

細胞間マグネシウムチャネルの局在異常の分子機構と新たな生理機能の解明

五十里 彰¹, 菅谷 純子², 木村 徹³

¹ 岐阜薬科大学薬学部, ² 静岡県立大学薬学部, ³ 杏林大学医学部

概要 マグネシウム不足は高血圧, 糖尿病, 心臓病などのさまざまな疾患と関連するが, マグネシウム濃度の調節機構は大部分が不明である。これまでの本財団からの研究助成により, 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, 大部分のクローディン-16 が脱リン酸化体で存在し, 尿中マグネシウム排泄量が増大する知見を得た。最近申請者らは, 酵母ツーハイブリッド法を用いてクローディン-16 の新規結合タンパク質を数種類同定し, 脱リン酸化型クローディン-16 の細胞内局在の異常には, syntaxin-8 という細胞内輸送タンパク質との結合低下が関与することを発見した。しかし, syntaxin-8 の有無に関わらず一部のクローディン-16 はタイトジャンクションに分布したため, 他の調節タンパク質の関与が強く示唆された。本研究では, クローディン-16 の新規結合タンパク質として見出された PDZRN3 の役割を検討した。

大腸菌で glutathion-S-transferase 融合クローディン-16 を調製して PDZRN3 との結合を調べたところ, PDZRN3 は野生型クローディン-16 と結合したが, PDZ 結合モチーフを欠失した変異型クローディン-16 と結合しなかった。同様に, イヌ腎臓由来 MDCK 細胞において, PDZRN3 と野生型クローディン-16 の結合が確認された。クローディン-16 を発現した MDCK 細胞をプロテインキナーゼ A 阻害剤の H-89 で処理すると, クローディン-16 と PDZRN3 の結合量が増加した。蛍光免疫染色で細胞内局在を調べたところ, クローディン-16 は主にタイトジャンクションに分布したが, PDZRN3 は細胞質とタイトジャンクションに分布した。H-89 処理により, 細胞質内の PDZRN3 とクローディン-16 の共局在量が増加した。一方, PDZRN3 siRNA の導入により, H-89 処理後もクローディン-16 は主にタイトジャンクションに分布した。以上のことから, 脱リン酸化型クローディン-16 はタイトジャンクションから細胞質へ移行するが, このエンドサイトーシスの過程は PDZRN3 によって調節されることが示唆された。次に, 細胞間マグネシウム透過性に対する PDZRN3 siRNA の効果を調べたところ, H-89 処理によるマグネシウム透過性の低下が, PDZRN3 siRNA によって阻害された。

本研究により, 脱リン酸化型クローディン-16 は PDZRN3 に結合し, 細胞質内に移行することが明らかになった。PDZRN3 の作用を阻害することにより, クローディン-16 のタイトジャンクションへの局在とマグネシウム再吸収が増加することが明らかになり, マグネシウム欠乏に起因する疾患の治療に向けた創薬研究の道筋が開かれた。

1. 研究目的

生体内でマグネシウムは骨形成, 神経伝達, 筋収縮などの多くの生理機能の調節に関与する。マグネシウム不足は高血圧, 糖尿病, 心臓病などのさまざまな疾患と関連するが, マグネシウム濃度の異常機構は大部分が不明なままである。食事や飲料水中のマグネシウムは腸管から,

受動的に吸収される。血液中のマグネシウムは腎糸球体でろ過され, その後尿細管から再吸収されることによって体内のマグネシウム濃度が調節される。マグネシウム輸送を担う分子の実体が不明であったが, 家族性低マグネシウム血症 (FHHNC) の原因遺伝子として, クローディン-16 が同定された⁽¹⁾。クローディン-16 は腎臓のヘンレ上行脚

のタイトジャンクションに局在し、細胞間経路を介したマグネシウム再吸収を担う(**Fig. 1**)。クロードインは20種類以上のアイソフォームが存在し、クロードイン-16はホモフィリック結合またはクロードイン-19とのヘテロフィリック結合により機能すると考えられている^(2,3)。これまでに申請者らは、食塩感受性高血圧ラットの尿中マグネシウム排泄量が増加し、これにはクロードイン-16のリン酸化量の低下と細胞内局在の異常が関与することを発見した^(4,5)。また、申請者ら⁽⁶⁾や他の研究グループの研究^(7,8)により、FHHNC患者で見つかったクロードイン-16変異体は、細胞内局在が異常になることが明らかになった。クロードイン-16の細胞内局在の異常が低マグネシウム血症を引き起こすと考えられるが、クロードイン-16の細胞内局在の制御機構は十分に調べられていない。また、FHHNC患者は腎障害を伴うことが多いが、クロードイン-16の局在異常と腎障害との関係は不明である。最近申請者らは、酵母ツーハイブリッド法を用いて、クロードイン-16の新規会合タンパク質を数種類同定し、脱リン酸化型クロードイン-16の細胞内局在の異常には、syntaxin-8という細胞内輸送タンパク質との結合低下が関与することを発見した⁽⁹⁾。しかし、syntaxin-8の有無に関わらず一部のクロードイン-16はタイトジャンクションに分布したため、他の輸送タンパク質の関与が強く示唆された。そこで本研究では、クロードイン-16の細胞内局在の調節に関わる輸送タンパク質を探索し、その分

子機序を調べた。さらに、クロードイン-16発現が尿細管上皮細胞の機能に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

2.1 プルダウンアッセイ

ヒトクロードイン-16のカルボキシ領域をpGEX4T-1ベクターにクローニングし、大腸菌でGST融合クロードイン-16タンパク質を調製した。同様に、PDZ結合モチーフを欠失した Δ PDZ-クロードイン-16を調製した。GSTタンパク質、イヌ腎臓由来のMDCK細胞のライセート、グルタチオンビーズを混合して一晩インキュベートした。ビーズに結合したタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットとクマシー染色に使用した。

2.2 細胞培養とトランスフェクション

MDCK細胞をDMEM培地(5%ウシ血清含)で培養した。3~4日毎に0.25%トリプシン溶液を用いて継代した。2 x 10⁵個の細胞を35 mm dishに播種してから24時間後に、Lipofectamine 2000を用いてプラスミドDNAおよびsiRNAをトランスフェクションした。24~48時間後にウエスタンブロット、蛍光免疫染色、マグネシウム透過性実験に使用した。

2.3 細胞ライセートの調製と免疫沈降

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%

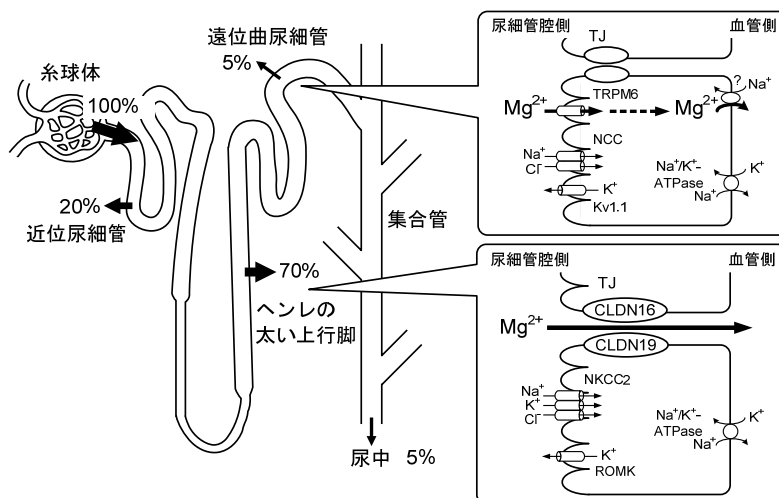


Fig. 1. 腎尿細管におけるマグネシウム再吸収経路の模式図

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。その後、8,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清画分を細胞ライセートとして使用した。免疫沈降では、細胞ライセート、プロテイン G-セファロース、抗 E3 ubiquitin ligase PDZ domain-containing RING-finger protein 3 (PDZRN3) 抗体を混合して一晩インキュベート後、遠心と RIPA バッファーによる洗浄を 3 回繰り返し、得られた沈降物をウエスタンブロットに使用した。

2. 4 ビオチン化

細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.5 mg/mL Sulfo-NHS-biotin 溶液でインキュベートし、細胞表面に分布するタンパク質をビオチン標識した。細胞を溶解後、ストレプトアビジンビーズで沈降したビオチン標識タンパク質をウエスタンブロットに使用した。

2. 5 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、一次抗体で一晩インキュベートした。ブロッキングには 2%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。一次抗体を洗浄後、二次抗体を室温で 1.5 時間インキュベートした。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 C-DiGit Blot Scanner (LI-COR 社)を使用した。

2. 6 蛍光免疫染色

細胞をカバーガラス上に培養し、メタノールで固定した。0.2% Triton X-100 で膜の透過処理を行い、4%ブロッケ

ースでブロッキングした。各種一次抗体を一晩インキュベート後、Alexa Fluor 488 と 555 を室温で 1.5 時間インキュベートした。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社)を用いて、目的タンパク質の細胞内局在を調べた。

3. 研究結果

3. 1 大腸菌を用いたクローデイン-16 カルボキシ領域と PDZRN3 の会合実験

酵母ツーハイブリッド法でクローデイン-16 のカルボキシ領域に結合するタンパク質を探し、PDZRN3 を同定した。PDZRN3 は E3 ユビキチンリガーゼの一つで、筋芽細胞や骨芽細胞の分化、神経細胞や内皮細胞の成長の調節に関与する。大腸菌で GST 融合クローデイン-16 タンパク質を調製し、野生型および Δ PDZ 変異体の発現を、クマシー染色で確認した (Fig. 2)。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、野生型クローデイン-16 と PDZRN3 の会合が確認された。一方、GST タンパク質や Δ PDZ 変異体は PDZRN3 と会合しなかった。以上のことから、クローデイン-16 は PDZ 結合モチーフを介して PDZRN3 と会合することが示唆された。

3. 2 MDCK 細胞におけるクローデイン-16 と PDZRN3 の結合

これまでに我々は、ドキシサイクリンによって発現を制御するクローデイン-16/MDCK 細胞を構築している。なお、クローデイン-16 のアミノ末端側には FLAG タグを融合してある。ドキシサイクリンの除去によってクローデイン-16 の発現誘導が確認された (Fig. 3A)。クローデイン-16 の発現によ

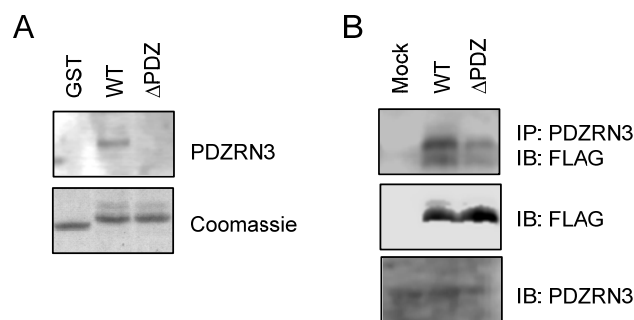


Fig. 2. 大腸菌発現系におけるクローデイン-16 と PDZRN3 の会合

(A) GST, GST 融合野生型クローデイン-16, GST 融合 Δ PDZ クローデイン-16 タンパク質を大腸菌で調製した。グルタチオンビーズ、MDCK 細胞のライセートとインキュベート後、10% SDS-PAGE で電気泳動した。PVDF 膜に転写後、クマシー染色または抗 PDZRN3 抗体でプロットした。(B) MDCK 細胞に FLAG タグを融合した野生型または Δ PDZ クローデイン-16 を発現させ、ライセートを調製した。クローデイン-16 と PDZRN3 の発現を各抗体で確認した。抗 PDZRN3 抗体による免疫沈降物を SDS-PAGE 電気泳動後、抗 FLAG 抗体でプロットした。

って、PDZRN3、クローディンとともにタイトジャンクションに分布するオクルディン、タイトジャンクションの裏打ちタンパク質であるZO-1、アドヘレンスジャンクションに分布するE-カドヘリンの発現量は変化しなかった。抗 PDZRN3 抗体を用いて MDCK 細胞のライセートを免疫沈降したが、FLAG-クローディン-16 のバンドは検出されなかった(**Fig. 3B**)。クローディン-16 はプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤の H-89 によって脱リン酸化され、細胞質へ移行する⁽⁴⁾。H-89 処理した細胞のライセートを用いて免疫沈降したところ、FLAG-クローディン-16 のバンドが検出された。このことから、クローディン-16 の細胞質局在化に PDZRN3 が関与すると示唆された。

3.3 MDCK 細胞におけるクローディン-16 と PDZRN3 の細胞内局在

野生型クローディン-16 は、ZO-1 とともに、タイトジャンクションに分布した(**Fig. 4**)。PDZRN3 は細胞質とタイトジャンクションに分布した。また、初期エンドソームのマーカである Rab7 は主に細胞質に分布し、クローディン-16 と共局在しなかった。H-89 処理により、クローディン-16 の一部は細胞質に分布した。細胞質内のクローディン-16 は PDZRN3 や Rab7 と共局在した。このことから、クローディン-16 の一部は初期エンドソームに分布することが示唆された。一方、PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、H-89 処理後もクローディン-16 の大部分はタイトジャンクションに分布し、Rab7 と共局在しなかった。このことから、脱リン酸化したクローディン-16 はタイトジャンクションから細胞質へ移行し、このエンドサイトーシスの調節に PDZRN3 が関与すると示唆された。

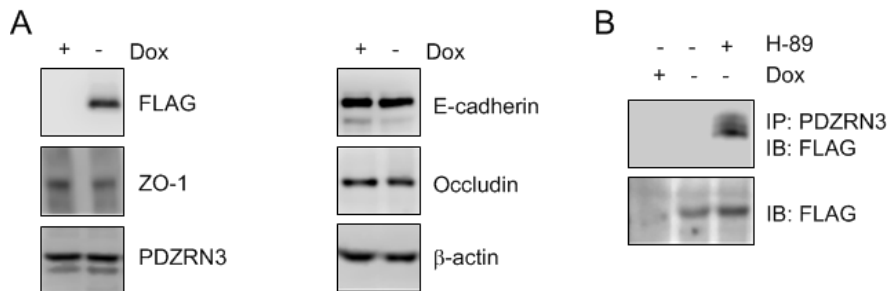


Fig. 3. MDCK 細胞におけるクローディン-16 と PDZRN3 の会合

ドキシサイクリンの存在下(+)と非存在下(-)で細胞を培養後、ライセートを調製した。(A) SDS-PAGE で電気泳動後、抗 FLAG, ZO-1, PDZRN3, E-カドヘリン, オクルディン, β -アクチン抗体でプロットした。(B) 細胞を 50 μ M H-89 の存在下と非存在下でインキュベートした。ライセートまたは抗 PDZRN3 抗体による免疫沈降物を電気泳動後、抗 FLAG 抗体でプロットした。

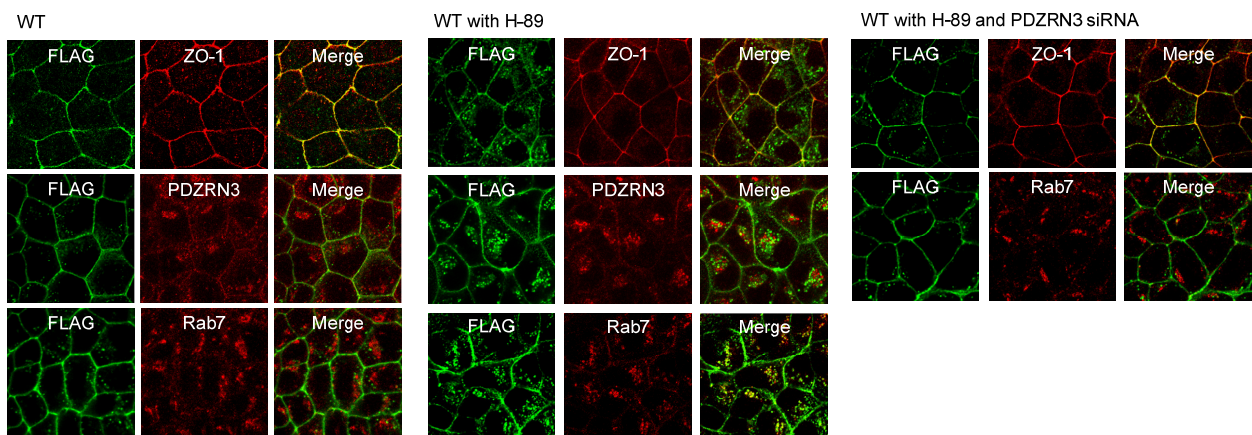


Fig. 4. MDCK 細胞におけるクローディン-16 と PDZRN3 の細胞内局在

野生型クローディン-16 を発現する MDCK 細胞を 50 μ M H-89 で 1 時間処理した。また、細胞に PDZRN3 siRNA を導入後、H-89 で 1 時間処理した。抗 FLAG, ZO-1, PDZRN3, Rab7 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各タンパク質の細胞内分布を調べた。

3. 4 クローディン-16 のタイトジャンクション局在に対する PDZRN3 siRNA の効果

細胞膜に分布するタンパク質をビオチン標識し、クローディン-16 のタイトジャンクション局在に対する PDZRN3 siRNA の効果を検討した。PDZRN3 siRNA の導入により、PDZRN3 発現の低下が確認された (Fig. 5)。H-89 処理により細胞膜表面におけるクローディン-16 の分布量が低下したが、クローディン-1 の分布量はほとんど変化しなかった。PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、H-89 の効果が阻害された。これらの結果は蛍光免疫染色で得られた結果と一致し、脱リン酸化したクローディン-16 の細胞内移行に PDZRN3 が関与すると示唆された。

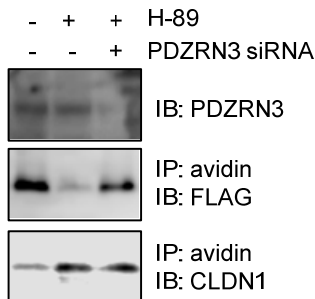


Fig. 5. 細胞膜表面へのクローディン-16 の分布に対する PDZRN3 siRNA の影響

野生型クローディン-16 を発現する MDCK 細胞を 50 μ M H-89 で 1 時間処理した。また、細胞に PDZRN3 siRNA を導入した。ライセートを抗 PDZRN3 抗体でプロットした。細胞をビオチン処理後、ビオチン化タンパク質をアビジンビーズで沈降させ、沈降物を抗 FLAG, クローディン-1 (CLDN1) 抗体を用いてプロットした。

3. 5 PDZRN3 siRNA による S217A 変異体の細胞内局在の変化

これまでに我々は、クローディン-16 の 217 番目のセリン残基がプロテインキナーゼ A によってリン酸化され、タイトジャンクションへの局在がリン酸化によって調節されることを報告している⁽⁴⁾。S217A 変異体は、主に細胞質に分布し、PDZRN3 や Rab7 と共局在した (Fig. 6)。PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、タイトジャンクションにおけるクローディン-16 の分布量が増加した。これらの結果は野生型クローディン-16 発現細胞を H-89 処理した際に得られた結果と一致し、脱リン酸化型クローディン-16 の細胞内局在の調節に PDZRN3 が関与すると示唆された。

3. 6 細胞間透過性に対する PDZRN3 siRNA の効果

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、細胞間イオン透過性とデキストラン透過性が低下する。H-89 処理により、TER が低下し、デキストラン透過性が増加した (Fig. 7)。これらの変化は、PDZRN3 siRNA により阻害された。また、H-89 処理により細胞間マグネシウム透過性が低下し、この変化は PDZRN3 siRNA によって阻害された。これらの結果は、H-89 処理によりクローディン-16 がタイトジャンクションから細胞内へ移行し、PDZRN3 siRNA によってクローディン-16 の細胞内移行が阻害されたウエスタンブロットや蛍光免疫染色の結果と対応する。以上のことから、脱リン酸化型クローディン-16 の細胞内移行に PDZRN3 との結合が関与し、両者の結合を阻害することにより、クローディン-16 の機能を回復させることができることが明らかになった。

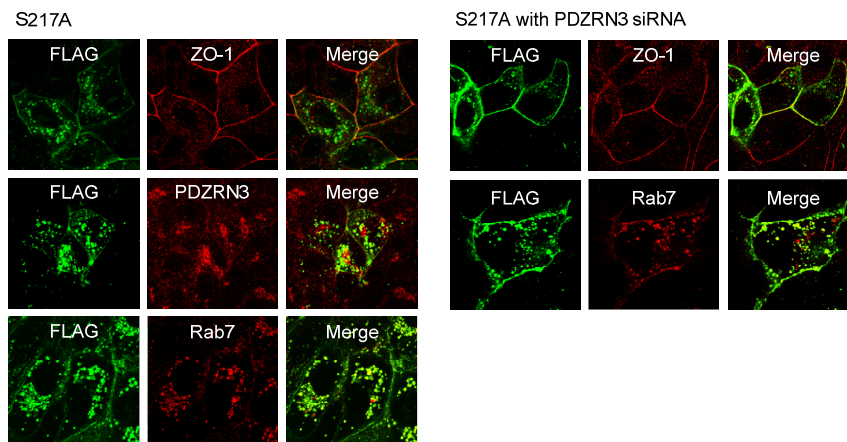


Fig. 6. PDZRN3 siRNA による S217A 変異体の細胞内局在の変化

S217A 変異型クローディン-16 を発現する MDCK 細胞に PDZRN3 siRNA を導入した。抗 FLAG, ZO-1, PDZRN3, Rab7 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

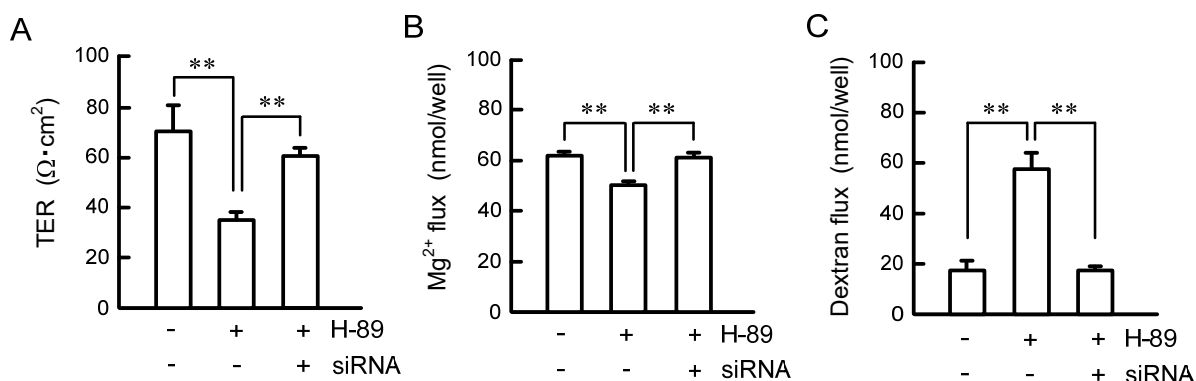


Fig. 7. クローディン-16 発現細胞における PDZRN3 siRNA による細胞間透過性の変化

野生型クローディン-16 を発現する MDCK 細胞をトランスウェルに播種後、PDZRN3 siRNA を導入した。2 日間培養後、TER を測定した。また、管腔側溶液に FITC 標識デキストランとマグネシウムを添加し、血管側溶液への輸送量を測定した。** P < 0.01

4. 考察

生体内において、マグネシウムは 300 種類以上の酵素の補助因子として働いており、生理機能の維持において必要不可欠なミネラルである。腸管から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によって、高マグネシウム血症や低マグネシウム血症が起こる。マグネシウム不足は高血圧、糖尿病、心臓病などのさまざまな疾患と関連するが、マグネシウム濃度の異常機構は大部分が不明なままである。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、尿中マグネシウム排泄量が増大することを明らかにした⁽⁵⁾。また、脱リン酸化したクローディン-16 は細胞質内に分布し、細胞間マグネシウム輸送量が低下することを報告した⁽¹⁰⁾。細胞質からタイトジャンクションへのクローディン-16 のエキソサイトーシスが、syntaxin-8 によって調節されることが明らかになったが、クローディン-16 の細胞内局在の調節に他のタンパク質の関与が推察された。本研究では、酵母ツーハイブリッド法によって新たな会合タンパク質として PDZRN3 を見出した。PDZRN3 は 2つの PDZドメインとカルボキシ末端に PDZ 結合モチーフをもつ E3 ユビキチンリガーゼである⁽¹¹⁾。ユビキチンは分子量が約 8,600 Da のタンパク質で、E1, E2, E3 の 3 種類の触媒酵素によって標的タンパク質に付加される。ユビキチン化されたタンパク質は、主にプロテアソームに運ばれて分解される。E3 は E1 や E2 に比べて、基質に対する選択

性が高いことが知られている。E3 は RING 型、U-box 型、HECT 型に大別され⁽¹²⁾、PDZRN3 は RING 型に分類される。クローディン-16 はカルボキシ末端に存在する PDZ 結合モチーフを介して PDZRN3 と結合することが明らかになったが、PDZRN3 には 2つの PDZドメインが存在するので、どちらの PDZドメインに結合するのかを調べる必要がある。

クローディン-16 の細胞内局在は PKA によるリン酸化によって調節されており、脱リン酸化型クローディン-16 は細胞質に分布する^(13,14)。細胞膜に分布する受容体やイオンチャネルなどは、ユビキチン化修飾によって細胞内へ取り込まれ、プロテアソームなどで分解される。クローディン-16 のユビキチン化と PDZRN3 の関係を今後調べる必要があるが、脱リン酸化型クローディン-16 と PDZRN3 の結合量が増加したことから、PDZRN3 はクローディン-16 をユビキチン化し、エンドサイトーシスを亢進すると推察される。これまでに E3 ユビキチンリガーゼの LNX1p80 がクローディン-1 に結合し、エンドサイトーシスとリソソーム分解を促進することが報告されたが、PDZRN3 siRNA によって細胞膜表面のクローディン-1 の分布量が変化しなかったことから、PDZRN3 はクローディン-1 のユビキチン化や分解に関与しないことが推察された。

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)クローディン-16 の新規会合タンパク質を探索し、E3 ユビキチンリガーゼの PDZRN3 を同定した。(2)PDZRN3 は

脱リン酸化型クローディン-16に結合し、クローディン-16のタイトジャンクションから細胞質内への移行調節に関与した。(3)PDZRN3の発現をノックダウンすることにより、タイトジャンクションにおけるクローディン-16の局在量と細胞間マグネシウム透過性が増加した。以上のことから、PDZRN3の働きを阻害することにより、クローディン-16のタイトジャンクションへの局在とマグネシウム再吸収が増加することが明らかになり、マグネシウム欠乏に起因する疾患の治療に向けた創薬研究の道筋が開かれた。PDZRN3阻害薬が低マグネシウム血症治療薬になると考えられ、今後の開発が期待される。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

7. 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., and Lifton, R. P. *Science* **285**, 103-106 (1999)
- 2) Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S., and Goodenough, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15350-15355 (2009)
- 3) Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakkaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhaus, S. C., Nurnberg, P., and Weber, S. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 949-957 (2006)
- 4) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Miwa, M. *J. Cell Sci.* **119**, 1781-1789 (2006)
- 5) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Degawa, M., Takahashi, T., Sugatani, J., and Miwa, M. *J. Physiol. Sci.* **56**, 379-383 (2006)
- 6) Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Takagi, K. *J. Biol. Chem.* **279**, 54826-54832 (2004)
- 7) Kausalya, P. J., Amasheh, S., Gunzel, D., Wurps, H., Muller, D., Fromm, M., and Hunziker, W. *J. Clin. Invest.* **116**, 878-891 (2006)
- 8) Muller, D., Kausalya, P. J., Meij, I. C., and Hunziker, W. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1049-1058 (2006)
- 9) Ikari, A., Tonegawa, C., Sanada, A., Kimura, T., Sakai, H., Hayashi, H., Hasegawa, H., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Endo, S., Matsunaga, T., and Sugatani, J. *J. Biol. Chem.* **289**, 13112-13123 (2014)
- 10) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Miwa, M. *J. Cell Sci.* **119**, 1781-1789 (2006)
- 11) Ko, J. A., Kimura, Y., Matsuura, K., Yamamoto, H., Gondo, T., and Inui, M. *J. Cell Sci.* **119**, 5106-5113 (2006)
- 12) Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., and Nakayama, K. I. *J. Biol. Chem.* **276**, 33111-33120 (2001)
- 13) Ikari, A., Ito, M., Okude, C., Sawada, H., Harada, H., Degawa, M., Sakai, H., Takahashi, T., Sugatani, J., and Miwa, M. *J. Cell. Physiol.* **214**, 221-229 (2008)
- 14) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., Sugatani, J., Degawa, M., and Miwa, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 283-290 (2008)

Clarification of Molecular Mechanisms Underlying Abnormal Localization and Novel Physiological Function of Paracellular Magnesium Channel

Akira Ikari¹, Junko Sugatani², Toru Kimura³

¹Gifu Pharmaceutical University, ²University of Shizuoka, ³Kyorin University

Summary

Magnesium is an essential cofactor for over 300 enzymes involved in metabolism and energy production. Magnesium filtrated in the glomeruli is reabsorbed through the paracellular pathway in the thick ascending limb (TAL) 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 in the TAL. 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 searched for binding protein that regulates the distribution of claudin-16 and found that E3 ubiquitin ligase PDZ domain-containing RING finger protein 3 (PDZRN3) could bind to claudin-16.

PDZRN3 is a member of the ligand of Numb Protein-X family of RING-type ubiquitin E3 ligase. PDZRN3 plays a role in the differentiation of myoblast and osteoblast, and development of neuronal and endothelial cells. However, the role has not been examined in the kidney. In the pull-down assay, PDZRN3 was associated with wild-type claudin-16, but not with Δ PDZ mutant. PDZRN3 was distributed both in the cytosol and tight junctions (TJs), whereas claudin-16 was mainly distributed in the TJs in canine renal MDCK cells. H-89, a protein kinase A inhibitor, increased the association of PDZRN3 with claudin-16. Furthermore, the cytosolic PDZRN3 was co-localized with claudin-16 in the cells treated with H-89. PDZRN3 siRNA blocked the trafficking of claudin-16 from the TJs to cytosol. H-89 decreased paracellular permeability to magnesium, which was inhibited by PDZRN3 siRNA.

In conclusion, we found that PDZRN3 binds to claudin-16 and increases its cytosolic distribution. The inhibition of the function of PDZRN3 may increase the localization of claudin-16 at the TJs and magnesium reabsorption in the kidney.