

9834 食塩代謝調節に作用する新たな生活活性ペプチドグアニリンファミリーの
細胞生理・分子生物学的研究

助成研究者：中里 雅光 (宮崎医科大学 第三内科)

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。各種腎疾患とuroguanylinの関連を解析し、uroguanylinが腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群では体液量調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。またuroguanylinは、心不全患者の心機能を評価するマーカーの1つであることを提示し、さらに心不全時に心臓からuroguanylinが分泌される可能性を示した。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。

9834 食塩代謝調節に作用する新たな生活活性ペプチドグアニリンファミリーの細胞生理・分子生物学的研究

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)。さらにヒトuroguanylinのcDNA と遺伝子の塩基配列解析を行った(8)(9)。今回は、uroguanylinの消化管と腎臓での生理作用を明らかにするため、uroguanylinの局在や病態での変動、NaCl負荷による遺伝子発現の変化、分泌動態ならびに細胞局在について検討した。

ネフローゼ症候群では、低アルブミン血症に伴う血漿浸透圧の低下とともに腎臓における水・ナトリウム代謝異常があり、浮腫が発症する。本症における浮腫の発症機序を明かにするために、ナトリウム摂取量と尿中uroguanylin排泄量ならびに尿中uroguanylin排泄量と電解質およびcyclic GMP排泄量を定量し、ナトリウム負荷とuroguanylinの関係を検討した。さらにネ

フローゼ症候群を含む慢性糸球体腎炎患者において血漿、尿中uroguanylin濃度を測定し、臨床データとの関係を検討し、病態との関わりについて解析した。心不全におけるuroguanylinの病態生理学的意義を検討し、心不全時における心臓からのuroguanylinの分泌を検討した。

②研究方式

(1) ヒトおよびラットの合成uroguanylin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(10)。正常者と心不全患者の血漿および尿中の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。

(2) 8週齢のSD雄ラット (n=15) に、胃ゾンデを用いて4%食塩水 1 mlまたは蒸留水 1 mlを投与し、負荷前、負荷15分、30分、45分、60分後に空腸と腎臓を採取した。AGPC法を用いてRNAを抽出し、Northern blot法にてuroguanylin遺伝子発現を検討した。

(3) 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。

(4) 健常人男性 (n=3) を対象とし、同容量の2%食塩水の経口的投与、経静脈的投与、および蒸留水の経口的投与を、1週間毎に同一被験者に負荷した。負荷後1時間毎に採尿し、SepPak処理後RIAを行い、尿中uroguanylin量を測定した。

(5) 18時間絶食後断頭した雄性Sprague-Dawleyラット (250-300g) を用いた。ラット腹部正中を切開後、上腸管膜動脈にカニューレを挿入し、Krebs-Ringer液を5ml/分の速度で血行性灌流を開始した。空腸上部から回盲部までの腸管 (約 40 cm) を血管を付着して切り出した。37度に温めた5% Mannitol液で腸管内容物を除去した後、5% Mannitol液を2.5 ml/分の速度で管腔性灌流を開始した。処理した腸管を37度に保ったwater-jacket bathに入れ、30分間平衡化した。平衡後、10分毎に血管と管腔の両灌流液を別々に採取した。灌流液は氷冷し遠心分離後、上清を-30度に保存した。Sep-Pak処理後RIAを用いて灌流液中のuroguanylin分泌量を測定した。

(6) 高塩食群 (10g/day, n = 12) と低塩食群 (7g/day, n = 16) の正常者について、尿中uroguanylin排泄量を定量した。健常群、慢性糸球体腎炎群、保存期腎不全群、血液透析群で血漿uroguanylin濃度を比較した。血漿uroguanylin

濃度をネフローゼ症候群で非ネフローゼ症候群で比較し、さらにネフローゼ症候群の寛解期での血漿uroguanylin濃度を解析した。

(7) 152例の心不全患者の血漿uroguanylinとbrain natriuretic polypeptide (BNP)濃度を定量し、5例については心臓カテーテル検査を行ない、前室間静脈、冠静脈洞、大動脈より採血し、uroguanylin濃度を比較した。ヒト心臓よりRNAを抽出し、uroguanylin遺伝子の発現を検討した。

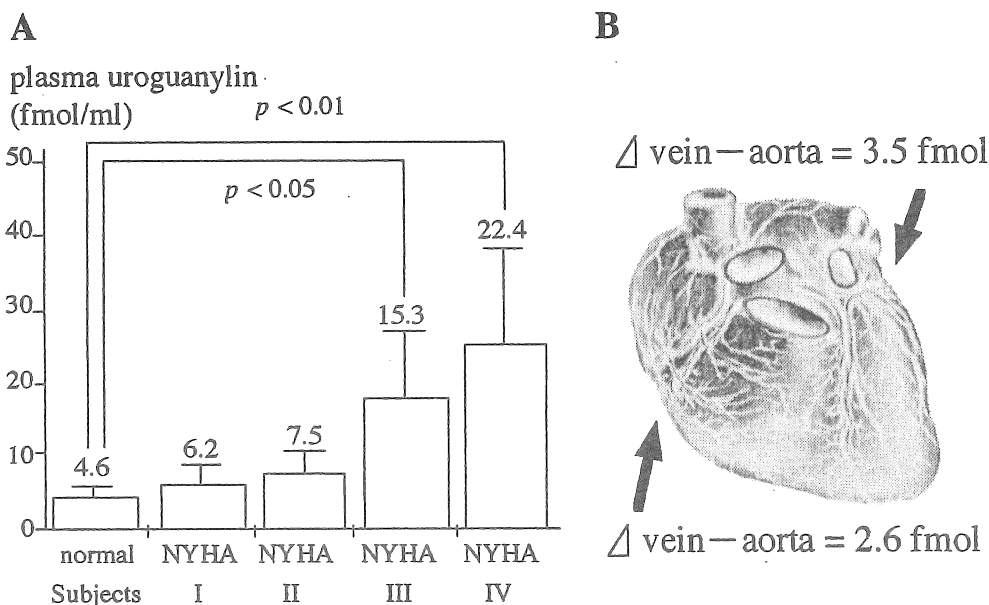
③研究結果

GC-Cを発現しているT84ヒト大腸癌細胞株を用いたbioassayとNMR解析により、uroguanylin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(11)(12)。さらにcyclic GMP assayにより一方のisomerのみがbioactiveであり、他方にはcyclic GMP産生能がないことを証明した。これらのtopological isomersは、ヒトの組織、血漿および尿中に実際に存在していることも併せて証明した。

ヒト健康人男性において、経口NaCl負荷により尿中uroguanylinは、負荷1時間後に1.4倍に増加したが、経静脈的NaCl負荷や経口水分負荷では増加しなかった。SD雄ラットへの高塩食(8.0% NaCl)負荷により、尿中uroguanylin排泄量の著明な増加を認めた。SD雄ラットへの2%食塩水負荷後のuroguanylin遺伝子発現は、空腸では15分、腎臓では45分を頂値として増加した。ラット腸管灌流にて、腸管内灌流液の塩分濃度に従いuroguanylinが腸管腔内および血管内への分泌が促進された。uroguanylinの腸管腔内(管腔側)と血管内(基底側)への分泌量の比は、9:1であった。uroguanylinは、消化管内分泌細胞(EC細胞)に顆粒状に存在し、細胞内局在では管腔側に多く存在し、基底側にも免疫活性を認めた(13)。また腎臓の遠位尿細管細胞にもuroguanylinの遺伝子発現と免疫活性およびGC-Cの遺伝子発現を認めた(13)。

慢性糸球体腎炎患者において、入院時の血漿uroguanylin濃度は血清蛋白、アルブミンと有意な負の相関関係を示した。血漿uroguanylin濃度はネフローゼ症候群で非ネフローゼ症候群より有意に高く、同時に血圧、心胸比も高値を示した。また、ネフローゼ症候群では寛解期には、血圧、心胸比の低下とともに血漿uroguanylin濃度の有意な低下を認めた。この血漿uroguanylin濃度の低下度は volume retention (入院時の体重と寛解期の体重の差)と有意な相関を認めた。尿中uroguanylin排泄量はネフローゼ患者では非ネフローゼ患者より少なかった。高塩食群(10g/day, n = 12)では低塩食群(7g/day, n = 16)に比べて、尿中uroguanylin排泄量は有意に増加していた(137.8 ± 14.4

pmol/day vs. 95.1 ± 16.3 pmol/day, $P < 0.05$)。尿中uroguanylin排泄量は Na^+ , K^+ , Cl^- , cGMP排泄量と有意な正の相関関係を示した。RT-PCR 法により、ヒト腎髄質に GC-C の発現を認めた。血漿uroguanylin濃度は血清クレアチニン濃度と正の相関を示し、健常群と比較し、慢性糸球体腎炎群、保存期腎不全群、血液透析群では有意に高値であった。



(A) Plasma uroguanylin concentrations in patients with congestive heart failure.

(B) Step-up of plasma uroguanylin concentrations in heart failure, indicating that uroguanylin is secreted from human heart.

uroguanylinの正常ヒト血漿濃度は5.2 fmol/mlであった。高齢者(65歳以上)では両ペプチドの血漿濃度は若年者より軽度高く、経口NaCl負荷によるuroguanylinの反応性は若年性に比し、2/3に低下していた。New York Heart Association (NYHA)分類による心不全の重症度とuroguanylinの血漿濃度との相関を検討した。各群のuroguanylin血漿濃度(平均±標準偏差)は、NYHA I (6.2 ± 2.5) NYHA II (7.5 ± 3.2), NYHA III (15.3 ± 13.3), NYHA IV (22.4 ± 21.4)であった。正常群と比較すると NYHA III ($P < 0.05$)とNYHA IV ($P < 0.01$)は、有意に高かった。また心不全の重症度のパラメータである血漿BNP濃度とuroguanylin濃度は、 $r=0.47$, $p<0.0016$ で有意な相関を示したが、血漿ANP濃度とは相関を認めなかった。活性型uroguanylinはヒト尿中に、800 fmol/ml存在しており、腎不全でその濃度は増加していた(14)。心不全患者では、前室間静脈と大動脈および冠静脈洞と大動脈の間でuroguanylin血漿濃度の増加を認め、心不全では心臓からuroguanylinが分泌されることが明らかと

なった。また手術時に得られたヒト心臓からRNAを抽出し、uroguanylin mRNAに特異的なreverse-transcription polymerase chain reactionを行い、ヒト心臓に、uroguanylin 遺伝子が発現していることを明らかにした。

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生理活性ペプチドである。uroguanylinは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(15)。従来から同量の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NaCl代謝を結ぶ生理活性物質(intestinal natriuretic factor)の存在が推測されていた。本研究ではuroguanylinのレセプターが腎臓に存在していることを確認した。uroguanylinは腸管と腎臓に存在し、NaCl負荷により腸管での遺伝子発現と腸間膜静脈への分泌並びに尿中への排泄量が著増することから、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。高塩食時には低塩食時より尿中uroguanylin排泄量が多いこと、尿中uroguanylin排泄量はナトリウム、cGMP排泄量と有意に相関することより、腎臓におけるナトリウム排泄の調節に関係しているものと考えられた。ネフローゼ症候群において血圧、心胸比とともに血漿uroguanylin濃度は増加していた。また、その増加率はvolume retention と相関していたことよりuroguanylin が腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群のvolume 調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。血中uroguanylin濃度の測定からuroguanylinは、心不全患者の心機能を評価するマーカーの1つであることが示された。従来知られていた心機能を評価するマーカーであるBNPとuroguanylinとの解離する心不全症例も存在するため、今後、詳細な解析を行い考察する。

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・NaCl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

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生理活性ペプチドである。特にuroguanylinは、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。また本研究によりウログアニリンは胃酸分泌を生理的に調節している可能性が示された。さらにuroguanylinは心不全時には体液負荷を減少させる

ために心臓から分泌されることも示唆された。guanylin family は消化管や腎臓で水・電解質のホメオスタシスに積極的に関与している。水・電解質代謝異常におけるguanylin familyの病態生理学的意義のさらなる解析が期待される。

⑥文献

- 1) S. Schultz, et al: Cloning and expression of guanylin: its existence in various mammalian tissues, *J Biol Chem*, 267: 16019-16021, 1992.
- 2) M.G. Currie, et al: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 947-951, 1992.
- 3) T. Kita, et al: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family, *Am J Physiol*, 266: F342-348, 1994.
- 4) M. Nakazato, et al: 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, et al: Tissue distribution and plasma concentration of human guanylin, *Int Med*, 35: 171-175, 1996.
- 6) H. Yamaguchi, et al: 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, et al: Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function, *Clin Nephrol*, 47: 28-32, 1997.
- 8) M. Miyazato, et al: Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin, *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 644-648, 1996
- 9) M. Miyazato, et al: Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin gene, *Genomics*, 43: 359-365, 1997.
- 10) M. Nakazato, et al: 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.
- 11) N. Chino, et al: Generation of two isomers with the same disulfide connectivity during disulfide bond formation of human uroguanylin, *Lett Pept Sci*, 3: 45-52, 1996.
- 12) N. Chino, et al: Topological isomers of human uroguanylin: Interconversion between biologically active and inactive isomers, *FEBS*

Lett, 421: 27-31, 1998.

- 13) M. Nakazato, et al: Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin, *Endocrinology*, 139: 5247-5254, 1998.
- 14) H. Kinoshita, et al: Plasma and urine levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases, *Kidney Int*, 52: 1028-1034, 1997.
- 15) R.N. Greenberg, et al: Comparison of effects of guanylin, uroguanylin, 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.

【研究論文の発表】

- ① M. Nakazato, H. Yamaguchi, Y. Date, M. Miyazato, K. Kangawa, M. Goy, N. Chino, S. Matsukura, Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin, *Endocrinology*, 139: 5247-5254, 1998.
- ② N. Chino, S. Kubo, T. Kitani, T. Yoshida, R. Tanabe, Y. Kobayashi, M. Nakazato, K. Kangawa, S. Sakakibara, Topological isomers of human uroguanylin: Interconversion between biologically active and inactive isomers, *FEBS Lett*, 421: 27-31, 1998.
- ③ Y. Date, M. Nakazato, H. Yamaguchi, M. Miyazato, K. Kangawa, M. Goy, N. Chino, S. Matsukura, Enterochromaffin-like cell, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology*, 140: 2398-2404, 1999.
- ④ H. Kinoshita, S. Fujimoto, H. Fukae, N. Yokota, S. Hisanaga, M. Nakazato, T. Eto, Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron*, 81: 160-164, 1998.
- ⑤ S. Fujimoto, H. Kinoshita, S. Hara, M. Nakazato, S. Hisanaga, T. Eto, Immunohistochemical localization of uroguanylin in the human kidney. *Nephron*, in press
- ⑥ H. Fukae, H. Kinoshita, S. Fujimoto, M. Nakazato, T. Eto, Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. *Nephron*, in press
- ⑦ H. Kinoshita, M. Nakazato, S. Fujimoto, T. Eto, Current Topics in

Biochemical Research: Significance of uroguanlin, a new natriuretic peptide, in renal diseases. RESEARCH TRENDS, in press

- ⑧ 中里雅光, 松倉 茂, 水・NaCl代謝調節に作用する新しい消化管ペプチド, グアニンファミリー, 日本内科学会雑誌, 87: 741-746, 1998.
- ⑨ 中里雅光, 水・NaCl代謝調節に作用する新しい消化管ペプチド グアニンファミリー, 消化管ホルモン, 医学図書出版, (東京) 9-14, 1999.

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 lumenocrine (luminal secretion) fashion. Uroguanylin receptor is also expressed in the kidney. The biosynthesis and secretion of uroguanylin are stimulated by oral NaCl load. Uroguanylin is synthesized in human heart and its plasma level increased in the patients with heart failure. Uroguanylin may link the intestine and kidney in an endocrine pathway for the control of renal salt excretion.