

## カルシウム結合蛋白質 (D-28K) の B<sub>6</sub> 欠乏ラットにおける動態

坪内 涼子<sup>1)</sup> 野々垣 常正<sup>2)</sup> 竹内 章夫<sup>1)</sup>  
布施 秀夫<sup>1)</sup> 青木 重久<sup>2)</sup> 柴田 幸雄<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup>愛知医科大学学生化学教室\*, (<sup>2)</sup>同病理学第二教室\*)

### The movement of calcium binding protein (D-28K) in vitamin B<sub>6</sub> deficient rat.

Ryoko TSUBOUCHI<sup>1)</sup>, Tsunemasa NONOGAKI<sup>2)</sup>, Fumio TAKEUCHI<sup>1)</sup>,  
Hideo FUSE<sup>1)</sup>, Shigehisa AOKI<sup>2)</sup> and Yukio SHIBATA<sup>1)</sup>.

*Department of Biochemistry<sup>1)</sup> and 2nd Department of Pathology<sup>2)</sup>, Aichi Medical University.*

The calcium-binding protein (CaBP) has been purified from rat kidney.

The purified CaBP was about 28000 molecular weight and was detected in kidney and brain. The tissue distribution and the content of CaBP were determined in normal and vitamin B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) deficient rats. In rat kidney, CaBP was present at the distal tubules and located in nuclei and cytoplasm. There was no difference in CaBP distribution between two groups. However, the content of CaBP in B<sub>6</sub> deficient rats was significantly lower than that in normal rats. The content of serum calcium (Ca) in Ca deficient rats was significantly lower than that in Ca administrated rats. On the other hand, the content of renal CaBP in the former was significantly higher than that in the latter. Thus the content of renal CaBP was inversely proportional to the content of serum Ca.

We inferred that the decrease of the content of the renal CaBP was at least one factor in the formation of renal calculi observed in B<sub>6</sub> deficient rats.

ビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) 欠乏に由来する腎臓尿路結石の成因については、B<sub>6</sub> 欠乏によりグリシニアミノトランスフェラーゼ [EC.2.6.1.4.] の活性が低下し、グリシンからグリオキシル酸を経て、蔞酸の生成が増加し<sup>1)</sup>、蔞酸カルシウムとして結石が形成されると考えられている。結石形成機序に関しては多くの研究があり、結石形成時の尿の条件や、結石の原因となる結晶の成長、凝集過程に影響を与える物質について<sup>2)</sup>など報告されている。我々は、B<sub>6</sub> 欠乏に由来する腎臓尿路結石の成因について、カルシウ

\*所在地：愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 (〒480-11)

ム (Ca) 代謝の面から検討し B<sub>6</sub> 欠乏ラット腎臓で Ca 再吸収能が低下していることを報告している<sup>3)</sup>。今回、ラット腎臓より精製した分子量約28,000を示すカルシウム結合蛋白質 (CaBP) について B<sub>6</sub> 欠乏ラットとコントロールラットで比較検討し、B<sub>6</sub> 欠乏に由来する腎臓尿路結石形成との関連について検討した。

### 実験方法

4週齢ウイスター系雄ラットを、B<sub>6</sub> 欠乏飼料 (オリエンタル酵母社製) で8週間飼育し B<sub>6</sub> 欠乏ラットとした。同飼料に塩酸ピリドキシンを10mg/kg 添加し、同様に飼育しコントロールラットとした。CaBP はウイスター系雄ラットの腎臓より精製した<sup>5)</sup>。精製 CaBP は、ウサギに免疫し常法に従い CaBP 抗血清を作成し、抗血清は IgG 分画として用いた。CaBP の組織内局在は、酵素抗体法 (ABC 法) にて検討した。CaBP の発現時期、量の確認にはイムノブロッティング法<sup>5)</sup>を用いた。同じ蛋白質量を電気泳動することにより、全蛋白質にしめる CaBP 量で比較した。また IgG にペルオキシダーゼを標識し、ELISA 法<sup>5)</sup>で腎臓中 CaBP の定量を行った。老ラットとしては、約3年齢のラットを用い、Ca 過剰投与したラットは CaCl<sub>2</sub> 80mg/ml 溶液 1 ml を4週間ゾンデで経口投与し、Ca 欠乏ラットは4週齢ラットを Ca 欠乏飼料で8週間飼育して作製した。

### 実験結果

腎臓において CaBP は、遠位尿細管に局在し、核および細胞質が濃く染まっていた。糸球体や近位尿細管には局在は認められなかった (Fig.1)。B<sub>6</sub> 欠乏ラットとコントロールラットで CaBP の局在に差は認められなかったが、B<sub>6</sub> 欠乏ラットではコントロールラットに比べ、薄く染まり CaBP 含量の減少を推察させた。そこで ELISA 法でその含量を測定すると、B<sub>6</sub> 欠乏ラットで CaBP 含量は減少していた (Table.1)。そして、この CaBP はその諸性質から<sup>5)</sup>、既に報告されている VD 依存性 CaBP (カルビンディン) ではないかと推察されたので、VD 欠乏ラット腎臓中の今回精製した CaBP 含量を測定すると、

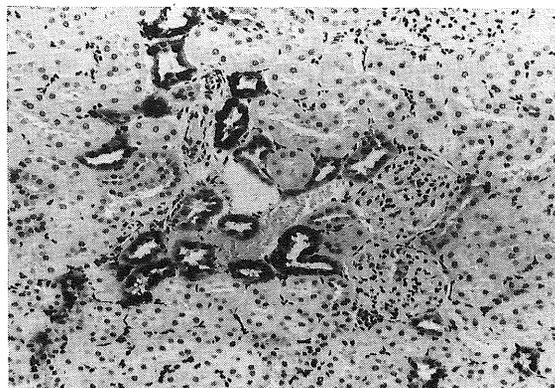
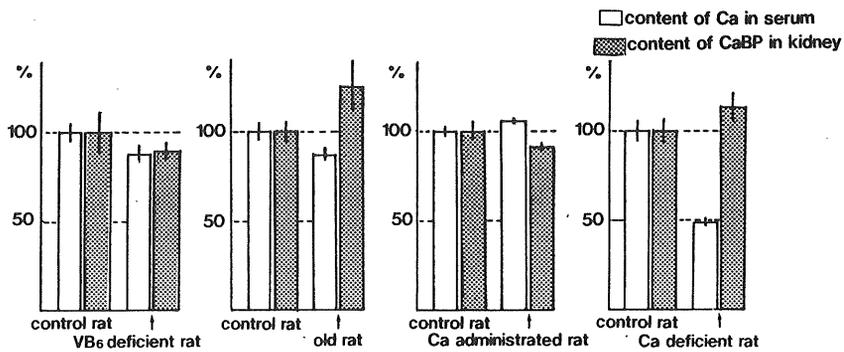


Fig. 1 Immunohistochemical localization of CaBP in the rat Kidney (avidin-biotin-immunoperoxidase complex method)

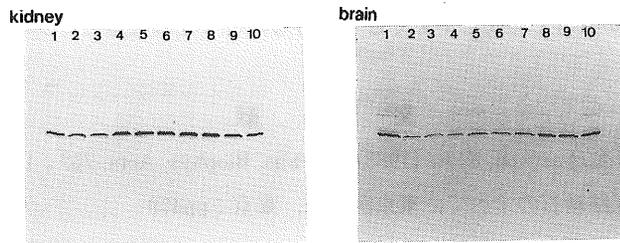
明らかな減少が確認された。血清中 Ca 含量と腎臓中 CaBP 含量を測定すると、コントロールラットに比べ、B<sub>6</sub> 欠乏ラットでは血清 Ca 含量腎臓 CaBP 含量ともに減少し、老ラットでは、血清 Ca 含量は減少し、一方、腎臓 CaBP 含量は増加を示した。Ca 経口投与ラットでは、血清 Ca 含量は増加し、腎臓 CaBP は減少を示した。更に、Ca 欠乏ラットでは、血清 Ca 含量は減少し、腎臓 CaBP 含量は増加を示した (Fig.2)。CaBP の臓器内発現時期を検討すると、腎臓、脳ともに誕生時既に存在している。しかし、腎臓では全蛋白質に対する CaBP 含量は誕生時のみ低値を示すが、脳では、成ラットとほぼ同じ含量を示すのは生後 2 ~ 3 週間後であった (Fig.3)。

**Table 1** The content of calcium-binding protein in control, VB<sub>6</sub> deficient and VD deficient rat kidney

	n	content in kidney (ug/mg protein)
control rat	12	3.235±0.092
VB <sub>6</sub> deficient rat	7	2.187±0.705
VD deficient rat	5	2.133±0.750



**Fig. 2** The contents of serum calcium and kidney calcium-binding protein



**Fig.3** The content of calcium-binding protein in rat kidney and rat brain on aging  
Samples (10ug protein/lane) were denatured with SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol and subjected to SDS-PAGE.

The blot was stained with anti-rat renal CaBP antiserum.

lane 1,10 ; 12 weeks old. lane 2,3 ; 1 day old.

lane 4 ; 2 days old. lane 5 ; 4 days old. lane 6 ; 6 days old.

lane 7 ; 9 days old. lane 8 ; 2 weeks old. lane 9 ; 3 weeks old.

## 考 察

糸球体で濾過された Ca は、その70%近くが近位尿細管で再吸収され、残りがヘンレ係蹄、遠位尿細管で再吸収されると考えられている。その数値上では、近位尿細管での再吸収の影響が大きいようである。しかし、遠位尿細管では主として副甲状腺ホルモンによる調節をうけ Ca 再吸収が活発に行われているとの報告があり<sup>6)</sup>、生体内 Ca 濃度を最終的に調節しているという点から、その重要性が注目されている。精製 CaBP は免疫組織学的方法で検索した結果、遠位尿細管に局在し、生体内 Ca 濃度調節への関与が考えられる。そこで、血清 Ca 濃度の変化と、腎臓 CaBP 含量の変化を比較すると、Fig.2 に示すように、B<sub>6</sub> 欠乏ラット以外では、血清 Ca 濃度と腎臓 CaBP 含量は反比例する結果を得た。この B<sub>6</sub> 欠乏ラット以外の結果から、血清 Ca 濃度が低下すると腎臓 CaBP はその含量を増すことにより、Ca 再吸収を活発にし、血清 Ca 濃度を上昇させるように働いているのではないかと推察される。B<sub>6</sub> は、蛋白質合成に影響を与え、B<sub>6</sub> 欠乏下で合成の低下する蛋白質も報告されているが、今回精製した CaBP も合成が低下しているのかもしれない。我々は、先に B<sub>6</sub> 欠乏ラットの腎臓での Ca 再吸収能が低下していることを、半精製した刷子縁膜を用いた実験で、報告している<sup>4)</sup>。今回精製した CaBP 含量も B<sub>6</sub> 欠乏ラットで減少し、B<sub>6</sub> 欠乏に由来する尿路結石の成因を考えると、Ca の再吸収がかなり大きな影響を与えているものと考えられる。勿論、蓚酸カルシウム結晶作成に当たって、カルシウム濃度より蓚酸濃度のほうが結晶作成に与える影響は大きいといった実験結果から、B<sub>6</sub> 欠乏により蓚酸生成が増大しているということ、第一義的に考えねばならないことであるが。この CaBP は、脳にも局在することを確認しているが<sup>5)</sup>、腎臓と脳ではその発現に差を認める (Fig.3)。腎臓では誕生翌日には、成ラットと変わらぬ含量を示すが、脳では生後 2~3 週目で成ラットとほぼ同じ含量を示している。腎臓と脳では、この CaBP の生理作用に大きな違いがあり発現時期にも差が生じているのではないだろうか。

今回精製した CaBP は、その諸性質から<sup>5)</sup> VD 依存性 CaBP と考えられる。VD 欠乏ラットで腎臓におけるこの CaBP 含量は減少するが、VD 欠乏ラットで腎臓結石は生じない。腎臓結石にはリン酸カルシウム、蓚酸カルシウム、尿酸カルシウム等の型があり、B<sub>6</sub> 欠乏由来の結石は主に蓚酸カルシウムから成っている。B<sub>6</sub> 欠乏による蓚酸生成の増加が結石形成の最大の要因としてあり、さらに Ca 代謝の変化 (Ca 再吸収の減少) が結石を形成しやすくしているものと考えられる。

## 文 献

- 1) Varalakshmi, P. and Richardson, K. E. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 757 ; 1
- 2) 若月晶 (1987) 腎尿路結石のすべて, 東京医学社, 東京 : pp479
- 3) 坪内涼子 (1988) 愛知医大誌, 16 ; 1
- 4) Tsubouchi, R. Takeuchi, F. and Shibata, Y. (1988) *Life Sci.*, 42 : 1565
- 5) 布施秀夫 (1993) 愛知医大誌, 21 : 243
- 6) Mundy, G. R. (1990) : Calcium handling by the kidney. *Calcium homeostasis : Hypercalcemia and hypocalcemia*. Martin Dunitz, London : pp19