

令和元年6月24日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07068

研究課題名(和文) アストロサイトでの重炭酸イオンを介したpH調節の生理的意義について

研究課題名(英文) Roles of the pH regulation through HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters in perisynaptic astrocytes

研究代表者

水谷 顕洋 (MIZUTANI, Akihiro)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30242861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の興奮性シナプスを包囲するアストロサイトの突起先端部分には、脳特異的なSLC4A4遺伝子のsplice variant、NBCe1/Cが発現している。本研究では、この特徴的な局在の制御機構を明らかにし、神経伝達および高次脳機能に及ぼす影響を解析すべく、NBCe1/C分子に結合する分子をスクリーニングしたところ、カルシニューリンが結合することを見出した。また、このカルシニューリンのCa<sup>2+</sup>/CaM phosphatase 活性が、NBCe1/Cの細胞膜移行を調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLC4A4遺伝子、その欠損により精神遅滞を引き起こすこと、また、その発現量と自殺行動との関係が示唆されている。今回の発見は、シナプスを包囲するアストロサイト突起に発現するNBCe1/C(中枢神経系特異的SLC4A4j発現産物)の細胞膜発現が、Ca<sup>2+</sup>シグナル依存的に調節されること示したのである。この発見により、シナプス間隙のpH環境が、神経伝達の状況によってアストロサイトが調節しうる可能性と、SLC4A4が果たす高次脳機能における分子メカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We found that a catalytic subunit of calcineurin binds to the C terminus of NBCe1-C in the mouse cerebellum. Heterologous-coexpression experiments revealed that calcineurin binds to NBCe1-C via a "PQIRIE" motif at its C terminus. The interaction enhanced cell surface expression of NBCe1-C, resulting in an increase of its transporter activity, for which the phosphatase activity of calcineurin was essential. When NBCe1-C was stably expressed in HeLa cells, its cell surface expression was enhanced by an intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration increase and was suppressed by FK506, a specific inhibitor of calcineurin. These mechanisms of surface expression and transport activity of NBCe1-C regulated by the Ca<sup>2+</sup>-CaM-calcineurin axis indicate specialized functions of NBCe1-C in the brain.

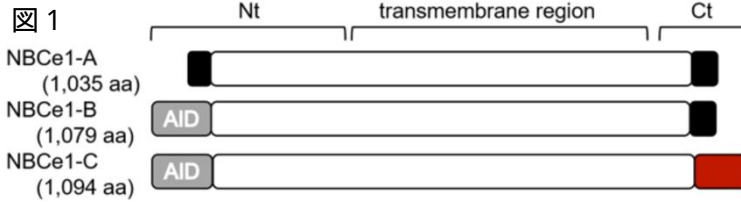
研究分野：神経科学

キーワード：NBCe1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

言うまでもなく、細胞内外の pH 環境は恒常性が保たれている。それには、様々な pH 緩衝系が加担しているが、その中心は、重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) 緩衝系である。SLC4A4 遺伝子産物は、起電性  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体 (NBCe1) で、alternative splicing により、NBCe1-A、NBCe1-B、NBCe1-C の 3 つの産物が存在する (図 1)。Splicing variant によって発現組織が異なり、NBCe1-A は腎臓、NBCe1-B は膵臓を含め種々組織、NBCe1-C はアストロサイトに、それぞれ特異的に発現している。これら NBCe1 の  $\text{HCO}_3^-$  輸送活性が我々身体の健常維持に重要であることは、SLC4A4 遺伝子の欠損家系がヒトで存在し、近位尿細管性アシドーシス、緑内障・白内障などの眼症状、精神遅滞等を呈することから明らかであり、Slc4A4 欠損マウスが近位尿細管性アシドーシスにより、生後 3 週しか生存しないこともこれを支持している。



上述の近位尿細管性アシドーシスは、splicing variants のうち、腎臓近位尿細管に特異的に発現している NBCe1-A の機能不全の結果によるものと考えられるが、精神遅滞等の中枢神経系の症状が、systemic acidosis による二次的なものなのか、それとも、アストロサイトに発現する NBCe1-C の機能不全によるものかは、controversial であり、仮に NBCe1-C の機能不全であるとしても、その発現部位が興奮性シナプスを包囲するアストロサイトの突起部分に集中していることから、シナプス伝達調節と密接な関係があることが示唆されるものの、それが精神遅滞に繋がる分子メカニズムは全く未知であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、アストロサイトに発現している NBCe1-C のシナプス伝達における役割、言い換えれば、シナプス間隙、及びシナプスを包囲するアストロサイト突起部分の  $\text{HCO}_3^-$  濃度調節を介した pH 調節機構が、健全なシナプス伝達維持にどの様に関わっているのかを明らかにするとともに、それが高次脳機能発現・維持に果たす役割をも明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 近位尿細管性アシドーシスを rescue した Slc4A4 遺伝子発現欠損マウスの創出と解析

本研究室は、Slc4A4 遺伝子産物の 516 番目のアミノ酸を non-sense codon に置換したマウス (ヒトの家系では、これにより正常な NBCe1 発現が完全に損なわれ、発病する。) Slc4A4 W516X KI (ノックイン) マウスを保有しているが、本マウスは、上述の通り、重篤な近位尿細管性アシドーシスのため、生後 3 週齢で死亡する。そのため、成獣による高次脳機能の解析は不可能である。そこで、この Slc4A4 W516X KI マウスをバックグラウンドに、NBCe1-A を腎臓近位尿細管に特異的に発現させたマウスを創出すれば、近位尿細管性アシドーシスが rescue された成獣を得ることができ、これを用いて、組織学的、生化学的、電気生理学的、行動学的、各解析を行うことで、目的を果たそうと考えた。

### (2) NBCe1-C の C-末端領域に結合する分子の探索と同定・解析

アストロサイトに特異的に発現する NBCe1-C 分子は、その C 末端領域が、alternative splicing により、NBCe1-A、NBCe1-B とは異なる配列になっている (図 1)。興味深いのは、その C 末端が、“-ETTL” と、PDZ domain 結合モチーフになっていることである。PDZ domain 結合モチーフは、機能的集合体を形成する際の“足場”に利用されるモチーフである。NBCe1-A、NBCe1-B が、前者は腎臓近位尿細管上皮細胞の、後者は膵臓腺房細胞の、それぞれ basolateral membrane に局在するのに対して、NBCe1-C は、アストロサイトという、上皮細胞とは異なる細胞極性を持つ、その突起部分に集中局在しており、これが NBCe1-C のシナプス伝達調節機構に深く関わる可能性があることから、NBCe1-C の C 末領域に結合する分子が NBCe1-C の特異な局在を調節している可能性があると考え、NBCe1-C の C 末端領域を GST 融合タンパク質として発現・精製し、これに結合する分子を、マウス小脳から GST fusion protein pull down assay にて探索した。

## 4. 研究成果

### (1) 近位尿細管性アシドーシスを rescue した Slc4A4 遺伝子発現欠損マウスの創出と解析

まず、トランスジェン作成には、近位尿細管に特異的に発現する、SGLT2 分子の promoter 領域を用いた。実際は、Isabelle Rubera 博士 (University of Nice-Sophia Antipolis) からご供与いただいた。これを用い、以下のトランスジェンを作成した (図 2)。本研究過程中、このトランスジェンを近位尿細管由来の樹立細胞系に導入しても、NBCe1-A の発現が確認できなかったことや、また、海外研究者から、NBCe1-B、NBCe1-C のみの発現を欠損させたマウスを作成したが、離乳後極端に生存率が低下するという学会での報告があったことから、このトランスジェンを用いて rescue マウスを作成する試みを少し躊躇していたため、本 rescue マウスの作成には時間がかかったが、離乳後の生存率低下は、おそらく歯牙の発育不良 (エナメル

質の形成不全)によるところが大きいと考え、rescue マウスの作成を行った。その結果、PCR 上、図 3 に示す様な、トランスジーンを保持するマウスを計 6 系統産出することに成功した。現在、これらマウスが、NBCe1-A 分子を腎臓特異的に発現しているかどうかを、解析中である。

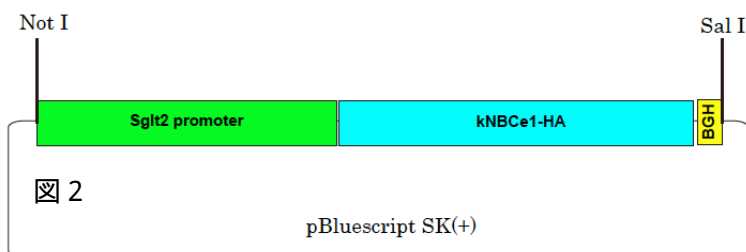


図 2

PCR product size : 3702bp

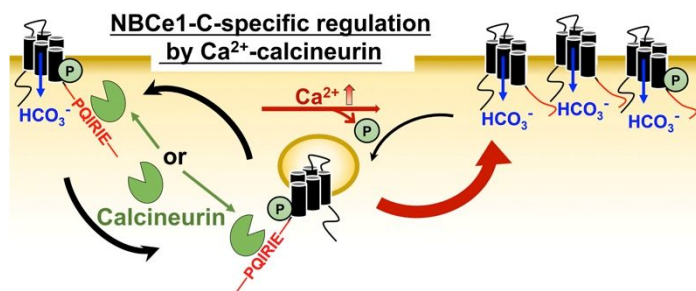


## (2) NBCe1-C の C-末端領域に結合する分子の探索と 同定・解析

NBCe1-C の C 末端領域と GST との融合タンパク質、GST-NBCe1-C/C に結合する分子を探索したところ、分子量 50 kDa のタンパク質が候補分子として単離され、それを LC-MS/MS 解析したところ、下表に示す分子が同定された。予想通り、MAGUK p55 や GOPC など、PDZ domain を有する分子もあったが、Mascot score から、今回単離された分子の主要成分はカルシニューリン (CaN) の catalytic subunit であると判断し、その解析を行ったところ、i) 小脳組織から NBCe1-C と CaN との複合体の存在を免疫沈降にて確認した。ii) NBCe1-C の CaN 結合部位は、NBCe1-C の C 末端領域の “PQIRIE” という 6 アミノ酸配列であり、これは、従来報告されている、CaN の結合配列にマッチした。iii) NBCe1-C と CaN との結合には、CaN の脱リン酸化活性は必要としない。iv) CaN と結合し、おそらく脱リン酸化されることで、NBCe1-C の細胞膜への発現量が増加する。v) Ca<sup>2+</sup>シグナルを介した CaN の活性化に伴い、NBCe1-C の細胞膜への発現量が増加する。以上のことを、heterologous expression system を用いて明らかにした。

Swiss Prot ID	Protein Name	Molecular weights	Mascot score
P2BB_MOUSE	Catalytic subunit of calcineurin beta isoform	59,163	576
PP2BA_MOUSE	Catalytic subunit of calcineurin alpha isoform	58,606	571
MPP6_MOUSE	MAGUK p55 subfamily member 6	62,592	83
GOPC_MOUSE	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	50,631	74
SNTA1_MOUSE	Alpha-1-syntrophin	53,632	59
MPP2_MOUSE	MAGUK p55 subfamily member 2	61,517	46
SNX27_MOUSE	Sorting nexin-27	60,950	35

本研究結果を要約すると、残念ながら、当初の目標であった、アストロサイトでのNBCe1-Cの機能については、rescue マウスの作成が立ち遅れ、その解明には至らなかったが、NBCe1-C の特異な C 末端領域に着目し、その結合分子を同定・解析することで、NBCe1-C の細胞膜発現調節機構の一端を明らかにすることができた。



特に、CaN という Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性のタンパク質脱リン酸化酵素が、NBCe1-C の C 末端領域に結合・脱リン酸化して、その膜発現量を調節するという事実は、シナプスを包囲するアストロサイトの突起部分という、シナプス伝達に応じて Ca<sup>2+</sup> signal が活発に動く場所に、NBCe1-C が集中して存在していることを考えると、刻々と変化するシナプス伝達場の pH 環境をこの CaN との相互作用を介することで NBCe1-C がこれに即応調節している可能性を示唆するものである。

今後は、産出された rescue マウスを用いた個体レベルの実験や CaN と NBCe1-C との相互作用を *in vivo* で解析していくとともに、NBCe1-C の PDZ domain 結合モチーフに結合する分子の同定を進めていくことで、NBCe1-C のアストロサイトでの特異な発現分布調節機構を解明も軸にして、NBCe1-C によるアストロサイトでの pH 環境調節が高次脳機能の発現・維持における役割を明らかにすることを計画している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hasegawa N, Hatano N, Tohyama S, Kita S, Mikoshiba K, Mizutani A., Calcineurin Binds to a Unique C-Terminal Region of NBCe1-C, the Brain Specific Isoform of NBCe1 and Enhances its Surface Expression. *BPB Reports* 2 7-18, 2019 査読あり

Hamada K, Maeda Y, Mizutani A, Okada S., The Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 $\alpha$ /PTEN Signaling Pathway Is Crucial for HIV-1 Entry. *Biol Pharm Bull* 42 130-138, 2019 査読あり

Matsuda S, Tohyama S, Mizutani A., Sex differences in the effects of adult short-term isolation rearing on contextual fear memory and extinction. *Neurosci Lett*. 687 119-123, 2018 査読あり

Kawaai K, Ando H, Satoh N, Yamada H, Ogawa N, Hirose M, Mizutani A, Bonneau B, Seki G, Mikoshiba K., Splicing variation of Long-IRBIT determines the target selectivity of IRBIT family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114 3921-3926, 2017 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

長谷川尚美, 遠山卓, 波多野直哉, 水谷顕洋  
カルシニューリンが脳型 NBCe1 の細胞内局在に与える影響  
第41回日本分子生物学会年会(横浜)2018年11月

長谷川尚美, 遠山卓, 竹中遙菜, 白鳥瞳, 水谷顕洋  
脳型 NBCe1 の細胞内局在に関わる結合分子の役割  
2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸)2017年12月

長谷川尚美, 遠山卓, 白鳥瞳, 竹中遙菜, 森滉貴, 佐藤沙弥香, 波多野直哉, 水谷顕洋  
中枢神経系における NBCe1 の細胞膜輸送に関わる分子について  
第137回日本薬学会年会(仙台)2017年3月

伊藤諒, 濱田浩一, 川崎聡子, 三森阜介, 加藤心一郎, 五月女諒介, 波多野直哉, 御子柴克彦, 水谷顕洋  
AE2/SLC4A2 を介した IRBIT ファミリーによる細胞内 pH 調節は、細胞移動を制御している  
第137回日本薬学会年会(仙台)2017年3月

長谷川尚美, 遠山卓, 森滉貴, 佐藤沙弥香, 竹中遙菜, 白鳥瞳, 水谷顕洋  
アストロサイトにおける脳型 NBCe1 の膜局在に関わる結合分子の役割  
第39回日本分子生物学会年会(神奈川県横浜市パシフィコ横浜)2016年11月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
無し

(2)研究協力者  
研究協力者氏名: 河合 克宏  
ローマ字氏名: (KAWAAI, katsuhiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。