

博士論文

近位尿細管の管腔側ナトリウム依存性酸塩基輸送機構の解明

鈴木 淳司

近位尿細管の管腔側ナトリウム依存性酸塩基輸送機構の解明

東京大学医学系研究科 内科学専攻

指導教員 南學 正臣 教授

申請者 鈴木 淳司

要旨

近位尿細管管腔側の酸塩基輸送機構はナトリウム(Na)輸送と連動しており、特に Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE)3 は、近位尿細管管腔側における Na 依存性酸塩基輸送機構の中心的役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、近年この定説には疑問が呈され、他の輸送体の存在も示唆されていたが、その本態は不明であった。今回、私の属する研究グループにおいて開発された手法を用いて、近位尿細管の Na 依存性酸塩基輸送について検討を行った。その結果、近位尿細管管腔側において NBCn2 が主要な役割を果たしていることを見出した。

序文

近位尿細管におけるナトリウム(Na)再吸収

腎臓近位尿細管では、 Na^+ や重炭酸イオン(HCO_3^-)などの生命維持に不可欠な様々な物質の調節が行われている。特に Na^+ は体液量と密接に関与しており、近位尿細管管腔側に発現している Na^+/H^+ 交換輸送体(Na^+/H^+ exchanger : NHE)3 や $\text{Na}^+/\text{グルコース}$ 共輸送体(sodium glucose co-transporter : SGLT)、 $\text{Na}^+/\text{リン酸}$ 、 $\text{Na}^+/\text{クエン酸}$ 、 $\text{Na}^+/\text{アミノ酸}$ 共輸送体など、基底側に発現している $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (Na^+ bicarbonate co-transporter : NBC)e1、 Na^+/K^+ ATPase など多数の輸送機構を介して、近位尿細管は全 Na^+ 再吸収量の約 50~70%を司ることで体液の恒常性維持にとって根源的な役割を担っている。

近位尿細管における酸塩基輸送

酸塩基平衡は生体内の恒常性を維持する上で非常に重要であり、細胞外液は $\text{pH} = 7.40 \pm 0.05$ と非常に狭い範囲で繊細に調整されている。この細胞外液における酸塩基平衡の調節において最も比重が大きい炭酸-重炭酸緩衝系には近位尿細管における HCO_3^- 再吸収機構が関連している。すなわち、近位尿細管は糸球体で濾過された HCO_3^- の約 80%を再吸収する(1-4)ことで緩衝系により消費された HCO_3^- を補充しているが、重要なことにこの近位尿細管における酸塩基輸送機構の殆どが Na 輸送と連

動しており、①管腔側に発現している NHE3、②基底側に発現している NBCe1、③管腔側に発現している液胞型 H⁺ポンプ(V-ATPase)が主たる担い手として知られている。

(図 1)

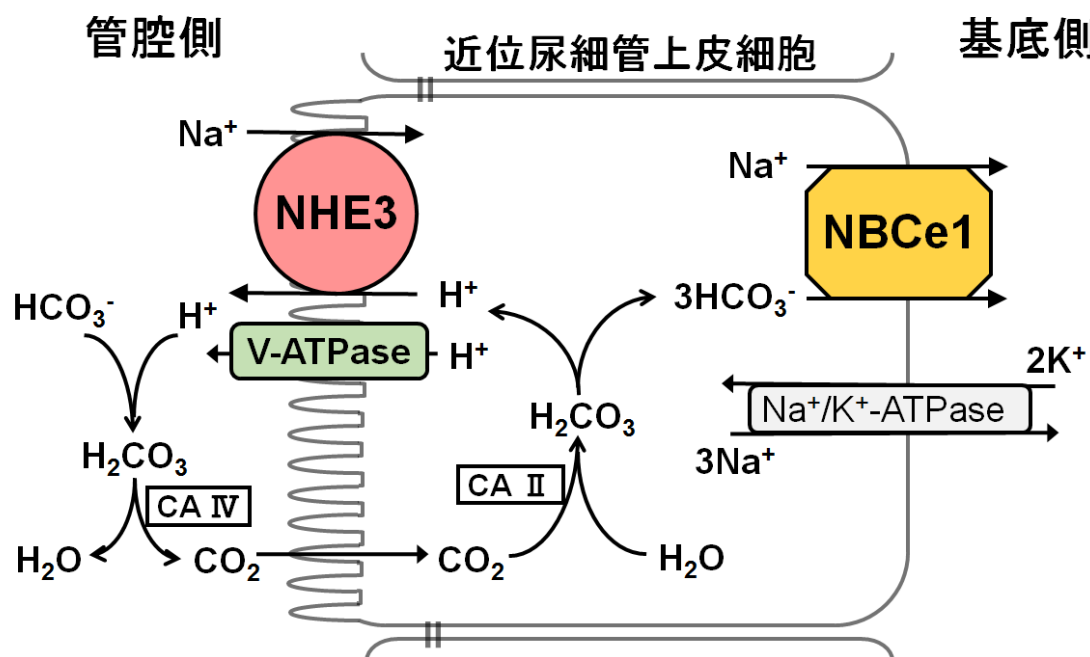


図 1 近位尿細管における酸塩基輸送

腎近位尿細管における酸塩基輸送は①管腔側の Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE3)、②基底側の Na⁺/HCO₃⁻共輸送体(NBCe1)、③管腔側の液胞型 H⁺ポンプ(V-ATPase)を主とした重炭酸再吸収過程を本態とし、能動的 Na⁺輸送と密接に関連している。

(CA : carbonic anhydrase、炭酸脱水酵素)

単離近位尿細管管腔側輸送体機能評価法

従来から尿細管管腔側の輸送体活性を評価する方法として、Burg らが 1960 年代に確立した単離尿細管微小灌流法が広く用いられている。これは単離した尿細管の両端を顕微鏡下に外筒パイペットを用いて吸引固定し、尿細管の内腔にさらに細い内筒パイペットを挿入して溶液を灌流させるもので(5)、ガラス毛細管からパイペットを作成する工程や鏡視下操作が煩雑であるなどの欠点があった。近年、佐藤らが開発した split-open 法はこれら欠点を補う新規手法として注目されている(6)。

NHE3

NHE は Na^+ と H^+ を対向輸送する二次性能動輸送体であり、殆どすべての生物に発現している酸塩基平衡を制御する重要な輸送体である(7, 8)。哺乳類には、NHE1 から NHE9 までの isoform が同定、クローニングされており(9-37)、全ての isoform の N 末端に存在する 12 回膜貫通領域がイオン輸送に関連する一方、C 末端に存在する親水性領域が多数の蛋白質と結合することができることから、C 末端は主に輸送体活性や局在の制御に関わるものと考えられている(25, 38)。

NHE の局在については、NHE1 は殆ど全ての細胞に発現している(39)のに対し、その他の isoform については細胞特異的な発現が知られている。例えば腎臓に発現する NHE1 から NHE4 までの 4 つの isoform の内(1, 30, 32-35, 37)、NHE1 と NHE4 は

尿細管基底側に(40-42)、NHE2 と NHE3 は尿細管管腔側に発現している(43-48)。

近位尿細管管腔側の酸塩基輸送については、刷子縁膜小胞の研究により電気的中性な amiloride(AML)感受性 Na^+/H^+ 交換輸送体の存在が示唆され(35, 49)、その後、サンショウウオの単離尿細管による実験でも Na^+/H^+ 交換輸送が行われていることが示された(50)。以降、近位尿細管における酸塩基輸送についての多くの検討を通じて、管腔側における酸塩基輸送の殆どが主に NHE3 を介して Na 依存性に行われていることが明らかになった(1, 21, 51-60)。

しかしながら、各種阻害薬や遺伝子欠損動物を用いた解析が可能となるに伴い、NHE3 だけでは管腔側における Na 依存性酸分泌機構の全てを説明できない事象が報告されるようになった。例えば NHE3 の特異的阻害剤である S3226 (62, 63)を使用したラット近位尿細管の微小灌流法による検討においては、近位尿細管の Na 再吸収は 30%程度しか抑制されなかった(64)。Schultheis PJ らが初めて作成した *Nhe3* 欠損マウスではごく軽度の酸血症しか認められず(pH 7.27 ± 0.02、 HCO_3^- : 21.1 ± 0.9 mEq/L)、微小灌流法による検討でも近位尿細管の $\text{Na}^+\cdot\text{HCO}_3^-$ 再吸収能は 30-40%保たれていた。(61)他にも、Choi. JY らの作製した *Nhe3* 欠損マウスも致死的な酸血症は呈さず、微小灌流法による検討では AML 感受性の Na 再吸収能が約 40%程度保たれていた(62)。また、同検討では *Nhe2* 欠損および *Nhe2/Nhe3* 二重欠損マウスを用いた検討も併せて行われたが、管腔側の酸塩基輸送と *Nhe2* の間に関連は認められな

かった(62)。その後、Goyalらが *Nhe8* をクローニングし、NHE8 が近位尿細管に発現しており刷子縁に局在していることを示した(27)。そして Baum らは *Nhe3*、*Nhe8* および *Nhe3/Nhe8* 二重欠損マウスを作成し検討を行ったが、*Nhe3/Nhe8* 二重欠損マウスは *Nhe3* 欠損マウスと同程度のごく軽度の酸血症のみを呈するにとどまっていた(*Nhe3* 欠損マウス: pH 7.17 ± 0.03 、 HCO_3^- 16.5 ± 0.7 mEq/L、*Nhe3/Nhe8* 二重欠損マウス: pH 7.13 ± 0.03 、 HCO_3^- 16.6 ± 0.8 mEq/L)(63)。これより近位尿細管管腔側における酸塩基輸送に NHE8 が寄与する割合は NHE3 よりはるかに小さいと考えられた。また小腸 NHE3 を強制発現させたトランスジェニック *Nhe3* 欠損マウス *tgNhe3*^{-/-} や、Li らが作成した腎臓近位尿細管特異的 *Nhe3* 欠損マウス NHE-PT KO においても同様にごく軽度の酸血症を呈するのみであった(*tgNhe3*^{-/-}: pH 7.10 ± 0.01 、 HCO_3^- 24.9 ± 0.9 mEq/L、NHE3-PT KO: pH 7.23 ± 0.02 、 HCO_3^- 21.2 mEq/L) (64, 65)。腎臓近位尿細管特異的 *Nhe3* 欠損マウスから単離した尿細管に対し微小灌流法を用いた検討では、近位尿細管の $\text{Na}^+\cdot\text{HCO}_3^-$ 再吸収能は約 70% 保たれていた。(65) これらの結果から、近位尿細管管腔側には未知の輸送機構が存在する可能性が示唆されていた。

さらに興味深いことに、近年、先天性 Na 下痢症(congenital sodium diarrhea : CSD) のヒト症例の遺伝子解析により 8 種類の NHE3 の変異が報告されたが、機能廃絶型変異を有する症例でも重篤な酸血症の合併は認められなかった(66)。このことは、*Nhe3* 欠損マウスが軽度の酸血症と下痢のみを呈していたこと(61, 67)と類似しており、近位

尿細管の管腔側には NHE3 以外の未知の酸塩基輸送体が存在することが強く示唆された。

NBCe1

slc4 ファミリーに属する輸送体には陰イオン交換輸送体(Anion Exchanger : AE)と $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (Na^+ Coupled Bicarbonate Transporter : NCBT)、 Na^+ 存在下で $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ の交換輸送を行う輸送体(Na^+ -Driven Cl^- Bicarbonate Exchanger : NDCBE)がある。NCBT には起電性の輸送体と電気的中性の輸送体があり、NDCBE は電気的中性である。起電性 NCBT には NBCe1、NBCe2 があり、電気的中性のものとしては、NBCn1、NBCn2 がある(68)。これらの内、NBCe1 には N 末端や C 末端が異なる 5 つのバリエーションが報告されており(A-E)、図 1 で示すように近位尿細管上皮細胞の基底側に発現している NBCe1A は、化学量論的に Na^+ と HCO_3^- を 1:3 の割合で細胞内から細胞外へ輸送することで HCO_3^- の再吸収に寄与している(69, 70)。

NBCe1A の機能低下(>50%)型変異を有するヒト症例では、眼症状を伴う重症の酸血症を来す(71-74)、NBCe1 欠損マウスでは重症酸血症を来すだけでなく致死的となる(75, 76)ことから、NBCe1 は酸塩基平衡の恒常性維持において重要な役割を果たしていると考えられている。

V-ATPase

V-ATPase はイオン輸送性 ATPase の一つであり、骨細胞やがん細胞などに発現して液胞の H^+ を能動的に輸送していることが知られているが、近位尿細管にも発現していることが分かっている(77)。近位尿細管において V-ATPase は、活性を測定することが技術的に困難であることなどから、その役割や制御機構などについては不明な点が多いものの、近位尿細管における HCO_3^- 再吸収に 20% 程度関与しており(78, 79)、その活性は特異的な阻害剤である bafilomycin によりほぼ完全に抑制される(78, 80)。その他にも、V-ATPase は細胞内小胞の酸性化を介してエンドサイトーシスやライソゾーム内での蛋白分解などの役割を担っていること(81-83)、 $2Cl^-/H^+$ 交換輸送体(CLC5)と共役してエンドサイトーシスを制御することにより尿蛋白再吸収過程において重要な役割を果たしていることが報告されている(84)。しかしながら、近位尿細管 V-ATPase の機能低下あるいは機能喪失による重篤な近位尿細管性アシドーシスの報告例がないことから、近位尿細管酸塩基輸送における V-ATPase の意義は小さいと考えられている。

NBCn2

NBCn2 は *slc4a10* でエンコードされる電気的中性な Na^+/HCO_3^- 共輸送体で、現時点では A から N までの変異を含めた 16 のバリエントが報告されている(85-89)。腎臓

における NBCn2 については、ラット腎臓には主に NBCn2-C、NBCn2-G の発現が報告されており、ヒト腎臓には NBCn2-A および NBCn2-B の発現が報告されているが、腎臓における NBCn2 の局在や役割については不明である。(86, 87)マウス腎臓における NBCn2 の発現は明らかにされておらず(86)ノックアウトマウスを用いた検討でも腎臓に関連する表現系は報告されていない(90, 91)。ヒトでは自閉症のコホート研究で初めて遺伝子変異をもつ症例が報告され(92)、後に他の変異症例で痙攣が報告されたが(93)いずれの症例でも酸塩基平衡や尿検査の異常は報告されていない。

近位尿細管における Na^+ や HCO_3^- の再吸収は、古典的には図 1 に示すように主に NHE3 や炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase : CA)を介した輸送様式と考えられているが、電気的中性な共輸送の機構も考えられ、輸送体の 1 つの候補に NBCn2 が挙げられる(図 2) (94)。

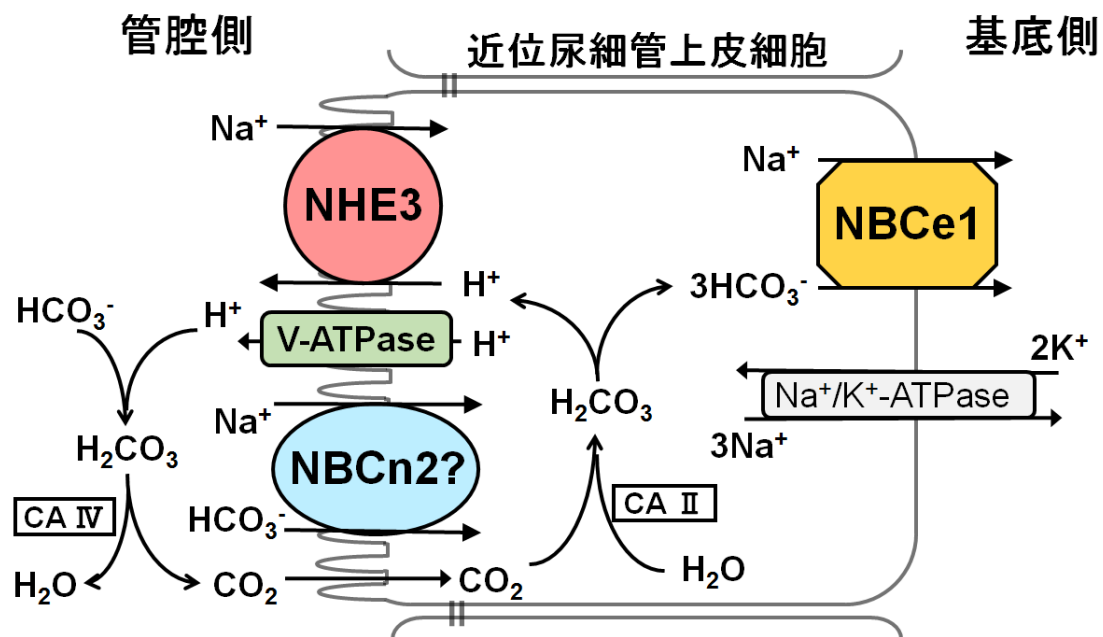


図 2 近位尿細管管腔側の酸塩基輸送に NBCn2 が関与する仮説モデル

管腔側に NBCn2 が存在し Na^+ と HCO_3^- を共輸送しているとする仮説。

目的

本研究では、従来近位尿細管管腔側の Na 依存性酸塩基輸送の中心的役割を担うとされてきた NHE3 以外の未知の輸送体が存在する可能性について、動物やヒトの単離尿細管を用いた生理実験を交えた多面的解析を行うことにより、近位尿細管 Na 輸送および酸塩基輸送機構の詳細を明らかにすることを目的として実験を行った。

方法

動物を用いた実験はすべて東京大学の動物実験規約に準拠して実施した。また、ヒト腎組織を使用した実験については、東大倫理委員会にて審査され承認を得た。

(承認番号:2520-(8))

実験に使用した検体:マウス・ラット

C57BL/6 マウスは 6~8 週齢、Wistar ラットは 4~6 週齢で使用し、フェノバルビタールナトリウム(50 mg/kg)の腹腔内投与による全身麻酔下で臓器を速やかに摘出後、安楽殺処分とした。

実験に使用した検体:ヒト

東京大学医学部附属病院泌尿器科・男性科において、腎臓悪性腫瘍に対して腎臓摘出術が施行された患者の内、術前に文書による協力同意が得られた患者の摘出検体の健常部分を実験に使用した。

近位尿細管の単離

4°Cに冷却した HEPES 緩衝液(127 mM NaCl、5 mM KCl、1.5 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、2 mM NaH₂PO₄、1 mM Na₂SO₄、25 mM HEPES、5.5 mM glucose、pH 7.4)内

において、摘出したマウス、ラットおよびヒト腎組織より実体顕微鏡下で用手的、速やかに近位尿細管の単離を行った。

split-open 法: 近位尿細管管腔側の露出

単離近位尿細管の管腔側の輸送体機能を評価するために、私の属する研究グループが開発した split-open 法を使用した。具体的には腎臓組織から単離した近位尿細管を、細胞接着剤 CELL-TAK[®](#354240、Corning、NY、U.S.A)と 2M Na₂CO₃ 溶液を 4:1 の比率で混和した溶液でコーティングしたカバーガラス上に貼付し、マイクロマニピュレーターに装着した鋭利なガラスパイペットを用いて光学顕微鏡下で尿細管表面を切開して管腔側を露出させる手法である。(図 3A)(6)

管腔側を露出した単離近位尿細管を溶液で灌流し、灌流液の電解質組成を変化させた際の細胞内 pH 変化を測定することで管腔側の輸送体活性を評価することが可能である。(図 3B)

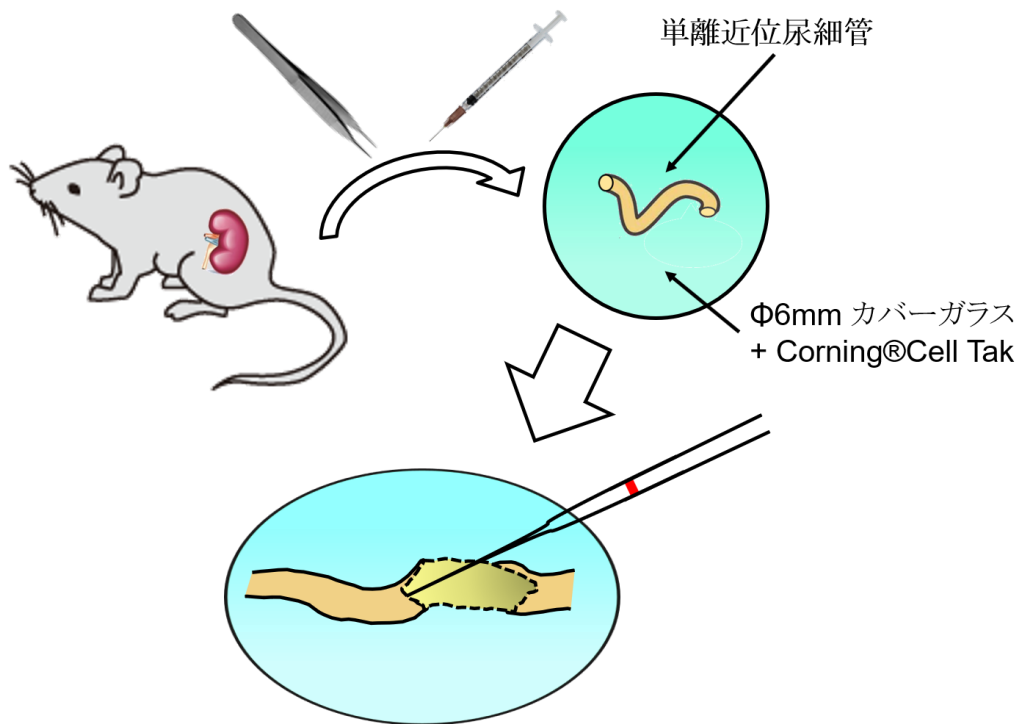


図 3A split-open 法

腎臓組織から尿細管を単離する操作は従来の微小灌流法と共通だが、カバーガラスに尿細管を固定した後の操作は比較的容易である。

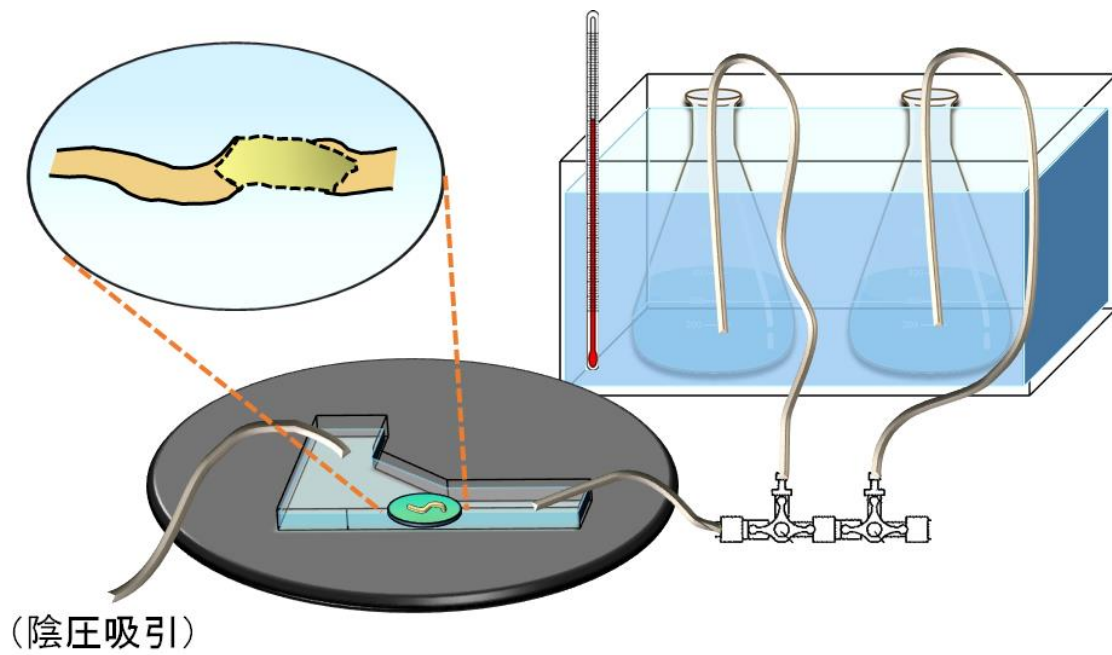


図 3B split-open 法を応用した単離尿細管灌流システム

カバーガラスに固定した尿細管に切開を加え、管腔側を露出させた状態で灌流液の組成を変化させた際の細胞内 pH 変化を観察する。

近位尿細管細胞内 pH 測定: 検量線の作成

近位尿細管細胞内 pH 測定に用いる検量線は、Metafluor 解析システムを搭載した倒立顕微鏡(IX-71, Olympus)を用い、以下の方法により作成した。φ 35 mm ディッシュ上で 90%以上コンフルエントとなった HEK293 細胞を HEPES 緩衝液で 5 分間×3 回洗い、3 μM BCECF-AM(2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (#117464-70-7、同仁科学研究所、熊本、日本))とイオノフォア(10 μM nigericin sodium salt(#28643-80-3、和光純薬、東京、日本)、10 μM monensin sodium salt(#22373-78-0、和光純薬、東京、日本)、10 μM valinomycin(#2001-95-8、和光純薬、東京、日本)、5 μM carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone(CCCP)(#555-60-2、Sigma-Aldrich、U.S.A.)、200 nM bafilomycin A1(#88899-55-2、和光純薬、東京、日本))を添加し、37°Cで 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、pH を調節した HEPES 緩衝液(pH 6.0、6.5、7.0、7.5)に交換し、W1: 440 nm と W2: 495 nm の励起光の照射により測定された蛍光強度(測定波長: 510-560 nm)の比をそれぞれ算出して作成した検量線(図 4)を Metafluor 解析システムに読み込ませた。

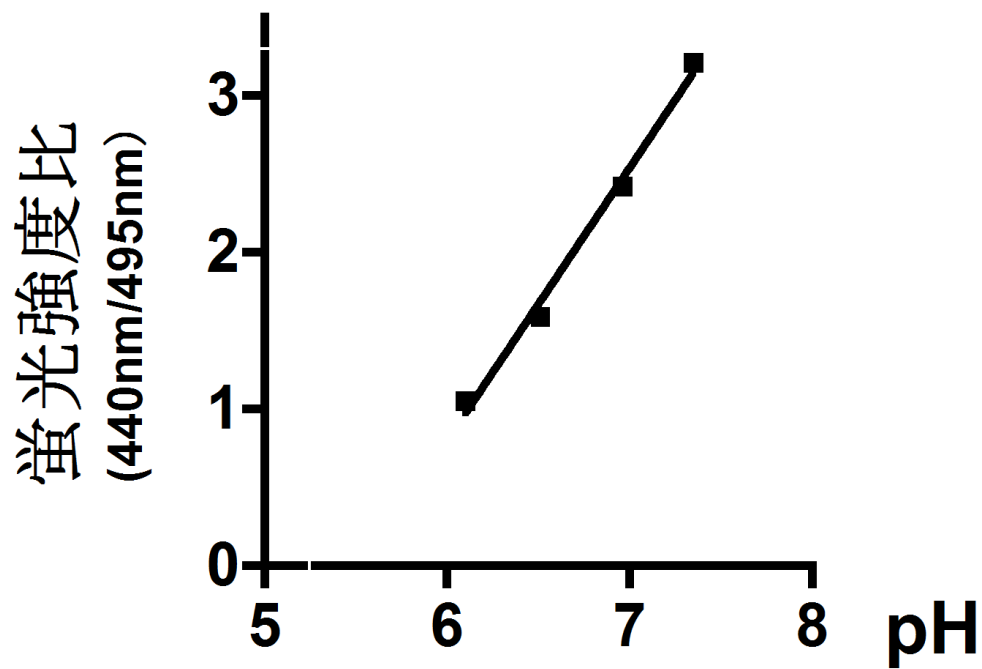


図 4 細胞内 pH 検量線

イオノフォアと BCECF-AM を導入した HEK 細胞に対し、各 pH 条件下で W1: 440 nm と W2: 495 nm の励起光を照射し、測定された蛍光強度の比から検量線を作成した。

近位尿細管 Na 依存性酸分泌活性(NHE 様活性)の評価

Na 依存性酸分泌活性は灌流液の Na⁺除去による単離近位尿細管の細胞内 pH 低下反応における初期速度を用いて評価した。(6, 95-99) 単離近位尿細管の細胞内 pH 測定に際しては、灌流システムおよび BCECF-AM と Metafluor 解析システムを用いた既報に基づいて施行した。(6) 測定に使用した灌流液の組成を表 1 に示す。本研究では基底側 NBCe1 の細胞内 pH 変化への影響を除外するため、HCO₃⁻を含まない灌流液のみを使用した。

測定条件: 露光時間: 0.5 sec、励起波長: W1: 440 nm と W2: 495 nm

蛍光測定波長: 510-560 nm (バンドパスフィルタ (71001a、Chroma Technology Corporation、Bellows Falls、VT、U.S.A.)を使用)

	HEPES 緩衝液	Na ⁺ free HEPES 液	Cl ⁻ free HEPES 液	Cl ⁻ free Na ⁺ free HEPES 液
Na ⁺	144	-	144	-
K ⁺	5	5	5	5
Cl ⁻	137	137	-	-
Ca ²⁺	1.5	1.5	5	5
Mg ²⁺	1	1	1	1
H ₂ PO ₄ ⁻	2	2	2	2
SO ₄ ²⁻	1	1	1	1
Glucose	5.5	5.5	5.5	5.5
HEPES	25	25	25	25
NMDG ⁺	-	144	-	144
Gluconate ⁻	-	-	132	132

表 1 灌流液の組成

全ての灌流液に重炭酸を含まない溶液を使用した。

イオン輸送阻害剤

近位尿細管 NHE 様活性における各輸送体の寄与を評価する際、標的とするそれぞれの輸送体に対する以下の阻害剤を灌流液に添加した。

EIPA (NHE 阻害剤): 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride

DIDS (陰イオン輸送体阻害剤): 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid

HOE642(NHE1 阻害剤): cariporide

使用濃度については既報に基づき、標的輸送体活性を十分に阻害する濃度とした。

(EIPA: 100 μ M、DIDS: 500 μ M、HOE642: 1 μ M) (100, 101)

単離近位尿細管遺伝子発現抑制法

阻害剤を用いた実験に加えて、私の属する研究グループが開発・報告した近位尿細管遺伝子発現抑制法(98)を応用し、イオン輸送体遺伝子を特異的にノックダウンした近位尿細管を用いて NHE 様活性の測定を行った。具体的には図 5 に示すように、グルタミン非含有ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)2 ml と 10 %ウシ胎児血清(FBS)を用いて作成した組織培養液を用いて、単離近位尿細管を 37 °C、5% CO₂ 下で 12~24 時間培養する単離尿細管培養系と siRNA を用いた遺伝子抑制を組み合わせることで、標的とするイオン輸送体に特異的な mRNA 発現を抑制した。

siNHE3 (sc-36059、Santa Cruz Biotechnology、Dallas、Texas、U.S.A.) と siNHE8 (sc-75912、Santa Cruz Biotechnology、Dallas、Texas、U.S.A.)については無血清培地 250 µl で希釈し、100 pM とした後、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (#11668027、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、U.S.A.)を使用してマウス単離近位尿細管細胞にトランスフェクションした。siNBCn2 (SR505598、Origene Technologies Inc、Rockville、MD、U.S.A.)については、無血清培地 250 µl で希釈し、20 pM とした後、SiTran 1.0 (TT300001、Origene Technologies Inc、Rockville、MD、U.S.A.)を使用してラット単離近位尿細管細胞にトランスフェクションした。それぞれ siRNA 導入より 24~30 時間経過したものを実験に使用し、また si-scramble を導入したものをコントロールとして使用した。遺伝子抑制効率は定量 PCR を用いて目的遺伝

子と β -Actin(内在性コントロール遺伝子)の mRNA 発現量の比を算出して評価した。

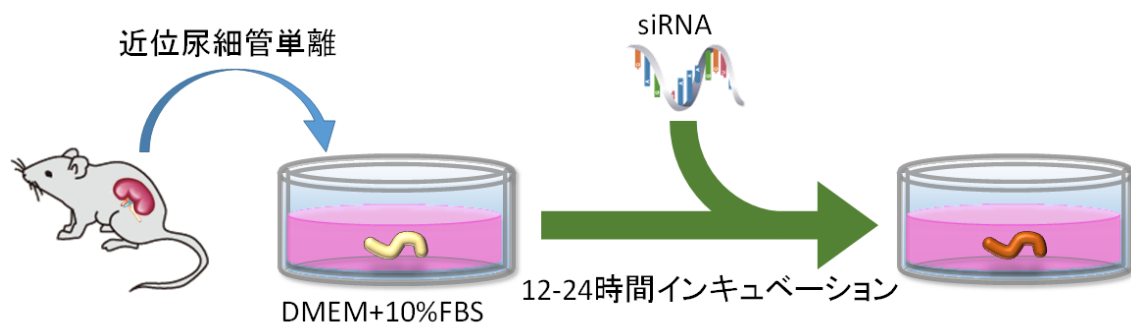


図 5 単離近位尿細管遺伝子発現抑制法

マウス、ラットの腎臓から近位尿細管を単離し、siRNA を添加した組織培養液中で培養することで、標的とするイオン輸送体に特異的な mRNA 発現を抑制する。

RNA の抽出と cDNA 合成

定量 PCR を施行するに際して、腎皮質または培養単離近位尿細管より全 RNA を抽出した。具体的には、氷上でポッター型ホモジナイザーを用いて RNA 抽出用試薬 (Isogen II、ニッポン・ジーン社、東京、日本) と組織を十分に混和し、遠心分離(12000 g、15 分間)後の上清に p-bromoanisole(#104-92-7、和光純薬、東京、日本)5 μ l を添加し、再度遠心分離(12000 g、10 分間)の後に上清を回収した。回収した上清をさらに 2-propanol 1000 μ l と転倒混和し、遠心分離(12000 g、10 分間)後のペレット(RNA)をエタノール沈殿法により精製・回収し、RNase フリー水に溶解し、最終 RNA 濃度が 0.5 μ g/ μ l となるよう調整を行った。cDNA 合成には高効率逆転写酵素(FSQ-201、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix、東洋紡ライフサイエンス社、東京、日本)を使用した。具体的には、抽出した RNA 溶解液 2 μ l を 65°C で 5 分間インキュベートした後に氷上で急冷し、キット付属の各試薬(5x RT buffer 2 μ l、RT enzyme Mix 0.5 μ l、primer mix 0.5 μ l、nuclease-free water)を添加して総量を 10 μ l に調整し、37°Cで 15 分間(逆転写反応)、98°Cで 5 分間(酵素失活反応)のインキュベーション後に精製された cDNA を実験に使用した。

定量 PCR

定量 PCR 産物の検出には Taqman プローブを使用した。具体的には、TaqMan Gene Expression master mix (4369016, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) を使用し、リアルタイム PCR 分析装置(ABI PRISM 7000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)により解析した。

Western blotting

目的蛋白の発現を確認するために、SDS-PAGE 法を用いた Western blotting を行った。まず、サンプルの準備としてラットおよびヒト腎皮質を緩衝液 A (25 mM Tris-HCl [pH 7.4]、10 mM sodium orthovanadate、10 mM sodium pyrophosphate、100 mM sodium fluoride、10 mM EDTA、10 mM EGTA、1 mM PMSF)とポッター型ホモジナイザーを用いて氷上でホモジナイズし、さらに夾雑物を除去するために、4°Cで遠心分離(3000 g、10 分間)を行い、上清を回収した。サンプル中の蛋白含有量が 20 µg となるよう調整し、試料用緩衝液(2ME-) (×4) (#198-13282、和光純薬、東京、日本)を用いて変性処理(95°C、5 分間の加熱処理)を行いサンプルとした。

泳動は、泳動緩衝液(25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS、pH 8.3)を用いて電流:20~40 mA、電圧:100~200 V の設定で行い、転写はニトロセルロース膜(ニトロセルロースメンブレン® 0.2 µm、#1620112、Bio-Rad Laboratories、U.S.A)と転写装置

を用いたセミドライ方式で行った。転写後、5% w/v 脱脂粉乳/TBS によりブロッキングを1時間行った。ブロッキング後 0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate(Tween® 20)含有 1×TBS(TBS-T)により 5 分間×3 回の洗浄を行い、1 次抗体反応をオーバーナイトで行った。1 次抗体反応後、TBS-T により 5 分間洗浄を 3 回を行い、2 次抗体反応を室温遮光下で 1 時間行った。抗体反応終了後、TBS-T により 10～15 分間の洗浄を 3 回を行い、蛍光発色剤(ImmunoStar® Zeta、#297-72403、和光純薬、東京、日本)と室温遮光下で 5 分間反応させたものを撮像した。1 次抗体には anti-*SLC4A10* antibody (#ab122229、Abcam、Cambridge、UK)を 1:1000 に希釈したものを使用し、2 次抗体には Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly (#611-1102、Rockland Immunochemicals Inc、PA、U.S.A.)を 1:1000 で希釈したものを使用した。抗体の希釈は Can Get Signal ®(#NKB-101、東洋紡ライフサイエンス、東京、日本)を用いて行った。

免疫組織化学染色

発現蛋白の局在について検討するため、腎皮質の免疫組織化学染色を共焦点顕微鏡(Leica TCS SP5II、ライカ社、東京、日本)を用いて行った。具体的には、凍結組織切片作製用包埋皿内に厚さ 2～3 mm 腎皮質のスライスを置き、内部に室温保存した O.C.T. Compound(ティシュー・テック O.C.T. コンパウンド® サクラファインテックジ

ジャパン社、東京、日本)を注入して腎皮質を包埋した。O.C.T. Compound により包埋された腎皮質を液体窒素により凍結の上、5 μm の切片を作成してスライドガラス上に20%パラホルムアルデヒドで固定した。スライドガラスを風乾後、リン酸緩衝液(PBS) を使用して3分間の洗浄を3回繰り返し、恒温槽を用いて0.3 M グリシン溶液内で37°C、60分インキュベーションした。PBSによる3分間×3回の洗浄後、検体周囲をスーパーバップペン リキッドブロッカー®(大道産業、東京、日本)を用いて囲い、1% FBS/PBS 100 μl を使用して15分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、1次抗体による抗体反応を90分行い、PBSにより3分間の洗浄を3回行った後、2次抗体反応を45分行った。1次抗体には anti-*SLC4A10* antibody(#ab122229、Abcam plc、Cambridge、UK)と anti-AQP1(sc-32737、Santa Cruz Biotechnology、Dallas、Texas、U.S.A.)を1:25で希釈して使用し、2次抗体には1:1000に希釈した Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488、#ab150077、Abcam plc、Cambridge、UK) および Goat Anti Mouse IgG H&L (Chromeo® 546、#ab60316、Abcam plc、Cambridge、UK)を使用した。また核染色は DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(28718-90-3、同仁科学研究所、熊本、日本)により染色した。抗体希釈液には、Can Get Signal® Immunostain Solution A(NKB-501、東洋紡ライフサイエンス社、東京、日本)を使用した。

統計解析

全ての数値は平均値 ± 標準誤差で記載し、検定は2群間の比較は Student の t 検定を使用し、多重比較検定は Bonferroni 法で行った。有意差は、 $P < 0.05$ とした。

結果

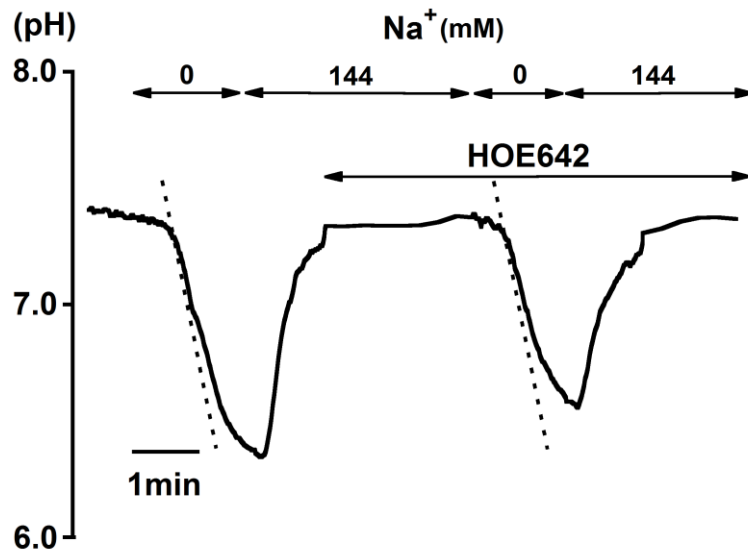
近位尿細管管腔側、基底側の Na 依存性酸塩基輸送(NHE 様活性)

カバーガラス上に固定したマウス単離尿細管の管腔側を split-open 法により露出させ、pH 感受性蛍光色素 BCECF-AM を用いて細胞内 pH を測定した。灌流液を HEPES 緩衝液から Na⁺非含有液に変更して灌流液の Na⁺除去を行うと急速な細胞内 pH 低下が見られ、Na⁺の再添加により細胞内 pH の上昇が見られ(NHE 様活性)、Na 依存性の酸塩基輸送が行われている事を確認した。この反応は NHE1 阻害剤 HOE642 の影響を受けなかった(図 6A)。

一方、単離近位尿細管を切開せず基底側のみ灌流される状態で同様に灌流液の Na⁺除去を行うとわずかな細胞内 pH 低下が見られたが、この反応は HOE642 によりほぼ完全に抑制されたことから、近位尿細管基底側の NHE1 の活性を反映していると考えられた(図 6B)。

これらの結果から、NHE 様活性における基底側の輸送体の影響は極めてわずかであり、split-open 法により管腔側を露出させた状態で測定された NHE 様活性は管腔側の Na 依存性酸塩基輸送体の活性をほぼ反映していると考えられた。以降の実験では単離近位尿細管の管腔側 NHE 様活性は split-open 法を施行した尿細管で評価した。

(A)



(B)

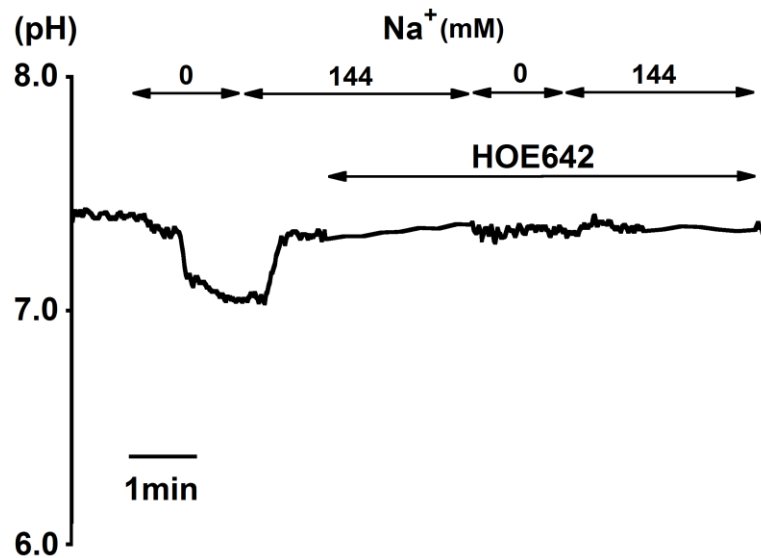


図 6 単離近位尿細管 NHE 様活性

(A) split-open 法による管腔側の露出あり (B) 管腔側の露出なし

NHE 様活性は灌流液より Na⁺除去後の dpH/dt の最大値(破線)とし、灌流液は HEPES 液と Na⁺ free HEPES 液(表 1)を使用した。

HOE642: cariporide (NHE1 阻害薬)

近位尿細管管腔側 Na 非依存性酸塩基輸送

次に、split-open 法により管腔側を露出させたマウス単離尿細管で灌流液の Na^+ 除去後の細胞内 pH の測定を続けたところ、灌流液の Na^+ 除去直後には急速な細胞内 pH の低下が見られたが、その後徐々に pH の上昇が認められた(図 7)その際灌流液の Na 濃度は一定であるため、Na 非依存性の酸分泌機序が想定された。近位尿細管管腔側に V-ATPase が発現していることが知られており、V-ATPase を介した酸分泌により細胞内酸性化回復が起きていると考えられた(79)。そのため V-ATPase 阻害剤 bafilomycin 100 nM を添加の上、同様に灌流液の Na^+ 除去後の細胞内 pH の変化を観察したところ、Na 非依存性 pH 上昇は bafilomycin で完全に抑制された。一方、 Na^+ 除去直後の NHE 様活性は bafilomycin の影響を受けなかった(図 7)。この結果から V-ATPase が近位尿細管管腔側の Na 非依存性酸塩基輸送に関与していると考えられたため、以降の実験では全ての灌流液に 100 nM bafilomycin を添加した。

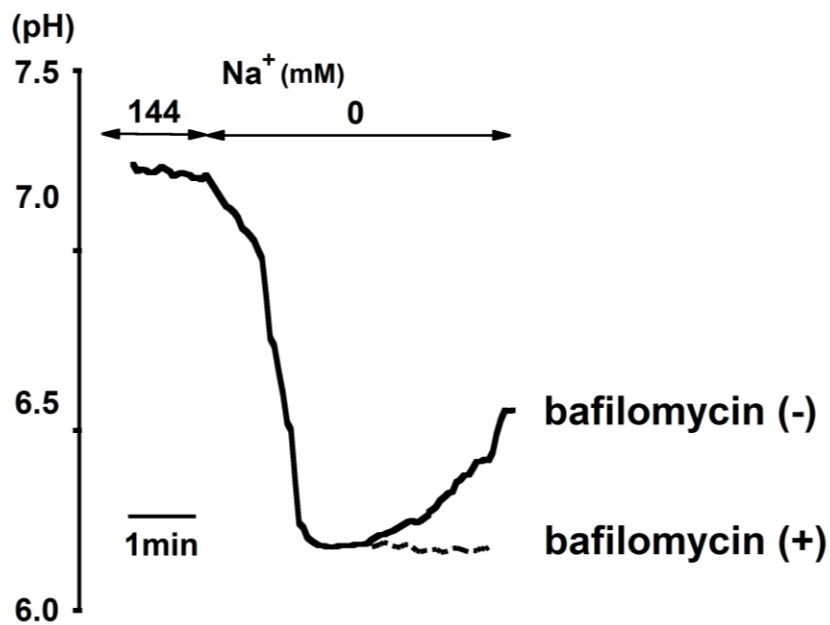


図 7 近位尿細管 V-ATPase 活性

灌流液は HEPES 液と Na⁺ free HEPES 液(表 1)を使用した。Na 非依存性の細胞内酸性化回復過程は V-ATPase 特異的阻害剤 bafilomycin により完全に抑制された。

近位尿細管管腔側 NHE 様活性における NHE の役割

近位尿細管管腔側の Na 依存性酸分泌には NHE3、NHE8 が関与することが報告されている(63)。マウス、ラット、ヒト近位尿細管における NHE の役割を明らかにするため、近位尿細管管腔側 NHE 様活性に対する NHE 阻害剤 EIPA の効果を測定した。100 μ M EIPA による NHE 様活性の阻害率はマウスでは $52.0 \pm 1.9\%$ 、ラットでは $45.2 \pm 2.6\%$ と 50% 前後であった。一方、ヒトでは $17.6 \pm 5.1\%$ と阻害率が有意に低く、ヒトにおいては NHE の関与が少ない可能性が考えられた(図 8)

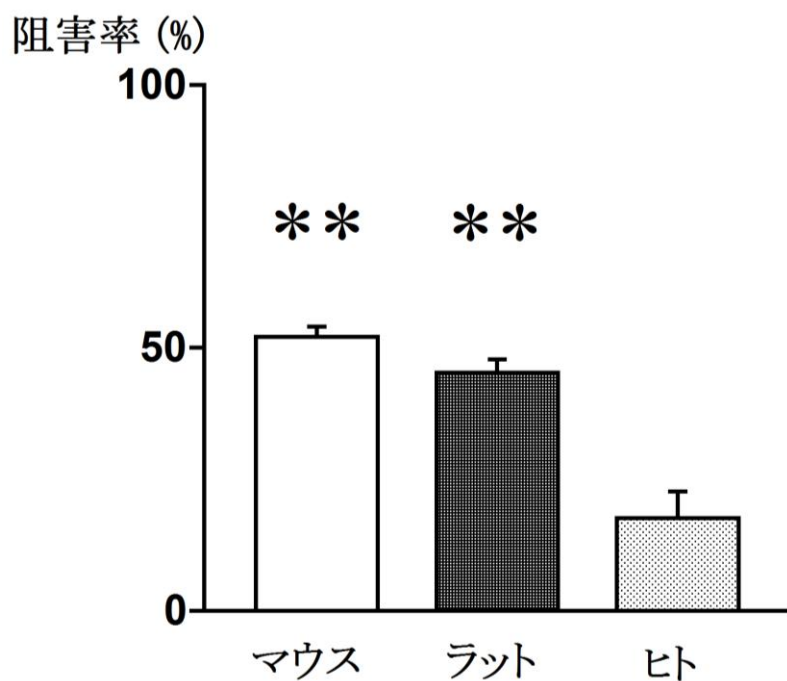


図 8 位尿細管管腔側 NHE 様活性に対する EIPA の阻害効果

阻害率 (%) = $(1 - \text{EIPA 添加後の NHE 様活性} / \text{EIPA 添加前の NHE 様活性}) \times 100$ としてマウス (n = 10)、ラット (n = 8)、ヒト (n = 7) の近位尿細管管腔側 NHE 様活性に対する EIPA の阻害効果を測定した。(** $P < 0.01$ versus ヒト)

次に、マウス単離近位尿細管に NHE3、NHE8 に対する siRNA を導入したサンプルを用いて定量 PCR を行い、各 siRNA の抑制効率と特異性を検証した。siNHE3 を導入した近位尿細管の NHE3 mRNA 発現量はコントロール(si-scramble)と比して $14.7 \pm 8.4\%$ と抑制され(図 9A)、siNHE8 を導入した近位尿細管の NHE8 mRNA 発現量はコントロール(si-scramble)と比して $24.1 \pm 4.4\%$ と抑制されていた(図 9B)。また siNHE3 による NHE8 への off-target 効果、siNHE8 による NHE3 への off-target 効果は無いことが示された。

さらに siRNA にて NHE3 と NHE8 の遺伝子発現を抑制したマウス単離近位尿細管に split-open 法を用いて管腔側 NHE 様活性を評価した。それぞれの siRNA の NHE 様活性への影響を調べたところ、NHE3 遺伝子発現を抑制した単離尿細管の NHE 様活性はコントロール(si-scramble)と比較して 50%程度に減弱していた。一方、NHE8 遺伝子発現を抑制した単離尿細管の NHE 様活性とコントロールの間に有意差は見られなかった。(図 9C) 以上より NHE8 は管腔側の NHE 様活性に殆ど寄与していないことが確認された。

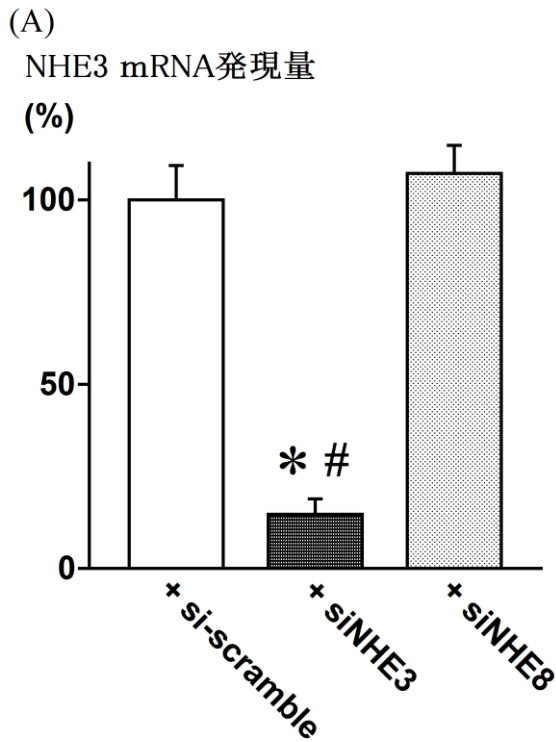


図 9A siNHE3 による遺伝子抑制効率
si-scramble(n = 4)、siNHE3(n = 4)、
siNHE8(n = 4)を導入したマウス近位尿
細管の NHE3 mRNA 発現量を+si-
scramble を 100%として比較した>(* P <
0.01 versus + si-scramble, # P < 0.01
versus + siNHE8)

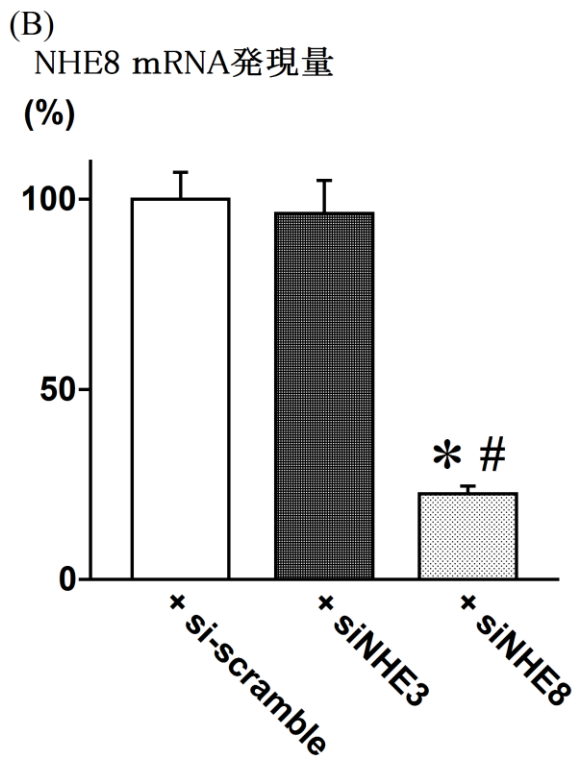


図 9B siNHE8 による遺伝子抑制効率
si-scramble(n = 4)、siNHE3(n = 4)、
siNHE8(n = 4)を導入したマウス近位
尿細管の NHE8 mRNA 発現量を+si-
scramble を 100%として比較した>(* P <
0.01 versus + si-scramble, # P < 0.01
versus + siNHE3)

NHE様活性

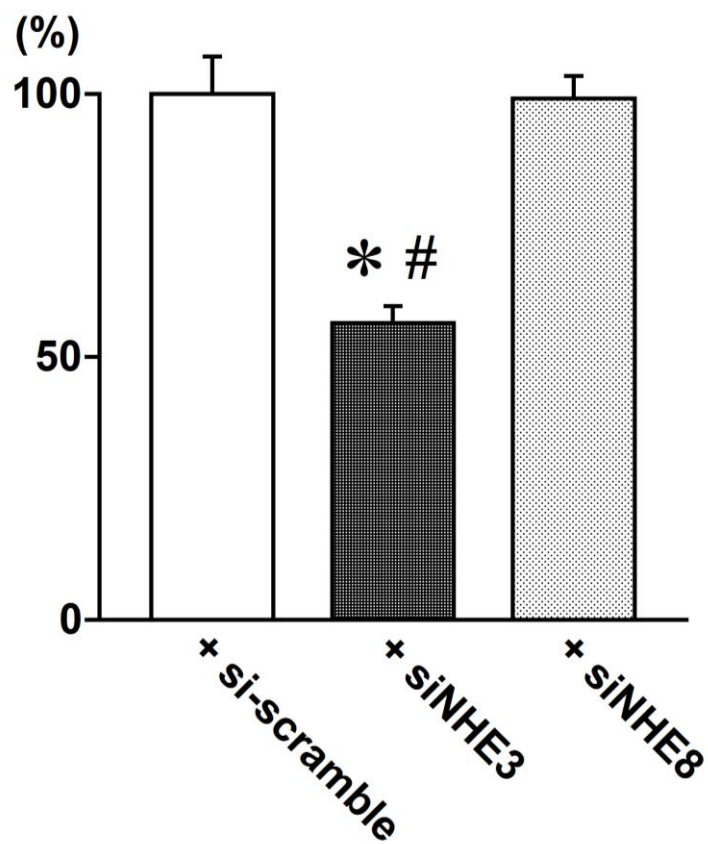


図 9C マウス近位尿細管管腔側 NHE 様活性における NHE3/8 の寄与
siRNA(si-scramble、siNHE3、siNHE8)を用いて遺伝子抑制を行ったマウス近位尿細管の NHE 様活性を、+ si-scramble を 100%として比較した。(* $P < 0.05$ versus + si-scramble、# $P < 0.05$ versus + siNHE8)

NHE 様活性への Cl⁻依存性輸送体の関与の検討

以前から Aronson らは近位尿細管管腔側に Cl⁻依存性酸塩基輸送体が存在する可能性を提唱している(図 10A)(102)。近位尿細管での発現や管腔側への局在は明らかにされていないが、AE や NCBT、NDCBE などの陰イオン輸送体が Cl⁻依存性に HCO₃⁻輸送を行っている可能性があるため、Cl⁻存在下と非存在下で管腔側 NHE 様活性を比較検討した(図 10B)。Cl⁻非存在下でも NHE 様活性は影響を受けず、細胞外 Cl⁻と共役している輸送体の関与は否定的であった。

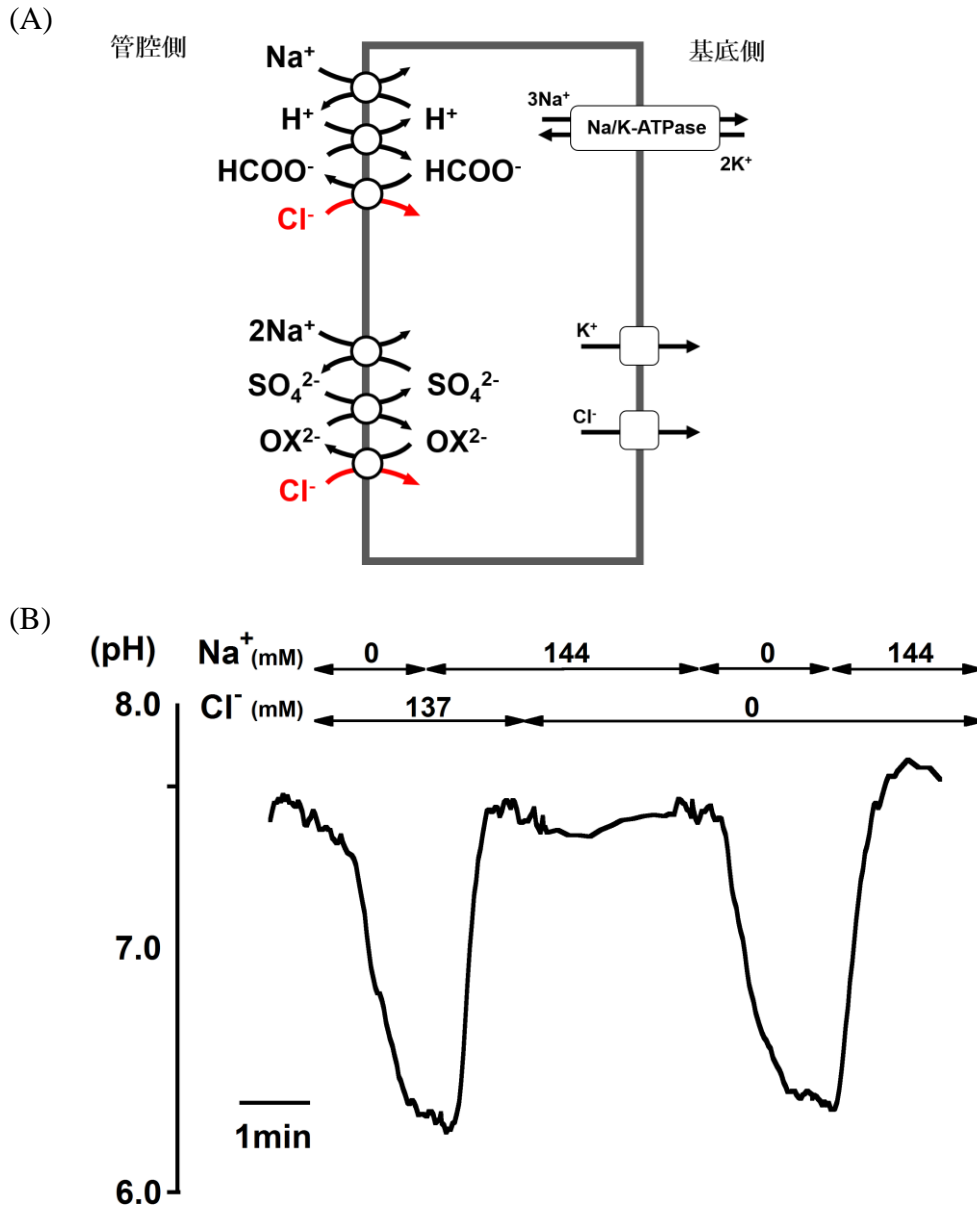


図 10 近位尿細管管腔側 NHE 様活性における Cl⁻依存性の検討

(A) Cl⁻依存性輸送体モデル。例としてギ酸イオンや硫酸イオン、シュウ酸イオンを介して間接的に NaCl が共輸送されている可能性を考慮している。

(B) Cl⁻存在下と非存在下におけるマウス近位尿細管管腔側 NHE 様活性

初回反応は HEPES 液と Na⁺ free HEPES 液を用いた通常の Na⁺除去後に HEPES 液に戻し、細胞内 pH が上がり切った後に灌流液を Cl⁻ free HEPES 液に置換した。2 回目の反応は Cl⁻ free Na⁺ free HEPES 液により Na⁺除去を行った。

灌流液は全て表 1 に記載のものを使用した。

NHE 様活性への陰イオン輸送体の関与の検討

近位尿細管管腔側の酸塩基輸送は重炭酸に依存せず、酸の分泌によると考えられてきた(49)。しかし、NHE 以外の管腔側 Na⁺依存性酸塩基輸送機構の有無を明らかにするため、陰イオン輸送体阻害剤 DIDS の NHE 様活性への影響を調べた。500 μM DIDS による NHE 様活性の阻害率はマウス、ラットで 43.7±2.4%、36.3±5.2%であったのに対し、ヒトでは 66.5±3.1%と DIDS による阻害率が有意に高く、陰イオン輸送体による酸塩基輸送の影響が大きいことが示唆された(図 11)。

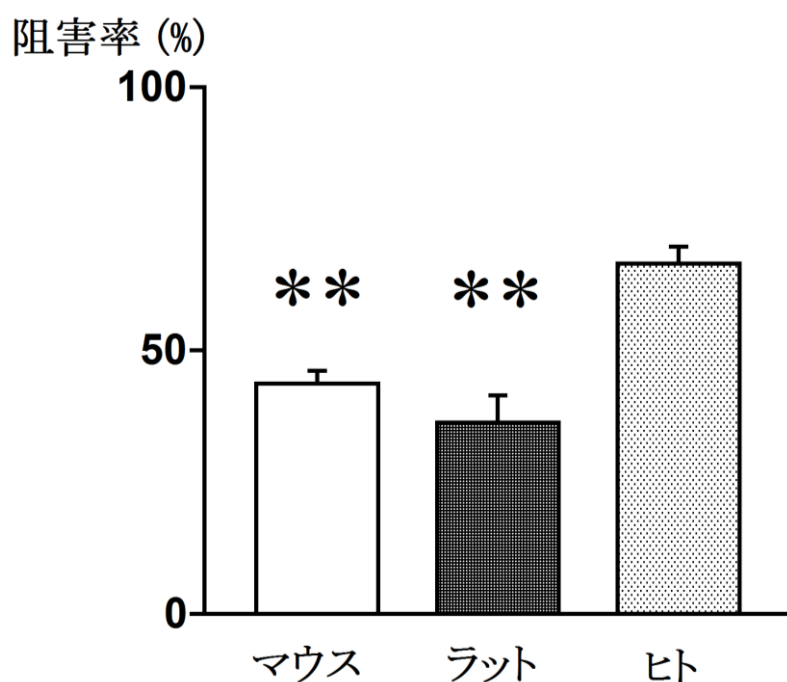


図 11 近位尿細管管腔側 NHE 様活性に対する DIDS の阻害効果

阻害率 (%) = (1 - DIDS 添加後の NHE 様活性 / DIDS 添加前の NHE 様活性) × 100
としてマウス (n = 15)、ラット (n = 12)、ヒト (n = 10) の近位尿細管管腔側 NHE 様活性における DIDS の阻害効果を測定した。(** $P < 0.01$ versus ヒト)

管腔側 NHE 様活性への NHE と陰イオン輸送体の関与の検討

NHE 阻害剤 EIPA 及び陰イオン輸送体阻害剤 DIDS を同時に添加し管腔側 NHE 様活性への影響を評価した。100 μ M EIPA 及び 500 μ M DIDS の同時添加により NHE 様活性の阻害率はマウスで $67.2 \pm 2.7\%$ であったのに対し、ラット、ヒトでは $83.5 \pm 2.0\%$ 、 $84.4 \pm 2.5\%$ であった(図 12)。

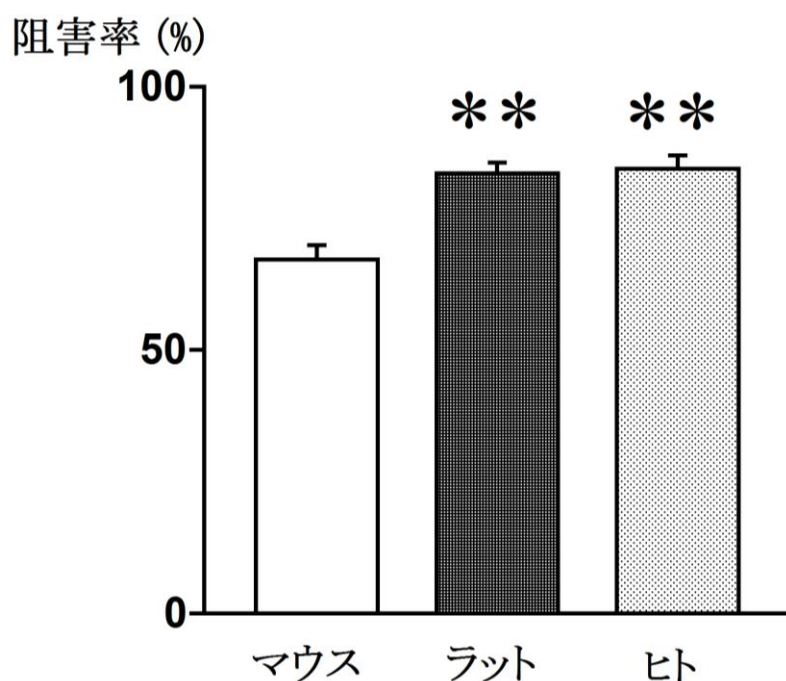


図 12 近位尿細管管腔側 NHE 様活性に対する EIPA + DIDS の阻害効果
阻害率 (%) = $(1 - \text{EIPA と DIDS 添加後の NHE 様活性} / \text{EIPA と DIDS 添加前の NHE 様活性}) \times 100$ としてマウス (n = 9)、ラット (n = 7)、ヒト (n = 5) の近位尿細管管腔側 NHE 様活性における EIPA + DIDS の阻害効果を測定した。(** $P < 0.01$ versus マウス)

近位尿細管管腔側 DIDS 感受性輸送体の同定

最近、ラット近位尿細管管腔側に $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 NBCn2 が発現している事が報告された(94)。Wang らは免疫組織化学染色と Western blotting により NBCn2 蛋白が近位尿細管管腔側に発現している事を示し、また、数学的なモデルにより酸塩基輸送へ寄与している可能性を示したが、実際の尿細管において NBCn2 がどのように酸塩基輸送に関与しているかは明らかでない。このため NBCn2 に対する siRNA をラット単離近位尿細管に導入し定量 PCR と生理実験にて NBCn2 の NHE 様活性への寄与を検討した。NBCn2 に対する siRNA の導入により NBCn2 mRNA 発現量はコントロール(si-scramble)と比較して $6.4 \pm 3.3\%$ と十分に抑制されていた(図 13 A)。

さらに siRNA にて NBCn2 の遺伝子発現を抑制したラット単離近位尿細管に split-open 法を用いて管腔側 NHE 様活性を評価した。siNBCn2 によって管腔側 NHE 様活性は約 50% 抑制されることを確認した(図 13B)。

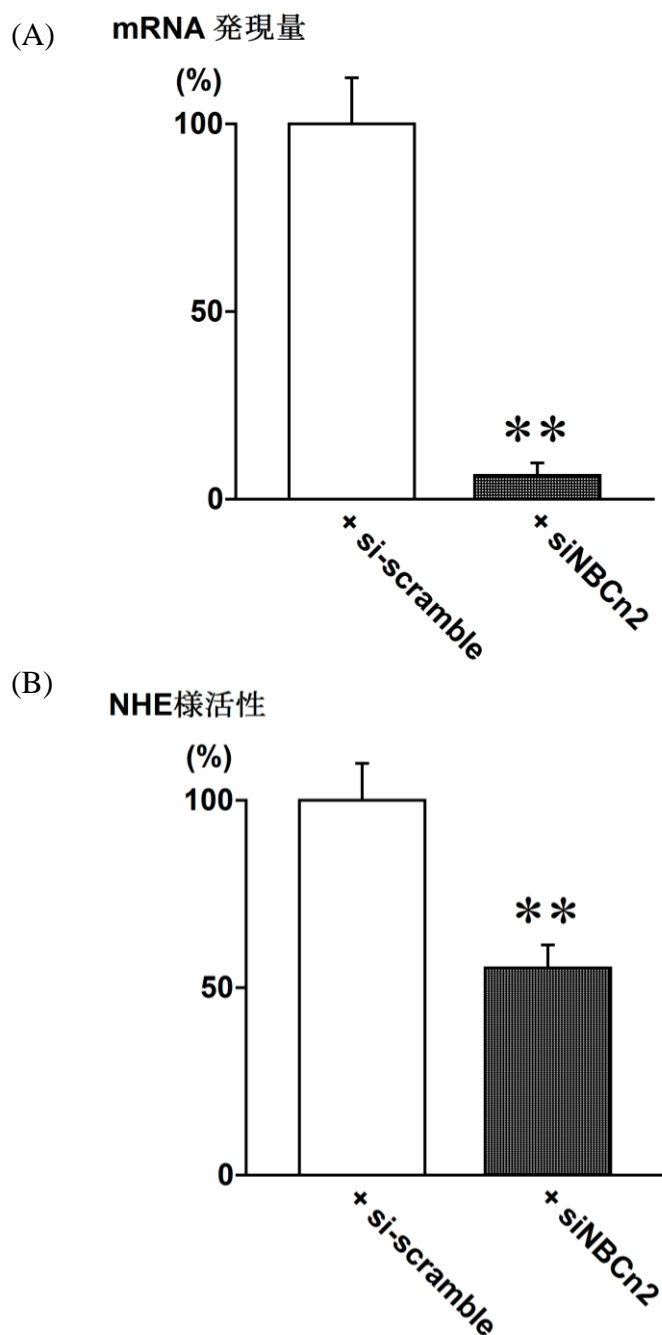


図 13 ラット近位尿細管管腔側 NHE 様活性における NBCn2 の寄与

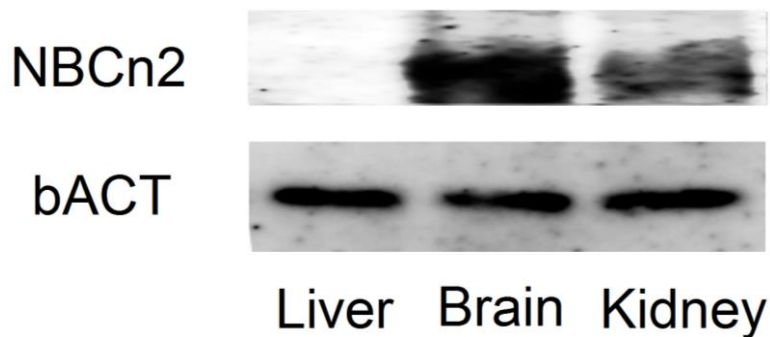
(A) siRNA による遺伝子抑制効率

si-scramble(n = 4)、siNBCn2 (n = 5)を導入したラット近位尿細管の NBCn2 mRNA 発現量を+si-scramble を 100%として比較した。(** $P < 0.01$ versus + si-scramble)

(B) siRNA(si-scramble、siNBCn2)を用いて遺伝子抑制を行ったラット近位尿細管の NHE 様活性を、+si-scramble を 100%として比較した。(** $P < 0.01$ versus +si-scramble)

また、ラット肝・脳・腎皮質の Western blotting、免疫組織化学染色により NBCn2 蛋白の発現と腎皮質における局在を確認した。Western blotting では NBCn2 が脳と腎皮質に豊富に発現している一方、肝臓には発現していないことが示された(図 14A)。免疫組織化学染色では NBCn2 蛋白が水チャネル AQP-1 と同様に近位尿細管上皮細胞の細胞膜に発現していることが示された。(図 14B)

(A)



(B)

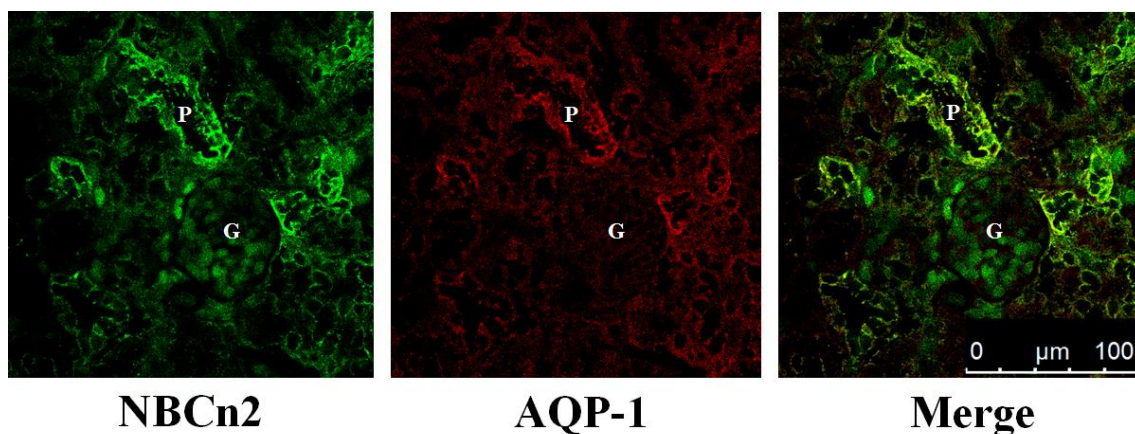


図 14A ラット肝臓、脳、腎皮質における NBCn2 発現

Western blotting によるラット肝臓、脳、腎皮質の NBCn2 蛋白発現解析 positive control として脳、negative control として肝臓を評価した。

図 14B ラット腎皮質における NBCn2 局在

免疫組織化学染色によるラット腎皮質の NBCn2 蛋白局在解析
G:糸球体 P:近位尿細管

ヒト近位尿細管 NBCn2 の発現

ヒトでは腎臓に NBCn2 が発現していることが報告されているがその局在は明らかでない(103)。このためヒト腎臓組織において Western blotting および免疫組織化学染色により NBCn2 蛋白の発現と局在を確認した。ヒト腎皮質の Western blotting では NBCn2 蛋白の発現を確認し(図 15A)、また、免疫組織化学染色により NBCn2 蛋白が水チャネル AQP-1 と同様、近位尿細管上皮細胞膜に管腔側優位に発現していることが示された(図 15B)。

(A)

(kDa)

150

100



(B)

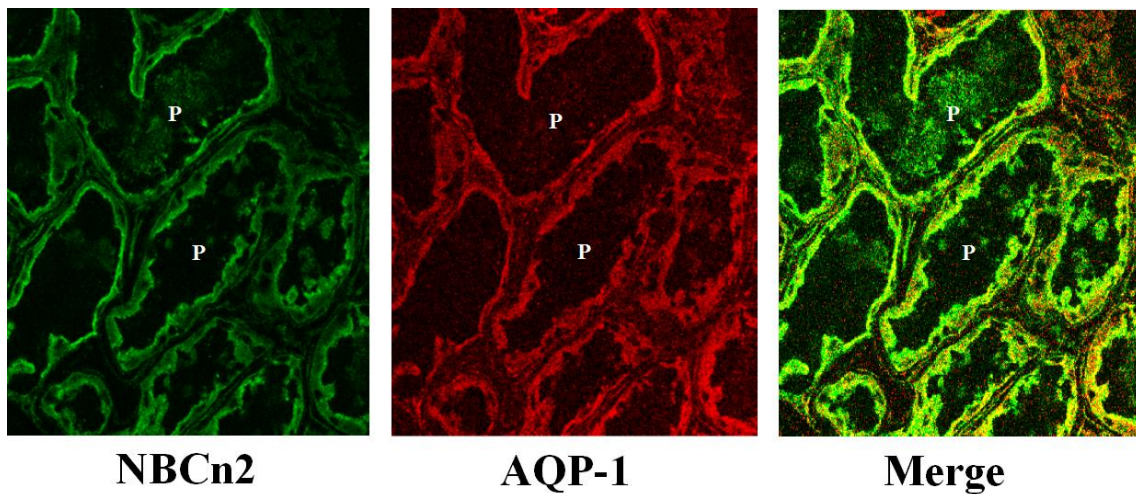


図 15 ヒト腎皮質における NBCn2 発現と局在

(A) Western blotting によるヒト腎皮質の NBCn2 蛋白発現解析

(B) 免疫組織化学染色によるヒト腎皮質の NBCn2 蛋白局在解析

P: 近位尿細管

考察

従来、近位尿細管の管腔側における Na 依存性酸分泌機構の中心は NHE3 であると考えられてきた。しかし、*Nhe3* 欠損マウスやヒト NHE3 機能廃絶型変異症例では酸血症を来さない事などから NHE3 の寄与の度合いには疑問が呈されていた(66)。このため、本研究では近位尿細管管腔側の Na 依存性酸塩基輸送(NHE 様活性)について検討を行った。NHE 阻害剤 EIPA により近位尿細管管腔側の NHE 様活性はマウス、ラット、ヒトで約 20-50%のみの抑制であった。また、マウス単離尿細管の NHE3 に対する siRNA 導入によっても NHE 様活性は約 50%しか抑制されなかった。一方、この NHE 様活性は陰イオン輸送体阻害剤 DIDS により 30~70%が抑制され、未知の輸送体の存在が示唆された。さらに、ラット近位尿細管管腔側に NBCn2 が発現していることが最近報告されていたが(94)、本研究でラット単離尿細管に NBCn2 に対する siRNA を導入したところ、NHE 様活性は約 50%が抑制された。これらの結果から、ラット近位尿細管管腔側の酸塩基輸送に NBCn2 が関与していることが初めて示された。また、ヒト近位尿細管管腔側にも NBCn2 が発現していることが明らかになったが、ヒトでは Na 依存性酸塩基輸送の大半が DIDS により抑制された事を考慮すると、NBCn2 が酸塩基輸送に大きく関わっている可能性が考えられた。

本研究では私の所属する研究グループにより開発された単離尿細管 split-open 法を用いて近位尿細管管腔側輸送体の解析を行った。従来の微小灌流法は確実に行う

ことができれば実際の尿細管の輸送を反映する有益なものであるが、手技が非常に煩雑で、確実に尿細管内腔に溶液を灌流させるには相当の熟練を要した。これに対して split-open 法は顕微鏡下でカバーガラス上に単離尿細管を固定し、鋭利な刃物により内腔を露出させるもので(図 3A)、手技が比較的容易かつ微小灌流法と異なり同時に複数の尿細管を観察することが可能であるという利点もあり、既に成果を上げている(6)。しかしこの方法は手技が簡便である一方、尿細管基底側の一部も灌流液に露出しているため基底側の輸送体の影響を受ける可能性も考えられた。そこで本研究では初めに、split-open 法を施行した単離尿細管の NHE 様活性に対して、基底側の輸送体の影響がごくわずかであることを生理実験で確認した(図 6)。また、新鮮単離近位尿細管の V-ATPase の活性を測定することは非常に困難であり、報告もごくわずかであった(104)。本研究で split-open 法により V-ATPase 活性が検出されたことも、近位尿細管管腔側の輸送活性を測定していることを支持するものである(図 7)。

単離近位尿細管へ siRNA を導入し特定の輸送体機能をノックダウンする手法も私の所属する研究室で開発されたものである(98)。従来遺伝子改変動物の作成には多大な労力や資源を要し、動物が発育せず実験が行えないことがあるなどの問題もあった(75, 76)。本方法は成体の実験動物から採取した組織に簡便な操作により siRNA を導入し、標的とする輸送体の mRNA 発現を抑制することができるもので、単離近位尿細管の特定の輸送体活性を ex vivo で評価できる画期的な方法でありすでに成果を

上げている(98)。しかし培養尿細管を用いることによる制限もある。例えば新鮮尿細管では生理的な管腔構造が保たれているため split-open 法を用いた管腔側の露出が容易だが、培養尿細管では困難な場合があることが挙げられる。

またラットおよびマウスではこの遺伝子導入技術が確立しているがヒトではこの遺伝子導入技術は確立していない。これには、実験動物では腎臓摘出後ただちに近位尿細管を単離し培養および siRNA 処理を開始することができるが、ヒトにおいては採取できる検体量が限られており、かつ腎臓の阻血から摘出までの時間が長くなる事が影響している可能性がある。今後は培養や siRNA 処理の条件を変更する等を検討する必要がある。

本研究では NHE 阻害剤 EIPA および陰イオン輸送体阻害剤 DIDS による NHE 様活性の阻害効果をマウス、ラット、ヒトで評価し、Na 依存性酸塩基輸送機構に種による差があることが示唆された。DIDS は陰イオン輸送体を非特異的に阻害するため、NBCn2 以外の例えば AE や NDCBE など、腎臓近位尿細管に発現が確認されていない陰イオン輸送体が関与している可能性は否定できない。NBCn2 に特異的な阻害剤が存在しないため、本研究ではラットの近位尿細管に siRNA を用いて NBCn2 の遺伝子発現を抑制することで、NBCn2 の生理機能活性を間接的に評価した。また腎臓に発現する NBCn2 バリエントは種によって異なることが知られており、マウス腎臓には NBCn2 の発現が確認されていない。NBCn2 バリエントの分子構造や制御機構の違い

が、薬剤感受性や輸送体活性の差を生じている可能性がある。マウスにおいて NHE 阻害剤 EIPA、陰イオン輸送体阻害剤 DIDS の同時添加による NHE 様活性の抑制がラット、ヒトと較べ有位に少ないことから、マウス近位尿細管管腔側において NHE3 と NBCn2 以外の Na 輸送機構の存在が考えられる。

近位尿細管管腔側の酸塩基輸送は重炭酸に依存しない酸の分泌によると考えられている(図 1)(105)。すなわち、管腔側から近位尿細管細胞内に取り込まれた CO_2 と H_2O は炭酸脱水酵素(CA)の作用により H^+ と HCO_3^- となり、 H^+ は主に NHE3 により管腔側に、 HCO_3^- は NBCe1 により基底側に輸送されていると考えられている。このことは CA II の欠損によりヒトで近位尿細管性アシドーシスを生じることからも裏付けられている(106)。

本研究では重炭酸を含まない実験系で検討を行うことで、近位尿細管管腔側で NBCn2 が重炭酸非依存的に Na 依存性酸塩基輸送を担っている可能性を示した。既報では NBCn2 は重炭酸存在下で輸送活性をもつことが報告されているが。(87, 107)、これらで報告されている輸送様式は *Xenopus oocyte* や培養細胞への強制発現により解析されたものであり、近位尿細管 *in vivo* での輸送を全て反映しているわけではない可能性がある。輸送様式や輸送活性が変化する機序として、例えば IRBIT (IP3 Receptor Binding Protein Released with Inositol Trisphosphate)などの *in vivo* における共役因子が考えられ、今後さらなる検討が必要である。

結語

本研究により、ラット近位尿細管管腔側において NBCn2 が Na 依存性酸塩基輸送を担っていることが示された。また、ヒト近位尿細管管腔側にも NBCn2 が発現しており、同様に酸塩基輸送を担っている可能性が示唆された。近位尿細管における NBCn2 の制御機構については不明な点が多いが、制御機構を解明することにより高血圧や酸塩基平衡異常の新規治療方法の開発につながる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、焼津市立総合病院関常司先生には終始、ご指導を戴いた。東京学芸大学保健管理センター鈴木正志先生には本論文の細部にわたりご指導を戴いた。日本赤十字社医療センター本間之夫先生ならびに東京大学医学部附属病院泌尿器科・男性科久米春樹先生、佐藤悠佑先生にはヒト腎臓検体採取に多大なるご協力を戴いた。他所属研究室の先生方には研究遂行にあたり日頃より有益なご助言を戴いた。ここに深謝の意を表する。

引用文献

1. Aronson PS. Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. *Am J Physiol*. 1983;245(6):F647-59.
2. Romero MF, Boron WF. Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:699-723.
3. Giebisch G. Two classic papers in acid-base physiology: contributions of R. F. Pitts, R. S. Alexander, and W. D. Lotspeich. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(5):F864-5.
4. Kurtz I. Molecular mechanisms and regulation of urinary acidification. *Compr Physiol*. 2014;4(4):1737-74.
5. Burg MB, Issacson L, Grantham J, Orloff J. Electrical properties of isolated perfused rabbit renal tubules. *Am J Physiol*. 1968;215(4):788-94.
6. Satoh N, Yamada H, Yamazaki O, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, et al. A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. *Pflugers Arch*. 2016;468(7):1183-96.
7. Orłowski J, Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22373-6.
8. Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res*. 1985;56(6):773-88.
9. Lee SH, Kim T, Park ES, Yang S, Jeong D, Choi Y, et al. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(2):320-6.
10. Ohgaki R, van IJendoorn SC, Matsushita M, Hoekstra D, Kanazawa H. Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry*. 2011;50(4):443-50.
11. Villa-Abrille MC, Cingolani E, Cingolani HE, Alvarez BV. Silencing of cardiac mitochondrial NHE1 prevents mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1237-51.
12. Bkaily G, Nader M, Avedanian L, Jacques D, Perrault C, Abdel-Samad D, et al. Immunofluorescence revealed the presence of NHE-1 in the nuclear membranes of rat cardiomyocytes and isolated nuclei of human, rabbit, and rat aortic and liver tissues. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82(8-9):805-11.
13. Liu L, Schlesinger PH, Slack NM, Friedman PA, Blair HC. High capacity Na⁺/H⁺ exchange activity in mineralizing osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2011;226(6):1702-12.

14. Donowitz M, Ming Tse C, Fuster D. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):236-51.
15. Orłowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):549-65.
16. Zachos NC, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:411-43.
17. Arena EA, Longo WE, Roberts KE, Geibel P, Nateqi J, Brandstetter M, et al. Functional role of NHE4 as a pH regulator in rat and human colonic crypts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(2):C412-8.
18. Casey JR, Grinstein S, Orłowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(1):50-61.
19. Igarashi P, Freed MI, Ganz MB, Reilly RF. Effects of chronic metabolic acidosis on Na⁽⁺⁾-H⁺ exchangers in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1992;263(1 Pt 2):F83-8.
20. Moe OW, Miller RT, Horie S, Cano A, Preisig PA, Alpern RJ. Differential regulation of Na/H antiporter by acid in renal epithelial cells and fibroblasts. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1703-8.
21. Ambühl PM, Amemiya M, Danczkay M, Lötscher M, Kaissling B, Moe OW, et al. Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 2):F917-25.
22. Amemiya M, Yamaji Y, Cano A, Moe OW, Alpern RJ. Acid incubation increases NHE-3 mRNA abundance in OKP cells. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 1):C126-33.
23. Lucioni A, Womack C, Musch MW, Rocha FL, Bookstein C, Chang EB. Metabolic acidosis in rats increases intestinal NHE2 and NHE3 expression and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(1):G51-6.
24. Attaphitaya S, Park K, Melvin JE. Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4383-8.
25. Hill JK, Brett CL, Chyou A, Kallay LM, Sakaguchi M, Rao R, et al. Vestibular hair bundles control pH with (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchangers NHE6 and NHE9. *J Neurosci.* 2006;26(39):9944-55.
26. Becker AM, Zhang J, Goyal S, Dwarakanath V, Aronson PS, Moe OW, et al. Ontogeny of NHE8 in the rat proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(1):F255-61.
27. Goyal S, Mentone S, Aronson PS. Immunolocalization of NHE8 in rat kidney.

Am J Physiol Renal Physiol. 2005;288(3):F530-8.

28. Cox GA, Lutz CM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, Fu A, et al. Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell.* 1997;91(1):139-48.
29. Kondapalli KC, Prasad H, Rao R. An inside job: how endosomal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers link to autism and neurological disease. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:172.
30. Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem.* 1992;267(13):9331-9.
31. Reilly RF, Hildebrandt F, Biemesderfer D, Sardet C, Pouyssegur J, Aronson PS, et al. cDNA cloning and immunolocalization of a Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1991;261(6 Pt 2):F1088-94.
32. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell.* 1989;56(2):271-80.
33. Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, Donowitz M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem.* 1992;267(13):9340-6.
34. Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J, et al. Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem.* 1993;268(16):11917-24.
35. Murer H, Hopfer U, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J.* 1976;154(3):597-604.
36. Kinsella JL, Aronson PS. Properties of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. 1980. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(5):1085-95.
37. Aronson PS, Suhm MA, Nee J. Interaction of external H⁺ with the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *J Biol Chem.* 1983;258(11):6767-71.
38. Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1561-72.
39. Lin PJ, Williams WP, Luu Y, Molday RS, Orłowski J, Numata M. Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger NHE7. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 9):1885-97.
40. Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, Aronson PS.

Immunocytochemical characterization of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol.* 1992;263(5 Pt 2):F833-40.

41. Chambrey R, Achard JM, St John PL, Abrahamson DR, Warnock DG. Evidence for an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger in rat renal cortical tubules. *Am J Physiol.* 1997;273(3 Pt 1):C1064-74.

42. Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu-Alfa AK, Wu MS, Exner M, Isenring P, et al. Immunochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4. *Am J Physiol.* 1998;275(4 Pt 2):F510-7.

43. Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int.* 1995;48(4):1206-15.

44. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 2):F736-42.

45. Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 2):F289-99.

46. Chambrey R, Warnock DG, Podevin RA, Bruneval P, Mandet C, Bélair MF, et al. Immunolocalization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *Am J Physiol.* 1998;275(3 Pt 2):F379-86.

47. Soleimani M, Bookstein C, Bizal GL, Musch MW, Hattabaugh YJ, Rao MC, et al. Localization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE-3 in rabbit and canine kidney. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1195(1):89-95.

48. Sun AM, Liu Y, Dworkin LD, Tse CM, Donowitz M, Yip KP. Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 (NHE2) is expressed in the apical membrane of the medullary thick ascending limb. *J Membr Biol.* 1997;160(1):85-90.

49. Kinsella JL, Aronson PS. Properties of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol.* 1980;238(6):F461-9.

50. Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *The Journal of general physiology.* 1983;81(1):29-52.

51. Alpern RJ. Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol Rev.* 1990;70(1):79-114.

52. Baum M. Developmental changes in rabbit juxtamedullary proximal convoluted tubule acidification. *Pediatr Res.* 1992;31(4 Pt 1):411-4.

53. Rector FC. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. *Am J Physiol.* 1983;244(5):F461-71.

54. Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ, Alpern RJ, Rector FC. Role of the Na⁺/H⁺ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest.* 1987;80(4):970-8.
55. Preisig PA, Rector FC. Role of Na⁺-H⁺ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol.* 1988;255(3 Pt 2):F461-5.
56. Ambühl P, Amemiya M, Preisig PA, Moe OW, Alpern RJ. Chronic hyperosmolality increases NHE3 activity in OKP cells. *J Clin Invest.* 1998;101(1):170-7.
57. Zhang Y, Mircheff AK, Hensley CB, Magyar CE, Warnock DG, Chambrey R, et al. Rapid redistribution and inhibition of renal sodium transporters during acute pressure natriuresis. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 2):F1004-14.
58. Aronson PS. Role of ion exchangers in mediating NaCl transport in the proximal tubule. *Kidney Int.* 1996;49(6):1665-70.
59. du Cheyron D, Paillard M, Poggioli J. [Regulation of the luminal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by intracellular protein trafficking]. *Nephrologie.* 2002;23(5):219-24.
60. Laghmani K, Preisig PA, Alpern RJ. The role of endothelin in proximal tubule proton secretion and the adaptation to a chronic metabolic acidosis. *J Nephrol.* 2002;15 Suppl 5:S75-87.
61. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet.* 1998;19(3):282-5.
62. Choi JY, Shah M, Lee MG, Schultheis PJ, Shull GE, Muallem S, et al. Novel amiloride-sensitive sodium-dependent proton secretion in the mouse proximal convoluted tubule. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1141-6.
63. Baum M, Twombly K, Gattineni J, Joseph C, Wang L, Zhang Q, et al. Proximal tubule Na⁺/H⁺ exchanger activity in adult NHE8^{-/-}, NHE3^{-/-}, and NHE3^{-/-}/NHE8^{-/-} mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(11):F1495-502.
64. Woo AL, Noonan WT, Schultheis PJ, Neumann JC, Manning PA, Lorenz JN, et al. Renal function in NHE3-deficient mice with transgenic rescue of small intestinal absorptive defect. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(6):F1190-8.
65. Li HC, Du Z, Barone S, Rubera I, McDonough AA, Tauc M, et al. Proximal tubule specific knockout of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3: effects on bicarbonate absorption and ammonium excretion. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2013;91(8):951-63.
66. Janecke AR, Heinz-Erian P, Yin J, Petersen BS, Franke A, Lechner S, et al. Reduced sodium/proton exchanger NHE3 activity causes congenital sodium diarrhea. *Hum Mol Genet.* 2015;24(23):6614-23.
67. Noonan WT, Woo AL, Nieman ML, Prasad V, Schultheis PJ, Shull GE, et al.

- Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R685-91.
68. Thornell IM, Bevenssee MO. Regulators of Slc4 bicarbonate transporter activity. *Front Physiol*. 2015;6:166.
69. Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO_3^- transport. *The Journal of general physiology*. 1983;81(1):53-94.
70. Soleimani M, Grassi SM, Aronson PS. Stoichiometry of Na^+ - HCO_3^- cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J Clin Invest*. 1987;79(4):1276-80.
71. Horita S, Yamada H, Inatomi J, Moriyama N, Sekine T, Igarashi T, et al. Functional analysis of NBC1 mutants associated with proximal renal tubular acidosis and ocular abnormalities. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(8):2270-8.
72. Deda G, Ekim M, Guven A, Karagol U, Tumer N. Hypopotassemic paralysis: a rare presentation of proximal renal tubular acidosis. *Journal of child neurology*. 2001;16(10):770-1.
73. Igarashi T, Inatomi J, Sekine T, Cha SH, Kanai Y, Kunimi M, et al. Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nat Genet*. 1999;23(3):264-6.
74. Igarashi T, Inatomi J, Sekine T, Seki G, Shimadzu M, Tozawa F, et al. Novel nonsense mutation in the Na^+ / HCO_3^- cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(4):713-8.
75. Gawenis LR, Bradford EM, Prasad V, Lorenz JN, Simpson JE, Clarke LL, et al. Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na^+ / HCO_3^- cotransporter. *J Biol Chem*. 2007;282(12):9042-52.
76. Lo YF, Yang SS, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, et al. Severe metabolic acidosis causes early lethality in NBC1 W516X knock-in mice as a model of human isolated proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int*. 2011;79(7):730-41.
77. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):917-29.
78. Ulate G, Fernandez R, Malnic G. Effect of bafilomycin on proximal bicarbonate absorption in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26(7):773-7.
79. Wagner CA, Giebisch G, Lang F, Geibel JP. Angiotensin II stimulates vesicular H^+ -ATPase in rat proximal tubular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9665-8.
80. Chan YL, Giebisch G. Relationship between sodium and bicarbonate transport

in the rat proximal convoluted tubule. *Am J Physiol*. 1981;240(3):F222-30.

81. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoïn S, et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol*. 2006;8(2):124-36.
82. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Osicka TM, Collins AB, Brown D, et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int*. 2007;71(6):504-13.
83. Maranda B, Brown D, Bourgoïn S, Casanova JE, Vinay P, Ausiello DA, et al. Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem*. 2001;276(21):18540-50.
84. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, Van der Smissen P, Verroust P, et al. Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8472-7.
85. Liu Y, Xu JY, Wang DK, Boron WF, Chen LM. Expression and distribution of NBCn2 (Slc4a10) splice variants in mouse brain: cloning of novel variant NBCn2-D. *Brain Res*. 2011;1390:33-40.
86. Liu Y, Wang DK, Jiang DZ, Qin X, Xie ZD, Wang QK, et al. Cloning and functional characterization of novel variants and tissue-specific expression of alternative amino and carboxyl termini of products of slc4a10. *PLoS One*. 2013;8(2):e55974.
87. Wang CZ, Yano H, Nagashima K, Seino S. The Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35486-90.
88. Wang DK, Liu Y, Myers EJ, Guo YM, Xie ZD, Jiang DZ, et al. Effects of Nt-truncation and coexpression of isolated Nt domains on the membrane trafficking of electroneutral Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters. *Sci Rep*. 2015;5:12241.
89. Giffard RG, Lee YS, Ouyang YB, Murphy SL, Monyer H. Two variants of the rat brain sodium-driven chloride bicarbonate exchanger (NCBE): developmental expression and addition of a PDZ motif. *Eur J Neurosci*. 2003;18(11):2935-45.
90. Damkier HH, Prasad V, Hubner CA, Praetorius J. Nhe1 is a luminal Na⁺/H⁺ exchanger in mouse choroid plexus and is targeted to the basolateral membrane in Ncbe/Nbcn2-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(6):C1291-300.
91. Jacobs S, Ruusuvuori E, Sipila ST, Haapanen A, Damkier HH, Kurth I, et al. Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(1):311-6.

92. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science (New York, NY)*. 2007;316(5823):445-9.
93. Gurnett CA, Veile R, Zempel J, Blackburn L, Lovett M, Bowcock A. Disruption of sodium bicarbonate transporter SLC4A10 in a patient with complex partial epilepsy and mental retardation. *Archives of neurology*. 2008;65(4):550-3.
94. Guo YM, Liu Y, Liu M, Wang JL, Xie ZD, Chen KJ, et al. Na⁽⁺⁾/HCO₃⁽⁻⁾ Cotransporter NBCn2 Mediates HCO₃⁽⁻⁾ Reclamation in the Apical Membrane of Renal Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(8):2409-19.
95. Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, et al. Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent nongenomic signaling. *Cell Metab*. 2011;13(5):550-61.
96. Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, et al. Identification of dominant negative effect of L522P mutation in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. *Pflugers Arch*. 2013;465(9):1281-91.
97. Shirai A, Yamazaki O, Horita S, Nakamura M, Satoh N, Yamada H, et al. Angiotensin II dose-dependently stimulates human renal proximal tubule transport by the nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(7):1523-32.
98. Nakamura M, Yamazaki O, Shirai A, Horita S, Satoh N, Suzuki M, et al. Preserved Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter sensitivity to insulin may promote hypertension in metabolic syndrome. *Kidney Int*. 2015;87(3):535-42.
99. Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, et al. Functional characterization of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1A. *Pflugers Arch*. 2011;461(2):249-59.
100. Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *Eur J Med Chem*. 2003;38(6):547-54.
101. Hogg RC, Wang Q, Large WA. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*. 1994;111(4):1333-41.
102. Aronson PS. Ion exchangers mediating NaCl transport in the renal proximal tubule. *Cell Biochem Biophys*. 2002;36(2-3):147-53.
103. Liu Y, Xu K, Chen LM, Sun X, Parker MD, Kelly ML, et al. Distribution of NBCn2 (SLC4A10) splice variants in mouse brain. *Neuroscience*. 2010;169(3):951-64.
104. Zimolo Z, Montrose MH, Murer H. H⁺ extrusion by an apical vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase in rat renal proximal tubules. *J Membr Biol*. 1992;126(1):19-26.

105. Boron WF. Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2368-82.
106. Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(9):2752-6.
107. Parker MD, Musa-Aziz R, Rojas JD, Choi I, Daly CM, Boron WF. Characterization of human SLC4A10 as an electroneutral Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (NBCn2) with Cl⁻ self-exchange activity. *J Biol Chem.* 2008;283(19):12777-88.