

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770139

研究課題名(和文)細胞内タンパク質NDRG4のネットワーク動態の解明

研究課題名(英文)Cytoplasmic interactions of NDRG4

研究代表者

井本 ひとみ(山本ひとみ)(IMOTO, Hitomi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：50532230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：脳の神経細胞に局在するNDRG4は、大脳皮質におけるBDNF量を正常に保ち、記憶学習能力の維持と虚血再灌流ストレスに対する神経細胞保護に必要である。また、NDRG4は、正常な心拍動リズムや長期的な水泳ストレスに対する心臓の生理的適応に必須である。本課題では、野生型マウスの脳から膜画分を調製してアフィニティ精製を行い、NDRG4の結合タンパク質としてNa⁺/K⁺-ATPase α 3サブユニット(NKA α 3)を同定した。さらに、NDRG1～NDRG3もNKA α 3に結合することを明らかにした。このことから、細胞特異的に発現するNDRGファミリーがNKAの分子機能を調節していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：NDRG4 localizes in neurons and retains the levels of BDNF in the mouse cerebral cortex, which is essential for maintaining the ability of spatial learning and neuronal protection after the temporary cerebral ischemia. NDRG4 plays important roles in the normal heart rhythm and physiological adaptation of cardiac muscle after forced swimming stress. In this study, we identified Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) α 3 subunit as NDRG4-interacting protein in the brain using affinity chromatography. We found that other NDRG members, NDRG1-NDRG3, also associate with NKA α subunit in HeLa cells cotransfected with NDRG members and NKA α subunit. These data indicate that NDRG members may regulate the NKA functions of ion pumping and cell signaling by interacting with NKA α subunit in a cell-specific manner.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：NDRG4 神経細胞 ナトリウム/カリウムATPase 脳 心臓

1. 研究開始当初の背景

N-myc downstream-regulated gene 1~4 (NDRG1~NDRG4) は、分子量 39-43kDa の細胞内タンパク質である。NDRG1 欠損マウスの坐骨神経では、脱ミエリン化を伴う進行性の神経変性が起こることから、メンバーのいずれかが欠損すると、正常な細胞の機能が障害を受けると考えられる。

代表者らは、NDRG メンバーのうち、NDRG4 が脳と心臓に局限して発現しており、NDRG4 欠損マウスでは野生型に比べて大脳皮質中の BDNF 量が減少し、記憶学習能力の低下と虚血再灌流ストレスに対する神経細胞死の増加がみられることを明らかにした。また、NDRG4 欠損マウスでは野生型と比較して心電図 P 波が延長しており、長期的な水泳ストレスによって心臓に負荷を与えた結果、野生型では心拍数が 20% 減少するが、欠損マウスでは心拍数の減少が野生型に比べて有意に小さいことを明らかにした。

近年、NDRG4 はゼブラフィッシュの心筋細胞の正常な増殖に必要であること、ヨーロッパ人を対象とした疫学研究で心電図 QT 間隔に関連する遺伝子座の 1 つに NDRG4 遺伝子が含まれていることが報告され、心機能の分野でも注目されつつある。このように、脳と心臓において NDRG4 が生理機能を発揮していることは明らかであるが、NDRG4 の結合タンパク質や分子機能については不明である。

2. 研究の目的

(1) 脳や心臓における NDRG4 の分子機能を解明するために、酵母ツーハイブリッド法やアフィニティ精製を利用して、NDRG4 の結合タンパク質を同定する。

(2) 心臓における NDRG4 の生理機能を明らかにするため、NDRG4 の組織学的局在を調べる。また、NDRG4 欠損マウスでみられる心拍数の調節異常は、脳からの出力異常に起因するものかを自律神経機能検査で調べる。さらに、通常飼育あるいは水泳ストレス負荷後の野生型および NDRG4 欠損マウスの心臓を用いて、NDRG4 が関わる細胞内ネットワークを調べる。NDRG メンバー間で機能の重複性も予測されていることから、NDRG1~NDRG3 を含めたタンパク質間相互作用も明らかになる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) NDRG4 結合タンパク質の同定

①マウスにおける NDRG4 mRNA の発現は、脳と心臓に局限しているため、まず脳の cDNA ライブラリーを使用した酵母ツーハイブリッド法で結合タンパク質の同定を試みた。また、得られたクローンが真の陽性クローンであるかを *in vitro* 結合実験で確認した。

②マウスの脳組織を利用して、アフィニティ精製を行った。つまり、NDRG4 がほとんど発

現していない HeLa 細胞に FLAG 融合 NDRG4 タンパク質を発現させて、anti-FLAG アフィニティゲルに固相化した。野生型マウスの脳から調製した膜画分をアフィニティゲルに加え、溶出画分を SDS-PAGE で展開して、銀染色で検出した。特異的なバンドをトリプシン消化後、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で解析した (図 1)。膜画分に含まれるタンパク質の可溶化には、界面活性剤として CHAPS、Sodium cholate、Digitonin、NP-40、TritonX-100、Octylglucoside、Dodecylmaltoside (DDM) を用いた。

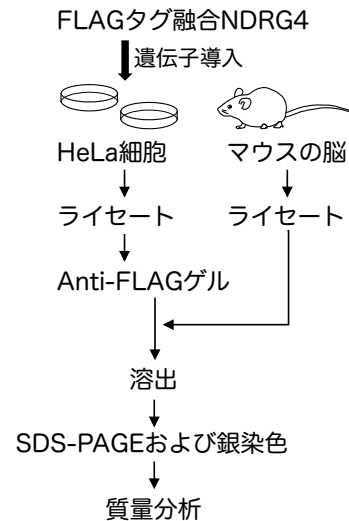


図1 NDRG4結合分子の同定法

③NDRG4 の結合特異性を確認するため、他の NDRG メンバーである NDRG1~NDRG3 と、得られた NDRG4 結合タンパク質との結合能を *in vitro* 結合実験で調べた。

(2) 心臓における NDRG4 の生理機能およびネットワーク動態の解明

①心臓における NDRG4 mRNA の局在を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。2 種類の RNA プローブを用いて検討し、また陰性対照として NDRG4 欠損マウスの組織を利用した。

②野生型および NDRG4 欠損マウスに生体電位送信機 (ETA-F10、DSI) を埋め込み、テレメトリシステムを用いて 6 日間連続して心拍応答を測定した。その後、心拍変動の周波数解析を行った。

③通常飼育あるいは 5 週間の水泳ストレス負荷後の野生型および NDRG4 欠損マウスの心臓ホモジネートから RNA を抽出し、変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイで調べた。

4. 研究成果

(1) NDRG4 結合タンパク質の同定

①酵母ツーハイブリッド法で得られた陽性クローンは、acyl-Coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3) と protein interacting

with C kinase 1 (PICK1) であった。これらと NDRG4 の結合を直接的に調べるために、まず HeLa 細胞に FLAG 融合 NDRG4 タンパク質を発現させ、anti-FLAG アフィニティゲルで免疫沈降を行った。共沈物をウエスタンブロットで調べたが、内在的に発現する ACBD3 および PICK1 はいずれも NDRG4 と結合していなかった。

②銀染色の結果、DDM 可溶性画分のみの特異的なバンドを検出した。液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で調べた結果、脳における NDRG4 結合分子として、 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 3$ サブユニット (NKA $\alpha 3$) を同定した (図 2)。NKA は、細胞膜上に普遍的に発現しているナトリウムポンプである。ATP の加水分解で得たエネルギーで、3 個の Na^+ を細胞外へ、2 個の K^+ を細胞内へと輸送してイオン濃度勾配を形成する。NKA は神経細胞の静止膜電位の維持やシナプス伝達に必須の分子であり、強心配糖体の受容体として知られているが、その機能調節については不明な点が多い。

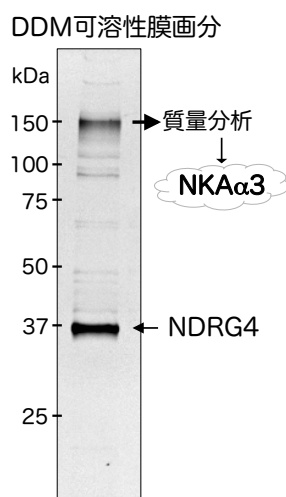


図2 NDRG4結合タンパク質の銀染色像

③哺乳類の NKA α サブユニットには 4 種のアイソフォームが存在するので、これらと NDRG1~NDRG4 の結合能について調べた。つまり、HeLa 細胞に FLAG タグ融合 NDRG と Myc タグ融合 NKA α サブユニットを発現させ、anti-FLAG アフィニティゲルで免疫沈降を行った。共沈物をウエスタンブロットで調べた結果、いずれの NDRG メンバーも、全ての NKA α サブユニットに結合した。このことから、NDRG ファミリーは様々な細胞で NKA 群の機能を調節していると考えられた。

(2) 心臓における NDRG4 の生理機能およびネットワーク動態の解明

①NDRG4 mRNA は心筋細胞に局在していた。NKA α サブユニットも心筋細胞に発現することが知られているので、NDRG4 が NKA を介して心筋の機能を維持している可能性がある。

NDRG4 と NKA の相互作用が正常な心拍動リズムやストレスに対する抵抗性の保持に必須であると考えられる。

②低周波数成分、中間周波数成分 (LF)、高周波数成分 (HF)、LF/HF を解析したところ、全ての指標において野生型と NDRG4 欠損マウスで差が無かった。このことから、NDRG4 欠損マウスの自律神経性循環調節機能は正常であると考えられた。

③得られたデータを解析した結果、水泳ストレス負荷後に野生型のみで 2 倍以上増加する 19 遺伝子 (apolipoprotein D や synaptotagmin XII など) と NDRG4 欠損マウスのみで 2 倍以上増加する 4 遺伝子 (myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta や 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthetase 2 など) が明らかになった。また、野生型のみで 2 倍以上減少する 8 遺伝子 (transferrin receptor や arachidonate 5-lipoxygenase など) と NDRG4 欠損マウスのみで 2 倍以上減少する 4 遺伝子 (myosin light chain kinase family, member 4 や tubulin, alpha 1B など) も明らかになった。しかし、Gene Ontology 解析では機能的に関連する遺伝子群は見出せなかった。

本研究により、NDRG4 は脳の神経細胞や心筋細胞に発現し、NKA と相互作用することによってこれら細胞の生理機能を制御していると考えられたが、詳細なネットワーク動態や NDRG ファミリーと α サブユニットの細胞特異的な結合選択性の解明については今後の研究が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 山本ひとみ: 虚血に対して保護的作用を示す細胞内タンパク質 NDRG4; 日本血栓止血学会誌, vol. 23, pp399-406, 2012 (査読無)

[学会発表] (計 2 件)

① Hitomi Yamamoto: Temporary cerebral ischemia induced by three-vessel occlusion in mice; 59th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Amsterdam, June 29th · 2013

② 井本(山本)ひとみ、宮田敏行、小亀浩市: 脳と心臓に特異的に発現する細胞内タンパク質 NDRG4 は Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 3$ サブユニットに結合する; 第 85 回日本生化学会大会、福岡市、2012 年 12 月 15 日

[その他]

ホームページ

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本ひとみ (山本ひとみ)

(IMOTO HITOMI) (YAMAMOTO HITOMI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：50532230