

令和元年5月22日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07075

研究課題名(和文) IRBITファミリーによるpH・塩素イオン濃度制御が神経機能に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Regulation of intracellular pH and chloride changes by IRBIT family in neurons.

研究代表者

河合 克宏 (Kawaai, Katsuhiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00553653

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)：IRBITファミリーのpHおよび塩素イオン濃度制御に関与する新規相互分子を同定し、機能解析を行った。その結果、IRBITファミリーはAnion Exchanger 2/3およびAno1と相互作用し、その活性を制御することを明らかにした。IRBIT欠損神経細胞はpHおよび塩素イオン濃度変化に異常がある事がわかった。IRBITファミリーは様々な標的分子と結合する多機能性タンパク質であることから、IRBITファミリーの標的分子選択性に関して解析を行い、IRBITおよびLongIRBITのsplicing variantsは異なる発現分布、タンパク質安定性、標的分子親和性を示す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

IRBITファミリーの標的分子選択機構の一つとして、スプライシングによる部分配列変化とヘテロ多量体形成の組み合わせによる多様性という新たな制御機構を示した。このことは、様々な分子と相互作用することで多様な生命現象に寄与する多機能性分子が、いかにして標的分子を選択し、適切な生命活動を担うのかという分子生物学の本質的問いに新たな知見を与えるものと考えられる。また、AEは原発性胆汁性肝硬変や尿生殖路の自己免疫疾患、QT短縮症候群や白内障との関連が報告されている。CaCCに関しては前頭洞癌との関連が報告されており、これら疾患の発症機序解明の新たな糸口となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified anion exchanger (AE) and calcium dependent chloride channel (CaCC) as novel IRBIT family interacting molecule and found that IRBIT family regulates the activity of AE and CaCC. IRBIT, Long-IRBIT, AE, and CaCC were expressed in hippocampal neurons. We also found that the intracellular pH and chloride changes were impaired in hippocampal neurons, which were derived from IRBIT or Long-IRBIT knockout mouse. In addition, we found that IRBIT and Long-IRBIT splicing variants formed heteromultimers and N-terminal variation of Long-IRBIT by splicing affected protein stability and target selectivity. Thus, N-terminal variation of IRBIT family members mediates the regulation of multiple signaling pathways.

研究分野：神経化学

キーワード：IRBIT LongIRBIT pH 塩素イオン Splicing variants 多機能性蛋白質 神経可塑性

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

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の pH は生体内で産生される二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) が重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) に変換され、細胞膜上に存在する輸送体により出入りすることでダイナミックに変化している。イオン輸送体による pH 制御は、膵臓における重炭酸イオン分泌を介した胃酸の中和や、腎臓における血中 pH 制御等重要な役割を担っており、血中 pH 異常は、その影響を受けやすい眼球において緑内障、白内障や角膜障害などの異常を引き起こすことが知られている。

神経細胞やグリア細胞といった中枢神経系においても、神経活動に伴う細胞内カルシウム変化と細胞内 pH 変化は密接に関わっている。

神経活動において、ポストシナプスでは NMDA 受容体等を介したカルシウム流入や小胞体上の  $\text{IP}_3$  受容体を介したカルシウム放出により細胞内カルシウム上昇が誘導され、種々のシグナル伝達を担っている。持続的な細胞内カルシウム上昇は細胞にとって非常に毒性が高いため、通常細胞膜上の PMCA や小胞体上の SERCA といったカルシウムポンプにより直ちに排出される。この際、カルシウムポンプ活性に伴う細胞内  $\text{H}^+$  の上昇が起こり、細胞内 pH の酸性化が起こる (図 1)。

細胞内の持続的な酸性化もまた、細胞にとって毒性があるため、中和により細胞内 pH を中性に戻す機能を担っている分子の一つが  $\text{Na-HCO}_3$  共輸送体 (NBC1) である (Svichar N *et al.* 2011, *J Neurosci.*)。

神経細胞において NBC1 は細胞内に  $\text{Na-HCO}_3$  を輸送することで上昇した  $\text{H}^+$  を中和して中性に戻すだけでなく、神経活動に伴い一時的に細胞内 pH をアルカリ性にシフトさせることが観察されている (depolarization induced alkalization / DIA) (図 1)。この一過性のアルカリ化の生理的意義については、未解明な点が多いが NMDA 受容体に代表される pH 感受性蛋白質の活性制御を介して神経可塑性等の神経機能に寄与しているのではないかと考えられている (Mitchell Chesler, *Physiol Rev*, 2003)。

NBC1 は N 末端と C 末端の選択的スプライシングにより、3 種類の splicing variants が存在する (図 2)。N 末端が特異的な kNBC1 は主に腎臓で発現しており構成的活性化型で、重炭酸イオンの再吸収等に寄与している。膵臓型の pNBC1 はこれまで Oocyte 等に発現させても活性が極めて低く、その活性化機構は不明だった。

我々は、小胞体膜上のカルシウムチャネルである  $\text{IP}_3$  受容体から放出される分子として発見した IRBIT が pNBC1 に結合しその活性を著しく上昇させることを明らかにした (Shi rakabe K *et al.* 2006, *PNAS*)。また、IRBIT は NBC1 に加えて、NHE3, CFTR, Slc26a6, NBCn1/2, Slc4a8/NDCBE といった様々な pH 調節に関わるイオン輸送体を制御していることがわかってきた。よって、IRBIT は pH 制御のマスター調節因子と考えられる。

## 2. 研究の目的

細胞内 pH 調節は細胞内塩素イオン濃度とも共役関係にあり、細胞内塩素イオン濃度は、抑制性神経伝達である  $\text{GABA}_A$  受容体が過分極により神経活動を抑制する強さを決める重要な因子であり、IRBIT は pH および塩素イオン濃度制御を介して、興奮性および抑制性の両面から、神経

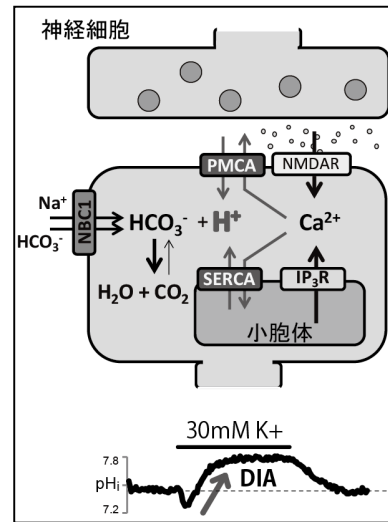


図 1 神経活動に伴う pH 変化とその制御

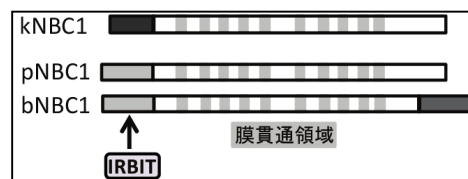


図 2 NBC1 splicing variants

伝達を調節し、神経機能に重要な役割を担っている可能性が考えられる。また、IRBIT はカルシウムイオンチャネルである IP<sub>3</sub>R を始め、mRNA 成熟に関わる CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) 複合体や、神経可塑性等に寄与する CaMKII 等を制御することもわかっており、標的分子を変えることで様々な生命現象に寄与する多機能性タンパク質である。そこで、本研究課題においては、IRBIT およびその相同分子である LongIRBIT がいかにして標的分子を選択するのか、また、脳神経系においてどの様に pH および塩素イオン濃度を制御し神経機能に寄与するのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) IRBIT ファミリーによる標的分子制御機構の解明

IRBIT ファミリーの生体内における発現分布を調べるため、マウス各組織における遺伝子発現量を定量 PCR 法により解析した。次に COS-7 細胞および HeLa 細胞発現系を用いて IRBIT ファミリーのタンパク質の安定性をタンパク分解系阻害剤およびタンパク質合成阻害剤により調べた。さらに、細胞株発現系と共免疫沈降法により、IRBIT ファミリーのヘテロ多量体形成能を検証した。IRBIT ファミリーと標的分子 (IP<sub>3</sub>R、NBCe1、Fip1L、CaMKII $\alpha$ 、NHE3) の結合親和性を共免疫沈降法または Pull down アッセイにより評価した。IRBIT ファミリー過剰発現が標的分子の活性に及ぼす効果を検証するため、IP<sub>3</sub>R 活性を生細胞カルシウムイメージング、NBCe1 および NHE3 活性を pH イメージング、CaMKII 活性を FRET イメージングにより検討した。

#### (2) IRBIT ファミリーと Anion Exchanger (AE)2/3 の結合および活性に及ぼす効果の評価

マウス胃抽出物より、免疫沈降法および質量分析により IRBIT ファミリーの新規相互作用分子を同定した。IRBIT ファミリーと新規相互作用分子である AE2/3 の結合を細胞株発現系と共免疫沈降法により検証した。次に、AE2/3 部分欠損タンパク質を発現するための発現ベクターを構築し、細胞株発現系により IRBIT ファミリー結合部位に関する検討を行った。また、AE2/3 と IRBIT ファミリーの細胞内局在を免疫染色法により検討した。また、AE2/3 の細胞表面への表出を表面ビオチン化法により調べた。AE3 活性への IRBIT ファミリーの効果を生細胞 pH イメージングおよび、細胞内塩素イオン FRET イメージングにより解析した。

#### (3) IRBIT ファミリーによる Ano1 および細胞内塩素イオン濃度制御に関する解析

IRBIT ファミリーと Ano1 の結合を COS-7 細胞発現株および共免疫沈降法により検討した。次に IRBIT ファミリー過剰発現が Ano1 活性に及ぼす効果を塩素イオン濃度に応じて変化する FRET プローブ (SuperClomeleon) を用いた細胞株の生細胞イメージングにより検討した。海馬神経細胞における IRBIT ファミリーおよび標的分子の発現を、初代培養マウス海馬神経細胞を用いた免疫染色法により解析した。IRBIT または LongIRBIT ノックアウトマウス由来の初代培養神経細胞を作成し、細胞内塩素イオンイメージングにより、検討した。刺激条件として外液塩素イオン濃度変化に対する応答および、GABA 依存性の細胞内塩素イオン変化を用いた。IRBIT 欠失がマウスの海馬神経機能に及ぼす効果を検証するため、IRBIT ノックアウトマウス由来海馬切片を用いた電気生理学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) IRBIT ファミリーによる標的分子(NBC1, IP3R etc)の制御機構

IRBIT には高い配列保存性を有する相同遺伝子があり、我々は N 末端により長い特異的配列が付加されていたことから LongIRBIT と命名した(Ando H et al. JNC 2009)。近年ヒトの網羅的遺伝子発現解析の結果、LongIRBIT には N 末端の異なる splicing variant が存在することがデータベース上で明らかとなり、実際、申請者はマウスにおいて相同する splicing variant (3 or 4)のクローニングに成功した(図3)。

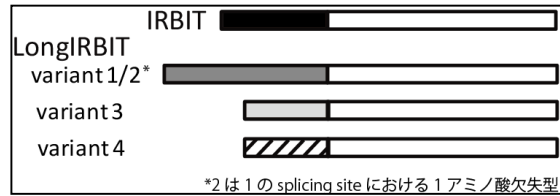


図3 LongIRBIT splicing variants

IRBIT および LongIRBIT の splicing variants はマウスの様々な組織において、異なる発現パターンを示し、特に脳神経系においては、発達段階において splicing variants の発現パターンが変化することがわかった。IRBIT および LongIRBIT の splicing variants は細胞株過剰発現系および胃組織抽出物において、ヘテロ多量体を形成することもわかった。さらに、申請者は細胞内における各 splicing variants の蛋白質安定性を調べた結果、splicing variants によりタンパク質の安定性が異なることを発見した。次に、細胞株を用いた結合実験において、IRBIT および LongIRBIT splicing variant 標的分子に対して異なる結合親和性を示すこともわかった。IRBIT ノックアウト細胞株および胃の一次培養細胞を用いて、IRBIT ファミリーの発現が標的分子の活性に与える影響を評価した所、IRBIT および LongIRBIT splicing variants により異なる影響を示すことがわかった。これらのことから、LongIRBIT splicing variants が IRBIT ファミリーの多機能性を発揮する制御機構の一端を担っていることを明らかにした(Kawai K et al. 2017, PNAS)。

##### (2) IRBIT ファミリーによる Anion Exchanger 2/3 の制御

我々は IRBIT ファミリーが発現する胃組織抽出物から新規 IRBIT 結合蛋白質を共免疫沈降法および質量分析により探索したところ、新規 IRBIT ファミリー結合分子として Anion Exchanger (AE) 2 および AE3 を同定した。AE2/3 への IRBIT および LongIRBIT スプライシングバリエーションの結合および活性制御への寄与について解析を進めた結果、IRBIT および LongIRBIT のスプライシングバリエーションは、AE2/3 に対して異なる結合親和性を示すことを見出した。さらに、AE3 部分欠損タンパク質を発現する遺伝子発現ベクターを作成し、細胞株を用いた共免疫沈降法により解析した結果、IRBIT ファミリー結合部位が AE3 の N 末端細胞内部位の複数の領域にわたることが分かった。このことは、IRBIT ファミリーと AE3 が立体的な結合面を形成していると考えられ、IRBIT ファミリーと AE3 の比較的強固な結合の理由と推測される。また、IRBIT ファミリーの中で AE3 に対して最も親和性の高い LongIRBIT variant 3 (LongV3)は、過剰発現により AE3 の細胞内局在に影響を与え、細胞表面に存在する AE3 の量を減少させることを表面ピオチン法により明らかにした。また、細胞内部に取り込まれた AE3 と LongV3 の複合体は、初期エンドソームのマーカースと共局在することがわかった。さらに、LongV3 の過剰発現系と細胞内 pH イメージおよび細胞内塩素イオンイメージングにより、LongV3 の過剰発現が、AE3 の活性を有意に低下させることがわかった。これらの結果から、LongV3 は AE3 細胞内局在を介して AE3 の活性調節に寄与することを明らかにした。

##### (3) IRBIT ファミリーによる Ano1 および細胞内塩素イオン濃度制御

我々は IRBIT ファミリーの新規相互分子として塩素イオンと重炭酸イオンの交換体である

Anion Exchanger 2/3 (AE2/3)を同定し、特に LongIRBIT variant 3 が AE3 の活性制御に寄与することを明らかにした。IRBIT ファミリーが AE3 の活性を制御することに加えて、IRBIT が塩素イオンチャネルである CFTR の活性を制御することから、IRBIT ファミリーと細胞内塩素イオン濃度制御に着目した。IRBIT ファミリーの相互作用分子である IP3 受容体および CFTR との相互作用が報告されていたカルシウム依存性塩素イオンチャネル TMEM16A/Ano1 に注目し、IRBIT ファミリーとの相互作用を検討したところ IRBIT ファミリーと Ano1 が結合することを見出した。さらに細胞内塩素イオン変化を観察可能な FRET プローブを用いて Ano1 依存性の塩素イオン濃度変化をライブセルイメージングで検討した。その結果、IRBIT ファミリーの過剰発現が Ano1 依存性の塩素イオン濃度変化に影響を及ぼすことがわかった。さらに、IRBIT が発現している海馬神経細胞には LongIRBIT および相互作用分子である AE3、Ano1、Slc4a8、NBCe1-C といった pH および塩素イオン濃度制御に関わる分子が発現していた。IRBIT または LongIRBIT のノックアウトマウス由来海馬神経細胞においては、外液塩素イオン濃度変化に対する応答および、GABA 依存性の細胞内塩素イオン濃度変化に異常がみられた。以上のことから、定常的な細胞内塩素イオン濃度に寄与する AE3 に加えて、細胞活動依存的な塩素イオン濃度変化に寄与する Ano1 の活性を介して、IRBIT ファミリーが細胞内 pH および塩素イオン濃度を制御している可能性が示唆された。さらに、IRBIT 欠失が神経細胞機能に及ぼす影響を評価するため IRBIT ノックアウトマウスの電気生理学的解析を進めた結果、定常状態での神経伝達には顕著な違いは見られなかったが、特定の条件下において IRBIT ノックアウトマウスは僅かだが、有意に長期可塑性に異常があることを明らかにした。我々は IRBIT ノックアウトマウスが行動異常を示すことを報告してきた(Kawaai K et al. 2015, PNAS)。今後は IRBIT による pH および塩素イオン濃度制御と神経伝達異常および行動異常の関連に関してより詳細に解析し、IRBIT ファミリーによる pH・塩素イオン濃度制御が神経機能に果たす役割を明らかにしていきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Edamoto M, Kuroda Y, Yoda M, Kawaai K, Matsuo K. Trans-pairing between osteoclasts and osteoblasts shapes the cranial base during development. **Scientific Reports**. 査読あり, 9, 2019, 1956. doi: 10.1038/s41598-018-38471-w.

(2) Matsuo K, Ji S, Miya A, Yoda M, Hamada Y, Tanaka T, Takao-Kawabata R, Kawaai K, Kuroda Y, Shibata S. Innervation of the tibial epiphysis through the intercondylar foramen. **Bone**. 査読あり, 120, 2018, 297-304. doi: 10.1016/j.bone.2018.11.007.

(3) Ando H, Kawaai K, Bonneau B, Mikoshiba K. Remodeling of Ca<sup>2+</sup> signaling in cancer: Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through oncogenes and tumor suppressors. **Adv Biol Regul**. 査読あり, 68, 2018, 64-76. doi: 10.1016/j.jbior.2017.12.001.

(4) 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**. 査読あり, 114, 2017, 3921-3926. doi: 10.1073/pnas.1618514114.

(5) Bonneau B, Ando H, Kawaai K, Hirose M, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K. IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. *Elife*. 査読あり, 2016, pii: e19896. doi: 10.7554/eLife.19896.

〔学会発表〕(計 3件)

(1) 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. 第60回日本神経化学学会大会 2017年

(2) Bonneau B, Ando H, Kawaai K, Hirose M, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K. IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. Gordon Research Conference 2017年

(3) Bonneau B, Ando H, Kawaai K, Hirose M, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K. IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. 第39回日本分子生物学会年会 2016年

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。