

9737 腎集合管におけるカリウム輸送機序の解明

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)

共同研究者：江幡 理 (自治医科大学 腎臓内科)

我々は単離、灌流したウサギCCDで血管側K濃度を2.5から8.5mMに上げると、正味のK分泌量、Na再吸収量が増えることを以前報告した。今回、K分泌およびNa再吸収増加の細胞内機序を解明するため、微小電極法を使って、集合管細胞の管腔側膜、血管側膜のNa、K輸送体(Naチャネル、Kチャネル、Naポンプ)活性の変動を検討した。ウサギCCDを単離、灌流し、血管側K濃度を2.5から8.5mMに上昇させると、経上皮電位、血管側膜電位、管腔側膜電位の一過性の急激な過分極とそれに引き続くゆるやかな脱分極を認めた。過分極相では経上皮コンダクタンス(GT)、分画管腔側膜抵抗(fRA)は変化しなかったが、脱分極相ではGTの増加とfRAの減少がみられた。管腔側にamiloride(Naチャネル阻害薬)またはBa(Kチャネル阻害薬)を投与すると血管側K濃度上昇に対する管腔側膜の電気的変化は部分的に抑制された。血管側にstrophanthidin(Naポンプ阻害薬)を投与すると血管側K濃度上昇に対する管腔側膜、血管側膜の電気的変化は完全に抑制された。血管側にBaを投与しても血管側K濃度上昇に対する電気的変化は影響されなかった。以上より、血管側K濃度上昇によって、血管側膜のNaポンプ活性の上昇とそれに続く管腔側膜Naチャネル、Kチャネル活性の増加が明らかになった。

9737 腎集合管におけるカリウム輸送機序の解明

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学 腎臓内科)
共同研究者：江幡 理 (自治医科大学 腎臓内科)

1. 研究の目的

腎は大腸と並びカリウムイオン (K) の主要排泄臓器である。糸球体で濾過されたKは近位尿細管、ヘンレ上行脚でほとんど全て再吸収され、遠位尿細管、特に皮質集合管 (CCD) で分泌され尿中に排泄される (1)。CCDは集合管細胞 (CD cell) と間在細胞 (IC cell; α, β, γ の3種類がある) より構成されるが、Kの分泌に最も関与しているのがCD cellである (1-6)。CD cellでは、Kは血管側膜に存在するNaポンプによって能動的に細胞内へ汲みあげられ、大部分は管腔側膜に存在するKチャネルを介して管腔内に受動的に分泌されるが、一部は血管側膜に存在するKチャネルを介して血管内へリークする。一方、ナトリウムイオン (Na) は管腔側膜に存在するNaチャネルを介して受動的に細胞内に入り、血管側膜に存在するNaポンプによって能動的に血管内へ汲みあげられる。

CCDでは血中K濃度のわずかな上昇も見逃すことなく感知し、尿中へKを排泄することにより、高K血症を防いでいる (1、2、7) が、その詳細な機序は解明されていない。この疑問に対し、我々はウサギCCDを単離、灌流し、血管側K濃度を生理的範囲の2.5から8.5mMに上げると、正味のK分泌量、Na再吸収量が増えることを明らかにした (4)。しかし、CCDは機能の異なる数種類の細胞から構成されており、Kの正味輸送量を測定しても、どの細胞がいかなる機序でK分泌を調節しているのか不明である。本研究ではこれらの結果及び疑問点を踏まえ、K分泌細胞であるCD cellの血管側膜、管腔側膜に存在するNa、K輸送体 (Naポンプ、Kチャネル、Naチャネル) 活性に焦点をあて、K分泌機序を解明したので報告する。

2. 研究の方法

雌日本白ウサギ (1.5~2.5kg) を実験に用いた。ベントバルビタール麻酔下にて、腎を摘出後、CCDをBurgら (8) の方法に従い、単離・灌流した。Table 1に灌流液の組成を示す。管腔内は5 mMのKを含む溶液 (5.0 K) にて、また血管側は2.5 mMのKを含む溶液 (2.5 K) にて約1時間灌流した後、血管側のK濃度を8.5 mMのKを含む溶液 (8.5 K) に変更した。この間、経上皮電位 (VT)、血管側膜電位 (VB)、管腔側膜電位 (VA) の変動を観察すると共に、管腔側より微小電流を流し、ケーブル解析 (2、3、5、6) を利用して経上皮コンダクタンス (GT)、分画管腔側膜抵抗 (fRA) を算出した。

管腔側膜のNaチャネル活性は管腔側へのamiloride (Naチャネル阻害薬、50 μ M) 投与前後の上記パラメーターの変動にて、管腔側膜または血管側膜のKチャネル活性は管腔側または血管側へのBa (Kチャネル阻害薬、2 mM) 投与前後の上記パラメーターの変動にて、また血管側膜

のNaポンプ活性は血管側へのstrophanthidin (Naポンプ阻害薬、200 μ M) 投与前後の上記パラメーターの変動にて、評価した。

3. 研究結果

3.1. 血管側K濃度を2.5から8.5mMに上げた時の電氣的パラメーターの推移

Fig. 1に血管側K濃度を2.5から8.5mMにあげた時のVT、VBの典型例を示す。VT、VBいずれも最初に一過性の急激な過分極(過分極相)が出現し、その後ゆるやかな脱分極(脱分極相)が認められた。VAも同様の変化を示した。過分極相においてはGT、fRA いずれも有意な変化しなかったが、脱分極相においてはGTの上昇、fRAの低下を認めた(Table 2)。再度、血管側K濃度を2.5から8.5mMにあげても同様の変化を示した。

3.2. 管腔側膜のNaチャネル活性の変動

管腔側へのamiloride投与前後のVT、VBの典型例をFig. 2に、また電氣的パラメーターのサマリーをTable 3に示す。amiloride投与後、過分極相の電位変化は完全に抑制された。また、脱分極相では有意な脱分極を認めたが、脱分極の程度はamiloride投与前に比べ有意に($p<0.05$)小さかった(投与後： $\Delta VT 2.6\pm 0.5$ mV、 $\Delta VB 3.9\pm 0.4$ mV、 $\Delta VA 1.2\pm 0.3$ mV；投与前： $\Delta VT 4.1\pm 0.6$ mV、 $\Delta VB 6.8\pm 0.5$ mV、 $\Delta VA 2.7\pm 0.4$ mV)。さらに、amiloride投与後も脱分極相ではGTの増加、fRAの減少を認めたが、その変化はamiloride投与前に比し有意に($p<0.05$)小さかった(投与後： $\Delta GT 0.5\pm 0.2$ mScm⁻²、 $\Delta fRA 0.02\pm 0.003$ ；投与前： $\Delta GT 1.0\pm 0.3$ mScm⁻²、 $\Delta fRA 0.03\pm 0.006$)。

3.3. 管腔側膜のKチャネル活性の変動

管腔側へのBa投与前後のVT、VBの典型例をFig. 3に、また電氣的パラメーターのサマリーをTable 4に示す。Ba投与後一過性の過分極を認めたが、その程度はBa投与前に比し有意に($p<0.05$)小さかった(投与後： $\Delta VT 0.8\pm 0.2$ mV、 $\Delta VB 0.9\pm 0.2$ mV；投与前： $\Delta VT 2.8\pm 0.62$ mV、 $\Delta VB 5.0\pm 0.3$ mV)。また、Ba投与後も脱分極相が認められたが、その程度はBa投与前に比し有意に($p<0.001$)小さかった(投与後： $\Delta VT 1.2\pm 0.2$ mV、 $\Delta VB 1.7\pm 0.3$ mV、 $\Delta VA 0.6\pm 0.2$ mV；投与前： $\Delta VT 4.9\pm 0.5$ mV、 $\Delta VB 6.9\pm 0.4$ mV、 $\Delta VA 2.0\pm 0.3$ mV)。Ba投与时、脱分極相ではGTの増加、fRAの減少を認めたが、その変化はBa投与前に比し有意に($p<0.001$)小さかった(投与後： $\Delta GT 0.2\pm 0.05$ mScm⁻²、 $\Delta fRA 0.01\pm 0.002$ ；投与前： $\Delta GT 0.8\pm 0.2$ mScm⁻²、 $\Delta fRA 0.03\pm 0.005$)。

3.4. 血管側膜のNaポンプ活性の変動

血管側へのstrophanthidin投与前後のVT、VBの典型例をFig. 4に、また電氣的パラメーターのサマリーをTable 5に示す。strophanthidin投与前後で、過分極相、脱分極相の電位変化は完全に抑制された。

3.5. 血管側膜のKチャネル活性の変動

血管側へのBa投与前後のVT、VBの典型例をFig. 5に、また電氣的パラメーターのサマリーをTable 6に示す。Ba投与前後で、過分極相、脱分極相の電氣的パラメーターは変動しなかった。

4. 考察

我々は単離、灌流したウサギCCDで血管側K濃度を2.5から8.5mMに上げると、正味のK分泌量、Na再吸収量が増えることを以前報告していた(4)が、本研究ではCD cellへの微小電極の刺入によって、CD cell管腔側膜および血管側膜に存在するNa、K輸送体がどのように関与しているのか明らかになった。

CD cellでは血管側K濃度のわずかな上昇に伴い、二相性の電位変化、すなわち一過性の急激な過分極相とそれに続くゆるやかな脱分極相、が観察された。過分極相ではGT、fRAは変化せず、またamilorideやstrophanthidinの前投与で完全に抑制された。従って、過分極相は血管側膜のNaポンプ活性の亢進によって生じることが考えられた。単離したラットCCDでouabain感受性のRb fluxを測定すると細胞外K濃度が2~7 mMでNa、K-ATPase活性が増加し、これはaldosteroneなどのホルモンや細胞内Na濃度に無関係に、またNa、K-ATPaseの新たな生合成を介さず起こることから、ポンプturnoverによると考えられている(9)。従って、今回われわれが観察した一過性の脱分極相もこのポンプturnoverによると思われる。

一方、脱分極相では過分極相とは対照的に、GTの増加とfRAの低下が出現した。脱分極相の電氣的パラメーターは管腔側へのamilorideやBaの前投与で部分的に抑制されること、血管側へのstrophanthidinの投与で完全に抑制されること、また血管側へのBaの投与は影響しないこと、から脱分極相は管腔側膜のNaチャンネル活性、Kチャンネル活性の増加によって生じることが考えられた。

今回の研究で血管側膜のNaポンプと管腔側膜のNaチャンネル、Kチャンネルの連動、すなわち”crosstalk”、が明らかになった。このcrosstalkはラットCCD(10)や他の上皮(11)でも報告されており、細胞容積や尿細管細胞内のNa、K濃度の急激な変化に対応し、細胞機能を維持するために必須の機序と考えられている。しかしながら、その細胞内機序については多くの因子が想定されており、今後の検討を待たざるを得ない。

5. 今後の課題

本研究では血管側のK濃度の変化によって、まず最初に血管側膜のNaポンプ活性が増加し、その後管腔側膜のNaチャンネル活性、Kチャンネル活性の増加することが明らかになったが、どのような細胞内機序を介して血管側膜の情報が管腔側膜へ伝達されるのか不明である。細胞内pH、Ca、Na、細胞内ATP、一酸化窒素、膜電位変化、protein kinase C、などが関与している可能性(12)があり、今後検討していきたい。

6. 文献

1. Wright, F.S., and G. Giebisch. Regulation of potassium excretion. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, vol II. D.W. Seldin and G. Giebisch, editors, Raven Press, Ltd., New York. 2209-2248, 1994.
2. Muto, S., S. Sansom, and G. Giebisch. Effects of adrenalectomy on CCD: evidence for differential response of two cell types. *Am. J. Physiol.* 253: F742-F752, 1987.

3. Muto, S., Yasoshima, K., Yoshitomi, K., Imai, M., and Y. Asano. Electrophysiological identification of α - and β -intercalated cells and their distribution along the rabbit distal nephron segments. *J. Clin. Invest.* 86: 1829-1839, 1990.
4. Muto, S., G. Giebisch, and S. Sansom. An acute increase of peritubular K stimulates K transport through cell pathways of CCT. *Am. J. Physiol.* 255: F108-F114, 1988.
5. O'Neil, R.G., and S.C. Sansom. Characterization of apical cell membrane Na^+ and K^+ conductances of cortical collecting duct using microelectrode techniques. *Am. J. Physiol.* 247: F14-F24, 1984.
6. Muto, S., S. Ebata, and Y. Asano. Short-term effects of uninephrectomy on electrical properties of the cortical collecting duct from rabbit remnant kidneys. *J. Clin. Invest.* 93: 286-296, 1994.
7. Stanton, B.A., and G. Giebisch. Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading. *Am. J. Physiol.* 243: F487-F493, 1982.
8. Burg, M.B., M. Grantham, S. Abromov, and J. Orloff. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am. J. Physiol.* 210: 1293-1298, 1966.
9. Fujii, Y., and A.I. Katz. Direct Na^+ - K^+ pump stimulation by K^+ in cortical collecting tubules: a mechanism for early renal K^+ adaptation. *Am. J. Physiol.* 257: F595-F601, 1989.
10. Wang, W., J. Geibel, and G. Giebisch. Mechanisms of apical K^+ channel modulation in principal renal tubule cells: effect of inhibitors of basolateral Na^+ - K^+ -ATPase. *J. Gen. Physiol.* 101: 673-694, 1993.
11. Schultz, S.G. Homeocellular regulatory mechanisms in sodium-transporting epithelia: avoidance of extinction by "flush-through". *Am. J. Physiol.* 241: F579-F590, 1981.
12. Wang, W., S.C. Hebert, and G. Giebisch. Renal K^+ channels: Structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 413-436, 1997.

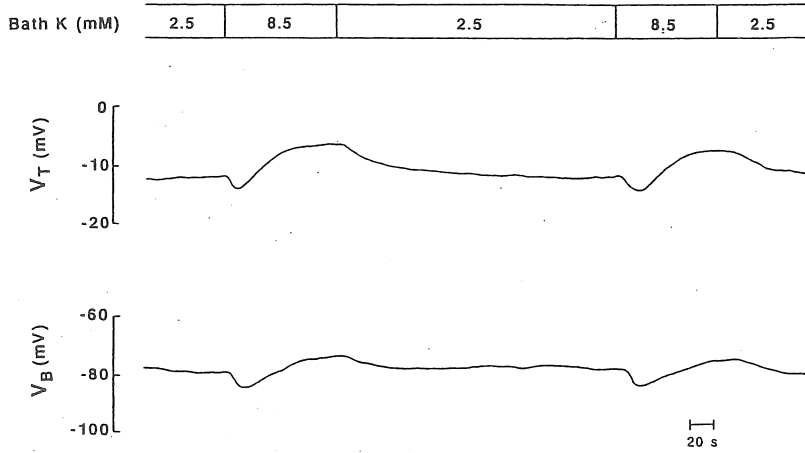


Fig. 1. Typical tracings showing effects of raising bath K on V_T and V_B of the CD cell.

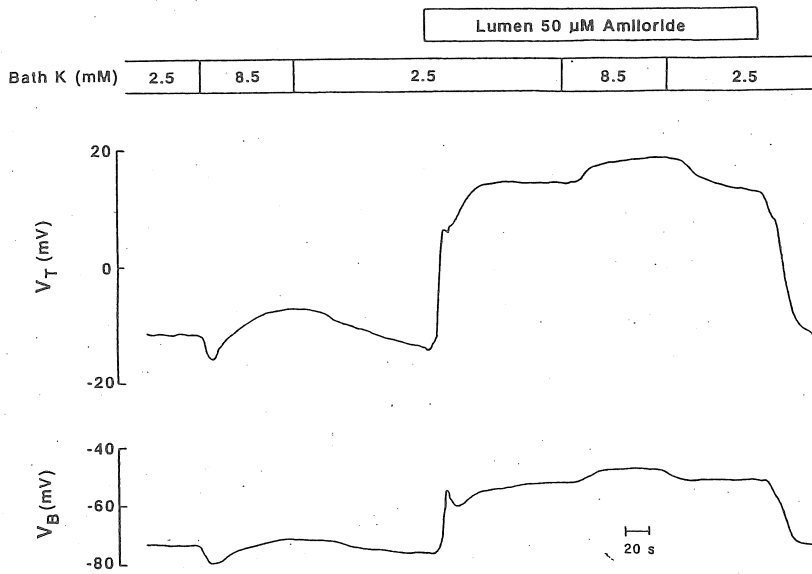


Fig. 2. Typical tracings showing effects of raising bath K in the presence of luminal amiloride on V_T and V_B of the CD cell.

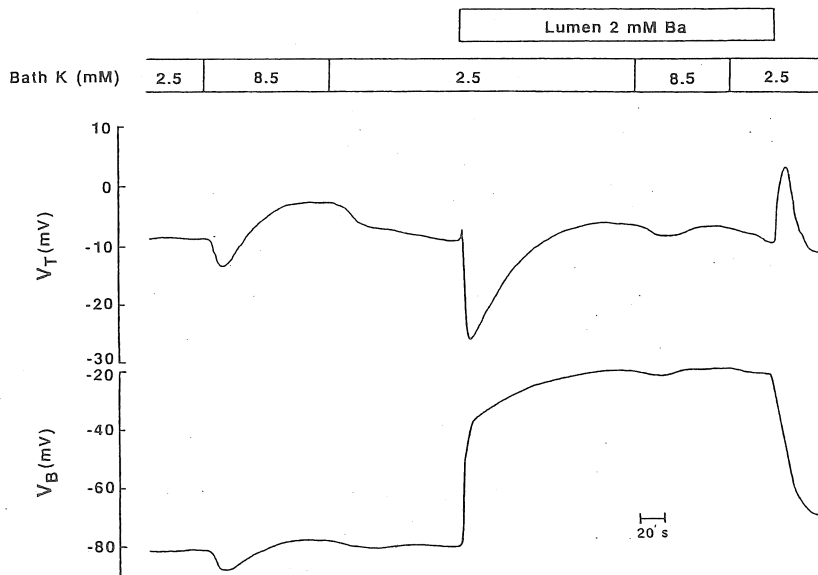


Fig. 3. Typical tracings showing effects of raising bath K in the presence of luminal Ba on VT and VB of the CD cell.

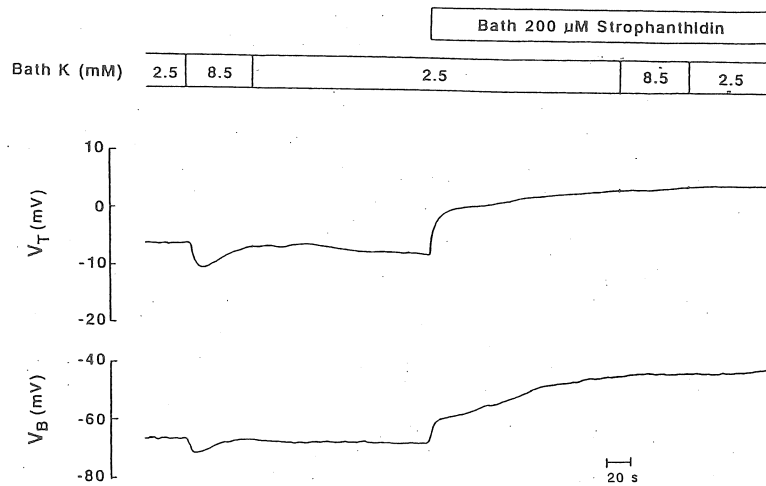


Fig. 4. Typical tracings showing effects of raising bath K in the presence of bath strophanthidin on VT and VB of the CD cell.

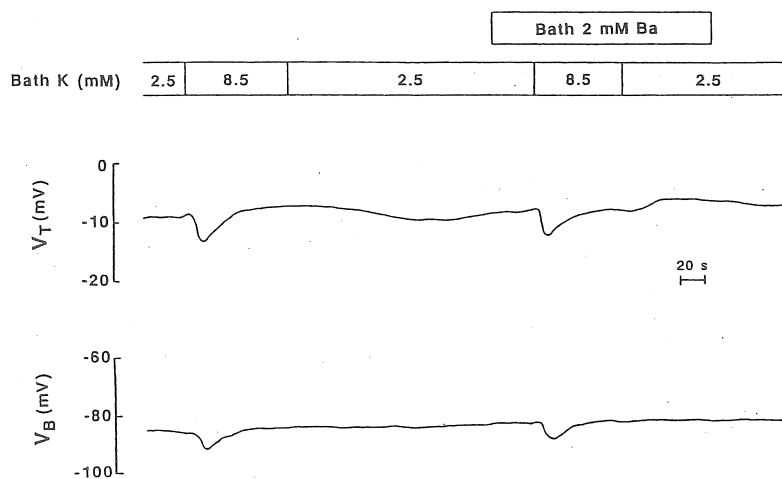


Fig. 5. Typical tracings showing effects of raising bath K in the presence of bath Ba on V_T and V_B of the CD cell.

Table 1. Solution composition

	Solution		
	5.0 K	2.5 K	8.5 K
NaCl	110.0	112.5	106.5
KCl	5.0	2.5	8.5
NaHCO ₃	25.0	25.0	25.0
NaAcetate	10.0	10.0	10.0
Na ₂ HPO ₄	0.8	0.8	0.8
NaH ₂ PO ₄	0.2	0.2	0.2
MgCl ₂	1.0	1.0	1.0
CaCl ₂	1.8	1.8	1.8
D-glucose	8.3	8.3	8.3
L-alanine	5.0	5.0	5.0

Composition is in mM. Each solution was equilibrated with 95%O₂/5%CO₂ and adjusted to pH 7.4 at 37° C.

Table 2. Effects of raising bath K concentration from 2.5 to 8.5 mM on barrier voltages and conductances.

Bath K	2.5 mM	8.5 mM		2.5 mM
		Hyper	Depo	
V_T , mV	(n=36) -6.7±0.5	-9.4±0.6*	-5.2±0.6*	-7.3±0.6*
V_B , mV	(n=36) -79.6±1.3	-85.0±1.42*	-78.5±1.3**	-80.1±1.4**
V_A , mV	(n=36) 72.9±1.3	75.8±1.3*	73.3±1.3	72.8±1.3
G_T , mS · cm ⁻²	(n=36) 8.6±0.4	8.8±0.4	9.6±0.5*	8.7±0.4*
fR_A	(n=36) 0.50±0.02	0.49±0.02	0.45±0.02*	0.50±0.02*

Values are mean±SE. Data at 8.5 mM in the bath K were taken at the peak of initial hyperpolarization (Hyper) and at the peak of late depolarization (Depo). *P<0.001, **P<0.05 compared with preceding period.

Table 3. Effects of raising bath K in the absence or presence of luminal amiloride on barrier voltages and conductances.

Bath K	- lumen amiloride				+ lumen amiloride			
	2.5 mM		8.5 mM		2.5 mM		8.5 mM	
	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo
V_T , mV	(n=8)	-7.4±1.5	-9.7±1.8*	-5.5±1.7*	6.4±1.2	6.7±1.1	9.3±1.0**	
V_B , mV	(n=8)	-80.7±3.1	-85.7±2.9*	-78.9±2.8*	-70.9±2.5	-70.6±2.6	-66.7±2.5*	
V_A , mV	(n=8)	73.3±3.1	76.0±2.9**	73.3±3.0*	77.3±2.6	77.3±2.7	76.0±2.7†	
G_T , mS · cm ²	(n=7)	8.6±0.7	8.8±0.7	9.8±0.9††	7.1±0.6	7.0±0.6	7.6±0.8††	
fR_A	(n=7)	0.49±0.06	0.48±0.06	0.45±0.06†	0.57±0.06	0.56±0.07	0.54±0.07*	

Values are mean±SE. Data at 8.5 mM in the bath K were taken at the peak of initial hyperpolarization (Hyper) and at the peak of late depolarization (Depo). *P<0.001; **P<0.005; †P<0.01; ††P<0.05 compared with preceding period.

Table 4. Effects of raising bath K in the absence or presence of luminal Ba on barrier voltages and conductances.

Bath K	- lumen Ba				+ lumen Ba			
	2.5 mM		8.5 mM		2.5 mM		8.5 mM	
			Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo
V _T , mV	(n=20)	-6.5±0.8	-9.3±1.0*	-4.3±0.7*	-5.1±0.8	-6.2±0.8*	-4.7±0.7*	
V _B , mV	(n=20)	-80.7±1.7	-85.6±1.7*	-78.7±1.9*	-43.8±2.7	-45.1±2.6*	-42.8±2.7*	
V _A , mV	(n=20)	74.2±1.9	76.3±1.9*	74.4±1.9*	38.7±2.8	38.8±2.8	38.1±2.8**	
G _T , mS · cm ⁻²	(n=11)	9.1±0.8	9.3±0.8	10.2±1.0†	6.2±0.7	6.3±0.7	6.5±0.7†	
fR _A	(n=11)	0.50±0.04	0.47±0.04	0.43±0.04*	0.86±0.02	0.86±0.02	0.84±0.02*	

Values are mean±SE. Data at 8.5 mM in the bath K were taken at the peak of initial hyperpolarization (Hyper) and at the peak of late depolarization (Depo). *P<0.001; **P<0.005; †P<0.05 compared with preceding period.

Table 5. Effects of raising bath K in the absence or presence of bath strophanthidin on barrier voltages.

Bath K	- bath strophanthidin				+ bath strophanthidin			
	2.5 mM		8.5 mM		2.5 mM		8.5 mM	
	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo
V _T , mV (n=6)	-6.8±2.0	-9.7±1.8*	-5.3±1.8**	4.5±1.5	4.6±1.5	4.8±1.5		
V _B , mV (n=6)	-80.6±1.7	-86.0±2.2*	-78.0±1.8*	-56.3±3.3	-56.6±3.5	-56.5±3.5		
V _A , mV (n=6)	73.8±3.2	76.2±3.5†	72.6±2.7†	60.8±3.8	61.2±4.0	61.3±4.0		

Values are mean±SE. Data at 8.5 mM in the bath K were taken at the peak of initial hyperpolarization (Hyper) and at the peak of late depolarization (Depo). *P<0.001; **P<0.005; †P<0.05 compared with preceding period.

Table 6. Effects of raising bath K in the absence or presence of bath Ba on barrier voltages and conductances.

Bath K	- bath Ba				+ bath Ba			
	2.5 mM		8.5 mM		2.5 mM		8.5 mM	
	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo	Hyper	Depo
V_T , mV	(n=7)	-8.1±1.2	-11.6±1.9**	-7.4±1.2**	-8.2±1.1	-11.7±1.7*	-8.3±1.3**	
V_B , mV	(n=7)	-83.4±2.3	-90.1±2.5*	-83.8±2.1*	-83.8±1.8	-91.3±2.0*	-85.7±1.9*	
V_A , mV	(n=7)	75.3±2.9	78.5±3.0*	76.4±2.5††	75.6±2.2	79.7±2.3*	77.4±2.1††	
G_T , mS · cm ⁻²	(n=7)	9.1±0.9	9.1±0.9	9.8±1.0†	8.8±0.8	8.9±0.9	9.3±1.0††	
fR_A	(n=7)	0.52±0.04	0.51±0.05	0.48±0.06**	0.48±0.05	0.47±0.06	0.43±0.06††	

Values are mean±SE. Data at 8.5 mM in the bath K were taken at the peak of initial hyperpolarization (Hyper) and at the peak of late depolarization (Depo). *P<0.001; **P<0.005; †P<0.01; ††P<0.05 compared with preceding period.

Mechanisms for K transport in the renal collecting duct

Shigeaki Muto and Satoru Ebata

Department of Nephrology, Jichi Medical School

Summary

Previous studies indicated that an acute elevation of peritubular K enhances K secretion and Na reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct (CCD) from rabbit kidneys. To determine the underlying cellular mechanisms, we used microelectrode techniques to assess the membrane properties of principal collecting duct cells in isolated perfused CCDs from rabbit kidneys after raising bath K from 2.5 to 8.5 mM. This induced, first, a short-lasting hyperpolarization and second, a sustained phase of depolarization of transepithelial, basolateral, and apical membrane voltages. Whereas the transepithelial conductance (GT) and fractional apical membrane resistance (fRA) remained unchanged during the initial phase of hyperpolarization, GT increased during depolarization and fRA decreased. Perfusion of the lumen with solutions containing either amiloride or Ba partially inhibited the high K-induced apical electrical changes, and basolateral strophanthidin abolished both apical and basolateral electrical responses during elevation of K in the bath. Addition of Ba to the bath had no effects on the high K-induced electrical changes during either phase. From these results we conclude that acute elevation of basolateral K activates the Na pump in the basolateral membrane, which secondarily elevates the activity of both Na and K channels in the apical membrane.