

## 43

助成番号 0143

## 胎児肺腔内液除去および肺水腫からの回復過程におけるナトリウムイオンの役割とその輸送制御機構の解明

助成研究者：丸中良典（京都府立医科大学 第一生理学教室）

共同研究者：新里直美（京都府立医科大学 第一生理学教室）

胎児期においては、母体を通じて行われていたガス交換は、新生時期以降は自らの肺において行われなければならない。このため、分娩時において、この肺腔内液は何らかのメカニズムで除去されなければならない。最近の研究により、分娩時のストレスにより血中カテコラミン濃度が上昇し、このカテコラミンにより、胎児肺胞上皮Ⅱ型 (alveolar type II: AⅡ) 細胞におけるアミロライド感受性ナトリウムイオン輸送 (再吸収) が促進され、このイオン輸送の結果、肺腔内液は血管側へと再吸収されることが明らかになってきた。また、このアミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収は、新生児期の肺呼吸機能発現のみならず、乳幼児から成人にいたる時期に発症した肺水腫からの回復過程にも寄与していることも明らかとなりつつある。しかしながら、そのメカニズムについては未だ不明である。このために、AⅡ細胞におけるカテコラミンの cAMP を介した経路による上皮型ナトリウムイオンチャネル (epithelial Na<sup>+</sup> channel: ENaC) およびナトリウム輸送活性化が、チロシンリン酸化酵素 (protein tyrosine kinase: PTK) 活性化を介して発現されることを明らかにすることを目的とした。

cAMP は、一般的に cAMP 依存型タンパクリン酸化酵素 (PKA) を活性化することにより、細胞内情報伝達を行っている。しかしながら、ラット胎生20日目のⅡ型呼吸上皮細胞においては、cAMP は PKA 活性化を通じてセリン/トレオニンのリン酸化を促進するが、この経路によってはナトリウムイオン輸送 (吸収) を促進しない<sup>16</sup>。一方、チロシンは、そのリン酸化/脱リン酸化を通じてイオン輸送やイオンチャネルの働きを制御している。しかしながら、上記のように、cAMP が PKA を活性化させることは知られているが、cAMP がチロシンリン酸化に関与するかは不明であった。最近の報告によると、ラット胎生20日目のⅡ型呼吸上皮細胞において、cAMP がチロシンのリン酸化を促進することが明らかとなった。さらに、この cAMP によるチロシンリン酸化促進効果は、カリウムおよびクロライドチャネル活性化による細胞容積減少を通じて発現されていることも明らかとなった。この報告は、細胞容積の持つ生理学的意義を明確に報告した点においても注目すべき実験結果と言える。



助成番号 0143

## 胎児肺腔内液除去および肺水腫からの回復過程におけるナトリウムイオンの役割とその輸送制御機構の解明

助成研究者：丸中良典 (京都府立医科大学 第一生理学教室)

共同研究者：新里直美 (京都府立医科大学 第一生理学教室)

### 1. 研究目的

胎児の肺は、その自らの上皮細胞においてクロライドイオンを分泌することによって肺腔内液を分泌している。肺腔内液分泌に伴い、肺腔内から外部に向かい陽圧が産み出されている。この陽圧は、胎児肺の発生・成長・分化に非常に重要な役割を果たしている。しかしながら、胎児期においては、母体を通じて行われていたガス交換は、新生時期以降は自らの肺において行われなければならない。このため、分娩時において、この肺腔内液は何らかのメカニズムで除去されなければならない。最近の研究により、分娩時のストレスにより血中カテコラミン濃度が上昇し、このカテコラミンにより、胎児肺胞上皮 II 型 (alveolar type II: ATII) 細胞におけるアミロライド感受性ナトリウムイオン輸送 (再吸収) が促進され、このイオン輸送の結果、肺腔内液は血管側へと再吸収されることが明らかになってきた。また、このアミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収は、新生児期の肺呼吸機能発現のみならず、乳幼児から成人にいたる時期に発症した肺水腫からの回復過程にも寄与していることも明らかとなりつつある。しかしながら、そのメカニズムについては未だ不明である。従って、このカテコラミンによるアミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収のメカニズムを解明することは、1) 新生児の肺呼吸機能の発現、2) 乳幼児から成人にいたる時期に発症した肺水腫からの回復メカニズムを明らかにするという点において、生理学・病態生理学的に重要であることは明らかである。このために、ATII 細胞におけるカテコラミンの cAMP を介した経路による上皮型ナトリウムイオンチャネル (epithelial Na<sup>+</sup> channel: ENaC) およびナトリウム輸送活性化が、チロシンリン酸化酵素 (protein tyrosine kinase: PTK) 活性化を介して発現されることを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法

- 2.1 細胞培養：麻酔下で胎生20日目・新生および成熟ラットより肺を摘出し、肺胞上皮II型(ATII)細胞を単離し、これを permeable support である NUNC filter 上に単層培養した。
- 2.2 パッチクランプ法：Leitz 社製倒立顕微鏡（モデル Labovert LS）を用い、マニピュレーターとしては、Newport 社の400シリーズを用いた。増幅器は、Axon Instruments 社の Axopatch 1D を用い、解析には、同社の P Clamp 8 を用いた。
- 2.3 生化学的方法：既報で用いた一般的な生化学的手法、主として western blot 法および immuno-precipitation 法を用いてリン酸化を確認した。

## 3. 研究成果

ラットの胎生20日目の肺II型呼吸上皮細胞には、2種類のアミロライド感受性のナトリウム透過性チャネル、即ち、12pSという単一イオンチャネルコンダクタンスを持ちナトリウムイオンに対して特異的に透過性を持つチャネル（ナトリウムチャネル）と28～30pSという単一イオンチャネルコンダクタンスを持ちナトリウムイオンおよびカリウムイオンに対してほぼ同程度の透過性を持つチャネル（非選択性陽イオンチャネル）の2種類のアミロライド感受性チャネルが存在した（図1）。これらの2種類のチャネルの内、ナトリウムチャネルはベーターアゴニストには反応せず（図2）、一方、NSCチャネルはベーターアゴニストによりその活性および数が増大した（図2）。このことから、ベーターアゴニストは、非選択性陽イオンチャネルの活性および数を増大させることにより、肺腔内液を除去していることが示唆された。

図3に示すように、ベーターアゴニストはラット胎生20日目の肺II型呼吸上皮細胞内カルシウムイオン濃度を二相性に増大させた（一過性の増大とこれに続く持続性の増大）。持続性の細胞内カルシウムイオン濃度増大は、ベーターアゴニストの細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPが、細胞外からのカルシウムイオン流入を促進することによる。この細胞内カルシウムイオン濃度の増大は、キニン感受性カルシウム活性型カリウムイオンチャネルを活性化させる（図4）ことによりカリウムイオンの細胞内からの流出を促進し（図4）、それに伴うクロライドイオン流出（クロライドイオンチャネルのcAMPによる活性化によるクロライドイオン

の流出も含まれる）と水の細胞外への脱出も増大させることにより（図4）、細胞容積の減少を引き起こした（図4）。この細胞容積の減少が、結果として細胞内クロライドイオン濃度の減少をもたらした（図5）。この細胞内クロライドイオン濃度減少の機序は、細胞内に膜不透過性の陰イオン（タンパク質やアミノ酸等）が存在することより、細胞内クロライドイオンの初期濃度が低く、カリウムイオンが細胞外に脱出する際に、細胞内の電気的中性維持のために、初期濃度の低いクロライドイオンのみが、カリウムイオンと同量、細胞外に脱出することによる（図6）。さらに、細胞内カリウムイオン濃度減少は、NSC チャネルを活性化させる働きがある。

cAMP は、一般的に cAMP 依存型タンパクリン酸化酵素（PKA）を活性化することにより、細胞内情報伝達を行っている。しかしながら、ラット胎生20日目のII型呼吸上皮細胞においては、cAMP は PKA 活性化を通じてセリン/トレオニンのリン酸化を促進するが、この経路によってはナトリウム輸送（吸収）を促進しないことが示唆された。即ち、PKA 阻害剤は、本細胞において PKA の活性を阻害することにより、cAMP 非刺激時のナトリウムイオン輸送を抑制するが、cAMP によってもたらされるナトリウムイオン輸送の増大には影響しないことが明らかとなった（図7）。ベータアゴニストには反応しないナトリウムイオンチャンネルが、cAMP 非刺激時においても PKA によるリン酸化によって活性化されていること、および cAMP による非選択性陽イオンチャンネルは PKA によるリン酸化とは関係なく活性を有していることが示唆された。一方、チロシンは、そのリン酸化/脱リン酸化を通じてイオン輸送やイオンチャンネルの働きを制御していることが示唆されている。上記のように、cAMP による PKA 活性化は知られているが、cAMP がチロシンリン酸化に関与するかは不明であった。我々は、ラット胎生20日目のII型呼吸上皮細胞において、cAMP がチロシンのリン酸化を促進することを明らかにした（図8）。さらに、この cAMP によるチロシンリン酸化促進効果は、カリウムイオンおよびクロライドイオンチャンネル活性化による細胞容積減少を通じて発現されていることも明らかとなった。このことは、細胞容積の持つ生理学的意義を明確に報告した点においても注目すべき実験結果と言える。

#### 4. 考察

cAMP が、細胞容積変化を介して、チロシンのリン酸化を促進し、ナトリウムイオン輸送を増大させることが明らかとなった。しかしながら、チロシンリン酸化が

ナトリウムイオン輸送の如何なる過程を活性化させるかは不明である。一つの可能性として、非選択性陽イオンチャネルの細胞内貯蔵部位から肺腔側膜への移動促進が、チロシンのリン酸化により促進されことによるが考えられる。

#### 5. 今後の課題

チロシンのリン酸化が、ナトリウムイオン輸送の種々の過程の如何なる段階に作用するかを明らかにすることが必要である。特に、非選択性陽イオンチャネル自身にチロシンリン酸化部位が存在するか否かを明らかにすることが必要である。しかしながら、そのためには、非選択性陽イオンチャネルのクローニングがまずされなければならない。

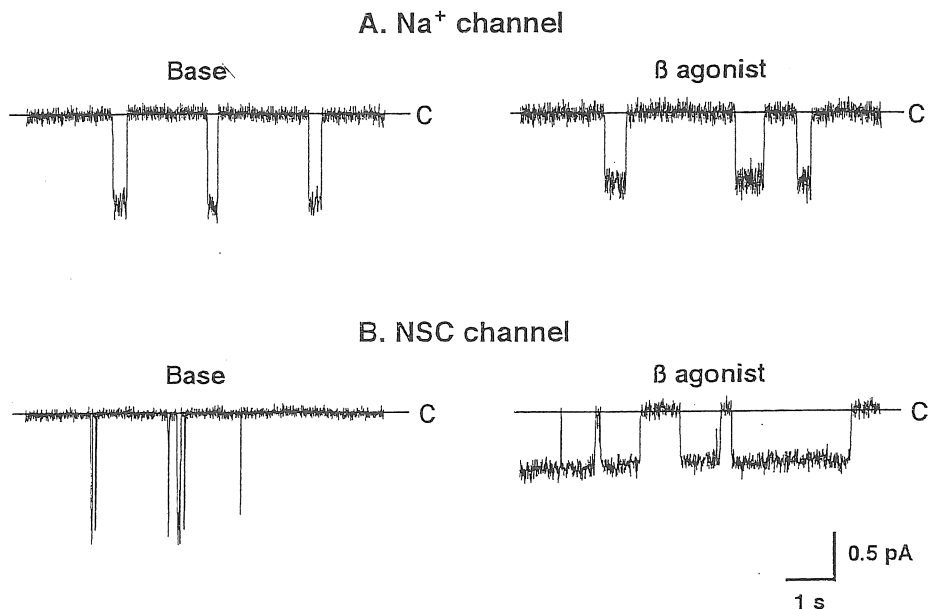


Fig. 1. Two types of channels in rat fetal distal lung epithelium (FDLE) obtained from the fetus of 20-day gestation in cell-attached patches. Actual traces of single channel currents through two types of channels. Downward deflection indicates inward currents across the patch membrane. The horizontal bar and "C" beside each current trace indicate the closed level of the channel. A: Na<sup>+</sup> channel with a single channel conductance of 12 pS. B: Nonselective cation (NSC) channel with a single channel conductance of 28 ~ 30 pS.

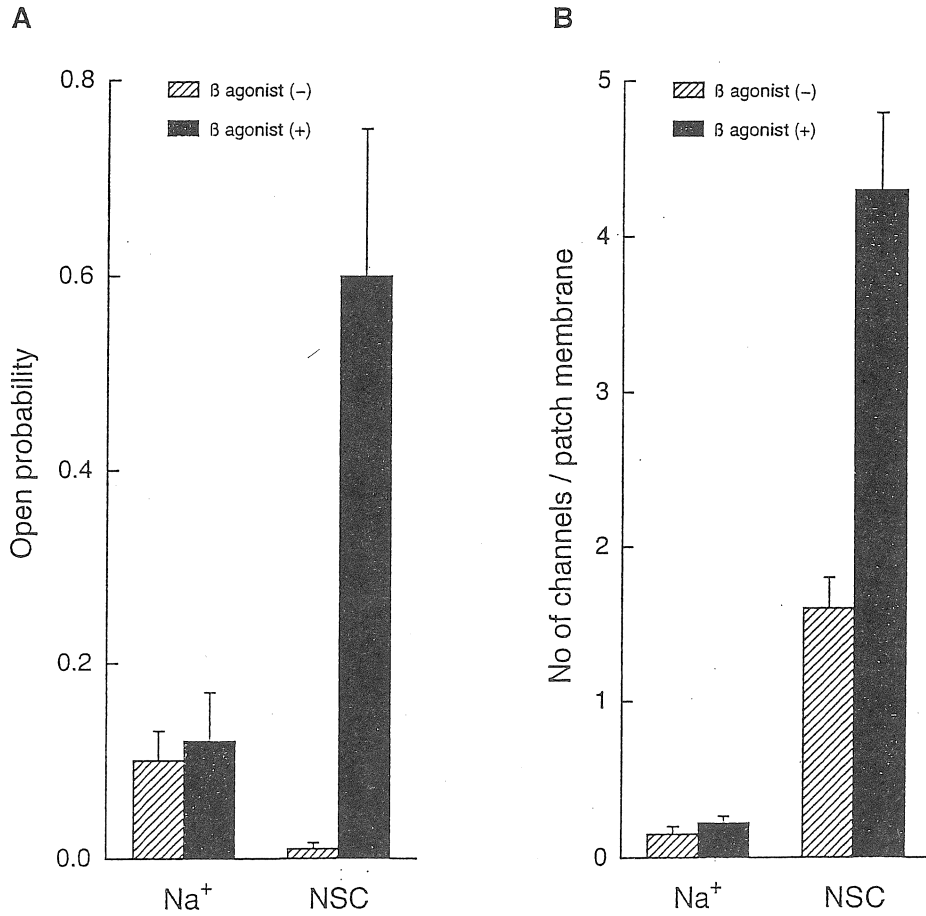


Fig. 2. The effects of  $\beta$  agonist on the Po (A) and number (B) of the NSC and  $\text{Na}^+$  channels. When the  $\beta$  agonist action on the Po was studied, a  $\beta$  agonist, terbutaline, was applied, while keeping the cell attached patch which had been made before application of the  $\beta$  agonist. On the other hand, when the  $\beta$  agonist action on the channel number was studied, a  $\beta$  agonist had been applied before the cell attached patch was made. The NSC channel was responded to a  $\beta$  agonist in Po and number of the channel, while the  $\text{Na}^+$  channel did not respond to a  $\beta$  agonist.

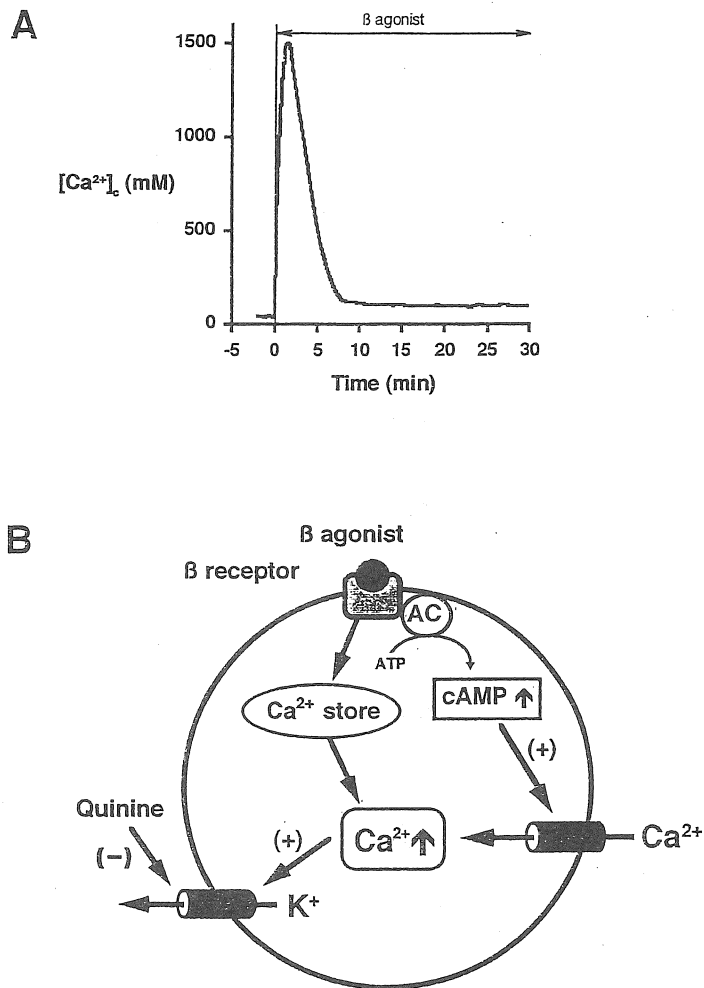


Fig. 3. Effects of  $\beta$  agonist on the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ). A: A  $\beta$  agonist increased  $[Ca^{2+}]_c$ ; transient and sustained increases. The sustained increase disappeared when the extracellular  $Ca^{2+}$  was removed, while the transient increase was still observed under the condition. B: These observations suggest that a  $\beta$  agonist increases  $[Ca^{2+}]_c$  by stimulating  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular space via a cAMP-dependent pathway and  $Ca^{2+}$  release from the cytosolic  $Ca^{2+}$  store via a cAMP-independent pathway.



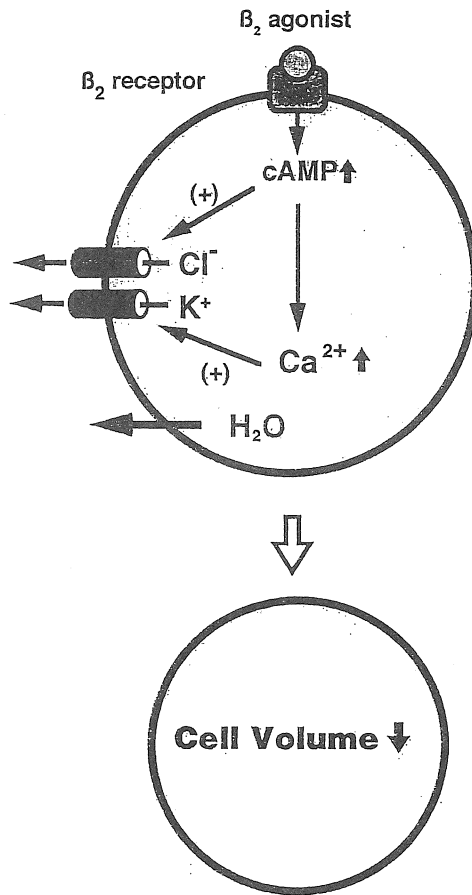


Fig. 4. Relationship between  $\beta$  agonist-induced increases in cAMP and  $[Ca^{2+}]_c$  and cell volume. cAMP activated a  $Cl^-$  channel, while  $Ca^{2+}$  activated a  $K^+$  channel, resulting in stimulation of KCl efflux. The KCl efflux caused a decrease in osmolality of cytosolic solution, leading to water release to the extracellular space. As results, cell shrinkage occurred.

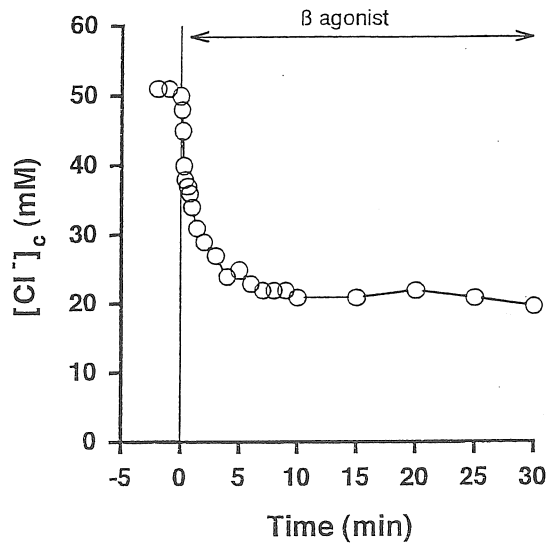


Fig. 5. Effects of  $\beta$  agonist on the cytosolic  $\text{Cl}^-$  concentration ( $[\text{Cl}^-]_c$ ).

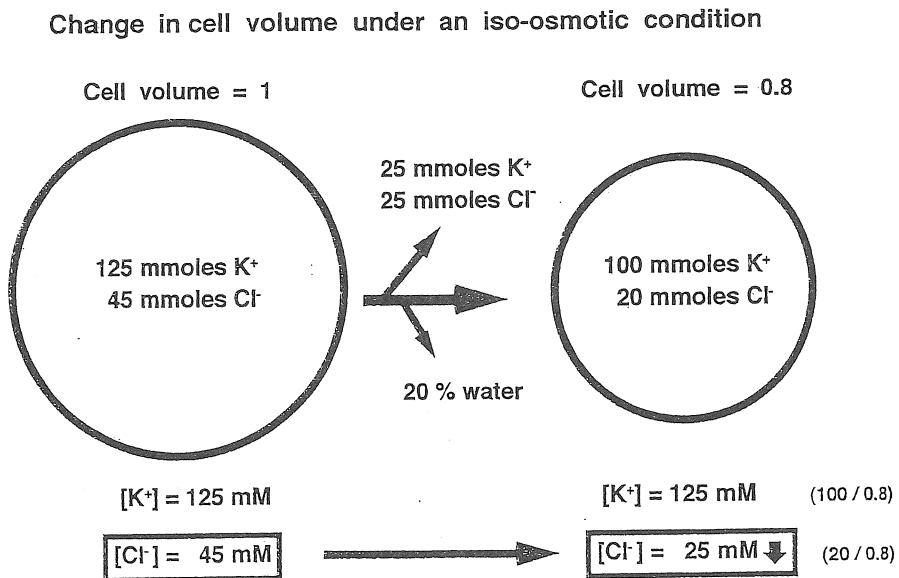


Fig. 6. Relationship between cell volume and  $[\text{Cl}^-]_c$ .

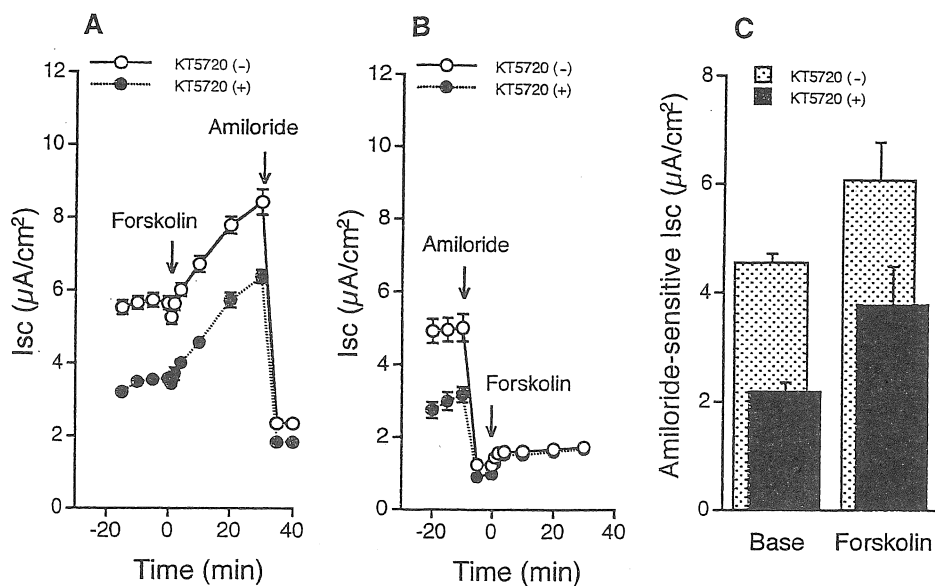


Fig. 7. The effect of KT5720 (an inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (PKA)) on unstimulated and forskolin-stimulated I<sub>sc</sub>. A) Treatment with KT5720 (0.5 μM, 2 h pretreatment and presence during the I<sub>sc</sub> measurement, bilateral application; closed circles) decreased the basal I<sub>sc</sub>. However, even in the KT5720-treated cell forskolin increased I<sub>sc</sub>. Amiloride (10 μM, apical application) blocked most of the forskolin-stimulated I<sub>sc</sub> to an identical level irrespective of KT5720 treatment. B) Amiloride (10 μM, apical application) was added before application of forskolin. Amiloride diminished the basal I<sub>sc</sub> to an identical level irrespective of KT5720 treatment (KT5720, closed circles). In the presence of amiloride, forskolin failed to increase I<sub>sc</sub> irrespective of KT5720 treatment. Treatment with KT5720 had no significant effects on the amiloride insensitive I<sub>sc</sub> irrespective of forskolin stimulation. C) The basal and forskolin stimulated amiloride-sensitive I<sub>sc</sub>. KT5720 decreased the basal and forskolin stimulated amiloride-sensitive I<sub>sc</sub> (KT5720 (-), dotted bars; KT5720 (+), solid bars). However, the amount of the KT5720-induced decrease in the basal and forskolin-stimulated amiloride-sensitive I<sub>sc</sub> was identical (compare the control values (dotted bars in the absence of KT5720) with those with KT5720 treatment (solid bars). Namely, the forskolin-induced increase in the amiloride-sensitive I<sub>sc</sub> was not affected by KT5720 treatment.

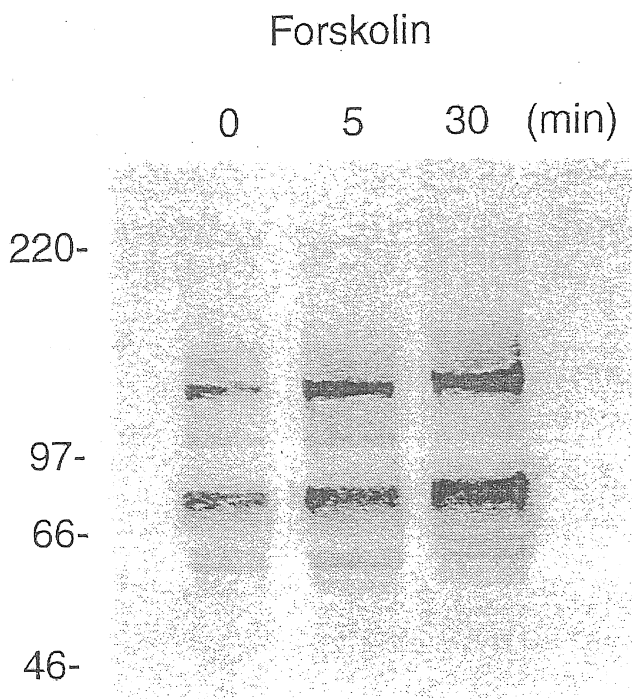


Fig. 8. Effects of forskolin on phosphorylation of tyrosine. A typical result of forskolin action on phosphorylation of tyrosine. Forskolin ( $5 \mu\text{M}$ ) increased phosphorylation of tyrosine residues of  $\sim 70\text{-}80$  kDa,  $\sim 97$  kDa and  $\sim 110\text{-}120$  kDa proteins.

## Roles of ion transport in clearance of lung fluid in fetal lung

Yoshinori Marunaka, Naomi Niisato

Department of Cellular and Molecular Physiology  
Kyoto Prefectural University of Medicine

### Summary

To study a cAMP-mediated signaling pathway in regulation of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  transport in rat fetal distal lung epithelial (FDLE) cells, we measured an amiloride sensitive short-circuit current ( $\text{Na}^+$  transport). FDLE had two types of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$ -permeable cation channels: nonselective cation (NSC) and  $\text{Na}^+$  channels. Only the NSC channel responded to cAMP, but the  $\text{Na}^+$  channel did not. This indicates that the NSC channel is responsible to cAMP-stimulation of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  transport in FDLE. Forskolin, which increases the cytosolic cAMP concentration, stimulated the  $\text{Na}^+$  transport. Forskolin also activated cAMP dependent protein kinase (PKA). A  $\beta$ -adrenergic agonist and cAMP mimicked the forskolin action. KT5720, a PKA inhibitor, did not influence the forskolin action, suggesting that forskolin stimulates the  $\text{Na}^+$  transport through a PKA-independent pathway. Moreover, tyrosine phosphorylation of ~70-80, ~97 and ~110-120 kDa proteins was increased by forskolin. A protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor, tyrphostin A23 abolished the forskolin action. Further, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB, a  $\text{Cl}^-$  channel blocker) prevented the stimulatory action of forskolin on the  $\text{Na}^+$  transport by abolishing the forskolin-induced cell shrinkage and tyrosine phosphorylation. Based on these results, we conclude that forskolin (and cAMP) stimulates the  $\text{Na}^+$  transport in a PTK-dependent but not a PKA-dependent pathway by causing cell shrinkage that activates PTK in rat FDLE cells.