

9431 接合尿細管の Ca^{2+} 輸送調節と Na^{+} 輸送の相互作用

助成研究者：谷口 淳一 (自治医科大学 医学部)

共同研究者：今井 正 (自治医科大学 医学部)

接合尿細管は Ca^{2+} 調節ホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) の標的組織であり、腎における主要な Ca^{2+} 排泄の調節部位である。しかし、尿管管灌流法によって測定した接合尿細管の ^{45}Ca 輸送速度は報告により数倍の違いがあり、PTH 以外の調節系が示唆された。これらの報告の実験条件を比較すると、灌流速度が速い実験の方が ^{45}Ca 輸送速度が速く、原尿の流速または管腔内圧が Ca^{2+} の再吸収速度に影響する可能性がある。この仮説を確かめるため、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura 2 を負荷して接合尿細管の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を測定した。灌流圧を 0.2KPa から 1.2KPa に上げると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $42 \pm 11 \text{ nM}$ 上昇し、灌流圧 (灌流速度) 依存性 Ca^{2+} 流入が明らかとなった。10nM PTH を基底側に投与すると、圧依存性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、 $101 \pm 30 \text{ nM}$ に増大した。同様な促進効果は、0.1mM Chlorphenyl-thio-cAMP (CPT-cAMP) でも観察された。圧依存性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、管腔内 Ca^{2+} を除くと消失したが、 $10 \mu\text{M}$ nifedipine を管腔内に投与しても全く阻害されない。1.2KPa で定圧灌流した接合尿細管に 10nM PTH を投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $31 \pm 7 \text{ nM}$ 上昇したが、0.2KPa では $6 \pm 2 \text{ nM}$ に過ぎなかった。管腔内投与した Gd^{3+} ($10 \mu\text{M}$) は 50nM PTH で上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を $89.5 \pm 18.5\%$ 抑制したが、nifedipine や benidipine は $100 \mu\text{M}$ でも 20–30% しか抑制できなかった。これらの実験結果から膜張力依存性陽イオンチャンネルの存在が示唆されたので、パッチクランプ法で同定した。接合尿細管を反転して管腔側膜を露出し、cell-attached パッチクランプで 200mM CaCl_2 を満たしたピペットから記録した単一チャンネル電流 ($42 \pm 2 \text{ pS}$) は、ピペット内に陰圧 (-4.9 KPa) をかけると平均開チャンネル数 (NP_o) は、 0.005 ± 0.001 から 0.022 ± 0.005 に上がった。さらに 0.1mM CPT-cAMP は、 NP_o を 0.085 ± 0.014 に増大させた。同様な性質を持つ単一チャンネル電流 ($173 \pm 7 \text{ pS}$) は、140mM NaCl を満たしたピペットからも記録できた。CPT-cAMP は、陰圧負荷しないパッチ膜のチャンネル活性は促進できなかった。これらの性質は灌流圧依存性の Ca^{2+} 流入とよく一致し、PTH 依存性 Ca^{2+} 流入が膜張力依存性陽イオンチャンネルを介していることを示唆した。また、管腔内に投与した $10 \mu\text{M}$ Gd^{3+} は、PTH で引き起こされる管腔内電位の 2 相性の変化のうち第 1 相の過分極には影響せず、amiloride 感受性 Na^{+} チャンネルの抑制による第 2 相の脱分極を抑制した。基底側膜の Ca^{2+} 輸送が $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送であることを考え合わせると、膜張力依存性陽イオンチャンネルを通して流入した Ca^{2+} が Na^{+} チャンネルを阻害して細胞内 Na^{+} 濃度を下げ、基底側の Ca^{2+} 輸送を促進すると考えられる。

9431 接合尿細管の Ca^{2+} 輸送調節と Na^+ 輸送の相互作用

助成研究者：谷口 淳一 (自治医科大学 医学部)

共同研究者：今井 正 (自治医科大学 医学部)

1. 研究目的

体液 Ca^{2+} 濃度の恒常性は、骨 Ca の吸収と遊離、腸管からの吸収と腎臓からの排泄の調節によって維持される。骨があくまで生体における Ca バッファであるのに対し、後二者は身体全体が保持する Ca 量を調節しており、体内 Ca 量の恒常性には骨の Ca 代謝よりもむしろ重要である。腎臓では Ca 調節ホルモンである副甲状腺ホルモン(PTH)の主要なターゲットが接合尿細管であり、 Ca^{2+} の再吸収を促進することが明らかにされたが、その詳しい作用メカニズムは分かっていない。

単離尿細管灌流法を用いて測定した正味の ^{45}Ca の再吸収速度は、同じウサギの接合尿細管でも報告により著しい差がある^{1,2)}。その実験条件の違いを調べると、再吸収速度の速い報告の方が速い灌流速度で測定している。このことは接合尿細管の Ca^{2+} 輸送がPTHによって調節されるだけでなく、原尿の流速に応じて増減する可能性を示唆している。

一方、腎臓から排泄される Na^+ 量と Ca^{2+} 量には通常、比例関係があるが、PTH作用時には Ca^{2+} 排泄が低下するのに対して Na^+ 排泄は増加する。したがって、接合尿細管ではPTHによる Ca^{2+} 輸送の調節メカニズムは Na^+ 輸送と共役していることが予想される。本研究では、管腔内の原尿の流れが接合尿細管の Ca^{2+} 再吸収に実際に影響するのか、そのメカニズムはどのようなものか、また、このメカニズムに対してPTHや Na^+ 再吸収がどのように作用するのかを明らかにする。

2. 研究方法

2.1 接合尿細管標本の準備

pentobarbital (35mg/Kg)で麻酔した日本白色ウサギ(2.0-2.5Kg)の腎臓を摘出して約1mmの厚さの腎切片を作り、改変Collins液(14.0mM KCl、44.0mM K_2HPO_4 、14.0mM KH_2PO_4 、9.0mM $NaHCO_3$ 、16.0mM sucrose、pH7.4)中に氷冷保存した。この腎切片から皮質部のみを切り取り、実体顕微鏡下、改変Collins液(4-6°C)中で精密ピンセットを用いて接合尿細管を単離した。

2.2 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は、接合尿細管を単離灌流しながら Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 を用いて $36^\circ C$ で測定した。接合尿細管の一端を尿細管灌流用二重ピペットの外側ピペットに吸い込み、続いて内側ピペットを管腔内に挿入し、管腔内を浴液 (135.0mM NaCl、5.0mM KCl、1.0mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 、1.0mM $MgCl_2$ 、5.6mM glucose、5.0mM alanine、10.0mM HEPES/Tris、pH7.4) に 5.0mM $CaCl_2$ を加えた溶液を灌流した。さらに内側ピペットの後端は灌流液を満したタイゴンチューブを接続し、管腔内灌圧 (灌流流速) を自由に換えられるようチューブ後端の高さを換えられるようにした。尿細管の他端は別の微小ピペットに吸い込み、固定した。ただし、このピペットから尿細管管腔内に圧がかからぬよう、吸込み口の内径を尿細管外径より十分大きくした。

こうして単離灌流した接合尿細管に fura-2 を取り込ませるため、膜透過性の誘導体である fura-2 / AM (30 μM) を浴液に加え、20 分間室温で放置した後、浴液で洗浄した。fura-2 による蛍光はオリンパス社製 2 波長顕微測光装置 OSP-3 によって測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ は、340nm および 380nm の励起光による蛍光の測定値からバックグラウンド蛍光と自家蛍光を予め差し引いた値 (F_{340} 、 F_{380}) から 2 波長蛍光比 ($R = F_{340} / F_{380}$) を経時的に求め、これから下の式に基づいて計算した。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{min})F_{max}}{(R_{max} - R)F_{min}} \quad (1)$$

ここで K_d は Ca^{2+} の fura-2 に対する見かけの解離定数 (224nM)、 F_{max} と F_{min} はそれぞれ、過剰の Ca^{2+} (1mM) と 0mM Ca^{2+} (0.1mM EGTA 存在下) での F_{380} 値で、 $F_{max} / F_{min} = 28.91$ である。また、 R_{max} (= 15.97) と R_{min} (= 0.47) はそれぞれ Ca^{2+} が過剰に存在する場合、 Ca^{2+} が存在しない場合の R 値である。測光スポットは尿細管直径よりも大きくし、灌流圧変化時の尿細管の動きによる測定誤差を極力小さくした。

2.3 単一チャネル電流の測定

PTII によって活性が促進される Ca^{2+} 透過性チャネルは管腔側膜に存在すると考えられるので、本研究では管腔側膜を露出させるため、1.8mM $CaCl_2$ を加えた浴液中で接合尿細管を Fig. 1 に示すような方法で裏返し、 $36^\circ C$ で cell-attached パッチクランプ法を用いて単一チャネル電流を記録した。接合尿細管を尿細管灌流用二重ピペットの外側ピペットに吸い込み、その断端を内側ピペットの先端で引っ掛けて、尿細管を自分自身の管腔内に押し込む。さらに外側ピペットに弱い陰圧をかけながら、内側ピペットを管腔内に進めて行くと、ポケットを裏返すように尿細管を裏返すことができた。このとき、内側ピペット内に 2-3KPa の陽圧を加えておくと尿細管が脹らみ、細胞同志が擦れて傷害を受けることを防止できる。この

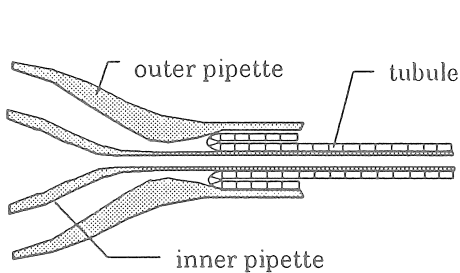


Fig.1 Everting method of renal tubule

パッチピペットはシリコンチューブでマノメータに接続し、一定の大きさの陰圧を負荷できるようにした。単一チャンネル電流記録はアンチエイリアスフィルタ（Bessel型高域遮断フィルタ、 $f_c = 2$ または5KHz）を通した後、10KHzでデジタル信号に変換し、パーソナルコンピュータで解析した。

ように、尿細管を裏返すことによって簡単にパッチピペットを管腔側膜に接近させることができるようになった。

単一チャンネル電流は、200mM CaCl_2 、10mM HEPES/Tris、pH7.4（ Ca^{2+} ピペット）または、140mM NaCl、10mM HEPES/Tris、pH7.4を満したパッチピペット（ Na^+ ピペット）に接続したパッチクランプアンプ（List社製、EPC-7）によって記録した。また、パ

2.4 管腔内電位と細胞内電位の測定

接合尿細管の管腔内電位（ V_i ）は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定時と同様に尿細管を単離灌流して内側ピペットを電位記録用アンプ（WPI社製、FD223）に接続して記録した。また、裏返した接合尿細管細胞の細胞内電位（ V_m ）は、同じ電位記録用アンプに接続したガラス微小電極を細胞内に刺入して記録し、その大きさは $-64.1 \pm 2.5 \text{mV}$ であった。

3. 研究結果

3.1 管腔側膜の圧依存性 Ca^{2+} 輸送とPTHの作用

接合尿細管の Ca^{2+} 再吸収が原尿の流速、あるいは管腔内圧に依存しているのかを検討するため浴液の Ca^{2+} を除き、管腔内にのみ Ca^{2+} が存在する条件で接合尿細管の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を記録した。灌流圧を0.2KPaから生理的な灌流圧（1.2KPa）に上げたところ、Fig. 2Aに示すように急激な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が観察され、その増加分（ $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ ）は $42 \pm 11 \text{nM}$ であった。灌流圧を0.2KPaに戻すと、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はゆっくりと下降した。この圧依存性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、10nM PTHを基底側（浴液）に加えておくと $101 \pm 30 \text{nM}$ と有意に大きくなった。

PTHは接合尿細管でcAMPの産生を促し、cAMPの膜透過性誘導体が Ca^{2+} 輸送を促進することから、cAMPはPTHの2次メッセンジャーと考えられている。そこでcAMPの膜透過性誘導体のひとつChlorphenyl-thio-cAMP（CPT-cAMP）が、圧依存性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に対してPTHと同様な促進作用を示すかどうか調べた。コントロールで0.2KPaから1.2KPaに灌流圧を上げたときの $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ は $36 \pm 16 \text{nM}$ だったか、0.1mM CPT-cAMPを投与した後では $84 \pm 26 \text{nM}$ とPTH投与時と同様に2倍以上に大きくなった（Fig. 2B）。

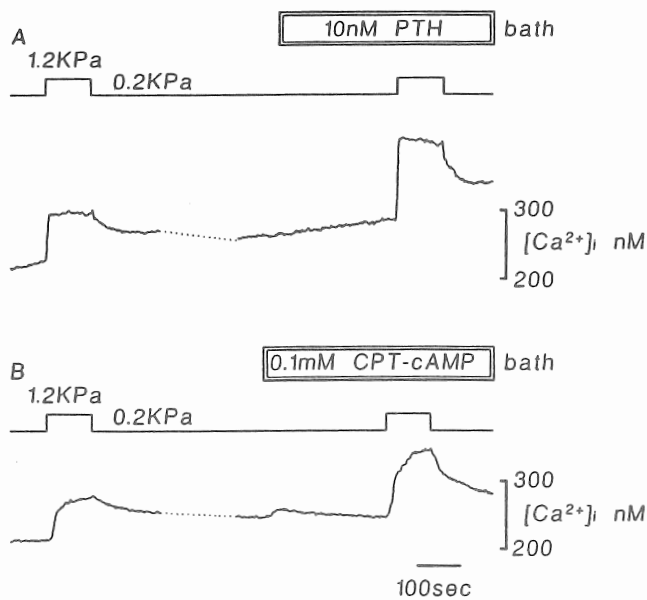


Fig.2. Effects of PTH or CPT-cAMP on pressure dependent increase of $[Ca^{2+}]_i$.

Ca^{2+} を存在する条件で行っているので、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は管腔側からの Ca^{2+} 流入によると考えられるが、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} が放出された可能性も考慮しなければならない。次に管腔内の Ca^{2+} も除いて、10nM PTH 存在下で $[Ca^{2+}]_i$ が管腔内圧の上昇に応じて増加するかどうか、検討した。基底側に PTH を投与した後、灌流圧を 0.2KPa から 1.2KPa に上げると、コントロールでは $\Delta [Ca^{2+}]_i$ は $109 \pm 9nM$ であったのに対し、管腔内液から Ca^{2+} を除き、0.1mM EGTA を加えた条件では $[Ca^{2+}]_i$ は全く上昇しなかった ($\Delta [Ca^{2+}]_i = -4 \pm 4nM$)。再び Ca^{2+} を管腔内に加えると、圧依存性の $\Delta [Ca^{2+}]_i$ は $154 \pm 32nM$ に回復した。したがって、 Ca^{2+} induced Ca^{2+} release のようなメカニズムの存在は否定できないが、少なくとも管腔内圧に依存して管腔側から細胞内に Ca^{2+} が流入すること、それが PTH で促進されることは間違いない。

3.2 圧依存性 Ca^{2+} 輸送に対するチャンネルブロッカーの作用

遠位側尿細管由来の培養細胞では、PTH で引き起こされる Ca^{2+} 流入が dihydropyridine (DHP) 系 Ca^{2+} チャンネルブロッカーで阻害されることが報告されている^{3,4)}。そこで DHP 系 Ca^{2+} チャンネルブロッカーが、ウサギ接合尿細管の PTH、管腔内圧依存性 Ca^{2+} 流入を阻害するかどうかを調べた。

10nM PTH を基底側に投与し、灌流圧を 0.2KPa から 1.2KPa に上げた場合、コントロールでは $\Delta [Ca^{2+}]_i$ は $100 \pm 6nM$ であった。ここで管腔内に $0.1 \mu M$ nifedipine を加えた後、

Fig. 2 をみても分かるように、0.2KPa と低い圧をかけて尿細管を還流すると、PTH や CPT-cAMP を投与しても、それだけではほとんど $[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかった。そこで、0.2KPa と 1.2KPa の圧をかけて還流し、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する PTH の作用を比較したところ、0.2KPa では $\Delta [Ca^{2+}]_i$ は $6 \pm 2nM$ に過ぎなかったが、灌流圧が 1.2KPa の場合、 $\Delta [Ca^{2+}]_i$ は $31 \pm 7nM$ と有意に大きかった。

これらの実験は浴液の Ca^{2+} を除き、管腔内だけに

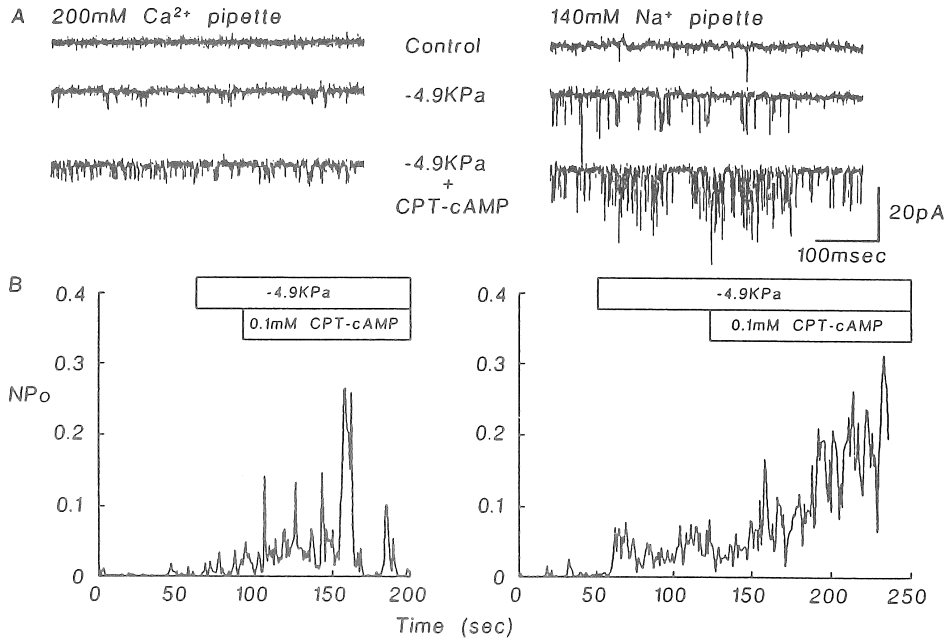


Fig. 3. Effects of CPT-cAMP on stretch-activated cation channel.

[Ca²⁺]_iの上昇を測定したが、その大きさは $144 \pm 13 \text{ nM}$ と全く阻害されなかった。この濃度はL型Ca²⁺チャンネルをブロックするのに十分な濃度であるが、さらに nicardipine の濃度を $10 \mu \text{ M}$ に上げてみた。しかし、 $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ は $144 \pm 13 \text{ nM}$ と阻害作用は見られなかった。

また、高圧灌流下 (1.2 KPa) で $50 \mu \text{ M PTH}$ によって増加した [Ca²⁺]_i を、DHP系Ca²⁺チャンネルブロッカーがどの程度抑制するかを調べた。その結果、nifedipine と benijipine は管腔内に $100 \mu \text{ M}$ を投与しても、その抑制の程度はそれぞれ $23.5 \pm 5.9\%$ 、 $30.1 \pm 11.0\%$ に過ぎないことが分かった。一方、膜張力依存性陽イオンチャンネルの阻害薬である Gd³⁺ は、 $10 \mu \text{ M}$ で $89.5 \pm 18.5\%$ 抑制した。したがって、ウサギ接合尿管管腔側膜のCa²⁺流入経路はDHP感受性Ca²⁺ではなく、膜張力依存性陽イオンチャンネルである可能性が高い。

3.3 Ca²⁺透過性チャンネルの同定

これまでの実験結果に基づいて、接合尿管の管腔側膜で膜張力依存性陽イオンチャンネルの同定を行った。裏返した尿管ではPTHの受容体がある基底側膜は隠されているので、PTHの代わりにCPT:cAMPの作用を検討した。

Ca²⁺ピペットを用いて、cell-attachedパッチクランプによって管腔側膜から記録した単一チャンネル電流がFig. 3の左パネルである。パッチピペット内に陰圧をかける前にはチャンネルはほとんど開いておらず、平均開チャンネル数 (NP_o) は 0.005 ± 0.001 に過ぎなかった。しか

し、 -4.9KPa の陰圧をピペット内かけると開時間の非常に短い、内向きの単一チャンネル電流 ($42\pm 2\text{pS}$) が活性化された ($\text{NP}_0=0.022\pm 0.005$)。0.1mM CPT-cAMP を投与すると、次第にチャンネル活性は促進され、1-2分後には NP_0 は 0.085 ± 0.014 まで増大した。

次に Na^+ ピペットを用いて同じ実験を繰り返した (Fig. 3 右パネル)。パッチピペット内に -4.9KPa の陰圧をかけると、やはり開時間の短い内向き電流が活性化され、 NP_0 は 0.003 ± 0.001 から 0.033 ± 0.001 に増大した。0.1mM CPT-cAMP 投与後は NP_0 はさらに 0.089 ± 0.024 まで上がり、 Ca^{2+} ピペットを用いた場合と同様に、膜張力依存性と CPT-cAMP 依存性を示した。ただし、そのコンダクタンスは $173\pm 7\text{pS}$ と大きかった。単一チャンネル電流は静止電位より $68.5\pm 1.9\text{mV}$ だけプラス側の電位で逆転し、電流-電圧関係は保母直線であった。また、140mM Na glutamate を満たしたピペットを用いても、電流-電圧曲線は Na^+ ピペットを用いた場合のそれと全く変わらなかった。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定では、PTH は低い灌流圧では Ca^{2+} 流入に対して明らかな促進作用を示さなかった。上述した膜張力依存性チャンネルが、同じ特性を示すかどうかを調べた。 Na^+ ピペットを用い、ピペット内に陰圧をかけずに CPT-cAMP を投与してみると、投与後 2-5 分を経過しても全くチャンネル活性は促進されなかった (コントロールで $\text{NP}_0=0.004\pm 0.002$ 、CPT-cAMP 投与下で $\text{NP}_0=0.002\pm 0.001$)。パッチ膜上にチャンネルの存在を確認するため、実験の最後にパッチピペットに陰圧をかけ、チャンネル活性が増大するのを観察した。

3.4 チャンネルの開閉キネティクス

膜張力依存性チャンネルの開閉キネティクスは、チャンネルの開時間が非常に短く、パッチ膜上にただ一つのチャンネルしか存在しないことを確認できなかった。このため閉反応の解析をあきらめ、複数のチャンネルが存在しても解析可能な開反応のみを解析した。

ピペットに陰圧をかけた状態で単一チャンネル電流の記録から、チャンネルの1回ごとの開時間を測定し、ある開時間の相対出現頻度分布を調べた。 Ca^{2+} ピペットから記録した電流でも、 Na^+ ピペットから記録した電流でも、その分布は 2 相性を示した。このことから膜張力依存性チャンネルは、速い閉反応と比較的遅い閉反応があることが分かる。 Ca^{2+} および Na^+ ピペットから記録した電流の速い閉反応の時定数はそれぞれ、 $0.15\pm 0.03\text{msec}$ と $0.15\pm 0.02\text{msec}$ で、遅い閉反応の時定数はそれぞれ、 $0.68\pm 0.20\text{msec}$ と $0.58\pm 0.05\text{msec}$ であり、互いにより一致を示した。

3.5 管腔内電位に対する Gd^{3+} の作用

Shimizu らは、単離灌流したウサギ接合尿管の V_m と V_i に対する PTH の作用を調べ、 V_i だけが過分極に続いて脱分極し、 V_m にはほとんど変化がないことを見いだした⁹⁾。さらに、 V_i の過分極は管腔内の Na^+ を除くと消失し、脱分極は管腔内に amiloride を投与したり、管腔内の Ca^{2+} を除くと阻害された。この結果から彼らは、PTH は管腔側膜で最初 Na^+ と Ca^{2+}

の流入を引き起こし、その後、細胞内に入った Ca^{2+} が amiloride 感受性 Na^+ チャネルを阻害することを示唆した。この反応に対して膜張力依存性チャネルがどのように関与しているかを調べるため、 V_i に対する PTH の作用が Gd^{3+} でどう変化するかを検討した。

コントロールでは $10 \mu\text{M}$ PTH の投与に対して、 V_i の過分極と脱分極の大きさはそれぞれ、 $-2.3 \pm 0.5\text{mV}$ と $+2.7 \pm 0.6\text{mV}$ だったが、管腔内に $10 \mu\text{M}$ Gd^{3+} 投与すると過分極と脱分極の大きさはそれぞれ $-2.8 \pm 1.0\text{mV}$ と $+1.3 \pm 0.4\text{mV}$ となって脱分極は有意に抑制された。

4. 考察

4.1 膜張力依存性チャネルのイオン選択性

Ca^{2+} ピペットから記録した単一チャネル電流は、ピペット内に 200mM CaCl_2 が存在する。このイオン環境ではピペット内の Ca^{2+} 、 Cl^- と細胞内の K^+ が流れうる主要なイオンである。しかし、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} の細胞内濃度をそれぞれ、 $100-150\text{mM}$ 、 $10-30\text{mM}$ 、 $0.1-1 \mu\text{M}$ と仮定すると、平行電圧が管腔側膜にかかる電圧 ($-64.1 \pm 2.5\text{mV}$) よりもプラス側にあるのは Ca^{2+} だけで、この内向き電流は Ca^{2+} によって運ばれている。

一方、 Na^+ ピペットから記録した電流は、管腔側膜を $+68.5 \pm 1.9\text{mV}$ 脱分極させた電圧、即ち、管腔側膜電圧が 0mV 付近で逆転した。このときパッチ膜内外に存在する主要なイオンである Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の平行電圧はいずれもこの付近にはないので、これらのイオンが区別されずに透過している可能性がある。しかし、パッチピペット内の Cl^- を glutamate に置き換えても電流-電圧曲線は全く変わらなかったため、この電流は Cl^- を除く Na^+ と K^+ が等しく運ばれていると考えられる。

また、 Ca^{2+} ピペットと Na^+ ピペットから記録した電流は、1) 膜張力依存性、2) CPT-cAMP による促進、3) 閉反応のキネティックスの 3 点で共通した性質を持つことから、同じチャネルを通過していると考えられる。以上を考え合わせると、膜張力依存性チャネルは、1 価および 2 価の陽イオンに対して選択性のないチャネルであると考えられる。ただし、 Ca^{2+} ピペットからは外向の K^+ 電流を記録できなかったため、細胞外に高濃度の Ca^{2+} が存在すると、1 価イオンの透過性が低下する可能性がある。

4.2 PTH で調節される Ca^{2+} 流入経路

接合尿細管は Ca^{2+} 排泄の主要な調節部位であるが、本研究で初めて管腔内圧あるいは原尿の流速に依存していることが分かった。in vivo で測定された遠位側尿細管の管腔内圧は 1KPa 付近でゆらいでおり、本研究で明らかにした Ca^{2+} 流入の圧依存性は、極めて生理的な管腔内圧の範囲にある。また、圧依存性 Ca^{2+} 流入は、 Ca^{2+} 排泄の主要な調節ホルモンである PTH や、その 2 次メッセンジャーである cAMP の膜透過性誘導体 CPT-cAMP でともに 2 倍以上に促進された。したがって、PTH で調節される Ca^{2+} 流入経路が、管腔内圧あるいは原尿の流速に依存することは明らかである。管腔内圧の変化はそれ自体が、また、原尿の流れ

は剪断応力によって管腔側膜に張力をかけることが十分に考えられる。実際、培養血管内皮細胞では、剪断応力によって Ca^{2+} が流入することが報告されている。

本研究で発見した膜張力依存性陽イオンチャンネルと圧依存性 Ca^{2+} 流入は、

- 1) 膜張力で促進される。
- 2) 膜に張力が加わった条件で、PTH や CPT-cAMP によって促進される。
- 3) 逆に、膜に張力が加わらないと、PTH や CPT-cAMP の作用が顕在化しない。

の3点で共通している。さらに、膜張力依存性陽イオンチャンネルのブロッカーである Gd^{3+} が、PTH によって増加した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ をほぼ完全に抑制する。したがって、PTH および管腔内圧（あるいは流速）に依存する Ca^{2+} 流入経路は膜張力依存性 Ca^{2+} チャンネルであり、これが接合尿細管管腔側膜の主要な Ca^{2+} 輸送経路である結論される。

Shimizu らは、 V_L の過分極に続く脱分極という2相性の変化から、PTH が最初、 Na^+ と Ca^{2+} の流入を促進し、続いて流入した Ca^{2+} が amiloride 感受性 Na^+ チャンネルを阻害することを示唆している⁵⁾。彼らは、PTH が非選択性陽イオンチャンネルを活性化して、 Na^+ と Ca^{2+} の流入を促し、第1相の過分極を起こしているのではないかと推測している。本研究で発見した膜張力依存性チャンネルは、この非選択性チャンネルそのものである可能性もある。しかし、PTH で引き起こされる V_L の2相性変化のうち、 Gd^{3+} で抑制されたのは脱分極だけであった。 Gd^{3+} が PTH による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を完全に抑制したことと考え合わせると、 Ca^{2+} の主な流入経路は膜張力依存性チャンネルだが、他に Na^+ を主体に通すチャンネルがある可能性が高い。

本研究の結果とは異なり、遠位側尿細管由来の培養細胞では、PTH 投与で引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が DHP 系 Ca^{2+} チャンネルブロッカーで阻害されることが報告されている^{3,4)}。また、本研究に用いた標本と同じウサギ接合尿細管の管腔側膜に、PTH で促進される DHP 感受性 Ca^{2+} 選択性チャンネルがあることを、パッチクランプ法によって Tan と Lau が報告している⁶⁾。実際、本研究でも、 Gd^{3+} が V_L の脱分極反応を完全に抑制できなかったのは、このチャンネルを通る Ca^{2+} 流入が残っていたためではないかと推測される。ただし、これらの実験に使用された DHP 系 Ca^{2+} チャンネルブロッカーの濃度は、数 $10 \mu\text{M}$ と血管平滑筋などの L 型 Ca^{2+} チャンネルをブロックする濃度より 100 倍以上高く、これらの上皮細胞に存在する Ca^{2+} チャンネルは、L 型 Ca^{2+} チャンネルとは考えにくい。また、このチャンネルが接合尿細管管腔側膜に存在したとしても、本研究で明らかにしたように、PTH で上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を抑制したのは、DHP 系 Ca^{2+} チャンネルブロッカーではなく Gd^{3+} であったことを考えれば、どちらのチャンネルが主要な Ca^{2+} 輸送経路であるかは明らかである。本来の接合尿細管では、膜張力依存性陽イオンチャンネルに比べて DHP 感受性 Ca^{2+} チャンネルの密度が著しく低かったのが、培養細胞ではその発現比率が逆転しているのではないかと推測される。

4.3 圧依存性（流速依存性） Ca^{2+} 流入の生理的意義

流速依存性 Ca^{2+} 流入のメカニズムは、血管内皮細胞でもっともよく研究されている。この

組織は、血圧が上昇したときに Ca^{2+} 流入を起こして内皮由来血管拡張因子（EDRF）を放出し、血管を拡張させると考えられている。しかしこの仮説は、培養液を攪拌して剪断応力を与えたり、細胞を培養した伸縮性基盤を伸展したときに Ca^{2+} 流入が観察されることに基づいており、本来の血管内の血流によって Ca^{2+} 流入が起こるかどうかは確かめられていない。組織は異なるが、管状構造を持つ組織の管腔内圧（あるいは管腔内流速）を上げたときに、実際に Ca^{2+} 流入が起こることを観察したのは本研究が最初である。

血管内細胞では流速依存性 Ca^{2+} 流入は、上述したように血圧の調節にとって重要な働きをしていると考えられているが、尿細管ではどのような生理的意義を考えられるだろうか。例えば、我々はしばしば水や食塩を取り過ぎてしまうが、こうした場合 vasopressin の分泌や renin-angiotensin-aldosterone 系が抑制され、利尿を起こす。これは水や Na^+ を排泄するには都合がよいが、そのままでは大量に排泄される尿とともに Ca^{2+} のような比較的摂取しにくい電解質までも同時に捨てられてしまう。尿量が増えれば増えるほど Ca^{2+} の再吸収が増大しなければ、体内の総 Ca 量が減少し、低 Ca^{2+} 血症や最近問題になっている骨多孔症などの疾患を招くおそれがある。本研究で明らかにしたように、接合尿細管では原尿の流れが増えれば増えるほど Ca^{2+} の再吸収能が増大し、また、PTH の作用も増強されて、 Ca^{2+} の損失を防いでいるといえる。

4.4 Ca^{2+} 輸送の調節と Na^+ 輸送の相互作用

接合尿細管管腔側膜の Ca^{2+} 輸送メカニズムが、膜張力依存性陽イオンチャネルであることが本研究で明らかになったが、基底側の Na^+ 濃度（ $[\text{Na}^+]_i$ ）を下げると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することから、基底側膜では Na/Ca 交換輸送によって Ca^{2+} が汲み出されると考えらる^{7,8)}。これは、もし管腔側から大量の Na^+ の流入があれば、細胞内の Na^+ 濃度が上昇して基底側の Ca^{2+} 輸送が抑制されることを意味し、十分な Ca^{2+} の再吸収ができなくなる。したがって、 Ca^{2+} の再吸収促進は、管腔側から細胞内への Na^+ 流入抑制と共役していることが重要である。

Shimizu らは、PTH による V_i の 2 相性の変化のうち、第 2 相の脱分極反応は流入した Ca^{2+} が amiloride 感受性 Na^+ チャネルを阻害するためと結論した⁹⁾。我々の研究でも、膜張力依存性陽イオンチャネルのブロッカーである Gd^{3+} が脱分極反応を抑制するのを確認した。このように PTH は、 Ca^{2+} を介して amiloride 感受性 Na^+ チャネルを抑制することで Ca^{2+} 自体の輸送をさらに促進することが示唆される。PTH 作用時に起こる、 Ca^{2+} の排泄が低下するのに対し Na^+ の排泄は増加するといった Ca^{2+} と Na^+ 排泄の解離は、 Ca^{2+} の再吸収を促進する結果、現れた現象であると考えられる。

5. 今後の課題

Gd^{3+} 存在下でも、PTH 作用時の V_i の脱分極反応は完全には抑制できず、僅かな Ca^{2+} の流入が残っていると考えられる。Tan と Lau⁶⁾ が報告した DHP 感受性 Ca^{2+} チャネルを透過す

る Ca^{2+} 流入ではないかと考えられるが、現在のところ検討できていない。

また、amiloride 感受性 Na^+ チャネルがどのようなメカニズムで抑制されるのかも、このチャネル以外に Na^+ , Cl^- 共輸送が接合尿管管腔側膜に存在するが、やはり PTH 作用時には抑制されるのかなど、今後の課題として残った。

6. 文献

- 1) G. R. Shareghi, and L. C. Stoner. Calcium transport across segments of the rabbit distal nephron in vitro. *Am. J. Physiol.* 235: F367-F375, 1978.
- 2) T. Shimizu, K. Yoshitomi, M. Nakamura, and M. Imai. Effects of PTH, calcitonin, and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments. *Am. J. Physiol.* 259: F408-F414, 1990.
- 3) B. J. Bacskai, and P. A. Friedman. Activation of latent Ca^{2+} channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* 347: 388-391, 1990.
- 4) L.-J. Dai, and G. A. Quamme. Hormone-mediated Ca^{2+} transients in isolated renal cortical thick ascending limb cells. *Pflügers Arch.* 427: 1-8, 1994.
- 5) T. Shimizu, K. Yoshitomi, M. Nakamura, and M. Imai. Effect of parathyroid hormone on the connecting tubule from the rabbit kidney: biphasic response of transmural voltage. *Pflügers Arch.* 416: 254-261, 1990.
- 6) S. Tan, and K. Lau. Patch-clamp evidence for calcium channels in apical membranes of rabbit kidney connecting tubules. *J. Clin. Invest.* 92: 2731-2736, 1993.
- 7) J. E. Bourdeau, and K. Lau. Basolateral cell membrane Ca-Na exchange in single rabbit connecting tubules. *Am. J. Physiol.* 258: F1497-F1503, 1990.
- 8) K. Hanaoka, O. Sakai, M. Imai, and K. Yoshitomi. Mechanisms of calcium transport across the basolateral membrane of the rabbit cortical thick ascending limb of Henle's loop. *Pflügers Arch.* 422: 339-346, 1993.

Interaction between Ca^{2+} transport regulation and Na^+ transport
in connecting tubule.

Junichi Taniguchi, and Masashi Imai.

Department of Pharmacology, Jichi Medical School.

Summary

To characterize Ca^{2+} transport across the apical membrane of rabbit connecting tubule (CNT), we examined the effects of luminal pressure on parathyroid hormone (PTH)-dependent apical Ca^{2+} transport in this segment perfused in vitro. An increase of perfusion pressure (0.2 to 1.2KPa) elevated cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by $42 \pm 11\text{nM}$ in fura 2 loaded CNT. Basolateral application of 10nM PTH accelerated the response. Addition of 0.1mM chlorphenyl-thio-cAMP (CPT-cAMP) to bath also augmented the response from $36 \pm 16\text{nM}$ to $84 \pm 26\text{nM}$. Under steady perfusion pressure at 1.2KPa, 10nM PTH increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by $31 \pm 7\text{nM}$, whereas it did only by $6 \pm 2\text{nM}$ at 0.2KPa. The pressure dependent increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was abolished by removing Ca^{2+} from lumen, and was not affected by adding 0.1 or 10 μM nifedipine into lumen in the presence of 10nM PTH. Both 100 μM nifedipine and benidipine added into lumen suppressed by 23.5 \pm 5.9% and by 30.1 \pm 11.0% of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by 50nM PTH, respectively, but luminal 10 μM Gd^{3+} did by 89.5 \pm 18.5%. An application of 10nM PTH hyperpolarized transmural voltage (V), followed by depolarization which indicated the block of amiloride-sensitive Na^+ channels. Luminal Gd^{3+} (10 μM) reduced only depolarization from $+2.7 \pm 0.6\text{mV}$ to $+1.3 \pm 0.4\text{mV}$ measured at 5min after peak hyperpolarization. Because Ca^{2+} is transported by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the basolateral membrane, block of apical Na^+ entry via amiloride-sensitive Na^+ channel could accelerated Ca^{2+} transport. Cell-attached patch clamp studies on the apical membrane of everted CNT using pipette filled with either 200mM CaCl_2 or 140mM NaCl revealed channel activities ($42 \pm 2\text{pS}$ or $173 \pm 7\text{pS}$, respectively). An application of negative pressure (-4.9KPa) to the patch pipette augmented its mean number of open channels from 0.005 ± 0.001 to 0.022 ± 0.005 in the Ca^{2+} -filled pipette, and was further accelerated to 0.085 ± 0.014 by 0.1mM CPT-cAMP. In the Na^+ -filled pipette, similar results were obtained, and CPT-cAMP did not activate the stretch-activated channels in the absence of negative pressure. These results suggest that a stretch-activated nonselective cation channel is a major route of Ca^{2+} transport in the apical membrane of rabbit CNT and that it is activated by PTH in the presence of hydrostatic pressure or luminal fluid flow.