

40

助成番号 0140

腎集合管 Na^+ 再吸収と K^+ 分泌制御の独立性

助成研究者：鈴木 喜郎(東京工業大学 生命理工学部)

共同研究者：河原 克雅(北里大学 医学部 生理学)

本研究の発端は、海水にも淡水にも適応できる魚類(広塩性魚類)の浸透圧調節機構を解析することによって、今まで哺乳類など他の生物に対する研究で明らかにできなかったことを解明する手がかりが得られないだろうかというアイデアである。その研究過程において、内向き整流性 K^+ チャネル(Kir)が上皮イオン輸送に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで哺乳類にもそのような Kir チャネルが存在するのではないかと考え、小腸や腎尿細管上皮に発現する Kir7.1 に着目した。腎臓において Kir7.1 は側底膜に発現し、 K^+ リサイクルと K^+ 排泄という2つの生理機能を担っている可能性が示唆されたが、2つの異なる機能をどのように担っているのかという新たな疑問が生じた。本研究では、新生児ラット腎 K^+ 排泄能の発達と Kir7.1 の時間的・空間的発現との関係を解析することによって生理機能との関連を探った。まず、負荷 K^+ に対する尿中 K^+ 排泄能を測定したところ、生後7日から生後14日の間に顕著に発達し、より詳細な解析によって生後14日から生後21日の間も発達過程にあることがわかった。生後7日から14日の間に管腔膜 K^+ チャネル(ROMK1)の発現増加が確認され、ROMK1 が管腔膜 K^+ 分泌路であるという従来の仮説を支持した。しかしながら ROMK1 および Na^+ , K^+ -ATPase 発現量に変化がなかった生後14日から21日の間に見られた腎 K^+ 排泄能の発達は、これらだけでは説明できない。この時期に Kir7.1 発現の有意な増加が確認されたことから、Kir7.1 の腎 K^+ 排泄への関与が示唆された。免疫組織染色の結果、Kir7.1 は生後7日において、主にヘンレの太い上行脚(TAL)に存在するが、腎 K^+ 排泄能の発達時期にあわせて遠位尿細管におけるシグナルが増加した。この発現増加が K^+ 排泄能の発達に関与すると考えられる。尿細管セグメントの違いによって発現開始時期が異なっていたことから、Kir7.1 遺伝子が各々のセグメントで異なる発現調節を受け、生理機能の独立性を保っていると考えられる。今後は推定された Kir7.1 の生理機能を、活性測定などの方法によって実証していくことが必要である。

助成番号 0140

腎集合管 Na^+ 再吸収と K^+ 分泌制御の独立性

助成研究者：鈴木 善郎 (東京工業大学 生命理工学部)

共同研究者：河原 克雅 (北里大学 医学部 生理学)

【研究目的】

生体内の体液量・浸透圧の調節系について今までに数多くの研究がなされ、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系をはじめとするホルモンやその標的となる効果器の働きによるという理解が得られている。しかしながら本態性高血圧の原因など、未解明の事柄も残されている。本研究の発端は、魚類の浸透圧調節系の研究を哺乳類などの他の生物の研究に役立てられないだろうかという試みである。

ウナギやサケなどの広塩性魚類と呼ばれる魚類は、海水と淡水といった極端に異なる浸透圧環境に容易に適応することができる。この能力はエラの塩類細胞(chloride cell)の優れたイオン輸送能と、適応時に見られるその劇的な変化に支えられている [1]。私達はエラの塩類細胞を解析する過程で、淡水から海水に適応する際に高発現する遺伝子として、内向き整流性 K^+ チャネル(eKir)を見いだした [2]。eKir は塩類細胞において Cl^- 分泌の際に必要な Na^+/K^+ -ATPase 活性のための側底膜 K^+ リサイクル路として浸透圧調節に重要な役割を果たしていると考えられる。またこの研究を通して、他の生物においてもイオン輸送に内向き整流性 K^+ チャネル(Kir)が関与するのではないかと、Kir チャネル遺伝子の発現調節が、環境変化に対する適応といった状況では重要ではなかろうかということが推測された。

このような考えをもとに、哺乳類のイオン輸送に関与する Kir チャネルを検索し、その候補として Kir7.1 に着目した。Kir7.1 は脳・脈絡叢上皮、甲状腺濾胞細胞、小腸上皮、腎尿細管上皮などに発現し、いずれも Na^+/K^+ -ATPase と同側の膜に局在することから、 Na^+ ポンプのための K^+ リサイクル路として両者の機能的な共役が示唆されている [3, 4]。さらに腎臓においては、負荷 K^+ による血中 K^+ 濃度の変動によって Kir7.1 発現量の変動することが明らかとなり、側底膜 K^+ リサイクルのみならず調節性 K^+ 分泌にも関与することが示唆された [4]。しかしここで、同じ遺伝子由来のチャネルが2つの異なる機能を担い得るのかという新たな疑問が生じた。本研究の目的は Kir7.1 が上記の2つの生理機能を本当に担っているのか、担っているとすればどのように独立性を保っているのかということをはっきりとすることである。まずその手がかりを得るために、新生児ラット腎臓の発達過程における K^+ 排泄能の成熟と Kir チャネルとの関係について解析した。新生児期の腎臓では、出生に伴いすみやかに Na^+ 再吸収が開始されるのに対し K^+ 排泄はかなり遅れて成熟することから [5]、こ

の時期の Kir7.1 発現を解析すれば生理機能との関連が推測できると考えた。

【研究方法】

1. 新生児ラット腎 K⁺排泄能の発達

生後 7, 14, 21 日の新生児ラットに K⁺(4 μmol/g body wt)を、KCl 溶液を飲ませることにより負荷した。負荷後 0, 2, 4, 6 時間の尿を採取し、尿量および尿中電解質量を測定した (Fig. 1A-C) [6]。また排泄能を評価するために、負荷した K⁺の半分を排泄できた時間を算出した。

2. Kir チャネル発現の検討

生後 7, 14, 21 日の新生児ラットから腎臓を摘出し、AGPC 法で total RNA を抽出した。Kir7.1, ROMK1, Na⁺,K⁺-ATPase, β-actin の mRNA 発現量を RNase プロテクションアッセイ法にて検討した。ROMK1 特異的シグナルは、ROMK1 特異的 exon (exon R1)の一部をプローブに含めることにより可視化した。また、各日齢のラット腎臓から蛋白質を調製し、ウエスタンブロット法にて Kir7.1, actin 蛋白質を解析した。

3. 免疫組織染色

リコンビナント Kir7.1 に対する抗体として作製した抗 Kir7.1 抗体、および市販の抗 ROMK 抗体を用いて免疫組織染色を行い、チャネル発現領域の推移を検討した。2%パラホルムアルデヒドで灌流した腎臓を凍結後、切片(厚さ 5 μm)を作製し、それぞれの抗体を作用させ Cy3 標識二次抗体により蛍光顕微鏡において可視化した。

【研究結果】

新生児ラットの負荷 K⁺に対する尿中 K⁺排泄量は、生後 7 日に比べ生後 14 日で約 2 倍に増加したが生後 21 日では変化しなかった(Fig. 1D)。一方、排泄にかかる時間は、調べた日齢において減少し続けた(Fig. 1E)。これらのことから K⁺排泄能は、生後 7 日から 14 日の間で明らかに発達しているが、14 日と 21 日の間でも、排泄速度が増すという意味において発達段階にあると考えられる。

新生児ラット腎臓における ROMK1 mRNA は、生後 7 日から 14 日の間に約 2 倍に増加したが、生後 21 日では変化しなかった(Fig. 2)。他の ROMK アイソフォームの合計の発現量は調べた日齢において変化しなかった。Na⁺-K⁺-ATPase α1 subunit mRNA は生後 7 日から 14 日の間でやや増加したが、それ以降は変化しなかった。一方、Kir7.1 は生後 14 日から 21 日の間に有意に増加した。さらに、発現開始時期を検討したところ、Kir7.1 は出生直前(G21)に腎臓における発現が確認された。

免疫組織染色の結果、Kir7.1 は生後 7 日では主にヘンレの太い上行脚(TAL)に存在していた。日齢を経ると、TAL における染色は変化しなかったが遠位尿細管におけるシグナルが増加した。これらの結果は、膜の局在性（側底膜と管腔膜）の違いはあるものの、ROMK の全アイソフォームに対する免疫組織染色の結果とほぼ合致した。

【考察】

尿中への K^+ 排泄は主に腎・遠位尿細管と皮質集合管で行われ、管腔膜 K^+ チャネルである ROMK1 を介して排泄されると考えられている [7]。本研究においても、尿中 K^+ 排泄量と ROMK1 発現との間に強い相関が確認された。しかし ROMK1 や Na^+,K^+ -ATPase 発現量に変化がなかった生後 14 日と 21 日の間における K^+ 排泄速度の増加は、これらだけでは説明できない。同じ時期に Kir7.1 発現量が有意に増加していたことから、側底膜 K^+ チャネルである Kir7.1 が K^+ 排泄に何らかの形で貢献していることが示唆された。

Kir7.1 は出生直前にすでに発現が認められた。また生後 7 日における抗体染色の結果から、新生児期初期には主に TAL に存在すると考えられる。新生児期初期には Na^+ 再吸収は開始するが K^+ 排泄能はまだ低いことから、Kir7.1 の TAL における役割は Na^+ 再吸収のための側底膜 K^+ リサイクルである可能性が高い。このことは ROMK の他のアイソフォームが TAL における Na^+ 再吸収のための管腔膜 K^+ リサイクルを行っていることと類似しているのではないだろうか[8]。

Kir7.1 は生後 14 日から 21 日の間に、遠位尿細管において発現量が増加した。このように Kir7.1 の発現時期は、尿細管セグメントによって異なっていた。この生後 14 日から 21 日における発現増加が K^+ 排泄システムの成熟に関与すると考えられる。ラット Kir7.1 遺伝子には少なくとも 2 つの機能的なプロモーターおよび転写開始点が存在し複数種の mRNA が作られることから [9]、ROMK 遺伝子における ROMK1(K^+ 排泄)と他のアイソフォーム (K^+ リサイクル) のように、mRNA の使い分けが行われ生理機能の独立性が保たれている可能性が考えられた。さらに Kir7.1 の遠位尿細管における発現誘導が ROMK1 のそれと同時にではなく遅れて起こることは興味深い。ラットは生後 21 日頃から離乳し始めるので、母乳以外の食物による K^+ 過負荷というリスクから生体を防御するためのもの、つまり環境の変化に対する適応と関係があるのかもしれない。

【今後の課題】

腎尿細管 K⁺排泄や側底膜 K⁺リサイクルなど Kir7.1 に予測された生理機能について、チャンネル活性の測定や dominant-negative 変異体の導入などの手法によって実証していくことが必要である。

【引用文献】

1. Sakamoto T, Uchida K, Yokota S: Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zool Sci* 18: 1163-1174, 2001
2. Suzuki Y, Itakura M, Kashiwagi M, et al: Identification by differential display of a hypertonicity-inducible inward rectifier potassium channel highly expressed in chloride cells. *J Biol Chem* 274:11376-11382, 1999
3. Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, et al: Inwardly rectifying K⁺ channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochem J* 342: 329-336, 1999
4. Ookata K, Tojo A, Suzuki Y, et al: Localization of inward rectifier potassium channel Kir7.1 in the basolateral membrane of distal nephron and collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 11: 1987-1994, 2000
5. Satlin LM: Regulation of potassium transport in the maturing kidney. *Semin Nephrol* 19: 155-165, 1999
6. Anzai N, Suzuki Y, Nishikitani M, et al: Development of renal potassium excretion capacity in the neonatal rat. *Jpn J Physiol* 51: 745-752, 2001
7. Giebisch G, Malnic G, Brerliner RW: Control of renal potassium excretion. In: *The Kidney*, vol. 1, 6th Ed., edited by Brenner BM, Philadelphia, Saunders, 1999, pp 417-454
8. Simon DB, Karet FE, Rodrigues-Soriano J, et al: Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutation in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet* 14: 152-156, 1996
9. Nakamura N, Suzuki Y, Ikeda Y, et al: Complex structure and regulation of expression of the rat gene for inward rectifier potassium channel Kir7.1. *J Biol Chem* 275: 28276-28284, 2000

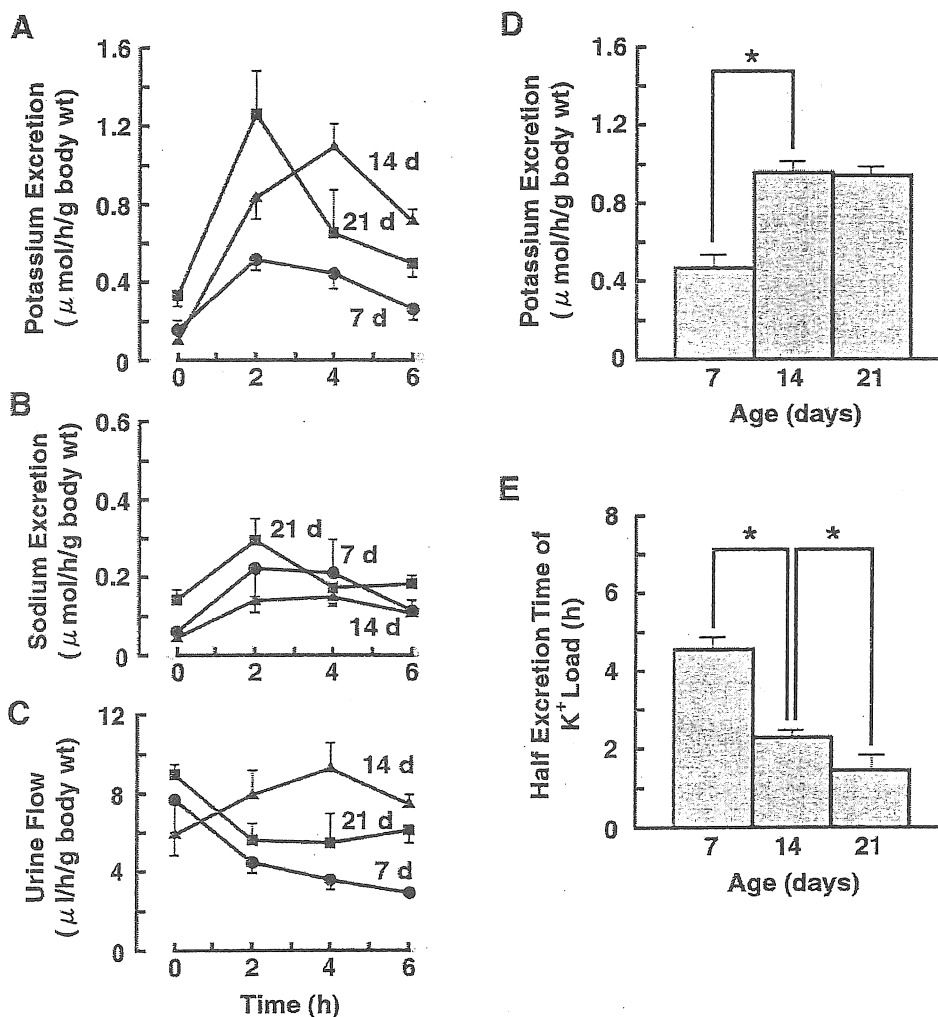


Fig. 1. Renal excretion of exogenous potassium loading. Time-dependent changes in the renal potassium (A) and sodium (B) excretion, and urine flow (C) in the neonatal rats of 7, 14 and 21 days. (D) indicates the total amount of K^+ excretion (excretion capacity) for 4 hours after K^+ load. The average of K^+ excretion were 0.5 ± 0.06 (7 d), 1.0 ± 0.05 (14 d) and 1.0 ± 0.03 (21 d) ($\mu\text{mol/h/g body wt}$). K^+ excretion amount significantly increased between 7 and 14 days after birth. (E) shows the half time of excretion of loaded K^+ . This column represents the excretion rate. The half excretion time was significantly decreased between 7 and 14, and between 14 and 21 days after birth. *indicates $p < 0.05$.

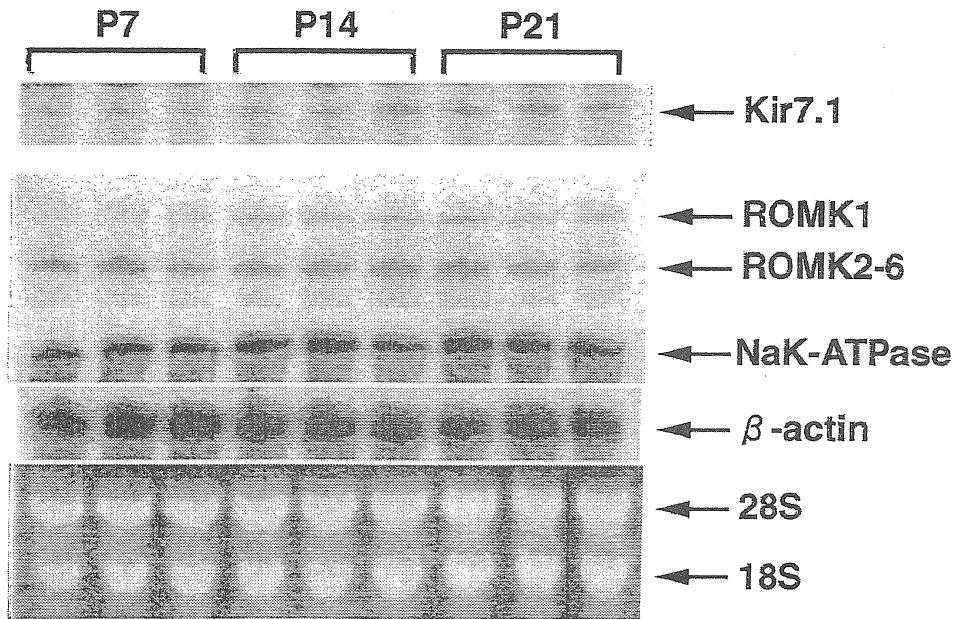


Fig. 2. Developmental increase in Kir7.1 and ROMK mRNA expression. Messenger RNA expression of Kir7.1, ROMK1, the sum of other ROMK isoforms (ROMK2-6), Na⁺,K⁺-ATPase α 1 subunit and β -actin were measured by RNase protection analysis. Whereas β -actin and ROMK2-6 mRNA were relatively constant during postnatal life, Kir7.1 abundance significantly increased during the period of 14 and 21 days. ROMK1 mRNA increased significantly between 7 and 14 days.

Independent regulation of the basolateral K⁺ recycling and K⁺ secretion in the renal collecting duct

Yoshiro Suzuki and Katsumasa Kawahara

Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology; Department of Physiology, Kitasato University School of Medicine

Summary

Coordinated expression of ROMK (luminal K⁺ channel in the thick ascending limb and the collecting duct) and Na⁺,K⁺-ATPase has been demonstrated to be involved in the postnatal development of renal K⁺ excretion, however, the developmental expression of the basolateral K⁺ channel Kir7.1 is unknown. The purpose of this study was to elucidate the possible involvement of Kir7.1 in the maturation of renal K⁺ excretion.

[Methods] Developmental changes in the renal K⁺ excretion was investigated by collecting urine in neonatal rats infused with K⁺ (KCl solution). RNase protection analysis was used to elucidate the expression of Kir7.1, ROMK and Na⁺,K⁺-ATPase mRNA from rat kidney at 7, 14 and 21 days.

[Results] Renal K⁺ excretion increased between 7 and 14 days after birth and sustained between 14 and 21 days. On the other hand, half excretion time of K⁺ load gradually increased through the experimental period of 7 and 21 days. Na⁺,K⁺-ATPase mRNA levels showed the peak of up-regulation at birth and remain elevated. ROMK1 mRNA levels significantly increased between 7 and 14 days. In contrast, Kir7.1 mRNA levels increased through the experimental period, especially between 14 and 21 days.

[Conclusion] Our results showed that Kir7.1 as well as ROMK1 were involved in the maturation of renal K⁺ excretion and indicate that Kir7.1 expression is strongly related with development of the renal K⁺ excretion between 14 and 21 days after birth.