

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659046

研究課題名（和文） 生理活性脂質によるトランスポーター・チャネルの制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism for regulation of ion transporter and channel by bioactive lipids

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・研究所・部長

研究者番号：70158583

研究成果の概要（和文）：Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE1)のホルモンによる活性化は、脂質結合ドメインの lipid-switch 機構で起こることが判明した。すなわち、このドメインは ATP、酸性リン脂質、DAG（あるいは強力なアナログである phorbol ester）などが結合し、結果として起こる LID の構造変化によって NHE1 活性が制御されることがわかった。また、NHE1 の活性化は、NHE1 に直接結合するカルシニューリンおよびその下流の NFAT 経路を促進することも判明した。

研究成果の概要（英文）：We found that NHE1 activation by hormones occurs via the lipid-interacting domain (LID) which functions as a molecular switch. ATP, acidic phospholipids or diacylglycerol (or its potent analogue phorbol ester) directly binds to LID and modulate the NHE1 activity via conformational change of LID. In addition, NHE1 activation was found to promote calcineurin-NFAT signaling pathway via direct interaction of calcineurin with NHE1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	480,000	3,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜、チャネル、トランスポーター、受容体、細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質はリセプター刺激によって活性化される PLC によって、Ca<sup>2+</sup>シグナルを惹起する IP<sub>3</sub> と蛋白質キナーゼ C(PKC)を活性化するジアシルグリセロール(DAG)に分解される。他方、PIP<sub>2</sub>は多くの膜蛋白質に直接結合することによって機能制御（多くの場合、活性化）を行うことが報告

されてきた。また最近、DAG が直接作用してチャネル活性を制御する例も知られるようになった。すなわち PIP<sub>2</sub>や DAG は膜蛋白質の直接的な生理活性脂質であることが明らかになりつつある。そのような膜蛋白質の代表的な例として Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)が挙げられる。

NHE (特に普遍型 1 型アイソフォーム NHE1) は私達が長年その構造・機能研究において世界をリードしてきたトランスポータである。主として **phorbol ester** (強力な DAG アナログ) の作用に基づき、NHE1 は PKC 標的であると信じられてきた。しかし NHE1 は PKC でリン酸化されないことから、NHE1 の活性調節には他のメカニズムが関与することが示唆された。NHE1 制御には膜直下領域 (**lipid-interacting domain, LID** と略記する) が必須であり、このドメインと脂質や ATP などのリガンドとの相互作用について詳細な検討を行い、活性化の機構を明らかにすることをめざした。

## 2. 研究の目的

- (1) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体 (NHE1 アイソフォーム) の活性制御にはフォスファチジルイノシトール-2 リン酸 (PIP<sub>2</sub>) 結合ドメインを含む膜直下領域 (LID) が重要である。その領域が他のリン脂質や **phorbol ester** をも結合するという思わぬ発見に基づき、これまでの常識である PKC によるリン酸化ではなく、NHE がこれら脂質との直接結合によって活性化されるのではないかという仮説を検証する。
- (2) 予備実験の結果、プロテインキナーゼの ATP 結合ドメインと相互作用する **staurosporine** が NHE1 の活性調節を強く抑制するということがわかっている。そこで、NHE1 が ATP 結合蛋白質であるかどうか、また ATP と LID との相互作用があるかを検証し、NHE1 の ATP 要求性のメカニズムを明らかにする。
- (3) さらに、NHE 構造を安定化させる脂質因子を探索し、これまで困難であった NHE の結晶構造解析へと展開する。
- (4) また研究の進展によっては、一般的に他のイオントランスポータ・チャネルの PIP<sub>2</sub> 結合部位近傍がそうした種々の生理活性脂質をも結合しうる "lipid switching" ドメインとして機能するかどうかを検証する。
- (5) NHE1 の新規結合蛋白質を同定し、ホルモンによる NHE1 活性調節との機能連関を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) プラスミドコンストラクトは、ヒト NHE1 をコードする cDNA を用いて、主として PCR を用いて定法に従って行った。NHE1 欠損細胞の培養、プラスミドトランスフェクション、細胞内 pH 測定も定法に従った。
- (2) コンフォーカル蛍光顕微鏡観察は、無蛍光

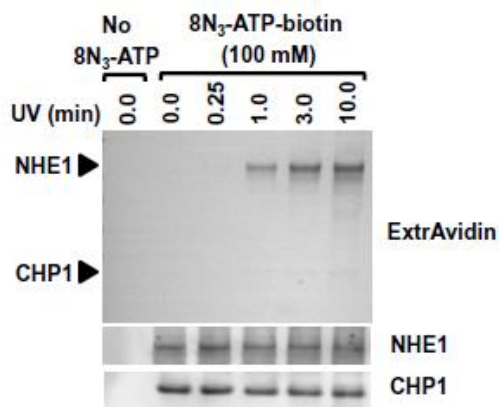
ガラスをコートしたディッシュに培養した細胞を用いた。

(3) SF9 からの蛋白質精製は、バキュロバイラスを精製したのち、SF9 に感染させ、アフィニティークラムを用いて行った。光親和性標識は蛋白質と 8-azido-ATP を接触させて、UV 照射して行った。

(4) その他の方法はすべて定法に従った。

## 4. 研究成果

- (1) NHE1 の 60 残基ほどからなる LID (aa 542-598) には PMA などのホルボールエステル (PEs) あるいはジアシルグリセロール (DAG) が直接結合することが判明した。これらの相互作用の結果として形質膜酸性リン脂質への結合が増強され、何らかの構造変化を伴って細胞内 H<sup>+</sup> 親和性の増大が起こると考えられた。すなわち、ホルモンによる NHE1 の活性化は PKC によるものではなく、PIP<sub>2</sub> ブレイクダウンによって生成される DAG の直接結合によると考えられる。LID は PE/DAG のみならず様々な脂溶性因子を broad specificity で結合することが示唆された (J. Biol. Chem., 2010)。(目的 1 に対する成果)
- (2) NHE1 の新しい結合蛋白質として Ca<sup>2+</sup> 依存性脱リン酸化酵素であり、心肥大のシグナル因子として知られるカルシニユリン (CaN) を発見した。CaN は NHE1 の細胞質ドメインの PIVITD というモチーフに結合することがわかった。NHE1 がホルモンによって活性化され、局所 pH が増加することで CaN が活性化され、転写因子 NFAT の核移行と心肥大関連遺伝子の発現増強が起こるという新しいシグナル系の存在が明らかになった (Mol. Cell. Biol., 2012)。(目的 5 に対する成果)
- (3) NHE1 活性には ATP が必要であり、この ATP 要求性には LID が必要である。しかし、そのメカニズムは明らかでない。SF9 から精製した NHE1 とそのサブユニット CHP1 との複合体標品を用いた光親和性試薬 8-azido-ATP との反応により、NHE1 が ATP 結合蛋白質でありことが判明した (図)。トロンビンによる限定分解、変異導入、平衡透析の方法によって、ATP 結合は LID で起こることがわかった (FEBS Journal, 2013)。(目的 2 に対する成果)
- (4) あらゆる手段を駆使して、NHE1 の X 線構造解析に適した蛋白質の精製を進め、比較的安定な LID と CHP1 との複合体の精製に成功した。結晶化に向けた萌芽の結果になると思われる。また、脂質との相互作用が報告されているイオンチャネルを多数クローニングし、目的達成に向けて始動している。(目的 3 および目的 4、に対する萌芽的成果)



## 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 10 件)

- ① Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY: Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in health and disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 査読有(2013) in press  
DOI:10.1016/j.yjmcc.2013.02.007
- ② Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S: Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is an ATP-binding protein. **FEBS J.** 査読有 280, 2013, 1430-1442  
DOI:10.1111/febs.12138
- ③ Fukuda H, Hirata T, Nakamura N, Kato A, Kawahara K, Wakabayashi S, Chang M-H, Romero MF, Hirose S: Identification and properties of a novel variant of NBC4 (Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transporter 4) that is predominantly expressed in choroid plexus. **Biochem. J.** 査読有 450, 2013, 179-187  
DOI:10.1042/BJ20121515
- ④ Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S: Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage. **Muscle & Nerve** 査読有 47(3), 2013, 372-378  
DOI:10.1002/mus.23632
- ⑤ Nakamura TY, Wakabayashi S: Diverse functions of neuronal calcium sensor-1(NCS-1) in excitable cells. **Trends in Cell & Molecular Biology** 査読有 Vol.7, 2012, 99-110  
<http://www.researchtrends.net/tia/title.asp?id=55>
- ⑥ Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. **Mol.**

**Cell Biol.** 査読有 32(16), 2012, 3265-3280  
DOI:10.1128/MCB.00145-12

⑦ Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T: Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. **J Biol. Chem.** 査読有 287(28), 2012, 23852-23863  
DOI:10.1074/jbc.M111.328708

⑧ Nakamura TY, Wakabayashi S: Role of neuronal calcium sensor-1 in the cardiovascular system. **Trends Cardiovasc. Med.** 査読有 22(1), 2012, 12-17  
DOI:10.1016/j.tcm

⑨ Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S: Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca<sup>2+</sup> signals. **Circ. Res.** 査読有 109(5), 2011, 512-523  
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.248864

⑩ Wakabayashi S, Nakamura TY, Kobayashi S, Hisamitsu T: Novel phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. **J Biol. Chem.** 査読有 285(34), 2010, 26652-26661  
DOI:10.1074/jbc.M110.130120

[学会発表] (計 17 件)

- ① 久光 隆 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 はその細胞質領域の PVITID 配列に直接結合したカルシニューリンを介して下流の NFAT 活性を増幅する 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 28 日 タワーホール船堀
- ② Shimada-Shimizu N et al.: Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is an ATP-binding protein; a possible mechanism for ATP requirement of transport activity. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology 2013 年 1 月 22 日 名古屋大学
- ③ 古林創史 他: カルシニューリン B 様蛋白質 CHP3 による GSK3β の活性調節メカニズムの解明 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場
- ④ 久光 隆 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体によるカルシニューリン-NFAT シグナル増幅: 結合モチーフ PVITID 配列の変異解析 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場
- ⑤ 嶋田-清水直子 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 の活性調節をブロックする阻害剤の活性-構造相関 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場
- ⑥ 若林繁夫: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体による心肥大

カルシウムシグナルの制御 生体機能と創薬シンポジウム2012 2012年8月31日 神戸学院大学

⑦若林繁夫: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 近傍の local pH をモニターする蛍光プローブの作成 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 松本市総合体育館

⑧久光 隆: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 はカルシニューリンとの直接結合を介して NFAT 経路を活性化する 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 松本市総合体育館

⑨久光 隆: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 はカルシニューリンとの結合を介して下流の NFAT 活性を増幅する 第85回日本薬理学会年会 2012年3月15日 国立京都国際会議場

⑩嶋田直子 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 は ATP 結合トランスポータか? 第84回日本生化学会大会 2011年9月23日 京都国際会議場

⑪久光 隆 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE1)の活性化による心肥大シグナル増幅機構 第84回日本生化学会大会 2011年9月21日 京都国際会議場

⑫若林繁夫 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の活性調節における生理活性脂質の役割 第88回日本生理学会大会 2011年3月28日 パシフィコ横浜

⑬Wakabayashi S et al.: Newly identified phorbol ester-binding motif mediates hormonal activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1). 第83回日本生化学会大会 2010年12月9日 神戸ポートアイランド

⑭久光 隆 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体は tail 領域を介して下流の脱リン酸化酵素カルシニューリン活性を増幅する 第83回日本生化学会大会 2010年12月9日 神戸ポートアイランド

⑮嶋田直子 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 の活性化だけを選択的に阻害する薬剤のスクリーニング 第83回日本生化学会大会 2010年12月8日 神戸ポートアイランド

⑯若林繁夫 他: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体は生理活性脂質およびホルボールエステルとの直接的相互作用を介して活性化される 第87回日本生理学会大会 2010年5月21日 盛岡市民文化ホール

⑰Wakabayashi, S: Molecular mechanism for hormonal activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) and its consequence in cardiac hypertrophy and heart failure. (Symposium “Sodium homeostasis and cardiac function”) 国際心臓研究学会 第20回世界会議 2010年5月13日 京都国際会議場

[図書] (計4件)

①西谷(中村)友重 他: 子どもの心臓収縮と心肥大を調節する新しい制御蛋白質 NCS-1 循環器病研究の進歩(通巻52号) Vol.XXXIII No.1(2012.11)、2012、46-55

② Iwata Y et al.: Abnormal Ion Homeostasis and Cell Damage in Muscular Dystrophy. InTech, “Muscular Dystrophy (ed. by M. Hegde/A. Ankala)”, 2012, pp143-158

③若林繁夫 他: 輸送体結合蛋白質の同定と複合体の構造解析、京都廣川書店、“トランスポートソームの世界 編: 金井好克、竹島浩、森 泰生、久保義弘”、2011、414-420

④岩田裕子 他: 筋変性疾患治療に向けた Ca<sup>2+</sup>透過チャネルを標的とした創薬の試み 化学工業社、化学工業 61(4)、2010、40-45

## 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・研究所・分子生理部・部長

研究者番号: 70158583

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

久光 隆 (HISAMITSU TAKASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号: 50327946

(H22-23)

嶋田-清水 直子 (SHIMADA-SHIMIZU NAOKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号: 60600385

(H22-23)