

## 緻密斑に特異的に局在するクロライドチャンネルの分子生物学的特性

坂本尚登<sup>1)</sup>、松尾孝俊<sup>1)</sup>、内藤一郎<sup>2)</sup>、長場 泰<sup>1)</sup>、清水健史<sup>1)</sup>、  
北里大学医学部内科学 IV<sup>1)</sup>、重井医学研究所<sup>2)</sup>

腎臓における尿細管-糸球体フィードバック機構は、生体の体液の恒常性や血圧の維持に重要な役割を果たしている。従来、このフィードバック機構の制御には、遠位尿細管の緻密斑細胞に局在するクロライドチャンネルの関与が示唆されているが、分子レベルでの細胞内調節機構については解明されておらず、遺伝子クローニングに基づく分子構造と機能連関を明らかにすることは重要な課題である。近年、申請者らは、C1Cクロライドチャンネルファミリーにサブファミリーを形成するC1C-5、C1C-4 および C1C-3 のクローニングに携り、各々のチャンネルに対する特異的なモノクロナール抗体 (MAb) の作成を行ってきた。その際、C1Cクロライドチャンネルの第1膜貫通部位と第2膜貫通部位の間の細胞外ループ領域を認識する抗ペプチド抗体の作成過程において、傍糸球体装置を構成する、緻密斑細胞に限局して染色性を示す抗体を見出した。そこで、この抗体のクローニングを行い、抗体が特異的に認識する標的蛋白の遺伝子の同定を、発現クローニング法で検討した。

モノクロナール抗体は、共同研究者、内藤の所属する重井医学研究所で独自に開発されたラットリンパ節法で調整した。抗体価をELISAで評価して最終的に得られた抗体をMD12 MAbと呼称した。同抗体を用いたマウス腎臓の免疫組織染色では、糸球体の血管極付近に隣接する尿細管に限局して染色性を認めた。なお、共焦点レーザー顕微鏡による細胞・細胞内局在の解析から、細胞質内と形質膜の両方に発現を示唆する所見が得られた。発現細胞の同定に際しては、傍糸球体装置を構成するレニン産生細胞や緻密斑細胞との関連性について二重免疫染色を試みているが、緻密斑細胞以外に血管細胞(輸入細動脈)へ局在する可能性が残っている。一方、マウス腎臓で行なったウェスタンブロット解析から、標的蛋白の分子量は約50 kDaと推察された。

次に、標的蛋白の遺伝子をクローニングするために、MD12 MAbで染色されない培養細胞(COS-7)を用いて、発現クローニングを試みた。真核細胞発現ベクターで構築した腎臓のcDNAライブラリーをCOS-7細胞へ形質導入し、抗体に結合する蛋白を発現した細胞を、マグネットビーズ法で選別してプラスミドの抽出を行い、最終的に遺伝子のクローニングを目指している。あいにく、この1年間で標的蛋白の遺伝子同定には到っていない。今後、現在進行中の発現クローニングを継続して、遺伝子のフルクローンを同定し、機能評価の実験に繋げたい。遺伝子同定により、ノックアウトやノックダウンモデルの作成が可能となり、尿細管-糸球体フィードバック機構の分子機構の解明、さらには、生体の血圧調節に関わる可能性の有無を中心に検討する必要性を感じている。



## 6

助成番号 0237

## 緻密斑に特異的に局在するクロライドチャネルの分子生物学的特性

坂本尚登 (北里大学医学部内科学 IV)  
松尾孝俊 (北里大学大学院医学研究科)  
内藤一郎 (重井医学研究所・超微形態部門)  
長場 泰 (北里大学医学部内科学 IV)  
清水健史 (北里大学大学院医学研究科)

## 研究目的

腎臓における尿細管-糸球体フィードバック機構 (tubuloglomerular feedback; TGF) は、生体の体液の恒常性や血圧の維持に重要な役割を果たしている。従来、このフィードバック機構の制御には、遠位尿細管の緻密斑細胞に局在するクロライドチャネルの関与が示唆されているが、分子レベルでの細胞内調節機構については解明されておらず、遺伝子クローニングに基づく分子構造と機能連関を明らかにすることは重要な課題である。近年、申請者らは、ClCクロライドチャネルファミリーにサブファミリーを形成するClC-5、ClC-4およびClC-3のクローニングに携り、各々のチャネルに対する特異的なモノクロナール抗体の作成を行っている<sup>1-5)</sup>。その際、ClCクロライドチャネルの第1膜貫通部位 (D1) と第2膜貫通部位 (D2) の間の細胞外ループ領域を認識する抗ペプチド抗体を作成している過程で、糸球体の血管極付近に隣接する一部の遠位尿細管細胞のみに限局して染色性を示す抗体を見出した。そこで、抗体が特異的に認識する標的蛋白がクロライドチャネルである可能性を想定し、まず抗体のクローン化を試みる。次に、発現クローニング法により腎臓のcDNAライブラリーから、標的蛋白の遺伝子をクローニングして、その生理学的意義を分子生物学的に検討する。

## 研究方法

## 1. モノクロナール抗体の作成

ClC-5のN末端に位置する、D1とD2の間の細胞外ループ領域に位置する18アミノ酸残基のペプチドを合成し、N末端をアセチル化して抗ペプチド・モノクロナール抗体をラットリンパ節法で調整した<sup>6)</sup>。抗体価は、ハイブリドーマの培養上清をELISAで評価して、免疫組織染色で腎臓の染色性をスクリーニングした。

## 2. 免疫組織学的検討

マウスの腎臓をPLP固定液で灌流固定し、作成した抗体の染色性を蛍光免疫染色法によりスクリーニングした。なお、免疫染色された細胞については、共焦点レーザー顕微鏡で細胞内局在部位を含めて解析した。

### 3. 抗体と特異的に反応して、腎臓に発現する蛋白の解析

抗ラット IgG をコーティングしたマグネットビーズに、作成したラットモノクローナル抗体 (IgG) を結合させ、マウス腎臓から超遠心法で調整した蛋白と反応させた後、特異的に結合する蛋白を免疫沈降法で分離して、ウェスタンブロットで解析した。

### 4. 発現クローニング

まず、作成した抗体が認識する蛋白をコードする遺伝子をクローニングするために、遺伝子導入をする培養細胞のスクリーニングを行った。LLCPK1、CHO-K1、COS-7 および HeLa 細胞の野生型について、免疫組織染色とウェスタンブロットを行い、抗体が認識する蛋白が発現していない細胞を選択した。

次に、選択した培養細胞へ、真核細胞発現ベクター (pCMV・SPORT2) で構築したマウス腎の cDNA ライブラリーを、リポフェクション法で遺伝子導入した。さらに、遺伝子導入した培養細胞から、抗体と反応する蛋白を発現した細胞をマグネットビーズ法で選択した。そこで、選択回収した細胞からプラスミドを抽出して大腸菌を形質転換した。シブ選択の後、プラスミドを単離してシークエンスを行い、標的蛋白 (クロライドチャネル) をコードする cDNA のクローニングを試みた。

## 研究結果

### 1. モノクローナル抗体の特性と抗体認識蛋白の腎臓内局在

作成したモノクローナル抗体で、傍糸球体 (JG) 装置領域に局限して染色性を示す抗体を MD12 と呼称した。この抗体で行った免疫組織所見を図 1 に示す。染色部位は腎臓の皮質部位に局限し (図 1 A)、高倍で示す如く、糸球体の血管極付近に隣接する一部の尿細管細胞に限られる (図 1 B)。なお、細胞内局在については、形質膜と細胞質内の両方に染色性を認めた (図 1 C)。さらに、局在細胞を同定するために、レニンや Cyclooxygenase-2 (COX-2) と二重免疫染色を試みたが、両者の 1 次抗体と 2 次抗体の交叉反応や染色性の弱さから正確な同定は出来なかった。緻密斑に局在する他の標識蛋白に対する抗体を用いてさらに検討すると共に、輸入細動脈への局在の可能性についても検討中である。

なお、ヒトの腎臓における局在部位を同定する目的で、腎生検で得られた迅速凍結切片を用いて免疫組織染色を試みたが、優れた染色部位は得られなかった。

### 2. MD12 抗体と結合する蛋白の特性

MD12 抗体を用いた免疫沈降法で、マウスの腎臓に発現する蛋白の特性について検討した。ウェスタンブロットの結果から、この蛋白は分子量約 50 KDa と推察された (図 2)。

### 3. 発現クローニング

マウス腎では、MD12 抗体で認識される蛋白が確認されたのに対して、ヒト腎の免疫組織所見では染色性を認めなかったことから、遺伝子導入する腎臓の cDNA ライブラリーはマウス腎から作成したものを選択した。

また、遺伝子を導入する培養細胞の選択に際しては、免疫染色あるいは

ウェスタンブロットによる解析で、LLCPK1 細胞と CHO - K1 細胞には野生型細胞にすでに MD12 抗体と交叉反応を示す蛋白が発現している可能性を否定できなかったため、COS-7 細胞を選択した (図 3)。

現在、遺伝子導入した COS-7 細胞を用いて標的遺伝子のクローニングを行っている最中であるが、MD12 抗体に染色性を示す細胞から遺伝子のフルクローンの同定には到っていない。

## 考察

腎臓における尿細管一糸球体フィードバック機構は、遠位尿細管細胞の中で特殊に分化した緻密斑細胞が尿細管腔内のクロライドイオン濃度変化を感知して、その情報を輸入細胞脈に局在するレニン産生細胞まで伝達し、レニン・アンジオテンシン系を介して血管抵抗を制御することにより、体液の恒常性や血圧の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。従って、このフィードバック機構の異常は、高血圧発症の起点として関与する可能性も示唆されている。しかしながら、尿細管腔内のクロライド濃度変化に伴う緻密斑細胞のクロライドイオン輸送の分子機構や輸入細胞脈におけるレニン分泌の制御機構については詳細不明である。一方、このフィードバック機構が、NKCC 共輸送体の抑制剤であるフロセミドの投与により破綻することから、緻密斑細胞の管腔側膜に NKCC 共輸送体が局在する可能性が報告されている。しかし、同細胞の血管側膜でのクロライドイオン輸送機構や細胞内でのクロライドイオンの役割については良く解っていない。

今回、われわれが、JG 装置領域のみを認識する MD12 抗体を見出すきっかけとなった ClC1 クロライドチャンネルは、9つの ClC クロライドチャンネルからなり、細胞膜に局在するチャンネルと細胞内小器官に局在するチャンネルに大別される。抗体作成に用いた抗原ペプチドは、ClC チャンネルの D1-D2 細胞外ループ領域に相当する。したがって、抗体に特異的に反応する標的蛋白が ClC クロライドチャンネルのホモログと想定すると、緻密斑細胞の血管側膜や細胞内に新たなクロライドチャンネルが局在する可能性を検討する根拠となった。

ただし、われわれが作成した MD12 抗体で認識される蛋白の局在部位は (図 1)、これまでに報告されている NKCC のネフロン局在特性や ClC クロライドチャンネルのひとつである ClC-5 の尿細管セグメントでの局在とも異なる。今後、発現クローニングで標的蛋白の遺伝子がクローニングされると、電気生理学的にチャンネル機能の有無について検討が必要と考える所以である。

一方、マウス腎の免疫組織染色の結果のみから、MD12 抗体で同定した細胞が遠位尿細管の緻密斑細胞と断定できるものではない。とくに、輸入細胞脈中膜平滑筋が特殊に分化したレニン産生細胞 (傍糸球体細胞) の可能性については、さらに検討の余地があると考えている。ただ、JG 装置領域に限局する局在特性は、この蛋白が尿細管一糸球体フィードバック機構に関わる何らかの分子である可能性を強く示唆するものであり、生物学的意義や機能の評価には遺伝子のクローニングが待たれる。

## 今後の課題

あいにく、この1年間で標的蛋白の遺伝子を同定することが出来なかった。今後、現在進行中の発現クローニングを継続して、フルクローンを同定し、機能評価の実験に繋がりたい。遺伝子の同定により、ノックアウトやノックダウンモデルの作成が可能となる。尿細管-糸球体フィードバック機構の分子機構の解明、さらには、生体の血圧調節に関わる可能性の有無を中心に検討する必要性を感じている。

## 文献

1. Sakamoto, H *et al* : Identification of a new outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl<sup>-</sup> channels. *J Biol Chem* 271: 10210-6, 1996.
2. Sakamoto, H *et al* : Cellular and Subcellular Immunolocalization of ClC-5 Chloride Channel in the mouse Kidney: Colocalization with H<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol.* 277(6 Pt 2):F957-65, 1999.
3. Kawasaki, M, T. Fukuma, K. Yamauchi, H. Sakamoto *et al* : Identification of an acid-activated Cl<sup>-</sup> channel from human skeletal muscles. *Am J Physiol.* 277 :C948-954, 1999.
4. Sakamoto, H *et al*: Regulation of ClC-5 and ClC-3 Chloride Channel Differentially Expressed in the Intercalated Cells (IC) of Collecting Duct in Response to Chronic Acidosis. *J Am Soc Nephrol* 12: 39A, 2001
5. Matsuo, T, Sakamoto, H *et al*: Dent's Disease-Associated CLCN5 Missense Mutations within Loop between the Putative Transmembrane Domains D5 and D6 Disrupt the Recycling of Channel to the Cell Surface. *J Am Soc Nephrol* 13: 73A, 2002
6. Sado Y *et al* : Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different alpha chains of human type IV collagen. *Histochem Cell Biol* 104: 267-75, 1995.

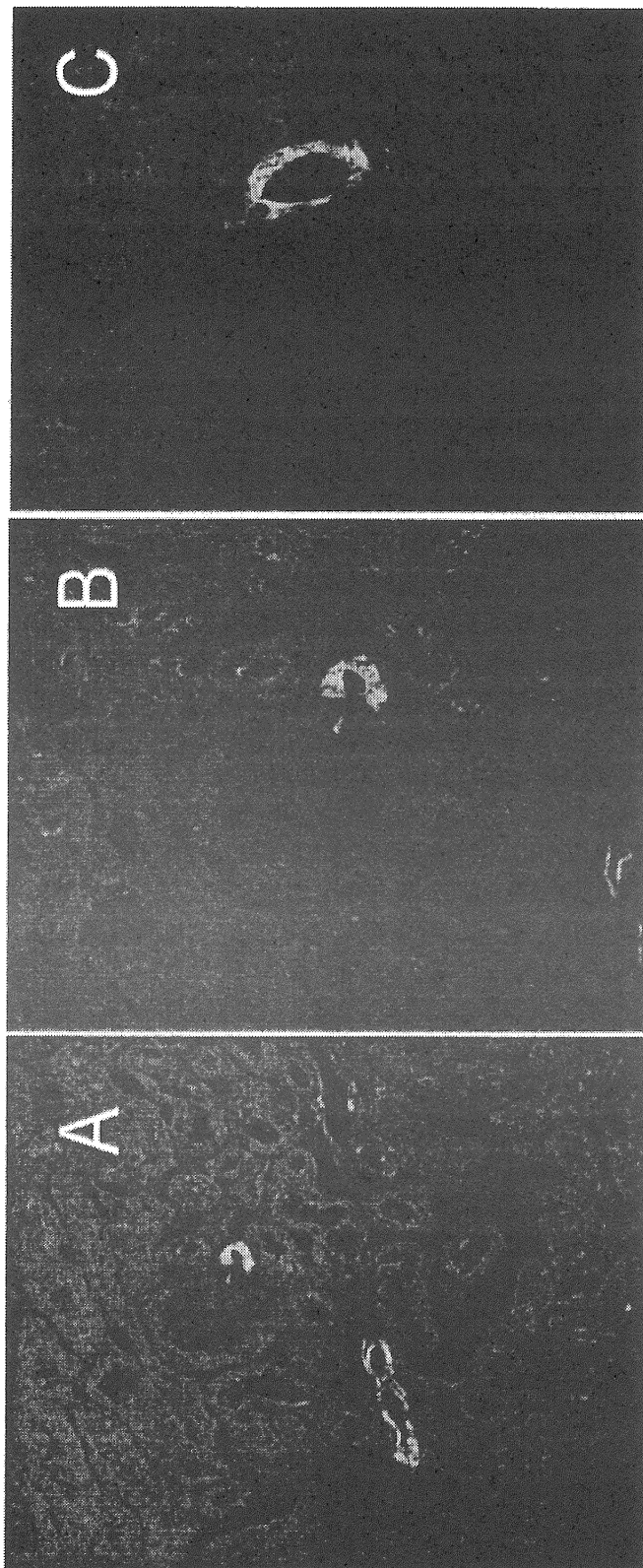


Fig. 1 Immunostaining of mouse kidney using MD12 MAb

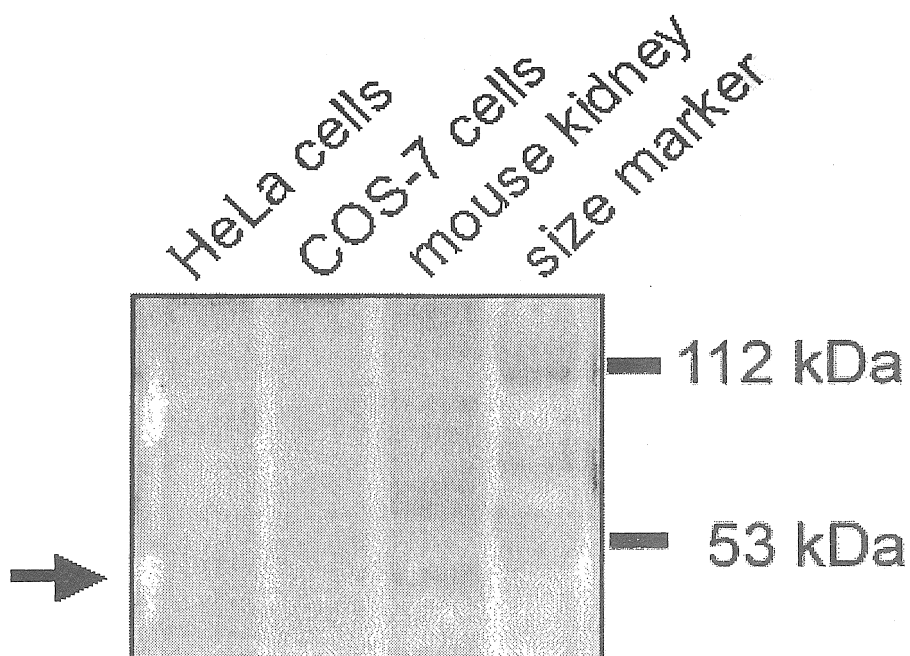
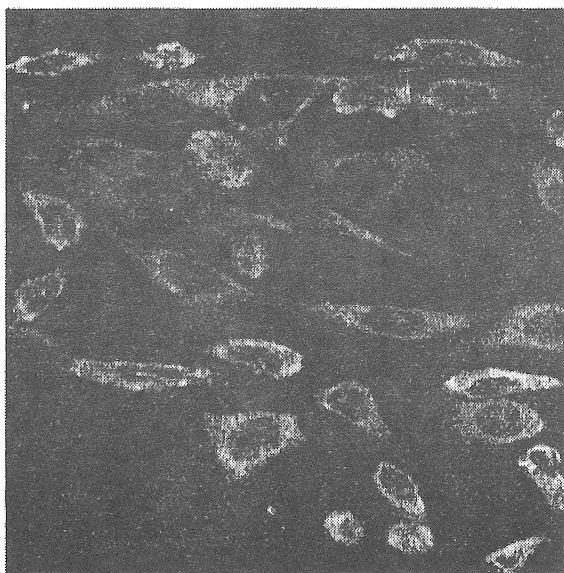


Fig. 2 Expression of immunoreactive protein with MD12 MAb



CHO-K1



COS-7

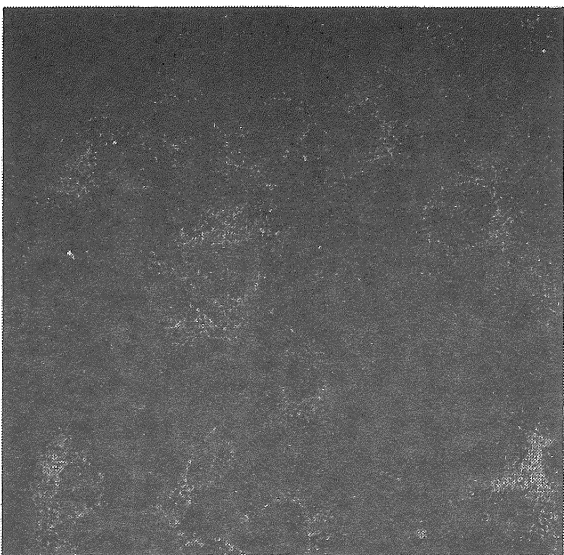


Fig.3 Immunostaining of the wild-type cultured cells using MD12 MAB

## Molecular profile of chloride channel specifically localized in macula densa cells

Hisato Sakamoto,<sup>1</sup> Takashi Matsuo,<sup>1</sup> Ichiro Naito,<sup>2</sup> Yasusi Nagaba,<sup>1</sup> and Shimizu Takeshi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Kitasato University, <sup>2</sup>Shigei Medical Institute

In the kidney, tubuloglomerular feedback (TGF) plays a key role in maintenance of fluid and electrolyte balance of the body as well as in blood pressure regulation. Previous studies have demonstrated that the chloride channel specifically localized in macula densa cells might be involved in the regulation of this feedback system. However the precise molecular mechanism by which regulate its cellular function is still a matter of debate. Thus, to identify the relationship between its molecular structure and function is particularly important subject. In the present study, we have successfully isolated a specific MAb to stain immunologically the cells that were restrictively localized within the juxtaglomerular apparatus. This MAb is an anti-peptide antibody against 18 amino acid residue of extracellular loop between first transmembrane domain (D1) and second transmembrane domain (D2) of ClC-5 chloride channel, which is the conserved region among the channels belong to the ClC chloride channel family, and designated as MD12 MAb.

The intense immunoreactive staining with MD12 MAb was apparent in macula densa of most glomeruli in the mouse kidney cortex. However, it has to be carefully considered whether immunolocalization is in the afferent arterioles. In addition, confocal microscopic approach provided the finding that the immunoreactive protein was localized both in plasma membrane and cytoplasmic region in the cells. Further experiments are necessary to identify the precise localization at cell and subcellular level in the juxtaglomerular apparatus. In contrast, the expected molecular size of this immunoreactive protein was appeared to be around 50 kDa.

Subsequently, we have attempted to identify the gene of the immunoreactive protein with MD12MAb using the expression cloning strategy. The pre-made mouse kidney cDNA library was initially transfected into the COS-7 cells, which did not exhibit any detectable staining with MD12 MAb. Then, the cells expressing immunoreactive protein with MD12 MAb were isolated magnetically using magnetic beads coated with this antibody. Now, it is final step to identify the gene coding immunoreactive protein with MD12 MAb. Following the cloning of target gene, we would like to expand this project to confirm the putative roles of this novel protein in TGF system.