

助成番号 9920

発生工学的アプローチによる腎輸送体蛋白異常の水電解質代謝異常への
関与に関する検討

CLC-K1 クロライドチャネルの腎髄質対向流系における役割

助成研究者：内田 信一（東京医科歯科大学 医学部 第二内科）

共同研究者：佐々木 成（東京医科歯科大学 医学部 第二内科）

CLC-K1 は腎臓特異的なクロライドチャネルであり、腎臓内ではヘンレの細い上行脚に存在し、経上皮クロライド輸送に関わると考えられてきた。我々は、最近 CLC-K1 ノックアウトマウスの作成に成功し、CLC-K1 がヘンレの細い上行脚の高いクロライド透過性を担っていることを証明するとともに、CLC-K1 ノックアウトマウスが腎性尿崩症を呈することを報告してきた。今回、CLC-K1 ノックアウトマウスが尿濃縮障害を呈するメカニズムを解明するために、CLC-K1 ノックアウトマウスの腎機能を詳細に検討した。

クリアランス試験では、CLC-K1 ノックアウトマウスの多尿は、水利尿であることが判明した。ヘンレの細い上行脚でのクロライド輸送の障害により、クロライド利尿がおきなかったことは、ヘンレの太い上行脚のクロライドチャネルである CLC-K2 の異常でバークマン症候群がおきたことと異なっており、腎臓内で相同性の高い2つのクロライドチャネルがその存在部位の違いにより果たす役割が異なることを表していた。乳頭部での浸透圧物質含量は、CLC-K1 ノックアウトマウスで有意に減少しており、脱水状況下でも上昇しなかった。浸透圧物質のうち、クロライドのみならずナトリウム、尿素の蓄積も CLC-K1 ノックアウトマウスでは阻害されており、このことはクロライドチャネルのみのノックアウトにより乳頭部で浸透圧物質全体の蓄積が阻害されていることを示しており、乳頭部の高浸透圧維持には、種々の輸送体が関与して正しく対向流系を構成することが必要であると示された。

1

助成番号 9920

発生工学的アプローチによる腎輸送体蛋白異常の水電解質代謝異常への 関与に関する検討

CLC-K1 クロライドチャネルの腎髄質対向流系における役割

助成研究者：内田 信一 (東京医科歯科大学 医学部 第二内科)

共同研究者：佐々木 成 (東京医科歯科大学 医学部 第二内科)

研究目的

CLC-K1 は腎臓特異的なクロライドチャネルであり、腎臓内ではヘンレの細い上行脚に存在し、経上皮クロライド輸送に関わると考えられてきた。我々は、最近 CLC-K1 ノックアウトマウスの作成に成功し、CLC-K1 がヘンレの細い上行脚の高いクロライド透過性を担っていることを証明するとともに、CLC-K1 ノックアウトマウスが腎性尿崩症を呈することを報告してきた。今回、CLC-K1 ノックアウトマウスが尿濃縮障害を呈するメカニズムを解明するために、CLC-K1 ノックアウトマウスの腎機能を詳細に検討した。

研究方法

- ①クリアランススタディーを行い、多尿が水利尿によるものか、クロライド利尿によるものかを検討した。麻酔下では血圧の維持が特にノックアウトマウスで難しく、4時間の間の、無麻酔下での採尿によりクリアランススタディーとした。
- ②血漿アルドステロン、尿中バゾプレシンを測定し、CLC-K1 ノックアウトの全身の体液バランスに与える影響を探った。
- ③腎乳頭部の組織浸透圧および溶質含量を測定し、CLC-K1 ノックアウトにより腎臓乳頭部での浸透圧物質蓄積の障害があるかを検討した。乳頭部はマウス4匹より集めたものを、水でホモジネイトし、上清のナトリウム、クロライド、カリウム、尿素を測定した。
- ④組織での浸透圧によりその発現が制御されているオスモライト関連遺伝子の発現をノーザンブロットにて検討し、③の結果を検証した。

以上の検討は、同一の親から生まれた兄弟のマウス (野生型、ヘテロ、ノックアウト) で行う実験を一つの単位とし、最低3回の実験を行った。

研究結果

① 図1に示すごとく、浸透圧クリアランスはCLC-K1 ノックアウトマウスでも野生型と変化無く、CLC-K1 ノックアウトマウスでみられた多尿は水利尿であり、ヘンレの細い上行脚のクロライド輸送を阻害しても、クロライドクリアランスには影響しないことが明らかとなった。FE Na は24時間脱水にしたCLC-K1 ノックアウトマウスで著明に低下しており、CLC-K1 ノックアウトマウスが著明な細胞外液低下をきたしていることが示された。

② 図2に示すごとく血漿アルドステロンは、脱水にしたCLC-K1 ノックアウトマウスで上昇しており、①の結果を裏付けていた。尿中バゾプレシンはCLC-K1 ノックアウトマウスで水を飲める状態にしておいて、正常、ヘテロマウスに比して高く、CLC-K1 ノックアウトマウスが絶えず脱水の危機に瀕している事が推定された。

③ 図3に示すごとく浸透圧物質含量全体は、CLC-K1 ノックアウトマウスで野生型に比して低下しており、脱水にしてもその蓄積の上昇は観察されなかった。主要な浸透圧物質の内、クロライド輸送の障害で、NaCl の蓄積のみならず、尿素の蓄積も同じ程度に障害されていた。

④ アルドース還元酵素(AR)は腎臓内では乳頭部にのみ存在し、その発現は組織浸透圧の制御を受けている。CLC-K1 ノックアウトマウスでは、図4に示すごとくAR発現は正常時でも低下しており、脱水条件下でも野生型と異なりその発現増強はみられなかった。髄質外層を主な発現部位とするナトリウム依存性のオスモライト輸送体遺伝子〔ミオイノシトール輸送体(SMIT)、ベタイン輸送体(BET)〕は、その発現がCLC-K1 ノックアウトマウスでも脱水時に増強し、このことはCLC-K1 ノックアウトマウスにおける組織浸透圧低下は乳頭部に限られていることが明らかとなった。

考察

CLC-K1 ノックアウトマウスが腎性尿崩症を呈することは、ヘンレの細い上行脚が対向流系の重要な要素の一つであることから、対向流系の破綻による髄質の高浸透圧維持機構の破綻によるものであることは推定されていたが、実証するデータは得られていなかった。本研究は、クリアランススタディー、乳頭部の浸透圧物質の直接測定により、この点を実証することができた。尿素の蓄積の低下のメカニズムは明らかでないが、逆にそのこと自体が、乳頭部での各々の浸透圧物質の蓄積が、単に各々の蓄積に司る輸送体が別々に働いているのではなく、対向流系という一つのシステムの一員として働いていることを示していた。各々の溶質の蓄積がエネルギー依存性のポンプのような輸送系に依存しているのなら、クロライドチャネルの異常で尿素の蓄積まで障害されることはないはずであり、Kokko, Rector により提唱されてきた *passive model* による対向流系というシステムが *in vivo* で働いていることの証明を、今回の研究で初めて成し遂げたといえる。

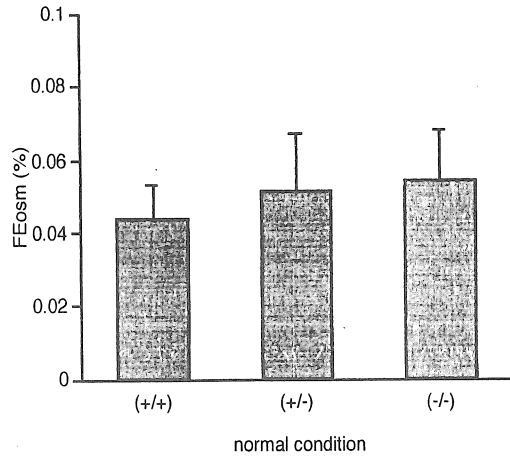
今後の課題

集合管での水透過性、尿素の輸送能が、CLC-K1 クロライドチャネルのノックアウトで影響を受けていないかを、生理学的手法により確認する必要がある。尿素輸送体は、種々のアイソフォームを有しており、集合管には UT-A1 というアイソフォームが存在していると言われているが、CLC-K1 ノックアウトマウスではその発現が野生型に比して低下している。しかしながら、免疫染色では集合管に野生型と変わらない染色を示している。このことは、尿素輸送体が複雑な制御を受けて、状況に応じて、アイソフォームが変化している可能性を示唆している。将来的には、この尿素輸送体の制御の実体を明らかにする一方、集合管の主要な尿素輸送体のノックアウトで腎性尿崩症が引き起こされるかを明らかにしたい。

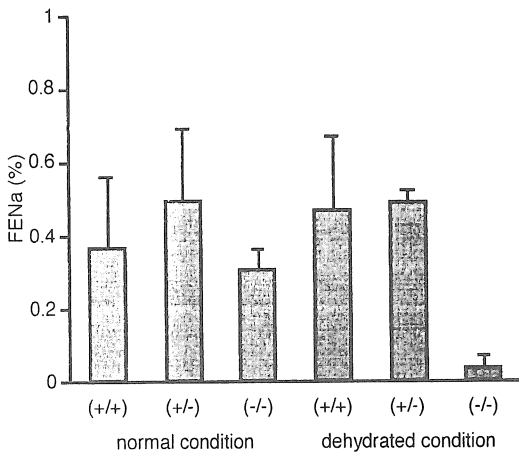
文献

1. Rai, T., S. Uchida, S. Sasaki, and F. Marumo. 1999 Isolation and characterization of kidney-specific CLC-K2 chloride channel gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 261:432-438.
2. Yoshikawa, M., S. Uchida, A. Yamauchi, A. Miyai, Y. Tanaka, S. Sasaki, and F. Marumo. 1999 Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am. J. Physiol.* 276:F552-F558.
3. Miyazaki, H., S. Uchida, Y. Takei, T. Hirano, F. Marumo, and S. Sasaki. 1999. Molecular cloning of CLC chloride channels in *Oreochromis mossambicus* and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255:175-181.
4. Matsumura, Y., S. Uchida, Y. Kondo, H. Miyazaki, S.B.H. Ko, A. Hayama, T. Morimoto, W. Liu, M. Arisawa, S. Sasaki, and F. Marumo. 1999. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genet.* 21:95-98.
5. Uchida, S., T. Rai, H. Yatsushige, Y. Matsumura, M. Kawasaki, S. Sasaki, and F. Marumo. 1998. Isolation and characterization of kidney-specific CLC-K1 chloride channel gene promoter. *Am. J. Physiol.* 274:F602-F610.
6. Morimoto, T., S. Uchida, H. Sakamoto, Y. Kondo, H. Hanamizu, M. Fukui, Y. Tomino, N. Nagano, S. Sasaki, and F. Marumo. 1997. Mutations in CLCN5 chloride channel in Japanese patients with low molecular weight proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:811-818.
7. Saito-Ohara, F., S. Uchida, Y. Takeuchi, S. Sasaki, A. Hayashi, F. Marumo, and T. Ikeuchi. 1996. Assignment of the genes encoding the human chloride channels, CLCNKA and CLCNKB, to 1p36 and of CLCN3 to 4q32-q33 by in situ hybridization. *Genomics* 36:372-374.
8. Sakamoto, H., M. Kawasaki, S. Uchida, S. Sasaki, and F. Marumo. 1996. Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl⁻ channels. *J. Biol. Chem.* 271:10210-10216.
9. Uchida, S., S. Sasaki, and F. Marumo. 1996. Functional regulation of ClC-K1 chloride channel by protein kinase A. In *Neurohypophysis: recent progress of vasopressin and oxytocin research*. T. Saito, K. Kurokawa, and S. Yoshida, editors. Elsevier, Amsterdam. 545-550.
10. Kawasaki, M., M. Suzuki, S. Uchida, S. Sasaki, and F. Marumo. 1995. Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* 14:1285-1291.
11. Takeuchi, Y., S. Uchida, F. Marumo, and S. Sasaki. 1995. Cloning, tissue distribution, and intrarenal localization of ClC chloride channels in human kidney. *Kidney Int.* 48:1497-1503.
12. Uchida, S., S. Sasaki, K. Nitta, K. Uchida, S. Horita, H. Nihei, and F. Marumo. 1995. Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J. Clin. Invest.* 95:104-113

a



b



c

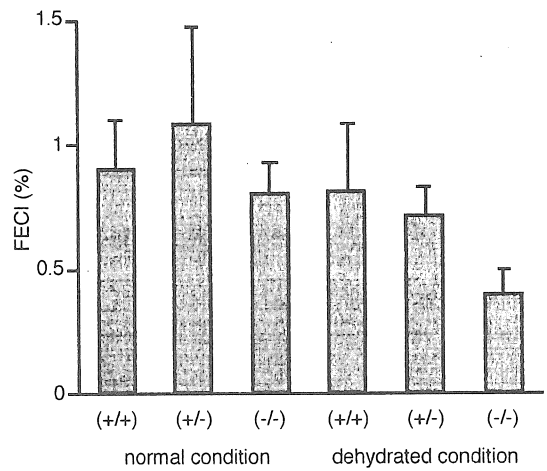


Figure 1

Fractional excretions of osmolar substances (a), sodium (b), and chloride (c) in *Clcnk1*^{+/+}, *Clcnk1*^{+/-}, and *Clcnk1*^{-/-} mice.

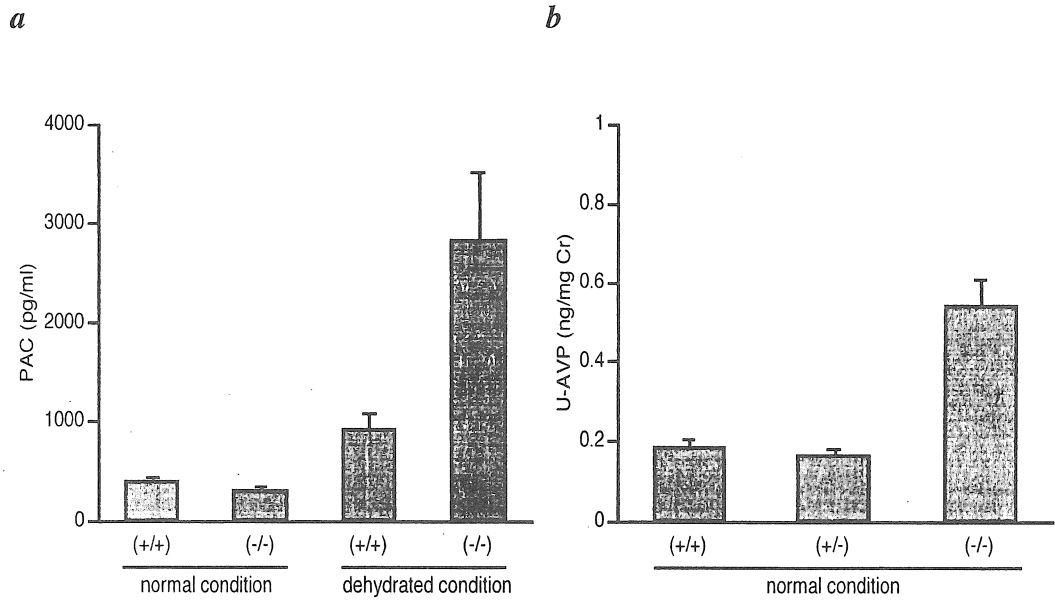


Figure 2

Plasma aldosterone (a) and urinary vasopressin (b) levels in *Clcnk1*^{+/+}, *Clcnk1*^{+/-}, and *Clcnk1*^{-/-} mice.

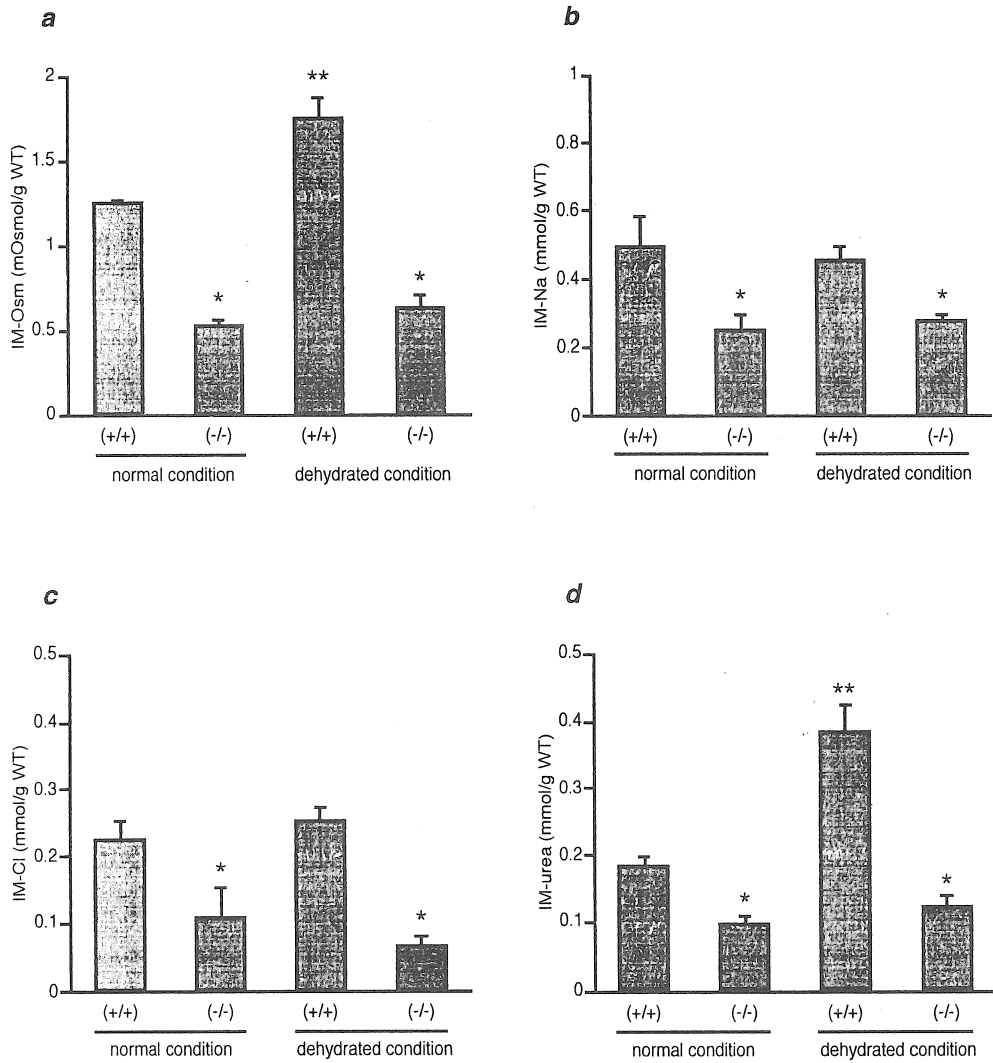


Figure 3

Inner medullary contents of osmolar substances (a), sodium (b), chloride (c), and urea (d). * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ with normal (+/+).

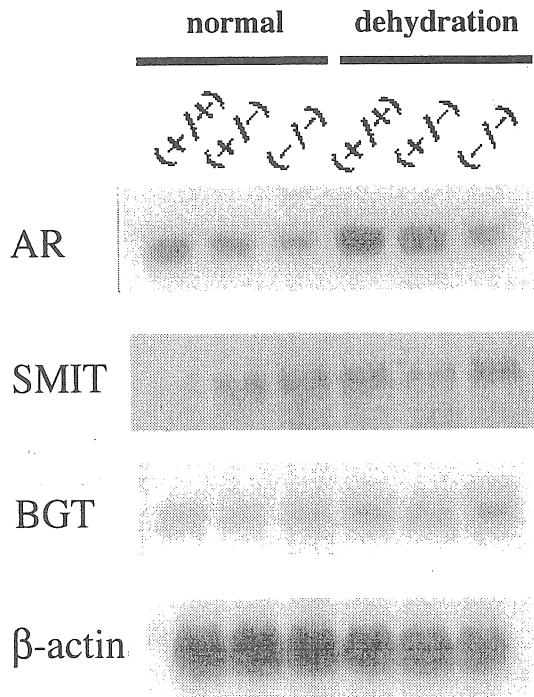


Figure 4

Northern blot of aldose reductase (AR), sodium/myo-inositol cotransporter (SMIT), betaine/GABA transporter (BGT), and β -actin in *Clcnk1*+/+, *Clcnk1*+/-, and *Clcnk1*-/- mice kidney.

**Analysis of channelopathy in the disorders of water and electrolyte metabolism
using transgenic animals**

Role of CLC-K1 chloride channel in the counter current systems of mice kidney

Shinichi Uchida and Sei Sasaki

Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University,
School of Medicine

CLC-K1 is a kidney-specific chloride channel exclusively present in the plasma membrane of the thin ascending limb of Henle's loop (tAL) in the inner medulla. Recently, we generated the *Clcnk1*^{-/-} mice by target gene disruption and found that the *Clcnk1*^{-/-} mice showed nephrogenic diabetes insipidus (NDI). To investigate the pathogenesis of impaired urinary concentrating ability, we analyzed renal functions of *Clcnk1*^{-/-} mice in details. The osmolar clearance/creatinine clearance ratio was not significantly different between *Clcnk1*^{+/-} and *Clcnk1*^{+/+} mice. Fractional excretion of sodium, chloride, and urea were also not significantly affected in *Clcnk1*^{-/-} mice compared with those of *Clcnk1*^{+/+} mice. These results indicate that while the loss of chloride transport in the tAL does not result in a chloride diuresis, the polyuria observed in *Clcnk1*^{-/-} mice was water diuresis and not osmotic diuresis. The papillary osmolarity in *Clcnk1*^{-/-} mice was significantly lower than that in *Clcnk1*^{+/+} mice under a hydrated condition, and it did not increase even after a 24-hour water deprivation. Sodium and chloride contents in the inner medulla in *Clcnk1*^{-/-} mice were at about half the levels observed in *Clcnk1*^{+/+} mice. Furthermore, the accumulation of urea was also impaired in *Clcnk1*^{-/-} mice, suggesting that the overall countercurrent system was impaired by a defect of its single component, chloride transport in the tAL. We concluded that NDI in the *Clcnk1*^{-/-} mice resulted from an impairment in the generation of inner medullary hypertonicity by a dysfunction of the countercurrent systems.