

9532 マクラデンサにおけるCl<sup>-</sup>チャンネルのクローニング

助成研究者：鈴木 誠 (自治医科大学 薬理学)

共同研究者：(東京医科歯科大学)

## 要約

マクラデンサ固有のCl<sup>-</sup>チャンネルを同定クローニングするためラット腎より、differential display 法によって、マクラデンサにのみ存在する遺伝子の断片を同定した。そのうち2つの fragments は、すでに報告されている、metalothionein, human repetitive element と高い相同性を有していた。8 fragments は報告がないか、あっても機能不明の塩基配列であった。この特異な遺伝子については現在 full-clone を単離しようとしている。しかしCl<sup>-</sup>チャンネルは含まれていなかった。同様の方法で、Cl<sup>-</sup>チャンネルに特異的なプライマーを用い実験したところ CIC3 の存在が示唆された。

つぎに CIC3 の発現実験を行った。とくにマクラデンサに feedback されるシグナルには細胞内 Ca の上昇を伴うことが確認されているので、細胞内 Ca の影響について検討した。定常状態、細胞内 Ca10nM 程度では、CIC3 チャンネルは外向き整流性の電位依存性の電流であった。詳細な観察では、少なくとも2つのコンダクタンスレベルすなわちCl<sup>-</sup>を通す穴があった。細胞内 Ca200nM 程度ではこのうち大きなコンダクタンスがブロックされまた1000nM になると小さなコンダクタンスもブロックされた。大きなコンダクタンスは電位依存性であるが小さなコンダクタンスは電位非依存性で、時定数も異なることから明らかに2つの異なる穴といえる。Ca によるブロックは、whole-cell でも確認された。従って、CIC3 は2つのCl<sup>-</sup>の通り口を持ち、細胞内 Ca によって別々にブロックを受けることが示唆される。上皮細胞などではCa 上昇シグナルは200nM 程度の上昇であること、興奮性膜では1000nM 程度まであがることを考えると、CIC3 が両者に存在していても実際の興奮状態では細胞全体のCl<sup>-</sup>透過性がなを違うことが理解される。



### 9532 マクラデンサにおけるClチャンネルのクローニング

助成研究者：鈴木 誠 (自治医科大学 薬理学)

共同研究者：(東京医科歯科大学)

#### 目的

マクラデンサはヘンレ上行脚の末梢に位置し尿管を流れるCl濃度の変化を糸球体にフィードバック (tubulo-glomerular feedback) する特殊な機能を有している。ここにおけるClチャンネルを特徴づけ、機能を検討することが本研究の目的である。ClチャンネルのうちCICファミリーは現在7個のメンバーから構成されているCIC-0-7。これらのメンバーは、12または13の膜貫通部位をもち、CIC-3以外の全ては、約40%のアミノ酸相同性を有している。Clチャンネルに共通のdegenerate primerを用い、マクラデンサを標的としてどのメンバーが存在するかについて検討すると共に、マクラデンサ固有の遺伝子の解析を試みた。

マクラデンサのシグナル伝達は細胞内Caの上昇を伴うので、発現させたCICファミリーのCaの作用について検討した。

#### 方法

1. ラット腎より、マクラデンサを含むヘンレ上行脚と含まないものを各々単離する。一般的なdifferential display法によって、マクラデンサ有りにのみ存在する増幅バンドをクローニングする。またClチャンネルに特徴的なdegenerate primerを用いて同様の検討を行った。
2. チャイニーズハムスターの卵細胞(CHO cell)に、デキサメサゾン誘導性の発現ベクターであるpMAM-neoを用いて、ラット腎よりクローニングされたCIC-3遺伝子のステーブルトランスフェクションをおこなった(Leeら, 1981; ChenとOkayamaら, 1987; Tacharaniら, 1991)。G418で5カ月間選択した後、トランスフェクションした細胞のうち75のクローン化した細胞でCIC-3 mRNAを調べた。
3. CHO細胞に対し、パッチクランプ法を用い、電流の解析を行った。特に細胞内Caの影響について詳細に検討した。

## 結果

### DIFFERENTIAL DISPLAY 法によるマクラデンサ特異遺伝子の検出

マクラデンサは、ヘンレ上行脚のごく一部で、顕微鏡下での単離は不可能であった。そこで、ヘンレ上行脚のうち、マクラデンサを含む尿細管を 100 本集め mRNA としたが、単離から PCR 検出まで、時間を要するためか、PCR 増幅はうまく行かなかった。しかし、逆に 5 本程度をすばやく単離し RNA 分画を RT-PCR をする事で、増幅が可能であった (図 1)。その結果マクラデンサを含む尿細管からのみ増幅されるバンドを 10 本確認した。2つの fragments は、すでに報告されている、metalothionein, human repetitive element と高い相同性を有していた。8 fragments は報告がないか、あっても機能不明の塩基配列であった。Cl チャンネルと相同性を有する fragments は得られなかった。

次に CIC ファミリーに共通の degenerative primer を用い同様の検討を行った。その結果 CIC3 はマクラデンサを含む尿細管でも含まない尿細管からでも増幅された。CIC3 full clone をもちいて CHO 細胞に transfection を行った。

### CHO 細胞における CIC-3 のトランスフェクションと発現

72 の transfection 細胞から 2 $\mu$ M のデキサメサゾン処理によって 3.5kb の CIC-3 mRNA を発現する唯一のセルライン C21 を得た。細胞表面での CIC-3 チャンネルの発現を調べるために、whole-cell patch clamp 法にて C21 細胞を分析した。C21 細胞では、外向き電流がみられたが (2535  $\pm$  176 pA; +10mV の膜電位における平均  $\pm$  SEM; n = 10)、transfection しなかった CHO-K1 細胞では同レベルの電流はみられなかった (14  $\pm$  4pA; n = 10)。膜電位が  $\pm$ 14mV 以上に保たれたとき、細胞死を引き起こす過大な電流が流れた。C21 細胞では、大きな外向き電流がみられ、その電流は、10 世代以上を通して安定してあらわれた。

Whole-cell patch clamp 法により C21 細胞でみられる電流における kinase C の活性化薬 TPA の効果をみた。1mM の TPA の 1 分間の処理により電流はブロックされ (120  $\pm$  50 pA; n = 6 図 1B, TPA(+))、この効果は TPA が溶液から除かれた後も、少なくとも 5 分間続いた。この TPA の阻害効果は、protein kinase の阻害剤である H-7 の 10 mM の追加によって完全に消失した (2743  $\pm$  194 pA; n = 6; 図 1B, TPA(+), H-7(+))。我々はまた、CIC-3 の whole-cell patch clamp の電流における 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS) の阻害効果についても検討した。1mM の DIDS 処理で、電流はブロックされた (40  $\pm$  26 pA; n = 6)。これらの性質は *Xenopus oocyte* における微小電極 voltage-clamp 法から得られた過去のデータと同じであった。

CIC-3Cl チャンネルの single channel の性質を調べるために、C21 細胞に対し cell free patch 法をおこない、CIC-3 の single channel recording を得た。CHO-K1 細胞において、正の膜電位で cell-attached と inside-out patch で、内因性の $\sim 30$ pS 程度の小コンダクタンスの Cl チャンネルが観察された (37.5%; 12/32; データは示さず)。CIC-3 の cDNA による電流は、C21 細胞の cell-attach patch calmp ではみられなかった。しかし、C21 細胞をパッチした膜を単離して、10nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の浴液においた後、膜電位を +60mV に保つと、さまざまな時間経過で大きな Cl 電流が流れた (0.5-3 分間の間で;  $n = 78/100$ )。C21 細胞における inside-out patch で、大コンダクタンスの Cl 電流が観察されたが、それは wild type の CHO-K1 細胞や insert のないベクターを transfection し、デキサメサゾンを加え培養した CHO-K1 細胞では観察されなかった ( $n = 0/50$ )。デキサメサゾン処理を加えなかった場合、オーバーエクスポーズしたノザンプロットでも C21 細胞では CIC-3 mRNA は弱い発現であり、大コンダクタンスクロライドチャンネルの出現する確率も減少していた ( $n = 18/50$ )。これらのデータに基づき、この大きなクロライド電流が CIC-3 の電流であると確認した。1mM EGTA を含むほぼ  $\text{Ca}^{2+}$  フリーの溶液中で、CIC-3 チャンネルは正の膜電位で外向きのクロライド電流を流すが、-20mV 以下の膜電位では内向き電流は流さない (図 2)。パッチした細胞膜が 1 つの channel しか含まない時、この大きなクロライドチャンネルには中コンダクタンス(S2)と大コンダクタンス(S1)の 2 つのコンダクタンス相が存在した (図 3 上; pCa 8)。開状態では、+40mV の膜電位で S1 と S2 の間での直接の移行がみられた。内外とも 120mM の Cl<sup>-</sup> の溶液での inside-out patch において、CIC-3 チャンネルのコンダクタンスの状態は 100 pS (S2) と 140 pS (S1) であった。Cl<sup>-</sup> を部分的に他の陰イオンに置き換えると、その電流平衡は Nernst の平衡による逆転電位によく当てはまった。陰イオンの透過性の比は I (3.4)、Br<sup>-</sup> (1.2)、Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup> (0.36) であった (図 3 下)。このように、CIC-3 チャンネルはパッチ法において脱分極誘導性の外向き整流性 Cl<sup>-</sup> チャンネルである。

#### CIC-3 チャンネルの $\text{Ca}^{2+}$ 依存性ゲーティング

まず inside-out patch において CIC-3 シングルチャンネルに対する kinaseC の効果を検討した。補助因子の存在下で、プロテインキナーゼ C (0.8 U/ml) は CIC-3 電流を阻害するが、EGTA 処理で速やかに電流は回復した (データは示さず)。このことから、 $\text{Ca}^{2+}$  は CIC-3 チャンネル活性の調節因子であり、kinaseC による調節に無関係であると推測された。したがって、このチャンネルにおける  $\text{Ca}^{2+}$  の効果を検討した。Inside-out patch で、+60mV の膜電位における CIC-3 single channel に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の溶液中の濃度変化の効果を図 3 に示す。溶液中

には 10 mM の H7 と 0.2 U/ml のアルカリフォスファターゼを含むが、ATP は含まない。ほぼ  $\text{Ca}^{2+}$  フリーの溶液中において、主な single channel の電流は大コンダクタンスの電流であり、それは S1 コンダクタンスレベルであった (140 pS)。しかし、S2 コンダクタンスレベル (100 pS) の電流もまれに観察された。100 nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の溶液中で、主たるシングルチャンネルの電流は S1 コンダクタンスレベルから S2 コンダクタンスレベルへ変化し、さらに小さなコンダクタンスレベル (40 pS) の S3 が出現した。3 つの相 (閉状態, S2, S3) の間で速くてダイレクトな移行がみられた。200 nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の溶液中では、主なシングルチャンネルの電流は、S3 コンダクタンスレベルであった。1000 nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の溶液中ではついに CIC-3 シングルチャンネルの電流は消失した。

3  $\mu\text{M}$  の staurosporin の存在下でのインサイドアウトパッチで、40 mV の膜電位における CIC-3 電流の、溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化に対する効果を図 4 に示す。10 nM の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の溶液中で C21 細胞の inside-out patch を構成中に CIC-3 チャンネルの自発的な開口を観察した。そのヒストグラムでは 2 つのギャップを示す 3 つの電流のピークがあった ( $-4.12 \pm 0.29$  [S2] また、 $-5.7 \pm 0.22$  pA [S1], Gaussian analysis, 図 4, A phase)。マルチプルアウトレット法を用いて、溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 200 nM と高くしたとき、そのチャンネルの電流は、大コンダクタンスレベルから S3 コンダクタンスレベルへと変化した ( $-1.6 \pm 0.18$  pA [S3], Gaussian analysis, 図 4, B phase)。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1 mM へ高くしたとき、電流は消失した。1 mM EGTA を含んだほぼ  $\text{Ca}^{2+}$  フリーの溶液中へおくことによって、チャンネル活性が回復した。上述の結果より、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が CIC-3 チャンネルを阻害すると考えられた。各々のコンダクタンスレベルの電位依存性を図 4 の下段に示す。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  200 nM における 30 pS のコンダクタンスレベル (LCCIC) は、電位依存性がないのに対し、大きなコンダクタンス (HCCIC) は電位依存性がある。

この現象を C21 細胞の whole cell patch clamp により検討した。Ca ionophore であるイオノマイシンを用いておこなった。Whole-cell patch clamp において、 $\pm 10$  mV の電圧パルスに対する CIC-3 の電流を観察した。パッチした細胞に 1 mM の濃度のイオノマイシンを与えると、ホールセルの電流は数秒の間に徐々に小さくなり、その逆転電位がシフトした。数分後にはホールセル電流は完全にブロックされた ( $n = 3$ )。

さらに様々な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度における CIC-3 チャンネルのシングルチャンネルレコーディングの解析をおこなった。S2 相における、膜電位に応じた開口確率を図 4 に示す。溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、開口確率は膜電位に依存性であった。溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させると S2 の半数を開口させる ( $P_o = 50\%$ ) 電圧は右方へ移動した (10 nM で 20 mV, 100 nM で 40 mV, 200 nM で 70 mV)。これらのイ

インターバルの絶対的分布を用いて、CIC-3 チャンネルの開状態と閉状態の解析をおこなった (Blatz と Magleby, 1986)。Ca<sup>2+</sup>濃度 10 nM の溶液中で、+20 mV の膜電位において 8 分間の記録をおこなった。この条件で、主なコンダクタンス相は S2 であり、S1 と S3 である確率は低かった。開状態と閉状態の解析により、S2 相における CIC-3 チャンネルは、少なくとも 3 つの開状態と少なくとも 4 つの閉状態をとることを示した。

## 考察

マクラデンサ固有の遺伝子のクローニングは、tubulo-glomerular feedback の機序にとってまた血圧維持においても重要な位置を占める。今回の研究では、その一部が得られたにすぎないが、今後、残る 8 つの fragments の遺伝子を明らかにし、マクラデンサ固有であるか否かを検討する必要がある。

CIC ファミリーでは CIC3 が増幅された。この研究は CIC ファミリーが stable transfection された cell line の確立を示している。チャイニーズハムスターとラットは発生学的に近いため、CHO-K1 細胞はラット CIC-3 チャンネルのより自然な発現に適しているかもしれない。CIC-3 単一チャンネル記録の実験はイオンチャンネルに新しい事実を提供している。CIC-3 チャンネルは、Ca<sup>2+</sup>感受性、外向き整流型 Cl<sup>-</sup> チャンネルである。バス内の Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は生理学的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の範囲内で単一チャンネル電流をフリッカーアウトさせた。その抑制は膜電位と細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度に依存していたが、プロテインカイネースや ATP に依存する過程では影響されなかった。CIC-3 は large-conductance Cl<sup>-</sup> channel である。Cl<sup>-</sup>を他のアニオンに部分的に置換した時の逆転電位に基づいて、我々はアニオンの透過度の順番を I<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > F<sup>-</sup> と決定した (Figure 2C)。この順番は Eisenman's series 1 に一致している。このことは、CIC-3 チャンネルが低い正電荷をもった部位をもち、他の Cl<sup>-</sup> channel と比較して相対的に大きい直径をもっていることを示唆しているかもしれない。それゆえに、その大コンダクタンスはそのポアのサイズに関係しているのかもしれない。

CIC-3 チャンネルは patch excision そして脱分極依存性のチャンネルである。チャンネル電流は cell-attached mode では出現しないが、cell-free mode においては活性化された。以前の生理学的実験では他の Cl<sup>-</sup> channel の excision activation が示された。その細胞に細胞内抑制因子が存在し、Cl<sup>-</sup> channel を抑制していることが予想される。我々の cell-attached studies においては、トランスフェクトされた細胞はバスの溶液で洗い、patched membrane は吸引によってピペット内に吸い込んだ。この操作は shear stress を生じさせ、その shear stress が細胞内 Ca 濃度を上昇させ PKC を活性化させるかもしれない。shear stress による細胞内変

化は CIC-3 チャンネルを抑制するかもしれない。細胞から patched membrane を取り外すことは CIC-3 チャンネルに細胞内コンポーネントの関与をなくした Ca 濃度を低下させることである。Ca 濃度の低下は CIC-3 チャンネルを活性化させるのかもしれない。CIC-3 チャンネルの特性をさらに研究することは patch excision や脱分極誘発性 Cl<sup>-</sup> channel の機序を明確にするかもしれない。多くの研究者たちは、イオンチャンネルの Ca 依存性活性化のメカニズム、Ca 活性化 K<sup>+</sup> channel そして Ca 活性化 Cl<sup>-</sup> channel を報告してきた。しかし、Ca 依存性不活化の機序として、GABA レセプターと Ca チャンネルの報告がされてきた。CIC-3 チャンネルの抑制は Ca 依存性不活化の機序のもう一つのタイプである。生理学的範囲内の Ca 濃度で excised patches が施行されたとき、CIC-3 チャンネルは S1, S2, S3, closed という 4 つコンダクタンスレベルの間をすばやく移行する。似たような half-blocking phenomenon は以前にも報告された。我々の研究は Ca による新しいタイプの half-blocking phenomenon を示した。Ca-free solution において、主なシングルチャンネルコンダクタンスレベルは S1 state だった。10 nM とすると、S1 state から S2 state に変化した。100 nM ではさらに低いコンダクタンスである S2 state に変化した。

S3 コンダクタンスレベルは、内因性の Cl<sup>-</sup> channel からではない。なぜならば、Ca 濃度を 100 nM 以上にしたときに、S1/S2 コンダクタンスのあとに出現するからである。wild-type の CHO cell における excised patches は主に 30 ps までの Cl<sup>-</sup> channel を認めるのみである。それゆえに、細胞内における生理学範囲内の Ca 濃度において CIC-3 チャンネルは 4 つのコンダクタンスレベルをスイッチする。Ca 濃度によるコンダクタンスレベルの変化は CIC-3 にコードされた Cl<sup>-</sup> channel のサブコンダクタンスレベルに起因しているだろう。しかし、その変化が triple-barreled channel のスイッチングによるかどうかは確かではない。いくつかの Cl<sup>-</sup> channel は double barrels をコードしていることが知られているので、triple-barreled の仮設も否定できない。以上のように本実験では、CIC3 が multi pore を持つことと、疎通性が細胞内 Ca によって制御されていることが明らかである。

CIC3 がマクラデンサの有無に関わらずヘンレ上行脚から増幅されたことは単にヘンレ上行脚にのみ存在する事を指示しているのかもしれない。マクラデンサに存在したとしても tubulo-glomerular feedback への関与は指示できない。マクラデンサでは G 蛋白が血管側ではなく管腔側に存在することが知られている。もし、CIC3 がマクラデンサではヘンレ上行脚とは存在極性が異なるならばその関与の可能性がある。今後、特異性の高い抗体を得ることで、この問題を解決しなくてはならない。



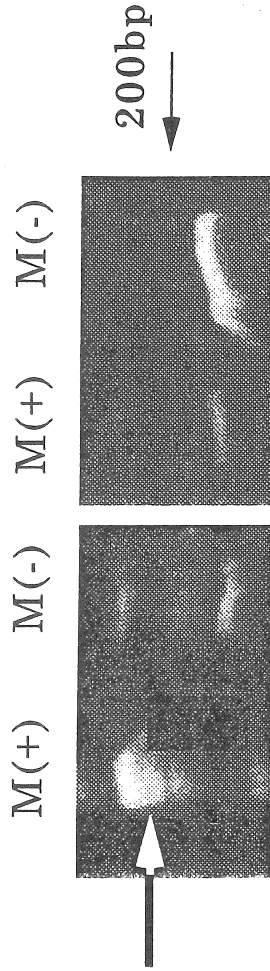


図1 単離尿管より differential display

ラット腎臓からマクラデンサのついたヘンレ上行脚 (M(+)) とマクラデンサをなくした上行脚 (M(-)) を単離し、RT-PCRを行った。サンプルをアルリルアミド変性ゲルで分離した。プライマーは 8・9mer でゲノム上出現頻度の高いものを用いた。左のプライマーの組み合わせでは約 200bp に M(+) で過剰なバンドが認められるが (矢印) 右の組み合わせでは認めない。過剰なバンドを M(+) 特異な増幅産物として塩基配列を決定した。

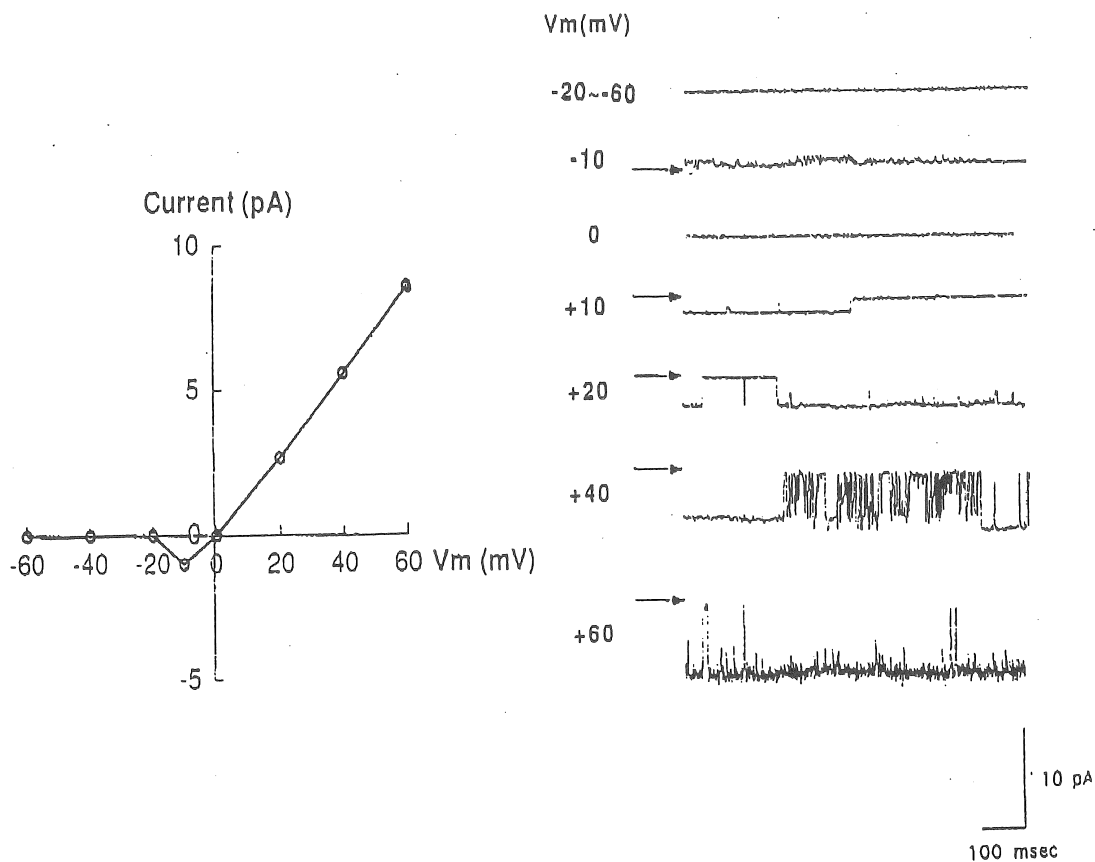


図2 CIC3 single channel

CHOにCIC3をtransfectした細胞で、inside-out patchを行った記録を示す。浴液  $pCa=8$  で、ピペットはCaを1mM含むTEACl150mM溶液である。図左にI-V曲線を、右に実際の記録を示す。Vmは膜電位を示す。

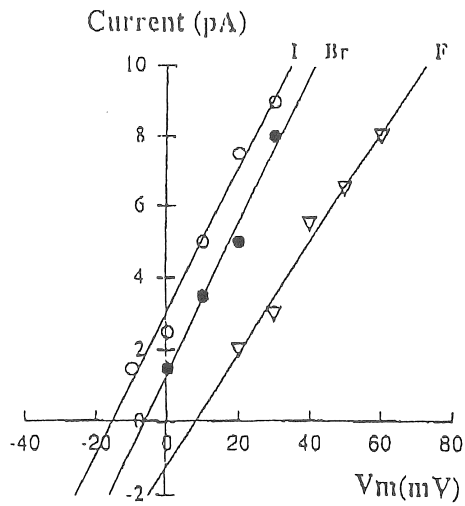
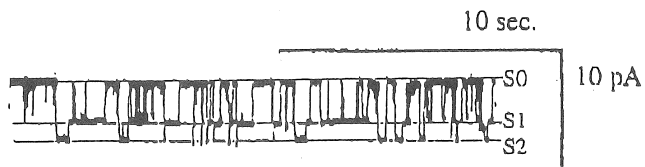


図3 CIC3の異なるコンダクタンスと、陰イオン選択性。  
 上段; Inside-out patchで観察された記録を示す。S0は0レベル。S1,S2の少なくとも2つのコンダクタンスレベルが観察された。下段; ClをI,Br,Fに置換した場合のI-V曲線を示す。

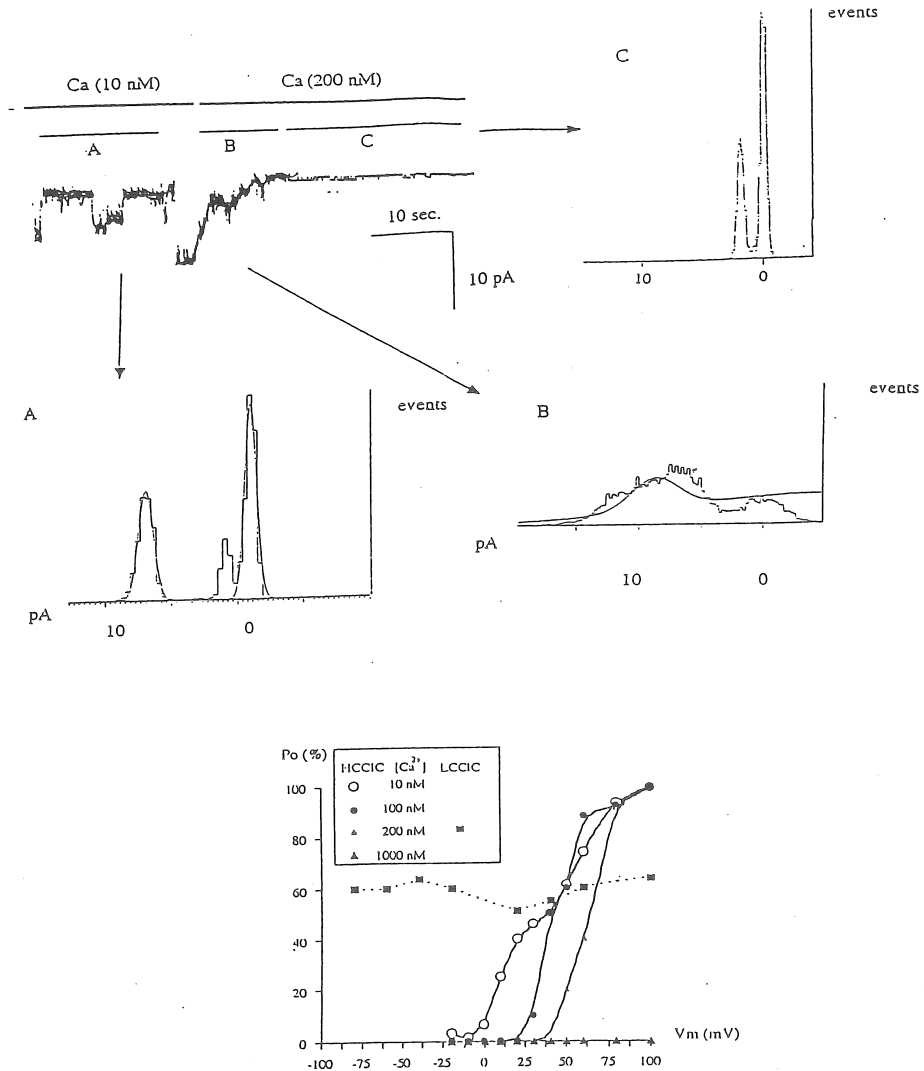


図4 細胞内CaのCICチャンネルへの影響。

上段; Inside-out patch で観察された記録を示す。A,B,Cの相で細胞内Caの濃度を上昇させ、そのときの電流の記録を示す。各相でGaussian analysisを下結果が矢印の後にグラフで示されている。A相では、3つのピークがあり、0から左方に最初のピークまでが小さなコンダクタンスレベル(LCCIC)で、0から次の大きなピークまでが大きなコンダクタンスレベル(HCCIC)である。細胞内Ca濃度が上昇するとBのグラフのごとくピークが明確ではなくなり (flickerling block) その後CのごとくLCCICのみのピークが認められるようになる。

下段;HCCICとLCCICの開口確率(Po)を電位を横軸に各細胞内Caに対応してプロットした。Ca濃度10、100nM(白丸、黒丸)ではHCCICが認められ、200nMではHCCIC(白三角)LCCIC(黒三角)が観察された。1000nMでは電流は認められない(黒三角)。

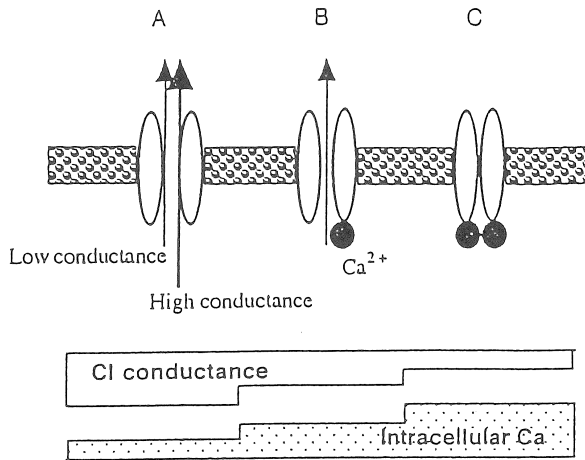


図5 CIC3 channel の開口機構と Ca の相互関係の想像図。

A ; Ca 10nM で細胞内定常状態では high conductance, low conductance (HCCIC, LCCIC)ともに開いている。B ; Ca 200nM で上皮の興奮などで達せられる値では、HCCIC のみが阻害される。C ; Ca 500nM 以上で、興奮性細胞の興奮期には完全に閉じてしまう。実際の解析では、さらに複雑なレベルがあるが簡単のため模式化した。

参考文献

Suzuki, M., Morita, T., Hanaoka, K., Kawaguchi, Y. and Sakai, O. : A Cl<sup>-</sup> channel activated by parathyroid hormone in rabbit renal proximal tubule cells. J. Clin. Invest., 83:735-742, 1991.

Suzuki, M., Miyazaki, K., Ikeda, M., Hayakawa, H., Ogawa, A., Kawaguchi, Y. and Sakai, O. : Cloning of a pH-sensitive K<sup>+</sup> channel possessing two transmembrane segments. Nature 367: 642-645, 1994.

Kawasaki, M., Suzuki, M., Utida, S., Sasaki, S. and Marumo, M. : Stable and functional expression of the ClC-3 Chloride channel in somatic cell lines. Neuron 14: 1285-1291, 1995.

A Cl channel in the kidney regulated by Ca.

助成研究者 鈴木誠 (自治医科大学薬理学)

共同研究者 河崎雅暢 (東京医科歯科大学第2内科)

Macula densa (MD) is a unique apparatus in the kidney, in which fluctuation of urinary Cl concentration regulates renal afferent arterial tone (tubulo-glomerular feedback). We have tried to substantiate the Cl channel contributing to this mechanism, differential display using RT-PCR was performed to microdissected ascending loop of Henle with or without MD. Eight fragments were amplified only in MD(+) tubules, which were not reported previously, but the fragments of Cl channel was not involved. ClC family member were detected by degenerate primer sets, resulting the presence of ClC3 in these tubules.

Thus we next investigated the mechanism of gating of ClC3 influenced by intracellular Ca concentration, since Ca signal transduction can be seen when the tubulo-glomerular feedback is on. ClC3 possesses at least two levels of gating, high conductance and low conductance. When intracellular Ca is in steady state, both conductances were active, while the rise in Ca to 200 nM abolishes high conductance and the rise to 1000 nM abolishes both conductance levels. We conclude that ClC3 could be localized in MD, which have two conducting pores regulated by the rise in intracellular Ca.