

令和元年5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19493

研究課題名(和文)足場タンパクに着目した薬物輸送トランスポーターの細胞膜局在における概日リズム制御

研究課題名(英文) Study on molecular mechanism for scaffold protein-regulated circadian localization of transporters on plasma membrane by

研究代表者

小柳 悟 (Koyanagi, Satoru)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60330932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜上へのトランスポーターの局在が、「足場タンパク質」によって24時間周期で変動(概日リズム)するメカニズムを解明した。足場タンパク質のひとつであるSodium hydrogen exchanger 3 regulator factor-1 (NHERF1)の発現は、肝臓、腎臓、小腸などにおいて概日リズムを示し、そのリズムは体内時計を構成する時計遺伝子によって制御されていた。また、NHERF1の発現リズムは脂肪酸輸送トランスポーター(FATP5)の膜局在に影響を及ぼし、その輸送活性に時刻依存的な変動を引き起こしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズムは個々の細胞レベルで発振され、それらが互いに同調することで組織・臓器・個体としての概日リズムを刻む階層的構造によって成立している。細胞は外部からの「情報・刺激の感受」「栄養成分の取込み」「老廃物の排泄」などを繰り返しながら恒常性を維持しているが、これら細胞機能は主に受容体、チャネル、トランスポーターなどによって制御される。NHERF1はトランスポーター以外にも複数の受容体やチャネルと結合することも見出されていることから、NHERF1による膜タンパク質の局在リズムは、薬物治療への応用のみならず、病態の解明や生命現象の理解などにもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A number of diverse cell-surface proteins are anchored to the cytoskeleton via scaffold proteins. Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 (NHERF1) functions as a scaffold protein, which is implicated in the regulation of membrane expression of various cell-surface proteins. In this study, we demonstrated that the components of circadian clock (clock genes) regulated the transcription of NHERF1, thereby generating diurnal accumulation of NHERF1 in the mouse liver. The results of immunoprecipitation experiments and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of mouse liver revealed that NHERF1 time-dependently interacted with fatty acid transport protein-5 (FATP5). Temporary accumulation of NHERF1 protein stabilized plasmalemmal localization of FATP5, thereby enhancing hepatic uptake of fatty acids at certain times of the day. This machinery contribute to diurnal changes in the ability of hepatic cells to uptake fatty acids.

研究分野：時間薬剤学

キーワード：足場タンパク質 トランスポーター 概日リズム 時計遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

受容体、チャネル、トランスポーターなど膜タンパクの多くは安定的に発現し、その半減期も数日に及ぶと考えられている。しかし、それらの所見は主に培養細胞を用いた実験から導き出されたものであり、生体内ではこれら膜タンパク質の発現や機能に約 24 時間周期の変動(概日リズム)が観察される場合がある。特に薬物輸送に関わるトランスポーターの膜発現リズムは、吸収、排泄、病巣部位への分布などにも影響を及ぼすため、その機構の解明は薬物治療の最適化や新たな製剤設計にも繋がるのが期待される。

2. 研究の目的

従来までに明らかにされてきたトランスポーターの発現リズム制御メカニズムは、主に転写やタンパクの分解過程で生じる概日リズムに起因するものであったが、一般に、膜タンパクの発現はそれを下支えする「足場」を必要とする。「足場タンパク質」は、複数の膜タンパク質と複合体を形成することにより、それらの細胞内局在やシグナル伝達を効率化させる。これまでに 20 種類以上の足場タンパク質が同定されており¹⁾、その多くが PDZ や SH3 などタンパク質同士の結合に関わる複数のドメインを有している。足場タンパク質はトランスポーター、受容体、チャネルなどを細胞内の適切な位置に配置させ、それらの発現を下支えするが^{2, 3)}、神経細胞などでは受容体刺激後のシグナル伝達経路の混線を防ぎ、細胞内のシグナル調節においても重要な役割を果たしている⁴⁾。

我々は肝臓、腎臓、小腸などで 24 時間周期の発現変動(概日リズム)を示す足場タンパクを同定し、このタンパクによって細胞内での足場形成に概日リズムが生じることで、トランスポーターなどの細胞膜上への局在が時刻によって変動するのではないかと仮設のもと分子生物学的側面から検討を行った。本研究では足場タンパクを基軸にトランスポーターの膜局在が時刻依存的に変動するメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

足場タンパク質の発現リズム制御機構の解析

自由摂食・摂水、明暗周期(明期:7:00-19:00)環境下で飼育した野生型および時計遺伝子 *Period2* の変異(*Per2^{m/m}*)マウスから肝臓、腎臓、小腸を 9:00、13:00、17:00、21:00、1:00、5:00 に採取し、mRNA およびタンパク質の抽出を行った。これら mRNA とタンパクを対象に各足場タンパク質の発現リズムの有無について、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて検討した。また、発現に概日リズムが認められた足場タンパクについては免疫組織染色法によって、より詳細な発現リズムの解析を行った。

発現に概日リズムが認められた足場タンパク質の 5' 上流域をクローニングし、レポーターベクターを作成してその転写活性に及ぼす時計遺伝子産物の影響を検討した。また、転写活性調節領域の DNA 断片を用いたクロマチン免疫沈降法によって、時計遺伝子と相互作用する転写因子(p65)の結合リズムを測定した。

足場タンパク質と時刻依存的に結合するトランスポーターの同定と膜局在の概日リズム評価

明暗周期環境下で飼育した野生型マウスの肝臓から明期または暗期の 2 時点において膜画分を調整し、概日リズムを示す足場タンパクに対する抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたサンプルは SDS-PAGE にて分離し、バンド強度に時刻依存的な差異が認められる部分を対象にペプチドマスフィンガープリント法で解析を行い、足場タンパクの発現リズムに応じて時刻依存的に結合する膜タンパクの同定を行った。

Per2^{m/m} マウスの肝臓におけるトランスポーター膜局在の時刻変動の評価

野生型マウスの肝臓において、足場タンパクの発現リズムに応じて時刻依存的に結合する膜タンパクに対して、その膜局在と機能が時計遺伝子の変異(*Per2^{m/m}*)マウスでどのように変化するか検討を行った。膜局在の概日リズムはウエスタンブロット法および免疫組織染色法を用いて測定した。また、同定したトランスポーター(FATP5)の輸送活性は放射標識したオレイン酸を用いて行った。

4. 研究成果

足場タンパク質 NHERF1 の発現リズム制御

足場タンパク質のなかで Sodium hydrogen exchanger 3 regulator factor (NHERF)には4つのサブタイプが同定されており(図1)これらはMRP2、organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2)、organic cation/carnitine transporter (OCTN2)などの薬物の輸送に関わるトランスポーターの細胞膜での発現安定化に参与している⁵⁻⁷⁾。NHERF1は、PDZドメインを介してトランスポーターなどの膜タンパク質と結合し、NHERF1とNHERF2においては、C末端側にEZRINやLIMA1などのリンカータンパク質と結合するEBドメインが含まれている、EZRINは細胞骨格とNHERFとの結合を補助し、LIMA1は細胞骨格を形成するフィラメントと結合する細胞膜の形態保持において重要な役割を果たしている、NHERFのなかで肝臓、腎臓、小腸上皮細胞などにおけるNHERF1の発現には有意な概日リズムが認められた。

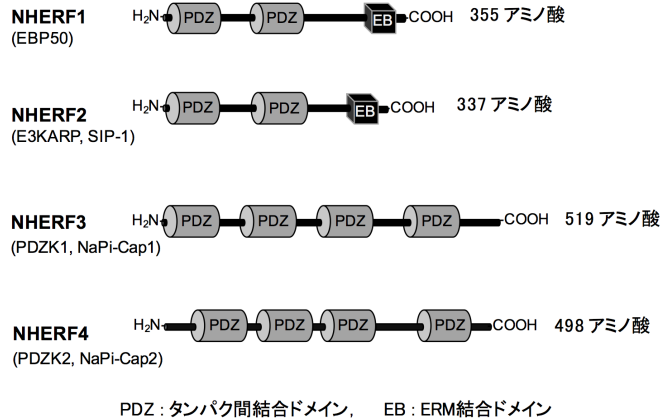


図1 足場タンパク質NHERFの種類と構造

NHERF1は*Slc9a3r1*遺伝子によってコードされる。ルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降による解析の結果、本遺伝子の発現はp65タンパクによって活性化され、その転写活性は時計遺伝子産物のPER2によって周期的に抑制されることが明らかになった(図2左)。また、*Period2*(*Per2*)遺伝子の機能不全マウス(*Per2^{fl/fl}*マウス)は、このような転写抑制機構が破綻しているため、NHERF1の発現リズムは消失し、その発現量はいずれの時刻においても高値を示した(図2右)。

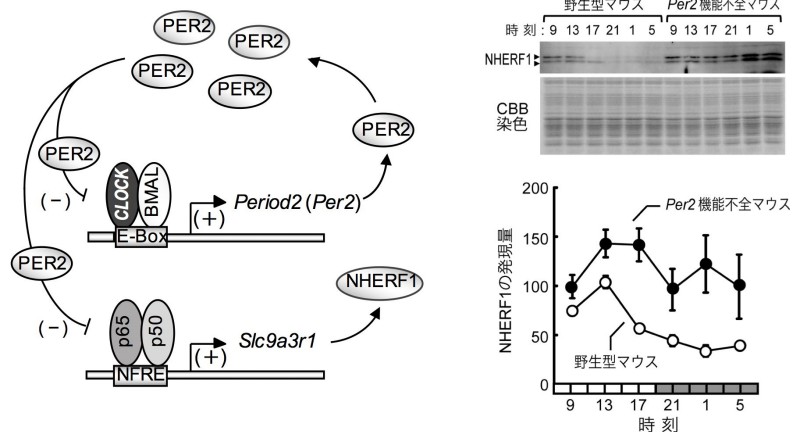


図2 NHERF1の発現リズム制御メカニズム

左) 概日時計機構による*Slc9a3r1*遺伝子の発現リズム制御

右) *Per2*機能不全マウスの肝臓におけるNHERF1の発現リズムの変化。図の縦軸は野生型マウスのピーク値を100とした場合の相対値を示す。

足場タンパク質によるトランスポーターの細胞膜局在における概日リズム制御

マウスの肝臓を対象に、NHERF1によって細胞膜上での発現が下支えされる膜タンパク質を解析したところ、複数のトランスポーターが同定された。その中で*Slc27a5*遺伝子によってコードされる脂肪酸輸送トランスポーター fatty acid transport protein 5 (FATP5)は、NHERF1の発現リズムに応じて細胞膜上での発現が概日リズムを示した。FATP5のmRNAと細胞全体でのタンパクの発現量は、いずれも一日を通じて大きな変動を示さなかったが、FATP5の細胞膜への局

在には概日リズムが認められた。また、基質となる脂肪酸（オレイン酸）の取込みも FATP5 膜局在のリズムと対応した概日変動を示し、その取込み量は時刻によって 1.5～2 倍ほど変動した。さらに、培養したマウス由来の肝細胞に NHERF1 を強制発現させたところ、細胞全体での FATP5 の発現量には変化は認められなかったが、細胞膜への FATP5 の局在は有意に増加し、オレイン酸の取り込み量も増大した。

これらの所見は、NHERF1 の発現量の変動によって膜タンパク質の発現を下支えする「足場」の形成に概日リズムが引き起こされることを示唆しており（図 3）、従来までの「遺伝子の転写」や「タンパク質の分解」に加え、足場タンパク質による局在過程においてもトランスポーターの細胞膜上での発現に概日リズムが引き起こされることが明らかになった。

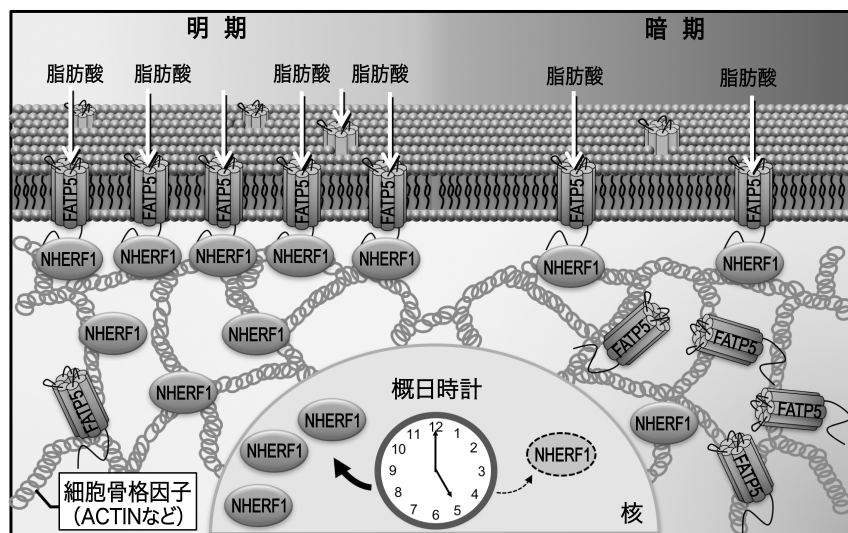


図 3 NHERF1 による FATP5 の細胞膜局在リズムの制御

足場形成における概日リズム制御の生理的意義

NHERF1 は FATP5 以外にも複数の膜タンパク質と結合していた。そのため、細胞全体では発現量に概日リズムが認められないトランスポーターも細胞膜上での発現には時刻による変動が引き起こされている可能性がある。一方、マウスの肝臓における脂肪酸の代謝は休息期（明期）から活動期（暗期）にかけて上昇するが、この時間帯は NHERF1 の発現量の増加と FATP5 の細胞膜上への局在が亢進する時刻と連動していた。このような分子間でのリズムの同調は、肝臓での脂肪酸代謝における一連のカスケードをより効率的に進行させると考えられ、同様の現象は糖代謝やアミノ酸代謝に関わる酵素の発現リズムにも認められている⁸⁾。このような現象から、生体は複数の生理機能の概日リズムを調和させることで、生命活動の効率化や恒常性の維持に務めていると考えられた。

<引用文献>

- 1) Langeberg LK, Scott JD. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 232-244 (2015).
- 2) Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* **378**, 85-88 (1995).
- 3) Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-3231 (2001).
- 4) Zheng Y, Zhang C, Croucher DR, Soliman MA, St-Denis N, Pasculescu A, Taylor L, Tate SA, Hardy WR, Colwill K, Dai AY, Bagshaw R, Dennis JW, Gingras AC, Daly RJ, Pawson T. Temporal regulation of EGF signalling networks by the scaffold protein Shc1. *Nature* **499**, 166-171 (2013).
- 5) Zheng J, Chan T, Cheung FS, Zhu L, Murray M, Zhou F. PDZK1 and NHERF1 regulate the function of human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) by modulating its subcellular trafficking and stability. *PLoS One* **9**, e94712 (2014).

- 6) Kato Y et al., Kato Y, Sai Y, Yoshida K, Watanabe C, Hirata T, Tsuji A. PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* **67**, 734-743 (2005).
- 7) Li M, Wang W, Soroka CJ, Mennone A, Harry K, Weinman EJ, Boyer JL. NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function. *J Biol Chem* **285**, 19299-19307 (2010).
- 8) Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307-320 (2002).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Tsurudome Y, Koyanagi S, Kanemitsu T, Katamune C, Oda M, Kanado Y, Kato M, Morita A, Tahara Y, Matsunaga N, Shibata S, Ohdo S; Circadian clock component PERIOD2 regulates diurnal expression of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 and its scaffolding function. *Sci Rep* 8:9072, 2018.
2. 鶴留優也, 小柳 悟; 足場タンパク質によるトランスポーター細胞膜局在の概日リズム制御. *ファルマシア*, 55(4): 325-329, 2019.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Koyanagi S, Chronopharmacology based on circadian clock-regulated xenobiotic transporters. *2018 International meeting on 22nd MOD and 33rd Annual Meeting of JSSX*. 2018, Oct., Kanazawa.
2. Koyanagi S, Quality use of medicines based on the circadian rhythms of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Kyushu University-University of Malaya Pharmacy Joint Symposium*. 2018, Nov., Malaysia (Kuala Lumpur).
3. Koyanagi S, Circadian clock regulation of intra-individual variations in drug disposition; Translational research of Chrono-pharmacokinetics, *International Conference of Precision Medicine*, 2017.Nov, Taiwan (Taipei).

〔図書〕(計 1 件)

1. 小柳 悟, 大戸茂弘; 概日時計の医療への応用, 山口大学時間学研究所 監修 時間学の構築 III ヒトの概日時計と時間, 恒星社厚生閣, 171-192, 2019.

〔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

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-27280-w>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 鶴留優也

ローマ字氏名: TSURUDOME YUYA

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。