

発表番号 63 (0332)

## 食塩感受性高血圧におけるパラセリン-1の関与

(パラセリン-1の発現に対する食塩摂取の影響とパラセリン-1発現細胞株の樹立)

助成研究者：五十里 彰（静岡県立大学薬学部）

腎糸球体でろ過されたマグネシウムは大部分がヘンレ上行脚で再吸収され、細胞内や血漿中のマグネシウム濃度が厳密にコントロールされている。我々は食塩感受性高血圧発症ラットの尿中マグネシウム排出量が増加することを報告しており、マグネシウム再吸収の低下が高血圧の発症や進展に影響すると考えている。しかしマグネシウム輸送体が不明であったためにそのメカニズムの解明が困難であった。最近、低マグネシウム（および低カルシウム）血症患者において、ヘンレ上行脚に存在するパラセリン-1というタンパク質に変異が起こっていることが報告された。パラセリン-1は上皮細胞のタイトジャンクションに分布し、マグネシウムとカルシウムの再吸収を担うと示唆されているが、直接の結果は示されていない。本研究では、食塩感受性高血圧発症ラットのパラセリン-1の発現量に変化しているのか、または変異体が発現しているのかを調べた。さらに、パラセリン-1の機能解析に必要とされる発現細胞株を樹立し、マグネシウム輸送能を確認した。

正常および食塩感受性高血圧発症ラットの腎臓からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法にて発現量の比較を試みたが、パラセリン-1の市販抗体が反応しなかったために、明白な結果は得られなかった。また、RT-PCR法により mRNA の発現量を比較したが、高血圧の影響は見られなかった。そこで高血圧によりパラセリン-1の調節機構が影響を受けると仮定し、その調節因子を探索するためにパラセリン-1発現細胞株を樹立した。ラットパラセリン-1 cDNA を FLAG 融合ベクターに組み込み、内因性のパラセリン-1を発現していない MDCK 細胞に形質導入した。免疫沈降法により、パラセリン-1がタイトジャンクションの裏打ちタンパク質である ZO-1 と会合していることを確認した。さらに、免疫蛍光染色法により、パラセリン-1が ZO-1 とタイトジャンクションに共局在することが明らかになった。次に、パラセリン-1の機能解析を試みた。上皮膜間電気抵抗値を測定したところ、パラセリン-1の発現により抵抗値の増加が見られた。これはパラセリン-1によりタイトジャンクションのバリアー機能が増加したためと推測される。パラセリン-1の二価カチオン輸送機能を調べるにあたり、マグネシウムの輸送量を直接測定するのが困難であるため、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を使用した。管腔側から血管側への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送量は時間依存的に増加した。管腔側のマグネシウム濃度を増加させたところ  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送が阻害されたことから、パラセリン-1を介してカルシウムとマグネシウムが競合的に輸送されると示唆された。



6

助成番号 0332

## 食塩感受性高血圧におけるパラセリン - 1 の関与

(パラセリン - 1 の発現に対する食塩摂取の影響とパラセリン - 1 発現細胞株の樹立)

五十里 彰 (静岡県立大学薬学部)

## 1. 研究目的

マグネシウムは体内において生物学的に重要な作用を持ち、生命維持の上で必要不可欠な電解質である。食物や飲料水中のマグネシウムは小腸で吸収され、イオン型のマグネシウムは腎系球体でろ過される。大部分はヘンレ上行脚で再吸収され、細胞内や血漿中のマグネシウム濃度が厳密にコントロールされている。これまでの疫学的調査やモデル動物を用いた実験から、マグネシウム摂取と高血圧との関連が指摘されていた。我々は食塩感受性高血圧発症ラットの尿中マグネシウム排出量が増加することを報告しており (Ikari *et al.*, 2002)、マグネシウム再吸収の低下が高血圧の発症や進展に影響すると考えている。しかしマグネシウム輸送体の実体が不明であったために、マグネシウムの再吸収がどのように調節されているのか、そしてマグネシウムと高血圧との関連を解明することが困難であった。最近、家族性低マグネシウム血症高カルシウム尿症 (HHS) 患者において、ヘンレ上行脚に存在するパラセリン - 1 というタンパク質の変異体が発現していることが報告された (Simon *et al.*, 1999)。そのためパラセリン - 1 はマグネシウムとカルシウムの再吸収を担うと示唆されているが、直接の結果は示されていない。

パラセリン - 1 はタイトジャンクションを構成するタンパク質であるクローディンファミリーに属している (別名: クローディン - 16)。235 個のアミノ酸からなる 4 回膜貫通型の立体構造を有し、細胞内のカルボキシ末端側では PDZ 結合モチーフと呼ばれる配列を介して、裏打ちタンパク質である ZO-1 と結合していると考えられている (Fig. 1, Fig. 2)。ZO-1 はクローディンなどのタンパク質と細胞骨格系タンパク質との橋渡しをしており、タイトジャンクションの領域につなぎ止める役割を持つ。HHS 患者の一部では、PDZ 結合モチーフに変異が起こっていることも報告されており、この配列を含めた構造と機能との関係を解明する必要がある。

本研究では、食塩感受性高血圧発症ラットの腎臓において、パラセリン - 1 の発現量が増加しているのか、または変異体が発現しているのかを調べた。また、パラセリン - 1 の機能解析に必要とされる発現細胞株を樹立し、マグネシウム輸送能を検討した。



## 2. 研究方法

### 2.1. RT-PCR および cDNA の分離精製

Wistar 系ラット、Dahl salt-resistant および Dahl salt-sensitive ラットの腎臓を摘出し、ISOGEN にて全 RNA を抽出した。One-step RT-PCR kit を用いて、パラセリン - 1 の cDNA を増幅した。センスおよびアンチセンスプライマーとして、5'-CGATATCCATGAAGGATCTTCTTC-3 と 5'-CCGGTCGACTTACACTCTCGTGTC-3' を使用し、それぞれ EcoRV と Sal I の制限酵素部位を付加してある。PCR 産物を 1.5% アガロース L に電気泳動し、推定サイズの 720 bp の DNA 断片を確認した。目的の DNA 断片を切り出し、ゲル抽出キットを用いて精製した。

### 2.2. DNA 配列の確認

精製した DNA 断片を pGEM-T ベクターに組み込み、大腸菌(DH5 $\alpha$ )に形質転換した。ブルーホワイトアッセイにてインサートが入ったプラスミドを持つ大腸菌のコロニーを選択し、制限酵素処理にてインサートのサイズを確認した。その後、ABI PRISM 3700 DNA analyzer にて DNA 配列を調べた。

### 2.3. パラセリン - 1 のサブクローニング

パラセリン - 1 の cDNA を pGEM-T ベクターから制限酵素処理にて切断し、哺乳類細胞発現ベクターである pCMV-Tag2A ベクターにサブクローニングした。

### 2.4. パラセリン - 1 の MDCK 細胞への安定発現

トランスフェクションの前日に MDCK 細胞を 35 mm dish に播種した。Lipofectamin 2000 を用いて、プラスミド DNA (パラセリン - 1-pCMV-Tag2A) を MDCK 細胞に導入した。G418 耐性コロニーを単離し、ウエスタンブロット法にてタンパク質の発現を確認した。パラセリン - 1 の発現が見られた細胞をストックした。

### 2.5. SDS-PAGE とウエスタンブロット法

MDCK 細胞を lysis buffer に溶解後、超音波で細胞膜を破壊し、遠心処理により核画分を除去した。タンパク質濃度が 30 $\mu$ g となるようにサンプルを調製し、10% または 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写後、一次抗体および二次抗体を反応させた。バンドの検出には、ECL ウエスタンブロットティング検出試薬およびオートラジオグラフィー用フィルムを使用した。

## 2.6. 蛍光免疫染色

MDCK 細胞を 3% パラホルムアルデヒドで固定後、0.3% Triton X-100 を含む PBS にて浸透化した。ブロッキング (VECTA SHIELD) 後、一次抗体および二次抗体を反応させた。二次抗体には、FITC または TexasRed 標識した抗体を使用した。蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss) を使用した。

## 2.7. 免疫沈降

Lysis buffer に溶解した細胞膜画分を、Protein G セファロースとマウス抗 FLAG 抗体と混合し、4 で 4 時間回転混和した。4 回の洗浄後、最終的にセファロースに結合したタンパク質を sample buffer にて溶出した。10%ゲルで SDS-PAGE 後、上述のように抗 ZO-1 抗体を反応させ、ウエスタンブロットを行った。

## 2.8. 上皮膜間電気抵抗値の測定と $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 輸送実験

トランスウェルに MDCK 細胞を培養し、Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore) を使用して、上皮細胞間電気抵抗値 (TER) を測定した。抵抗値が安定した細胞を用いて、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  輸送実験を行った。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  輸送溶液をトランスウェルの上層に加え、指定時間後に下層の溶液を採取した。クリアゾールを混合し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

## 3. 研究結果

### 3.1. パラセリン - 1 の発現に対する食塩摂取の影響

Dahl salt-resistant および Dahl salt-sensitive ラットを高食塩食で 2 週間飼育後、腎臓から RNA を抽出した。パラセリン - 1 に対するプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、推定サイズ 720 bp の DNA 断片が増幅された。半定量性 PCR を行ったが、パラセリン - 1 mRNA の発現に対する食塩摂取の影響は見られなかった。次に、腎臓ホモジネートを調製し、パラセリン - 1 タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて確認した。しかし、サンタクルーズ社より購入したパラセリン - 1 抗体は反応しなかったために、タンパク質レベルでの発現量を調べることはできなかった。

### 3.2. パラセリン - 1 の変異体の発現

これまでに HHS 患者においてパラセリン - 1 の変異体が発現していることが報告されている。食塩摂取によりパラセリン - 1 の変異体が発現するのかを検討した。Dahl salt-sensitive ラットの腎臓から RNA を抽出後、RT-PCR により 720 bp の cDNA が得られた。2 匹のラットから得た 6 個の cDNA クローンの塩基配列を調べたところ、全て正

常なパラセリン - 1 と同一の配列であった。以上のことから、食塩摂取によりパラセリン - 1 の発現量は変化せず、変異体が優位に発現する可能性も低いと考えられた。次に、パラセリン - 1 の細胞内調節因子が食塩摂取により影響を受けていると仮定し、調節因子を探索するために必要な細胞の構築を行った。

### 3.3. パラセリン - 1 の安定発現株の樹立

パラセリン - 1 cDNA を哺乳類発現ベクターの pCMV-Tag2A ベクターにサブクローニングした。pCMV-Tag2A ベクターは目的のタンパク質に FLAG タンパク質を融合して発現するベクターである。DNA 配列を調べて、FLAG とパラセリン - 1 のフレームがずれていないことを確認した。また、これまでに報告されているラットパラセリン - 1 と DNA 配列が一カ所異なっており、アミノ酸に翻訳すると 25 番目のアルギニンがトリプトファンになった。ヒトやウシのパラセリン - 1 も 25 番目がトリプトファンであることから、我々の結果は正しいと思われる。そこで得られたプラスミドを MDCK 細胞に形質導入し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現を確認した (Fig. 3)。予想されたタンパク質のサイズは 23 kDa であり、形質導入していない細胞ではバンドは検出されなかったが、発現細胞ではバンドが観察された。内在性のタイトジャンクション構成タンパク質であるオクルディンや ZO-1 の発現量を調べたところ、コントロール細胞と発現細胞で差は見られなかった。以上のことから、FLAG を融合したパラセリン - 1 タンパク質を発現する細胞の樹立に成功した。

### 3.4. パラセリン - 1 と ZO-1 の結合

パラセリン - 1 がタイトジャンクションに分布し機能を有するためには ZO-1 と結合する必要があると考えられる。そこで MDCK 細胞に内在する ZO-1 とパラセリン - 1 が結合しているのかを免疫沈降法により確認した。FLAG 抗体で免疫沈降したサンプルでは ZO-1 のバンドが検出されたが、マウス IgG で免疫沈降したサンプルでは ZO-1 のバンドが検出されなかった。このことから強制発現させたパラセリン - 1 は内在性の ZO-1 と結合していることが明らかになった。

### 3.5. パラセリン - 1 の細胞内分布

パラセリン - 1 の細胞内分布を調べるために、FITC 標識した二次抗体を用いて免疫染色を行った。オクルディンと ZO-1 の染色には、Texas-Red 標識した二次抗体を用いた。オクルディンと ZO-1 の赤色は細胞が接着する部位に強く見られ、パラセリン - 1 の緑色も同じ部位に見えた。両者の蛍光を重ね合わせると黄色になったことから、パラセリン - 1 とオクルディンと ZO-1 は同じ領域、つまりタイトジャンクションに局在することが明らかになった (Fig.4)。

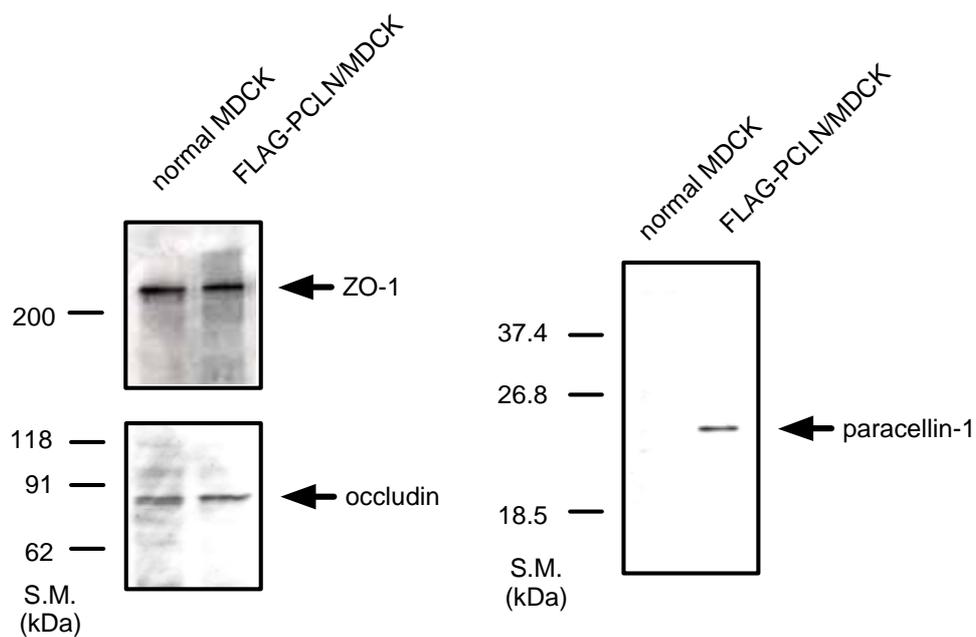


Fig. 3 Expression of paracellin-1, occludin and ZO-1

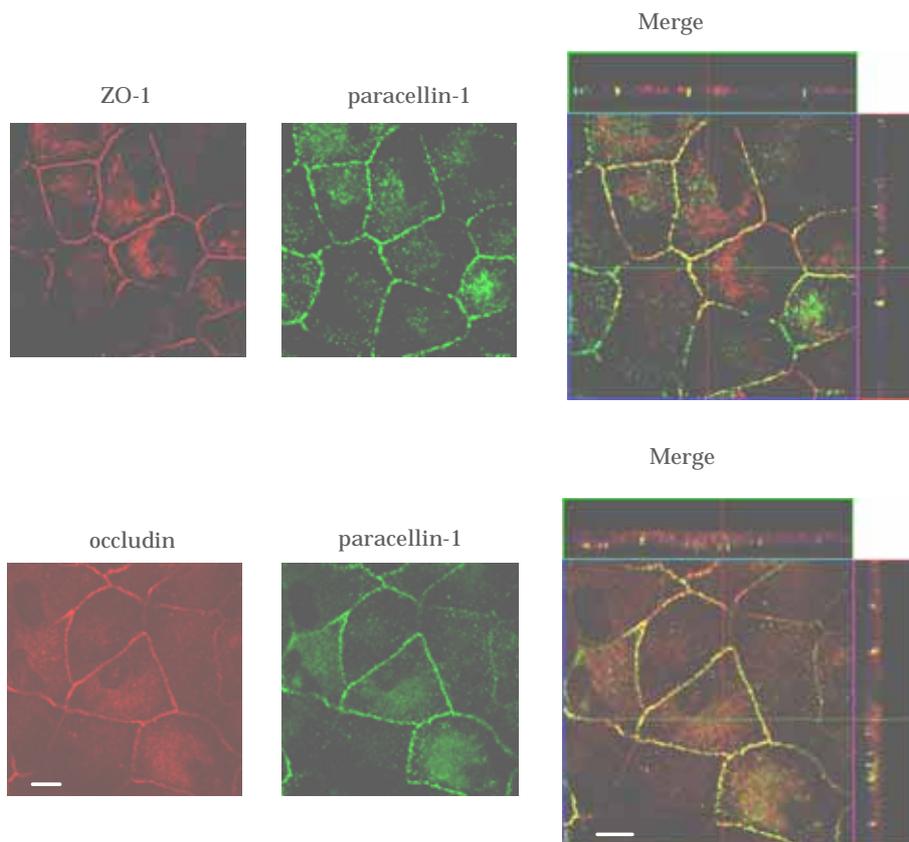


Fig. 4 Distribution of paracellin-1, occludin and ZO-1

### 3.6. パラセリン - 1 の発現による TER の増加

パラセリン - 1 のカルシウムやマグネシウム輸送機能を測定するためには、細胞間に隙間のない、十分にコンフルエントな状態で実験を行う必要がある。これらの理由から、同数の細胞をトランスウェルにまいて TER の測定を開始した。2 日目までは両者に差はあまり見られなかったが、3 日目から 4 日目にかけて両者とも抵抗値が大きくなり、特にパラセリン - 1 を発現した細胞の方が、TER が大きくなった (Fig.5)。その後、播いた直後よりも高い値でプラトーになったので、この状態の細胞を機能解析に使用した。

### 3.7. パラセリン - 1 による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 輸送の増加

パラセリン - 1 のマグネシウム輸送機能を測定するにあたり、マグネシウムのアイソトープは非常に半減期が短いため使用が困難である。そこで  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を用いたアイソトープ実験によってカルシウムおよびマグネシウム輸送機能について検討した。コントロール細胞でも管腔側から血管側への時間依存的な  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送が観察されたが、パラセリン - 1 を発現した細胞の方が輸送量は大きかった (Fig.6)。血管側から管腔側への輸送は、コントロール細胞とパラセリン - 1 を発現した細胞で差は見られなかった。さらに、管腔側のマグネシウム濃度を増加させることにより、競合阻害がおこるのかを調べたところ、コントロール細胞での  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送はマグネシウム濃度に影響を受けなかったが、パラセリン - 1 を発現した細胞では、マグネシウム濃度の増加に伴って  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送が阻害され、コントロール細胞の値に近くなった (Fig.7)。以上のことから、パラセリン - 1 はタイトジャンクションのバリアー機能を増強するとともに、カルシウムおよびマグネシウムの輸送に参与することが明らかになった。

## 4. 考察

上皮細胞のタイトジャンクションにはオクルディンやクローディンファミリーといったタンパク質が存在しており、外界と体内との境界を形成する。これまでタイトジャンクションはバリアーとしての役割を担うだけだと考えられていたが、選択的にイオンを通すチャネルとしても働くことが示されてきた。例えば、クローディン 4 はナトリウムの透過性を低下させクローディン 2 は一価カチオンの透過性を増加させる (Itallie *et al.*, 2001; Amasheh *et al.*, 2002)。さらにクローディン 15 の細胞外領域に存在する負電荷を持ったアミノ酸を正電荷のアミノ酸に置換すると、ナトリウム透過性が減少するとともにクロライド透過性の増加することが示された (Colegio *et al.*, 2002)。クローディンファミリーに属するパラセリン - 1 (クローディン 16) はマグネシウムおよびカルシウムの再吸収を担うと示唆されている。哺乳類動物のマグネシウム輸送体は見つかっていないことから、パラセリン - 1 がマグネシウムを輸送することが実証できるならば、今後のマグネシウム輸送体に関する研究において有用であると考えられる。

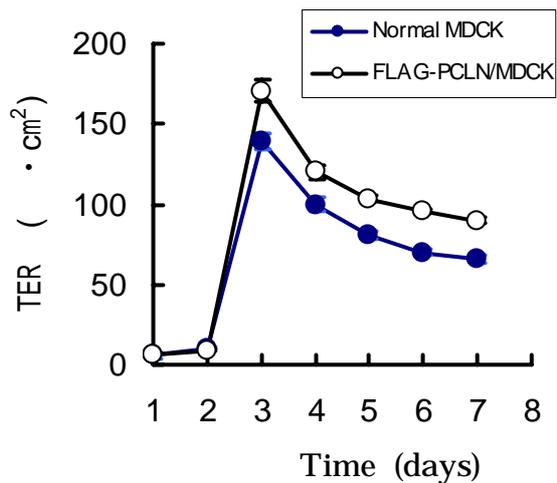


Fig. 5 Increase of TER by expression of paracellin-1

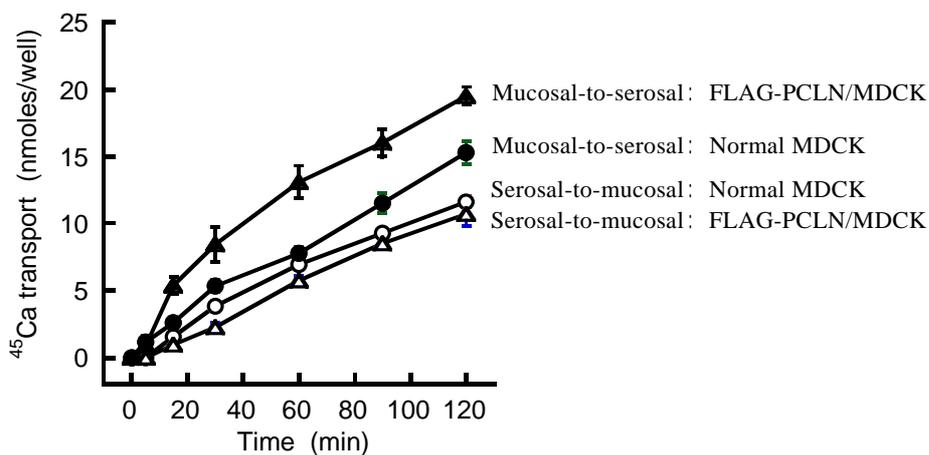


Fig. 6 Increase of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> transport by expression of paracellin-1

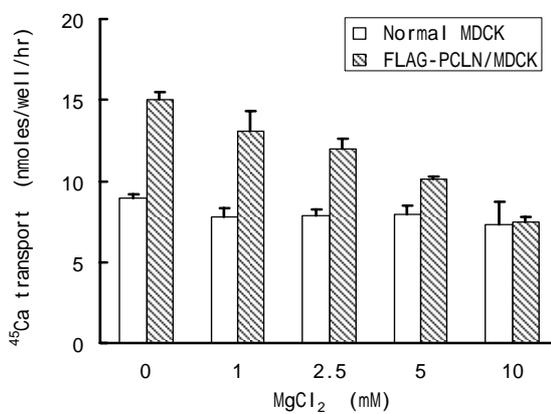


Fig. 7 Inhibition of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> transport by magnesium

マグネシウムは生命維持に必要な電解質であるとともに、体内貯留の異常が高血圧などの疾患の発症・進展に関係していると示唆されている。しかし、高血圧モデル動物にマグネシウムを投与しても血圧に対してあまり効果が見られないという報告もあり、因果関係がはっきりしていない。これまでに私は食塩感受性高血圧発症ラットにおいて、マグネシウムの尿中排泄量が増加する知見を得ており、腎臓におけるマグネシウム再吸収が低下していると示唆した。高血圧とマグネシウムとの因果関係を証明するためには、マグネシウム輸送体の実体を突き止め、その発現や調節機構を明らかにする必要がある。本研究では、パラセリン - 1 の発現量に対する食塩感受性高血圧の影響を調べたが、mRNA レベルでは影響がなさそうであり、タンパク質レベルでは市販の抗体がパラセリン - 1 に反応しなかったために、発現量に変化しているのか解明することができなかった。

次にパラセリン - 1 の調節機構を調べるために、パラセリン - 1 発現細胞株を樹立した。パラセリン - 1 を強制発現させることにより、内在性のオクルディンや ZO-1 の発現量はほとんど変化しなかったことから、タイトジャンクションに存在するタンパク質が密になっていると考えられる。これを裏付けるように、TER の測定では発現していない細胞に比べて抵抗値が高くなった。また、パラセリン - 1 などのタイトジャンクションタンパク質は、細胞内に裏打ちタンパク質として ZO-1 などと結合する必要がある。私の樹立した細胞でも、パラセリン - 1 は ZO-1 と結合していることを確認した。この ZO-1 との結合には、パラセリン - 1 のカルボキシ末端の PDZ 結合モチーフが重要であると考えられている。他のクローディンも PDZ 結合モチーフを有しており、タイトジャンクションにタンパク質が発現するために必要な配列であるだろう。最近、HHS 患者の一部には PDZ 結合モチーフに変異が起こっていることも報告されており、この配列の意義を細胞レベルで明らかにする必要がある。

タイトジャンクションを介したイオン透過性の研究は、まだ始まったばかりであり報告がない。パラセリン - 1 を発現させた細胞では、管腔側から血管側への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送が増加し、逆方向の輸送は影響を受けなかった。このことからパラセリン - 1 を介した二価カチオンの輸送は一方方向性だと考えられる。さらに  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の輸送はマグネシウムの添加により阻害されたことから、カルシウムとマグネシウムがパラセリン - 1 によって形成された二価カチオン選択性の“孔”を競合的に通過すると示唆される。これまでマグネシウムを輸送するタンパク質は哺乳類動物において全く解明されていなかったが、パラセリン - 1 が傍細胞輸送に関与することが明らかになった。最近我々はマグネシウムの経細胞輸送に関わると推測されるナトリウム依存性マグネシウム排出機構が、炎症性メディエーターのアラキドン酸によって活性化されることを報告した (Ikari *et al.*, 2003)。この経細胞輸送に関わるタンパク質は明らかにされていないが、マグネシウムの認識部位はパラセリン - 1 に似ていると推測される。上皮細胞を介したマグネシウムの輸送がどのように調節されているのか、総合的に検討する必要がある。

## 5. 今後の課題

高血圧とマグネシウム再吸収との関係を明らかにするために、パラセリン - 1 タンパク質の発現量変化を調べる必要がある。そのため、パラセリン - 1 の特異的抗体を作製する必要がある。また、パラセリン - 1 の細胞内調節機構を解明し、高血圧の影響を検討する必要がある。パラセリン - 1 の発現細胞株の樹立に成功し、機能の評価系を確立したことから、調節機構を調べることは比較的容易であるだろう。これまでに明らかにした経細胞輸送の調節機構とパラセリン - 1 の調節機構が異なるのかを調べ、両者がどのように結びついているのか検討する必要がある。現代社会において、ストレスや食生活の変化がマグネシウム摂取量を減少させている。マグネシウムは骨組織や筋肉などに貯蔵されており、血中濃度が減少してもすぐに補充されるために、摂取不足に気がつきにくい。マグネシウムの吸収機構を明らかにし、その生理作用をもう一度見直すことが重要だと思われる。

## 6. 文献等

- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D., and Fromm, M. (2002) *J. Cell Sci.* 115, 4969-4976
- Colegio, O. R., Itallie, C. M. V., McCrea, H. J., Rahner, C., and Anderson, J. M. (2002) *Am. J. Physiol.* 283, C142-C147
- Ikari, A., Kano, T., and Suketa, Y. (2002) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 294, 710-713
- Ikari, A., Nakajima, K., Suketa, Y., Harada, H., and Takagi, K. (2003) *Biochim. Biophys. Acta.* 1618, 1-7
- Itallie, C. V., Rahner, C., and Anderson, J. M. (2001) *J. Clin. Invest.* 107, 1319-1327
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., and Lifton, R. P. (1999) *Science* 285, 103-106

Involvement of paracellin-1 in salt-sensitive hypertension  
(Effect of high-salt intake on paracellin-1 expression and establishment of  
paracellin-1-expressing cells)

Akira Ikari

University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences

Most magnesium filtered through the glomerular membrane is reabsorbed in the thick ascending limb (TAL) of Henle loop. So far, we have been reported that urinary magnesium concentration in Dahl salt-sensitive rats is higher than that in normal rats. We hypothesized that the decrease of magnesium reabsorption affects crisis and development of hypertension. It is, however, difficult to clarify the mechanisms of urinary magnesium loss because magnesium transporter has not been identified. Recently, Simon *et al.* identified a new protein, named paracellin-1. This protein is expressed in TAL tight junctions and might play a critical role in the control of paracellular permeability for magnesium and calcium. In the present study, we determined whether the expression level of paracellin-1 is changed in Dahl salt-sensitive rats. Furthermore, we established the cells stably expressing paracellin-1 and examined the function of paracellin-1.

The expression level of paracellin-1 protein was examined by western blotting. However, there is no signal, suggesting that the commercial antibody did not react with paracellin-1. Next, paracellin-1 mRNA was semi-quantified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The mRNA levels were same between salt-sensitive and resistant rats. We hypothesized that the regulatory factors are affected by hypertension. To clarify the regulatory mechanisms of paracellin-1, we made Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells expressing rat paracellin-1. Paracellin-1 inserted into FLAG-tagged vector was transfected into MDCK cells. Immunoprecipitation showed that paracellin-1 was associated with ZO-1, a peripheral membrane protein. In immunocytochemistry, paracellin-1 was colocalized with ZO-1 in tight junction. Paracellin-1 expression increased the transepithelial electrical resistance, indicating paracellin-1 enhanced the barrier function. Furthermore, transport of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  from apical to basal was increased in time-dependent manner. The addition of magnesium into apical side inhibited the transport of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . These results indicate that paracellin-1 is expressed functionally in tight junction and transports calcium and magnesium competitively.