

クローディン-16 マグネシウムチャネルの局在異常を改善する ケミカルシヤペロンと会合タンパク質の探索

五十里 彰¹, 長谷川 元², 伊藤 善規³, 木村 徹⁴

¹ 岐阜薬科大学薬学部, ² 埼玉医科大学医学部, ³ 岐阜大学医学部, ⁴ 杏林大学医学部

概要 マグネシウムは 300 種類以上の酵素の補助因子として働き、過度な低マグネシウム状態になると、致命的な不整脈や高カリウム血症が起こる。体内のマグネシウム含量は腸管からの吸収と腎尿細管からの再吸収機構によって厳密に調節される。糸球体でろ過されたマグネシウムのうち、60%程度がヘンレ上行脚に発現するクローディン-16 (CLDN16) を介して再吸収される。家族性低マグネシウム血症 (FHHNC) 患者で CLDN16 遺伝子の変異体が多数同定され、大部分の変異体の細胞局在が異常になることが明らかになった。そのため、CLDN16 変異体の局在異常を改善することにより、FHHNC 患者の低マグネシウム血症が改善する可能性がある。本研究では、FHHNC 患者で同定された CLDN16 変異体の局在異常を改善する薬剤を探索した。

CLDN16 は 4 回膜貫通型タンパク質で、2 つの細胞外ループ構造を有する。1 番目のループ (1st ECL) に変異がある D97S 変異体を MDCK 細胞に発現させたところ、主に後期エンドソームに分布した。野生型と比較して D97S 変異体タンパク質の安定性が低く、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下で、約 6 時間後にタンパク質が消失した。プロテアソーム阻害剤によって D97S 変異体の発現量が増加したため、プロテアソームで分解されやすいことが示唆された。また、クラスリン依存性およびカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤の処理によって、細胞膜上の D97S の分布量が増加した。以上より、細胞膜上における D97S 変異体の安定性が低く、エンドサイトーシスを受けやすいことが示唆された。マリア治療薬のプリマキンを処理したところ、細胞膜表面における D97S の分布量が増加した。同様に、1st ECL に変異がある R131C の局在異常もプリマキンによって改善したが、他の変異体の細胞局在は変化しなかった。これまでに我々は脱リン酸化型 CLDN16 のエンドサイトーシスにユビキチン化が関与することを報告している。そこで、D97S のユビキチン化に対するプリマキンの効果を調べたが、ユビキチン化量は変化しなかった。次に、CLDN16 の機能に対するプリマキンの効果を検討した。D97S 発現細胞で、プリマキン処理により細胞間マグネシウム透過性が有意に増加した。以上の結果から、プリマキンは一部の CLDN16 変異体の局在異常を改善し、マグネシウム再吸収を亢進させることが示唆された。

1. 研究目的

食物や飲料水などから摂取されたマグネシウムは、50%程度が小腸から体内へ吸収され、残りは排泄される。体内のマグネシウム含量は腸管からの吸収と腎尿細管からの再吸収機構によって厳密に調節されており、血中濃度が 1.8~2.4 mg/dL の範囲内で一定に保たれる。大部分のマグネシウムは骨組織などに貯蔵されており、血中のマグネシウム量は全体の 1%未満である。マグネシウムの摂取不足や排出亢進などによって血中マグネシウム濃度が低下

すると、各臓器からマグネシウムが供給される。そのため、慢性的なマグネシウム不足は、臓器を形成する細胞内のマグネシウム濃度の低下を引き起こし、高血圧や糖尿病などの生活習慣病を増悪化させると考えられている。

糸球体でろ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 (CLDN16) を介して再吸収される^(1,2)。CLDN16 は 20 種類以上のメンバーからなる CLDN ファミリーに属し、4 回膜貫通型の構造を有する^(3,4)。アミノ末端とカルボキシ末端は細胞質側に存在し、

カルボキシ末端の PDZ 結合モチーフを介して足場タンパク質の ZO-1 と結合することにより、タイトジャンクションにつながり止められている。1999 年にエール大学の Simon らが家族性低マグネシウム血症 (FHHNC) 患者で CLDN16 遺伝子の変異体を報告後、これまでに 20 カ所以上の変異体が同定された⁽⁵⁻⁷⁾。哺乳動物細胞への強制発現実験において、大部分の変異体が細胞質に分布することが示され、CLDN16 変異体の局在異常が低マグネシウム血症の原因であると示唆された。CLDN16 の局在異常を改善することにより、低マグネシウム血症が改善する可能性があるが、そのような作用を有する薬剤は開発されていない。そのため、FHHNC 患者にはマグネシウム投与の対症療法が実施されるが、その効果は不十分でしばしば低マグネシウム血症状態が持続する⁽⁸⁾。最終的に、FHHNC 患者は慢性腎臓病を罹患し、腎移植が必要になる。そのため、FHHNC 患者の低マグネシウム血症を改善する新たな治療薬の開発が期待される。本研究では、FHHNC 患者で同定された CLDN16 変異体を培養細胞に発現させ、その局在異常を改善する化合物を探索した (Fig. 1, これまでに報告された変異部位を黒色で示し、本研究で検討した変異部位を赤色で示す)。

2. 研究方法

2.1 CLDN16 発現ベクターの作製

ヒト CLDN16 遺伝子の open reading frame を PCR 法で

増幅後、pCMV-Tag2 ベクターに組み込んだ。FLAG タグを融合した CLDN16 遺伝子を、pTRE2hyg ベクターまたは pcDNA3 ベクターにサブクローニングした。KOD-Plus Mutagenesis kit を用いて各種変異体を作製した。

2.2 細胞培養とトランスフェクション

MDCK/Tet-OFF 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。一過性発現細胞として、トランスフェクションから 48 時間後に実験に使用した。安定発現細胞を樹立する際には、400 µg/ml hygromycin B または 400 µg/ml zeocin を含有する DMEM 培地にプラスミド DNA をトランスフェクションした細胞を播種した。約 2 週間の培養後、ウエスタンブロット法で CLDN16 の発現を確認し、安定発現株として使用した。

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% 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 FLAG 抗体

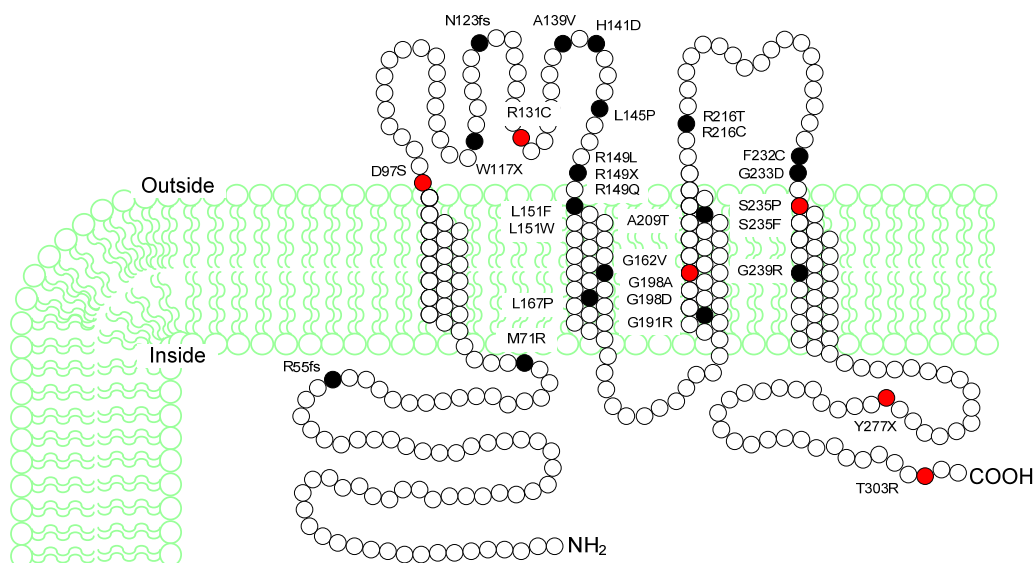


Fig. 1. Mutation sites of CLDN16 in FHHNC

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(1,000 倍希釈)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。一次抗体を洗浄後、二次抗体(3,000 倍希釈)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%ブロッカーでブロッキングした。各種一次抗体(100 倍希釈)を一晩インキュベート後、Alexa Fluor 488と Alexa Fluor 555 標識二次抗体(100 倍希釈)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局在を調べた。

3. 研究結果

3. 1 内在性細胞間接着タンパク質の発現に対する CLDN16 過剰発現の影響

MDCK 細胞に空ベクターまたは FLAG タグを融合した CLDN16 の D97S 変異体発現ベクターをトランスフェクションした。抗 FLAG 抗体を用いて、CLDN16 の発現を確認した(Fig. 2)。MDCK 細胞に内在的に CLDN16 は発現していなかった(データは示さない)。タイトジャンクションの形成に関わる CLDN1, occludin (OCLN), ZO-1, ZO-2, アドヘレンスジャンクションの形成に関わる E-cadherin (E-cad) の発現量は、D97S 変異体の発現によって有意に変化しなかった。

3. 2 CLDN16 の細胞局在

野生型 CLDN16 は ZO-1 とともに、主にタイトジャンクションに分布したが、D97S 変異体は細胞質に分布した(Fig. 3)。D97S 変異体の局在部位を明らかにするため、各種オルガネラマーカとの共染色を実施した。その結果、D97S 変異体の大部分は後期エンドソームマーカートの Rab7 と共局在し、一部が初期エンドソームマーカートの EEA1 と共局在した。このことから、D97S 変異体はタイトジャンクションにおける分布が阻害され、主にエンドソームに局在することが明らかになった。

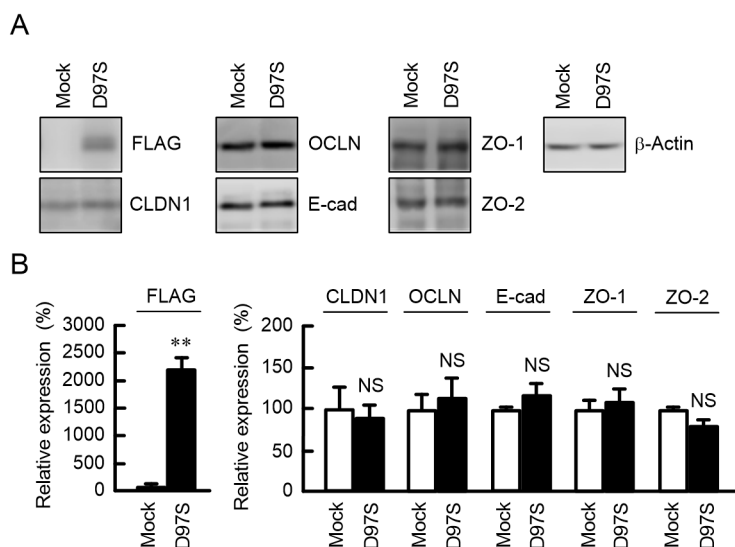


Fig. 2. Effect of D97S mutant expression on endogenous junctional proteins

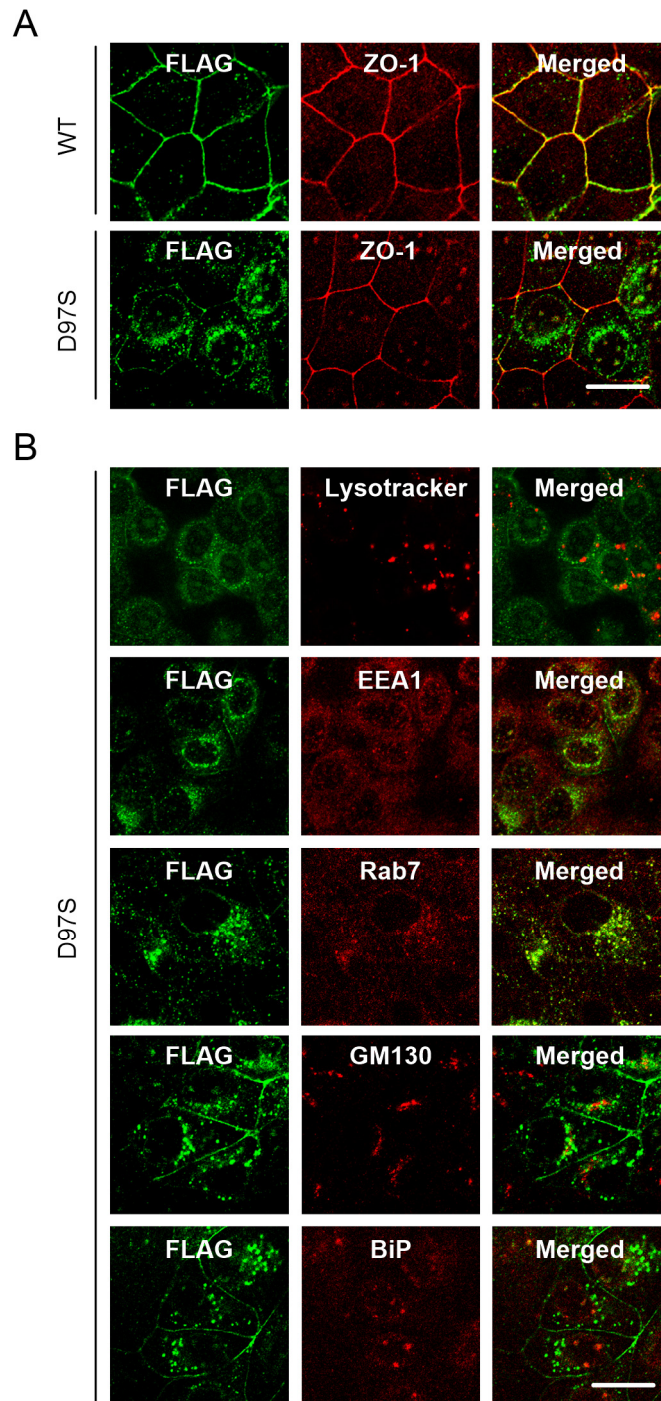


Fig. 3. Subcellular localization of WT CLDN16 and the D97S mutant

3. 3 CLDN16 タンパク質の安定性の比較

翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドの存在下、野生型と D97S 変異体タンパク質の発現量を調べた。野生型の発現量は 6 時間後に 50%程度まで減少したのに対し、D97S 変異体は減少の割合が大きく、6 時間後にほぼ完全に消失した (Fig. 4)。D97S 変異体の分解が亢進していることが考えられたため、リソソーム阻害剤のクロロキンとプロテア

ソーム阻害剤のラクタシスチンの効果を検討した。D97S 変異体の発現量はラクタシスチン処理によって増加したが、クロロキン処理によって変化しなかった。一方、内在性の CLDN2 と CLDN4 の発現量はクロロキン処理によって増加した。これらの結果から、D97S 変異体は CLDN2 や CLDN4 と異なり、プロテアソームによって分解されやすいと示唆された。

3. 4 D97S 変異体の細胞分布に対するエンドサイトーシス阻害剤とプリマキンの影響

D97S 変異体がタイトジャンクションに移行するか否かを明らかにするため、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤のモノダンシルカダペリンとカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤のメチル- β -シクロデキストリンの効果を検討した。両阻害剤とも、D97S 変異体タンパク質の発現量を増加させ、局在が細胞質内からタイトジャンクションへと変化した (Fig. 5)。また、細胞内小胞輸送阻害剤のプリマキン処理により、細胞膜表面におけるD97S 変異体の局在量が増加した。以上の結果から、エンドサイトーシスに関わる因子の阻害により、D97S 変異体がタイトジャンクションに分布することが示唆された。

3. 5 CLDN16 変異体の細胞局在に対するプリマキンの影響

プリマキン処理によって D97S 変異体のタイトジャンクションへの局在が改善したため、他の変異体に対する効果を検討した。細胞外ループに変異を有する R131C 変異体は主に細胞質に分布したが、プリマキン処理により一部がタイトジャンクションに分布した。一方、3 番目の膜貫通ドメイン

に変異を有する G198D、4 番目の膜貫通ドメインに変異を有する S235P、細胞質内に変異を有する Y277X と T303R 変異体の局在異常は、プリマキン処理によって改善しなかった。

3. 6 D97S 変異体タンパク質の安定性に対するプリマキンの影響

シクロヘキシミドとプリマキンの存在下、D97S 変異体タンパク質の発現量を調べた。時間依存的に D97S 変異体タンパク質の発現量が減少したが、その割合はプリマキン非存在下でインキュベートした細胞よりも小さかった (Fig. 6)。これまでに我々は脱リン酸化型 CLDN16 のエンドサイトーシスに、E3 ユビキチンリガーゼである PDZRN3 によるユビキチン化が関与することを報告している⁹⁾。D97S 変異体のユビキチン化量は野生型よりも有意に多かったため、エンドサイトーシスを受けやすい状態であると示唆された。プリマキン処理により D97S 変異体のユビキチン化量は有意に変化しなかった。このため、プリマキンによる D97S 変異体タンパク質の発現増加に、ユビキチン化修飾は関与しないことが明らかになった。

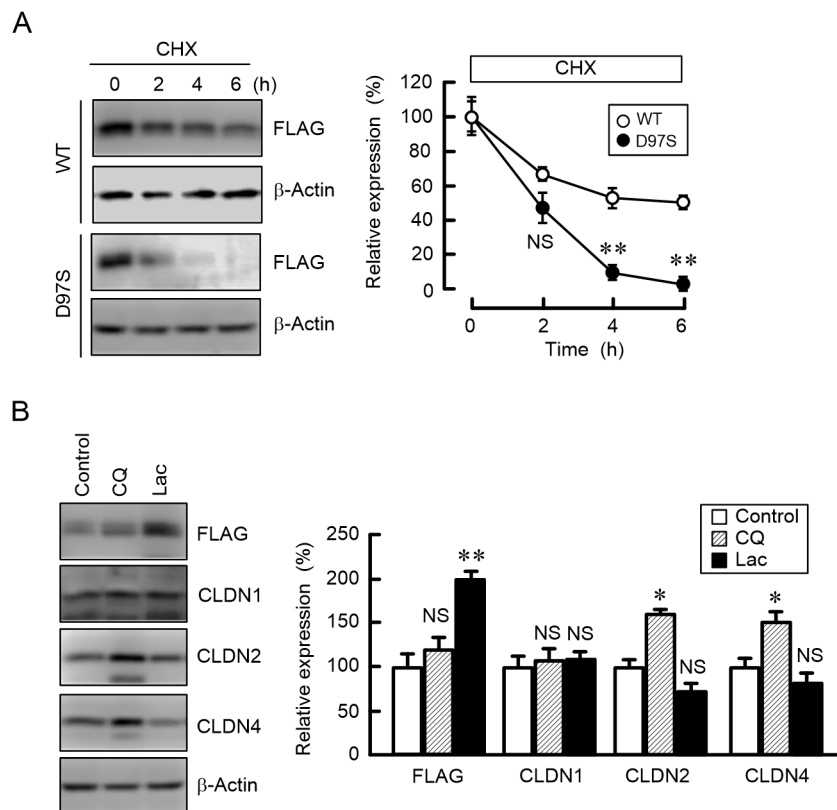


Fig. 4. Protein stability of WT CLDN16 and the D97S mutant

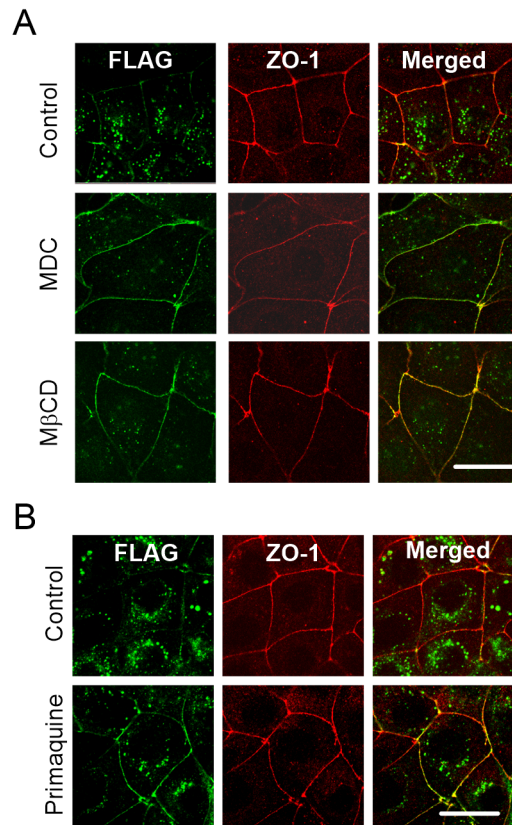


Fig. 5. Increase in cell surface localization of the D97S mutant by endocytosis inhibitor and primaquine treatment

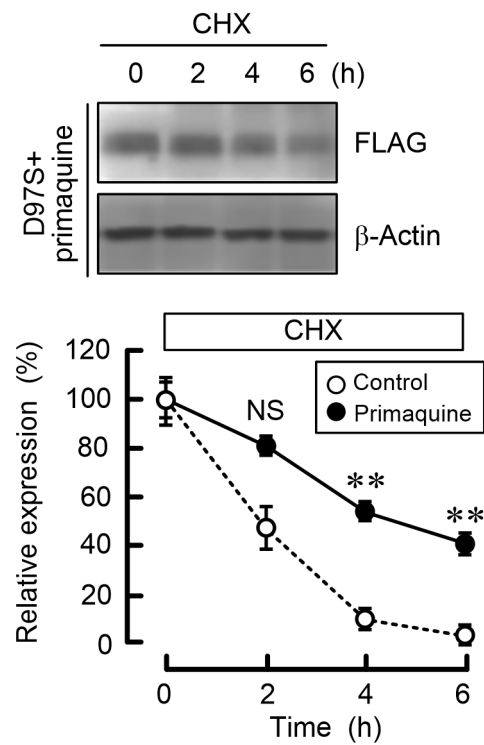


Fig. 6. Effect of primaquine on protein stability of the D97S mutant

4. 考 察

FHHNC 患者において 20 カ所以上の CLDN16 変異体が報告され、その大部分の変異部位は細胞外ルーブと膜貫通ドメインに分布する⁽⁵⁻⁷⁾。各変異体の機能と局在は異なり、タイトジャンクションに分布する変異体は完全または部分的に機能を保持している。一方、細胞内に分布する変異体は、機能を消失する。本研究において、D97S, R131C, G198D, S235P, Y277X, T303R 変異体は主に細胞質に分布したが、この結果は過去の報告と一致する。クラスリン依存性およびカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤の処理により、タイトジャンクションにおける D97S 変異体の分布量が増加したことから、D97S 変異体は細胞膜へ移行するが、エンドサイトーシスを受けやすいことが示唆された。

マラリア治療薬のプリマキンは、細胞内小胞輸送の制御に関わることが報告されている⁽¹⁰⁻¹²⁾。プリマキン処理により、タイトジャンクションにおける D97S の分布量が増加し、タンパク質の分解が遅延した。そのため、プリマキンは D97S 変異体のエンドサイトーシスを抑制することが示唆された。プリマキン処理により D97S 変異体のユビキチン化量は有意に変化しなかったため、プリマキンはユビキチン化修飾とそれに続くエンドサイトーシス過程を阻害せず、別の機序を介して細胞膜上に D97S 変異体を安定に分布させることが示唆された。

遺伝子変異により機能を欠損する可能性があるため、D97S 変異体のマグネシウム透過性を調べたところ、無処理細胞に比べて有意にマグネシウム透過性が亢進した。そのため、D97S 変異体はマグネシウム輸送機能を保持しているが、タイトジャンクションに分布できないためにマグネシウム再吸収が低下すると示唆された。これまでに我々は脱リン酸化型 CLDN16 がユビキチン化修飾を受け、エンドサイトーシスされることを報告したが、プリマキン処理による D97S 変異体の局在変化に、ユビキチン化は関与しなかった。そのため、プリマキンは D97S 変異体の細胞内小胞からタイトジャンクションへのエキソサイトーシスを促進、またはユビキチン化以外の機序を介してタイトジャンクションから細胞内へのエンドサイトーシスを阻害することが示唆された。

5. 今後の課題

本研究では、CLDN16 の D97S 変異体において、プリマキン処理によってタイトジャンクションへの分布量が増大し、マグネシウム透過性が亢進することを解明した。これまで FHHNC 患者に対する効果的な治療法は存在しておらず、プリマキンが低マグネシウム血症の新たな治療薬になると期待できる。しかし、プリマキンの作用機序が未解明のため、CLDN16 変異体への直接的な作用だけでなく、細胞内輸送小胞などへの作用を検討する必要がある。また、プリマキン処理によってタイトジャンクションへの R131C 変異体の分布量も増大したが、G198D, S235P, Y277X, T303R 変異体の分布は変化しなかった。今後、D97S や R131C 以外の変異体の局在異常を改善する薬剤を探索する必要がある。

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

- 1) Quamme, G. A., and de Rouffignac, C. (2000) Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front. Biosci.* **5**, D694-711
- 2) Konrad, M., Schlingmann, K. P., and Gudermann, T. (2004) Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *American Journal of Physiology Renal Physiology* **286**, F599-F605
- 3) Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 511-516
- 4) Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 285-293
- 5) 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. (1999)

- Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* **285**, 103-106
- 6) 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. (2006) Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 949-957
- 7) Claverie-Martin, F. (2015) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. *Clinical kidney journal* **8**, 656-664
- 8) Rodriguez-Soriano, J., Vallo, A., and Garcia-Fuentes, M. (1987) Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr. Nephrol.* **1**, 465-472
- 9) Marunaka, K., Furukawa, C., Fujii, N., Kimura, T., Furuta, T., Matsunaga, T., Endo, S., Hasegawa, H., Anzai, N., Yamazaki, Y., Yamaguchi, M., and Ikari, A. (2017) The RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3 controls localization of the Mg^{2+} regulator claudin-16 in renal tube epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 13034-13044
- 10) van Weert, A. W., Geuze, H. J., Groothuis, B., and Stoorvogel, W. (2000) Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 394-399
- 11) Zhang, Z., Ledford, H. A., Park, S., Wang, W., Rafizadeh, S., Kim, H. J., Xu, W., Lu, L., Lau, V. C., Knowlton, A. A., Zhang, X. D., Yamoah, E. N., and Chiamvimonvat, N. (2017) Distinct subcellular mechanisms for the enhancement of the surface membrane expression of SK2 channel by its interacting proteins, alpha-actinin2 and filamin A. *J. Physiol.* **595**, 2271-2284
- 12) Poythress, R. H., Gallant, C., Vetterkind, S., and Morgan, K. G. (2013) Vasoconstrictor-induced endocytic recycling regulates focal adhesion protein localization and function in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305**, C215-227

Search for Chemical Chaperon and Associated Protein which Improve the Mislocalization of Claudin-16 Magnesium Channel

Akira Ikari¹, Hajime Hasegawa², Yoshinori Ito³, Toru Kimura⁴

¹Department of Biopharmaceutical Sciences, Gifu Pharmaceutical University,

²Saitama Medical Center, Saitama Medical University,

³Department of Pharmacy, Gifu University Hospital

⁴Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine

Summary

The magnesium balance of whole body is regulated by the kidney which adapts Mg^{2+} excretion based on net Mg^{2+} absorption from the intestine. Mg^{2+} filtrated by glomeruli is reabsorbed by transcellular and paracellular pathways in renal tubular epithelial cells. Claudin-16 (CLDN16) regulates the paracellular reabsorption of Mg^{2+} in the thick ascending limb (TAL) of Henle's loop. Genetic disorders of CLDN16 cause mislocalization of CLDN16, resulting in hypomagnesemia. There is no effective treatment for hypomagnesemia except for magnesium administration. Here, we searched for a novel drug to restore tight junctional localization of a CLDN16 mutant. A D97S mutant, which has a mutation in the first extracellular loop (ECL) of CLDN16, was mainly colocalized with endosome marker, whereas wild-type (WT) CLDN16 was colocalized with ZO-1, an adaptor protein of tight junctions. The protein stability of the D97S mutant was lower than that of the WT. The expression level of the D97S mutant was increased by lactacystin, a proteasomal inhibitor. Endocytosis inhibitors increased the tight junctional localization of the D97S mutant. We found that primaquine, an antimalarial agent, increased the protein stability and cell surface localization of the D97S mutant, but the localization of other mutants, which have mutations in the cytosolic domain or second ECL, was not affected. Paracellular Mg^{2+} flux was increased by primaquine in D97S mutant-expressing cells. These results suggested that primaquine increases the tight junctional localization of the D97S mutant, resulting in an elevation of Mg^{2+} reabsorption. Primaquine may become an effective treatment drug for selected patients with mutant CLDN16.