

## 食塩感受性高血圧におけるマグネシウム再吸収の異常機構の解明

五十里 彰<sup>1</sup>, 木村 徹<sup>2</sup>, 菅谷 純子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学薬学部, <sup>2</sup>杏林大学医学部

**概要** 慢性的なマグネシウム不足は、心疾患や高血圧などの循環器疾患、精神疾患などを引き起こすと考えられている。マグネシウムは生理機能の維持において重要な役割を担うにも関わらず、その調節機構は不明な点が多い。これまでの本財団からの研究助成により、申請者は腎尿細管に発現するクローディン-16 がマグネシウムチャンネルとして機能し、その細胞内分布調節にリン酸化機構が関与することを報告した。さらに、食塩感受性高血圧発症ラットにおいて、クローディン-16 が脱リン酸化し、マグネシウム排泄が増大することを明らかにした。脱リン酸化したクローディン-16 は細胞質内に分布したが、その調節機構は不明であった。そこで本研究では、クローディン-16 の細胞内分布調節に関与する会合タンパク質を探索した。また、クローディン-16 の発現調節機構が未解明であるため、転写調節機構を調べた。

酵母ツーハイブリッド法を用いて、クローディン-16 のカルボキシ領域に結合するタンパク質を探索したところ、細胞内トラフィッキングの調節に関与する syntaxin-8 (Stx-8)、COPS5 などが見つかった。大腸菌で glutathion-S-transferase 融合クローディン-16 と maltose-binding protein 融合 Stx-8 タンパク質を調製し、両者の会合を調べたところ、予想通り会合することが明らかになった。イヌ腎臓由来の MDCK 細胞にクローディン-16 を発現させて免疫沈降を行ったところ、クローディン-16 と Stx-8 の結合が確認された。現在、クローディン-16 の細胞内分布の調節における Stx-8 の役割を調べている。

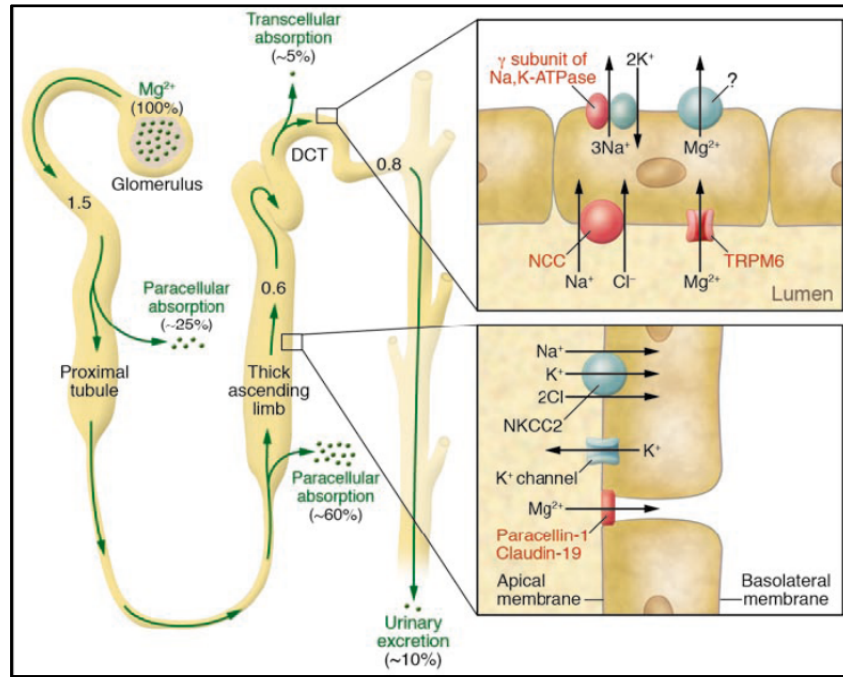
フクロネズミ腎臓由来の OK 細胞において、内在性クローディン-16 の発現が確認された。ヒトクローディン-16 のプロモーター領域をクローニングし、レポーターアッセイを行ったところ、-2195/-1682 の領域に活性部位があることを確認した。マグネシウム再吸収を促進すると報告されている上皮成長因子 (EGF) を作用させたところ、クローディン-16 mRNA 量が約 1.5 倍、転写活性が約 5.3 倍に増加した。これらの結果から、クローディン-16 の転写活性に対する EGF の効果は弱いと示唆された。現在、緑色蛍光タンパク質を融合したクローディン-16 を OK 細胞に発現させ、細胞内分布に対する EGF の効果を検討中である。

以上のように、クローディン-16 の転写と細胞内分布の調節機構を検討し、EGF は転写活性に大きな影響を及ぼさないこと、Stx-8 が細胞内分布の調節に関与する可能性があることを明らかにした。今後、これらの調節機構の異常と病態との関係を検討する必要がある。

### 1. 研究目的

生体内のマグネシウム含量は、腎尿細管における再吸収機構によって厳密に調節される。慢性的なマグネシウム不足は、心疾患、高血圧などの循環器疾患や腎障害の発症に関与すると示唆されている。そのため、マグネシウム再吸収に関与するイオン輸送体を同定し、その発現や機能の調節機構を解明することは、生理学的および病態生理学的に大変重要である。腎臓の糸球体で濾過されたマ

グネシウムの大部分は、ヘンレ上行脚で再吸収される (**Fig. 1**)。これまでの本財団からの研究助成により、我々はヘンレ上行脚に発現するクローディン-16 がマグネシウムチャンネルとして機能し、その細胞内分布調節にリン酸化機構が関与することを報告した<sup>[1]</sup>。さらに、食塩感受性高血圧発症ラットにおいて、クローディン-16 が脱リン酸化し、マグネシウム排泄が増大することを明らかにした<sup>[2]</sup>。脱リン酸化したクローディン-16 は細胞質内に分布したが、その



Muallem, S. and Moe, O. W., J. Clin. Invest. 117, 2086-2089 (2007)

Fig. 1. 腎尿細管におけるマグネシウム輸送経路の模式図

調節機構は不明であった<sup>[3]</sup>。そこで本研究では、クローディン-16の細胞内分布調節に関与する会合タンパク質を探索した。また、クローディン-16の発現調節機構が未解明であったため、その転写調節機構を調べた。

## 2. 研究方法

### I クローディン-16の新規会合タンパク質の探索

#### 2. 1. 1 クローディン-16カルボキシ領域のクローニング

ヒトの腎臓から抽出した mRNA を鋳型として逆転写反応を行い、プライマー (sense: 5'-GGAATTCAAAGATGT TGGAACCTGAGAG-3', anti-sense: 5'-CGGGATCCTTACAC-CCTTGTGTCTAC-3') を用いてクローディン-16のカルボキシ領域を増幅した。アガロースゲルで電気泳動後、目的のサイズのバンドを抽出し、pGBKT7ベクターにクローニングした。シーケンス解析後、以下の実験に使用した。

#### 2. 1. 2 自律活性化試験

クローディン-16/pGBKT7ベクターを酵母に形質転換し、トリプトファン不含培地、オーレオバシジン A 含有培地で培養した。

#### 2. 1. 3 接合実験

酵母 Y2HGold 株を用いて、コンピテント細胞を作製し

た。クローディン-16/pGBKT7ベクターをコンピテント細胞に形質転換した。ヒトの腎臓 cDNA ライブラリーから作製した pGADT7ベクターを含む酵母と、クローディン-16/pGBKT7ベクターを含む酵母を接合させ、トリプトファン/ロイシン/アデノシン/ヒスチジン不含培地で培養した。

### 2. 1. 4 プラスミド DNA の抽出

酵母のコロニーを爪楊枝でかき取り、Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kitを用いて、プラスミド DNA を抽出した。シーケンス解析を行い、遺伝子配列を決定した。BLAST検索を用いて、遺伝子配列に対応するタンパク質を同定した。

## II クローディン-16の転写調節機構の解析

### 2. 2. 1 細胞培養

フクロネズミ腎臓由来の OK 細胞を DMEM/F-12 培地 (5% FCS 含) で培養し、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を MEM 培地 (5% FCS 含) で培養した。3~4 日毎にトリプシン溶液を用いて継代した。

### 2. 2. 2 細胞抽出画分と膜画分の調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、セルスクレーパーで掻き集めてマイクロチューブに移し、5,000 rpm、4°C で 2 分間遠心した。上清を除去後、lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4,

0.1% SDS)で懸濁し、20 秒間のソニケーションにより細胞膜を破壊した。これを細胞抽出画分とし、引き続き 8,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清画分を膜画分として使用した。

### 2. 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ときは、2% bovine serum albumin 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. 2. 4 RT-PCR

細胞を PBS で 2 回洗浄後、ISOGEN で溶解し、溶解液をマイクロチューブに移した。遠心操作により、total RNA を抽出して水に溶解した。得られた mRNA の濃度を測定後、逆転写反応を行った。その後、Table 1 のプライマーを使用して、リアルタイム PCR 反応を行った。

### 2. 2. 5 プロモーターアッセイ

ヒトクローディン-16 の 5'-flanking 領域の-2748/-1 を PCR 法で増幅後、pGL4 ルシフェラーゼベクターにサブクローニングした。PCR 法により、デリーションベクターを作製した。pGL4 ベクターと pRL-TK ベクターを OK 細胞と HEK293 細胞にトランスフェクションし、6 時間後に 5% FCS 含 DMEM/F-12 培地に置換し、さらに 48 時間培養した。EGF を処理する場合は、トランスフェクションの 24 時間後に処理した。Dual-Glo Luciferase assay kit を用いて、ルシフェラーゼの発光強度を測定し、クローディン-16 の転写活性を算出した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 クローディン-16 の新規会合タンパク質の探索

#### 3. 1. 1 クローディン-16/pGBKT7 ベクターの自律活性化と毒性試験

クローディン-16/pGBKT7 ベクターがレポーター遺伝子の転写活性を自律的に活性化しないことを確認するため、pGADT7 ベクターの非存在下で酵母に形質転換した。トリプトファン不含培地でコロニーができ、オーレオバシジン A 含有培地でコロニーができなかった (Fig. 2) ことから、自律活性化能がないことが明らかになった。また、pGBKT7 空ベクターを形質転換した酵母とクローディン-16/pGBKT7 ベクターを形質転換した酵母のコロニーの大きさに差がなかったことから、クローディン-16 カルボキシン領域を発現させても毒性がないことが明らかになった。

#### 3. 1. 2 ライブラリースクリーニング

クロンテック社から購入した Mate & Plate Library (Universal Human) を用いて、クローディン-16 のカルボキシン領域に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、トリプトファン/ロイシン不含/オーレオバシジン A 含有培地で多数のコロニーを得た。この時、トランスフォーム効率は  $1.1 \times 10^4$ 、ライブラリー力価は  $6.0 \times 10^8$ 、スクリーニングされるクローン数は  $4.4 \times 10^8$ 、接合効率は 2.4% であった。

#### 3. 1. 3 プラスミド DNA の遺伝子配列解析

ライブラリースクリーニングで得られた 94 個の陽性コロニーから、プラスミド DNA を抽出した。得られた遺伝子の配列を解析し、BLAST サーチでタンパク質を同定した。その結果、小胞輸送の調節に関与する syntaxin-8 (Stx-8)、ユビキチンリガーゼの調節に関与する COP9 constitutive phothomorphogenic homolog subunit 5 (COPS5)、タイトジャンクションの足場タンパク質の multiple PDZ domain protein (MUPP-1)、細胞外マトリックスの fibronectin が候補タンパク質として見つかった (Table 2)。

Table 1. プライマーの配列

Primer		Sequence
クローディン-16	Sense	5'-CTCACCCCTGCTCCTTGGTCT-3'
	Anti-sense	5'-GCCAATGATTCCTGGGGTACCT-3'
β-actin	Sense	5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3'
	Anti-sense	5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3'

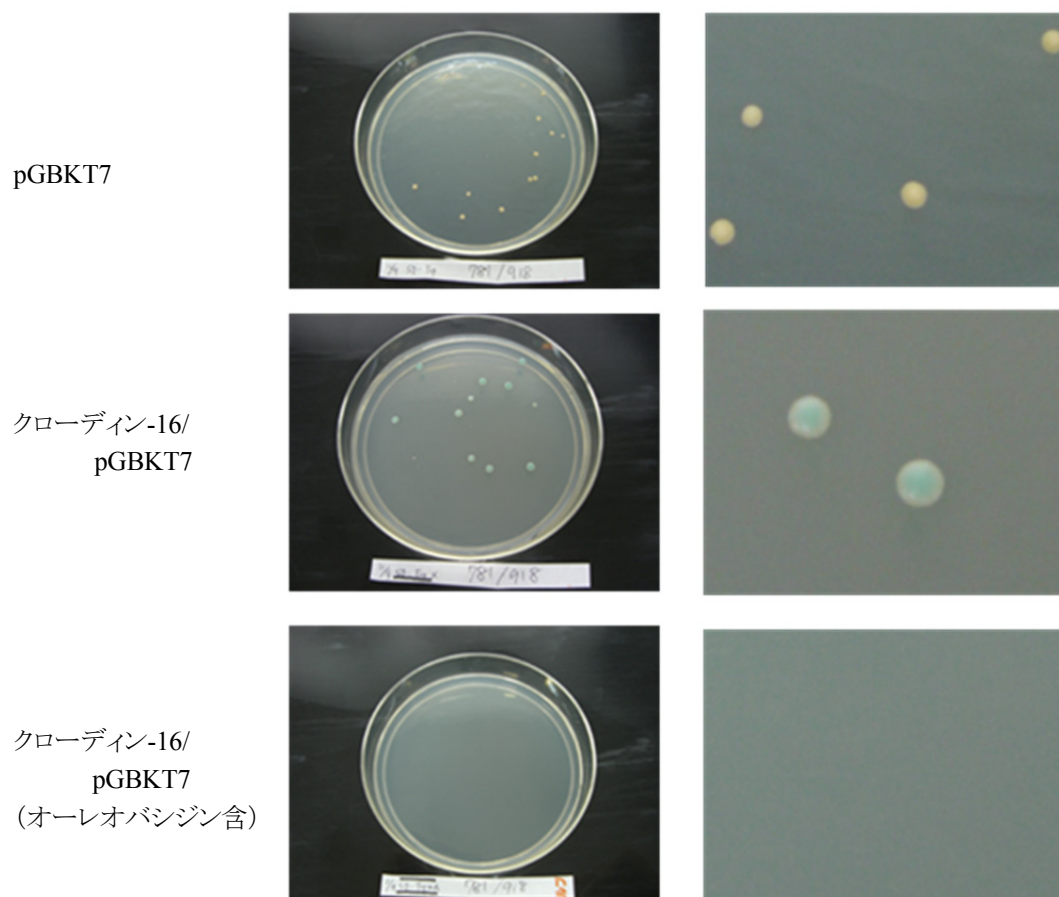


Fig. 2. 自律活性化試験

Table 2. 酵母ツーハイブリッド法で同定されたクローディン-16の会合タンパク質

同定されたタンパク質	タンパク質の働き
Syntaxin-8	小胞とターゲット膜への融合および、膜のターゲッティングにおいて重要な役割を果たすタンパク質である。主に膜タンパク質のエンドサイトーシスの調節に関与する。
COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (COPS5)	E3 ユビキチンリガーゼのポジティブ因子として働く COP9 シグナルソームのサブユニットのひとつである。
Multiple PDZ domain protein (MUPP-1)	13 個の PDZ ドメインを有する。クローディンとの結合が既に明らかになっており、タイトジャンクションの足場タンパク質として働く。
Fibronectin	細胞外マトリックスタンパクのひとつ。細胞の接着、細胞の発生や分化に関与する。

### 3. 1. 4 大腸菌を用いたクローディン-16と Stx-8の会合実験

クローディン-16 の細胞内輸送を調節するタンパク質を明らかにするため、Stx-8 に着目して研究を進めた。GST 発現ベクターにクローディン-16 のカルボキシ領域を組み込んだところ、約 30 kDa のバンドが観察された (Fig. 3)。

MBP 発現ベクターに Stx-8 の細胞質領域を組み込んだところ、約 60 kDa のバンドが観察された。作製したタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、クローディン-16と Stx-8 の会合が確認された。一方、GST タンパク質と MBP タンパク質は会合しなかった。以上のことから、クローディン-16と Stx-8 は会合することが証明された。

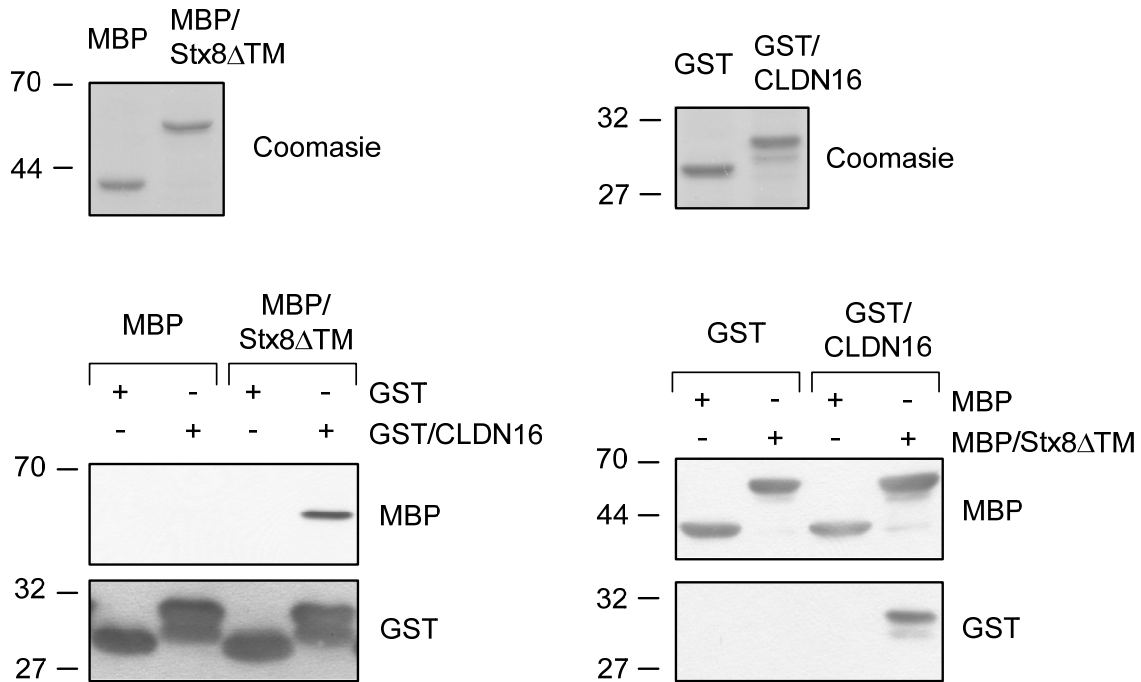


Fig. 3. 大腸菌発現系におけるクローディン-16とStx-8の会合

### 3. 2 クローディン-16の転写調節機構の解析

#### 3. 2. 1 腎尿管培養細胞におけるクローディン-16の発現の確認

OK細胞とHEK293細胞から膜タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法でクローディン-16の発現を確認したところ、両細胞でバンドが検出された。OK細胞と比較してHEK293細胞ではバンドの位置が高かったが、これはヒトクローディン-16のアミノ末端領域が他動物種に比べて長いためであると示唆される。

#### 3. 2. 2 クローディン-16の転写調節領域の解明

クローディン-16の転写調節機構を調べるため、-2748/-1のプロモーター領域をクローニングした(Fig. 4)。このベクターは、mockベクターと比較してHEK293細胞では約1.5倍、OK細胞では約5.3倍の転写活性を示した。OK細胞の方がレポーター活性が大きかったため、OK細胞を用いてデリーションアッセイを行った。-2196/-1プラスミドは、-2748/-1プラスミドと同程度のレポーター活性を示したのに対し、-1681/-1プラスミドでは活性が有意に低下した。このことから、-2195/-1682の領域に転写調節因子が作用すると示唆された。

#### 3. 2. 3 クローディン-16の発現に対するEGFの効果

EGFはマグネシウムの再吸収を調節すると考えられて

いるが、そのメカニズムは解明されていない。そこで、クローディン-16の発現に対するEGFの効果調べた。クローディン-16 mRNA量に対するEGFの効果調べたところ、mRNA量が約1.5倍増加した(Fig. 5)。この効果はMEK阻害剤のU0126によって阻害された。

#### 3. 2. 4 クローディン-16の転写調節因子の探索

クローディン-16の発現調節にMEKの関与が示唆されたため、その下流に存在する転写調節因子として、c-Fos、c-Jun、NF-kBのリン酸化量を測定した。その結果、これらのリン酸化量はEGFによって増加し、U0126の共処理によって低下した(Fig. 6)。このことから、c-Fos、c-Jun、NF-kBがクローディン-16の転写調節に関与する可能性がある。

#### 3. 2. 5 クローディン-16の細胞内分布に対するEGFの効果

これまでに我々は、クローディン-16の細胞内分布がリン酸化機構によって調節されており、クローディン-16が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量が増加することを報告している<sup>[1]</sup>。そこで、クローディン-16の細胞内分布に対するEGFの効果を検討することにした。クローディン-16の細胞内分布を調べるため、AcGFP融合クローディン-16の発現細胞を構築した。ク

ーディン-16 の発現を、蛍光免疫染色法で確認した。AcGFP による緑色の蛍光が、細胞間の領域に観察された。また、GFP 抗体を用いてウエスタンブロット法でクローディン-16 の発現を確認したところ、予想サイズの 50 kDa 付近

にバンドが観察された。今後、この細胞を用いて、クローディン-16 の細胞内分布調節における EGF の効果を調べていく予定である。

```

-2748
GTTTGCATGA CTCTCCTTTT TGTATCTCCT ATTACATTAT GGCCTCACTC ACAGAAATTC ACATGCAAGC
CTGAATGTTT TATGTTATTC TCTAAGAGTA GTAAACTTAA ATTCAGGAAC AATTCATATAG CCACCTGAAT
AATTCCCCAC TCCCTATCAC ATACAATGTT CAGTGACCAT TAGGAGCGAA TGAATGCTAT AGTCTAGATT
TTTTTTTTTG TGAAAGAATC TATGATTTCC AGAGATATGT ATGCACATGT GTGTGTTTGC ATATGAGAAT
GCATATGCTT AGCATTTTTT GGTCTTTATT TCTTTCCATT AAGTTCTGAT ATTTGGATTT GGGACCTATT
GGTGCTAGTT AGGGAAGAGT TTGTAGCAAA GATGGAATTC TGATACCCCTC TTTTCTAAAA CTTTGTCTGT
GATTTGTAGT ATATAACTCT TAAAAAATTG TTTTCTTTT GTTGTTCTAA ACTCATCTCT CAAAGTATGG
                                                                                               -2196
CCATCTGTTT CAAAATCAGA ATTTTATACA AAACACATGT AAAATATGAA TTCCTGGCTT CCACTCCCAA
TTTCTGAAT CCAAATGTCT GGGAGTGGAA TTCCTGGGT TGCATTTATA ACAAGTGGCC TTACAGAGTC
CAGTGACAC TCAGGTTGAA GAACTACTGC CTTGGAGTGC ACTGTTAGCA GGTAAAGTAC ACTGTGAAAA
GTCCTGTGT GAAATGTCAG CAACAAGTCC AGGACTTTTC CTGCAAAGGG CATGTGCTTT TGGAATTGGT
TTGCTCTCCC AGATCAGCAG AGTAAATCTT AATAGCATTT CAGATTTTAG GGCACAGGGA AAGATTCTCT
GTGACTCACC AAAGCAGCAT GTTTGTATTC CGTGGGCAAT GACATTCTTT GAATGAGCAC TTAaaaaaca
GGTATTTTTT TTCCAActGT TAAACAAAAT AAGTAAAATA AAAGCATCTG TAATGTACCT CGCAGATAGT
                                                                                               -1681
TATAACGATC GCTAATGTGT ACAGTAATCA CCCCTTCTCC TTGAGGAATA TGTTCAAAGA CCCTCAGTGG
ATGTCAGAAA CGAAGGACAG TACTGGATCC TACACACACT ATACGCAACA GTAGGTCAGA TCACCGAGGC
AGCTATTAAG TGAActAAGGG GTGGGTAGTG CATACAATGT GGAAATGCTG GCCAAAGGGA TGATTCATAT
CCCATGTGAA GTGGGATGGC TTGAGATTTT ATCACGCTAT TCAGAACAGT GTTCAATTTA CCACTGATGA
ATTGTTTATC TATGAAATTT CCCATGTAAT TTTTGCAGAC CATGATTAAC CACTGGTAAC TGAAGCCTCA
AAAGGAAAT TCTGGATAGC AGGGGTGGTA CTGTAGACCC TATGTATAGA AATAATTAAG CTTATATTC
ACCTATGGTT TTCCATGCAG CTTTTACATT TAAATTTACG TTTTATATAC TTGAATAAAA TGAATTAaaa
TTAGAAAAAA CAAAGTTTAG CCACAAAAAG TTTATTATFG TAATATATTT TGAaaaaatgg TTTATCAATA
CTGATTTTAG CTTTTTATAC TGTATATTAT GATCAAATAA TTTTCAAATG GAAAAAAGTA ATCCTTTTAT
AAGCTGTTGG TAAAATAAGA ATCTTAGTAG CTGATTCATG CCAGAGTAAT TACCTCTTTC TGGCCTTTTC
TCTGCTCCTT TCTTCTCTC CCTCCCAATT TCTTCTCTC ACTCTGTCTC CCCTTTGACA TTCTCTCCTA
CATTAAAGAA CACCACCTTG TTTTACTGT TCTCATCAA AATTTTTATT TTAGTATATA GAAGTCTACC
TGATGAAGAG AAAATGTTGA TATATGTGCT TTTTAAAGCA TATTAAAGAG TATTGGTTAT GGAATTTGTA
GACCCATTA GGATACCTAT TCAGATACAG ATAAAAATCC AGTTGCCCA GTTACATATT AAAAactttt
TTTTACAAAA AAGAAACACA CTTTCTTCT AATATAACAG TTTTTTTTTT TTCATTAGAC GCGTTTTCAA
ACATTGGTCC ATGAGGGAAA AGTAATAATA TAGGAAATTC TTAGTCATGT TAATATTTTC CATTAGCTA
TTACTGACAG ATGCTATTCT AAGCGACTTA CAGGCACAAT ATCTTTTATT CCTCATATGA AGAACAAGCA
TTATATAAAG AAAATATTAA TACATGCATT TTCAGAACT ACAGCCCAAG GGCTCTCAGA CCATAAATTC
AGAGCAAGAA TTTCCACCCA GAGCTGTCTG CATTAaaaTG CACTTGT TCCACTCTAC GATGCTGAAA
GGTTAGGAGC CTTGGCTGTC CTTACTGCC AGGTGCTACA AGTCCTTCAT GGGGCTGTTC TACGCAACAC
TTTGGAATGC AGACTCCCTT GAGCGAGCAC TTGTTTAGCA TAGTTTACC AGTGGCCTGT CTGTCTAAAG
TAGTCGGCGA ATATTAAAAT AGTCCTAACA ATAAAAAAC ACTCAGTCAA CCGTGTAGCC TTCTCCGAG
TGGGAGGAG AATAGCTCAC TCTCCCTAGA GGCCTAAGA AAGATCAGTT TACAGGTTCC AGCATGGGGT
GGGACCTTC CTCCTTCCCC CGTCTTGCA CTGGCACTTG GTCTGGTGAC CACCACTAGC CCACAGTTGG
GTCAGAAAA GTTACAGAAC TCCTCTCTCC CCCACCGAA ACACACTCAG CCCTTGCACT GACCTGCCTT
                                                                                               -1
CTGATTGGAG GCTGGTTG

```

Fig. 4. クローディン-16 のプロモーター領域の遺伝子配列

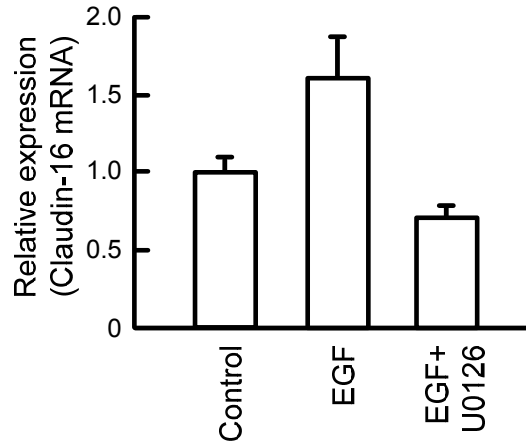


Fig. 5. クローディン-16 mRNA の発現に対する EGF の効果

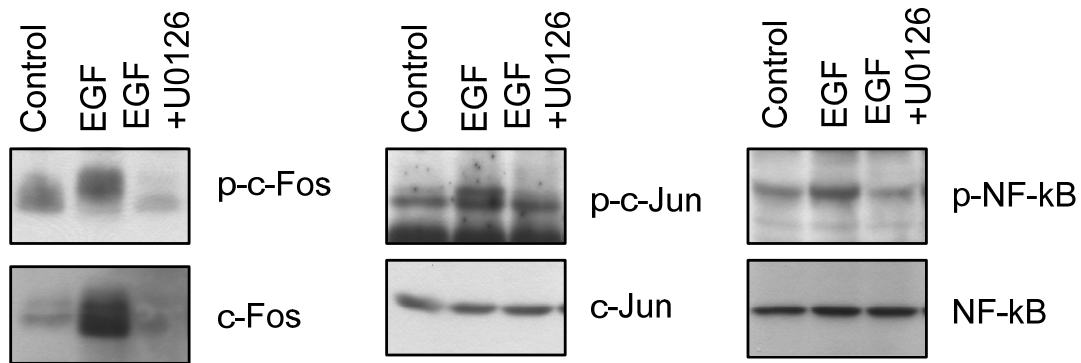


Fig. 6. EGF による c-Fos、c-Jun、NF-kB のリン酸化

#### 4. 考察

食事や飲料水中のマグネシウムは、腸管から受動拡散によって吸収される。そのため、腸管におけるマグネシウム吸収の調節機構は存在しないと考えられている。体内に吸収されたマグネシウムは糸球体で濾過され、その大部分が尿細管から再吸収されることにより、体内のマグネシウム含量が厳密に調節される。そのため、尿細管におけるマグネシウム再吸収機構の異常が、高マグネシウム血症や低マグネシウム血症を引き起こすと考えられる。糸球体で濾過されたマグネシウムのうち、約 60%がヘンレ上行脚に発現するクローディン-16 を介して再吸収される。クローディン-16 がマグネシウム濃度の調節において重要な役割を担うと示唆されるが、その発現調節機構は不明なままであった。近年、我々は食塩感受性高血圧発症ラットを用いて、クローディン-16 が脱リン酸化し、マグネシウム排泄が増大することを明らかにした<sup>[2]</sup>。また、脱リン酸化したクロー

ーディン-16 は細胞質内に分布し、マグネシウム輸送量を低下させることを報告した<sup>[1]</sup>。本研究において、酵母ツーハイブリッド法を用いてクローディン-16 の会合タンパク質を探索し、Stx-8 というタンパク質を見つけた。Stx-8 は膜タンパク質の細胞内輸送に関与することから、クローディン-16 のタイトジャンクションへの輸送、または細胞質への輸送の調節に関与すると示唆される。大腸菌タンパク質発現系を用いてクローディン-16 と Stx-8 の会合が確認された。今後、クローディン-16 の細胞内トラフィックの調節において、Stx-8 がどのような役割を担うのかを解明する必要がある。

細胞膜上に分布する pro-EGF は、プロテアーゼの働きによって切断され、EGF を細胞外に分泌する<sup>[4]</sup>。Pro-EGF の遺伝子配列に変異があり、正常に EGF を分泌できない人が、低マグネシウム血症を引き起こすことが報告された<sup>[5]</sup>。EGF はマグネシウム指向性ホルモンとして働くことが明

らかになったが、そのメカニズムはほとんど解明されていない。我々は、TRPM6 というマグネシウムチャネルの発現が、EGF によって調節されることを報告した<sup>[6]</sup>。また、Groenestege ら<sup>[5]</sup>は TRPM6 の細胞膜へのトラフィックが、EGF によって調節されることを報告した。このように TRPM6 に対する EGF の作用が明らかになってきたが、クロードイン-16 の発現に対する作用は調べられていない。本研究においてクロードイン-16 の発現に対する EGF の効果を調べたところ、EGF はクロードイン-16 mRNA 量を増加させた。この発現増加は、U0126 によって完全に阻害されたことから、MEK を介するリン酸化機構が関与すると示唆された。EGF によって c-Fos、c-Jun、NF- $\kappa$ B といった転写調節因子のリン酸化量が増加したことから、これらの転写調節因子がクロードイン-16 の転写調節に関与すると示唆される。レポーターアッセイにおいて、-2195/-1682 のプロモーター領域に転写調節因子が作用すると示唆された。この領域には、c-Fos、c-Jun、NF- $\kappa$ B の推定上の結合領域が存在することから、これらの転写調節因子の関与が高いと考えられる。

## 5. 今後の課題

本研究では、大きく分けて3つの研究成果が得られた。(1)クロードイン-16 の新規会合タンパク質を探索し、細胞内トラフィックの調節に関与する Stx-8 を同定した。クロードイン-16 の細胞内分布の調節における Stx-8 の役割を解明する必要がある。(2)EGF によるクロードイン-16 の転写調節領域を解明した。転写調節因子を明らかにする必要がある。(3)クロードイン-16 の細胞内分布を調べるため、AcGFP を融合したクロードイン-16 発現細胞を構築した。クロードイン-16 の細胞内分布に対する EGF の効果を調べる必要がある。

クロードイン-16 の転写調節機構と細胞内トラフィック機構の全容を解明することにより、クロードイン-16 の発

現異常と病態との関係が明らかになると期待される。

## 文献等

- [1] A. Ikari, S. Matsumoto, H. Harada, K. Takagi, H. Hayashi, Y. Suzuki, M. Degawa, M. Miwa, Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 1781-1789.
- [2] A. Ikari, S. Matsumoto, H. Harada, K. Takagi, M. Degawa, T. Takahashi, J. Sugatani, M. Miwa, Dysfunction of paracellin-1 by dephosphorylation in Dahl salt-sensitive hypertensive rats, *J Physiol Sci* 56 (2006) 379-383.
- [3] A. Ikari, M. Ito, C. Okude, H. Sawada, H. Harada, M. Degawa, H. Sakai, T. Takahashi, J. Sugatani, M. Miwa, Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway, *J. Cell. Physiol.* 214 (2008) 221-229.
- [4] S.M. Le Gall, R. Auger, C. Dreux, P. Mauduit, Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process, *The Journal of biological chemistry* 278 (2003) 45255-45268.
- [5] W.M. Groenestege, S. Thebault, J. van der Wijst, D. van den Berg, R. Janssen, S. Tejpar, L.P. van den Heuvel, E. van Cutsem, J.G. Hoenderop, N.V. Knoers, R.J. Bindels, Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2260-2267.
- [6] A. Ikari, A. Sanada, C. Okude, H. Sawada, Y. Yamazaki, J. Sugatani, M. Miwa, Up-regulation of TRPM6 transcriptional activity by AP-1 in renal epithelial cells, *J. Cell. Physiol.* 222 (2010) 481-487.



## Elucidation of Mechanism of Abnormal Magnesium Reabsorption in Salt-Sensitive Hypertension

Akira Ikari <sup>1</sup>, Toru Kimura <sup>2</sup>, Junko Sugatani <sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences

<sup>2</sup>Kyorin University, School of Medicine

### Summary

The magnesium balance of whole body is regulated by the kidney which adapts magnesium excretion based on net magnesium absorption from intestine. Magnesium filtrated in the glomeruli is predominantly reabsorbed through the paracellular pathway in the thick ascending limb of Henle's loop. Claudin-16 belongs to the claudin family of tight junctional proteins and plays a critical role in the reabsorption of magnesium. So far, we reported that the phosphoserine level of claudin-16 in hypertensive rats is lower than that in normotensive rats and urinary magnesium excretion increases in hypertensive rats. Dephosphorylated claudin-16 is mainly distributed in the cytosol, but the regulatory mechanism has not been clarified. In the present study, we examined the associated protein that regulates the intracellular distribution of claudin-16 and the transcriptional regulatory mechanism of claudin-16.

Claudin-16 was endogenously expressed in OK cells derived from opossum kidney. We examined the reporter activity using the promoter of human claudin-16. The region from -2,195 to -1,682 was important to increase the reporter activity. Epidermal growth factor (EGF), a magnesiotropic hormone, increased mRNA expression by 1.5 and reporter activity by 5.3. These results suggest that EGF has little effect on the transcriptional activity of claudin-16. In the future, we are going to examine the effect of EGF on the intracellular distribution of claudin-16.

We performed a yeast two-hybrid screening for the detection of the novel associated proteins with the carboxyl region of claudin-16 and obtained several proteins such as syntaxin-8 (Stx-8) and COPS5. These proteins regulate the intracellular trafficking of several membrane proteins. In the pull-down assay, we demonstrated that the carboxyl region of claudin-16 binds to Stx-8.

In conclusion, we found that claudin-16 expression is significantly increased by EGF, but the effect is very small. The carboxyl region of claudin-16 was associated with Stx-8. In the future, we have to examine the relationship between the defect of these regulatory mechanism and pathological condition.