

Title	ラット近位尿細管におけるL-glutamine輸送系の解明と慢性代謝性アシドーシス時の応答性
Author(s)	堀尾, 勝
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35665
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【14】

氏名・(本籍)	ほり 堀	お 尾	まさる 勝
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7797	号
学位授与の日付	昭和62年5月11日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	ラット近位尿細管におけるL-glutamine輸送系の解明と慢性代謝性アシドーシス時の応答性		
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 熊原 雄一 教授 園田 孝夫		

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

glutamineは尿細管上皮細胞におけるアンモニア産生の前駆物質として重要であり、慢性代謝性アシドーシス時にはアンモニア産生の増加とともにglutamineの腎組織への取り込み増加が知られている。最近の知見によればアンモニアは主として近位尿細管で産生され、その各セグメントにおける産生量やアシドーシス時の応答性の違いが報告されているが、基質となるglutamineの各セグメントにおける上皮細胞内への輸送に関する詳細な検討はない。本研究の目的は近位尿細管各セグメントのglutamine輸送を刷子縁膜小胞(BBMV)、側底膜小胞(BLMV)を用いて検討し、その輸送特異性および慢性代謝性アシドーシス時の輸送応答性を明らかにすることにある。

〔方 法〕

1) 小胞の調製: SD系雄性ラット(200~220g)に1.5% NH₄Clを7日間飲水させ慢性代謝性アシドーシスラットを作成した(血漿HCO₃⁻=17.0±3.6mEq/l)。断頭開腹後、腎を灌流、摘出し、tissue slicerおよび実体顕微鏡を用いS₁+S₂セグメントを含む皮質外層(OC)とS₃セグメントを含む髓質外層(OM)を切り取り、Ca沈澱法によりBBMVを、InuiらのPercoll[®]勾配法によりBLMVを調製した。

2) L-glutamine輸送測定: 輸送測定は迅速ろ過法を用いた。小胞20μlを入れた試験管にL-[³H]-glutamineと輸送に必要な電解質を含む反応液100μlを加え小胞内へのglutamine輸送を開始させた。適当時間のincubation後、反応停止液を加え、filter上で吸引、ろ過、洗浄後、小胞内に取り込まれたglutamineの放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定し、glutamine輸送量を算出した。

[結 果]

1) marker enzyme : B B M Vではalkaline phosphatase (A L P) , γ -glutamyl transpeptidase (γ -G T P) のhomogenateに対する比活性はO C, O Mとも約15倍であり, B L M Vでは $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{A T P a s e}$ の比活性はO Cで約10倍, O Mで約4倍であった。反対側膜および他の細胞内小器官のmarker enzyme比活性は低く, contaminationの少ない良好な膜標品が得られた。

2) Na依存性 : B B M V, B L M VともNa勾配がある場合にglutamine輸送の著明な促進がみられ, Na依存性が示された。NaをK, Li, Rb, Csに置換した条件ではB B M V, B L M Vともglutamine輸送はNaの場合の20%以下となり, Naは他の陽イオンに置換不可であった。glutamine輸送をNa濃度の関数として測定するとB B M V, B L M VともMichaelis-Menten型の飽和現象を示し, 以下に述べるglutamine輸送kineticsの結果と合わせ, glutamine/Naのcoupling ratioは1 : 1であると考えられた。

3) B B M Vの輸送kinetics : 5秒間のglutamine初期輸送をglutamine濃度の関数として測定しEadie-Hofstee plotにより, みかけのkinetic parameterを求めた。対照群O C - B B M Vでは $K_m = 3.18 \pm 0.51 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 99.8 \pm 22.4 \text{nmol/min/mg protein}$, O M - B B M Vでは $K_m = 3.10 \pm 1.13 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 16.1 \pm 9.2 \text{nmol/min/mg protein}$ とO C - B B M Vで有意にhigh capacityを示した。アシドーシス群のkinetic parameterはO C - B B M Vでは $K_m = 2.70 \pm 0.50 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 77.0 \pm 11.4 \text{nmol/min/mg protein}$, O M - B B M Vでは $K_m = 2.92 \pm 0.79 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 15.1 \pm 2.7 \text{nmol/min/mg protein}$ であり対照群に比較して K_m , V_{max} とも有意な変化を認めなかった。

4) B L M Vの輸送kinetics : O C - B L M Vでは対照群で $K_m = 1.17 \pm 0.08 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 5.34 \pm 1.73 \text{nmol/min/mg protein}$, acidosis群では $K_m = 1.44 \pm 0.36 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 8.12 \pm 1.45 \text{nmol/min/mg protein}$ であった。両群で K_m に差はないが V_{max} はアシドーシス群で有意に高値を示した。O M - B L M Vでは対照群で $K_m = 1.63 \pm 0.28 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 1.70 \pm 0.79 \text{nmol/min/mg protein}$, アシドーシス群では $K_m = 1.68 \pm 0.55 \text{mM}$, $V_{\text{max}} = 2.33 \pm 0.70 \text{nmol/min/mg protein}$ であり, kinetic parameterに有意差はなかった。

[総 括]

1) B B M V, B L M VにおけるL-glutamine輸送系はNa依存性で, 他のcationでは置換不可であり, glutamine/Naのcoupling ratioは1 : 1であった。

2) O C - B B M Vの輸送系はhigh capacity, O M - B B M Vのそれはlow capacityであった。

3) 慢性代謝性アシドーシス時にはB B M VのNa依存性glutamine輸送系に変化はなく, O C - B L M Vにおいてのみ輸送系のcapacityが増加することを明らかにした。

このことより慢性代謝性アシドーシス時には近位尿細管 $S_1 + S_2$ セグメントの側底膜に存在するNa依存性glutamine輸送系のcapacityが増加し, 同セグメントでのglutamine取り込みが特異的に増加すると考えられる。またこの輸送増加が慢性代謝性アシドーシス時のアンモニア産生が近位尿細管 $S_1 + S_2$ セグメントで特異的に増加することに大きく寄与していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は腎近位尿細管で主に産生されるアンモニアの前駆物質であるグルタミンの細胞内への輸送をラット腎より単離した刷子縁膜小胞，側底膜小胞を用い，その輸送特性，慢性代謝性アシドーシス時の応答性を検討したものである。

刷子縁膜のグルタミン輸送は近位尿細管 $S_1 + S_2$ セグメントは S_3 セグメントに比べhigh capacityであること，慢性代謝性アシドーシス時にはアンモニア産生増加が報告されているのと同じ $S_1 + S_2$ セグメントの側底膜のグルタミン輸送capacityが増加することを明らかにした。このことは尿細管グルタミン輸送系に新しい知見を加えるとともに慢性代謝性アシドーシス時の輸送系の応答性をはじめてセグメント単位で明らかにした点で学位論文として価値あるものと評価される。