

- 1) Li, Q., Lee, J.A., & Black, D.L. (2007) *Ann. Rev. Neurosci.*, **8**, 819–831.
- 2) Xie, J.Y. (2008) *Biochem. Biophys. Acta*, **1779**, 438–452.
- 3) Xie, J.T. & Black, D.L. (2001) *Nature*, **410**, 936–939.
- 4) An, P. & Grabowski, P.J. (2007) *PLoS Biol.*, **5**, e36.
- 5) Iijima, T., Wu, K., Witte, H., Hanno-Iijima, Y., Glatter, T., Richard, S., & Scheiffele, P. (2011) *Cell*, **147**, 1601–1614.
- 6) Yu, J.K., Hai, Y., Liu, G.D., Fang, T.L., Kung, S.K.P., & Xie, J.Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 1505–1513.
- 7) Liu, G., Razanau, A., Hai, Y., Yu, J., Sohail, M., Lobo, V.G., Chu, J., Kung, S.K., & Xie, J. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 22709–22716.
- 8) Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A.C., Scott, D.B., & Ehlers, M.D. (2003) *Neuron*, **40**, 581–594.
- 9) Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. (2005) *Trends Neurosci.*, **28**, 229–238.
- 10) Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003) *Nat. Neurosci.*, **6**, 708–716.
- 11) Baudouin, S. & Scheiffele, P. (2010) *Cell*, **141**, 908.
- 12) Ko, J., Fuccillo, M.V., Malenka, R.C., & Sudhof, T.C. (2009) *Neuron*, **64**, 791–798.
- 13) Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., & Mishina, M. (2010) *Cell*, **141**, 1068–1079.
- 14) Krueger, D.D., Tuffy, L.P., Papadopoulos, T., & Brose, N. (2012) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22**, 1–11.
- 15) Licatalosi, D.D. & Darnell, R.B. (2006) *Neuron*, **52**, 93–101.

飯島 崇利

(スイス・バーゼル大学バイオセンター  
神経生物学部門)

Mechanisms and functions underlying neuronal activity-dependent alternative pre-mRNA splicing  
Takatoshi Iijima (Department of Cell and Neurobiology, Biozentrum, University of Basel, Klingenbergstrasse 50/70, CH-4056, Basel, Switzerland)

## 腎尿細管におけるマグネシウム輸送の分子制御

### 1. はじめに

マグネシウムは生体内で4番目に多く存在する陽イオンであり、その約60%はカルシウムとともに骨に貯蔵され、血清中には1%しか存在しない。細胞内に分布するマグネシウムは、エネルギーを必要とする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重要な役割を果たす。マグネシウムの一日に必要な摂取量は300 mg程度(成人)であるが、現代の日本人の平均摂取

量は約250 mgで不足しがちなミネラルといえる。慢性的なマグネシウム不足は、骨粗鬆症、心疾患、糖尿病などの生活習慣病のリスクを増大させることが示唆されている。生体内のマグネシウムバランスは、腎臓での再吸収機構によって厳密に調節されているが、腎臓に発現するマグネシウム輸送体の遺伝子変異や免疫抑制剤の投与などにより、マグネシウムバランスが崩れる。しかし、マグネシウムホメオスタシスの異常機構は不明であった。本稿では、腎尿細管のマグネシウム再吸収機構に関する最近の話題について、著者らの研究成果を含めて紹介する。

### 2. 傍細胞経路を介したマグネシウム輸送

糸球体でろ過されたマグネシウムイオンは、約70%がヘンレの太い上行脚で再吸収される<sup>1)</sup>。この部位では、傍細胞経路を介してマグネシウムが再吸収され、その輸送は上皮膜電位勾配によって調節される(図1)。傍細胞経路を介したマグネシウム輸送を担うタンパク質は、タイトジャンクション(密着結合)に分布するクローディン-16である。タイトジャンクションは、物質が自由に透過しないようにバリアーとして働くと考えられていたが、イオン選択的なポアを形成することが明らかになってきた。ヒトクローディン-16タンパク質は、305個のアミノ酸からなる4回膜貫通型の構造を有する。タイトジャンクションには、クローディンの他に、足場タンパク質のZO-1やZO-2、シグナル伝達因子などが存在する。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)の患者において、20種類以上のクローディン-16の変異体が報告された<sup>2-4)</sup>が、低マグネシウム血症の発症機構は不明であった。

我々は、FLAGタグを融合したクローディン-16をイヌ腎尿細管由来のMDCK細胞に発現させ、クローディン-16変異体の機能解析を行った<sup>5)</sup>。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、管腔から血管への<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>透過性を増加したことから、二価カチオンに対するチャンネルとして働くことが示唆された。高濃度のマグネシウム存在下では<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>の輸送が阻害されたことから、カルシウムとマグネシウムが競合的に輸送されると考えられる。クローディン-16のPDZ結合モチーフの欠失体と点変異体は、タイトジャンクションから解離して細胞質に分布した。クローディン-16の免疫沈降により、野生型はZO-1と結合するが、変異体はZO-1と結合しないことが明らかになった。さらに、変異体を発現した細胞では、非発現細胞と同程度まで二価カチオンの輸送量が低下した。我々の

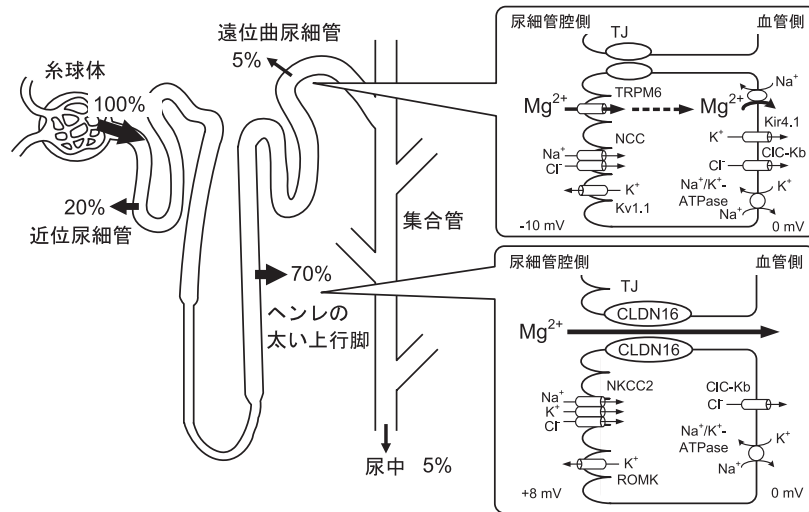


図1 腎尿細管におけるマグネシウム再吸収機構

糸球体でろ過されたマグネシウムのうち、20%が近位尿細管、70%がヘンレの太い上行脚、5%が遠位尿細管から再吸収され、約5%が尿中に排泄される。ヘンレの太い上行脚では、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  共輸送体 (NKCC2)、腎髄質外部  $\text{K}^+$  チャネル (ROMK)、 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$  によって形成される電気化学勾配を駆動力とし、タイトジャンクション (TJ) に発現するクローディン-16 (CLDN16) を介してマグネシウムが再吸収される。遠位曲尿細管では、TRPM6 チャンネルを介してマグネシウムが管腔側から細胞内へ輸送されるが、細胞内から血管側への輸送分子は不明である。

研究から、PDZ 結合モチーフに変異のある FHHNC 患者では、クローディン-16 と ZO-1 の結合が阻害され、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ができないためにマグネシウム再吸収量が低下し、低マグネシウム血症が引き起こされると示唆された。

クローディン-16 の細胞内局在の調節機構を調べたところ、プロテインキナーゼ A (PKA) によるリン酸化が関与することを見いだした<sup>6)</sup>。PKA 阻害剤の処理により、クローディン-16 のリン酸化量が低下し、クローディン-16 はタイトジャンクションから解離した。さらに、上皮細胞膜を介したマグネシウム透過性が低下した。細胞内カルボキシ末端領域の Ser208, Ser213, Ser217 に変異を導入したところ、Ser217 変異体でのみリン酸化量が低下したことから、この部位が PKA によってリン酸化されることが明らかになった。次に、マグネシウム不足と高血圧症との関連が指摘されているため、食塩感受性高血圧発症ラットを用いて、クローディン-16 の発現に対する影響を調べた<sup>7)</sup>。正常と高血圧ラットのクローディン-16 の発現量に有意な差はなかった。しかし、高血圧ラットではクローディン-16 のリン酸化量が低下していた。クローディン-16 の脱リン酸化により、タイトジャンクションへの局在が低下する

ため、食塩感受性高血圧発症ラットではマグネシウム再吸収が低下すると示唆された。

ヘンレ上行脚の上皮細胞の基底側膜には、細胞外多価カチオン感受性受容体 (CaSR) が発現している。CaSR は血管側のマグネシウム濃度センサーとして働き、血管側から管腔側へのマグネシウムの逆流 (排出) を防ぐと考えられているが、詳細な機構は不明であった。我々はクローディン-16 に対する CaSR の新しい作用機構を明らかにした<sup>8)</sup>。CaSR は Gi タンパク質と共役しており、CaSR の活性化により PKA 活性が低下した。さらに、クローディン-16 のリン酸化量が低下し、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た (図 2)。ジブチリル cAMP (cAMP アナログ) の共処理により、クローディン-16 のリン酸化量、クローディン-16 の細胞内局在、マグネシウム輸送量がコントロールと同程度まで回復した。このことから、CaSR はクローディン-16 のリン酸化状態の変化を介してその細胞内局在を調節し、マグネシウム再吸収を制御すると示唆された。

### 3. 遠位曲尿細管におけるマグネシウム再吸収機構

遠位曲尿細管におけるマグネシウム再吸収量は 5% 程度

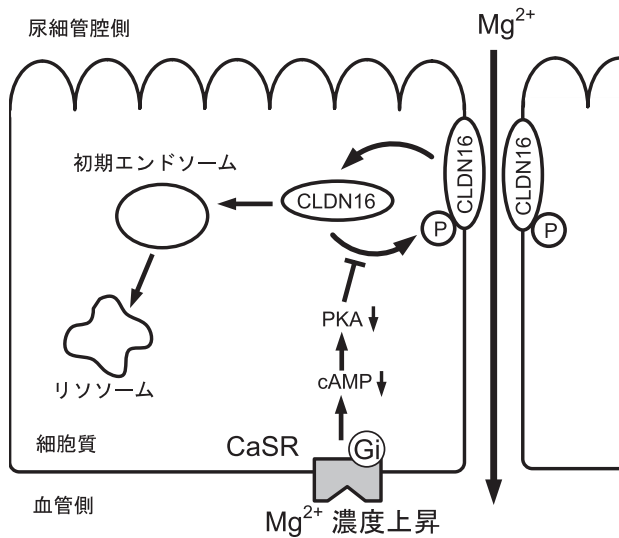


図2 クローディン-16のリン酸化と細胞内局在

PKAによって野生型クローディン-16はリン酸化され、タイトジャンクションに分布するが、非リン酸化体 (Ser217 変異体) は主に細胞質に分布する。CaSRの活性化により、cAMP濃度の低下、PKA活性の低下を介して、脱リン酸化したクローディン-16が増加する。脱リン酸化したクローディン-16は、初期エンドソームを経由してリソソームへ運ばれ、分解される。

であるが、体内のマグネシウム濃度を微調整するために重要な役割を果たすと考えられている (図1参照)。この部位では、経細胞経路を介してマグネシウムが再吸収される。細胞内から血管側へマグネシウムを運ぶイオン輸送体の分子実体は不明であるが、管腔側から細胞内へマグネシウムを取り込むチャネルとして、transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) がクローニングされた<sup>9,10</sup>。TRPM6は腎臓の遠位尿管にのみ発現し、尿管の他の部位には発現しない。我々は遠位尿管由来のMadin-Darby canine kidney細胞を用いてTRPM6の発現調節機構に関する研究を進め、上皮成長因子 (EGF) が、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) のリン酸化を介してTRPM6 mRNAの発現を増加させ、マグネシウム輸送量を増加させることを見いだした<sup>11</sup>。ヒトTRPM6の-1214~-718のプロモーター領域を用いて転写活性を調べたところ、EGF処理により活性が増大し、ERK阻害剤のU0126処理により活性が低下した。ERKのシグナル伝達経路の下流には、転写調節因子のc-Fosが存在する。c-Fos siRNAを用いてc-Fosの発現をノックダウンしたところ、TRPM6の転写活性が有意に低下した<sup>12</sup>。また、c-Fosが結合すると推測されるプロモーター領域に変異を導入すると、TRPM6の転写活性が低下した。これらの結果から、EGFはMAPキ

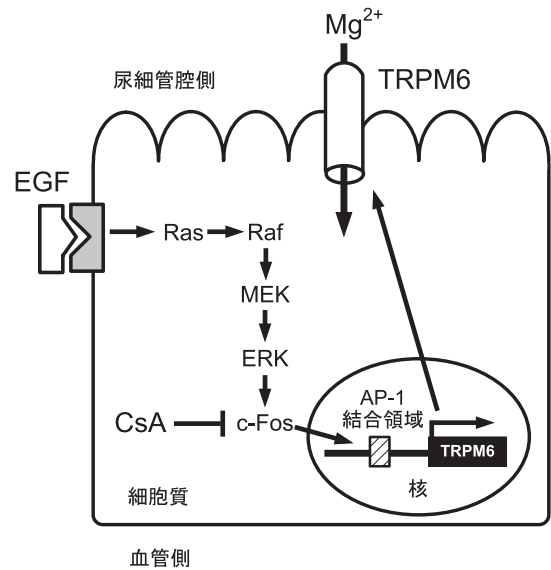


図3 EGF/MEK/ERK経路によるTRPM6の転写調節

EGFは、MEK/ERK経路を活性化し、c-Fosのリン酸化、核内移行、AP-1結合領域への結合を介してTRPM6の転写活性を増大する。免疫抑制剤のCsAは、c-Fosの発現量を低下させるため、TRPM6の発現量が低下し、低マグネシウム血症が起ると示唆される。

ナーゼキナーゼ (MEK)/ERK/c-Fos経路の活性化を介して、TRPM6の発現量を増加させることが明らかになった (図3)。常染色体劣性低マグネシウム血症の患者では、EGFの前駆体であるpro-EGF (I型膜貫通前駆体タンパク質) に変異があり、EGFの分泌量が少ない。また、EGF受容体のモノクローナル抗体であるセツキシマブは、結腸・直腸がんの治療に使用されるが、低マグネシウム血症の副作用を引き起こす<sup>13</sup>。EGFの分泌やそのシグナル伝達機構に異常があると、TRPM6の発現量が低下し、低マグネシウム血症になると示唆される。

免疫抑制剤のタクロリムスやシクロスポリンA (CsA) は、臓器移植や膠原病の治療に使用される。副作用として、低マグネシウム血症を引き起こすことがあり、その使用量と期間が制限される。我々は、CsAが転写調節因子のc-Fosの発現量を低下させ、TRPM6 mRNA発現量を低下させることを見いだしている。ERKのリン酸化がc-Fosの発現調節に関与することから、CsAはEGFによるシグナル伝達を阻害することにより、TRPM6の発現量を低下させると示唆された<sup>14</sup>。

#### 4. おわりに

腎尿管においてマグネシウム再吸収を担うイオン輸送

体の分子実体が解明され、遺伝子疾患や薬剤性低マグネシウム血症の発症機序が明らかになってきた。高血圧や糖尿病などの生活習慣病と低マグネシウム血症との関連が指摘されているため、マグネシウム輸送体の異常と病態との関係を解明する必要がある。今後、マグネシウム輸送体を標的とした疾患治療薬が開発されることを期待する。

## 謝辞

本研究は、静岡県立大学薬学部産業衛生学講座および生体情報分子解析学分野に配属された学部学生、大学院生とともに行われたもので、この場を借りてお礼申し上げる。

- 1) Quamme, G.A. & de Rouffignac, C. (2000) *Front. Biosci.*, 5, D694-D711.
- 2) 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., & Lifton, R. P. (1999) *Science*, 285, 103-106.
- 3) Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Ronfarth, G., Bowald, M., Bonzel, K.E., Seeman, T., Sulakova, T., Kuwertz-Broking, E., Gregoric, A., Palcoux, J.B., Tasic, V., Manz, F., Scharer, K., Seyberth, H.W., & Konrad, M. (2001) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 1872-1881.
- 4) Tajima, T., Nakae, J., & Fujieda, K. (2003) *Pediatr. Nephrol.*, 18, 1280-1282.
- 5) Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., & Takagi, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 54826-54832.
- 6) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., & Miwa, M. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 1781-1789.
- 7) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Degawa, M., Takahashi, T., Sugatani, J., & Miwa, M. (2006) *J. Physiol. Sci.*, 56, 379-383.
- 8) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., Sugatani, J., Degawa, M., & Miwa, M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 283-290.
- 9) Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsun, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W., & Konrad, M. (2002) *Nat. Genet.*, 31, 166-170.
- 10) Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R., & Sheffield, V.C. (2002) *Nat. Genet.*, 31, 171-174.
- 11) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani, J., & Miwa, M. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 1129-1133.
- 12) Ikari, A., Sanada, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani, J., & Miwa, M. (2010) *J. Cell. Physiol.*, 222, 481-487.
- 13) Tejpar, S., Piessevaux, H., Claes, K., Piront, P., Hoenderop, J. G., Verslype, C., & Van Cutsem, E. (2007) *Lancet Oncol.*, 8,

387-394.

- 14) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Takahashi, T., Sugatani, J., & Miwa, M. (2008) *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377, 333-343.

五十里 彰

(静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学分野)

Molecular mechanism of magnesium transport in renal tubule

Akira Ikari (Department of Pharmaco-Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

## 遺伝子探索による耐熱性キチン分解酵素の開発と機能解明

### 1. はじめに

カニやエビの甲殻を構成する主成分のキチンは地球上でセルロースに次ぐ生産量を占めるバイオマス資源である。キチンはN-アセチルグルコサミン (NAG) のホモポリマーであり、その構成成分であるNAGには関節痛改善や美肌効果といった優れた特性が見いだされ、近年食品や医薬品といった幅広い分野で応用されている。現在、NAGはキチンの酸加水分解によって(工業的に)得られているが、酸加水分解を行うとアセチル基が脱離してしまい大部分がグルコサミンになってしまう。そこで副反応の少ない酵素法が目ざされており、我々はキチンを効率よく分解できるキチン分解酵素を発見・開発することでキチン系バイオマスの有効利用を目指している。

### 2. 遺伝子探索によるキチナーゼの発見

自然界に存在する様々な微生物の未利用遺伝子の中で、100℃近い高温環境で生育できる超好熱菌由来の酵素は極めて高い熱安定性を有し、産業用酵素としての可能性を秘めている。しかしながら超好熱菌由来のキチン分解酵素群に関する報告は今中らによる超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* の遺伝子および酵素学的性質に関する報告のみであった<sup>1)</sup>。この *T. kodakaraensis* のキチン代謝経路は既知のものとは大きく異なる(図1A)<sup>1)</sup>。すなわち、キチナーゼによるキチン分解反応①は他の生物でも見られるが、次の二糖の部分的脱アセチル化反応②、N-アセチルグルコサミンとグルコサミンへの加水分解反応③、そして、