

助成番号 9930

## 細胞内イオン環境の変動に対する腎尿細管細胞ナトリウムポンプ遺伝子の発現制御

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)

共同研究者：宮田 幸雄 (自治医科大学 腎臓内科)

多くの細胞で、細胞内 $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ) 濃度の増加が $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を引き起こすことが知られている。しかし、 $[\text{Na}^+]_i$  濃度の増加は細胞内・外の $\text{Na}^+$  勾配を減らし、2次的に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体活性や $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体活性を抑制し、それぞれ細胞内遊離 $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 濃度の増加や細胞内pH ( $\text{pHi}$ ) の低下を招き、これらが $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を誘導している可能性がある。そこで、ラット腎尿細管由来の培養細胞であるnormal rat kidney epithelial cells (NRK)を用いて、 $\text{Na}^+$  ポンプ阻害薬であるouabainで $[\text{Na}^+]_i$  濃度を増加させた時の $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現をNorthern blotにて解析し、mRNAの発現と $[\text{Na}^+]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 $\text{pHi}$ との関連を明らかにした。 $[\text{Na}^+]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 $\text{pHi}$ はそれぞれ $\text{Na}^+$ 感受性蛍光色素であるSBFI、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光色素であるfura-2、 $\text{pH}$ 感受性蛍光色素であるBCECFを用いて測定した。ouabain (1 mM)を投与する $[\text{Na}^+]_i$  濃度は増加した。 $\alpha 1$ -mRNAレベルは3時間目で2.3倍に増加しはじめ、投与12時間後にはピークに達し、3.3倍の増加を示した。同様に、 $\beta 1$ -mRNAレベルも3時間目で2.4倍に増加し、投与12時間後にはピークに達し、3.3倍の増加を示した。転写阻害薬のactinomycin Dや蛋白合成阻害薬のcycloheximideはいずれもouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を抑制した。ouabainを3時間投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の増加を認めた。これと同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の増加を $\text{Ca}^{2+}$  ionophoreであるionomycinを投与して作成しても $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は増加しなかった。EGTAを加えた $\text{Ca}^{2+}$  freeの培養液にouabainを3時間投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度は不変であったが、 $[\text{Na}^+]_i$  濃度および $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルは増加した。ouabainを3時間投与すると $\text{pHi}$ は低下した。これと同様の $\text{pHi}$ の低下を $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体の阻害薬であるethylisopropylamilorideを投与して作成したが、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は増加しなかった。 $\text{Na}^+$  ionophoreであるmonensinを $\text{Ca}^{2+}$  freeの培養液に添加すると $[\text{Na}^+]_i$  濃度および $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加を認めた。ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は $\alpha 1$ -subunit蛋白、 $\beta 1$ -subunit蛋白レベルの増加を伴っていた。以上より、NRKにおいて、 $[\text{Na}^+]_i$  濃度の増加が直接 $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子  $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を制御していることが証明された。



助成番号 9930

## 細胞内イオン環境の変動に対する腎尿細管細胞ナトリウムポンプ遺伝子の発現制御

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)

共同研究者：宮田 幸雄 (自治医科大学 腎臓内科)

## 1. 研究目的

ナトリウム ( $\text{Na}^+$ ) ポンプ ( $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ ) はATP水解のエネルギーを用いて、細胞内・外の $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$  (カリウム) の濃度勾配に逆らって、 $\text{Na}^+$ を細胞外に、 $\text{K}^+$ を細胞内に能動的に輸送する膜蛋白で、 $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖の2つのsubunitから構成されている (1)。 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖にはさらに、少なくとも3つのisoform ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ;  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ ) が報告され、腎臓を含む多くの組織では $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖が主要isoformである (2-4)。 $\text{Na}^+$  ポンプはどの細胞にも存在するが細胞により機能は異なり、腎尿細管細胞では $\text{Na}^+$ の再吸収に、心筋細胞や平滑筋細胞では収縮、興奮、増殖に重要な役割を担っている。また、このATP水解のエネルギーは、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体、など $\text{Na}^+$ -依存性2次性能動輸送の駆動力にもなっている。一方、細胞内 $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ) 濃度の増加が、 $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を制御していることはLLC-PK1細胞など腎尿細管細胞を含めた多くの細胞で報告されている (5-12) が、 $[\text{Na}^+]_i$  が直接 $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を制御しているかどうか証明されていない。 $[\text{Na}^+]_i$  濃度の増加によって、細胞内・外の $\text{Na}^+$ 濃度勾配は減少し、2次的に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体活性や $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体活性が抑制され、細胞内遊離 $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 濃度の増加 (13, 14) や細胞内pH ( $\text{pHi}$ ) の低下 (14, 15) が起こり、これが $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を制御している可能性がある。そこで、本研究では遠位尿細管の性質を有するnormal rat kidney epithelial cell (NRK) (16, 17)を用いて、 $[\text{Na}^+]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 $\text{pHi}$ のいずれが $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の発現を直接制御しているのかを証明すると共に、細胞内イオン環境の変動によって調節される $\text{Na}^+$  ポンプ遺伝子の制御エレメントの同定を目的とする。

## 2. 研究方法

## 2.1. NRKの培養

NRKは American Tissue Culture Collection より購入した。細胞は5%ウシ胎児血清 (FBS) と1%の非必須アミノ酸を含むDMEM液にて培養し、実験はFBS freeのDMEM液に置換後24時間目に行った。

## 2.2. Northern blot

100 mmのdishに培養したNRKからTotal RNAをチオシアン酸グアニジン法 (18) にて抽出した。1%アガロースホルムアルデヒドゲルにて電気泳動を行い、ナイロン膜 (Hybond N、Amersham) に転写した。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+\text{-ATPase}$   $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖遺伝子に特異的ラットcDNAを用いてハイブリダイズした。ナイロン膜を洗浄後 (2 x SSC、0.1%SDS、室温2回; 0.1 x SSC、0.1%SDS、45°C1回)、オートラジオグラフィー

を行い、mRNAの発現量をデンシトメーターにて定量した。また、上記ナイロン膜をラット特異的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) cDNAを用いてハイブリダイズ、オートラジオグラフィーを行い、internal controlとした。

### 2.3. Western blot

100mmのdishに培養したNRKに4℃下でPBSを加え回収後、超音波にて破碎し、ホモジネートを作製した。一定量のホモジネート蛋白をSDS-PAGEに負荷し電気泳動を行い、ニトロセルロース膜 (Hybond-ECL, Amersham) に転写した。転写した膜は室温にて5%スキムミルクを含むTris-buffered saline-Tween 20 (TBS-Tween) に浸した後、ウサギ抗ラットNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase α1-subunit抗体、抗ラットNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase β1-subunit抗体を加え、1時間浮置した。TBS-Tweenにて抗体を洗浄後、peroxidaseを抱合した抗ウサギ免疫グロブリンG抗体を加え、1時間浮置した。TBS-Tweenにて抗体を洗浄後ECLキット (Amersham) にて発光させ、蛋白発現量をデンシトメーターにて定量した (18)。

### 2.3. [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pHiの測定

[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pHiは以前報告した方法に準じて行った(19-21)。24-wellの培養dish内にガラスカバー スリップを入れ、この上に培養したNRKをPSSでリンスした後、Na<sup>+</sup>感受性蛍光色素であるSBFI、Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素であるfura-2、pH感受性蛍光色素であるBCECFを負荷し、蛍光スペクトロメーター (CAF-100、日本分光、東京) にて測定した。

### 2.4. α1-subunit遺伝子、β1-subunit遺伝子のプロモーター活性の解析

α1-subunit遺伝子5'上流領域 (-1,537~+261) またはβ1-subunit遺伝子5'上流領域 (-764~+129) をルシフェラーゼリポーター遺伝子に組み込んだプラスミドDNAを作成した。このα1-subunit遺伝子5'上流領域 またはβ1-subunit遺伝子5'上流領域と β-galactosidase expression vector (internal control) とを同時にリポフェクション法にて一過性にNRKに導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。

## 3. 研究結果

### 3.1. ouabainによる[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>濃度およびα1-mRNA、β1-mRNAへの影響

[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>濃度を増加させる目的でNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの阻害薬のouabainを使用した。ouabainの投与濃度を決定するため0.1、1、5 mMのouabainをNRKに投与し、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>濃度を測定した。Fig. 1に典型例を示す。ouabain 0.1 mMでは[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>は不変であったが、1 mMでは14.4から16.6 mMに、また5 mMでは27.9 mMに上昇した。以上より、以下の実験はouabain 1 mMを使用することとした。1 mMのouabainを24時間NRKに投与すると、Fig. 2に示すように、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>濃度は投与6時間後にピークに達し、その後24時間目まで上昇は持続した。この時、α1-mRNA、β1-mRNAレベルはouabain投与3時間目でそれぞれ2.3倍、2.4倍に増加しはじめ、12時間後にはピークの3.3倍に増加した (Fig. 3: Aは典型例、Bはサマリーを示

す)。さらに、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルはいずれも ouabain投与24時間目でも3倍の増加が持続した (Fig. 3)。

次にouabainの、 $[Na^+]_i$ 濃度および $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNA発現に対する濃度依存性につき検討した。Fig. 4に示すように、NRKにouabainを0から1mMまで3時間投与すると、ouabain 0.5 mM以上で $[Na^+]_i$ 濃度は有意に増加し、ouabain 1 mMの投与で $[Na^+]_i$ 濃度は最高値に達した。一方、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルはouabain 0.3 mM以上で有意に増加し、0.5 mMで最高値に達し、1 mMでは0.5 mMと同様のレベルであった (Fig. 5: Aは典型例、Bはサマリーを示す)。

### 3.2. ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現に対するactinomycin D、cycloheximideの影響

ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現が転写や蛋白合成を介しているかどうかを検討するため、各々の阻害薬であるactinomycin D (AD)、cycloheximide (CHX)を投与した。ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現はAD (Fig. 6: Aは典型例、Bはサマリーを示す)、CHX (Fig. 7: Aは典型例、Bはサマリーを示す)の投与により完全に抑制された。

### 3.3. ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現に対する $[Ca^{2+}]_i$ の影響

ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現に対する $[Ca^{2+}]_i$ の影響を検討するため、細胞外を $Ca^{2+}$ 存在下 (2 mM $Ca^{2+}$ を含む) および非存在下 (DMEMより $Ca^{2+}$ を除去し0.1 mMのEGTAを添加) でouabainをNRKに3時間投与し $[Na^+]_i$ 、 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度 (Fig. 8)と $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベル (Fig. 9: Aは典型例、Bはサマリーを示す)を観察した。細胞外 $Ca^{2+}$ 存在下で、ouabainは $[Na^+]_i$ 濃度、 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度をそれぞれ14.5から30.6 mM、82.3から164.9 nMに増加させた。一方、細胞外より $Ca^{2+}$ を除去すると $[Ca^{2+}]_i$ 濃度は17.2 nMに低下したが、 $[Na^+]_i$ 濃度は不変であった。 $Ca^{2+}$ 非存在下でouabainを投与すると、 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度は不変であったが、 $[Na^+]_i$ 濃度は20.8 mMに増加した。この $Ca^{2+}$ 非存在下でのouabainによる $[Na^+]_i$ 濃度の増加は、 $Ca^{2+}$ 存在下でのouabainによる $[Na^+]_i$ 濃度の増加に比し小さかった。このことから、ouabainによる $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加の機序として、 $[Na^+]_i$ 濃度増加に伴う細胞内・外の $Na^+$ 勾配の減少→二次的な $Na^+/Ca^{2+}$ 交換輸送体活性の抑制→外向きの $Ca^{2+}$ の方向が逆になり、内向きになったことが推測される。

細胞外 $Ca^{2+}$ 存在下で、ouabainは $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルをそれぞれ2.2倍、2.3倍に増加させた。細胞外 $Ca^{2+}$ 非存在下においても、ouabainは $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルを $Ca^{2+}$ 存在下と同様に増加させた (Fig. 9)。ouabainと同様の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加を $Ca^{2+}$  ionophoreであるionomycin  $10^{-7}$  MをNRKに3時間投与して作った (Fig. 10)が、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルは不変であった (Fig. 11: Aは典型例、Bはサマリーを示す)。

### 3.4. ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現に対するpHiの影響

ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現に対するpHiの影響を検討するため、ouabainを3時間NRKに投与し、pHiと $[Na^+]_i$ 濃度を測定した (Fig. 12)。pHiはouabainにより7.20から7.02に低下した。ouabainと同様のpHiの低下を $Na^+/H^+$ 交換輸送体の阻害薬であるethylisopropylamiloride (EIPA)を3時間

NRKに投与して作成した (Fig. 12) が、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルは不変であった (Fig. 13: Aは典型例、Bはサマリーを示す)。 $[\text{Na}^+]_i$ 濃度はouabain投与で13.6から25.8 mMに増加したが、EIPA投与では逆に10.5 mMに減少した (Fig. 12)。以上より、ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の増加やpHiの低下によるものではなく、 $[\text{Na}^+]_i$ 濃度の増加が直接関与していることが考えられた。

### 3.5. $[\text{Na}^+]_i$ 濃度の増加による $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現

$[\text{Na}^+]_i$ 濃度の増加が直接 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を制御していることをさらに確認するため、 $\text{Na}^+$  ionophoreであるmonensinを投与した。細胞外より $\text{Ca}^{2+}$ を除去し0.1 mMのEGTAを添加したDMEMにmonensin 10  $\mu\text{M}$ を加え、NRKに3時間投与すると $[\text{Na}^+]_i$ 濃度は13.3から26.5 mMに増加し (Fig. 14)、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルはそれぞれ2.3倍、2.1倍に増加した (Fig. 15: Aは典型例、Bはサマリーを示す)。

### 3.6. ouabainによる $\alpha 1$ -subunit 蛋白、 $\beta 1$ -subunit 蛋白の発現

ouabainをNRKに24時間投与すると $\alpha 1$ -subunit、 $\beta 1$ -subunit 蛋白レベルはそれぞれ2.3倍、2.6倍に増加した (Fig. 16: Aは典型例、Bはサマリーを示す)。

### 3.7. ouabainによる $\alpha 1$ -subunit 遺伝子、 $\beta 1$ -subunit 遺伝子のプロモーター活性に及ぼす作用

$\alpha 1$ -subunit 遺伝子、 $\beta 1$ -subunit 遺伝子の5'上流領域に $\text{Na}^+$ 反応性エレメントが存在するかどうかを、 $\alpha 1$ -subunit 遺伝子、 $\beta 1$ -subunit 遺伝子の5'上流領域にルシフェラーゼリポーター遺伝子を組み込んだプラスミドをNRKに一過性形質変換し、ouabain投与前後のルシフェラーゼ活性を測定した。ouabain投与にて $\alpha 1$ -subunit 遺伝子、 $\beta 1$ -subunit 遺伝子のいずれのルシフェラーゼ活性も上昇しなかった。

## 4. 考察

本研究では $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現が $[\text{Na}^+]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、pHiいずれの変動によって直接制御されているのかを遠位尿細管の性質を持ったNRKにて検討した。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの阻害薬であるouabainを投与すると、時間依存性、濃度依存性に $[\text{Na}^+]_i$ 濃度の増加と共に、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加が認められた。このouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は $\alpha 1$ -subunit蛋白、 $\beta 1$ -subunit蛋白レベルの増加を伴っていた。

ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加が転写阻害薬であるADにて完全に抑制されたことより、ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現はmRNAの破壊の亢進よりも転写の亢進が考えられた。また、ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加が蛋白合成阻害薬であるCHXにて完全に抑制されたことより、ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は少なくとも何らかの調節蛋白の合成を介していることが示唆された。

ouabainは $[\text{Na}^+]_i$ 濃度の増加と同時に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の増加を引き起こした。細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ を除去すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度は低下するが、ouabainによる $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下と同様で

あった。ionomycinにてouabainと同様の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加を引き起こしても $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加は認めなかった。ouabainは $[Na^+]_i$ 濃度の増加と同時にpHiの低下を引き起こした。EIPAを投与し $Na^+/H^+$ 交換輸送体活性を抑制することによってouabainと同様のpHiの低下を作成したが、 $[Na^+]_i$ 濃度は逆に低下し、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルは不変であった。monensinは $[Na^+]_i$ 濃度の増加と共に $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加を引き起こした。以上より、 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加やpHiの低下ではなく、 $[Na^+]_i$ 濃度の増加が直接 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を制御していることが明らかになった。

細胞外 $Ca^{2+}$ 非存在下ではouabainによる $[Na^+]_i$ 濃度の増加はわずか(14.5から20.8 mM)であったが、細胞外 $Ca^{2+}$ 存在下( $[Na^+]_i$ 濃度は14.5から30.6 mMに増加)と同様の $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの増加を引き起こした。また、ouabainの濃度依存性でも示したように、ouabain 0.5 mM以上で $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAレベルの増加は飽和に達しているのに対し、 $[Na^+]_i$ 濃度はouabain 1 mM投与にてさらに上昇した。以上より、 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現は $[Na^+]_i$ 濃度が20 mM以上になると飽和に達することが明らかになった。従って、わずかな $[Na^+]_i$ 濃度の増加がシグナルとなって $Na^+$ 、 $K^+$ -ATPase mRNAの発現が誘導されることが示唆された。

## 5. 今後の課題

本研究では $[Na^+]_i$ 濃度の増加が直接 $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を制御していることが明らかになった。 $[Na^+]_i$ 濃度の絶対値でなく、 $[Na^+]_i$ 濃度のわずかな増加がシグナルとなって $\alpha 1$ -mRNA、 $\beta 1$ -mRNAの発現を調節していることが判明し、 $Na^+$ ポンプ遺伝子内には $Na^+$ センサー?が存在する可能性が示唆された。今回の研究では、 $[Na^+]_i$ 濃度の増加によって $Na^+$ ポンプ遺伝子の発現を転写レベルで調節する制御エレメントは $\alpha 1$ -subunit遺伝子、 $\beta 1$ -subunit遺伝子5'上流領域には同定できなかったが、それぞれの遺伝子の他の領域には $Na^+$ 反応性エレメントが存在する可能性が依然として残っている。また、 $[Na^+]_i$ 濃度の増加が何らかの調節蛋白の合成を介してmRNAの発現を制御しているかもしれない。これらの可能性につき今後検討していきたい。

## 6. 文献

- 1) Sweadner KJ: Isozymes of the  $Na^+K^+$ -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 988: 185-220, 1989.
- 2) Herrera VL, Emanuel JR, Ruiz-Opazo N, Levenson R, Nadal-Ginard B: Three differentially expressed  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase  $\alpha$  subunit isoforms: structural and functional implications. *J Cell Biol* 105: 1855-1865, 1987.
- 3) Orłowski J, Lingrel JB: Tissue-specific and developmental regulation of rat  $Na^+K^+$ -ATPase catalytic  $\alpha$ -isoform and  $\beta$ -subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263: 10436-10442, 1988.
- 4) Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson R: Identification of the mammalian  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase  $\beta$  subunit. *J Biol Chem* 271: 22754-22758, 1996.
- 5) Lescale-Matys L, Hensley CB, Crnkovic-Markovic R, Putnam DS, McDonough AA: Low  $K^+$  increases  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase abundance in LLC-PK1/C14 cells by differentially increasing  $\beta$ , and not  $\alpha$ , subunit mRNA. *J Biol Chem* 29: 17935-17940, 1990.

- 6) Tang M-J, McDonough AA: Low  $K^+$  increases Na, K-ATPase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit mRNA and protein abundance in cultured renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 263: C436-C442, 1992.
- 7) Harber RS, Pressley TA, Loeb JN, Ismail-Beigi F: Ionic dependence of active Na-K transport "clamping" of cellular  $Na^+$  with monensin. *Am J Physiol* 253: F26-F33, 1987.
- 8) Yamamoto K, Ikeda U, Seino Y, Tsuruya Y, Oguchi A, Okada K, Ishikawa S, Saito T, Kawakami K, Hara Y, Shimada K: Regulation of Na, K-adenosine triphosphatase gene expression by sodium ions in cultured neonatal rat cardiocytes. *J Clin Invest* 92: 1889-1895, 1993.
- 9) Taormino JP, Fambrough DM: Pre-translational regulation of the  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase in response to demand for ion transport in cultured chicken skeletal muscle. *J Biol Chem* 265: 4116-4123, 1990.
- 10) Yamamoto K, Ikeda U, Okada K, Saito T, Kawakami K, Shimada K: Sodium ion mediated regulation of Na/K-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 28: 957-962, 1994.
- 11) Rayson BM: Rates of synthesis and degradation of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase during chronic ouabain treatment. *Am J Physiol* 256: C75-C80, 1989.
- 12) Pollack LR, Tate EH, Cook JS:  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase in HeLa cells after prolonged growth in low  $K^+$  or ouabain. *J Cell Physiol* 106: 85-97, 1981.
- 13) Silver RB, Frindt G, Windhager EE, Palmer LG: Feedback regulation of Na channels in rat CCT. I. Effects of inhibition of Na pump. *Am J Physiol* 264: F557-F564, 1993.
- 14) Wang W-H, Geibel J, Giebisch G: Mechanism of apical  $K^+$  channel modulation in principal renal tubule cells. *J Gen Physiol* 101: 673-694, 1993.
- 15) Harvey BJ, Ehrenfeld J: Role of  $Na^+/H^+$  exchange in the control of intracellular pH and cell membrane conductances in frog skin epithelium. *J Gen Physiol* 92: 793-810, 1988.
- 16) De Larco JE, Todaro GJ: Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell lines: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94: 335-342, 1978.
- 17) Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM: Regulation of sodium-potassium adenosine triphosphate subunit gene expression by corticosteroids and  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Endocrinol* 135: 901-910, 1994.
- 18) Muto S, Nemoto J, Ebata S, Kawakami K, Asano Y: Corticosterone and  $11$ -dehydrocorticosterone stimulate Na, K-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 54: 492-508, 1998.
- 19) Okada K, Ishikawa S, Saito T: Mechanisms of vasopressin-induced increase in intracellular  $Na^+$  in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 261: F1007-F1012, 1991.
- 20) Okada K, Tsai P, Briner VA, Caramelo C, Schrier RW: Effects of extra- and intracellular pH on vascular actions of arginine vasopressin. *Am J Physiol* 260: F39-F45, 1991.
- 21) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.



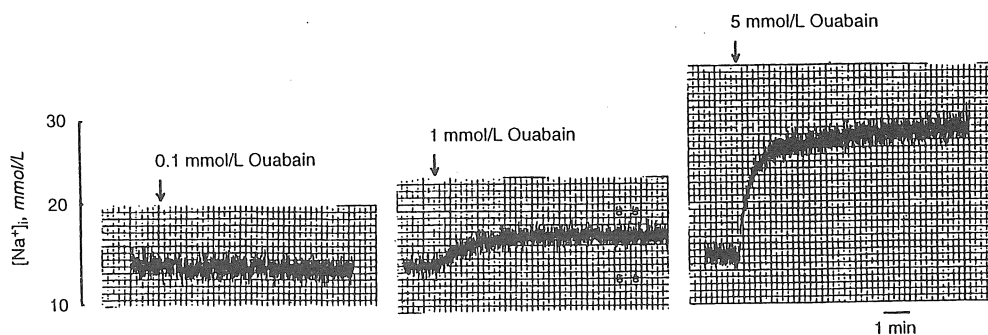


Fig. 1. Representative fluorescent tracings of  $[Na^+]_i$  immediately after the addition of ouabain at different concentrations to normal rat kidney epithelial cells (NRK). The arrow indicates time of ouabain addition.

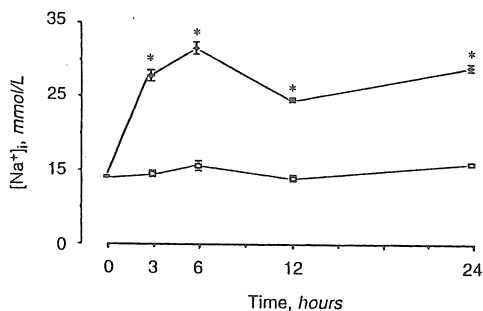


Fig. 2. Time course of  $[Na^+]_i$  upon the addition of ouabain to NRK during 24 hours. Each point is means  $\pm$  SE of six separate experiments. Symbols are: ( $\square$ ) control; ( $\diamond$ ) ouabain; \* $P < 0.001$  compared with control.

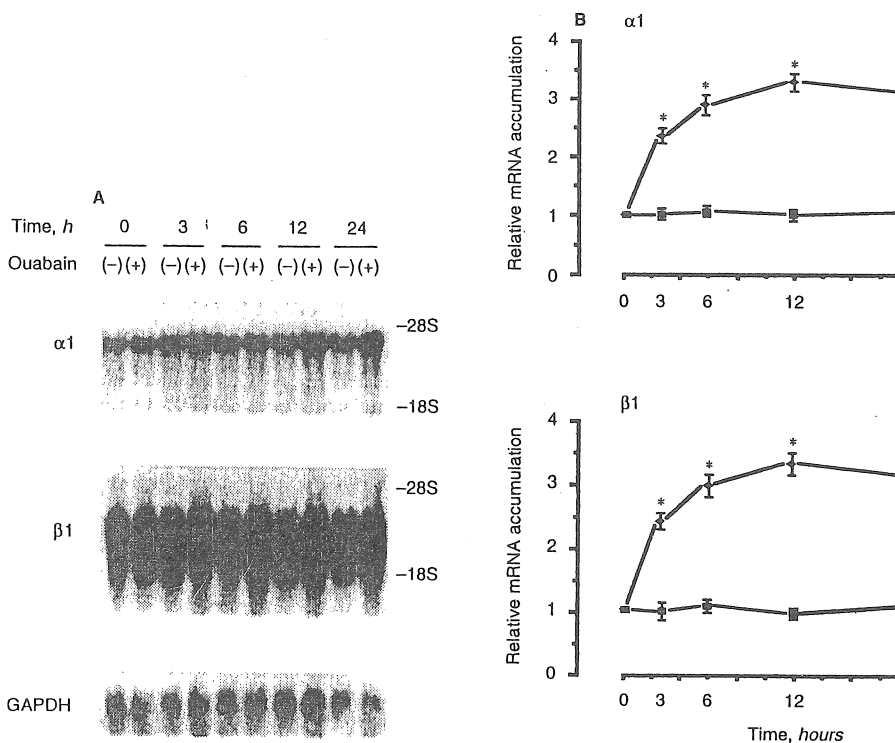


Fig. 3. Time course of  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation by ouabain in NRK. (A) Northern blot analyses. (B) Quantification of the Northern blot. Symbols are: ( $\square$ ) control; ( $\diamond$ ) ouabain. Abundance of mRNA is expressed as units of densitometry relative to GAPDH. Each point is means  $\pm$  SE of six separate experiments. \* $P < 0.001$  compared with control.

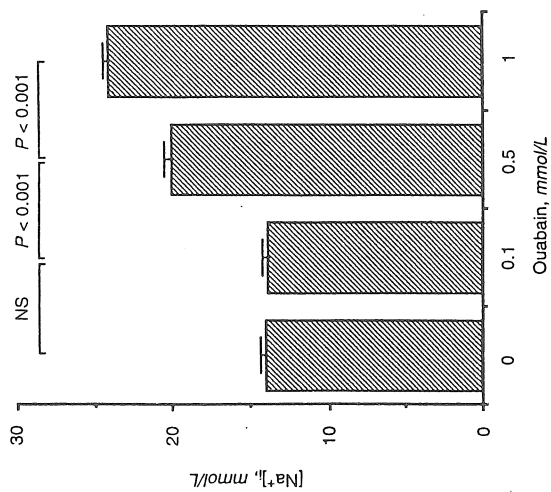


Fig. 4. [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> upon the addition of ouabain at different concentrations to NRK. NRK were exposed to ouabain at different concentrations for 12 hours. Data are means ± SE of six separate experiments.

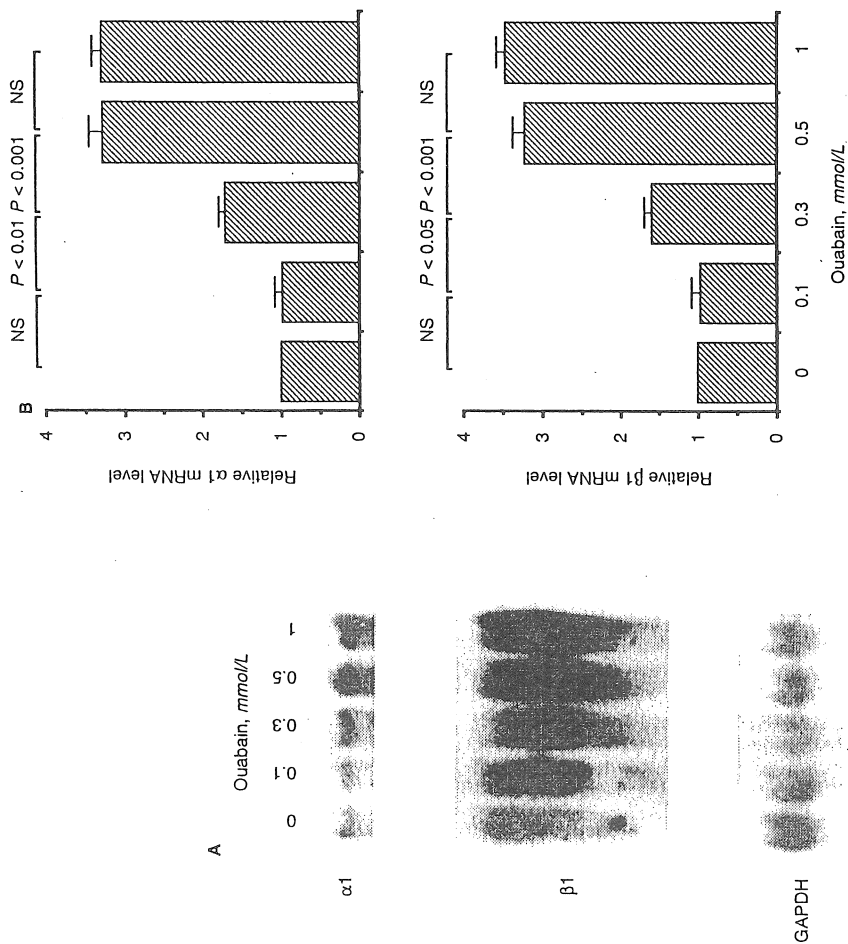
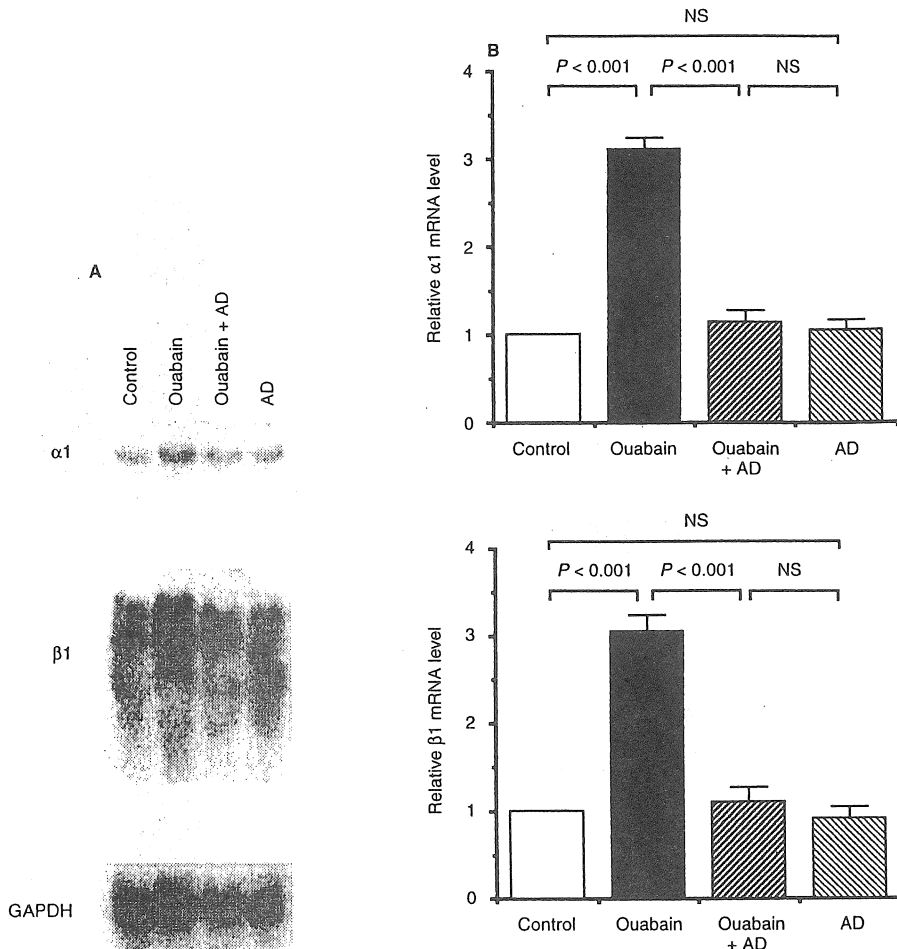
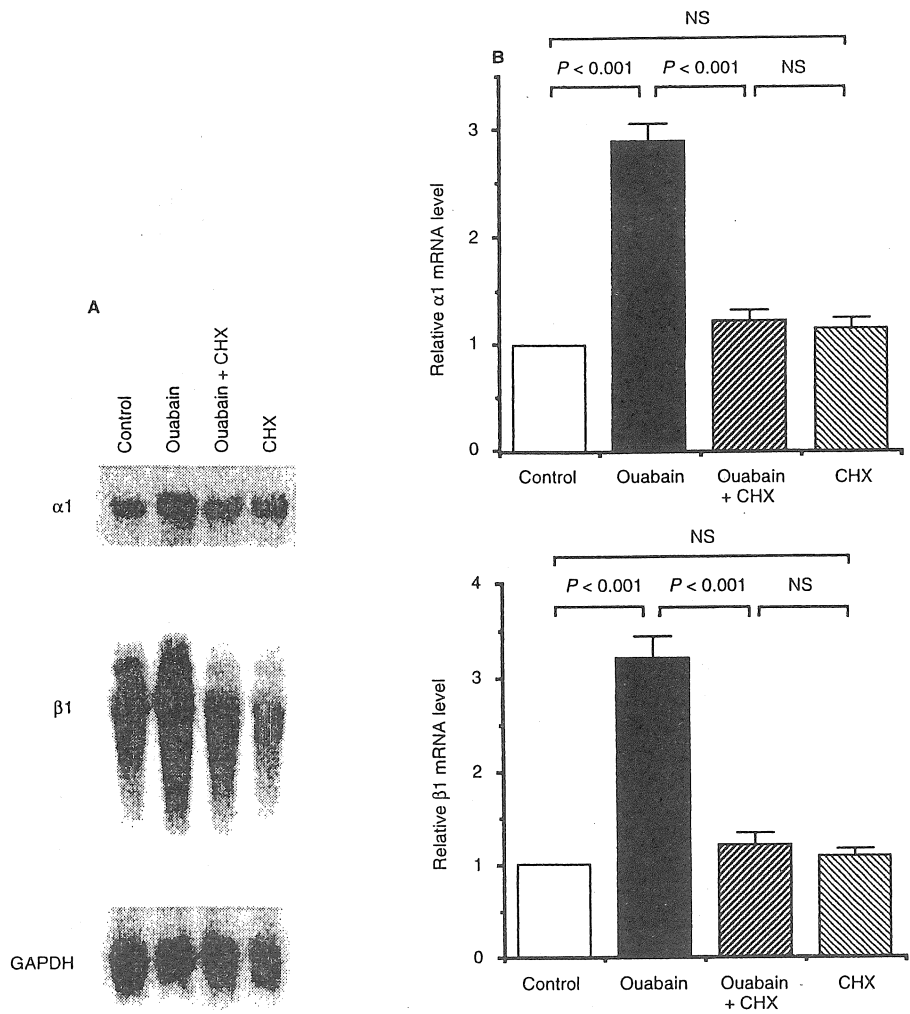


Fig. 5. α1- and β1-mRNA accumulation upon the addition of ouabain at different concentrations to NRK. NRK were exposed to ouabain at different concentrations for 12 hours. (A) Northern blot analyses in NRK treated with ouabain at different concentrations. (B) Quantitations of the Northern blot. Data are means ± SE of seven separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.



**Fig. 6.** Effects of the transcription inhibitor actinomycin D (AD) on ouabain-induced up-regulation of  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK. NRK were preincubated for one hour with AD (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and were further exposed to ouabain (1  $\text{mmol}/\text{L}$ ) in the continued presence of AD for 12 hours. (A) Northern blot analyses in control and ouabain-treated NRK in the absence and presence of AD. (B) Quantitations of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of five separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.



**Fig. 7. Effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) on ouabain-induced up-regulation of  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK.** NRK were preincubated for 30 minutes with CHX (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and were further exposed to ouabain (1 mmol/L) in the continued presence of CHX for 12 hours. (A) Northern blot analyses in control and ouabain-treated NRK in the absence and presence of CHX. (B) Quantitations of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of five separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.

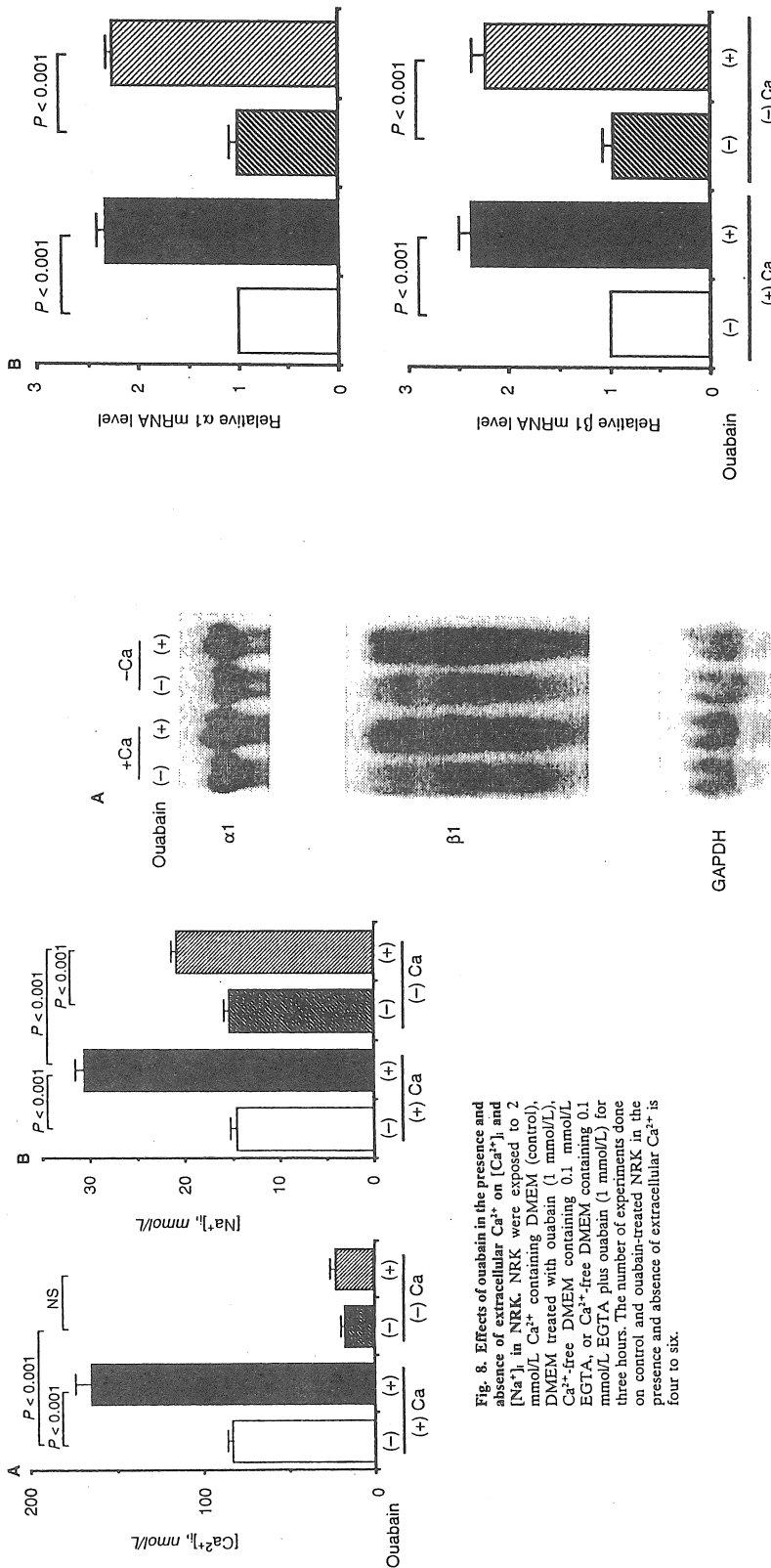


Fig. 8. Effects of ouabain in the presence and absence of extracellular  $Ca^{2+}$  on  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Na^+]_i$  in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $Ca^{2+}$  containing DMEM (control), DMEM treated with ouabain (1 mmol/L),  $Ca^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA, or  $Ca^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA, or  $Ca^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA plus ouabain (1 mmol/L) for three hours. The number of experiments done on control and ouabain-treated NRK in the presence and absence of extracellular  $Ca^{2+}$  is four to six.

Fig. 9. Effects of ouabain in the presence and absence of extracellular  $Ca^{2+}$  on  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $Ca^{2+}$  containing DMEM (control), DMEM-treated ouabain (1 mmol/L),  $Ca^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA, or  $Ca^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA plus ouabain (1 mmol/L) for three hours. (A) Northern blot analyses in control and ouabain-treated NRK in the absence and presence of extracellular  $Ca^{2+}$ . (B) Quantifications of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of five separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.

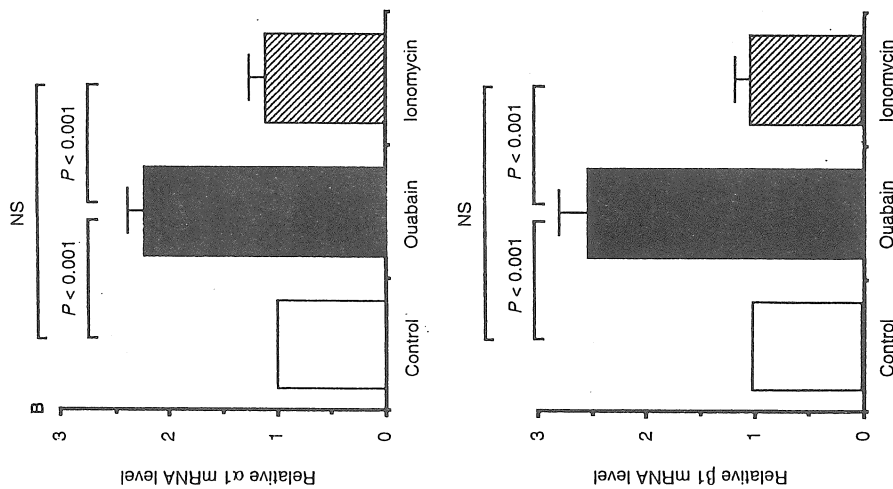


Fig. 11. Effects of ionomycin on  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM (control), DMEM treated with ouabain (1 mmol/L), or with ionomycin ( $10^{-7}$  mol) for three hours. (A) Northern blot analyses in control, ouabain-, and ionomycin-treated NRK. (B) Quantitations of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of five separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.

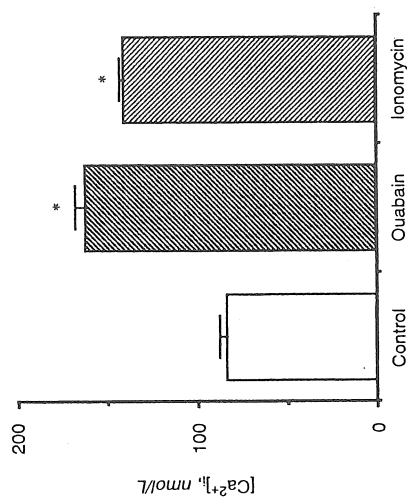


Fig. 10. Effects of the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore, ionomycin, on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM (control), DMEM treated with ouabain (1 mmol/L), or with ionomycin ( $10^{-7}$  mol) for three hours. The number of experiments done on control, ouabain-, and ionomycin-treated NRK is five. \*  $P < 0.001$  compared with control.

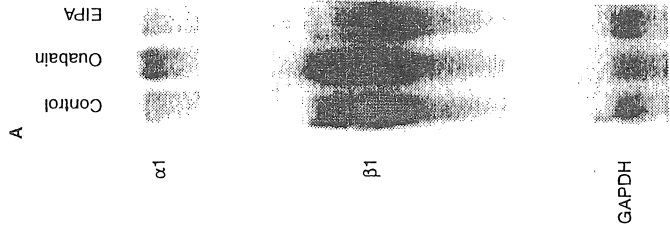
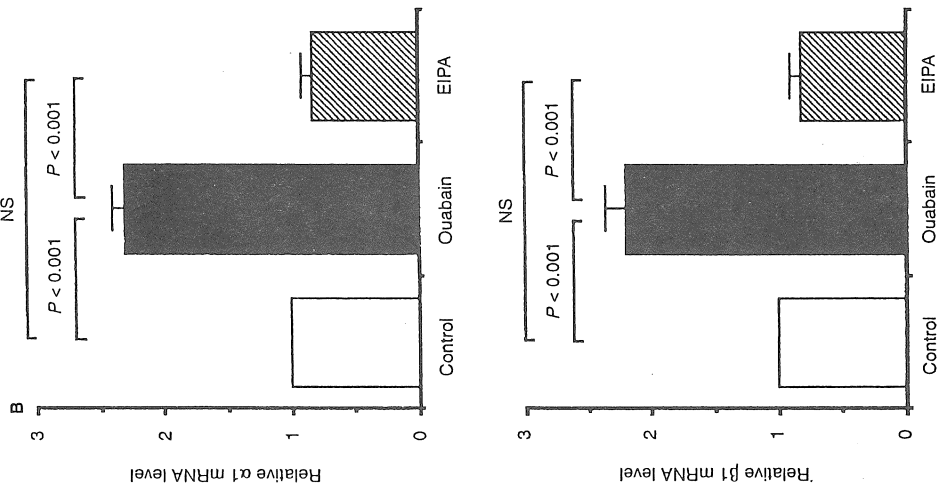


Fig. 13. Effects of EIPA on  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM (control), 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM treated with ouabain (1 mmol/L), or 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM treated with EIPA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) for three hours. (A) Northern blot analyses in control, ouabain-, and EIPA-treated NRK. (B) Quantitations of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of four separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples.

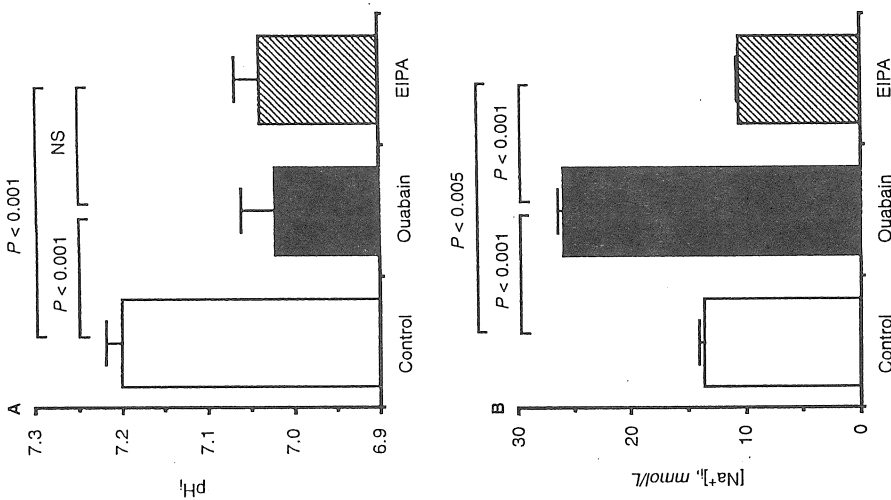


Fig. 12. Effects of the specific inhibitor of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange, ethylisopropylamide (EIPA), on pH<sub>i</sub> and  $[\text{Na}^+]_i$  in NRK. NRK were exposed to 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  containing DMEM. DMEM treated with ouabain (1 mmol/L) or with EIPA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) for three hours. The number of experiments done on control, ouabain-, and EIPA-treated NRK is five.

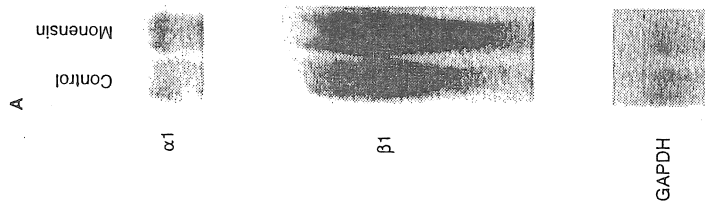


Fig. 15. Effects of monensin on  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -mRNA accumulation in NRK. NRK were exposed to  $\text{Ca}^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA (control) or  $\text{Ca}^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA plus monensin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) for three hours. (A) Northern blot analyses in control and monensin-treated NRK. (B) Quantifications of the Northern blot. Data are means  $\pm$  SE of four separate experiments, expressed as a relative increase in mRNA expression compared with control samples. \* $P < 0.001$  compared with control.

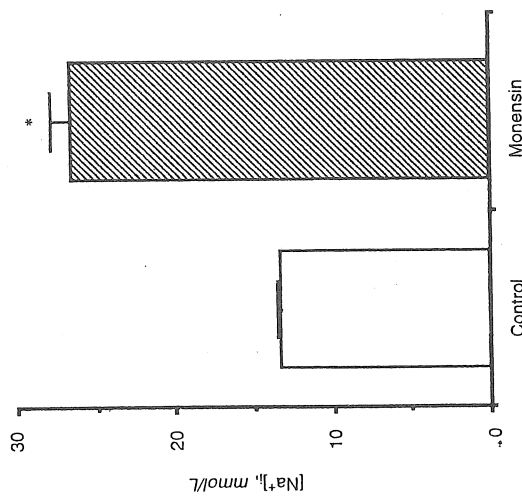
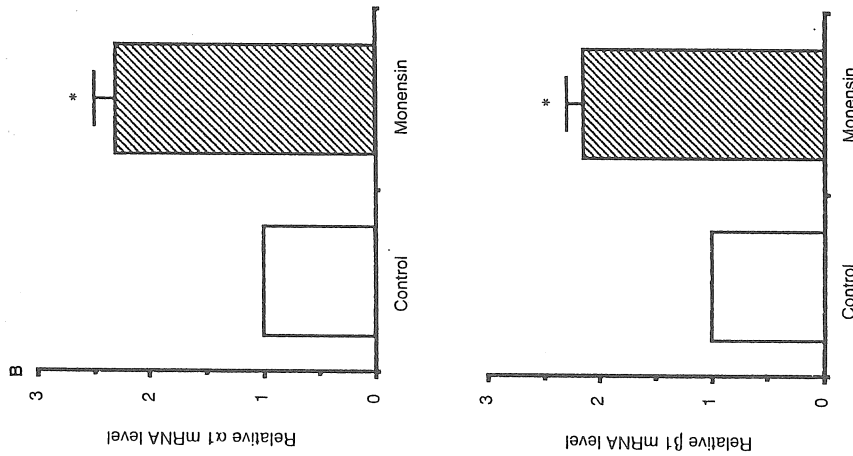


Fig. 14. Effects of the  $\text{Na}^+$  ionophore, monensin, on  $[\text{Na}^+]_i$  in NRK. NRK were exposed to  $\text{Ca}^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA (control) or  $\text{Ca}^{2+}$ -free DMEM containing 0.1 mmol/L EGTA plus monensin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) for three hours. The number of experiments done on control and monensin-treated NRK is five. \* $P < 0.001$  compared with control.



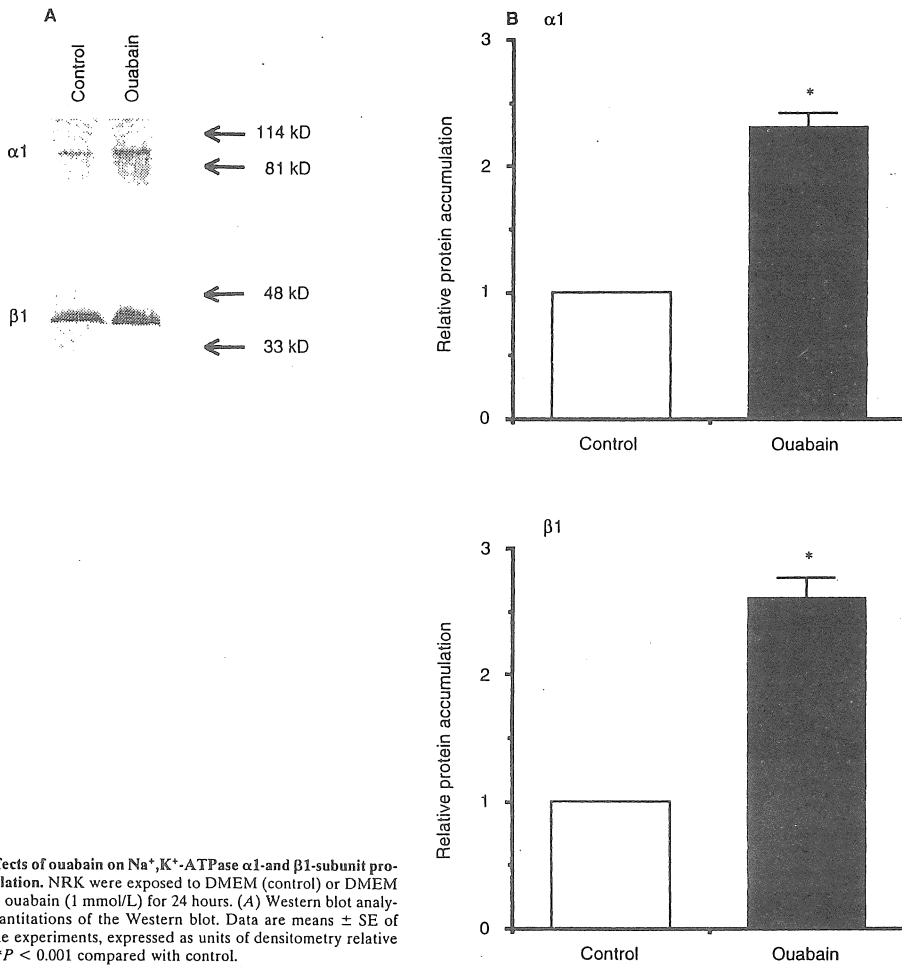


Fig. 16. Effects of ouabain on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -subunit protein accumulation. NRK were exposed to DMEM (control) or DMEM treated with ouabain (1 mmol/L) for 24 hours. (A) Western blot analyses. (B) Quantitations of the Western blot. Data are means  $\pm$  SE of four separate experiments, expressed as units of densitometry relative to control. \* $P < 0.001$  compared with control.

## Na<sup>+</sup> pump gene regulation in cultured renal tubule cells by changes in intracellular ionic concentrations

Shigeaki Muto, Yukio Miyata

Department of Nephrology, Jichi Medical School

### Summary

In a wide variety of cell systems, increases in cell Na<sup>+</sup> ([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) lead to an induction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase mRNA expression. On the other hand, the increase in [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> can also induce a rise in cell Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) through a secondary inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and a decrease in cell pH (pH<sub>i</sub>) through a secondary inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. It is not known whether [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and/or pH<sub>i</sub> directly modulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase mRNA expression. Therefore, we used normal rat kidney epithelial cells (NRK) to examine the effects of ouabain on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA accumulation by Northern blot analysis and the relationship between the mRNAs accumulation and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, or pH<sub>i</sub>. [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and pH<sub>i</sub> were measured using a Na<sup>+</sup>-sensitive fluorescent dye (SBFI), a Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dye (Fura-2), and a pH-sensitive fluorescent dye (BCECF), respectively. Ouabain (1 mM) significantly increased [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. Upon addition of ouabain,  $\alpha$ 1-mRNA levels increased to 2.3 times the control level at 3 hr, with a maximum 3.3-fold elevations at 12 hr.  $\beta$ 1-mRNA levels also increased to 2.4 times the control level at 3 hr, with a maximum 3.3-fold increase at 12 hr. The ouabain-mediated  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA induction was inhibited by both the RNA transcription inhibitor (actinomycin D) and the protein synthesis inhibitor (cycloheximide). Ouabain at 3 hr caused an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Similar increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, which were elicited by the Ca<sup>2+</sup> ionophore (ionomycin) in the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, had no effect on  $\alpha$ 1- or  $\beta$ 1-mRNA levels. In Ca<sup>2+</sup>-free medium treated with EGTA, ouabain at 3 hr caused a significant increase in [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> without any changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and also increased  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA levels. Ouabain at 3 hr caused a significant decrease in pH<sub>i</sub>. Similar decreases in pH<sub>i</sub>, which were elicited by the specific inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange (ethylisopropylamiloride), caused no effect on  $\alpha$ 1- or  $\beta$ 1-mRNA levels. Exposure of NRK to the Na<sup>+</sup> ionophore (monensin) in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> increased [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA levels. The increases in  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA levels upon addition of ouabain were associated with significant increases in  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-subunit proteins. We conclude that in NRK, ouabain causes an increase in [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, which directly modulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-mRNA accumulation.