

腎ナトリウム共輸送体及び交換体並びに関連輸送タンパク質の発現と調節因子

祐田 泰延

Expressions and Regulations of Renal Sodium-Cotransporters and -Antiporters, and Related-Transport Proteins

Yasunobu SUKETA

*Department of Pharmacy, Chiba Institute of Science Faculty of Pharmacy,
3 Shiomi-cho, Choshi City 288-0025, Japan*

(Received February 8, 2008)

The authors' researches have been focused on pathogenic, physiological and biochemical mechanisms in hypertension and diabetes. Studies on hypertension were performed using salt-sensitive hypertensive Dahl rats as compared with the corresponding normotensive rats. Especially, implication with mobilization of electrolytes such as sodium, potassium, calcium and magnesium in hypertension gave rise to provocative to the author. Furthermore, complications of diabetes with hypertension were themes for the authors' researches. Thus, sodium-dependent glucose transport has been studied on sodium-dependent glucose transporters such as SGLT1 and SGLT2 using cell lines of porcelain renal cell, LLC-PK₁, and murine renal cell, NRK-52E. Relationship between magnesium mobilization and NO in hypertension has been explored using renal epithelial cell-lines and salt-sensitive hypertensive Dahl rats in the latter half of the author's research life.

Key words—Na⁺/K⁺-ATPase; Na⁺/Cl⁻, Na⁺/glucose-cotransporter; epithelial Na⁺-channel; Na⁺/Mg²⁺-exchanger; Mg²⁺-transporter; trafficking

はじめに

ナトリウム (Na) 動態は生命維持にとって、イオン強度やイオン平衡の恒常性維持は極めて重要で、腎臓での再吸収と密接に係わっている。その失調は高血圧症等を惹起することになる。これらの恒常性は、内分泌系、神経分泌系、神経支配等によって巧妙に調節制御されている。一方、細胞内のイオン強度はカリウム (K) が主要な成分で一定濃度に維持されている。またカルシウム (Ca)、¹⁾ マグネシウム (Mg)²⁾ は骨格並びに情報伝達や生理機能調節に重要である。他方、糖は生体エネルギー産生にとって重要な成分である。腎糸球体で濾過された原尿に含まれるこれらの成分は近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位尿細管さらに集合管において再吸収される。³⁻⁶⁾ ここでは、主として筆者らが研究してきた

腎 Na⁺ 輸送体並びに Na⁺/Mg²⁺-交換体さらには Na⁺/糖-共輸送体の発現と調節に関する最近の知見について概観したい。

1. 腎ナトリウム輸送と膜輸送タンパク質

Na⁺ は細胞外のイオン強度、イオン平衡や pH 等の恒常性維持に重要である。これらの恒常性維持は哺乳動物では、主として腎で行われている。溶液や水の取り込みの大きな量的並びに質的变化にも関わらず、腎は細胞外コンパートメントの組成や容量を非常に狭い範囲内に厳密に調節し、維持されている。腎による Na⁺ 濃度の恒常性維持は多数の Na⁺ 特異的輸送タンパク質により営まれ、かつそれらの営みはレニン-アンジオテンシン系等の特異的因子、ホルモン、神経分泌等によって巧妙に制御されている。ここでは、主として腎 Na⁺ 調節に係わる腎膜タンパク質とその遺伝的変異による機能失調について概説する。

1-1. 腎での Na⁺/K⁺-ATPase の局在と役割

あらゆる上皮 Na⁺ 再吸収においてと同様に腎尿細管細胞では、Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) が側基底

千葉科学大学薬学部薬学科 (〒288-0025 銚子市潮見町3)

e-mail: ysuketa@nifty.com

本総説は、平成19年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

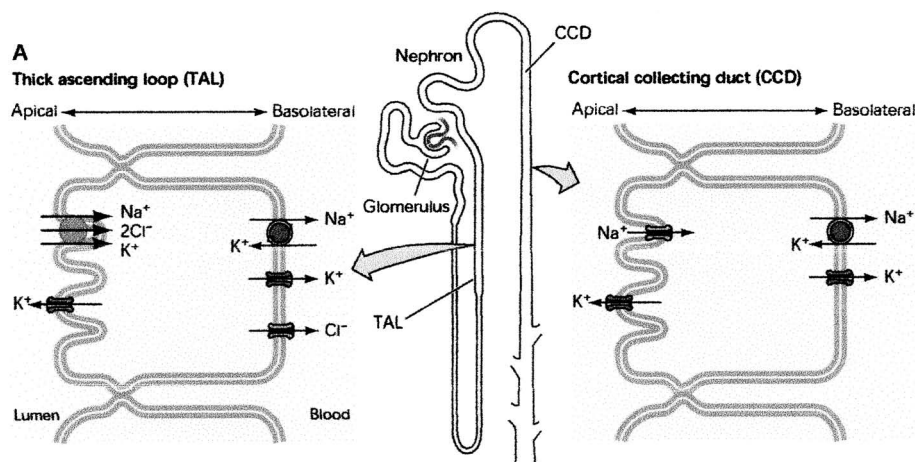


Fig. 1. Model of Thick Ascending Limb (TAL) and Cortical Collecting Duct (CCD)

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and Na^+ channel are localized in apical membrane of epithelial cells, whereas Na^+/K^+ -ATPase and Cl^- channel are localized in basolateral membrane of the epithelial cells. On the other hand, K^+ channel is localized in the both membrane sites of the epithelial cells.⁷⁾

膜にもっぱら分布している (Fig. 1).⁷⁾ 細胞内及び細胞外コンパートメント間の NKA によって生成する Na^+ 勾配は頂端膜を介して消費される。質的には、正味の Na^+ 再吸収は腎 NKA の主な機能であり、またネフロン種々分節での NKA の豊富さと Na^+ 再吸収には密接した関係がある。ヒトでは、腎は 1 日当たり 600 g 以上の Na^+ を再吸収して、またこの過程では 2 kg 以上の ATP が使用されると云われている。

1-1-1. Na^+/K^+ -ATPase のトラフィッキングと関連タンパク質 NKA のエンドサイトーシスはクラスリン依存性である。Efendiev ら⁸⁾ はドーパミン受容体情報が *dynamin-2* を動員促進し NKA エンドサイトーシス部位に集合する機構を研究している。ドーパミンが原形質膜及び PI3 キナーゼ (PI3K) と *dynamin-2* との会合を増加した。ドーパミンは OK 細胞や野生型 *dynamin-2* 過剰発現では NKA 活性を阻害したが、ドミナントネガティブ変異体発現では阻害しなかった。Dynamin 集合には脱リン酸化は重要である。ドーパミンはプロテインホスファターゼ 2A 活性を上昇し、*dynamin-2* を脱リン酸化した。プロテインホスファターゼ 2A のドミナントネガティブ変異体発現細胞では、ドーパミンは *dynamin-2* を脱リン酸化しないし、NKA 活性を低下しない。*Dynamin-2* は Ser⁸⁴⁸ でリン酸化され、S848A 変異体ではドーパミンの効果を有意に抑制した。これらの結果から、ドーパミンは受容体を介して *dynamin-2* リン酸化を制御し、NKA エンドサ

イトーシスの部位で PI3K と相互作用して、その局在を促進するという明確な情報ネットワークを証明した。

FXDY5 は膜タンパク質の FXYD^{注1)} ファミリーである。この群の 5 種は NKA と相互作用し、調節している。しかしながら、FXDY5 は他のファミリーとは構造的に異なっていて、E-cadherin の調節や移送を促進する役割を演じていると推測されている (Fig. 2).⁹⁾ この研究では FXYD5 が NKA 活性を調節できるか否かを決め、さらに細胞・組織分布と生化学的性質が調べられている。¹⁰⁾ FXYD5 は連結管、集合尿管及び集合管境界細胞の側基底膜に存在し、一方ヘンレ係蹄では頂端膜に存在していた。抗-FXYD5 抗体は NKA α サブユニットを免疫沈降させた。アフリカツメガエル卵母細胞の NKA α 1 及び β 1 サブユニットを用いた FXYD5 共発現はポンプ活性で 2 倍以上誘導され、ウワバイン阻害性外向き電流として、あるいはウワバイン感受性 ⁸⁶Rb 取り込みのいずれも観察された。このように、FXDY5 は NKA と相互作用し、またその性質を調節することが明らかになった。

G-タンパク質共役受容体に対応して NKA 分子のエンドサイトーシスはプロテインキナーゼ C (PKC)-依存性様式でクラス I_A PI3K (PI3K-I_A) の活性化を必要とする。Yudowski ら¹¹⁾ は、その p85 α サブユニット SH3 ドメインを介した PI3K-I_A

注1 FXYD: 遺伝子命名は Phe-X-Tyr-Asp に基づいたもので、fix-it と発音する。

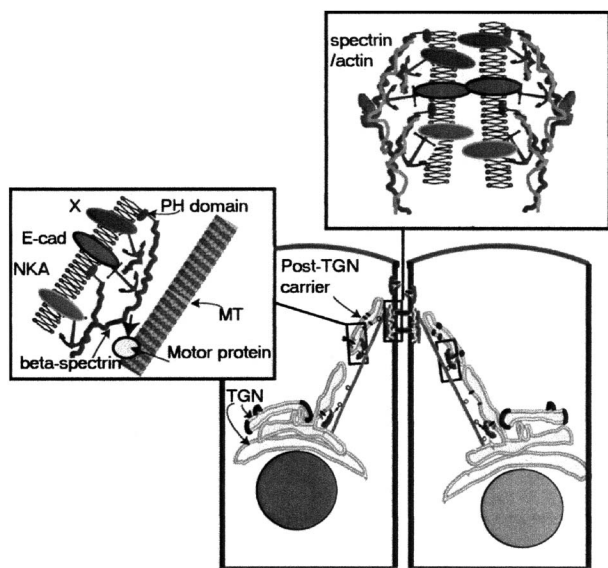


Fig. 2. A Schematic Model Showing the Collaboration of Ankyrin-G, β -2-Spectrin, and E-Cadherin in Membrane Domain Formation

In this model, E-cadherin- β -catenin complexes linked to ankyrin-G are transported to the plasma membrane along microtubules by motor protein, β -spectrin couples the microtubule motors to ankyrin-G-E-cadherin- β -catenin complexes. Bulk lipid transport is also achieved by interaction of β -spectrin with phospholipids. Transcellular interactions between E-cadherin at the plasma membrane probably target the complexes to sites of cell-cell contact. Other ankyrin-G-binding membrane proteins (Na^+/K^+ -ATPase (NKA) and yet to be identified membrane proteins (X)) are co-recruited along with the sites of cell-cell contact. The membrane proteins are retained at the plasma membrane through an interaction between ankyrin-G and spectrin actin-skeleton. TGN: *trans*-Golgi network, MT: microtubules.⁹⁾

は NKA 触媒 α サブユニットのプロリン-リッチ領域に結合している。この相互作用は NKA α サブユニットのプロリン-リッチモチーフに送達されて、アダプタータンパク質 (AP)-2 結合及びクラスリンの増加に必須である。PI3K- I_A 上昇をもたらすセリン残基の PKC- 依存性リン酸化によって促進される。このようにして、NKA 触媒サブユニットのセリン-リン酸化は PI3K- I_A の局在制御にとってアンカーとして働き、G-タンパク質共役受容体情報に対応して NKA エンドサイトーシスの活性化に働いている。

1-1-2. 腎 Na^+/K^+ -ATPase 活性変動と高血圧症・糖尿病 高血圧症と糖尿病との係わりが議論になっている。筆者ら¹²⁾ は Dahl 食塩耐性 (DR) と食塩感受性 (DS) ラット腎 NKA 及び $\text{Na}^+/\text{糖}$ -共輸送体 (SGLT) 1 への高食塩負荷の影響を調べた。DS ラット NKA や SGLT1 のタンパク質レベルは DR ラットと同様であったが、高食塩負荷によって影響を受けた。DS ラットでは、高食塩負荷は

Table 1. Summary of Kinetic Constants for Na^+/K^+ -ATPase (NKA) and SGLT1

	K_m		V_{max}	
	NKA	SGLT1	NKA	SGLT1
DR-0.2	0.52±0.14	0.22±0.03	0.47±0.09	1.49±0.12
DR-8	0.82±0.34	0.20±0.04	0.38±0.12	1.55±0.10
DS-0.2	0.56±0.05	0.23±0.03	0.42±0.11	1.52±0.06
DS-8	2.24±0.38*	0.11±0.01*	0.51±0.15	2.56±0.19*

Value are means \pm S.E. from three independent measurements. The K_m and V_{max} values for ATP and AMG were estimated from Lineweaver-Burk plots. The K_m is presented as mM for NKA and SGLT1, whereas the V_{max} is presented as $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ for NKA, and $\text{nmol}/\text{mg}/\text{min}$ for SGLT1. * $p < 0.05$, statistically significant differences among DR-0.2 (normotensive Dahl salt-resistant rats normally loaded by salt (0.2% NaCl)), DR-8 (normotensive Dahl salt-resistant rats highly loaded by salt (8% NaCl)), DS-0.2 (hypertensive Dahl salt-sensitive rats normally loaded by salt (0.2% NaCl)), and DS-8 (hypertensive Dahl salt-sensitive rats highly loaded by salt (8% NaCl)).

NKA を低下させ、そしてこの低下は ATP に対する見掛けのミカエリス定数 (K_m) の減少と一致していたが、最大速度 (V_{max}) の変化と一致しなかった (Table 1)。対照的に、高食塩負荷は DS ラット SGLT1 活性を上昇させた。NKA のリン酸化チロシン残基のタンパク質レベルは DS ラットの高食塩負荷によって減少した。リン酸化セリン量は DR ラットの高食塩負荷によって影響されなかったが、DS ラットでは検出できなかった。他方、SGLT1 のリン酸化セリン残基は高食塩負荷によって増加した。これらの結果から、高食塩負荷が DS ラットでプロテインキナーゼレベルを変化させ、また NKA 及び SGLT1 の調節はタンパク質リン酸化を介して行われていると結論した。

肥満性 Zucker ラットの NKA に及ぼすドーパミンの阻害効果の低下は G タンパク質との連携が失われることによるという仮説をたてて、Banday ら¹³⁾ は Sprague-Dawley ラット腎近位尿細管の一次細胞を用いて実験している。D1 受容体作動薬の SKF-38393 は未処理細胞では NKA 活性を阻害したが、インスリン前処理細胞での酵素活性を阻害しなかった。D1 受容体リガンド [^3H]SCH-23390 結合による原形質膜 D1 受容体は、D1 受容体タンパク質存在量と同様に、未処理細胞と比較してインスリン前処理細胞で有意に低下した。SKF-38393 は正常細胞膜での [^{35}S]GTP γS 結合の有意な亢進をした。これは D1 受容体-G タンパク質複合体が無傷であることを推測させた。これらの結果から、細胞のイン

スリンに対する慢性的暴露は D1 受容体存在量と G タンパク質会合ともに低下をすると推測された。

ヒト α -adducin 多型は腎 Na 調節異常や高血圧と相関している。高血圧性 adducin 表現型を保持する Milan ラットは高い腎 NKA 活性を持っていて、それらの NKA 分子は正常血圧系統のラットと同様にドーパミンに応答してエンドサイトーシスを起こさなかった。¹⁴⁾ Adaptin- μ 2 サブユニットの高リン酸化のために、ドーパミンは adaptin と NKA の相互作用を促進しない。正常腎上皮細胞への高血圧症ラットあるいはヒト高血圧性変異体の adducin の発現は、NKA 活性、adaptin- μ 2 サブユニット高リン酸化、また NKA エンドサイトーシス障害を持った高血圧性表現型を形成する。このように、高血圧症の定型である腎 NKA 活性増加や Na 再吸収変化は、Na 利尿シグナルに応答した腎 NKA エンドサイトーシスの動的制御を障害する adducin 変異体に起因する可能性がある。

1-2. Na⁺ 輸送タンパク質 Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体の特徴 肥厚上行脚の頂端膜に局在している Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体 (NKCC2) はバソプレシンに反応して尿濃度を駆動する交流分配増加に重要な役割を演じている (Fig. 1)。⁷⁾ 管腔側での NKCC2 を介した Na⁺-Cl⁻ 吸収は肥厚上行脚の低い水透過性と髄質緊張性を増加するための交流分配機構と協同して、集合管での水吸収を促進している。バソプレシン/cAMP により NKCC2 共輸送体は膜表面に移送されると推測されていて、肥厚上行脚原形質膜やサブアピカル (頂端側) 小胞に豊富に発現されている。

1-2-1. Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体の調節とスーパーオキシド スーパーオキシド O₂⁻ は NKCC2 活性を亢進させて肥厚上行脚での Na⁺-Cl⁻ 吸収を促進する。Silva ら¹⁵⁾ は O₂⁻ が PKC を活性化することで Na⁺-Cl⁻ 吸収を促進するという仮説をたてて、1) PKC 阻害剤の存在あるいは非存在下での Cl⁻ 吸収、2) 総 PKC 活性、3) 特異 PKC アイソフォームの活性化に及ぼす O₂⁻ の影響を調べた。分離・灌流の髄質肥厚上行脚はキサンチン酸化酵素とヒポキサンチンによって産生される O₂⁻ に暴露した。O₂⁻ は 42% まで Cl⁻ 吸収を増加した。PKC 阻害剤のスタウロsporin 処理後 O₂⁻ は Cl⁻ 吸収を亢進しなかった。肥厚上行脚の懸濁液では、O₂⁻ は

総 PKC 活性を 33% まで上昇し、また PKC- α 及び PKC- δ 活性をそれぞれ 1.75-及び 0.35-倍上昇させた。PKC- α/β - 選択性阻害剤 Gö976 は分離・灌流の髄質肥厚上行脚によって Cl⁻ 吸収を刺激する O₂⁻ 能力を阻害した。これらの結果から、PKC- α は肥厚上行脚の O₂⁻ 刺激 NaCl 吸収のために要求されていると結論した。

酸化ストレス応答キナーゼ (OSR) 1 や Ste (Sterile: 不妊に由来) 20 関連プロリン-, アラニン-リッチキナーゼ (SPAK) は NKCC2 に結合した Ste20p-関連プロテインキナーゼである。Anselmo ら¹⁶⁾ は非リジン (K) プロテインキナーゼ (WNK) 1 が OSR1, SPAK 及び NKCC 活性を調節するという知見を提示している。OSR1 は細胞内では WNK1 との複合体で存在し、*in vitro* で組換え型 WNK1 によって活性化され、そして細胞では WNK1-依存様式でリン酸化される。低分子型干渉 RNA を用いた Hela 細胞からの WNK1 欠失は OSR1 活性を低下させる。加えて、WNK1 あるいは OSR1 のいずれかの欠失は NKCC 活性を低下させ、これは NKCC 機能に WNK1 及び OSR1 の両者が必要であることを示唆している。OSR1 及び SPAK は容量調節や哺乳動物の血圧恒常性に寄与する過程で WNK1 及び NKCC と結び付いているようである。

NKCC ファミリーの短期間制御はリン酸化/脱リン酸化によって起こる。Gimenez ら¹⁷⁾ はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた NKCC2 の輸送活性は高張によって亢進された。トレオニン T99, T104, 及び T117 は高張では NKCC2 の活性化に対応した制御ドメインを形成していることを証明した: トレオニン 3 残基とも全高張応答を得るために必要である。等張及び高張条件下では、NKCC2 はトレオニン制御ドメインのリン酸化しない場合、活性の 50% を保持している。ペプチド部分の選択的欠失により、プロリン-アラニンリッチの Ste-20-関連キナーゼ結合モチーフを含むトレオニン制御ドメインの NKCC2 上流の N 末端細胞質ドメインはあまり役割をしていないことが解った。NKCC2 に NKCC1 の最初の 104 アミノ酸残基を包むキメラ NKCC は、必然的に NKCC2 と同様な挙動を示した。

齧歯類ブメタナイド感受性 NKCC2 遺伝子の長鎖 C 末端アイソフォーム (L-mBSC1) は NKCC2 を

コードし、一方、短鎖 C 末端アイソフォーム (S-mBSC1) は cAMP によって阻害され、NKCC2 活性にドミナントネガティブ効果を現わす。Maede ら¹⁸⁾はアフリカツメガエル卵母細胞で細胞表面に発現した L-BSC1 アイソフォームの性状を調べるために促進性 GFP 融合 L-mBSC1-EGFP を作製している。L-mBSC1-EGFP cRNA 注射した卵母細胞では蛍光膜色素 FM 4-64 と共分布した原形質膜と相関する蛍光が確認された。L-mBSC1-EGFP 卵母細胞の蛍光強度は cAMP で変化しなかった。対照的に、L-mBSC1-EGFP 蛍光強度は S-mBSC1 の共発現により用量依存的に低下した。S-mBSC1 の阻害効果は cAMP でなくなった。エキソサイトーシス阻害剤のコルヒチンは L-mBSC1-EGFP/S-mBSC1- 結合卵母細胞に及ぼす cAMP 効果を阻害した。L-mBSC1 細胞表面発現のすべての変化はブメタナイド感受性 ⁸⁶Rb 取り込みの変化と相関していた。

1-2-2. Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体と Bartter 症候群

腎特異的 NKCC2 は SLC12 遺伝子ファミリーに属している；ループ利尿標的や 1 型 Bartter 症候群の原因である。NKCC2 配列は 2 つの推定 N-グリコシル化部位を含んでいるので、NKCC2 の機能的性質上のグリコシル化の役割を評価した。¹⁹⁾ N-グリコシル化部位の 1 つ (N442Q 又は N452Q) 又は両者 (N442, 452Q) は部位-指向性変異によって除かれた。野生型 NKCC2 や変異クローンはアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて、そして ⁸⁶Rb 流入、ウェスタンブロットング及び共焦点顕微鏡によって解析した。野生型 NKCC2-注射卵母細胞での tunicamycin によるグリコシル化の阻害は NKCC2 活性の 80% まで低下した。注射した卵母細胞のイムノブロット法は NKCC2 のグリコシル化が N442, 452Q-注射した卵母細胞では完全に妨げられることを示した。機能活性は N442Q-及び N452Q-注射した卵母細胞では 50% まで低下し、また N442, 452Q で注射した卵母細胞では 80% まで低下した。一方、野生型あるいは GFP 標識 NKCC2 クローン促進した変異体を注射した卵母細胞の共焦点顕微鏡は表面蛍光強度が単一変異体では約 20% また二重変異体では 50% 減少することを示した。イオン輸送動力学的解析は N442Q 及び N442, 452Q による陽イオン親和性には変化がなかったが、Cl⁻ 親和性の小さい上昇を示した。しかしながら、ブメタナイド

親和性のわずかな減少が観察された。これらのデータは NKCC2 がグリコシル化されることを実証し、またグリコシル化の防止が原形質膜への挿入の影響による機能的発現また共輸送体の内因的活性を低下すると推測した。

Giménez ら²⁰⁾はアフリカツメガエル卵母細胞に NKCC2B 変異体を発現させて、A-又は F-変異体に変える突然変異誘発研究法による変異特異的親和性の相異等の実験をした。スプライス領域は第 2 膜貫通ドメイン (TM2) 及び TM2 と TM3 を結ぶ推定細胞内ループ (ICL1) を含んでいる。変異体 B は 3 つの TM2 残基による影響の半分と 3 つの ICL1 残基の半分の 6 残基置換した F 変異体に機能的に変化させることが判明した。ICL1 残基との関連は ICL1 の領域が膜固定ドメイン部分に存在する可能性が強く示唆された。6 残基の変化は B-から A-変異体への比較的小さい機能的変化を現すのに十分であった：TM2 の 3 残基は B-から F-変異体の変化に関係する残基のうち 2 つに主に応答していた。中等度 Bartter 症候群の B-変異体は不活性な共輸送体を反映していることが判明した。これらの結果から、それらは TM2 後の内向きに曲ったループが塩素結合や移送ドメインに寄与するモデルを形成していると推測された。

1-3. 腎 Na⁺/Cl⁻ 共輸送体の役割とナトリウム輸送 Na⁺/Cl⁻ 共輸送体 (NCC) は遠位曲尿細管に局在していて原尿 Na⁺-Cl⁻ の 5-10% を再吸収して、チアザイド系利尿剤に感受性である。また WNK1 や WNK4 は NCC 活性調節にとって重要な役割を果たしている。すなわち、WNK1 は NCC 活性を上昇させ、一方 WNK4 は NCC 活性を低下させる。²¹⁾ Gitelman 症候群は SLC12 共輸送体 NCC の機能欠損変異による低 K 血症と代謝性アルカローシスを持ち低血圧症を示す常染色体欠損症の 1 つである。また、偽低アルドステロン症 II (PHA II) 表現型はチアザイド利尿剤の投与により正常に回復する。

1-3-1. Na⁺/Cl⁻ 共輸送体と Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体の比較 齧歯類 NKCC2 遺伝子 (SLC12A1) は、ブメタナイド感受性 (BSC1-9/NKCC2) をコードする 3 種は長鎖 C 末端ドメインを特徴とし、一方、mBSC1-A4, B4 あるいは F4 は短鎖 C 末端ドメインを持っている。Plata ら²²⁾はアフリカツメガエ

ル卵母細胞に mBSC1-A4W を発現させて、その機能的性状を調べた。mBSC1-A4-を注射した卵母細胞は、正常浸透圧で対照の H₂O-注射したもの以上に有意な Na⁺ 取り込み上昇を示さなかった。mBSC1-4 タンパク質の大部分は卵母細胞の細胞質に存在していて、原形質膜には存在しなかった。対照的に、mBSC1-4 卵母細胞を低張にすると、Na⁺ 取り込みは有意に上昇したが、⁸⁶Rb 取り込み上昇しなかった。Na⁺ 取り込み上昇は Cl⁻ 依存的で、フロセミド及び cAMP 感受性であるが、K⁺ 非依存的であった。Na⁺ 取り込みは浸透圧を低下させると増加した。低張条件下で mBSC1-A4 タンパク質は原形質膜に発現していた。これらの結果から、SLC12A1 遺伝子の mBSC1-A4 アイソフォームは低張活性化で、cAMP 及びフロセミド感受性 Na⁺/Cl⁻ 共輸送体 (NCC) を発現していることを示唆している。こうした結果から、BSC1 遺伝子の選択的スプライシングは肥厚上行脚細胞の NCC から NKCC2 へのスイッチングを可能にするという分子機構を提出できたとしている。

ヒトの腎変異 NCC (rNCC) はチアザイド型利尿剤の治療標的であり、血圧調節に組み込まれている。細胞 Cl⁻ 流入を介する Na⁺ 駆動共輸送体 (NCC 及び NKCC1/2) はリン酸化によって活性化される。N 末端ドメインの 3 個のトレオニン残基の集合は、細胞 Cl⁻、細胞容量、バソプレシン及び WNK/STE-20 キナーゼによる NKCC1/2 の調節に係わっている。rNCC 制御機構についてアフリカツメガエル卵母細胞に rNCC をヘテロ発現させて調べている。²³⁾ 細胞内塩素涸渇をすると rNCC 活性は 3 倍まで増加した。この枯渇効果は相乗的で用量依存的であった。促進的 GFP-標識付 rNCC の共焦点顕微鏡解析では塩素涸渇により rNCC 細胞表面発現を変化させなかった。rNCC の N 末端ドメインの Thr⁵³ 及び Thr⁵⁸ のリン酸化を増加した。セリン残基 Ser⁷¹ とトレオニン除去は細胞内塩素涸渇に対する rNCC 応答を完全に止めた。このような結果から、rNCC は N 末端ドメインリン酸化を含む機構によって活性化されると結論した。

1-3-2. Na⁺/Cl⁻ 共輸送体のキナーゼドメインと利尿剤結合ドメイン WNK キナーゼは哺乳動物遠位ネフロンに高発現されている。WNK1 あるいは WNK4 の変異は高 K 血性高血圧症 (FHht) を

惹起する。Yang ら²⁴⁾ は、WNK1 と WNK4 のイオン輸送の制御機構を研究している。WNK1 は NCC 活性に及ぼす WNK4 を抑制し、WNK4 のキナーゼドメインを含むタンパク質複合体と相関している。キナーゼ活性を失った WNK1 は WNK4 と相関しているが、それは WNK4-介在 NCC 阻害を抑制しない。しかしながら、WNK1 キナーゼドメインのみでは WNK4 効果を阻害するには十分ではない。WNK4 の C 末端 222 アミノ酸は NCC を阻害するのに十分であるが、この断片は WNK1 によって阻害されない。事実、WNK1 阻害は WNK1 結合領域に無傷 WNK4 キナーゼを必要とする。これらの結果は次のようである：1) WNK4 の C 末端は NCC 抑制を調節している。2) WNK1 キナーゼドメインは WNK4 キナーゼドメインと相互作用していて、そして 3) WNK4 の WNK1 阻害は WNK1 触媒活性と無傷な WNK1 タンパク質に依存的である。

チアザイド感受性 NCC は遠位尿管管塩類再吸収の主要経路である。Moreno ら²⁵⁾ は、グリコシル化状態、N 末端と C 末端ドメイン、細胞外グリコシル化ループ並びに、Na⁺、Cl⁻ 及び metolazone の親和性に対する膜貫通分節の役割を解明するために、ラットとヒラメの NCC キメラと変異 cDNAs を構築し、アフリカツメガエル卵母細胞でヘテロ発現系として調べている。ヒラメ NCC のグリコシル化部位の除去は metolazone に対する共輸送体の親和性に影響しなかった。ラット及びヒラメ NCC 間の N 末端と C 末端ドメイン、グリコシル化部位あるいは全細胞外グリコシル化ループ交換はイオンや metolazone に対する親和性に影響を与えなかった。対照的に、ラット及びヒラメ NCC 間の膜貫通領域の置換は塩化物に対する親和性変化領域が膜貫通 1-7 領域内に、チアザイドに対しては膜貫通 8-12 の領域に分布していた。この両分節は Na⁺ 親和性に係わっていると推測された。

1-3-3. Gitelman 症候群と Na⁺/Cl⁻ 共輸送体

Gitelman 症候群はチアザイド感受性 NCC 変異に起因した食塩消費と低カリウム血症の常染色体退行性疾患の一種である。Gitelman 症候群の病因を研究するために、8 つの疾病変異体をマウス NCC に導入し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。²⁶⁾ 野生型発現卵母細胞への Na⁺ 取り込みは、正常卵母細胞の取り込みよりも 7 倍以上も増加し

た。変異型発現卵母細胞の Na^+ 取り込みは正常卵母細胞と変らなかった。ヒドロクロロチアザイドは野生型発現卵母細胞による Na^+ 取り込みを正常値まで低下させたが、変異型発現卵母細胞では影響がなかった。野生型発現卵母細胞では輸送体タンパク質のグリコシル化型 (125 kDa) と非グリコシル型 (110 kDa) が検出された。変異型発現卵母細胞は非グリコシルタンパク質のみを示し、タンパク質プロセッシングによる分解を示唆した。輸送体タンパク質の抗体による免疫染色は野生型発現卵母細胞では非常に濃い膜染色を示した。mNCC_{R948X} 発現卵母細胞では膜染色は示さなかった：事実、拡散細胞質染色は明瞭であった。これらの結果は Gitelman 症候群を引き起こす数種の変異体 NCC が膜移送されないことから、小胞体機能に影響を及ぼしている可能性があるとしている。

1-4. 腎上皮 Na^+ チャンネルの特徴 上皮ナトリウムチャンネル (ENaC)/degenerin 遺伝子ファミリーは 1990 年代の初頭に発見された新しいイオンチャンネルの代表である。²⁷⁾ ENaC の調節は数レベルで起る。ENaC の主なホルモン調節因子、アルドステロンは ENaC-介在する Na 輸送を調節する鉍質コルチコイド受容体を通じて作用し、またかなりの注目が、この応答の初期段階の成分を明らかにすることに焦点が集まってきている。SGK (serum and glucocorticoid kinase) 1 及び GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper protein) の 2 つの遺伝子が ENaC の調節に係わっていて、SGK1 と GILZ は ENaC をアップレギュレーションすることが明らかになってきている。²⁸⁾

1-4-1. Na^+ チャンネルのトラフィッキングと情報伝達経路 上皮 Na^+ チャンネル (ENaC) は腎集合管に分布し、上皮細胞横断 Na^+ 輸送経路である (Fig. 1)。⁷⁾ 上皮細胞表面への ENaC のトラフィッキング機構を介して Na^+ 輸送が制御されている。Snyder ら²⁹⁾ は ENaC のトラフィッキングの多段階機構を概説している：細胞表面へのチャンネルの移送は ENaC の合成やエキソサイトーシスを上昇させるアルドステロンやバソプレシンによって制御されている。エンドサイトーシスと分解は α , β 及び γ ENaC の C 末端に位置する配列 (PPPXYXXL), いわゆる PY モチーフによって調節されている。この配列はエンドサイトーシスモチーフとして機能し、また

分解のために ENaC を標的とする E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ Nedd4-2 の結合部位として機能している (Fig. 3)。²⁹⁾ このモチーフの欠落あるいは破壊変異体は細胞表面でチャンネル蓄積を引き起こし、Liddle 症候群を惹起する。Nedd4-2 はアルドステロンやバソプレシンによる ENaC 制御にとって主要部であり、両ホルモンは Nedd4-2 のリン酸化を誘導する。こうして、アルドステロンとバソプレシンは細胞表面へ、また細胞表面からの ENaC のトラフィッキングの変化によって Na 輸送を制御している。

ヒト ENaC は遠位ネフロンで Na 取り込みの律速段階を担っている。細胞膜の活性型 Na チャンネル数増加による Liddle 症候群では、 β ENaC あるいは γ ENaC サブユニット遺伝子はユビキチンタンパク質リガーゼの Nedd4 ファミリーに対する結合部位

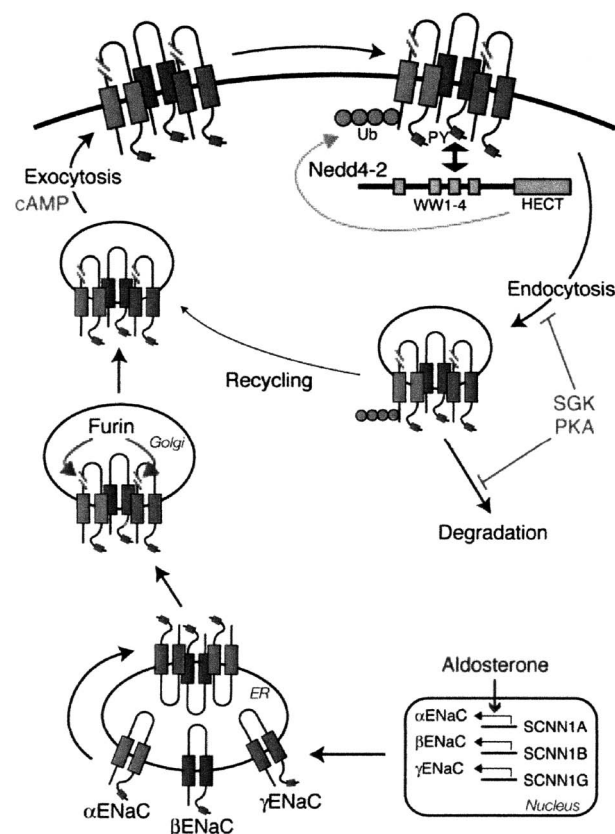


Fig. 3. Model of Epithelial Na^+ Channel (ENaC) Trafficking
Aldosterone stimulates transcription of α -ENaC (in kidney collecting duct), resulting in formation of functional channel complexes, which facilitates ENaC release from the ER. In the Golgi, some ENaC channels are proteolytically cleaved in the extracellular domain of α - and γ -ENaC, resulting in channel activation. At the cell surface, Nedd4-2 binds to ENaC, increasing endocytosis and degradation. This step likely involves ubiquitination of N-terminal lysines in α - and γ -ENaC. SGK and PKA inhibit endocytosis and degradation by phosphorylating Nedd4-2, which decreases Nedd4-2 binding to ENaC.²⁹⁾

を破壊する変異を持っている。Wiemuth ら³⁰⁾は細胞表面に局在する ENaC サブユニットが多ユビキチン化され、また Nedd4-2 がこのユビキチン化を調節するという知見を提供している。ENaC が AP-2 クラスリンアダプター $\mu 2$ サブユニットと相関していることを確認した。これらの結果は、ユビキチンやクラスリンアダプター結合部位が細胞表面から ENaC を移送のために協奏的に作用していることを示している。

低分子量 GTPase のスーパーファミリーの K-Ras と RhoA は ENaC を活性化する。K-Ras は PI3K 及びチャンネルと直接相互作用する PIP₃ の産生を含む情報伝達経路を介して ENaC を活性化する。Pochynyuk ら³¹⁾は RhoA と K-Ras の作用情報伝達経路を通じた ENaC の最終的な活性化機構を報告している。RhoA 情報伝達の活性化によって ENaC の膜レベルを急速に増加する。この過程は機能的 ENaC 電流を劇的に増加して、厳密に制御されている。RhoA は下流作動因子の Rho キナーゼや PIP-キナーゼを介して ENaC に情報伝達している。PIP-キナーゼ活性化による PIP₂ は原形質膜への ENaC を含む小胞の機能調節をしている可能性がある。

1-4-2. Na⁺ チャンネルの発現とステロイドホルモン ヒトでは血圧は思春期以降、女性よりも男性で上昇する。Quinkler ら³²⁾はヒトの腎やヒト腎近位尿細管細胞株 HKC-8 で ENaC α -サブユニット (α ENaC) のアンドロゲン依存性制御を研究している。アンドロゲン受容体 (AR) は雄性腎と HKC-8 に発現させた。 α ENaC mRNA 発現は HKC-8 のテストステロン処理後 2-3 倍に増加した。テストステロンによる誘導は AR 拮抗薬 flutamide 添加後完全に阻害された。 α ENaC プロモーター配列は転写開始部位から 140 塩基上流に局在する推定 AR 応答要素 (ARE) として同定された。HKC-8 細胞トランスフェクションはテストステロンが ARE 介在遺伝子発現を直接アップレギュレーションした。 *In vivo* で、睪丸摘出ラットのテストステロン処理は腎 α ENaC mRNA 発現の増加をもたらした。テストステロン処理マウス集合管細胞株 M-1 では、アミロライドが正常細胞よりも、強力な短絡電流低下を引き起こした。これらの結果は α ENaC 発現が *in vivo* 及び *in vitro* でアンドロゲンによって直接制御

され、血圧の性差を説明する有力な機構である。

WNK4 変異は PHA II を引き起こし、Na⁺-Cl⁻ 再吸収増加と K⁺ 分泌傷害を特徴としている。Ring ら³³⁾は ENaC と WNK4 の機能状態を調べている。WNK4 がアルドステロン情報伝達調節因子である SGK1 によってリン酸化された。野生型 WNK4 は ENaC や ROMK の活性を阻害する一方、SGK1 部位のリン酸化を模した WNK4 変異 (WNK_{S1169D}) は両チャンネルの阻害を軽減した。これらの効果は電気生理学的な腎 Na⁺ 再吸収増加と頂端膜 K 透過性増加のために、K⁺ 分泌が増加する可能性を示した。アルドステロン情報伝達の下流を誘導する事実は高 K 血症とアルドステロンに対する生理学的応答で WNK4 と係わることが証明された。

1-4-3. Liddle 症候群と Na⁺ チャンネル ENaC の細胞表面発現を低下させる E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ Nedd4-2 は Na 再吸収を制御している。この制御因子欠損により Liddle 症候群を引き起こす。Zhou³⁴⁾ らは Liddle 症候群と Nedd4-2 及び ENaC のユビキチン化の係わりを調べている。Nedd4-2 過剰発現はユビキチン化を増加させたが、一方 Nedd4-2 サイレンシングはユビキチン化を減少させた。Nedd4-2 は ENaC のモノ/オリゴユビキチン化と多ユビキチン化型の両者を減少させたが、モノユビキチン化は ENaC 表面発現を低下させ、また ENaC 電流を低下させた。ユビキチン化は Liddle 症候群と関連した ENaC 変異や Nedd4-2 触媒性 HECT ドメイン変異によって破壊された。これらの結果から、Nedd4-2 は細胞表面で ENaC に結合して、ユビキチン化し、そして分解では細胞表面で ENaC を標的にし、このようにして上皮 Na⁺ 輸送を減少させるというモデルを推測している。

2. 腎マグネシウムの再吸収と調節

近位尿細管や傍糸球体ネフロンへの Mg²⁺ 送達に及ぼす急性代謝性また呼吸性アシドーシスや急性代謝性アルカローシスの影響について、ラットのマイクロバンクチャーによって試験されている。その結果、急性代謝性又は呼吸性アシドーシスは有意な影響を及ぼさないが、急性代謝性アルカローシスは傍糸球体ネフロンの Mg²⁺ 再吸収を促進することが推測された。³⁵⁾ 管腔から溶液への Mg²⁺ 輸送は Na⁺ と Ca²⁺ の部分吸収よりも低く、したがって、尿管液 Mg²⁺ 濃度は水吸収とともに増加したとしてい

る。³⁶⁾ 尿細管 Mg^{2+} 濃度ゼロの溶液で灌流した場合、溶液から管腔への Mg^{2+} 移動は小さく且つ経上皮 Mg^{2+} 濃度勾配に依存的である。

2-1. 腎マグネシウム輸送とナトリウムの関係
MDCK のアンジオテンシン II (Ang II) 処理は細胞質遊離 Mg ($[Mg^{2+}]_i$) の減少を伴った細胞質遊離 Ca ($[Ca^{2+}]_i$) と Na ($[Na^+]_i$) の増加を引起す。この研究³⁷⁾ では、Ang II 誘導 $[Mg^{2+}]_i$ 減少は $[Ca^{2+}]_i$ に非依存的であるが、細胞外 Na^+ に依存的である。 $[Mg^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]_i$ と $[Na^+]_i$ は選択的蛍光試薬 mag-fura-2AM, fura-2AM 及びベンゾフランイソフタレート (アセトキシメチルエステル) をそれぞれ用いて、蛍光デジタルイメージングによって Ang II 活性化 MDCK 細胞で測定した。Ang II は用量依存的に $[Mg^{2+}]_i$ を減少させ、また $[Na^+]_i$ を増加させた。これらの効果は irbesartan (選択的 AT_1 受容体阻害剤) で阻害されたが、PD12319 (選択的 AT_2 受容体阻害剤) で阻害されなかった。イミプラミンやキニジン (推定 Na^+/Mg^{2+} -交換体の阻害剤) また細胞外 Na^+ 除去は Ang II 介在 $[Mg^{2+}]_i$ 効果を失った。タプシガルジン (小胞性 Ca -ATPase 阻害剤) 前処理細胞では、Ang II-刺激 $[Ca^{2+}]_i$ 一過性発生は減少し ($p < 0.01$)、一方、作動薬誘導 $[Mg^{2+}]_i$ 応答は不変化であった。1,2-ビス (2-アミノフェノキシ) エタン- N,N,N',N' -四酢酸は Ang II 誘導 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を阻害したが、Ang II 誘導 $[Mg^{2+}]_i$ 応答には影響しなかった。ベンザミル、 Na^+/Ca^{2+} -交換体選択的阻害剤は $[Na^+]_i$ を阻害したが、 $[Mg^{2+}]_i$ 応答を阻害しなかった。これらの結果は MDCK 細胞では AT_1 受容体が $[Ca^{2+}]_i$ に直接関係しない Na^+ 依存性 Mg^{2+} 輸送体を介した $[Mg^{2+}]_i$ を調節することを証明した。これらの結果は、急速な $[Mg^{2+}]_i$ 調節が単なる Ca^{2+} による細胞内緩衝部位からの Mg^{2+} の再分布の結果ではなく、腎由来細胞における Na^+ 依存性、ホルモン制御 Mg^{2+} 輸送体の存在を意味する知見である。

推定 Na^+/Mg^{2+} -交換体は種々な哺乳動物細胞の $[Mg^{2+}]_i$ を制御している可能性が示唆されているが、現在、 Na^+/Mg^{2+} -交換体の分子的性状の解明は進展していない。そこで、筆者ら³⁸⁾ は腎上皮 NRK-52E 細胞の Na^+ 依存性 Mg^{2+} 流出の調節機構を研究した。細胞外溶液中の Mg^{2+} 除去は 5 mM Mg^{2+} -負荷細胞では Na^+ 依存性 $[Mg^{2+}]_i$ 減少を誘

導したが、対照細胞では起こらなかった (Fig. 4)。アミロライドは用量依存的に $[Mg^{2+}]_i$ 減少を阻害したが、一方 Na^+ 濃度を上昇させた。カルホスチン C ($1 \mu M$)、PKC 阻害剤、またゲニステイン ($10 \mu M$)、チロシンキナーゼ阻害剤は $[Mg^{2+}]_i$ 減少を阻害した。 $[Mg^{2+}]_i$ 減少は細胞内 NO と cGMP 量の上昇と相関して起こった。NO 供与体の (*E*)-4-メチル-2-[(*E*)-ヒドロキシミノ]-5-ニトロ-6-メトキシ-3-ヘキシミド (0.1 mM)、また膜透過性 cGMP 同族体の 8-Br-c GMP (0.1 mM) は $[Mg^{2+}]_i$ 減少を加速した。対照的に、NO 拮抗的阻害剤の L-NMMA (0.1 mM)、また NO-感受性グアニレートシクラーゼ阻害剤の ODQ ($10 \mu M$) は $[Mg^{2+}]_i$ 減少を有意に阻害した (Fig. 5)。これらの結果は、

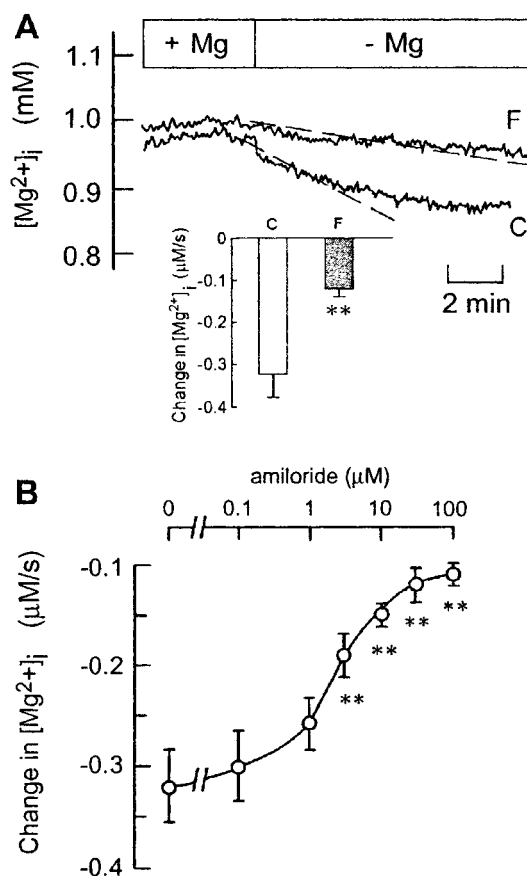


Fig. 4. Removal of Extracellular Mg^{2+} Induces Na^+ -Dependent $[Mg^{2+}]_i$ Decrease

(A) Typical traces of $[Mg^{2+}]_i$ change in NRK-52E cells. The cells were perfused with Mg^{2+} -loading solution ($+Mg^{2+}$), and then with Mg^{2+} -free solution ($-Mg^{2+}$) in the presence (C) and absence (F) of Na^+ . Inset: the change in $[Mg^{2+}]_i$ with time was estimated in the first 200 s following perfusion of Mg^{2+} -free (\square) or Na^+/Mg^{2+} -free solutions (\blacksquare), ** significantly different from the value of Na^+ -containing solution ($p < 0.01$). (B) Amiloride was preincubated with each concentration for 5 min before measurements, ** significantly different from the value in the absence of amiloride ($p < 0.01$).

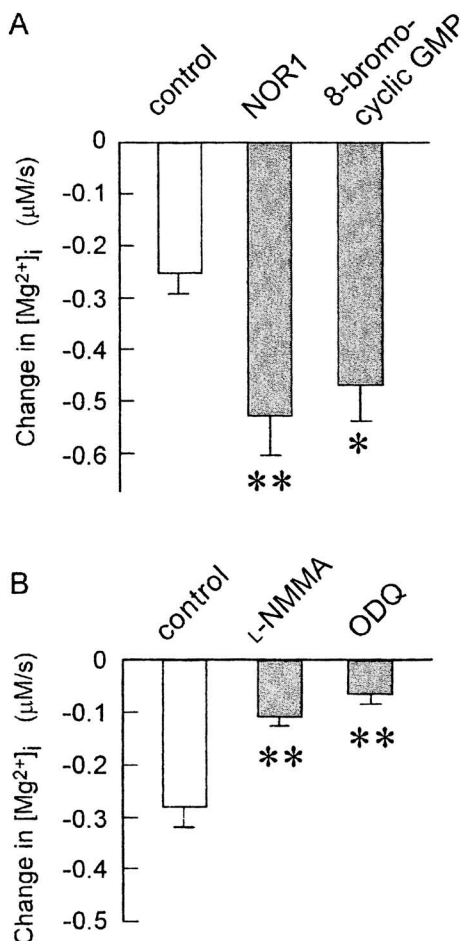


Fig. 5. NO and Cyclic GMP Accelerate $[Mg^{2+}]_i$ Decrease (A) NOR1 (0.1 mM) and 8-bromo-cyclic GMP (0.1 mM) were added 3 min before the perfusion of Mg^{2+} -free solution. (B) L-NMMA (0.1 mM) and ODQ (10 μM) were preincubated for 30 min ($n=6-8$), * and ** significantly different from the control value ($p<0.05$ and <0.01 , respectively).

細胞外 Mg^{2+} 濃度の減少が Na^+ 依存性 Mg^{2+} 流出のアップレギュレーションを導く NO や cGMP の産生を誘導することを示唆している。

腎尿細管細胞の $[Mg^{2+}]_i$ の調節機構を研究するために、Watanabe ら³⁹⁾は非常に高い細胞外 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_o > 100$ mM: 101Mg-耐性細胞) の培地で生育できるマウス腎皮質尿細管細胞の変異株を確立した。 $[Mg^{2+}]_i$ は野生型及び耐性細胞で蛍光指示薬 furaptra (mag-fura 2) を用いて測定した。101Mg-耐性細胞の $[Mg^{2+}]_i$ 平均レベルは 51 mM あるいは 1 mM $[Mg^{2+}]_o$ のいずれかで野生型細胞のそれよりも低く維持されていた。 $[Mg^{2+}]_o$ が 51 mM から 1 mM に低下させると、 $[Mg^{2+}]_i$ の減少は野生型細胞よりも 101Mg-耐性細胞で有意に速かった。101Mg-耐性細胞と野生型細胞のこれらの相異

は細胞外 Na^+ の非存在あるいはイミピラミンの存在で消失した。 Na^+ 依存性 Mg^{2+} -輸送活性は 101Mg-耐性細胞で促進されると結論した。 Mg^{2+} 排出の促進は $[Mg^{2+}]_i$ の増加を比較的高いレベルで防止され得るし、また Mg^{2+} 耐性に対して応答し得る。

このように、この Na^+/Mg^{2+} -交換体タンパク質の単離またクローニングはいまだ成功していないのが現状であるが、恐らく側基底膜に存在しているものと推測されている。

2-2. 腎マグネシウム輸送と melastatin- 関連 TRP カチオンチャンネル Mg^{2+} 動態の重要な役割にも係わらず、経上皮輸送を介した正確な機構は不明のままである。過去 2, 3 年にうちに、 Mg^{2+} 動態の先天性異常の遺伝子的解明が進み、腎上皮 Mg^{2+} 輸送に、例えば肥厚上行脚の細胞間隙 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 再吸収の鍵分子のパラセリン-1 (claudin-16) あるいは遠位曲尿細管の NKA の γ -サブユニットの予期しない分子が既に既知物質として数種のタンパク質が明らかになっている。Konrad ら⁴⁰⁾は腎 Mg^{2+} 輸送に関する総説を発表し、一過性受容体電位 (TRP) 遺伝子ファミリーのイオンチャンネルである TRPM (melastatin- 関連 TRP [transient receptor potential, 一過性受容体電位] カチオンチャンネル) 6 に焦点を当てて研究している。これが変異した場合に、続発性低カルシウム血症を伴う原発性低マグネシウム血症でみられる小腸 Mg^{2+} 吸収や腎 Mg^{2+} 保持の合併障害を引き起こすとしている。

細胞性 Mg^{2+} 輸送に直接関係したタンパク質の分子同定は最近の一連の研究により、生体 Mg^{2+} 恒常性にとって一過性受容体電位 (TRP) ファミリーの 2 種の重要な役割が解明されるまで未知のままであった。TRPM6 及び TRPM7 はカチオン選択性及び活性機構と同様にドメイン構造の有意な多様性を示す TRP チャンネル 8 種の melastatin- 関連 TRPM サブファミリーに属している。⁴¹⁾ 両タンパク質は chanzymes (channels plus enzymes) と呼ばれてきた C-末端に異型キナーゼドメインのユニークな特徴を形成している。電気生理学的及び生化学的分析により、TRPM7 の細胞 Mg^{2+} 恒常性にとって重要な役割が同定され、一方、上皮 Mg^{2+} 輸送の TRPM6 の重要な役割は、続発性低カルシウム血症あるいは HSH を有する原発性低マグネシウム血症

と呼ばれる重度遺伝性低マグネシウム血症患者の機能失調変異の発見により明らかになった。

哺乳動物の Mg^{2+} 恒常性は腸での Mg^{2+} 吸収と腎での Mg^{2+} 排泄の平衡に依存しているが、これらの器官の Mg^{2+} 経上皮の輸送に関連するタンパク質の分子的性状についてはあまり知られていない。最近、カチオンチャネルの一過性電位受容体ファミリーの TRPM6 変異を有する患者では、腎及び／あるいは腸障害による Mg^{2+} 動態の結果として、続発性低カルシウム血症を伴う低マグネシウム血症 (HSH) を患うことが示された。⁴²⁾ TRPM6 は腎遠位曲尿細管頂端膜や小腸刷子縁膜に特に局在していて、上皮では能動性 Mg^{2+} 再吸収や吸収と特に相関していることを示した。腎では、パルブアルブミンやカルバインジン-D_{28K} の 2 つの 2 価金属結合タンパク質が TRPM6 と共発現していて、遠位曲尿細管の細胞内 Mg^{2+} 緩衝液として機能している。HSH 患者では野生型 TRPM6 が異種発現しているが TRPM6 変異体は同定されていない。野生型 TRPM6 は細胞内 Mg^{2+} レベルによって厳密に調節される Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルを誘導する。TRPM6-誘導チャネルは強力な外向き電流を現わして、 Ca^{2+} よりも Mg^{2+} に対して 5 倍の親和性を持ち、そしてルテニウムレッドによって電位依存性様式で阻害される。これらの結果は TRPM6 が Mg^{2+} 吸収する上皮の頂端側 Mg^{2+} チャネルのすべてあるいは部分をなしていることを示唆している。

TRPM6 遺伝子変異を持つ患者の Mg^{2+} 再吸収障害は、上皮 Mg^{2+} 輸送の TRPM6 の重要な役割を強調している。全長 TRPM6 を分離する試みをしている間に、ヒト TRPM6 遺伝子は多重 mRNA アイソフォームをコードしていることが判明した。⁴³⁾ 全長 TRPM6 変異体は HEK293 細胞やアフリカツメガエル卵母細胞のヘテロな発現で細胞内に保持されることから、機能的なチャネル複合体を形成しなかった。しかしながら、TRPM6 は最も近接した同族体、 Mg^{2+} 透過性カチオンチャネル TRPM7 と特異的に相互作用して、細胞表面で機能的な TRPM6/TRPM7 複合体として集合をもたらす。S141L TRPM6 ミスセンス変異体の自然な存在は TRPM6 のオリゴ集合体を排除することから、ヒト疾病に対する細胞生物学的な説明を提供している。これらの

結果は TRPM6/TRPM7 ヘテロオリゴマー化が上皮 Mg^{2+} 吸収における TRPM6 の役割に重要な寄与をしていると推測される。

2-3. 腎マグネシウムの非経上皮細胞輸送と腎細胞密着結合 Mg^{2+} 恒常性の遺伝病は腎の Mg^{2+} 保持に主に影響する疾病である。 Mg^{2+} 動態に異常を持つ患者の遺伝学的研究から、上皮 Mg^{2+} 輸送に関して分子的解明がなされた。すなわち、それは密着結合 (tight junction) タンパク質パラセリン-1 (claudin-16) であり、ヘンレ係蹄の肥厚上行脚で両細胞接着部位、つまり密着結合に局在していて Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 再吸収の重要な主役として発見された。そして遠位曲尿細管での Mg^{2+} 再吸収にとって重要な成分であり、これは腎 NKA の γ サブユニットと同一成分として同定された。

Mg^{2+} 尿細管再吸収は密着結合タンパク質パラセリン-1 によって調節されている。それは遺伝子 *PCLN-1* (CLDN16) によってコードされていて、腎にもつばら発現している。尿細管 Mg^{2+} 補正は多くのホルモンや因子によって調節されている。この研究⁴⁴⁾ はヒト *PCLN-1* (*hPCLN-1*) の腎尿細管細胞の特異的発現にとって必須な調節機構を明らかにし、またパラセリン-1 遺伝子プロモーターに及ぼす Mg^{2+} 輸送調節因子の影響を探索することである。内因性パラセリン-1 mRNA 及びタンパク質は腎細胞株のオボサム腎 (OK), HEK293, 及び MDCK で検出されたが、繊維芽細胞株の NIH3T3 では検出されなかった。7 種の 5'-欠失産物以外に 7.5-Kb *hPCLN-1* の 5'-側の DNA 配列はルシフェラーゼのレポーターベクターにクローンされて、腎細胞と非腎細胞に一過性に遺伝子導入した。ルシフェラーゼ活性の最高レベルが 5'-側の 2.5-Kb 断片 (pJ2M) の遺伝子導入によってもたらされた。この活性は OK 細胞では最大であり、定位依存性であったが、NIH3T3 細胞では存在しなかった。 Mg^{2+} 除去は遺伝子導入 OK 細胞の pJ2M-誘導活性を有意に増加させ、一方 Mg 負荷は通常 Mg^{2+} 条件に比較してその活性を減少させた。塩基配列-1633 と -1703 の間に大きな機能的有意性領域 70-bp を結合していた。単一のペルオキシソーム増殖因子-応答要素 (PPRE) を含むこの 70-bp 分節の欠失、あるいは PPRE の変異はルシフェラーゼ活性を 60% 低下させた。1,25(OH)₂ ビタミン D による 70-bp 配

列刺激はルシフェラーゼ活性を 52%まで低下させた。PPRE 非存在下あるいは変異 PPRE 存在下では 1,25(OH)₂ビタミン D の効果は消失した。この研究で、70-bp DNA 領域内での PPRE は *hPCLN-1* プロモーターの細胞特異的な制御活性において重要な役割を演じている可能性がある」と結論している。また環境の Mg²⁺ 濃度と 1,25(OH)₂ ビタミン D が転写レベルで両細胞性パラセリン-1 介在 Mg²⁺ 輸送を調節している可能性がある。

高カルシウム血症と腎石灰沈着症を合併する家族性低マグネシウム症 (FHHNC) は密着結合 claudin-16 の変異によって引き起こされるヒトの疾患である。しかしながら、Mg 腎治療や FHHNC を引き起こす Mg 機能失調の根底にある分子機構は未知である。そこで、Hou ら⁴⁵⁾ は claudin-16 が肥厚上行脚の両細胞性カチオンの選択性維持に重要な役割を演じていることに着目した。そこで、RNA 干渉を用いて、claudin-16-欠損マウスモデルを作製した。Claudin-16 ノックアウトマウスは Mg や Ca の慢性的な腎消費を呈し、腎石灰沈着症に進展した。これらの結果から、claudin-16 は以前に提案されているような選択的 Mg²⁺/Ca²⁺ チャネルよりもむしろ非選択性両細胞カチオンチャネルを形成すると推測された。結論として、イオン恒常性維持に腎密着結合制御が中心的な重要性を担っていて、FHHNC の病因に対する解答を提供するものであるとしている。さらに、密着結合タンパク質は電解質異常の医薬品開発の大きな標的となり得るとしている。

3. 腎の糖再吸収と糖輸送体

糖輸送には促進拡散型糖輸送体の GLUTs とエネルギー依存型 Na⁺/糖-共輸送体の SGLTs がある。SGLT1 及び SGLT2 は腎の管腔側すなわち刷子縁膜に分布していて糖の再吸収の役割を担っている。また、SGLT3 は糖輸送体ではなく、糖センサーとして働いている。GLUT1 は腎の血管側つまり上皮細胞の側基底膜に分布し、近位尿細管、ヘンレ係蹄及び集合管の 3S 分節と糸球体に局在している。他方、GLUT2 は、従来では腎上皮細胞の側基底膜にのみ存在して、近位曲尿細管の S1 分節に局在しているとされていたが、最近、糖尿病腎では刷子縁膜に発現されることが報告されている。⁴⁶⁾ 腸管上皮細胞では、管腔側の糖濃度が高い場合、刷子縁膜に GLUT2 が高発現される。また腎では GLUT4 及び

GLUT9 は遠位尿細管に、また、GLUT8 は糸球体足細胞や遠位尿細管上皮細胞に局在している、さらに GLUT12 は遠位尿細管と集合管に発現していることが知られている。

3-1. GLUTs の発現と調節 Marks ら⁴⁶⁾ は刷子縁膜の糖輸送についてストレプトゾトシン誘導糖尿病の影響を調べている。この研究により、糖尿病ラットでは 67.5% ($p < 0.05$) まで刷子縁膜での促進性糖輸送を増加させることを発見している。しかし、糖尿病ラットを昼夜絶食させるとこの影響は消滅したとしている。糖尿病期間中では GLUT2 が刷子縁膜で発現していることをウェスタンブロッティングや免疫組織化学により実証している。一方、正常動物あるいは一昼夜絶食した糖尿病動物ではそのタンパク質は刷子縁膜で検出され得なかった。結論として、ストレプトゾトシン誘導糖尿病は GLUT2 の刷子縁膜への移送を促進し、これが高血糖症期間中、近位尿細管細胞に低親和性/高容量経路による糖取り込みを提供している可能性を示唆している。

腎疾患は糖尿病の主な合併症の 1 つであり、貧弱な血糖症管理は糖尿病性腎症の進展を招くことになる。細胞生存において重要な機能を持つ糖輸送体ファミリーの新しい仲間の GLUT8 の組織分布と調節について調べている。⁴⁷⁾ 代謝情報伝達に対応して GLUT8 発現の正常な制御を理解するために、絶食と摂食により研究している。加えて、GLUT8 発現はインスリン耐性、GLUT4 -/- 及び *db/db* マウスの 2 つの異なったモデルを用いて、次のような知見を得ている。GLUT8 は糸球体足細胞やネフロン¹の遠位尿細管上皮細胞に局在していて、腎 GLUT8 発現は *in vivo* で血漿グルコースレベルによって影響を受けた。糖尿病 *db/db* マウス腎足細胞は非糖尿病 *db/db* マウスと比較して GLUT8 を高レベルで発現する。足細胞は糸球体硬化症の進展に重要な役割を演じており、また高グルコースレベルは種々の腎細胞のアポトーシス性細胞死を誘導することが知られているので、これらの結果は糸球体硬化症や糖尿病性腎症の病理にさらなる洞察を提供する可能性がある。

糖尿病性腎の糖輸送はアップレギュレーションされていて、進行性糖尿病腎症の病因に含まれてきている。高血糖症、高血圧症、やレニン-アンジオテンシン系活性化は腎症の進展に重要と信じられてい

る。この研究⁴⁸⁾では糖尿病性腎症のラットモデルの促進性 GLUT1 や GLUT12 の発現を実験した。Sprague-Dawley ラットや形質転換 (mRen-2) 27 ラットにはストレプトゾトシンあるいは賦形剤のいずれかが投与された。GLUT12 発現や局在は免疫組織化学、イムノブロットング、*in situ* ハイブリダイゼーションや共焦点免疫蛍光法によって試験している。GLUT1 イムノラベリングは全ネフロン側の基底膜上に検出され、一方 GLUT12 は遠位尿細管や集合管に局在していた。GLUT12 イムノラベリングの有意な増加は Sprague-Dawley 正常ラットと比較して Ren-2 の対照や Ren-2 糖尿病ラットで観察された。GLUT12 発現は Sprague-Dawley 糖尿病ラットと比較して Ren-2 糖尿病ラットでより高かった。長期糖尿病では腎近位尿細管の GLUT1 レベルの有意な増加をもたらした。またその発現は Sprague-Dawley 糖尿病ラットと比較して Ren-2 糖尿病ラットでより高かった。GLUT12 タンパク質はヒトやラットの遠位尿細管や集合管の細胞質や頂端膜 (刷子縁膜) に分布していた。遠位尿細管や集合管の GLUT12 の頂端膜への局在は後ネフロンの付加的糖再吸収に寄与し得ると推測される。GLUT1 及び GLUT12 の両レベルは高血圧や糖尿病性腎症の動物モデルでは上昇する。

GLP-2 存在下でのラット空腸刷子縁膜に一時的に発現させた GLUT2 の役割については膜タンパク質の単離や免疫組織化学と同様に小腸管腔の灌流 (*in vivo*) を用いて研究している。⁴⁹⁾ GLP-2 の 1 時間血管灌流 (*in vivo*) ではフルクトース吸収速度は 2 倍になったが、この増加は管腔へのフロレチンでブロックされた。ラット空腸の凍結切片の免疫組織化学は成熟腸管細胞の側基底膜及び刷子縁膜の両方で GLUT2 の発現を示した。50 mM D-グルコースでの小腸管腔の灌流あるいは 800 pM GLP-2 の 1 時間血管灌流は刷子縁膜での GLUT2 発現を増加させた。ビオチン化表面露出したタンパク質のウェスタンブロットングを用いて、これらの定量的変化は刷子縁膜では 2 倍を示した。しかし、グルコースと GLP-2 の相加効果はなかった。これらの結果は、血管の GLP-2 が食餌性ヘキソース取り込みを持つ低親和性高容量型 GLUT2 のラット空腸刷子縁膜への挿入を促進することを示唆している。

3-2. 腎上皮細胞の Na/糖-共輸送体 SGLTs の調

節とトラフィッキング SGLTs に関する研究は Hediger らのグループ,³⁾ Wright らのグループ⁵⁾ 等によって集中的に研究されてきたが、これらの報告のなかにトラフィッキングに関する研究はほとんどみられなかった。そこで筆者ら^{50,51)} は SGLTs のトラフィッキングに関する研究に着手した。

筆者ら⁵⁰⁾ は SGLT1 活性の調節に及ぼす Ang II の影響についてブタ腎近位上皮細胞株 LLC-PK₁ を用いて研究した。Ang II は用量依存的に LLC-PK₁ 細胞への α -[¹⁴C]メチルグルコース (AMG) の取り込みを阻害した。この阻害は最大輸送速度 (V_{max}) が 2.20 nmol/mg タンパク質から 1.19 nmol/mg タンパク質への減少に基づいているが、見掛け上の親和性 (K_m) は変化しなかった。ウェスタンブロット分析では、刷子縁膜 SGLT1 のタンパク質レベルは Ang II によって減少したけれども、細胞内コンパートメントを含めた総 SGLT1 量は変化しなかった。情報伝達系では Ang II は cAMP の生成をブロックする。細胞内 cAMP を調節している Gi タンパク質の不活性化剤の 1 つである百日咳毒素は Ang II によって惹起する AMG 取り込み減少を完全に防いだ。8-Br-cAMP は刷子縁膜での AMP 取り込みと SGLT1 タンパク質レベルを上昇させた。Wortmannin 及び LY294002 は SGLT1 活性を阻害し、また 8-Br-cAMP による SGLT1 活性上昇効果を減弱した。また、これらの阻害剤は 8-Br-cAMP で誘導される SGLT1 の細胞膜への発現を抑えた。筆者ら⁵⁰⁾ は Ang II が SGLT1 の翻訳後の調節に重要な役割を演じていると結論した。SGLT1 の細胞膜への移送の阻害は PKA 不活性化や PI3-キナーゼ活性の減少によって惹起されると推測した。

熱ショックストレスは Hsp70 を含む熱ショックタンパク質によって誘導され、またブタ腎 LLC-PK₁ では SGLT が活性化されるが、この機構の詳細は解明されていなかった。筆者ら⁵¹⁾ は SGLT1 タンパクが Hsp70 と相互作用して SGLT1 活性を上昇させているか否かを研究した。熱ショックストレスは SGLT1 発現を変化させることなく SGLT1 活性を上昇させた。SGLT1 活性の上昇は TGF- β 1 抗体によって完全に阻害され、熱ショックの代わりに、TGF- β 1 は SGLT1 の発現を変化させることなく SGLT1 活性を用量また時間依存的に増加させた。SGLT1 抗体で TGF- β 1 処理した細胞から免疫沈降した

Hsp70 量は正常細胞より高く, LLC-PK₁ への抗 Hsp70 抗体の移入は SGLT1 活性の増加を阻害した. 共焦点顕微鏡を用いて, SGLT1 と Hsp70 は TGF- β 1 処理細胞では頂端側に分布していたが, 未処理細胞では SGLT1 は細胞質内に留まり, 頂端膜に分布しておらず, この観察は新発見である. また抗 Hsp70 抗体はこの移送を妨害することを発見した (Fig. 6). これらの結果は Hsp70 が SGLT1 のエキサイトーシス関連タンパク質を活性化して, 頂端膜への SGLT1 のトラフィッキングを増加して, 糖取り込みをアップレギュレーションしていることを示している.⁵¹⁾

一方, ヒト腸管細胞モデルの 1 つとして Caco-2 細胞を用いて, SGLT1 が微小管に結合した形で細胞内コンパートメントに分布していることが示された.⁵²⁾ 腸管細胞へのナトリウム依存性グルコース取

り込みの調節で細胞内 SGLT1 の役割を明確にするために, Khoursandi ら⁵³⁾ は細胞に種々刺激を与えて Caco-2 細胞での SGLT1 の細胞内分布と SGLT1 を介したグルコース取り込みを比較している. 頂端側でのエンドサイトーシスを促進する薬剤 mastoparan (50 μ M) と Caco-2 細胞を 90 分間インキュベーションした場合, SGLT1 が大量に頂端膜から細胞内コンパートメントへ移送され, AGM 取り込みを減少 (-60%) させた. グルコース無添加培地 (1 時間) でプレインキュベーションした細胞では高グルコース (100 mM) 培地でインキュベーション (1 時間) したときと比較して有意に高い Na⁺ 依存性グルコース取り込み増加 (45% 高い) を示した. 興味あることには, 細胞外グルコースレベルによる Caco-2 細胞への SGLT1 を介したグルコース取り込み調節は細胞で SGLT1 の再分布なしに行われた. これらの結果は, D-グルコースの取り込みは薬理的に細胞膜と細胞内プールとの間の SGLT1 の移送によって調節されているが, D-グルコースの調節には別な機構もあり得るとしている. それは高グルコースによる刷子縁膜への GLUT2 の移送及び糖吸収を指しているのかも知れない.

おわりに

腎ナトリウム輸送体発現と膜移送調節因子に係わる研究が進み, これらの失調により発症する疾病は輸送体遺伝子や膜移送調節因子遺伝子の変異との関連が解明されてきている.

高血圧症において, マグネシウム動態は重要と考えられるが, 詳細な研究が少なかった.⁵⁴⁾ 腎マグネシウム輸送を担う輸送体について, 頂端膜に局在する Mg²⁺ 輸送体 (TRPM6/TRPM7) は分子的解明が進展してきているが, 側基底膜に局在が推測されている推定 Na⁺/Mg²⁺-交換体⁵⁵⁾ はいまだ分子的に解明されていない (Fig. 7).⁴⁰⁾ 細胞-細胞間の接合部位である, いわゆる密着結合のパラセリン-1 (claudin-16) が Mg²⁺ 輸送に預かっていることが明らかになってきている. また, 従来から密着結合を介して, Ca²⁺ と Mg²⁺ が同時に輸送される Ca²⁺/Mg²⁺ 輸送体が知られている.

これら腎輸送体の分子的構造, 作用機構さらに発現機構の解明が進展するにしたがって, それらに関連した疾病の治療法が開発されてきている. これらの中には, 上記でみたように遺伝的なもののがかなり

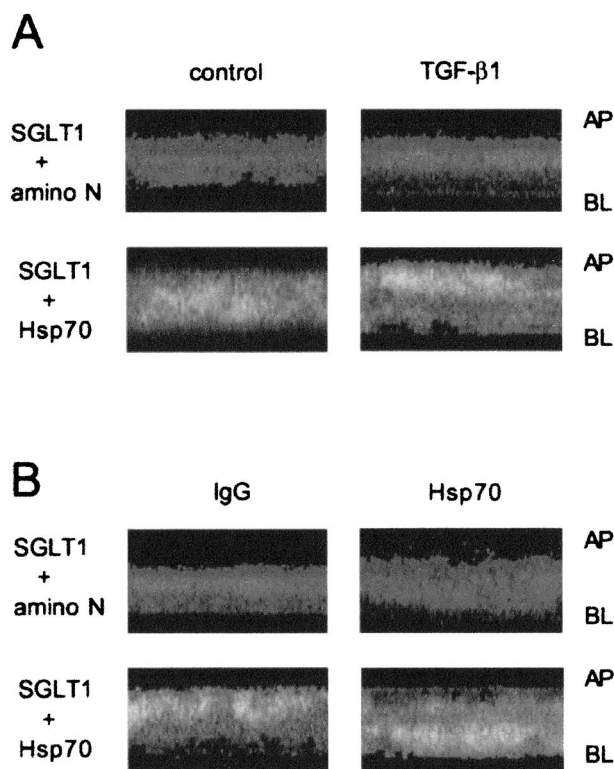


Fig. 6. Effects of an Anti-Hsp70 Antibody on SGLT1 and Hsp70 Localization

(A) The cells were treated with anti-SGLT1, anti-Hsp70, and anti-aminopeptidase N antibodies. Images of confocal microscope (x-z axis) showed localization of SGLT1 (red), Hsp70 (green), and aminopeptidase N (blue) in control cells and in 2 ng/ml TGF- β 1-treated cells. AP: apical membrane site, BL: basal membrane site. (B) The cells were transfected with 1.8 μ g/ml anti-mouse IgG or 1.8 μ g/ml anti-Hsp70 antibody (Hsp70) using a Chariot kit followed by incubation with 2 ng/ml TGF- β 1. The merging colors showed the co-localization of aminopeptidase N with SGLT1 (purple) and Hsp70 with SGLT1 (yellow).

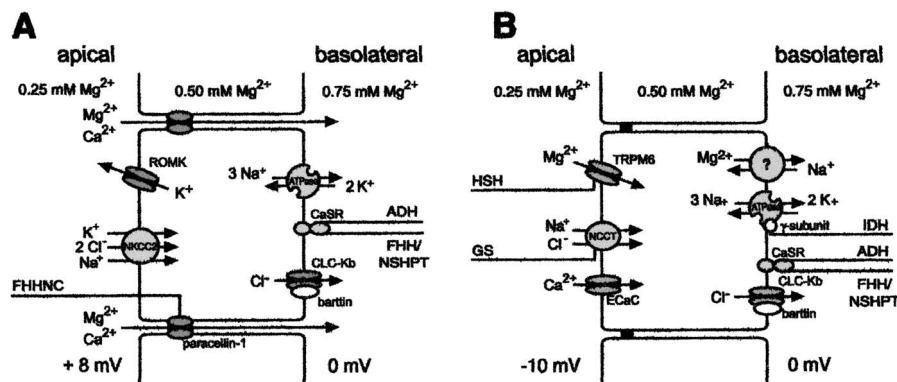


Fig. 7. Magnesium Reabsorptions in Thick Ascending Limb (TAL) and Distal Convolved Tubule (DCT)

(A) Driving force for the reabsorption against a concentration gradient is a lumen-positive voltage gradient generated by the reabsorption of NaCl. FHHNC, familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. ADH: autosomal-dominant hypoparathyroidism, FHH/NSHPT: familial hypomagnesemia/neonatal severe hyperparathyroidism. (B) Active transcellular transport is mediated by an apical entry through a magnesium channel and a basolateral exit, presumably via a Na⁺/Mg²⁺ exchange mechanism. HSH: hypermagnesemia with secondary hypocalcemia, GS: Gitelman variant of Bartter syndrome, IDH: isolated dominant hypomagnesemia.⁴⁰⁾

ある。そうしたものであっても、遺伝疾患の重篤な患者以外は生活習慣の改善で発症や症状をかなり軽減できるものと思われる。一方、遺伝的腎機能障害等による重症高血圧患者の治療は、将来、より最適化された降圧剤の開発と、より安全で正確な遺伝子治療法が開発が期待される。

REFERENCES

- Hoenderop J. G. J., Nilius B., Bindels R. J. M., *Physiol. Rev.*, **85**, 373–422 (2005).
- Dai L.-J., Ritchie G., Kerstan D., Kang H. S., Cole D. E. C., Quamme G. A., *Physiol. Rev.*, **81**, 51–84 (2001).
- Hediger M. A., Rhoads D. B., *Physiol. Rev.*, **74**, 993–1026 (1994).
- Suketa Y., Ikari A., Kawano K., *Igakuno Ayumi*, **199**, 213–218 (2001).
- Wright E. M., Loo D. D. F., Hirayama B. A., Turk E., *Physiology*, **19**, 370–376 (2004).
- Suketa Y., *Saishin Igaku*, **62**, 1957–1966 (2007).
- Lin D.-H., Sterling H., Wang W.-H., *Physiology*, **20**, 140–146 (2005).
- Efendiev R., Yudowski G. A., Zwiller J., Leibiger B., Katz A. I., Berffren P.-O., Pedemonte C. H., Leibiger I. B., Bertorello A. M., *J. Biol. Chem.*, **277**, 44108–44114 (2002).
- Kizhatil K., Davis J. Q., Davis L., Hoffman J., Hogen B. L. M., Bennett V., *J. Biol. Chem.*, **282**, 26552–26561 (2007).
- Lubarski I., Pihakaski-Maunsbach K., Karlsh S. J. D., Maunsbach A. B., Garty H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 37717–37724 (2005).
- Yudowski G. A., Efendiev R., Pedemonte C. H., Katz A. I., Berggren P.-O., Bertorello A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 6556–6561 (2000).
- Ikari A., Tachihara Y., Kawano K., Suketa Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1310**, 118–124 (2001).
- Banday A. A., Asghar M., Hussain T., Lokhandwala M. F., *Hypertension*, **41**, 1353–1358 (2003).
- Efendiev R., Krmar R. T., Ogimoto G., Zwiller J., Tripodi G., Katz A. I., Bianchi G., Pedemonte C. H., Bertorello A. M., *Circ. Res.*, **95**, 1100–1108 (2004).
- Silva G. B., Ortiz P. A., Hong N. J., Garvin J. L., *Hypertension*, **48**, 467–472 (2006).
- Anselmo A. N., Earnest S., Chen W., Juang Y.-C., Kim S. C., Zhao Y., Cobb M. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 10883–10888 (2006).
- Giménez I., Forbush B., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, F1341–F1345 (2005).
- Maede P., Hoover R. S., Plata C., Vázquez N., Bobadilla N. A., Gamba G., Hebert S. C., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **284**, F1145–F1154 (2003).
- Paredes A., Plata C., Rivera M., Moreno E., Vázquez N., Muñoz-Clares R., Hebert S. C.,

- Gamba G., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**, F1094–F1102 (2006).
- 20) Giménez I., Forbush B., *J. Biol. Chem.*, **282**, 6540–6547 (2007).
 - 21) Kalhe K. T., Rinehart J., Ring A., Giménez I., Gamba G., Hebert S. C., Lifton R. P., *Physiology*, **21**, 326–335 (2006).
 - 22) Plata C., Maede P., Hall A., Welch R. C., Vázquez N., Hebert S. C., Gamba G., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **280**, F574–F582 (2001).
 - 23) Pacheco-Alvarez D., Cristóbal P. S., Maede P., Moreno E., Vázquez N., Muñoz E., Diaz A., Juárez M. E., Giménez I., Gamba G., *J. Biol. Chem.*, **281**, 28755–28763 (2006).
 - 24) Yang C.-L., Zhu X., Wang Z., Subramanya A. R., Ellison D. H., *J. Clin. Invest.*, **115**, 1379–1387 (2005).
 - 25) Moreno E., Cristóbal P. S., Rivera M., Vázquez N., Bobadilla N. A., Gamba G., *J. Biol. Chem.*, **281**, 17266–17275 (2006).
 - 26) Kunchaparty S., Palcso M., Berkman J., Velázquez H., Desir G. V., Bernstein P., Reilly R. F., Ellison D. H., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **277**, F643–F649 (1999).
 - 27) Kellenberger S., Schild L., *Physiol. Rev.*, **82**, 735–767 (2002).
 - 28) Bhalla V., Soundararajan R., Pao A. C., Li H., Pearce D., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **291**, F714–F721 (2006).
 - 29) Snyder P. W., *Endocrinology*, **146**, 5079–5086 (2005).
 - 30) Wiemuth D., Ying K. E., Rohlf M., McDonald F. J., *Biochem. J.*, **405**, 147–155 (2007).
 - 31) Pochynyuk O., Meina J., Gamper N., Genth H., Stockand J. D., Staruschenko A., *J. Biol. Chem.*, **281**, 26520–26527 (2006).
 - 32) Quinkler M., Bujalska I. J., Kaur K., Onyimba C. U., Buhner S., Allolio B., Hughes S. V., Hewison M., Stewart P. M., *Hypertension*, **46**, 787–798 (2005).
 - 33) Ring A. M., Leng Q., Rinehart J., Wilson F. H., Kahle K. T., Hebert S. C., Lifton R. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 4025–4029 (2007).
 - 34) Zhou R., Patel S. V., Synder P. M., *J. Biol. Chem.*, **282**, 20207–20212 (2007).
 - 35) Roy D. R., Blouch K. L., Jamison R. L., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **243**, F197–F203 (1982).
 - 36) Quamme G. A., Smith C. M., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **246**, F544–F550 (1984).
 - 37) Touyz R. M., Mercure C., Reudelhuber T. L., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13657–13663 (2001).
 - 38) Ikari A., Nakajima K., Taki S., Suketa Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **451**, 133–139 (2002).
 - 39) Watanabe M., Konishi M., Ohkido I., Matsufuji S., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, F742–F748 (2005).
 - 40) Konrad M., Schlingmann K. P., Gudermann T., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **286**, F599–F605 (2004).
 - 41) Schlingmann K. P., Gudermann T., *J. Physiol.*, **566**, 301–308 (2005).
 - 42) Voets T., Nilius R., Hoefs S., van der Kemp A. W., Droogmans G., Bindels R. J. M., Hoenderop J. G. J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 19–25 (2004).
 - 43) Chubanov V., Waldegger S., Schnitzler M. M., Vitzthum H., Sassen M. C., Seyberth H. W., Konrad M., Gudermann T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 2894–2899 (2004).
 - 44) Efrati E., Arsentiev–Rozenfeld J., Zelikovic I., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **288**, F272–F283 (2005).
 - 45) Hou J., Shan Q., Wang T., Gomes A. S., Yan Q., Paul D. L., Bleich M., Goodenough D. A., *J. Biol. Chem.*, **282**, 17114–17122 (2007).
 - 46) Marks J., Carvou N. J. C., Debnam E. S., Srai S. K., Unwin R. J., *J. Physiol.*, **553**, 137–145 (2003).
 - 47) Schiffer M. D., Susztak K., Ranalletta M., Raff A. C., Böttinger E. P., Charron M. J., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, F186–F193 (2005).
 - 48) Linden K. C., DeHaan C. L., Zhang Y., Glowacka S., Cox A. J., Kelly D. J., Rogers S., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**, F205–F213 (2006).
 - 49) Au A., Gupta A., Schembri P., Cheeseman C.I., *Biochem. J.*, **367**, 247–254 (2002).
 - 50) Kawano K., Ikari A., Nakano M., Suketa Y., *Life Sci.*, **71**, 1–13 (2002).
 - 51) Ikari A., Nakano M., Kawano K., Suketa Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 33338–33343 (2002).
 - 52) Kipp H., Khoursandi S., Scharlau D., Kinne R. K. H., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**,

- C737–C749 (2003).
- 53) Khoursandi S., Scharlau D., Herter P., Kuhnen C., Martin D., Kinne R. K. H., Kipp H., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **287**, C1041–C1047 (2004).
- 54) Ikari A., Kano M., Suketa Y., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **294**, 710–713 (2002).
- 55) Ikari A., Nakajima K., Suketa Y., Harada H., Takagi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1618**, 1–7 (2003).