

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590971
 研究課題名 (和文) 蛋白質間相互作用によるナトリウム重炭酸共輸送体機能修飾の意義
 研究課題名 (英文) Functional NBCe1 regulation by proteins' interaction
 研究代表者 山田 秀臣 (YAMADA HIDEOMI)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：60396752

研究成果の概要 (和文) : NBC1 (NBCe1) は細胞内の重炭酸濃度を調整することで細胞内外の pH を調整している重要な輸送体の一つである。この機能異常は生命の危険にさらされるほど重い、近位尿細管性アシドーシスを引き起こすだけでなく、重度の眼症状の帯状角膜症、白内障、緑内障に罹患して失明に至る患者も多い。また当該患者の中に高率に片頭痛を引き起こしていた。今回 NBC1 は脳内のグリア細胞に発現し、NBC1 はシナプス間隙の pH を一定にすることで neurotransmitter の正常な伝達を助けており、膜発現を欠如する NBC1 変異を持つ患者群は NBC1 の機能消失から間隙の pH 低下が継続するため、異常シグナル発生し、片頭痛が起こると報告した。この報告以外にも NBC1 の SNP の中に機能低下するものを認めることを報告した。この意義について NBC1 は二量体として膜発現をするが、我々が示した片頭痛の発症機序は二量体の正常な NBC1 の膜移動を阻害する Dominant Negative 効果を来す変異体も存在する。NBC1 の SNP により、同時に NBC1 の機能低下と Dominant Negative を起こせば hetero 変異でも Common Disease の一つである片頭痛を発症させる可能性を示した。

研究成果の概要 (英文) : NBC1 (NBCe1) belongs to bicarbonate transporter family (SLC4). This transporter plays an important role of adjusting the intracellular and/or extracellular pH to maintain the concentration of bicarbonate. The dysfunction of NBC1 brings on several and severe symptoms enough to threaten the life. This disease causes not only severe proximal renal tubular acidosis, but also symptoms of severe ocular-abnormalities (band-keratopathy, cataract, and glaucoma). Some patients suffering from these abnormalities develop blindness. They also have a high rate of migraine occurrence. Because NBC1 presents in the glia cells of the brain, NBC1 must work and maintain pH of the synaptic cleft. As NBC1 controls activities of neurotransmitters by pH in the cleft, the NBC1 mutants, which dose not express in the membrane, can not control right stable pH of the synaptic cleft. Because low pH of the cleft induces the abnormal signal of neurotransmitters, patients must have such a migraine. In addition, we reported that among several NBC1 SNPs, K558R had less activity of NBC1. NBC1 works on the membrane as a dimeric form. We also showed some of NBC1 mutants exert dominant negative effects on the wild-type NBC1. This fact raises a possibility that SNPs of NBC1 may cause migraine. The investigation of NBC1 may help further clarify the pathogenesis of migraine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：NBC1 (NBCe1), RTA

1. 研究開始当初の背景

NBC1 には SLC4A4 遺伝子に由来する腎型輸送体 kNBC1 および腭型輸送体 pNBC1 という 2 つの N 末スプライスヴァリエントがあり、それぞれ異なる生理的役割を担っている。すなわち kNBC1 は主に腎近位尿細管基底側膜に存在しこの部位からの重炭酸再吸収を司っている。一方、pNBC1 は腭臓、眼および脳内に広く分布し、腭液への重炭酸分泌ならびに細胞内 pH 調節などを担っている。申請者らは NBC1 変異により眼症状を伴う近位尿細管性アシドーシスが生じることを世界に先駆けて報告し (Nature Genet 23:264, 1999)、NBC1 の生理的および病態生理的意義を確立してきた (JCI 108:107, 2001, AJP 284:C729, 2003)。NBC1 の構造と機能に関する知見が蓄積されるにつれ、NBC1 の多彩な生理的・病態生理的役割には NBC1 単独分子の機能変化だけでなく、蛋白質間相互作用による機能修飾機構が深く関与することが明らかになってきた。一例をあげると kNBC1 と pNBC1 は N 末の 40-80 個程度のアミノ酸が異なる配列を持つ以外は完全に同一であるが、従来このように相同性が高い NBC1 ヴァリエントが何故大きく異なる生理機能を持つのか不明であった。このことに関連して申請者らは IP₃ 受容体結合蛋白として同定されていた IRBIT 蛋白 (JBC 278:10602, 2003) が、pNBC1 の特異的サブユニットとして働くという画期的な知見を報告している (PNAS 103:9542, 2006)。

2. 研究の目的

Na-HCO₃ 共輸送体 NBC1 は酸塩基平衡、体液量および細胞内 pH 調節など多岐にわたる生体の恒常性維持機構の中で特に重要な役割を担っている輸送体である。NBC1 分子同士の相互作用に加えて IRBIT アイソフォームの蛋白と NBC1 との相互作用が NBC1 機能を修飾し、NBC1 の多彩な生理的および病態生理的作用に大きな影響を与えることが示唆された。この蛋白質間相互作用を介した NBC1 機能調節機構の持つ意義を酸塩基平衡の維持や血圧調節機構、さらには片頭痛発症機序などに関連づけながら明らかにする目的であった。またヒトにおいても脳内特異的な NBC1 である bNBC1 をクローニングし、ラットとの差異を確認するとともにその機能、組織的特徴を検討した。

更に NBC1 の SNP の中でアミノ酸変異を生むものが 2006 年当時 4 カ所報告されていた。この変異体の機能解析を行い、NBC1 の機能低

下等異常の有無を確認した。

3. 研究の方法

NBC1 野生型の C 末に Myc-His タグを挿入したコンストラクトを作成し、各種変異体については GFP 融合コンストラクトを作成し、MDCK 細胞およびラット C6 グリオーマ細胞などに発現させる。既に報告した方法に従い (JASN 2005, PNAS 2006, Pflugers Arch 2007)、細胞膜マーカーや細胞内微小器官に対する特異的抗体染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により各変異体の細胞内発現部位を同定する。次に同様の手法で野生型と変異体の共発現実験を行い、Dominant Negative 作用の有無について検討した。またこれらの細胞抽出液を回収して免疫沈降法を用いて解析を行い、NBC1 分子同士の結合を確認した。一方、Dominant Negative 作用が確認された変異体と野生型 NBC1 については単独および両方を安定発現する細胞株を樹立し、この細胞株を用いて細胞内 pH 測定実験を行い、細胞膜 NBC1 活性を測定した。pNBC1 同士、kNBC1 同士の組み合わせに加えて、pNBC1-kNBC1 の組み合わせにおいても実験を行い NBC1 ヴァリエントの間で Dominant Negative 作用に差は認めないことを確認した。

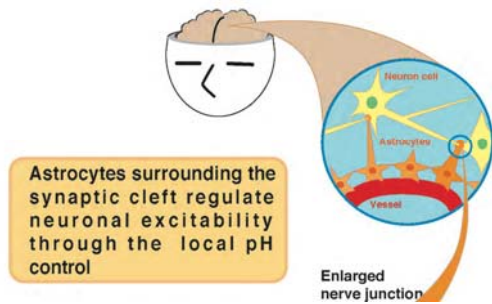
またヒトグリオーマ細胞から NBC1 ヴァリエントである脳型 NBC、bNBC1 のクローニングを行った。この bNBC1 の C 端部は kNBC1 や pNBC1 と異なっていたが N 端部は pNBC1 と共通であった。よって IRBIT による活性を *Xenopus* Oocyte による発現実験をおこなった。その他、組織染色により脳内における bNBC1 の発現部位を検討、特異的抗体を用いた免疫組織学的解析や Western blot 法などを用いて比較検討した。グリア細胞の Bergmann 細胞のシナプス接合部で IRBIT の共発現の有無を確認した。

更に SNP として報告されている E122G, S356Y, K558R, N610I の変異体を作成して *Xenopus* Oocyte による発現と電気生理的機能解析や MDCK 細胞による局在の変化の有無を検討とした。

4. 研究成果

NBC1 の機能異常が片頭痛を引き起こす：申請者らが報告している遺伝性近位尿細管性アシドーシス症例で、膜発現を欠くタイプの

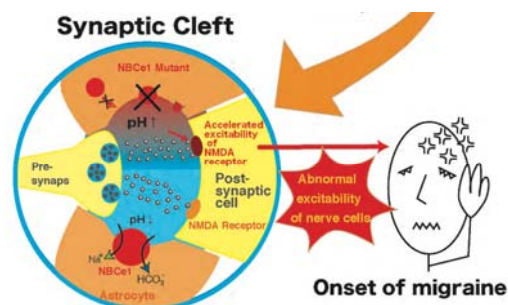
NBC1 ホモ接合体変異全例が片頭痛を合併していた。NBC1 は脳内のシナプス結合部の星状細胞に発現している。NBC1 の細胞膜発現に異常があると星状細胞内への重炭酸流入が欠



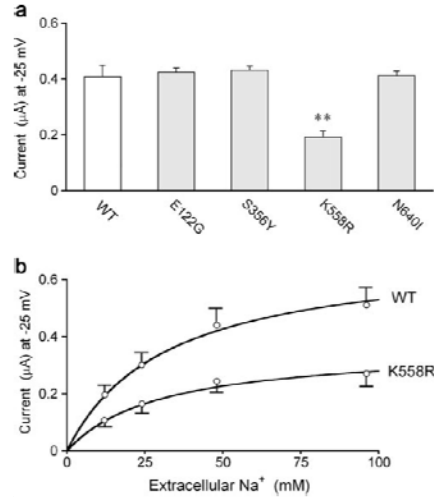
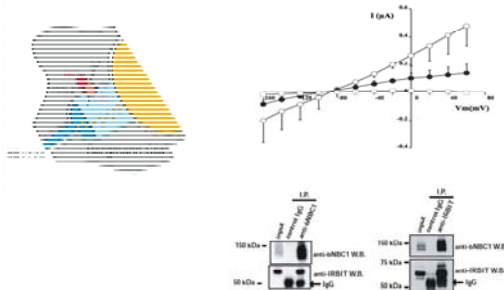
損するため神経細胞の異常興奮が引き起こされると考えた。C6 グリア細胞を用いた実験で NBC1 は二量体を形成しており、膜発現を欠く変異体と野生型を共発現させると NBC1 の機能低下を確認した。また共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内 NBC1 発現分布の実験でも膜発現を欠く変異型との共発現で細胞内に野生型 NBC1 が留まっているのが確認できた。以上のことから変異体 NBC1 では野生型の膜発現の低下を起こす Dominant Negative 効果により片頭痛が起こりうる可能性を証明し、新たな片頭痛発症機序を報告した (PNAS, 107, 15963-15968, 2010)。今後は家族性の片頭痛の家系の遺伝子解析を行う予定である。

図 片頭痛発症のメカニズム (仮説図)

またヒト bNBC1 をクローニングして輸送活性を *Xenopus* Oocyte を用いて測定した。kNBC1、および pNBC1 とのコンストラクトを比較の上、電気生理学的な検討を行った。bNBC1 は pNBC1 と同様に IRBIT により輸送活性が増強されることを確認した (下右上図)。免疫沈降で bNBC1 と IRBIT の結合を確認している (下右下図)。また bNBC1 の脳内発現を免疫染色等



で確認したところ Bergmann 細胞に発現していた。現在以上のデータをまとめ、論文投稿準備中である



更に SNP として報告している変異体の機能解析を行った。K558R は *Xenopus* Oocyte の蛋白発現を検討したところ機能が 40-47% の低下を認めた。この機序は MDCK 細胞による局在の検討から特に膜移送の問題は認めず、次図に示すように輸送機能そのものの低下であることを示した。

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 11 件)

- ① Lo Y, BS, Yang S, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Fujita T, MD, Usui T, Tsai J, Yu I, PhD6, Lin S, Lin S: Severe Metabolic Acidosis Causes Early Lethality in NBC1 W516X Knock-in Mice as a Model of Human Isolated Proximal Renal Tubular Acidosis. *Kidney Int*, 査読有、79, 730-741, 2011
- ② Yamada H, Horita S, Suzuki M, Fujita F, Seki G: Functional role of a putative carbonic anhydrase II-binding domain in the electrogenic $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Channels*, 査読有、5:2, 1-4, 2011
- ③ Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, Seki G, Fujita T: Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the electrogenic $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1A. *Pflugers Arch*, 査読有、461: 249-259, 2011

- ④ Suzuki M, Paesschen WV, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, Jonghe PD, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, Mikoshiba M, Shimadzu M, Shiohara M, Braverman N, Al-Gazali L, Fujita Y, Seki G: Defective membrane expression of the $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Proc Natl Acad Sci U S A、査読有、107: 15963-15968, 2010
- ⑤ Jutabha P, Anzai N, Kitamura K, Taniguchi A, Kaneko S, Yan K, Yamada H, Shimada H, Kimura T, Katada T, Fukutomi T, Tomita K, Urano W, Yamanaka H, Seki G, Fujita T, Moriyama Y, Yamada A, Uchida S, Michael F. Wempe MF, Endou H, Sakurai H. Human sodium-phosphate transporter 4 (hNPT4/ SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. J Biol Chem、査読有、285: 35123-32, 2010
- ⑥ Seki G, Yamada H, Li Y, Horita S, Ishizaka N, Koike K and Fujita T: Roles of MEK/ERK pathway in vascular and renal tubular actions of angiotensin II. Vascular Disease Prevention、査読有、6, 154-159, 2009
- ⑦ Suzuki M, Vaisbich M, Yamada H, Horita S, Li Y, Sekine T, Moriyama N, Igarashi T, Endo Y, Cardoso T, de Sá L, Koch H, Seki G, Fujita T: Functional analysis of a novel missense NBC1 mutation and of other mutations causing proximal renal tubular acidosis. Pflugers Arch、査読有、455:583-593, 2008
- ⑧ Li Y, Yamada H, Kita Y, Kunimi M, Horita S, Suzuki M, Endo Y, Shimizu T, Seki G, Fujita T: Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ transport. J Am Soc Nephrol、査読有、19: 252-259, 2008
- ⑨ Seki G, Yamada H, Li Y, Horita S, Suzuki M, and Fujita T: The Roles of Abnormal Renal Sodium Handling in Hypertension Associated with Metabolic Syndrome. Current Hypertension Reviews、査読有、4: 197-202, 2008
- ⑩ Seki G, Yamada H, Horita S, Suzuki M, Sekine T, Igarashi T and Fujita T: Activation and Inactivation Mechanisms of Na-HCO_3 Cotransporter NBC1. J Epithelial Biology and Pharmacology、査読有、1: 35-39, 2008
- ⑪ Li Y, Yamada H, Kita Y, Suzuki M, Endo Y, Horita S, Yamazaki O, Shimizu T, Seki G, Fujita T: Arachidonic acid metabolites inhibit the stimulatory effect of angiotensin II in renal proximal tubules. Hypertension Res、査読有、31: 2155-2164, 2008
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 山崎 修、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木正志、関 常司、藤田 敏郎: NBC1 の SNP 変異 K558R は機能低下型変異である。第 53 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月 16 日 神戸
- ② 山崎 修、Lo Yi-Fen、白井 雅弓、山本明子、Song Ying、石黒 洋、Yang Sung-Sun、Lin Shih-Hua、堀田 晶子、山田 秀臣、関 常司、藤田 敏郎: NBC1W516X ノックインマウスによる NBC1 生理的機能の解析、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日 神戸
- ③ 堀田 晶子、山崎 修、山田 秀臣、鈴木正志、遠藤 陽子、関 常司、藤田 敏郎: インスリン抵抗性におけるインスリンの近位尿細管作用、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日 神戸
- ④ 白井 雅弓、山崎 修、山田 秀臣、堀田晶子、鈴木 正志、榎本 裕、久米 春喜、本間 之夫、関 常司、藤田 敏郎: アンジオテンシン II はヒト近位尿細管 NBC1 活性を濃度依存的に亢進させる、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日 神戸
- ⑤ 山崎 修、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木正志、関 常司、藤田 敏郎: NBC1 の SNP 変異 K558R は機能低下を呈する、第 5 回トランスporter 研究会年会 2010 年 7 月 10 日 東京
- ⑥ 山崎修、Lo Yi-Fen、白井雅弓、山本明子、Song Ying、石黒洋、Yang Sung-Sun、Lin Shih-Hua、堀田晶子、山田 秀臣、関 常司、藤田敏郎: NBC1 W516X ノックインマウスを用いた NBC1 の生理機能解析、第 5 回トランスporter 研究会年会、2010 年 7 月 10 日 東京
- ⑦ 関 常司、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木正志、藤田 敏郎: NBC1 の病態生理学的意義とヴァリアント特異的調節機構、第 52 回日本腎臓学会学術総会、2009 年 6 月 4 日 横浜
- ⑧ 山田 秀臣、永吉 旭土、水谷 顕洋、安東 英明、御子柴 克彦、堀田 晶子、鈴木 正志、関 常司、藤田 敏郎、第 52 回日本腎臓学会学術総会、2009 年 6 月 3 日 横浜
- ⑨ 鈴木 正志、山田 秀臣、堀田 晶子、山崎 修、関 常司、藤田 敏郎: NBC1C 未欠損体は ER に留まり dominant negative 作用を有する、第 52 回日本腎臓学会学術総会、2009 年 6 月 5 日 横浜
- ⑩ 山崎 修、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木正志、関 常司、藤田 敏郎: NBC1 の SNP

変異体の解析、第 52 回日本腎臓学会学術
総会、2009 年 6 月 4 日 横浜

- ⑪ 関 常司、堀田 晶子、鈴木 正志、山田 秀臣: 近位尿細管性アシドーシス研究の現状と課題。第 44 回日本小児腎臓学会学術集会、2009 年 6 月 26 日 東京
- ⑫ Seki G, H Yamada: Physiology and pathophysiology of Na-HCO₃ cotransporter NBC1. The Journal of Physiological Science Vol 58 Suppl, S22, 日本生理学会シンポジウム、2008 年 3 月 25 日、東京
- ⑬ 遠藤 陽子、山田 秀臣、李 月紅、鈴木 正志、山崎 修、門脇 孝、関 常司、藤田 敏郎: PPARg/EGFR/ERK 経路を介したチアゾリンの近位尿細管作用、第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 6 月 1 日 福岡
- ⑭ 山田 秀臣、永吉 旭士、水谷 顕洋、安東 英明、御子柴 克彦、関 常司、藤田 敏郎: ヒト脳型 NBC1 の存在と IRBIT による活性化。IRBIT アイソフォームによる pNBC1 の活性調節、第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 6 月 1 日 福岡

(国際学会)

- ① Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Seki G, Fujita T: Functional analysis of SNP mutations leading to single amino acid substitution in NBCe1. Annual Meeting of American Society of Nephrology. (Denver, USA, November 16-21, 2010)
- ② Suzuki M, Seki G, Horita S, Yamada H, Igarashi T, Fujita T: Defective membrane expression of Na-HCO₃ cotransporter NBCe1 is associated with migraine. Annual Meeting of American Society of Nephrology. (Denver, USA, November 16-21, 2010).
- ③ Yamada H, Horita S, Suzuki M, Seki G: Functional comparison of NBC1 variants expressed in Xenopus oocytes. World Congress of Nephrology 2009. (Milan, Italy, May22-26, 2009).
- ④ Suzuki M, Horita S, Van Paesschen W, Yamada H, Bergmans B, T Sekine T, Igarashi T, Seki G, Fujita T: NBC1 mutations showing defective plasma membrane expression cause pH dysregulation in astrocytes and are associated with migraine. ISN Frontier 2009 (Florence, Italy, September 17-20, 2009)
- ⑤ Yamada H, Nagayoshi A, Mizutani A, Ando H, Mikoshiha K, Horita S, Suzuki M,

Seki G, Fujita T: Identification of human brain type NBC1 and its regulation by IRBIT. ISN Frontier 2009 (Florence, Italy, September 17-20, 2009)

- ⑥ Seki G, Endo Y, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Kadowaki T, Fujita T: Pioglitazone stimulates renal proximal transport through PPARg-dependent non-genomic pathway. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2008. (Philadelphia, USA, November 4-9)
- ⑦ Suzuki M, Horita S, Van Paesschen W, Yamada H, Bergmans B, T Sekine T, Igarashi T, Seki G, Fujita T: NBC1 mutants showing defective plasma membrane expression are associated with migraine. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2008, (Philadelphia, USA, November 4-9)

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 山田 秀臣、関 常司: 近位尿細管性アシドーシスとアンモニア排泄。腎と透析 Vol 67, 53-55, 2009 (東京医学社)
- ② 堀田 晶子、関 常司、山田 秀臣: 近位尿細管機能異常。改訂第 7 版内科学書 391-393, 2009 (中山書店)
- ③ 関 常司、堀田 晶子、山田 秀臣: 腎尿細管性アシドーシス。改訂第 7 版内科学書 396-398, 2009 (中山書店)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 秀臣 (YAMADA HIDEOMI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60396752

(2) 研究分担者

関 常司 (GEORGE SEKI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30206699

(3) 連携研究者

()
研究者番号：