

## 電解質及び糖質の輸送と代謝に関する基礎並びに応用研究——分子生物学との接点を求めて

祐田 泰延

**Fundamental and Applied Studies on Transport and Metabolism of Electrolytes and Glucose——Aim to Contact with Molecular Biology**

Yasunobu SUKETA

*University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan*

(Received May 1, 2002)

The authors' research focuses on polyuria, natriuresis, glucosuria, glycemia, and renal calcification in occupational lead poisoning and endemic fluorosis. Changes in electrolyte mobilization and in glucose metabolism and transport following the administration of lead compounds or fluoride were examined to elucidate these mechanisms. The results suggest fundamental approaches to the mechanism of aging and life style diseases. Our results show that: 1) Natriuresis and polyuria in lead poisoning and fluorosis are due to a decrease in renal Na/K-ATPase activity; 2) Renal calcification in fluorosis is due to stimulation of parathyroid function and activation of the renal phosphatidylinositol cascade; 3) Glycemia in fluorosis is due to elevation of renal and hepatic glucose-6-phosphatase activities; 4) Glucosuria in fluorosis is due to decreased renal Na/K-ATPase activity (but fluoride administered directly did not damage the renal Na/glucose cotransporter (SGLT)); 5) Renal calcification in fluorosis is due to stimulation of parathyroid function; and 6) The decrease in renal Na/K-ATPase and SGLT activities with aging and hypertension is due to a decrease in phosphorylation activity by protein kinase C (PKC) etc. (decrease in PKC productivity with aging and hypertension).

**Key words**——fluorosis; lead poisoning; aging; lifestyle diseases; ion transport; transport and metabolism of glucose

## はじめに

電解質輸送は電解質平衡並びに体液平衡にとって、また糖質の代謝及びその輸送はエネルギー獲得並びに生体機能維持にとって重要なものである。こうした輸送を担っている蛋白質は膜蛋白質であり、それらにはNa-ポンプ、Ca-ポンプ、Na/H-交換体、水チャネル、Na/glucose cotransporter (SGLT) 及び glucose transporter (GLUT) などの輸送蛋白質がある。これら輸送蛋白質の機能調節は種々の神経系並びに内分泌系の支配を受けて巧妙に営まれている。

体液の電解質平衡は主として腎において行われ、糸球体で濾過された電解質は大部分腎細管のネフロンによって再吸収される。これらの再吸収を担う輸送体の分布はネフロンにより、さらに基底膜側と管腔側により異なることは周知の通りである。体液成

分の恒常性維持は生物にとって正常な生命維持つまり健康の保持に重要であり、電解質平衡は体液量にも影響を与えるものであり健康状態においては厳密に制御されており、内分泌系等を介してプロテインキナーゼあるいはプロテインフォスファターゼによる膜蛋白質の構造変化等を介して下流へと情報伝達されている。糖質は三大栄養素の1つであり、生体成分の大部分はC, H, Oから成り立っており、そのなかでも糖質は極めて初期的な成分であるとともに、その分解がエネルギー産生そのものといって過言ではない。

そうした観点から、本研究は電解質並びに糖質の輸送と代謝異常と環境因子、遺伝因子、加齢及び性差の因子との関連性を追究しつつ、それらの関連した疾病、すなわち高血圧症並びに糖尿病といった生活習慣病の治療法の解明を目指して母子衛生、生活衛生、労働衛生、老人保健といったヒトの一生から見た問題解決、つまり応用から基礎へ、あるいは基礎から応用へと指向した研究とその周辺を紹介したものである。

静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡市谷田 52-1)

e-mail: ysuketa@theia.ocn.ne.jp

\*本総説は、平成13年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

## 1. 電解質の動態と輸送系

電解質には無機及び有機イオンがあるが、ここでは無機イオンなかでも Na, Ca 及び Mg について述べることにしたい。腎臓における Na の再吸収は副腎皮質より分泌されるアルドステロンによって調節されていることはよく知られた事実である。アルドステロンの受容体は遠位尿細管に分布しており、また Ca については甲状腺より分泌されるカルチトニン、また上皮小体より分泌されるパラトルモンにより制御されている。さらに腸管よりの Ca 吸収はビタミン D<sub>3</sub> で調節されている。電解質輸送体は生命の誕生以来、生命体の外環境への適応並びに維持のために生体内情報伝達機能として働き、また一方ではより効率的な生体反応の恒常性維持のために精巧な生体内イオン環境の調整を行うべく、進化発展してきたものである。そうしたことから、それらの調節機能も環境に応じて多種多様に進化しつつ現在に至っている。それらは Na-チャンネル、K-チャンネル、Na/K-ATPase, Ca-ATPase, Ca-チャンネル、H-ATPase, Na/H-交換体などである。ここでは Na/K-ATPase, Ca-ATPase, Ca-チャンネル及び Mg-輸送体について述べることにする。

**1-1. ナトリウム動態と Na/K-ATPase** Na/K-ATPase は鉍質コルチコイドの主なターゲットであるが、Na/K-ATPase に対するアルドステロンやデキサメサゾンの主な作用は Na-ポンプの長期発現を維持することであることが種々の組織で示されている。アルドステロンは特に遠位ネフロンの上皮で Na<sup>+</sup> 再吸収を調節することによって細胞外容積及び血圧を調整している。この経細胞輸送の主な調節部位は刷子縁膜側の Na<sup>+</sup> 流入に介在している上皮 Na-チャンネルであり、また基底膜側から協奏的に Na<sup>+</sup> 排出している Na/K-ATPase は短期間アルドステロンによって調節されていることはよく知られている。これはマウス集合管培養細胞で2時間以内に Na/K-ATPase の機能が最高に達することが Na 電流測定により認められ、かつ Na/K-ATPase の細胞表面への発現が 20—50% 増加することにより示されている。<sup>1)</sup> 興味のあることには、アルドステロンによる Na-ポンプの長期増強はアフリカツメガエルの腎細胞株 (A6) ではプロテインフォスファターゼ阻害剤の1つのカルシニユリンで抑制される。<sup>2)</sup>

**1-1-1. Na 輸送とインスリン**—インスリンやバソプレシンなどのペプチドホルモンは Na/K-ATPase 制御因子の大きなクラスをなしている。Na/K-ATPase に対する効果が最もよく調べられているペプチドホルモンはインスリンである。インスリンは糖質の貯蔵を調節し、また K<sup>+</sup> のホメオスタシスにとって重要な役割を演じている主な代謝性ホルモンである。<sup>3)</sup> インスリンは単離したラットの近位曲尿細管でのウバイン感受性<sup>86</sup> Rb 流入速度を亢進させることが示されている。<sup>4)</sup> インスリンの作用としては、インスリンを介した Na/K-ATPase の細胞内ストアからの細胞表面へのトランスロケーションがある。<sup>5)</sup> アルギニンバソプレシン (AVP) ではラット腎髄質のヘンレ係蹄上行脚 Na/K-ATPase 活性は濃度依存的に阻害され、10<sup>-8</sup> M で 49% 阻害される。<sup>6)</sup> 一方、Blot-Chabaut ら<sup>7)</sup> は皮質集合管では、AVP は潜在的なプールのリクルーティングと活性化によって側基底膜 Na/K-ATPase の数や活性を増加することを示しており、AVP はプロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) を活性化する事実などから、これには PP2A 依存性脱リン酸化過程が介在するものと考察している。

**1-1-2. Na 輸送とプロスタグランジン**—ラットの大脳皮質のシナップトゾーム Na/K-ATPase 活性は 5-HPETE (1 μM) により 67% まで阻害された (IC<sub>25</sub> = 10<sup>-8</sup> M) との報告がある。<sup>8)</sup> 5-HPETE は 5-リポオキシゲナーゼによる産物であるが、12-HPETE 及び 15-HPETE では阻害されなかったとしている。このように Na/K-ATPase 活性はアラキドン酸代謝物、20-hydroeicosa-tetranoic acid (20HETE) によって阻害されることはよく知られており、それにはプロテインキナーゼ C (PKC) が介在していることが示されている。Nowicki ら<sup>9)</sup> によるとアフリカミドリザル腎 SV40 形質転換細胞株 (COS) では、20HETE は PKCα の原形質から膜への転移を引き起こすことを観察している。ラット野生型 Na/K-ATPase の α1 サブユニットをトランスフェクトした COS 細胞の Na/K-ATPase 活性を阻害するが、PKC のリン酸化部位である Ser-23 を Ala に変異させたものは阻害しないとしている。プロスタグランジン E2, F2 及び 12 はラット心筋 Na/K-ATPase 活性を、それぞれ 30, 80 及び 80% にまで低下させたが、プロスタグランジン D2 及び E1

(28 pM—280 nM) はいずれも何の効果も示さなかったとしている。<sup>10)</sup> また、同心筋 Mg-ATPase 及び Ca-ATPase 活性はこれらのプロスタグランジンによってなら影響されなかったとしている。

1-1-3. 電解質輸送とプロテインキナーゼの役割——PKC によるリン酸化は Na/K-ATPase の  $\alpha$ -サブユニットで起こることはよく知られている。そして、それは 18 位の Ser 残基がリン酸化されるが、ATP の水解を直接阻害するのではない。つまり、そのリン酸化は Na/K-ATPase の  $V_{max}$  や  $Na^+$  に対する見掛けの親和性に有意な影響を及ぼさない。<sup>11)</sup> Freschenko ら<sup>12)</sup> は Na/K-ATPase の制御のなかで PKC 及び PKA (プロテインキナーゼ A) のクロストークが存在すると仮定して哺乳細胞培養系でのリン酸化を調べている。すなわち、NRK-52E 及び L6 細胞では PKC による Ser-18 のリン酸化は、フォルスコリンであらかじめ cAMP 依存性のシグナリングを活性化すると減少する。PKA のリン酸化部位である Ser-938 は cAMP により、リン酸化は検出されなかったとしている。一方、ラットの野生型 Na/K-ATPase の  $\alpha 1$  をトランスフェクトした COS 細胞では、23 位の Ser を Ala に変異させた場合に比べて細胞内  $Na^+$  濃度が高くまた pH が低い。<sup>13)</sup> また、前者ではホルボールブチルエステルにより ATP 水解や Rb 取り込みが阻害されるが、後者の変異体 S23A を発現させた細胞では見られなくなる。<sup>13)</sup> このような結果は PKC が介在した Na/K-ATPase  $\alpha 1$  のリン酸化が機能的な役割を示している。ドーパミンによる Na/K-ATPase 活性阻害は、腎尿細管が高食塩食摂取期間中に尿中ナトリウム排泄の修飾を受けることにとって重要な機構である。しかしながら、この調節の分子的な機構はいまだ明白に理解されていなかった。ドーパミンに符合した Na/K-ATPase 活性の阻害はその  $\alpha$ -及び  $\beta$ -サブユニットのエンドサイトーシスと関連しているとして、<sup>14)</sup> 彼らが分離した近位尿細管細胞とオポサムの腎由来細胞株を用いてドーパミンで誘導される Na/K-ATPase のエンドサイトーシスやその活性阻害は  $\alpha$ -サブユニットのリン酸化に伴って起こることを証明している。また、これは PKC 依存性である。腎 Na/K-ATPase は、ATPase の性状を修飾する膜 1 回貫通型蛋白質である  $\beta$ -サブユニットと会合している。ラット及びヒトでは 2 種のバリエーション

が存在する。<sup>15)</sup>

1-2. Na/K-ATPase のトランスロケーション アンキリンの結合機構を検証するステップとして、ヒト赤血球スペクトリンとアンキリンとの結合領域及び Na/K-ATPase の  $\alpha$ -サブユニットの 5 つの暫定的なドメインのそれぞれはバクテリアのリコンビナントな融合蛋白として調製し、赤血球及び腎アンキリン (それぞれ Ank1 及び Ank3) との相互作用が *in vitro* で分析されている。<sup>16)</sup> それによると予期したように、スペクトリンはそれぞれ Ank1 及び Ank3 と強固に結合し、また Na/K-ATPase の 2 つのドメイン、すなわちドメイン II (140–290) 及びドメイン III (345–784) にコードされている部位と特異的に相互作用していることがバイオアフィニティカラムで証明されている。

また Na/K-ATPase のトラフィッキングについては非常に興味のもたれる課題であり、上記の蛋白質の役割について述べることにする。スペクトリン ( $\beta IS$ ) とアンキリン ( $Ank_{G119}$ ) はゴルジ膜とダイナクチンとの複合体と関連しているが、小胞のトラフィッキングにおけるそれらの役割は不明のままであった。Devarajan ら<sup>17)</sup> は、トランスフェクトしたイヌ腎由来 MDCK 細胞を用いてアクチン結合ドメインと  $\beta I$  スペクトリンの膜相関ドメイン 1 (MAD1) が一緒になって常在性ゴルジに照準をあわせるシグナルを形成することを見出ししている。このシグナルの発現はゴルジスペクトリン骨格を破壊し、小胞体 (ER) からの Na/K-ATPase の  $\alpha$ -及び  $\beta$ -サブユニット並びに小胞性口内炎ウイルス G 蛋白質の輸送を阻害するが、ゴルジ集合の形成、 $\beta$ -COP の分配あるいは E-カドヘリンの細胞表面への表出を阻害しない。

1-3. Na/K-ATPase 活性と環境因子 近年、疾病の成因、またその進展については、環境因子と遺伝因子の両面から考察されることが日常的になっている。環境因子については内因的なもの、外因的なもの種々様々である。環境因子としては化学的要因、物理的要因及び生物学的要因に分けられる。化学的要因のなかにも種々あり、金属などの無機化合物や有機化合物もある。Na/K-ATPase は水銀、バナジウム、鉛はじめカドミウムでよく阻害される。<sup>18)</sup> 水銀は SH 酵素の強力な阻害剤であり、バナジウムは Na/K-ATPase の K-site に結合して強力な

阻害効果を発揮するウワバインと同様な作用機構を有し、それよりも強い阻害能をもっている。鉛は融点が比較的low、加工が容易なこと、また顔料や塗料としてヒポクラテスの時代の古くから使用され、鉛中毒が注目されていた。また、フッ素は  $\text{AlF}_4^-$  としてよく知られ、その細胞作用は G-蛋白質の活性化である。  $\text{AlF}_4^-$  は Na/K-ATPase 活性を阻害し、ATP に対しては非競合的である。また *p*-ニトロフェニルフォスフェートに対しては競合的に Na/K-ATPase の K 依存性-*p*-ニトロフェニルフォスファターゼを阻害する。<sup>19)</sup>

1-3-1. 鉛中毒と電解質代謝——著者らは鉛作業環境における鉛中毒について、作業労働者のなかには飲酒愛好者がいる場合もあり、こうしたことから職業病予防検診には、こうした生活習慣を配慮すべきであると考えた。そこで、ムーンシャインウイスキー（鉛含有密造ウイスキー）の飲酒による鉛中毒でレニン活性低下などが引き起こされるとの報告<sup>20)</sup>に注目し、電解質輸送とレニン—アンジオテンシン—アルドステロン系との関わりを研究した。これまで、鉛中毒時における特徴的な症状は、ポルフィリン尿症、<sup>21—27)</sup> 貧血症<sup>21)</sup> などであり、そのほか疝痛<sup>21)</sup> がある。

著者らは、<sup>25,26)</sup> まず絶食ラットに鉛単独（0, 5, 50, 200 mg Pb/kg, 酢酸鉛水溶液）1 回経口投与後について、0, 6, 12 及び 24 時間目に心臓穿刺により採血、腎臓を摘出し調べることにした。尿量 (ml/hr) は投与後 6 時間までを頂点として増加し、12 時間後には正常値にまで回復した。それにほぼ相関して腎 Na/K-ATPase 活性が低下し、6 時間目に最も強く抑制され、徐々に回復した。また鉛単独投与（200 mg Pb/kg, 酢酸鉛水溶液）では著しい尿中 Na 排泄増加も確認された。鉛投与直後から 4 時間ごとに、アルドステロン（10  $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ ）、アンジオテンシン（10  $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ ）あるいはバソプレシン（50 mU/ml/kg）を皮下注射したところ、尿量と尿中 Na 排泄ともに有意な回復を示した。また、ラットに鉛単独長期（12 週間）経口投与では血清 Na 濃度は 5 mg/kg 以上で、また血清 K 濃度は 2 mg/kg 以上で有意に減少した。また腎 Na/K-ATPase 活性は鉛 5 mg/kg 以上の長期（12 週間）投与では対照の 50—70% 低下を示した (Fig. 1)。<sup>27)</sup> 血清アルドステロン濃度の低下し始める鉛の閾値 2

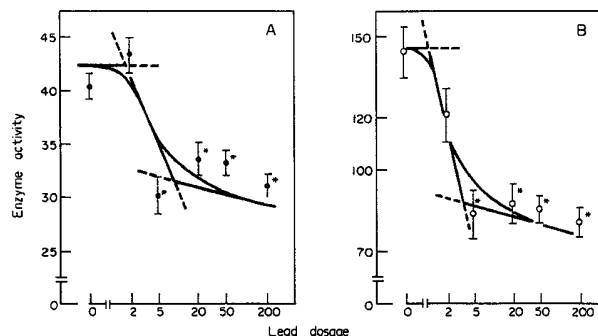


Fig. 1. Responses of Renal K<sup>+</sup>-Dependent Phosphatase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activities to Various Doses of Lead

Rats were killed after long-term (12 weeks) ingestion of lead acetate (0–200 mg Pb · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>). Enzyme activities are expressed as nmoles product · (mg protein)<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>. Lead dose: mg Pb · kg<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>. The values are average data from 6 rats; standard errors are indicated by bars. Panel A: renal K<sup>+</sup>-dependent phosphatase activity (●). Panel B: renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity (○). Significant difference from the respective control: (\*) *p* < 0.02.

mg/kg と推定された。<sup>27)</sup> 著者ら<sup>28)</sup> は単回大用量の鉛投与による急性鉛中毒では腎基底膜を含め全身的に膜機能に影響を及ぼし、必然的にアラキドン酸代謝カスケードにも異常を来しているものと仮定した。そこでインドメタシンを投与したところ、上記、鉛投与による腎 Na/K-ATPase 活性の低下は有意に回復した。また、鉛投与により血漿プロスタグランジン E2 レベルは 10 倍以上の上昇を示した。

鉛単独投与による尿中 Na 排泄増加は、エタノール同時投与により抑制された。それと相関して、エタノール同時投与では鉛による腎 Na/K-ATPase 活性抑制は減弱された。これはエタノール単独投与により腎 Na/K-ATPase 活性は亢進されることによる。<sup>29)</sup>

1-3-2. フッ素と電解質代謝——フッ素の組織内への移行は、投与方法により多少異なると推測されるが、骨 > 肺 > 腎 > 肝 > 大腸、脾 > 脳 の順になっている。フッ素は Ca 及びリンなどの親和力が強く、骨を形成しているヒドロキシアパタイトに対する親和力は非常に高いとされている。<sup>30)</sup> 血小板の機能をも促進<sup>31)</sup> することなどから、最近では微量有効成分として取り扱われる場合が多くなってきている。

a. フッ素と生理イオン動態 著者らが研究を開始した当時はフッ素中毒時の各組織についてのイオン動態については骨組織<sup>32)</sup> についての知見が散見される程度であった。著者らは現在までに知見の乏しい組織について調べることにした。特に肺は作業

Table 1. Contents of Calcium and Magnesium in Several Organs of Fluoride-Treated Rats<sup>a)</sup>

Organs	Calcium			Magnesium		
	Normal	Fluoride	F/N	Normal	Fluoride	F/N
Brain	34.79 ± 3.32	25.05 ± 3.51	0.72	98.74 ± 10.07	86.89 ± 8.99	0.88
Lung	39.20 ± 5.01	61.15 ± 7.01	1.56	145.6 ± 9.80	138.0 ± 10.6	0.95
Spleen	18.49 ± 2.67	61.39 ± 5.36	3.32	148.6 ± 8.50	173.6 ± 14.2	1.17
Liver	12.17 ± 0.96	7.79 ± 1.60	0.64	200.9 ± 10.4	248.0 ± 19.0	1.23
Kidney	26.83 ± 4.21	283.7 ± 43.5	14.3	193.2 ± 15.6	287.9 ± 26.3	1.49

a) The rats were killed 24 hr after a single ip dose of fluoride (NaF, 35 mg/kg body wt). Calcium and magnesium contents are expressed as micrograms per gram of wet weight of tissues. Values represent means ± SE from six rats.

環境などの問題<sup>33)</sup>との関連で、また腎は骨代謝やイオンなどの再吸収との関連性があり以下のような実験を進めた。フッ素を腹腔内投与したラットの組織の Ca は Table 1 に示すように腎の石灰化が著しく、ついで脾、肺の順であった。<sup>34)</sup> また脳では幾分 Ca 含量が低下していた。一方、Mg は Ca ほどではないが、わずかに増加の傾向がみられ、腎は正常に比して 1.49 倍の増加を示し、肺では有意な差は示していない。ちなみに、肺ミトコンドリア ATPase 活性に及ぼすフッ素投与の影響については、<sup>35)</sup> Ca<sup>2+</sup> 存在下の酵素反応系では活性がわずかに上昇を示したが、Mg<sup>2+</sup> あるいは Ca<sup>2+</sup> の非存在下では、逆に有意に低下した。

b. フッ素と腎機能 Roholm ら<sup>36)</sup>は種々の動物を使って、フッ素 (NaF) によって間質性腎炎に似た慢性腎障害を引き起こすことを報告しており、また急性フッ素中毒による腎機能及び構造変化は、尿細管拡張や腫脹あるいは急性尿細管壊死などが知られている。<sup>37)</sup> Gottlieb ら<sup>38)</sup>は尿量の増加や尿素排泄の減少を観察しており、Taylor ら<sup>39)</sup>も同様の結果を得ている。これら尿量の増加、尿比重の減少及び水摂取の増加は電解質を伴わない水再吸収の障害で尿細管細胞の傷害であろうとしている。また、尿糖の増加も観察しており、この尿糖の増加は尿細管の傷害と血糖上昇の両者によるものと推測している。そこで、著者らはフッ素中毒時の腎機能障害について腎のイオン動態の側面から詳細に検討し、フッ素による尿量の増加は、腎尿細管における Na 再吸収抑制を伴ったものであることを腎 Na/K-ATPase 及び関連酵素活性の低下からも証明することができた。<sup>40-43)</sup> また、炭酸水素イオンと腎 Na/K-

ATPase 活性に及ぼす影響も検討した。<sup>44)</sup>

1-4. カルシウム動態とその調節機構 カルシウムは、細胞情報伝達さらに骨細胞など生体の支柱、生体の保護、食物の咀嚼などの機能（脊椎骨、殻、歯など）また骨組織の Ca は生体の液性を維持する緩衝剤としても機能している元素でもある。腸からの Ca 吸収及び腎からの Ca 再吸収は全身の Ca の恒常性にとって主な決定因子である。

Ca 輸送体 (CaT1) をプローブとして、Peng ら<sup>45)</sup>は Ca-チャンネル (ECaC) 及び CaT1 にそれぞれ 84.2% 及び 73.4% のホモロジーを有する新規の CaT2 を分離している。CaT2 の腎での発現はカルバインディン-D<sub>28K</sub>, Na/Ca-交換体 1 (NCX1) のそれと類似していたとしている。腎上皮 ECaC の同定は、カルバインディン-D<sub>28K</sub>, Na/Ca-交換体や Ca-ATPase を含む Ca-輸送蛋白質を補足するものであり、これらは 1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> 感受性ネフロン分節に共発現されている。<sup>46)</sup> 貯蔵 Ca-チャンネルには IP<sub>3</sub> 受容体 Ca-チャンネル及びリアノジン受容体 Ca-チャンネルなど 7 つほど活性化機構がある。<sup>47)</sup> ちなみに、IP<sub>3</sub> は G<sub>q</sub> (G 蛋白質のアイソフォーム) 及びホスホリパーゼ C<sub>β</sub> の活性化と関連している。ところで、イノシトールリン脂質代謝回転が注目されたのは、言うまでもなく西塚の PKC の発見によるところが大きい。<sup>48)</sup> その代謝回転のなかでホスホリパーゼ C により IP<sub>3</sub> とともに遊離されるジアシルグリセロール (DG) が PKC 活性を亢進し、IP<sub>3</sub> が貯蔵 Ca-チャンネルを刺激して Ca を細胞内に遊離するというものである。<sup>49)</sup>

1-4-1. カルシウム動態とフッ素——フッ素は微量栄養元素に数えられることもある。それには骨の

アパタイト構造を強固にする<sup>50)</sup>とか、アデニレートシクラーゼ活性を亢進する<sup>51)</sup>こと、さらにはホスホリパーゼ C の活性化<sup>52)</sup>や G 蛋白質の活性化<sup>53)</sup>などといった背景がある。フッ素は *in vitro* 動物あるいは植物由来のいかん、又は原形質膜、ミトコンドリアあるいはミクロソームなどのオルガネラのいかんにかかわらず金属関与酵素を阻害する。Ca-AT-Pase 活性もこの例外ではない。<sup>35)</sup> しかしアデニレートシクラーゼなどの酵素は活性化される。また *in vivo* においてはフッ素は副甲状腺機能を亢進し、パラトルモン (PTH) の分泌を促し、骨からの Ca の放出を促進し、血中 Ca を上昇させる。<sup>34)</sup> その結果、腎臓では Ca 沈着、すなわち石灰化 (calcification) が起こることになるが、肝臓、脾臓ではほとんど石灰化は進行しない。こうした腎臓の石灰化は副甲状腺摘出した動物では抑制される (Table 2)。<sup>54)</sup> またフッ素投与によって起きる腎細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入は Ca-チャンネル阻害剤のニフェジピンによって抑制されることから、フッ素投与によって腎細胞内の Ca-チャンネルが開いたことを示している。<sup>55)</sup> *In vitro* での腎刷子縁膜小胞への<sup>45)</sup> Ca 取込みは 1 mM

NaF で 10% 程度上昇したが、この取込みは予期に反してそれほど大きいものではなかった。<sup>55,56)</sup> また、この取込みも Ca-チャンネル阻害剤で抑制された。

しかし、フッ素投与直後の腎細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入はフッ素の一次作用による可能性を示唆しているものである。またフッ素投与による二次作用、例えば PTH 分泌亢進の可能性も残っている。事実、著者らは副甲状腺機能の亢進も上述のように観察している。細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入に及ぼすフッ素の影響については、Strnad ら<sup>57)</sup> はヒト好中球での呼吸のバースト (burst) がフッ素で活性化される機構として G 蛋白質 (Ni) の活性化が関連しているものと考え、好中球の Ca<sup>2+</sup> 流入に及ぼすフッ素の影響を NaF 5—18 mM の濃度範囲で Quin 2 を用いて調べている。その結果、NaF 1 mM 以上で細胞内 Ca が上昇することが示され、ホスホリパーゼ C の関わりが示唆された。こうした仮説は G 蛋白質 (N<sub>i</sub>) がホスホリパーゼ C との coupling factor と考えられており、<sup>58)</sup> また堅田ら<sup>59)</sup> のフッ素により G 蛋白質 (N<sub>i</sub>) が 35 KDa と 41 KDa のサブユニットに解離されるという知見に基づいている。

Table 2. Effect of Thyroid-Parathyroidectomy on the Fluoride-Induced Increase in Renal and Hepatic Calcium of Rats

	Control			Fluoride-administered		
	Intact	TPTX	Suppression by TPTX (%)	Intact	TPTX	Suppression by TPTX (%)
<b>Kidney</b>						
Whole cells	1.26 ± 0.04 (1)	1.26 ± 0.04 (1.00)	—	60.21 ± 3.97 (47.8)	23.07 ± 3.98 (18.3)	63.0 <sup>a)</sup>
Nuclei and cell debris	0.26 ± 0.01 (1)	0.26 ± 0.01 (1.00)	—	41.34 ± 3.70 (159)	13.08 ± 3.20 (50.3)	68.8 <sup>a)</sup>
Mitochondria	0.27 ± 0.01 (1)	0.26 ± 0.01 (0.96)	3.7	7.89 ± 0.86 (29.2)	3.37 ± 0.15 (12.5)	59.2 <sup>a)</sup>
Microsomes	0.32 ± 0.03 (1)	0.31 ± 0.02 (0.97)	3.1	2.81 ± 0.24 (8.78)	1.80 ± 0.15 (5.63)	40.2 <sup>a)</sup>
Cytosol	0.41 ± 0.03 (1)	0.43 ± 0.04 (1.05)	—	8.17 ± 4.45 (19.9)	4.82 ± 0.29 (11.8)	43.3
<b>Liver</b>						
Whole cells	0.51 ± 0.02 (1)	0.52 ± 0.05 (1.02)	—	0.77 ± 0.11 (1.51)	0.57 ± 0.02 (1.12)	80.5 <sup>b)</sup>
Nuclei and cell debris	0.12 ± 0.01 (1)	0.12 ± 0.01 (1.00)	—	0.17 ± 0.01 (1.42)	0.12 ± 0.01 (1.00)	100.0 <sup>b)</sup>
Mitochondria	0.14 ± 0.02 (1)	0.13 ± 0.01 (0.93)	7.1	0.21 ± 0.01 (1.43)	0.16 ± 0.01 (1.07)	50.0 <sup>b)</sup>
Microsomes	0.13 ± 0.01 (1)	0.15 ± 0.02 (1.15)	15.4	0.21 ± 0.02 (1.62)	0.15 ± 0.01 (1.15)	100.0 <sup>b)</sup>
Cytosol	0.12 ± 0.01 (1)	0.12 ± 0.01 (1.00)	—	0.19 ± 0.02 (1.58)	0.14 ± 0.01 (1.17)	74.4 <sup>b)</sup>

Calcium contents are expressed as micromoles/g fresh tissue. Values are averages obtained from 5 rats ± S.E.

a) b) Denotes significant difference from respective controls (intact); a)  $p < 0.01$ , b)  $p < 0.05$ .

1-4-2. イノシトール燐脂質代謝と Ca 流入——イノシトール燐脂質代謝の生理機能との関わりは、種々の臓器組織で活発に研究されてきたものである。培養細胞系ではラットの哺乳類癌細胞株 (WRK1) を用いて  $[^3\text{H}]$ -myo イノシトールを取り込ませて  $[^3\text{H}]$ -PIP<sub>2</sub> を生合成させた後、これを基質として *in vitro* でフッ素 (NaF) を加えてホスホリパーゼ C 活性に及ぼすフッ素の影響を  $[^3\text{H}]$ -IP<sub>3</sub>,  $[^3\text{H}]$ -IP<sub>2</sub>,  $[^3\text{H}]$ -IP の生成能を検索することにより調べられている。それによると IP<sub>3</sub>, IP<sub>2</sub> の生成能はフッ素添加によりそれぞれ 4, 3.6 倍に上昇したが、IP の生成能には影響しなかったとしている。<sup>52)</sup> また NaF 5 mM 存在下での AlCl<sub>3</sub> による IP<sub>3</sub> 及び IP<sub>2</sub> 生成の亢進は 10  $\mu\text{M}$  でほぼ最高となる。ラットにフッ素を投与した場合 (*in vivo*),  $[^3\text{H}]$ -PIP<sub>2</sub> を基質とした腎細胞膜ホスホリパーゼ C 活性は投与の 1 時間後では対照のそれに比べやや上昇したものの有意なものではなかった。フッ素投与直後 (1 時間目) には腎臓の刷子縁膜小胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入が有意に上昇し、その Ca<sup>2+</sup> 流入の上昇はニフェジピンによって抑制されたことは上述のとおりである。<sup>55)</sup> 一方、後述のように PKC 活性<sup>60)</sup> の上昇は cAMP の上昇が終結した後で観察され、また細胞外 Ca<sup>2+</sup> の細胞内への流入増加と相関していた (Fig. 2)。<sup>55)</sup> また、著者らはラット腎上皮培養細胞株 (NRK-52E) を用いてフッ素による Ca<sup>2+</sup> 流入と IP<sub>3</sub>, IP<sub>2</sub> 生成に与える影響を、前者は fura2 により、後者は上記 Guillon らの方法<sup>52)</sup> により調べ、Ca<sup>2+</sup> 流入の上昇に先行して IP<sub>3</sub>, IP<sub>2</sub> 生成の亢進を観察することができた (Fig. 3)。<sup>61)</sup>

1-5. Mg 輸送と生体機能 著者らは、高血圧症ラットの一つである Dahl 食塩感受性高血圧発症ラット (DahlS ラット) を用いて、高血圧発症並びにその進展について電解質動態から詳細に検討することとした。その結果、高血圧発症並びにその進展に伴って尿中への Mg 排泄が増加することを見出した。ちなみに、DahlR (食塩耐性) では当時、動物における Mg 輸送体についての報告が少なく、こうした理由から研究を進めることとした。

Gunther ら<sup>62)</sup> は赤血球が Na/Mg 交換をしていることを報告しており、これは Mg<sup>2+</sup> 負荷した細胞で活性化され、結果的に Mg<sup>2+</sup> 流出をもたらすというものであった。著者ら<sup>63)</sup> は、ラット腎由来上皮細胞

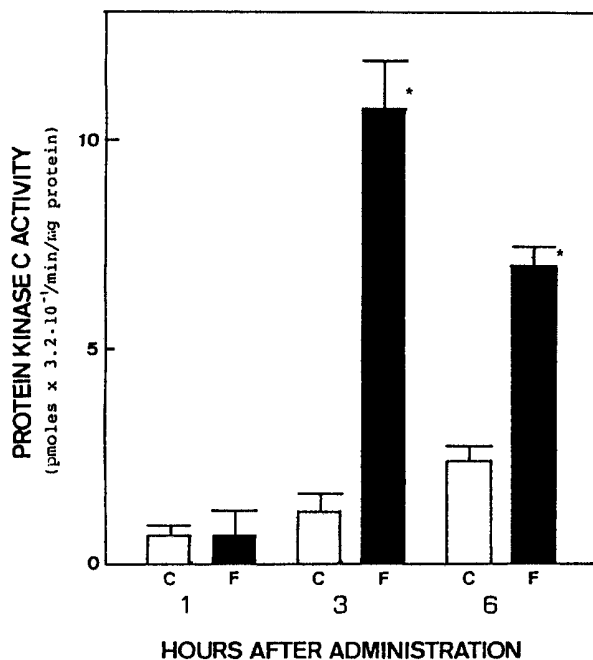


Fig. 2. Effect of Fluoride Administration on Renal Protein Kinase C Activity

Changes in the protein kinase C activity of kidney were determined at various times after a single dose of fluoride (NaF 35 mg/kg, ip) of control (NaCl 48.7 mg/kg, ip). Values are averages obtained from 4 rats. Standard errors are indicated by vertical bars. Asterisks indicate significant difference from control ( $p < 0.02$ ).

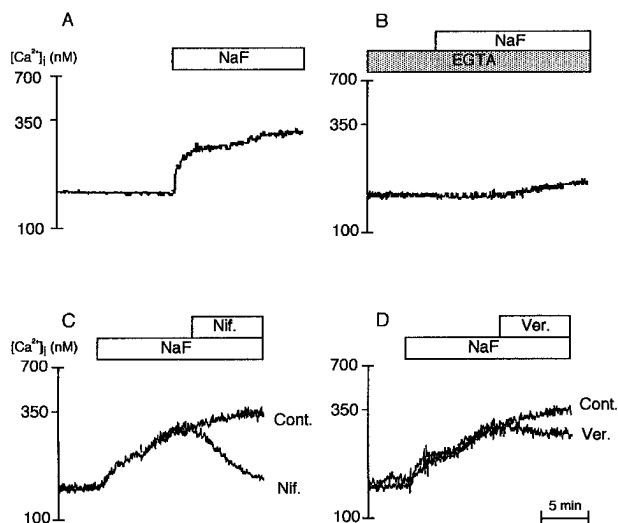


Fig. 3. Measurement of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was described in Materials and Methods

Cells were grown on cover slips and loaded with the Ca<sup>2+</sup> probe INDO 1-AM. Data show the effect of 10 mM sodium fluoride in the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup> (A), or in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> containing 500  $\mu\text{M}$  EGTA (B). And then data show that the effect of 10 mM sodium fluoride in the presence of 20  $\mu\text{M}$  nifedipine (C), or in the presence of 20  $\mu\text{M}$  verapamil (D). These results are typical in total of four experiments.

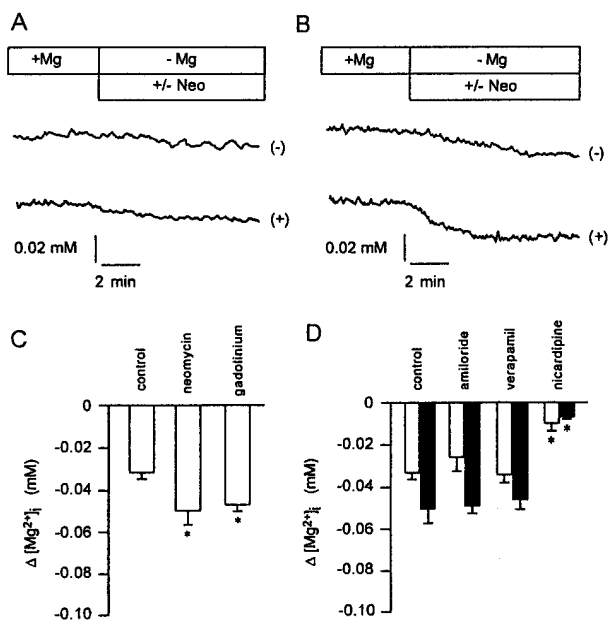


Fig. 4. Intracellular Free  $Mg^{2+}$  Concentration ( $[Mg^{2+}]_i$ ) in  $Mg^{2+}$ -Loaded NRK-52E Cells

(A) The cells were cultured in normal medium. The bathing solution was changed from  $Mg^{2+}$ -loading solution to  $Mg^{2+}$ -free solution in the absence (-) of presence (+) of neomycin (0.5 mM). (B) The cells were cultured in 10 mM  $Mg^{2+}$ -containing medium for 1-2 days. (C) The value of  $[Mg^{2+}]_i$  was assessed before and 5 min after the change of bathing solution. There indicated, the cells were exposed to the  $Mg^{2+}$ -free solution containing neomycin (0.5 mM) or gadolinium (1 mM).  $n=5-6$ . \* $p<0.05$ , significantly different from control. (D) The cells were pre-incubated with amiloride (0.1 mM), verapamil (50  $\mu$ M), or nifedipine (50  $\mu$ M) for 5 min. The bathing solution was changed to  $Mg^{2+}$ -free solution in the absence (open bar) and presence (closed bar) of neomycin.  $n=4-5$ .

株 NRK-52E を細胞外  $Mg^{2+}$  濃度を 0.8 mM から 15 mM に上昇させると CaSR-mRNA のレベルが約 2 倍に上昇することを見出した。またネオマイシンで誘導される  $[Mg^{2+}]_i$  減少はニカルジピン (50  $\mu$ M) で阻害されるが、ベラパミル (50  $\mu$ M) あるいはアミロライド (50  $\mu$ M) では阻害されない (Fig. 4)。<sup>63)</sup> こうした結果は CaSR は細胞外  $Mg^{2+}$  濃度をモニターしていて、恐らく Na 非依存性  $Mg^{2+}$  輸送系の活性化を引き起こしているものと考察した。Ebel ら<sup>64)</sup> はコリン Cl 溶媒系では、Na 非依存性  $Mg^{2+}$  流出はコリン交換体を介した非選択的輸送によって行われ得ることが示され、ヘミコリジウム-3 (HC-3)、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (DoTMA) 及びシンコニアルカロイドによって Mg 流出が阻害されたとしている。

**1-6. 電解質代謝と疾病及び加齢** Dahl 食塩感受性ラットの DahlS の  $\alpha_1$ Na/K-ATPase 遺伝子は感受性高血圧遺伝子で Q276L に突然変異のある

ことが判明している。<sup>65)</sup> また、Dahl ラットでは 18-OH-DOC 合成能に差異があり、それは DahlR の 11-deoxycorticosterone から 18-OH-DOC 及び corticosterone の両者を合成する副腎の P450c11 $\beta$  (11 $\beta$ -hydroxylase) 遺伝子の突然変異によることがこれまでに明らかになっている。<sup>66)</sup> 糖尿病発症と Na 輸送との関連性が深く、糖尿病誘導 1 日後と 8 日後の Na/K-ATPase 活性について腎の近位曲尿細管、髓質上行脚及び皮質集合管の各ネフロン分節を用いて比較し、42%と 23%、0%と 55%、81%と 45%であり、いずれにおいてもおおむね上昇している。また Na/K-ATPase  $\alpha_1$ -及び  $\beta_1$ -サブユニットの mRNA 発現についても同様にそれぞれ 52%と 22%、0%と 47%及び 140%と 110%に上昇したと述べている。<sup>67)</sup>

加齢したラット腎皮質の基底膜 Na/K-ATPase 活性は幼若のそれに比べて 40%に低下していた。またホジネートでも同様な結果が得られたとしている。<sup>68)</sup> 著者らも幼若 (5 週齢)、成熟 (25 週齢) 及び加齢 (100 週齢) ラットを用い、Marin ら<sup>68)</sup> と同様な加齢ラット腎皮質の基底膜 Na/K-ATPase 活性の低下を観察した。<sup>69)</sup> また加齢によって酵素蛋白の合成が低下するのではなく、酵素蛋白のリン酸化能の低下によるとした。<sup>69)</sup> 正常加齢 (30 ヶ月齢) ラットでは尿量増加、アンモニア排泄増加及び塩素排泄増加がみられるが、低カリウム血症ラット (F333  $\times$  BNF (1)) は対照の正常幼若ラット (4 ヶ月齢) に比して血漿アルドステロン (35%) また血漿濃度 (40%) に低下したとしている。<sup>70)</sup> また加齢したラット腎皮質の基底膜 Na/K-ATPase 活性は対照の正常幼若ラット (4 ヶ月齢) に比して低下していたが、低カリウム血症ラット (F333  $\times$  BNF (1)) では腎皮質の基底膜 Na/K-ATPase 活性は対照に比して増加していたと報告している。

## 2. 糖質代謝並びに輸送系

糖質は三大栄養素のなかで生物のエネルギー産生、すなわち ATP 産生にとって最も重要なものである。解糖系で上方に向かえば貯蔵性が増し、下方へ向かえば、より効率的な酸化的リン酸化反応へと向かうことになる。こうしたことから、糖質の代謝及び輸送は生命の保持にとって必須な系であり、その調節系は生命体の恒常性維持にとって重要である。血糖の調節は、生体にエネルギーを安定供給す



るための機能であり、糖新生、解糖及び糖の吸収/再吸収により行われている。

**2-1. G6P 水解酵素の活性調節におけるプロテインキナーゼ C の役割** PKC は様々な細胞機能調節を行っており、促進的な働きのみならず負の調節 (down regulation, negative feedback control) にも関与しており、次に示す例はそれである。ラット塩基性白血病細胞を TPA で処理すると細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  存在下に抗原刺激をしても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加は観察されないことから、TPA による PKC の直接刺激で Ca-チャンネルが閉じると考えられていること<sup>71)</sup> など多数が知られている。

著者らはフッ素投与による一過性のグルコース-6-リン酸 (G6P) 水解酵素活性の上昇の正常値への回復期に PKC が働いているという仮説をたてて、H-7<sup>72)</sup> (PKC の特異的阻害剤) をフッ素投与直後に投与して、フッ素による G6P 水解酵素活性上昇の PKC による抑制効果が H-7 処理でどの程度解除されるかを調べた。<sup>73)</sup> その結果、H-7 処理では約 44% の有意な抑制解除が観察されたが、W-7<sup>74)</sup> (CaM 依存性キナーゼの特異的阻害剤) 処理では約 30% 抑制解除されたものの有意な変化ではなかった。こうした結果は仮説を支持するもので、PKC が G6P 水解酵素活性の down regulator として機能している可能性が強いことを示した。<sup>55,73)</sup> また Ca 依存性プロテアーゼ (CANP) の活性上昇は観察されなかったことから、CANP はこの酵素活性の down regulator ではないとした。<sup>55,73)</sup>

**2-2. フッ素と糖質代謝異常** 動物のフッ素症で従来から言われている特徴的なものは、骨粗鬆症及び斑状歯であるが、急性的なものとして血糖上昇、尿糖増加や尿量増加が特徴である。著者らは血糖及び尿糖の増加に着目し、まず糖質代謝の側からその機構を調べることにした。その結果、解糖系関連酵素群でフッ素投与により活性上昇するものは、ただ 1 つ G6P 水解酵素活性であった (Fig. 5)。<sup>75-80)</sup> この上昇は、フッ素投与によるフッ素イオンそのものによる 1 次作用ではなく、2 次作用であることが推測された。こうしたことから、まず酵素蛋白の修飾によるものか、あるいは酵素蛋白の増加によるものかを検討した。その結果、活性上昇の要因の 1 つは転写及び翻訳レベルの上昇、つまり酵素蛋白そのものの増加によることが明らかとなった。<sup>76)</sup> また、

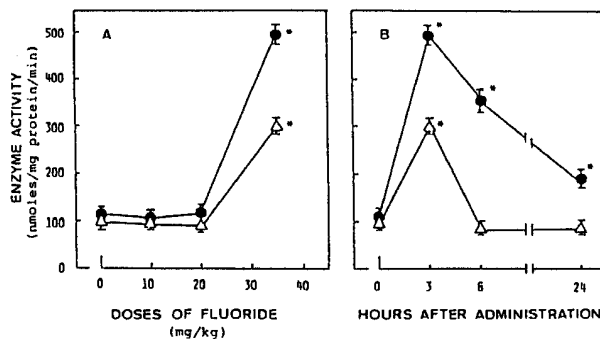


Fig. 5. Response of Hepatic and Renal Glucose-6-Phosphatase Activity to Fluoride Dose (A) and Changes in the Enzyme Activity after the Fluoride Dose (B)

The rats were killed 3 hr after various fluoride doses as shown in A. Changes in the enzyme activity were determined at various times after a single fluoride injection (NaF, 35 mg/kg, i.p.). Standard errors are indicated by vertical lines. Asterisks indicate significant difference from control ( $p < 0.02$ ). ●, Liver; △, Kidney.

その上昇は副腎摘出によって、ほぼ完全に抑制されるが、甲状腺/副甲状腺摘出によって有意な影響は観察されなかったことから、副腎機能亢進によるものとした (Table 3)。<sup>77,78)</sup>

**2-2-1. G-蛋白質とフッ素**—フッ素は Rall によりアデニレートシクラーゼの活性化因子の 1 つに挙げられていること<sup>51)</sup> も 1-4-1. で既に述べた。著者らはフッ素投与したラットの腎臓及び肝臓における代謝異常の機構を解明する過程で、フッ素を腹腔内投与 1 時間後にそれぞれの臓器で cAMP 濃度が 2 及び 3 倍に上昇することを報告した (Fig. 6)。<sup>79)</sup> またその際、血清中 cAMP 濃度は 10 倍以上になることを観察した。これらの cAMP 濃度の上昇は G6P 水解酵素活性上昇に先行して現れ、これが G6P 水解酵素活性上昇の引き金になっているものと推測している。<sup>79)</sup> 一方、フッ素がなぜアデニレートシクラーゼ活性を上昇させるかは長い間不明であった。しかし 1982 年にフッ素によるアデニレートシクラーゼ活性上昇が  $\text{Be}^{2+}$  などの無機イオン添加によりさらに増強され、なかでも  $\text{Al}^{3+}$  が最も強力であることが報告された。<sup>53)</sup> また G 蛋白質である  $\text{T}\alpha$  と  $\text{Al}^{3+}$  の結合様式がリン酸の構造に酷似した空間配位をとることが報告されている。<sup>81)</sup>

興味を引くのは、フッ素濃度 (NaF) が 5—10 mM 必要であるのに対してアルミニウム濃度 ( $\text{AlCl}_3$ ) が 10  $\mu\text{M}$  と低いことである。<sup>53)</sup> 高いフッ素濃度が必要なのは組織や細胞内にある Ca などに結

Table 3. Effect of Adrenalectomy on Elevation of Renal and Hepatic Glucose-6-Phosphatase Activity Induced by Fluoride Administration

	Liver			Kidney		
	Enzyme activity <sup>a)</sup>	Relative value (%)	Suppression by adrenalectomy (%)	Enzyme activity <sup>a)</sup>	Relative value (%)	Suppression by adrenalectomy (%)
Control (NaCl)						
Intact	117.1 ± 5.5	100	0	100.7 ± 0.6	100	0
Adrenalectomized	113.3 ± 12.1	96.8	3.2	60.7 ± 6.7	60.3	39.7 <sup>b)</sup>
Fluoride (NaF)						
Intact	497.4 ± 16.8	425	0	300.3 ± 13.7	298	0
Adrenalectomized	115.3 ± 16.7	98.5	101 <sup>c)</sup>	46.0 ± 1.2	45.7	128 <sup>c)</sup>

The animals were killed 3 hr after the administration of NaF (35 mg/kg, i.p.) or NaCl (48.7 mg/kg, i.p.) (control). Values are means obtained from 6 rats ± standard error. *a)* Enzyme activity is expressed as nanomoles of P<sub>i</sub> liberated per milligram of protein per minute. *b)* Significant suppression by adrenalectomy ( $p < 0.02$ ). *c)* Significant suppression by adrenalectomy ( $p < 0.005$ ).

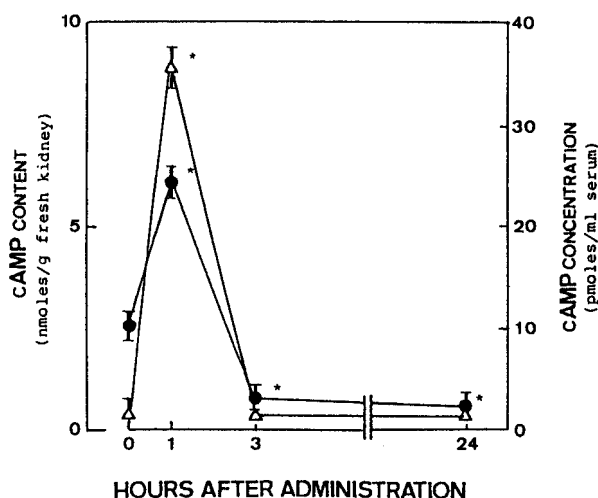


Fig. 6. Changes in Cyclic AMP in Kidney and Serum after Fluoride Administration

The rats were killed at various times after single large dose of fluoride (NaF 35 mg/kg, ip). Values are averages obtained from 4 rats ± SE. Asterisks indicate significant difference from control ( $p < 0.02$ ). ●: Kidney, △: Serum.

合することによって消費されるためであろう。フッ素投与1時間後に腎細胞膜結合型G蛋白質は最高の上昇(対照に比べ約1.4倍)を示し、投与6時間後でも対照の1.2倍と高く、緩やかに正常値に戻りはじめる (Fig. 7).<sup>55)</sup> 一方、細胞質型のG蛋白質はフッ素投与後数時間まで直線的に増加する。<sup>55)</sup> こうした著者らの結果、つまりフッ素によるG蛋白質の上昇とcAMP活性化がよく符合していて、G蛋白質がアデニレートシクラーゼ系の活性化を制御しているという説を支持するものである。<sup>53)</sup>

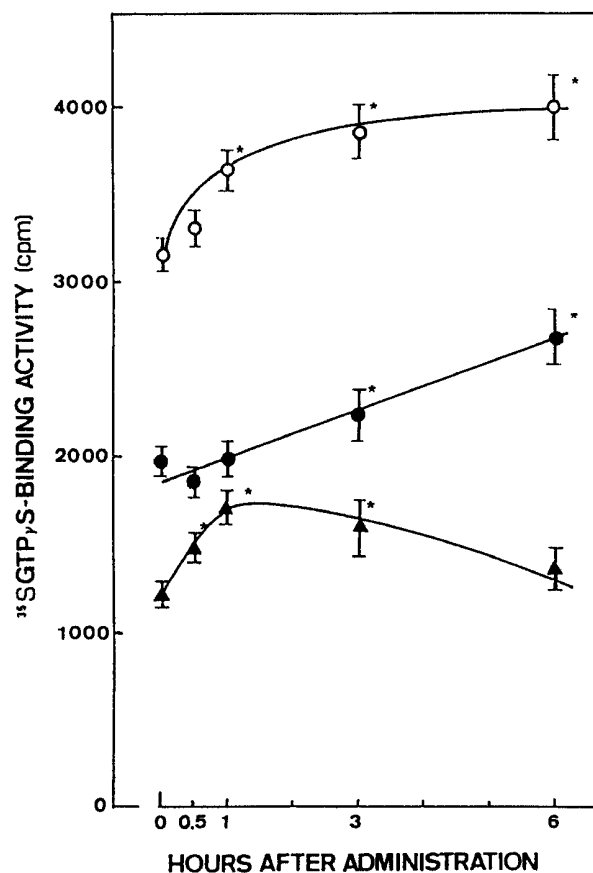


Fig. 7. Effect of Fluoride Administration on GTP-Binding Protein in Plasma Membranes and Cytosol of Kidney

Changes in the protein in plasma membranes (▲) and cytosol (●) of kidney were determined at various times after a single large dose of fluoride (NaF 35 mg/kg, ip). Values are averages obtained from 4 rats ± SE. Asterisks indicate significant difference from control ( $p < 0.02$ ). ○: Total GTP-binding protein.

2-2-2. プロテインキナーゼ C 活性とフッ素——PKC が発見された当時、その活性化機構としてホスホリパーゼ C の活性化により PIP<sub>2</sub> から遊離された DG に加えて、Ca が必要とされていた。その後、種々のアイソフォームが分離され、また Ca を必要としないアイソフォームも発見された。フッ素投与により腎 PKC 活性は亢進され、その最高値は投与 3 時間後に現れ対照の正常の約 10 倍にも達し、その後、緩やかに回復していくことが示された。<sup>55)</sup> 一方、悪性化したマクロファージの変異株 PB3 などでは膜結合が多く存在し、いわゆるスイッチ・オンの状態が持続するためであろうとした発癌機構の説明の 1 つになっている。<sup>82)</sup> こうしたことから、腎細胞内においてホスホリパーゼ C の活性化が PKC 活性上昇の律速酵素であっても、これらの情報伝達には細胞質 Ca 濃度などが介在していることも想像され、事実、著者らは腎細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入の上昇を観察している。<sup>55)</sup> これと PKC 活性の亢進が非常によく相関している。またフッ素投与による腎細胞質型 PKC 活性の亢進について、PKC に特異的な阻害剤の一種の H-7 と Ca カルモデュリン依存性プロテインキナーゼに特異的な阻害剤の 1 つである W-7 を濃度を変えてインキュベ

ション系に加えそれぞれの影響を調べ、前者の方が後者に比べ 1000 倍以上も強力に抑制した。<sup>83,84)</sup>

2-3. 糖の吸収/再吸収と糖輸送体 腎臓における D-グルコース再吸収機構は腎上皮細胞を介して刷子縁膜から基底膜へと経細胞的に輸送され、前者の膜には Na<sup>+</sup> 依存性の Na<sup>+</sup>/グルコース共輸送体 (sodium dependent glucose cotransporter, SGLT) が、後者の膜には Na<sup>+</sup> 非依存性の促進拡散型グルコーストランスポーター (facilitative glucose transporter, GLUT) が分布し、その輸送を担っている。腎尿細管の刷子縁膜 (管腔膜) 側での吸収は Na<sup>+</sup> の電氣的及び化学的勾配に従ってグルコースは 2 次的な能動輸送系により細胞内に輸送される。この輸送系が、<sup>85)</sup> いわゆる SGLT である。一方、側基底膜では上皮細胞内に取り込まれた Na イオンは側基底膜に存在する Na ポンプにより血管側に能動輸送され、グルコースは側基底膜に存在する GLUT を介して血管側へと受動輸送される (Fig. 8)。

2-3-1. Na 非依存性糖輸送体 GLUTs——グルコース、ガラクトース、フルクトースなどの単糖を輸送する促進拡散型グルコーストランスポーター (GLUTs) は、現在 GLUT1-12 の合計 12 種が報告されている。なかでも GLUT4 はインスリン感受性

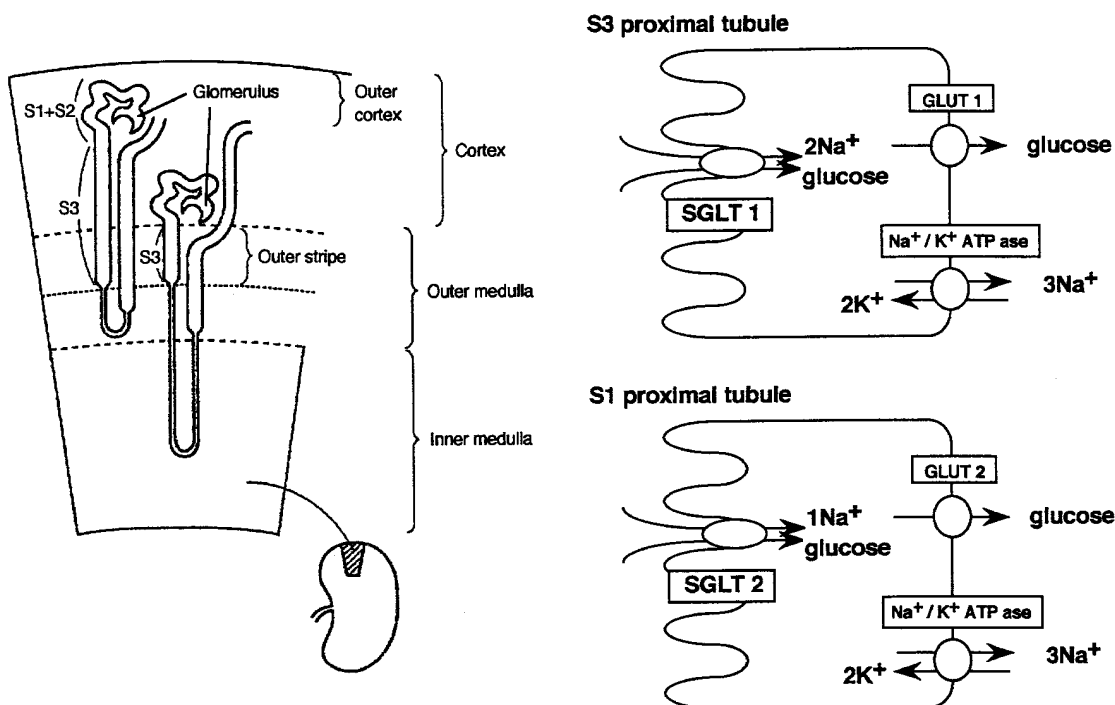


Fig. 8. Schematic Model of Transepithelial Glucose Transport in Proximal Tubule of Kidney

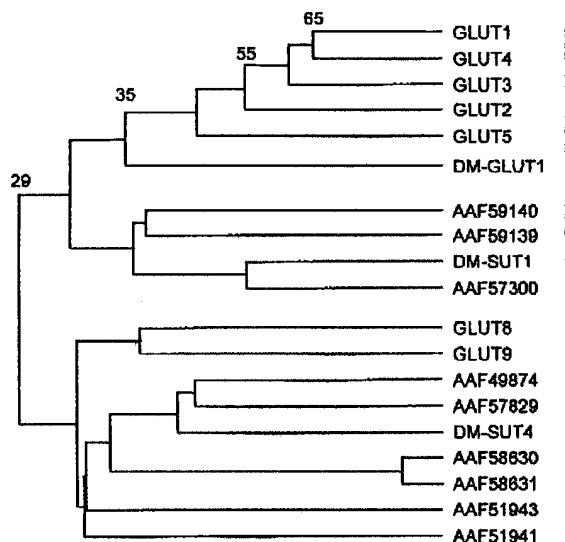


Fig. 9. Dendrogram of a Multiple Alignment of the Mammalian and *Drosophila* Sugar Transporters

The *Drosophila melanogaster* proteins with the highest similarity to the human GLUT1 were identified with a BLASTP search, and an alignment was performed with the CLUSTAL program (open gap cost 10, unit gap cost 10). Numbers at the branches of the tree indicate percentage identity. GLUT proteins represent the human isoforms. AAF codes, DM-GLUT1, DM-SUT1 and DM-SUT4 represent *Drosophila* proteins.

組織である骨格筋、心臓及び脂肪細胞に分布している、その機能解析が最も進んでいるトランスポーターで興味ある知見が多く報告されている。これらのトランスポーターは組織局在性があり、分子量は45—55 kDで、すべて12回膜貫通型モデルであることが示されている。このファミリーは、そのホモロジーから Fig. 9 のような系統樹が得られ、生物の進化過程はいかに効率的にエネルギーを獲得するかの過程でもあり、そうしたことから GLUT の進化は興味を持たれる。一方、薬物トランスポーター、有機カチオン、有機アニオン及びペプチドトランスポーターを含めた大きなスーパーファミリーを形成していて、これらはいずれも12回膜貫通型モデルの構造を有している。

GLUT1-5はいずれも細胞膜に存在し、腎臓や小腸の刷子縁膜には GLUT5 が分布し、ヒトの筋肉や脂肪細胞にも発現している。<sup>86)</sup> また、GLUT2 はそれぞれの基底膜に存在していて糖の再吸収や吸収に重要な役割を担っている。糖尿病を持つヒトやラットでは腎尿細管でのグルコース再吸収は事実上昇していて、長期間未治療の場合、腎尿細管では GLUT2 の過剰発現が予測されるとしており、低親

和性の GLUT2 の増加を認めている。それは糖再吸収が血管側への促進型のグルコース放出によって上昇することが証明されたことになり、その放出は高血糖症では律速となっていることを示している。<sup>87)</sup>

GLUT1 は赤血球、血液組織関門、心臓に局在し、メサングウム細胞では GLUT1 のみしか分布していない。腎尿細管障害は日常的に存在していて回復する場合と細胞死する場合とがあり、その過程の機構については関心がもたれる。GLUT1 と glucose-regulated proteins (GRPs) が共にストレス時に上昇する<sup>88)</sup> ことに注目し、またストレス時に細胞内 Ca が上昇するという知見からブタ腎上皮細胞株 LLC-PK<sub>1</sub> を用いて Ca イオノフォア A23187 により実験的に細胞内 Ca 上昇をさせ、GLUT1-mRNA の発現上昇が観察されている。<sup>89)</sup> GLUT3 はニューロンに多く存在しているもので、培養細胞株を用いた強制発現では頂端側膜に発現されることが認められている。GLUT7 は肝細胞の小胞体に存在しているが、GLUT8 は睾丸に特異的に分布していることが知られていて、GLUT1 に対するホモロジーは 29.4% である。GLUT9 は GLUT5 に 44%、GLUT1 に 38% のホモロジーがあり、脾臓、末梢リンパ球及び脳に分布している。<sup>90)</sup> GLUT1、GLUT3 及び GLUT4 は高親和性である。一方、GLUT2 (Km=17 mM) 及び GLUT5 は低親和性で、それぞれの遺伝子は、ヒトでは前者は染色体の 3q26.1-q26.2 に、後者は 1p36.2 にマップされている。<sup>91)</sup> また GLUT5 はフルクトースしか輸送しない。<sup>92)</sup>

2-3-2. Na 依存性糖輸送体 SGLTs の特徴——Na 依存性糖輸送体は Na/グルコース共輸送体とも和訳され、その略称が SGLT である。SGLT には、現在までに SGLT1、SGLT2 及び SGLT3 の 3 種類のアイソフォームが知られている。このファミリーにはナトリウム依存性イノシトールトランスポーター (SMIT1)、Na 依存性ヌクレオシドトランスポーター (SNST) など数種が知られている。また真核生物だけでなく、大腸菌などの原核生物にも広く分布し、Na 依存性のプロリントランスポーター (PutP)、パントテン酸トランスポーター (panF) なども同族で、糖質以外のものを基質とする一群のナトリウム依存性トランスポータースーパーファミリーを形成している。<sup>85)</sup>

a. 高親和性/低容量の糖輸送体 SGLT1 と糖/水

輸送 SGLT1 は、1987年 Hediger らによりクローニングされたもの<sup>93)</sup>で、ヒトでは664個のアミノ酸残基からなる分子量73 kDaの膜蛋白質で、当初は膜を11回貫通しているモデルが提唱されていた<sup>94)</sup>が、現在では14回膜貫通型モデルが一般的に受け入れられている。<sup>95)</sup>腎臓ではS3分節を中心とする外髄質、つまり近位尿細管の刷子縁膜に局在し、その主な発現組織は消化管では小腸で、食道、胃、大腸には確認されていない。腎SGLT-mRNAの発現はラットでは胎生期の18日目にはじまり、生後1日目まで増加するといわれている。<sup>96)</sup>

ちなみにヒトSGLT1はプローブとしてウサギSGLT1を用いて小腸cDNAライブラリーから単離され、<sup>95)</sup>その遺伝子は染色体22q13.1に組み込まれている。<sup>97)</sup>SGLT1はグルコース、ガラクトースを基質としNaとグルコースの輸送比が2:1で、グルコースに対するKmは0.1—0.4 mM (Na<sup>+</sup>100 μM)で、高親和性で低容量のグルコーストランスポーターの性質を示している。また、フロリジンで強く阻害され、Kiは動物種により異なり0.01 μM—0.2 mMで、ヒトでは0.2 mMである。<sup>98)</sup>グルコーストランスポーター蛋白質が、どんな機構で細胞膜を介して基質と複合体を形成するのかが明らかでなかった。そこでLooらはSGLT1の糖の移行ドメインQ457をCys残基に置換してローダミン-6-マレイイミドでラベルして調べた電位ジャンプなどから、Q457C変異体は糖輸送能を有していたが、メタンチオスルホネート試薬でのアルキル化後では消失してしまうことを証明した。このアルキル化反応にはNa<sup>+</sup>を必要とし、糖及びフロリジンにより阻害され、前定常期の直後に蛍光の変化を観察したことから、これらの結合にはコンホメーション変化が伴っていると結論している (Fig. 10).<sup>99)</sup>

最近、ヒトSGLT1を発現させたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞では強力な水輸送活性を生ずることが発見され、<sup>100)</sup>その輸送能はNa<sup>+</sup>2分子、グルコース1分子に対して水210—220分子にも達するという新知見が加わった。<sup>101)</sup>これについては非代謝性基質であるα-メチルグルコース (αMG) 5 mMでは120±20 pLs<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>に達する水流入 (*J<sub>w</sub>*) を伴った内向きの800±10 nAのNa電流を生じ、またフロリジンにより局所浸透勾配がSGLT1に共役して水輸送を駆動することが証

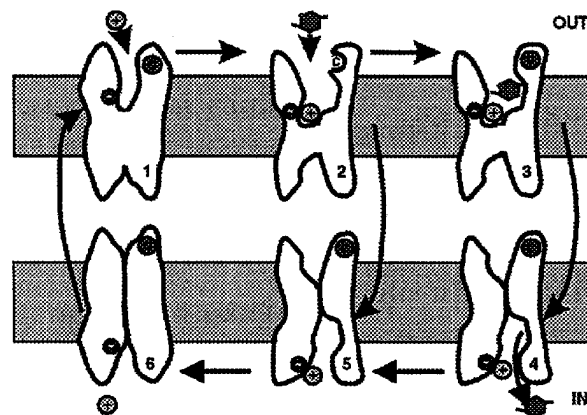


Fig. 10. An Alternative Access Model with 6 Conformational States (1-6) that Accounts for the Transport Properties of SGLT1

Cysteine residue (C) in Q457C SGLT1 is indicated as being in 2 forms: one accessible and another not accessible to external methanethiosulfonate reagents.<sup>119)</sup>

明されている。最近、小腸SGLT1活性はアルギニンバソプレシン (0.5 μM) によって亢進されるが、アルドステロン (0.5 μM) では何の変化もみられていないとの報告は興味のある知見である。<sup>102)</sup>

b. 低親和性/高容量の糖輸送体のSGLT2及びSGLT3 ヒトの腎ではS1/S2分節の外皮質、つまり近位曲尿細管の上皮細胞の刷子縁膜側に強く発現するSGLTが発見され、これまで知られていたものとは性質を異にする低親和性 (~2 mM) で高容量のものでSGLT2と命名された。<sup>103)</sup>SGLT2はアフリカツメガエル卵母細胞による発現系ではその輸送活性は強くないが、pSGLT2 (現在、SGLT3名称変更) と同様な性質を持っていることを明らかにしている。<sup>104)</sup>Naとグルコースの輸送比は1:1で、ガラクトース以上にグルコースに対する選択性が高い。SGLT1とは対照的にSGLT2-mRNAの発現は胎生期の17日目に始まり19日目にかけて増加し、その後、胎生期19日目と生後1日目の間で降下することが知られている。<sup>96)</sup>このSGLT2遺伝子は染色体16p11.2にコードされていて、またその蛋白質の分子量は73 Kdで、アミノ酸配列はSGLT1と59%のホモロジーを持っている。<sup>102)</sup>現在、SGLT2の制御機構等についてはいまだ不明な点が多く存在している<sup>105)</sup>ものの、SGLT2は腎にのみ特異的に発現しており、腎において実際に糖の再吸収にとって大きな役割を果たしているトランスポーターであると推察されており、S1分節を中心に近

位尿細管に発現している。

SGLT3は従来 pSGLT2 と呼ばれていたものが昨年、名称変更されたものである。<sup>106)</sup> pSGLT2 は最初にブタのシステム A アミノ酸トランスポーター SAAT1 (Sodium dependent amino acid transporter)<sup>107)</sup>としてクローニングされたが、低親和性グルコーストランスポーターであることが分かり、次いで pSGLT2 と変更され、昨年までこのように呼ばれていた。<sup>104)</sup> SGLT3 はグルコースの非代謝性基質である  $\alpha$ MG に対する  $K_m$  は 2 mM で、グルコースに対しては 6 mM であるが、ガラクトースはほとんど通さない。また、 $\text{Na}^+$  に対する  $K_m$  は 10 mM で  $\text{Na}$  とグルコースの輸送比が 2 : 1 であり、フロリジンに対する  $K_i$  は 1 mM である。これらの性質は、すでに生理学的に解明されているグルコーストランスポーターの SGLT2 の性質に似ていて、<sup>108)</sup> この SGLT3 遺伝子は染色体 22p12.1-12.3 にコードされていることが最近明らかになっている。<sup>109)</sup> SGLT3 のアミノ酸配列はラット SGLT1 に対して 78% のホモロジーがあり、ラット SGLT2 に対してはたった 60% のホモロジーしかない。

2-3-3. 糖輸送体の調節とトラフィッキング——GLUT4 は筋肉や脂肪細胞に存在し、通常、細胞内のインスリン感受性コンパートメント内に留まっているが、インスリンにより細胞膜上に移行してグルコース輸送活性を発現し、インスリンがなくなると GLUT4 は再び細胞内に移行して糖輸送活性が低下するというリサイクル機構により調節されている。<sup>110)</sup> マウスの腎傍糸球体細胞での GLUT4 とレニンとの選り分けやトラフィッキングが注目されているが、両者は全く別な経路で行われていることが形態学的に証明されている。<sup>111)</sup> また、このトラフィッキングや GLUT4 の小胞へのドッキングには syntaxin-4/Munc-18c/VAMP2 が関与している。<sup>112)</sup> このようにトラフィッキングに関わる分子や分子相互の作用が次第に解明されてきている。

GLP-2 (グルカゴン様ペプチド 2) をインフュージョンすると刷子縁膜小胞に有意なオーバーシュートを伴った  $\text{Na}$  依存性のグルコース取り込み増加が引き起こされ、ウエスタンブロッティングにより SGLT1 の上昇と相関していることが確認されている。<sup>113)</sup> また、GLP-2 の効果は管腔側に Brefeldin A や Wortmanin を添加するとブロックされることか

ら、GLP-2 は SGLT1 の細胞内プールから刷子縁膜へのトラフィッキングを誘導する作用を持っていると解釈している。著者ら<sup>114)</sup>は、アンジオテンシン II に SGLT1 活性抑制作用のあることを見出し、トラフィッキングの抑制あるいは down regulation に関与しているらしいことが明らかになりつつある。

2-3-4. 糖輸送体と疾病及び加齢——糖尿病患者や糖尿病ラットでは腎近位尿細管の GLUT2 が過剰発現していることが報告されている。<sup>87)</sup> Fanconi-Bickel 症候群では、重篤な腎尿細管機能障害とくる病を持つ肝腎糖新生増多症が特徴となっており、これらの症候群を有する 3 家系では GLUT2 に P417L の突然変異があり、それとの相関性が明らかになっている。<sup>115)</sup> 一方、ZDF 糖尿肥満ラットの膵  $\beta$  細胞での GLUT2 発現は糖尿病の  $\beta$  細胞機能障害発症の際に激減し、この ZDF ラットにレプチン受容体を過剰発現させると GLUT2、グルコキナーゼ及びグルコース刺激インスリン分泌は回復する。<sup>116)</sup>  $\beta$  細胞の GLUT2 及びグルコキナーゼはグルコース刺激インスリン要求性でレプチン感受性であるが、ZDF ラットはレプチン受容体遺伝子の優性遺伝でレプチン非依存性である。つまり、このことが ZDF ラットの糖尿病発症の原因となっている。

SGLT が関与する疾患としては、小児での先天性ガラクトース・グルコース吸収不全症があり、SGLT1 異常により引き起こされることが報告されている。<sup>117)</sup> これは小腸におけるガラクトース及びグルコースの吸収障害によるものである。一方、SGLT1 の糖結合部位は C 末端ヘリックスのいわゆる C<sub>5</sub> (407-664) に存在し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させるとグルコースのユニポータとしての発現型を示すことが知られている。先天性ガラクトース・グルコース吸収不全症をもつ患者では Q457R に突然変異のあることが明らかにされており、<sup>118)</sup> 既に、その遺伝子診断にも役立っている。著者ら<sup>119)</sup>は、食塩感受性高血圧発症ラットの Dahl ラット (DS) では高食塩食により腎 SGLT1 のセリンリン酸化反応が促進されるのに対して腎  $\text{Na}/\text{K-ATPase}$  ではチロシンリン酸化反応が抑制されることを見出している。しかしながら、SGLT2 に関しては家族性腎性糖尿病への関与は示唆されている<sup>120)</sup>ものの、現在、その発症機構を含めて不明な点が多い。著者ら<sup>105)</sup>は SGLT2 の新規な 3 種のサブ

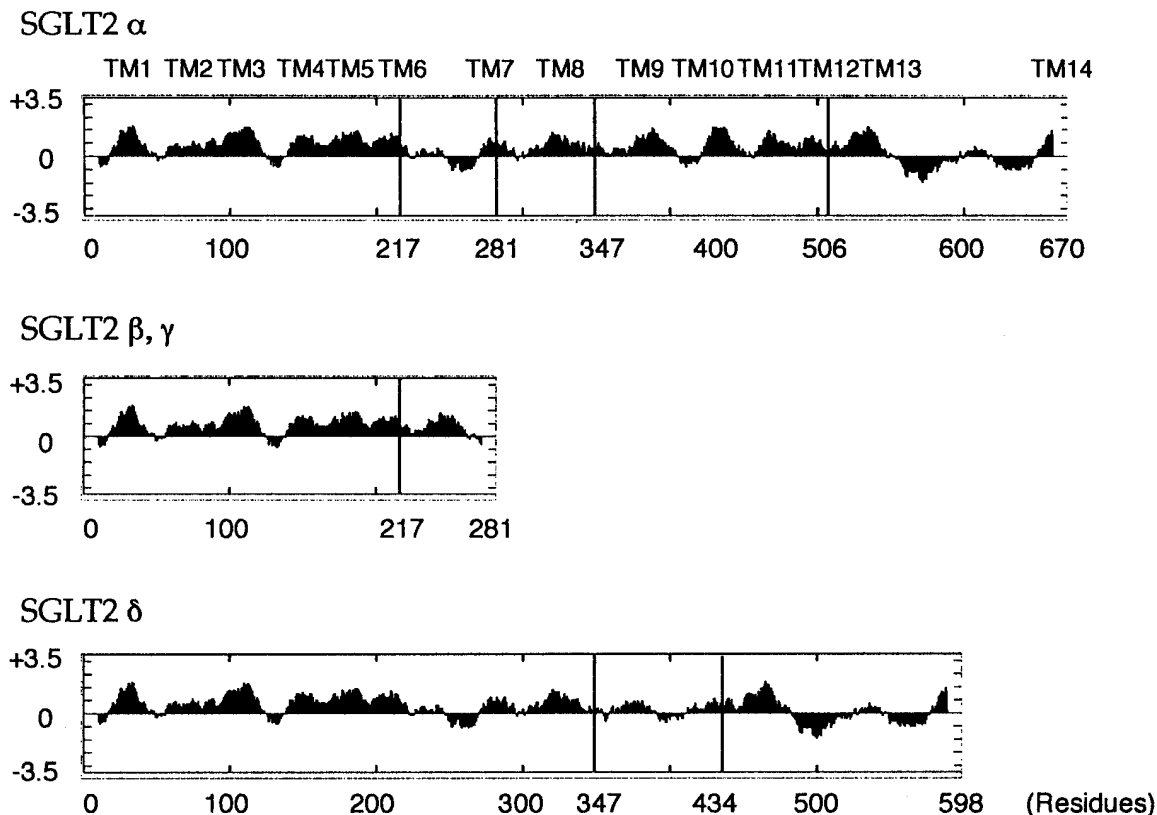


Fig. 11. Hydrophobicity Plots of Rat SGLT2 Isoforms

タイプを発見した (Fig. 11) が、これらはこの疾病の原因解明に繋がる可能性もある。

Armoni ら<sup>121)</sup>は脂肪細胞の基底膜の 3-O-メチルグルコース輸送速度は加齢によって影響を受けず、またそれは加齢で GLUT のレベルが影響を受けないことと相関していた。しかしインスリンで活性化されるグルコース輸送は加齢したラット (18 ヶ月齢) では 60%低下していた。インスリンは GLUT の基底膜へのトランスロケーションを促進する作用を持っていて、インスリンにより GLUT 機能活性は 6 倍にまで上がるが、その効果は幼若ラット (1.5 ヶ月齢) に比して加齢ラットでは 40%まで減少していたとしている。ラットのフルクトース輸送体 (GLUT5) は授乳期の後に通常現れるが、早期に高フルクトース食で飼育すると早熟的に誘導され得る。<sup>122)</sup> 高グルコース食で飼育した授乳期のラットでは、GLUT5-mRNA 発現は主に微絨毛の上部 3/4 に分布するが、その基部にはほとんど発現しない。またフルクトースで飼育した場合には、GLUT5-mRNA 発現は微絨毛の基部を除いて全域

に 2—3 倍になるとしている。脳の微小血管 GLUT1 の分布について大脳皮質では変化は有意ではなかったが、成熟>SAMP8>スクレイピー感染>加齢ラットの順で減少した。一方、海馬では、>成熟>加齢>スクレイピー感染>SAMP8 (早老症) ラットの順で有意な減少を示したとしている。<sup>123)</sup>

#### おわりに

電解質及び糖質の輸送と代謝について、環境毒性の側面から労働環境及び/又は生活環境に関わりの深いもののなかから、地域に密着した鉛中毒とフッ素症を研究課題に選び、研究を始めることとした。静岡県には鉛ガラスを製造/成形する工場が、またフッ素化合物を融剤とするアルミニウム精錬工場が立地していたことが研究の発端である。

鉛中毒ではポルフィリン代謝異常が特異的と言われているが、密造酒としてムーンシャインウイスキーによる鉛中毒ではレニン活性の低下などが報告されていた。これは鉛作業者の健康管理上、アルコール飲酒愛好者に対する配慮から、応用基礎研究

をレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系と電解質, 特に Na に焦点を絞って研究した。また, フッ素症については, インド, アフリカ及び中国における疫学的な問題, また欧米では齲歯予防から水道水のフルオリドーション, 酸性フォスファターゼ活性上昇による骨粗鬆症の治療などから研究対象として Ca 代謝, 糖代謝, Na, 水の再吸収 (多尿症との関連) と関連した研究を推進した。

その後, 退官までの 10 余年間は, これらの研究に神経系及び免疫系の分野を研究対象に加え, 主として生活習慣病あるいは加齢との関連で高血圧症, 糖尿病, 神経障害並びに骨粗鬆症の発症機構の解明へと研究の方向を変えながら, 現在に至っている。

さて, 電解質輸送に関連した Na/K-ATPase, Ca-ATPase, Ca チャネルに関する研究の現状を鳥瞰すると一次構造はほとんど解明されたといつてよい。これらの遺伝子発現とその調節のさらなる解明, 欠損, 突然変異の部位のさらなる解析, その他, 新規的な機構解明に向けたアプローチ, 加齢と遺伝子に関するさらなる研究などはヒトゲノム解析が一応終了した今, より新たな展開の模索に向かって進むことを期待したい。糖輸送蛋白質である SGLTs や GLUTs の X 線回折による立体構造解析はいまだ進展していないが, 近い将来明らかにされるであろう。また, SGLTs や GLUTs に関連した疾病などの原因遺伝子が同定されるに従って遺伝子診断に実用されているが, さらに遺伝子治療また治療薬の開発へと研究が発展することが期待される。

著者らの研究のうち神経系及び免疫系の研究成果については, 紙面の都合で割愛することとした。

## REFERENCES

- 1) Summa V., Mordasini D., Roger F., Bens M., Martin P.-Y., Vandewalkle A., Verrey F., Féaille E., *J. Biol. Chem.*, **276**, 47087-47093 (2001).
- 2) Rokaw M. D., West M. E., Palevsky P. M., Johnson J. P., *Am. J. Physiol.*, **271**, C194-C202 (1996).
- 3) Therien A. G., Blostein R., *Am. J. Physiol.*, **279**, C541-C566 (2000).
- 4) Feraille E., Carranza M. L., Rousselot M., Favre H., *Am. J. Physiol.*, **267**, F55-F62 (1994).
- 5) Grindstaff K. K., Blanco G., Mercer R. W., *J. Biol. Chem.*, **271**, 23211-23221 (1996).
- 6) Fryckstedt J., Aperia A., *Acta Physiol. Scand.*, **144**, 185-190 (1992).
- 7) Blot-Chabaud M., Coutry N., Laplace M., Bouvalet J.-P., Farman N., *J. Membrane Biol.*, **153**, 233-239 (1996).
- 8) Foley T. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 374-376 (1997).
- 9) Nowicki S., Chen S. L., Aizman O., Cheng X. J., Li D., Nowicki C., Nairn A., Greengard P., Aperia A., *J. Clin. Invest.*, **99**, 1224-1230 (1997).
- 10) Karmazyn M., Tuana B. S., Dhalla N. S., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 1122-1127 (1981).
- 11) Feschenko M. S., Sweadner K. J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17726-17733 (1997).
- 12) Feschenko M. S., Stevenson E., Sweadner K. J., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34693-34700 (2000).
- 13) Belusa R., Wang Z.-M., Matsubara T., Sahlgren B., Dulubova I., Nairn A. C., Ruoslahti E., Greengard P., Aperia A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20179-20184 (1997).
- 14) Chibalin A. V., Pedemonte C. H., Katz A. I., Féaille E., Berggren P.-O., Bertorello A. M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 8814-8819 (1998).
- 15) Arytstarkhova E., Donnet C., Asinovski N. K., Sweadner K. J., *J. Biol. Chem.*, **277**, 10162-10172 (2002).
- 16) Devarajan P., Scaramuzzino D. A., Morrow J. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2965-2969 (1994).
- 17) Devarajan P., Stabach P. R., Matteis M. A. D., Morrow J. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10711-10716 (1997).
- 18) Grisham C. M., "The Structure of the Na/K-ATPase. Implications for the Mechanism of Sodium and Potassium Transport. Advances in Inorganic Biochemistry Vol. 1," ed. by Eichhorn G. L., Marzilli L. G., Elsevier/North-Holland, The Netherlands, 1979, pp. 193-218.
- 19) Missiaen L., Wuytack F., Smedt H. D., Vrolix M., Casteels R., *Biochem. J.*, **253**, 827-833 (1988).
- 20) Sandstead H. H., Michelakis A. M., Temple J. E., *Arch. Environ. Health*, **20**, 356-363 (1970).



- 21) Waldron A. H., Stöfen D., "Subclinical Lead Poisoning," Academic Press, London (1971).
- 22) Suketa Y., Aoki M., Yamamoto T., *J. Toxicol. Environ. Health*, **1**, 127-132 (1975).
- 23) Suketa Y., Yamanaka N., Yamamoto T., *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**, 25-29 (1976).
- 24) Suketa Y., Kawamoto J., *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**, 663-669 (1977).
- 25) Suketa Y., Hasegawa S., Yamamoto T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 203-207 (1979).
- 26) Suketa Y., Ujiie M., Okada S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 230-237 (1981).
- 27) Suketa Y., Ujiie M., Okada S., *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2913-2919 (1982).
- 28) Suketa Y., Nishimura Y., Nakajima M., Ueda M., Okada S., *Toxicol. Lett.*, **32**, 221-226 (1986).
- 29) Suketa Y., Ban K., Yamamoto T., *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2293-2297 (1981).
- 30) Young R. A., van der Lugt W., Elliott J. C., *Nature*, **223**, 729-730 (1969).
- 31) Burke G., *Endocrinology*, **86**, 346-352 (1970).
- 32) Cohn S. H., Dombrowski C. S., Hauser W., Atkins H. L., *Am. J. Clin. Nutr.*, **24**, 20-28 (1971).
- 33) Hodge H. C., "Fluorides and Human Health," WHO monogram series, No. 59, WHO 1970.
- 34) Suketa Y., Mikami E., Hayashi M., *Toxicol. Appl. Pharm.*, **39**, 313-319 (1977).
- 35) Suketa Y., Sogo T., Yamamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1094-1097 (1977).
- 36) Roholm K., "Fluorine Intoxication, A Clinical-Hygienic Study," Lewis and Co., London, 1937.
- 37) Shupe J. L., Peterson H. B., Leone N. C., "Fluorides, Effects on Vegetation, Animals and Humans," Pergamon Press, Salt Lake 1983.
- 38) Gottlieb L., Grant S. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **29**, 1293-1294 (1932).
- 39) Taylor J. M., Scott J. K., Maynard E. A., Smith F. A., Hodge H. C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **3**, 278-289 (1961).
- 40) Suketa Y., Mikami E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 551-559 (1977).
- 41) Suketa Y., Terui Y., *Fluoride*, **13**, 4-9 (1980).
- 42) Suketa Y., Terui Y., *Fluoride*, **13**, 148-151 (1980).
- 43) Suketa Y., Kuwahara M., Sahashi K., Suzuki N., Akiyama Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**, 225-233 (1983).
- 44) Suketa Y., Ujiie M., Sato I., Nomura Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **672**, 142-150 (1981).
- 45) Peng J.-B., Chen X.-Z., Berger U. V., Valiliev P. M., Brown E. M., Hediger M. A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 28186-28194 (2000).
- 46) Hoenderop J. G. J., Nilius B., Bindels R. J. M., *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 529-549 (2002).
- 47) Barritt G. J., *Biochem. J.*, **337**, 153-169 (1999).
- 48) Nishizuka Y., *Nature*, **308**, 693-698 (1984).
- 49) Berridge M. J., Irvine L. F., *Nature*, **312**, 315-321 (1984).
- 50) Heaney R. P., *Am. J. Med.*, **39**, 877-880 (1965).
- 51) Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.*, **232**, 1065-1076 (1958).
- 52) Guillon G., Mouillac B., Balestre M. N., *FEBS Lett.*, **204**, 183-188 (1986).
- 53) Sterweis P. C., Gilman A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4888-4891 (1982).
- 54) Suketa Y., Kanamoto Y., *Toxicology*, **26**, 335-345 (1983).
- 55) Suketa Y., Sakai Y., "Calcium Protein Signaling," ed. by Hidaka H., Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 255, Plenum Press, New York, 1989, pp. 515-524.
- 56) Suketa Y., Harada H., Yamaguchi M., Ibuki Y., "The Biology and Medicine of Signal Transduction," ed. by Nishizuka Y., Endo M., Tanaka C., Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, Vol. 24, Raven Press, New York, 1990, p. 214 (abstract).
- 57) Strnad C. F., Wong K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **133**, 161-167 (1985).
- 58) Cockcroft S., Gamperts B. D., *Nature*, **314**, 534-536 (1985).
- 59) Katada T., Bokoch G. M., Norhup J. K., Ui M., Gilman A. G., *J. Biol. Chem.*, **259**, 3568-3577 (1984).
- 60) Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T., Nishizuka Y., *J. Biol. Chem.*, **254**, 3692-3695 (1979).
- 61) Murao H., Sakami N., Iguchi T., Murakami T., Suketa Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 581-584 (1976).

- (2000).
- 62) Günther T., Vormann J., Höllriegl., *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 455–461 (1995).
  - 63) Ikari A., Nakajima K., Kawano K., Suketa Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **287**, 671–674 (2001).
  - 64) Ebel H., Hollstein M., Güther T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1559**, 135–144 (2002).
  - 65) Herrera V. L., Lopez L. V., Ruiz-Opazo N., *Mol. Med.*, **7**, 125–134 (2001).
  - 66) Cover C. M., Wang J.-M., Lezin E. S., Kurtz T. W., Mellon S. M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 16555–16560 (1995).
  - 67) Scherzer P., Popovtzer M. M., *Am. J. Physiol.*, **282**, F492–F500 (2002).
  - 68) Marin R., Proverbio T., Proverbio F., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2275–2279 (1985).
  - 69) Suketa Y., Tsuji S., Nakajima T., Yamashita H., Aiso I., “Functional and Conformational Changes of Renal Na/K-ATPase by Aging. Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels,” ed. by Suketa Y., Carafoli E., Lazdunski M., Mikoshiba K., Okada Y., Wright E. M., ICS 1208, Elsevier Science, The Netherlands, 2000, pp. 19–22.
  - 70) Eiam-Ong S., Sabatini S., *Gerontology*, **45**, 254–264 (1999).
  - 71) Sagi-Eisenberg R., Pecht J., *Immunol. Lett.*, **8**, 237–241 (1984).
  - 72) Hidaka H., Inagaki M., Kawanoto S., Sakaki Y., *Biochemistry*, **23**, 5036–5041 (1984).
  - 73) Suketa Y., Ibuki Y., Imagawa T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 549–554 (1995).
  - 74) Hidaka H., Yamaki T., Naka M., Tanaka T., Hayashi H., Kobayashi R., *Mol. Pharmacol.*, **217**, 66–72 (1980).
  - 75) Suketa Y., Ohtani K., Yamamoto T., *Fluoride*, **12**, 84–91 (1979).
  - 76) Suketa Y., Sato M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **52**, 386–390 (1980).
  - 77) Suketa Y., Sato M., Kura M., *Experientia*, **36**, 438–439 (1980).
  - 78) Suketa Y., Asao Y., Kanamoto Y., Sakashita Y., Okada S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 199–205 (1985).
  - 79) Suketa Y., Yamada Y., Hasegawa J., Asao Y., *Mol. Pharmacol.*, **22**, 116–220 (1982).
  - 80) Suketa Y., Kanamoto Y., Satoh Y., Okada S., “Changes in the Metabolism of Glucose and Calcium Following a Single Dose of Fluoride. Fluoride Research 1985,” ed. by Tsunoda H., Yu M. H., Studies in Environmental Science, Vol. 27, Elsevier Science, The Netherlands, 1986, pp. 211–224.
  - 81) Bigay J., Dettère P., Pfister C., Chabre M., *FEBS Lett.*, **191**, 181–185 (1985).
  - 82) Mazurek N., Regazzi R., Borner C., Wyss R., Conscience J. F., Erne P., Eppenberger U., Fabbro D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 1277–1281 (1987).
  - 83) Suketa Y., Sakai Y., Yamaguchi M., Harada H., *J. Trace Ele. Exp. Med.*, **2**, 138–140 (1989).
  - 84) Suketa Y., Suzuki K., Taki T., Itoh Y., Yamaguchi M., Sakurai T., Tanishita Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 273–278 (1995).
  - 85) Wright E. M., *Am. J. Physiol.*, **280**, F10–F18 (2001).
  - 86) Darakhshan F., Hajduch E., Kristiansen S., Richter E. A., Hundal H. S., *Biochem. J.*, **336**, 361–366 (1998).
  - 87) Kamran M., Peterson R. G., Dominguez J. H., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **8**, 943–948 (1997).
  - 88) Wertheimer E., Sasson S., Cerasi E., Ben-Neriah Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 2525–2529 (1991).
  - 89) Dominguez J. H., Song B., Liu-Chen S., Qulali M., Howard R., Lee C. H., McAteer J., *J. Clin. Invest.*, **98**, 395–404 (1996).
  - 90) Doege H., Bocianski A., Joost H.-G., Schürmann A., *Biochem. J.*, **350**, 771–776 (2000).
  - 91) Thorens B., *Am. J. Physiol.*, **270**, G541–G543 (1996).
  - 92) Burant C. F., Takeda J., Brot-Lauoche E., Bell G. I., Davidson N. O., *J. Biol. Chem.*, **267**, 14523–14526 (1992).
  - 93) Hediger M. A., Coady M. J., Ikeda T. S., Wright E. M., *Nature*, **330**, 379–381 (1987).
  - 94) Hediger M. A., Turk E., Wright E. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5748–5752 (1989).
  - 95) Turk E., Kerner C. J., Lostao M. P., Wright E. M., *J. Biol. Chem.*, **271**, 1925–1934 (1996).
  - 96) You G., Lee W. S., Barros E. J., Kanai Y., Huo T. L., Khawaja S., Wells R. G., Nigam S. K., Hediger M. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 29365–29371 (1995).

- 97) Turk E., Klisak I., Bacllao R., Sparkes R. S., Wright E. M., *Genomics*, **17**, 752–754 (1993).
- 98) Hirayama B. A., Lostao M. P., Panayotova-Heiermann M., Loo D. D., Wright E. M., *Am. J. Physiol.*, **270**, G919–G926 (1996).
- 99) Loo D. D., Hirayama B. A., Gallard E. M., Lam J. T., Turk E., Wright E. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7789–7794 (1998).
- 100) Loo D. D., Zeuthen T., Chandy G., Wright E. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13367–13370 (1996).
- 101) Duquette P. P., Bissonnette P., Lapointe J. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3796–3801 (2001).
- 102) De La Horra M. C., Cano M., Peral M. J., Calobge M. L., Ilundäin A. A., *Am. J. Physiol.*, **280**, R655–R660 (2001).
- 103) Wells R. G., Mohandas T. K., Hediger M. A., *Genomics*, **17**, 787–789 (1993).
- 104) Kanai Y., Lee W. S., You G., Brown D., Hediger M. A., *J. Clin. Invest.*, **93**, 397–404 (1994).
- 105) Murao H., Watanabe A., Satou T., Suketa Y., “Cloning and Characterization of Rat SGLT2 Isoforms. Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels,” ed. by Suketa Y., Carafoli E., Lazdunski M., Mikoshiba K., Okada Y., Wright E. M., ICS 1208, Elsevier Science, The Netherlands, 2000, pp. 355–356.
- 106) Diez-Sampedro A., Eskandari S., Wright E. M., Hirayama B. A., *Am. J. Physiol.*, **280**, F278–F282 (2001).
- 107) Kong C. T., Yet S. F., Lever J. E., *J. Biol. Chem.*, **268**, 1509–1512 (1993).
- 108) Pajor A. M., Hirayama B. A., Wright E. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1106**, 216–220 (1992).
- 109) Dunham I. Shimizu N., Roe B. A., Chisoe S., et al., *Nature*, **402**, 489–495 (1999).
- 110) Devaskar S. U., de Mello D. E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 4373–4378 (1996).
- 111) Anderson T. J., Martin S., Berka J. L., James D. E., Slot J. W., Stow J. L., *Am. J. Physiol.*, **274**, F26–F33 (1997).
- 112) Tellam J. T., Macaulay S. L., Mclutosh S., Hewish D. R., Ward C. W., James D. E., *J. Biol. Chem.*, **272**, 6179–6186 (1997).
- 113) Chessemann C. I., *Am. J. Physiol.*, **273**, R1965–R1971 (1997).
- 114) Kawano K., Murao H., Suketa Y., “Glucose Transport Activity in Cultured Renal Epithelial Cells is Suppressed by Angiotensin II. Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels,” ed. by Suketa Y., Carafoli E., Lazdunski M., Mikoshiba K., Okada Y., Wright E. M., ICS 1208, Elsevier Science, The Netherlands, 2000, pp. 365–366.
- 115) Burwinkel B., Sanjad S. A., Al-Sabban E., Al-Abbad A., Kilimann N. W., *Hum. Genet.*, **105**, 240–243 (1999).
- 116) Wang M. Y., Koyama K., Shimabukuro M., Mangelsdorf D., Newgard C. B., Unger R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 11921–11926 (1998).
- 117) Turk E., Zahel B., Mundlos J., Dyer J., Wright E. M., *Nature*, **350**, 354–356 (1991).
- 118) Wright E. M., *Am. J. Physiol.*, **275**, G875–G882 (1998).
- 119) Ikari A., Tachihara Y., Kawano K., Suketa Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1510**, 118–124 (2001).
- 120) Heilig C. W., Liu Y., England R. L., Freytag S. O., Gilbert J. D., Heilig K. O., Zhu M., Concepcion L. A., Brosius F. C. 3rd., *Diabetes*, **46**, 1030–1039 (1997).
- 121) Armoni M., Harel C., Burvin R., Karanieli E., *Endocrinology*, **136**, 3292–3298 (1995).
- 122) Jiang L., David E. S., Espina N., Ferraris R. P., *Am. J. Physiol.*, **281**, G666–G674 (2001).
- 123) Vorbrodts A. W., Dobrogowska D. H., Mecher H. C., Carp R. I., *J. Neurocytol.*, **28**, 711–719 (1999).