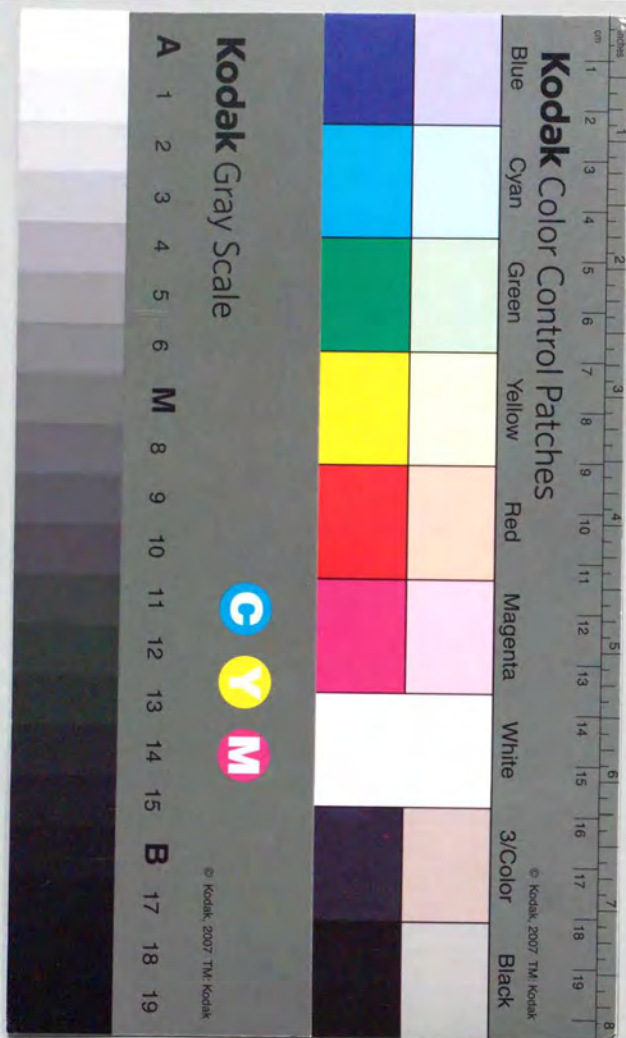


細胞外pH低下による腎ナトリウム-水素イオン
交換輸送体活性調節における
プロテインキナーゼCおよび転写因子AP-1の関与

須江重郎



①

細胞外 P H 低下による
腎ナトリウム－水素イオン
交換輸送体活性調節における
プロテインキナーゼ C および
転写因子 A P - 1 の関与

堀江重郎

研究目的

近位尿細管は、腎における、重炭酸イオンの再吸収の大部分を担っている(1)。慢性代謝性アシドーシス、慢性呼吸性アシドーシス、カリウム欠乏、及び糸球体濾過量の慢性増加(hyperfiltration)などの病態では、近位尿細管における水素イオンの排泄と、それに伴う重炭酸イオンの再吸収が増加していることが知られている(2-16)。

この腎における適応現象は、蛋白レベルでは、近位尿細管管腔側のNa/H交換輸送体、ナトリウム-クエン酸共輸送体、また側底側のナトリウム-重炭酸共輸送体($\text{Na}/(\text{HCO}_3)_n$)、リン酸依存性グルタミナーゼ及びホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼなどの活性増加を伴うことが知られている。これらの蛋白は、実際に細胞膜輸送体として近位尿細管細胞からの酸排泄に関わったりあるいは、アンモニア生成に関係することにより腎における酸の排泄に寄与していることが知られている(2-14)。実験動物において慢性代謝性アシドーシスの病態を作り、腎尿細管を単離して、正常の状態下で実験しても、これらの尿細管細胞がおかれていた病態下での特性は失われずに持続している。

この持続効果は、micropuncture、microperfusion、腎近位尿細管細胞膜標品 (vesicle) などの実験システムにおいて、認められてきた(2-16)。培養細胞系においても、この持続効果が認められ、細胞蛋白レベルでの、長期的適応現象であることが示唆されている(17)。Na/H交換輸送体の活性増加の特徴としては、輸送体の基質に対する親和性は変わらずに、 V_{max} が増加することが示されている(3,6,8,9,11)。

実験動物において、腎の適応現象を観察する場合、実際の疾患モデルに近似させることができる利点がある反面、現象を解析する際に関与している因子が多く、逆に問題を複雑化することも有りえる。酸の持続投与による慢性代謝性アシドーシスモデル動物における、Na/H交換輸送体活性の上昇は、アシドーシスの腎近位尿細管細胞に対する直接的な作用以外にも、糸球体濾過量の変化や、体液因子、神経内分泌の影響が関わっていると想像される。これらの因子を排除し、細胞外pHの低下そのものの、近位尿細管細胞に対する効果を観察するために、近位尿細管由来培養細胞を実験系として使用した。

ウサギ近位尿細管培養細胞においては、細胞外pHを7.40より、7.10まで低下させると48時間後に、アミロライド非感受性Na/H交換輸送体の活性上昇が、細胞外pHを再び7.4に戻して測定しても認められ、この適応現象

は転写阻害剤アクチノマイシンD、蛋白合成阻害剤サイクロヘキサミドにより阻害されることが、確認されている(17)。この実験結果より、細胞外pHの低下によるアミロライド非感受性Na/H交換輸送体の活性上昇は、蛋白合成に依存し、また、細胞外pHをもとの状態に戻しても効果が持続することが、わかった。また興味深いことに、Na/H交換輸送体の、細胞外pH低下による活性上昇は、ヒト線維芽細胞では生じなかったため、細胞特異性が示唆された。

Na/H逆輸送体は、活性阻害剤であるアミロライドに対する感受性と、上皮細胞における局在により、いわゆるHousekeepingの性格を持つものと、上皮特異的なものに分類される(18)。HousekeepingであるNa/H逆輸送体は、アミロライドの誘導体であるEIPAに対する感受性が高く(IC_{50} がnM域)、上皮細胞では、主に側底側に存在する。一方上皮特異的なNa/H逆輸送体は、EIPAに対する感受性は低く(IC_{50} は μ M域)、管腔側に局在する。培養細胞においては、EIPA非感受性である、ウサギ尿細管由来初代培養細胞、OKP細胞、およびEIPA感受性であるMCT細胞において、酸性培地における、Na/H逆輸送体の活性上昇が報告されている。またIgarashiらは、ブタ近位尿細管由来培養細胞であるLLCPK1細胞において、酸性培地においては、管腔側、側底側のEIPA感受性の異なる2種類のNa/H逆輸送体の活性が共に上昇したことを報告している(19)。

Na/H逆輸送体の遺伝子(NHE)については、これまでいくつかのcDNAがクローニングされている。NHE-1は、アミロライド感受性であるHousekeepingのNa/H逆輸送体に相当し、腎近位尿細管に特異的なNa/H逆輸送体ではないが、MCT細胞で、細胞外pHを7.4より7.0に低下させて培養することにより、メッセンジャーRNAレベルは24時間後に3倍に増加し、同様の実験条件において、線維芽細胞では、NHE-1のメッセンジャーRNAレベルは減少した。またラットのアシドーシスモデルにおいてもNHE-1のメッセンジャーRNAレベルは増加していた(20)。以上の実験結果は、細胞外pHの低下に伴うNa/H逆輸送体の適応現象が、尿細管特異的Na/H逆輸送体と共に、HousekeepingのNa/H逆輸送体も活性化することを示している。一方線維芽細胞では、HousekeepingのNa/H逆輸送体の発現は細胞外pHの低下により抑制されることより、腎近位尿細管細胞と線維芽細胞においては、細胞外pHの変化に対する細胞応答のメカニズムが異なる可能性があることを示唆している。

近年ペプチドのリセプターを介した細胞への作用機序につき、細胞内の情報伝達系の解析が急速に進みつつある。特にプロテインキナーゼCは、イオンチャネルの活性制御や、細胞の増殖や癌化に広く関わり、細胞内情報伝達系において非常に重要な位置を占めている酵素である(21)。慢性アシドーシスモデル、及び糸球体濾過の増加は、

腎近位尿細管細胞の増大(hypertrophy)を生ずることが知られており、プロテインキナーゼCを介する情報伝達系の関与が示唆されている(22)。

本論文においては、腎近位尿細管由来培養細胞であるMCT細胞において、細胞外pHを低下させたときに生じるアミロライド感受性Na/H交換輸送体活性の上昇に、プロテインキナーゼCを介する情報伝達系が関与しているか検討を加える。

研究方法

1) MCT細胞の継代培養

SV40ウイルスで形質転換したマウス近位尿管由来細胞株(MCT細胞)は、5%牛胎児血清加RPMI培地で継代培養した(20)。実験に際しては、MCT細胞は、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 ug/ml)、および5%胎児牛血清加DME M/F12培地で培養し、実験前48時間及び実験中は、血清を除いた培地を使用した。“酸性”培地は、コントロールの培地に塩酸で滴定し、重炭酸濃度を50%にしたものを用いた。

2) 細胞内pHの測定

ガラスカバーグラスに細胞を培養し、pH感受性の蛍光色素BCECF(2',7'-bis(carboxyethyl)-5-(and6)carboxyfluorescein)のアセトキシメチルエステル体を40分間37℃でインキュベートし細胞に取り込ませた。細胞を培地でリンスしたあとに、カバースリップをコンピューター制御された吸光光度計(SLM8000)内のキュベットに固定した。キュベット内は10 ml/minで灌流

されるシステムを持ち、細胞外に漏出した蛍光色素は、キュベット内に貯留することなく、すみやかに除去される(17)。蛍光色素BCECFは、励起波長により、pH感受性が変化する特性を持つ。波長450 nmで励起させた場合、蛍光信号は、細胞に取り込まれた色素量を主に反映し、細胞内pHによる影響が最少になる。すなわちpH感受性が最小となる。波長500 nmで励起させた場合は、蛍光信号は、細胞内色素量に加え、細胞内pHによる変化が最大になり、pH感受性が最大になる。従って、波長500 nmでの信号を波長450 nmでの信号で除した比 $r(500/450)$ は細胞内に取り込まれた、色素量に関わらず、細胞内pHを反映すると思われる。

細胞内pH(pH_i)の測定は、高 K^+ -Nigericin法により、 pH_i を信号比 $r(500/450)$ で検量することにより求めた。すなわち K^+/H^+ イオノフォアであるNigericinで、細胞を処理し、細胞外液のカリウム濃度を細胞内と等しくすることにより、細胞内pHを細胞外液の任意のpHにクランプしたときの、波長450 nmと500 nmでの信号比 $r(500/450)$ を求め、細胞外液のpHを変化させることにより細胞内pHと $r(500/450)$ の関係の検量線を求めた(17)。

3) Na/H交換輸送体活性の測定:

CO₂/HCO₃⁻緩衝系の存在しない系において細胞をアンモニア (NH₃)・アンモニウムイオン (NH₄⁺)を含む、無ナトリウム緩衝液で灌流し、平衡状態に達したのちに、アンモニア (NH₃)・アンモニウムイオン (NH₄⁺)を、灌流液より除くと、アンモニア (NH₃)は、速やかに細胞膜より、細胞外に流出するものの、アンモニウムイオン (NH₄⁺)は、細胞膜より、細胞外に流出できずアンモニア (NH₃)と水素イオン (H⁺)に分解されるため、細胞内pHの低下をみる。、低下した細胞内pHは、細胞外液に再びナトリウムを加えることにより、ナトリウム濃度依存的に急速に回復する。Na/H交換輸送体活性は、pH_i低下後の最低値における、ナトリウム依存性のpH_i初期上昇速度で評価した(17)。

測定に際し用いた標準緩衝液の組成は次の通りである:

Na 138 mM, K 4.5 mM, Ca 1.1 mM, Mg 1.5 mM, Cl 147.7 mM, HEPES 15 mM

ナトリウムを含まない緩衝液においては、ナトリウムは、等モルのコリンにより置換された。また、NH₃/NH₄⁺溶液においては、さらに20 mMのアンモニアでコリンを置換した。

すべての緩衝液は、N-methyl-D-glucanmoniumhydroxide

を用い、pH 7.4に滴定した。

培養細胞は、まず標準緩衝液により灌流され、細胞内pHが一定値を示したことを確認したのち、ナトリウムを含まないNH₃/NH₄⁺緩衝液により5分間灌流した。その後、灌流液を、コリン緩衝液(0Na)に替えることにより、細胞内pHは急速に低下し、最低値に達する。その後に灌流液をナトリウム緩衝液に替えると、細胞内pHは急速に上昇する。この時の細胞内pHのalkalinizationのカーブの接線の傾き (dpH_i/dt) によりNa/H交換輸送体活性を評価した。

細胞のbuffer capacityは、NH₃/NH₄⁺パルスに対する、細胞内pHの変化により、評価できる。

$$\text{buffer capacity} = \frac{[\text{NH}_4]_i}{\Delta \text{pH}_i}$$

[NH₄]_iはNH₃/NH₄⁺を、コリン緩衝液に替える直前のpH_i、細胞外[NH₄],細胞外pHより計算できる。

$$\text{このとき、} \quad \frac{dpH_i}{dt} = \text{-----} \times (\text{buffer capacity})$$

が、pH_iが最低値でのNa/H交換輸送体活性を表わす。

図1に、灌流液の変化による、pHiの変化を示す。

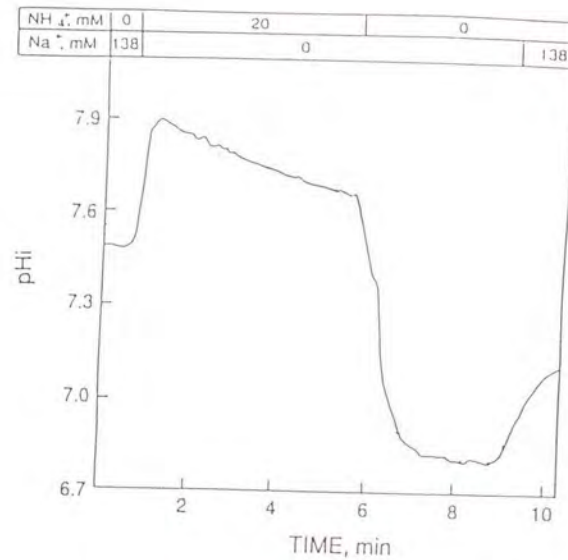


図1: Na/H交換輸送体活性の評価
灌流液の変化に伴うpHiの変化

文献上、buffer capacityは実験条件に関わらず、変化を認めないことが多い(17,23)。

今回の実験でも、buffer capacityの実験群間での変化は認められなかったため、Na/H交換輸送体活性は、dpHi/dtにより評価した。

4) ノーザンブロットによる、メッセンジャーRNA量の評価

培養細胞からのメッセンジャーRNAの抽出は、Chirgwinの方法に従った(24)。

培養細胞はguanidinium thiocyanateを加えてホモジナイズし、CsClをクッションとして、超遠心したのち、フェノール/クロロホルムにより抽出し、エタノールにより沈澱させた。Poly-A+RNAは、oligo-dTクロマトグラフィーにより精製した。Poly-A+RNAは、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動したのち、ナイロンフィルターにトランスファーした。ノーザンブロットのためのプローブは、各々のプラスミドを適当な制限酵素にて切断したのちに、アガロースゲルによる電気泳動により生成したDNA templateにより作られた。

すなわち、CATプローブは、pBLCAT3のXhoI/NcoI insert (550 base pairs)(25)が、切り出され、GAPDHは、1.1 kbのBamHI/HindIII insert (26)が用いられた。

protooncogeneであるc-fosとc-junについてはそれぞれ2.2kbと2.6 kbのcDNA (27,28)が用いられた。

これらのプローブは、Klenow fragmentによる、random primingにより、活性が、 5×10^8 cpm/ug以上のものを使用した。プローブは、Nensorb (Dupont)により、カラム生成をした。

ナイロンフィルターは、5xSSC (0.75 M NaCl; 75mM Na₂SO₄)

Citrate), 5XDenhardt's (Ficoll, PVP, BSA 各1 mg/ml), 0.5% SDS, 50% formamide, および 0.5 mg/ml の denatured salmon testes DNAにより、42°Cで prehybridizeされ、プローブが加えられた。

フィルターはそののち1xSSC, 0.1% SDS 20°Cで15分間、次に0.1xSSC, 1% SDS 55°Cで1時間洗浄された。

フィルターは、-70°Cでフィルムに感光され、現像されたオートラジオグラムは、レーザーデンスitrometryにより定量した。

ノーザンブロットは、GAPDHのメッセンジャーRNAレベルをRNA量のコントロールとした。

5) 細胞内遺伝子導入およびCAT測定

c-jun および c-fos の遺伝子産物が、DNA に結合する AP-1 結合部位 (TRE response elements; 5'-AAGCATGAGTCAGACA-3') を6回結合させたヌクレオチドを作成し、interferon promoterを持つ、

CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) の上流域に挿入したプラスミド (p6XTRE/IFNCAT) を、neomycin 耐性獲得遺伝子であるプラスミド (pSV2-Neo) と共に、Lipofectin (BRL, Bethesda, U.S.A.) を用いて、MCT 細胞内に導入した (29)。

10% FBS 加 RPMI 培地に 400 ug/ml の G-418 を加え継代

培養することにより、transfectants を選択した。

プロテインキナーゼCを活性化することにより、AP-1 活性も上昇させることが知られているホルボールエステルを positive control として、CAT活性の上昇と、CATメッセンジャーRNAの発現をスクリーニングした。

細胞は2日間同一の培地で培養したのちに実験プロトコルの開始3日前よりDMEM/F12培地 (ペニシリン、ストレプトマイシン加) に変更した。

培養皿より、剥離した細胞を、100 ul の 0.25 M TRIS pH7.8 溶液中に攪拌、冷凍、溶解を繰り返し、細胞膜を破壊し、蛋白を抽出した。CAT活性は、100 ug の蛋白を 1 ul の 14C-chloramphenicol (25 uCi/ml), 20 ul の 4.0 mM acetyl Coenzyme A, 70 ul の 1.0 M TRIS, pH7.8 に加え、37°Cで50分間インキュベートし、1 mM のエチルアセテートで反応を止めた。

遠心後上清を蒸発させ、沈澱を 10 ul のエチルアセテートで溶解し、シリカゲル上にスポットし、薄層クロマトグラフィーをクロロホルム・メタノールのタンクで行い、展開後薄層クロマトグラフィーをX線フィルムに感光した。

CAT活性の定量は、クロマトグラフィーより、シリカゲルを削り取り液体シンチレーションカウンターで測定した。CATベクターを細胞内に導入されていない細胞では、CAT活性は認められなかった。

結果

#1 酸性培地における、腎近位尿細管由来培養細胞 Na/H交換輸送体活性の上昇におけるプロテインキナーゼCの役割

Na/H交換輸送体に対する細胞外pHの持続的低下に、プロテインキナーゼCが関与しているとすれば、プロテインキナーゼCを不活化することにより、酸性培地の効果も消失すると考えられる。

プロテインキナーゼCの抑制には2つの方法を用いた。スフィンゴシンは、プロテインキナーゼCのDAG結合部位に特異的に結合することにより、プロテインキナーゼCを不活化することが知られている(30,31)。スフィンゴシン(10 μ M)を、培地を変更する12時間前に投与し、そののち、酸性、正常pH培地にそれぞれ引き続き投与した。実験の結果を図2に示す。対象群では、24時間の酸性培地での培養により、Na/H交換輸送体活性は47%の上昇を見たが、スフィンゴシンを投与した群では、酸性培地の効果は認められなかった。

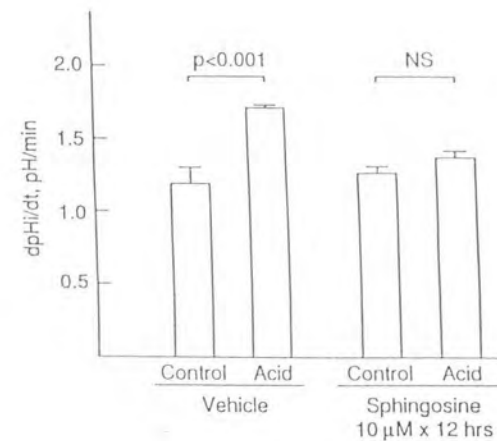


図2：酸性培地におけるNa/H逆輸送体活性上昇に対するスフィンゴシンの効果。

縦軸は、ナトリウム再投与後のpHiの初期上昇速度を示す。(dpHi/dt)

次に、プロテインキナーゼCを高濃度のホルボールエステルにより、down-regulateすることにより、不活化した(32)。

培地に、400 nMのPMAを48時間加えたのちに、400 nMのPMAを加えた酸性培地の効果をみた。

実験の結果を図3に示す。ホルボールエステルで処理していない細胞では、24時間の酸性培地での培養により、46%のNa/H交換輸送体の上昇があったものの、ホルボールエステル投与群では、酸性培地の効果は消失していた。

対象培地で培養した場合の、ホルボールエステル処理の、Na/H交換輸送体活性に対する効果を検討すると、ホルボールエステル投与群では、非投与群に対し19%の僅かな上昇を認めた。これは、down regulationされる間にプロテインキナーゼCが活性化され、Na/H交換輸送体活性を上昇させたことによると考えられた。

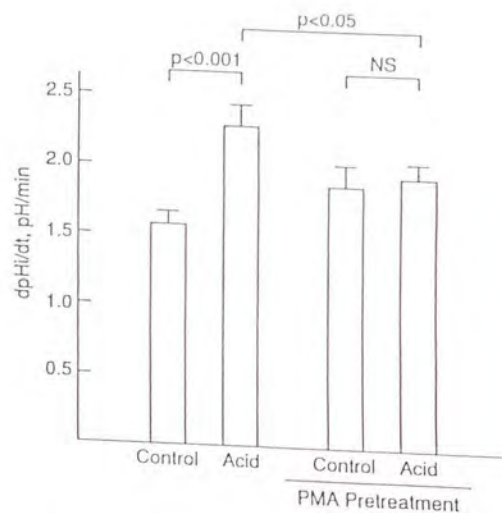


図3: PMA down-regulation の効果

縦軸は、 dpH_i/dt を示す。

以上の実験事実、プロテインキナーゼCが、酸によるNa/H交換輸送体の活性上昇に関与していることを示唆している。

※2 細胞外pH低下によるAP-1活性の増加

細胞外pHの低下により、遺伝子発現をともなう、プロテインキナーゼCが活性化されることを調べるために、細胞外pHの低下のAP-1活性への効果を検討した。

プロテインキナーゼCの活性化により、発現が制御される遺伝子の多くはその5'上流領域に、共通塩基配列をもち、この塩基配列に、nuclear factorであるAP-1が結合することにより、転写調節が行われることが明らかになっている。6個のAP-1塩基配列をプロモーターに持ったCATプラスミドが細胞内に導入されたMCT細胞に対し、CAT活性に対する効果を見ることにより、細胞外pH低下がAP-1活性を増加するかどうか調べた。

実験結果を図4に示す。MCT細胞は、コントロール(pH 7.3)、アシドーシス(pH 7.0)、ホルボールエステル(100 nM)加コントロール培地で培養した。培地を変更した時点を0としたところ3時間後に、アシドーシスとPMA群ではCAT活性は3~4倍に上昇し、この増加は、24時間後まで継続した。このCAT活性の上昇が、転写によらず、蛋白の翻訳による可能性を否定するためにノーザンブロットプロット法によりCATメッセンジャーRNA量を評価した。図5に実験結果を示す。

細胞内にCATプラスミドを導入されたMCT細胞は種々のサイズのメッセンジャーRNAが存在するが、プラスミドに組み込まれているインターフェロンプロモーターより転

写が開始している場合のサイズは、1640塩基数である。
このサイズのメッセンジャーRNA量は100 nMのPMAで1時間および3時間後に増加していた。アシドーシスは、1時間ではCATメッセンジャーRNAの変化をきたさなかったが、3時間後には、2.5倍に増加した。

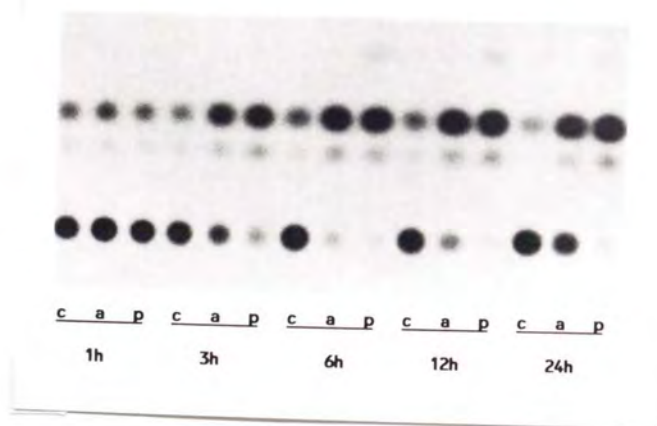


図4：細胞外pH低下のAP-1活性への効果。薄層クロマトグラフィーによるCAT assay。c：正常培地 a：酸性培地 p：100 nM PMA

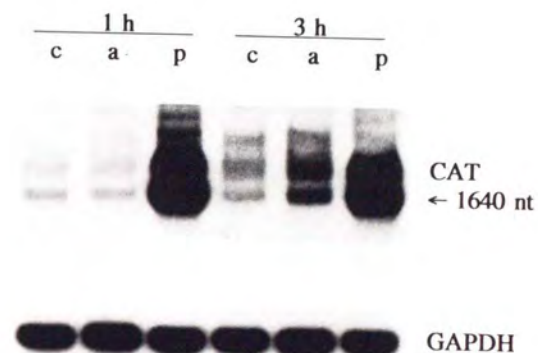


図5：細胞外pHの低下による、CAT mRNAへの効果。矢印で示した1640塩基数の転写物が、細胞内に導入したプラスミドが正しく転写されたものと思われる。GAPDH mRNAレベルは、コントロールである。

#3 アシドーシスの c-jun, c-fos に対する効果。

AP-1活性は実際には、プロトオンコジーンである c-fos/ c-junのダイマーがAP-1部位に結合することにより生じる(33)。細胞外pHの低下が、MCT細胞において c-fos, c-junの発現に影響するかを検討した。酸性培地で培養された細胞を、コントロールの細胞(培地の交換をした)と経時的にメッセンジャーRNA量の比較をした。酸性の培地に交換後、c-fosのメッセンジャーRNAレベルは、15から30分後に、対象に比べ2.5倍に上昇し、そののち急激にコントロールレベルに戻った(図6)。同様の反応が3回の実験で認められた。また c-junに関しては、2つのサイズの転写物が存在し、各々が、酸性培地において、1から2時間後に、メッセンジャーRNAレベルは2倍に上昇した(図7)。c-fosのメッセンジャーRNAが c-junのメッセンジャーRNAの上昇に先行するのはプロテインキナーゼC活性化に特徴的である(34,35)。

これらの実験より、MCT細胞は酸性培地において c-fos, c-junの発現とAP-1活性の増加を生じることが明らかになった。

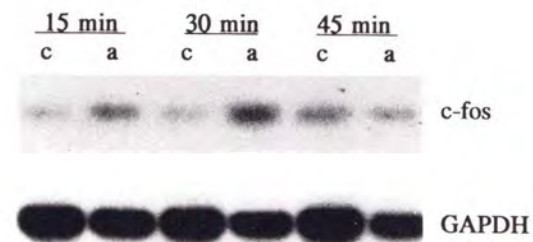


図6: 細胞外pH低下による c-fos mRNAへの効果
時間は、正常及び酸性培地に移してから経過を表わす。

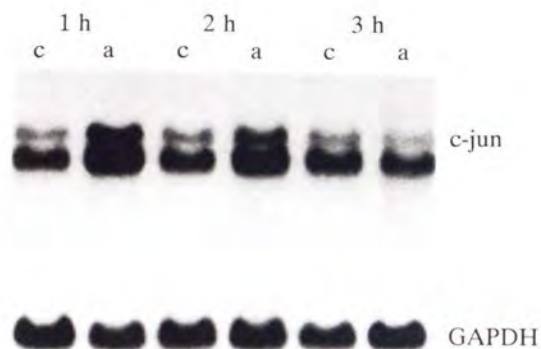


図 7: 細胞外 pH 低下による、c-jun mRNA への効果。時間は、培地を正常、酸性培地へ移してからの経過時間である。

考察

腎近位尿細管細胞を酸性培地にて 48 時間培養すると、Na/H 交換輸送体活性の増加を生じる。この現象は、細胞が、酸性培地より、コントロールの pH 溶液に移されても消失しない。またこの効果は蛋白合成阻害剤である cycloheximide により抑制される (17)。

酸性培地での培養による Na/H 交換輸送体活性の増加は近位尿細管細胞の特性をもつ培養細胞株 (MCT, OKP, LLC-PK1) にみられるものの、ヒト線維芽細胞や、NIH3T3 細胞では認められず、細胞特異性があると考えられる。腎尿細管由来培養細胞において、アミロライド感受性 Na/H 逆輸送体 (MCT, LLC-PK1 側底側) およびアミロライド非感受性 Na/H 逆輸送体 (OKP, LLC-PK1 管腔側) が共に細胞外 pH の低下により活性が上昇しており、また、MCT および LLC-PK1 細胞では、Na/H 交換輸送体の Housekeeping gene である NHE-1 のメッセンジャー RNA レベルの増加が認められている (19, 20)。一方線維芽細胞では、酸性培地においては、NHE-1 の発現が減少することにより、低 pH に対する細胞応答には細胞特異性があることが考えられる。

培養近位尿細管細胞においては、プロテインキナーゼ C の持続的活性化は、酸性培地での培養と似た効果をもたらす。すなわち、Na/H 交換輸送体活性の上昇をもたらす。この効果は、転写および翻訳に依存し、NHE-1 のメッ

ンジャーRNAレベルの増加をもたらす(21)。

今回、プロテインキナーゼCを不活化することにより、MCT細胞において細胞外pHの低下による効果が消失することを確認した。すなわち、MCT細胞での細胞外pH低下に伴うNa/H交換輸送体活性上昇には、プロテインキナーゼCの活性化が必要であることが明らかになった。また細胞外pHを低下させることにより、AP-1活性の上昇が示され、AP-1活性が上昇する前には、immediate early response geneである、c-fos, c-junの発現が増加した。

protooncogeneであるc-fos, c-junは血清、ホルボールエステル、EGF, FGF, PDGFをはじめとする細胞成長因子により誘導され、細胞成長に重要な働きをしていると考えられている(36, 37)。また細胞成長以外にも1, 25-dihydroxyvitamin D₃、プロテインキナーゼC活性化による骨髄細胞の分化、線維芽細胞でのTNF α によるcollagenaseの発現、心筋細胞における、 α -, β -adrenergicのmyosin light chain-2の発現などにも関与していることが知られている(38, 39)。興味深いことに、プロテインキナーゼC活性化による骨髄細胞の分化誘導においてはNHE-1のメッセンジャーRNAの増加と転写速度の増加が認められている(40)。

動物に酸を長期投与することによって生じる代謝性アシドーシスモデルにおいては、腎近位尿細管細胞のhypertrophyを生じることが知られており(41)、また腎のhypertrophyには、c-fos, c-junが介在していることが知

られている(22)。今回、腎近位尿細管由来細胞では、低pHでは、c-fos, c-junの発現がみられたことより、アシドーシスにおける腎のhypertrophyにおいて、プロテインキナーゼCの活性化の関与が示唆された。

腎近位尿細管のアシドーシスに対する適応現象は、アミロライド非感受性である、腎近位尿細管細胞管腔側に特異的なNa/H逆輸送体により調節されている。MCT細胞のNa/H逆輸送体は、アミロライド感受性のため、House-keepingのNa/H逆輸送体であると考えられ、実際に腎近位尿細管細胞管腔側に特異的なNa/H逆輸送体の、低pHへの応答におけるプロテインキナーゼCの意義は明らかではない。線維芽細胞であるNIH3T3細胞では、低pHにおいては、Na/H逆輸送体活性は低下し、NHE-1の発現も抑制されるが、細胞外pH低下に対して、c-junの発現はみられず、また、c-fosは3時間後も持続的に上昇する、蛋白合成阻害に特徴的なパターンを取ることが報告されている(42)。従って、細胞外pHの変化に対する細胞応答には、細胞特異性があると考えられる。

今回の研究では、NHE-1を持つMCT細胞において、細胞外pHの低下によるNa/H逆輸送体活性上昇における、プロテインキナーゼCを介する細胞内情報伝達系の関与を明らかにした。

まとめ

腎近位尿細管由来培養細胞である MCT細胞において、酸性培地での培養によりプロテインキナーゼCが活性化され、続いてc-fos, c-junがそれぞれ15~30分、1~2時間後に活性化された。AP-1活性の上昇は3時間後に顕著になった。細胞外pHの低下が直接プロテインキナーゼCを活性化するのか、あるいは、phospholipaseCまたはDより、プロテインキナーゼCの活性化が生じるのかは、今後の検討課題である。この現象におけるAP-1の役割として、

- 1) AP-1が直接Na/H交換輸送体遺伝子の発現を増加させる。
- 2) AP-1は他の遺伝子産物を増加させ、この遺伝子産物が、Na/H交換輸送体遺伝子発現を増加させる。
- 3) AP-1は必ずしもNa/H交換輸送体遺伝子発現には関係なく他のプロテインキナーゼCによって活性化される遺伝子産物がNa/H交換輸送体遺伝子を発現させる。

以上3つの場合が考えられ、今後の研究課題である。

ヒトNa/H逆輸送体遺伝子のうちHousekeeping geneであるNHE-1は、AP-1結合部位を、3箇所 5'上流領域に持っており(43)、これらのAP-1結合部位はプロテインキナーゼCによる遺伝子発現調節に関与していると推測される。従来、プロテインキナーゼCを活性化することにより、

短期的に、細胞膜輸送体活性が調節を受けることが知られ、その機序の一つに、プロテインキナーゼCによる蛋白のリン酸化が考えられているものの、プロテインキナーゼCの持続的活性化による細胞膜輸送体への長期的な作用についての検討は少ない。今回、細胞外pHを持続的に低下させる刺激により、AP-1活性が、c-fos, c-junの発現と共に増加したことは、AP-1がNa/H交換輸送体遺伝子発現を媒介している可能性を示唆し、またアシドーシスにより細胞がhypertrophyを生じる細胞内機序の一つである可能性が示唆された。

文 献

1. Alpern, R.J.
Cell mechanisms of proximal tubule acidification.
Physiol.Rev., 1990, 70:70-114.
2. Cohn, D.E., Klahr, S. and Hammerman, M.R.
Metabolic acidosis and parathyroidectomy increase
 Na^+/H^+ exchange in brush border vesicles.
Am.J.Physiol, 1983, 245(Renal Fluid Electrolyte
Physiol. 14):F217-F222.
3. Tsai, C.J., Ives, H.E., Alpern, R.J., Yee, V.J.,
Warnock, D.G., and Rector, Jr. F.C.
Increased V_{max} for Na^+/H^+ antiporter activity in
proximal tubule brush border vesicles from
rabbits with metabolic acidosis.
Am.J.Physiol, 1984, 147(Renal Fluid Electrolyte
Physiol. 16):F339-F343.
4. Kinsella, J.L., Cujkid, T., and Sactor, B.
 Na^+/H^+ exchange activity in renal brush border
membrane vesicles in response to metabolic
acidosis: the role of glucocorticoids.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1984, 81:630-634.
5. Preisig, P.A., and Alpern, R.J.
Chronic metabolic acidosis causes an adaptation
in the apical membrane Na/H antiporter and baso-
lateral membrane $\text{Na}(\text{HCO}_3)_3$ symporter in the rat
proximal convoluted tubule.
J.Clin.Invest., 1988, 82:1445-1453.
6. Akiba, T., Rocco, V.K., and Warnock, D.G.
Parallel adaptation of the rabbit renal cortical
sodium/proton antiporter and sodium/
bicarbonate cotransporter in metabolic acidosis
and alkalosis.
J.Clin.Invest., 1987, 80:308-315.
7. Krapf, R.
Mechanisms of adaptation to chronic respiratory
acidosis in the rabbit proximal tubule.
J.Clin.Invest., 1989, 83:890-896.
8. Ruis, O.S., Arruda, J.A.L., and Talor, Z.
 $\text{Na}-\text{HCO}_3$ cotransport and $\text{Na}-\text{H}$ antiporter in
chronic respiratory acidosis and alkalosis.
Am.J.Physiol, 1989, 256(Renal Fluid Electrolyte
Physiol. 25):F414-F420.

9. Soleimani, M., Bergman, J.A., Hosford, M.A., and McKinney, T.D.
Potassium depletion increases luminal Na^+/H^+ exchange and basolateral $\text{Na}^+:\text{CO}_3:\text{HCO}_3^-$ transport in rat renal cortex.
J.Clin.Invest., 1990, 86:1076-1083.
10. Preisig, P.A., and Alpern, R.J.
Increased Na/H antiporter $\text{Na}/3\text{HCO}_3^-$ symporter activities in chronic hyperfiltration: a model of cell hypertrophy.
J.Gen.Physiol., 1991, 97:195-217.
11. Harris, R.C., Seifter, J.L., and Brenner, B.M.
Adaptation of Na^+/H^+ exchange in renal microvillous membrane vesicles.
J.Clin.Invest., 1984, 74:1979-1987.
12. Salihagic, A., Mackovic, M., Banfic, H., and Sabolic, I.
Short-term and long-term stimulation of Na^+/H^+ exchange in cortical brush-border membranes during compensatory growth of the rat kidney.
Pfluegers Arch.Eur.J.Physiol., 1988, 413:190-196.
13. Jenkins, A.D., Dousa, and Smith, L.H.
Transport of citrate across renal brush border membrane: effects of dietary acid and alkali loading.
Am.J.Physiol., 1985, 249(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 18):F590-F595.
14. Alpern, R.J., Warnock, D.G., and Rector, Jr. F.C.
In the kidney. 3rd ed. B.M. Brenner and F.C. Rector, Jr., editors. W.B. Saunders.
Renal acidification mechanisms. Philadelphia, PA. 1986:206-249.
15. Cogan, M.G.
Chronic hypercapnia stimulates proximal bicarbonate reabsorption in the rat.
J.Clin.Invest., 1984, 74:1942-1947.
16. Chan, Y.L., Biagi, B., and Giebisch, G.
Control mechanisms of bicarbonate transport across the rat proximal convoluted tubule.
Am.J.Physiol., 1982, 242(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 11):F532-F543.

17. Horie, S., Moe, O., Tejedor, A., and Alpern, R.J.
Preincubation in acid medium increases Na/H
antiporter activity in cultured renal proximal
tubule cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990, 87:4742-4745.
18. Haggerty, J.G., Agarwal, N., Reilly, R.F.,
Adelberg, E.A., and Slayman, C.W.
Pharmacologically different Na/H antiporters on
the apical and basolateral surfaces of cultured
porcine kidney cells (LLC-PK₁)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85:6769-6801.
19. Igarashi, P., Freed, M.I., Ganz, M.B., Reilly, R.F.
Effects of chronic metabolic acidosis on Na(+)-H⁺
exchangers in LLC-PK₁ renal epithelial cells.
Am. J. Physiol., 1992, 263:83-88.
20. Moe, O.W., Miller, R.T., Horie, S., Cano, A.,
Preisig, P.A., and Alpern, R.J.
Differential regulation of the Na/H antiporter by
acid in renal epithelial cells and fibroblasts.
J. Clin. Invest., 1991, 88:1703-1708.
21. Nishizuka, Y.
The role of protein kinase C and its implications
for cellular regulation.
Nature, 1988, 334:661-665.
22. Fine, L.
The biology of renal hypertrophy.
Kidney Int., 1981, 29:619-634.
23. Horie, S., Moe, O., Miller, R.T., Alpern, R.J.
Long-term activation of protein kinase C causes
chronic Na/H antiporter stimulation in cultured
proximal tubule cells.
J. Clin. Invest., 1992, 89:365-372.
24. Chirgwin, J.J., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J.,
and Rutter, W.J.
Isolation of biologically active ribonucleic
acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry., 1979, 18:5294-5299.

25. Luckow, B., and Schutz, G.
CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15:5490.
26. Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Subrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., and Blanchard, J.M.
Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13:1431-1442.
27. Curran, T., Gordon, M.G., Rubino, K.L., and Sambucetti, L.C.
Isolation and characterization of the C-fos (rat) DNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene*, 1987, 2:74-84.
28. Ryder, K., and Nathans, D.
Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85:8464-8467.
29. Hata, A., Akita, Y., Konno, Y., Suzuki, K., and Ohno, S.
Direct evidence that the kinase activity of protein kinase C is involved in transcriptional activation through a TPA-responsive. *FEBS Lett.*, 1989, 252:144-146.
30. Hannun, Y.A., Greenberg, C.S., and Bell, R.M.
Sphingosine inhibition of agonist-dependent secretion and activation of human platelets implies that protein kinase C is a necessary and common event of the signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262:13620-13626.
31. Lowe, J.H.N., Huang, C.L., and Ives, H.E.
Sphingosine differentially inhibits activation of the Na^+/H^+ exchange by phorbol esters and growth factors. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:7188-7194.
32. Huang, F.L., Yoshida, Y., Cunha-Melo, J.R., Beaven, M.A., and Huang, K.P.
Differential down-regulation of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264:4238-4243.

33. Curran, T., and Franza, K.B.R., Jr.
Fos and Jun: The AP-1 Connection.
Cell, 1988, 55:395-397.
34. Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., and Verma, I.M.
Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos.
Nature, 1988, 334:314-319.
35. Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., and Karin, M.
The jun proto-oncogene is positively auto-regulated by its product, jun/AP-1.
Cell, 1988, 55:875-885.
36. Kharbanda, S.M., Sherman, M.L., and Kufe, D.W.
Transcriptional regulation of c-jun gene expression.
J.Clin.Invest., 1990, 86:1517-1523.
37. Sherman, M.L., Stone, R.M., Datta, R., Bernstein, S.H., and Kufe, D.W.
Transcriptional and post-transcriptional regulation of C-jun expression during monocytic differentiation of human myeloid leukemic cells.
J.Biol.Chem., 1990, 265:3320-3323.

38. Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., and Karin, M.
Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α .
Nature, 1989, 337:661-663.
39. Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H.E., and Chien, K.R.
 α - and β -Adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells.
J.Biol.Chem., 1990, 265:13809-13817.
40. Rao, G.N., de Roux, N., Sardet, C., Pouyssegur, J., and Berk, B.C.
 Na^+/H^+ antiporter gene expression during monocytic differentiation of HL60 cells.
J.Biol.Chem., 1991, 266:13485-13488.

41. Lotspeich, W.D.

Renal hypertrophy in metabolic acidosis and its
relation to ammonia excretion.

Am.J.Physiol., 1965, 208:1135-1142.

42. Yamaji, Y., Moe, O., Miller, R.T., Alpern, R.J.

Acid activation of early response genes is tissue
specific.

J.Am.Soc.Nephrol., 1992, 3:483 (Abstr.)

43. Miller, R.T., Counillon, L., Rages, G., Lifton, F.P.,
Sardet, C., and Pouyssegur, J.

Structure of the 5'-flanking regulatory region
and gene for the human growth factor-activatable
Na/H exchanger NHE-1.

J.Biol.Chem., 1991, 266:10813-10819.

