

助成番号 0639

ナトリウム出納制御機構の解明による高血圧症の新たな治療法

種本 雅之, 伊藤 貞嘉

東北大学病院腎高血圧内分泌科

概要 【目的】 先進諸国において最大の罹患率を示す疾患であり、かつ、心血管イベントの主要な危険因子である高血圧症において、適切な血圧制御は心血管イベントの発症を抑制し疾患の予後を改善することが判明している。しかし、高血圧症例の多くで血圧制御が適切になされておらず、その原因として、血圧の主因子である循環血漿量の制御が不良であることが疑われる。循環血漿量は尿細管ナトリウム再吸収により規定されるが、 Na^+/K^+ -ATPase を駆動力とするこの再吸収過程は、ナトリウム再吸収に際し流入するカリウムを細胞外に排出するカリウムリサイクリング機構に依存していることが判明していた。本研究では、カリウムリサイクリング機構を構築するカリウムチャネルの機能発現機構の制御法を解明することを試みた。

【方法】 従来の研究で解明していた血管側カリウムリサイクリングの機能発現を制御する局在シグナルを認識する蛋白の同定を yeast two hybrid 法にて試みた。更に、同定した蛋白の腎臓での発現を免疫染色法にて、蛋白間相互作用を制御する機構の解明を免疫沈降法にて試みた。

【結果】 カリウムチャネルの局在シグナルを認識する蛋白としてアンカー蛋白 Membrane Associate Guanylate kinase with Inverted domain structure (MAGI-1a) の新たなスプライス変異体を同定した。MAGI-1a は腎遠位尿細管のヘンレ上行脚の遠位端部から遠位曲尿細管において血管側カリウムチャネルと共発現し、腎臓において血管側カリウムチャネルとの相互作用を認めた。MAGI-1a とカリウムチャネルの相互作用は、MAGI-1a の5番目の PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) 領域とカリウムチャネルの PDZ-binding motif を介して行われており、この相互作用はチャネルのリン酸化により阻害された。

【考察】 同定したアンカー蛋白 MAGI-1a の新たなスプライス変異体が、腎遠位尿細管における血管側カリウムチャネルの機能発現を規定していると推定された。MAGI-1a とカリウムチャネルの相互作用がカリウムチャネルのリン酸化により制御されたことから、腎遠位尿細管に発現している SGK1 等のキナーゼが *in vivo* でカリウムリサイクリング機構の機能発現を制御している可能性が推察される。リン酸化を介し、MAGI-1a によるカリウムリサイクリング機構の機能発現を制御することにより、循環血漿量の調節を介して血圧を制御する新たな降圧治療の可能性が示唆された。

1. 研究目的

高血圧は先進諸国において最大の罹患率を示す疾患であると共に、脳梗塞・心筋梗塞・腎不全といった生命の維持に重要な臓器に対する障害(心血管イベント)の主要な危険因子である(Chobanian *et al.*, 2003)。血圧を低値に保つことにより、これら心血管イベントの発症が抑制されることが明らかとなり、高血圧治療ガイドライン2004においても、より低値への血圧コントロールが推奨されている。しかし、多くの高血圧症例において、適切な血圧のコントロールがなされていないのが現状である。

血圧は循環血漿量と血管抵抗の二大要因により規定されると考えられるが、Guyton により提唱された「高血圧の病態維持には循環血漿量調節機能の異常が存在するこ

とが不可欠」という概念が近年あらためて確認され、高血圧治療における循環血漿量制御の重要性が再認識されてきている(Lifton *et al.*, 2001)。しかし、現在、臨床で使用されている降圧薬の多くは血管抵抗を制御する薬剤であり、循環血漿量の制御作用を有する降圧薬は利尿薬のみであり、一方で、利尿薬は低 K^+ 血症を初めとする副作用を呈するために、循環血漿量を十分に制御する用量が使用出来ていないことが多い。以上のことから、高血圧症例での循環血漿量制御が不適切であることが、血圧コントロール不良な高血圧症例が存在する主要な原因となると推察される。

尿細管ナトリウム再吸収機構は、生体におけるナトリウム出納調節を行うことにより、循環血漿量の規定に重要な

役割を果たすことが判明している。この尿細管ナトリウム再吸収機構は、血管側に発現している Na^+/K^+ -ATPase を駆動力としている。 Na^+/K^+ -ATPase は、ナトリウム再吸収に際して細胞内カリウムの流入を伴うため、細胞内に流入したカリウムを細胞外に排出するカリウムリサイクリング機構に、その活性が依存していると考えられる (Fig. 1) (Giebisch, 2001)。本研究では、カリウムリサイクリング機構を構築するカリウムチャネルの発現制御機構を解明することから、その制御法を解明することを試みた。カリウム再吸収に関与するカリウムリサイクリング機構の制御により、低 K^+ 血症等の副作用を呈しにくい循環血漿量制御法が解明できる可能性がある。

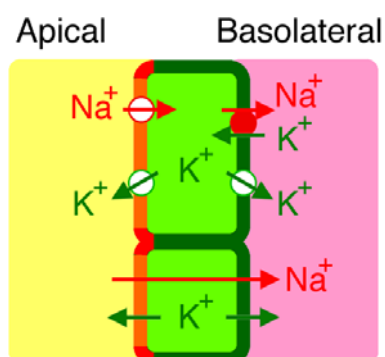


Fig. 1 “ K^+ -recycling” for renal distal tubular Na^+ -reabsorption. In renal distal tubules, Na^+ is reabsorbed transcellularly. Na^+/K^+ -ATPase conducts active transport on basolateral side, and Na^+ -transporters conduct passive transport on apical side (upper schematic cell). Because Na^+/K^+ -ATPase induces intracellular K^+ -entry, the pathway for K^+ -excretion, “ K^+ -recycling”, is indispensable for Na^+ -reabsorption to continue. Renal distal tubules have two pathways for “ K^+ -recycling”, the apical and basolateral pathways, and regulate the net K^+ -secretion/absorption without affecting the net Na^+ -reabsorption by coordinating these pathways (lower schematic cell).

2. 研究方法

2.1 局在シグナル結合蛋白の同定

従来の研究で、血管側カリウムリサイクリング機構は内向き整流性カリウムチャネルに属する2種類のチャネルのヘテロマー (Kir5.1/Kir4.1 heteromer) を主体していることを解明し (Tanemoto *et al.*, 2000)、その血管側への発現が Kir4.1 サブユニットのカルボキシル末端部に存在する二つの局在シグナルにより規定されることを明らかにしていた (Tanemoto *et al.*, 2005; Tanemoto *et al.*, 2004)。これら局在シグナルを認識する蛋白を明らかにするために、これらの局在シグナルを含む Kir4.1 サブユニットのカルボキ

シル末端部に対して yeast two hybrid 法を施行した。

yeast two hybrid 法により同定されたアミノ酸配列を用い、PCR 法にて腎臓 cDNA から、この配列を含む蛋白の全配列を解明した。

2.2 同定した結合蛋白とチャネルの相互作用の解明

解明した全配列 (結合蛋白) を用いて、結合蛋白とチャネルの相互作用を蛋白レベルで確認した。相互作用の確認には、チャネルを Green fluorescent protein (GFP) 複合蛋白としてラベルし、結合蛋白の各領域を含むグルタチオン S 転移フェラーゼ (GST) 複合体を作製し、GST pull-down 法を用いた。

2.3 結合蛋白の組織発現分布の解明

結合蛋白に対する特異的抗体を作製し、免疫組織染色法にて腎臓内での発現分布と、腎臓におけるチャネルとの共発現の有無を確認した。更に、免疫沈降法にて、腎臓における結合蛋白とチャネルの相互作用を確認した。

2.4 結合蛋白とチャネルの相互作用の制御の解明

チャネル側の相互作用部位が、従来の研究で解明していた局在シグナルの一つである PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-binding motif であることが、上記の実験の結果判明した。そこで、PDZ-binding motif を欠損、または PDZ-binding motif にアミノ酸変異を導入した変異体を作製し、PDZ-binding motif の変異による相互作用の阻害を確認した。

更に、PDZ-binding motif が A キナーゼ (PKA) によるリン酸化修飾を受ける可能性が推定されたため、PKA の活性化を促進する条件及び阻害する条件において相互作用を確認することにより、PKA の活性化による結合蛋白とチャネルの相互作用に対する効果を検討した。

3. 研究結果

3.1 血管側カリウムリチャネル結合蛋白

yeast two hybrid 法にて同定した蛋白断片中で Kir4.1 サブユニットのカルボキシル末端部と特異的結合をしようことを確認したことから、アンカー蛋白 Membrane Associate Guanylate kinase with Inverted domain structure (MAGI-1a) ファミリーのカルボキシル末端部が同定された (Laura *et al.*, 2002)。

更に、PCR 法にて腎臓 cDNA から同定したその全配列は、既報の MAGI-1a と異なり、いわゆる WW 領域の前後にインサートをもつ新たなスプライス変異体であることが判明した (Fig. 2)。

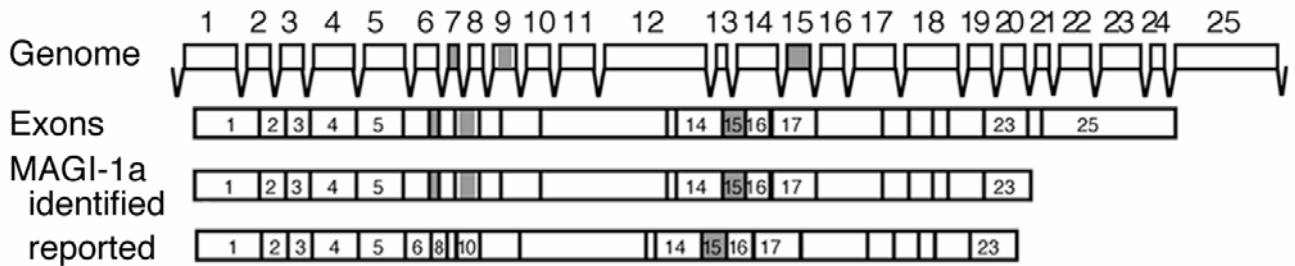


Fig. 2 MAGI-1a isoform identified from rat kidney. Exons of MAGI-1a deduced from the sequence in a genomic database and their arrangement in MAGI-1a isoforms are schematically shown. Gray indicates the splice sites identified in this study.

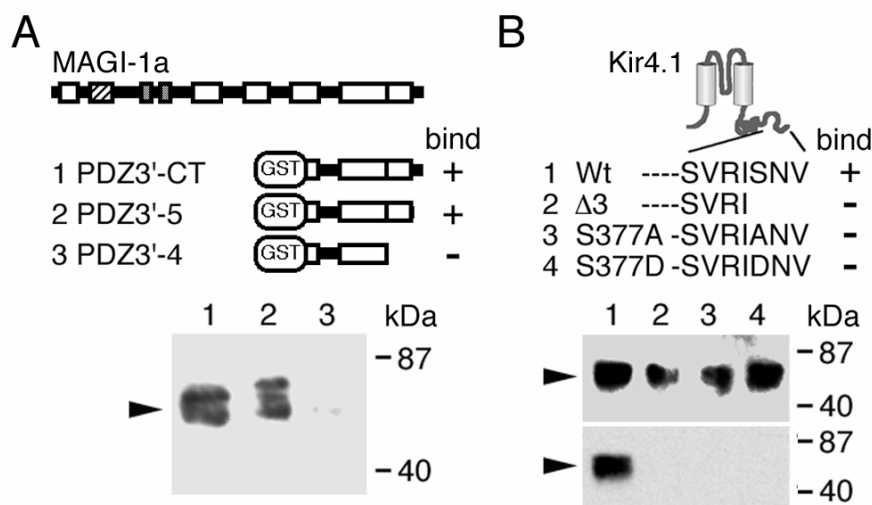


Fig. 3 PDZ domain-dependent interaction of MAGI-1a and Kir4.1. (A) GST pull-down of GFP-Kir4.1 by the CT segments of MAGI-1a. Schema shows each GST-fusion construct and summarizes its binding to Kir4.1. The lower panel shows a representative result. Fusion proteins that contain PDZ5 interacted with Kir4.1; however, PDZ5 deletion diminished the interaction. (B) GST pull-down analysis of GFP-Kir4.1 mutants by the PDZ3'-CT segment of MAGI-1a. Schema shows the sequence of the CT of each GFP-Kir4.1 mutant and summarizes its binding to MAGI-1a. Panels show representative results of expression (upper) and pull-down analysis (lower). Deletion ($\Delta 3$) and a single mutation (S377A, S377D) in the PDZ-binding motif disrupted the interaction.

3. 2 結合蛋白とチャネルの相互作用部位

GST pull-down 法では、MAGI-1a の 3 番目以降の PDZ 領域を含む部分とチャネルの相互作用を認め、5 番目の PDZ 領域を持たない MAGI-1a 断片とチャネルは相互作用しなかった (Fig. 3A)。また、チャネルのカルボキシル末端部の PDZ-binding motif を欠損する変異体および、PDZ-binding motif のセリンに変異を導入したアミノ酸変異体は、MAGI-1a と相互作用を認めなかった (Fig. 3B)。

3. 3 結合蛋白の組織発現分布の解明

MAGI-1a のアミノ末端部の特異的なアミノ酸配列を用いて、抗 MAGI-1 抗体を作製した。作製した抗 MAGI-1 抗体

が MAGI-1a を特異的に認識することを確認し (Fig. 4A)、抗 MAGI-1 抗体を用いた免疫沈降法により、腎臓において MAGI-1a とカリウムチャネル Kir4.1 がお互いに相互作用していることを解明した (Fig. 4B)。更に、抗 MAGI-1 抗体を用いて、MAGI-1a の腎臓内での発現分布を確認した。MAGI-1a は腎皮質に存在する尿細管の血管側に特異的な発現を認め、その発現が腎遠位尿細管血管側カリウムチャネル Kir4.1 と一致することから、MAGI-1a が腎尿細管の中でも、特にヘンレ上行脚の遠位端部から遠位曲尿細管で、これらの尿細管に特異的な血管側カリウムチャネルと共発現していることを解明した (Fig. 4C)。

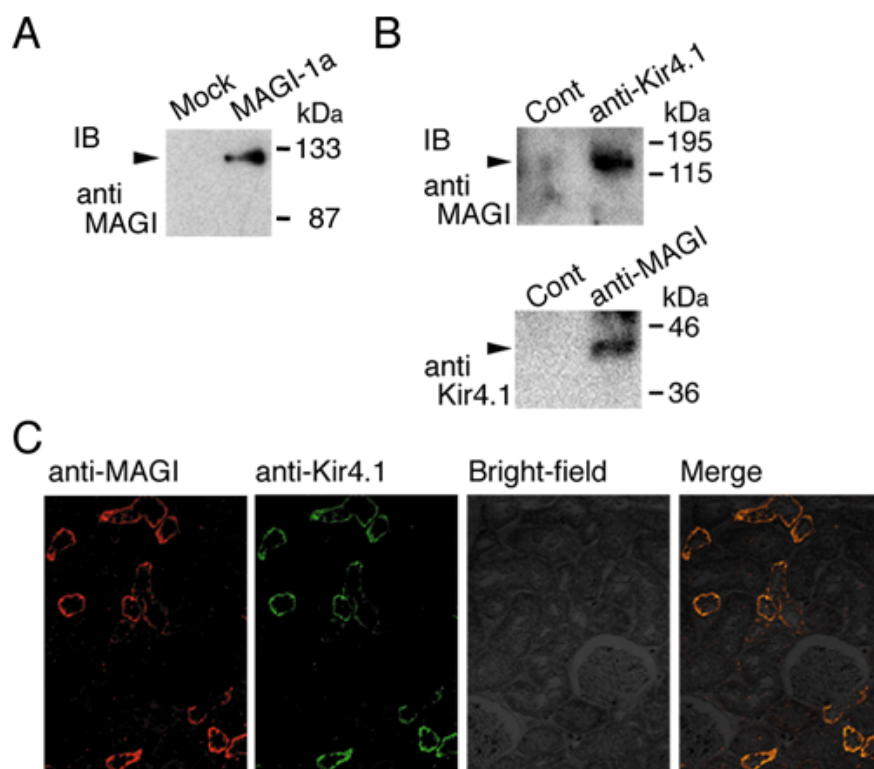


Fig. 4 Expression of MAGI-1a in rat kidney. (A) Immunoreactivity of the anti-MAGI-1 antibody raised in the present study. The antibody specifically recognized MAGI-1a expressed in HEK293T cells. Mock and MAGI-1a indicates lysates from HEK293T cells transfected with a mock vector and MAGI-1a, respectively. (B) Immunoprecipitation of MAGI-1a and Kir4.1 in rat kidney. MAGI-1a and Kir4.1 were coprecipitated. (C) Coimmunostaining of rat kidney with the anti-MAGI-1 antibody (red) and anti-Kir4.1 antibody (green). In the cortex, MAGI-1a was colocalized with Kir4.1 on the basolateral side of distal tubules. Scale bar: 50 μ m

3.3 結合蛋白とチャネルの相互作用のリン酸化による制御

3.2の GST pull-down 法において、Kir4.1 の PDZ-binding motif のセリン(Serine377)をそのリン酸化状態と相同アミノ酸であるアスパラギン酸に変異させる(Kir4.1S377D)とMAGI-1aとカリウムチャネル Kir4.1の相互作用が阻害されることが判明した(Fig. 3a)。Serine377は PKA によりリン酸化を受ける可能性がある特異的配列上に存在していたことから(Pearson and Kemp, 1991)、PDZ-binding motifのリン酸化がMAGI-1aとカリウムチャネル Kir4.1の相互作用を制御する可能性が疑われた。そこで、PKA 活性化の有無によるMAGI-1aと Kir4.1の相互作用を培養細胞系(HEK293T)で確認した。

HEK293T細胞に共発現させたMAGI-1aと Kir4.1の相互作用は、PKA 刺激下では阻害され、この阻害は PKA 活性抑制化では解除された(Fig. 5)。このことから、MAGI-1aと Kir4.1は、PDZ-binding motifが非リン酸化状態にある時のみ相互作用しうることが判明した。

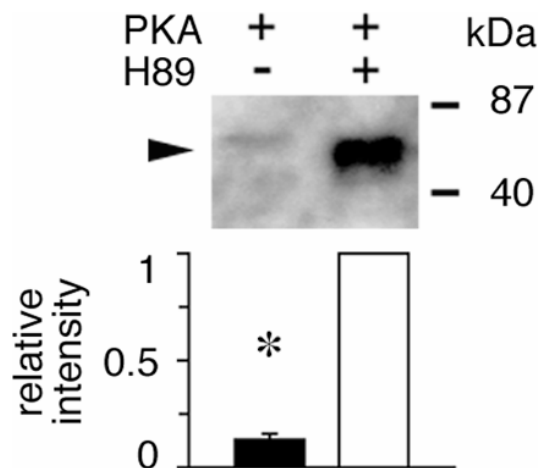


Fig. 5 Disruption of MAGI-1a/Kir4.1 interaction by activation of PKA. Panel shows the representative results of immunoprecipitation. The conditions of incubation are indicated in the panel above. The disruption was impeded by H89, a PKA-specific inhibitor. PKA, incubation with cAMP cocktail; H89, inhibition by H89. Bar graph shows the relative intensity of the coprecipitated Kir4.1 with PKA stimulation as compared with coinhibition by H89 (n = 3; * $P < 0.01$).

4. 考 察

遠位尿細管カリウムチャネルの局在シグナルを認識する蛋白として、アンカー蛋白 MAGI-1a の新たなスプライス変異体の同定に成功した。同定した MAGI-1a は腎遠位尿細管のヘンレ上行脚の遠位端部から遠位曲尿細管において同部の血管側カリウムチャネル (Tanemoto *et al.*, 2004) と共発現し、②腎内での蛋白間相互作用を認め、③カリウムチャネルの局在シグナル PDZ-binding motif と相互作用したことから、他のアンカー蛋白が膜蛋白の PDZ-binding motif を介した相互作用により機能発現制御を行っているのと同様に (Fanning and Anderson, 1999)、MAGI-1a もカリウムリサイクリング機構の血管側通路の機能発現制御を行っている可能性が推定された。

MAGI-1a とカリウムチャネルの蛋白間相互作用は、①PKA によるリン酸化にて阻害され、②PDZ-binding motif のリン酸化状態と相同アミノ酸変異体にて阻害されたことから、PDZ-binding motif のリン酸化状態が MAGI-1a とチャネルの相互作用を制御していることが推定された。即ち、MAGI-1a は非リン酸化状態の PDZ-binding motif とは相互作用するが、リン酸化状態の PDZ-binding motif とは相互作用しないと考えられた (Fig. 6)。

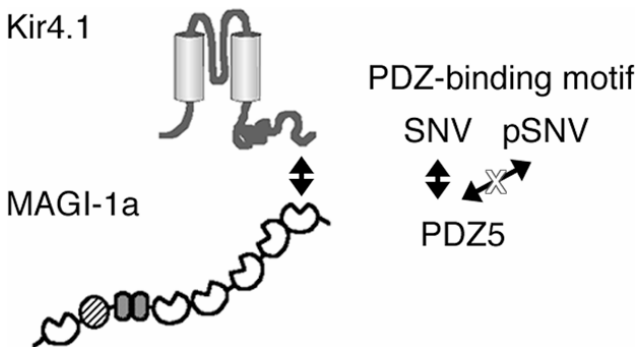


Fig. 6 Schematic summary of the MAGI-1a/Kir4.1 interaction. PDZ5 of MAGI-1a interacts with the PDZ-binding motif of Kir4.1 with unphosphorylated serine³⁷⁷.

本研究では、カリウムチャネルの PKA によるリン酸化を明らかにしたが、腎臓においては他のキナーゼがチャネルをリン酸化し、アンカー蛋白 MAGI-1a との相互作用を制御し、その結果、カリウムリサイクリング機構の機能発現を制御している可能性が疑われた (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003; Vitari *et al.*, 2005)。腎遠位尿細管には SGK1 等のキナーゼが発現していることが解明されており、腎遠位

尿細管に発現しているこれらキナーゼが、*in vivo* では、カリウムリサイクリング機構の機能発現を制御している可能性がある。

リン酸化を介し、MAGI-1a によるカリウムチャネルの細胞内局在を通してカリウムリサイクリング機構の機能発現を制御することにより、生体におけるナトリウム出納調節を行える可能性が本研究により示唆された。細胞内リン酸化経路を調節することにより、循環血漿量を調節し、血圧を制御する新たな降圧治療を解明出来る可能性が推定される。

5. 今後の課題

カリウムチャネルのリン酸化がチャネル活性や局在に及ぼす影響や、実際に腎臓で機能しているカリウムチャネルのリン酸化経路を解明する必要がある。また、アンカー蛋白 MAGI-1a が実際に生体で如何に機能しているかをノックアウトマウス等を用いた個体レベルで解明する必要がある。この解明により、実際に生体で如何にカリウムリサイクリング機構を人為的に制御しうるかが、更に明らかに出来る。

チャネルとアンカー蛋白の相互作用の三次元モデルがコンピュータ上で作製できる可能性がある。作製したモデルに基づき *in silico* で相互作用をシミュレーション解析できれば、より簡便かつ的確にナトリウム出納調節を介する高血圧治療の解明を進めることが期待できる。また、シミュレーション解析にて各個人の遺伝子情報に基づいた高血圧のテーラーメイド医療化を促進できることも期待できる。

文 献

1. Alvarez de la Rosa D, Coric T, Todorovic N, Shao D, Wang T, Canessa CM (2003) Distribution and regulation of expression of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in the rat kidney. *J Physiol.* **551**: 455-466. Epub 2003 Jun 2019.
2. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama.* **289**: 2560-2572. Epub 2003 May 2514.
3. Fanning AS, Anderson JM (1999) Protein modules as

- organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 432-439.
4. Giebisch G (2001) Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int* **60**: 436-445.
 5. Laura RP, Ross S, Koeppe H, Lasky LA (2002) MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp Cell Res.* **275**: 155-170.
 6. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**: 545-556.
 7. Pearson RB, Kemp BE (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* **200**: 62-81
 8. Tanemoto M, Abe T, Ito S (2005) PDZ-binding and di-hydrophobic motifs regulate distribution of Kir4.1 channels in renal cells. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 2608-2614. Epub 2005 Jul 2620.
 9. Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, Ito S (2004) PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F1148-1153. Epub 2004 Aug 1103.
 10. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* **525**: 587-592.
 11. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR (2005) The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J.* **391**: 17-24.

No. 0639

New Therapeutic Approach for Hypertension through Regulation of Na⁺ Balance

Masayuki Tanemoto, Sadayoshi Ito

Division of Nephrology, Hypertension & Endocrinology

Department of Medicine, Tohoku University Hospital

Summary

【Back ground and objectives】 Hypertension, the most common disorder in industrialized societies and an independent risk factor for end-organ damage, is one of the chief burdens of the healthcare system. The treatment of hypertension based on its pathophysiology can arrest the progression of end-organ damage, and will relieve the burden on the healthcare system. Recent genetic analysis has revealed that the Na⁺ reabsorption in the distal convoluted tubules (DCT), which depends on K⁺ recycling, participates in the pathogenesis of hypertension. Previously, we showed that the Kir5.1/Kir4.1 heteromer, which is an heteromeric assembly of two inwardly rectifying K⁺ channels, comprises the principal pathway for the basolateral K⁺ recycling in the DCT, and that two motifs in the carboxyl terminal portion of the Kir4.1 subunit regulate its functional expression. Therefore, the mechanism that recognizes these motifs is thought to be a key factor for the renal regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis. In this study, we aimed to identify the mechanism.

【Methods and Results】 By using yeast two-hybrid screening, we identified a new isoform of Membrane Associate Guanylate kinase with Inverted domain structure 1 (MAGI-1a) as a scaffolding protein for the channels that comprise the basolateral K⁺ recycling pathway. By using the anti-MAGI-1 antibody, which specifically recognizes MAGI-1a, we further revealed the interaction between MAGI-1a and Kir4.1 in the kidney, and the colocalization of MAGI-1a with Kir4.1 in the DCT. MAGI-1a interacted with the PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-binding motif of Kir4.1 through its 5th PDZ domain, and the phosphorylation of the motif impeded the interaction.

【Conclusions】 A new splice variant of MAGI-1a plays a regulatory role in the basolateral K⁺ recycling by functioning as a scaffolding protein for the K⁺ channels that comprise the recycling pathway. The phosphorylation of the channels impedes the anchoring of the channels by MAGI-1a and decreases the basolateral K⁺ recycling. Affecting the activity of the basolateral K⁺ recycling, the pathway for channel phosphorylation could coordinate renal Na⁺ and K⁺ reabsorption in the DCT. These findings suggest that the phosphorylation-dependent regulation of basolateral K⁺ recycling by MAGI-1a could be a new target for the treatment of hypertension and hyperkalemia.