

発表番号 55 (0525)

食塩摂取による新規マグネシウム輸送体パラセリン-1の機能変化と そのメカニズムの解明 (パラセリン-1のマグネシウム輸送機能に対するリン酸化の影響)

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。食塩感受性高血圧発症ラットにおいて、正常血圧ラットよりも尿中マグネシウム排出量が増加することから、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られる。マグネシウム再吸収には、上皮細胞のタイトジャンクションに発現するパラセリン-1というタンパク質が関与すると示唆されている。一昨年の本財団からの研究助成により、高血圧ラットのパラセリン-1の発現量は変化しておらず、リン酸化セリン量が低下することを発見した。本研究では、パラセリン-1のリン酸化部位を同定し、リン酸化とマグネシウム輸送機能との関連について検討した。

FLAG融合ベクターにラットパラセリン-1 cDNAをサブクローニング後、MDCK細胞に安定発現した。パラセリン-1はタイトジャンクションに分布し、パラセリン-1を発現しない細胞に比べて上皮膜間電気抵抗値(TER)が増加した。さらに、管腔側から血流側へのマグネシウム輸送量が増加した。無刺激状態においてパラセリン-1のセリン残基がリン酸化されており、プロテインキナーゼA

(PKA)阻害剤のH-89処理により、セリンリン酸化が阻害された。パラセリン-1は12個のセリン残基を有し、9個が細胞外、3個が細胞内のカルボキシ側領域に含まれる。カルボキシ側領域のcDNAをGST融合ベクターに組み込み、大腸菌でタンパク質を作成した。同様にセリン残基をアラニンに置換した変異体を作成した。これらのタンパク質とPKAをインキュベーションしたところ、セリン-217変異体のみリン酸化が阻害されたことから、パラセリン-1のリン酸化には217番目のセリンが関与することが明らかになった。MDCK細胞に3種類のセリン変異体を発現したところ、セリン-217変異体のみTERとマグネシウム輸送能の増加が見られなかった。蛍光免疫染色により細胞内局在を調べると、野生型をH-89処理した細胞と同様に、セリン-217変異体はタイトジャンクションから解離し、リソソームへ移行した。

以上より、パラセリン-1はPKAによりリン酸化され、タイトジャンクションに分布することによりマグネシウム輸送を担うことが明らかになった。高血圧ラットでは、リン酸化が阻害されているためにパラセリン-1を介したマグネシウム再吸収が低下していると示唆される。

助成番号 0525

食塩摂取による新規マグネシウム輸送体パラセリン-1 の機能変化と そのメカニズムの解明 (パラセリン-1 のマグネシウム輸送機能に対するリン酸化の影響)

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ミネラルである。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糸球体でろ過される。大部分はヘンレ上行脚の傍細胞経路を介して再吸収され、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病態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。近年、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、ヘンレ上行脚のタイトジャンクションに発現するパラセリン-1 というタンパク質の変異体が報告された (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)。ZO-1 はクローディンなどのタイトジャンクション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いる。我々は、PDZ 結合モチーフの変異により、パラセリン-1 がタイトジャンクションから解離し、二価カチオンの輸送量が低下することを報告している (Ikari *et al.*, 2004)。

一昨年の本財団からの研究助成により、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 の発現量は変化しないが、リン酸化セリン量が減少することを発見した。また、パラセリン-1 を安定発現した培養細胞の

樹立に成功した。本研究では、パラセリン-1 安定発現細胞を用いて、パラセリン-1 のリン酸化部位を同定し、リン酸化とマグネシウム輸送機能との関連について検討した。

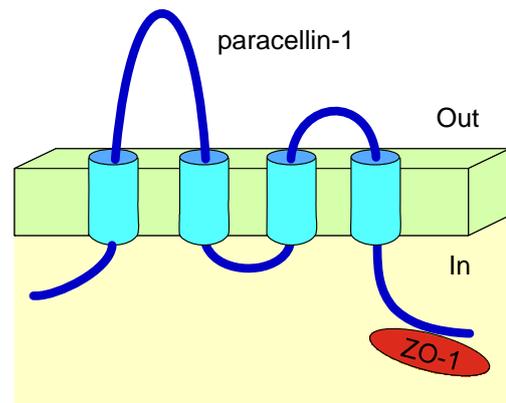


Fig. 1 Schematic model of paracellin-1

2. 研究方法

2.1 パラセリン-1 の MDCK 細胞への安定発現と細胞培養

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で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 3 クローン凍結保存した。MDCK 細胞は、5% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養し、3~4 日毎に継代した。

2.2 膜画分の調製と免疫沈降

コンフルエントの状態まで培養した MDCK 細胞をセルスクレーパーで剥がし、PBS に懸濁した。遠心後、沈澱を RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl) に溶解し、20 秒間ソニケーション処理を行った。遠心後、上清を回収して全膜画分とした。全膜画分をプロテイン G セファロースビーズと抗 FLAG 抗体と混合し、4°C で 2 時間回転混和した。4 回の洗浄後、最終的にセファロースビーズに結合したタンパク質を sample buffer で溶出した。

2.3 SDS-PAGE とウエスタンブロット

7.5%、10% または 15% 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。ブロッキングには 5% スキムミルクを使用した。ただし、リン酸化抗体を使用する場合は、2% ウシ血清アルブミンでブロッキングした。バンドの検出には、ECL ウエスタンブロットインク検出試薬およびオートラジオグラフィ用フィルムを使用した。

2.4 上皮膜間電気抵抗値の測定とマグネシウム輸送実験

MDCK 細胞をトランスウェルに培養し、Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore) を使用して、上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。タイトジャンクションが障害を受けていないことを確認するために、FITC-デキストラン (分子量 4,000) の透過性を測定した。抵抗値が安定した細胞を用いて、マグネシウム輸送実験を行った。10 mM マグネシウムを含む transport buffer (140 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM Hepes, 25 mM glucose) 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。マグネシウムキレート剤の XB-1 を用いてマグネシウム濃度を定量化した。

2.5 Ussing chamber を用いた電気生理学的測定

MDCK 細胞を 1 cm² のフィルターに培養し、フィルターを Ussing chamber に据え付けた。Ussing chamber は 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 10 mM Hepes を含む溶液で満たした。希釈電位は、Ussing chamber の片側の溶液の NaCl 濃度を 72.5 mM に減らして測定した (浸透圧をそろえるために 145 mM mannitol を添加)。イオン透過比 (η) は、Goldman-Hodgkin-Katz の式を用いて計算した。ナトリウム (P_{Na}) と塩素 (P_{Cl}) の透過性は、Kimizuka-Koketsu の式を用いて計算した。

$$P_{Na} = (G/C)(RT/F^2)\eta/(1+\eta)$$

$$P_{Cl} = (G/C)(RT/F^2)/(1+\eta)$$

$$\eta = P_{Na} / P_{Cl}$$

(G: 単位面積あたりのコンダクタンス, C: 塩化ナトリウム濃度, R: 気体定数, F: ファラデー定数)

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

顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss) を使用した。

2.7 プルダウンアッセイ

パラセリン-1 cDNA のカルボキシ側領域を GST ベクターにサブクローニングした。Site-directed mutagenesis kit を用いて、S208A, S213A, S217A 変異体を作成した。BL21 大腸菌に形質転換し、GST 融合タンパク質を調製した。In vitro リン酸化反応では、150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 100 mg GST fusion タンパク質, 0.2 mM ATP, 20 U/ml PKA 触媒サブユニットを混合し、30°C で 1 時間インキュベーションした。グルタチオンセファロースビーズを用いて GST 融合タンパク質を沈澱し、sample バッファーで溶出した。

3. 研究結果

3.1 PKA によるパラセリン-1 のリン酸化

イヌ腎臓由来 MDCK 細胞を用いて、パラセリン-1 の発現をウエスタンブロットにより確認した。FLAG タグを融合したパラセリン-1 ベクターを導入していない細胞では、抗パラセリン-1 抗体によりバンドが検出されなかったことから、MDCK 細胞には内在性のパラセリン-1 が発現していないことが明らかになった (Fig. 2 A)。パラセリン-1 発現細胞においては、抗 FLAG 抗体と抗パラセリン-1 抗体でパラセリン-1 タンパク質の発現を確認した (Fig. 2 A, B)。外因性のパラセリン-1 の発現により、内在性タイトジャンクション構成タンパク質のオクルディン、クローディン-1、クローディン-4、ZO-1 の発現量に変化は見られなかった (Fig. 2 C-F)。抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、抗リン酸化セリン抗体でバンドが検出されたことから、無刺激状態でパラセリン-1 のセリン残基はリン酸化されていることが明らかになった (Fig. 2 H)。PKA 阻害剤の H-89 (50 μ M) や myristoylated protein kinase A inhibitor 14-22 amide (PKI, 10 μ M) 処理によりリン酸化のバンドが消失したことから、パラセリン-1 のリン酸化には PKA が関与すると考えられる。これらの阻害剤はパラセリン-1 の発現量を変化させなかった。アデニル酸シクラーゼ阻害剤の 2', 5'-dideoxy adenosine (DDA, 50 μ M) でも同様にリン酸化が阻害され、この DDA の阻害作用は 8-Br-cAMP 処理により回復した (Fig. 2 J)。これらの結果から、パラセリン-1 は生理的条件下において cAMP/PKA 依存性経路によってリン酸化されると示唆される。

3.2 パラセリン-1 によるナトリウム透過性の減少

上皮膜のタイトジャンクションは、イオンの電荷と大きさに対して選択的な透過性を示し、細胞型によりその透過性は異なる。パラセリン-1 を発現した細胞では、発現し

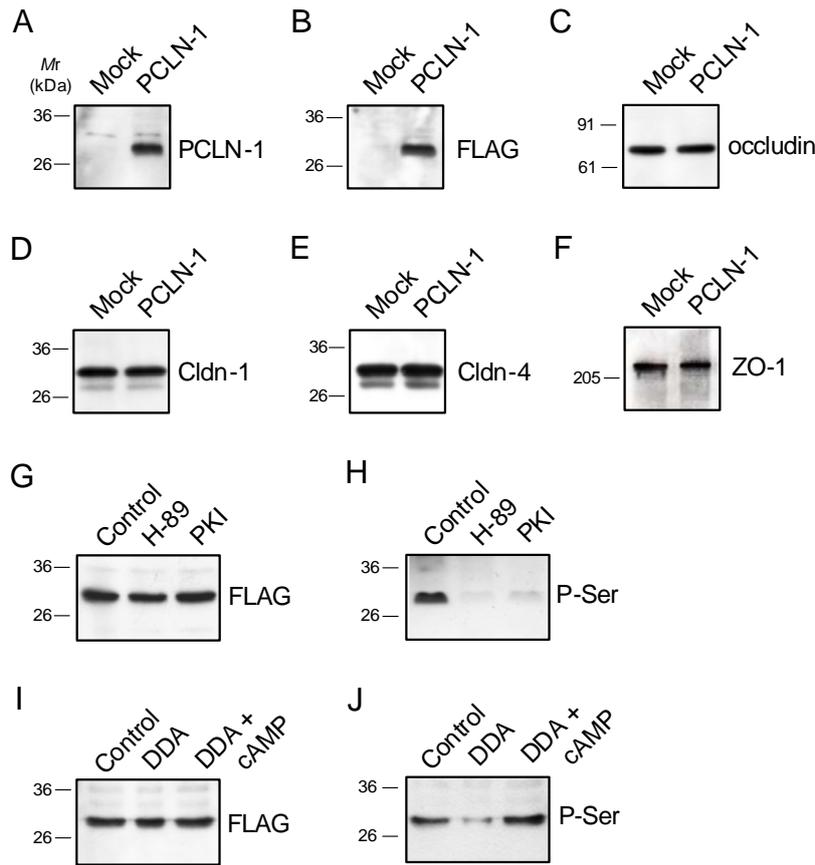


Fig. 2 Phosphorylation of paracellin-1 by cAMP

ない細胞に比べて TER が増加した (Fig. 3)。ナトリウムイオンと塩素イオンに対する透過性を調べたところ、パラセリン-1はナトリウム透過性を減少することが明らかになった。

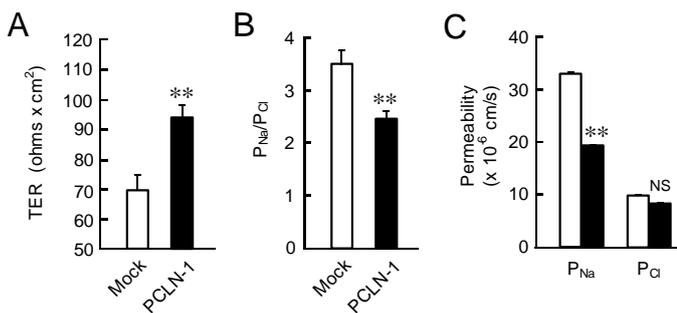


Fig. 3 Effect of paracellin-1 expression on transepithelial permeability

3.3 パラセリン-1の機能に対するリン酸化の影響

パラセリン-1を発現した細胞を H-89、PKI または DDA 処理したところ、発現しない細胞と同程度まで TER が低下した。これらの阻害剤は FITC-デキストランの透過性に影響しなかったことから、タイトジャンクションに障

害を及ぼしたのではないと考えられる。パラセリン-1 発現細胞では、管腔側から血管側へのマグネシウム輸送量が増加したことから、パラセリン-1はマグネシウム輸送体としても機能すると示唆される。PKA 阻害剤は TER に対する効果と同様にマグネシウム輸送量を低下した。以上のことから、パラセリン-1 のバリアー機能やマグネシウム輸送機能を維持するためには、PKA によるリン酸化が必要であると示唆される。

3.4 パラセリン-1と ZO-1 の結合とタイトジャンクションへの局在

パラセリン-1 のカルボキシ末端の TRV 配列を介して、パラセリン-1 は ZO-1 と結合している (Ikari *et al.*, 2004)。ZO-1 はタイトジャンクションタンパク質とアクチン細胞骨格タンパク質の橋渡しの役割を担う。無刺激状態でパラセリン-1 は ZO-1 と結合しているが、PKA 阻害剤処理により両者の結合は阻害された。蛍光免疫染色において、パラセリン-1 は ZO-1 と共にタイトジャンクションに局在した (Fig. 4)。PKA 阻害剤処理により、ZO-1 の細胞内分布に変化はなかったが、パラセリン-1 は細胞質へと移行した。以上のことから、PKA によるリン酸化

がパラセリン-1 と ZO-1 との結合、そしてタイトジャンクションへの局在に深く関与することが明らかになった。

3.5 PKA によるリン酸化部位の同定

ラットパラセリン-1 は、ヒト、ウシ、マウスのホモログと比較して、91、88、99% という高い相同性を示す。パラセリン-1 は 12 個のセリン残基を含み、9 個は細胞外に位置し、3 個は細胞内のカルボキシ側領域 (Ser208, Ser213,

Ser217) に位置する。これら 12 個のセリン残基は、ほ乳類のパラセリン-1 ホモログ間で完全に保存されている。パラセリン-1 の細胞内カルボキシ側領域を GST に融合し、大腸菌 BL21 でタンパク質を作成した。S208A と S213A 変異体は野生型と同様に活性型 PKA 触媒サブユニットによってリン酸化されたが、S217A 変異体はリン酸化されなかった (Fig. 5 A, 5 B)。

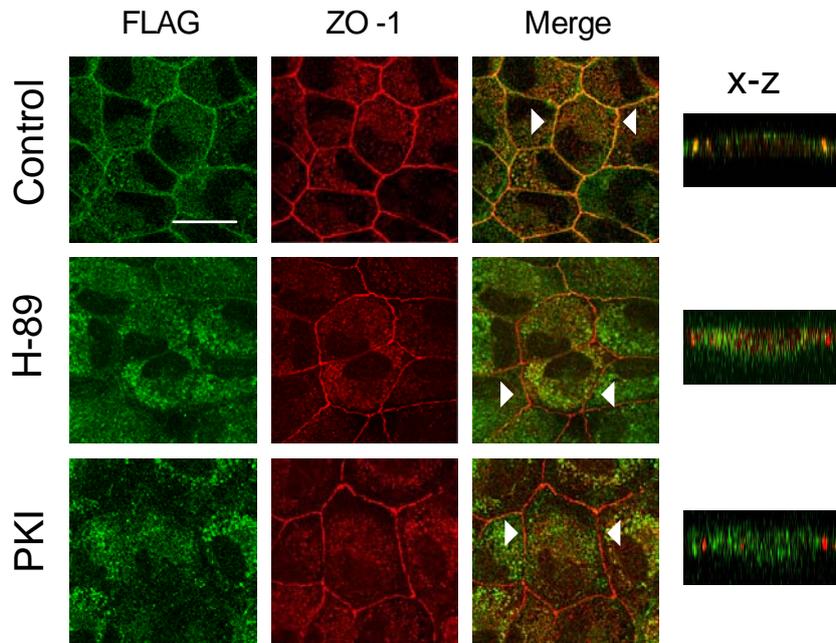


Fig. 4 Dissociation of paracellin-1 from tight junction by PKA inhibitors

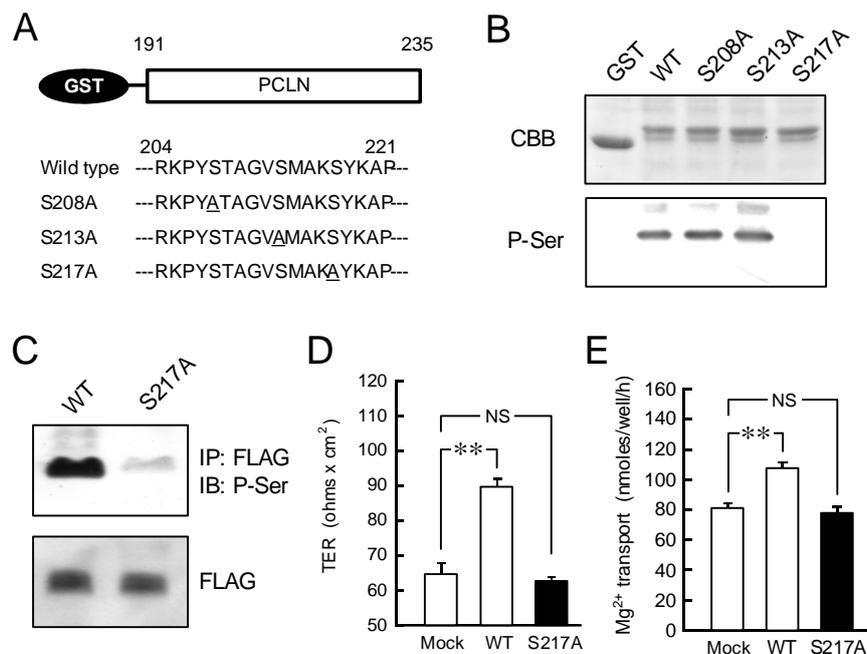


Fig. 5 Phosphorylation of Ser217 by PKA

3.6 S217A 変異体の機能解析

パラセリン-1 のリン酸化の効果を詳細に検討するために、非リン酸化変異体 S217A を MDCK 細胞に安定発現した。S217A 変異体の発現量が野生型と同程度のクローンを使用した。S217A 変異体の発現により、内在性のクローディン-1、クローディン-4、ZO-1 の発現量に変化はなかった。野生型とは異なり、S217A 変異体は無刺激条件下で大部分が脱リン酸化していた (Fig. 5C)。S217A の発現により、パラセリン-1 を発現しない細胞と比較して、TER やマグネシウム輸送量に差はなかった (Fig. 5D, E)。以上のことから、パラセリン-1 がその機能を発揮するためにはリン酸化が必要であることが示された。

3.7 リン酸化阻害によるパラセリン-1 のリソソームへの移行

脱リン酸化したパラセリン-1 の細胞内局在を調べるために、細胞内オルガネラの二重染色による蛍光測定を行った。リソソーム、ゴルジ装置、初期エンドソームをそれぞれ lysotracker, furin, early endosomal antigen 1 で染色した。野生型パラセリン-1 はこれらの蛍光色素と重ならなかったが、H-89 処理したパラセリン-1 の分布は lysotracker と重なった。同様に非リン酸化変異体 S217A は、タイトジャンクションには分布せずに lysotracker と重なった。リソソーム経路は主にタンパク質の分解に参与している。そこで脱リン酸化したパラセリン-1 の分解について検討した。タンパク質合成酵素阻害剤のシクロヘキシミド存在下、H-89 処理によりパラセリン-1 の発現量が減少した。同様に S217A 変異体の発現量もシクロヘキシミドの存在下で減少した。脱リン酸化したパラセリン-1 や非リン酸化のパラセリン-1 はプロテアーゼによって分解されると考えられる。パラセリン-1 発現量の減少は、リソソーム阻害剤のクロロキシン (100 μ M) によって阻害されたが、プロテアソーム阻害剤のラクタシスチン (10 μ M) は効果がなかった。これらの結果から、脱リン酸化および非リン酸化パラセリン-1 はリソソームプロテアーゼによって分解されることが明らかになった。

4. 考察

マグネシウムは生命維持に必要な不可欠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、因果関係は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

を得たことから、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。最近、我々はタイトジャンクション構成タンパク質のパラセリン-1 が二価カチオンの輸送に関与することを発見した (Ikari *et al.*, 2004)。本研究では、パラセリン-1 の調節機構として、リン酸化の効果を検討した。

高マグネシウム血症は尿中への cAMP 排泄量を減少し、マグネシウム再吸収が低下する。逆に、cAMP 産生ホルモンのバゾプレシン、グルカゴン、パラチロイドホルモンによってマグネシウム再吸収が増加する。これらのことから、マグネシウム再吸収は cAMP によって正の調節を受けると示唆される。我々は、パラセリン-1 が cAMP/PKA 依存性経路によりリン酸化され、TER やマグネシウム輸送量を増加することを発見した。上皮膜を介したマグネシウム輸送は、管腔側の正の電位に従った受動拡散であるため、cAMP/PKA 経路がパラセリン-1 以外に作用している可能性がある。実際、管腔の電位形成に参与する Na/K/Cl 共輸送体と Na/K-ATPase は cAMP/PKA 依存性経路によって正の調節を受ける。しかしながら、セリン-217 変異体を発現した細胞において、パラセリン-1 を発現しない細胞と比較して、TER とマグネシウム輸送量に差がないという結果から、この可能性は否定することができた。

これまでタイトジャンクションはバリアーとしての機能が注目されてきたが、選択的にイオンを通すポアを形成することが明らかになってきた。イオン透過性の特徴は個々のクローディンの発現によって異なっている。例えば、クローディン 4 はナトリウム透過性を、クローディン-8 はカチオン透過性を低下する。一方、クローディン 2 は一価カチオンの透過性を増加する。さらにクローディン遺伝子のノックアウトや不活性型変異体は、傍細胞透過性の異常を引き起こす。各臓器におけるクローディンアイソフォームの発現パターンの差異により、臓器毎の多様な傍細胞透過性が規定されていると考えられる。

パラセリン-1 と同様に、クローディン-3 とクローディン-5 は PKA によってリン酸化されることが報告されている。また、クローディン-1 とクローディン-4 はプロテインキナーゼ C によってリン酸化される。さらに、プロテインキナーゼ WNK4 がクローディン-1、-2、-3、-4 をリン酸化することが報告されている。本研究において、PKA によるパラセリン-1 のリン酸化は、パラセリン-1 がタイトジャンクションに分布し、マグネシウムを輸送するために必須であることを世界に先駆けて証明した。内皮細

胞において、PKA によってクロードイン-5 のタイトジャンクションにおける分布が増加する。一方、PKA によってクロードイン-3 はタイトジャンクションから細胞内へと移行する。このようなリン酸化によるクロードイン毎の細胞内分布の違いがなぜ生じるのかは不明である。

リソソームは膜タンパク質や細胞外タンパク質の分解に関与する。多くの細胞で、このリソソームにおけるタンパク質の分解にはユビキチン化が関与する。この分解過程はポリユビキチン化とモノユビキチン化の二経路に大別される。インターロイキン-2 受容体 α チェーンや表皮成長因子受容体にモノユビキチンを付加したキメラ体は、細胞表面からリソソームへと移行することが報告されている。パラセリン-1 の脱リン酸化がユビキチンの認識に関与するのかもしれない。

5. 今後の課題

パラセリン-1 の働きは、他に発現するクロードインの組み合わせにより変化する可能性がある。そのため、内在的にパラセリン-1 を発現する細胞を用いて、TER やマグネシウム輸送機能を測定する必要がある。また、パラセリン-1 の調節機構として、PKA によるリン酸化が明らかになったことから、高血圧モデル動物の腎臓における

cAMP 含量や PKA 活性を定量化する必要がある。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。マグネシウムを効率よく吸収、再吸収するために、マグネシウム輸送体をターゲットにした新しい食品因子や薬剤の開発により、マグネシウム不足が解消され、高血圧や循環器疾患の発症や悪化が抑制されると期待される。

文献等

- Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Takagi, K. (2004) *Journal of Biological Chemistry* 279, 54826-54832
- Ikari, A., Kano, T., and Suketa, Y. (2002) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 710-713
- 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, 103-10

0525

Functional changes of paracellin-1, a magnesium transporter, by salt intake
and clarification of regulatory mechanisms of paracellin-1
(Effect of phosphorylation on magnesium transport by paracellin-1)

Akira Ikari

University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences

Summary

The magnesium balance of whole body is regulated by the kidney which adapts magnesium excretion based on net magnesium absorption from intestine. Renal magnesium filtrated in the glomeruli is predominantly reabsorbed through the paracellular pathway in the thick ascending limb of Henle. Paracellin-1 belongs to the claudin family of tight junction (TJ) proteins and possibly plays a critical role in the reabsorption of magnesium. So far, we reported that urinary magnesium excretion was increased in hypertensive rats compared with normotensive rats. Although the paracellin-1 expression level in hypertensive rat was not different from that in normotensive rat, the phosphoserine level of paracellin-1 in hypertensive rat was lower than that in normotensive rat. In the present study, we examined the regulatory mechanisms of phosphorylation of paracellin-1. Furthermore, we investigated the roles of phosphorylation in magnesium transport.

Rat paracellin-1 inserted into FLAG-tagged vector was transfected into MDCK cells. Paracellin-1 was localized at TJ and increased in transepithelial electrical resistance (TER). Furthermore, paracellin-1 increased in the transepithelial magnesium transport from apical to basal sides. Immunoprecipitation showed that paracellin-1 was phosphorylated at serine residue in the non-stimulated conditions. H-89, a protein kinase A (PKA) inhibitor, decreased in the phosphoserine level of paracellin-1. *In vitro* analysis using GST fusion protein revealed that the Ser217Ala mutant was not phosphorylated by PKA. Furthermore, the Ser217Ala mutant showed no increases of TER and the transepithelial magnesium transport in MDCK cells. The Ser217Ala mutant was distributed in lysosome as well as the wild-type paracellin-1 treated with H-89.

In conclusion, we found that paracellin-1 is phosphorylated by cAMP/PKA dependent pathway and the phosphorylated paracellin-1 is distributed at TJ. In hypertensive rats, the reduction of phosphoserine level of paracellin-1 may cause increase in urinary magnesium excretion.