

発表番号 57

腎近位尿細管の細胞間短絡路のNaCl輸送における クロードイン2の役割

助成研究者：武藤重明（自治医科大学腎臓内科）

共同研究者：宮田幸雄（自治医科大学腎臓内科）

月田承一郎（京都大学大学院分子細胞情報学）

近位尿細管のタイトジャンクションに発現しているクロードイン2の細胞間短絡路のNaCl輸送における役割を解明するため、ジーンターゲティング法により、クロードイン2遺伝子のノックアウト(KO)マウスを作成し、その野生型(WT)マウスを対照として、近位尿細管の形態と機能を、それぞれパラフィン切片法による光学顕微鏡観察、超薄切片法、フリーズフラクチャー法による電子顕微鏡観察と単離・灌流した近位尿細管の経上皮抵抗とNa/Clの透過性の比、腎クリアランス法によって、比較した。形態的解析では、KOマウスの近位尿細管上皮細胞においてもタイトジャンクションが存在することが観察され、WTマウスと比較してその構造に著しい差は見られなかった。機能的解析では、KOマウスの近位尿細管で経上皮抵抗はWTよりも増加していた。また、WTの近位尿細管の細胞間短絡路はNa透過性が優位であるのに対し、KOではCl透過性が優位であった。腎クリアランスでは、分画Na排泄、分画Cl排泄とも、KOマウスでWTマウスに比し、有意差を認めなかった。以上より、クロードイン2は、近位尿細管の細胞間短絡路のNa選択性を維持していることが考えられた。

12

助成番号 0243

腎近位尿細管の細胞間短絡路のNaCl輸送における クロードイン2の役割

助成研究者: 武藤重明(自治医科大学腎臓内科)

共同研究者: 宮田幸雄(自治医科大学腎臓内科)

月田承一郎(京都大学大学院分子細胞情報学)

1. 研究目的

腎臓の近位尿細管は、非対称で極性をもった上皮細胞と細胞間をシールしているタイトジャンクションとで構成され、糸球体で濾過されたNaClの約70%を、管腔側膜と血管側膜に特異的に発現しているNaCl輸送体を介し(経細胞輸送)、またタイトジャンクションの細胞間隙を介して(細胞間輸送)再吸収している⁽¹⁾。これまで、近位尿細管におけるホルモン、オートコイド、薬物によるNaCl輸送特性の研究は、各NaCl輸送体に特異的な阻害薬と微小尿管灌流法、微小電極法、などを組み合わせて行われ、管腔側膜や血管側膜に存在するNaCl輸送体の調節機序の解析など、経細胞輸送に焦点が充てられ、大きな成果をあげてきた⁽²⁻⁵⁾。一方、近位尿細管のように、細胞間短絡路がleakyな上皮ではNaClの細胞間輸送は極めて重要であるが、その機序についての研究はわれわれの最近の報告⁽⁶⁾以外ほとんどない。近年、分子生物学的手法の進歩により、タイトジャンクションを構成する蛋白質の1つであるクロードイン(現在少なくとも20種類以上存在し、ファミリーを形成)の遺伝子構造が明らかになった⁽⁷⁾が、クロードインが細胞間短絡路のバリアーとしてNaCl輸送に実際に関わっているのか、もしそうならばいかなる機序によるのか、不明である。そこで、本研究では、近位尿細管のタイトジャンクションに特異的に発現しているクロードイン2遺伝子⁽⁸⁾を欠損したマウスを作成し、近位尿細管の細胞間短絡路のNaCl輸送におけるクロードイン2の役割を解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 動物

gene targeting によってクロードイン2遺伝子のノックアウト(KO)マウスと、その野生型マウス(WT)を作成した

2.2 形態的解析

2群のマウスで、光顕(パラフィン切片をヘマトキシリン/エオジン染色)、および電顕(超薄切片、凍結割断レプリカ)レベルで近位尿細管細胞および細胞間隙を観察し、KOマウスの形態的異常の有無、程度をWTマウスと比較した。

2.3 機能的解析

2群のマウス腎より単離した近位尿細管 S2 セグメントを 146 mM の Na、120 mM の Cl を含む 300 mOsm/kgH₂O の溶液で灌流し、経上皮電位 (V_t) を測定し、2 群で比較した。次に、管腔側の NaCl 濃度を 50 mM 減らした時 (sucrose を加え、溶液の浸透圧を 300 mOsm/kgH₂O に調整) の V_t の変化より拡散電位 (V_d) を求め、Goldman-Hodgkin-Katz の式より Na と Cl の透過性の比を算出し、Na 透過性が優位か、Cl 透過性が優位かを検討した。この V_d が細胞間短絡路の Na/Cl 透過性を表わしているかどうかを確認するために、経細胞輸送を Na ポンプ阻害薬の ouabain で抑制後管腔側の NaCl 濃度を 50 mM 減らした時の V_d を測定した。管腔内より微小電流 (100 nA) を通電し、ケーブル解析により、経上皮抵抗を算出した。最後に、2 群のマウスを代謝ケージで 24 時間飼育し、尿と血液を採取し、近位尿細管の Na/Cl 輸送特性が腎臓全体の Na/Cl 輸送に影響しているかどうかを検討した。

3. 研究結果

3.1 形態的解析結果

ヘマトキシリン/エオジン染色をした腎臓のパラフィン切片の光顕像では、WT マウスと比較して、KO マウスは構造に著しい差を認めなかった。近位尿細管におけるフリーズフラクチャー法による電顕像、超薄切片法による電顕像でも、KO マウスにおいて、WT マウスと同様にタイトジャンクションが存在することが確認され、WT マウスと比較して、KO マウスは構造に著しい差は認められなかった。

3.2 機能的解析結果

近位尿細管 S2 セグメントを単離・灌流し、管腔内の NaCl 濃度を 50 mM 減らすと、WT マウスでは V_t が positive deflection を示すのに対し、KO マウスでは negative deflection を示した。V_d も、同様に WT マウスで positive deflection、KO マウスで negative deflection を示し、Goldman-Hodgkin-Katz の式より、Cl に対する Na の透過性の比を算出すると、WT マウスでは Na 透過性優位であるのに対し、KO では Cl 透過性優位であった。経細胞輸送を ouabain で抑制しても、同様の pattern を示した。従って、上記 Cl に対する Na の透過性の比は細胞間短絡路の Na/Cl 輸送特性を反映していることが明らかとなった。経上皮抵抗は、KO マウスで WT に比し、約2倍の増加を示した。腎クリアランス法では分画 Na 排泄、分画 Cl 排泄とも 2 群で有意差を認めなかった。

なお、この報告書で述べたデータは全て投稿準備中のものであり、原因を用いることができなかった。

4. 考察

クローディンは 4 回膜貫通型の 23kDa の蛋白で、タイトジャンクションの接着分子と考えられている。少なくとも 20 種類以上のサブタイプが同定され、組織、細胞特異的に発現している。また、1 つの細胞で複数のクローディンが発現している。クローディン 2 は腎臓と肝臓に多く発現し、腎臓では近位尿細管、細いヘンレの下降脚に発現している。経上皮抵抗が高

くクロードイン1と4を発現している培養細胞(MDCK cell)にクロードイン2を強制発現させると、経上皮抵抗が低くなるが、クロードイン3の発現では不変であることが報告されている⁽⁹⁾が、生理的役割、特にNaCl輸送バリアーとしての機能は不明であった。また、intactな細胞での解析も皆無であった。今回の我々の研究で、クロードイン2が近位尿細管の細胞間短絡路のNa選択性の維持に重要な役割を担っていることがはじめて明らかになった。一方、腎クリアランス法によって、近位尿細管でのクロードイン2遺伝子の欠損によるNa/Cl透過性の異常は、腎臓全体のNa/Cl輸送には直接影響しないことが明らかとなり、近位尿細管よりも遠位の尿細管セグメントで代償していることが考えられた。

5. 今後の課題

クロードイン2が、近位尿細管の細胞間短絡路のNa選択性の維持にどのような機序で関与しているのか、今後の課題である。近位尿細管の細胞間短絡路では、クロードイン2に加え、クロードイン10、11も発現しており⁽⁸⁾、クロードイン2との相互作用も興味もたれる。また、クロードイン2は、尿濃縮に関わっている細いヘンレの下降脚にも発現しており、近位尿細管とは異なった機能をしている可能性があり、検討予定である。

6. 文献

- (1) Weinstein, A.M.: Sodium and chloride transport: proximal nephron. In: *The Kidney: physiology & pathophysiology*, third edition, edited by Seldin, D.W. and Giebisch, G., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1287-1332.
- (2) Tsuruoka, S., Sugimoto, K., Muto, S., Nomiyama, K., Fujimura, A., and Imai, M.: Acute effect of cadmium-methallothionein on glucose and amino acid transport across the apical membrane of the rabbit proximal tubule perfused in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 292: 769-777, 2000.
- (3) Muto, S., Miyata, Y., Imai, M., and Asano, Y.: Troglitazone stimulates basolateral rheogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport activity in rabbit proximal tubule S2 segments. *Exp. Nephrol.* 9: 191-197, 2001
- (4) Tsuruoka, S., Sugimoto, K., Fujimura, A., Imai, M., Asano, Y., and Muto, S.: Protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase independently contribute to P-glycoprotein-mediated drug secretion in the mouse proximal tubule. *Pfluegers Arch* 44: 321-328, 2001
- (5) Miyata, Y., Asano, Y., and Muto, S.: Hyperosmolality activates basolateral NHE in the proximal tubule from P-glycoprotein null mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282: F718-F729, 2002.
- (6) Takahashi, M., Taniguchi, T., Muto, S., Tsuruoka, S., and Imai, M.: Effect of protamine on ion selectivity of superficial and juxtamedullary proximal straight tubules. *Nephron* 83: 154-159, 1999.

- (7) Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S.: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J. Cell Biol.* 141: 1539-1550, 1998.
- (8) Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S.: Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 875-886, 2002.
- (9) Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S.: Conversion of *zonulae occludentes* from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153: 263-272, 2001.

Modulation of ion selectivity in the proximal tubule paracellular shunt pathway by claudin-2

Shigeaki Muto, Yukio Miyata, Shoichiro Tsukita

Department of Nephrology, Jichi Medical School

Department of Cell Biology, Kyoto University Graduate School

Summary

Claudin-2 is one of the tight junction proteins expressed in proximal tubule, but its role in paracellular shunt pathway Na/Cl transport is unknown. Therefore, we generated mice lacking *claudin-2* by gene targeting disruption and compared morphological and functional features between the *claudin-2* knockout (KO) mice and their wild-type (WT) mice. Light microscopic findings exhibited that there were no significant differences between the two groups of the kidneys. Both ultrathin section electron microscopic images and freeze fracture replica showed that tight junction strands indeed existed in the proximal tubule from the KO mice, and there were no prominent differences of the proximal tubule tight junction and proximal tubule cells between the two groups. Next, we isolated and perfused proximal tubule S2 segments from both groups of the kidneys to estimate the permeability ratio of Na to Cl. In the tubule of the WT mice, when the luminal perfusate was abruptly changed to the low NaCl solution, transepithelial voltage (V_t) deflected to the positive direction, and the tubule was more permeable to Na than to Cl. In sharp contrast, in the tubule of the KO mice, V_t deflected to the negative direction upon abrupt reduction of the luminal NaCl concentration, and the tubule was more permeable to Cl than to Na. The transpithelial resistance in the tubule from the KO mice was significantly greater than that of the WT mice. The fractional excretion of Na or Cl was not significantly different between the two groups. We conclude that claudin-2 contributes to Na selectivity in the paracellular shunt pathway of the mouse proximal tubule.