

論文の内容の要旨

論文題名 ラット腎臓におけるクエン酸 transporter NaDC-1 の遺伝子、蛋白発現の検討

氏名 有賀誠司

【研究目的】 尿中クエン酸はカルシウムを尿中でキレートすることにより腎結石の生成を抑制することが知られており、現に再発性尿路結石の患者の約半数は低クエン酸尿症を示すと言われている。これらの患者の多くでは低クエン酸尿症は代謝性アシドーシス、体内での酸の過剰産生、低カリウム血症が原因であると言われている。クエン酸は腎糸球体で 100%濾過された後、近位尿細管でその 75-85%が再吸収され残りは再吸収、分泌されることなく尿中に排泄されることから近位尿細管での再吸収がその尿中排泄量を調節している。近年、クエン酸の transporter が家兔腎近位尿細管よりクローニングされ NaDC-1(Sodium-dicarboxylate cotransporter-1)と命名された。本研究では慢性代謝性アシドーシス、低カリウム血症ラット、慢性アルカリ摂取のラット腎近位尿細管管腔側刷子縁上の NaDC-1 の遺伝子発現、蛋白発現への影響を検討した。

【方法】 動物 本実験では雄 Sprague-Dawley rats (180-350g)を用いた。
[慢性酸投与] 酸投与ラットには 0.28M 塩化アンモニウム溶液、コントロールラットに蒸留水を飲水として投与し両群において食餌摂取量を同量とした。両群のラットは酸投与後 1、2、4、7、14 日目に麻酔後、動脈血を採取し腎臓を摘出 (sacrifice) した。[急性酸投与] ラットに 2M 塩化アンモニウム (1ml/100g 体重)を、コントロールラットには 2M 塩化ナトリウムを強制投与し

、1、2、3、6、16時間後に sacrifice した。[アルカリ投与] コントロールラット には塩化ナトリウム 6mmol /kg.体重/日、アルカリ投与ラットには炭酸水素ナトリウム 6mmol /kg.体重/日を含む合成餌を投与し pair feeding 7日後にラットを sacrifice した。[低カリウム血症ラットの作成] コントロールラットには合成餌、低カリウムラットには合成餌の塩化カリウムを同量の塩化ナトリウムで置換したものを与え、pair feeding とした。ラットは3、7、14日に sacrifice した。

以上の実験では24時間尿を sacrifice する前日に採取した。ラットは麻酔をかけた後に大動脈より動脈血を採取し、両側腎臓を取り出した。

Western blot 腎皮質管腔側刷子縁を抽出し、SDS-PAGE 後、家兎 NaDC-1 の164-223 アミノ酸に対する polyclonal anti-rabbit NaDC-1 抗血清でプロービングを行った。バンドが複数出現したためブロッキング (antiserum と fusion protein をニトロセルロース膜と反応させる前に 4℃で1時間インキュベートした。)、Deglycosylation により糖蛋白を除去したのち western blot を行った。**Immunohistochemistry** ラットを麻酔した後、腹部大動脈より5分間、固定液を灌流することにより腎臓を固定した。固定液を洗浄した後、腎臓を 5 μm の厚さに切りスライドにのせた。抗 NaDC-1 抗体と一晚インキュベートした。**Northern blot** 腎皮質より RNA を抽出し、20 μg の total RNA を電気泳動しナイロン膜にトランスファーした。ランダムヘキサマー法により核標識した家兎 NaDC-1, ラット 18srRNA を用いプロービングを行った。**Nuclear runoff assay** 酸を1日負荷したラットとコントロールラット (蒸留水を負荷) の腎皮質より核を分離した。核を [³²P] UTP, ATP, CTP, GTP とともに 20℃の water bath にて振盪させながらインキュベートした後 RNA を抽出し、ラット NaDC-1, PEPCCK [phosphoenolpyruvate carboxykinase], 18SrRNA の cDNA を含むプラスミド DNA とコントロールとしてのプラスミドベクター pGEM(promega)を付着させたナイロンメンブレンとハイブリダイゼーションを72時間行った。

【結果】 酸負荷ラットでは血中重炭酸イオン濃度は時間の経過と共に正常化した。低クエン酸尿症は全てのタイムポイントで見られ、血中重炭酸イオン濃度が正常化後も見られた。重炭酸ナトリウム投与ラットではコントロールと比較して血中重炭酸イオン濃度に変化は見られず、尿中クエン酸排泄はコントロールに比較して著明な増加を示した。K 欠乏食投与ラットでは時間の経過と共に低カリウム血症を示し、尿中クエン酸排泄量の減少を示した。

Western blot では家兎 NaDC-1 antiserum によりラット刷子縁 (BBM) に5つのバンド (105, 76, 67, 60, 46) が現れた。ブロッキング、deglycosylation により 60kDa のバンドがラット NaDC-1 蛋白と判断した。酸負荷ラットでは NaDC-1 蛋白の発現が時間の経過と共に増加し、低クエン酸尿症の程度と一致していた。7日間アルカリを投与したラットでは NaDC-1 蛋白の発現量には変化

がみられなかった。低カリウム血症ラットにおいては、血清カリウム値の低下とともに NaDC-1 蛋白発現が増加した。この場合でもこの蛋白発現の増加の程度は低クエン酸尿症の程度と一致していた。

抗家兔 NaDC-1 抗体を用いた免疫組織染色の結果、NaDC-1 は近位尿細管の S1、S2、S3 segment の刷子縁に発現しており発現の程度は S2>S1>S3 の順であった。酸負荷ラットにおいて、NaDC-1 蛋白は近位尿細管の全ての部位にてコントロールラットに比較して強く発現しており、特に S2 における強発現が著明であった。

NaDC-1 mRNA のシグナルは northern blot にて 2.4kb の位置に確認され、mRNA の発現量は慢性代謝性アシドーシスでは酸負荷 1 日目最大の増加がみられ、血中重炭酸イオン濃度の変化も最大であり血中重炭酸イオン濃度の変化の程度と NaDC-1 mRNA の発現の程度には有意な負の相関関係がみられた。急性代謝性アシドーシスにおいても NaDC-1 mRNA の発現増加がみられアシドーシスの程度と時間差をもって相関した。低カリウム血症ラットでは無カリウム食を投与して時間の経過に伴い NaDC-1 mRNA 発現量が増加した。アルカリを投与ラットでは NaDC-1 mRNA 発現量には差がなかった。

酸負荷 1 日目において NaDC-1 mRNA の発現が最大であったことより、このタイムポイントでの酸負荷の NaDC-1 転写率への影響を nuclear runon assay にて検討した。酸負荷ラットではコントロールに比べ $60 \pm 29\%$ の増加を示したものの、両群間に有意差はなかった。一方陽性コントロールとしての PEPCK mRNA 転写率は有意な増加を示した。

【考 察】 管腔側 Na⁺/citrate cotransporter の活性はラットを用いた実験で慢性アシドーシス、低カリウム血症において上昇することが証明されており、本実験は慢性の酸投与下、無カリウム食摂取で腎尿細管 NaDC-1 の蛋白、mRNA 発現量が増加することを証明した。慢性酸負荷ラットでは血中重炭酸イオン濃度の最低下時に mRNA の増加が顕著であったこと、また急性酸投与においても NaDC-1 mRNA の増減は血中重炭酸イオン濃度の変化にある程度時間差をもって動くことより血中重炭酸イオン濃度の変化が NaDC-1 mRNA の発現量に関与していると考えられた。nuclear runon assay では酸負荷ラットにおいてコントロールに比べて有意な増加は示さなかったことより NaDC-1 mRNA の酸負荷に対する増加は転写率の増加によるものより、転写後の mRNA の安定性等によると考えられた。一方、酸負荷ラットでは NaDC-1 蛋白発現量も増加した。しかしながら mRNA とは違い、蛋白発現の程度は時間の経過とともに、すなわち血中重炭酸イオン濃度の変化が見られなくなったにもかかわらず増加した。持続的な NaDC-1 蛋白の増加には血中重炭酸濃度以外の因子も関与していると考えられた。低カリウム血症ラットでは血中カリウム値がコントロールに比べ低下するにつれ NaDC-1 蛋白、mRNA の発現量が共に増加した。こ

ここでは血中カリウム値が NaDC-1 蛋白、mRNA の増加に関与していると推測される。代謝性アシドーシスと低カリウム血症との共通点として細胞内のアシドーシスが挙げられ、NaDC-1 の活性化、蛋白、mRNA の増加には細胞内の pH が key factor であると思われる。

慢性アルカリ投与ラットでは NaDC-1 蛋白、mRNA に変化がみられなかったにもかかわらず尿中クエン酸排泄が有意に増加した理由として、1) NaDC-1 は citrate²⁻のみを輸送するがアルカリ尿では citrate³⁻が増加すること、2) 慢性アルカリ投与ラットでの近位尿細管細胞内のクエン酸の代謝の低下による細胞内のクエン酸濃度の上昇が考えられる。クエン酸は近位尿細管細胞質内の 2 つの pathway により代謝されるが、慢性代謝性アシドーシス、アルカローシスではこれらの pathway の酵素活性、蛋白、mRNA 発現が変化的に証明されており、これらの一連の transporter、酵素等が酸負荷により協調して反応していると考えられた。