第15回 日本臨床薬理学会 1994年12月1～2日 アクトシティ浜松

ラット腎炭酸脱水酵素と Mg^{2+} - HCO_3^- -ATPase の活性に
及ぼすテストステロンとエストラジールの作用鈴木史郎*¹ 高村省三*¹ 吉田純子*¹
新沢泰子*¹ 丹波修*²

炭酸脱水酵素(CAと略)は血液を含めて種々の臓器に存在する。また近年はisozymeの同定が進み、臓器および細胞画分によりⅦ型まで判明しているが腎の細胞質におけるそれはⅡ型のみである。この酵素の今一つの特徴は、電解質膜輸送に関する役割と共に、種々のホルモンにより誘導または阻害を受ける点にある。既に性ホルモンによりラットの子宮、前立腺、肝などで本酵素の活性が調節され、動物種差、臓器特異性、性差の存在、更にisozymeによりホルモン応答の異なることが報告されている。一方、腎酵素系に対する性ホルモンの影響については、腎が性ホルモンの主要標的臓器とは見なされていないためか不明な点が多い。我々は、従来の研究で腎CAおよびこれと共役すると考えられる Mg^{2+} -依存、 HCO_3^- -賦活ATPase(ATPaseと略)の酵素活性に及ぼす副腎皮質ホルモン¹⁾、甲状腺ホルモン²⁾投与の影響を調べてきたが、今回は性ホルモン投与の影響について報告する。

【対象と方法】

正常および性腺摘出雌雄Wistarラット(生後8W)を用いた。各群にゴマ油で稀釈したプロビオン酸テストステロン(T; 1～3mg/kg体重/日、皮下、7日間)とジプロビオン酸エストラジール(E₂; 25～500μg/kg体重/日、皮下、7日間)をそれぞれ投与し、最終投与後24時間後に、ネブタール麻

酔下で股動脈より血液を採取後、ヘパリン加生食水で門脈、腹部大動脈より全身環流を行った。腎を取り出し、皮質の一部に 50mM D-mannitol-2mM Tris-HCl buffer (pH7.1, 4℃)を加え、20倍ホモジネートを作り、これに終末濃度10mMの $CaCl_2$ を加え3000gで15分遠心し、沈渣を捨て上清を43000gで20分遠心し、得られた上清はCA活性測定用試料とし、沈渣に上述 buffer を加えて再度ホモジナイズ、遠心し、刷子縁を含む沈渣を上述bufferに懸濁し、 Mg^{2+} -ATPaseおよび Mg^{2+} - HCO_3^- -ATPase活性測定用試料とした。

CA活性測定は、酵素標本に加えた飽和 CO_2 水のpH変化をphenol redを指示薬として測定する比色法により、ATPase活性は酵素標本に1mM $MgCl_2$, 50mM $NaHCO_3$, 3mM ATP, 50mM Tris-HCl buffer (pH 9.0, 37℃)を加え10分間振盪し、遊離する無機燐を測定し、酵素活性を $\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ で表した。血清中ホルモン濃度はRIA法により測定した。

【結果】

1. 正常雄ラットの腎細胞質CA活性に対し、Tは用量依存的にこれを抑制し、CA活性と血清中のT濃度の間に負の相関を認めた。しかし、Tは刷子縁ATPase活性に対しては影響を与えなかった。辜丸摘出は術後2WでCA活性を増加させたが、T補償は正常ラット同様これを抑制し、CA活性と血清中T濃度の間に負の相関が認められた。ATPase活性に対しては辜丸摘出、T補償いずれも影響を与えなかった。

*¹ 金沢医科大学薬理
〒920-02 石川県河北郡内灘町大学 1-1

*² 同 附属病院薬剤部

Experimental condition	Changes in enzyme activities	
	ATPase	CA
+ Testosterone		
Normal male rat	—	↓
Orchiectomy	—	↑
+ testosterone	—	↓
Normal female rat	—	↓
Oophorectomy	↓	—
+ testosterone	—	↓
+ Estradiol		
Normal male rat	↑	↑
Orchiectomy	—	↑
+ estradiol	↑	↑
Normal female rat	↑	—
Oophorectomy	↓	—
+ estradiol	↑	—

Fig. 1 Effects of testosterone and estradiol administration on rat kidney enzyme activities under various experimental conditions. ↑ increased, ↓ decreased, — unchanged

2. 正常雌ラットの腎細胞質CA活性はT投与により雄ラット同様抑制され、CA活性と血清中T濃度の間に負の相関が認められた。卵巣摘出はCA活性に影響を与えなかったが、T投与はこれを抑制した。ATPase活性は卵巣摘出により減少したがT投与はこれに影響を与えなかった。

3. 正常雄ラットに対するE₂の投与は腎細胞質CA活性と刷子縁ATPase活性を用量依存的に増加させ、両酵素活性と血清中E₂濃度の間に正の相関が認められた。睾丸摘出はCA活性を増加させ、ATPase活性に変化を与えなかったが、E₂投与は何れの酵素活性も増加させ、血清中E₂濃度との間に正の相関が認められた。

4. 正常雌ラットに対するE₂投与は刷子縁ATPase活性のみ増加させ、CA活性に影響を与えず、ATPase活性と血清中E₂濃度間には正の相関が認められた。卵巣摘出はATPase活性を減少させ、E₂補償はこれを逆に増加させ、血清中E₂濃度間に正の相関を認めたが、CA活性に対しては影響を与えなかった。

【考察】

本実験の結果をFig.1に示した。T投与は雌、雄ラット何れに対しても腎細胞質CA活性に対し抑制的に作用し、一方、E₂投与は雄ラット腎CA活性に促進的に作用し、TとE₂間に相反的な作用がみられたことは両ホルモンの拮抗作用を考えると興味

深い。腎CA活性に対する両ホルモンの拮抗作用の詳細は不明であるが、本実験の結果は腎の電解質輸送に対する両ホルモンの作用の違いを示すものと思われる。E₂は更に雄ラットATPase活性に対し促進的に作用し、CAとの間に共役がみられた。腎尿管刷子縁におけるHCO₃⁻-ATPaseの存在が報告されて以来久しい。本酵素は膜におけるCl⁻/HCO₃⁻の交換に関与していると推定されるが真の役割は未だ明かではない。

腎酵素系に対する両ホルモンの作用について、分子レベルでは標的と考えられる酵素蛋白の誘導、対応するmRNAの合成の有無を明かにする必要があるがこれらは今後の問題であろう。E₂(200μg/kg/日 × 7)による腎CAとATPaseの賦活はactinomycin D (30 μg/kg/日 × 3), cycloheximide (1mg/kg/日 × 3)の併用により抑えられるので³⁾ mRNAおよび蛋白の合成誘導が間接的に推定される。

【文献】

- 1) Suzuki, S., Ren, L.-J. and Chen, H.: Further studies on the effect of aldosterone on Mg²⁺-HCO₃⁻-ATPase and carbonic anhydrase from rat intestinal mucosa. J. steroid Biochem., 33: 89-99 (1989).
- 2) Suzuki, S., Chen, H., Takahashi, T. et al.: Effects of hyper- and hypothyroidism on carbonic anhydrase, Mg²⁺-dependent ATPase and Mg²⁺-dependent, HCO₃⁻-stimulated ATPase activities of rat duodenal mucosa and kidney cortex. J. Endocrinol., 126: 119-129 (1990).
- 3) Suzuki, S., Yoshida, J., Sugiki, K. et al.: Antagonistic effects of actinomycin D and cycloheximide on estradiol-induced activation of carbonic anhydrase, Mg²⁺-dependent ATPase and Mg²⁺-dependent, HCO₃⁻-stimulated ATPase in male rat kidney: studies with crude enzyme samples. Steroid Biochem. (Life sci. Adv.), 12: 52-60 (1993).