

助成番号 0633

## 腎尿細管における新規マグネシウム輸送体パラセリン-1の発現調節機構に関する研究(リン酸化によるパラセリン-1の細胞内分布調節)

五十里 彰

静岡県立大学薬学部

**概要** 高血圧症とマグネシウム摂取不足との関連が指摘されるが、マグネシウム吸収機構の機能変化は調べられていない。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、腎臓のマグネシウム再吸収量が低下すると考えた。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。昨年の本財団からの研究助成により、プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化を介したリン酸化によって、パラセリン-1のタイトジャンクションへの局在が調節されることを明らかにした。タイトジャンクションの構築において、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) の関与が報告されている。本研究では、高血圧ラットにおけるパラセリン-1の発現量とリン酸化量を解析した。また、パラセリン-1のリン酸化における VASP の関与について検討した。

食塩感受性高血圧発症ラットの腎臓では、正常血圧ラットに比べて cAMP 含量が低下していた。また、パラセリン-1の発現量に差はないが、リン酸化量が低下していた。高血圧の発症や増悪にパラセリン-1の発現変化が関与する可能性がある。

Tet-OFF 発現誘導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。ドキシサイクリンでパラセリン-1の発現をコントロールできる細胞株を三種類得た。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クローディン-1, -2, -4, オクルディン, ZO-1の発現量に変化はなかった。血清存在下、パラセリン-1はリン酸化されており、タイトジャンクションに分布した。血清の除去、または PKA 阻害剤の H-89 処理により、パラセリン-1は脱リン酸化され、細胞質へと移行した。血清非存在下、cAMP アナログの DBcAMP 処理により、パラセリン-1はリン酸化され、タイトジャンクションに分布した。VASP のリン酸化機構を調べたところ、パラセリン-1と同様に血清存在下でリン酸化され、血清の除去や H-89 処理により脱リン酸化された。免疫沈降法により、パラセリン-1は VASP と会合しないが、PKA と会合することが明らかになった。また、非リン酸化型 VASP 変異体を発現させても、パラセリン-1のリン酸化に変化はなかった。

以上より、高血圧ラットの腎臓では、cAMP 含量が低下しており、パラセリン-1は脱リン酸化するためにマグネシウム再吸収が低下すると示唆された。また、PKA によるパラセリン-1のリン酸化に、VASP は関与しないことが明らかになった。

### 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系球体でろ過される。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。マグネシウム欠乏には、腎臓における再吸収機構の異常が関係すると考えられているが、マグネシウム輸送体の実体が不明であったため、原因の特定が困難であった。昨

年の本財団からの研究助成により、ヘンレ上行脚のタイトジャンクションに発現する新規タンパク質のパラセリン-1がマグネシウム輸送体として働くことを報告した。さらにパラセリン-1の分布調節機構を調べ、PKAによるリン酸化が関与することを発見した。

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、パラセリン-1の点変異体が報告された (Simon *et al.*, 1999)。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 (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。

これまでに我々は、食塩感受性高血圧発症ラットにおいて、血圧の上昇とともに尿中へのマグネシウム排泄量が増加することを報告している。腎臓におけるパラセリン-1 の発現量を調べたところ、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。そこで高血圧ラットにおけるパラセリン-1 の脱リン酸化機構の検討を行った。また、タイトジャンクションの構築に、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) と呼ばれるタンパク質のリン酸化が関与することが報告されている。そこで、パラセリン-1 のリン酸化における VASP の関与について検討した。

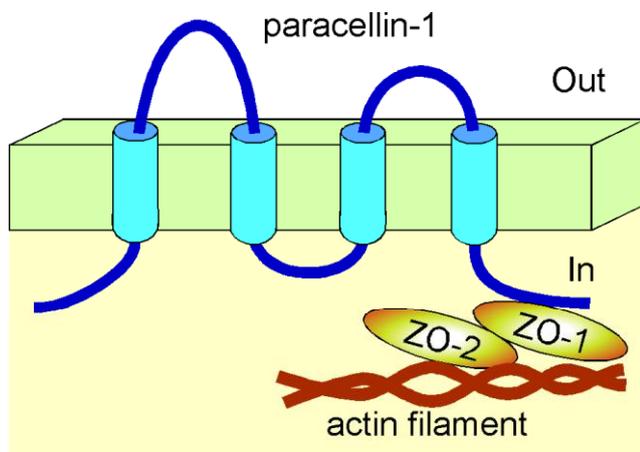


Fig. 1 Schematic model of paracellin-1

## 2. 研究方法

### 2.1 Tet-OFF システムによるパラセリン-1 発現細胞の樹立

パラセリン-1 の発現を、ドキシサイクリンで誘導できるように、Tet-OFF MDCK 細胞を使用した。トランスフェクションの前日に細胞を 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 /FLAG/pTRE2 hyg) を細胞に導入した。ハイグロマイシン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。ドキシサイクリンでパラセリン-1 の誘導発

現が見られた細胞を 3 クローン凍結保存した (T6, T11, T13)。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 VASP 発現プラスミドベクターの作製

MDCK 細胞から RT-PCR 法により VASP の翻訳領域をクローニングした。pEGFP-C3 ベクターにサブクローニングし、VASP に EGFP のタグを付けた。さらに、pcDNA3.1/Zeo ベクターにサブクローニングし、zeocin 耐性ベクターに組み込んだ。VASP-S160A 変異体は、QuickChange site-directed mutagenesis kit を用いて作製した。

### 2.3 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。

### 2.4 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ティング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。

### 2.5 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の形態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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 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。

## 2.6 蛍光免疫染色

MDCK 細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、0.2% Triton X-100 を含む PBS にて浸透化した。ブロックエースでブロッキング後、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 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。BL21 大腸菌に形質転換し、GST 融合タンパク質を調製した。MDCK 細胞の全膜画分とインキュベート後、グルタチオンセファロースビーズを用いて GST 融合タンパク質複合体を沈澱し、sample バッファーで溶出した。

## 3. 研究結果

### 3.1 パラセリン-1 の誘導発現

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。ドキシサイクリン存在下で培養した細胞では、パラセリン-1 は発現しなかった (Fig. 2)。ドキシサイクリンの除去により、パラセリン-1 は発現した。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クローデイン-1, -2, -4, オクルデイン, ZO-1 の発現量に変化は見られなかった。このことから、パラセリン-1 の誘導発現による生理的な効果は、他のタイトジャンクションタンパク質の発現変動によるものではないと示唆される。

### 3.2 パラセリン-1 の発現による TER とマグネシウム輸送の増加

MDCK 細胞をトランスウェルに培養し、経時的に TER を測定した。パラセリン-1 を発現した細胞では、発現しない細胞に比べて TER が増加した (Fig. 3)。また、管腔側から血管側へのマグネシウムの輸送量も、パラセリン-1 の発現により増加した。一方、FITC-デキストランの輸送量に変化はなかった。以上のことから、パラセリン-1 は電荷を持たない高分子の輸送には影響せず、マグネシウムの透過性を増加させることが示された。パラセリン-1 の発現が、マグネシウム再吸収の調節に密接に関連すると示唆される。

### 3.3 cAMP によるパラセリン-1 のリン酸化とマグネシウム輸送の増加

パラセリン-1 は血清存在下で細胞を培養した場合にリン酸化されていたが、血清を除去した培地で培養するとリン酸化量が低下した (Fig. 4)。また、血清存在下で、H-89 処理によりパラセリン-1 のリン酸化量が低下した。パラセリン-1 のリン酸化に PKA の関与が示唆されたため、cAMP アナログの DBcAMP の効果を検討した。

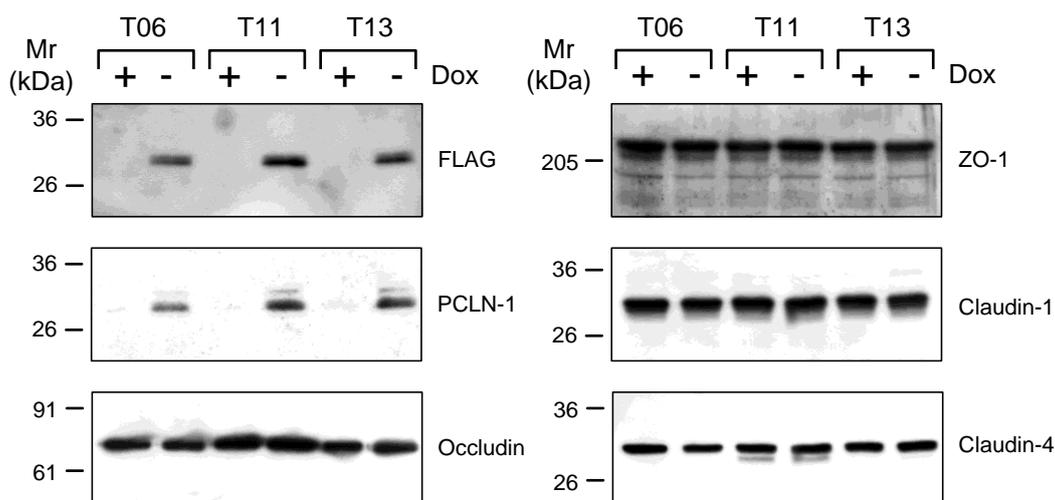


Fig. 2 Inducible expression of FLAG-tagged paracellin-1 in MDCK Tet-OFF cells

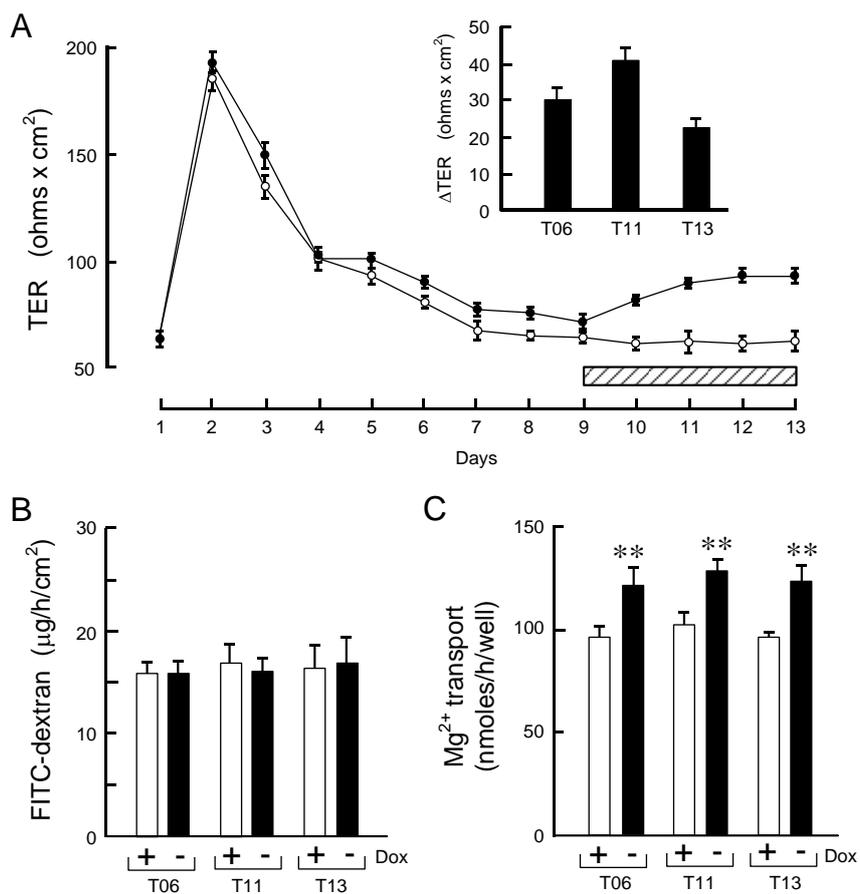


Fig. 3 Effect of paracellin-1 expression on paracellular permeability

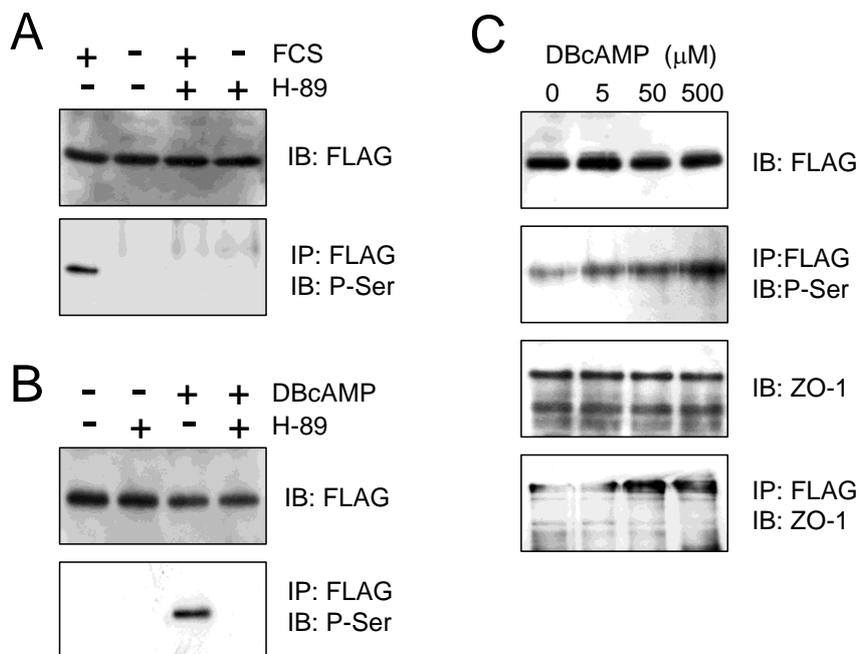


Fig. 4 Phosphorylation of paracellin-1 by serum factors and cAMP

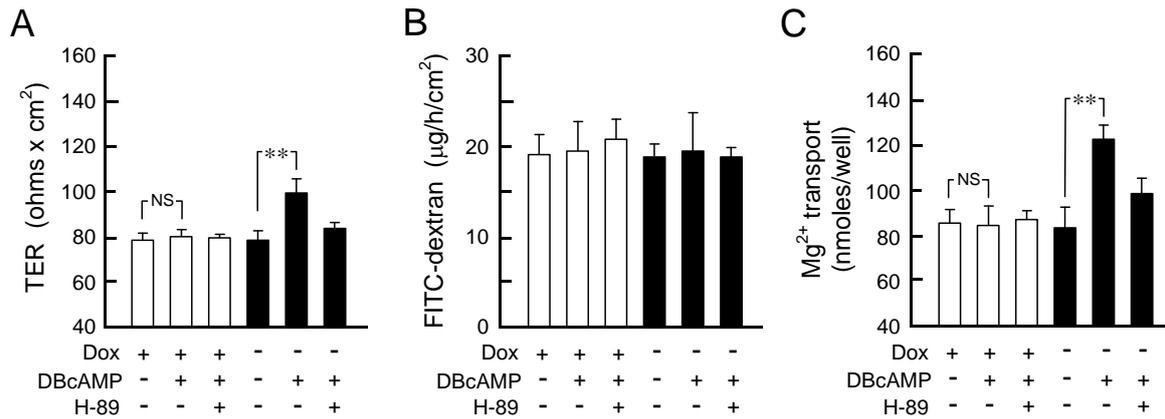


Fig. 5 Effect of paracellin-1 expression on transepithelial permeability

DBcAMPは濃度依存的にパラセリン-1をリン酸化し、このリン酸化はH-89処理により阻害された。DBcAMP処理により、足場タンパク質のZO-1の発現量は変化しないが、パラセリン-1とZO-1の会合量が増加した。以上のことから、パラセリン-1はcAMP/PKA経路によってリン酸化され、パラセリン-1とZO-1の会合には、このリン酸化機構が必要であると示唆された。次に、パラセリン-1の機能に対するリン酸化の影響を検討した。ドキシサイクリン非存在下で培養した細胞では、DBcAMP処理によりTERとマグネシウム輸送量が増加した(Fig. 5)。しかし、ドキシサイクリン存在下で培養した細胞では、DBcAMP処理により変化しなかった。一方、FITC-デキストランの輸送量は、ドキシサイクリンやDBcAMPの影響を受けなかった。

### 3.4 パラセリン-1のリン酸化によるタイトジャンクションへの局在

血清非存在下で細胞を培養すると、パラセリン-1は細胞質に分布した。足場タンパク質のZO-1は細胞の隣接部位のタイトジャンクションに分布したため、パラセリン-1とZO-1の分布は重ならなかった。DBcAMP処理により、パラセリン-1タイトジャンクションに分布し、H-89はこの局在を阻害した。以上のことから、cAMP/PKA経路によるパラセリン-1のリン酸化が、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。一方、クローディン-1、-4、オクルディンの分布は、H-89の影響を受けなかった。

### 3.5 cAMPによるVASPのリン酸化

VASPはリン酸化されると、非リン酸化の50 kDaから54 kDaへとバンドが移動する。VASPはパラセリン-1と同様に、血清存在下で細胞を培養した場合にリン酸化されていたが、血清を除去した培地で培養するとリン酸化量が低下した(Fig. 6)。また、血清存在下で、H-89処理により

VASPのリン酸化量が低下した。DBcAMPは濃度依存的にVASPをリン酸化し、このリン酸化はH-89処理により阻害された。パラセリン-1とVASPのcAMP/PKA経路によるリン酸化の様式が非常に類似しているため、両者が相互作用している可能性がある。そこで両者の会合について検討した。DBcAMPでVASPがリン酸化されたにも関わらず、パラセリン-1とVASPの会合はみられなかった。

### 3.6 cAMPによるパラセリン-1とPKAの会合

cAMPによるパラセリン-1のリン酸化に、VASPの関与が否定的であったので、PKAの直接作用について検討した。DBcAMP処理により、PKAの発現量は変化しなかったが、パラセリン-1とPKAの会合量は増加した(Fig. 7)。また、プルダウンアッセイにおいて、パラセリン-1のカルボキシ末端を融合したGSTタンパク質では、PKAの会合がみられた。以上のことから、cAMPによってリン酸化されたPKAが直接パラセリン-1に会合し、パラセリン-1をリン酸化すると示唆された。

### 3.7 パラセリン-1のリン酸化におけるVASP変異体の影響

VASPの160番目のセリン残基は、PKAによって最もリン酸化を受けやすい部位である。そこで、S160Aの変異体を作製し、パラセリン-1を発現したMDCK細胞に導入した。VASPにはEGFPタグを予め付けた。S160A-VASPは100 kDa付近に一本のバンドがみられたが、WT-VASPは二本のバンドがみられた。これは、リン酸化と脱リン酸化したVASPのものと推察される。VASPの発現により、パラセリン-1、ZO-1、PKAの発現量に変化はみられなかった。WT-VASP発現細胞で、パラセリン-1はタイトジャンクションに分布したが、S160A-VASP発現細胞では、細胞質へと移行した。ZO-1の分布を調べたところ、S160A-VASP発

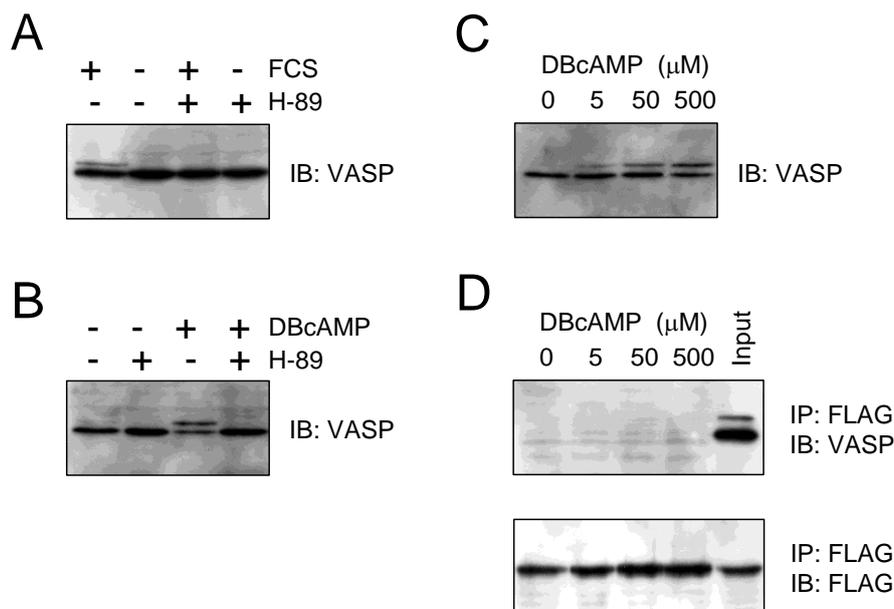


Fig. 6 No association of paracellin-1 with VASP

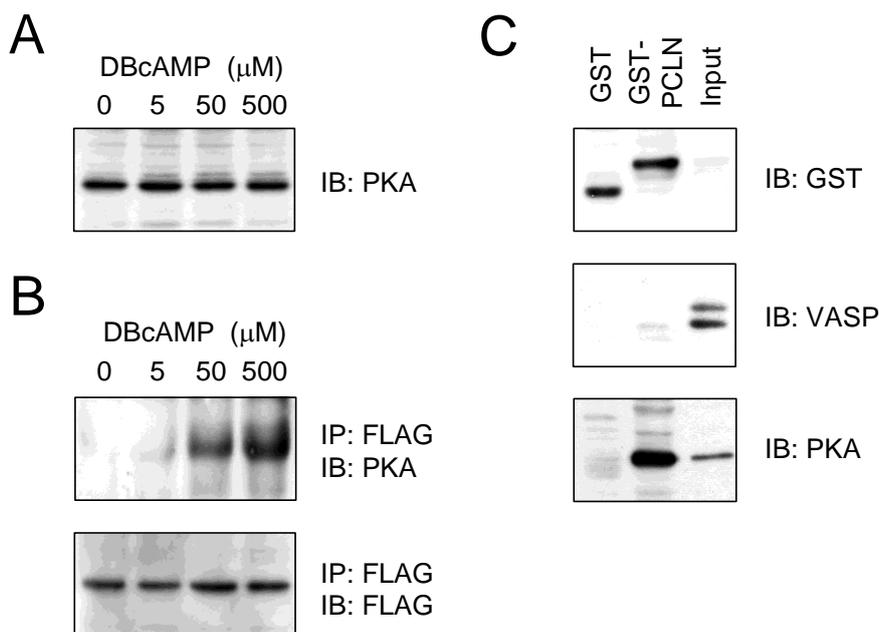


Fig. 7 Direct association of paracellin-1 with PKA

現細胞で、細胞質に分布した。このことから、S160A-VASP 発現細胞では、タイトジャンクションが形成されないと示唆された。WT-VASP 発現細胞で、パラセリン-1 の発現とともに TER が増加したが、S160A-VASP 発現細胞では、上皮膜がリーキーになっており、パラセリン-1 を発現しても TER は増加しなかった。興味深いことに、VASP がリン

酸化されない S160A-VASP 細胞において、DBCAMP はパラセリン-1 をリン酸化し、パラセリン-1 と PKA および ZO-1 との会合を引き起こした (Fig. 8)。以上のことから、パラセリン-1 のリン酸化に VASP は関与しておらず、PKA が直接リン酸化すると示唆された。

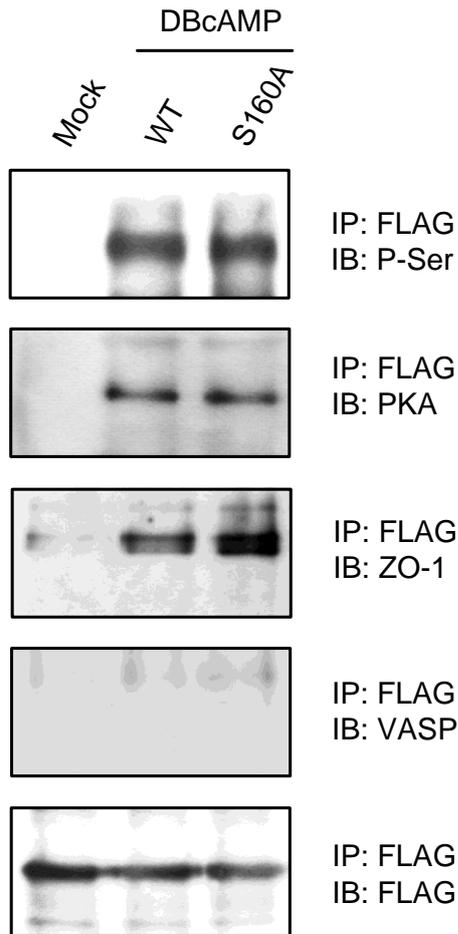


Fig. 8 Association of paracellin-1 with ZO-1 in the S160A-VASP mutant-expressing cell

#### 4. 考 察

マグネシウムは生体内で二番目に多い二価カチオンで、カルシウムと同様に大部分が骨組織に貯蔵されている。飲食物から 300 mg のマグネシウムが摂取されると、その内 200 mg が腸管から吸収される。しかし、血液中のマグネシウムは腎臓の糸球体でろ過されるため、体内のマグネシウムホメオスタシスの調節には、腎臓における再吸収機構が重要な役割を担う。50 年以上も前から、マグネシウムの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た。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。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したことから、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の異常を明

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し、その細胞内分布調節に PKA が関与することを発見した(Ikari *et al.*, 2006a)。本研究では、パラセリン-1 のリン酸化の意義と、PKA によるパラセリン-1 のリン酸化機構の詳細を検討した。

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、副甲状腺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。食塩感受性高血圧ラットを用いて、腎臓の cAMP 含量が低下し、パラセリン-1 のリン酸化レベルが低下していることを突き止めた(Ikari *et al.*, 2006b)。パラセリン-1 の脱リン酸化は、タイトジャンクションへの局在を阻害するため、パラセリン-1 を介したマグネシウム再吸収が低下すると示唆された。本研究成果は高血圧症におけるマグネシウム再吸収機構の異常メカニズムを解明した初めての報告である。

パラセリン-1 は cAMP/PKA によってリン酸化されるが、PKA 以降の調節因子が不明である。上皮細胞や内皮細胞において、タイトジャンクションの形成時に、cAMP → PKA → VASP → ZO-1 のリン酸化といったシグナル伝達機構の関与が報告されている。パラセリン-1 も cAMP によってリン酸化されることから、VASP の関与が予測された。しかし、パラセリン-1 と VASP は会合しない、S160A-VASP 変異体の強制発現下でもパラセリン-1 はリン酸化されるという結果から、パラセリン-1 のリン酸化に VASP は関与しないと示唆された。また、パラセリン-1 は PKA と会合したことから、タイトジャンクション形成時とは異なり、パラセリン-1 は PKA によって直接リン酸化されると示唆された。

パラセリン-1 の他にもリン酸化を受けるタイトジャンクション構成タンパク質が報告されている。クローディン-1 は MAP キナーゼによってリン酸化され、タイトジャンクションへの分布が調節される。クローディン-3 は PKA によって、クローディン-4 は EphA2 によってリン酸化され、タイトジャンクションから解離する。また、アルドステロンによるクローディン-4 のリン酸化は、タイトジャンクションの分布に影響しない。クローディン-5 は PKA によってリン酸化され、タイトジャンクションに分布する。このようにリン酸化の調節因子や効果は、各クローディンによって異なる。今後、この相違の原因を検討し、生理的および病態的なタイトジャン

クシヨンの調節機構を明らかにする必要がある。

## 5. 今後の課題

現代社会において、過度のストレスや食生活の変化によりマグネシウム摂取量と吸収量が減少している。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、慢性的なマグネシウム不足に気がつきにくい。マグネシウムを効率よく吸収および再吸収するために、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が期待される。マグネシウム輸送体の発現や機能の調節機構に関する研究はまだ始まったばかりで、十分に解明されていない。今後、パラセリン-1を含めたマグネシウム輸送体の発現が、どのようなホルモンや食品因子で活性化されるのかを検討し、マグネシウム不足による高血圧症や循環器疾患の治療や改善に結びつけていきたい。

## 文献等

1. 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., & Lifton, R. P.: Paracellin-1, a renal tight junction protein regulated for paracellular  $Mg^{2+}$  resorption. *Science* (1999) **285**, 103-110
2. Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., & Miwa, M.: Phosphorylation of paracellin-1 at serine 217 by protein kinase A is essential for localization in tight junction. *Journal of Cell Science* (2006a) **119**, 1781-1789
3. Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Degawa, M., Takahashi, T., Sugatani, J., & Miwa, M.: Dysfunction of paracellin-1 by dephosphorylation in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Journal of Physiological Sciences* (2006b) **56**, 379-383

No. 0633

## Regulatory Mechanism of Expression and Magnesium Transport of Paracellin-1, a Novel Magnesium Transporter, in Renal Tubular Cells (Phosphorylation of Paracellin-1 by Protein Kinase A and Magnesium Transport)

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 the phosphoserine level of paracellin-1 in hypertensive rats is lower than that in normotensive rats and urinary magnesium excretion is increased in hypertensive rats. In the present study, we examined the regulatory mechanisms of phosphorylation of paracellin-1 and the effect of phosphorylation on magnesium transport.

Paracellin-1 was stably expressed in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells using a Tet-OFF system. The phosphorylation of paracellin-1 is upregulated by fetal calf serum (FCS). This phosphorylation was completely inhibited by H-89, a PKA inhibitor. Without FCS, dibutyryl cAMP (DBcAMP) increased the phosphoserine level of paracellin-1 in a concentration-dependent manner. The phosphorylated paracellin-1 elicited increases of transepithelial electrical resistance and transepithelial transport of  $Mg^{2+}$ . Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) was also phosphorylated in the presence of FCS or DBcAMP. PKA was immunoprecipitated with paracellin-1, but VASP was not. In cells expressing a dephosphorylated mutant (Ser160Ala) of VASP, paracellin-1 was phosphorylated by DBcAMP and was associated with ZO-1, a tight junctional scaffolding protein, without integral cell-cell junctions. We suggest that PKA directly phosphorylates paracellin-1, resulting in the localization to TJ and the maintenance of  $Mg^{2+}$  reabsorption.

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