

9731 新たな水・電解質代謝調節ペプチド guanylin family peptides の  
体液調節に関する基礎的・臨床的研究

助成研究者：中里 雅光 (宮崎医科大学 第三内科)

要旨

uroguanylinは、グアニレートシクラーゼ結合C型受容体(GC-C)に対する内在性リガンドとして、哺乳類の腸管と尿から最近、単離されたペプチドである。われわれはuroguanylinに特異的な抗体を作製し、その構造解析・定量法ならびに免疫組織化学的手技を確立した。

uroguanylinは、胃、上部小腸に加え、腎臓、肺、膵臓にも発現し、その血漿濃度は、心不全患者で、重症度に従い増加していた。

uroguanylinはNaCl負荷により、腸管での遺伝子発現と分泌並びに尿中への排泄量が著増することから、NaCl代謝調節に関し、腸管-腎臓連関を結びつける内分泌性因子

(intestinal natriuretic factor)である可能性があり、病態生理との関連が注目される。



## 9731 新たな水・電解質代謝調節ペプチド guanylin family peptides の 体液調節に関する基礎的・臨床的研究

助成研究者：中里 雅光 (宮崎医科大学 第三内科)

### ① 研究目的

グアニレート (GC)結合型受容体にはGC-A, GC-B, GC-Cの3種類があり、前2者には心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)とその同族ペプチドであるBNP, CNPが結合し、水・Naの再吸収抑制と排泄促進ならびに血管トーンスや血管内皮増殖の調節に関与している。GC-C受容体は腸管、腎臓、副腎、膵臓、気道、中枢神経系に存在し(1)、その内在性リガンドは共通した2個のS-S結合を持つuroguanylin (16アミノ酸残基)とguanylin (15アミノ酸残基)であることが、1993年以降明確にされてきた(2)(3)。uroguanylinとguanylinは細胞内情報伝達物質としてcyclic GMP産生を促進し、腎臓と消化管での水・Naの吸収抑制とCl分泌を齎らす。両ペプチドの腸管での作用は細菌性下痢のメカニズムと同一であり、その原因となるエンテロトキシンと47%のアミノ酸相同性を有する。uroguanylinとguanylinは50%のアミノ酸相同性を示し、その構造や生理作用の共通性から1つのペプチドファミリーを形成している。これまでにわれわれは、ヒトとラットのguanylinの構造解析、定量法、組織含量、体内分布、構造機能相関ならびに遺伝子発現について報告してきた(4)(5)(6)(7)。

uroguanylinの基礎的・臨床的意義を明らかにするために、RIA(感度 0.2 fmol)による定量法、アミノ酸配列解析と質量分析による内在性分子型の構造決定、cyclic GMP産生能、ヒトとラットのuroguanylinのcDNA と遺伝子の塩基配列解析、uroguanylinの細胞局在と遺伝子発現について検討した。

### ② 研究方式

既知のヒトuroguanylin-16のN端とC端のアミノ酸に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ヒト結腸のcDNAライブラリーよりuroguanylin cDNAをクローニング後、塩基配列を決定した。得られたヒトuroguanylin cDNAの塩基配列を基にmix primerを作成し、cDNA cloningおよび塩基配列解析を行った。ラットuroguanylin cDNAについても同様の手法でcDNAクローニングを行った。Northern blot解析とRT-PCRを用い、各組織におけるuroguanylinとguanylinの遺伝子発現を検索した。

|            | 1   | 15 | 前駆体蛋白の<br>アミノ酸残基数 |
|------------|---|----|-------------------|
| ヒトグアニリン    | Pro-Gly-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys | 15 | 115               |
| ラットグアニリン   | ----Ala-----  |    | 115               |
| ヒトウログアニリン  | Asn-Asp-Asp-----Leu----Val-Asn-Val-----Leu                  |    | 112               |
| ラットウログアニリン | Thr-Asp-Glu-----Leu----Ile-Asn-Val-----                     |    | 106               |
| エンテロトキシン   | Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-----Leu----Cys-Asn-Pro-----Ala-----Tyr  |    |                   |

図1. ヒトとラットのグアニリンとウログアニリンのアミノ酸配列および大腸菌エンテロトキシンとの相同性。----- はヒトグアニリンと同一アミノ酸を、 $\square$  はS-S結合を示す。ヒトウログアニリンのみは16アミノ酸残基より成り、15位のシステインのC端にロイシンが付加されている。グアニリンは-1、ウログアニリンは-3の酸性ペプチドである。プレプロ前駆体蛋白のアミノ酸残基数を右端に示している。

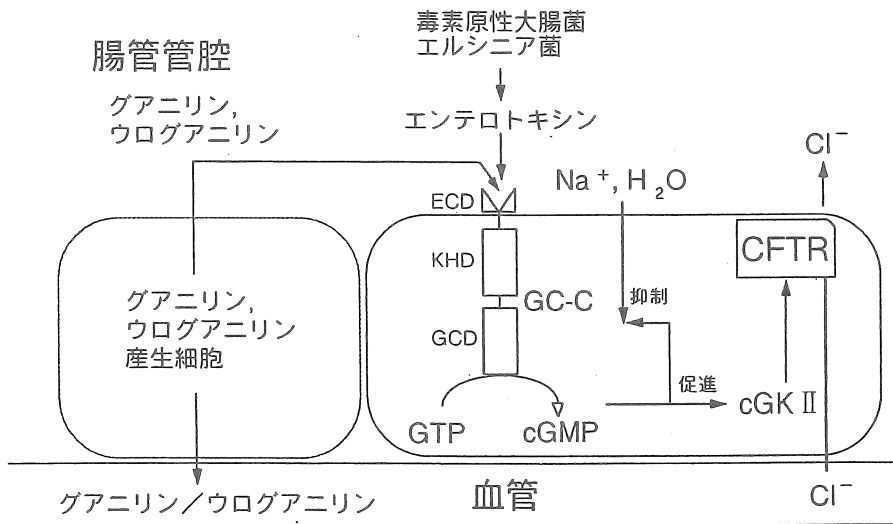


図2. 腸上皮細胞におけるグアニリンファミリーペプチド産生細胞と標的細胞との関係。グアニル酸シクラーゼ結合C型受容体(GC-C)は膜1回貫通型受容体で、グアニリンファミリーペプチドやエンテロトキシンが結合する細胞外ドメイン(extracellular domain:ECD)、プロテインキナーゼ類似ドメイン(kinase homology domain:KHD)とグアニル酸シクラーゼドメイン(guanylate cyclase domain:GCD)から成る。グアニリンとウログアニリンの大部分は腸管管腔内へ放出され、GC-Cと結合する。その結果cyclic GMPが産生され、type II cyclic GMP依存性プロテインキナーゼ(cGK II)が活性化されて、Cl<sup>-</sup>チャネルであるCFTRを開放し、Cl<sup>-</sup>分泌をもたらす。グアニリンとウログアニリンの一部は基底膜側から血管内へ分泌される。グアニリンとウログアニリンの産生細胞は別々である。

ヒトおよびラットの合成uroguanylinとguanylin に対する特異的で高感度の抗血清を家兎を用いて作成した。N端にTyrを延長した合成ペプチドをヨード化し、リガンドとしてラジオイムノアッセイ系を開発した。内因性分子型の同定は、組織酸抽出物をSep Pak C-18、ゲル濾過、抗体アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)で免疫活性物質を分離し、アミノ酸配列解析および質量分析により行った。正常者と心不全または腎不全患者の血漿および尿中のguanylinとuroguanylinの濃度は、Sep-Pak C-18で抽出後、RIAにより定量した。さらにRP-HPLCによりその分子型も同定した。Guanylin family peptidesのcyclic GMP産生能は、GC-Cを発現している培養ヒト大腸癌細胞株(T-84 cell line)にguanylin family peptidesおよびその前駆体を投与し、培養液中に放出されるcyclic GMP量をRIAで定量し、検討した。

免疫組織化学的研究は、ヒトおよびラットの手術または剖検時に得られた各組織を中性緩衝ホルマリン固定後、streptoavidin peroxidase法による免疫染色で行った。*in situ* hybridizationをヒトおよびラットuroguanylinのcRNAプローブを用いて行った。

8週齢のSD雄ラット(n=6)に、標準食(0.85% NaCl)を7日間与えた後、低塩食(0.3% NaCl)、高塩食(8.0% NaCl)、低塩食(0.3% NaCl)をそれぞれ3日間ずつ連続して投与した。24時間尿を採取し、SepPak処理後RIAを行い、尿中のuroguanylin排泄量を測定した。

### ③ 研究結果

ヒトとラットのuroguanylin cDNAはそれぞれ596と578 baseの長さで、mature uroguanylin分子をC端に含む112アミノ酸と106アミノ酸よりなる前駆体をcodeしている。Northern blotとRT-PCRにより、その遺伝子発現を腎臓、胃、腸、肺、膵臓に認めた。ヒトuroguanylinは2.5kbで、3ヶのエキソンと2ヶのイントロンよりなることを明確にした。ヒトとラットguanylin cDNAは600 baseの長さで、mature guanylinをC端に含む115アミノ酸よりなる前駆体をcodeしていた。guanylin遺伝子は腸管のみに発現し、そのmRNA量は十二指腸から結腸に下行するにつれ、増加した。somatic cell hybrid法を用いて、ヒトuroguanylinは第1染色体短腕上に位置することを同定した(8)。ゲル濾過、抗体結合クロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーにより、uroguanylinとguanylinの内因性分子型を単離し、アミノ酸配列解析と質量分析により全一次構造を決定した。両ペプチドとも産生細胞中では10-kDaの前駆体として存在し、分泌時にprocessingされmature formとなることを呈示した。10-kDaのproguanylinとprouroguanylinは腎不全患者血漿中にも検出された。

GC-Cを発現しているT84ヒト大腸癌細胞株を用いたbioassayにより、10-kDaの前駆体には生物活性がなく、mature formのみがcyclic GMP産生を容量依存性に促進した。また両ペプチドには、一次構造ならびにS-S結合が完全に同一であるが、2つのtopological isomers(right handed spiral formとlefthanded spiral form)が存在することを明らかにした(9-11)。



表. ヒト組織におけるグアニリンとウログアニリンの分布

|      | グアニリン |                            | ウログアニリン |                            |
|------|-------|----------------------------|---------|----------------------------|
|      | mRNA  | ペプチドの組織含有量<br>(fmol/mg湿重量) | mRNA    | ペプチドの組織含有量<br>(fmol/mg湿重量) |
| 胃    | —     | —                          | 卅       | 2.4                        |
| 十二指腸 | +     | 11.1                       | 卅       | 2.5                        |
| 空腸   | 卅     | 14.6                       | 卅       | 2.8                        |
| 回腸   | 卅     | 35.6                       | 卅       | 1.2                        |
| 上行結腸 | 卅     | 27.8                       | —       | 0.2                        |
| 腎    | —     | —                          | +       | 1.5                        |
| 脾臓   | —     | —                          | +       | 0.3                        |

cRNAを用いた *in situ* hybridization と特異抗体による免疫組織化学により、uroguanylin の産生細胞を消化管内分泌細胞に認めた (13)。ラットでは消化管の内分泌細胞と腎臓尿管細胞に加え、肺の Clara 細胞や脾臓内分泌細胞にも uroguanylin の遺伝子発現を認めた。

guanylin はヒトとラットで消化管内分泌細胞のみに存在していた。

#### ④ 考察

guanylin family は、ナトリウム利尿ホルモンと共に GC リガンドファミリーに属し、水・電解質代謝調節維持に作用する新規生理活性ペプチドの可能性がある。両ペプチドは Using chamber を用いて腸管粘膜に投与すると  $\text{Cl}^-$  分泌をきたすことが証明されており、腸管で paracrine として機能していると考えられる。熱耐性エンテロトキシンは腸管への投与後、水と  $\text{Na}^+$  の吸収抑制、また腎動脈動注によりナトリウム利尿と尿中への cyclic GMP 排泄を増加させる (14)。耐熱性エンテロトキシンの構造相関性から guanylin family の腎動脈投与によるナトリウム利尿活性の今後の検討が待たれる。従来から同量の  $\text{NaCl}$  を経口摂取した場合の方が静注した場合より電解質利尿が多いことが知られ、腸管と腎臓の電解質代謝を結ぶ生理活性物質の存在が推測されていた。uroguanylin は腸管と腎臓に存在し、 $\text{NaCl}$  負荷により尿中排泄量が著増させ、また腎動脈動注によりナトリウム利尿と尿中への cyclic GMP 排泄を増加させることから、この腸管-腎臓連関を結びつける内分泌性因子である可能性がある。guanylin family とそのレセプターにおける近年の細胞生理、ペプチド化学、分子生物学的知見は、水・電解質代謝調節機構の最構築と体液調節の病態の解明に大きく寄与すると考えられる。

#### ⑤ 今後の課題

本研究により、uroguanylin は消化管と腎臓で水・ナトリウム代謝に関与していることが示された。今後、その生理作用を明らかにするため、uroguanylin の分泌調節機構、 $\text{NaCl}$  負荷による遺伝子発現の変化と分泌動態をさらに明らかにしていく。また水・ナトリウム代謝の

異常をきたす病態（心不全、腎不全等）における guanylin family の病態生理学的意義についても臨床的検討を進める。さらに申請者は、guanylin family peptides の機能解析を進めるために、マウスでの cDNA と genome のクローニングにも成功した。すでに gene targeting を行っており、今後 uroguanylin と guanylin の欠損マウスの作製に向けても研究を展開する予定である。

## ⑥ 文献

1. S. Schultz, Chrisman, T.D., and Garbers, D.L.: Cloning and expression of guanylin: its existence in various mammalian tissues, *J Biol Chem*, 267: 16019-16021, 1992.
2. M.G. Currie, Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L., and Smith, C. E.: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 947-951, 1992.
3. T. Kita, Smith, C.E., Fok, K.F., Duffin, K.L., Moore, W.M., Karabatsos, P.J., Kachur, J.F., Hamra, F.K., Pidhorodeckyj, N.V., Forte, L.R., and Currie, M.G.: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family, *Am J Physiol*, 266: F342-348, 1994.
4. M. Nakazato, Matsukura, S.: Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency, *Biochem Biophys Res Commun*, 205: 1966-1975, 1994.
5. Y. Date, Nakazato, M, Yamaguchi, H, Miyazato, M, Matsukura, S: Tissue distribution and plasma concentration of human guanylin, *Int Med*, 35: 171-175, 1996.
6. H. Yamaguchi, Nakazato, M, Miyazato, M, Kangawa, K, Matsuo, H, Matsukura, S: Two novel rat guanylin molecules, guanylin-94 and guanylin-16, do not increase cyclic GMP production in T84 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 214:1204-1210, 1995.
7. H. Kinoshita, Nakazato M, Yamaguchi H, Matsukura S, Fujimoto S, and Eto T: Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function, *Clin Nephrol*, 47: 28-32, 1997.
8. M. Miyazato, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H:: Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin gene, *Genomics*, 43: 359-365, 1997.
9. M. Nakazato, Yamaguchi H, Kinoshita H, Kangawa K, Matsuo H, Chino N, and Matsukura S: Identification of biologically active and inactive human uroguanylin



- in plasma and urine and their increases in renal insufficiency,  
Biochem Biophys Res Commun, 220: 586-593, 1996.
10. N. Chino, Kubo, S, Miyazato, M, Nakazato, M, Kangawa, K, Sakakibara, S:  
Generation of two isomers with the same disulfide connectivity during disulfide  
bond formation of human uroguanylin, Lett Pept Sci, 3: 45-52, 1996.
  11. N. Chino, Kubo. S, Kitani. T, Yoshida. T, Tanabe. R, Kobayashi. Y, Nakazato, M.:  
Kangawa, K., and Sakakibara, S.: Topological isomers of human uroguanylin:  
Interconversion between biologically active and inactive isomers, FEBS Lett,  
421: 27-31, 1998.
  12. H. Kinoshita, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H,  
Hisanaga S, and Eto T: Plasma and urine levels of uroguanylin and its molecular  
forms in renal diseases, Kidney Int, 52: 1028-1034, 1997.
  13. Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Goy M, Chino N, Matsukura S:  
Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive  
uroguanylin. Endocrinology, in press
  14. R.N. Greenberg, Greenberg RN., Hill M., Crytzer J., Krause WJ., Eber SL., Hamra  
FK and Forte LR.: Comparison of effects of guanylin, uroguanaylin, and *Escherichia*  
*coli* heat stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that  
uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone, J Invest Med, 45: 276-283, 1997.

## 【研究の発表】

1. 日本内分泌学会総会(1997)  
ヒトとラットのuroguanylinの構造解析、定量法の開発、生体内分布および病態生理下での血漿濃度の変動  
中里雅光、宮里幹也、伊達 紫、山口秀樹、寒川賢治、松尾壽之、松倉 茂
2. 日本内分泌学会総会(1997)  
ラットuroguanylin cDNAのクローニング、構造解析、組織分布および細胞局在に関する研究  
伊達 紫、中里雅光、宮里幹也、山口秀樹、児島将康、寒川賢治、松尾壽之、松倉茂
3. 第70回日本内分泌学会総会(1997)  
ヒトuroguanylin遺伝子のクローニングおよび染色体部位の決定  
宮里幹也、中里雅光、山口秀樹、伊達 紫、児島将康、寒川賢治、松尾壽之、松倉 茂
4. 第40回日本腎臓病学会総会(1997)  
Uroguanylin(UG)産生および尿中排泄量におよぼす食塩負荷の影響  
木下浩、藤元昭一、横田直人、江藤胤尚、中里雅光
5. International Congress of Nephrology (1997)  
Uroguanylin and its receptor guanylate cyclase (GC-C) in the kidney  
Kinoshita H, Fujimoto S, Yokota N, Nakazato M, Eto T.
6. 第94回日本内科学会講演会(1997)  
新規水・電解質代謝調節ペプチドuroguanylinの遺伝子構造・組織発現および病態生理学的意義  
宮里幹也、中里雅光、山口秀樹、伊達 紫、松倉 茂
7. 第94回日本内科学会講演会(1997)  
肺癌患者でのG-CSF投与による血中defensin動態の生化学的研究  
伊達 紫、中里雅光、芦谷淳一、迎 寛、松倉 茂
8. 第1回日本心血管内分泌代謝学会 (1997)  
高張食塩水負荷時のヒトおよびラットにおけるuroguanylin分泌動態の検討  
山口秀樹、中里雅光、宮里幹也、伊達紫、寒川賢治、松尾壽之、松倉 茂

## **Uroguanylin is a Prime Candidate for an Intestinal Natriuretic Factor**

Masamitsu Nakazato, M.D., Ph.D.  
Third Department of Internal Medicine  
Miyazaki Medical College

### **Summary**

Uroguanylin, a new member of the guanylin peptide family, acts on guanylyl cyclase C to regulate intestinal and renal fluid and electrolyte transport through the second messenger, cyclic GMP. We have clarified tissue distribution of uroguanylin, its cellular source, structure-bioactivity relationship, cDNA and genome sequences, gene expression in the tissue, chromosomal localization, and pathophysiological implications. Uroguanylin has a widespread tissue distribution and is located in cells which function in an endocrine, paracrine and/or luminochrine (luminal secretion) fashion. Oral salt loading increased the biosynthesis and secretion of uroguanylin in the intestine as well as the urinary excretion of cyclic GMP and sodium chloride. The uroguanylin injection into the renal artery enhanced natriuresis. Uroguanylin therefore is a prime candidate for a substance that could link the intestine and kidney in an endocrine pathway that regulates renal salt metabolism.