

論文内容の要旨

論文題目「ウナギの新規グアニリンファミリーとその浸透圧調節作用」 (Osmoregulatory Functions of a Novel Guanylin Family)

氏名 弓削 進 弥

海産真骨魚類(以下海水魚と記す)は、体液浸透圧が環境海水よりも低い(約 1/3)ため、常に脱水される危険にさらされる。浸透圧差で体内から受動的に失われる水分を補うために、海水魚は海水を盛んに飲み、そのほとんど全ての水分を塩分とともに腸で吸収する。よって、過剰な塩分を捨てる役割を果たす鰓と同様、海水魚の腸も、水とイオンを吸収するために極めて重要な浸透圧調節器官である。私は、腸で産生され、腸での水や NaCl の輸送調節を行うことが哺乳類で知られているホルモン、グアニリンファミリーが、海水魚の腸での水やイオンの吸収調節に深く関与していると予想し、本研究に取り組んだ。実験材料として、淡水海水双方で生息できる高い浸透圧能力を備える広塩性魚類のウナギを用いた。またウナギは、腸の形態や機能を環境塩分変化に応じて素早く変化させるため、腸のホルモンを研究する上で非常に有用だと考えた。

修士課程で私は、ウナギの腸と腎臓で、哺乳類で知られているグアニリン、ウログアニリンの他に、第 3 のグアニリンとして、他の脊椎動物では知られていないレノグアニリンを同定し、そのうちグアニリンとウログアニリンの遺伝子発現が、淡水ウナギに比べ海水ウナギの腸で有意に上昇することを示した。博士課程では、引き続きそれらの機能を調べるために、まずホルモンの作用部位に必ず存在する受容体の研究から行なった。さらに、海水魚の腸でのイオン輸送に対するグアニリンファミリーの作用を、

Ussing chamber を用いて電気生理学的に解析し、ウナギで同定した新規グアニリンファミリーの浸透圧調節作用を調べた。

哺乳類では、2種のグアニリンは同じ1つの受容体、膜貫通型グアニル酸シクラーゼC(GC-C)受容体に結合することが知られている。しかし私は、ウナギの腸と腎臓から、2種のGC-C cDNA をクローニングし、それぞれGC-C1、GC-C2と名付けた。アミノ酸配列、および4つの主要領域(細胞外、膜貫通、キナーゼ様、シクラーゼ触媒領域)とC端テール配列からなる基本構造は、他の脊椎動物で知られているGC-Cとよく似ていた。また、分子系統解析からも、クローン化した2種の遺伝子は、他の種のGC-Cと同じグループに属し、他のGC型受容体とは異なる場所に位置することが示された。培養細胞COSで発現させた2種のGC-Cに、3種の合成ウナギグアニリンを投与すると、どのリガンドも $10^{-8}/10^{-7} \sim 10^{-5}$ Mの間で用量依存的なセカンドメッセンジャーcGMPの産生が見られた。有意なcGMP産生を引き起こす最小濃度でリガンドの効力を比較すると、GC-C1では、ウログアニリン>グアニリン \geq レノグアニリン、GC-C2では、グアニリン \geq レノグアニリン>ウログアニリンであった。これらの結果より、2種のウナギGC-Cは機能的グアニリン受容体であり、両者でリガンド選択性に違いがあることが示された。リガンド選択性の違いは、2種のGC-Cのアミノ酸配列の保存性が、細胞内領域(74-90%)に比べリガンドが結合する細胞外領域で低い(53%)事実と一致する。以上より、魚類のグアニリン系には哺乳類よりも多数のホルモンと受容体が存在することが示され、その多様な関係を哺乳類以外で初めて明らかにすることができた。

2種のウナギGC-C遺伝子は、ホルモンと同様、主に消化管(食道、胃、腸)と腎臓で発現が検出されたため、3種のウナギグアニリンは、産生器官で局所的に作用している可能性が示唆された。さらに2種のGC-C遺伝子は、グアニリン、ウログアニリン遺伝子と同様、淡水ウナギに比べ海水ウナギの腸で有意に発現が上昇していた。しかしその上昇は淡水から海水に移行後24時間以内では起こらなかったため、環境塩分濃度の変化に対する反応は、ホルモン遺伝子よりも遅いことが分かった。以上より、グアニリン系は特に海水ウナギの腸で重要な働きをしていることが示唆された。

そこで、海水ウナギの腸でのグアニリンファミリーの役割を調べるために、腸を前腸、中腸、後腸の3部位に分け、Ussing chamberを用いて、合成ウナギグアニリンの作用を短絡電流値(I_{sc})の変化で調べた。chamberにセットし膜の両側を同じリンガー溶液で満たし、粘膜側電位を0とした場合、前腸は漿膜側正(+)、中腸と後腸は漿膜側負(-)の経上皮膜電位を示し、また、後腸は前腸の約4倍、中腸の約8倍の電氣的膜抵抗を示したため、腸の部位による機能の違いが予想された。漿膜側投与では、どの部位に対してもどのグアニリンも有意な反応が見られなかったため、以降全て粘膜側投与で実験を行った。その結果、前腸ではほとんどの個体で3種のグアニリンによる I_{sc} 変化は見られなかったが、中

腸と後腸では、3種のグアニリンは、いずれも $10^{-8} \sim 10^{-6}$ M で用量依存的に I_{sc} を減少させ、高濃度では I_{sc} の流れを逆転させた。また、電気的膜抵抗の総変化は、中腸で 60%程度、後腸で 40%程度の減少を示した。これらにより、ウナギの腸では2種の GC-C 受容体は粘膜側に存在することが示された。さらに、 I_{sc} の正負逆転と膜抵抗の減少の結果から、グアニリンファミリーが、起電性のチャネル/輸送体に作用し、そのゲートを開き、そこを通るイオンの流れを増加させ、その結果全体的なそのイオンの流れの方向が逆転したと予想された。

全体の I_{sc} 減少の 50%減少を引き起こす濃度 (ID_{50}) をホルモン作用の強さとして表したところ、中腸では3種のグアニリン間に有意な差は見られなかったが、後腸では、グアニリンが、ウログアニリンとレノグアニリンの 1/2 以下の ID_{50} を示し、作用が有意に強かった。また、中腸と後腸でそれぞれのグアニリンの ID_{50} を比較したところ、中腸は後腸の 1/4 ~ 1/10 以下を示し、3種のグアニリンはいずれも後腸より中腸で強く作用することが示された。これらは、2種の GC-C 受容体の発現が、腸の後方より前方に多く、また後腸では、GC-C1 に比べ、グアニリンが一番強い cGMP 産生能を示す GC-C2 の発現の方が 10 倍近く高かったことと一致すると考えられる。なお、本生理実験では、他のグアニリンと異なり環境塩分変化による遺伝子発現の変化が見られなかったレノグアニリンも、他のグアニリンと同様な結果を示しており、特別な違いを示さなかった。

次に、最も作用が強く見られた海水ウナギの中腸で、グアニリンを代表として、海水魚の経腸上皮イオン輸送に関与するイオンチャネルや輸送体の阻害剤を用い、グアニリンが調節する標的を調べた。その結果、 Cl^{-} チャネルのうち特に CFTR を強く阻害する NPPB、あるいは NKCC を阻害する bumetanide が粘膜側に存在する状態では、グアニリンによる I_{sc} 減少が著しく阻害された。同じく粘膜側に $Na^{+}-Cl^{-}$ 共役輸送体 (NCC) の阻害剤 HCTZ、 Cl^{-}/HCO_3^{-} 交換体の阻害剤 DIDS、上皮型 Na^{+} チャネルの阻害剤 amiloride がそれぞれ存在しても、グアニリンによる I_{sc} の変化に影響はほとんど見られなかった。NPPB と DIDS は、漿膜側存在下での実験も同様に行なったが、グアニリンの作用に影響を示さなかった。これらにより、海水ウナギの腸上皮の粘膜側には CFTR 様チャネルが存在し、いっぽう漿膜側の Cl^{-} チャネルは NPPB に非感受性の、CFTR とは異なるタイプのものが存在することが示唆された。さらに膜抵抗が減少したことから合わせると、グアニリンは、粘膜側のそのチャネルを直接調節し活性化させている可能性が示唆された。しかし NKCC に対しては、直接の作用かどうかは不明である。

以上より、グアニリンファミリーは、海水ウナギの中腸で粘膜側 CFTR を介した Cl^{-} 排出を促進することが示唆された。排出された Cl^{-} は、再び、NKCC や NCC によって吸収されると考えられるが、特に水を引っ張る強力な駆動力を発生させる NKCC は、吸収において Na^{+} に対し 2 倍の Cl^{-} を必要とするため、このような管腔側への Cl^{-} の補給は重要だと予想される。また、近年、CFTR は Cl^{-} だけでなく HCO_3^{-} も同

様に通すチャネルであることが証明されており、グアニリンによる CFTR を通じた重炭酸排出作用も予想される。同じく近年、海水魚の腸で盛んに排出される重炭酸は、腸内の pH 維持だけでなく、飲む海水に一定量含まれるが、腸で 10%程度しか吸収されずに残る Ca^{2+} や Mg^{2+} を重炭酸塩 (CaCO_3 や MgCO_3) として沈殿させ、腸内の浸透圧上昇を防ぐ役割があることが強く示唆されている。特に海水魚の中腸～後腸にかけては、腸内溶液の浸透圧が体液と等張であることで水吸収が盛んに起こる。よって、その部位で I_{sc} 変化を示したグアニリンファミリーは、重炭酸排出の調節に関与している可能性が示唆される。また、重炭酸排出という点では、グアニリンの作用により排出された Cl^- が、NKCC だけでなく、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換体によっても吸収され、さらにこの交換体による HCO_3^- 排出も促進されると予想される。なお、中腸でのこれらの作用は、 I_{sc} や膜抵抗の変化が似た傾向を示した後腸でも本質的には同様だと予想される。

本研究により、ウナギは、3 種のホルモンと 2 種の受容体からなる多様化したグアニリン系を持つことが示された。さらにグアニリンファミリーは、腸の中後半部位で、粘膜側の CFTR を活性化し、 Cl^- と HCO_3^- を排出させることで水の吸収を促進し、ウナギの海水適応を促進させることが示唆された。

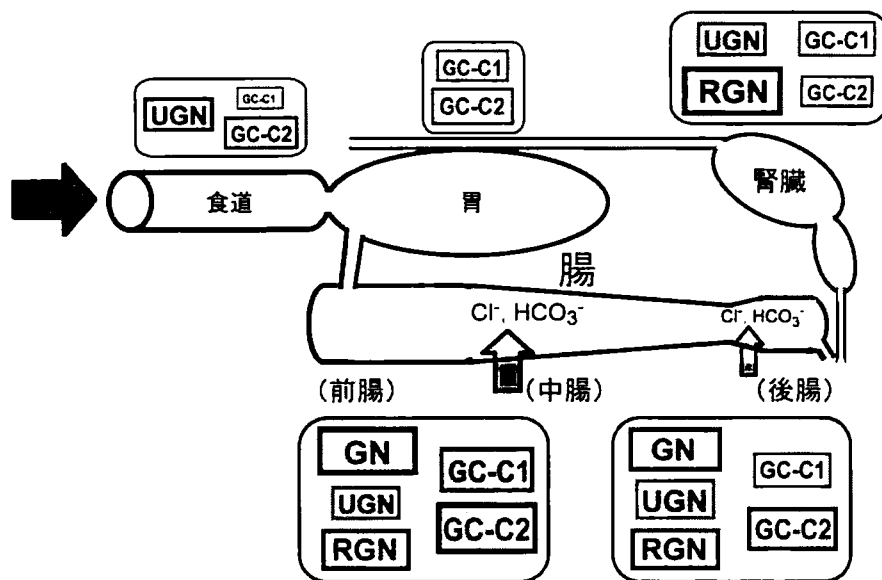


図. ウナギのグアニリン系のまとめ

GN: グアニリン、UGN: ウログアニリン、RGN: レノグアニリン、GC-C: グアニル酸シクラーゼ C 受容体。□の大きさは相対的な遺伝子発現レベルを示す。■(灰色)の遺伝子は、淡水ウナギに比べ海水適応ウナギで有意に発現が上昇する。