

## 水電解質輸送

富田 公夫

この1年間の尿細管での水電解質輸送に関する研究の進展について、尿細管部位別にまとめた。

### 近位尿細管

#### 1. 痛風および尿酸排泄低下に関連する尿酸輸送体 (SLC2A9)の発見<sup>1)</sup>

高尿酸血症のおよそ10%に痛風、関節炎が発症する。クロアチア住民において SNP (single nucleotide polymorphism) を検索し、血清尿酸値や尿中尿酸排泄量の低下と SLC2A9 (solute carrier 2 群 A9) との間に強い相関を見つけた。

SLC2A9 はヘキソースとポリオール輸送体 (SLC2) のファミリーで、フルクトース (果糖) 輸送体 (SLC2A5) と高い相同性を持つ、GLUT9 である。Oocyte での成績では、尿酸とフルクトースともに輸送するが、尿酸が存在するとフルクトースの輸送は95%抑えられるので尿酸に高い親和性を持つ輸送体であることがわかる。Benzbromarone で55%抑制される。果糖は血清尿酸値を上昇させるただ一つの糖であることを考えると興味深い。

近位尿細管での尿酸の再吸収の50%は URAT1 に依ると考えられているが、SLC2A9 もこの部位の再吸収に関与していると考えられる。SLC2A9 には2つのアイソフォームがあり、長いものは近位尿細管の血管側にあり、短いものは管腔側に認められる。マウスの腎臓では遠位曲尿細管や接合尿細管にある。興味深いことに、ヒトでは痛風の尿酸沈着部位である関節軟骨の軟骨細胞にこの輸送体が認められており、関与が示唆される。

#### 2. エストロジェンは Na/P 共輸送体の発現を down-regulation する<sup>2)</sup>

腎および小腸での P の再吸収は II 型 Na/P 共輸送体 (SLC34) で行われている。亜型として IIa, IIb, IIc があり、小腸では主に IIb が存在し、腎では IIa, IIc の両者が近位尿細管の刷子縁膜に存在し P を再吸収する。IIa 型をノックアウトしたマウスでは尿中への P 排泄が増加することより、IIa 型の腎での有用性が示唆されている。IIa 型は糖質コルチコイド、EGF, PTH, ビタミン D, 甲状腺ホルモン、ドパミン、代謝性アシドーシス、食事中 P 量、phosphatonin などの調節を受けている。閉経後に骨粗鬆症が起りやすいことより、性ホルモンの減少が関与していることが示唆されているが、性ホルモンの P 輸送体への効果は知られていなかった。

卵巣摘出ラットに  $17\beta$ -estradiol を投与すると食事摂取量減少にもかかわらず、腎からの P 喪失と低 P 血症が認められ、近位尿細管の Na/P 共輸送体 IIa 型の発現がコントロールに比べ有意に減少していた。エストロジェンは III 型、IIc 型の発現には影響を示さなかった。卵巣および副甲状腺摘出ラットに  $17\beta$ -estradiol を投与しても同様の効果が認められた。これらより、エストロジェンによる腎からの P 喪失と低 P 血症は、食事摂取量や PTH とは独立して、Na/P 共輸送体 IIa 型の発現を抑制することにより生じることが示された。

### ヘンレループ

#### 1. Claudin-16, Claudin-19 は協調して陽イオン選択性を保つ<sup>3)</sup>

ヘンレ上行脚を NaCl で還流すると NaCl の再吸収とともに管腔内への K 分泌と血管側への Cl 排出により管腔内が陽性に荷電され、この管腔内陽性荷電がこの尿細管細胞間での Na, Ca, Mg の再吸収の driving force になっている。

claudin は尿細管の細胞間透過性を調節する tight junction (TJ) を構成する重要な蛋白をコードする遺伝子ファミリーに属する。

家族性低 Mg 血症性腎石灰化症 (familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis : FHHNC) は、腎からの Mg, Ca が喪失し腎障害が進行し腎不全に至る遺伝性腎尿細管疾患で、claudin-16 (CLDN-16 : paracellin), claudin-19 (CLDN-19) の遺伝子変異が原因とされている。CLDN-16 は tight junction の陽イオン選択性を保ち、非選択的な細胞間陽イオンチャネルを形成するうえで重要な役割を持っている。腎での CLDN-16 を欠損させると、陽イオン選択性がなくなり、管腔内陽性荷電も消失し、Mg の再吸収も消失する。

CLDN-19 は始め末梢性 myelin で研究されており、ヘンレ上行脚に存在し CLDN-16 と同部位に存在することが示されていたが、その役割は不明であった。ブタの腎上皮細胞を用いての成績で、CLDN-19 は Cl ブロッカーとして、また CLDN-16 は Na チャネルとして作用することが示された。CLDN-19 と CLDN-16 の wild type を発現させると陽イオンの選択性は保たれるが (PNa/PCl=3.8), どちらかに遺伝子変異があると選択性が消失する。両者は相互に協調的に陽イオンの選択性を形成していることがわかった。

## マクラデンサ

### 1. Vasopressin は V1a 受容体を介して RAA を刺激する<sup>4)</sup>

Vasopressin は腎での水再吸収作用以外の作用を持つ。Vasopressin の受容体には V1a, V1b, V2 があり、V1a 受容体は主に血管系に広く分布し、V1b 受容体は脳下垂体前葉に、V2 受容体は腎に存在する。V1a 受容体は血管の収縮、細胞増殖、血小板凝集、グリコーゲン分解、脂質代謝、耐糖能などに関与している。腎臓では V2 受容体はヘンレ上行脚や集合管に広く存在し、V1a 受容体もヘンレ上行脚、マクラデンサ、集合管に存在している。

V1a 受容体の欠損 (V1a<sup>-/-</sup>) マウスで V1a 受容体の役割の解析が行われた。V1a<sup>-/-</sup> マウスでは、循環血液量の減少と血圧の低下が認められた。血液中の心房性利尿ペプチドの低下に加え、血漿レニン活性、アンジオテンシン II、アルドステロンの低下も認められた。特に、マクラデンサ細胞での NOS 合成酵素や COX-2 などレニン刺激物質の発現低下が著明であった。これらのことから、vasopressin はマクラデンサの V1a 受容体を介して RAA 系を刺激することに

より体液調節に関与していることが示された。

## 遠位尿細管

### 1. Klotho は TRPV5 チャネルのシアル酸を取り除き、galectin-1 に結合しやすくし、TRPV5 チャネルを細胞膜表面に保持して活性化を持続させる<sup>5)</sup>

遠位尿細管 (DCT, CNT) の Ca の再吸収は管腔側膜の選択性 Ca イオンチャネルの TRPV5 (transient receptor potential vanilloid 5) チャネルにより細胞内へ能動輸送されている。TRPV5 チャネルをノックアウトすると著明な Ca 尿がみられ、Ca 再吸収の重要な役割を占めていることがわかる。TRPV5 チャネルを調節する因子として、klotho, 組織カリクレイン, pH, Ca, Mg, PIP2, WNK4 などが知られている。Klotho は抗加齢ホルモンとして Ca 調節をしており、その欠損により骨塩の減少を生ずる。1 回膜貫通型の蛋白で、 $\beta$ -glucuronidase 活性を有する細胞外ドメインを持つ。細胞に発現させると、TRPV5 チャネルが亢進し Ca の再吸収が増加する。この作用は、精製した  $\beta$ -glucuronidase で同様の効果が報告されている。この詳細は不明であった。

Klotho の細胞外ドメインの  $\beta$ -glucuronidase により、膜に結合している TRPV5 チャネルの末端のシアル酸を取り除くことにより、disaccharide galactose-N-acetylglucosamine (LacNAc) が露出する。これは、細胞外に存在する galectin-1 の ligand であり結合する。このため TRPV5 チャネルは細胞膜上に存在することになり、チャネル活性が持続することになる。このような作用機序に関する知見は新規のもので興味深い (図 1)。

### 2. WNK3, WNK4 の N 端ドメインが Na-Cl 共輸送体への効果発現に重要である<sup>6)</sup>

WNK (with no lysine kinase) には、WNK1, WNK 2, WNK 3 と WNK 4 の 4 種がある。WNK1 と WNK 4 の遺伝子異常はサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (SLC12A3 : NCC) 機能亢進を示す偽性低アルドステロン症 (pseudohypoaldosteronism : PHAII) として知られているものであり、高血圧、高 K 血症、代謝性アシドーシスを呈する。

輸送体の活性化についてはそのリン酸化がよく知られている。陽イオン/Cl 共輸送体 (SLC12) には、Na とカップリングする腎特異的 Na/K/2Cl 共輸送体 (SLC12A1 : NKCC2), 普遍的に存在する Na/K/2Cl 共輸送体 (SLC12A2 : NKCC1), サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (SLC12A3 : NCC), K とカップリングする K/Cl 共輸送体 1~4 (SLC12A4~7 と KCC1~4) があり、リン酸化により Na

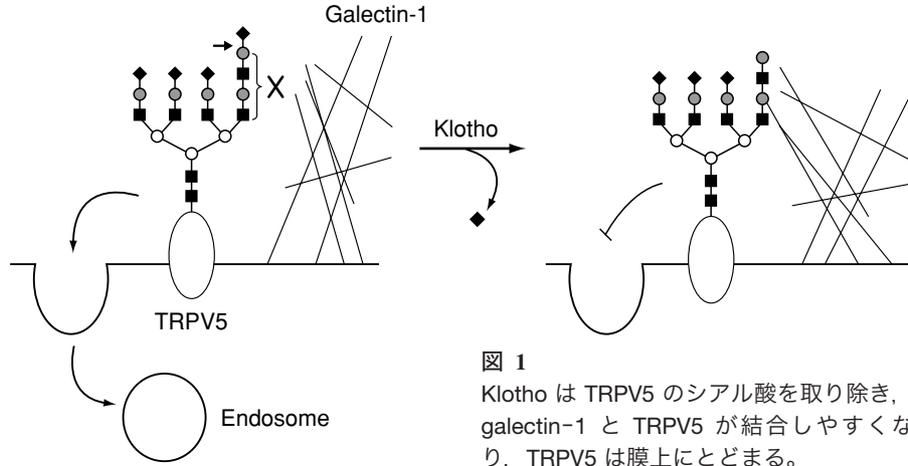


図 1  
Klotho は TRPV5 のシアル酸を取り除き、galectin-1 と TRPV5 が結合しやすくなり、TRPV5 は膜上にとどまる。  
(文献 5 より引用)

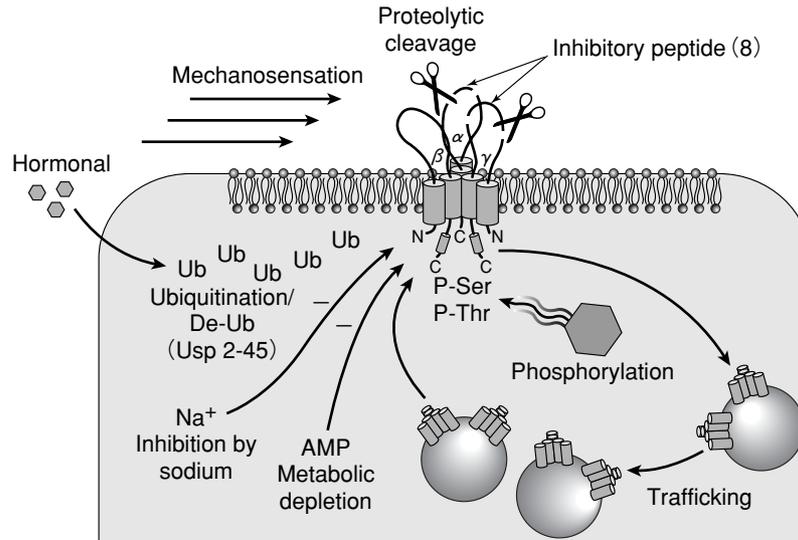


図 2 ENaC の調節(Bhalla V, et al. JASN 2008. より引用)

とカップリングする共輸送体は活性化し、K とカップリングする共輸送体は不活性化する。WNK 4 は NCC も KCC も抑制するため、作用機序はリン酸化とは別のものが推測されていた。WNK 3 は Na とカップリングする共輸送体 (NCC, NKCC1, NKCC2) は活性化し、K とカップリングする K/Cl 共輸送体 (KCCS) は抑制し、リン酸化による制御に類似している。WNK 3 と WNK 4 を比べると NCC に対しては逆に作用し (活性化と抑制)、KCC に対しては同様である (抑制)。

セリン/スレオニンキナーゼドメインの相同性は 80% 以上であるが、N 端、C 端のアミノ酸配列の相同性は 17% 未満であるので、キメラ蛋白を作って活性化に必須の部位を検討した。キナーゼドメインは輸送体に対する効果発現には重要でなく、N 端ドメインが効果に重要であることが

示された。

### 3. Vasopressin により誘導される ubiquitin-specific protease 10 (Usp10) は ENaC を活性化する<sup>7)</sup>。

ENaC の PY モチーフの WW ドメインにユビキチン-リガーゼ Nedd4-2 が結合することにより、ENaC が膜から離れ活性を失うことはよく知られている。このユビキチン化は可逆的な過程であることがわかってきている。アルドステロンにより誘導される Usp2-45 (ubiquitin-specific protease 2-45) は ENaC を脱ユビキチン化し、ENaC 活性を亢進させることが示されている。Vasopressin を投与すると ENaC の膜上の発現の亢進とともに、Usp10 と SNX3 (sorting nexin 3) の発現が認められた。Usp10 の作用は Usp2-45 とは異なり直接作用ではなく、SNX3 の degradation を低下させ ENaC の膜上への輸送を助けているものと考えられる。

### 3. ENaC の inhibitory domain の同定<sup>8)</sup>

ENaC のサブユニットには、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ があり、それぞれ2つの膜貫通ドメインと大きな細胞外ループから構成されている。 $\gamma$ サブユニットでは、セリンプロテアーゼのプロスタシンとフーリンにより切断され、43 アミノ酸が切り取られて ENaC の活性が亢進することが示されている。 $\alpha$ サブユニットには、フーリンにより切断される部位が2つあり、その間の26 アミノ酸が切り取られて ENaC の活性が亢進することも示された。合成した26 アミノ酸を投与すると可逆的に ENaC の活性が抑制されている。この合成アミノ酸存在下でもアミロライドは効果が認められるので、作用部位は異なると考えられる。

この26 アミノ酸のどの部位が ENaC の抑制に重要かについて、deletion mutant を作製検討し、8 アミノ酸が必須であることが示された。これに対応する合成ペプチドは ENaC 活性を有意に抑制している。この8 アミノ酸が血中に存在するか否かは不明である(図2)。

### 4. Vasopressin による AQP-2 の Ser-264 のリン酸化が細胞内輸送に関連する<sup>9)</sup>。

Vasopressin により水チャネル(AQP-2)が細胞膜に移動することが水輸送に必須であり、多くの成績により、AQP-2 の C 端の ser-256 のリン酸化が管腔膜への AQP-2 の輸送に必須であることが示されている。AQP-2 の C 端には、ser-256 以外にも ser-261, ser-264, ser-269 などにリン酸化部位がある。

Vasopressin により ser-264 がリン酸化された AQP-2 (pS264-AQP-2)は、短時間では(15分)血管側と管腔膜ともに認められ、60分後には大部分が管腔膜と endosome に局在した。血管側に認められた pS264-AQP-2 が輸送されて局在したのか、そこにあった AQP-2 がリン酸化され、のち管腔膜に輸送されたのか詳細は不明であるが、ser-264 のリン酸化が細胞内輸送に関連していることが示された。

## 文 献

- Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, Knott SA, Kolcic I, Polasek O, Graessler J, Wilson JF, Marinaki A, Riches PL, Shu X, Janicijevic B, Smolej-Narancic N, Gorgoni B, Morgan J, Campbell S, Biloglav Z, Barac-Lauc L, Pericic M, Klaric IM, Zgaga L, Skaric-Juric T, Wild SH, Richardson WA, Hohenstein P, Kimber CH, Tenesa A, Donnelly LA, Fairbanks LD, Aringer M, McKeigue PM, Ralston SH, Morris AD, Rudan P, Hastie ND, Campbell H, Wright AF. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 437-442.
- Faroqui S, Levi M, Soleimani M, Amlal H. Estrogen down-regulates the proximal tubule type IIa sodium phosphate cotransporter causing phosphate wasting and hypophosphatemia. *Kidney Int* 2008 ; 73 : 1141-1150.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 619-628.
- Aoyagi T, Izumi Y, Hiroshima M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F100-F107.
- Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-o M, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *PNAS* 2008 ; 105 : 9805-9810.
- San-Cristobal P, Ponce-Coria J, Vázquez N, Bobadilla NA, Gamba G. WNK3 and WNK4 amino-terminal domain defines their effect on the renal  $\text{Na}^+$ -Cl-cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F1199-F1206.
- Boukroun S, Ruffieux-Daidié D, Vitagliano JJ, Poirot O, Charles RP, Lagnaz D, Firsov D, Kellenberger S, Staub O. Vasopressin-inducible ubiquitin-specific protease 10 increases ENaC cell surface expression by deubiquitylating and stabilizing sorting nexin 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F889-F900.
- Carattino MD, Passero CJ, Steren CA, Maarouf AB, Pilewski JM, Myerburg MM, Hughey RP, Kleyman TR. Defining an inhibitory domain in the alpha-subunit of the epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 294 : F47-F52.
- Fenton RA, Moeller HB, Hoffert JD, Yu MJ, Nielsen S, Knepper MA. Acute regulation of aquaporin-2 phosphorylation at Ser-264 by vasopressin. *PNAS* 2008 105 : 3134-3139 ;