

9736 腎尿細管 K^+ チャネルの $NaCl$ センサー機能の解明

助成研究者：岡田 泰伸 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

共同研究者：Ravshan SABIROV (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

Rustam AZIMOV (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

体液における $NaCl$ 量や濃度は腎尿細管とくに密集斑細胞において検知され、「レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系」でコントロールされている。この腎尿細管での $NaCl$ センサーのメカニズムについての詳細は未だ不明である。

密集斑のATP依存性 K^+ チャネルにおいて、その活性自身が尿細管腔液の Na^+ に対する感受性を示すことが明らかにされている。一方、腎臓に発現しているROMK1チャネルは、細胞内pHに対して著しい感受性を示すことも知られている。密集斑においては Na^+/H^+ 交換トランスポータ(NHE)の活性が高いことが知られているので、密集斑におけるATP依存性 K^+ チャネルの Na^+ 感受性は、NHE活性を介する細胞内pH変化に原因する可能性が考えられる。そこで本研究では、この可能性を直接的に検討するために、腎上皮由来の株細胞HEK293やツメガエル卵母細胞に外来性にROMK1やNHE3を発現させて、ROMK1チャネルの $NaCl$ センサーメカニズムを調べた。

卵母細胞に発現させたROMK1チャネル電流は、外液の $NaCl$ をNMDG-Clに置換するとゆっくと抑制され、元へ戻すと電流はゆっくと元のレベルへと回復した。 $NaCl$ のNMDG-Cl置換効果は、マイクロパッチ電流においても同様に観察された。ほぼ同様の効果は、 $NaCl$ をマニトールによって置換しても得られた。 Na^+/H^+ 交換トランスポータの阻害剤であるアミロライド(10 μM)の効果調べたところ、部分的ではあるが Na^+ 除去効果を抑制した。ラット腎よりクローニングされ、密集斑など尿細管各所に発現が知られている Na^+/H^+ 交換トランスポータNHE3を卵母細胞に共発現させると、 $NaCl$ のNMDG-Cl置換効果は更に著しいものとなり、ROMK1チャネルの定常電流の Na^+ 除去による抑制の効果のスピードも程度も著しくなった。

HEK293細胞内にNHE3と共発現させたROMK1チャネル電流においても同様に Na^+ 除去による活性抑制がみられた。

以上の結果から、細胞外の Na^+ 減少は、 Na^+/H^+ 交換トランスポータを介して細胞内pHを減少させることによって、ROMK1チャネル活性を抑制することが結論された。従って、密集斑の $NaCl$ センサー機構の内の Na^+ センサーには、ROMK1チャネルとNHEトランスポータが関与しているものと考えられる。 Cl^- センサーには Cl^- チャネルや $Na^+-K^+-2Cl^-$ コトランスポータなどが関与している可能性が考えられる。

9736 腎尿細管 K^+ チャネルのNaClセンサー機能の解明

助成研究者：岡田 泰伸 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

共同研究者：Ravshan SABIROV (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

Rustam AZIMOV (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

<研究目的>

体液における NaCl 量や濃度は腎尿細管とくに密集斑細胞において検知され、「レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系」でコントロールされている。この腎尿細管での NaCl センサーのメカニズムについての詳細は未だ不明である。

腎尿細管上皮細胞膜の K^+ イオン透過性は、腎機能に重要な役割を果たしているものと考えられている。尿細管上皮にはとくに ATP 依存性 K^+ チャネルが多数存在することが最近のパッチクランプ研究によって明らかにされている[1, 2]。また最近、腎から ROMK1 やそのスプライス・ヴァリアントである ROMK2 や ROMK3 がクローニングされ[3, 4]、これらが腎尿細管 TAL, CCD や密集斑における低コンダクタンス, ATP 依存性 K^+ チャネルの分子実体であるものと考えられるようになった。

密集斑の ATP 依存性 K^+ チャネルにおいて、その活性自身が尿細管腔液の Na^+ に対する感受性を示すことが明らかにされている[5]。一方、ROMK1 チャネルは、細胞内 pH に対して著しい感受性を示すことも知られている[6]。密集斑においては Na^+/H^+ 交換トランスポーター (NHE) の活性が高いことが知られているので、密集斑における ATP 依存性 K^+ チャネルの Na^+ 感受性は、NHE 活性を介する細胞内 pH 変化に原因する可能性が考えられる。

本研究では、この可能性を直接的に検討するために、腎上皮由来の株細胞 HEK293 やツメガエル卵母細胞に外来性に ROMK1 や NHE3 を発現させて、ROMK1 チャネルの NaCl センサーメカニズムを調べた。

<研究方法>

分子生物学

ROMK1 の cDNA は倉智嘉久博士 (阪大・医) より、ラット NHE3 の cDNA は若林繁夫博士 (循環器センター) より御恵与いただき、それらの mRNA を合成した。ツメガエル卵母細胞 (ステージ V と VI) はコラゲナーゼ法により調整し、mRNA を注入後、ND96 液中にて2-4日間培養したのちに実験に供した。HEK293 細胞は DMEM 液中で培養し、これらの cDNA を lipofectamine 法によってトランスフェクションした。

電気生理学

卵母細胞の全細胞電流の測定は、二本刺し膜電位固定法によって行った。用いた細胞外液は次の組成 (mM) のものである: 90 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7.4)。必要ときには NaCl をすべて NMDG-Cl に置換して用いた。セル・アタッチ法による単一チャネル電流記録はビテリン層を手動的に取り除いた上で行った。細胞外液及びピペット内液の組成 (mM) は、100 KCl, 10 EDTA, 10 HEPES (pH 7.3) である。

HEK293 細胞の全細胞電流の測定はナイスタチン穿孔パッチクランプ法によって行った。用いた細胞外液の組成 (mM) は、130 NaCl, 10 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7.4)、ピペット内液は、107 KCl, 1 CaCl₂, 1.2MgCl₂, 5HEPES, 10 EGTA (pH 7.2) である。必要時には、外液の NaCl を等浸透圧的に NMDG-Cl 又は マントールに置換した。

電流は Dagan CA-1 又は Axopatch 200A アンプを用いて記録し pCLAMP6 を用いて解析した。実験はすべて室温 (23-25°C) で行った。

<研究結果>

1、卵母細胞に発現させた ROMK1 チャネル

ROMK1 発現によって卵母細胞は、すでに報告[7]したように K⁺ に選択性を示す大電流を持つようになる (図1)。外液の NaCl を NMDG-Cl に置換するとゆっくりと K⁺電流は抑制され、元へ戻すと電流はゆっくりと元のレベルへと回復した (図2A)。定常条件では約 50%にも電流は減少するが (図1AB、図2B)、その弱い内向き整流性に変化はなかった (図1BC)。

これらの結果は、ROMK1 チャネル活性は細胞外 Na⁺濃度によってポジティブに制御されていることを示している。しかし、セルアタッチモードで単一 ROMK1 チャネルを測定したところ、単一チャネルコンダクタンスの大きさも、チャネルのゲーティングも、外液 Na⁺除去によって何ら影響を受けなかった (図3)。従って、細胞外 Na⁺はこの K⁺チャネルのポアに直接作用しているものではないことが明らかとなった。

NaCl の NMDG-Cl 置換効果は、マイクロパッチ電流においても同様に観察された (図4)。ほぼ同様の効果は、NaCl をマントールによって置換しても得られた。従って、ROMK1 チャネル活性は Cl⁻イオン濃度変化には影響されず、Na⁺にのみ感受性を示すことが明らかとなった。

卵母細胞には内在的に NHE1 が発現しているので、上記の Na⁺効果はこの Na⁺/ H⁺交換トランスポータ活性変化をもたらし、その結果生じた細胞内 pH の変化によって引き起こされた可能性がある。そこで、Na⁺/H⁺交換トランスポータの阻害

剤であるアミロライド(10 μ M)の効果を調べたところ、部分的ではあるが Na^+ 除去効果を抑制することが判明した(図5)。

2、卵母細胞に NHE3 と共発現させた ROMK1 チャネル

ラット腎よりクローニングされ、密集斑など尿細管各所に発現が知られている Na^+/H^+ 交換トランスポータ NHE3 を卵母細胞に共発現させると、 NaCl の NMDG-Cl 置換効果は更に著しいものとなり(図2A)、その定常電流抑制効果(図2B)も、抑制スピード(図2C)も著しくなった。

従って、ROMK1 チャネルの Na^+ 感受性は、(少なくとも部分的には)細胞内 pH 変化を介してもたらされていることが結論された。

3、HEK293 細胞内に NHE3 と共発現させた ROMK1 チャネル

ヒト胎児腎株細胞 HEK293 に ROMK1 の cDNA をトランジェントに発現させて、通常的全細胞電流記録法で K^+ 電流を測定したところ、弱い内向き整流性を示す大きな K^+ 電流が測定された。しかし、時間抑制性にこの電流は消失した。ピペット内液に ATP (1 mM)を添加すると、このランダウンは阻止できた。ナスタチンパッチクランプ全細胞電流記録法では、ATP を加えずとも長時間にわたってこの K^+ 電流の測定は可能であった(図6)。

細胞外 NaCl をマニトールに置換しても、この HEK293 細胞に発現させた ROMK1 チャネル電流は高々10-20%しか抑制されなかった。しかし、NHE3 を共発現させた場合には、著しいマニトール置換効果が認められるようになることが明らかとなった(図6)。

4、結論

細胞外の Na^+ は、 Na^+/H^+ 交換トランスポータを介して細胞内 pH を減少させ、ROMK1 チャネル活性を抑制する。

<考察>

腎尿細管の K^+ チャネルは、膜電位の形成や、基底側壁細胞膜での(Na ポンプ活性とカップルした) K^+ リサイクリングや、管腔側膜における K^+ 分泌などに関与している[8]。今回の研究は、新たに尿細管腔液の Na^+ レベルの検知する役割のあることを示している。ROMK1 チャネルは密集斑に発現していることが分子生物学的に明らかにされており[9]、密集斑細胞の管腔側細胞膜には Na^+ 感受性 K^+ チャネル活性がパッチクランプ研究によって明らかにされている[5]。それゆえ、ROMK1 の Na^+ 感受性が、密集斑の NaCl センサーメカニズムに大きな役割を果たしていること

が強く示唆される。このような ROMK1 の Na⁺センサー機能は、尿細管一糸球体フィードバック機構に最も重要な役割を演じているものと考えられる。

密集斑の NaCl センサー機構の内の Na⁺センサーには、ROMK1 チャネルの他に NHE トランスポーターが関与しているものと考えられる。加えて、Cl⁻チャネルや Na⁺-K⁺-2Cl⁻コトランスポーターなどが Cl⁻センサーとして働いている可能性が考えられるので、この方向での今後の研究が望まれる。

<文献>

1. Giebisch G. Renal potassium channels: an overview. *Kidney Int.* 48: 1004-1009, 1995.
2. Wang W., Hebert S.C., Giebisch G. Renal K⁺ channels: structure and function. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 413-436, 1997.
3. Hebert S.C. An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). *Kidney Int.* 48: 1010-1016, 1995.
4. Hebert S.C., Wang W.H. Structure and function of the low conductance K_{ATP} channel, ROMK. *Wiener Klinische Wochenschrift* 109: 471-476, 1997.
5. Hurst A.M., Lapointe J.Y., Laamarti A., Bell P.D. Basic properties and potential regulators of the apical K⁺ channel in macula densa cells. *J. Gen. Physiol.* 103: 1055-1070, 1994.
6. Tsai T.D., Shuck M.E., Thompson D.P., Bienkowski M.J., Lee K.S. Intracellular H⁺ inhibits a cloned rat kidney outer medulla K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 268: C1173-C1178, 1995.
7. Sabirov Z.R., Morishima S., Okada Y. Probing the water permeability of ROMK1 and amphotericin B channels using *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1368: 19-26, 1998.
8. Kawahara K., Anzai N. Potassium transport and potassium channels in the kidney tubules. *Jpn. J. Physiol.* 47: 1-10, 1997.
9. Xu J.Z., Hall A.E., Peterson L.N., Bienkowski M.J., Eessalu T.E., Hebert S.C. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol.* 273: F739-F748, 1997.

<図の説明>

図1 卵母細胞発現系 ROMK1 電流とその Na⁺感受性。

NaCl を NMDG-Cl に置換したときの全細胞電流への影響。

- A. 定常条件下での K⁺電流。右端のパルスプロトコールによって与えた電圧に対する電流応答。
- B. 電流－電圧特性。Aのステップパルス 100 ms 時の電流値をプロット。NMDG-Cl 置換前後の代表的なデータが各2例示されている。
- C. コンダクタンス－電圧特性。Bの値より求めたコンダクタンスを標準化して示されている。

図2 卵母細胞発現系 ROMK1 電流の Na⁺感受性に対する NHE3 共発現の影響。

- A. NMDG-Cl 置換効果及びその回復の時間経過。-100 mV から -20 mV へのランプ波を -60 mV の保持電位から与えたときのピーク電流応答をプロット。線は ROMK1 単独発現系、白丸は NHE3 との共発現系でのデータを示す。
- B. NMDG-Cl 置換による抑制の定常条件下での程度。-100 mV での電流値より計算。ROMK1 単独発現 (n=6) と NHE3 との共発現 (n=5) の場合の平均値 (棒グラフ) と標準偏差値 (縦線)。
- C. NMDG-Cl 置換の抑制効果の時間経過の最大スピードの平均値 (棒グラフ) と標準偏差値 (縦線)。ROMK1 単独 (n=6)、NHE3 と共発現 (n=5)。

図3 ROMK1 発現卵母細胞上での単一 K⁺チャンネル電流に対する Na⁺のマニトール置換の無影響。

- A. 代表的な単一チャンネル電流記録。
- B. 単一チャンネル電流－電圧特性。5例の平均値 (丸印及び三角印) の標準偏差値 (縦線)。
- C, D. ROMK1 チャンネルのマニトール置換後、前のゲーティングのキネティクス。

図4 ROMK1 発現卵母細胞のマクロパッチ K⁺電流に対する NMDG-Cl 置換による Na⁺除去効果 (3例の実験の代表例)。

- 左. ランプ波 (+150 mV から -150 mV) で得られた電流－電圧特性に対する NMDG 置換の影響。
- 右. ±100mV における K⁺電流ピーク値に対する NMDG 置換の効果とその回復の時間経過。

図5 ROMK1 発現卵母細胞の全細胞 K^+ 電流の NMDG 置換による Na^+ 除去効果に対するアミライド (10 mM) の影響。

図6 ROMK1/ NHE3 共発現 HEK293 細胞の全細胞 K^+ 電流の Na^+ 除去 (マニトール置換) 効果。(6例の実験の代表例)。

- A. マニトール置換効果及びその回復の時間経過。 -100 mV から +100 mV へのランプ波を -60 mV の保持電位から与えたときのピーク電流応答をプロット。
- B. -100 mV から +100 mV へ 10 mV おきに増大させたステップパルスに対する電流応答 (保持電位 -60 mV)。
- C. ランプ波による電流 - 電圧特性。

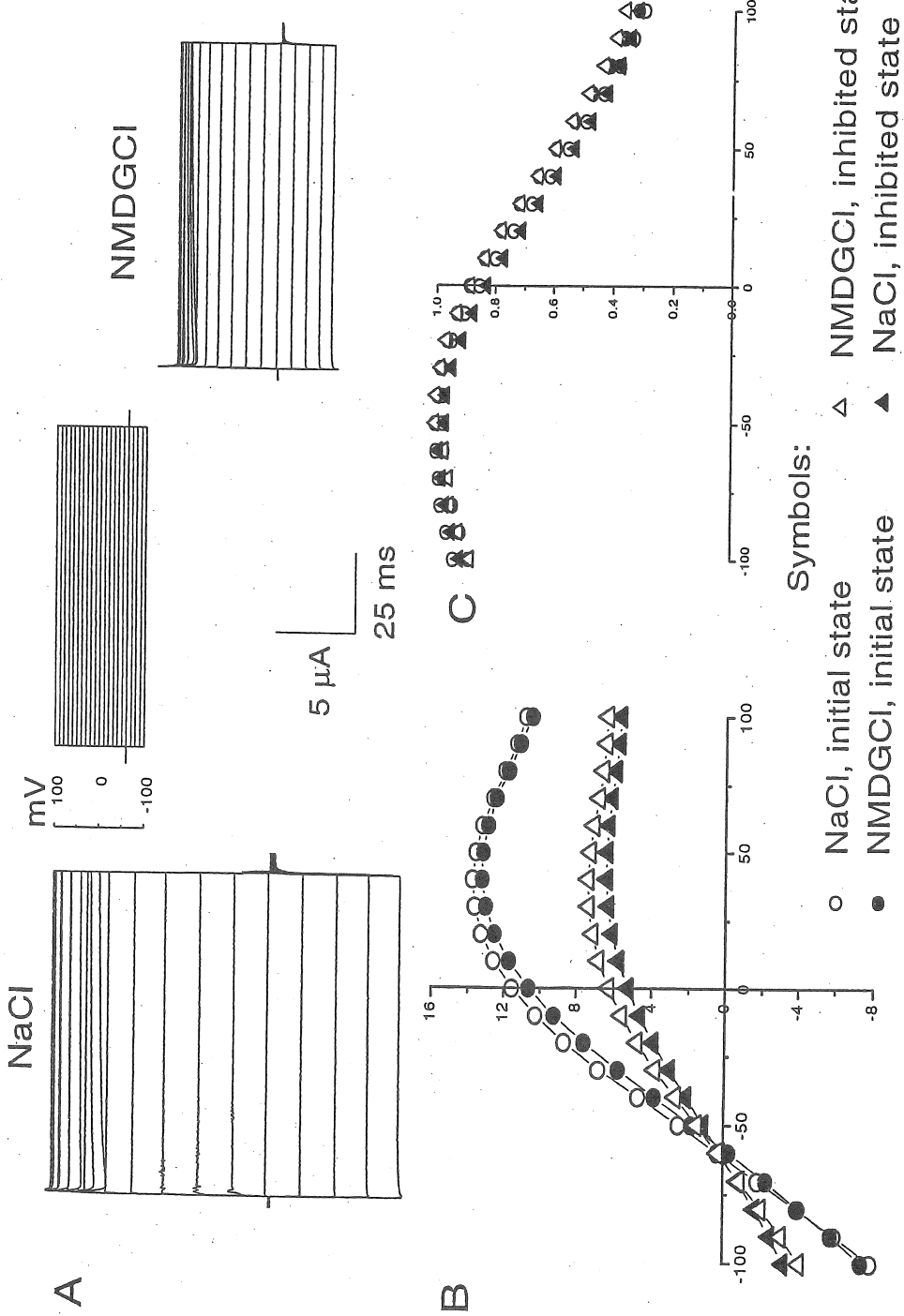


FIG 1 Na^+ sensitivity of macroscopic current of RDMKI channel expressed in a *Xenopus* oocyte.

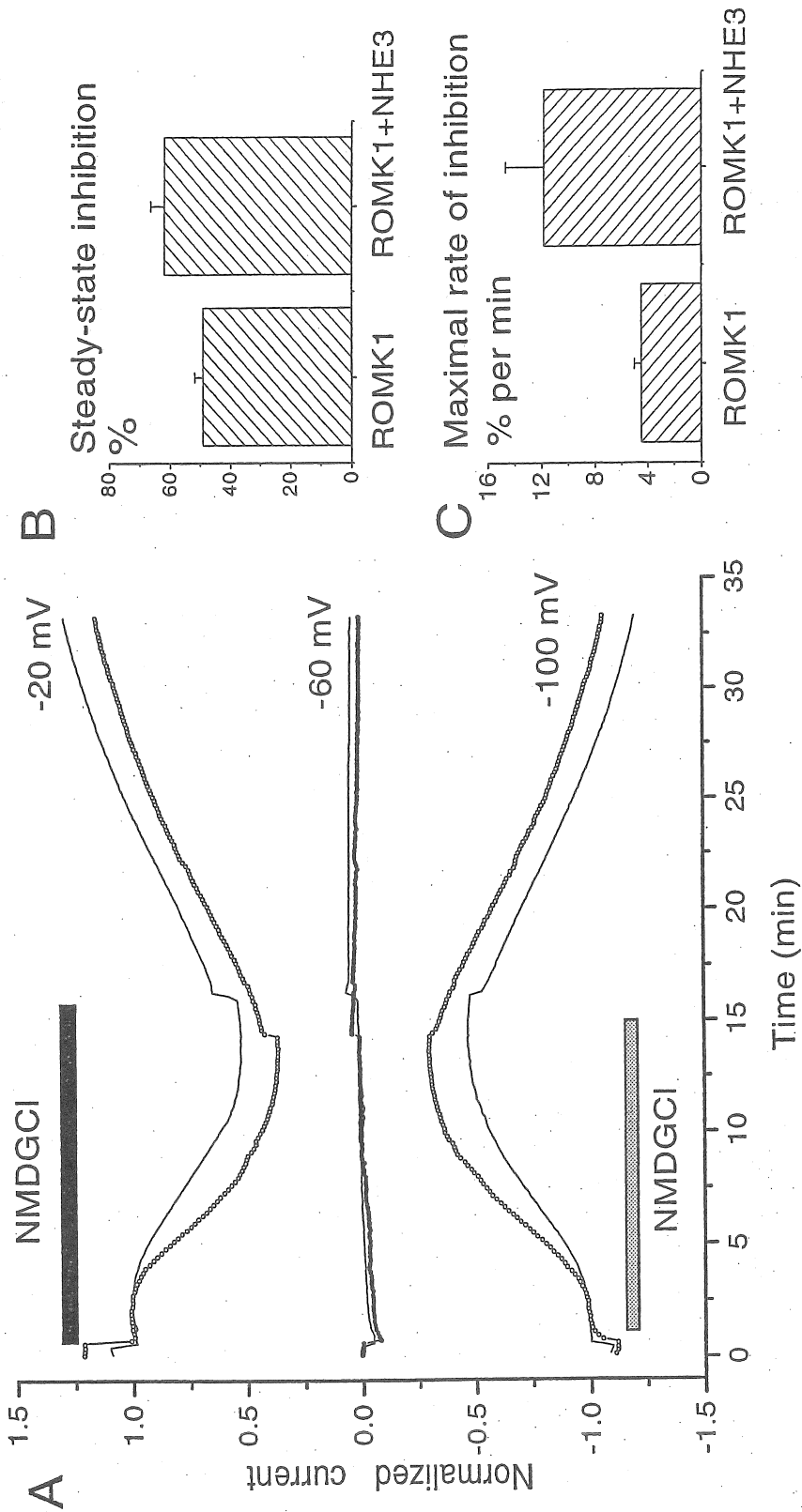


Fig 2 Effect of coexpression with NHE3 on Na^+ sensitivity of macroscopic current of ROMK1 channel expressed in *Xenopus oocytes*.

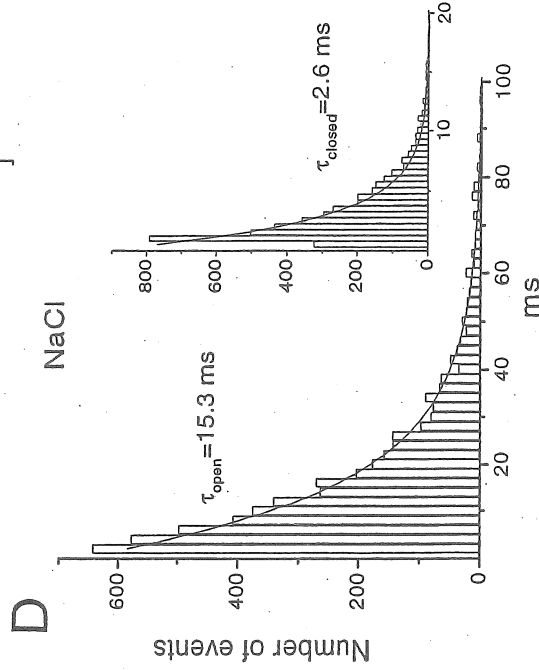
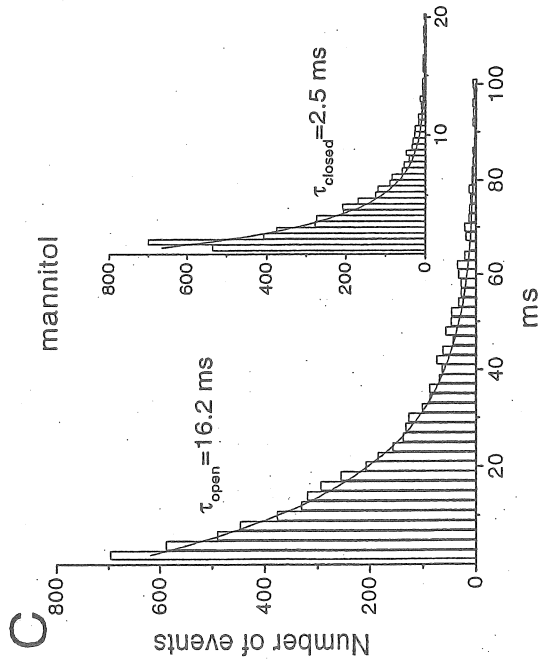
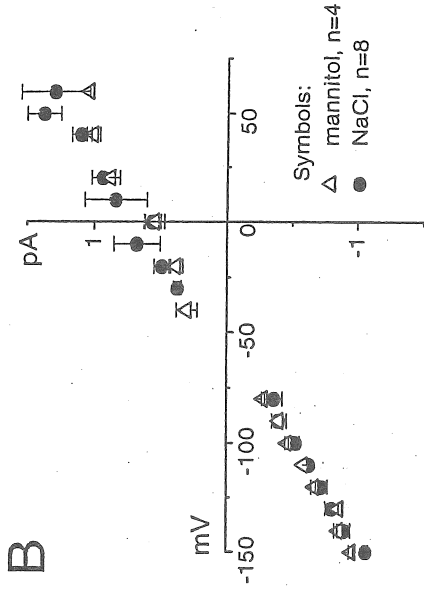
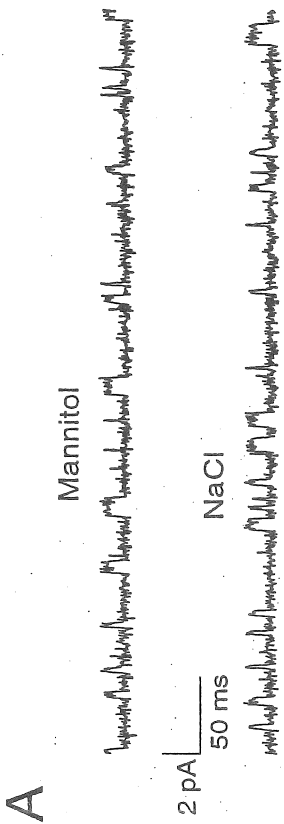


Fig 3 No effect of Na^+ removal from the pipette solution on single ROMKI channel activities in the cell-attached patches on *Xenopus* oocytes.

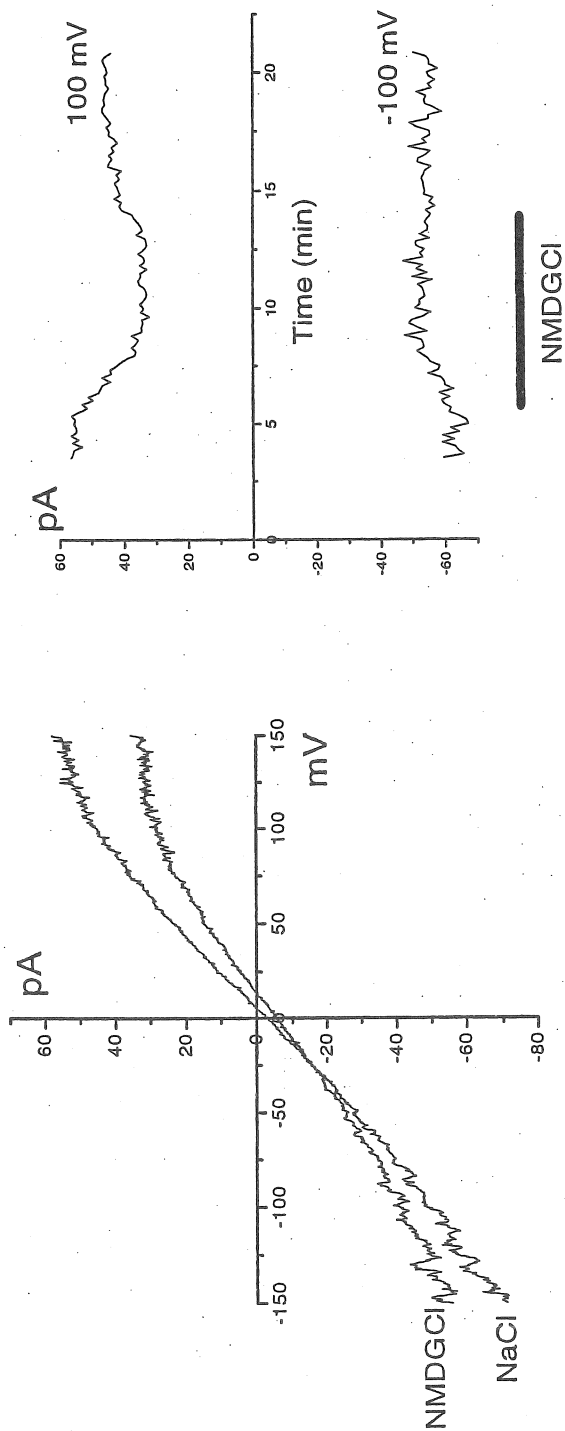


FIG 4 Inhibitory effect of Na^+ removal from bath solution on the ROMK1 macropatch currents on a *Xenopus* oocyte.

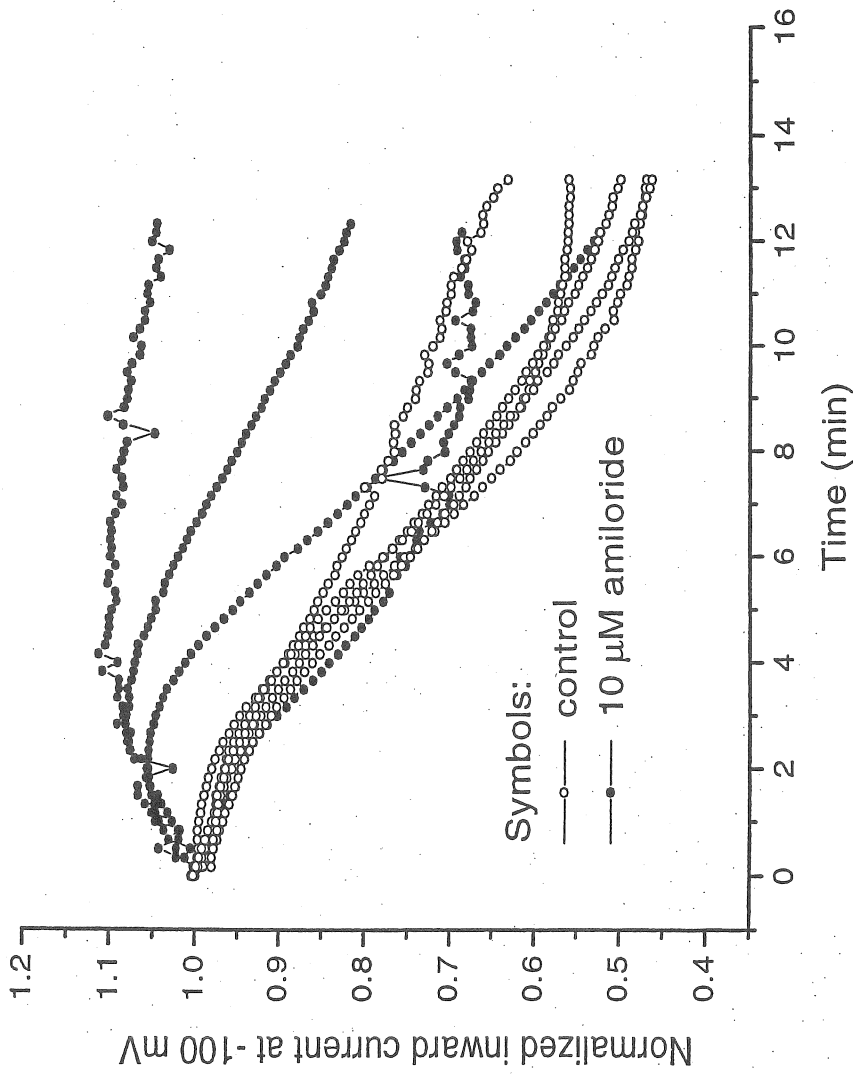


FIG 5 Amiloride effect on Na^+ sensitivity of macroscopic currents of RDMX1 channel expressed in Xenopus oocytes.

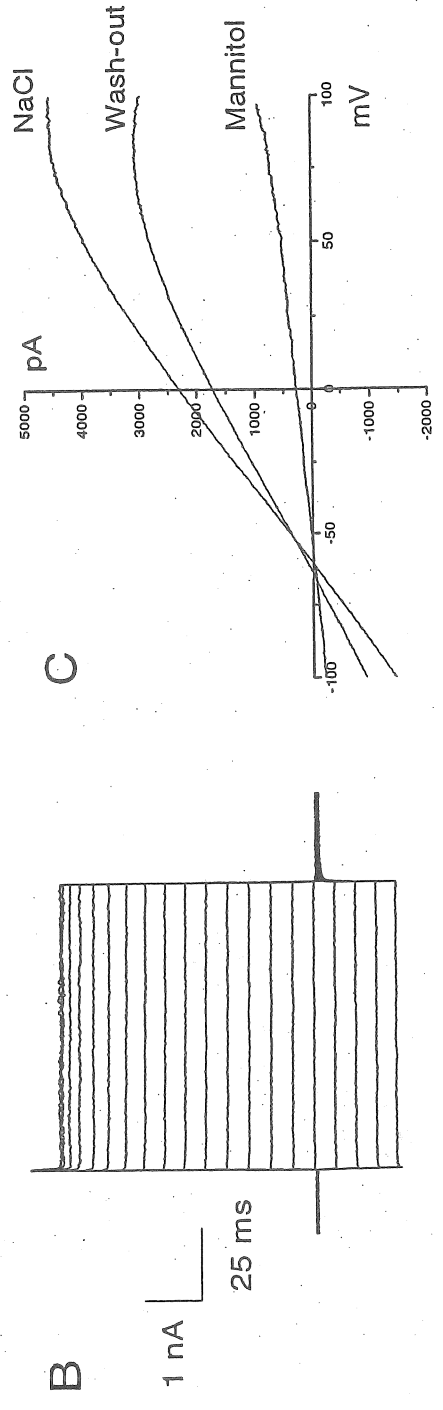
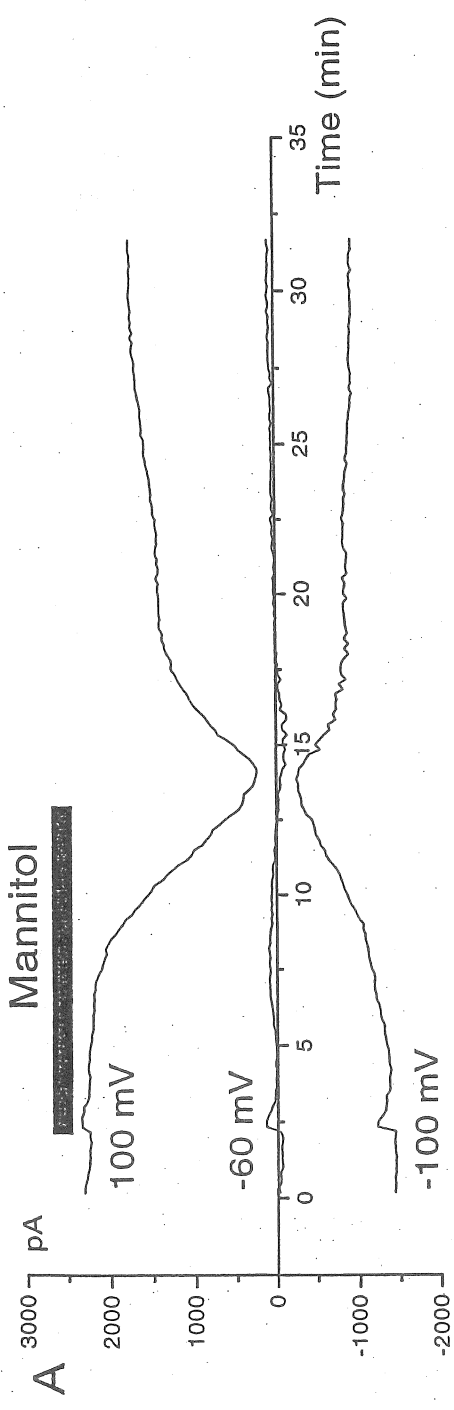


FIG 6 Na^+ sensitivity of macroscopic currents of ROMK1 channel expressed in human HEX293 cells.

NaCl Sensor Mechanism of Renal Tubular Potassium Channels

Yasunobu Okada, Ravshan Sabirov, Rustam Azimov

National Institute for Physiological Sciences

Summary

Potassium permeability of renal epithelial cells is a crucially important parameter in kidney function. An ATP-sensitive K^+ channel ROMK1 and its splice-variants ROMK2 and ROMK3 have recently been cloned from kidney and most likely represent low-conductance K_{ATP} channels of TAL, CCD and macula densa (Hebert and Wang 1997). Macula densa cells have been shown to possess high density of potassium channel of intermediate conductance, responding to the changes in extracellular Na^+ (Hurst et al. 1994). Recent studies have established the presence of both ROMK potassium channels (Xu et al. 1997) and NHE3 type Na/H antiporters (Amemiya et al. 1995). The aim of this project was to reveal a possible regulation of renal epithelial K^+ channels by Na^+ .

The macroscopic ROMK1 current expressed in *Xenopus* oocytes was found to slowly inactivate upon replacement of extracellular Na^+ ions with NMDG⁺. Maximal value of inhibition was app. 50% and could be significantly enhanced by coexpression of sodium-proton exchanger NHE3. Amiloride at 10 μ M greatly changed the inhibition kinetics, suggesting that Na-dependent inhibition is mediated, at least in part, by sodium-proton antiport. Direct interaction of Na with the external entrance to the pore is not involved in the process, since the inhibition could be seen in cell-attached macropatches (pipettes contained constant NaCl) upon extracellular Na^+ or NaCl removal. In addition, single channel amplitudes and gating kinetics were the same in cell-attached single-channel recordings when pipette solution contained either NaCl or mannitol.

ROMK1 channels transiently expressed in a human embryonic kidney cell line, HEK 293, were rather insensitive to the extracellular NaCl. However, coexpression with NHE3 antiporters conferred profound Na^+ sensitivity on the channel. Upon replacing NaCl with mannitol the inhibition could be as deep as 80%.

Taken together, it is concluded that a cross-talk between ATP-sensitive K^+ channels and Na/H exchangers is likely to represent one of the mechanisms of the tubuloglomerular feedback signal transduction in kidney.