

培養腎上皮細胞 OK を用いた有機アニオン  
輸送機構及びその活性調節に関する研究

1999

永井純也

# 目 次

## 総論の部

緒言	1
第 I 章 培養腎上皮細胞 OK における有機アニオン輸送特性	2
第 1 節 OK 細胞における <i>p</i> -aminohippurate 輸送特性	3
1 - a <i>p</i> -Aminohippurate の経細胞輸送特性	4
1 - b 側底膜及び頂側膜における <i>p</i> -aminohippurate 輸送の方向性	6
1 - c 側底膜及び頂側膜における <i>p</i> -aminohippurate 輸送特性	8
1 - d 考察	10
第 2 節 有機アニオン輸送の基質認識性	12
2 - a <i>p</i> -Aminohippurate 輸送に対する各種 $\beta$ -ラクタム抗生物質の影響	12
2 - b $\beta$ -ラクタム抗生物質の輸送特性	15
2 - c 側底膜有機アニオン輸送に対する種々のジカルボン酸の影響	17
2 - d 考察	18
第 3 節 側底膜における有機アニオン / ジカルボン酸交換輸送	20
3 - a 側底膜 <i>p</i> -aminohippurate 輸送に対する $\alpha$ -ketoglutarate の影響	20
3 - b <i>p</i> -Aminohippurate による $\alpha$ -ketoglutarate efflux の促進効果	24
3 - c 側底膜 <i>p</i> -aminohippurate 輸送と $\alpha$ -ketoglutarate efflux の相関関係	27
3 - d 細胞内 ATP 枯渇による側底膜 <i>p</i> -aminohippurate 輸送への影響	28
3 - e 考察	30
第 II 章 OK 細胞における有機アニオン輸送の活性調節	33
第 1 節 <i>p</i> -Aminohippurate 輸送に対するプロテインキナーゼ活性化の影響	33
1 - a Protein kinase C 活性化剤による影響	34
1 - b Protein kinase C 活性化剤による阻害機構	37
1 - c Protein kinase A 活性化剤による影響	40
1 - d 考察	42
第 2 節 副甲状腺ホルモンによる <i>p</i> -aminohippurate 輸送の活性調節	43
2 - a 副甲状腺ホルモンによる影響	44

2-b 副甲状腺ホルモンによる阻害におけるプロテインキナーゼの関与.....	47
2-c 考察.....	49
結論.....	51
謝辞.....	53
実験の部	
第I章 実験の部.....	54
第II章 実験の部.....	57
論文目録.....	58
引用文献.....	59

## 略号表

8-Br-cAMP	: 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate
CEX	: cephalixin
CEZ	: cefazolin
CFIX	: cefixime
CTM	: cefotiam
CZX	: ceftizoxime
DBcAMP	: dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate
DiC <sub>8</sub>	: 1,2-dioctanoyl- <i>sn</i> -glycerol
DIDS	: 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid
DMSO	: dimethyl sulfoxide
HEPES	: 2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
IBMX	: 3-isobutyl-1-methylxanthine
IC <sub>50</sub>	: 50% inhibitory concentration
α-KG	: α-ketoglutarate
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	: Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> adenosinetriphosphatase
OAG	: 1-oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol
PAH	: <i>p</i> -aminohippurate
PBS	: phosphate buffered saline
PCG	: benzylpenicillin
PDBu	: phorbol 12,13-dibutyrate
4α-PDD	: 4α-phorbol 12,13-didecanoate
PKA	: protein kinase A
PKC	: protein kinase C
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate
PTH	: parathyroid hormone
TEA	: tetraethylammonium
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 総論の部

### 緒言

生体は様々な物質を摂取しているにも関わらず、細胞外液の組成は一定の値に維持されている。腎臓はこの内部環境の恒常性に最も重要な役割を果たしている臓器である。腎臓では、糸球体におけるろ過、尿細管における分泌及び再吸収を通じて尿が産生され、生体にとって不要な物質は尿中へと排泄される。薬物も基本的に生体にとって異物であり、生体内に投与された薬物の多くは最終的に尿中へと排泄される。薬物あるいはその代謝物の多くは有機イオン性物質であり、それらは腎臓の近位尿細管上皮細胞において能動的に分泌されることが知られている。有機アニオン性物質の尿細管分泌には、近位尿細管上皮細胞に存在する有機アニオン輸送系が関与することが知られており<sup>1-3)</sup>、その輸送機構はこれまでに *in vivo* 腎クリアランス法<sup>4-6)</sup>、*in vitro* 腎皮質切片法<sup>7-9)</sup>、単離尿細管灌流法<sup>10-12)</sup>、細胞膜小胞系<sup>13-16)</sup>等の様々な手法を用いることによって明らかにされてきた。中でも、細胞膜小胞系による解析は、血管側の側底膜及び管腔側の刷子縁膜の輸送特性を個別に評価できることから、有機アニオン輸送の駆動力、基質認識性等の多くの知見を提供した<sup>17)</sup>。一方、尿細管分泌は、側底膜と刷子縁膜の両細胞膜における輸送の総和として表される経細胞輸送であるとともに、有機アニオンの輸送には細胞内代謝系や様々な輸送体が密接に関係していることが示唆されていることから<sup>2, 18-19)</sup>、インタクトな細胞における腎有機アニオン輸送の検討も必須であると考えられる。しかし、これまでに腎有機アニオン輸送を解析するためのモデル細胞系が確立されていないこと等から、有機アニオン輸送系の細胞レベルでの解析は栄養物質、無機イオン及び有機カチオン等の輸送系に比べ立ち遅れていた。最近、京都大学医学部附属病院薬剤部研究室において、フクロネズミ腎由来のOK細胞が代表的有機アニオン *p*-aminohippurate (PAH) を分泌方向選択的に経細胞輸送することが見出されていた<sup>20)</sup>。

そこで著者は、OK細胞における有機アニオン輸送を詳細に解析することにより、OK細胞が腎有機アニオン輸送のモデル細胞系として極めて有用であることを明確にした。さらに、OK細胞を用い有機アニオン輸送の活性調節について細胞レベルでの解析を系統的に行った。

以下、得られた結果について論述する。

## 第 I 章 培養腎上皮細胞 OK における有機アニオン輸送特性

腎臓の構成単位であるネフロンは、左右の腎にそれぞれおよそ100万個存在しており、腎小体(糸球体とBowman嚢)から始まり集合尿細管にいたる一続きの細管を形成している。ネフロンを構成する尿細管は、近位尿細管、Henle係蹄、遠位尿細管、集合管の4つに大別され、それぞれ異なった形態的・機能的特性を有している。特に近位尿細管では栄養物質、無機イオン、水等の生体必須成分が再吸収されるとともに、不要代謝産物や薬物等の生体外異物の分泌が営まれている。再吸収、分泌過程はともに上皮細胞の刷子縁膜(管腔側)と側底膜(血管側)における輸送の総和として表される。それゆえ、これらの過程を理解するためには、側底膜及び刷子縁膜におけるそれぞれの輸送に加えて、それらの輸送の総和である経上皮細胞輸送の解析も必要であると考えられる。また、側底膜及び刷子縁膜に存在する様々な物質輸送系は、細胞膜を隔てた細胞内と細胞外との環境の違いをその駆動力として巧みに利用していることが知られており、このような知見は *in vivo* あるいは *in vitro* レベルでの種々の実験系が駆使されることにより解明されてきた。

培養細胞を用いた実験の利点は、複雑な生体制御機構から解放されているため、単純化したあるいは任意に設定した条件下において解析できることである。培養細胞は、初代培養細胞系と樹立細胞系とに分けられる。生体から取り出し、培養しはじめてすぐに利用する初代培養細胞系は、その由来する組織の特性を保持している場合が多いが、有限増殖であるため再現性よく継続的に実験を行うことは難しい。一方、樹立細胞系は、増殖能が安定しているため継代維持や大量培養が可能であり、実験を進める上で扱いやすい利点を有している。しかし、樹立細胞系は、その由来する組織の特殊な機能を必ずしも保持していない場合があり、実験に供するためにはその細胞系の機能特性をよく認識しておく必要がある。

腎有機アニオン輸送系を細胞レベルで解析しようとする試みは、本研究を開始する以前から様々なグループによって活発になされていた<sup>21-24)</sup>。しかし、初代培養系及び樹立細胞系を含め種々の細胞系で検討されたものの、少なくとも哺乳類由来の細胞系で腎有機アニオン輸送解析に有用なモデル細胞系は見出されていなかった。Koyama ら<sup>25)</sup>が樹立したフクロネズミ腎由来のOK細胞は、ヘキソース、アミノ酸、リン等の特殊輸送系を有しており、近位尿細管上皮細胞に特有の性質をよく保持していることが明らかにされている<sup>26,27)</sup>。最近、OK細胞が方向選択的なPAH経細胞輸送活性を有することが見出され、腎有機アニオン輸送系のモデル細胞系としての可能性が示されていた<sup>20)</sup>。

本章では、OK細胞におけるPAHの経細胞輸送、側底膜輸送及び頂側膜輸送特性について系統的な解析を行い、腎有機アニオン輸送系のモデル細胞系としての有用性を評価するとともに、有機アニオン輸送特性について細胞レベルで得られた結果を論述する。

### 第 1 節 OK細胞における *p*-aminohippurate 輸送特性

培養皿に播種されたOK細胞は単層を形成し、側底膜を培養皿の底面に接着させ、頂側膜(尿細管上皮細胞の刷子縁膜に相当)を培養液側に向ける性質を有している。このような性質から多孔性フィルター上に単層培養した場合、以下に示す輸送を個別に評価することが可能である(Fig. 1、図中の番号は下述の番号と対応する)。

- ① 側底膜側から頂側膜側へ(分泌方向に相当)の経細胞輸送
- ② 頂側膜側から側底膜側へ(再吸収方向に相当)の経細胞輸送
- ③ 細胞外から側底膜を介した細胞内への輸送
- ④ 細胞外から頂側膜を介した細胞内への輸送
- ⑤ 細胞内から側底膜を介した細胞外への輸送
- ⑥ 細胞内から頂側膜を介した細胞外への輸送

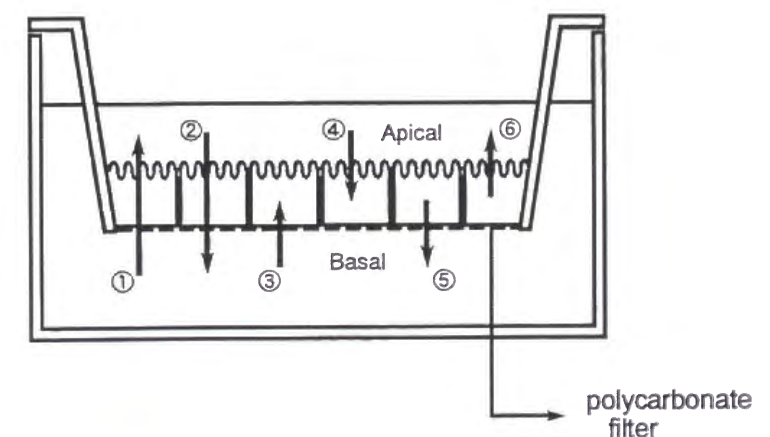
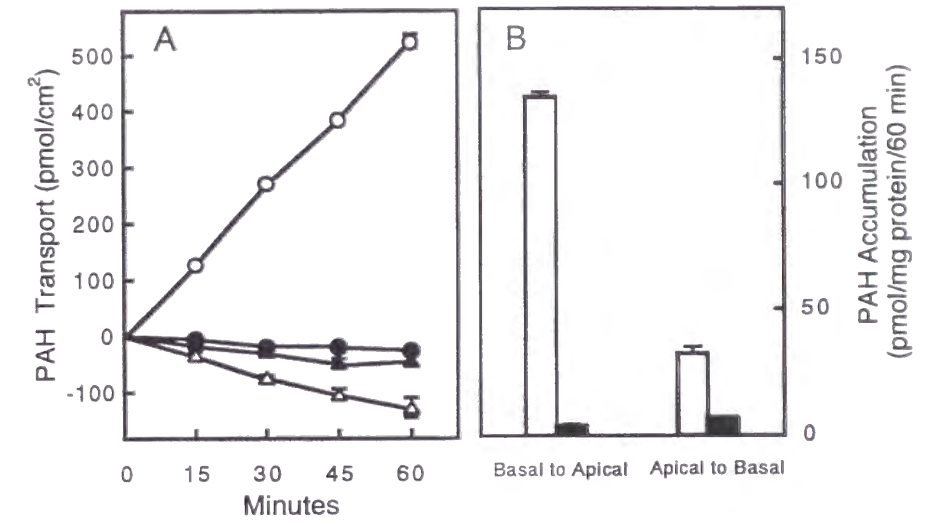


Fig. 1. Transport study in OK cell monolayers cultured in Transwell chamber.

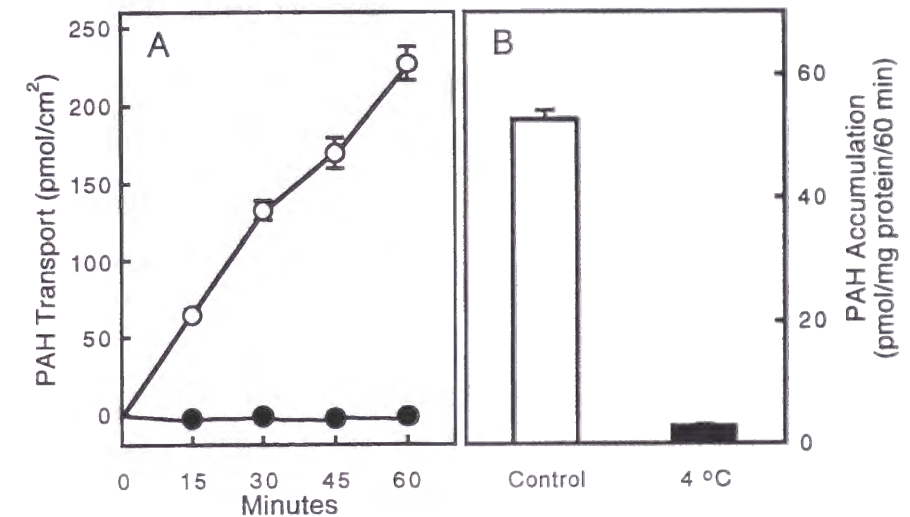
腎近位尿細管における有機アニオンの分泌は経細胞輸送であり、その輸送には側底膜及び刷子縁膜の両細胞膜における輸送が関与する。本節では、OK細胞におけるPAHの経細胞輸送、側底膜及び頂側膜輸送特性について解析するとともに、近位尿細管上皮細胞においてPAHが分泌方向へと選択的に輸送される要因について考察した。なお、OK細胞におけるPAHの経細胞輸送量は、細胞及び細胞間隙を通過した $[^{14}\text{C}]$ PAHの総輸送量から細胞間隙のみを通過する $[^3\text{H}]$ mannitolの透過量を差し引くことによって評価した。また、PAHの細胞内初期取り込み、細胞内蓄積量及び細胞内からのeffluxを評価する場合においても、 $[^{14}\text{C}]$ PAHと $[^3\text{H}]$ mannitolとを同時に測定することによって、非特異的な細胞内取り込みや細胞膜表面吸着を補正した。細胞内初期取り込み量と細胞内蓄積量との区別については、前者が細胞内移行量が時間に対し直線的に増加する1分間の取り込み量(側底膜あるいは頂側膜のいずれかの細胞膜における輸送のみが関与すると考えられる)であるのに対し、後者は60分間、すなわち定常状態における取り込み量(両細胞膜が関与)を測定することで評価を行った。

### 1 - a *p*-Aminohippurate 輸送の経細胞輸送特性

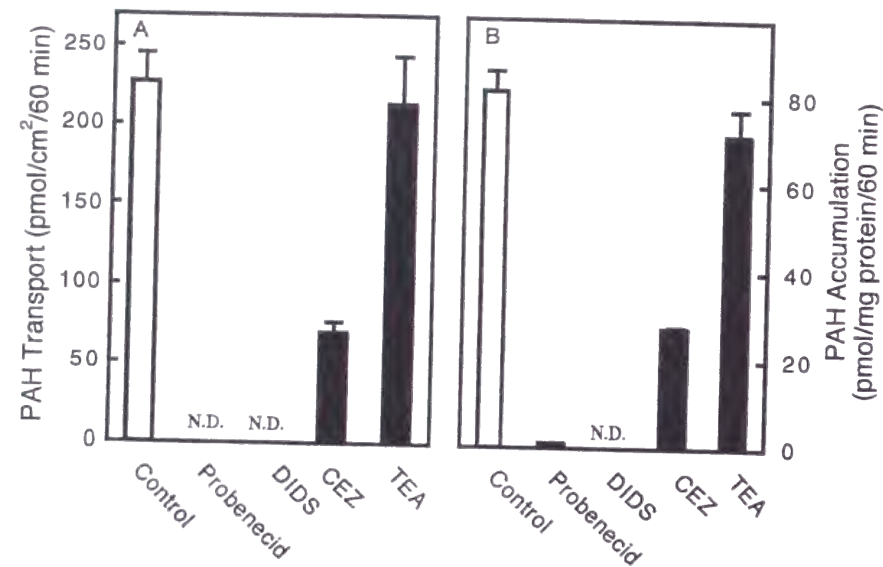
まず、OK細胞におけるPAHの経細胞輸送活性について検討した結果をFig. 2Aに示す。OK細胞における $[^{14}\text{C}]$ PAHは、尿細管分泌に相当する側底膜側から頂側膜側へと経細胞輸送され、その逆方向には全く輸送されないことが観察された。さらに、この経細胞輸送活性は非標識PAHによって完全に阻害された。Fig. 2Bは、経細胞輸送時に同時に測定した細胞内蓄積量を示す。細胞内蓄積量についても側底膜側から取り込ませた場合の方が、頂側膜側からのそれよりも大きいことが認められた。また、非標識PAHによっていずれの細胞内蓄積量も阻害された。さらに、PAHの経細胞輸送及び細胞内蓄積量に対する温度の影響について検討した(Fig. 3)。その結果、37°Cの条件下で観察されたPAHの経細胞輸送活性及び細胞内蓄積量は、4°Cの条件下で著しく低下した。Fig. 4は側底膜側から頂側膜側へのPAHの経細胞輸送及び細胞内蓄積量に対する種々の薬物の影響を調べた結果である。PAHの経細胞輸送及び同時に測定した細胞内蓄積量は、有機アニオン輸送阻害剤であるprobenecid、4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene (DIDS)、アニオン性薬物であるcefazolin (CEZ)のいずれにおいても著しく阻害された。一方、有機カチオンであるtetraethylammonium (TEA)による影響は全く観察されなかった。以上の結果より、OK細胞においてPAHは特殊輸送系を介して分泌方向選択的に経細胞輸送されることが明らかになった。



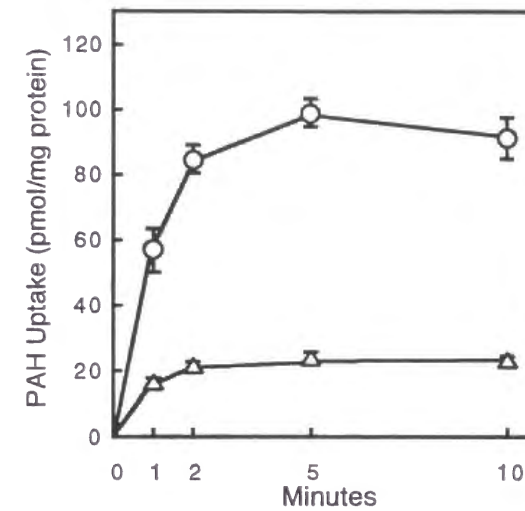
**Fig. 2. Transcellular transport (A) and accumulation (B) of  $[^{14}\text{C}]$ PAH by OK cells.**  $[^{14}\text{C}]$ PAH (15  $\mu\text{M}$ ) and D- $[^3\text{H}]$ mannitol (15  $\mu\text{M}$ ) were added simultaneously to the basal ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) or apical ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ) side of monolayers in the absence ( $\circ$ ,  $\triangle$ ) or presence ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ) of 5 mM unlabeled PAH. After incubation for 15, 30, 45 and 60 min at 37°C, medium in apical side was collected (100  $\mu\text{l}$ ), and radioactivity was counted. B: after 60 min transport measurement, accumulation of  $[^{14}\text{C}]$ PAH in OK cells was determined in the absence (open columns) or presence of 5 mM unlabeled PAH (closed columns).



**Fig. 3. Effect of temperature on transcellular transport from the basal to apical side (A) and accumulation (B) of PAH by OK cells.**  $[^{14}\text{C}]$ PAH (15  $\mu\text{M}$ ) and D- $[^3\text{H}]$ mannitol (15  $\mu\text{M}$ ) were added simultaneously to the basal side of monolayers at 37°C ( $\circ$ ) or 4°C ( $\bullet$ ). After incubation for 15, 30, 45 and 60 min, medium in apical side was collected (100  $\mu\text{l}$ ), and radioactivity was counted. B: after 60 min transport measurement, accumulation of  $[^{14}\text{C}]$ PAH in OK cells was determined at 37°C (open column) or 4°C (closed column).



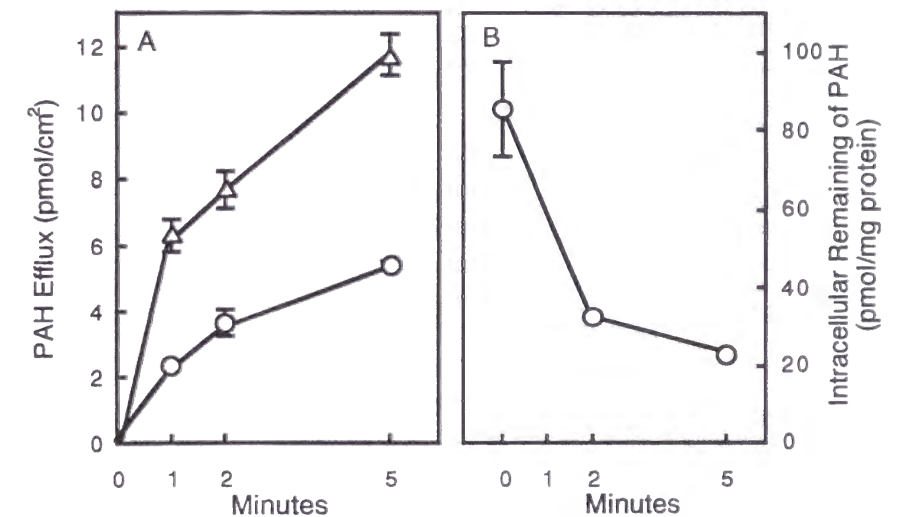
**Fig. 4. Effect of various compounds on transcellular transport from the basal to apical side (A) and accumulation (B) of PAH by OK cells.** A: [<sup>14</sup>C]PAH (15 μM) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15 μM) were added to the basal side of monolayers in the absence or presence of probenecid, CEZ, TEA (1 mM) and DIDS (100 μM). After incubation for 60 min at 37 °C, medium in apical side was collected (100 μl), and radioactivity was counted. B: after 60 min transport measurement, accumulation of [<sup>14</sup>C]PAH in OK cells was determined in the absence or presence of probenecid, CEZ, TEA (1 mM) and DIDS (100 μM).



**Fig. 5. PAH uptake from basal or apical side of OK cells.** [<sup>14</sup>C]PAH (15 μM) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15 μM) were added to the basal (○) or to the apical (△) side of monolayers. After incubation for 1, 2, 5 and 10 min at 37 °C, PAH uptake by the cells was measured.

#### 1 - b 側底膜及び頂側膜における *p*-aminohippurate 輸送の方向性

次に、OK 細胞の側底膜及び頂側膜における PAH 輸送の方向性についてそれぞれ解析した。まず、PAH を側底膜あるいは頂側膜側へ添加し、細胞内への取り込みについて検討した。細胞内への取り込み活性は側底膜側から PAH を添加した場合の方が、頂側膜側のそれに比べて高いことが認められた (Fig. 5)。次に、あらかじめ細胞内に取り込ませた PAH の細胞内からの efflux について検討した。PAH の細胞内からの efflux 活性は、側底膜側に比べ頂側膜側への efflux 活性が高いことが観察され、細胞内残存量は PAH の efflux に伴い経時的に減少した (Fig. 6)。Fig. 5 及び Fig. 6 から得られた側底膜及び頂側膜における両方向の輸送活性比較を行うために、それらの輸送活性を同次元 (μL/mg protein/min) になるように再計算した (Fig. 7)。すなわち、細胞内初期 (1 min) 取り込み量 (側底膜側 : 55.0, 頂側膜側 : 16.8 pmol/mg protein/min) を添加した PAH 濃度 (15 μM) で除し、細胞内からの初期 efflux (側底膜側 : 14.0, 頂側膜側 : 38.6 pmol/mg protein/min) は efflux 実験開始直前の細胞内 PAH 濃度 (9.7 μM) で除することでそれぞれの輸送活性を算出した。なお、efflux 実験開始直前の細胞内 PAH 濃度の



**Fig. 6. PAH efflux from OK cells (A) and intracellular remaining of PAH (B).** A: [<sup>14</sup>C]PAH (15 μM) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15 μM) were added to the basal side of monolayers. After incubation for 30 min at 37 °C, the cells were washed and PAH efflux to the apical (△) or to the basal (○) side was measured at 1, 2 and 5 min. B: intracellular remaining of PAH during the efflux experiment was measured at 0, 2 and 5 min.

算出には、Yuan ら<sup>28)</sup>によって報告されている OK 細胞の細胞内容積 9.5  $\mu\text{L}/\text{mg protein}$  を用いた。再計算した結果を Fig. 7 に示す。この解析により、側底膜では細胞の外から中への輸送が逆方向の輸送に比べて優位であり、一方頂側膜では細胞内の中から外への輸送が、その逆方向に比べて優位であることが示された。従って、OK 細胞における PAH 経細胞輸送の方向性は、側底膜及び頂側膜の両細胞膜における輸送が方向選択的であるために生じることが明らかとなった。

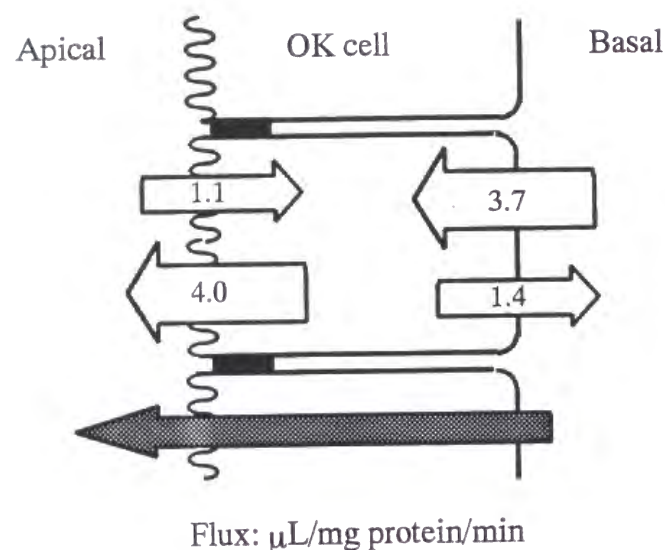


Fig. 7. Directional flux of PAH across OK cells.

### 1 - c 側底膜及び頂側膜における *p*-aminohippurate 輸送特性

次に、側底膜及び頂側膜における PAH の輸送特性についてそれぞれ検討した。Fig. 8 は、側底膜における PAH 輸送に対する温度あるいは有機アニオン輸送阻害剤の影響を検討した結果である。側底膜における PAH 輸送は、37°C (control) に比べ 4°C の条件下において低下するとともに、probenecid 及び furosemide によって阻害された。また、あらかじめ細胞内に取り込ませた PAH の頂側膜側への efflux は、4°C の条件下において著しく減少した (Fig. 9A)。さらに、その efflux の減少に伴って PAH の細胞内残存量は増加することが認められた (Fig. 9B)。また、Fig. 10 に示されるように、probenecid 及び furosemide は、PAH の細胞内から頂側膜側への efflux を阻害し、細胞内残存量を増加させた。従って、OK 細胞の側底膜及び頂側膜の両細胞膜における PAH 輸送は、ともに特殊輸送系が関与することが示された。

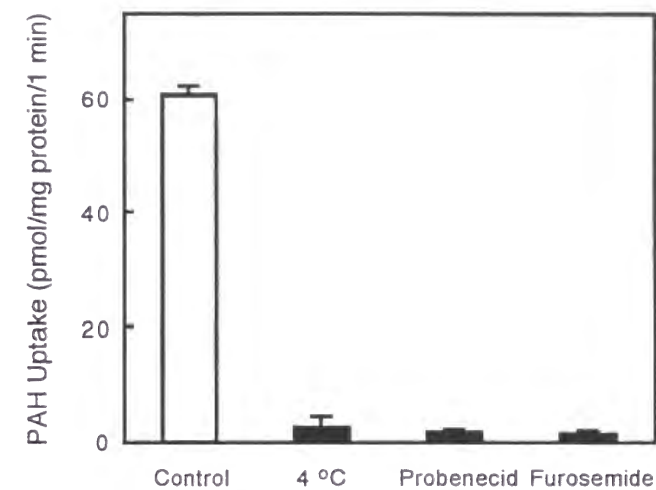


Fig. 8. Effect of temperature or organic anion inhibitors on PAH uptake from the basal side of OK cells. [<sup>14</sup>C]PAH (15  $\mu\text{M}$ ) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15  $\mu\text{M}$ ) without or with 1 mM organic anion inhibitor (probenecid or furosemide) were added to the basal side of monolayers. After incubation for 1 min at 37 °C or 4 °C, PAH uptake by the cells was measured.

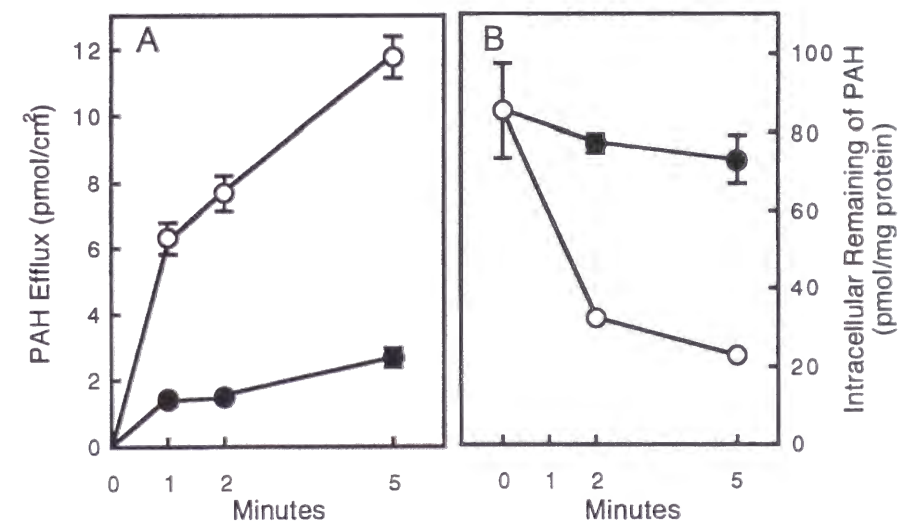
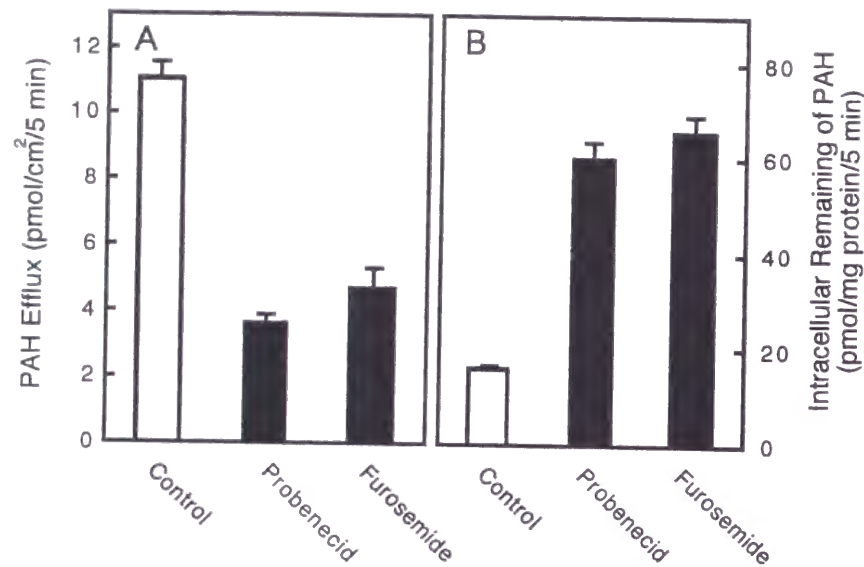


Fig. 9. Effect of temperature on PAH efflux to the apical side of OK cells (A) and intracellular remaining (B). [<sup>14</sup>C]PAH efflux to the apical side and intracellular remaining were measured at [<sup>14</sup>C]PAH at 37 °C (○) or at 4 °C (●).





**Fig. 10. Effect of anion transport inhibitors on PAH efflux to the apical side of OK cells (A) and intracellular remaining (B).** [<sup>14</sup>C]PAH efflux for 5 min and intracellular remaining at the time were measured in the absence or presence of 5 mM probenecid or furosemide added to the both sides of the cells.

#### 1-d 考察

近年、培養細胞系を用いた近位尿細管上皮細胞における薬物輸送研究は急速に進展しており、代表的な培養腎上皮細胞としてブタ腎由来の LLC-PK<sub>1</sub> が繁用されている<sup>26)</sup>。LLC-PK<sub>1</sub> 細胞は、有機カチオンである tetraethylammonium、N<sup>1</sup>-methylnicotinamide 及び procainamide を分泌方向に対応する側底膜側から頂側膜側へと方向選択的に経細胞輸送する<sup>29-31)</sup>ことが報告されていることから、腎有機カチオン輸送研究に繁用されている。しかし、有機アニオンである PAH の輸送は、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞において観察されず<sup>20-23)</sup>、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞には腎有機アニオン輸送系が発現していないと考えられている。また、ウサギ近位尿細管上皮細胞の初代培養系を用いた PAH 輸送の検討<sup>23)</sup>がなされているが、その細胞系における PAH 輸送は probenecid で阻害効果が認められず、腎有機アニオン輸送のモデル細胞系としての確立には至っていない。一方、Dawson と Renfro<sup>24)</sup>は、ある種の魚類(winter flounder、カレイの一種)の腎近位尿細管から単離した初代培養系を用い、方向選択的かつ有機アニオン輸送阻害剤 probenecid 感受性の PAH 輸送活性を見出しているが、その報告の中で細胞調製間において輸送活性のばらつき

が大きいことを述べている。また、その報告では経細胞輸送特性のみの評価であり、側底膜あるいは頂側膜輸送特性の解析はなされていない。さらに、哺乳類由来ではないことも問題となる点である。本研究において、培養腎上皮細胞 OK における PAH 輸送を検討した結果、分泌方向に対応する方向選択的な PAH の経細胞輸送活性が観察されるとともに、その輸送は、低温下あるいは probenecid 等の共存下で阻害されることが認められた。従って、OK 細胞は PAH を方向選択的に経細胞輸送する機能を有していると考えられ、哺乳類の腎臓を起源とする培養細胞系において初めて、OK 細胞が腎有機アニオン輸送のモデル細胞系として利用できることが示唆された。

系球体でろ過されたグルコースは近位尿細管でほぼ完全に再吸収されるため、健常人の尿中にはほとんど排泄されない(尿中にはろ過されたうちの 0.05% 以下)。このグルコースの再吸収には、近位尿細管上皮細胞刷子縁膜に存在する Na<sup>+</sup> との共輸送による能動輸送系と、側底膜に存在する促進拡散による受動輸送系の両輸送系が関与していることが知られている。尿細管管腔側から細胞内方向には、側底膜の Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase によって常に Na<sup>+</sup> 勾配が形成されていることから、尿細管管腔側のグルコースは刷子縁膜を介して細胞内に能動的に取り込まれるとともに側底膜を介した促進拡散により細胞外へと転送される。このように、刷子縁膜における能動輸送によって方向性が決定されることにより、グルコースは再吸収方向へと経細胞輸送される。一方、PAH は腎臓を一度通過するだけでそのほとんど(80% 以上)が血中から除去されることが知られている。このように効率よく尿中排泄される理由は、PAH が近位尿細管において分泌方向へ活発に経上皮輸送されていることによるものであるが、その分泌方向への輸送が側底膜側あるいは刷子縁膜側のいずれの細胞膜輸送によって決定されているのかこれまで明らかではなかった。そこで著者は、OK 細胞で認められる PAH 経細胞輸送の方向性が決定される要因を解析するため、側底膜及び頂側膜における PAH 輸送について検討した。その結果、側底膜、頂側膜のいずれの細胞膜においても、PAH は分泌方向に対応する輸送が優位であることが見出された。さらに、それらの輸送は、温度依存性を示すとともに有機アニオン輸送阻害剤で低下したことから、側底膜及び頂側膜における輸送はともに特殊輸送系が関与することが明らかとなった。膜小胞系における解析から、側底膜及び刷子縁膜の PAH 輸送は特殊輸送系が関与することが示唆されていることと、本研究において得られた細胞レベルでの結果を考え合わせると、腎近位尿細管上皮細胞において PAH が効率よく分泌(経上皮輸送)される要因は、側底膜及び頂側膜の両細胞膜において PAH を輸送する特殊輸送系が存在すること、かつその輸送の方向性が分泌方向に優位であることが関与しているものと考えられる。

## 第2節 有機アニオン輸送の基質認識特性

前節においてOK細胞はPAHの分泌方向に相当する経細胞輸送活性を有するとともに、その方向性は側底膜及び頂側膜のそれぞれにおいて特殊輸送系が関与するために生じることを示した。しかし、OK細胞を用いた有機アニオン輸送系の解析結果が腎有機アニオン輸送の特性として一般性を有するためには、その輸送系が実際に腎尿細管に存在する有機アニオン輸送系と対応するものであることを示す必要がある。本節では、OK細胞におけるPAH輸送の基質認識性が腎有機アニオン輸送系と対応するか否かについて解析するため、これまでに有機アニオン輸送系を介して尿細管分泌されることが示唆されているβ-ラクタム抗生物質<sup>32-34)</sup>を選び、OK細胞のPAH輸送系に対する阻害効果ならびにβ-ラクタム抗生物質自身の輸送特性について詳細な検討を行った。また、Ulrichら<sup>35-39)</sup>はラット腎尿細管側底膜におけるPAH輸送の基質認識性について系統的な検討を行っている。そこで、OK細胞におけるPAH輸送系に対する種々のジカルボン酸の阻害効果について調べ、OK細胞と腎尿細管における側底膜有機アニオン輸送系の基質認識性についての比較解析を試みた。

### 2 - a *p*-Aminohippurate 輸送に対する各種β-ラクタム抗生物質の影響

まず、OK細胞における側底膜PAH輸送に対する各種抗生物質の影響について検討した。その結果をFig. 11に示す。ペニシリン系抗生物質であるbenzylpenicillin及びセファロスポリン系抗生物質であるcefazolin、cefotiam、cefizoxime、cefixime、cephalexinのいずれの共存においても側底膜PAH輸送は強く阻害された。また、側底膜PAH輸送はbenzylpenicillin共存において濃度依存的に阻害され(Fig. 12)、そのIC<sub>50</sub>は55 μMと算出された。さらに、側底膜PAH輸送に対するbenzylpenicillinの阻害形式について検討するため、速度論的解析を行った(Fig. 13)。Benzylpenicillin存在下で側底膜PAH輸送の濃度依存性について検討し、Eadie-Hofstee plot解析からkinetic parameterを算出した。その結果、Table 1に示すようにbenzylpenicillin共存によって側底膜PAH輸送の最大輸送速度V<sub>max</sub>値は変化せず、ミカエリス定数K<sub>m</sub>値は上昇した。この解析から、benzylpenicillinによる側底膜PAH輸送の阻害形式は競合阻害であることが示された。

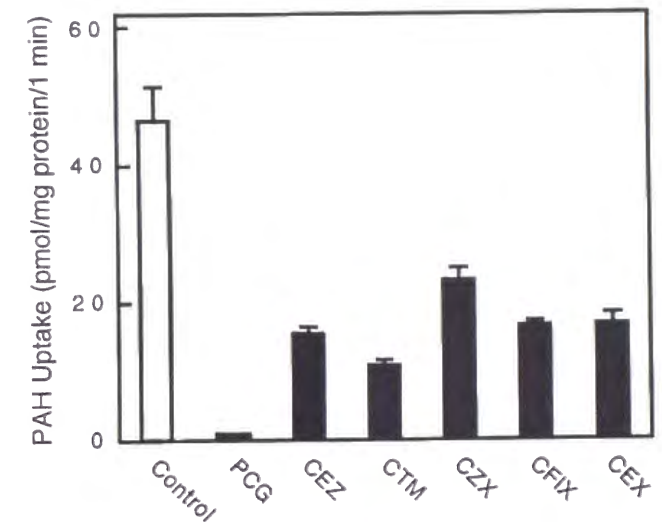


Fig. 11. Effects of various β-lactam antibiotics on PAH uptake from the basal side of OK cells. [<sup>14</sup>C]PAH (15 μM) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15 μM) were added to the basal side of monolayers. [<sup>14</sup>C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured in the absence or presence of 1 mM β-lactam antibiotic added to the basal side.

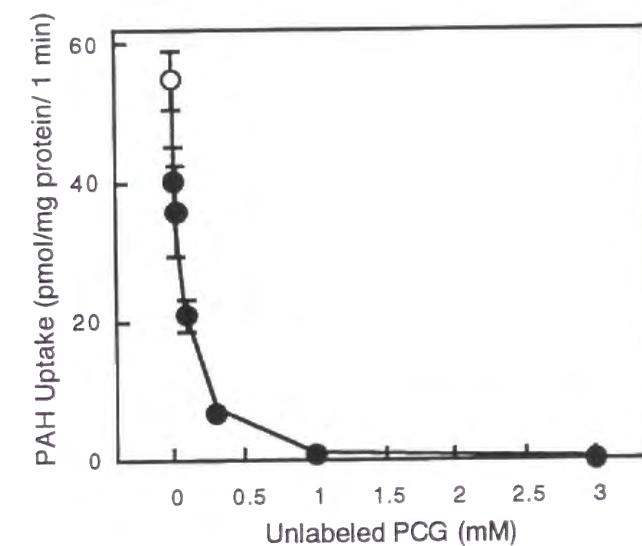


Fig. 12. Effects of various concentrations of PCG on PAH uptake from the basal side of OK cells. [<sup>14</sup>C]PAH (15 μM) and D-[<sup>3</sup>H]mannitol (15 μM) were added to the basal side of monolayers. [<sup>14</sup>C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured in the absence or presence of various concentrations of PCG (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 mM) added to the basal side.

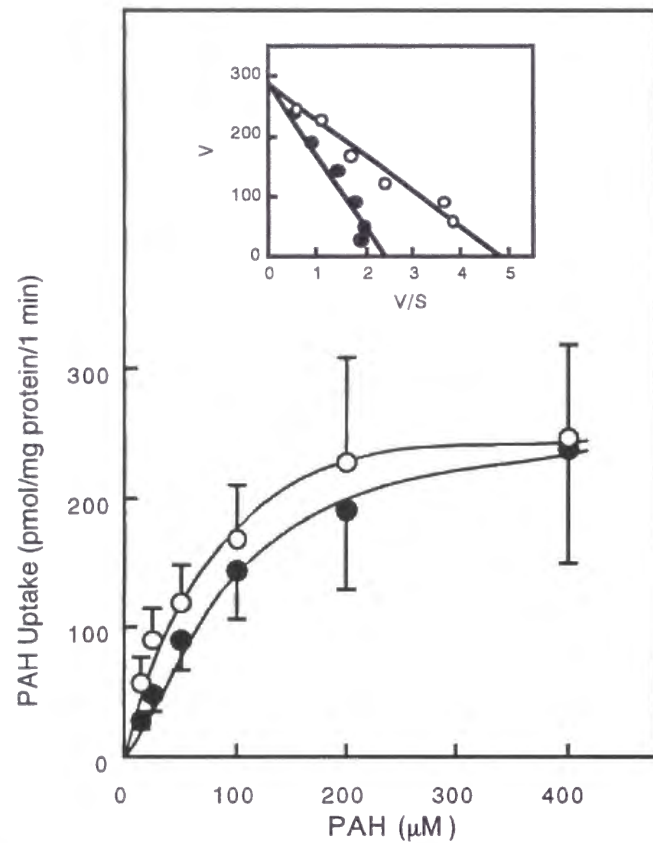


Fig. 13. Effect of PCG on kinetics of PAH uptake from the basal side of OK cells. The basolateral uptake of various concentrations of [<sup>14</sup>C]PAH for 1 min was measured in the absence of (○) or presence (●) of 0.1 mM PCG added to the basal side. Inset, Eadie-Hofstee plots of the data.

Table 1. Kinetic parameters of PAH uptake from the basal side of OK cells in the absence or presence of 0.1 mM PCG.

	Km (μM)	Vmax (pmol/mg protein/1 min)
Control	53.6 ± 4.1	279.4 ± 86.9
0.1 mM PCG	107.8 ± 13.9	299.7 ± 105.5

## 2 - b β-ラクタム抗生物質の輸送特性

次に、OK 細胞におけるβ-ラクタム抗生物質輸送について検討を行った。Fig. 14 に benzylpenicillin の経細胞輸送について調べた結果を示す。PAH の場合と同様、benzylpenicillin においても側底膜側から頂側膜側へと輸送され、その逆方向には全く輸送されないことが認められた。その経細胞輸送活性は非標識 benzylpenicillin、PAH 及び cefazolin の共存によって阻害された。また、Fig. 15 に示すように側底膜 benzylpenicillin 輸送は非標識 benzylpenicillin、PAH、probenecid、cefazolin 及び cefotiam のいずれによっても強く阻害された。さらに cefazolin 及び cefotiam の輸送についても検討した (Fig. 16)。β-ラクタム抗生物質 cefazolin 及び cefotiam の側底膜からの取り込みは PAH 及び probenecid によって阻害された。これらの結果から、β-ラクタム抗生物質は OK 細胞において PAH と共通の輸送系を介して輸送されることが示唆された。

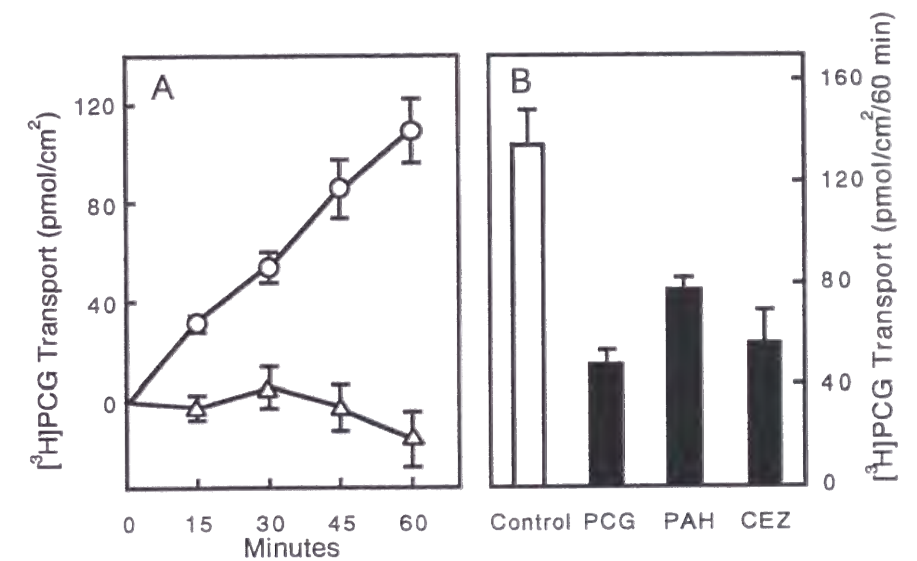


Fig. 14. Transcellular transport (A) and effect of unlabeled PCG, PAH and CEZ on basal-to-apical transport (B) of [<sup>3</sup>H]PCG by OK cells. A: [<sup>3</sup>H]PCG (15 μM) and [<sup>14</sup>C]sucrose (15 μM) were added to the basal side (○) or to the apical (△) of monolayers. After incubation for 15, 30, 45 and 60 min, medium on the other side was collected (100 μl) and radioactivity was counted for determination of transcellular transport of [<sup>3</sup>H]PCG. B: [<sup>3</sup>H]PCG (15 μM) and [<sup>14</sup>C]sucrose (15 μM) were added to the basal side of monolayers, and transcellular transport of [<sup>3</sup>H]PCG from the basal to apical side at 60 min was measured in the absence or presence of 5 mM unlabeled PCG, PAH and CEZ.

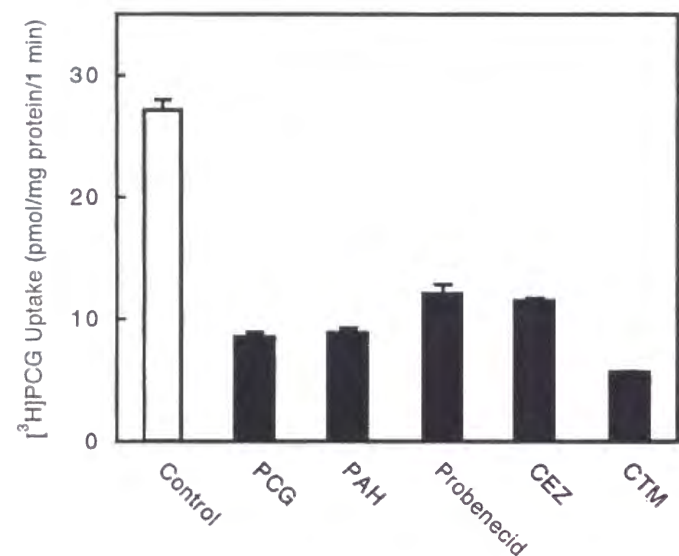


Fig. 15. Effects of various anionic compounds on PCG uptake from the basal side of OK cells.  $[^3\text{H}]$ PCG (15  $\mu\text{M}$ ) and  $[^{14}\text{C}]$ sucrose (15  $\mu\text{M}$ ) were added to the basal side of monolayers. PCG uptake for 1 min was measured in the absence or presence of 1 mM anionic compound.

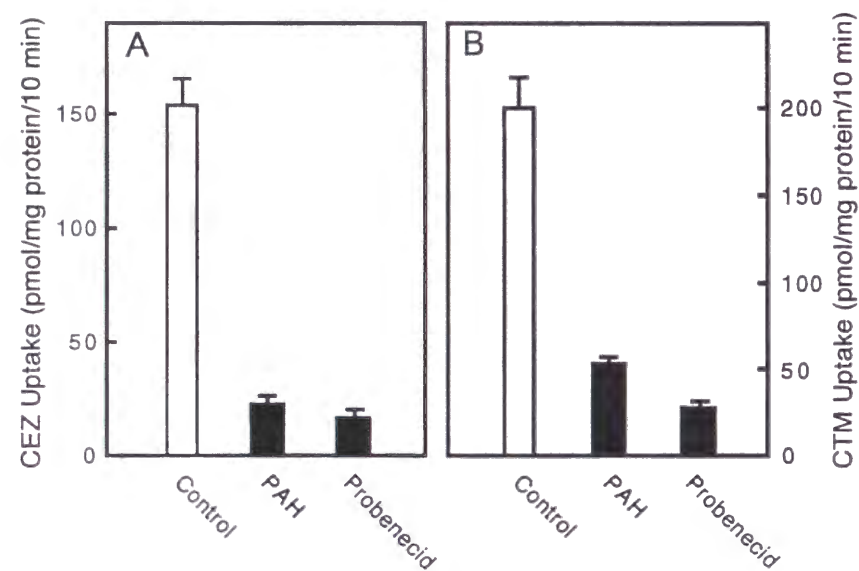


Fig. 16. Effects of PAH and probenecid on CEZ (A) and CTM (B) uptake from the basal side of OK cells. CEZ (0.5 mM) or CTM (0.5 mM) was added to the basal side of monolayers. The uptake of CEZ or CTM for 10 min was measured in the absence or presence 1 mM PAH or probenecid.

## 2-c 側底膜有機アニオン輸送に対する種々のジカルボン酸の影響

次に、種々の炭素数を有するジカルボン酸を用いて、OK細胞の側底膜 PAH 及び benzylpenicillin の輸送への影響について検討した。Fig. 17 に側底膜 PAH 輸送について調べた結果を示す。なお、横軸はジカルボン酸の有する炭素数を示す。側底膜 PAH 輸送は、炭素数が3の malonate 及び4の succinate、fumarate のいずれによっても全く影響を受けなかったが、炭素数5の glutarate、 $\alpha$ -ketoglutarate 及び6の adipate によって著しく阻害された。さらに炭素数7の pimelate を用いた場合、側底膜 PAH 輸送阻害効果は一度弱くなるが、炭素数が8、9、10と大きくなるにつれて再び強くなるという特徴的なパターンを示した。また、側底膜 benzylpenicillin 輸送についても種々のジカルボン酸の影響について検討した結果、Fig. 18 に示すように PAH の場合とほぼ同様のパターンが得られた。

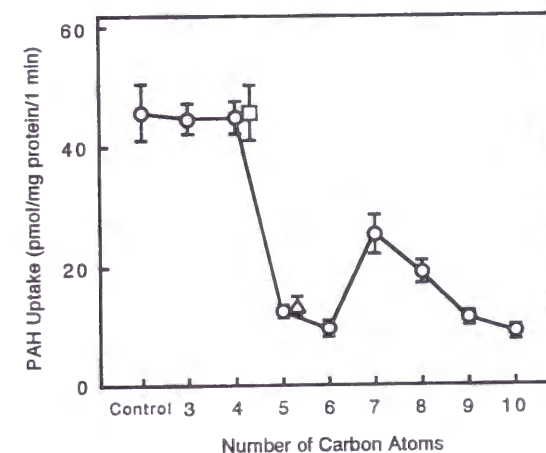


Fig. 17. Effects of various dicarboxylates on PAH uptake from the basal side of OK cells.  $[^{14}\text{C}]$ PAH uptake for 1 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  was measured in the absence or presence of 1 mM fumarate ( $\square$ ),  $\alpha$ -KG ( $\triangle$ ) or other dicarboxylates ( $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$ ) with 3 (malonate), 4 (succinate), 5 (glutarate), 6 (adipate), 7 (pimelate), 8 (suberate), 9 (azelate) and 10 (sebacate) carbon atoms.

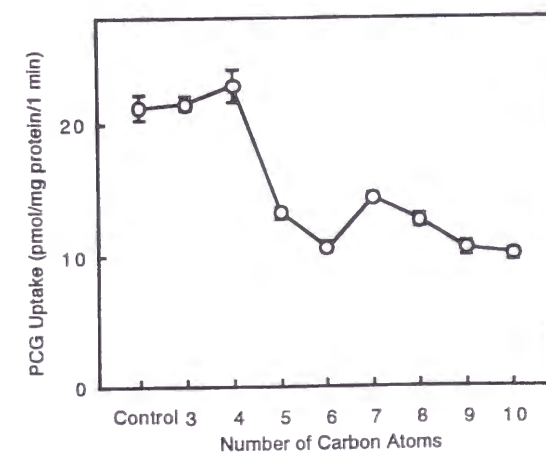


Fig. 18. Effects of various dicarboxylates on PCG uptake from the basal side of OK cells.  $[^{14}\text{C}]$ PCG uptake for 1 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  was measured in the absence or presence of 1 mM dicarboxylates ( $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$ ) with 3 (malonate), 4 (succinate), 5 (glutarate), 6 (adipate), 7 (pimelate), 8 (suberate), 9 (azelate) and 10 (sebacate) carbon atoms.

Fig. 17 及び Fig. 18 の結果を縦軸に阻害率 (control の輸送量に対するジカルボン酸共存により減少した輸送量の比の百分率)、横軸に二個のジカルボン酸の負電荷間の距離をとり、表し直したものが Fig. 19 である。OK 細胞における PAH 及び benzylpenicillin の側底膜輸送は、負電荷間の距離が約 5 Å までのジカルボン酸によっては全く影響を受けなかったが、6-8 Å のジカルボン酸によって著しく阻害された。さらに長い炭素鎖を有するジカルボン酸を用いた場合、側底膜における両輸送の阻害効果は一度弱くなるが、10-13 Å と長くなるにつれて再び強くなることが認められた。

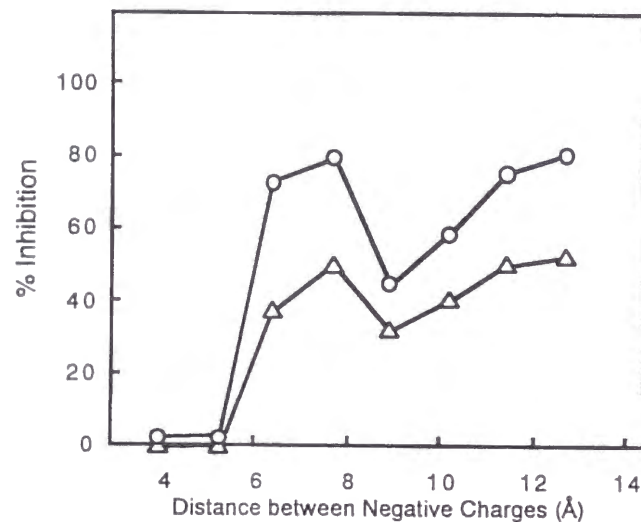


Fig. 19. The inhibitory effect of dicarboxylates as a function of their distance between negative charges on PAH and PCG uptake. Data in Fig. 17 and Fig. 18 were expressed as percent inhibition of PAH (○) and PCG (□) uptake. The distances between negative charges of dicarboxylates are (in Å) malonate, 3.9; succinate, 5.2; glutarate, 6.4; adipate, 7.7; pimelate, 8.9; suberate, 10.2; azelate, 11.4 and sebacate, 12.7.

## 2-d 考察

ペニシリン系抗生物質やセファロスポリン系抗生物質等のβ-ラクタム系抗生物質の体内からの消失は、主として腎臓からの排泄であることが知られている<sup>40,41)</sup>。これら薬物の尿中排泄は、糸球体におけるろ過と尿細管における分泌の両方が関与しているものと考えられる。また、probenecidの併用投与はβ-ラクタム系抗生物質の腎クリアランスを低下させることは古くから知られている。この現象は尿細管分泌においてβ-ラクタム系抗生物質は有機アニオン輸送系を介して分泌され、その輸送をprobenecidが阻害した結果であるものと考えられてい

る。OK細胞においても、種々のβ-ラクタム系抗生物質はPAHの輸送を阻害するとともに、それ自身の輸送はprobenecidやPAHによって阻害され、*in vivo*で認められる現象と対応することが認められた。また、側底膜PAH輸送に対するbenzylpenicillinの阻害形式を速度論的に解析したところ、その阻害形式は競合阻害であることが示されるとともに、種々のジカルボン酸による阻害パターンはPAHの場合とよく対応していた。従って、β-ラクタム系抗生物質は側底膜に存在するPAHと共通の輸送系を介して細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。

Ulrichら<sup>35-39)</sup>は、ストップフロー尿細管周囲毛細血管灌流法を用い、腎近位尿細管側底膜におけるアニオン輸送系についての基質認識性を系統的に調べている。その結果、基質認識性の違いから側底膜におけるアニオンの輸送は、sulfate system、Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransport system、PAH systemの三種の輸送系として区別できることを述べている。それら三種の輸送系における一連の研究において、種々の化合物による阻害効果について検討しており、三種の輸送系の基質認識性は一部オーバーラップするがそれぞれ異なる阻害パターンを示すことを報告している。例えば、三種のアニオン輸送系に対する種々のジカルボン酸の影響について検討した報告<sup>36,37)</sup>によると、sulfate systemでは両端のカルボシル基の距離が3から4Åのジカルボン酸(oxalate)を強く認識し、Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransport systemでは、5から6Åの距離を有するジカルボン酸(succinate、glutarate)を強く認識する。さらに、PAH systemでは負電荷間の距離が6から7Å(glutarate、adipate)及び10Å以上(azelate、sebacate)のジカルボン酸をよく認識する。今回、OK細胞で認められた側底膜PAH輸送に対するジカルボン酸の影響はその炭素鎖長の違いにより特徴的な阻害効果を示したが、その阻害パターンは腎近位尿細管側底膜で示されたPAH輸送系の報告の結果とほぼ対応した。従って、OK細胞のPAH輸送系は、腎尿細管上皮細胞におけるsulfate system、Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransport systemではなく、PAH systemのそれと同一、または極めて近い基質認識性を有するものと考えられる。また、Ulrichらは種々の炭素数を有する飽和直鎖モノカルボン酸によるPAH systemへの影響についても検討<sup>35,37)</sup>を行っており、モノカルボン酸が有する疎水性領域が大きくなる(4Å以上)につれてPAH systemを強く阻害することを見出している。ジカルボン酸とモノカルボン酸による影響の結果から、彼らはPAH systemの基質結合部位は6から7Åの負電荷間距離を有する二価アニオンを認識する部分(bivalent mode)と、4Å以上の疎水性領域を有する一価アニオンを認識する部分(hydrophobic mode)の両方を兼ね備えていることを提唱している。このモデルによれば、種々のジカルボン酸によるPAH輸送への影響において認められた最初の阻害ピーク(6から7Å)はbivalent modeによって認識されており、再度認められる阻害効果

の上昇(10Å以上)は hydrophobic mode に認識されているものと考えられる。著者は予試験的に側底膜小胞を用い、側底膜において PAH と交換輸送されうるジカルボン酸について調べた結果、PAH との trans-stimulation 効果は bivalent mode で認識されるあたりの炭素数 5 及び 6 のジカルボン酸において最も高く、炭素鎖が長くなるにつれて交換輸送活性は減少する傾向が観察された。従って、側底膜 PAH 輸送系で運ばれる基質になるのは bivalent mode によって認識される場合であり、hydrophobic mode によって認識される場合は阻害効果は示すものの、それ自身は輸送されにくい可能性があるものと思われる。

### 第3節 側底膜における有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送

腎近位尿細管上皮細胞側底膜における有機アニオン輸送は能動輸送が関与することが示唆されていたが、その駆動力については長い間不明のままであった。1987年、Shimadaら<sup>15)</sup>による膜小胞系を用いた報告を契機として、側底膜における PAH 輸送はジカルボン酸( $\alpha$ -ketoglutarate)との交換輸送によって駆動されることが見出され、その後引き続いて単離尿細管や腎皮質を用いた実験においても同様の報告がなされている<sup>9, 12, 42)</sup>。また、Pritchard<sup>43)</sup>は腎皮質細胞内の  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度あるいは側底膜を隔てた  $\alpha$ -ketoglutarate の濃度勾配の大きさによって、PAH 輸送活性が調節されることを報告している。実際に、近位尿細管上皮細胞内の  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度(100 - 300  $\mu$ M)<sup>44, 45)</sup>は血漿中(約 10  $\mu$ M)<sup>46)</sup>に比べて高いことが示されている。この濃度勾配の維持には、側底膜あるいは刷子縁膜に存在する Na<sup>+</sup>/ジカルボン酸共輸送や細胞内代謝系が重要であるものと推察されている。本節では、細胞レベルにおいても側底膜 PAH 輸送はジカルボン酸との交換輸送であるのか否かについて調べるとともに、実際に細胞内の  $\alpha$ -ketoglutarate が PAH と交換し細胞外に efflux されてくることが認められるかについて検討した。

#### 3 - a 側底膜 p-aminohippurate 輸送に対する $\alpha$ -ketoglutarate の影響

腎皮質切片<sup>7, 9)</sup>及び側底膜小胞<sup>15)</sup>を用いた検討において、PAH 取り込み時に  $\alpha$ -ketoglutarate あるいは glutarate を共存させるとその濃度変化に対して PAH 輸送活性は二相性を示すことが知られている。即ち、 $\alpha$ -ketoglutarate が低濃度共存(約 10  $\mu$ M)する場合には PAH の取り込みは

増加し、さらに、 $\alpha$ -ketoglutarate の濃度を高めると PAH の取り込み量は減少してくる。この現象は Na<sup>+</sup> 存在下においてのみ認められるため、以下のように説明される。低濃度においては、 $\alpha$ -ketoglutarate が Na<sup>+</sup>/ジカルボン酸共輸送系を介して細胞内あるいは膜小胞内に取り込まれ、 $\alpha$ -ketoglutarate の細胞内濃度あるいはその濃度勾配が高まる。それにより、有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送を介した PAH の取り込みは上昇する。しかし、さらに共存させる  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度を高めていくと、 $\alpha$ -ketoglutarate が PAH 取り込みを阻害するようになるので PAH 輸送は減少すると考えられている。本研究では、まず OK 細胞においても同様の現象が認められるかについて検討するため、OK 細胞の側底膜 PAH 輸送に対する  $\alpha$ -ketoglutarate 共存の影響についてその濃度を変化させて調べた。その結果を、Fig. 20 に示す。低濃度  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\leq 10^{-5}$  M) 共存下で側底膜 PAH 輸送活性が上昇する傾向は認められるが、腎皮質切片や側底膜小胞の場合とは異なり、顕著な促進効果は観察されなかった。一方、100  $\mu$ M 以上の  $\alpha$ -ketoglutarate 共存下においては側底膜 PAH 輸送の低下が認められた。

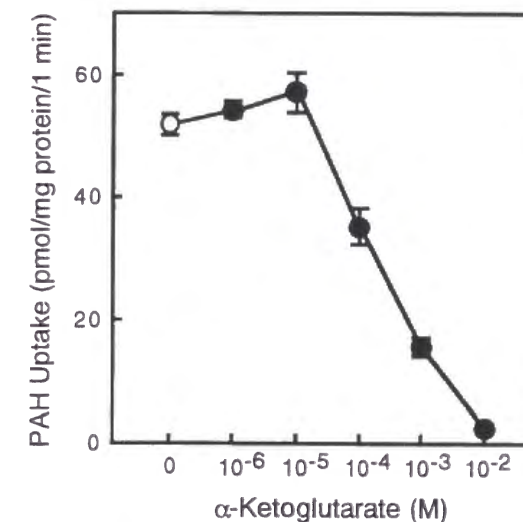


Fig. 20. Effect of  $\alpha$ -KG on PAH uptake from the basal side of OK cells. [<sup>14</sup>C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured in the absence or presence of various concentrations of  $\alpha$ -KG added to the basal side.

さらに、側底膜 PAH 輸送に対する  $\alpha$ -ketoglutarate の阻害形式について検討するため、速度論的解析を行った (Fig. 21)。検討したすべての PAH 濃度において 1 mM  $\alpha$ -ketoglutarate 共存による阻害効果が観察された。その結果を Lineweaver-Burk plot により解析し、kinetic parameter を算出した。Table 2 に示すように  $\alpha$ -ketoglutarate 共存によって側底膜 PAH 輸送の最大輸送速

度  $V_{max}$  値は減少し、ミカエリス定数  $K_m$  値を上昇させることが認められた。従って、 $\alpha$ -ketoglutarate による PAH 輸送の阻害形式は Fig. 13 で示した benzylpenicillin の場合とは異なり  $V_{max}$  値が減少する混合型であった。混合型が意味することは現在のところ明確ではないが、 $\alpha$ -ketoglutarate が PAH 輸送の細胞内 counterion として機能するのであれば、細胞外に高濃度存在することで駆動力に必要である外向き  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度勾配が低下し、その結果として  $V_{max}$  値が変動した可能性も考えられる。

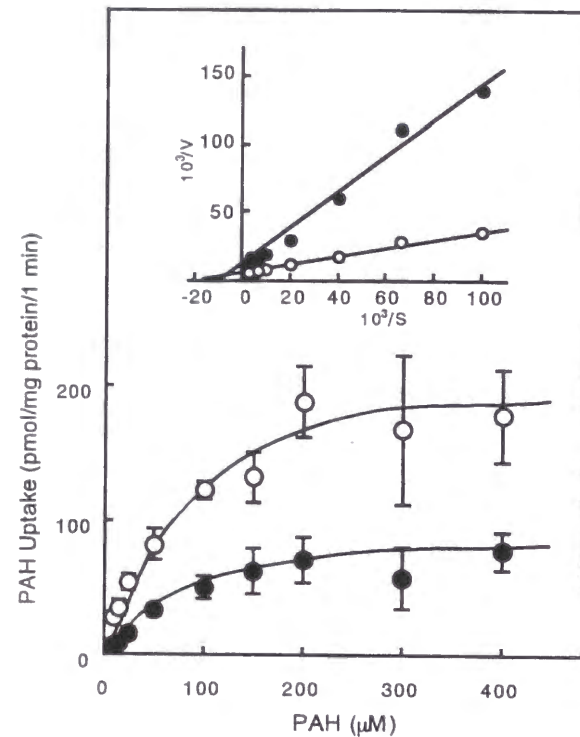


Fig. 21. Effect of  $\alpha$ -KG on kinetics of PAH uptake from the basal side of OK cells. The basolateral uptake of various concentrations of [ $^{14}$ C]PAH for 1 min was measured in the absence (○) or presence (●) of 1 mM  $\alpha$ -KG added to the basal side. Inset, Lineweaver-Burk plots of the data.

Table 2. Kinetic parameters of PAH uptake from the basal side of OK cells in the absence or presence of 1 mM  $\alpha$ -KG.

	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/mg protein/1 min)
Control	$64.0 \pm 3.6$	$193.9 \pm 23.5$
1 mM $\alpha$ -KG	$118.4 \pm 8.6$	$96.5 \pm 17.2$

次に、OK 細胞側底膜における  $\alpha$ -ketoglutarate の取り込みについて解析を行った。Fig. 22A は、 $\alpha$ -[ $^{14}$ C]ketoglutarate の側底膜取り込みを経時的に調べた結果である。Fig. 5 で認められたように PAH の側底膜取り込みが 5 分で定常状態に達した場合とは対照的に、 $\alpha$ -ketoglutarate の側底膜取り込みは 30 分後においても飽和することなく直線的に上昇した。また、側底膜における  $\alpha$ -[ $^{14}$ C]ketoglutarate の取り込みは、5 mM 非標識  $\alpha$ -ketoglutarate 及び PAH 共存下で著しく低下した (Fig. 22B)。 $Na^+$  非存在下において  $\alpha$ -[ $^{14}$ C]ketoglutarate 取り込みは減少したが、その低下は control ( $Na^+$  存在下) の約 40% までにとどまった。また、 $Li^+$  存在下において  $\alpha$ -ketoglutarate の取り込みに変化は認められなかった。ラット腎尿細管側底膜小胞を用いて  $Na^+$ /ジカルボン共輸送を解析した報告<sup>47)</sup>では、OK 細胞の場合と同様、 $\alpha$ -ketoglutarate 共存及び  $Na^+$  非存在下においてジカルボン酸 ([ $^3$ H]methylsuccinate) の取り込みは低下している。しかし、側底膜小胞では  $Na^+$  非存在下 (choline 置換) において  $Na^+$  存在下の 14% までにジカルボン酸取り込みは著しく低下しているとともに、 $Li^+$  共存による阻害が観察されている。また、PAH 共存による阻害効果は認められていない。従って、OK 細胞側底膜におけるジカルボン酸の取り込み特性は、ラット腎尿細管側底膜のそれと異なる可能性が示唆された。

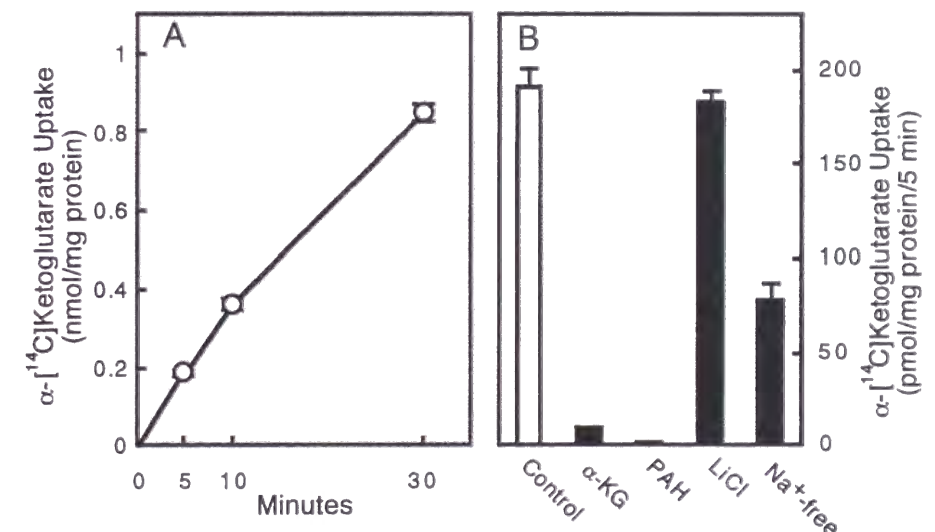


Fig. 22.  $\alpha$ -KG uptake from the basal side of OK cells. A,  $\alpha$ -[ $^{14}$ C]KG (15  $\mu$ M) and D-[ $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basal side of monolayers. After incubation for 5, 10 and 30 min at 37  $^{\circ}$ C,  $\alpha$ -KG uptake by the cells was measured. B: basolateral uptake of  $\alpha$ -[ $^{14}$ C]KG for 5 min was measured in the absence or presence of 5 mM unlabeled  $\alpha$ -KG, 5 mM PAH or 5 mM lithium (LiCl) added to the basal side of monolayers. For the measurement of  $\alpha$ -KG uptake in the absence of  $Na^+$  ( $Na^+$ -free),  $Na^+$  in the uptake medium (both sides) was replaced with choline.

### 3 - b *p*-Aminohippurate による $\alpha$ -ketoglutarate efflux の促進効果

OK 細胞における側底膜 PAH 輸送は  $\alpha$ -ketoglutarate 共存によって阻害されることから、有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送が関与している可能性が推測されるが、直接的な証明でない。そこで、OK 細胞側底膜を介する PAH の取り込みが  $\alpha$ -ketoglutarate との交換によるものか否か明確にするため、以下の検討を行った。すなわち、OK 細胞の側底膜側 buffer 中に  $100 \mu\text{M}$  PAH を存在させ、一定時間インキュベーションした後、側底膜側 buffer 中に出現した  $\alpha$ -ketoglutarate を測定した (Fig. 23A)。PAH 存在下における  $\alpha$ -ketoglutarate の efflux 量は、PAH 非存在下に比べいずれの測定時間においても顕著に高いことが認められた。Fig. 23B は、同時に測定した細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度についての結果であるが、細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度は両者において有意な変化は認められなかった。Fig. 24 は、PAH 存在下における細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate と細胞外へ efflux された  $\alpha$ -ketoglutarate との量的関係を表したものである。この結果より、PAH 添加後 60 分においては添加直後の細胞内に存在した量を越える  $\alpha$ -ketoglutarate が細胞外に efflux されているにもかかわらず、細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 量はほぼ一定のレベルに維持されていることが明らかとなった。

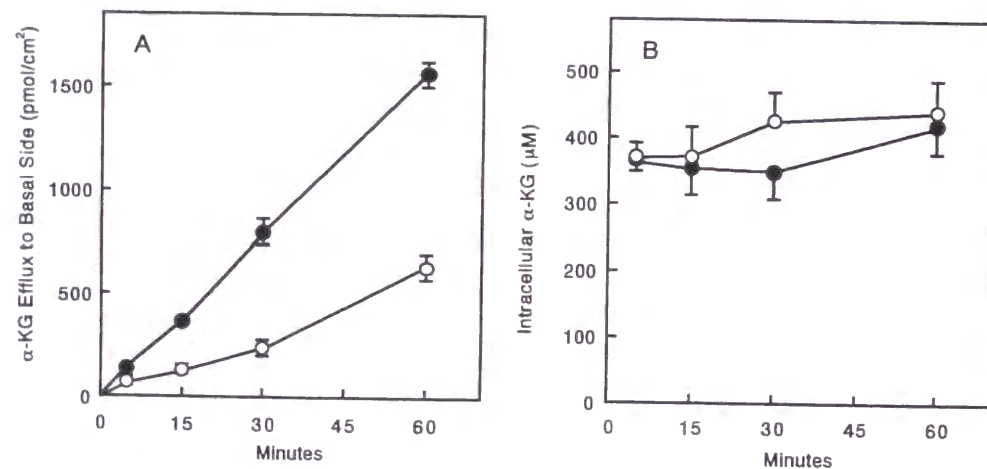


Fig. 23. Effect of PAH application on  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side (A) and the intracellular level of  $\alpha$ -KG (B) in OK cells. A: after incubation without (○) or with (●) PAH ( $100 \mu\text{M}$ ) in basolateral medium for 5, 15, 30 and 60 min at  $37^\circ\text{C}$ ,  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side was measured. B: after incubation for 5, 15, 30 and 60 min, the intracellular level of  $\alpha$ -KG in OK cells was determined.

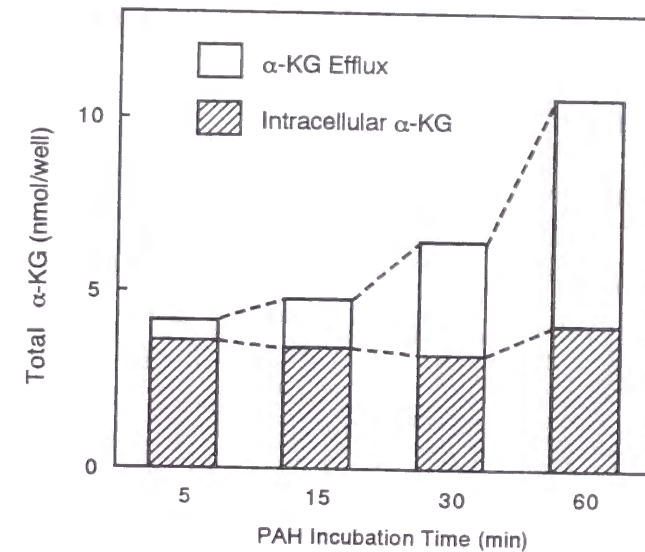
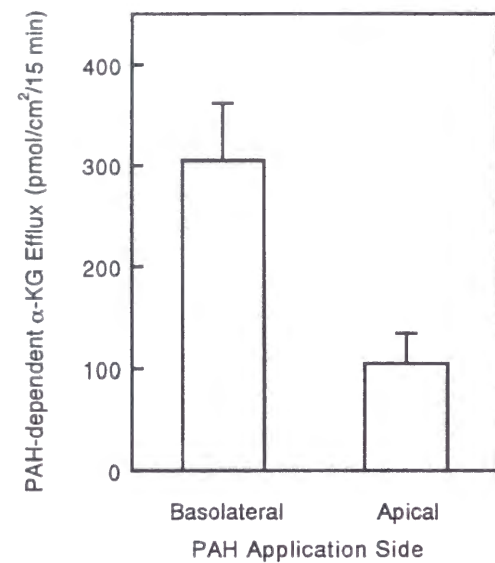


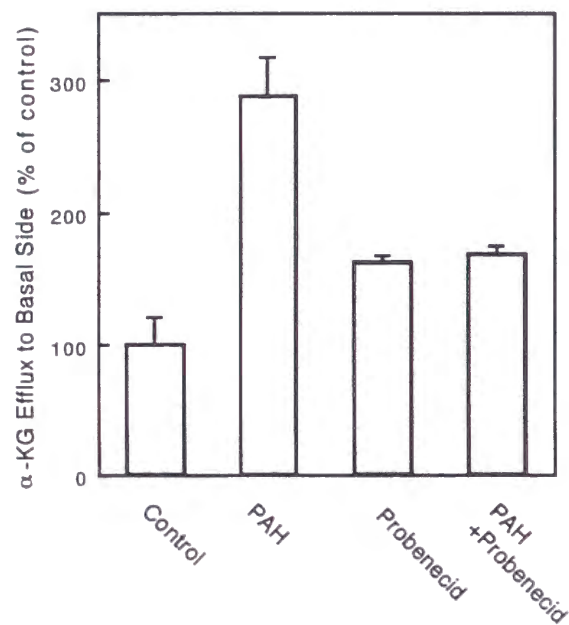
Fig. 24. Change in  $\alpha$ -KG efflux and intracellular  $\alpha$ -KG in the presence of PAH in OK cells. After incubation with PAH ( $100 \mu\text{M}$ ) in basolateral medium for 5, 15, 30 and 60 min at  $37^\circ\text{C}$ ,  $\alpha$ -KG efflux (total of the efflux to the basolateral and apical side) and the intracellular level of  $\alpha$ -KG were measured.

次に、PAH を側底膜側あるいは頂側膜側に添加し、細胞内から efflux された  $\alpha$ -ketoglutarate 量について比較を行った (Fig. 25)。頂側膜側に PAH を添加した場合に比べ、側底膜側添加の場合には、 $\alpha$ -ketoglutarate の efflux が約 3 倍高いことが観察された。この両細胞膜における PAH 添加時の efflux の差は、Fig. 5 で認められた PAH の取り込みが頂側膜側に比べ、側底膜側からの方が大きいことと対応しているものと考えられる。これらの結果より、OK 細胞側底膜に PAH /  $\alpha$ -ketoglutarate 交換輸送が存在することが示唆された。しかし、側底膜側 PAH 添加による側底膜側 buffer 中の  $\alpha$ -ketoglutarate の増加は、PAH との交換輸送を介さずに efflux してきた  $\alpha$ -ketoglutarate の再取り込みを PAH が阻害した結果である可能性も考えられる。そこで、次に PAH 添加時に probenecid を共存させることによる  $\alpha$ -ketoglutarate の efflux への影響について検討した (Fig. 26)。その結果、PAH 添加により促進された  $\alpha$ -ketoglutarate の efflux は、probenecid 共存下において減少した。この結果は、probenecid が側底膜における PAH /  $\alpha$ -ketoglutarate 交換輸送を阻害したことを示すものであり、OK 細胞側底膜には有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送が存在することが示された。





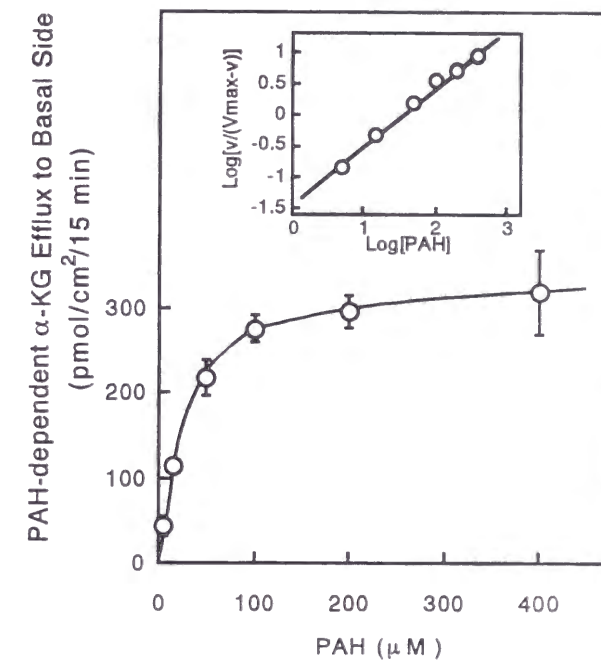
**Fig. 25.** Effect of side of PAH application on  $\alpha$ -KG efflux from OK cells. PAH (100  $\mu$ M) was added to either the basolateral or apical side. After incubation for 15 min at 37 °C,  $\alpha$ -KG efflux to the PAH-applied side was measured. To estimate PAH-dependent  $\alpha$ -KG efflux, the efflux in the absence of PAH was subtracted from that in the presence of PAH.



**Fig. 26.** Effect of probenecid on PAH-dependent  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side of OK cells. After incubation in the absence or presence of PAH (100  $\mu$ M) and/or probenecid (100  $\mu$ M) in the basolateral medium,  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side was measured.

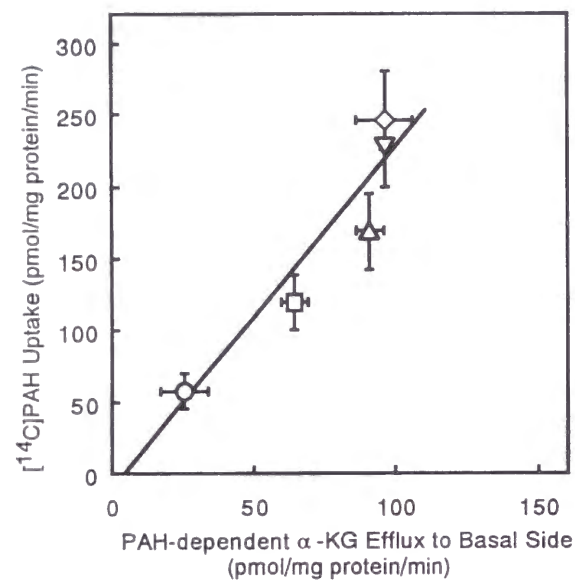
### 3 - c 側底膜 *p*-aminohippurate 輸送と $\alpha$ -ketoglutarate efflux の相関関係

次に、側底膜における PAH と  $\alpha$ -ketoglutarate の交換比率について検討するため、側底膜側に添加する PAH の濃度を变化させ、その時に側底膜側に efflux された  $\alpha$ -ketoglutarate 量を測定した (Fig. 27)。その結果、PAH 取り込み活性を調べた場合 (Fig. 13、Fig. 21) と同様に、側底膜側に efflux された  $\alpha$ -ketoglutarate も側底膜側に添加する PAH 濃度を上昇させることによって飽和することが認められた。Eadie - Hofstee plot 解析によりミカエリス定数  $K_m$  は 33.6  $\mu$ M と算出され、Fig. 13 あるいは Fig. 21 での側底膜 PAH 取り込み解析から得られた値 (それぞれ 53.6  $\mu$ M、64.0  $\mu$ M) と近いものであった。Fig. 27 の inset は Hill plot を示しており、そのプロットから得られた Hill 係数は 0.96 であることから PAH 分子と  $\alpha$ -ketoglutarate 分子は 1 : 1 で交換輸送されることが示唆された。この 1 : 1 の関係は、Schmitt と Burckhardt<sup>48)</sup> がウシ由来の腎尿細管側底膜を用いて解析した結果と一致する。



**Fig. 27.**  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side of OK cells with varying concentrations of PAH. After incubation with various concentrations of PAH in the basolateral medium for 15 min,  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side was measured. To estimate PAH-dependent  $\alpha$ -KG efflux, the efflux in the absence of PAH was subtracted from that in the presence of PAH. Inset, Hill plot of the data.

また、PAH 依存性の側底膜  $\alpha$ -ketoglutarate efflux を X 軸、側底膜 PAH 取り込みを Y 軸とし、側底膜側に添加した PAH 濃度ごとにプロットした結果を Fig. 28 に示す。その結果、側底膜側に添加した PAH の濃度を上昇させた時、PAH 依存性の側底膜  $\alpha$ -ketoglutarate efflux と側底膜 PAH 取り込みとは比例関係にあり、そのプロットは直線性を示した。直線の傾きは 2.4 と算出されたことから、この解析から得られた PAH 分子と  $\alpha$ -ketoglutarate 分子との交換比率は 2:1 であり、解析法の違いにより交換比率が異なる結果となった。

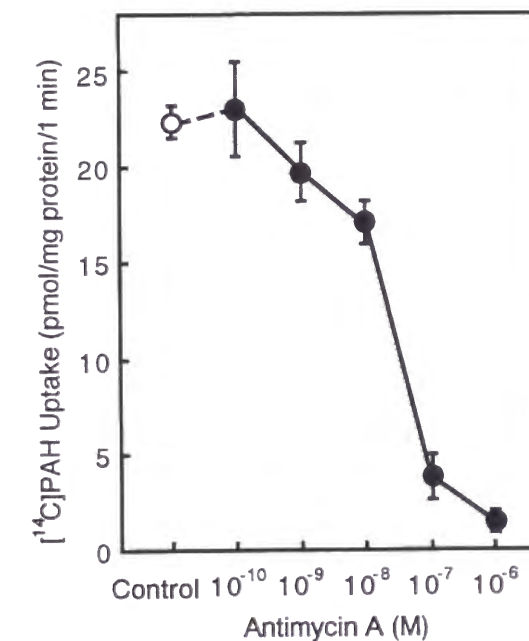


**Fig. 28. Correlation between the basolateral PAH uptake and the PAH-dependent  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side of OK cells with varying PAH concentration.** For PAH uptake, [ $^{14}$ C]PAH and [ $^3$ H]mannitol were added to the basolateral side of the cell monolayers. PAH uptake was measured for 1 min at 37 °C. For PAH-dependent  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side, data in figure 27 were expressed as pmol/mg of protein per min. PAH concentrations in the basolateral medium of OK cells are (in  $\mu$ M) 15 ( $\circ$ ), 50 ( $\square$ ), 100 ( $\triangle$ ), 200 ( $\nabla$ ) and 400 ( $\diamond$ ). The linear regression was as follows:  $y = 2.4x - 15.6$  ( $r = 0.94$ ).

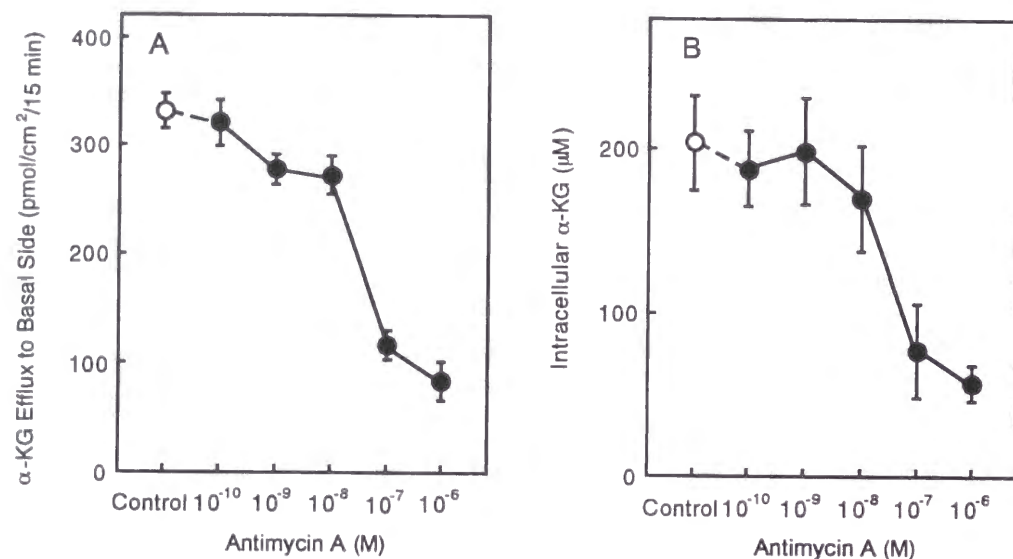
### 3 - d 細胞内 ATP 枯渇による側底膜 *p*-aminohippurate 輸送への影響

エネルギー代謝阻害剤処理及び嫌気的条件下等において腎尿細管側底膜 PAH 輸送が著しく阻害されることが明らかにされている<sup>7,49,50</sup>) が、その一方で側底膜 PAH 輸送に ATP の加水分解が直接的に共役していることを示す結果は得られておらず<sup>49,50-53</sup>)、ATP の関与についての詳

細は不明であった。そこで本研究ではまず、OK 細胞においても ATP 枯渇下で側底膜 PAH 輸送が低下するか否かを検討した。その結果、側底膜 PAH 輸送活性はエネルギー代謝阻害剤 antimycin A 処理によって濃度依存的に阻害され、見かけの  $IC_{50}$  は 28 nM と算出された (Fig. 29)。この輸送阻害は、PAH /  $\alpha$ -ketoglutarate 交換輸送活性の低下によると考えられることから、PAH 添加時における側底膜  $\alpha$ -ketoglutarate efflux 活性についても検討した。その結果、antimycin A 処理濃度依存的に減少し、見かけの  $IC_{50}$  は 51 nM であった (Fig. 30A)。このときに同時に測定した細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度も antimycin A 処理濃度依存的な低下が観察され、見かけの  $IC_{50}$  は 45 nM であった (Fig. 30B)。Antimycin A 処理による検討により、側底膜 PAH 輸送活性、 $\alpha$ -ketoglutarate efflux 活性及び細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度の  $IC_{50}$  がほぼ一致した。このことは、OK 細胞側底膜における PAH の取り込みが  $\alpha$ -ketoglutarate との交換輸送であることをさらに明確にするとともに、エネルギー代謝阻害剤による側底膜 PAH 輸送の減少は、少なくとも一部、PAH 輸送の駆動力となる細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度の低下が関与していることが示唆された。



**Fig. 29. Dose-dependent effect of antimycin A on PAH uptake from the basolateral side of OK cells.** Confluent monolayers were incubated for 30 min with various concentrations of antimycin A ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH (15  $\mu$ M) and D- [ $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basolateral side of the monolayers, and [ $^{14}$ C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured.



**Fig. 30.** Effect of antimycin A on  $\alpha$ -KG efflux to the basolateral side (A) and the intracellular  $\alpha$ -KG concentration (B) in OK cells. A: confluent monolayers were incubated for 30 min with various concentrations of antimycin A ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M). After washing the cells, PAH (100  $\mu$ M) was added to the basal side, and the  $\alpha$ -KG efflux to the applied side for 15 min was measured. B: after incubation for 15 min,  $\alpha$ -KG in OK cells was determined.

### 3-e 考察

本節において示されたようにOK細胞では他の実験系で認められている低濃度 $\alpha$ -ketoglutarate共存による顕著な促進効果は観察されなかった。この相違がOK細胞における $\alpha$ -ketoglutarate取り込みに起因しているものと考え、OK細胞におけるジカルボン酸輸送の検討を行った。OK細胞側底膜における $\alpha$ -ketoglutarateの取り込みは、 $\text{Na}^+$ 依存性が若干認められたものの、 $\text{Na}^+$ /ジカルボン酸共輸送系に阻害効果を示す $\text{Li}^+$ 存在下では全く影響が認められなかった。さらに、腎皮質切片<sup>9)</sup>( $^{14}\text{C}$ ]glutarate)とOK細胞( $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ ]ketoglutarate)におけるジカルボン酸の取り込みを実験開始5あるいは30分後の溶液中放射活性に対する組織内放射活性の比で比較したところ、腎皮質の場合でそれぞれ2.7と11.2、OK細胞の場合でそれぞれ1と6であることから、OK細胞ではジカルボン酸の濃縮的な取り込みが腎皮質のそれに比べて低いものと考えられる。また、細胞内に取り込まれた後の $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -ketoglutarateの代謝

について調べるため、ペーパークロマトグラフィーによる検討を行った。OK細胞の側底膜側から5分間あるいは30分間 $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -ketoglutarateを取り込ませた後、抽出したサンプルをスポットし展開した結果、放射活性の $R_f$ 値はともに0.35であった。一方、標品の $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -ketoglutarateをスポットした時の $R_f$ 値は0.46であり、明らかに細胞に取り込ませた場合とは異なることが認められた。さらに、400  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -ketoglutarateを含む溶液をOK細胞の側底膜側あるいは頂側膜側に添加し、30分間インキュベーションした後、細胞内 $\alpha$ -ketoglutarate濃度を測定したところ、 $\alpha$ -ketoglutarate添加による細胞内 $\alpha$ -ketoglutarate濃度の上昇はいずれも全く認められなかった。以上、OK細胞では $\text{Na}^+$ /ジカルボン酸共輸送系が欠損しているあるいはその活性が著しく低いことに加えて、細胞内に飽和することなく $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -ketoglutarateは取り込まれるものの細胞内で速やかに代謝されていること等から、細胞外から $\alpha$ -ketoglutarateを添加しても細胞内 $\alpha$ -ketoglutarate濃度が上昇せず、OK細胞においては $\alpha$ -ketoglutarateによる側底膜PAH輸送の促進効果が観察されにくいものと考えられる。

本研究では、細胞外にeffluxされる $\alpha$ -ketoglutarateを測定するという手法を用い、OK細胞側底膜PAH輸送も $\alpha$ -ketoglutarateとの交換輸送であることを明らかにした。これまでの報告では、PAHの取り込み活性を指標として $\alpha$ -ketoglutarateとの交換輸送の関与が示唆されてきたが、本節におけるOK細胞を用いた検討により、実際に細胞内の $\alpha$ -ketoglutarateが細胞外のPAHと交換されて細胞外へとeffluxされることを明らかにできたものと考えられる。Effluxされた $\alpha$ -ketoglutarateを測定することで、側底膜におけるPAHと $\alpha$ -ketoglutarateとの交換比率についての算出も可能にした。しかし、本研究においてPAHと $\alpha$ -ketoglutarateとの交換比率は解析方法の違いにより1:1と2:1の二通りの場合が得られた。この相違は今のところ明らかではないが、その理由として以下に述べるのが可能性として考えられる。すなわち、側底膜において1分子PAHと1分子 $\alpha$ -ketoglutarateとが交換輸送され、その一方、交換輸送とは独立してPAHはもう一分子取り込まれる。従って、PAHの取り込み活性として見た場合は2:1となり、 $\alpha$ -ketoglutarateのeffluxとして見た場合は1:1として算出されるものと考えられる。一方、アニオン性の官能基としてカルボシル基をPAHは1つ、 $\alpha$ -ketoglutarateは2つ有しているため、その交換比率が1:1の場合には起電性の交換輸送となる。しかし、SchmittとBurckhardt<sup>48)</sup>による側底膜小胞を用いた解析では、Hill plot解析から1:1の交換比率が導かれたものの、膜電位を形成させたときの交換輸送活性変化は観察されなかったことから、必ずしも1:1で説明できないことを報告している。

また今回、PAHとの交換によって細胞内 $\alpha$ -ketoglutarateが細胞外にeffluxされるにもかかわらず、細胞内 $\alpha$ -ketoglutarate含量は一定の濃度に維持されていることから、細胞内

$\alpha$ -ketoglutarate の供給にはクエン酸回路等の細胞内代謝系が寄与しているものと考えられる。PAH 添加後 60 分においても細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度が維持されていた(すなわち、駆動力が維持されていた)ことは、Fig. 2A で示されているように PAH の経細胞輸送量が 60 分まで直線的に増加していることを説明するものと考えられる。この結果は、側底膜 PAH 輸送の駆動力である外向き  $\alpha$ -ketoglutarate 勾配形成・維持には、これまで指摘されてきた  $\text{Na}^+$ /ジカルボン酸共輸送系の関与に加えて、クエン酸回路などによる細胞内代謝系も密接に関係していることを示唆するものである。さらに、側底膜 PAH 取り込み、PAH 添加時の  $\alpha$ -ketoglutarate efflux 及び細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度に対する代謝阻害剤 antimycin A の見かけの  $\text{IC}_{50}$  は、それぞれ 28 nM、51 nM、45 nM とほぼ一致した。この結果は、PAH/ $\alpha$ -ketoglutarate 交換輸送活性が細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度変化によって調節を受けることを示している。Pritchard<sup>43)</sup>は、腎皮質切片における PAH の取り込みが細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度あるいはその濃度勾配によって変動することを示唆しており、OK 細胞の結果もこれと対応するものである。また、これまで側底膜 PAH 輸送における ATP 依存性については明確ではなかったが、今回の OK 細胞を用いた細胞レベルの検討によって、ATP 枯渇下における側底膜 PAH 輸送の低下には細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度の減少が、少なくとも一部、関与しているものと考えられる。

## 第 II 章 OK 細胞における有機アニオン輸送の活性調節

腎臓は、体液の恒常性を維持するための重要な臓器であり、内部環境の変化に応じて細胞外液の電解質組成、pH、浸透圧、細胞外液量等を調節する機能を有している。内部環境の変化を腎に伝える情報伝達物質として様々なホルモンが知られており、代表的なものとして副甲状腺ホルモン、心房性ナトリウム利尿ペプチド及びバソプレッシン等がある。それらのホルモンは、ネフロン(主に尿細管)に存在する受容体に結合することにより、細胞内の情報伝達系を作動させ、プロテインキナーゼ系等の活性化を引き起こす。その結果、機能蛋白のリン酸化、それに伴う活性変化等が起こり、様々な細胞応答の総和として、水や電解質の再吸収あるいは分泌の調節という応答が起きるものと考えられている<sup>54-57)</sup>。

培養細胞を用いた実験系は、設定条件を厳密にコントロールできることから、ホルモンやオータコイド等による水や栄養物質輸送の活性調節研究においても繁用されている<sup>26)</sup>。一方、薬物輸送系についての活性調節に関する研究はこれまでほとんどなされていなかった。中でも、腎有機アニオン輸送系については有用なモデル細胞系が報告されていなかったこと等もあり、その情報については本研究を開始するにあたり皆無に等しかった。著者は、前章において OK 細胞が有機アニオン輸送活性を有するとともに、その輸送は腎尿細管上皮細胞に発現している有機アニオン輸送特性をよく保持していることを明らかにした。また、OK 細胞は副甲状腺ホルモン<sup>58-63)</sup>やアデノシン<sup>64-66)</sup>等による物質輸送の活性調節の研究にも繁用されている。従って、OK 細胞は腎における有機アニオン輸送の活性調節機構を解析する上で有用であると考えられる。

本章では、腎有機アニオン輸送の活性調節について解析するため、OK 細胞における PAH 輸送に対するプロテインキナーゼ C (PKC) 及びプロテインキナーゼ A (PKA) 活性化の影響について精査した。さらに、PKC 及び PKA を活性化する副甲状腺ホルモンによる影響についても検討を加えた。

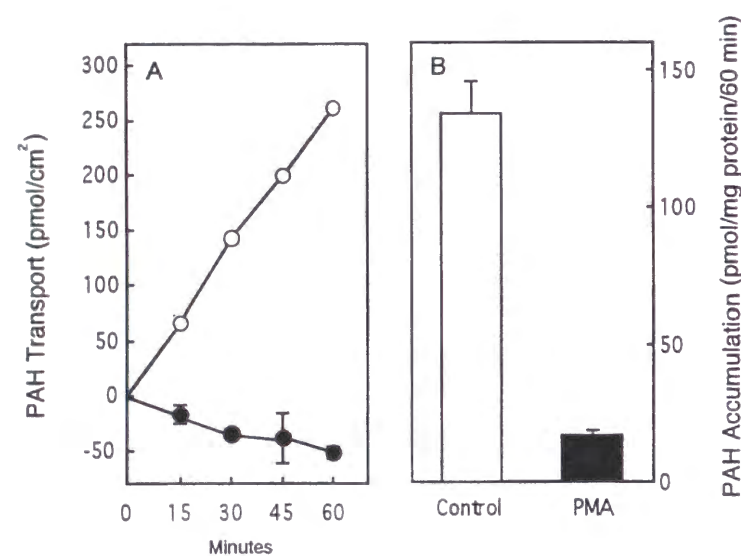
### 第 1 節 *p*-Aminohippurate 輸送に対するプロテインキナーゼ活性化の影響

ホルモンやオータコイド等の情報伝達物質がその受容体に結合すると、GTP 結合蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼ C 等の酵素活性変化が生じる。それらの酵素

活性変化は、PKA 及び PKC を活性化あるいは抑制し、これらのプロテインキナーゼによるリン酸化反応が細胞内情報伝達系において中心的な役割を果たしているものと考えられている<sup>67-71</sup>)。そこで本節では、OK 細胞における PAH 輸送に対する PKC 及び PKA 活性化の影響について解析を行った。

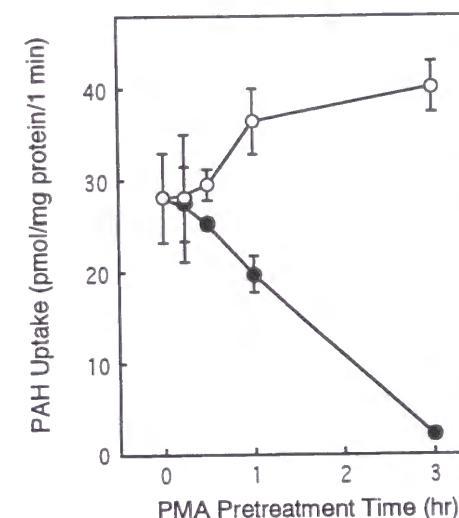
### 1 - a Protein kinase C 活性化剤による影響

OK 細胞における PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量に対する PKC 活性化の影響について検討した (Fig. 31)。PKC 活性化剤には、ホルボールエステル phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いた。側底膜側から頂側膜側への PAH の経細胞輸送は、 $10^{-7}$  M PMA の 3 時間処理によって著しく減少し、細胞内取り込み量も低下した。PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量は PMA 処理によってともに低下したことから、PMA による PAH 経細胞輸送低下の少なくとも一部は、側底膜の PAH 輸送が阻害されたためであるものと推察された。従って、OK 細胞側底膜における PAH 輸送に対する PMA の影響についてさらに解析を進めた。

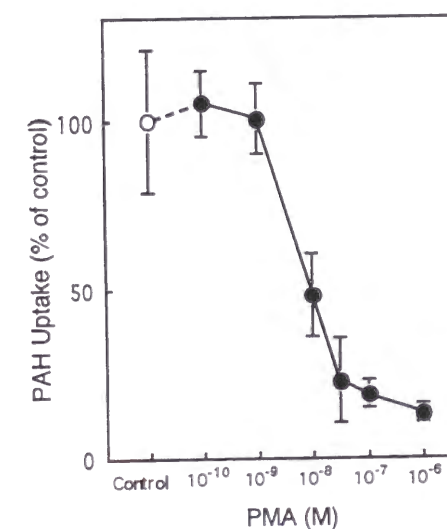


**Fig. 31. Effect of PMA on basal-to-apical transport (A) and accumulation (B) of PAH by OK cell monolayers.** A: Confluent monolayers were incubated for 3 hr without (○) or with (●) PMA ( $10^{-7}$  M) added directly to the culture media. After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH (15  $\mu$ M) and D-[ $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basal side of the monolayers. After 15, 30, 45 and 60 min, the medium on the other side was collected (100  $\mu$ l), and the radioactivity levels were counted to determine the transcellular transport of [ $^{14}$ C]PAH. D-[ $^3$ H]Mannitol was used to correct for paracellular flux. B: After a 60-min transport measurement, the accumulation of [ $^{14}$ C]PAH in OK cells was determined.

Fig. 32 は、側底膜 PAH 輸送に対する PMA ( $10^{-7}$  M) の影響について処理時間を変化させて検討した結果を示す。15 分間処理までは側底膜 PAH 輸送に影響せず、30 分間処理で減少傾向が認められ、3 時間処理で側底膜 PAH 輸送はほぼ完全に阻害された。また、Fig. 33 に示すように側底膜 PAH 輸送は PMA 処理によって濃度依存的に阻害され、見かけの  $IC_{50}$  は 8.5 nM と算出された。



**Fig. 32. Effect of time on the PMA-induced inhibition of PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were incubated for various periods in the absence (○) or presence (●) of PMA ( $10^{-7}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH (15  $\mu$ M) and D-[ $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basal side of monolayers, and [ $^{14}$ C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured.



**Fig. 33. Dose-dependent effect of PMA on PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were incubated for 3 hr with various concentrations of PMA ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M), and [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.

次に、側底膜 PAH 輸送の kinetic parameter に及ぼす PMA の影響について検討した。Fig. 34 に示すように、PMA 処理は検討したすべての PAH 濃度の初期取り込みを阻害した。また、Table 3 は、Fig. 34 の inset に示した Eadie-Hofstee plot 解析から得られた kinetic parameter を示す。この結果から、PMA 処理は、OK 細胞における側底膜 PAH 輸送の最大輸送速度と基質親和性の両方を低下させることが明らかとなった。

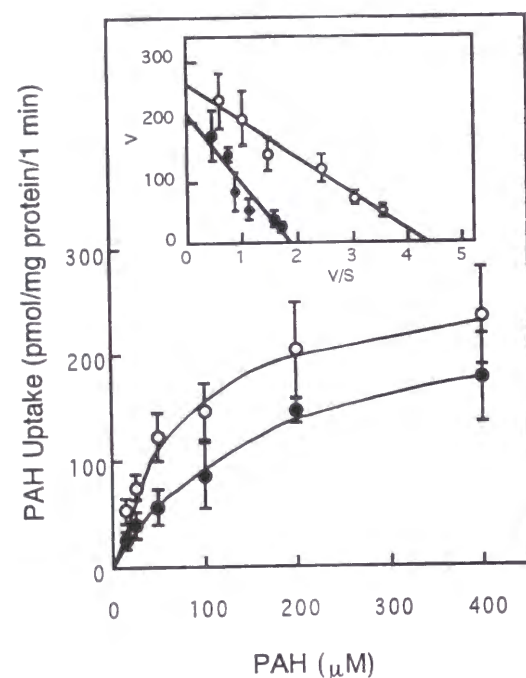


Fig. 34. Influence of PMA on the kinetic parameters of PAH uptake from the basal side of OK cells. Confluent monolayers were incubated for 3 hr in the absence (○) or presence (●) of PMA ( $10^{-8}$  M), and [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured. Inset, Eadie-Hofstee plots of the data.

Table 3. Kinetic parameters of PAH uptake from the basal side of OK cells pretreated without or with  $10^{-8}$  M PMA.

	Km ( $\mu$ M)	Vmax (pmol/mg protein/1 min)
Control	$46.0 \pm 1.2$	$221.3 \pm 44.2$
$10^{-8}$ M PMA	$71.3 \pm 7.3$	$153.1 \pm 54.0$

### 1 - b Protein kinase C 活性化剤による阻害機構

PAH 輸送の活性調節に対する PKC の関与をさらに明確にするため、種々の PKC 活性化剤を用いて側底膜 PAH 輸送に及ぼす影響について検討した。即ち、Fig. 35 に示すように、PKC を活性化するホルボールエステルである PMA 及び phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)、ホルボールエステル analog である mezerein、ジアシルグリセロール誘導体である 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) 及び 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DiC<sub>8</sub>) のいずれの処理においても側底膜 PAH 輸送は、強く阻害された。しかし、不活性型のホルボールエステルである 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD) 処理では、全く影響は認められなかった。

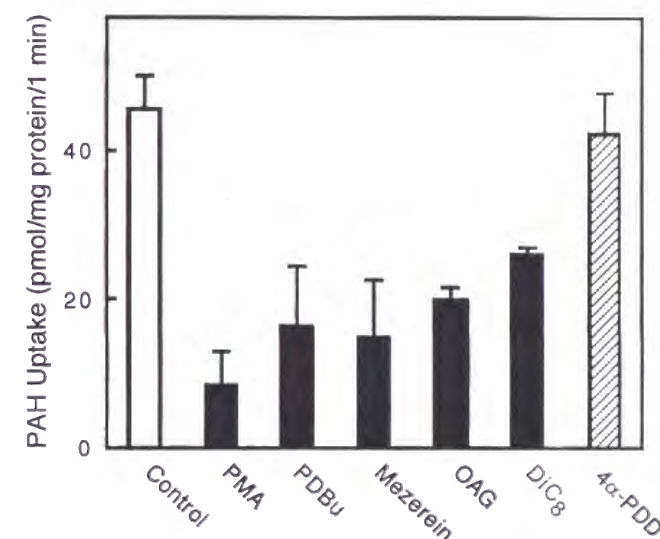
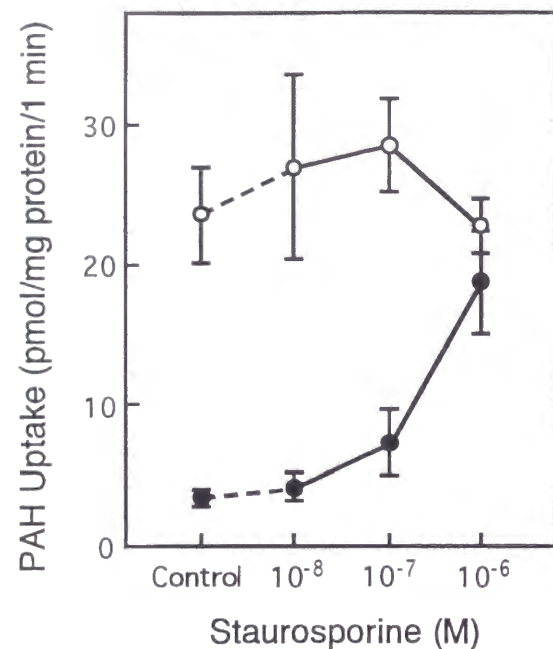
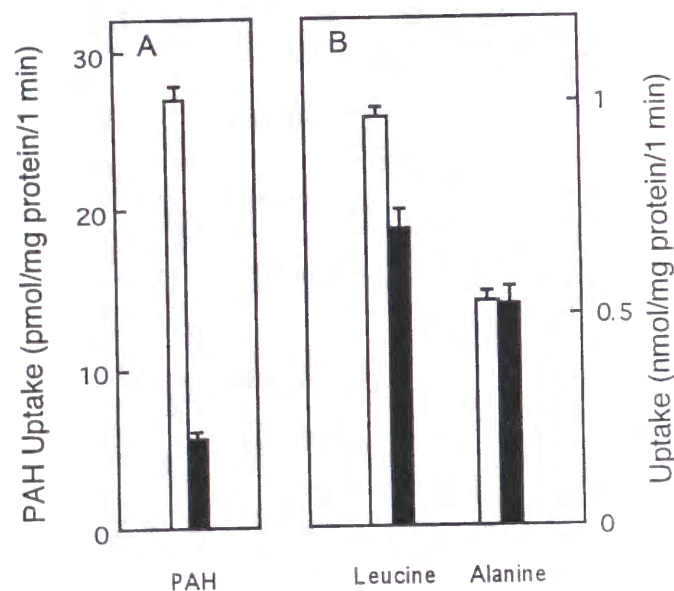


Fig. 35. Effect of various protein kinase C activators on PAH uptake from the basal side of OK cells. Confluent monolayers were incubated for 3 hr with  $10^{-7}$  M of phorbol esters and 250  $\mu$ M of diacylglycerols. After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.

さらに、PMA による PAH 輸送阻害効果に対する PKC の関与について明確にするため、PKC 阻害剤である staurosporine を用いて検討した。その結果を Fig. 36 に示す。 $10^{-7}$  M PMA による PAH 輸送の阻害効果は、staurosporine 処理濃度依存的に抑制された。また、PMA 処理による別の輸送系へについても考察した。 $10^{-7}$  M PMA で OK 細胞を 3 時間処理した後、側底膜 PAH 輸送、頂側膜 leucine 輸送及び頂側膜 alanine 輸送について検討した。その結果、PMA 処理により PAH 輸送が control の 22% まで低下したのに比べ、leucine 輸送では control の 73% にとどまるとともに、alanine 輸送においては阻害効果は全く観察されなかった (Fig. 37)。

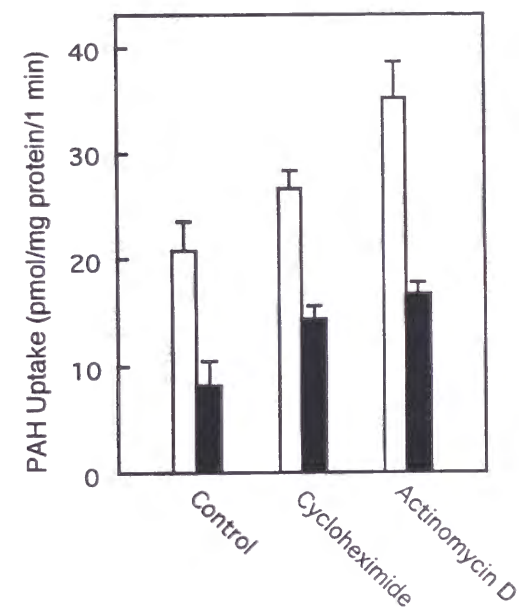


**Fig. 36. Effect of staurosporine on PMA-induced inhibition of PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were exposed to various concentrations of staurosporine ( $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M) for 15 min, followed by an additional 3 hr incubation in the absence (○) or presence (●) of PMA ( $10^{-7}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.

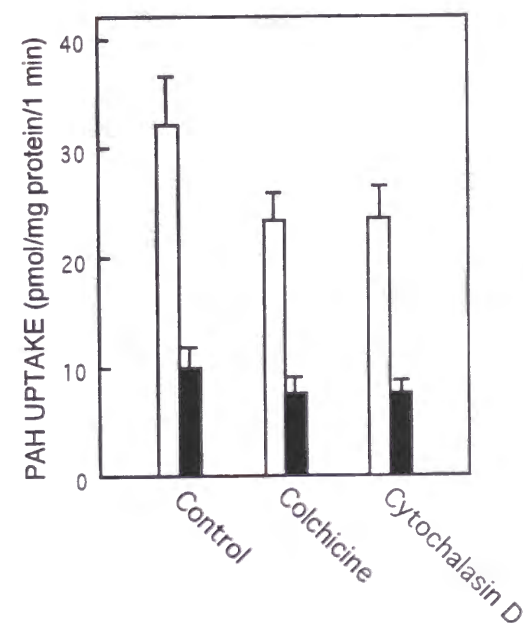


**Fig. 37. Effect of PMA on the transport of leucine and alanine in the OK cells.** Confluent monolayers were incubated for 3 hr in the absence (open columns) or presence (closed columns) of PMA ( $10^{-8}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured as described. [ $^3$ H]Leucine (15  $\mu$ M) or [ $^3$ H]alanine (15  $\mu$ M) and [ $^{14}$ C]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the apical side of the monolayers, and the uptake of amino acid for 1 min at 37 °C was measured.

次に、PMAによるPAH阻害効果についてさらに検討するため、その阻害に対する蛋白合成阻害剤及び細胞骨格系阻害剤の影響について解析した。その結果、蛋白質の生合成における翻訳過程を阻害する cycloheximide 及び転写過程を阻害する actinomycin D のいずれの処理においても、PMAによるPAH輸送阻害効果に影響を及ぼさなかった (Fig. 38)。また、細胞骨格系を構成する微小管及びマイクロフィラメントをそれぞれ阻害する colchicine あるいは cytochalasin D による検討を行ったが、いずれの処理においてもPAH輸送に対するPMAの阻害効果はほとんど変化しなかった (Fig. 39)。



**Fig. 38. Effect of cycloheximide and actinomycin D on the PMA-induced inhibition of PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were exposed for 14 hr to culture medium (control), plus cycloheximide (40  $\mu$ M) or actinomycin D (0.2  $\mu$ M), followed by an additional 3 hr incubation in the absence (open columns) or presence (closed columns) of PMA ( $10^{-8}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.



**Fig. 39. Effect of colchicine and cytochalasin D on PMA-induced inhibition of PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were exposed for 1 hr to culture medium (control), plus colchicine (20  $\mu$ M) or cytochalasin D (20  $\mu$ M), followed by an additional 3 hr incubation in the absence (open column) or presence (closed column) of PMA ( $10^{-8}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.

### 1 - c Protein kinase A 活性化剤による影響

次に、PKA 活性化による PAH 輸送への影響について検討した。まず、PKA 活性化剤である dibutyryl cAMP (DBcAMP) 及び forskolin で OK 細胞を処理した後、PAH の側底膜側から頂側膜側への経細胞輸送量及び細胞内蓄積量を測定した。その結果、PKA 活性化剤処理による影響は全く観察されなかった (Fig. 40)。

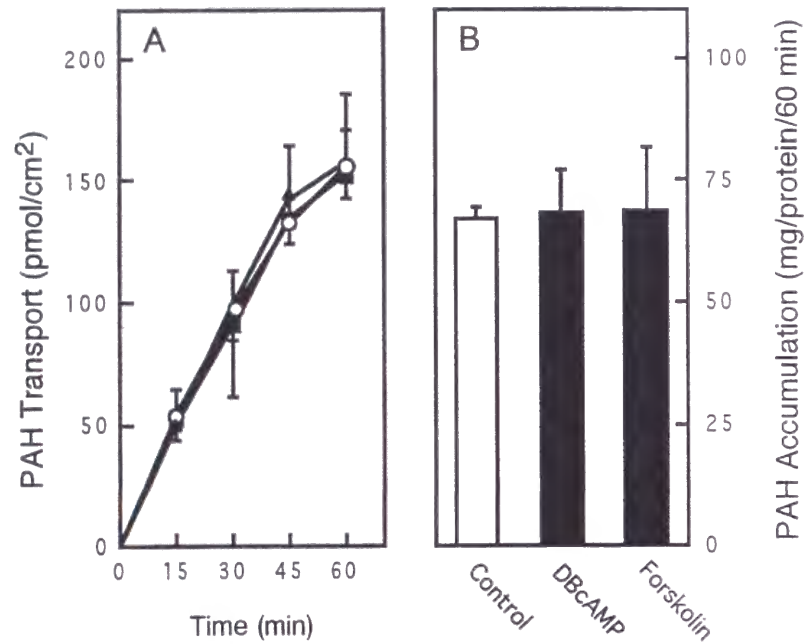


Fig. 40. Effect of protein kinase A activators on basal-to-apical transport (A) and accumulation (B) of PAH by OK cells. Confluent monolayers were incubated for 3 h without (○) or with  $10^{-5}$  M DB cAMP (▲) or  $10^{-5}$  M forskolin (■). After washing the cells, transcellular transport at 15, 30, 45 and 60 min (A) and accumulation at 60 min (B) of [ $^{14}$ C]PAH were measured.

さらに、側底膜 PAH 輸送についても、種々の PKA 活性化剤 (cAMP アナログ: DBcAMP、8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP); アデニル酸シクラーゼ活性化剤: forskolin; ホスホジエステラーゼ阻害剤: 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)) 処理のいずれにおいても影響は認められなかった (Fig. 41)。また、DBcAMP の処理時間及び処理濃度を変化させて検討を行ったが、側底膜 PAH 輸送に対する有意な影響は認められなかった (Fig. 42)。

以上の結果より、PKA 活性化は OK 細胞における PAH 輸送に影響しないものと考えられた。

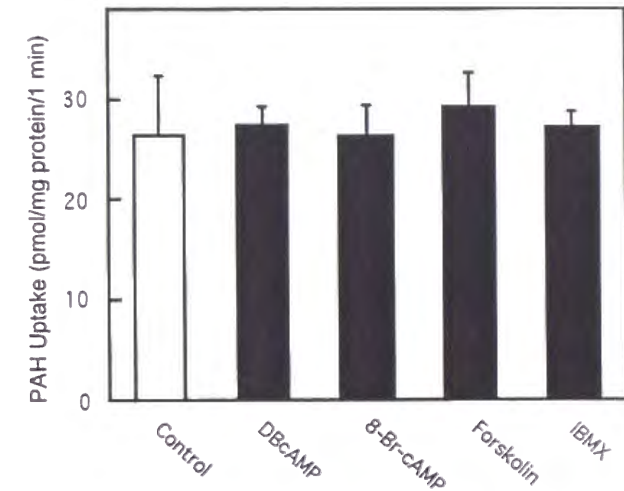


Fig. 41. Effect of protein kinase A activators on PAH uptake from the basal side of OK cells. Confluent monolayers were incubated for 3 hr with cAMP analogs, forskolin ( $10^{-5}$  M) and IBMX ( $10^{-3}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured as described.

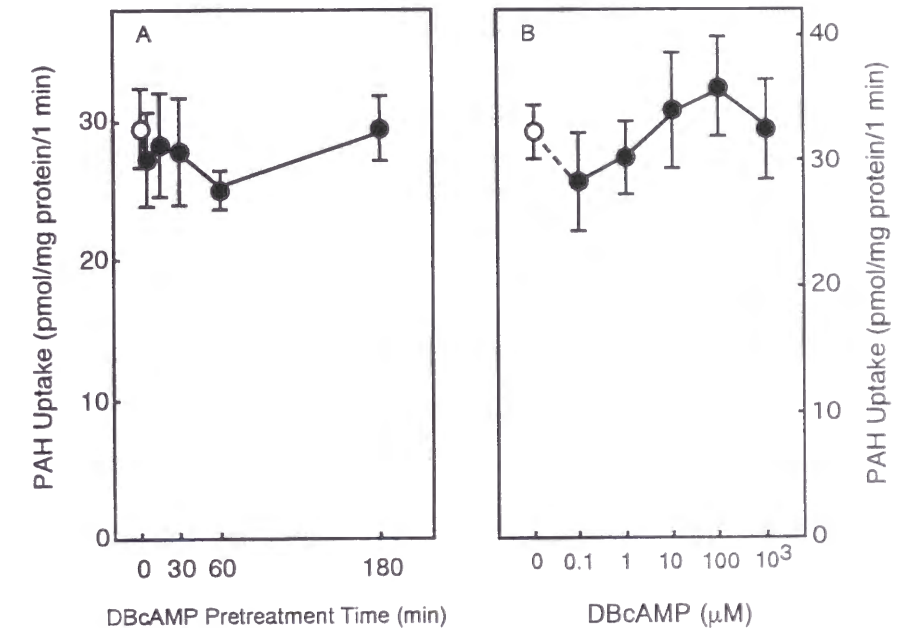


Fig. 42. Effect of DBcAMP on PAH uptake from the basal side of OK cells. A: Confluent monolayers were incubated for various periods in the presence of DBcAMP ( $10^{-5}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH (15  $\mu$ M) and D- $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basal side of monolayers, and [ $^{14}$ C]PAH uptake for 1 min at 37 °C was measured. B: Confluent monolayers were incubated for 3 hr with various concentrations of DBcAMP ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M), and [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.



#### 1-d 考察

本研究において、PKC 活性化剤としてホルボールエステルである PMA を主に用いて実験を進めたが、PMA は様々な細胞反応を引き起こすこと<sup>72)</sup>から PKC 活性化以外の要因が PAH 輸送阻害に関与している可能性も考えられる。しかし、本研究では PMA とは同様に活性型のホルボールエステルやジアシルグリセロール誘導体によっても OK 細胞における PAH 輸送は阻害されることを認めた。また、PMA による影響はその PKC 阻害剤である staurosporine によってほぼ完全に消失した。さらに、OK 細胞における alanine の取り込み活性は、近位尿細管の初代培養細胞で報告されている<sup>73)</sup>場合と同様に PMA 処理による影響は受けず、輸送系の違いによって PMA による影響が顕著に異なることが認められた。従って、本研究において示された結果は、PKC 活性化が少なくとも一部、関与しているものと考えられる。

PKC によるトランスポータの活性調節機構の一つとして、転写や翻訳過程に影響することによる蛋白合成変化があり、PMA 処理によるヒト繊維芽細胞 glucose 輸送の活性化が蛋白合成阻害剤により妨げられる<sup>74)</sup>こと等が報告されている。そこで、PKC 活性化による PAH 輸送阻害についても蛋白合成が関与するのか否か検討するため、転写過程の阻害剤である actinomycin D 及び翻訳過程の阻害剤である cycloheximide の影響について調べた。しかし、これらの影響は観察されず、PKC 活性化による PAH 輸送阻害は、蛋白合成の変化によるものではないものと考えられる。また、PKC 活性化が重要な役割を果たす副甲状腺ホルモンによる OK 細胞頂側膜 Na<sup>+</sup>/phosphate 共輸送阻害は、細胞骨格系の阻害剤である colchicine によって妨げられる<sup>75)</sup>ことが報告されており、PKC による Na<sup>+</sup>/phosphate 共輸送の活性調節に細胞骨格系が関与していることが示唆されている。また、腎有機アニオン輸送は細胞骨格系阻害剤処理によりその活性を低下させることが報告されている<sup>76,77)</sup>。そこで、PKC による PAH 輸送阻害に対する細胞骨格系の関与について調べるため、微小管形成阻害剤である colchicine 及びマイクロフィラメント系を阻害する cytochalasin D による影響について検討した。しかし、それらの阻害剤は PKC による PAH 輸送阻害効果に影響せず、PKC 活性化による PAH 輸送阻害は細胞骨格系の機能変化によるものではないものと考えられた。一方、PKC は輸送蛋白を直接リン酸化することが知られており、ヒト赤血球 glucose トランスポータ<sup>78)</sup>、ラット培養血管内皮細胞 Ca<sup>2+</sup> ポンプ<sup>79)</sup>、OK 細胞 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase の  $\alpha$ -subunit<sup>80)</sup>等が PKC 活性化により直接リン酸化を受けることが報告されている。1997 年に Sekine ら<sup>81)</sup>は、腎近位尿細管上皮細胞側底膜の有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送に関与すると考えられる輸送蛋白 OAT1 のクローニングに成功し、その同定された OAT1 のアミノ酸配列中に推定 PKC リン酸化部位が少なくとも 4 箇所は存在することを報告している。従って、OK 細胞に発現している側底膜 PAH

輸送体は PKC 活性化によって直接リン酸化を受けることによりその輸送活性が変化している可能性も考えられる。

Hohage ら<sup>82)</sup>は、単離ウサギ近位尿細管を用いた検討から側底膜 PAH 輸送は PKC 活性化によって促進されることを報告しており、OK 細胞を用いた結果はその報告と相反するものとなった。一方、最近著者の結果を支持する報告が二報なされている。その一つは、Halpin と Renfro<sup>83)</sup>による報告であり、その報告では winter flounder における近位尿細管の初代培養細胞を用いた実験から、有機アニオン 2,4-dichlorophenoxyacetic acid の分泌方向の輸送が PKC 活性化によって阻害されること、PKA 活性化による影響は受けないことが示されている。もう一つは、Miller<sup>84)</sup>による報告であり、killifish (硬骨魚類の一種) から単離した近位尿細管における有機アニオン fluorescein の輸送が PKC 活性と負の相関があることが示されている。PKC による腎有機アニオン輸送への影響が必ずしも一致しない理由については、種差や実験系の違い等が考えられるが、その詳細は現在のところ不明である。

以上、OK 細胞を用いた検討により PAH 輸送は PKC 活性化によって阻害を受けることが示唆され、腎近位尿細管上皮細胞に受容体を有するホルモン及びオータコイド刺激に引き続いて活性化されるプロテインキナーゼ系によって、薬物の体内動態が変動する可能性が示唆された。

#### 第 2 節 副甲状腺ホルモンによる *p*-aminohippurate 輸送の活性調節

副甲状腺ホルモンは血液カルシウム濃度の低下によって副甲状腺から分泌され、骨及び腎を主な標的器官とし、血液カルシウム濃度上昇に効果を発揮する。腎における作用としてリン及び重炭酸の排泄促進、カルシウム及びマグネシウムの排泄減少、ビタミン D 活性化反応促進等多岐にわたる<sup>56,85,86)</sup>。副甲状腺ホルモンはその標的細胞において PKA 及び PKC の両者を活性化することが知られており、提唱されている細胞内情報伝達の流れ<sup>87,88)</sup>を以下に述べる (Fig. 43)。血液を介して標的器官に運ばれてきた副甲状腺ホルモンは細胞膜受容体に結合し、GTP 結合蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ及びホスホリパーゼ C を活性化する。アデニル酸シクラーゼ活性化によって、細胞内 cAMP 濃度が上昇し PKA が活性化される。ホスホリパーゼ C 活性化においては、ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸を選択的に分解する。分解産物の一つであるジアシルグリセロールは、PKC を活性化し、もう一つの分

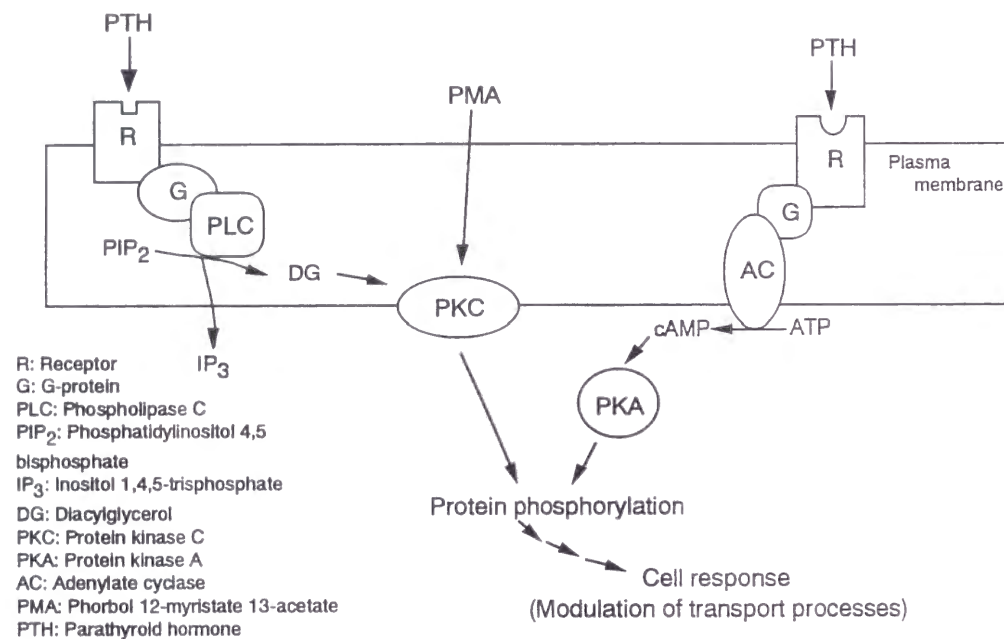


Fig. 43. Schematic concepts of PTH-stimulated signal transduction in target cells.

解産物であるイノシトール1,4,5-三リン酸は小胞体に作用し、Ca<sup>2+</sup>を細胞質へ遊離させる。PKA及びPKCの活性化は種々の機能蛋白質のリン酸化を引き起こし、その機能活性を変化させることにより様々な細胞応答を示す。OK細胞は副甲状腺ホルモン受容体を有しているとともに、そのホルモン刺激によるPKA及びPKC活性化を引き起こす情報伝達系が成立していることから、副甲状腺ホルモンによる刷子縁膜Na<sup>+</sup>/phosphate共輸送及びNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>exchangeの活性調節についての報告が数多くなされている<sup>89-93)</sup>。本節では、OK細胞を用いてPAH輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの影響について解析した。

## 2-a 副甲状腺ホルモンによる影響

まず、PAH輸送に対する副甲状腺ホルモンの影響について検討する前に、実験条件の妥当性を確認するため、OK細胞におけるNa<sup>+</sup>/phosphate共輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの影響について検討した(Fig. 44)。OK細胞におけるphosphateの取り込みは、Na<sup>+</sup>非存在下では存在

下(control)に比べ著しく低く、phosphateの取り込みの大部分はNa<sup>+</sup>/phosphate共輸送系を介することが確認された。このNa<sup>+</sup>/phosphate共輸送は10<sup>-7</sup>M副甲状腺ホルモンにより処理時間依存的に阻害された。また、PKA活性化剤であるDBcAMP及びPKC活性化剤であるPMAによって抑制された。従って、実験に用いたOK細胞において、副甲状腺ホルモン受容体を介したNa<sup>+</sup>/phosphate共輸送系の活性調節、PKAまたはPKC活性化によるNa<sup>+</sup>/phosphate共輸送の阻害効果を確認した。

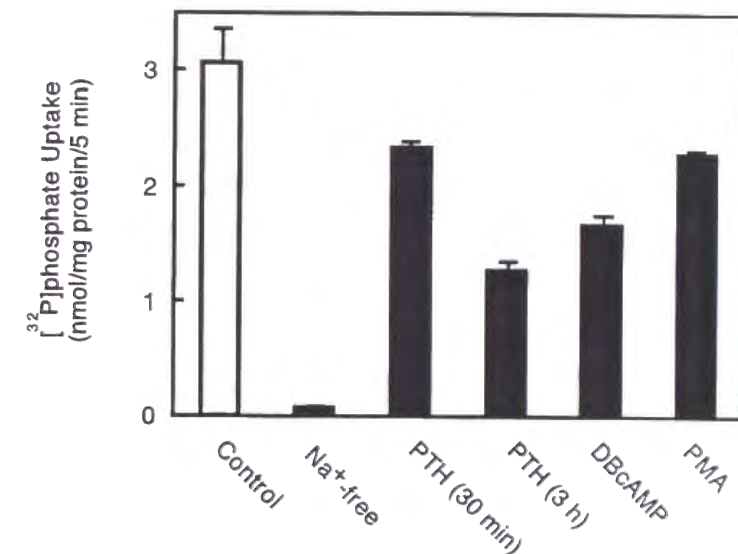
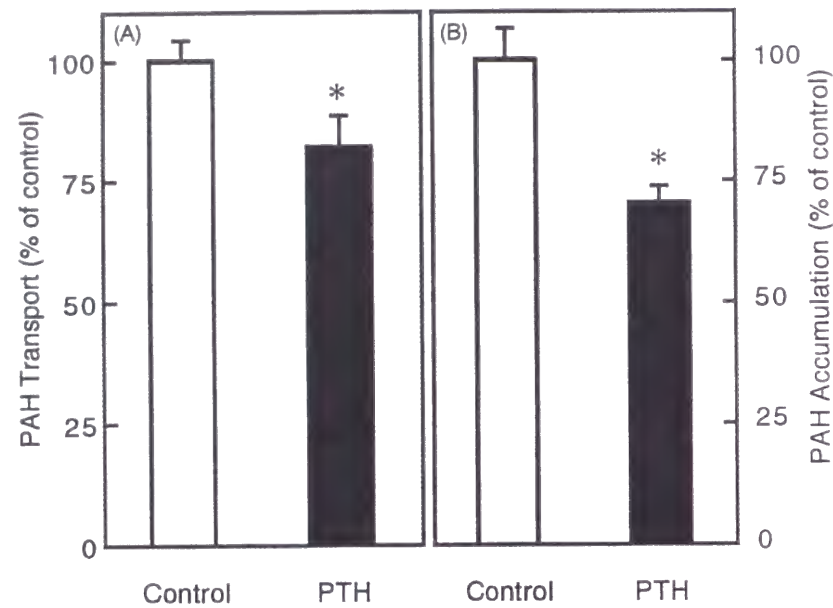
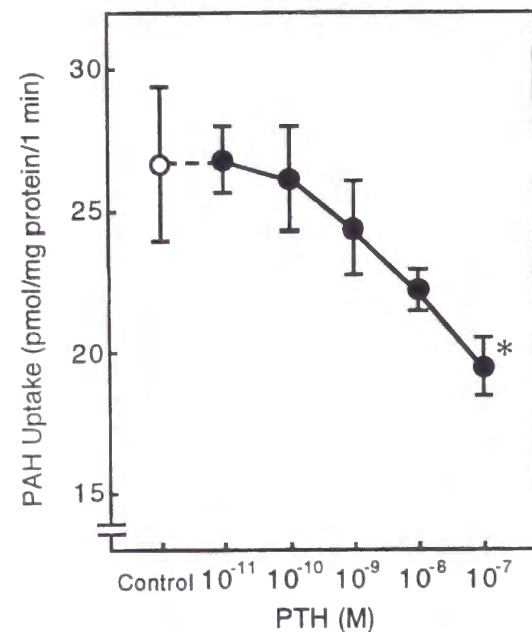


Fig. 44. Effect of PTH, DBcAMP and PMA on phosphate uptake from the apical side of OK cells. Confluent monolayers were incubated with PTH (10<sup>-7</sup> M) for 30 min or 3 hr and DB cAMP (10<sup>-5</sup> M) and PMA (10<sup>-7</sup> M) for 3 hr. After washing the cells, [<sup>32</sup>P]phosphate (100 μM) was added to the apical side of the monolayers, and [<sup>32</sup>P]phosphate uptake for 5 min at 37 °C was measured.

次に、PAHの側底膜側から頂側膜側への経細胞輸送及び細胞内蓄積におよぼす副甲状腺ホルモンの影響について検討した(Fig. 45)。その結果、PAHの経細胞輸送量は副甲状腺ホルモンにより減少し、同時に測定した細胞内蓄積量も有意に低下した。従って、副甲状腺ホルモンは、OK細胞におけるPAH経細胞輸送を阻害することが示唆された。また、副甲状腺ホルモンは経細胞輸送量と細胞内蓄積量の両方を阻害したことから、少なくとも一部は側底膜PAH輸送の減少が関与すると考えられる。そこで、次に側底膜PAH輸送に対する副甲状腺ホルモンの影響について検討した。Fig. 46は、側底膜PAH輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの濃度影響を調べた結果である。側底膜PAH輸送は、副甲状腺ホルモン処理によって濃度依存的に抑制されることが観察された。

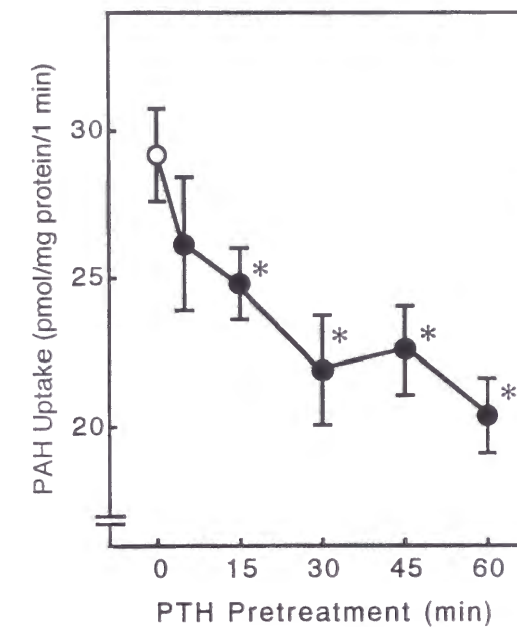


**Fig. 45. Effect of PTH on basal-to-apical transport (A) and accumulation (B) of PAH by OK cells.** [ $^{14}\text{C}$ ]PAH (15  $\mu\text{M}$ ) and D- $^3\text{H}$ mannitol (15  $\mu\text{M}$ ) were added to the basal side of monolayers, and distilled water (open columns, final concentration 0.25 % vol/vol) or PTH (closed columns, final concentration  $10^{-7}$  M) was added at 25 min after start of the transport measurement. A: at 60 min, medium on the apical side was collected (100  $\mu\text{l}$ ), and radioactivity levels were counted to determine transcellular transport of [ $^{14}\text{C}$ ]PAH. B: after a 60-min transport measurement, accumulation of [ $^{14}\text{C}$ ]PAH in OK cells was determined. \* $P < 0.05$ , significant difference from each control.



**Fig. 46. Dose-dependent effect of PTH on PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were incubated for 15 min with various concentrations of PTH ( $10^{-11}$  to  $10^{-7}$  M). After washing the cells, [ $^{14}\text{C}$ ]PAH (15  $\mu\text{M}$ ) and D- $^3\text{H}$ mannitol (15  $\mu\text{M}$ ) were added to the basal side of monolayers, and [ $^{14}\text{C}$ ]PAH uptake for 1 min at  $37^\circ\text{C}$  was measured. \* $P < 0.05$ , significant difference from control.

さらに、 $10^{-7}$  M 副甲状腺ホルモンでOK細胞を5分から1時間処理した後、側底膜PAH輸送活性を調べた結果、処理時間依存的に阻害されることが認められた (Fig. 47)。



**Fig. 47. Effect of time on PTH-induced inhibition of PAH uptake from the basal side of OK cells.** Confluent monolayers were incubated for various periods with PTH ( $10^{-7}$  M), and [ $^{14}\text{C}$ ]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured. \* $P < 0.05$ , significant difference from control at time 0.

## 2 - b 副甲状腺ホルモンによる阻害におけるプロテインキナーゼの関与

前節においてOK細胞におけるPAH輸送はPKC活性化によって阻害され、PKA活性化の影響を受けないことを示した。しかし、副甲状腺ホルモンはPKC及びPKAの両者を活性化することから、それぞれのプロテインキナーゼを個別に活性化させた場合について解析することに加えて、両者のプロテインキナーゼを同時に活性化させた場合の検討も必要である。そこで、PKC活性化剤及びPKA活性化剤を同時に処理することによるPAH輸送への影響について検討した (Fig. 48)。その結果、PMA及びDBcAMPを同時処理したときのPAH輸送は、PMA単独処理におけるそれと同程度に阻害された。従って、PKAはPKC活性化時においてもPAH輸送に影響しないものと考えられた。以上のことから、副甲状腺ホルモンによるPAH輸送活性調節には、PKA活性化は関与していないものと考えられる。そこで、副甲状腺ホルモンによるPAH輸送阻害に対するPKCの関与について明確にするため、staurosporineの影響について調べた。その結果、副甲状腺ホルモンによるPAHの細胞内蓄積量の低下は、

staurosporine 前処理により完全に消失した (Fig. 49)。従って、副甲状腺ホルモンによる PAH 輸送の活性調節には PKC 活性化が重要な役割を果たしていることが推察された。

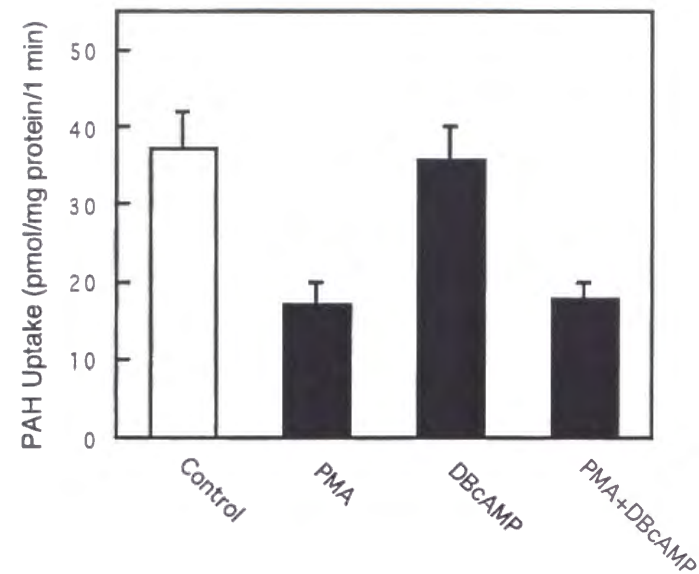


Fig. 48. Effect of pretreatment with PMA alone or in combination with DbcAMP on PAH uptake from the basal side of OK cells. Confluent monolayers were incubated for 3 hr in the absence or presence of PMA ( $10^{-8}$  M) and/or DbcAMP ( $10^{-5}$  M). After washing the cells, [ $^{14}$ C]PAH uptake from the basal side of monolayers was measured.

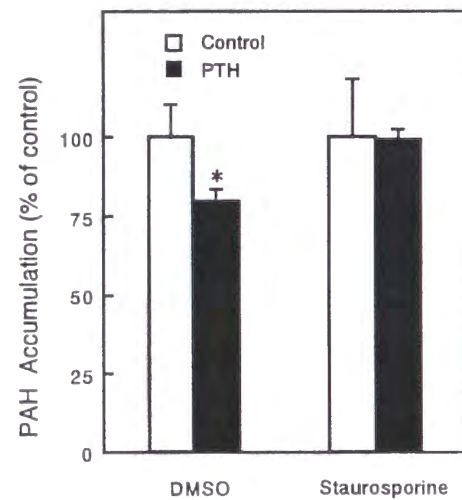


Fig. 49. Effect of staurosporine on PTH-induced inhibition of PAH accumulation of OK cells. [ $^{14}$ C]PAH (15  $\mu$ M) and D- $^3$ H]mannitol (15  $\mu$ M) were added to the basal side of monolayers with staurosporine ( $10^{-6}$  M) or its vehicle, and distilled water (open columns, final concentration 1 % vol/vol) or PTH (closed columns, final concentration  $10^{-6}$  M) was added at 25 min after starting of the transport measurement. At 60 min, accumulation of [ $^{14}$ C]PAH in OK cells was determined. \* $P < 0.05$ , significant difference from each control.

## 2 - c 考察

副甲状腺ホルモンは、OK 細胞における PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量とともに阻害した。この結果から、副甲状腺ホルモンによる PAH 輸送の阻害効果は、少なくとも一部、側底膜 PAH 輸送阻害が関与することが推察されたことから、さらに側底膜 PAH 輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの影響について検討した。側底膜 PAH 輸送は、副甲状腺ホルモン処理により濃度依存的かつ時間依存的に阻害することが観察された。Quamme ら<sup>90)</sup>は、OK 細胞における  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送について副甲状腺ホルモンの濃度依存性について検討しており、その最大阻害効果の 50% を引き起こす副甲状腺ホルモン濃度は  $10^{-12}$  -  $10^{-11}$  M であることを報告している。これに対し、PAH 輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの影響は  $10^{-11}$  M ではほとんど影響が認められず、PAH 輸送における副甲状腺ホルモンの感受性は  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送に比べかなり低いものであった。一方、PKC 活性化剤 PMA による見かけの  $\text{IC}_{50}$  が PAH 輸送 (8.5 nM) と  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送 (約 10 nM)<sup>95)</sup> の両者でほぼ対応していることから、低濃度副甲状腺ホルモンにおける  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送系の阻害効果には PKC 活性化に加えて、別の異なる阻害機構が作用している可能性があるものと考えられる。また、本研究に用いた OK 細胞は Quamme らが用いたその細胞よりも PTH 受容体を介した情報伝達系の活性化に対する感受性が低い可能性も考えられる。

前節において OK 細胞における PAH 輸送は、PKC 活性化により阻害され、PKA 活性化による影響を受けないことを示したことから、副甲状腺ホルモン刺激による PAH 輸送阻害効果は、PKC 活性化が関与していることが推察される。実際に、PKC 阻害剤である staurosporine を用いて検討したところ、PAH 輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの阻害効果はその前処理において完全に消失した。Friedman ら<sup>96)</sup>は、副甲状腺ホルモンによるマウス遠位尿管  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の促進効果には、PKA と PKC の両方が活性化される必要があることを報告している。しかし、Fig. 48 で認められたように OK 細胞における PAH 輸送の場合には、PKC 活性化のみで阻害効果を示すとともに、PKA 活性化は PKC による阻害効果に対して影響を全く及ぼさなかった。従って、副甲状腺ホルモンによる PAH 輸送の活性調節は、PKC 活性化が重要な役割を果たし、PKA 活性化は関与していないものと推察された。

$\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送の場合においても、副甲状腺ホルモン刺激によって引き起こされる作用は、PKA 活性化よりもむしろ PKC 活性化が重要であることが報告されている。Quamme ら<sup>90)</sup>は、副甲状腺ホルモンが OK 細胞においてホスホリパーゼ C を活性化し細胞内 cAMP を上昇させない濃度で  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送を阻害することを示している。また、あるクローン化された OK 細胞 (OKH cell) は副甲状腺ホルモン依存的なホスホリパーゼ C 活性化が失活

しているが、その細胞における  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送は副甲状腺ホルモンによって阻害されない<sup>77)</sup>ことが報告されている。さらに、Hayes ら<sup>78)</sup>は卵母細胞に発現させた腎  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送体 (NaPi-2) に対する PKA 及び PKC の影響について検討しており、前者ではなく後者の活性化において phosphate の輸送は減少することを報告している。また、ラット骨腫瘍細胞 UMR-106 の  $\text{Na}^+$ /phosphate 共輸送系においても、副甲状腺ホルモン刺激による阻害効果には PKC 系が重要であることが報告されている<sup>79)</sup>。

以上、OK 細胞を用いて PAH 輸送に及ぼす副甲状腺ホルモンの影響について検討を行った。その結果、副甲状腺ホルモンにより OK 細胞における PAH 輸送は阻害され、その阻害には PKC の活性化が関与することが示唆された。

## 結 論

以上、著者はフクロネズミ腎由来の OK 細胞を用いた有機アニオン PAH 輸送に関する研究を行い、以下のような結論を得た。

### (I) 培養腎上皮細胞 OK における有機アニオン輸送特性

フクロネズミ腎由来の OK 細胞は、腎有機アニオン輸送系のモデル薬物 PAH を尿細管分泌方向に対応する側底膜側から頂側膜側へのみ経細胞輸送した。また、OK 細胞の側底膜及び頂側膜の両細胞膜において、分泌方向に PAH を輸送する特殊輸送系が存在することが示唆され、両細胞膜における輸送の方向性が PAH 経細胞輸送の方向性を決定するのに重要であることが示唆された。各種  $\beta$ -ラクタム抗生物質は、OK 細胞における PAH の経細胞輸送及び側底膜輸送を阻害した。また、 $\beta$ -ラクタム抗生物質自身も OK 細胞において方向選択的に経細胞輸送されるとともに、有機アニオン輸送阻害剤による阻害を受けたこと等から、 $\beta$ -ラクタム抗生物質は有機アニオン輸送の基質になることが示された。OK 細胞側底膜 PAH 輸送に及ぼす種々の炭素鎖長を有するジカルボン酸の影響について検討した結果、側底膜 PAH 輸送は負電荷間の距離が約 5 Å までのジカルボン酸によっては全く影響を受けず、6-8 Å のジカルボン酸によって著しく阻害された。さらに長いジカルボン酸で阻害効果は一度減少するものの 10 Å、11 Å と長くなるにつれて再び強まるという特徴的なパターンを示すことが観察された。この結果は、腎近位尿細管を用いた実験結果とよく一致するものであり、OK 細胞における PAH 輸送系は腎近位尿細管上皮細胞側底膜に存在する有機アニオン輸送系とほぼ同一、あるいは極めて類似した基質認識性を有することが明らかとなった。また、OK 細胞における側底膜 PAH 輸送は、 $\alpha$ -ketoglutarate との交換輸送であることが示されるとともに、細胞内代謝系で生成された  $\alpha$ -ketoglutarate が側底膜において PAH と交換し実際に細胞外に efflux されることを見出した。

### (II) OK 細胞における有機アニオン輸送の活性調節

腎近位尿細管における有機アニオン輸送系の活性調節機構について検討するため、OK 細胞を用い、PAH 輸送に対するプロテインキナーゼ活性化の影響について解析した。PKC 活性化剤であるホルボールエステル PMA 処理によって、PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量は阻害された。また、側底膜 PAH 輸送は、PMA により処理濃度及び処理時間依存的に阻害

された。PMAと同様にジアシルグリセロール誘導体等の処理においても、OK細胞における側底膜PAH輸送は阻害されたが、不活性型のホルボールエステルである4 $\alpha$ -PDD処理では影響されなかった。さらに、PMAによる側底膜PAH輸送阻害効果はPKC阻害剤であるstaurosporineにより抑制された。従って、OK細胞におけるPAH輸送はPKC活性化によって阻害されることが示された。また、OK細胞におけるPAH輸送に及ぼすPKA活性化の影響についても検討を加えた。しかし、DBcAMPやforskolin等のPKA活性化剤処理は、PAHの経細胞輸送、細胞内蓄積量及び側底膜輸送にほとんど影響しなかった。従って、OK細胞におけるPAH輸送はPKA活性化による影響を受けないものと推察された。PKA及びPKCを活性化させる副甲状腺ホルモンによる有機アニオン輸送の活性調節についても検討を加えた。その結果、副甲状腺ホルモンはOK細胞におけるPAHの経細胞輸送及び細胞内蓄積量を減少させた。さらに、副甲状腺ホルモンは側底膜におけるPAH輸送を処理時間及び処理濃度依存的に阻害した。また、副甲状腺ホルモンによるPAHの細胞内蓄積量の減少は、staurosporine処理によって消失した。従って、副甲状腺ホルモンはOK細胞におけるPAH輸送活性を変化させ、その調節にはPKC活性化が関与することが示唆された。

以上、著者はOK細胞におけるPAH輸送が腎近位尿細管上皮細胞における有機アニオン輸送系に対応する特性を有することを明らかにし、腎有機アニオン輸送系を解析する上でOK細胞が極めて有用な培養細胞系であることを示すことができた。それとともに腎有機アニオン輸送の方向性を決定する要因、基質認識性及び細胞内代謝系の関与等についての情報を得ることができた。また、OK細胞におけるPAH輸送に対するプロテインキナーゼ活性化及び副甲状腺ホルモンによる影響について検討を行うことによって、有機アニオン輸送等の薬物輸送においてもホルモンによる刺激やそれに続くプロテインキナーゼの活性化を介して活性調節を受ける可能性があることを示唆する知見を得た。これらの研究成果は、有機アニオン輸送を介したアニオン性薬物等の尿細管分泌機構を解明する上で有用な基礎的知見となるものと考えられる。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 乾 賢一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御助言と御指導を戴いた広島大学高野幹久教授に心から感謝の意を表します。さらに、種々の貴重な御助言と御指導を戴いた東京医科歯科大学安原真人教授、京都大学橋本征也助教授、同矢野育子助手に深謝します。

また、数々の有益な御助言と御指導を戴いた岡野友信博士、廣實清司修士、高山 明博士、岡村みや子修士、並びに京都大学医学部附属病院薬剤部の諸氏に深く感謝します。

## 実験の部

### 第 I 章 実験の部

#### [1-1] 試薬・器具

Medium 199 は、Flow Laboratories 社のもの、ウシ胎児血清は Whittaker Bioproducts 社のもの、trypsin-EDTA (10X) は Gibco 社のものを用いた。プラスチック製培養皿は Corning Glass Works 社のもの、Transwell® は Costar 社のものを用いた。*p*-[Glycyl-1-<sup>14</sup>C]aminohippurate (1.5-2.2 GBq/mmol), D-[<sup>3</sup>H]mannitol (728.9-1110.0 GBq/mmol) は New England Nuclear 社のもの、 $\alpha$ -[<sup>14</sup>C]ketoglutarate (2-keto[5-<sup>14</sup>C]glutaric acid (2.1 GBq/mmol), [phenyl-4(n)-<sup>3</sup>H]benzylpenicillin (666-814 GBq/mmol), [<sup>14</sup>C]sucrose (23.3 GBq/mmol) は Amersham 社のもの、非標識 *p*-aminohippuric acid, probenecid, tetraethylammonium, aspartate aminotransferase, antimycin A, NADH は Sigma 社のもの、furosemide, 非標識 benzylpenicillin, malonic acid, succinic acid, fumaric acid,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, adipic acid, pimelic acid, suberic acid, azelic acid, sebacic acid はナカライテスクのものを用いた。Glutaric acid は、Aldorich 社のものを用いた。Malate dehydrogenase は、東洋紡のものを用いた。cefazolin は藤沢薬品工業、cefotiam は武田薬品工業より供与されたものを用いた。その他の試薬は市販特級品を用いた。

#### [1-2] OK 細胞の培養

フクロネズミ腎由来の OK 細胞は、J. S. Handler 博士 (Bethesda, MD) から提供されたものを用いた。OK 細胞は、抗生物質非存在下 10% ウシ胎児血清を含む medium 199 を用い、CO<sub>2</sub> インキュベータ (5% CO<sub>2</sub> - 95% air) 内で培養された。OK 細胞の継代は、5-7 日ごとに細胞を 0.02% EDTA - 0.05% trypsin を用いて培養皿から剥離し、直径 100 mm の培養皿に 100 x 10<sup>4</sup> cells / 10 ml の細胞密度で播種することによって行われた。多孔性フィルター上で培養する場合、Transwell® を用い、OK 細胞をポリカーボネート製の膜フィルター (孔径 3  $\mu$ m、表面積 4.71 cm<sup>2</sup>) 上に 40 x 10<sup>4</sup> cells / cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。播種後、2-3 日ごとに培地交換を行い、5-7 日目に実験を行った。

#### [1-3] [<sup>14</sup>C]PAH の輸送実験

輸送実験は、通常、Dulbecco の等張リン酸緩衝溶液 (PBS、137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) に 5 mM の D-glucose を含むもの

を用いて行った。OK 細胞は、Transwell 上で 5-7 日間培養された後、37°C または 4°C の条件下で輸送実験に用いられた。経細胞輸送実験は、[<sup>14</sup>C]PAH を含む基質溶液を側底膜側 (2.6 mL) または頂側膜側 (1.5 mL) に添加し、一定時間インキュベーションした後、反対側に出現した [<sup>14</sup>C]PAH を測定することによって行った。PAH の細胞内取り込み活性は、[<sup>14</sup>C]PAH を含む基質溶液を側底膜及び頂側膜側に添加し一定時間インキュベーションした後、0.1 M NaOH で細胞を溶解し [<sup>14</sup>C]PAH の細胞内移行量を測定することで評価した。PAH の efflux 活性は、あらかじめ [<sup>14</sup>C]PAH を取り込ませた細胞を用い、一定時間後に側底膜及び頂側膜側に efflux した [<sup>14</sup>C]PAH を測定することで評価した。細胞間隙を介した paracellular 輸送、細胞膜への吸着、非特異的な細胞内への取り込みは、D-[<sup>3</sup>H]mannitol を用いて補正した。[<sup>14</sup>C]PAH 及び D-[<sup>3</sup>H]mannitol の放射活性は、液体シンチレーションカウンター法で測定した。

#### [1-4] [<sup>3</sup>H]benzylpenicillin の輸送実験

[<sup>3</sup>H]benzylpenicillin の経細胞輸送実験及び細胞内取り込み実験は、[1-3]に記載した [<sup>14</sup>C]PAH の輸送実験の場合と同様の方法で行った。細胞間隙を介した paracellular 輸送、細胞膜への吸着、非特異的な細胞内への取り込みの補正には、[<sup>14</sup>C]sucrose を用いて行った。

#### [1-5] Cefazolin 及び cefotiam の輸送実験

Cefazolin 及び cefotiam の輸送実験には、Transwell 上で 5-7 日間培養した OK 細胞を用いた。細胞を洗浄後、cefazolin あるいは cefotiam を含む PBS 溶液を側底膜側に添加し、37°C 条件下において 10 分間インキュベーションし、洗浄後、細胞が付着しているフィルターを抽出用溶液 [0.03 M phosphate buffer (pH 7.0) / methanol = 50 / 50] に浸した。室温で 1 時間放置後、その抽出液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により定量した。

#### [1-6] Cefazolin 及び cefotiam の定量法<sup>100)</sup>

Cefazolin 及び cefotiam の定量は、HPLC を用いて測定した。HPLC には、LC-3A (島津製作所)、検出器には紫外分光光度計 SPD-6A (島津製作所) を用いた。固定相は Chemcosorb 5-ODS-H カラム (15 cm x 4.6 mm、ケムコ) を用い、カラム温度は 40°C に設定した。移動相は 0.03 M phosphate buffer (pH 7.0) と methanol の混合液を用い、その組成比は 0.03 M phosphate buffer (pH 7.0) / methanol = 74 / 26 とした。移動相の流速は 1.3 mL/min とした。また、検出波長は、272 nm (cefazolin) 及び 262 nm (cefotiam) とした。

### [1-7] $\alpha$ -[ $^{14}\text{C}$ ]ketoglutarate の輸送実験

$\alpha$ -[ $^{14}\text{C}$ ]ketoglutarate の細胞内取り込み実験は、[1-3]に記載した PAH の輸送実験の場合と同様の方法で行った。Na<sup>+</sup> 非存在下輸送実験には、NaCl を同濃度の choline chloride に置換した。

### [1-8] $\alpha$ -Ketoglutarate の efflux 及び細胞内濃度の測定

細胞を洗浄後、PAH を含む PBS 溶液を側底膜側あるいは頂側膜側に添加し、一定時間 37°C あるいは 4°C でインキュベーションした。その後、側底膜及び頂側膜側それぞれの PBS 溶液に含まれる  $\alpha$ -ketoglutarate を定量した。PAH を含まない PBS 溶液を用いて同様の操作を行い、得られた値を PAH 非依存的な  $\alpha$ -ketoglutarate の efflux とした。細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 含量は、細胞が付着したフィルターを 3% (v/v) 過塩素酸に 30 分間浸した後、その溶液に 3 M NaOH を加えて中和し、定量操作を行った。

### [1-9] $\alpha$ -Ketoglutarate の定量<sup>101)</sup>

$\alpha$ -ketoglutarate は、aspartate, aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase 存在下において、NADH を NAD<sup>+</sup> に変換する。この反応を利用し、NADH の蛍光強度減少を励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm に設定した分光蛍光光度計 (島津製作所、RF-5000) を用いて測定することで  $\alpha$ -ketoglutarate を定量した。細胞内  $\alpha$ -ketoglutarate 濃度は、細胞内容積を 9.5  $\mu\text{L}/\text{mg}$  of protein<sup>28)</sup> を用いて算出した。

### [1-10] 蛋白質定量法

細胞懸濁液の蛋白濃度は、 $\gamma$ -globulin を標準物質として使用し、Bradford 法<sup>102)</sup>により定量した。

## 第II章 実験の部

### [2-1] 試薬

L-[4,5- $^3\text{H}$ (N)]leucine (1.92 TBq/mmol),  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$  (37 GBq/mmol) は New England Nuclear 社のもの、L-[2,3- $^3\text{H}$ ]alanine (1.85 TBq/mmol), D-[1- $^{14}\text{C}$ ]mannitol は Amersham 社のもの、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), mezerein, 4 $\alpha$ -phorbol 12, 13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD), 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG), 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol (DiC<sub>8</sub>), synthetic bovine (1-34)-parathyroid hormone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), cytochalasin D, actinomycin D は Sigma 社のものを用いた。Staurosporine, dibutyryl cAMP, forskolin は和光純薬のもの、cycloheximide, colchicine, 8-bromo-cAMP はナカライテスクのものを用いた。その他の試薬は市販特級品を用いた。

### [2-2] [ $^{14}\text{C}$ ]PAH の輸送実験

PAH の経細胞輸送及び側底膜輸送は、[1-3]に記載した方法に従った。

### [2-3] [ $^3\text{H}$ ]leucine 及び [ $^3\text{H}$ ]alanine の輸送実験

Transwell 上で 5 - 7 日間培養した OK 細胞を用いた。[ $^3\text{H}$ ]leucine 及び [ $^3\text{H}$ ]alanine の細胞内取り込みは、基質を含む PBS 溶液を頂側膜側に添加し 37°C で 1 分間インキュベーションし、洗浄後、0.1 M NaOH で細胞を溶解し [ $^3\text{H}$ ]leucine 及び [ $^3\text{H}$ ]alanine の細胞内移行量を測定することにより評価した。細胞膜への吸着、非特異的な細胞内への取り込みの補正には、[ $^{14}\text{C}$ ]mannitol を用いて行った。[ $^3\text{H}$ ]leucine、[ $^3\text{H}$ ]alanine 及び [ $^{14}\text{C}$ ]mannitol の放射活性は、液体シンチレーションカウンター法で測定した。

### [2-4] [ $^{32}\text{P}$ ]phosphate の輸送実験

Transwell 上で 5 - 7 日間培養した OK 細胞を用いた。輸送実験は、HEPES 緩衝溶液 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 14 mM HEPES/Tris, pH 7.4) を用いて行った。Na<sup>+</sup> 非存在下輸送実験には、NaCl を同濃度の choline chloride に置換した。[ $^{32}\text{P}$ ]phosphate の取り込み実験は、[ $^{32}\text{P}$ ]phosphate を含む HEPES 緩衝溶液を頂側膜側に添加し、37°C で 5 分間インキュベーションし、洗浄後、0.1 M NaOH で細胞を溶解し [ $^{32}\text{P}$ ]phosphate の細胞内移行量を測定することで評価した。[ $^{32}\text{P}$ ]phosphate の放射活性は、液体シンチレーションカウンター法で測定した。



## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

*p*-Aminohippurate transport in apical and basolateral membranes of the OK kidney epithelial cells.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 970-975 (1994).

Specificity of *p*-aminohippurate transport system in the OK kidney epithelial cell line.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**: 1161-1166 (1995).

Regulation of *p*-aminohippurate transport by protein kinase C in OK kidney epithelial cells.

*Am. J. Physiol.* **271**: F469-F475 (1996).

Inhibition of PAH transport by parathyroid hormone in OK cells: involvement of protein kinase C.

*Am. J. Physiol.* **273**: F674-F679 (1997).

Efflux of intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate via *p*-aminohippurate/dicarboxylate exchange in OK kidney epithelial cells.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**: 422-427 (1998).

## 引用文献

1. Møller, J. V. and Sheikh, M. I.: Renal organic anion transport system: Pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* **34**: 315-358, 1983.
2. Pritchard, J. B. and Miller, D.: Comparative insights into the mechanisms of renal organic anion and cation secretion. *Am. J. Physiol.* **261**: R1329-1340, 1991.
3. Pritchard J. B. and Miller, D. S.: Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol. Rev.* **73**: 765-796, 1993.
4. Mudge, G. H. and Taggart, J. V.: Effect of acetate on the renal excretion of *p*-aminohippurate in the dog. *Am. J. Physiol.* **161**: 191-197, 1950.
5. Schachter, D. and Freinkel, N.: Self-depression of  $T_{mPAH}$  in the dog at high plasma PAH levels and its reversibility by acetate. *Am. J. Physiol.* **167**: 531-538, 1951.
6. Jenson, R. L., Tobias, G. J., Greaney, J. F., Relman, A. S. and Schwartz W. B.: Renal tubular function during severe metabolic acidosis. *Am. J. Physiol.* **179**: 188-190, 1954.
7. Cross, R. J. and Taggart, J. V.: Renal tubular transport: Accumulation of *p*-aminohippurate by rabbit kidney slices. *Am. J. Physiol.* **161**: 181-190, 1950.
8. Foulkes, E. C. and Miller, B. F.: Steps in *p*-aminohippurate transport by kidney slices. *Am. J. Physiol.* **196**: 86-92, 1959.
9. Pritchard, J. B.: Rat renal cortical slices demonstrate *p*-aminohippurate/glutarate exchange and sodium/glutarate coupled *p*-aminohippurate transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 969-975, 1990.
10. Tune, B. M., Burg, M. B. and Patlak, C. S.: Characteristics of *p*-aminohippurate transport in proximal renal tubules. *Am. J. Physiol.* **217**: 1057-1063, 1969.
11. Grantham, J. J.: Studies of organic anion and cation transport in isolated segments of proximal tubules. *Kidney Int.* **22**: 519-525, 1982.
12. Chatsudhipong, V. and Dantzler, W. H.: PAH/ $\alpha$ -KG countertransport stimulates PAH uptake and net secretion in isolated rabbit renal tubules. *Am. J. Physiol.* **263**: F384-F391, 1992.
13. Hori, R., Takano, M., Okano, T., Kitazawa, S. and Inui, K.: Mechanisms of *p*-aminohippurate transport by brush-border and basolateral membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta* **692**: 97-100, 1982.
14. Kahn, A. M., Branham, S. and Weinman, E. J.: Mechanism of urate and *p*-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **245**: F151-F158, 1983.

15. Shimada, H. Moewes, B. and Burckhardt, G.: Indirect coupling to Na<sup>+</sup> of *p*-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **253**: F795-F801, 1987.
16. Inui, K., Takano, M., Okano, T. and Hori, R.: Role of chloride on carrier-mediated transport of *p*-aminohippurate in rat renal basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **855**: 425-428, 1986.
17. 乾 賢一、薬学雑誌 **108**: 921-937, 1988.
18. 乾 賢一、“腎臓学 病態生理からのアプローチ”、黒川 清編、南江堂、pp 97-106、1995.
19. 高野幹久、月刊薬事 **38**: 499-508, 1996.
20. Hori, R., Okamura, M., Takayama, A., Hirozane, K. and Takano, M.: Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am. J. Physiol.* **264**: F975-F980, 1993.
21. Rabito, C. A.: Occluding junctions in a renal cell line (LLC-PK<sub>1</sub>) with characteristics of proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* **250**: F734-F743, 1986.
22. Fauth, C., Rossier, B. and Roch-Ramel, F.: Transport of tetraethylammonium by a kidney epithelial cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *Am. J. Physiol.* **254**: F351-F357, 1988.
23. Miller, J. H.: Sodium-sensitive, probenecid-insensitive *p*-aminohippuric acid uptake in cultured renal proximal tubule cells of the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199**: 298-304, 1992.
24. Dawson, M. A. and Renfro, J. L.: Organic anion secretion by winter flounder renal proximal tubule primary monolayer cultures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**: 39-44, 1990.
25. Koyama, H., Goodpasture, C., Miller, M. M., Teplitz, R. L. and Riggs, A. D.: Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* **14**: 239-246, 1978.
26. Handler, J. S.: Studies of kidney cells in culture. *Kidney Int.* **30**: 208-215, 1986.
27. Malmström, K., Stange, G. and Murer, H.: Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochim. Biophys. Acta* **902**: 269-277, 1987.
28. Yuan, G., Ott, R. J., Salgado, C. and Giacomini, K. M.: Transport of organic cations by a renal epithelial cell line (OK). *J. Biol. Chem.* **266**: 8978-8986, 1991.
29. Fouda, A. -K., Fauth, C. and Roch-Ramel, F.: Transport of organic cations by kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**: 286-292, 1990.
30. Saito, H., Yamamoto, M., Inui, K. and Hori, R.: Transcellular transport of organic cation across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Am. J. Physiol.* **262**: C59-C66, 1992.
31. Takano, M., Kato, M., Takayama, A., Yasuhara, M., Inui, K. and Hori, R.: Transport of procainamide in a kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* **1108**: 133-139, 1992.
32. Hori, R., Ishikawa, Y., Takano, M., Okano, T., Kitazawa, S. and Inui, K.: The interaction of cephalosporin antibiotics with renal cortex of rats: accumulation to cortical slices and binding to purified plasma membranes. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2267-2272, 1982.
33. Nierenberg, D. W.: Drug inhibition of penicillin tubular secretion: concordance between in vitro and clinical findings. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 712-716, 1987.
34. Tsuji, A., Terasaki, T., Tamai, I. and Takeda, K.: *In vivo* evidence for carrier-mediated uptake of  $\beta$ -lactam antibiotics through organic anion transport systems in rat kidney and liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 315-320, 1990.
35. Ullrich, K. J. and Klöss, S.: Contraluminal para-aminohippurate transport in the proximal tubule of the rat kidney. III. Specificity: monocarboxylic acids. *Pflügers Arch.* **409**, 547-554, 1987.
36. Ullrich, K. J. and Rumrich, G.: Contraluminal transport systems in the proximal renal tubule involved in secretion of organic anions. *Am. J. Physiol.* **254**, F453-F462, 1988.
37. Fritsch, G., Rumrich, G. and Ullrich, K. J.: Anion transport through the contraluminal cell membrane of renal proximal tubule. The influence of hydrophobicity and molecular charge distribution on the inhibitory activity of organic anions. *Biochim. Biophys. Acta* **978**: 249-256, 1989.
38. Ullrich, K. J., Rumrich, G. and Klöss, S.: Contraluminal organic anion and cation transport in the proximal renal tubule: V. Interaction with sulfamoyl- and phenox diuretics, and with  $\beta$ -lactam antibiotics. *Kidney Int.* **36**, 78-88, 1989.
39. Ullrich, K. J.: Specificity of transporters for ‘organic anions’ and ‘organic cations’ in the kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 45-62, 1994.
40. Nightingale, C. H., Greene, D. S. and Quintiliani, R.: Pharmacokinetics and clinical use of cephalosporin antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **64**: 1899-1927, 1975.
41. Mandell, G. V. and Sande, M. A.: Penicillins, cephalosporins, and other beta-lactam antibiotics. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. by A. G. Gilman, L. S. Goodman, W. R. Theodore and F. Murad, pp. 1115-1149, Macmillan, New York, 1985.
42. Chatsudhipong, V. and Dantzler, W. H.: PAH- $\alpha$ -KG countertransport stimulates PAH uptake and net secretion in isolated snake renal tubules. *Am. J. Physiol.* **261**: F858-F867, 1991.

43. Pritchard, J. B.: Intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate controls the efficacy of renal organic anion transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**: 1278-1284, 1995.
44. Boyd, T. A. and Goldstein, L.: Kidney metabolite levels and ammonia production in acute acid-base alterations in the rat. *Am. J. Physiol.* **236**: E289-E294, 1979.
45. Lemieux, G., Pichette, C., Vinay, P. and Gougoux, A.: Cellular mechanisms of the antiammoniagenic effect of ketone bodies in the dog. *Am. J. Physiol.* **239**: F420-F426, 1980.
46. Martin, M., Ferrier, B. and Baverel, G.: Transport and utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate by the rat kidney *in vivo*. *Pflügers Arch.* **413**: 217-224, 1989.
47. Burckhardt, G.: Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *Pflügers Arch.* **401**: 254-261, 1984.
48. Schmitt, C. and Burckhardt, G.: *p*-Aminohippurate/2-oxoglutarate exchange in bovine renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Pflügers Arch.* **423**: 280-290, 1993.
49. Ross, C. R. and Weiner, I. M.: Adenine nucleotides and PAH transport in slices of renal cortex: effects of DNP and CN. *Am. J. Physiol.* **222**: 356-359, 1972.
50. Dominguez, A. M. and Shideman, F. E.: Effect of malonate and antimycin A on renal tubular transport of *p*-aminohippurate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**: 329-332, 1955.
51. Maxild, J.: Effect of externally added ATP and related compounds on active transport of *p*-aminohippurate and metabolism in cortical slices of the rabbit kidney. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **86**: 509-530, 1978.
52. Podevin, R. A. and Boumendil-Podevin, E. F.: Inhibition by cyclic AMP and dibutyryl cyclic AMP of transport of organic acids in kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta* **375**: 106-114, 1975.
53. Sheikh, M. I., Maxild, J. and Möller, J. V.: Effect of vanadate on the renal accumulation of *p*-aminohippurate in the rabbit kidney tubules *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 2141-2146, 1981.
54. Cohen, P.: Protein phosphorylation and hormone action. *Proc. R. Soc. Lond.* **234**, 115-144, 1988.
55. 富田公夫、丸茂文昭、“腎臓学 病態生理からのアプローチ”、黒川 清編、南江堂、pp36-50、1995.
56. Muff, R., Fischer, J. A., Biber, J. and Murer, H.: Parathyroid hormone receptors in control of proximal tubule function. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 67-79, 1992.
57. Sasaki, S., Ishibashi, K. and Marumo, F.: Aquaporin-2 and -3: Representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 199-220, 1998.
58. Caverzasio, J., Rizzoli, R. and Bonjour, J.-P.: Sodium-dependent phosphate transport inhibited by parathyroid hormone and cyclic AMP stimulation in an opossum kidney cell line. *J. Biol. Chem.* **261**: 3233-3237, 1986.
59. Quamme, G., Pfeilschifter, J. and Murer, H.: Parathyroid hormone inhibition of  $\text{Na}^+$ /phosphate cotransport in OK cells: requirement of protein kinase C-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1013**: 159-165, 1989.
60. Murer, H., Werner, A., Reshkin, S., Wuarin, F. and Biber, J.: Cellular mechanisms in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. *Am. J. Physiol.* **260**: C885-899, 1991.
61. Reshkin, S. J., Forgo, J. and Murer, H.: Apical and basolateral effects of PTH in OK cells: Transport inhibition, messenger production, effects of pertussis toxin, and interaction with a PTH analog. *J. Memb. Biol.* **124**, 227-237, 1991.
62. Friedlander, G., Couette, S., Coureau, C. and Amiel, C.: Mechanisms whereby extracellular adenosine 3',5'-monophosphate inhibits phosphate transport in cultured opossum kidney cells and in rat kidney. *J. Clin. Invest.* **90**, 848-858, 1992.
63. Quamme, G., Pelech, S., Biber, J. and Murer, H.: Abnormalities of parathyroid hormone-mediated signal transduction mechanisms in opossum kidney cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1223**, 107-116, 1994.
64. Coulson, R., Johnson, R. A., Olsson, R. A., Cooper, D. R. and Scheinman, S. J.: Adenosine stimulates phosphate and glucose transport in opossum kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **260**: F921-F928, 1991.
65. Coulson, R. and Scheinman, S. J.: Xanthine effects on renal proximal tubular function and cyclic AMP metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**: 589-595, 1989.
66. Coulson, R., Proch, P. S., Olsson, R. A., Chalfant, C. E. and Cooper, D. R.: Upregulated renal adenosine  $A_1$  receptors augment PKC and glucose transport but inhibit proliferation. *Am. J. Physiol.* **270**, F263-F274, 1996.
67. Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698, 1984.
68. Nishizuka, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312, 1986.
69. Nishizuka, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665, 1988.
70. 藤井達三、寺田 弘、野村靖幸、“薬物作用と生体膜”、南江堂、pp237-282、1987.
71. 宇井理生、“New 薬理学”、田中千賀子、加藤隆一編、南江堂、pp15-42、1989.
72. 黒木登志夫、実験医学 **7**: 1134-1138、1989.

73. Friedlander, G. and Amiel, C.: Protein kinase C activation has dissimilar effects on sodium-coupled uptakes in renal proximal tubular cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* **264**: 3935-3941, 1989.
74. Longo, N., Griffin, L. D., Langley, S. D. and Elsas, L. J.: Glucose transport by cultured human fibroblasts : regulation by phorbol esters and insulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**: 24-30, 1992.
75. Malmström, K. and Murer, H.: Parathyroid hormone regulates phosphate transport in OK cells via an irreversible inactivation of a membrane protein. *FEBS Lett.* **216**: 257-260, 1987.
76. Miller, D. S., Barnes, D. M. and Pritchard, J. B.: Confocal microscopic analysis of fluorescein compartmentation within crab urinary bladder cells. *Am. J. Physiol.* **267**: R16-R25, 1994.
77. Miller, D. S. and Pritchard, J. B.: Nocodazole inhibition of organic anion secretion in teleost renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **267**: R695-R704, 1994.
78. Witters, L. A., Vater, C. A. and Lienhard, G. E.: Phosphorylation of the glucose transporter *in vitro* and *in vivo* by protein kinase C. *Nature* **315**: 777-778, 1985.
79. Kuo, T. H., Wang, K. K. W., Carlock, L., Diglio, C. and Tsang, W.: Phorbol ester induces both gene expression and phosphorylation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J. Biol. Chem.* **266**: 2520-2525, 1991.
80. Middleton, J. P., Khan, W. A., Collinsworth, G., Hannun, Y. A. and Medford, R. M.: Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 15958-15964, 1993.
81. Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y. and Endou, H.: Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* **272**: 18526-18529, 1997.
82. Hohage, H., Löhr, M., Querl, U. and Greven, J.: The renal basolateral transport system for organic anions: properties of the regulation mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 659-664, 1994.
83. Halpin, P. A. and Renfro, J. L.: Renal organic anion secretion: evidence for dopaminergic and adrenergic regulation. *Am. J. Physiol.* **271**: R1372-R1379, 1996.
84. Miller, D. S. Protein kinase C regulation of organic anion transport in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* **274**: F156-F164, 1998.
- 85 安友佳朗、永田直一、日本臨床 **50**: 2925-2930, 1992.
86. 古川洋太郎、“最新内科学大系第14巻 カルシウム代謝異常”、井村裕夫、尾形悦郎、高久史麿、垂井清一郎編、中山書店、pp15-35、1993.
87. Dunlay, R. and Hruska, K.: PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am. J. Physiol.* **258**: F223-F231, 1990.
88. 藤田拓男、“生体における情報伝達”、田中千賀子、西塚泰美編、南江堂、pp68-70、1993.
89. Cole, J. A., Eber, S. L., Poelling, R. E., Thorne, P. K. and Forte, L. R.: A dual mechanism for regulation of kidney phosphate transport by parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* **253**, E221-E227, 1987.
90. Murer, H., Werner, A., Reshkin, S., Wuarin, F. and Biber, J.: Cellular mechanisms in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. *Am. J. Physiol.* **260**: C885-C899, 1991.
91. Quamme, G., Pfeilschifter, J. and Murer, H.: Parathyroid hormone inhibition of  $\text{Na}^+$ /phosphate cotransport in OK cells: intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  as a second messenger. *Biochim. Biophys. Acta* **1013**, 166-172, 1989.
92. Helmle-Kolb, C., Montrose, M. H., Stange, G. and Murer, H.: Regulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in opossum kidney cells by parathyroid hormone, cyclic AMP and phorbol esters. *Pflügers Arch.* **415**: 461-470, 1990.
93. Helmle-Kolb, C., Montrose, M. H. and Murer, H.: Parathyroid hormone regulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in opossum kidney cells: polarity and mechanisms. *Pflügers Arch.* **416**: 615-623, 1990.
94. Quamme, G., Pfeilschifter, J. and Murer, H.: Parathyroid hormone inhibition of  $\text{Na}^+$ /phosphate cotransport in OK cells: generation of second messengers in the regulatory cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 951-957, 1989.
95. Malmström, K., Stange, G. and Murer, H.: Intracellular cascades in the parathyroid-hormone-dependent regulation of  $\text{Na}^+$ /phosphate cotransport in OK cells. *Biochem. J.* **251**: 207-213, 1988.
96. Friedman, P. A., Coutermarsh, B. A., Kennedy, S. M. and Gesek, F. A.: Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* **137**: 13-20, 1996.
97. Miyauchi, A., Dobre, V., Rickmeyer, M., Cole, J., Forte, L. and Hruska, K. A.: Stimulation of transient elevations in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is related to inhibition of Pi transport in OK cells. *Am. J. Physiol.* **259** : F485-F493, 1990.
98. Hayes, G., Busch, A. E., Lang, F., Biber, J. and Murer, H.: Protein kinase C consensus sites and the regulation of Na/Pi-cotransport (NaPi-2) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* **430**: 819-824, 1995.
99. Arao, M., Yamaguchi, T., Sugimoto, T., Fukase, M. and Chihara, K.: Involvement of protein kinase C in the stimulation of sodium-dependent phosphate transport by parathyroid hormone in osteoblast-like cells. *Eur. J. Endocrinol.* **131**: 646-651, 1994.

100. Inui, K., Yamamoto, M. and Saito, H.: Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: Specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**: 195-201, 1992.
101. Williamson, J. R. and Corkey, B. E.: Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds: Update with tissue metabolite levels and intracellular distribution. In *Methods in Enzymology*, Volume LV, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, pp. 200-222, Academic Press, New York, 1979.
102. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254, 1976.