

9339 尿細管におけるNaCl輸送のホルモン・薬物による制御

助成研究者:谷口 淳一(自治医科大学 薬理学)

共同研究者:今井 正(自治医科大学)

神経伝達物質のひとつである acetylcholine (ACh) は Na^+ 利尿作用を示すが、糸球体濾過率を変えないことから、腎血管に対する作用だけでは利尿作用を説明できない。そこで、尿細管に対する直接作用が推測されてきたが、我々は muscarine 性受容体が発見されたウサギ皮質部集合管管腔側膜の amiloride 感受性 Na^+ コンダクタンス ($\text{Amil-G}_{\text{Na}}$) を ACh が阻害すると考え、これに対する ACh の作用を検討した。

単離灌流した集合管の基底膜側に 10^{-8} - 10^{-5} M ACh を投与すると、経上皮電圧は濃度依存的にプラス側にシフトし、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura 2 を用いた顕微測光法で測定した細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は一過性の大きな上昇を示した後、持続的な増加が見られた。Carbachol も同様の作用を示したが、その強さは ACh の約 10 分の 1 であった。これらの作用は atropine や pirenzepine で拮抗され、muscarine 性受容体を介していることが分った。ACh の電気生理学的な作用を詳しく検討するため、細胞内に微小電極を刺入し基底側膜電圧を記録し、ケーブル解析を行った。それによると、ACh は経上皮抵抗を増加させるとともに集合管細胞 (CD 細胞) の管腔側膜抵抗分画を増加させ、同時に管腔側膜を過分極させていた。これらの変化は管腔内に 10^{-5} M amiloride を投与すると消失し、ACh が CD 細胞の $\text{Amil-G}_{\text{Na}}$ を阻害していることが示唆された。ACh は集合管を構成するもうひとつの細胞、 β -間在細胞に対しては作用を示さず、ACh の標的細胞は CD 細胞であることが分った。ACh による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇には管腔内 Ca^{2+} は必要なかったが、基底側の Ca^{2+} を除くと持続相のみが消失し、細胞内小胞からの Ca^{2+} 放出と基底側からの流入で、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加していることが分った。 Ca^{2+} 依存性蛋白リン酸化酵素 (PKC) の活性化剤である phorbol ester を投与すると単独で管腔側膜の G_{Na} が阻害されるだけでなく、ACh の付加的な阻害作用も見られなかった。逆に、PKC の阻害薬である H-7 投与下では、ACh の G_{Na} に対する阻害作用は減衰した。これらの結果は、ACh の Na^+ 利尿作用の少なくとも一部は、CD 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇と PKC の活性化によって皮質部集合管管腔側膜の $\text{Amil-G}_{\text{Na}}$ が阻害されるという仮説によって説明できることを示した。

9339 尿細管におけるNaCl輸送のホルモン・薬物による制御

助成研究者:谷口 淳一(自治医科大学 薬理学)

共同研究者:今井 正(自治医科大学)

1. 研究目的

神経伝達物質のひとつである acetylcholine (ACh) を腎動脈より投与すると、水と Na^+ の排泄が増加する (Na^+ 利尿)。近年、腎臓が副交感神経の支配を受け、muscarine 性受容体が皮質および髄質部の集合管に存在するという形態学的な知見が報告されたことから^{1, 2)}、上述した ACh の利尿作用が生理学的にも意味のあるものと考えられるようになった。ACh は腎動脈抵抗を下げ、腎血流量を増加させるが、糸球体濾過率の変化を引き起こさないため^{3, 4)}、ACh による利尿は腎血行動態の変化だけでは説明できない。したがって、尿細管、恐らくは集合管における Na^+ 再吸収の抑制を伴うものと考えられる。しかし、ラットの髄質外層集合管で ACh が細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を上げることが報告された以外⁵⁾、集合管における muscarine 性受容体の機能的な意義は十分には明らかにされてはいなかった。そこで我々は、電気生理学的、あるいは、顕微蛍光測光の手法を使って、単離した家兎の皮質部集合管の Na^+ 再吸収経路に対して ACh がどのような作用をもつのか、検討した。

2. 研究方法

2. 1. in vitro 単離尿細管灌流法

通常の家兎用飼料を与え、自由に飲水できる条件で飼育したオスの日本白色ウサギ (1.5-3.0 Kg) を pentobarbital (35 mg/Kg) で麻酔した後、腎臓を取り出した。厚さ約 1 mm の腎スライスをつくり、4-6 °C に冷やした修正 Colins 液に浸し、実体顕微鏡下で鋭利なピンセットを用い皮質部集合管を単離した。

単離した尿細管は倒立顕微鏡のステージ上に設置した実験浴槽に移し、尿細管の一端をマニピュレータに設置したガラス二重ピペットの外側ピペット (A ピペット) の狭窄部まで吸い込み、その後、内側ピペット (B ピペット) を尿細管の管腔内に挿入した。また、他端はガラス一重ピペット (C ピペット) に吸い込み、B ピペットに静水圧をかけることで尿細管管腔内を B ピペットから C ピペットへ 10-20 nl/min で灌流した。B ピペット内には細いポリエチレンチューブを挿入し、これによって管腔内灌流液の交換を行った。また、実験浴槽は予熱した修正 Krebs-Ringer 液を 8-10 ml/min で流し、浴液温度を 37 °C に維持する

とともに、浴液の交換を 10 sec 以内に行えるようにした。

2. 電気生理学的測定とケーブル解析

ケーブル解析により経上皮抵抗 (R_T) および経上皮抵抗中の管腔側膜抵抗分画 (fR_A) の変化を観察するため、尿細管細胞内に刺入した微小電極から基底側膜電圧 (V_B) を、B ピペット端の尿細管管腔内に刺入した微小電極から管腔内電圧 (V_T) を測定し、B ピペットから一定電流 (50-100 nA, 500 msec) を流したときの各電圧の振れを記録した。解析には、尿細管の両端が電氣的に閉じているものと仮定し、有限ケーブル解析を適用した。

管腔内の長さ定数を λ とすると、

$$\lambda = \frac{L}{\cosh^{-1}(\Delta V_0 / \Delta V_L)} \quad [1]$$

と表される。 ΔV_0 と ΔV_L はそれぞれ B ピペットから電流を流したときの B ピペット端および C ピペット端における V_T の振れの大きさで、L は灌流した尿細管の長さである。 R_T は、

$$R_T = \frac{2\pi\lambda\Delta V_0}{I_0} \tanh\left(\frac{L}{\lambda}\right) \quad [2]$$

として測定される。ただし、 I_0 は B ピペットより管腔に流された一定電流の大きさである。管腔内の単位長さあたりの抵抗 (R_C) と電氣的な管腔半径 (r_E) は、管腔内灌流液の固有抵抗を ρ とすると、

$$R_C = \frac{\Delta V_0}{\lambda I_0} \tanh\left(\frac{L}{\lambda}\right) \quad [3]$$

$$r_E = \sqrt{\frac{\rho}{\pi R_C}} \quad [4]$$

で表される。[4] 式によって求めた管腔半径と顕微鏡下、目視で測定した管腔半径の比が 0.8-1.2 の場合に限って、実験が信頼できるものとしてデータを採用した。

V_B を測定した細胞が B ピペット端から X だけ離れているとすると、この地点での管腔内電圧の振れ ΔV_X は、

$$\Delta V_X = \Delta V_0 \frac{\cosh((L-X)/\lambda)}{\cosh(L/X)} \quad [5]$$

として計算できる。この細胞の fR_A は、

$$fR_A = 1 - \frac{\Delta V_B}{\Delta V_X} \quad [6]$$

として求められる。

2. 3. ピーナッツ agglutinin 結合による β -間在細胞の識別

皮質部集合管は集合管細胞 (CD 細胞) と α および β -間在細胞 (α -IC 細胞、 β -IC 細胞) からなるが、このうち β -IC 細胞を識別するために、この細胞に対して特異的に結合するピーナッツ agglutinin を蛍光色素 FITC で標識し、37 °C で 5 min 間、単離灌流した尿管に負荷した⁶⁾。その後、蛍光顕微鏡下で 490 nm の励起光を照射し、蛍光を認めた細胞を β -IC 細胞として識別した。

2. 4. $[Ca^{2+}]_i$ の測定

$[Ca^{2+}]_i$ は、単離灌流した尿管に Ca^{2+} 濃度指示薬である蛍光色素 fura 2 の細胞膜透過型誘導体 fura 2 AM (20 μ M) を室温で 20 min 負荷し、fura 2 AM 洗浄後、340 nm および 380 nm の光で fura 2 を励起したときの 510 nm の蛍光強度 (F_{340} 、 F_{380}) を交互に測定し、その比 ($R = F_{340} / F_{380}$) から求めた。1 回の測定は 10 msec で 100 回分のデータの算術平均を取り、1 sec 毎に $[Ca^{2+}]_i$ を下の式 [7] から求めた⁷⁾。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{min}) F_{min}}{(R_{max} - R) F_{min}} \quad [7]$$

ここで、 K_d は Ca^{2+} の fura 2 に対するみかけの解離定数 (224 nM) で、 R_{max} と R_{min} は過剰の Ca^{2+} 存在下と Ca^{2+} のない (1 mM EGTA 存在下) 場合の R で、 F_{max} と F_{min} は同じ条件下で測定した F_{380} の値である。

2. 5. 溶液

実験に用いた溶液の組成は以下の通りである。

修正 Krebs-Ringer 液; 115 mM NaCl、5 mM KCl、25 mM $NaHCO_3$ 、0.8 mM Na_2HPO_4 、0.2 mM NaH_2PO_4 、1.8 mM $CaCl_2$ 、1.0 mM $MgCl_2$ 、10 mM Na acetate、8.3 mM D-glucose、5.0 mM L-alanine。

この溶液はいずれの実験でも、実験浴槽溶液および尿管管腔内溶液の標準溶液として用いた。無 Ca^{2+} 溶液は標準溶液から $CaCl_2$ を除くとともに 1 mM EGTA を加え、また、12 Cl^- 溶液では、標準溶液の NaCl の内 110.8 mM 分を等濃度の Na cyclamate に置き換えた。pH はいずれも 95 % O_2 、5 % CO_2 ガスを通気することで 7.4 に維持した。

修正 Collins 溶液; 14 mM KH_2PO_4 、44 mM K_2HPO_4 、14 mM KCl、8 mM $NaHCO_3$ 、160 mM

sucrose、pH7.4。

3. 研究結果

3. 1. CD 細胞および β -IC 細胞の電気生理学的性質に対する ACh の作用

皮質部集合管を単離灌流して V_T を記録すると、実験浴槽に比べて管腔内はマイナス電位を示すが、Table 1 に示すように 10^{-6} M ACh を基底側膜側（実験浴槽）に投与すると、 V_T の大きさは約 10 mV 減少し、 R_T は約 17 % 増加した。この変化が CD 細胞あるいは β -IC 細胞のどちらに対する作用であるのか、また、それぞれの細胞の管腔側膜あるいは基底側膜に対する作用であるのかを検討するため、各細胞内に微小電極を刺入して V_B 、管腔側膜電圧 ($V_A = V_B - V_T$) および fR_A を測定した。その結果、ACh は β -IC 細胞に対しては何の変化も及ぼさなかったが、CD 細胞の基底側膜を脱分極させるとともに管腔側膜を -70.5 ± 4.1 mV から -72.7 ± 3.4 mV に過分極させた。基底側膜の脱分極については詳しく検討することはできなかったが、管腔側膜の過分極については ACh が fR_A を増加させたことから、管腔から細胞内への陽イオンの流入経路を阻害したことを示唆した。

3. 2. ACh の作用に対する amiloride の影響

上述した CD 細胞の管腔側膜上の、ACh によって阻害される陽イオン流入経路として最も可能性が高いのが amiloride 感受性 Na^+ コンダクタンスである。この可能性を検討するため、ACh の作用に対する amiloride の影響を調べた。

管腔内に投与した amiloride (10^{-5} M) は、予想されるように管腔側膜を 7.6 ± 3.9 mV 過分極させ、 R_T および fR_A を増加させた (Table 2)。これによって amiloride が管腔側膜の Na^+ コンダクタンスを阻害したことを確認できた。このように管腔内に 10^{-5} M amiloride 投与下では、Table 2 に示すように基底側膜側に投与した 10^{-6} M ACh によって V_T 、 V_B は影響を受けず、このことから分るように管腔側膜も何の変化も示さなかった。この結果は、ACh が管腔側膜の amiloride 感受性 Na^+ コンダクタンスを阻害することを示している。

3. 3. $[Ca^{2+}]_i$ に対する ACh の作用

基底側膜側に ACh を投与すると、 10^{-8} M から 10^{-5} M の間で濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ は上昇した。基底側あるいは管腔側のどちらから Ca^{2+} が流入しているのかを確かめるため、実験浴槽および管腔の Ca^{2+} をそれぞれ除き（無 Ca^{2+} 溶液）、ACh (10^{-6} M) を投与した。その結果、管腔側の Ca^{2+} を除いても $[Ca^{2+}]_i$ の上昇分は全く変わらなかったが（ピーク値: 102.3 ± 11.9 nM (+ Ca^{2+}) vs 111.1 ± 11.8 nM (- Ca^{2+})、2 min 後: 76.9 ± 10.2 nM (+ Ca^{2+}) vs 76.2 ± 9.9 nM (- Ca^{2+})）、実験浴槽の Ca^{2+} を除いた場合、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の初期には細胞内の貯蔵部位からの放らし一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇があったが（ピーク値: 83.0 ± 17.2 nM (+ Ca^{2+}) vs 55.0 ± 13.0 nM (- Ca^{2+})）、大部分の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は消失した

(2 min 後: 51.1 ± 10.8 nM (+Ca²⁺) vs -5.6 ± 1.6 nM (-Ca²⁺))。

3. 4. ACh の作用に対する muscarine 受容体遮断薬の影響

次に ACh 受容体を同定するため、muscarine 受容体遮断薬である atropine と pirenzepine の効果を調べた。

実験浴槽に投与した 10^{-6} M atropine は、 10^{-6} M ACh による V_T の変化分を 7.8 ± 2.1 mV から 1.3 ± 0.7 mV に減少させ、同じ濃度の pirenzepine も V_T の変化分を 11.6 ± 3.2 mV から 2.8 ± 1.3 mV に減少させた。同じ濃度のこれらの遮断薬はそれだけでは [Ca²⁺]_i を変えなかったが、 10^{-6} M ACh による [Ca²⁺]_i の上昇分を著しく減少させた (ピーク値: 66.4 ± 18.7 nM (-atropine) vs 5.2 ± 1.2 nM (+atropine)、 91.9 ± 30.8 nM (-pirenzepine) vs 26.6 ± 9.1 nM (+pirenzepine))。

3. 5. ACh の作用機序における Ca²⁺ の役割

ACh による CD 細胞の電気生理学的性質に対する作用が、[Ca²⁺]_i の上昇によって伝達されているのかどうかを検討するため、実験浴槽の Ca²⁺ を除き (無 Ca²⁺ 溶液)、 V_T および R_T に対する ACh の作用を調べた。

実験浴槽の Ca²⁺ を除いても V_T は全く変化せず (-11.8 ± 1.0 mV (+Ca²⁺) vs -11.5 ± 1.0 mV (-Ca²⁺))、また、 R_T も変化がなかった (84.8 ± 6.9 Ωcm² (+Ca²⁺) vs 83.1 ± 6.5 Ωcm² (-Ca²⁺))。そこに 10^{-6} M ACh を投与しても、 V_T (-11.5 ± 1.0 mV (-ACh) vs -8.7 ± 1.4 mV (+ACh)) も R_T (83.1 ± 6.5 Ωcm² (-ACh) vs 86.2 ± 8.9 Ωcm² (+ACh)) もわずかな変化しか示さなかった。ACh の作用発現には基底側からの Ca²⁺ の細胞内への流入が必要である。

次に Ca²⁺ がどのように管腔側膜の Na⁺ コンダクタンスを阻害しているのかを検討するため、Ca²⁺ 依存性蛋白リン酸化酵素 (C キナーゼ) の活性化薬である phorbol ester、PMA と PDBu、および阻害剤である H-7 の作用を調べた。

10^{-7} M PMA を実験浴槽に投与すると、ACh の場合と同様に V_T は -11.5 ± 2.2 mV から -4.0 ± 1.0 mV へとプラス側に動き、 R_T は 79.1 ± 5.4 Ωcm² から 85.5 ± 4.7 Ωcm² に増加した。また、同じ濃度の PDBu も同様に V_T を減少させ (-14.3 ± 1.3 mV (-PDBu) vs -6.0 ± 1.2 mV (+PDBu))、 R_T も増加させた (74.4 ± 6.0 Ωcm² (-PDBu) vs 84.1 ± 6.8 Ωcm² (+PDBu))。このような phorbol ester の作用は、管腔内に 10^{-5} M amiloride 存在下では著しく小さかった (V_T : 2.2 ± 0.9 mV (-PMA) vs 1.4 ± 0.6 mV (+PMA)、 R_T : 86.9 ± 7.2 Ωcm² (-PMA) vs 91.9 ± 8.9 Ωcm² (+PMA) および V_T : 1.0 ± 0.4 mV (-PDBu) vs 0.9 ± 0.5 mV (+PDBu)、 R_T : 73.8 ± 11.2 Ωcm² (-PDBu) vs 75.3 ± 11.2 Ωcm² (+PDBu))。また、 10^{-7} M PMA 処理した後 10^{-6} M ACh を投与しても、 V_T (-4.0 ± 1.0 mV (-ACh) vs -3.0 ± 1.0 mV (+ACh)) にも R_T (85.5 ± 4.7 Ωcm² (-ACh))

vs $87.1 \pm 5.3 \Omega \text{cm}^2$ (+ACh)) にも加算的な変化はほとんどなかった。 10^{-7} M PDBu も同様に ACh の作用を覆い隠した (V_T : -6.0 ± 1.2 mV (-ACh) vs -5.3 ± 0.9 mV (+ACh))、 R_T : $84.1 \pm 6.8 \Omega \text{cm}^2$ (-ACh) vs $89.7 \pm 8.1 \Omega \text{cm}^2$ (+ACh))。

一方、C キナーゼの阻害剤である H-7 (3×10^{-5} M) は単独で実験浴槽に投与しても、 V_T (-14.7 ± 3.4 mV (-H-7) vs -15.5 ± 3.0 mV (+H-7)) にも R_T ($87.5 \pm 16.6 \Omega \text{cm}^2$ (-H-7) vs $86.2 \pm 15.4 \Omega \text{cm}^2$ (+H-7)) にも影響を及ぼさなかった。しかし、この濃度の H-7 存在下では、 10^{-6} M ACh の V_T (-15.5 ± 3.0 mV (-ACh) vs -10.5 ± 2.6 mV (+ACh)) および R_T ($86.2 \pm 15.4 \Omega \text{cm}^2$ (-ACh) vs $92.0 \pm 16.0 \Omega \text{cm}^2$ (+ACh)) に対する作用は、H-7 が存在しない場合 (Table 1 参照) に比べ、明らかに小さかった。

4. 考察

4. 1. 皮質部集合管における ACh の標的細胞

家兔の皮質部集合管には、CD 細胞、 α -IC 細胞、 β -IC 細胞の3種の細胞が存在することが明らかにされている。このうち CD 細胞は V_B が大きく、 fR_A が小さいが、逆に二種の IC 細胞はともに V_B が小さく、 fR_A は 1 に近いくらい大きい。これらの性質の違いから CD 細胞を IC 細胞から識別した。 β -IC 細胞については、1) FITC 標識をつけたピーナッツ agglutinin の結合、2) V_B が -30 mV 以下であることで同定したが、IC 細胞には基底側膜に大きな Cl^- コンダクタンスがあるが、 β -IC 細胞では観察される管腔からの Cl^- の流入が α -IC 細胞にはないという事実を利用して、管腔内の Cl^- 濃度を下げたときに大きな基底側膜の過分極があるものを β -IC 細胞として α -IC 細胞から識別した。また、我々の使用した近位側皮質部集合管にはほとんど α -IC 細胞が存在しないことが知られているので⁸⁾、この細胞に対する ACh の作用は検討しなかった。

こうして CD 細胞と β -IC 細胞を同定した上で ACh の作用を調べたが、Table 1 に示すように ACh に反応したのは CD 細胞だけで、muscarine 性受容体を持つ ACh の標的細胞は CD 細胞であった。このことはさらに、CD 細胞がない接合尿管の V_T および R_T は ACh に対して何の変化も示さなかったという結果からも裏付けられた。

4. 2. ACh による CD 細胞の Na^+ コンダクタンスの阻害

CD 細胞には Na^+ コンダクタンスの他に大きな K^+ コンダクタンスがあることが知られているが、もし ACh がこの K^+ コンダクタンスを阻害したとすると管腔側膜は脱分極するはずで、実際には過分極したという実験結果と一致しない。逆に、 K^+ コンダクタンスを増大したとすると、 R_T や fR_A が大きくなったという結果を説明できなくなり、 K^+ コンダクタンスに対する ACh の作用は否定される。

また、CD 細胞の管腔側膜に Cl^- コンダクタンスがあり、ACh がこれを阻害したとすれば、電気生理学的な変化はうまく説明できる。しかし、Samson ら⁹⁾が、CD 細胞の管腔側膜

には Cl^- コンダクタンスは存在しない、あるいはあっても検出できないほどに小さいことを報告しており、 Cl^- コンダクタンスに対する作用を考えることも困難である。したがって、管腔内に amiloride が存在すると、ACh は管腔側膜をそれ以上、過分極させることができないことを考え合せると、ACh は CD 細胞の管腔側膜に存在する amiloride 感受性 Na^+ コンダクタンスを阻害すると考えられ、ACh の Na^+ 利尿作用をうまく説明する。

4.3 Na^+ 再吸収に対する細胞内 Ca^{2+} と C キナーゼの役割

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させるような薬物は、CCD の Na^+ 再吸収を減少させることが報告されてきたが、本研究においても、ACh が CCD 細胞の基底側膜からの Ca^{2+} 流入と細胞内からの Ca^{2+} 放出を増加させて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上げ、その結果、管腔側膜の amiloride 感受性 Na^+ チャネルをブロックすることが分った。また、C キナーゼ促進作用をもつ PMA や PDBu は単独でも CCD の管腔側 Na^+ コンダクタンスを阻害するだけでなく、これらの薬物存在下では ACh はそれ以上、電気生理学的な変化を引き起こさなかったことや、逆に、C キナーゼ阻害作用をもつ H-7 が部分的に ACh の作用を減少させることから、ACh は何らかの形で C キナーゼによるリン酸化を介して CCD の管腔側 Na^+ コンダクタンスを抑制すると考えられる。

5. 今後の課題

CD 細胞の基底側膜に存在する muscarine 性受容体は、atropine と pirenzepine によって遮断され、このうち pirenzepine は M_1 受容体に対して選択性が高いことから¹⁰⁾、muscarine 性受容体のサブタイプは M_1 受容体であろうと推測されるが、サブタイプの決定は今後の研究課題である。また、ACh は細胞内小胞から Ca^{2+} の放出だけでなく、基底側からの Ca^{2+} 流入を促したが、その流入経路は現在のところ特定できていない。基底側膜 Ca^{2+} 流入経路については、dihydropyridine 誘導体 Ca^{2+} チャネルブロッカーである manidipine が、アゴニストによる Ca^{2+} 流入を減少させることから、dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャネルが候補として考えられるが、一方で、同じ dihydropyridine 誘導体の nifedipine では carbachol による Ca^{2+} 流入を阻害できないことも報告されており、幅広く Ca^{2+} 流入経路を検索することが必要である。

6. 文献

1. C. J., Pirola, A. L., Alvarez, M. S., Balda, S., Finkielman, and V. E., Nahmod. *Am. J. Physiol.* **257**: F746-F754, 1989.
2. C. J., Pirola, A. L., Alvarez, S., Finkielman, and V. E. Nahmod. *Am. J. Physiol.* **260**: F198-F203.
3. A. J., Vander. *Am. J. Physiol.* **206**: 492-498, 1964.
4. J. C. Yun, G., Oriji, J. R. Gill, Jr., B. R., Coleman, J., Peters, and H, Keiser. *Am. J. Physiol.* **265**: F46-F52, 1993.

5. J. Marchetti, S. Taniguchi, F. Lebrun, and F. Morel. *Pfluegers Arch.* **416**: 561-567, 1990.
6. M. Hayashi, Y. Yamaji, M. Iyori, W. Kitajima, and T. Saruta. *J. Clin. Invest.* **87**: 1153-1157, 1991.
7. G. Gryniewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450, 1985.
8. S. Muto, K. Yasoshima, K. Yoshitomi, M. Imai, and Y. Asano. *J. Clin. Invest.* **86**: 1829-1839, 1990.
9. S. C. Sansom, E. J. Weinman, and R. G. O'neil. *Am. J. Physiol.* **247**: F291-F302, 1984.
10. R. K. Goyal. *New Eng. J.* **321**: 1022-1029, 1989.

Table 1. Effect of ACh on Electrophysiological Parameters in Rabbit CCD.

	Control	10^{-6} M ACh (bath)	n	p
V_T (mV)	-16.9 ± 2.5	-6.7 ± 1.6	19	<0.001
R_T (Ωcm^2)	94.9 ± 7.1	111.2 ± 9.7	19	<0.001
CD cell				
V_B (mV)	-87.6 ± 4.5	-79.0 ± 3.4	8	<0.01
fR_A	0.36 ± 0.06	0.51 ± 0.06	8	<0.01
β-IC cell				
V_B (mV)	-15.9 ± 2.3	-13.4 ± 1.6	3	N.S.
fR_A	0.94 ± 0.01	0.95 ± 0.01	3	N.S.

Values are expressed as mean \pm S.E.. V_T : transepithelial voltage, R_T : transepithelial resistance, V_B : basolateral membrane voltage, fR_A : fractional resistance of the apical membrane, CD cell: collecting duct cell, IC cell: intercalated cell.

Table 2. Effect of ACh on Electrophysiological Parameters in the Presence of Amiloride in the lumen in Rabbit CCD.

	Control	Amiloride	Amiloride + ACh
V_T (mV)	-17.1 ± 3.0 (6)	3.3 ± 0.8 (6)**	3.6 ± 1.0 (6)
V_B (mV)	-88.4 ± 5.1 (4)	-73.6 ± 3.3 (4)*	-70.5 ± 5.1 (4)
R_T (Ωcm^2)	77.3 ± 3.3 (6)	82.9 ± 2.7 (6)*	91.6 ± 5.1 (6)*
fR_A	0.26 ± 0.06 (4)	0.44 ± 0.08 (4)*	0.57 ± 0.13 (4)

Concentrations of amiloride and acetylcholine (ACh) were 10^{-5} M and 10^{-6} M, respectively. Values are expressed as mean \pm S.E.. They were compared with the left values using paired *t* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Regulation of NaCl transport by hormone and drug in renal tubule.

Junichi Taniguchi, and Masashi Imai.

Department of Pharmacology, Jichi Medical School.

Summary

To clarify the mechanism of natriuresis by acetylcholine (ACh), we examined the effect of ACh on the amiloride sensitive Na^+ conductance in the apical membrane of the isolated rabbit cortical collecting duct (CCD) perfused in vitro using the conventional microelectrode and the microscopic fluorescence spectro-photometry techniques. Basolateral application of ACh positively shifted transepithelial voltage (V_T) and triggered a transient increase of cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) followed by a sustained increase in a dose-dependent manner (10^{-8} - 10^{-5} M). Both actions of ACh were blocked by atropine and pirenzepine, muscarinic receptor antagonists. On the basis of cable analysis, we found ACh to increase fractional resistance of apical membrane (fR_A) of the collecting duct (CD) cells, but not β -intercalated (β -IC) cells, accompanied by a positive deflection of V_T and an increase of transpithelial resistance (R_T). Luminal application of 10^{-5} M amiloride, a Na^+ channel blocker, almost completely abolished the electrophysiological effects of ACh. ACh-induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not changed by removing luminal Ca^{2+} , while ACh evoked only a transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after removal of basolateral Ca^{2+} . This observation indicated that ACh triggered a release of Ca^{2+} from intracellular store site and an influx of Ca^{2+} via basolateral membrane. Both phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and phorbol-12, 13-dibutylate (PDBu), protein kinase C (PKC) activators, inhibited apical Na^+ conductance, and prevented ACh to show further inhibition. 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), an inhibitor of PKC, partially attenuated the inhibitory effect. These results support the view that ACh inhibits the apical Na^+ conductance in the CD cells of rabbit CCD by both increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and activation of PKC. This view partly explains the natriuretic effect of ACh.