

ラット毛細胆管側肝細胞膜における 胆汁酸の一次性能動輸送について

北野元一

近畿大学医学部第2内科学教室

The primary active transport of bile acid in rat liver
canalicular membrane vesicles

Motokazu Kitano

Second Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

ATP-dependent primary active transport of bile acid was studied by using taurocholate, the major bile acid in humans and rats, in vesicles enriched in rat liver canalicular plasma membranes. Incubation of canalicular membrane vesicles with taurocholate in the presence of ATP and magnesium ion (Mg^{2+}), resulted in a stimulated uptake of taurocholate into the vesicles. An increase in the Mg^{2+} concentration from 100 $\mu\text{mol/l}$ to 10 mmol/l in the presence of 1 mmol/l ATP and ATP-regenerating system, caused an increase in the taurocholate uptake to the level of saturation in a concentration dependent manner ($K_m=400 \mu\text{mol/l}$). Replacement of Mg^{2+} with the same concentration of manganese ion, cobalt ion and cadmium ion, caused a decrease in ATP-dependent taurocholate transport to 70%, 38% and 53%, respectively. Other bile acids such as glycocholic acid and taurodeoxycholic acid had dose-dependent inhibitory effects on ATP-dependent active transport of taurocholate, but non-bile acid organic anions such as glutathione and cefpiramide had only weak or no inhibitory effects. Sulfated bile acids such as tauroolithocholic acid 3-O-sulfate inhibited ATP-dependent taurocholate transport competitively ($K_i=23 \mu\text{mol/l}$), which was in contradiction to the hypothesis that separate transport systems in the rat liver exist for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids.

Key words : bile acid, transport, canalicular membrane vesicles, ATP, taurocholate

緒 言

胆汁酸は胆汁の主要な構成成分で、肝臓でコレステロールから生成され、肝→胆道系→十二

指腸→空腸→回腸→門脈→肝を巡る閉鎖的腸肝循環を行い、この間において胆汁の生成・小腸内における脂肪の消化吸収に関与するという肝代謝物質の中でも極めて重要な有機陰イオンで

ある¹。

この循環の中で、胆汁中の胆汁酸濃度は肝細胞内の胆汁酸濃度の数十倍もあるために、肝細胞から毛細胆管への分泌は特別な輸送機構が存在し、濃度勾配に逆らっての能動輸送であると推定されていた²。

だが、胆汁酸の肝細胞内の輸送過程には類洞側肝細胞膜での摂取、細胞内 ligandin との結合、タウリンやグリシンとの抱合と様々な段階があり、*in vivo* での観察により肝細胞から毛細胆管への分泌を詳細に解析することは非常に困難である³。

また肝細胞膜を使った *in vitro* の実験においても、類洞側と毛細胆管側とでその特性・役割が全く異なること、毛細胆管側肝細胞膜が全肝細胞膜の10%しか無いことから⁴、肝細胞膜全体を用いての実験では毛細胆管側肝細胞膜における胆汁酸輸送を観察することは不可能であった。

近年、毛細胆管側肝細胞膜空胞 (CMV) のみを分離する方法を Inoue ら⁶、Meier ら⁵ が報告し、これを用いることによって、毛細胆管側肝細胞膜におけるタウロコール酸の輸送が膜内外の電位差 (肝細胞内が -40 mV 負電位) を駆動力とする担体輸送であると報告した^{7,8}。しかしながら電位差のみを駆動力として形成される濃度勾配はせいぜい4~5倍であり、実在する数十倍の濃度勾配を説明するのは不十分であった⁹。

本研究はタウロコール酸輸送駆動力を CMV を用いて急速濾過法で観察し、適正な輸送駆動力といえる ATP に依存する一次性能動輸送の存在を明らかにするとともに、その輸送機構の詳細について検討した。

方 法

1. 試薬

[³H]taurocholate (185 GBq/mmol) は、New England Nuclear (Boston, MA, USA) から購入した。ATP, ADP, AMP, Adenosine, creatinephosphate, creatine phosphokinase,

neuroaminidase (type 4), taurocholic acid (TC), taurodeoxycholic acid (TDC), tauro-lithocholic acid 3-O-sulfate (TLCS), glutathione (GSH), glycocholic acid (GC) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬は和光純薬 (大阪) より購入した。cefpiramide sodium (C-PM) は住友製薬株式会社より提供をうけた。

2. 動物

体重約 250—300 g の雄 Sprague-Dawley (SD) ラットは、日本 SLC (浜松市) より購入した。一定の温度 (23°C)、湿度 (50%)、光 (12時間周期) の条件で飼育し、水と飼料は自由に与えた。

3. CMV の調整

SD ラット肝より、Inoue⁶ らの方法に拠ってカルシウム添加分画遠心法と nitrogen cavitation により調整した。調整した CMV は 0.25 mol/l saccharose と 0.2 mmol/l CaCl₂ を含む 10 mmol/l HEPES-KOH buffer (pH 7.4) に懸濁して、液体窒素中で保存し、1ヶ月以内に使用した。

調整直後の CMV と、液体窒素中に1ヶ月保存後の CMV とで、TC 輸送や酵素活性に差は認めなかった。

4. CMV の検討

Na⁺K⁺-adenosine triphosphatase (Na⁺K⁺-ATPase) と Mg²⁺-adenosine triphosphatase (Mg²⁺-ATPase) 活性は Sharshmidt ら¹⁰ の方法で、Alkaline phosphatase (ALP) 活性は Bessey ら¹¹ の方法で、acid phosphatase 活性は Walter ら¹² の方法で、succinate dehydrogenase 活性は King ら¹³ の方法で、NADH dehydrogenase 活性は Wallach ら¹⁴ の方法で各々測定した。蛋白量の測定は Bradford¹⁵ の方法にて測定した。

5. CMV の sidedness の検討

毛細胆管側肝細胞膜において、シアル酸は毛細胆管面にのみ分布しており、この性質を利用して、CMV の inside-out (空胞の表面が細胞質面) と right side-out (空胞の表面が毛細胆

管面)の割合を, Warren のシアル酸測定法¹⁶を用いて決定した.

すなわち CMV 0.1 ml (300 µg) に, A 液 (0.1 mg/ml シアリダーゼ水溶液 0.1 ml) または B 液 (0.1 mg/ml シアリダーゼ+0.2% Triton X-100 の水溶液 0.1 ml) を加えて 22°C, 30分 incubation した. ついで, この CMV 含有液 0.2 ml に 0.2 mmol/l 過ヨウ素酸 0.1 ml を添加後, 室温 20分間放置した. 10% 亜ヒ酸 1 ml を加え, 黄褐色の消えるまで振り混和した. さらに 0.6% チオバルビタール酸 3 ml を加え, 100°C 15分間加温した. 水冷後シクロヘキサノン 5 ml を加えて混和抽出し, 2,000 rpm, 5分遠心した. そしてシクロヘキサノン層に遊離したシアル酸を吸光度 550 nm で比色した. シアリダーゼのみの A 液を加えたものは, CMV 外面にあるシアル酸のみ遊離し, シアリダーゼ+0.2% Triton X-100 の B 液を加えたものは, CMV 外面と内面双方のシアル酸が遊離する. よって, inside-out の CMV の比率は, $(1 - A \text{ 液での吸光度} / B \text{ 液での吸光度}) \times 100\%$ で求めた.

6. ATP 濃度変化の検討

HPLC システム (Waters' Associates, Milford, MA, USA) を使用して, Bodola の方法¹⁷で測定した. カラムは Puresil C18 (Waters) を用いて, 移動相の流量 0.5 ml/min で逆相の gradient 溶出を行い, 254 nm の吸光度を測定した. 移動相は, 12.5 mmol/l triethylamine, 4 mmol/l tetrabutylammonium hydrogensulfate を含有する 0.125 mol/l phosphate buffer (pH 6.5) に 3% acetonitrile を添加して調整した.

スタンダードサンプルは, Adenosine, ATP, ADP, AMP を 400 ng/20 µl になるように 0.1 mol/l phosphate buffer (pH 6.5) に溶解し, その 20 µl を注入した.

CMV 懸濁液 (蛋白量 80 µg) を反応液 (最終濃度で 0.25 mol/l saccharose, 0.2 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l HEPES-KOH buffer (pH 7.4), ATP 1 mmol/l, ATP-

regenerating system¹⁸ (creatine phosphate 10 mmol/l, creatine phosphokinase 100 µg/ml) に加えて, 反応開始後 20秒・60秒・100秒・150秒にてサンプルは 10 µl ずつとり, 素早く液体窒素で凍結して反応を停止し, その後 0.3 mol/l HClO₄ 1 ml を加えて homogenize し遠沈後, 上清に 4.5% の 10 mol/l KOH を加え中性にし, さらに遠沈して KClO₄ を除き, 上清を 0.1 mol/l phosphate buffer (pH 6.5) で 100倍希釈して, その 20 µl を HPLC に注入した.

そして, スタンダードとの比較によりサンプル中の ATP, ADP, AMP の濃度を測定した.

7. CMV への TC 摂取の観察

SD ラットから得られた CMV への [³H]TC の摂取は Lücke ら¹⁹ の急速濾過法にて観察した.

凍結した CMV 懸濁液を 37°C で急速に解凍し, 26G のシリンジで 10回 vesiculation 後, 使用まで氷上にて保存した.

[³H]TC の摂取の観察においては, 種々の濃度の [³H]TC を含む反応液 (最終濃度で 0.25 mol/l saccharose, 0.2 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l HEPES-KOH buffer (pH 7.4), ATP 1 mmol/l, creatine phosphate 10 mmol/l, creatine phosphokinase 100 µg/ml) 130 µl に一定量の CMV 懸濁液 (蛋白量 60~100 µg) 20 µl を加えて, 37°C で加温混和する. 20秒後, 60秒後に反応液より 20 µl を分取し, 0°C の反応停止液 (0.25 mol/l saccharose, 0.2 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l HEPES-KOH buffer (pH 7.4), 1 mmol/l TC) 1 ml に加えて反応を停止し, ただちに試料をミリポアーフィルター (HA, 0.45 µm, Millipore continental, Bedford, MA, USA) 上にて急速濾過を行った. そして, 引き続きフィルターを反応停止液 8 ml で洗浄した. 反応停止液には, [³H]TC の CMV への非特異的吸着を減少させる目的で 1 mmol/l TC を加えた. フィルター上の CMV の放射性活性を, Filter Count (Packard Inst. Co. USA)

で溶解し、460-C 液体シンチレーションカウンター (Packard Inst. Co. USA) にて測定した。

反応液に対しては、種々の条件を設定した。ATP 依存性摂取は、ATP 1 mmol/l 存在下の値から非存在下の値を差しひいて決定した。反応液中の ATP を種々の濃度に設定して、ATP 依存性摂取の変化を観察して ATP 濃度依存性を検討した。Mg 濃度依存性の検討には、反応液中の $MgCl_2$ を種々の濃度に設定して、ATP 依存性摂取の変化を観察した。各種 2 価イオンの影響を観察する場合には、10 mmol/l $MgCl_2$ の代わりに 10 mmol/l の $MnCl_2$, $CoCl_2$ 又は $CdCl_2$ を加えた。非胆汁酸有機アニオン (CPM, GSH) や各種胆汁酸 (GC, TDC, TLCS) による ATP 依存性 TC 摂取への影響を観察する

場合には、反応液に種々の濃度の物質を加えて、その変化を観察した。TC と TLCS との競合阻害を観察する場合は、種々の濃度 (25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 75 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) の $[^3\text{H}]$ TC を含む反応液に、一定の濃度 (50 $\mu\text{mol/l}$) の TLCS を加えて、ATP 依存性摂取の変化を観察した。

統計処理

データは $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表し、統計計算は Student's t-test により行った。

成 績

1. CMV の酵素活性と sidedness

SD ラットの CMV の純度を膜マーカー酵素にて検討した。

Table 1 に示すように、毛細胆管側肝細胞膜

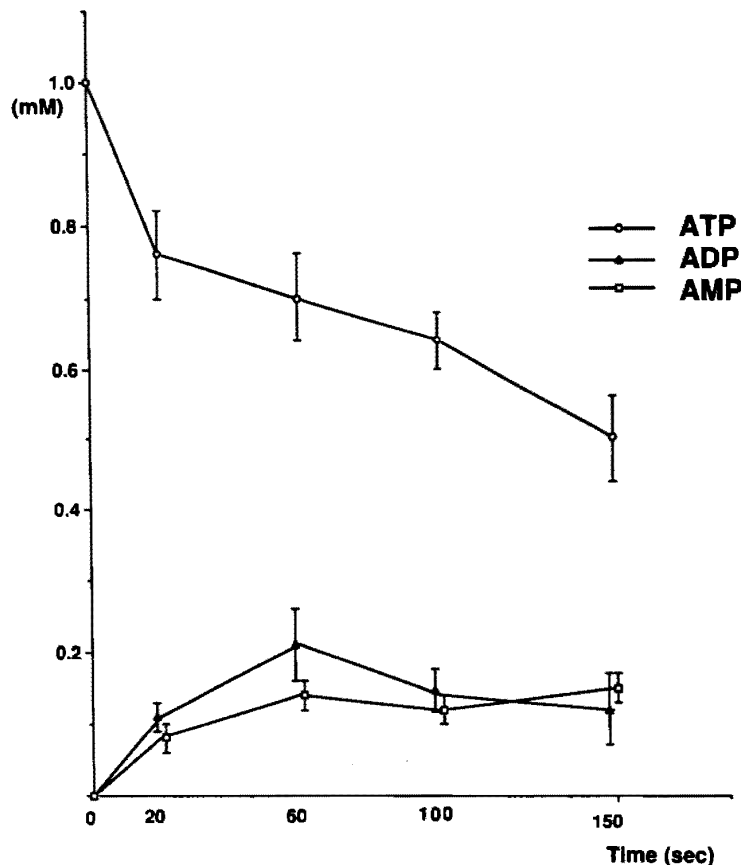


Fig. 1 Changes of ATP, ADP, and AMP concentration in the incubation medium after incubation of CMV with ATP and ATP-regenerating system

CMV were incubated with 1 mmol/l ATP and ATP-regenerating system at 37°C. Open circles represent ATP concentration, open triangles ADP concentration, and open squares AMP concentration in the incubation medium. Data are presented as $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

Table 1 Characterization of membrane marker enzymes

Marker enzymes	Relative enrichment to homogenate
Mg ²⁺ -ATP ase	38.9±12.2
Na ⁺ , K ⁺ -ATP ase	1.91±3.32
Alkaline phosphatase	102.8±21.3
Acid phosphatase	0.30±0.48
NADH dehydrogenase	0.45±0.36
Succinate dehydrogenase	0.37±0.34

Results are expressed as mean±SD (n=5)

に特異的な Mg²⁺-ATPase や ALP は homogenate に対して高い濃縮率を示した。それに対し、類洞側肝細胞膜に特異的な Na⁺K⁺-ATPase、ライソゾームに特異的な acid phosphatase、ミトコンドリアに特異的な succinate dehydrogenase、ミクロゾームに特異的な NADH dehydrogenase の濃縮率は低く、Inoue ら⁶ の報告した値とほぼ変わりなかった。また CMV の sidedness は、inside-out が15%、right side-out が85% (n=2) であった。

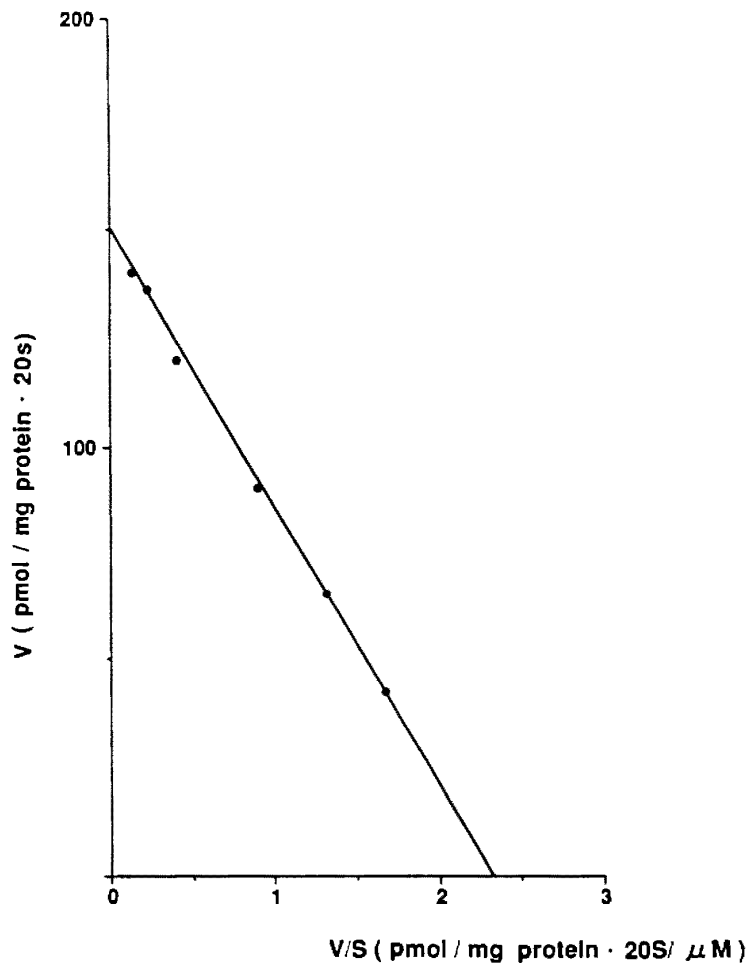


Fig. 2 Eadie-Hofstee plot of ATP-dependent TC uptake in the presence of various concentration of ATP

CMV were incubated with 50 μmol/l [³H] TC in the presence of various concentration of ATP and ATP-regenerating system in 150 μl of the incubation medium. After a 20s incubation at 37°C, vesicle-associated radioactivity was measured. ATP-dependent TC uptake was obtained from the difference in the presence and absence of ATP. ATP-dependent uptake increased to saturation with increasing concentrations of ATP (K_m=64μmol/l). The obtained data were applied for the Eadie-Hofstee plot. Each point represents the mean of 4 independent determinations,

V : TC uptake

S : ATP concentration

2. ATP 濃度変化

1 mmol/l ATP と ATP-regenerating system 存在下で, CMV 添加後の transport buffer 中の各ヌクレオチドの濃度変化を Figure 1 に示す.

20秒後, 60秒後においても ATP 濃度は反応開始前の7割以上に維持されていた.

3. TC の CMV における ATP 依存性摂取の存在

反応液中の ATP 濃度を 25 $\mu\text{mol/l}$ から 1 mmol/l まで設定して, ATP-regenerating system 存在下にて, 50 $\mu\text{mol/l}$ の $[^3\text{H}]$ TC の ATP 依存性摂取の変化を観察した. ATP 濃度の増加と共に, TC の ATP 依存性摂取は増加し飽和傾向を示した. これを酵素 Kinetics における Eadie-Hofstee plot, すなわち Y 軸に TC の摂取量, X 軸に TC の摂取量/基質の ATP 量をあてはめると直線関係が得られた (Fig. 2). この直線の勾配が Michalis 定数である $-K_m$ であり, Figure 2 より K_m は 64 $\mu\text{mol/l}$ と求められた.

4. Mg^{2+} イオンの ATP 依存性 TC 摂取に及ぼす影響

反応液中の 10 mmol/l MgCl_2 存在下と非存在下において ATP 依存性の TC 摂取を比較すると, MgCl_2 存在下に比べて非存在下では全く ATP 依存性の摂取が観察されなかった (Fig. 3). つぎに反応液中の MgCl_2 濃度を 100 $\mu\text{mol/l}$ から 10 mmol/l まで設定して, ATP 1 mmol/l と ATP-regenerating system 存在下にて, 50 $\mu\text{mol/l}$ の $[^3\text{H}]$ TC の ATP 依存性摂取の変化を観察した. MgCl_2 濃度の増加と共に, TC の ATP 依存性摂取は増加し飽和傾向を示した (Fig. 4). Eadie-Hofstee plot にて K_m を求めると 400 $\mu\text{mol/l}$ であった (Fig. 5).

5. 各種二価陽イオン (Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) の ATP 依存性 TC 摂取に及ぼす影響

反応液中の MgCl_2 の代わりに各々同濃度の MnCl_2 , CoCl_2 又は CdCl_2 を加えた状態において, 50 $\mu\text{mol/l}$ の $[^3\text{H}]$ TC の ATP 依存性摂取

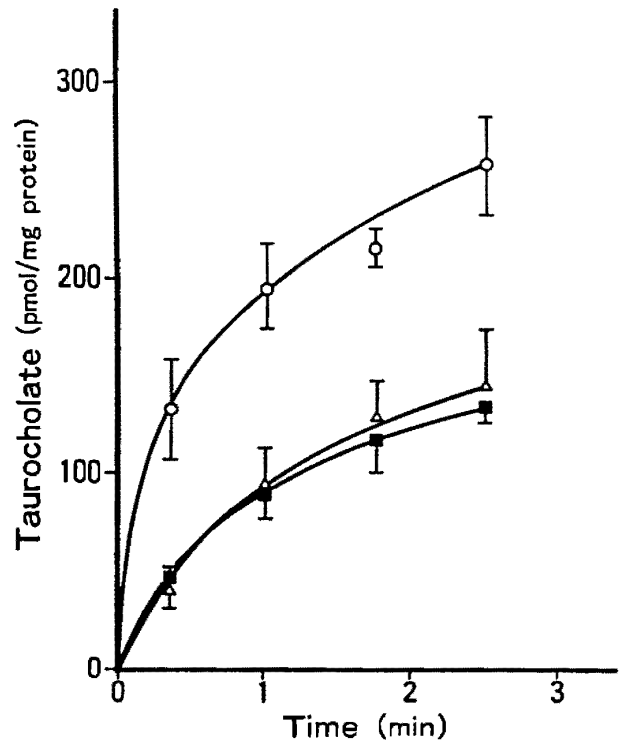


Fig. 3 Effect of Mg^{2+} on TC uptake by CMV. TC uptake by CMV was observed at 37°C. The $[^3\text{H}]$ TC concentration was 50 $\mu\text{mol/l}$. Open circles represent TC uptake in the presence of 10 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l ATP and ATP-regenerating system. Solid squares represent TC uptake in the absence of 10 mmol/l MgCl_2 and in the presence of 1 mmol/l ATP and ATP-regenerating system. Open triangles represent TC uptake in the presence of 10 mmol/l MgCl_2 and in the absence of ATP and ATP-regenerating system. Data are presented as mean \pm SD ($n=3$).

取を比較した. 反応液中に MgCl_2 を用いた場合の摂取を100%とすると, MnCl_2 , CoCl_2 又は CdCl_2 を用いた場合には各々70%, 38%, 53%であった (Fig. 6).

6. 各種胆汁酸の ATP 依存性 TC 摂取に及ぼす影響

50 $\mu\text{mol/l}$ の $[^3\text{H}]$ TC に対して TDC を 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ 同様に GC を 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ 加えると用量依存性に TC の ATP 依存性摂取は抑制された. 200 $\mu\text{mol/l}$ の TDC を添加すると, 摂取は非添加時の約20%までに抑制された

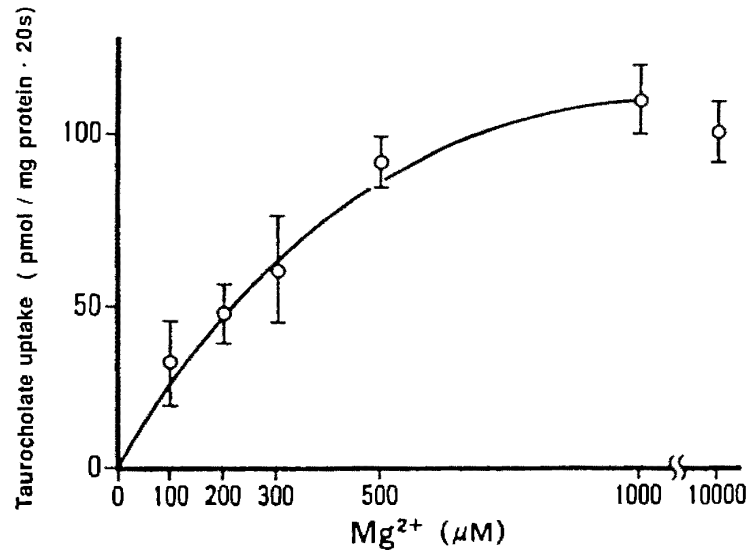


Fig. 4 Effect of Mg²⁺ concentration on ATP-dependent TC uptake by CMV

CMV were incubated with 50 μmol/l [³H] TC, 1mmol/l ATP and ATP-regenerating system, and various concentrations of Mg Cl₂ in 150 μl of incubation medium. After a 20s incubation at 37°C, vesicle-associated radioactivity was measured. ATP-dependent TC uptake was obtained from the difference in the presence and absence of MgCl₂. Data are presented as mean ± SD (n=4).

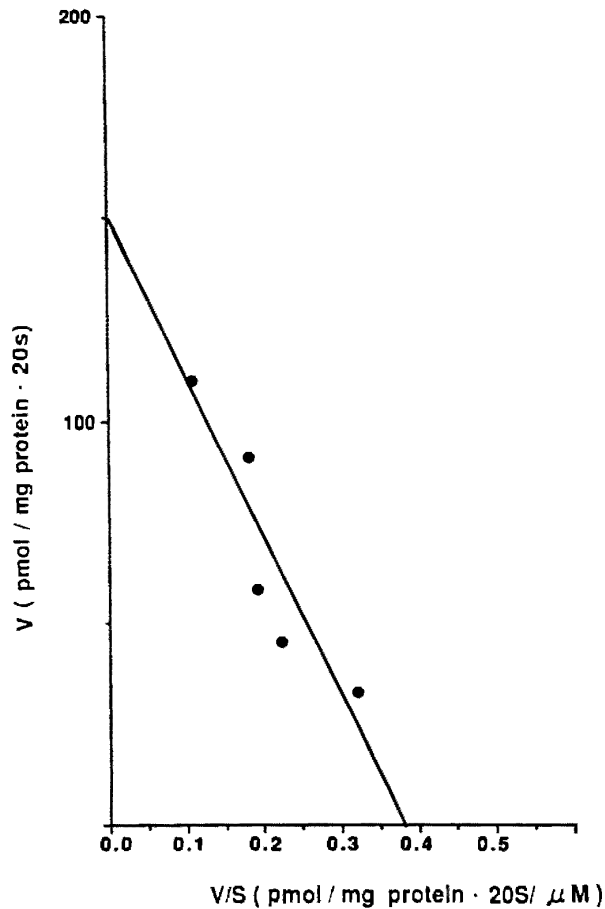


Fig. 5 Eadie-Hofstee plot of effect of Mg²⁺ concentration on TC uptake by CMV

The data obtained from Figure 4 were applied for Eadie-Hofstee plot (K_m=400 μmol/l).

V : TC uptake S : Mg²⁺ concentration

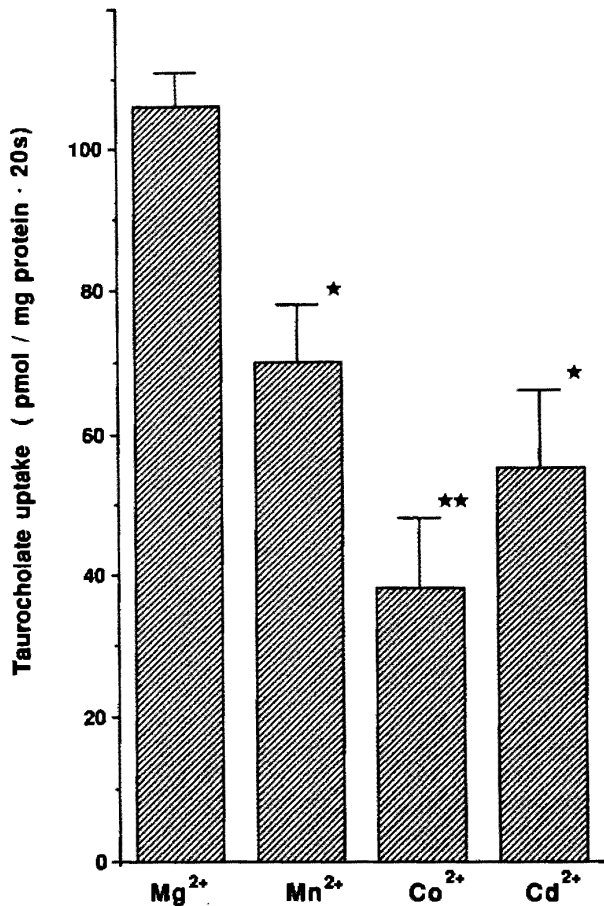


Fig. 6 Effect of divalent cations on ATP-dependent TC uptake by CMV

ATP-dependent TC uptake was measured by replacing 10 mmol/l Mg²⁺ with the same concentration of other divalent cations. [³H] TC concentration was 50 μmol/l. Divalent cation stimulated ATP-dependent TC uptake was obtained from the difference in the presence and absence of divalent cation at 37°C. Data are presented as mean ±SD (n=4)

★: p<0.05 compared to Mg²⁺

★★: p<0.01 compared to Mg²⁺

(Fig. 7). GC 添加の場合もほぼ同様であった (Fig. 8).

7. 硫酸抱合型胆汁酸の ATP 依存性 TC 摂取に及ぼす影響

50 μmol/l の [³H]TC に対して TLCS 50 μmol/l, 又は 100 μmol/l を, 10 μmol/l の [³H]TC に対して TLCS 10 μmol/l, 20 μmol/l, 又は 50 μmol/l を, 1 μmol/l の [³H]TC に対して, TLCS 1 μmol/l, 5 μmol/l, 又は 10

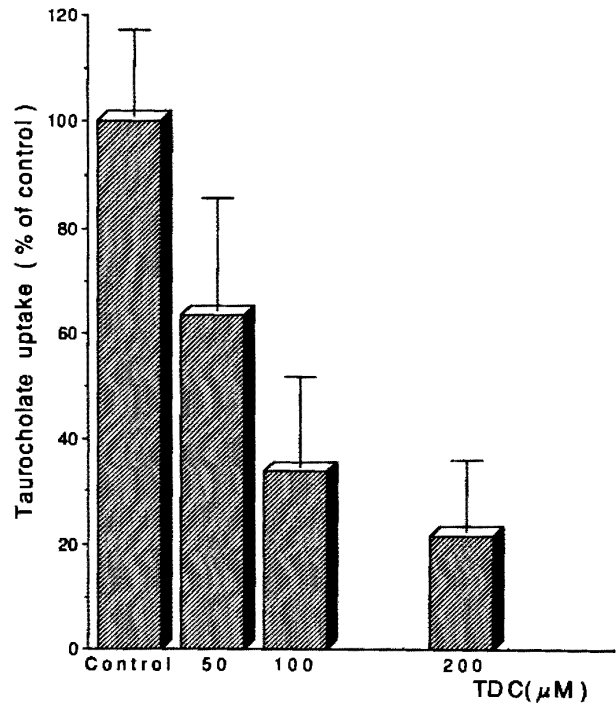


Fig. 7 Dose-dependent inhibition of TC uptake by TDC

CMV were incubated with 50 μmol/l [³H] TC at 37°C in the presence of various concentration of TDC (50 μmol/l, 100 μmol/l, 200 μmol/l). Values are expressed as percentages of the uptake in the absence of TDC. Data are presented as mean values ±SD (n=4).

Table 2 Dose-dependent inhibition of TC uptake by TLCS

[³ H] TC concentration	Inhibitor	% of control
[³ H] TC 50 μM	control	100 ± 8.8
	TLCS 50 μM	43.2 ± 14.4
	TLCS 100 μM	15.6 ± 8.3
[³ H] TC 10 μM	control	100 ± 10.5
	TLCS 10 μM	78.5 ± 10.3
	TLCS 20 μM	55.0 ± 9.1
	TLCS 50 μM	42.5 ± 9.9
[³ H] TC 1 μM	control	100 ± 11.9
	TLCS 1 μM	77.9 ± 7.3
	TLCS 5 μM	45.1 ± 6.9
	TLCS 10 μM	24.0 ± 10.7

ATP-dependent TC uptake by CMV was measured at [³H]-TC concentration of 1, 10, and 50 μM. The indicated concentration of TLCS was added to the incubation medium. Results are expressed as mean ±SD (n=3).

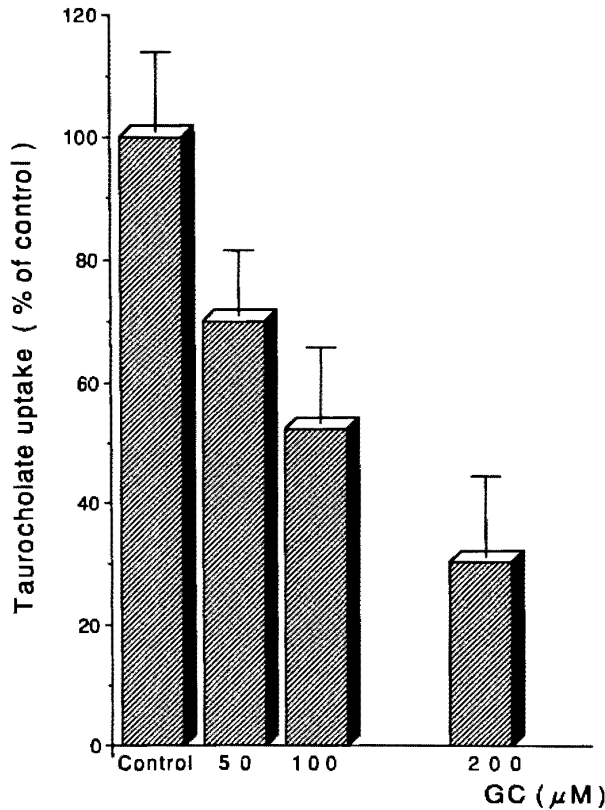


Fig. 8 Dose-dependent inhibition of TC uptake by GC

CMV were incubated with 50 μmol/l [³H] TC at 37°C in the presence of various concentration of GC (50 μmol/l, 100 μmol/l, 200 μmol/l). Values are expressed as percentages of the uptake in the absence of GC. Data are presented as mean values ± SD (n=4).

μmol/l を各々反応液に加えて ATP 依存性 TC 摂取を観察した. TC の高濃度においても低濃度においても TLCS が用量依存性に ATP 依存性 TC 摂取を抑制するのが観察された (Table 2).

ついで反応液中の [³H]TC を 25 μmol/l, 50 μmol/l, 75 μmol/l, 100 μmol/l まで設定し, 50 μmol/l の TLCS の存在下と非存在下で TC の ATP 依存性摂取を観察した.

得られたデータを Eadie-Hofstee plot で表現すると, TLCS 存在下と非存在下はそれぞれ Y 軸上で交差する直線を形成し, TLCS による TC 摂取への競合阻害が酵素 Kinetics と同様の概念により認められた.

競合阻害の場合, TLCS 非存在下の勾配 =

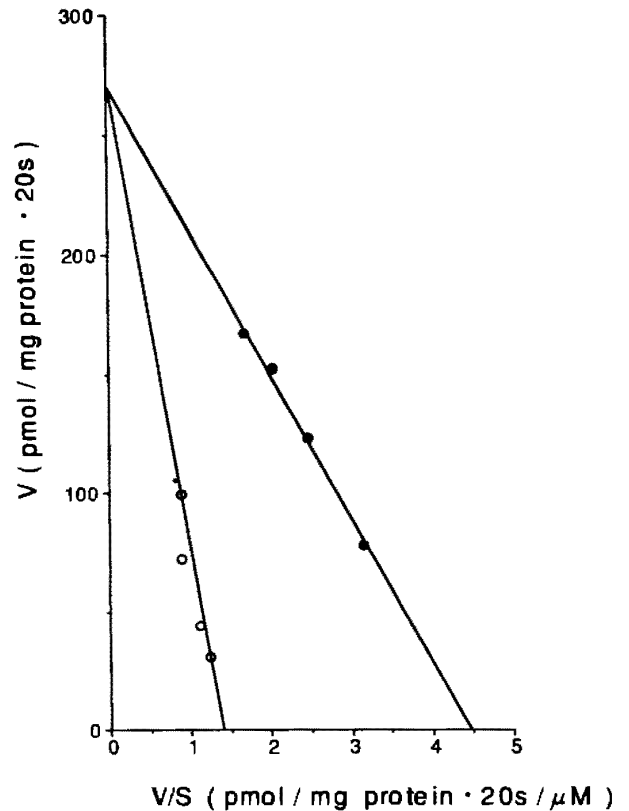


Fig. 9 Eadie-Hofstee plot of ATP-dependent TC uptake showing competitive inhibition by TLCS

The ATP-dependent TC uptake rate was measured by using various concentrations of [³H] TC in the presence (○) or absence (●) of 50 μmol/l TLCS. Using the apparent Km calculated for TC uptake a Ki of 23 μmol/l was calculated for TLCS. Each point represents the mean of 4 independent determinations.

V : TC uptake
S : TC concentration

TLCS 存在下の勾配 × (1 + TLCS 濃度 / Ki) の関係が成立し, これから阻害定数の Ki が 23 μmol/l と求められた (Fig. 9).

8. 非胆汁酸有機アニオンの ATP 依存性 TC 摂取に及ぼす影響

50 μmol/l の [³H]TC に対して CPM を 50 μmol/l, 100 μmol/l, 200 μmol/l, 又は 500 μmol/l, あるいは GSH を 100 μmol/l, 500 μmol/l の濃度で反応液に加えて ATP 依存性 TC 摂取の変化を観察した.

CPM は用量依存的に TC 摂取を抑制する

も、その影響は弱く TC の10倍濃度 500 $\mu\text{mol/l}$ を加えても TC 摂取は5割程度維持された (Fig. 10).

GSH 添加の場合は TC 摂取の抑制はほとんど認められず、10倍濃度 500 $\mu\text{mol/l}$ を加えても余り変化はなかった (Fig. 11).

考 察

今回著者が Inoue らの方法に従って精製した CMV の各マーカー酵素の値を Table 1 に示す。類洞側肝細胞膜や他の細胞分画 (ミトコンドリア, ライソゾーム, ミクロゾーム) の混入は少なく, CMV の精製度は Inoue らの報告した値におおむね一致し, 観察には充分であると考えられた。

つぎに CMV の sidedness の問題であるが, 著者ら²⁰の報告により TC の ATP 依存性輸送は直接 ATP を水解し, そのエネルギー

により物質を運ぶ一次性能動輸送であることから, 輸送担体に ATP の結合と ATPase としての酵素活性が必要である。これらの酵素活性は right side-out のみの CMV では TC 輸送は全く見られない²¹ ことから, おそらく膜の細胞内側面に存在するものと推定されている。著者の精製した CMV では inside-out は15%であり, 他の報告²¹ とほぼ同様であり十分に観察可能な割合である。

また毛細胆管側肝細胞膜には, その役割が全く不明である ecto-enzyme の $\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ が存在²² し, この種の実験で反応液中の ATP を急速に消耗させるため観察の障害となる可能性がある。このため著者は予備実験として ATP-regenerating system¹⁸ を CMV を含む反応液に加えて ATP 濃度の時間的変化を観察したが, 20秒後・60秒後共に反応開始前の70%以上の濃度を維持しており, 反応の20秒後で

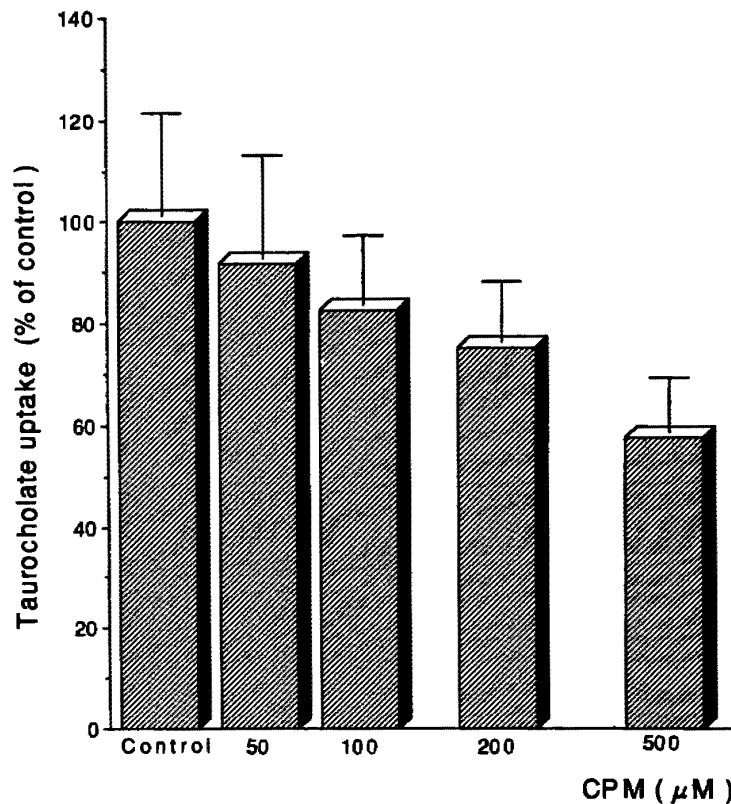


Fig. 10 Dose-dependent inhibition of TC uptake by CPM

CMV were incubated with 50 $\mu\text{mol/l}$ [^3H] TC at 37°C in the presence of various concentrations of CPM (50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$). Values are expressed as percentages of the uptake in the absence of CPM. Data are presented as mean values \pm SD (n=4).

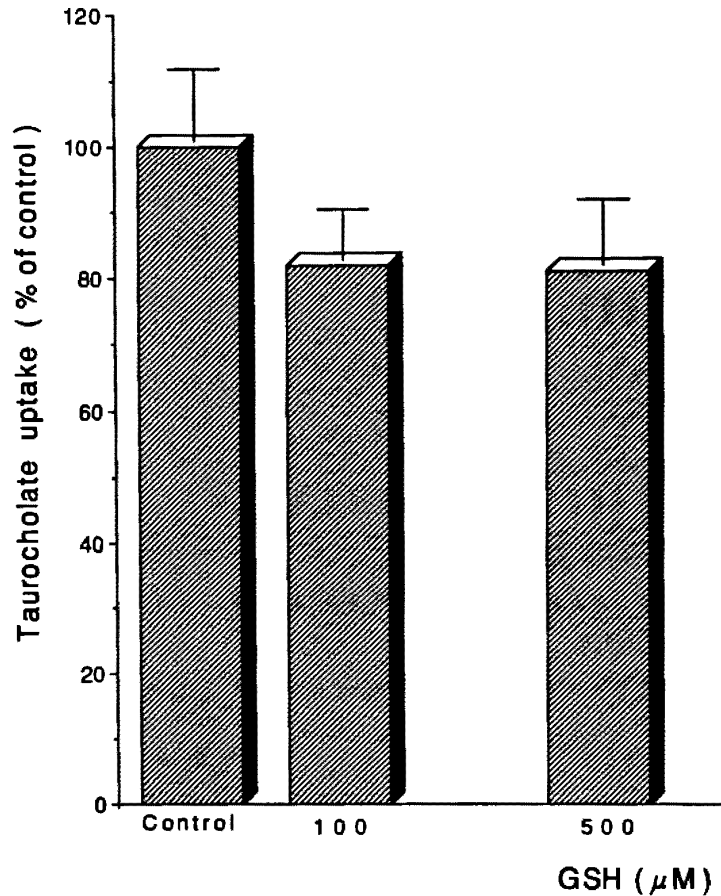


Fig. 11 Dose-dependent inhibition of TC uptake by GSH

CMV were incubated with $50\mu\text{mol/l}$ [^3H] TC at 37°C in the presence of various concentrations of GSH ($100\mu\text{mol/l}$, $500\mu\text{mol/l}$). Values are expressed as percentages of the uptake in the absence of GSH. Data are presented as mean values \pm SD ($n=4$).

は TC 摂取の観察において ATP の濃度低下を考慮する必要は無いものと考えた。

CMV での TC 摂取は Na^+ と K^+ の非存在下で ATP 濃度依存性に増加し飽和現象を示した。これは、すでに報告した²⁰ 各ヌクレオチドにおける ATP の特異性が際立っていること、ATP の非水解化アナログである Adenosine 5'-(β, γ -imino) triphosphate では TC 摂取を刺激しないこと、そして各種 ATPase 阻害剤であるバナデートにより TC 摂取が抑制されること、すなわち直接の ATP 水解の必要性等とともに、ATP 依存性の TC の一次性能動輸送の存在を示している。CMV における TC の一次性能動輸送は、胆汁酸の肝細胞内と毛細胆管の間の濃度勾配を考える上で合理的かつ生理的に重要であると考えられる。

つぎに ATP 飽和曲線の解析において著者の得た K_m は $64\mu\text{mol/l}$ であったが、これに対し Nishida ら²³ は $670\mu\text{mol/l}$, Müller²⁴ らは $800\mu\text{mol/l}$ と高濃度の K_m を報告している。この違いの理由としては著者が [^3H]TC を各報告^{7,8,20,24} での TC の K_m に近い $50\mu\text{mol/l}$ を反応液に加えているのに、他者は共に $5\mu\text{mol/l}$ しか [^3H]TC を加えておらず、そのため TC 摂取が飽和に達するのに時間がかかり、ATP の必要量が多くなったためと考える。2 個以上の基質が存在する場合、一方の観察のときは他方は飽和した条件でないと、結果に影響を及ぼす可能性があり、よって K_m 近くの値で観察した方が条件設定が合理的であろう。

いっぽう Ishikawa は²⁵, 赤血球膜や心筋細胞膜に存在するグルタチオン抱合体の ATP 依

存性一次性能動輸送において Mg^{2+} の必要性を示唆している。著者の結果においても Mg^{2+} 非存在下では CMV での TC の ATP 依存性摂取は全く観察されず、 Mg^{2+} 濃度を増加させるに従ってその摂取は飽和現象を示した。CMV の TC 摂取に Mg^{2+} 濃度依存性が認められたことは、CMV における TC の胆汁中への排泄過程の規定因子の一つとして ATP 以外に Mg^{2+} が重要であることを示している。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} など他の 2 価陽イオンでは輸送はある程度は維持されるものの Mg^{2+} の特異性が認められた。

以上のことより毛細胆管側肝細胞膜における TC の排泄機序において、2 価陽イオン（特に Mg^{2+} ）の関与は重要であることがわかった。

この Mg^{2+} の役割については、よく知られている Mg-ATP 複合体として作用するためなのか、 Mg^{2+} -ATPase の基質として必要になるのかは、この結果からは推定できない。しかし、最近 Sippel ら²⁶ は TC の ATP 依存性輸送担体が 110 kDa の糖蛋白で、ecto-enzyme である Mg^{2+} -ATPase と同一であったという報告をしており注目される。

一方胆汁酸以外の有機アニオンについては CMV を用いた実験により、胆汁酸のそれとは異なるも、ATP を直接必要とする一次性能動輸送機構が報告された^{18,27-29}。それは多種特異的に有機アニオンを輸送するため multispecific organic anion transporter (MOAT) と提唱されている³⁰。また抱合型高ビリルビン血症を呈し、Dubin-Johnson 症候群のモデルと考えられる黄疸ラットの Wistar 系 mutant である TR-ラット、SD 系 mutant の Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) が報告^{31,33} され、これらを使った *in vivo* の検討で、種々の有機アニオンの排泄障害が存在するが胆汁酸の排泄は正常であることが明らかになった。さらに、黄疸ラットの CMV を用いた研究で BSP や Leukotrien C_4 などの非胆汁酸有機アニオンの ATP 依存性輸送が低下している報告もあり^{28,29,33}、これらのことから黄疸ラットの病因

は MOAT の欠陥であり、そして黄疸ラットで胆汁排泄の低下している物質は MOAT を經由するという仮説^{4,30} が提唱された。Kuiper ら³⁴ や Takikawa ら³⁵ は黄疸ラットで硫酸抱合型胆汁酸の胆汁排泄が低下している *in vivo* のデータから、TLCS をはじめ硫酸抱合型胆汁酸は TC の経路とは異なり MOAT を通ると主張している。

一方、著者は TC の ATP 依存輸送の抑制の面から、種々の有機アニオンによる、この輸送体への親和性、つまり排泄経路を共有しているか否かについて検討した。この抑制実験で最も重要なことは、観察する物質の疎水性であり、水溶性の低い物質は非競合的阻害を起こしやすいので正しい評価を下しにくい。

この点を考慮して TC 輸送の抑制を検討する有機アニオンとして、胆汁酸では GC と TDC を、硫酸抱合型胆汁酸では TLCS を、そして非胆汁酸有機アニオンでは CPM と GSH を選び観察した。GC と TDC の場合は加えた量に応じて、 $[^3H]TC$ を用量依存的に抑制した。非胆汁酸有機アニオンでは、黄疸ラットで胆汁排泄が共に低下している GSH³⁶ と CPM³⁷ で観察した。 $[^3H]TC$ の10倍量加えても胆汁酸の場合と比べて抑制の程度は弱く、特に GSH は全くといっていいほど抑制せず、親和性は低いものとする。この GSH に関して、最近では CMV において ATP 依存性の輸送が存在しないとの報告があり³³、TC の ATP 依存性輸送に親和性が低い著者の結果を支持している。

TLCS 添加の場合、*in vivo* での報告から推定して TC 輸送の抑制は弱いものと考えたが、結果は異なった。TC の高濃度でも低濃度でも、TLCS は用量依存的に TC 輸送を抑制した。Competitive study でもその plot において Y 軸上で交差し $K_i=23 \mu\text{mol/l}$ と TC の K_m と近似の値であった。よって、TC の ATP 依存輸送に TLCS の親和性が強いこと、すなわち TLCS が TC の輸送体を通ることが示唆された。このことから、黄疸ラットにおいて TLCS の胆汁排泄が低下している原因は毛細胆

管側肝細胞膜上の MOAT の欠陥ばかりではなく、肝細胞内輸送での他の段階の障害である可能性もある。

Akerboom ら²⁷ は MOAT の代表的基質であるグルタチオン抱合体の CMV における ATP 依存性輸送が、硫酸抱合物 (*p*-Nitrophenylsulfate など) により全く抑制されないことを報告した。これは著者の主張を逆の面から支持している。著者の結果と合わせて考えると、TLCS を含む硫酸抱合物は MOAT ではなく TC を通す輸送担体と親和性が強い可能性がある。

以上、黄疸ラットでみられる有機アニオン排泄低下の原因は、それらが輸送される MOAT の欠陥であるとの仮説では、同じく MOAT で輸送されるという硫酸抱合型胆汁酸による TC 輸送の阻害を説明できず、この仮説の修正が必要である。

謝 辞

原稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました第2内科山本俊夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、直接御指導、御助言を頂きました第2内科足立幸彦助教授、並びに本研究を行うにあたり多大な協力を頂きました小林宏明博士および教室員各位に心から感謝致します。

文 献

1. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.
2. Meier PJ. Transport polarity of hepatocytes. In: Berk PD, eds. Applied basic science in hepatology: a tribute to Hans Popper. New York: Thieme Medical, 1988; 293-306. (Berk PD, Lieber CS, Popper H, Schaffner F, Gollan JL, eds. Seminars in liver disease; vol. 8).
3. 杉山雄一, 肝細胞における輸送と貯蔵. 木谷健一, 戸田剛太郎編. 臨床生理学シリーズ5 肝臓. 東京: 南江堂, 1990; 28-42.
4. Arias IM, Che M, Gatmaitan Z, Leveille C, Nishida T, Pierre M. The biology of the bile canaliculus, 1993. Hepatology 1993; 17: 318-329.
5. Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. J Cell Biol 1984; 98: 991-1000.
6. Inoue M, Kinne R, Tran T, Biepinipica L, Arias IM. Rat liver canalicular membrane vesicles: isolation and topological characterization. J Biol Chem 1983; 258: 5183-5188.
7. Meier PJ, Meier-Abt AST, Barrett C, Boyer JL. Mechanisms of taurocholate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membrane vesicles: evidence for an electrogenic canalicular organic anion carrier. J Biol Chem 1984; 259: 10614-10622.
8. Inoue M, Kinne R, Tran T, Arias IM. Taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles: evidence for the presence of an Na⁺-independent transport system. J Clin Invest 1984; 73: 659-663.
9. Zimniak P, Awasthi YC. ATP-dependent transport system for organic anions. Hepatology 1993; 17: 330-339.
10. Scharschmit BF, Keefe EB, Blankeuship NM, Ockner RK. Validation of recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and Na K-ATPase activity. J Lab Clin Med 1979; 93: 790-799.
11. Bassey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J Biol Chem 1946; 164: 321-329.
12. Walter K, Schutt C. Acid and alkaline phosphatase in serum. In: Bergmeyer HU, ed. Method of enzymic analysis, Vol. II. New York: Academic Press, 1974: 856-864.
13. King TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. Meth Enzymol 1967; 10: 322-331.
14. Wallach DFH, Kamat VB. Preparation of plasma membrane fragments from mouse ascites cell. Meth Enzymol 1965; 8: 164-166.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
16. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J Biol Chem 1959; 234: 1971-1975.
17. Bodola F, Benedict R. Measurement of the release of adenine nucleotides during platelet

- aggregation by small-bore-column iso-cratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988 ; 459 : 281-289.
18. Kobayashi K, Sogame Y, Hara H, Hayashi K. Mechanism of glutathione S-conjugate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membranes. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 7737-7741.
19. Lücke H, Strange G, Kinne R, Murer H. Taurocholate-sodium cotransport by brush membrane vesicles from rat ileum. *Biochem J* 1978 ; 174 : 951-958.
20. Adachi Y, Kobayashi H, Kurumi Y, Shouji M, Kitano M, Yamamoto T. ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles. *Hepatology* 1991 ; 14 : 655-659.
21. Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Hsu J, Arias IM. The function of Gp 170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 11693-11698.
22. Lin SH, Russell WE. Two Ca^{2+} -dependent ATPase in rat liver plasma membrane. the previously purified (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is not a Ca^{2+} -pump but an ecto-ATPase. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 12253-12258.
23. Müller M, Ishikawa T, Berger U, et al. ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane by a 110-kDa glycoprotein binding ATP and bile salt. *J Biol Chem* 1991 ; 264 : 18920-18926.
24. Nishida T, Gatmaitan Z, Che M, Arias IM. Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 6590-6594.
25. Ishikawa T. ATP/ Mg^{2+} -dependent cardiac transport system for glutathione S-conjugates: a study using rat heart sarcolemma vesicles. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 17343-17348.
26. Sippel CJ, Suchy FJ, Ananthanarayanan M, Perlmutter DH. The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport protein. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 2083-2091.
27. Akerboom TPM, Narayanaswami V, Kunst M, Sies H. ATP-dependent S-(2,4-dinitrophenyl) glutathione transport in canalicular plasma membrane vesicles from rat liver. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 13147-13152.
28. Kitamura T, Jansen P, Hardenbrook C, Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Arias IM. Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR-) rats with conjugated hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 3557-3561.
29. Ishikawa T, Müller M, Klünemann C, Schaub T, Keppler D. ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane: role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 19279-19286.
30. Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, Radomska A, Hofmann AF, Kuipers F, Jansen PLM. Inhibition of glutathione-conjugate secretion from isolated hepatocytes by dipolar bile acids and other organic anions. *Biochem J* 1991 ; 274 : 281-286.
31. Jansen PLM, Petere WH, Lamers WH. Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology* 1985 ; 5 : 573-579.
32. Mikami T, Nozaki Y, Tagaya T, et al. The characteristic of a new mutant in rats with hyperbilirubinuria syndrome. *Cong Amon* 1986 ; 26 : 250-251.
33. Feránandez-Checa JC, Takikawa H, Horie T, Ookhtens M, Kaplowitz N. Canalicular transport of reduced glutathione in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 1667-1673.
34. Kuipers F, Enserink M, Havinga R, et al. Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acid in rat. *J Clin Invest* 1988 ; 81 : 1593-1599.
35. Takikawa H, Sano N, Narita T, et al. Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. *Hepatology* 1991 ; 14 : 352-360.
36. Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, Liefting W, de Haan J, Jansen PLM. Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* 1989 ; 84 : 476-483.
37. 内田芳信, Cefpiramide の胆汁排泄機構に関する検討: 胆汁酸および有機陰イオン排泄経路との関連について. *帝京医学雑誌* 1991 ; 14 : 389-398.