

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390046

研究課題名(和文) 脂質シグナルによるイオン輸送体の活性制御機構とその構造基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for regulation of ion transporter via lipid signaling and its structural basis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：形質膜イオン輸送体は多くのシグナルによって巧妙に制御されるが、その破綻は様々な病気を悪化させる。本研究では、動物細胞Na⁺/H⁺交換輸送体NHE1制御機構を詳しく解析した。NHE1はATP結合蛋白質であり、NHE1活性はATPの直接結合によって維持されることが判明した。さらに、NHE1のホルモンによる活性化は、NHE1の脂質結合ドメインにDAGなどの生理活性脂質が結合し、ATPに代わって形質膜との親和性が増加することによって起こることを明らかにした。また、NHE1の活性化はNHE1に直接結合するカルシニユリンを介して、その下流の転写因子NFATへのシグナルを増幅できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Although plasma membrane ion transports are delicately controlled by many signals, its breakdown contributes to exacerbation of various diseases. In this research, we studied in details about the regulatory mechanism of mammalian Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, which was unknown until now. We found that NHE1 is an ATP binding protein, and that NHE1 activity is maintained by direct binding of ATP. Furthermore, hormonal activation of NHE1 was found to occur by the switching mechanism between ATP and bioactive lipids (diacylglycerol, etc.) via lipid-interacting domain of NHE1. Moreover, activation of NHE1 was found to amplify the NFAT signaling via calcineurin which directly interacts with NHE1.

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：トランスポータ 生理活性脂質 結晶構造 創薬 細胞内イオン制御

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質の一つ、フォスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸(PIP₂)は、リセプターシグナリングに伴って生成されるジアシルグリセロール(DAG)、イノシトール 3-リン酸の原料脂質であるだけでなく、トランスポーターやチャネルの直接的な制御因子にもなることが 20 年ほど前に初めて明らかにされた。それ以降、PIP₂と相互作用する膜蛋白質が相次いで報告され、現在では 30 を超える数の蛋白質がリストアップされている。多くの場合、脂質結合部位は膜貫通ヘリックスを含むイオン輸送を担うドメインと親水性の細胞質ドメインをつなぐインターフェイス領域に位置し、構造基盤を含めた解析が遅れており、脂質結合による活性制御の分子機序はほとんど理解されていない。PIP₂で活性化される代表的なトランスポーターとしては、動物細胞に広く発現する Na⁺/H⁺交換(NHE)および Na⁺/Ca²⁺(NCX)交換輸送体が挙げられるが、その制御機構の全容は不明である。NHE(特に普遍型 1 型アイソフォーム NHE1)は申請者らが長年その構造・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ーである。NHE1 は生理的には細胞内 pH、Na⁺濃度、細胞容積を調節するが、その制御破綻は心臓病や癌の増悪に寄与する。私達は最近 NHE1 の過剰な活性化が心肥大・心不全を起こす Ca²⁺シグナルを惹起するのに充分であることを示した。生理的・病態的に重要なことは、NHE1 があらゆる種類の液性因子、機械刺激などに反応して活性化されることであるが、分子機構は不明である。しかし、ホルモンによる活性化については protein kinase C(PKC)の強力なアクチベータ phorbol ester(強力な DAG アナログ)によって NHE1 が強く活性化されることから、厳密な証明もないまま「NHE1 は PKC を介して活性化される」という説が受け入れられてきた。私達は最近、NHE1 の活性化は PIP₂結合部位を含む約 60 残基ほどの膜直下領域(lipid-interacting domain, LID と呼ぶことにする)に phorbol ester/DAG が直接結合し、その結果形質膜との相互作用が増強することによって起こるといふ説を発表した。特に興味深いのは、phorbol ester(PMA など)膜透過性 DAG アナログ OAG、リセプターアゴニストを添加すると、GFP 蛍光ラベルした LID が細胞膜に集積するという現象である。同様の現象は PKC の phorbol ester 結合ドメイン(C1 ドメイン)においてもよく知られている。すなわちこれらの結果は、phorbol ester/DAG 結合によって LID の何らかのダイナミックな構造変化が起こり、PIP₂や PS などの酸性リン脂質への親和性増加が起こることを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NHE1 の最重要ドメインである LID の機能と構造を明らかにすることである。具体的には、(1)形質膜に発現する NHE

アイソフォーム(NHE1-NHE5)のホルモン、phorbol ester、浸透圧変化などによる活性調節の多様性が LID と脂質あるいは脂溶性因子との相互作用の違いに立脚するという仮説を検証する。(2)NHE1 が「ATP 結合蛋白質」であることを確定し、なぜ NHE1 活性に ATP が必要なのかを明らかにする。(3) staurosporine や phorbol ester の化学構造に基づき、インシリコとバイオアッセイを用いて、NHE1 の“活性化だけ”を阻害する薬物をスクリーニングする。得られた化合物による心疾患病態改善効果を調べる。(4)浸透圧変化に反応して生成する脂質を同定し、その LID との相互作用が NHE1 活性化に関与するかどうかを明らかにする。(5) LID の結晶構造を解明し、脂質因子との相互作用を含めて活性調節の構造基盤を明らかにする。(6)SF9 細胞より精製した NHE1/CHP1 複合体の結晶構造(全体構造)を明らかにする。(7)NHE1 の活性化が下流の酵素へのシグナリングをどのように増強するかを解析する。特に、最近見出した NHE1 に直接結合するカルシニユリン(CaN)について解析する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子工学的な方法。ヒト NHE1 およびその変異体、あるいは他の関連遺伝子への変異導入は、基本的には PCR プロダクトの発現ベクターへの挿入、DNA シークエンスによる変異の確認など、基本的な遺伝子工学操作により行った。

(2) NHE1 遺伝子発現。リポフェクタミンによる NHE1 活性を持たない線維芽細胞へのトランスフェクション、活性による選択により行った。

(3)NHE1 活性と細胞内 pH 測定。NHE1 活性は阻害剤で阻害される細胞への 22Na⁺取り込み活性によって測定した。細胞内 pH は pH 感受性蛍光色素 BCECF の変化か、あるいは ¹⁴C-benzoic acid の取り込み活性によってモニターした。

(3)免疫染色、GFP 蛍光蛋白質の顕微鏡観察は、細胞を無蛍光ガラスへ培養し、従来の方法によりコンフォーカル顕微鏡(オリンパス、FV1000)で行った。

(4)SF9 からの NHE1/CHP1 複合体の精製。CHP1 は NHE1 の細胞質側の必須サブユニットである。これらの遺伝子に精製用タグを付加し、pFASTBac ベクターに挿入し、パキユロバイラスに移行し、SF9 昆虫細胞へ感染させて、NHE1/CHP1 複合体を発現させた。形質膜調整、界面活性剤による可溶化を経て、NHE1/CHP1 複合体を精製した。

(5)光親和性標識。精製した NHE1/CHP1 複合体を ATP アナログ、8-Azido-ATP-biotin と混合し、紫外線ランプとともに光標識を行った。

(6)薬物のスクリーニング。Staurosporine と phorbol ester の二つのリード化合物の構造をもとに、類似性に立脚したインシリコスクリーニングを行って、上位にランクされた化

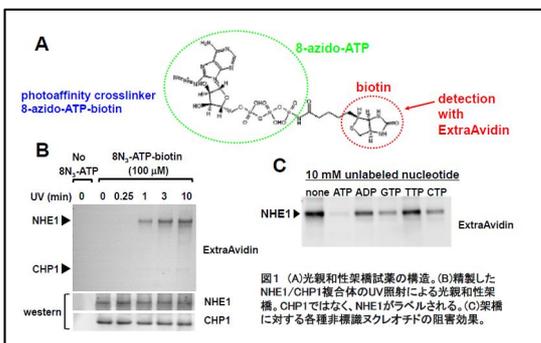
化合物を入手した。また、インドロカルバコール骨格を有する化合物も別途入手した。

4. 研究成果

3年間の研究において、目的欄の(2)(3)(7)については研究が進展し、論文発表に至った。それ以外(1, 4, 5, 6)についても相当な程度まで研究が進んだものもあるが、まだ先は長いと言わざるをえない。そこでここでは、目的欄の(2)(3)(7)について記載する。

(1) (目的欄 2) NHE1 は ATP 結合蛋白質である。細胞内 pH や Na^+ 濃度の制御を担う形質膜 Na^+/H^+ 交換輸送体 NHE1 は二次性能動輸送体ファミリーに属し、その活性には ATP 加水分解のエネルギーを必要としない。しかし奇妙なことに、細胞を代謝阻害剤で処理して ATP を枯渇させると、生理的な中性 pH 付近での活性は完全に消失する。ところが、NHE1 には P-loop モチーフなどの典型的な ATP 結合モチーフは存在せず、NHE1 活性になぜ ATP が必要なのかは未だに解明されていない。そこで、NHE1 が ATP 結合蛋白質であるかどうかを検討した。

NHE1 および細胞内の必須サブユニット CHP1 にそれぞれ Strep および His の精製用タグを付加し、SF9 昆虫細胞から NHE1/CHP1 複合体を精製した。ATP 結合は、光親和性架橋試薬 8-azido-ATP-biotin による光架橋で検出した(図 1A)。この試薬を使えば、biotin への ExtraAvidin 結合によって架橋された蛋白質を検出できる。紫外線(UV)照射により 8-azido-ATP-biotin と NHE1 との光親和性架橋が起こった(図 1B)。この架橋は NHE1 サブユニット CHP1 では起こらないので、ATP は NHE1 に親和性があると考えられる。この光架橋は competitor である種々の非標識ヌクレオチド(10 mM)で抑制された(図 1C)。特に ATP は最も強く光架橋を阻害し、NHE1 は ATP 結合蛋白質であることが強く示唆された。ATP の親和性は約 1-2 mM であり、それは ATP による NHE1 活性化の濃度域に一致した。また、ADP の親和性は低いので、NHE1 に結合した ATP は代謝阻害剤によって細胞内の ATP プールのほとんどすべてが ADP へ変換するのに伴って NHE1 から解離すると考えられる。ATP は NHE1 制御にとって最重要ドメインである脂質結合ドメイン(LID)に結合する。LID には典型的な ATP 結合モチーフはないが、ATP



結合蛋白質で頻繁に見られる (R/K)(X_{2,3})(R/K) という配列が存在する。おそらく ATP は NHE1 の重要な制御因子であり、NHE1 活性は LID への ATP 結合によって維持されていることが示唆された。

(2) (目的欄 3) 薬理的検討による NHE1 の活性制御の機構。NHE1 は蛋白質キナーゼ C (PKC) の強力なアクチベータであるホルボールエステルによって活性化されることから、PKC がホルモンによる NHE1 活性制御の重要な因子であると考えられていたが、私達の説は PKC ではなく、ホルボールエステルは LID を介して NHE1 を活性化するというものである。この説をさらに強固にするために、30 種類の PKC 阻害剤として知られる化合物を入手し検討したところ、そのほとんどが PKC を阻害する濃度で NHE1 の活性化を阻害せず、PKC は関与しないことが判明した。しかし、staurosporine と数種の類似体は NHE1 活性化を阻害した。TNP-ATP を用いた解析により、staurosporine と数種の類似体が競合的に LID に直接結合することによって NHE1 活性化を阻害することが結論された。

以上の結果から、NHE1 活性化の機構は次のように説明される。NHE1 には常時 ATP が結合し、静止状態で高い NHE1 活性を維持している(図 2)。ホルモンによって GPCR が活性化されると、DAG が LID に結合し、形質膜内層の酸性リン脂質への LID の親和性が増加する。この際、ATP から酸性リン脂質への “switch” が起こると考えられる。LID のこの動きが NHE1 全体の構造変化をもたらし、細胞内 H^+ の親和性増加を伴う活性化に導くと考えられる。

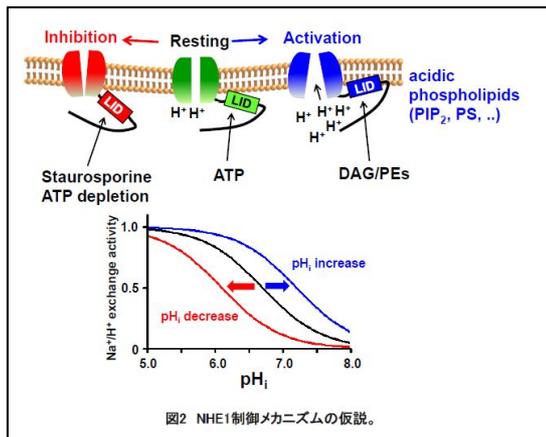
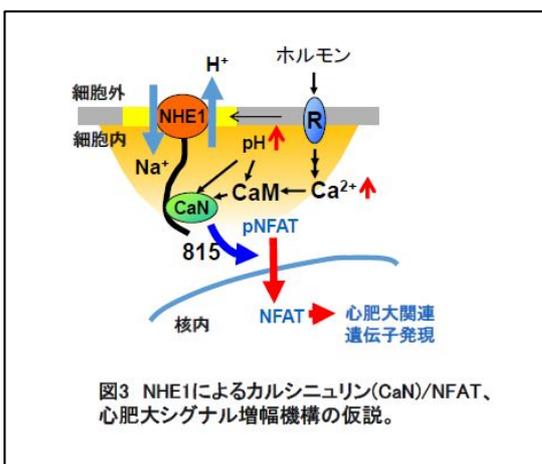


図2 NHE1制御メカニズムの仮説。

(3) (目的欄 7) NHE1 によるカルシニユリン活性化。 Na^+/H^+ 交換輸送体 NHE1 の新規結合蛋白質として、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素カルシニユリン (CaN) を発見した。CaN は、NHE1 の C 末端側細胞質領域に存在する既知の CaN 結合モチーフ (PxIxIT) と似た配列に直接結合することがわかった。そこで、NHE1 発現が CaN 活性に影響するのか、CaN の脱リン酸化標的である転写因子 NFAT のプロモーター活性および GFP 標識 NFAT の核移行を調べた。驚くことに、内在性 CaN の活性は、NHE1 を欠失した細胞と比べて、野生型

NHE1 を過剰発現すると 3 倍程度上昇し、GFP 標識 NFAT の核移行も促進した。いくつかの NHE1 変異体を使って調べた結果、NHE1 による CaN 活性増幅作用には、NHE1 の CaN 結合能と活性の両方が必要であることが分かった。これらのことから NHE1 は、その近傍の pH 環境を調節することで結合した CaN 活性を制御する役割を持つことが予想された。実際に、in vitro の CaN 活性は pH 依存적であり、アルカリ pH で活性が上昇した。これらのことから、NHE1 は自身の活性化を介して直接結合した CaN を活性化し、下流の NFAT シグナルを増幅するという新たな機構が存在することが考えられた(図3)。NHE1 と CaN はともに心筋細胞肥大に関わる重要な分子であることから、本研究で見つかったこの相互作用が、心肥大過程において何らかの役割を持つことが考えられる。



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)

Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Hirayama N, Wakabayashi S: Na⁺/H⁺ exchanger 1 is regulated via its lipid-interacting domain, which functions as a molecular switch: A pharmacological approach using indolocarbazole compounds. (2014) *Mol. Pharmacol.* 85(1): 18-28 査読有 DOI:10.1124/mol.113.089268.

Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY: Regulation of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in health and disease. (2013) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61: 68-76 査読有 DOI:10.1016/j.yjmcc.2013.02.007.

Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S: Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger 1 is an ATP-binding protein. (2013) *FEBS J.* 280(6):1430-1442 査読有 DOI:10.1111/febs.12138.

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⁺/HCO₃⁻ co-transporter 4) that is predominantly expressed in choroid plexus. (2013) *Biochem. J.* 450: 179-187 査読有 DOI:10.1042/BJ20121515.

Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S: Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage. (2013) *Muscle & Nerve* 47(3): 372-378 査読有 DOI:10.1002/mus.23632

Nakamura TY, Wakabayashi S: Diverse functions of neuronal calcium sensor-1(NCS-1) in excitable cells. (2012) *Trends in Cell & Molecular Biology* Vol.7: 99-110 査読有 <http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=7&tid=55&aid=3601&pub=2012&type=3>

Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S: Na⁺/H⁺ Exchanger 1 Directly Binds to Calcineurin A and Activates Downstream NFAT Signaling, Leading to Cardiomyocyte Hypertrophy. (2012) *Mol. Cell Biol.* 32(16): 3265-3280 査読有 DOI:10.1128/MCB.00145-12

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. (2012) *J Biol. Chem.* 287(28): 23852-23863 査読有 DOI:10.1074/jbc.M111.328708.

Nakamura TY, Wakabayashi S: Role of Neuronal Calcium Sensor-1 in the Cardiovascular System. (2012) *Trends Cardiovasc. Med.* 22(1): 12-17 査読有 DOI:10.1016/j.tcm.2012.06.004

Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S: Neuronal Calcium Sensor-1 Promotes Immature Heart Function and Hypertrophy by Enhancing Ca²⁺ Signals. (2011) *Circ. Res.* 109(5): 512-523 査読有 DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.248864.

[学会発表](計20件)

若林 繁夫、嶋田-清水直子、久光 隆、中村-西谷友重: ATP 結合蛋白質としての Na⁺/H⁺ 交換輸送体 NHE1: 脂質結合ドメインを介する活性制御 第 91 回日本生理学会大会(招待講演) 2014 年 3 月 17 日 鹿児島大学

久光 隆、若林 繁夫: Na⁺/H⁺ 交換輸送体 NHE1 とカルシニユリンとの適度な結合親和性が下流の NFAT 転写活性の増幅に重要である 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 16 日 鹿児島大学

Wakabayashi S: Regulation of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in health and disease. 35th Anniversary Symposium "Growth Control Lab" (招待講演) 2014年3月7日 Hotel West End Nice/France

久光 隆、若林繁夫: Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 によるカルシニューリンの活性増幅作用には両者の適度な結合親和性が重要である 2013年12月19日 日本生体エネルギー研究会 第39回討論会 静岡県コンベンションアーツセンター

若林繁夫: 心臓における Na⁺/H⁺交換輸送体の制御と病態的意義 2013年12月18日 日本生体エネルギー研究会 第39回討論会(招待講演) 静岡県コンベンションアーツセンター

久光 隆、若林繁夫: Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの適度な結合親和性が下流の NFAT 活性の増幅効率を決める 第86回日本生化学会大会 2013年9月13日 パシフィコ横浜

若林繁夫、嶋田-清水直子、久光 隆、平山令明、中村(西谷)友重: Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1)の活性調節は脂質結合ドメインの分子スイッチ機構で起こる: 制御に選択的な薬剤を用いた解析 第86回日本生化学会大会 2013年9月12日 パシフィコ横浜

Hisamitsu T, Wakabayashi S: Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 directly binds calcineurin and enhances downstream NFAT transcriptional activity. IUPS Satellite Symposium "H⁺ Ion Sensing, Signalling and Servo-control" 2013年7月27-30日 University of Oxford/UK

Wakabayashi S: The Na⁺/H⁺ exchanger1: signaling pathways leading to cardiac hypertrophy. "Cardiac Ca²⁺, Na⁺ and pH regulation in health and disease Kaito Symposium" ISHR XXI World Congress 2013年7月3日 San Diego Convention Center/USA

若林繁夫: Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 による pH 制御機構: 心臓肥大に導く上流・下流のシグナル伝達 第90回日本生理学会大会(招待講演) 2013年3月28日 タワーホール船堀(東京)

久光 隆、若林繁夫: Na⁺/H⁺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

Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S: Evidence that Na⁺/H⁺ 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22-24日 名古屋大学

古林創史、若林繁夫: カルシニューリン B 様蛋白質 CHP3 による GSK3 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

久光 隆、若林繁夫: Na⁺/H⁺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

嶋田-清水直子、久光 隆、平山令明、若林繁夫: Na⁺/H⁺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

若林繁夫: Na⁺/H⁺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

西谷(中村)友重: 幼少期の心機能および心肥大を制御する新しいカルシウム調節タンパク質の発見と分子機構 第89回日本生理学会大会(招待講演) 2012年3月29日 長野県松本文化会館

若林繁夫: Na⁺/H⁺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

久光 隆: Na⁺/H⁺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

久光 隆、中村(西谷)友重、古林創史、嶋田直子、岩田裕子、若林繁夫: Na⁺/H⁺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(招待講演) 2011年9月21日 京都国際会議場

〔図書〕(計3件)

西谷(中村)友重、若林繁夫: 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 (2012) 循環器病研究の進歩(通巻52号) Vol. XXXIII No.1(2012.11): 46-55

Iwata Y, Wakabayashi S: Abnormal Ion Homeostasis and Cell Damage in Muscular Dystrophy. (2012) "Muscular Dystrophy (ed. by M. Hegde/A. Ankala)", pp143-158 (InTech)

若林繁夫、武田壮一、久光 隆: 輸送体結合蛋白質の同定と複合体の構造解析 (2011) "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"(京都廣川書店) 414-420

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・部長
研究者番号: 70158583

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

武田 壮一 (TAKEDA, Souichi)
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：80332279
(H23-24)

岩田 裕子 (IWATA, Yuko)
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：80171908
(H23)

西谷 友重 (NISHITANI, Tomoe)
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：50393244
(H23)

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
(H23)

古林 創史 (KOBAYASHI, Soushi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員
研究者番号：50511531
(H23)

嶋田 直子 (SHIMADA, 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
(H23)

鎌内 慎也 (KAMAUCHI, Shinya)
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：003975641
(H23-25)

中尾 周 (NAKAO, Shu)
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：306-46956
(H24)