

### 9537 体液塩バランスにおける大腸の役割

助成研究者：鈴木 裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部）

消化管における水電解質の吸収や分泌は、消化や栄養補給といった栄養生理学的な側面のみならず、特に大腸では、腎臓と並んで体液バランス調節にも大きく寄与していると考えられている。今回は、起電性Na吸収についてその調節メカニズムを、Ussing chamberを用い短絡電流測定により検討した。

アルドステロン処理をしたモルモットの遠位大腸を用い、cAMPによる調節に関し検討した。8BrcAMP(0.3mM, 漿膜側投与)は、短絡電流を初期に低下させ(15-30分で最低値に)その後次第に上昇させた。1-2時間後には、わずかながら8BrcAMP投与前のレベルより高い値となった。アデニル酸シクラーゼを活性化させるForskolin(1 $\mu$ M, 漿膜側)でも同様の効果があった。 $\beta$ アドレナリン作動薬のIsoproterenol(1 $\mu$ M, 漿膜側)も同様な変化を引き起こした。何れの効果も、管腔側amiloride(0.1mM)存在下では殆ど消失したことから、起電性Na吸収活性は、cAMPにより初期に抑制されその後活性化されると考えられる。次にA-kinaseの関与を検討するため、非特異的Kinase阻害剤のK252a(1.87 $\mu$ M, 管腔側+漿膜側)で前処理した大腸で検討したところ、8BrcAMPに対する起電性Na吸収の反応は消失した。更にPhosphatase阻害剤のOkadaic acid(0.1 $\mu$ M, 管腔側+漿膜側)で前処理した大腸では、8BrcAMPによる初期のNa吸収抑制反応は増強されたが、後期の促進反応は消失した。以上の結果を説明できる仮説は、1) A-kinaseによるリン酸化反応が起電性Na吸収調節に関与し、初期の抑制を引き起こす。2) リン酸化反応は同時にPhosphataseを活性化し後期の促進効果を引き起こす。

一般にcAMP系の活性化は大腸での分泌を亢進し、吸収を抑制することが知られている。今回見られた後期の促進効果がどのような生理的意味を持つのかさらに検討する必要がある。



## 9537 体液塩バランスにおける大腸の役割

助成研究者：鈴木 裕一 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

### 【目的】

小腸から大腸へはかなりの量のNaが流入する。この大部分は大腸上皮より再吸収され糞便へのNa排泄はわずかである。大腸でのNa吸収は、大腸上皮頂側膜にあるNa/H 交換輸送とアミロライド感受性のNaチャンネルを介した2つの機構で行われている。何れの場合も側底膜のNa,K-ATPaseが吸収を支えている。Na/H交換輸送は、基本的に大腸全長にわたって存在し、大腸で再吸収されるNaの大部分の吸収になっている。一方、Naチャンネルを介するNa吸収は起電性であり、大腸後半部で発達している。この大腸起電性Na吸収は体液Naバランスの調節に、腎臓を補助する形で、一定の役割を果たしていると考えられる。なぜなら、Na貯留ホルモンである電解質コルチコイド(アルドステロン)で吸収活性が著明に増大し、この時同時に糞便中へのNa排泄も低下することがよく知られているからである(1, 2)。

様々な生理活性物質が、例えば大腸壁内に分布している壁内神経、粘膜内の血管内皮細胞、免疫細胞、繊維芽細胞などから放出され、大腸水電解質の吸収や分泌の制御にあずかっていることが知られている。この中で、大腸Na/H逆輸送によるNa吸収や、ClやKイオン分泌活性調節に関しては比較的よく検討されてきているが、体液Naバランスに一定の役割を果たしている上記の大腸起電性Na吸収の調節に関しては、アルドステロンによる活性上昇はよく知られているものの、その他の活性物質の関与に関しては殆ど知られていなかった。我々はこれまでモルモット遠位大腸を用い、起電性Na吸収の調節について検討を始め、これまでコリン作動性神経やATP(細胞外)更にVasopressinによる抑制効果の存在を明らかにしてきた(3)。

今回、細胞内cAMP(及び一部のcGMP)関連の起電性Na吸収調節機序について若干の検討を加えた。なお起電性Na吸収活性は、短絡電流(Isc)測定により行った。短絡電流測定は間接的な方法ではあり、また詳細な細胞メカニズムを直接検討

するには向いていないが、全体的に現象を観察することが出来るので、調節機構解析の最初の段階として有効なアプローチであると考えられる。

#### 【研究方法】

体重250-800gの雄モルモットより摘出した遠位結腸を使用した。実験は、起電性Na吸収を促進させる目的でaldosteroneを投与し高アルドステロン症にした動物を用いて実験を行った。aldosterone (1.39 mM in saline) を実験前日夕方背皮下に、さらに当日朝方大腿筋中に0.75ml/g体重だけ注射した。朝方注射後3-4時間経過した後、撲殺、直ちに正中切開し遠位大腸を摘出した。摘出した腸は速やかに切り開き、アクリル板上で2枚のスライドガラスを用いて粘膜を粘膜下層より剥離し、Ussing型のチャンバーに装着した。

標本は、窓の面積0.5cm<sup>2</sup>のチャンバーの間に挟み、リンゲル液10mlを入れた。短絡電流 (I<sub>sc</sub>) は短絡電流測定装置 (CEZ9100, 日本光電) により測定した。全ての実験において、内因性プロスタグランジン産生の影響を避ける目的でtetrodotoxin(TTX) 0.3μM, 及び大腸に存在するCl及びKイオン分泌活性を抑える目的でbumetanide 0.1mMを何れも漿膜側に加えた。

#### 【研究結果】

8Br-cAMP (0.3mM)を漿膜側に投与すると短絡電流 (I<sub>sc</sub>) は初期に低下し約30分後でもっとも低い値となった。その後次第に上昇し、タイムコントロールと比較してより大きな値になった (Fig. 1)。管腔側にamiloride (0.1mM)存在下では、I<sub>sc</sub>は殆どゼロとなり、この条件下での8Br-cAMP処理は一過性のわずかなI<sub>sc</sub>上昇を認めるのみであった (Fig1)。従って、8Br-cAMPによるI<sub>sc</sub>変化の大部分はamiloride感受性起電性Na吸収活性を反映しており、このNa吸収活性が8Br-cAMPにより二相性に制御されることが示唆された。

Adenylyl cyclaseを活性化するforskolin(1 μM) の漿膜側投与によっても8Br-cAMPによるのと基本的に同様の反応が見られた。即ち、amiloride感受性のI<sub>sc</sub>が初期で抑制され、後期では亢進を示した (Fig. 2)。

Adenylyl cyclaseとカップルしていることの知られているβアドレナリン作動薬isoproterenol(1μM)の漿膜側投与の効果を検討したところ、8Br-cAMPや

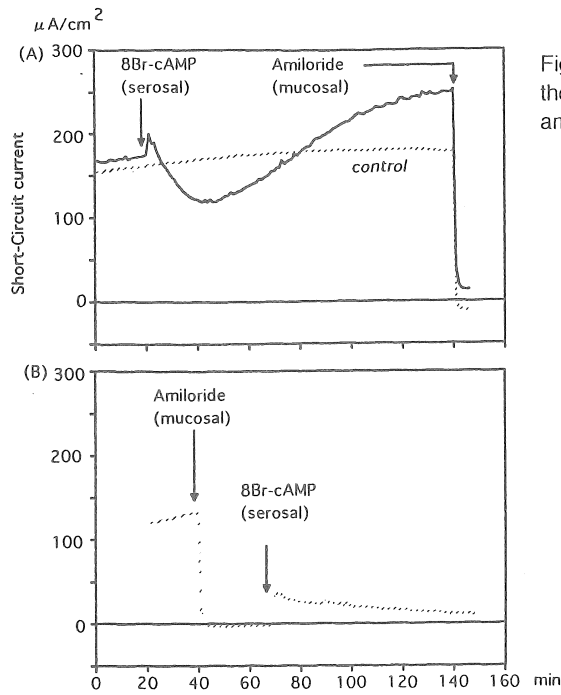


Fig. 1 Effect of 8Br-cAMP on I<sub>sc</sub> in the absence and the presence of amiloride.

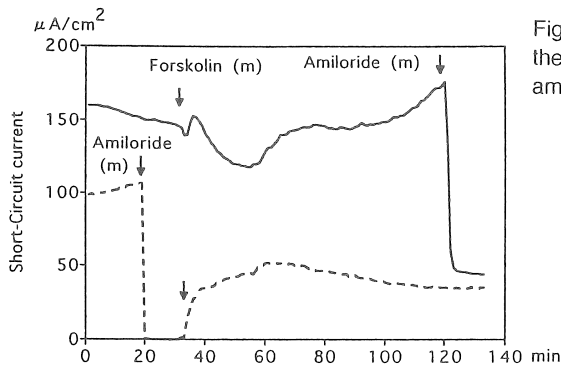


Fig. 2 Effect of forskolin on I<sub>sc</sub> in the presence and absence of amiloride.

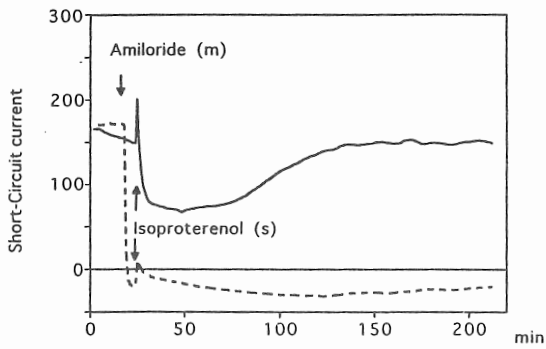


Fig. 3 Effect of isoproterenol on I<sub>sc</sub> in the presence and absence of amiloride.

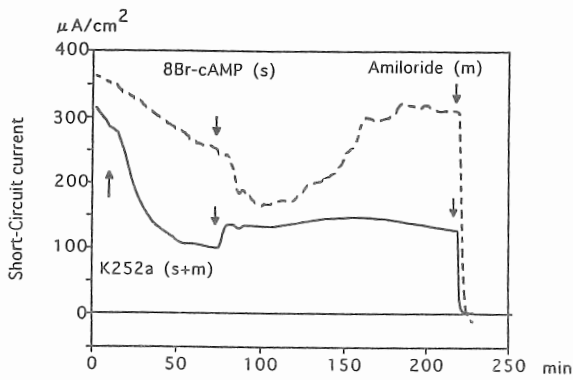


Fig. 4 Effect of K252a on the 8Br-cAMP-induced I<sub>sc</sub> changes.

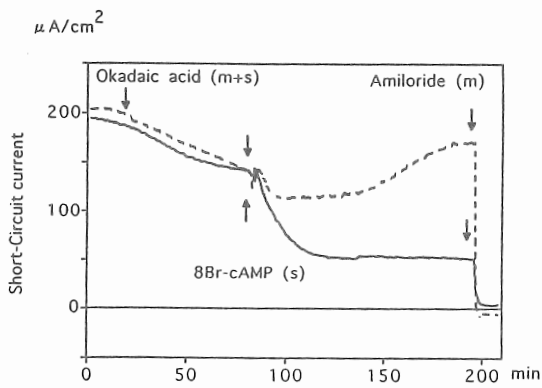


Fig. 5 Effect of okadaic acid on the 8Br-cAMP-induced I<sub>sc</sub> changes.

forskolinと基本的に同様の、amiloride感受性Iscの初期抑制と後期促進（この効果はやや弱かった）の二相性変化を引き起こすことが明らかになった(Fig. 3).

以上の結果より、adenylyl cyclaseの活性化により細胞内に上昇したcAMPが、起電性Na吸収活性の二相性変化、即ち、初期の抑制と後期の亢進を引き起こすことが示された。

次に、このcAMPの効果が直接的なのか、蛋白リン酸化酵素を介して間接的に起こるのか、ついて検討した。cAMP依存性蛋白リン酸化酵素、cGMP依存性蛋白リン酸化酵素、Ca依存性蛋白リン酸化酵素等蛋白リン酸化酵素に対する非特異的阻害剤であるK252a (1.87 $\mu$ M, 管腔側+漿膜側)前処理により、8Br-cAMPによる効果は、抑制、亢進何れの相も基本的に消失した(Fig. 4).

Protein phosphatase阻害剤のokadaic acidの効果を次に検討したところ、okadaic acid (0.1 $\mu$ M, 管腔側+漿膜側)前処置により、8Br-cAMPによる初期の抑制相はその抑制がより著明になった。これに対し、後期の亢進相はokadaic acidにより基本的に消失した(Fig. 5).

もう一つのcyclic nucleotide系の情報伝達物質である8Br-cGMPの効果も検討してみた。8Br-cAMP同様8Br-cGMP()もamiloride感受性Iscを初期に抑制し、後期に亢進した(Fig. 6).

#### 【考察】

大腸起電性Na吸収の活性制御におけるcAMPの役割を短絡電流測定により検討した。その結果、cAMPは起電性Na吸収を初期に抑制し、後期に亢進することが示された。cAMPの何れの効果も蛋白リン酸化酵素を介して起こることも示された。おそらくcAMP依存性蛋白リン酸化酵素が関与している可能性が高いが、今後はより特異性の高い蛋白リン酸化酵素阻害剤を用いて確認する必要がある。

Protein phosphatase阻害剤のokadaic acidにより初期の抑制相はより大きくなった。この結果は、蛋白リン酸化酵素活性化を介してリン酸化されたある蛋白が初期抑制に関わっていることと一致する。okadaic acidはこの蛋白の脱リン酸化（抑制効果の不活性化）を抑えることによりその抑制効果を大きくしていると説明できる (Fig 7, right)。一方後期相はokadaic acidで抑制された。これは一見すると、蛋白リン酸化酵素阻害剤の効果（同じく後期相を抑制）と矛盾する。一つの説明は、cAMPにより活性化された蛋白リン酸化酵素がphosphatase自体を（おそら

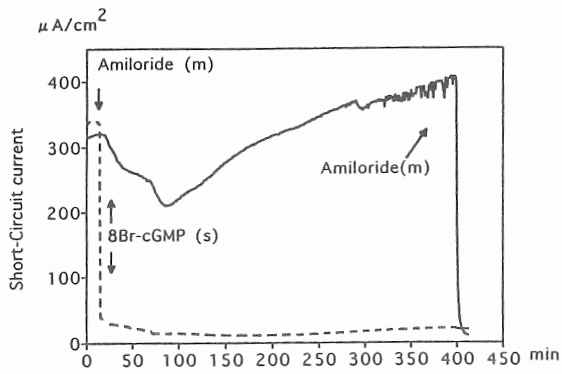


Fig. 6 Effect of 8Br-cAMP on Isc in the absence and presence of amiloride.

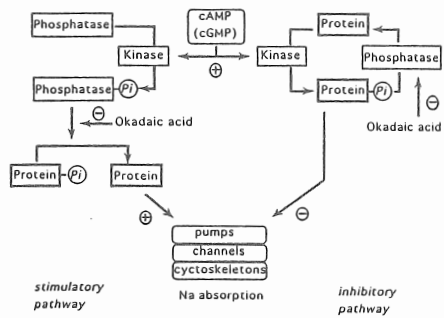


Fig. 7 Model for regulation of Na absorption in the colon by cAMP.



くリン酸化を介して) 活性化し, それが何らかの過程 (おそらくphosphataseによるある蛋白の脱リン酸化) を経て後期のNa吸収増加を引き起こす, というものである(Fig. 7, left).

#### 【今後の課題】

上皮イオン輸送はどの場合も, 幾つかのチャネル, トランスポータ, ポンプの共同作業で起こる(4). 起電性Na吸収は, 少なくとも, 頂側膜のamiloride感受性Naチャネル, 側底膜のNa,K-ATPaseとKチャネルの3者が関与する. またこれらの輸送体は多くの場合に細胞骨格系とも深く関わっている. 今後, cAMPによるNa吸収制御の細胞メカニズムを明らかにする際には, これらの関与する構成要素がどのように制御されているのかを分子レベルで明らかにする必要がある (Fig. 7, bottom)

#### 【文献】

- 1) Chang, EG and Rao, MC. Intestinal water and electrolyte transport. In Physiology of the Gastrointestinal tract, edited by LR Johnson, Raven Press, New York, 1994, pp2027-2081.
- 2) Binder, HJ and Sandle, GI. Electrolyte transport in the mammalian colon. In Physiology of the Gastrointestinal tract, edited by LR Johnson, Raven Press, New York, 1994, pp2133-2171.
- 3) 鈴木裕一, 林久由 体液遠バランスにおける大腸の役割. 平成6年度助成研究報告書, ソルトサイエンス研究財団 1996, pp135-142.
- 4) Schultz, SG and Hudson, RL. Biology of sodium-absorbing epithelial cells. In Handbook of Physiology, sec 6, The gastrointestinal System, edited by SG Schultz, M Field, and RA Frizzell, American Physiological Society, Bethesda, 1991, pp45-81.

## Role of large intestine in regulation of salt balance

Yuichi Suzuki

Lab. of Physiol., Sch. of Food and Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, Shizuoka

### Summary

There is an amiloride-sensitive, electrogenic Na absorption in the distal colon, which is activated by a mineralocorticoid, aldosterone. The purpose of this study was to examine the role of cAMP in regulation of the electrogenic Na absorption in the colon. To this end, we measured short-circuit current (Isc) in hyperaldosteronic guinea pig distal colon mounted in Ussing chamber. In the presence of bumetanide in the serosal solution to inhibit electrogenic K and Cl secretion, 8Br-cAMP (0.3 mM) added to the serosal side caused a biphasic Isc responses: Isc decreased initially and reached bottom (60-79% of the baseline level) 20-40 min after the addition, and then increased gradually to the level above the baseline. A similar biphasic response was observed when forskolin (1mM), an activator of adenylyl cyclase, or isoproterenol (1mM), a beta-adrenergic agonist, was added to the serosal side. All of these biphasic Isc responses were virtually abolished when tissue was treated with mucosal amiloride, indicating that they are mostly reflecting the change in the amiloride-sensitive, electrogenic Na absorption. The biphasic changes in electrogenic Na absorption induced by 8Br-cAMP were both mostly abolished by a nonspecific protein kinase inhibitor K252a. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, enhanced the initial inhibitory effect, but abolished the late stimulatory effect of 8Br-cAMP on the electrogenic Na absorption. Conclusion: cAMP initially inhibits and then stimulates the electrogenic Na absorption through the activation of protein kinases. Protein phosphatase may also play a role in regulation of Na absorption by cAMP.