

細胞間マグネシウム透過型チャネルの異常による 腎不全発症機序の解明

五十里 彰

岐阜薬科大学薬学部 教授

緒 言

腎臓の尿細管は、糸球体でろ過された電解質や栄養素を再吸収することにより、体内濃度を一定に保つ働きを有する。高血圧や糖尿病などの生活習慣病の患者は、腎不全を併発することが多いが、有効な治療法は見つかっていない。日本国内では、末期腎不全で透析を受ける患者数が30万人を超え、超高齢化社会の到来とともに透析患者数のさらなる増加が懸念される。腎不全の発症機序の解析において、トランスフォーミング増殖因子- β や血小板由来増殖因子などのサイトカインが糸球体硬化や腎間質の繊維化を促進させ、腎不全を発症・進行させることが報告されている。しかし、サイトカインの分泌異常機構や他因子の関与については不明なままである。

高カルシウム尿症と腎石灰化を伴う家族性低マグネシウム血症 (FHHNC) の患者は、腎尿細管におけるマグネシウム再吸収の異常を呈し、思春期までに約3分の1が末期腎不全に陥る。これまでに我々はFHHNCの原因遺伝子として同定されたクロードイン-16が、細胞間マグネシウムチャネルとして機能することを報告した¹⁾。さらに、FHHNC患者で同定されたクロードイン-16の変異体や、食塩感受性高血圧発症ラットで同定した脱リン酸化型クロードイン-16が、本来分布すべき細胞間接着装置から解離して細胞質内に分布することを解明した²⁻⁴⁾。このようにクロードイン-16のマグネシウムチャネルとしての働きと細胞内局在の調節機構が明らかになった。FHHNC患者にはマグネシウムが経口または静注で投与され、低マグネシウム血症が治療される。それにも関わらず腎不全を発症するため、低マグネシウム血症だけが腎不全の原因になるのではなく、クロードイン-16の発現や細胞内局在の異常も、腎不全の発症に関与するという仮説を立てた。また、クロードイン-16ノックアウトマウスは、低マグネシウム血症を呈するが腎不全を起ささないことから、ヒトとマウスのクロードイン-16の構造および機能の違いが、腎不全の発症機序解明の手

がかりになると考えた。本研究では、腎不全の新規発症機序の解明を目指し、ヒトクロードイン-16の細胞内局在調節機構と、クロードイン-16が尿細管細胞の機能に及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. ベクターの調製

ヒト腎臓のmRNAから調製したcDNAを用いて、PCR法によりFXD2 cDNAを増幅後、pMAL-c5xベクター (New England BioLabs)、pEGFPベクター (Clontech)、pCMV-Tag3ベクター (Stratagene) にサブクローニングした。ヒトクロードイン-16を含むpFN21Aベクター (Kazusa DNA Research Institute) を鋳型として、PCR法により長鎖クロードイン-16と短鎖クロードイン-16 cDNAを増幅後、pCMV-Tag2ベクターにサブクローニングした。

2. 酵母ツーハイブリッド法

ヒトの腎臓から抽出したmRNAを鋳型として、PCR法でクロードイン-16のアミノ基側細胞質領域を増幅した。PCR産物を酵母発現ベクターに組み込み、接合実験に使用した。ヒトの腎臓cDNAライブラリーから作成したベクターとクロードイン-16アミノ基側細胞質領域を組み込んだベクターを含む酵母を接合させ、寒天培地で培養した。コロニーからプラスミドDNAを抽出後、シーケンス解析を行って遺伝子配列を決定した。BLASTサーチを用いて、遺伝子配列に対応するタンパク質を同定した。

3. リコンビナントタンパク質の作成とプルダウンアッセイ

FXD2/pMALベクターとNHE1/pMALを大腸菌に形質転換後、Overnight Express (Novagen社) を用いてマルトース結合タンパク質融合FXD2タンパク質

(MBP-FXYD2) と MBP 融合 NHE1 タンパク質 (MBP-NHE1) を調製した。イヌ腎臓由来の MDCK 細胞に短鎖クローディン-16 と長鎖クローディン-16 を発現させ、細胞ライセート、グルタチオンビーズ、MBP-FXYD2 または MBP-NHE1 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に使用した。

4. 腎尿管上皮細胞の培養とトランスフェクション

MDCK 細胞を、DMEM (5% fetal bovine serum 含) で培養し、3~4 日ごとに 0.25% トリプシン溶液を用いて継代した。Lipofectamine 2000 (Life Technologies 社) を用いて、プロトコールに従ってベクター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、細胞間透過性実験に使用した。

5. 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 回繰り返して、得られた沈降物をウエスタンブロットに使用した。

6. 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を用いてビオチン標識タンパク質を共沈降し、ウエスタンブロットに使用した。

7. 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。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イング検出試薬および C-DiGit Blot Scanner (LI-COR 社) を使用した。

8. 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% ブロックエ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、タンパク質の細胞内局在を調べた。

9. 細胞間透過性の評価

細胞をトランスウェルに播種後、コンフルエントの状態になるまで培養した。Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore 社) を用いて、上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。トランスウェルの面積で補正後、空のトランスウェルにおける TER 値を差し引くことによりサンプルの TER 値 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) を算出した。また、xylydyl blue-1 (XB-1) を用いて、管腔側から血管側への上皮膜間マグネシウム透過性を測定した。

結 果

1. 長鎖クローディン-16 のアミノ基側細胞質領域に結合するタンパク質の探索

ヒトのクローディン-16 には、ラットやマウスと比較して同程度の大きさのもの (短鎖クローディン-16) と、アミノ基側領域が長いアイソフォーム (長鎖クローディン-16) が存在する (図 1)。長鎖クローディン-16 のアミノ基側領域を組み込んだベクターを用いて、酵母ツーハイブリッド法により結合タンパク質を探索したところ、FXYD2 と NHE1 が同定された。本研究では、FXYD2 が長鎖クローディン-16 の細胞内局在と NHE1 の機能に及ぼす影響を検討した。

2. 長鎖クローディン-16 と FXYD2 の結合

ラットとヒトの腎臓から抽出されたタンパク質を用いて、ウエスタンブロット法によりクローディン-16 の発現を確認した。ヒトでは 23 kDa 付近と 30 kDa 付近に 2 本のバンドが検出された (図 2A)。23 kDa 付近のバンドはラットと同じ位置であるため、ヒト短鎖クローディン-16 であると考えられた。一方、30 kDa 付近のバンド

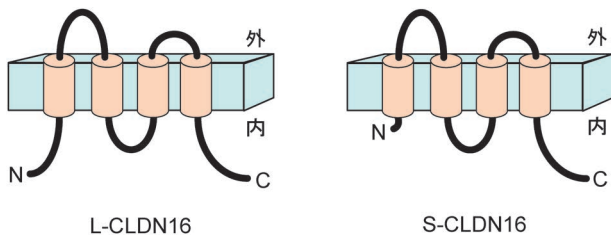


図1 ヒトのクロードイン-16のスプライスバリエント

ヒトのクロードイン-16には、長鎖 (L-CLDN16) と短鎖 (S-CLDN16) の2種類のスプライスバリエントが存在する。

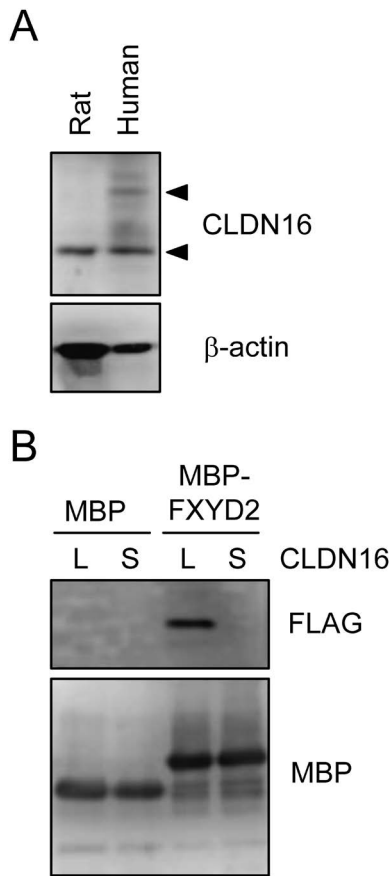


図2 長鎖クロードイン-16とFXYD2の結合

(A) ラットとヒトの腎臓から抽出されたタンパク質を用いて、ウエスタンブロットを行った。ローディングコントロールとしてβ-アクチンを用いた。(B) MDCK細胞にFLAGタグを融合したL-CLDN16とS-CLDN16を過剰発現させ、MBPまたはMBP-FXYD2とともにプルダウンアッセイを行った。MBP抗体でMBP-FXYD2のサイズを確認した。

は、ラットでは検出されなかったためヒト長鎖クロードイン-16であると考えられた。次に、クロードイン-16とFXYD2の結合を調べるため、プルダウンアッセイを実施した。長鎖および短鎖クロードイン-16をMDCK細胞に発現させ、大腸菌で調製したMBP-FXYD2との結合を調べたところ、長鎖クロードイン-16がFXYD2と

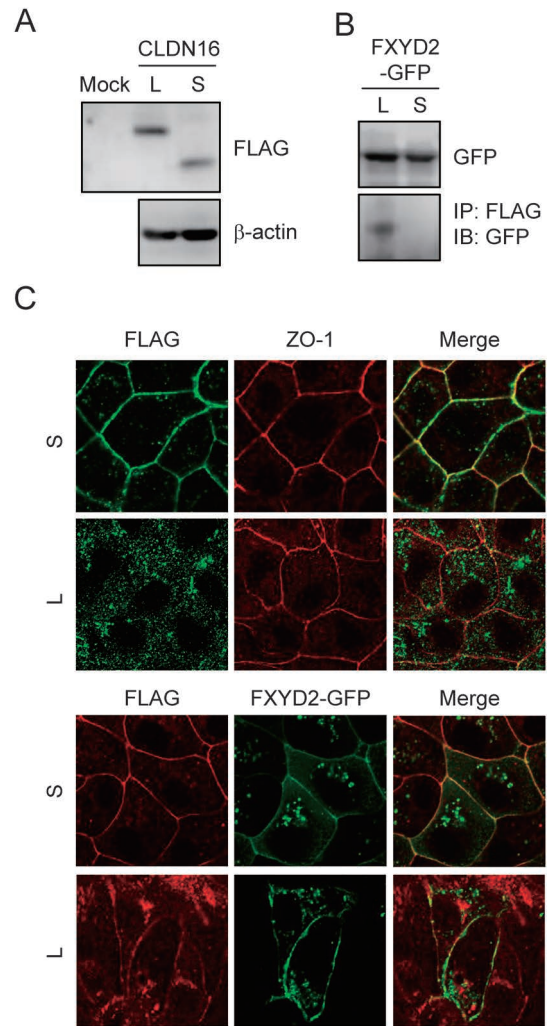


図3 クロードイン-16の細胞内局在に対するFXYD2の影響

(A) MDCK細胞にL-CLDN16とS-CLDN16を発現させたところ、ウエスタンブロットにより目的サイズにバンドが検出された。(B) MDCK細胞にL-CLDN16とS-CLDN16をFXYD2-GFPと共発現させ、CLDN16とFXYD2の結合を調べた。(C) MDCK細胞にL-CLDN16とS-CLDN16をFXYD2-GFPと共発現させ、蛍光免疫染色により細胞内局在を調べた。

結合することが明らかになった (図2B)。

3. 長鎖クロードイン-16の細胞内局在に対するFXYD2の影響

MDCK細胞に長鎖および短鎖クロードイン-16をトランスフェクションしたところ、それぞれ30 kDaと23 kDa付近に一本のバンドが検出された (図3A)。FXYD2-GFPを共トランスフェクションし、クロードイン-16との結合を調べたところ、長鎖クロードイン-16と結合したが、短鎖クロードイン-16と結合しなかった (図3B)。蛍光免疫染色により短鎖クロードイン-16と長

鎖クローディン-16の細胞内局在を調べたところ、短鎖クローディン-16はタイトジャンクションの裏打ちタンパク質であるZO-1とともにタイトジャンクションに局在したが、長鎖クローディン-16は主に細胞質に分布した(図3C)。FXVD2-GFPを共トランスフェクションしたところ、FXVD2とともに短鎖クローディン-16は細胞膜に分布した。また、細胞膜に分布する長鎖クローディン-16の量が増加した。

4. 細胞間透過性に対するクローディン-16とFXVD2発現の影響

これまでに我々は、ラットクローディン-16の発現により、TERとマグネシウム透過性が増加することを報告した¹⁾。ヒト短鎖クローディン-16発現細胞では、mock細胞よりもTERとマグネシウム透過性が増加したが、長鎖クローディン-16発現細胞ではほとんど変化しなかった(図4)。FXVD2-GFPの共発現により、長鎖クローディン-16発現細胞におけるTERとマグネシウム透過性が、短鎖クローディン-16発現細胞と同程度まで増加した。一方、短鎖クローディン-16発現細胞ではFXVD2-GFPの共発現によってほとんど変化しなかった。FXVD2 siRNAは、長鎖クローディン-16とFXVD2-

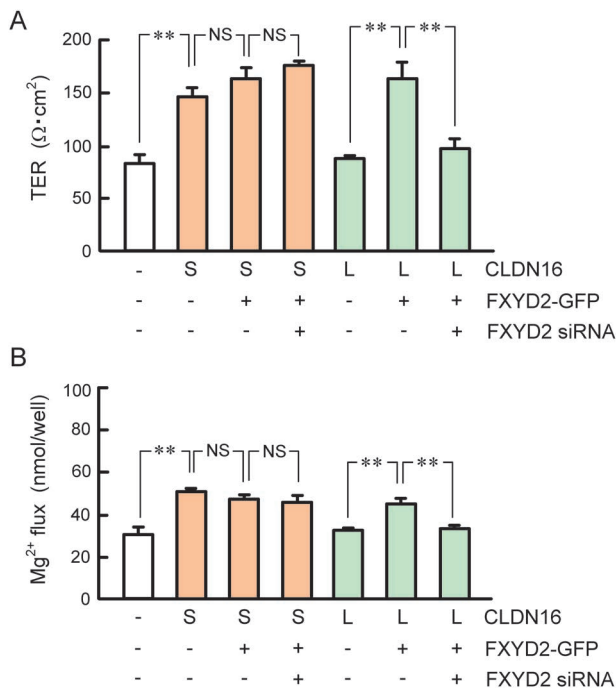


図4 クローディン-16の機能に対するFXVD2の影響

MDCK細胞にS-CLDN16とL-CLDN16を発現させ、TER (A)とマグネシウム透過性 (B)を測定した。また、FXVD2-GFPとFXVD2 siRNAの効果を調べた。** $p < 0.01$, NS $p > 0.05$ 。

GFP共発現細胞で、TERとマグネシウム透過性を有意に低下させた。

5. 長鎖クローディン-16とNHE1の結合

クローディン-16とNHE1の結合を調べるため、プルダウンアッセイを実施した。長鎖および短鎖クローディン-16をMDCK細胞に発現させ、大腸菌で調製したMBP-NHE1との結合を調べたところ、長鎖クローディン-16がNHE1と結合することが明らかになった(図5A)。長鎖クローディン-16発現細胞からタンパク質を抽出後、FALG抗体を用いて免疫沈降を行ったが、NHE1との結合は確認されなかった(図5B)。FXVD2-mycを共発現したところ、長鎖クローディン-16とNHE1が結合し、細胞膜表面におけるクローディン-16の分布量が増加した。蛍光免疫染色により長鎖クローディン-16の細胞内局在を調べたところ、長鎖クローディン-16が主に細胞質に分布したのに対し、NHE1とZO-1は細胞膜に分布した(図5C)。FXVD2-mycの共発現により、細胞膜における長鎖クローディン-16の分布量が増加したが、NHE1やZO-1の細胞内局在はほとんど変化しなかった。

6. 酸負荷による細胞障害に対するクローディン-16発現の影響

MDCK細胞に長鎖クローディン-16、短鎖クローディン-16、FXVD2-mycをトランスフェクションしたところ、mockと比較して細胞障害が有意に変化しなかった(図6A)。HEPESで緩衝したDMEMを用いて、細胞をpH 7.4、7.0、6.5の培地に暴露したところ、長鎖クローディン-16または短鎖クローディン-16の単独発現細胞では、pH 6.5で生存率が大きく低下した(図6B、C)。同様に、FXVD2-myc発現細胞でも、pH 6.5に暴露することにより生存率が低下した。長鎖クローディン-16とFXVD2-mycの共発現により、pH 6.5による生存率の低下が有意に抑制されたが、短鎖クローディン-16とFXVD2-mycの共発現では効果がなかった。

考 察

FHHNC患者で40カ所以上のクローディン-16遺伝子の変異が報告されており、その大部分が細胞外ループと膜貫通領域に分布する。腎尿細管由来のMDCK細胞やLLC-PK₁細胞を用いた発現実験により、クローディン-16の遺伝子変異とマグネシウム輸送機能との関係が明らか

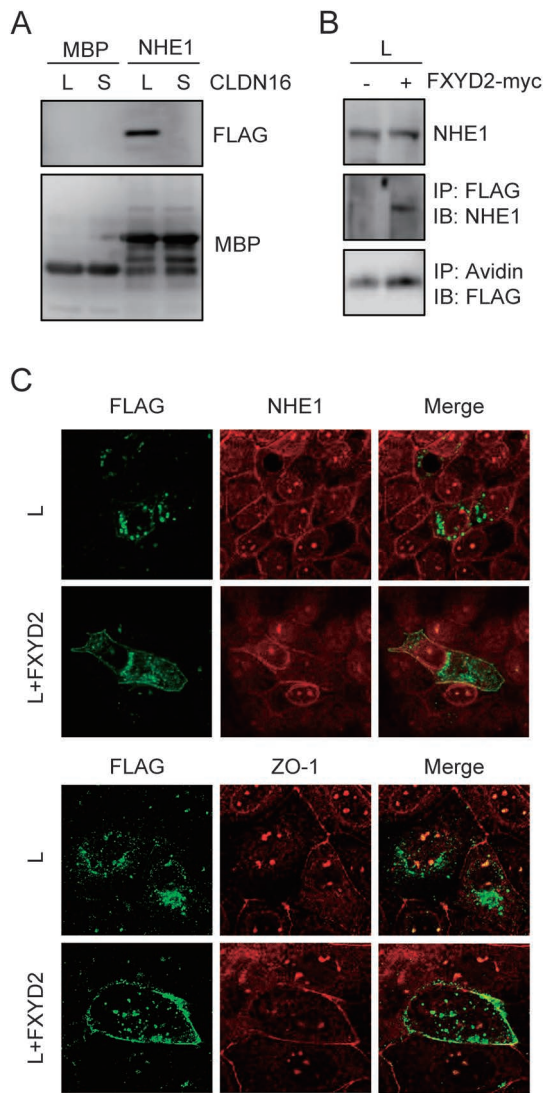


図5 長鎖クローディン-16とNHE1の結合

(A) MDCK細胞にFLAGタグを融合したL-CLDN16とS-CLDN16を過剰発現させ、MBPまたはMBP-NHE1とともにプルダウンアッセイを行った。MBP抗体でMBP-NHE1のサイズを確認した。(B) MDCK細胞にL-CLDN16とFXYD2-mycを発現させ、NHE1の発現、L-CLDN16とNHE1の結合、細胞膜表面におけるCLDN16の分布量を調べた。(C) 蛍光免疫染色により、NHE1の細胞内局在に対するL-CLDN16とFXYD2の影響を調べたが、NHE1の細胞内局在は変化しなかった。

にされてきた^{5,6)}。マグネシウム輸送機能が低下または欠失した変異体は、本来分布すべきタイトジャンクションではなく、主にエンドソームやリソソームに分布する。近年我々は、クローディン-16のタイトジャンクションへの移行に、SNAREファミリーに属するsyntaxin-8が関与することを発見した⁴⁾。クローディン-16のカルボキシル基側細胞質領域に存在する217番目のセリンをアラニンに置換すると、リン酸化量が低下してsyntaxin-8と

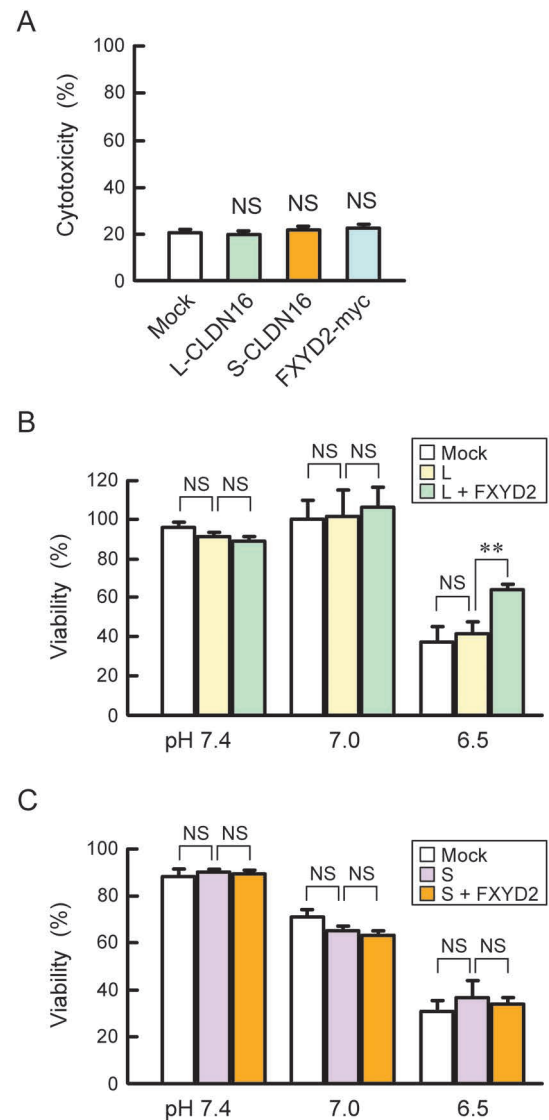


図6 酸負荷による細胞障害に対するクローディン-16とFXYD2発現の影響

(A) MDCK細胞にL-CLDN16、S-CLDN16、FXYD2-mycを発現させたが、細胞障害率はほとんど変化しなかった。NS $p > 0.05$ vs. mock。(B) MDCK細胞にL-CLDN16とFXYD2-mycを発現後、酸負荷による細胞生存率の変化を調べた。(C) MDCK細胞にS-CLDN16とFXYD2-mycを発現後、酸負荷による細胞生存率の変化を調べた。* $p < 0.01$, NS $p > 0.05$ 。

の結合が阻害された。クローディン-16がタイトジャンクションに分布するためには、セリン残基のリン酸化とsyntaxin-8との結合が必要であると考えられた。カルボキシル基側細胞質領域の役割が明らかになってきたが、アミノ基側細胞質領域の役割は十分に解明されていなかった。本研究で我々は酵母ツーハイブリッド法により、アミノ基側細胞質ドメインに結合する新たなタンパク質として、FXYD2とNHE1を同定した。FXYD2は長

鎖クローニン-16と結合したが、短鎖クローニン-16と結合しなかったことから、クローニン-16のアミノ基側細胞質領域がFXVD2との結合に必要であることが明らかになった。

FXVD2は Na^+/K^+ -ATPase γ サブユニットをコードする遺伝子で、 Na^+/K^+ -ATPaseの活性や発現の調節に関与すると報告されている⁷⁾。また、孤立性常染色体劣性低マグネシウム血症の患者でFXVD2の遺伝子変異が報告され⁸⁾、マグネシウム再吸収の調節においても重要な役割を果たすと考えられる。しかし、FXVD2がどのような機序でマグネシウム再吸収を調節するのかは不明であった。MDCK細胞に発現させたヒト長鎖クローニン-16は主に細胞質に分布したが、FXVD2の共発現により長鎖クローニン-16はタイトジャンクションにも分布した(図3)。さらに、管腔側から血管側へのマグネシウム透過性がFXVD2の共発現によって増加し、この効果がFXVD2 siRNAの導入によって阻害された(図4)ことから、長鎖クローニン-16はFXVD2の存在下でマグネシウムチャネルとして機能することが明らかになった。これまで長鎖クローニン-16を用いた発現実験では、長鎖クローニン-16は主に細胞質に分布し、マグネシウム透過性に影響を及ぼさないことが報告されており⁵⁾、我々の研究成果は長鎖クローニン-16もマグネシウム輸送に関与することを初めて実証したことになる。

NHE1は広範な組織に発現し、細胞外から Na^+ イオンを流入させ、その対向輸送として H^+ を細胞外に排泄することにより、細胞内pHや細胞内 Na^+ 濃度の調節に関与する。長鎖クローニン-16とNHE1の結合を調べたところ、FXVD2非発現細胞で両者は結合しなかったが、FXVD2の共発現によって両者が結合したことから、長鎖クローニン-16がタイトジャンクションに分布後にNHE1と結合することが示唆された。また、クローニン-16やFXVD2の発現により、NHE1の発現量と細胞内局在は変化しなかったため、NHE1の発現調節に長鎖クローニン-16は関与しないことが明らかになった。細胞内pHを変化させた際の生存率に対する長鎖クローニン-16の影響を調べたところ、pH6.5にお

ける細胞生存率が、FXVD2と長鎖クローニン-16の共発現細胞で増大した。一方、FXVD2と短鎖クローニン-16の共発現細胞では、生存率が変化しなかった。これらの結果から、長鎖クローニン-16はNHE1による細胞内pHの調節機能を亢進させることが示唆された。尿細管上皮細胞では HCO_3^- の再吸収や H^+ の分泌が行われており、尿細管内のpHが大きく変動する。長鎖クローニン-16の発現低下によってNHE1の機能が低下するため、pH変動に対する尿細管上皮細胞の調整機能が低下して腎不全に至る可能性がある。

要 約

クローニン-16の発現機能解析を行い、ヒトにのみ発現する長鎖クローニン-16がFXVD2やNHE1と結合することを見出した。これまで長鎖クローニン-16は細胞質に分布し、マグネシウムチャネルとして機能しないと報告されていたが、FXVD2と共発現することによってタイトジャンクションに分布し、マグネシウム透過性を亢進させることが明らかになった。さらに、長鎖クローニン-16はNHE1と結合し、酸負荷による障害から細胞を保護したことから、長鎖クローニン-16はマグネシウム再吸収だけでなく、細胞内pHの調節にも関与することが示唆された。クローニン-16は腎障害の新たな治療標的になる可能性があり、今後の創薬研究が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Ikari, et al.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 54826–54832, 2004.
- 2) A. Ikari, et al.: *J. Physiol. Sci.*, **56**, 379–383, 2006.
- 3) A. Ikari, et al.: *J. Cell. Physiol.*, **214**, 221–229, 2008.
- 4) A. Ikari, et al.: *J. Biol. Chem.*, **289**, 13112–13123, 2014.
- 5) J. Hou, et al.: *J. Cell Sci.*, **118**, 5109–5118, 2005.
- 6) P. J. Kausalya, et al.: *J. Clin. Invest.*, **116**, 878–891, 2006.
- 7) K. Geering: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**, F241–250, 2006.
- 8) I. C. Meij, et al.: *Nat. Genet.*, **26**, 265–266, 2000.