

Title	有機酸の体内動態制御分子を介した腎上皮細胞内における有機酸濃度正常化戦略の構築
Sub Title	Developing the strategy to normalize organic acids concentration in renal epithelial cells via transporting regulation
Author	野口, 幸希(Noguchi, Saki)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2021
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>有機酸代謝異常によって生成した有機酸は尿中に排出される。中でもメチルマロン酸は、近位尿細管上皮細胞において腎毒性を呈することが知られる。腎近位尿細管上皮細胞へのメチルマロン酸取り込みに関わる分子を明らかにするため、尿細管上皮細胞に発現する有機アニオントランスポーターによるメチルマロン酸の基質認識を評価した。これまでに、近位尿細管基底側膜に発現する有機アニオントランスポーターOAT1を介したメチルマロン酸の取り込みは示された一方、OAT3を介したメチルマロン酸取り込みは示されていない。本研究では、近位尿細管刷子縁膜に発現する有機アニオントランスポーターであるOAT4によるメチルマロン酸の基質認識を明らかにするため、tetracycline誘導性OAT4発現細胞を用いて解析した。OAT4は、基質によって、細胞内ジカルボン酸との交換輸送による取り込み及び細胞外塩化物イオンとの交換輸送による排出のいずれの方向への基質輸送にも関与する。しかし、細胞外塩化物イオンの有無にかかわらずOAT4を介したメチルマロン酸の輸送は示されなかった。そこで、尿細管刷子縁膜におけるメチルマロン酸の取り込み機構を解析するために、ラット腎尿細管上皮細胞膜小胞を作成した。作成した膜小胞は、ほぼすべてが生体と同じ配向性を示すと算出され、ナトリウム依存性のD-glucose取り込みを示したことから、尿細管刷子縁における輸送機能を評価可能であると判断した。ラット腎刷子縁膜小胞を介した放射標識体メチルマロン酸の取り込みは、2分間、時間依存的に上昇し、4℃における取り込みは、37℃における取り込みの約20%であった。また、膜小胞を介した5分間のメチルマロン酸取り込みは、非標識メチルマロン酸10 mMまたはメチルマロン酸の構造異性体であるコハク酸10mMが小胞外液に存在することによって約50%減少した。これらより、近位尿細管刷子縁膜を介したメチルマロン酸輸送にはコハク酸感受性の輸送担体が介在することが示唆された。</p> <p>Organic acids generated by disorders of organic acid metabolism are excreted in the urine. Of them, methylmalonic acid, a metabolite of methylmalonyl-CoA, exerts renal toxicity in the proximal tubules. Since both renal excretion and reabsorption are estimated in its renal excretion, substrate recognition of methylmalonic acid by renal brush border and basal organic anion transporters (OATs) were examined. OAT4, a bidirectional organic anion transporter located in brush border membrane of human proximal tubules is proposed to use chloride ion as a counterpart of organic anion exchange. However, OAT4-mediated uptake of methylmalonic acid was not detected both in the presence or absence of extracellular chloride. Then, rat kidney vesicles were prepared to analyze the transport mechanism of methylmalonic acid through the proximal tubules. Almost all resultant vesicles indicated right-side-out orientation, and sodium ion-dependent D-glucose uptake by the vesicles were detected. Thus, the vesicles were judged to be able to evaluate the transport through the brush border membrane of proximal tubules. The uptake of methylmalonic acid by the vesicles time dependently increased over 2 min and the uptake at 4°C was decreased to 20% of the uptake at 37 °C. Furthermore, uptake of tritium labeled-methylmalonic acid by the vesicles at 5 min was decreased almost half by the existence of extracellular unlabeled methyl malonic acid (10 mM) and succinic acid (10 mM), structural isomer of methylmalonic acid. Therefore, involvement of succinic acid sensitive-transporter was suggested in the reabsorption mechanism of methyl malonic acid through brush border membrane of proximal tubules.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-00002020-0043

研究代表者	所属	薬学部	職名	助教	補助額	1,500 千円
	氏名	野口 幸希	氏名 (英語)	Saki Noguchi		
研究課題 (日本語)						
有機酸の体内動態制御分子を介した腎上皮細胞内における有機酸濃度正常化戦略の構築						
研究課題 (英訳)						
Developing the strategy to normalize organic acids concentration in renal epithelial cells via transporting regulation.						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
野口幸希 (Saki Noguchi)		薬学部・助教				
1. 研究成果実績の概要						
<p>有機酸代謝異常によって生成した有機酸は尿中に排出される。中でもメチルマロン酸は、近位尿細管上皮細胞において腎毒性を呈することが知られる。腎近位尿細管上皮細胞へのメチルマロン酸取り込みに関わる分子を明らかにするため、尿細管上皮細胞に発現する有機アニオントランスポーターによるメチルマロン酸の基質認識を評価した。これまでに、近位尿細管基底側膜に発現する有機アニオントランスポーター OAT1 を介したメチルマロン酸の取り込みは示された一方、OAT3 を介したメチルマロン酸取り込みは示されていない。本研究では、近位尿細管刷子縁膜に発現する有機アニオントランスポーターである OAT4 によるメチルマロン酸の基質認識を明らかにするため、tetracycline 誘導性 OAT4 発現細胞を用いて解析した。OAT4 は、基質によって、細胞内ジカルボン酸との交換輸送による取り込み及び細胞外塩化物イオンとの交換輸送による排出のいずれの方向への基質輸送にも関与する。しかし、細胞外塩化物イオンの有無にかかわらず OAT4 を介したメチルマロン酸の輸送は示されなかった。そこで、尿細管刷子縁膜におけるメチルマロン酸の取り込み機構を解析するために、ラット腎尿細管上皮細胞膜小胞を作成した。作成した膜小胞は、ほぼすべてが生体と同じ配向性を示すと算出され、ナトリウム依存性の D-glucose 取り込みを示したことから、尿細管刷子縁における輸送機能を評価可能であると判断した。ラット腎刷子縁膜小胞を介した放射標識体メチルマロン酸の取り込みは、2 分間、時間依存的に上昇し、4°C における取り込みは、37°C における取り込みの約 20% であった。また、膜小胞を介した 5 分間のメチルマロン酸取り込みは、非標識メチルマロン酸 10 mM またはメチルマロン酸の構造異性体であるコハク酸 10 mM が小胞外液に存在することによって約 50% 減少した。これらより、近位尿細管刷子縁膜を介したメチルマロン酸輸送にはコハク酸感受性の輸送担体が介在することが示唆された。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Organic acids generated by disorders of organic acid metabolism are excreted in the urine. Of them, methylmalonic acid, a metabolite of methylmalonyl-CoA, exerts renal toxicity in the proximal tubules. Since both renal excretion and reabsorption are estimated in its renal excretion, substrate recognition of methylmalonic acid by renal brush border and basal organic anion transporters (OATs) were examined. OAT4, a bidirectional organic anion transporter located in brush border membrane of human proximal tubules is proposed to use chloride ion as a counterpart of organic anion exchange. However, OAT4-mediated uptake of methylmalonic acid was not detected both in the presence or absence of extracellular chloride. Then, rat kidney vesicles were prepared to analyze the transport mechanism of methylmalonic acid through the proximal tubules. Almost all resultant vesicles indicated right-side-out orientation, and sodium ion-dependent D-glucose uptake by the vesicles were detected. Thus, the vesicles were judged to be able to evaluate the transport through the brush border membrane of proximal tubules. The uptake of methylmalonic acid by the vesicles time dependently increased over 2 min and the uptake at 4°C was decreased to 20% of the uptake at 37 °C. Furthermore, uptake of tritium labeled-methylmalonic acid by the vesicles at 5 min was decreased almost half by the existence of extracellular unlabeled methyl malonic acid (10 mM) and succinic acid (10 mM), structural isomer of methylmalonic acid. Therefore, involvement of succinic acid sensitive-transporter was suggested in the reabsorption mechanism of methyl malonic acid through brush border membrane of proximal tubules.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Noguchi S, Okochi M, Atsuta H, Kimura R, Fukumoto A, Takahashi K, Nishimura T, Tomi M	Substrate Recognition of Renally Eliminated Angiotensin II Receptor Blockers by Organic Anion Transporter 4	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	2020年10月			
Pan X, Noguchi S, Ando M, Nishimura T, Tomi M	MicroRNA-126 suppresses the invasion of trophoblast-model JEG-3 cells by targeting LIN28A	Biochemical and Biophysical Research Communications	2021年2月			
野口幸希、舟橋和毅、西村友宏、登美斉俊	Olmesartan の MDCK 細胞層透過における OAT4 介在輸送の方向性評価	日本薬剤学会第 35 年会	2020年5月			
三輪 晴香、野口 幸希、加島里菜、西村 友宏、登美 斉俊	OAT1 及び OAT3 を介したアンジオテンシン II 受容体拮抗薬輸送の評価	第 5 回トランスポーター研究会関東部会	2020年11月			