

## 9633 腎髄質内層ヘンレの細い上行脚におけるクロライド輸送調節機序の解析

助成研究者：根東 義明(東北大学 医学部)  
 共同研究者：永野 千代子(東北大学 医学部)  
 師 保之(東北大学 医学部)  
 藤原 幾磨(東北大学 医学部)  
 高橋 美奈子(東北大学 医学部)  
 大沼 祥子(東北大学 医学部)

ヘンレの細い上行脚(以下ATL)は、腎髄質内層に位置し、受動的NaCl拡散をつかさどる。この部位のNaClの再吸収は、細胞膜上に著しく豊富なCl<sup>-</sup>チャンネルClC-K1と細胞間隙のナトリウム透過性による。Cl<sup>-</sup>チャンネルは、細胞内外のpHやCa<sup>++</sup>により調節される。細胞内のpHやCa<sup>++</sup>の変化がCl<sup>-</sup>透過性に与える影響について検討した。ゴールデンハムスターより左腎を摘出し、ATLを単離し、倒立顕微鏡上で微小灌流した。経上皮電位は管腔内のパーフュージョンピペットと浴液の3M KClのflowing boundary 電極間で測定し、浴液側のNaClの濃度を2分の1に低下させたときに生じるNaCl拡散電位と細胞内pHおよびCa<sup>++</sup>の変化を観察した。

amilorideとnigericinは、NaCl拡散電位を低下させなかった。nicardipineは有意に経上皮電位を上昇させ、BAPTA-AMは低下させた。NH<sub>4</sub>Cl負荷時、浴液のpHを5.8に低下させると、細胞内pHの低下と拡散電位の低下が起こったが、NH<sub>4</sub>Cl負荷では除去時に拡散電位の変化は見られなかった。nigericinおよびBAPTA-AM負荷時、拡散電位は変化せず、細胞内pHの低下と細胞内Ca<sup>++</sup>の上昇が観察された。BAPTA-AMは経上皮電位を低下させ、細胞内pHと細胞内Ca<sup>++</sup>も低下させた。浴液酸性化により、拡散電位は低下し、nigericin投与下では同様の浴液酸性化がより強い拡散電位の低下を起こした。BAPTA-AMにより細胞内Ca<sup>++</sup>濃度を低下させると、拡散電位は徐々に低下し、BAPTA-AM投与後には浴液酸性化による拡散電位の低下は著しく促進された。trifluoperazineおよびW-7の存在下では浴液酸性化による拡散電位の低下速度は促進され、Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン依存性キナーゼII抑制薬のKN62の存在下では、浴液酸性化による拡散電位の低下促進は観察されなかった。

以上より、浴液酸性化によるCl<sup>-</sup>透過性の抑制は細胞外からの作用で、細胞内Ca<sup>++</sup>の変動はCa<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体を介してCl<sup>-</sup>チャンネルの細胞外pH感受性を抑制すること、Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体のCl<sup>-</sup>チャンネルの細胞外pH感受性にたいする作用はCa<sup>++</sup>・カルモデュリン依存性キナーゼIIを介さないことが示唆された。



## 9 6 3 3 腎髄質内層ヘンレの細い上行脚におけるクロライド輸送調節機序の解析

助成研究者：根東 義明 (東北大学 医学部)  
 共同研究者：永野 千代子 (東北大学 医学部)  
 師 保之 (東北大学 医学部)  
 藤原 幾磨 (東北大学 医学部)  
 高橋 美奈子 (東北大学 医学部)  
 大沼 祥子 (東北大学 医学部)

## 【研究目的】

小児期の遺伝性腎疾患には、Bartter症候群を始めとしてヘンレの上行脚でのクロライド輸送の異常が病因と考えられるものが散見される。ヘンレの上行脚には太い部位と細い部位があり、そのイオン輸送機構が全く異なることは1987年以降、我々が詳細に検討してきた。以前より我々は単離尿細管微小灌流法を用いて、ヘンレの細い上行脚 (ATL) のクロライド再吸収の機構について詳細に研究し、クロライド再吸収の大部分が細胞間隙ではなく、細胞を通過しておこなわれていること [1, 2]、又、管腔側および血液側の両細胞膜上にスチルベン誘導体で抑制されるクロライドチャンネルが存在すること [3] を証明した。このことは、分子生物学的研究でも、この部位に特異的なスチルベン誘導体感受性クロライドチャンネル遺伝子がクローニングされ、裏付けられた。我々の研究により、このクロライドチャンネルが、細胞内pHや細胞内Ca活性によって調節されることが明らかとなった。最近我々は、この部位の尿細管での細胞内pHやCa調節機構を検討し、細胞内pHの調節が主に血液側細胞膜上にのみ存在するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送系により行われていること [4]、細胞内Ca<sup>++</sup>の調節が血液側細胞膜上にのみ存在するCaチャンネルとCaポンプのバランスにより行われていることを明らかにした [5]。さらに我々は、1981年ハムスター腎ATLで、抗利尿ホルモン (AVP) が細胞内cAMPを増加させるにもかかわらず、イオン輸送に何ら作用しないとの報告がある [6] ことに注目し、AVPのATLでの生理作用について検討を重ねた結果、実験条件の改善により、実はAVPがクロライドの受動的再吸収を選択的に促進する事を見出した [7]。しかし、今だにこれらの調節因子がどのような関連性をもってクロライド輸送を調節しているかについての知見は皆無である。そこで今回、細胞内のpHやCa<sup>++</sup>の変化がCl<sup>-</sup>透過性に与える影響について検討した。

## 【研究方法】

ゴールデンハムスターより左腎を摘出し、ATLを単離し、倒立顕微鏡上で微小灌流した。微小灌流の方法は、Burgらの原法 [8] をKondo and Fromterの方法 [9] によって改良したものをを用いて行った。経上皮電位は管腔内のパーフュージョンピペットと浴液の 3M KClの

flowing boundary 電極間で測定し、浴液側のNaClの濃度を2分の1に低下させたときに生じるNaCl拡散電位と細胞内pHおよびCa<sup>++</sup>の変化を観察した。灌流液の組成としては、管腔内外ともに、定常状態においては、NaCl 200mM、KCl 3mM、CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM、MgCl<sub>2</sub> 1mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM、glucose 5.5mM、l-alanine 5mM、urea 100mM、HEPES 10mM、pH 7.4の溶液を用い、経上皮NaCl拡散電位を測定する際には、Na<sup>+</sup>濃度を2分の1に低下させるため、必要量のNaClを同じ浸透圧に相当するureaで置き換えて用いた。Caイオンを除去する実験系では、CaCl<sub>2</sub>を同じ浸透圧に相当するNaClで置換した。

1) ハムスター腎より実体顕微鏡下に直径約20 $\mu$ mのヘンレの細い上行脚を単離し、尿細管内外をマイクロマニピュレーターを用いて各々灌流する。尿細管細胞内にCa感受性蛍光色素Fura-IIやpH感受性蛍光色素BCECFを取りこませ、顕微蛍光測光法により、細胞内カルシウムイオン活性および細胞内pHを経時的に測定する。すでにこの尿細管セグメントにおいて細胞内カルシウムイオン活性が測定可能である。既に我々は上述の如く、この部位の尿細管に血液側細胞膜のみにCa channelおよびCa pumpがそんざいするという実験結果をAm. J. Physiol. 誌に掲載し[5]、細胞内pHの測定についてもNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送系が血液側細胞膜に選択的に存在することをAm. J. Physiol. 誌上に報告した[4]。また、この間、生理的濃度(10-10M前後)の抗利尿ホルモン(AVP)が有為に細胞内Ca<sup>++</sup>濃度を上昇させることを見出し出しており[7]、V<sub>2</sub>-receptorがこの部位の尿細管に存在していることが示唆されているので、今回の研究では、細胞内CaやpHの調節機構との関連性を検討する。

2) 同様の尿細管単離灌流実験に経上皮電位の測定系を組み合わせ、クロライドの拡散電位を測定し、AVPのV<sub>2</sub>-receptorを介したクロライド輸送(再吸収)促進作用に与える細胞内CaとpHの調節機構の役割を検討する。すでに、細胞内Ca<sup>++</sup>のBAPTA-AMによるキレートが拡散電位を抑制するという事実を確認しており、その機序を明らかにする。また、細胞内pHについても、同様の検討を行う。

#### 【研究結果】

図1は、各種の輸送抑制薬などを用いて、ATLの細胞内環境を変化させた場合に起こる経上皮NaCl拡散電位の変化をまとめたものである。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体はATLでは血液側細胞膜にのみ存在することがこれまでの研究結果から明らかかなことから、まずこの輸送体を抑制することによって細胞内を酸性化させた場合のCl<sup>-</sup>輸送の調節機構が存在するかどうかを検討するため血液側に10-3M amilorideを投与した。また、同様にして、さらに強く細胞内を酸性化するために、血液側にK<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体であるnigericinを7micromols/lの濃度で投与して、細胞内K<sup>+</sup>が細胞外に放出される力を利用して、細胞内にH<sup>+</sup>イオンを流入させた場合のNaCl拡散電位の変化を観察した。これらの結果、amilorideは図1の最左側のグラフに示したように、NaCl拡散電位を低下させなかった。また、nigericinも、左より2つめのグラフの如く、単独では拡散電位を低下させた。

次に細胞内カルシウムイオンのCl<sup>-</sup>輸送に果たす役割について検討を加えた。まず、これまでの検討から、ATLの細胞膜では大半のカルシウムイオン透過性が血液側細胞膜上にあり、細胞外へのカルシウムのくみ出しはカルモデュリン依存性カルシウムポンプが、細胞内への透過性はnifedipine感受性カルシウムチャンネルがそれぞれ担っていることがわかっているため、これらの事実を利用して、まず、カルシウムチャンネルを抑制することにより、細胞内カルシウムイオン濃度を下げた場合のCl<sup>-</sup>透過性の変化を検討した。図1の左より3番目のグラフに示したように、nifedipineはわずかではあるが、有意に経上皮電位を上昇させた。そこで次に、細胞内カルシウムを更に強く低下させた場合の経上皮拡散電位の変化を観察するため、細胞内カルシウムのキレート剤であるBAPTA-AMを25 μmol/lの濃度でATLに投与し、細胞内に取り込ませた。すると、経上皮電位は、図5に代表的時間経過を示したように、BAPTA-AMの投与時間に依存して低下を示した。最終的には、図1に示したようにその変化は大きく、有為だった。

細胞内だけを酸性化あるいはアルカリ化した場合の経上皮NaCl拡散電位の変化を観察するため、さらにNH<sub>4</sub>Clのパルス投与を行った場合の電位変化を観察した。

図2に示したように、NH<sub>4</sub>Cl負荷時、浴液のpHを5.8に低下させると、細胞内pHの低下と拡散電位の低下が起こったが、NH<sub>4</sub>Cl負荷では除去時に拡散電位の変化は見られなかった。この事は、細胞内のpHの変化がそれ自体では経上皮NaCl輸送には影響を与えない事を示唆した。

ここで次に、nigericinおよびBAPTA-AM負荷時、拡散電位が変化しなかった事を重視し、実際にこれらの実験条件下で細胞内pHと細胞内Ca<sup>++</sup>がどう変化しているかを、それぞれ細胞内にイオン感受性蛍光色素であるBCECFとFura-IIをacetoxymethyl esterの形で投与し、細胞内にtrapされた色素の蛍光性を利用して測定を行った。

その結果、図3に示したように、細胞内pHはnigericinとBAPTA-AMのいずれを投与した場合にも低下し、細胞内Ca<sup>++</sup>はnigericinにより上昇、BAPTA-AMにより緩徐に低下することが観察された。

まとめると、nigericinは細胞内pHを低下させる一方で、Ca<sup>++</sup>はむしろ上昇させ、結果的にはそれ自体では経上皮電位を変化させなかったが、BAPTA-AMは経上皮電位を低下させ、細胞内pHと細胞内Ca<sup>++</sup>も低下させた。

次に浴液酸性化による拡散電位の低下に対する各種薬剤の影響を検討した。すると、図1に代表的実験経過を示したように、浴液酸性化により、拡散電位は低下したが、nigericin投与下では同様の浴液酸性化が、明らかに強い拡散電位の低下を起こした。

また、同様にして、浴液酸性化の作用とBAPTA-AMの作用の関連を検討してみたところ、図5に示したように、BAPTA-AMにより細胞内Ca<sup>++</sup>濃度を低下させると、拡散電位は徐々に低下し、BAPTA-AM投与後には浴液酸性化による拡散電位の低下は著しく促進された。

これらの実験結果は、Na<sup>+</sup>の単独の拡散電位の測定結果では、一切観察されなかったとい

う事実から(データは、今回の結果では提示せず)、強い細胞内のCaの低下がクロライドのpH感受性を促進してその透過性を著しく抑制させるということを示している。このことから、細胞内Caがクロライドの透過性に強く関与していることが示唆されたが、この細胞内のCaの作用が必ずしも直接イオン化Ca<sup>++</sup>を介していない様に思えるような矛盾した実験結果を示していることから、むしろCa<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体などが関与している可能性が高いと予測し、一連の実験を追加した。

図6に、代表的なCa<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体の抑制薬であるtrifluoperazineおよびW-7を投与した場合の浴液酸性化による拡散電位の抑制による、その低下速度の変化を示した。

結果からも明らかなように、低濃度のtrifluoperazineおよびW-7の存在下では浴液酸性化による拡散電位の低下速度は促進された。

そこで、近年Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体の二次的な作用のmediatorと考えられているカルモデュリン依存性キナーゼIIが、この調節に関わっているかどうかを検討するため、カルモデュリン依存性キナーゼIIの特異的抑制薬として知られるKN62を浴液に投与して抑制した上で、Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体抑制薬と同様に拡散電位の低下速度の促進が観察されるかどうかを検討した。

図7に見られるように、Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン依存性キナーゼII抑制薬のKN62の存在下では、浴液酸性化による拡散電位の低下促進は観察されず、このクロライドのpH感受性の調節機構にはカルモデュリン依存性キナーゼIIは関与していないことが示唆された。

### 【考察】

以上より、浴液酸性化によるCl<sup>-</sup>透過性の抑制は細胞外からの作用で、細胞内Ca<sup>++</sup>の変動はCa<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体を介してCl<sup>-</sup>チャンネルの細胞外pH感受性を抑制すること、Ca<sup>++</sup>・カルモデュリン複合体のCl<sup>-</sup>チャンネルの細胞外pH感受性にたいする作用はCa<sup>++</sup>・カルモデュリン依存性キナーゼIIを介さないことが示唆された。

ヘンレの細い上行脚でのクロライド輸送の調節は、現在までのところ、我々がこの間発見してきたpH、Ca<sup>++</sup>、抗利尿ホルモンによる機構のほかにも、脱水などが、その本体であるクロライドチャンネルClC-K1のmRNA発現量を増加させる事が知られている。今回解析を行ったCa<sup>++</sup>によるcalmodulinを介した間接的調節機構が、他の抗利尿ホルモンや脱水などによる促進作用とどのような関係に有るのかは、今回の研究からは知り得なかった。この点に関しては、今後更に検討を進める必要がある。

今回の研究結果を加え、これまで明らかとなってきた各種イオンのATLにおける輸送機構を、簡便に図8に提示した。

今後の研究により、これらの調節機構の詳細が更に明らかになるものと思われる。

### 【今後の課題】

今回の検討では、Cl<sup>-</sup>イオンの透過性をアイソトープを用いて測定していないため、これらの結論をより明確化するために、アイソトープを用いた実験を今後実施していきたい。さらに、細胞外pHによるCl<sup>-</sup>イオン輸送体の抑制作用が細胞内Ca<sup>++</sup>とカルモデュリンにより調節を受けるといふ機序の詳細は、現時点では不明であり、さらに詳細な検討をおこなうことにより、この作用がいずれもCl<sup>-</sup>輸送体に対する直接的なものなのか、あるいはカルモデュリンによる間接的な作用を観察しているのかを更に詳細に検討する必要がある。

【文献】

1. Yoshitomi K, Kondo Y, Imai M: Evidence for conductive Cl<sup>-</sup> pathways across the cell membranes of the thin ascending limb of Henle's loop. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 866-871.
2. Takahashi N, Kondo Y, Fujiwara I, Ito O, Igarashi Y, Abe K: Characterization of Na<sup>+</sup> transport across the cell membranes of the ascending thin limb of Henle's loop. *Kidney Int.* 1995; 47: 789-794.
3. Kondo Y, Yoshitomi K, Imai M: Effects of anion transport inhibitors and ion substitution Cl<sup>-</sup> transport in TAL of Henle's loop. *Am. J. Physiol.* 1987; 253: F1206-F1215.
4. Fujiwara I, Kondo Y, Igarashi Y, et al.: Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in basolateral membrane of hamster ascending thin limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: F410-415.
5. Takahashi N, Kondo Y, Ito O, Igarashi Y, Omata K, Abe K: Cytosolic Ca<sup>2+</sup> dynamics in hamster ascending thin limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: F1148-1153.
6. Imai M, Kusano E: Effects of arginine vasopressin on the ascending thin limb of Henle's loop of hamsters. *Am. J. Physiol.* 1982; 243: F167-F172.
7. Takahashi N, Kondo Y, Ito O, Igarashi Y, Omata K, Abe K: Vasopressin stimulates Cl<sup>-</sup> transport in ascending thin limb of Henle's loop in hamster. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1623-1627.
8. Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J: Preparation and study of fragments of single rabbit nephron. *Am. J. Physiol.* 1966; 210: 1293-1298.
9. Kondo Y, Fromter E: Axial heterogeneity of sodium-bicarbonate cotransport in proximal straight tubule of rabbit kidney. *Pflügers Arch.* 1987; 410: 481-486.



図1 各種薬剤が経上皮NaCl拡散電位に与える作用

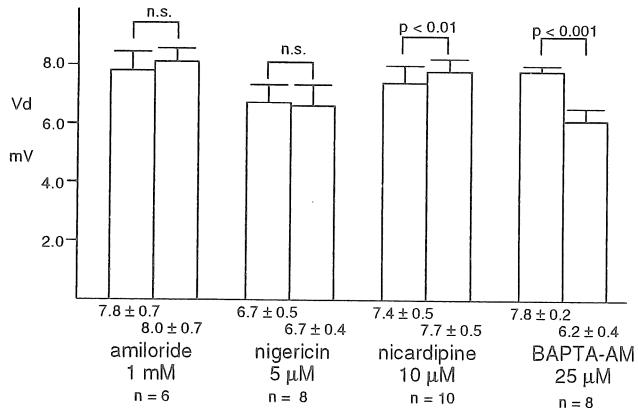


図2 NH<sub>4</sub>Cl負荷時の細胞内pHおよび経上皮NaCl拡散電位の変化

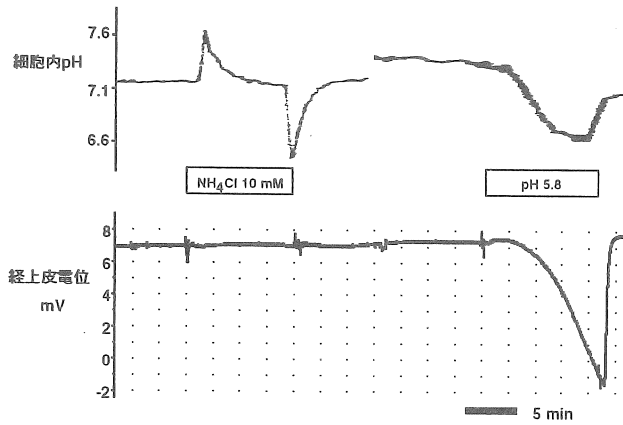


図3 NH<sub>4</sub>Cl負荷時の細胞内pHおよび経上皮NaCl拡散電位の変化

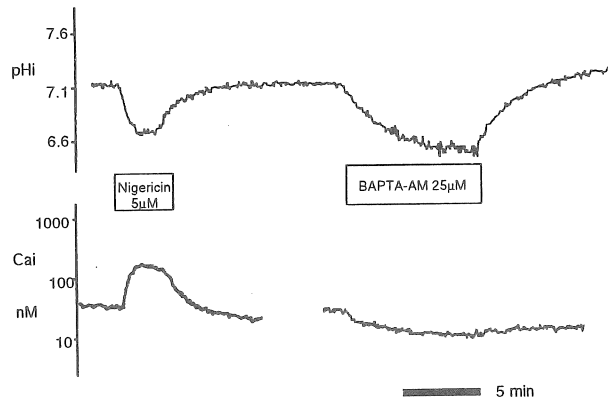


図4 浴液酸性化によるVd抑制に及ぼすnigericinの影響

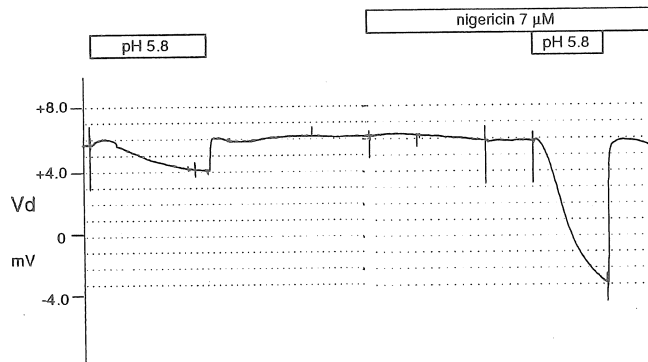


図5 浴液酸性化のVd抑制作用に対するBAPTA-AMの影響

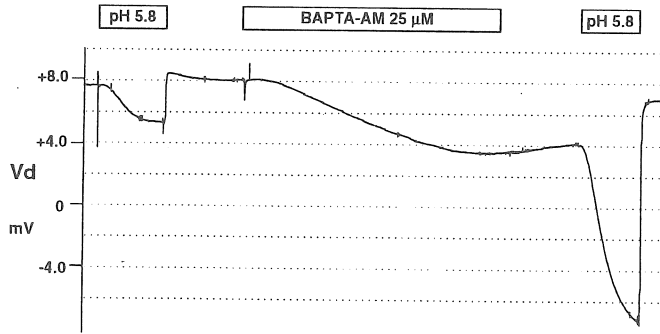


図6 Calmodulin系がpH 5.8による経上皮NaCl拡散電位の低下速度に与える作用

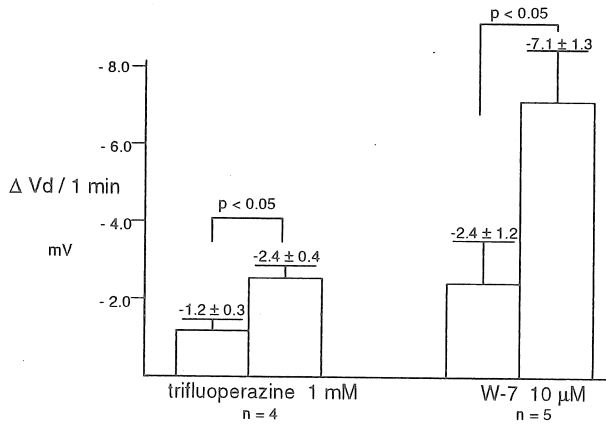


図7 浴液酸性化によるVd抑制へのKN62の作用

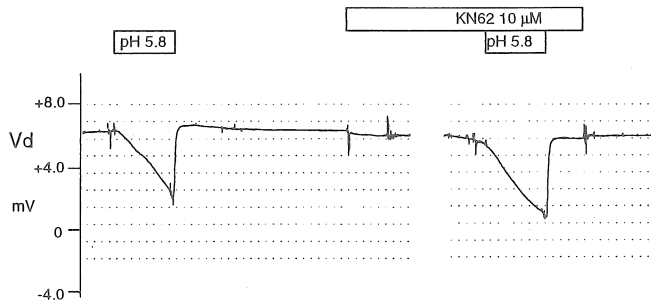
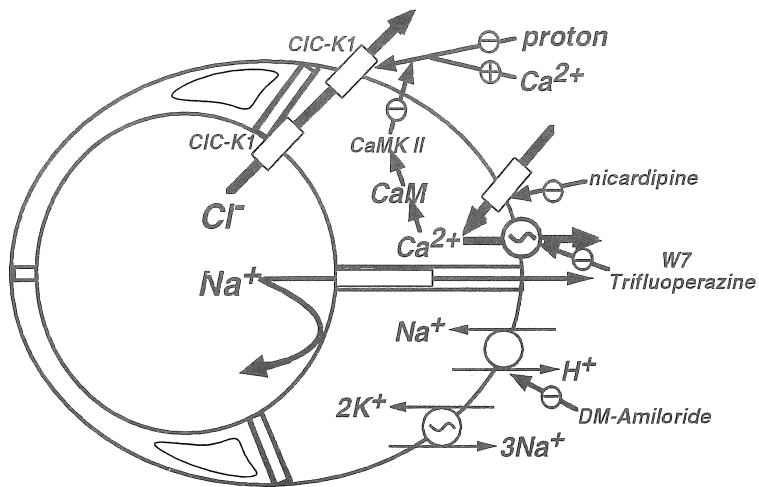


図8 ATLのイオン輸送機構の概要



## Analysis on the regulatory mechanism of chloride transport in the ascending thin limb of Henle's loop

Yoshiaki Kondo, Chiyoko N. Inoue, Yasuyuki Moro, Ikuma Fujiwara, Minako Takahashi, Shoko Onuma

Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine

### Summary

To elucidate the regulatory mechanism of  $\text{Cl}^-$  transport in the ascending thin limb (ATL) of Henle's loop, a series of experiments were conducted in the *in vitro* microperfused ATL from hamster kidney.

The effects of various agents on transepithelial diffusion potential of  $\text{NaCl}$  ( $V_d$ ) were examined in the *in vitro* microperfused ATLs. One mmol/l amiloride and 7  $\mu\text{mol/l}$  nigericin did not alter  $V_d$ . 10  $\mu\text{mol/l}$  nicardipine slightly but significantly increased  $V_d$ . Twenty-five  $\mu\text{mol/l}$  BAPTA/AM largely decreased  $V_d$ . While acidification of the ambient solution to pH 5.8 induced decrease in  $V_d$ , the same magnitude of intracellular acidification by ambient  $\text{NH}_4\text{Cl}$  removal did not alter  $V_d$ .

Nigericin and BAPTA-AM both exaggerated the inhibitory response of  $V_d$  to ambient acidification. Calmodulin inhibitors such as trifluoperazine and W-7 also increased the magnitude of the inhibitory effect of ambient acidification on  $V_d$ . KN62, the calmodulin-dependent kinase II inhibitor, did not alter the inhibitory effect of ambient acidification on  $V_d$ .

These data strongly suggest that intracellular calcium regulates pH sensitivity of  $\text{Cl}^-$  channels via calmodulin-dependent process. Calmodulin-dependent kinase II is not involved in this regulatory process.