

特集：尿細管疾患の臨床

# 分子レベルからみた尿細管機能

河原克雅

## はじめに

Human Genome Sequencing Project の完了は，“ポストゲノム時代”の幕開けを告げると同時に，古典的な生理機能を「2 万数千個の機能タンパク分子をコードする遺伝子ネットワークの産物」として理解する新たな視点を提供した<sup>1,2)</sup>。

腎臓は，細胞外液の量ならびに電解質組成，pH，浸透圧などの物理化学的性状を至適状態に保つ，重要な臓器である。腎臓の機能は，構成単位となるネフロン(腎小体+尿細管)の集合，すなわち，個々の“糸球体濾過能”と“尿細管上皮細胞の輸送能”の総和である<sup>3,4)</sup>(図 1a)。

ヒトの場合，尿細管各セグメントの輸送能はブラックボックスなので，腎クリアランスの式を変形して評価することができる。

尿細管(ネフロン全体)の輸送能( $J_{L-B}$ ) =

$$P_X \cdot GFR - U_X \cdot V \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

ただし， $J_{L-B}$ ：管腔側から血管側へのフラックス，GFR：(時間)糸球体濾過量， $P_X$ ：ある物質 X の血漿濃度， $U_X$ ：X の尿中濃度，V：(時間)尿量。

物質 X の尿細管輸送能は， $J_{L-B}$ の値が>0 であれば吸収，<0 であれば分泌である(図 1b)。

一方，腎臓(尿細管)の酸( $H^+$ )分泌能は，尿中には複数の $H^+$ 緩衝物質が存在するので，「尿中へのアンモニアや不揮発性酸(リン酸，クレアチニンなど)の排泄量」と「 $HCO_3^-$ 再吸収量」との総和で評価される(式②)。

$$\text{腎の酸分泌能} = NH_4^+ \text{の分泌量} + \text{不揮発性酸の分泌量} - HCO_3^- \text{の再吸収量} \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

近年，腎尿細管のアンモニア( $NH_3$ )輸送<sup>5)</sup>は細胞膜“脂質二重層の拡散”から膜輸送体によって運ばれる“担体輸送”

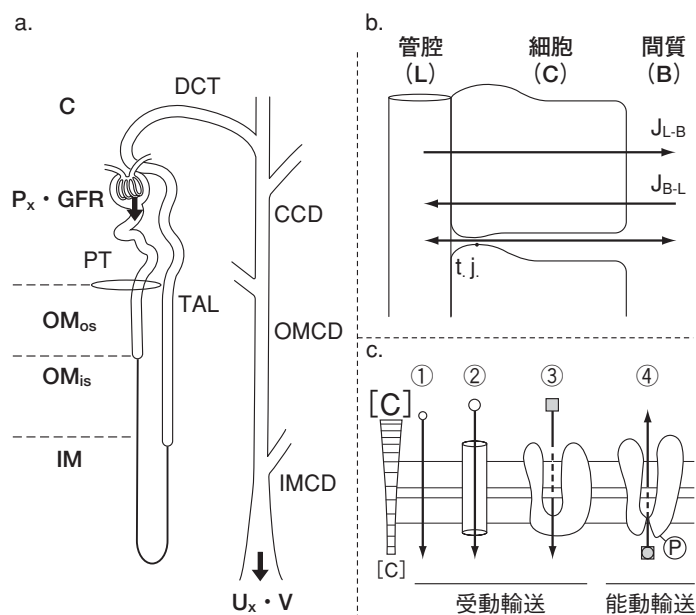
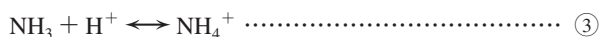


図 1 ネフロンの走向と尿細管上皮輸送

- a：ネフロンの走向と主要なセグメント名。矢印(太い)は，糸球体濾過量と尿細管排泄量を示す(詳細は本文参照)。セグメント名(略称)：近位尿細管(PT)，ヘンレの太い上行脚(TAL)，遠位曲尿細管(DCT)，皮質(C)・髄質外層(OM)・髄質内層(IM)集合管(CCD・OMCD・IMCD)。OMos・OMis：髄質外層外帯・内帯
- b：上皮輸送(溶液吸収・分泌)の模式図。(1)経細胞輸送：(管腔→間質) $J_{L-B}$ ；(間質→管腔) $J_{B-L}$ 。(2)細胞間輸送。t.j.：tight junction タイトジャンクション
- c：膜輸送体の模式図と受動・能動輸送。①単純拡散，②チャネル，③キャリアー，④ポンプ。PはATPからのエネルギー供給を意味する。

であることが明らかになってきた(図 1c)。本稿では，尿細管の酸分泌機構にとって必須の「ガス( $NH_3$ ， $CO_2$ )輸送」<sup>5,6)</sup>について，最近の分子生物学的知見を整理して紹介する。なお，本稿では， $NH_3$ (ガス)と $NH_4^+$ (イオン)を分けて表記し，その必要のないときはアンモニア( $NH_3/NH_4^+$ )と称した<sup>7)</sup>(式③)。





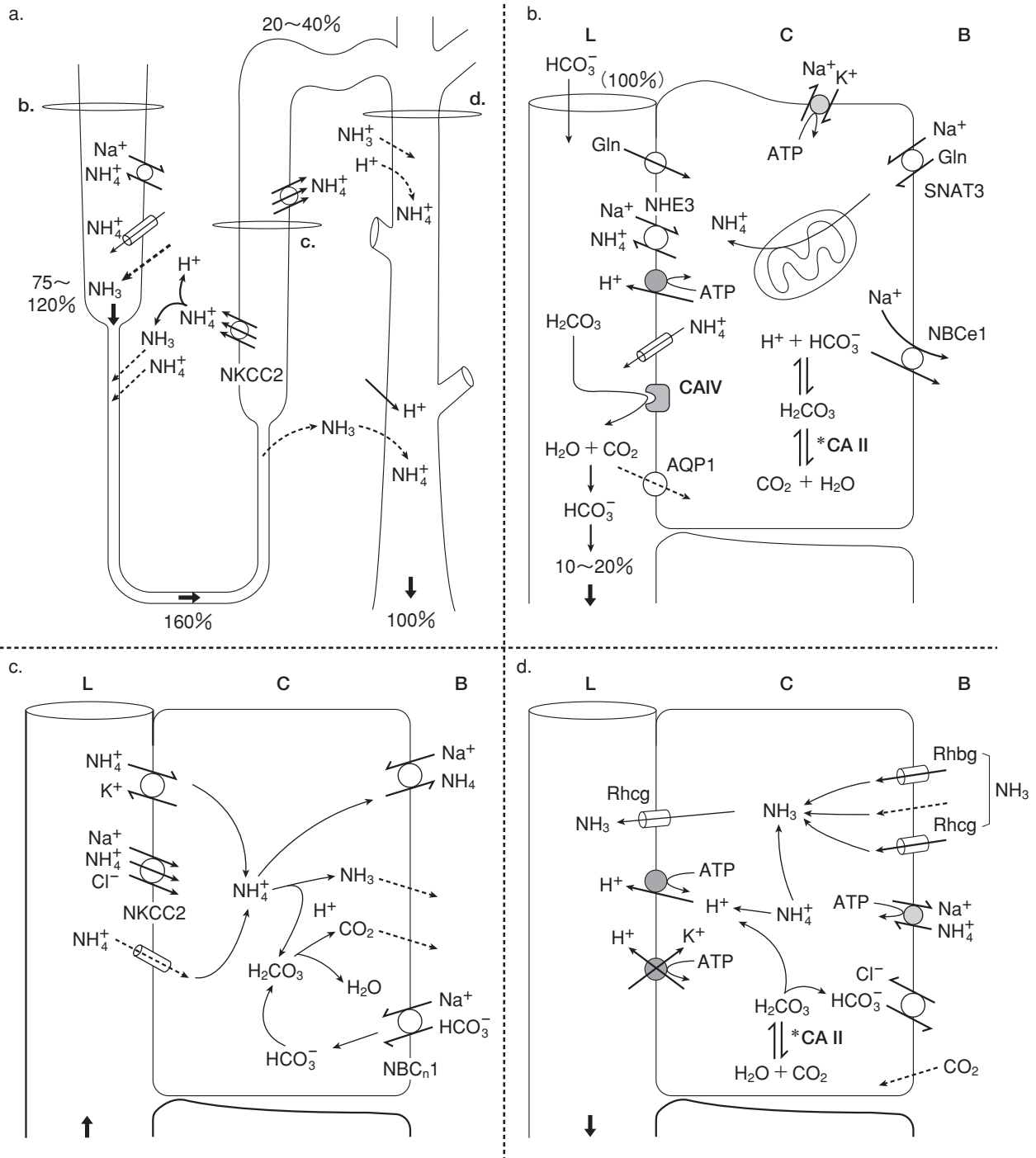


図 2 ネフロンのアンモニア(NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)輸送と細胞内機構

- a : ネフロンのセグメント別アンモニア輸送。管腔内の数値は尿中アンモニアを 100 としたときの相対値
  - b : 近位尿細管のアンモニア分泌
  - c : ヘンレの太い上行脚のアンモニア再吸収と間質への分泌
  - d : 集合管間細胞の尿中アンモニア分泌
- 太い矢印は尿細管液の流れの方向を示す。

ここで注意していただきたいのは、血漿 pH は、アシドーシス/アルカローシスの定義に使用される有力な血液指標

であるが(式⑤)、「生体(細胞膜)は必ずしも血漿 pH をモニターしていない」ということである<sup>28)</sup>。

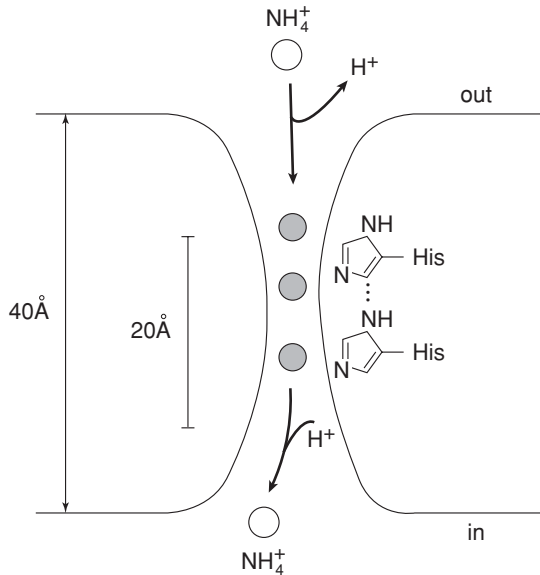


図 3 アンモニアチャネルの分子構造

### NH<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>不透過な細胞膜

1980年代後半、Knepper(NIH)の研究グループは、「PST(ウサギ)は、NH<sub>3</sub>やNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を輸送する」(図2b)や「TAL(ウサギ)では、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>は能動的に輸送される(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>輸送体が、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)-2Cl<sup>-</sup>輸送体として働く)」(図2c)を明らかにした<sup>29,30</sup>(彼らは、TAL細胞膜がP<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>>>P<sub>NH<sub>3</sub></sub>であることに気づいていたようであるが)。翌年、Hebert(1989年)の研究グループは、「TAL(マウス)はNH<sub>3</sub>不透過な細胞膜である」と結論した<sup>31</sup>。この5年後、Boronら(1994年)は、「ウサギ胃腺上皮(管腔膜)は、CO<sub>2</sub>、NH<sub>3</sub>に不透過である」ことを報告した<sup>15</sup>。

それでは、CO<sub>2</sub>やNH<sub>3</sub>は、どのような機構で細胞膜を横切るのだろうか。Boronら<sup>15</sup>が発見した「NH<sub>3</sub>は疎水性小分子であるが、脂質二重層を制限的に輸送される」という実験結果は、幸運にもNH<sub>3</sub>輸送タンパク(膜輸送体)の存在を予言していた。

### アンモニア輸送の分子機構(ガスチャネル)

尿中に排泄される多くの分子のなかで、NH<sub>3</sub>は特殊な分子である。なぜなら、NH<sub>3</sub>はガスというだけではなく、尿中NH<sub>3</sub>のほとんどすべては腎尿細管(主に近位尿細管)で産生される<sup>5,32,33</sup>。細胞膜NH<sub>3</sub>チャネル“孔部”の分子サイズは、直径約1.35Åである(図3)<sup>34,35</sup>。

細胞膜に発現するRh糖タンパクは、以下の3種が知られている。

**RhAG** : RhAGは、RBCに発現するRhesus複合体であるが、腎尿細管には発現していない。RhAGは、アンモニアをNH<sub>3</sub>の形で輸送する<sup>36</sup>。

**RhBG** : RhBGは、RhAGと異なり、体内組織(腎、肝、皮膚、消化管、肺など)に広く発現する。輸送基質は、NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(NH<sub>3</sub>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)とmethylammonia。細胞内発現部位(マウス、ラット)は、DCT-IMCDの側底膜(IC>>PC)である。例外的だが、CCD(IC)BタイプとIMCDの主細胞にはRhBGは発現していない。代謝性アシドーシスになると、集合管のRhBG mRNA/タンパクが増加した<sup>25</sup>。

**RhCG** : RhCGは、RhBG同様、広く体内組織(腎、中枢神経、睪丸、肺、肝、消化管、肺など)に発現し、アンモニアを輸送する(NH<sub>3</sub>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)。ヒト、マウス、ラットの場合、DCT-IMCD細胞両側膜に発現する(IC>>PC)。非発現部位は、RhBGと同様である。代謝性アシドーシス時には、特にOMCDやIMCDにおいて、RhCG mRNA/タンパクを増加させ、血漿pHを正常域に保とうとする。しかし、集合管特異的RhCG KOマウスでは尿中アンモニア排泄能が低いため(アシドーシス刺激に対するレスポンスが悪いため)、より重篤な代謝性アシドーシスになった<sup>37</sup>。Cyclosporine A投与時は、RhCGの発現量が減少するので、尿中アンモニア排泄能が低下する<sup>38</sup>。興味深いことに、睪丸に発現するRhCGを欠失させると、精子の妊孕力が低下した<sup>39</sup>。

RhBG/RhCGが、NH<sub>3</sub>のほかにCO<sub>2</sub>を輸送するかどうかについてはまだよくわかっていない<sup>5</sup>。

### おわりに

CKDの結果や増悪因子として重要な位置を占める代謝性アシドーシス(急性・慢性)<sup>27</sup>は、尿細管細胞の酸分泌に関与する酵素(CA: carbonic anhydrase)や輸送体(NHE, RhBG/RhCG, H<sup>+</sup>ATPase)の発現ならびに活性が亢進し、尿中への酸分泌量が増加する。と同時に、代謝性アシドーシス時には、水・電解質輸送機能調節に関与する多くの受容体や輸送体の発現量も亢進/減弱する<sup>25,40</sup>ので、腎機能全体に多大な影響を与える。細胞膜のガスチャネルは、腎尿細管の新しい輸送経路として、今後の研究の進展が期待される。

### 謝辞

北里大学大学院医療系研究科平成20~21年度教員プロジェクト研究「メタボリックアシドーシス: 腎尿細管のH<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送分子の役割」への支援(to K. K.)に感謝する。

利益相反: 申告するべきものなし

## 文献

1. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007 ; 447 : 799-816.
2. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 19428-19433.
3. 坂井建雄, 河原克雅. 人体の正常構造と機能(V). 東京 : 日本医事新報社, 2003.
4. Giebisch G, Windhager E. Transport of sodium and chloride. In : Boron WF, Boulpaep EL (eds) *Medical Physiology*, Philadelphia : Saunders, 2003 : 774-789.
5. Weiner D, Verlander JW. Molecular physiology of the Rh ammonia transport proteins. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2010 ; 19 : 471-477.
6. Boron WF. Sharpey-Schafer lecture : gas channels. *Exp Physiol* 2011 ; 95.12 : 1107-1130.
7. Weiner ID, Verlander JW. Role of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol* 2011 ; 300 : F11-F23.
8. Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. Expression cloning and cDNA sequencing of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter. *Nature* 1987 ; 330 : 379-381.
9. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992 ; 256 : 385-387.
10. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993 ; 362 : 31-38.
11. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial  $\text{Na}^+$  channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994 ; 367 : 463-467.
12. Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001 ; 10 : 655-659.
13. Pitts RF. Renal excretion of acid. *Fed Proc* 1948 ; 7 : 418-426.
14. Alberts B. Membrane transport. In : *Molecular biology of the cell*, 5th ed. New York : Garland Science, 2008.
15. Waisbren SJ, Geibel JP, Modlin IM, Boron WF. Unusual permeability properties of gastric gland cells. *Nature* 1994 ; 368 : 332-335.
16. Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF, Boron WF. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the  $\text{CO}_2$  permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1998 ; 274 : C543-C548.
17. Cooper GJ, Boron WF. Effect of PCMBs on  $\text{CO}_2$  permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : C1481-C1486.
18. Prasad GV, Coury LA, Finn F, Zeidel ML. Reconstituted aquaporin 1 water channels transport  $\text{CO}_2$  across membranes. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 33123-33126.
19. Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Boron WF, Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for  $\text{CO}_2$  transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J* 2006 ; 20 : 1974-1981.
20. Alper SL. Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. *Exp Physiol* 2006 ; 91 : 153-161.
21. Herrera M, Hong NJ, Garvin JL. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 2006 ; 48 : 157-164.
22. Herrera M, Garvin JL. Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *Am J Physiol* 2007 ; 292 : F1443-F1451.
23. Ripoché P, Goossens D, Devuyt O, Gane P, Colin Y, Verkman AS, Cartron JP. Role of RhAG and AQP1 in  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$  gas transport in red cell ghosts : a stopped-flow analysis. *Transfus Clin Biol* 2006 ; 13 : 117-122.
24. Wang Y, Tajkhorshid E. Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins* 2010 ; 78 : 661-670.
25. Cheval L, Morla L, Elalouf JM, Doucet A. Kidney collecting duct acid-base "regulon". *Physiol Genomics* 2006 ; 27 : 271-281.
26. Fry AC, Karet FE. Inherited renal acidosis. *Physiology* 2007 ; 22 : 202-211.
27. Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis : pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol* 2010 ; 6 : 274-285.
28. Boron WF. Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2368-2382.
29. Garvin JL, Burg MB, Knepper MA.  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  transport by rabbit renal proximal straight tubules. *Am J Physiol* 1987 ; 252 : F232-F239.
30. Garvin JL, Burg MB, Knepper MA. Active  $\text{NH}_4^+$  absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol* 1988 ; 255 : F57-F65.
31. Kikeri D, Sun A, Zeidel ML, Hebert SC. Cell membranes impermeable to  $\text{NH}_3$ . *Nature* 1989 ; 339 : 478-480.
32. Nonoguchi H, Uchida S, Shiigai T, Endou H. Effect of chronic metabolic acidosis on ammonia production from L-glutamine in microdissected rat nephron segments. *Pflügers Arch* 1985 ; 403 : 229-235.
33. 河原克雅, 福田英一, 小林瑞佳.  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ の尿細管輸送経路と髄質内蓄積. *腎と透析* 2009 ; 67 : 44-48.
34. Khademi S, O'Connell J 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh : structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 2004 ; 305 : 1587-1594.
35. Knepper MA, Agre P. Structural biology. The atomic architecture of a gas channel. *Science* 2004 ; 305 : 1573-1574.

36. Ripoche P, Bertrand O, Gane P, Birkenmeier C, Colin Y, Cartron JP. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of  $\text{NH}_3$  into red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 17222-17227.
37. Lee HW, Verlander JW, Bishop JM, Igarashi P, Handlogten ME, Weiner ID. Collecting duct-specific Rh C glycoprotein deletion alters basal and acidosis-stimulated renal ammonia excretion. *Am J Physiol* 2009 ; 296 : F1364-F1375.
38. Lim SW, Ahn KO, Kim WY, Han DH, Li C, Ghee JY, Han KH, Kim HY, Handlogten ME, Kim J, Yang CW, Weiner ID. Expression of ammonia transporters, Rhbg and Rhcg, in chronic cyclosporine nephropathy in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2008 ; 110 : e49-e58.
39. Biver S, Belge H, Bourgeois S, Van Vooren P, Nowik M, Scohy S, Houillier P, Szpirer J, Szpirer C, Wagner CA, Devuyst O, Marini AM. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. *Nature* 2008 ; 456 : 339-343.
40. Nowik M, Lecca MR, Velic A, Rehrauer H, Brändli AW, Wagner CA. Genome-wide gene expression profiling reveals renal genes regulated during metabolic acidosis. *Physiol Genomics* 2008 ; 32 : 322-334.