ¹H nuclear magnetic resonance relaxation method using an extracellular relaxation reagent, gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid (Gd-DTPA). The rate constant for water efflux from the acinar cell suspension was estimated to be ca. 5 s⁻¹ at 29°C which would be consistent with diffusive water permeability (P_d) of ca. 1.4×10^{-3} cm s⁻¹. This value is the same range of those obtained in perfused rat submandibular gland (3×10^{-3} cm s⁻¹), *Necturus* gallbladder (1.6×10^{-3} cm s⁻¹) and human red blood cells (2.4 to 4.7×10^{-3} cm s⁻¹). Activation energy of water transport through the cell membrane (E_a) was estimated from temperature dependence (5–30°C) of the rate constant for water efflux. From the slope of Arrhenius plot, E_a value is estimated to be 4.6 ± 0.6 kcal/mol. This activation energy is much smaller than that obtained in the lipid bilayer vesicles (12–14 kcal/mol), and is the same range of red blood cells with AQP1 ($E_a = 5$ kcal/mol). Thus, this indicates that water transport of acinar cells should be done by a channel-mediated pathway, and suggests contribution of AQP5. A potential inhibitor of AQP5 water channel, HgCl₂, was applied to the acinar cells. The acinar cells are so sensitive to the presence of HgCl₂. After counting trypan-blue uptake of cells with various concentration of HgCl₂, we choose 50 μM of HgCl₂ since more than 50% of cells could survive in this concentration. The rate constant for water efflux from the cells did not change significantly, but only a tendency to decrease. Since 50 μM of HgCl₂ is a half of 100 μM used for perfused rat submandibular gland, it is possible that Hg²⁺ did not reach the effective concentration to inhibit AQP5. We are now under preparation to measure E_a value of acinar cells with HgCl₂.