

発表番号 46 (0335)

遠位尿細管における浸透圧感受性イオンチャネルの
陽イオン輸送における役割

助成研究者：鈴木 誠（自治医科大学薬理学）

【背景】TRP はもともとショウジョウバエの眼の異常から発見された、イオンチャネルであり、Ca, Na, K に選択性のない非選択性陽イオンチャネルである。我々が単離した TRPV4 はその中で、唯一浸透圧が低下し、細胞容積が大きくなると活性化するメカノセンサーチャネルとして知られている。このチャネルは、腎臓に mRNA が多く検出され、遠位尿細管の血管側に存在する。しかし、マクラデンサ細胞にはなくフィードバックとは関係がない。遠位尿細管は尿の浸透圧が低い水透過性は少なく、細胞容量の変化は大いか、少ないかは明らかではない。

我々が最初に報告した TRPV4 ノックアウトマウスでは目立った電解質異常は認められなかった。その後の別施設の研究でも電化質異常はなく、ともに中枢における浸透圧調節に異常がある可能性を示唆できるだけであった。

【目的】今回の研究では腎臓での意義を明らかにするため、ノックアウトマウスを解析し、TRPV4 の生理的役割を検討したい。

【方法】遠位尿細管を単離し、容量調節機構を *in vitro* で検討する。バランスケージで監視された、飲水、尿量などを検査し、Na 負荷、制限、利尿剤負荷などについて、尿中電解質の変化を *in vivo* で検討する。さらに麻酔下で点滴による尿の容量負荷について検討する。

【結果】遠位尿細管を糸球体とともに単離し、近位尿細管を対象に細胞内 Ca の濃度を測定した。細胞外を高浸透圧から低浸透圧に変化させると、細胞内 Ca が低下し上昇する。TRPV4^{-/-}マウスでは低浸透圧における遠位尿細管での細胞内 Ca の上昇層が見られず、また尿細管の太さも容量調節が欠如している事が明らかであった。細胞容量に *in vivo* で関与するものとして、食事中的 Na の負荷、制限について、バランスケージを用いて、検討したが、TRPV4^{+/+}と TRPV4^{-/-}マウス間で差が認められなかった。この際尿量と Na, K の関係を解析したところ、傾きに違いがあり、尿の浸透圧よりも尿流量を感知する機序に TRPV4 が関与する可能性が示唆された。

そこで、利尿薬(サイアザイド、フロセマイド、アセタゾラマイド)を用いて、尿流量を変化させたところ、Na, K の尿量に対する分泌比が TRPV4^{-/-}マウスでは低下していることが明らかになった。これは、2%NaCl 点滴下での1ml/min 近傍の尿量に対する Na, K の分泌が Two-way ANOVA 検定で有意差があることを示しており、変化としてはごく僅かであった。

現在、麻酔下で尿流量をより厳密に操作した場合の Na, K 排泄率を検討している。

【結論】TRPV4 は細胞容量を感知して、腎臓の電解質代謝を調節する。しかし、TRPV4 が浸透圧の大きく変化する遠位尿細管管腔側ではなく血管側にあることから、入力シグナルとしては尿の浸透圧より、尿流量による圧負荷のほうが重要であった。TRPV4^{-/-}マウスでは尿流量増加による Na, K 分泌刺激が低下していると考えられる。

遠位尿細管における浸透圧感受性イオンチャネルの陽イオン輸送における役割

鈴木 誠(自治医科大学 薬理学)

【研究目的】

NaCl の代謝異常が細胞外液量の増大である高血圧などにつながる事は、周知の事実である。腎臓や脳は、外液量の増大や、浸透圧の違いをどのようにして測定し、正常に保とうとしているのか、その分子機序は明らかではない。

1997 年に辛子(カプサイシン)受容体の分子実態が明らかになったが、これは TRP (transient receptor potential) と類似の構造を持つ分子であった。TRP はもともとショウジョウバエの眼の異常から発見されたイオンチャネルであり、Ca、Na、K に選択性のない非選択性陽イオンチャネルである。我々は、カプサイシン受容体(TRPV1)が熱も感受することに基づき、この遺伝子ファミリーの中に圧力や浸透圧に反応する分子があるという仮説を立て、腎臓からの新規なファミリー遺伝子の単離を目指した。

我々が単離した TRPV4 は、浸透圧が低下し細胞容積が大きくなると活性化するメカノセンサーチャネルとして、現在唯一知られている分子である。このチャネル遺伝子の mRNA は、腎臓に多く検出され、特に遠位尿細管の血管側に局在する。しかし、マクラデンサ細胞には存在しないことから、尿細管糸球体フィードバックとは無関係と考えられる。遠位尿細管では、尿の浸透圧は低い水透過性は少なく、細胞容量の変化が多いか少ないかは明らかではない。現在までの仮説によれば、マクラデンサ細胞にある圧受容体は血圧に関与すると考えられている。一方、遠位尿細管にある圧受容体は、尿流量依存性 K 分泌に関わると推察される。

しかしながら、我々が最初に報告した TRPV4 ノックアウトマウス(TRPV4^{-/-})では、尿中に目立った電解質異常は認められなかった。その後の別施設の同様の研究においても電解質異常は報告されておらず、ともに中枢における浸透圧調節に異常がある可能性を示唆できるだけであった。そこで、今回の研究では TRPV4 の腎臓での意義を明らかにするため、TRPV4^{-/-}の腎機能を解析し、TRPV4 の生理的役割を検討する。

【研究方法】

(1) マウス腎臓を燐酸バッファーで還流した後、collagenase を用い、尿細管の単離を容易にした。マウスの各尿細管セグメントを単離し、1% TritonX、DEPC 水下で、凍結解凍を行った。この液 3 μ l を用いて、タカラ(RNA-PCR)を用い、プロトコール通りに RT-PCR を行なった。プライマー、5'-CCTTCAGAGACATCTACTACCG-3' 及び 5'-CTCCAGTGGCTGATAGTAGG-3'、を用

いた。

(2) 遠位尿細管を単離し、容量調節機構を *in vitro* で検討した。糸球体を目標に隣接する近位尿細管とマクラデンサを含む遠位尿細管を単離した。細胞内 Ca を測定するために、Fluo-3 を用い、共焦点蛍光顕微鏡 (Fluoview, Olympus) で、細胞内 Ca を測定した。Fluo-3AM 10 μ M を含培養液で 20 分間インキュベートしロードした。クレブスバッファー (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.5 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 3 mM, pH=7.4, Osm=300 mOsm/kg) を浴液として還流した。尿細管の管腔は閉じて実施した。浸透圧はマンニトールまたは水によって調整した。還流液を浸透圧 500 mOsm/kg から 200 mOsm/kg に変化させ、細胞内 Ca の反応は蛍光強度によって測定した。

(3) 密封された個別のバランスケージでマウスを飼育した。2日の馴化期間後、Na 負荷、Na 制限、利尿剤負荷の各条件下において、飲水量および尿量等を測定し、尿中電解質の変化を *in vivo* で検討した。一部のマウスでは非観血的に血圧を測定し、実験終了後に血清を採取した。尿中および血清中の Na と K は炎光光度法、その他は吸光光度法 (WAKO 試薬) を用いて解析した。

(4) さらに、麻酔下での点滴によって尿の容量負荷を制御した際の尿量と電解質変化についても検討した。

【研究結果】

一般に、マウスの尿細管は単離が難しく、特に collagenase を用いずに遠位尿細管を採取するのは困難である。今回の実験では正常マウスの尿細管を collagenase 適用により各部位別に単離し解析に用いた。RT-PCR の結果では、腎組織を大別すると TRPV4 の mRNA は腎皮質にその存在が認められた。単離した各部位別では、TRPV4 は太いヘンレ上行脚から皮質集合管にかけて存在することが示唆された (Figure1)。

次に、遠位尿細管を糸球体とともに単離し、近位尿細管を対照に細胞内 Ca 濃度を測定した。細胞外を高浸透圧から低浸透圧に変化させると、細胞内 Ca が一旦低下し再び上昇する。TRPV4 / マウスでは低浸透圧における遠位尿細管での細胞内 Ca の上昇層が認められず、また尿細管の太さも、野生型マウス (TRPV4^{+/+}) とは異なる変化を示すことから、容量調節が欠如している事が明らかであった (Figure2)。

バランスケージを用いた電解質バランスを Table1 に示す。尿中 Na は TRPV4 / マウスでは低い傾向にあり、食事中的 Na の負荷、制限下でも有意差が認められることがあった。細胞容積の調節に *in vivo* で関与する要因として、食事中的 Na の負荷や制限が考えられる。そこで、これら条件下において検討したが、TRPV4^{+/+} と TRPV4 / マウス間で、尿量、飲水量、尿中 Na 濃度、K 濃度は、一部を除いては差が認められなかった (Figure3)。

TRPV4^{-/-} マウスの尿中 Na 濃度は、野生型と差が認められることもある。しかしマウスの数を増やしてみても飲水量と尿量には両方で明らかな差は認められなかった。一方、尿量と尿中

Na 濃度および K 濃度との関係を解析したところ、相関直線の傾きに Two-way ANOVA 検定で有意差があり、尿の浸透圧よりも尿流量を感知する機序に TRPV4 が関与する可能性が推察された。Na 負荷および利尿薬負荷条件下においても同じ結果が得られた。

利尿薬(サイアザイド、フロセマイド、アセタゾラマイド)を用いて、尿流量を変化させた結果、尿量に対する尿中 Na 濃度および K 濃度の分泌比が TRPV4 / マウスでは低下していることが明らかになった。これは、2%NaCl 摂取下での1ml/min 近傍の尿量に対する尿中 Na と K の分泌が、いずれの利尿薬存在下でも Two-way ANOVA 検定で有意差があることを示している。この差は数値としては僅かだが明らかなものであった(Figure4)。

現在、この差をより正確に測定するため、麻酔下で点滴により尿流量を厳密に操作した場合の Na 排泄率および K 排泄率を検討している。

【考察】

TRPV4 は、細胞容積に反応して細胞内に Ca 流入を起こすイオンチャネルである事が明らかである。細胞容積が大きくなると細胞膜が進展し、この機械的圧を感受して TRPV4 は活性化する。このことは既に、この遺伝子を発現させた培養細胞、血管内皮細胞、ケラチノサイトでも明らかになっている。しかし、TRPV4 はこれまで Stretch-activated channel とは言われていない。それは、TRPV4 を HEK(Human epithelial kidney) 細胞や CHO(Chinese Hamster ovary) 細胞等の発現系の細胞に強制発現させた実験では、Stretch-activated channel として観察されないからである。今回、TRPV4 が主として遠位尿細管に局在する事が明らかとなったことは、A6 培養細胞の所見と一致すると考えられる。A6 培養細胞は、両生類由来細胞であるが、Stretch-activated channel 特有の性質を持つチャネルと、ADH に対する反応を有しており、遠位尿細管細胞と性質が一致する。また今回の実験では、培養細胞ではなく、生体から単離した尿細管を用いているので培養による修飾を受けておらず、生体の機能を反映しているものと考えられる。また管腔を閉じた状態の単離尿細管を用いても、浸透圧に対する細胞内 Ca の反応が低下していることから、TRPV4 は遠位尿細管細胞の血管側にあって浸透圧感受性に Ca を透過させたと言えよう。

機械受容チャネルの in vivo、特に腎臓における生理的意義は永らく不明であった。今回の研究によってはじめて、その一端が明らかにされた。バランススケージを用いた初期の実験では、尿中の Na 濃度が低く、血液中の Na は高めで、尿量がやや多く、飲水量もやや多いことから、当初は尿崩症を疑って実験を進めた。しかしながら、動物数を増やして統計処理を行えば行うほど、尿中の Na 濃度以外の差は明らかではなくなってしまう。尿の浸透圧には変化が認められないことから、TRPV4^{-/-}マウスでは、水の代謝異常はあったとしても決して大きくないと考えられる。TRPV4 チャネルは脳にも存在し、バゾプレッシン分泌や飲水行動と関わる可能性が我々や他グループの研究で報告されており、これらの反応が複雑に変異することで浸透圧調節が影響を受けることが示唆された。しかし一方で、尿中の Na 濃度は常に低く計測されており、

この原因は腎臓での Na 排泄に基づくと推察された。

尿中 Na の最終濃度を決定している部位は遠位尿細管である。TRPV4 が関与するとすれば、そのシグナルは尿浸透圧もしくは尿流量を感知すると推察される。今回の結果から、尿流量、flow、の増加に伴い増大する Na 濃度および K 濃度が影響を受けると考えられた。Two-WAY ANOVA はこれらの相関直線の相互関係を検定する優れた方法であるが、統計学的有意差が認められたことから、TRPV4^{-/-}マウスにおける Na 代謝異常は尿流量に反応していることが示唆される。今回の研究では、利尿薬を投与することによって、生理的範囲よりも大きな尿流量を生体内で作り得た。この場合にはじめて TRPV4 の flow-dependent K 分泌および Na 分泌への関与が明確に示唆されたことから、in vivo での TRPV4 の役割はさほど重要なものではないのかも知れない。血管側にあるチャネルは、尿流量が変化したとしても、非生理的状态にまでその変化が大きくないと影響されないといってもよい。しかしながら、バランスケージで普通食を摂取している場合にも若干ながら差があることから、このような僅かな差であっても、長期的には大きな差となる可能性も残っている。

結論として、TRPV4 は細胞容積を感知して腎臓の電解質代謝を調節する。しかし、TRPV4 が浸透圧の大きく変化する尿に直接的に接する遠位尿細管の管腔側ではなく血管側に局在することから、チャネル活性化への入力シグナルとしては尿の浸透圧よりも尿流量による圧負荷を感知していることが示唆される。TRPV4 / マウスでは尿流量増加による Na および K 分泌刺激が低下していると考えられる。

【今後の課題】

Na の尿濃度が低い理由として、バゾプレッシンによる反応低下を挙げる事ができる。単離尿細管を還流し、バゾプレッシンによる Na 分泌の増減を測定できれば、この機構が証明できると考えられる。

生体内での遠位尿細管への機械刺激としては、腎不全などにおける細胞肥大が大きく関与する可能性がある。片腎摘出による腎不全モデルマウスを作製する事で、この可能性を検討できるかもしれない。

遠位尿細管での NaCl の代謝で最も重要と考えられるのは、マクラデンサにおける浸透圧感受性の未知のチャネルである。これは Cl チャネルであることが近年示唆されており、この分子実態を明らかにする事が急務である。

文献

- Heather AC, Smith TL, and Bargmann CI. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neuroscience* 17: 8259-8269, 1997.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
- Suzuki M, Ishibashi K, and Imai M. Expression of putative stretch activated nonselective cation channel in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 10: 44, (abstract), 1999.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, and Plant TD. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature Cell Biol.* 2: 695-702, 2000.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Šali A, Hudspeth AJ, Friedman JM. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-35, 2000.
- Wissenbach U, Bodding M, Freichel M, and Flockerzi V. Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* 485:127-134, 2000.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga T, Brake AJ, and Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441, 1999.
- Suzuki M, Sato J, Kutsuwada K, Ooki G, and Imai M. Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J.Biol.Chem.* 274: 6330-6335, 1999.
- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, and Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 610-615, 1998.
- Ota M, Crofton JT, Festavan G, and Share L. Central carbachol stimulates vasopressin release into interstitial fluid adjacent to the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 592: 249-254, 1992
- Suzuki, M., Ohki, G., Mochizuki, T., Somloc, S., Ishibashi, K., and Imai, M. Opening of ligand-gated cation channel families by calpain inhibitors1. *FEBS Lett.* 517: 219-224, 2002.

- Taniguchi J, Takeda M, Yoshitomi K, and Imai M. Pressure- and parathyroid-hormone-dependent Ca²⁺ transport in rabbit connecting tubule: role of the stretch-activated nonselective cation channel. *J Membr. Biol.* 140:123-132, 1994.
- Mizuno A, Imai M, and Suzuki M. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am.J.Physiol.* 258, C96-101, 2003
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira, K, and Imai M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J.Biol.Chem.* 278, 22664-22668, 2003
- Suzuki M, Watanabe Y, Oyama Y, Mizuno A, Kusano E, Hirao A, and Ookawara S. Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in the mouse skin. *Neurosci. lett.* 26;353(3):189-92, 2003.
- Suzuki M, Mizuno A, and Hirao A. Microfilament-Associated Protein 7 Increases the Membrane Expression of TRPV4. *J.Biol.Chem* 19;278(51):51448-53 2003.
- Man-Kyo Chung, Hyosang Lee, Atsuko Mizuno, Makoto Suzuki and Michael J. Caterina TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J.Biol.Chem* (in press) 2004.

Table 1. Electrolytes, blood pressure and water balance in TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} mice.**Plasma (n=10)**

	Cr (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca(mg/dl)	Cl (mEq/l)
TRPV4 ^{+/+}	0.10 ± 0.003	137.9 ± 1.0	5.4 ± 0.1	9.8 ± 0.4	115 ± 2.8
TRPV4 ^{-/-}	0.11 ± 0.02	140.7 ± 0.8	5.4 ± 0.4	8.8 ± 0.3	110 ± 1.8

Urine(n=10)

	Cr (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Ca(mg/dl)	Cl (mEq/l)
TRPV4 ^{+/+}	36.2 ± 3.8	164.9 ± 20.6	277.5 ± 29.2	20.9 ± 1.9	178 ± 27.3
TRPV4 ^{-/-}	32.5 ± 3.2	123.1 ± 14.6*	217 ± 27.7	17.1 ± 1.5	136.9 ± 18.6

*P<0.05

Blood pressure 11W (n=10)

	<i>Systolic</i>	<i>Diastolic</i>
TRPV4 ^{+/+}	116.1 ± 5.2	69.8 ± 3.8 (mmHg)
TRPV4 ^{-/-}	104.8 ± 4.2	64.2 ± 5.4 (mmHg)

Blood pressure 20W (n=10)

	<i>Systolic</i>	<i>Diastolic</i>
TRPV4 ^{+/+}	123.2 ± 2.7	71.2 ± 4.6 (mmHg)
TRPV4 ^{-/-}	120.1 ± 8.1	64.2 ± 5.3 (mmHg)

	<i>Water Intake</i>	<i>Urine Output (ml/day) (n=15)</i>
TRPV4 ^{+/+}	4.0 ± 0.8	1.4 ± 0.4
TRPV4 ^{-/-}	4.5 ± 1.0	1.8 ± 0.5

Table Legend

Urinary chemical data and water intake are determined for the normal diet averaged triplicate over one week. At the end of the maintenance, blood was sampled. Tail blood pressure was measured duplicate at the given age.

Figure 1

Detection of TRPV4 mRNA by RT-PCR and immunohistochemistry.

The renal cortex, medulla and denoted renal segments were isolated. RT-PCR was performed to detect TRPV4 mRNA. PCT, proximal convoluted tubule; mTAL, medullary ascending thin limb; cTAL, cortical ascending thin limb; CCT, collecting duct.

Inmunohistochemical detection of TRPV5, which is determined to be located in the presence of distal connecting tubules, and TRPV4 were performed. Arrows in the adjacent sections indicate presence of TRPV5 and TRPV4.

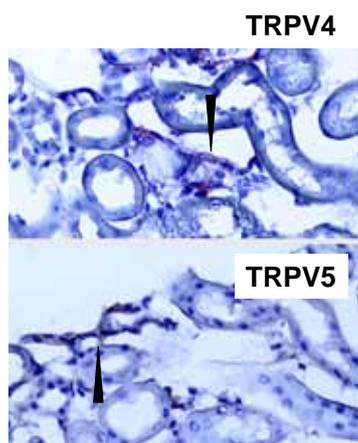
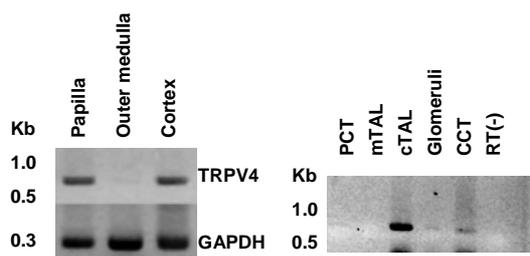


Figure 2

Effect of anisoosmotic solution on the intracellular free calcium of distal renal tubules from TRPV4^{+/+} and ^{-/-} mice.

Glomeruli (G), proximal convoluted tubule (PCT) and adjacent cortical ascending loop (cTAL) was isolated (right photo). The intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) was measured as a fluorescent intensity of fluo-3 (green). The [Ca²⁺]_i in response to hypertonic solution followed by hypotonic solution was measured. Mean ± S.E. from eight experiments are figured in proximal and distal tubule from TRPV4^{+/+} (upper panel) and TRPV4^{-/-} (lower panel) mice.

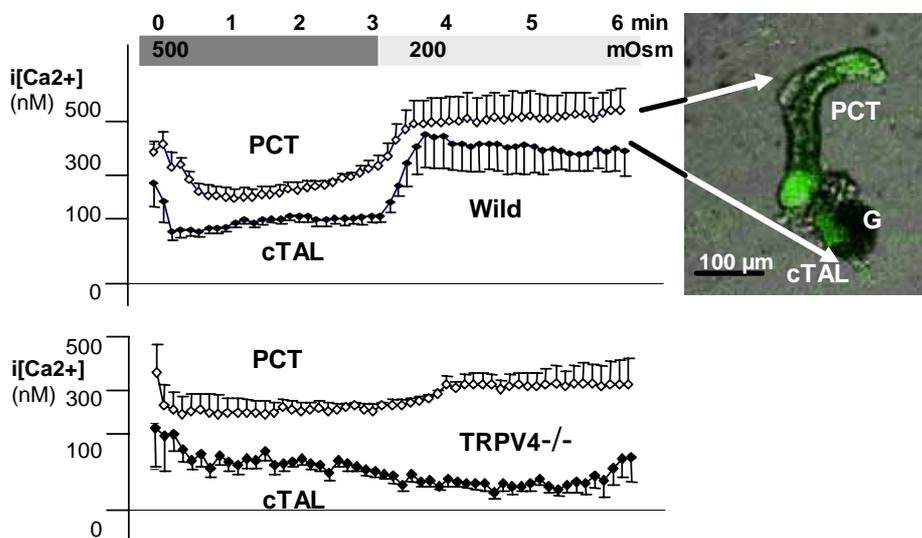


Figure 3

Electrolyte concentrations in urine or serum in TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} mice.

Mice of TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} were maintained in balanced cages and free access for water and meal. The concentrations were stabilized within 3-5 days and summarized the concentration. The mice of TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} was restricted (0.1%) or overloaded (2%) with salt. The resultant concentrations of electrolytes are measured. * indicated $p < 0.05$ by ANOVA analysis.

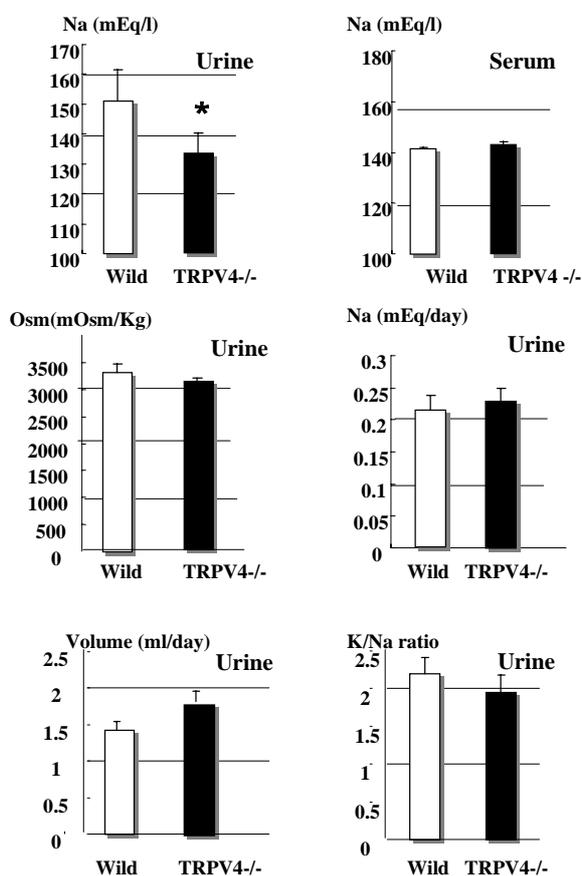
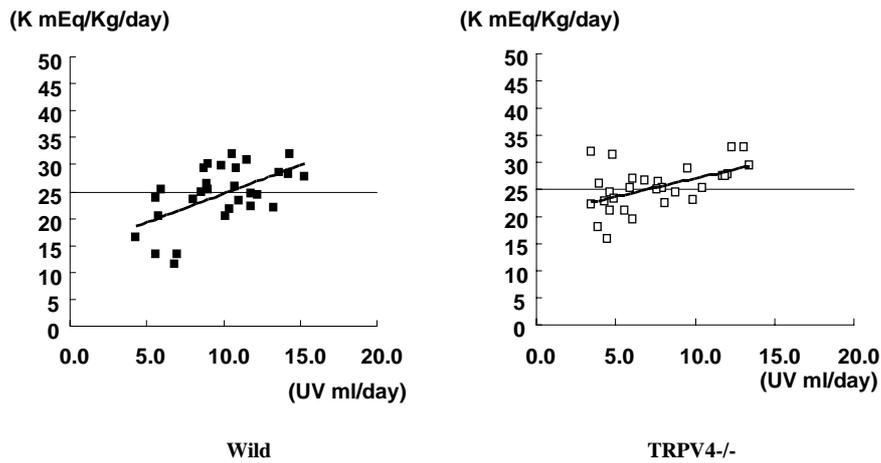


Figure 4

Relation of urinary K concentration and urine volume.

During the Na loading and restriction, urine volume was varied. The excretion of K vs. urine volume is plotted to represent flow-dependent K excretion. The reclining of the regression is analysed by Two-way ANOVA and significantly different in TRPV4^{+/+} (left) and TRPV4^{-/-} (right) mice.



Role of volume sensitive Ca permeable channel, TRPV4, in the kidney.

Makoto Suzuki

Jichi Medical School. Department of Pharmacology.

Summary

Transient receptor potential (TRP) is a molecular family of Ca permeable cation channels. TRPV4 is a family member similar to vanilloid receptor and only Ca permeable channel activated by the swelling of cell. We have first reported that impaired sensitivity to plasma osmolarity was observed in mice lacking TRPV4. Although the controversy remained in the regulation of body osmolarity, TRPV4 may play a role in renal electrolyte metabolism because mRNA is rich in the kidney. To access a contribution of TRPV4 to renal physiology, we investigated (1) in vitro the volume-sensitive intracellular Ca of renal tubules in response to aniso-osmolarity and (2) Na and K metabolism during various salt and diuretic intakes.

TRPV4 is located in basolateral membrane of thick ascending limb to collecting duct cells. We microdissected distal renal tubule with adjacent proximal tubule and measured the intracellular free calcium (iCa). The bath osmolarity was changed from hypertonic to hypotonic solution. The iCa decreased and then increased in distal tubule of TRPV4^{+/+} and proximal tubules in TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} mouse. Whereas, iCa did not increase in the distal tubule of TRPV4^{-/-} mouse. Thus swell-sensitive rise in iCa was impaired in TRPV4^{-/-}.

Restriction or overdose of salt to mice in balanced cage resulted in that dairy urinary Na or K excretion and their concentrations were not different between TRPV4^{+/+} and ^{-/-} mice. Thus concentration of urinary Na is not primary signal to stimulate TRPV4. In other words, hypotonicity or hypertonicity of luminal fluid of the distal segments did not stimulate TRPV4 activation. Urinary Na/K concentration vs. urine volume, however, was different between these animals. Thus TRPV4 may sense urinary flow rather than urinary osmolarity. To clarify the issue, we added diuretics to 2% NaCl of tap water for drinking and found a significant difference in Na-UV or K-UV relationships in TRPV4^{+/+} and ^{-/-} mice. The relationships revealed linear, the increment of which were significantly different by two-way ANOVA.

We therefore conclude that TRPV4, a volume sensitive Ca permeable channel, senses flow rather than concentration of urine. The flow-dependent Na and K excretion mechanism may be impaired in mice lacking TRPV4.