

助成番号 0734

アンカー蛋白を介したチャネル制御に基づく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 【背景】腎臓は、生命活動に伴い細胞から排出される老廃物を体外へ排泄する器官としてのみならず、生体の体液ホメオスターシスを維持する器官として、生体の活動の維持に不可欠の役割を果たしている臓器である。腎臓では、糸球体で濾過した血液を、尿細管で再吸収する過程を経ることにより、体液ホメオスターシスの維持を司っている。体液ホメオスターシスの中でも、細胞内主陽イオンであるカリウムと細胞外主陽イオンであるナトリウムのホメオスターシスを維持することは、生命の維持に最も重要である。腎臓ではこれらイオンの調節を遠位尿細管で行っており、尿細管細胞は Na^+/K^+ -ATPase を能動的な駆動力とし、細胞膜上のカリウムチャネル・ナトリウムチャネル・ナトリウムトランスポーターを介した受動的輸送により、陽イオンの再吸収過程を調節している。

【目的】従来の研究で、遠位尿細管血管側カリウムチャネルの機能発現に携わるアンカー蛋白の同定に成功しており、本研究では、同定したアンカー蛋白によるカリウムチャネルの発現調節機構の更なる解明を試みた。

【方法】アンカー蛋白に対する新たな抗体を作製することにより、アンカー蛋白とカリウムチャネルの腎臓尿細管における相互作用の蛋白レベルでの更なる解析を試みた。動物個体に対する摂取イオン負荷量の変化に対するアンカー蛋白/チャネルの相互作用の変化の有無を免疫沈降法にて試みた。蛋白に対する修飾状態を認識する特異的抗体を用いることにより、修飾状態の変化とアンカー蛋白/チャネルの相互作用に変化の関連の解明を試みた。

【結果】アンカー蛋白のスプライス変異体の発現を、遠位尿細管の血管側のみならず管腔側で認め、血管側では血管側カリウムチャネルとの共発現を認めた。腎臓の膜分画蛋白においてアンカー蛋白/チャネルの相互作用が免疫沈降法にて確認され、この相互作用がナトリウム負荷にて増強されていることが確認された。また、アンカー蛋白/チャネルの相互作用はリン酸化修飾により阻害されることが判明したが、この修飾は短時間内では、チャネル活性に影響を与えなかった。

【考察】従来結果と本研究結果から、遠位尿細管ではアミノ末端の長い変異体が血管側、短い変異体が管腔側に各々発現していることが判明した。このことから、管腔側のイオン輸送体の発現にも同定したアンカー蛋白が関与している可能性が示された。リン酸化を介した制御は、短時間ではチャネル活性に影響しなかったが、アンカー蛋白/チャネルの相互作用はチャネルの尿細管内血管側への発現を制御し、個体に対するナトリウム負荷にて制御されていたことから、尿細管でのイオン輸送の長期に渡る活性に影響を与える可能性が推定される。尿細管でリン酸化修飾を行うキナーゼを明らかにすることにより、その制御を介して尿細管イオン輸送を制御出来る可能性がある。

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、生命の維持に重要な臓器に対する障害(心血管イベント)の独立危険因子であることが判明している¹⁾。高血圧の適切な治療による適切な血圧の維持により、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、近年の高血圧治療ガイドラインにおいては、他の心血管イベント危険因子合併症例においては、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。生理学的に推定されていた「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であり、循環血漿量調節機能は腎臓が担っている」という、高血圧治療における腎臓での循環血漿量制御の重要性が、近年の病態生理学的検討から再認識された²。しかし、以下の問題点のため、高血圧症例での循環血漿量制御が不適切であることが多い。①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る。②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ない。このように、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っていると推察される。

腎臓は、糸球体で濾過されたナトリウムを、尿細管で再吸収する機構により、ナトリウムの摂取量に対応し、排泄を制御することにより、循環血漿量を規定している。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が、 Na^+/K^+ -ATPase は、

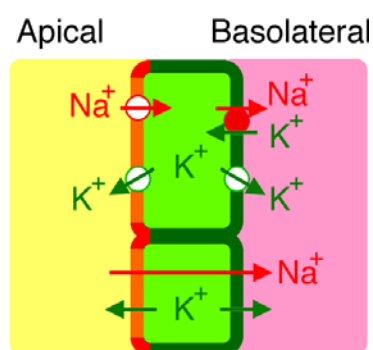


Fig. 1. “ K^+ -recycling” for renal distal tubular Na^+ -reabsorption. In renal distal tubules, Na^+/K^+ -ATPase conducts active transport on basolateral side, and Na^+ -transporters conduct passive transport on apical side (upper schematic cell). Because Na^+/K^+ -ATPase induces K^+ -entry into the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

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)³。従来の研究で、カリウムリサイクリング機構を担う血管側カリウムチャネルのアンカー蛋白の同定に成功しており、本研究では、アンカー蛋白のカリウムリサイクリングの制御機構に関して、更なる解明を試みた。

2. 研究方法

2.1 MAGI-1a とチャネルの相互作用の制御

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⁴、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⁵。更に、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 法を施行することにより、カリウムチャネルのカルボキシル末端部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) ファミリー⁶のカルボキシル末端部を同定し、同定したアミノ酸配列に基づく PCR 法にて腎臓から、MAGI-1a の新たなスプライス変異体を同定単離していた (Fig. 2)。

同定した MAGI-1a 変異体とチャネルの Green fluorescent protein (GFP) 複合体と、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) 複合体において、各々の欠損変異体やアミノ酸変異体を作製することにより、MAGI-1a とチャネルの相互作用部位の同定を行った結果、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 であり、モチーフ中のセリン残基が MAGI-1a とチャネルの相互作用に不可欠の役割を果たすことを解明していた。

更に、このセリン残基は 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⁷、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、モチーフのリン酸化による MAGI-1a とチャネルの相互作用に対する効果を培養細胞系 (HEK293T) において検討し、この結果、HEK293T 細胞に共発現させた MAGI-1a と Kir4.1 の相互作用は、PKA 刺

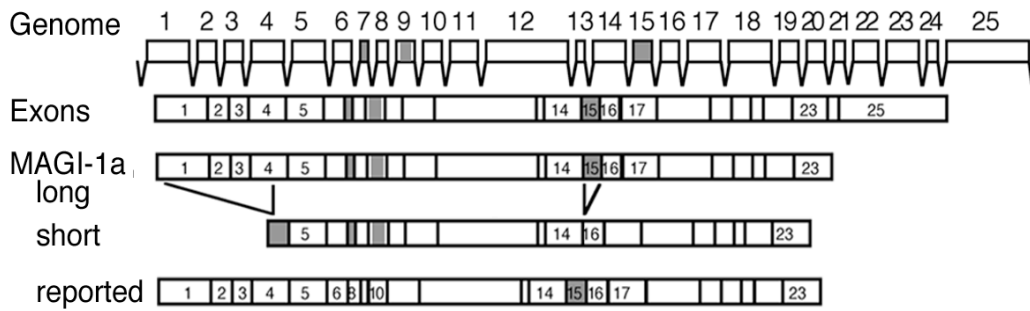


Fig. 2. Arrangements of exons in the MAGI-1a isoforms, identified from rat kidney, are schematically shown. Splice sites identified in this study are indicated by gray.

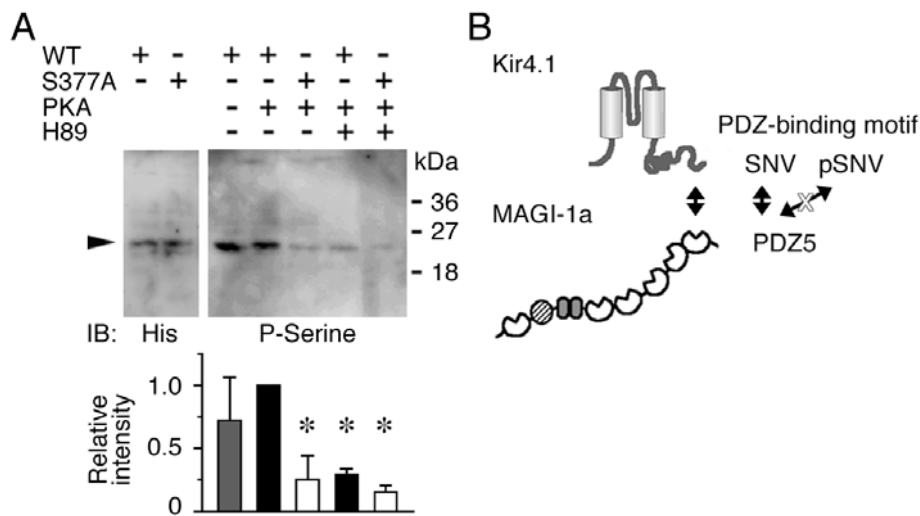


Fig. 3. Phosphorylation of serine residue in PDZ-binding motif.

A, PKA-phosphorylation of CT portion of Kir4.1. Poly-histidine tagged CT81 segment of Kir4.1 expressed in HEK293T cells was detected by antibodies indicated. His, anti-polyHistidine antibody; P-Serine, anti-phosphoserine antibody. Sequence of segments and condition of treatments are indicated above panels. WT, wild-type; S377A, mutant with serine377 to alanine; PKA, stimulation with cAMP cocktail; H89, inhibition by H89. Representative immunoblots are shown in upper panels and relative intensity is summarized in bar graph (mean \pm SD, n = 4, * $P < 0.01$ compared with WT/PKA+/H89-).

B, Schematic summary of MAGI-1a-long/Kir4.1 interaction. Only PDZ-binding motif of Kir4.1 with unphosphorylated serine377 can bind to PDZ5 of MAGI-1a-long.

激下では阻害され、この阻害はPKAに対する特異的な活性抑制により解除され、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ことを解明していた (Fig. 3)。

そこで、HEK293T 細胞においてリン酸化のチャンネルへの効果を更に検討した。培養細胞系にチャンネルを発現させ、PKA の活性化を促進する条件及び阻害する条件において、カリウムチャンネル活性を測定することにより、リン酸化によるチャンネル制御への効果を検討した。

2. 2 MAGI-1a 変異体の組織発現分布

MAGI-1a 変異体の組織発現分布を MAGI-1a スプライス変異体共通抗体を用いて検討した。アミノ末端側において二つの MAGI-1a 変異体に共通する特異的なアミノ酸配列 (MAGI-1a スプライス変異体のスプライス部位外の特異的なアミノ酸配列) に対して、特異的な抗体を作製し、抗 MAGI-1a 抗体を作製した。作製した抗体の MAGI-1a 変異体に対する特異性を確認し、特異性が確認できた抗体を用いて、各変異体を含めた MAGI-1a の腎臓内での発現

分布を、免疫組織染色法にて確認した。チャネルに対する特異的抗体を用いた二重染色法にて、腎臓における MAGI-1a とチャネルの共発現の有無を確認した。

2. 3 MAGI-1a とチャネルの腎臓における相互作用

MAGI-1a 特異的抗 MAGI-1a 抗体とチャネル特異的抗体を用いて、免疫沈降法にて腎臓における両蛋白の相互作用を確認した。

2. 4 イオン負荷の MAGI-1a・チャネル相互作用への効果

個体への食塩負荷状態が MAGI-1a・チャネル相互作用に及ぼす影響を検討した。8 週齢ラットを各群 3 匹づつ、低食塩 (0.3% NaCl) の普通食と高食塩食 (8% NaCl) で、2 週間飼育し (high-salt)、飼育後、腎臓からの蛋白を抽出した。抽出した蛋白を用いて、両個体群における MAGI-1a・チャネル相互作用の相違を、免疫沈降法を用いて比較した。

2. 5 腎臓での食塩排泄障害が高血圧に関与していると考えられる病態における臨床的検討

腎臓での食塩排泄障害が高血圧に関与していると推察される二次性高血圧の原因の一つとして腎血管性高血圧がある。腎血管性高血圧の原因として動脈硬化性血管病変を上げることができる。動脈硬化性腎動脈狭窄症の治療指標として、画像所見の評価法を検討した。

一般に腎動脈狭窄症の評価法としては、腎動脈の狭窄病変による相対的占有率 (相対狭窄度) が用いられているが、相対狭窄度の病変に対する評価指標としての有効性は十分に検討されていなかった⁸。そこで、造影所見の特徴から動脈硬化性狭窄と診断した 55 病変を対象とし、病変所見から最狭窄部の変数として、その最小径と相対狭窄度を計測し、これらと狭窄部圧格差との関連、血圧コントロールを指標とした治療効果との関連を解析した。

3. 研究結果

3. 1 リン酸化によるチャネル制御への効果

HEK293T 細胞を用いた培養細胞系 (HEK293T) においては、PKA 刺激による PDZ-binding motif のリン酸化により、MAGI-1a と Kir4.1 の相互作用は阻害され、この阻害は PKA に対する特異的な活性抑制により解除された。このことより、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を解明していた

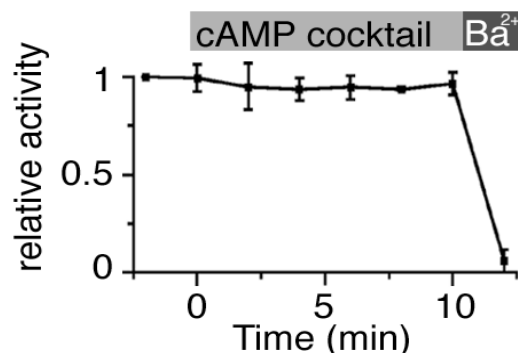


Fig. 4. Effect of PKA phosphorylation on Kir4.1 channel activity. The graph summarizes the relative K^+ -current of Kir4.1 under conditions indicated above graph ($n = 3$). No reduction of the channel activity was observed during PKA phosphorylation. cAMP cocktail, cAMP cocktail in bath solution; Ba^{2+} , 3 mM barium in bath solution.

(Fig. 3)。しかし、MAGI-1a と Kir4.1 の相互作用を十分に阻害しうることを確認した時間 PKA 刺激を加えても、HEK293T 細胞に MAGI-1a と共発現させた Kir4.1 のカリウムチャネル活性は抑制されなかった (Fig. 4)。

3. 2 MAGI-1a の組織発現分布の解明

アミノ末端側において二つの MAGI-1a 変異体に共通する特異的アミノ酸配列を用いて、抗 MAGI-1a 抗体を作製した。作製した抗 MAGI-1a 抗体が各 MAGI-1a 変異体を特異的に認識することを確認した (Fig. 5A)。

作製した抗 MAGI-1a 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 変異体は腎皮質に存在する尿細管の血管側のみならず尿細管腔側にも、その発現を認め、血管側では腎遠位尿細管血管側カリウムチャネル Kir4.1 との共発現を認めた (Fig. 5B)。この結果、MAGI-1a 変異体が遠位尿細管に特異的に発現し、ヘンレ上行脚の遠位端部から遠位曲尿細管において、これらの尿細管に特異的な血管側カリウムチャネルと血管側において共発現していることが判明した。

3. 3

以前作成した長いアミノ末端を持つ MAGI-1a 変異体のみが有するアミノ末端部に対する特異的抗 MAGI-1a 抗体を用いて、相互に免疫沈降されることを確認したのと同じく、今回作製した抗 MAGI-1a 抗体を用いた免疫沈降法においても、腎臓でカリウムチャネル Kir4.1 は MAGI-1a と免疫沈降された (Fig. 5c)。

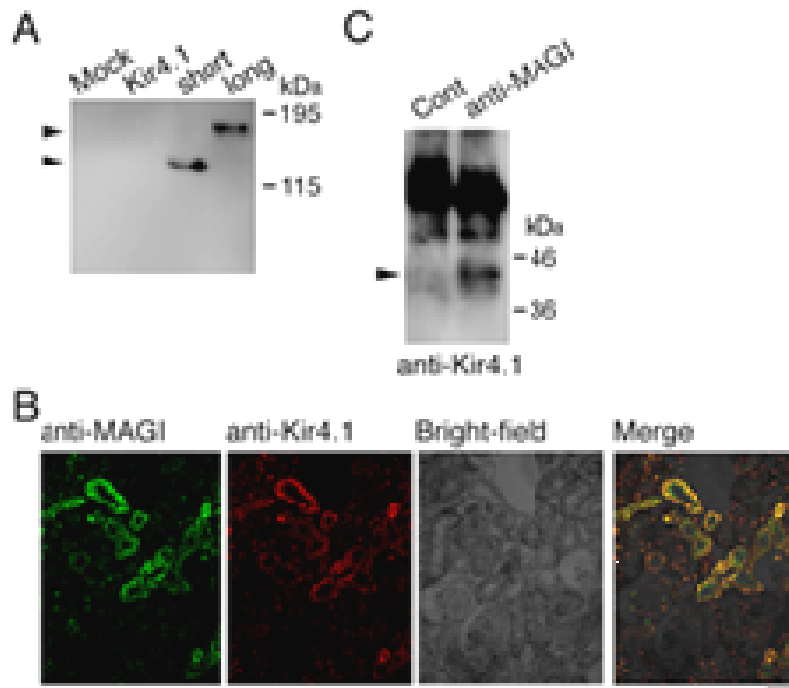


Fig. 5. Expression of MAGI-1a in rat kidney.

A, Immunoreactivity of the anti-MAGI-1a antibody raised in this study. The antibody specifically detected MAGI-1a isoforms expressed in HEK293T cells. Arrowheads indicate the sizes for MAGI-1a-short (lower) and MAGI-1a-long (upper).

B, Coimmunostaining of rat kidney with the anti-MAGI-1a antibody (green) and the anti-Kir4.1 antibody (red). MAGI-1a was colocalized with Kir4.1 on the basolateral side of distal tubules in the cortex. Scale bar: 50 μ m.

C, Mutual immunoprecipitation of MAGI-1a and Kir4.1. Immunoprecipitants of pre-immune rabbit IgG (Cont) and anti-MAGI-1 antibody (anti-MAGI) were detected by the antibodies indicated. Arrowheads indicate the predicted size of Kir4.1.

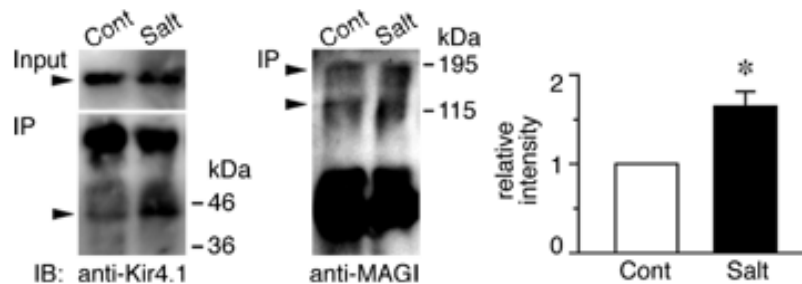


Fig. 6. Increased intrarenal MAGI-1a/Kir4.1 interaction in the salt-loaded rats. Left and middle panels show representative results of immunoblotting. More Kir4.1 was coprecipitated with MAGI-1a in the kidney of the salt-loaded rat than the control, although nearly same amount of Kir4.1 is expressed in both (left panels). The antibody used for coprecipitation precipitated a same amount of MAGI-I isoforms in the control and salt-loaded rats (middle panel). Bar graph shows the relative intensity of the coprecipitated Kir4.1 in the salt-loaded rats to that in the control (n=4; * P <0.01). Cont, control; Salt, salt-load.

3. 4 結合蛋白とチャネルの相互作用のリン酸化による制御

普通食低食塩(0.3% NaCl) (コントロール)または高食塩食(8% NaCl) (食塩負荷)で2週間飼育したラットの腎臓か

ら抽出した蛋白を同量ウエスタンブロットで解析した。食塩負荷群ではコントロール群に比較し、Kir4.1の発現量が少ない傾向が認められたが、発現量に有意な差は無かった (Fig. 6)。

これに対して、抗 MAGI-1a 抗体により免疫沈降される Kir4.1 の量は、コントロール群に比較し、食塩負荷群で有意に多かった。抗 MAGI-1a 抗体により免疫沈降される MAGI-1a 変異体の量は両群ではほぼ同じであった。

3.5 腎動脈狭窄の画像的指標の検討

最小径は相対狭窄度より高い圧格差との相関(収縮期; $r^2 = 0.429$)を示した。収縮期圧格差 > 20 mmHg に対し最小径は最大の ROC 曲線下面積(0.907)を有し、最小径 < 3 mm の感度/特異度は 0.973/0.611 であった。血行再建治療効果も最小径 < 3 mm の病変は最小径 ≥ 3 mm の病変より高く、相対狭窄度に基づいては有意でなかった治療効果のある病変の選別を、有意に行えた($P < 0.001$)。

4. 考察

従来の研究で、①PDZ-binding motif が遠位尿細管血管側カリウムチャンネルの機能的局在を規定するシグナルであること、②PDZ-binding motif の認識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を同定、③MAGI-1a と血管側カリウムチャンネルの相互作用が PDZ-binding motif のリン酸化状態で制御されることの解明に成功していた^{5,9}。

本研究では、更に、①PDZ-binding motif のリン酸化は、培養細胞における強制発現下では、少なくとも数分間という短時間のタイムスケールでは、MAGI-1a との相互作用には影響をあたえるが、カリウムチャンネル活性には影響しないこと、②生体に対するナトリウム負荷量により、MAGI-1a と血管側カリウムチャンネルの相互作用が影響されることを明らかにできた。

血管側カリウムチャンネルの MAGI-1a との相互作用が阻害されても、カリウムチャンネル活性が影響されなかったことに関しては、PDZ-binding motif を介したカリウムチャンネルへの制御が、チャンネルの細胞表面への発現量では無く、細胞表面直下のチャンネルの発現量に影響することを、反映していると考えられた。このことを、示唆する所見として、以前の研究で、カリウムチャンネルの細胞表面ではなく、細胞表面直下の細胞内器官への発現量が、PDZ-binding motif を介して増加することを示している⁵。

本研究では、MAGI-1a の新たなスプライス変異体の双方を認識する抗体を用い、腎臓での MAGI-1a の発現を、遠位尿細管の血管側のみならず、管腔側にも認めた。以

前の研究で、スプライス変異体のより長い変異体のみを特異的に認識する抗体では、MAGI-1a の発現を血管側だけに認めていたことから、スプライス変異体のより長い変異体が血管側に、より短い変異体が管腔側に発現している可能性が示された。双方を認識する抗体でも、腎臓内での MAGI-1a と血管側カリウムチャンネルの相互作用を再確認することができたことから、より長い MAGI-1a 変異体が腎遠位尿細管の血管側において、カリウムチャンネルのアンカー蛋白として機能している可能性が更に強固となった。

食塩負荷食にて、塩分含有量の少ないコントロール食下の個体に比較し、個体における MAGI-1a と血管側カリウムチャンネルの相互作用が増強する可能性が、本研究にて示された。食塩負荷状況により、個体のミネラルコルチコイド分泌が制御されることが明らかになっており(食塩負荷により分泌抑制、塩分不足にて分泌促進)、食塩負荷状況下では、遠位尿細管におけるミネラルコルチコイド作用が抑制され、ミネラルコルチコイドにより誘導される SGK1 等のキナーゼの作用が低下したことが推定される¹⁰。これら尿細管でのキナーゼの作用が低下により、チャンネル PDZ-binding motif のリン酸化が抑制され、MAGI-1a との相互作用が増強された可能性が推察される。

本研究では、以上の基礎的研究に加え臨床的側面からの、高血圧疾患に対する治療法のアプローチも行い、二次性高血圧の主因の一つである腎動脈狭窄病変において、その狭窄部の血行動態への影響の指標として、従来用いられていた指標である相対狭窄度より、狭窄部最小径が、血管造影所見上の指標としては有効である可能性を示すことが出来た¹¹。

5. 今後の課題

個体レベルでの、血管側カリウムチャンネルの制御に、ミネラルコルチコイドが関与している可能性が推定された。ミネラルコルチコイドを介した経路が、カリウムチャンネルのリン酸化がチャンネル活性や局在に及ぼす影響や、実際に腎臓でカリウムチャンネルのリン酸化に関与しているかを、解明する必要がある。また、MAGI-1a の変異体が、尿細管管腔側にも発現していたことは、管腔側カリウムチャンネルの発現制御にも MAGI-1a が関与している可能性を示唆しており、MAGI-1a と管腔側カリウムチャンネルの関連の解明も試みたい。ノックアウトマウス等を用いた個体レベルでの研

究も、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の解明に必要である。更に、遠位尿細管におけるカリウムチャネルの制御にWNKキナーゼ family の関与も示唆されており、これらによるカリウムチャネルのリン酸化への関与も解明する必要がある¹²。

文 献

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*. 2003; 289: 2560-2572.
2. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001; 104: 545-556.
3. Giebisch G. Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int*. 2001; 60: 436-445.
4. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol*. 2000; 525: 587-592.
5. Tanemoto M, Abe T, Ito S. PDZ-binding and dihydrophobic motifs regulate distribution of Kir4.1 channels in renal cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2608-2614.
6. Laura RP, Ross S, Koeppen H, Lasky LA. MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp Cell Res*. 2002; 275: 155-170.
7. Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol*. 1991; 200: 62-81.
8. Safian RD, Textor SC. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2001; 344: 431-442.
9. Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, Ito S. PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: F1148-1153.
10. Alvarez de la Rosa D, Coric T, Todorovic N, Shao D, Wang T, Canessa CM. Distribution and regulation of expression of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in the rat kidney. *J Physiol*. 2003; 551: 455-466.
11. Tanemoto M, Abe M, Uruno A, Abe T, Ito S. Angiographic index for angioplasty-treatable atheromatous renal artery stenosis. *Hypertens Res*. 2008. in press
12. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J*. 2005; 391: 17-24.

No. 0734

New Therapy of Hypertension by the Regulation of Ion Channel Scaffolding

Masayuki Tanemoto, Sadayoshi Ito

Division of Nephrology, Hypertension & Endocrinology
Department of Medicine, Tohoku University Hospital

Summary

【Back ground and objectives】 Being the most common disorder in the industrialized societies and an independent risk factor for end-organ damage, hypertension 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) participates in the pathogenesis of hypertension. In the previous studies, we identified the components of K⁺ recycling pathways, which is indispensable for the Na⁺ reabsorption in DCT. A member of the Membrane Associated Guanylate Kinase (MAGUK) family, Membrane Associate Guanylate kinase with Inverted domain structure 1 (MAGI-1a), functions as a scaffolding protein for the basolateral K⁺ channels, one of the K⁺ recycling pathways in DCT. In this study, we aimed to identify the regulatory mechanism for the interaction of MAGI-1a and the K⁺ channels.

【Methods and Results】 By raising antibodies that specifically recognize isoforms of MAGI-1a, we clarified different intracellular distribution of two variants of MAGI-1a in DCT: one variant (MAGI-1a-long) on the basolateral side, and the other variant (MAGI-1a-short) on the apical side. MAGI-1a-long colocalized with the basolateral K⁺ channels, and its intra-renal interaction with the channels was increased under a sodium-loading condition. The interaction between MAGI-1a-long and the channels was regulated by the phosphorylation of the carboxyl-terminal portion of the channel subunit, Kir4.1. The phosphorylation disrupted the interaction and changed the intracellular distribution of the channels, but did not affect the channel activity at least for short duration.

【Conclusions】 MAGI-1a seem to participate in the intracellular distribution of membrane proteins in DCT, and different variants function as scaffolding protein for different part: MAGI-1a-long and MAGI-1a-short for basolateral and apical part, respectively. The phosphorylation-dependent regulation of the K⁺ channels' scaffolding by MAGI-1a-long is thought to regulate the long-term but not short-term basolateral K⁺ recycling. It is possible that MAGI-1a-short functions as a scaffolding protein for the apical channels and transporters, and the scaffolding is phosphorylation-dependently regulated. The *in vivo* mechanism for the phosphorylation could be a new target for the treatment of hypertension and hyperkalemia.