

機関番号：84404

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077015

研究課題名（和文） 膜プロトンセンサーの細胞内のイオンセンサーとの相互作用による
活性制御機構の解明研究課題名（英文） Regulatory mechanism for interaction between membrane proton sensor
and cytosolic ion sensor.

研究代表者

若林 繁夫 (WAKABAYASHI SHIGEO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生理部・部長

研究者番号：70158583

研究成果の概要（和文）：心臓では、高血圧や糖尿病などのストレスによって心肥大が生じ、その適応が破綻すると心不全が起こる。心臓に発現する膜輸送センサー蛋白質や細胞内 Ca^{2+} センサー蛋白質の遺伝子改変動物を用いた解析や分子細胞生理学的研究によって、心臓の病態進行にセンサー蛋白質の時間的・空間的なモーダルシフトが密接にリンクしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In the heart, various stress including hypertension and diabetes induce cardiac hypertrophy, but if such adaptations fail, heart failure occurs. Using genetically modified animals and physiological approaches for ion sensor proteins, specifically membrane ion transporters and Ca^{2+} sensors, we found that there is a close link between the progression of heart diseases and the spatiotemporal “modal shift” of these sensor proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,900,000	0	12,900,000
2007年度	13,700,000	0	13,700,000
2008年度	12,900,000	0	12,900,000
2009年度	11,000,000	0	11,000,000
2010年度	11,000,000	0	11,000,000
総計	61,500,000	0	61,500,000

研究分野：分子細胞生理学

科研費の分科・細目：

キーワード：生理学、蛋白質、循環器・高血圧、シグナル伝達、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内 pH、 Na^+ 濃度、細胞容積調節に関わる Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE,SLC9)は、増殖因子、ホルモンなどの化学物質に加えて、高浸透圧、ストレッチなど機械的刺激を含むあらゆる種類の細胞外シグナルによって活性化を受ける細胞膜セルセンサーの代表格である。この活性制御は細胞質側に内蔵する pH センサ

ーの働きによって起こるが、その実体については現在不明である。申請者らの最近の研究によって、NHE が生理的な活性を維持し最大限のシグナル応答を行うためには、自己センサー間(ダイマー化)および異種センサー間の相互作用が必須であることが明らかになっている。申請者らは最近、後者の例としてカルシニューリン様タンパク質(CHP)との相互

作用があらゆる形質膜 NHE アイソフォームの生理活性に必須であることを発見した。さらに実験的証拠から、活性制御に必須である NHE の膜直下領域(約 100 残基)には CHP 以外にも複数個の未同定の因子が結合し、NHE の制御に関わることが示唆された。申請者らは、NHE の膜直下領域と複数個の制御因子からなる巨大な複合体が膜貫通ドメインを含む輸送本体(ダイマー)と相互作用し活性制御を行うと考えている。そこで本研究計画では、この膜直下の構造物が“pH センサー複合体”であるという仮説を提唱する。この複合体はさらにリン酸化や他のシグナル因子との相互作用によって複雑に制御を受ける可能性がある。たとえば、NHE は脂質シグナル分子である PIP₂ によって活性化されるので、細胞内 Ca²⁺濃度依存的に PI4 キナーゼを活性化し膜の PIPn 量を増加させる神経カルシウムセンサー蛋白質(NCS-1)は NHE を活性化させ、細胞・個体の生理作用と密接に関与する可能性がある。

2. 研究の目的

Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1,SLC9)は、増殖因子、ホルモン、ストレッチなどあらゆる種類の細胞外シグナルによって活性化を受ける細胞膜センサーである。活性化には細胞質側に内蔵する pH センサーの H⁺低感受性から高感受性へのモーダルシフトが関与する。今回の研究の目的は、NHE1 と細胞内 Ca²⁺センサーとの相互作用によって起こる pH センサーの変化が、どのような生理機能あるいは病態的役割に関与するかを、主としてまるごと心臓および単離心筋細胞を用いて明らかにすることを主眼とする。心臓では、環境ストレスによる負荷によって心筋細胞は肥大し、その適応が破綻すると心不全に陥るが、細胞内 Ca²⁺は重要なシグナル因子として同定されている。本研究では、心肥大・心不全発症におけるシグナル伝達における NHE1 および関連する Ca²⁺センサー蛋白質の機能と病態、モーダルシフトとの関連について研究を行う。

具体的には、①NHE1 の活性化は心肥大・心不全発症に十分なシグナルになりうるか、またどのようなメカニズムでその発症に導くのかをトランスジェニックマウスを作成して検討する。②NHE1 のホルモンによる活性化の分子メカニズムを明らかにする。③プロテオーム的な手法を用いて同定した NHE1 の新規結合蛋白質カルシニユリンについて、NHE1 との相互作用の生理的意義を明らかにする。④心臓に発現するが、その機能が未

知の Ca²⁺センサー蛋白質 NCS-1 の心臓における機能をノックアウトマウスを用いて明らかにする。⑤心臓に発現する別の EF ハンド Ca²⁺センサー蛋白質 CHP3 の心臓における機能を明らかにする。⑥拡張型心筋症、筋ジストロフィー発症における Ca²⁺透過チャネル TRPV2 の病態的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

➤ NHE1 の阻害ドメインを欠損した恒常的活性化型変異体 NHE1 をα-ミオシン重鎖プロモータの下流につなぎ、定法に従って NHE1 を心筋特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。

➤ 定法に従って、成体心筋からの心筋細胞単離、新生児マウスおよびラットの心筋細胞培養を行った。細胞内 Ca²⁺濃度は Indo-1、Fura-2、Fluo-4 を用いた蛍光測光、細胞内 pH、細胞内 Na⁺はそれぞれ BCECF および SBFI を用いた蛍光測光により行った。

➤ NHE1 に結合する蛋白質の探索は、HA タグした NHE1 を細胞に発現し、HA-アガロースを用いて NHE1 を精製し、共精製されてくる蛋白質を解析した。蛋白質の同定は LC-MS/MS を用いた。

➤ その他、生化学的・細胞生理学的実験、免疫染色、組織染色、心機能測定などは定法に従って行った。

4. 研究成果

①活性化型 Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)を心臓特異的に高発現するトランスジェニック(Tg)マウスの解析。この Tg マウスは心肥大を経て心不全になり、心機能の著明な低下をまねき早期に死亡することがわかった。これらの心機能低下は、NHE1 の特異的阻害剤カリボライド投与により抑制された。Tg マウスからの単離心筋細胞では生理的には Na⁺濃度上昇に伴って細胞内 Ca²⁺過負荷が起こること、Ca²⁺濃度上昇に伴って心肥大シグナルである CaMKII、カルシニユリン(CaN)の活性化、およびそれらの下流の HDAC、NFAT シグナル分子が活性化され、心肥大・心不全発症に大きく関与することが判明した。これまで多くの動物モデルで NHE1 の活性化が心肥大を誘発するという報告がなされてきたが、これらのモデルでは他のシグナル系が同時に活性化されていることから NHE1 の活性化単独で病態を引き起こすのに充分かどうかは明らかでなかった。今回の結果は、NHE1 の活性化が心肥大・心不全を発症する Ca²⁺シグナルを増強するのに十分なシグナル発信源になりうることを示している。

②NHE1 のホルモンによる活性化のメカニズム。心疾患時、NHE1 はホルモン等によって活性化を受けるが、これまでそのメカニズムの詳細はほとんど明らかでなかった。PKC の強力な活性化剤 **phorbol ester** が強く NHE1 を活性化することから、30 年以上にわたってホルモンによる NHE1 活性化は PKC によって起こると信じられてきた。しかし NHE1 分子は PKC によってはリン酸化されない。今回常識に反して、NHE1 は **phorbol ester** および内在性セカンドメッセンジャー DAG のターゲットであることが判明した。NHE1 の活性化は PKC ではなく、これら脂質の直接的相互作用、それに引き続く NHE1 脂質センサードメインと形質膜との相互作用増強による NHE1 の構造変化の結果として起こると考えられた。

③NHE1 新規結合蛋白質としての脱リン酸化酵素カルシニューリン (CaN) の発見と NHE1 との相互作用の役割。細胞からの NHE1 精製と LC-MS/MS を組み合わせることにより、NHE1 の新規結合蛋白質として CaN を同定した。詳細な研究の結果、NHE1 が存在する形質膜直下の限局された領域(ラフトと考えられる)におけるアルカリ化が CaN-NFAT 系を増幅する仕組みがあることを見出した。重要なことは、 H^+ が CaN 活性を大幅に変化させるという点である。CaN 結合部位は輸送活性には影響しない NHE1-C 末端 tail 領域の 6 残基 PVITID に存在する。不要とも思えるこの tail 領域は NHE1 活性化を細胞内酵素に増幅して伝搬し、心肥大のような細胞機能変化を効率的に遂行させるための重要なプラットフォームとして機能すると思われる。すなわち、NHE1 は自身近傍の CaN 活性を NHE1 活性に応じて制御するという輸送体以外の役割が明らかとなった。

④心臓における NCS-1 の生理機能と病態的意義。NCS-1 は、興奮性細胞特異的に発現する Ca^{2+} センサー蛋白質であるが、心臓における役割については不明であった。今回、NCS-1 欠損 (KO) マウスを用いて解析した結果、NCS-1 の発現量は未成熟期で高く、特に未成熟期の心筋 Ca^{2+} 動態ならびに心筋収縮に重要な役割を担っていることが明らかとなった。そのメカニズムとして、NCS-1 は心筋 IP_3 受容体と結合して局所の Ca^{2+} を上昇させ、その結果 CaMKII を活性化して筋小胞体 Ca^{2+} 量を増加させ、心筋全体の Ca^{2+} シグナルを上昇させるためであることがわかった。また心筋 IP_3 受容体の活性化は心肥大の際にも認められることから NCS-1 と心肥

大との関係について調べたところ、NCS-1 は心肥大の際にも発現が上昇し、KO 心筋ではホルモン刺激による心肥大が軽減されたことから心肥大形成にも寄与している可能性が示唆された。これらの知見は、未だ全貌が明らかでない未成熟期特有の興奮-収縮相関および心肥大形成のメカニズムの一端を明らかにしたものと見える。

⑤心臓における CHP3 の役割。NCS-1 と同様に、心臓に多く発現するが機能未知の Ca^{2+} 結合蛋白質としてカルシニューリン B 様蛋白質 3 (CHP3) がある。アデノウィルスを用いて CHP3 をノックダウンさせた心筋細胞 (CHP3-KD 細胞) の生理機能を解析したところ、興味深いことに、ホルモン刺激などが無い状況下でも心肥大マーカーの発現レベルの増大が認められ、CHP3 は心肥大を抑制しているのではないかという可能性が考えられた。また、リン酸化アレイ解析が契機となって、心肥大を抑制的に調節する蛋白質であるグリコーゲン合成リン酸化酵素 3 β (GSK3 β) が CHP3 の制御因子として浮上した。実際に、GSK3 β は CHP3 と共免疫沈降し、CHP3-KD 細胞ではコントロールに比べて GSK3 β のリン酸化の増強が認められた。その他の結果とも合わせて、CHP3 は GSK3 β のリン酸化を制御する心肥大調節の新しいシグナル因子であることが示唆された。

⑥ Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 の病態的役割。TRPV2 は筋ジストロフィー・心筋症などの筋変性疾患の際に形質膜に移行し活性化され、筋細胞死を引き起こす過剰な Ca^{2+} 流入を惹起すると考えられている。病態時における TRPV2 活性を抑制するドミナントネガティブ変異体を導入することにより、筋変性疾患が改善されることが判明した。また、TRPV2 に対する機能的抗体を含む特異的阻害候補物質の探索と筋変性疾患モデル動物への適応を試み、TRPV2 活性阻害候補化合物は筋変性疾患の病態改善に有効であることが判明した。

以上述べたように、5 年間の特定領域研究によって、細胞膜プロトンセンサー NHE1、 Ca^{2+} センサー TRPV2、NCS-1、CHP3 の機能と病態解析を推進し、それぞれのセンサー蛋白質に病気の発症とリンクするモダリティが起きていることが明らかとなった。

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 7 件)

- ① Wakabayashi, S., Nakamura, T.Y., Kobayashi, S., Hisamitsu, T.: Novel phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol. Chem.* 285(34): 26652-26661, 2010, 査読あり
- ② Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacqz, J., Wakabayashi, S., Gailly, P.: Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Lett.* 583(22): 3600-3604, 2009, 査読あり
- ③ Cha, C.Y., Oka, C., Earm, Y.E., Wakabayashi, S., Noma, A.: A Model of Na⁺/H⁺ Exchanger and Its Central Role in Regulation of pH and Na⁺ in Cardiac Myocytes. *Biophys. J* 97(10): 2674-2683, 2009, 査読あり
- ④ Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., Wakabayashi, S.: Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum. Mol. Genet.* 18(5): 824-834, 2009, 査読あり
- ⑤ Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 103(8): 891-899, 2008, 査読あり
- ⑥ Hisamitsu, T., Ben Ammar, Y., Nakamura, T.Y., Wakabayashi, S.: Dimerization is crucial for the function of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *Biochemistry* 45(44): 13346-13355, 2006, 査読あり
- ⑦ Ben Ammar, Y., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., Wakabayashi, S.: Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation. *EMBO J.* 25: 2315-2325, 2006, 査読あり

[学会発表] (計8件)

- ① 中村(西谷)友重、アンドレス・ジェロミン、御子柴克彦、若林繁夫: カルシウムセンサーNCS-1は心筋カルシウムシグナルを増強して幼若心筋の心機能亢進および心肥大に寄与する 第88回日本生理学会大会 2011年3月29日 パシフィコ横浜
- ② Wakabayashi, S., Nakamura-Nishitani, Y., Kobayashi, S., Hisamitsu, T.: Newly identified phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1).

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月9日 神戸ポートアイランド

- ③ Wakabayashi, S.: Molecular mechanism for hormonal activation of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) and its consequence in cardiac hypertrophy and heart failure. (Symposium "Sodium homeostasis and cardiac function") ISHR 第20回世界会議 2010年5月13日 京都国際会議場
- ④ Wakabayashi, S., Nakamura-Nishitani, T.Y., Iwata, Y.: Molecular and functional aspects of Na⁺/H⁺ exchanger 1: Relevance in cardiac hypertrophy and heart failure. 第36回国際生理学会 2009年7月30日 京都国際会議場
- ⑤ 中村(西谷)友重、Jeromin, A., 若林繁夫: 新しい心機能調節因子としての Ca²⁺ センサータンパク質 NCS-1 の役割 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月9日 神戸ポートピアホテル
- ⑥ Wakabayashi, S.: Structural and functional aspects of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 and its obligatory binding partner CHP. Experimental Biology Annual Meeting 2007, April 28-May 2 2007, Washington, DC, USA
- ⑦ Nakamura, T., Jeromin, A., Nabekura, J., Wakabayashi, S.: Novel roles of NCS-1, a calcium sensor protein, on neuronal survival and cardiac excitability. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB congress, June 18-23 2006, Kyoto Japan
- ⑧ Iwata, Y., Katanosaka, Y., Wakabayashi, S.: Na⁺/H⁺ exchange inhibitors protect against muscle degeneration in cardiomyopathic hamsters. 26th Annual Scientific Sessions, European Section of the ISHR, June 14-17 2006, Univ. of Manchester, UK

[図書] (計4件)

- ① 岩田裕子、若林繁夫: 筋変性疾患治療に向けた Ca²⁺透過チャネルを標的とした創薬の試み 2010 化学工業 61(4): 40-45, 2010 化学工業社
- ② 中村(西谷)友重、古林創史、久光 隆、岩田裕子、若林繁夫: Na⁺/H⁺交換輸送体: 機能調節と薬物標的としての意義 (創薬研究者必見! -最新トランスポーター研究 2009 遺伝子医学MOOK12: 255-261), 2009 (株)メディカルトゥ
- ③ 若林繁夫、岩田裕子、中村(西谷)友重、

久光 隆、ベンアマー・ヨセフ：Na⁺/H⁺交換輸送体の構造・機能と病態的意義
循環器病研究の進歩(通巻 47 号)
Vol. XXVIII No. 1(2007. 11)：73-82, 2007
協和企画

- ④ 若林繁夫、久光 隆、ユセフ・ベンアマ
ニ、中村(西谷)友重、岩田裕子：動物細胞 Na⁺/H⁺交換輸送体：分子から疾患まで
生化学 79(6)：579-587, 2007

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

①

名称：抗 TRPV2 抗体

発明者：岩田裕子、若林繁夫

権利者：(財)ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特願

番号：2010-016760

出願年月日：2010 年 1 月 28 日

国内外の別：国内

②

名称：TRPV2 の部分ペプチド

発明者：岩田裕子、若林繁夫

権利者：(財)ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特願

番号：2009-186219

出願年月日：2009 年 8 月 11 日

国内外の別：国内

③

名称：目的物質精製用タグおよび精製用タグ
を用いた目的物質の精製方法

発明者：若林繁夫

権利者：(財)ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特願

番号：2007-130239

出願年月日：2007 年 5 月 16 日

国内外の別：国内

④

名称：トランスジェニック非ヒト動物

発明者：岩田裕子、西谷友重、若林繁夫

権利者：(財)ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特願

番号：2007-123514

出願年月日：2007 年 5 月 8 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 繁夫 (WAKABAYASHI SHIGEO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・部長

研究者番号：70158583

(2) 研究分担者 (H18~H21)

岩田 裕子 (IWATA YUKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・室長

研究者番号：80171908

西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・室長

研究者番号：50393244

久光 隆 (HISAMITSU TAKASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・研究員

研究者番号：50327946

ベンアマル ユセフ (BEN AMMAR YOUSSEF)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・流動研究員

研究者番号：90463273

(H19 のみ)

古林 創史 (KOBAYASHI SOUSHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・流動研究員

研究者番号：50511531

(H20~H21)

(3) 連携研究者 (H22)

岩田 裕子 (IWATA YUKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・室長

研究者番号：80171908

西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・室長

研究者番号：50393244

久光 隆 (HISAMITSU TAKASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・研究員

研究者番号：50327946

古林 創史 (KOBAYASHI SOUSHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・流動研究員

研究者番号：50511531

嶋田 直子 (SHIMADA NAOKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子生理部・流動研究員

研究者番号：60600385