

発表番号 56

腎皮質集合管における管腔内 Na 非依存性 K 分泌機序の解明

助成研究者：武藤重明（自治医科大学腎臓内科）

共同研究者：宮田幸雄（自治医科大学腎臓内科）

腎臓は摂取した K の約 9 割を排泄する臓器で、皮質集合管（CCD）が主にその役割を担っている。CCD における K 分泌は Na 再吸収と連動して起こるのが特徴で、血管側膜の起電性 Na ポンプと、管腔側膜の Na チャネルと K チャネルが司っている。我々は単離・灌流した CCD において、管腔内 Na 存在下で血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に急速に増加させると、経上皮電位 (V_T) と血管側膜電位 (V_B) は一過性の急激な過分極とそれに続く緩やかな脱分極を認め、前者は血管側膜の起電性 Na ポンプ活性の増加、後者は管腔側膜 Na チャネル活性と K チャネル活性の増加によって起こることを報告した (Am J Physiol 276: F143-F158, 1999)。ここで、管腔内 Na 濃度が 0 になったら K 分泌は完全に消失してしまうのかという疑問が生じる。そこで、本研究ではこの疑問に答えるべく、CCD における管腔内 Na 非依存性 K 分泌の有無とその機序を検討した。ウサギ CCD を単離・灌流し、管腔内 Na 非存在下で血管側の K 濃度を 2.5 から 8.5mM に増加させると、正味の K 分泌量は増加した。また、 V_T と V_B はいずれも脱分極を示し、管腔内 Na 存在下で出現した過分極相は認められなかった。この時、経上皮コンダクタンス (G_T) と分画管腔側膜抵抗 (fR_A) はともに増加した。血管側の K 濃度増加による V_T 、 V_B の脱分極と、 G_T 、 fR_A の増加は、K チャネル阻害薬の Ba の管腔内または血管側への投与や、Na/H 交換輸送体 (NHE) 阻害薬の ethylisopropylamiloride の血管側への投与によって部分的に抑制されたが、Na チャネル阻害薬の amiloride の管腔内への投与では不変であった。以上より、ウサギ CCD では血管側 K 濃度の増加に対し管腔内 Na 非依存性の K 分泌機序が存在し、これには血管側膜の Na ポンプ、K チャネル、NHE と、管腔側膜 K チャネルが関与していることが明らかになった。

腎皮質集合管における管腔内 Na 非依存性 K 分泌機序の解明

助成研究者：武藤 重明 (自治医科大学腎臓内科)

共同研究者：宮田 幸雄 (自治医科大学腎臓内科)

1. 研究目的

腎臓は摂取した K の約 9 割を排泄する臓器で、集合管起始部や皮質集合管 (CCD) に存在する集合管細胞 (CD cell) がその役割を担っている⁽¹⁾。CD cell における K 分泌は Na 再吸収と連動して起こるのが特徴で、血管側膜の起電性 Na ポンプと、管腔側膜の Na チャネルと K チャネルが司っている。CD cell では血中 K 濃度の急激な上昇を見逃すことなく感知し尿中へ K を排泄することにより、生命に重篤な高 K 血症の出現を防いでいる。その機序として、われわれは単離・灌流したウサギ CCD で、a) 管腔側 Na 濃度を 147 mM に固定し (K 濃度は 5 mM)、血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5 mM に急速に増加させると、正味の K 分泌量と Na 再吸収量の増加が出現すること⁽²⁾、b) この時、CD cell の基底側膜電位は二相性の変化、すなわち一過性の急激な過分極相とそれに続く緩やかな脱分極相を認め、前者は血管側膜の起電性 Na ポンプ活性の増加、後者は管腔側膜 Na チャネル活性と K チャネル活性の増加によって起こることを明らかにした⁽³⁾。さらに、この血管側膜の起電性 Na ポンプと管腔側膜 Na チャネル、K チャネルとの連動は、管腔内 Na 濃度に依存し、管腔内 Na 濃度が低下すると減弱すること、細胞内 Na 濃度の低下を介していることも明らかにした⁽⁴⁾。ここで、管腔内 Na 濃度が 0 になったら K 分泌は完全に消失してしまうのかという疑問が生じる。一方、Na が皆無で K 含有量が豊富なバナナを摂取している南米の奥地に住むヤノマモインディアンでは尿中 Na 排泄量はほとんど 0 であるのに対し尿中 K 排泄量は著明に多いことから⁽⁵⁾、CD cell では管腔内 Na の再吸収とは連動せずに K を分泌していることが推測される。そこで、本研究では CD cell における管腔内 Na とは独立した K 分泌機序の解明、具体的には管腔内 Na 非依存性 K 分泌機序の存在の有無と、それに関わるトランスポーターの同定を目的とする。

2. 研究方法

雌性日本白ウサギ (1.5 ~ 2.5 kg) を実験に用いた。ペントバルビタール麻酔下にて、腎を摘出後、CCD を Burg ら⁽⁶⁾の方法に従い、単離・灌流した。

管腔側 Na 濃度を 0 mM に固定し (choline で置換) (K 濃度は 5 mM) 灌流後、血管側の K 濃度を Na 存在下で 2.5 から 8.5 mM に急速に増加させた時と、管腔側 Na 濃度を 147 mM に固定し (K 濃度は 5 mM) 灌流後、血管側の K 濃度を 2.5 から 8.5 mM に急速に増加させた時の正味の K 分泌量 ($-J_K$) と Na 再吸収量 (J_{Na}) を既報⁽²⁾の方法に従って測定した。

管腔側 Na 濃度を 0 mM に固定し灌流後、血管側の K 濃度を 2.5 から 8.5 mM に急速に増加させた時の CD cell の血管側膜と管腔側膜に存在する Na、K 輸送体 (Na チャネル、K チャネル、Na ポンプ、Na/H 交換輸送体) 活性の変動を以下の実験によって解析した。まず、微小電極を CD cell に刺入し、血管側の K 濃度を増加させた時の経上皮電位 (V_T) と基底側膜電位 (V_B) を測定すると共に、管腔内より 50 nA の微小電流を通電し、既報⁽¹⁻³⁾の方法に従ってケーブル解析により経上皮コンダクタンス (G_T) と分画管腔側膜抵抗 (r_{RA}) を算出した。また、管腔内に K チャネル阻害薬の Ba を投与し、投与前後の G_T と r_{RA} の値より管腔側膜コンダクタンス (G_A)、血管側膜コンダクタンス (G_B)、タイトジャンクションコンダクタンス (G_{TJ}) を算出した。管腔側膜の Na チャネル活性と K チャネル活性を各々 amiloride と Ba で抑制し、また血管側膜の K チャネル活性を Ba で抑制後、血管側の K 濃度を上げ、 V_T 、 V_B 、 G_T 、 r_{RA} の変動を観察した。さらに、血管側膜の Na/H 交換輸送体 (NHE) を ethylisopropylamiloride (EIPA) で抑制した後、血管側の K 濃度を上げ、上記電氣的パラメーターと、細胞内 pH (pH_i)、 $-J_K$ の変動を比較した。 pH_i の測定は、既報⁽⁷⁾の方法に従い細胞内に pH 感受性蛍光色素の BCECF-AM を負荷して行なった。

3. 研究結果

管腔内 Na 非存在下では Na 存在下に比し $-J_K$ は約半分に低下した。血管側の K 濃度を 8.5 mM に増加させると、 $-J_K$ は管腔内 Na 存在下、非存在下のいずれの場合も増加したが、増加の程度は Na 非存在下で小さかった。

管腔内 Na 非存在下で血管側の K 濃度を増加させると、 V_T と V_B はいずれも脱分極を示し、管腔内 Na 存在下で出現した過分極は認められなかった。また、血管側 K 濃度の増加に伴い、 G_T と r_{RA} は増加した。この時、 G_A 、 G_B 、そして G_{TJ} はいずれも増加を示し、増加の程度は G_B が最も大きく、次いで G_A 、 G_{TJ} の順であった。管腔内に Na チャネル阻害薬の amiloride を投与しても血管側の K 濃度増加による V_T と V_B の脱分極および、 G_T と r_{RA} の増加は不変であった。一方、K チャネルの阻害薬の Ba を管腔内または血管側に投与すると、いずれも血管側 K 濃度の増加による V_T と V_B の脱分極および、 G_T と r_{RA} の増加を部分的に抑制した。同様に、血管側に NHE の阻害薬の EIPA を投与すると、血管側 K 濃度の増加による V_T と V_B の脱分極および、 G_T と r_{RA} の増加を部分的に抑制した。EIPA 存在下で血管側の K 濃度を増加させると、 $-J_K$ は増加を示したが、増加の程度は EIPA 非存在下に比し小さかった。管腔内 Na 非存在下で血管側 K 濃度を増加させると、 pH_i は増加したが、この増加は血管側への EIPA の投与によって完全に抑制された。血管側への EIPA の単独投与で pH_i と $-J_K$ はいずれも低下を認めた。

なお、この報告書で述べたデータは全て投稿準備中のものであり、原図を用いることができなかった。

4. 考 察

我々は単離・灌流したウサギ CCD において、管腔内 Na 存在下で血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5 mM

に上げると、 $-J_K$ と J_{Na} が増えることを以前報告した⁽²⁾。本研究では管腔内 Na 非存在下でも血管側 K 濃度を増加させると、程度は小さいが $-J_K$ が増加することから、管腔内 Na 非依存性 K 分泌機序が存在することが明らかになった。さらに、a) 血管側 K 濃度の増加による $-J_K$ の増加は、血管側膜の Na ポンプ活性と管腔側膜の K チャンネル活性の増加によって起こること、b) 血管側膜の Na ポンプは管腔内 Na が存在しないため抑制されており起電性を有していないこと、c) 血管側膜の NHE を介した Na の細胞内への流入と血管側膜の K チャンネルを介した K の細胞内と血管側との間のリサイクリングによって Na ポンプが効率的に作動していることが判明した。今回の研究で血管側膜の Na ポンプと、管腔側膜の K チャンネルおよび血管側膜の K チャンネルの連動、すなわち“crosstalk”、が存在することが明らかになった。この crosstalk はラット CCD⁽⁸⁾ や、ウサギ近位尿細管⁽⁹⁾、そして他の上皮⁽¹⁰⁾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。その細胞内伝達機序の一つとして、血管側膜の NHE の活性化を介した細胞内アルカリ化が示唆される。

5. 今後の課題

本研究では管腔内 Na 非存在下においても、血管側の K 濃度の生理的範囲内での増加に対して、CCD では血管側膜の Na ポンプ活性と管腔側膜の K チャンネル活性を同時に増加させることによって、K 分泌を刺激することが明らかになった。血管側 K 濃度増加に対する Na ポンプの活性化には、血管側膜の NHE と K チャンネルが不可欠であることも判明した。血管側膜の NHE や K チャンネルが血管側の K 濃度の上昇により実際に活性化されるのか、今後詳細な検討が必要と思われる。また、CD cell の管腔側膜には low-conductance K channel と maxi K channel が存在するが、どちらの K チャンネルが管腔内 Na 非依存性 K 分泌に関与しているのか、今後の検討課題である。

文 献

- 1) Muto, S.: Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol. Rev.* 81: 85-116, 2001
- 2) 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:F105, 1988
- 3) Muto, S., Asano, Y., Seldin D., and Giebisch, G.: Basolateral Na^+ pump modulates apical Na^+ and K^+ conductances in rabbit cortical collecting ducts. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 276: F143-F158, 1999.
- 4) Muto, S., Asano, Y., Wang, WH, Seldin, D., and Giebisch, G.: Activity of the basolateral K^+ channels is coupled to the $Na^+-K^+-ATPase$ in the cortical collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285: F945-F954, 2003.
- 5) Oliver, W.J., Cohen, E.L., and Neel, J.V.: Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a “no-salt” culture. *Circulation* 52:146-51, 1975
- 6) Burg, M.B., Grantham, Abromov, M.S., and Orloff, J.: Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am. J. Physiol.* 210: 1293-1298, 1966.

- 7) Miyata, Y., Muto, S., Yanagiba, S., and Asano, Y.: Extracellular Cl⁻ modulates shrinkage-induced activation of Na⁺-H⁺ exchange in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 278: C1218-1229, 2000.
- 8) Wang, W., Geibel, J., and Giebisch, G.: 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.
- 9) Tsuchiya, K., Wang, W., Giebisch, G., and Welling, P.A.: ATP is a coupling modulator of parallel Na, K-ATPase-K channel activity in the renal proximal tubule. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 89: 6418-6422, 1992.
- 10) Schultz, S.G.: Homeocellular regulatory mechanisms in sodium-transporting epithelia: avoidance of extinction by "flush-through". *Am. J. Physiol.* 241: F579-F590, 1981.

Luminal Na-independent K secretion in the renal cortical collecting duct

Shigeaki Muto and Yukio Miyata

Department of Nephrology, Jichi Medical School

Summary

We previously demonstrated that raising bath K from 2.5 to 8.5 mM in the presence of luminal Na in the isolated perfused rabbit cortical collecting duct (CCD) resulted in an initial hyperpolarization of transepithelial voltage (V_T) and basolateral membrane voltage (V_B), followed by a delayed depolarization, and that the initial phase was due to basolateral electrogenic Na pump stimulation and the late phase was due to stimulation of the apical Na and K conductances (Am J Physiol 276: F143-F158, 1999). In the present study, we used the microelectrode technique to determine the effects of raising bath K on apical Na and K conductances, and basolateral K conductance and Na/H exchange (NHE) in the absence of luminal Na in the isolated perfused rabbit CCD. Acute increase in the bath K from 2.5 to 8.5 mM in the absence of luminal Na abolished the early phase of hyperpolarization of V_T and V_B , but still depolarized V_T and V_B with increased both transepithelial conductance (G_T) and fractional apical membrane resistance (fR_A). The high bath K-induced depolarization of V_T and V_B and increased G_T and fR_A were partially inhibited by addition of Ba (a K channel inhibitor) in either the luminal or the basolateral side and by addition of ethylisopropylamiloride (a specific inhibitor of the NHE) in the basolateral side, but were not affected by luminal addition of amiloride (a Na channel inhibitor). Acute increase in the bath K also increased net K secretion. We conclude that, in the rabbit CCD, raising bath K in the absence of luminal Na leads to an increase in K secretion, which is mediated by Na pump, K conductance, and NHE in the basolateral membrane and by K conductance in the apical membrane.