

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(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590105

研究課題名(和文) pH調節トランスポーターNHE1の新規カルシニューリン活性化因子としての意義の解明

研究課題名(英文) Role of a pH-regulating transporter NHE1 as a novel activator of calcineurin

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内Na<sup>+</sup>濃度およびpHを制御するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体NHE1と心臓の肥大化シグナルを仲介するCa<sup>2+</sup>依存性脱リン酸化酵素カルシニューリン(CaN)が直接結合する事を見つけ、この相互作用の意義を調べた。その結果、NHE1の活性化が、NHE1に結合したCaNの活性化を介して最終的に遺伝子発現を調節し、この機構が心筋細胞の肥大化に寄与するという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel molecular interaction between Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 and Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase calcineurin (CaN), both of which are involved in the progression of cardiac hypertrophy. We sought the significance of this interaction and found that the activated NHE1 amplified the activity of the CaN bound to NHE1, leading to cardiac hypertrophy through activation of a downstream transcription factor NFAT.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：トランスポーター カルシニューリン pH 心肥大

## 1. 研究開始当初の背景

心臓は、高血圧、ホルモン刺激などの負荷が続くと病的に肥大化し、心不全に至る可能性が極めて高くなる。心不全は心臓病の最終病像で、予後は極めて悪い。従って、病的肥大への移行メカニズムを解明することは、心不全予防の手段を考える上で大変重要である。病的肥大形成に関わる因子として  $\text{Na}^+$  や  $\text{Ca}^{2+}$  などの細胞内無機イオンを初め、多くのシグナル経路が明らかにされているが、例えば、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリン (CaN) もその一つである (Molkentin, *Cell* 1998)。CaN は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇で活性化されるが、詳細な制御機構は明らかではない。近年、CaN が刺激に応じて電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや形質膜  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ分子に結合し、これら  $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリング分子近傍の局所  $\text{Ca}^{2+}$  変化により制御されることで病的肥大に繋がるという機構が提唱されている。これらのことから私たちは、CaN が細胞形質膜などに局在化することで効率的な活性制御をうける未解明の仕組みが更に存在すると予想している。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (NHE1) は、形質膜に存在するトランスポーターであり、 $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を交換輸送することで細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) や細胞内  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_i^+$ ) 濃度を調節する。心筋細胞において NHE1 が持続的に活性化すると  $\text{Na}_i^+$  上昇を介して  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルに影響し、病的肥大を惹起することが報告されている (Nakamura, *Circ Res* 2008)。しかし、病的肥大における  $\text{pH}_i$  の役割はよく分かっていない。NHE1 は病的肥大を促進するホルモンによって活性化されるが、その活性制御は、細胞質に伸びる 300 アミノ酸からなる C 末領域が担うと信じられている。しかし、その後半の 200 アミノ酸残基を除去しても活性制御機構に影響しないとの報告 (Wakabayashi et al, *PNAS* 1992) から、C 末後半部分は NHE1 活性制御以外の、何らか別の存在意義を持つことを予想した。そこで私たちは、その意義を理解する手がかりを得るために NHE1 の新規結合蛋白質の探索を行い、その領域が CaN と結合することを発見した。

## 2. 研究の目的

本研究は、心筋およびモデル細胞系を用いて NHE1 と CaN との新規相互作用の病的肥大形成における役割とそのメカニズムを明らかにする事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) NHE1 の新規相互作用蛋白質の探索

NHE1 の新規相互作用蛋白質の探索は、NHE 活性を欠失した PS120 細胞にタグ標識した NHE1 を強制発現し、この細胞可溶化物を抗タグ抗体でアフィニティー精製した際に共精製されてくる蛋白質を質量分析で同定することで行った。

### (2) 用いた培養細胞

内在性の NHE 活性を欠失した PS120 繊維芽細胞およびラット新生児より調製した初代心筋細胞を用いた。心筋細胞への遺伝子導入には、アデノウイルスを用いた。

### (3) NHE1 と CaN との相互作用部位の決定

HA タグを融合した NHE1 の C 末端領域を逐次欠失させた変異体を PS120 細胞に発現し、その可溶化物を抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、共沈物に CaN が含まれるかイムノプロットで検出した。また、NHE1 と CaN との直接結合は、精製 CaN および NHE1 の C 末端領域を用いた *in vitro* のプルダウンアッセイにより検討した。

### (4) NHE1 活性の測定

野生型または変異型 NHE1 を安定発現する PS120 細胞を用いて、NHE1 阻害剤感受性の  $^{22}\text{Na}^+$  取り込み活性、または  $^{14}\text{C}$ -安息香酸平衡法により測定した。

### (4) 細胞内 CaN 活性の測定

CaN の直接の標的である転写因子 NFAT のプロモーター活性を、NFAT 応答配列に融合したルシフェラーゼの発現系で検討した。また、GFP を融合した NFAT を発現した細胞での CaN 活性化に伴う NFAT の核移行を蛍光顕微鏡で観察した。

### (5) *in vitro* の CaN 活性測定

*in vitro* の CaN 活性の測定は、CaN アッセイキット (Biomol 社) を用いて、添付プロトコールに従って行った。なお、pH 依存性を測定するための反応溶液は、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が一定となるように pH 系列を調製した。

## 4. 研究成果

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 NHE1 の新規結合蛋白質として、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素カルシニューリン (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 (PVITID) に直接結合することがわかった。この結合配列を欠失した NHE1 変異体の活性は野生型と同等で、NHE1 の基質輸送能には影響しない事が分かった。そこで、NHE1 発現が CaN 活性に影響するのか、細胞内の 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 PS120 細胞と比べて、野生型 NHE1 を過剰発現する PS120 細胞では 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 結合能と基質輸送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 依存的であり、アルカリ pH で活性が上昇し、至適 pH は 8.6 であった。これらのことから、NHE1 は自身の活性化による近傍の局所アルカリ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1)。そこで、上記のような機構が実際の心筋細胞で機能するか調べた。野生型 NHE1 をアデノウイルスで導入した培養心筋細胞を用いて検討した結果、NFAT の核移行、心肥大マーカー (ANF, RCAN1) の発現が亢進し、細胞は肥大化した。これらの現象は、CaN を結合できないが基質輸送活性は保持する変異型 NHE1 を導入した場合には起こらなかった。これらの結果は、PS120 細胞で得られた NHE1 による CaN 増幅機構が、心筋細胞の肥大過程において機能すると考えられる。

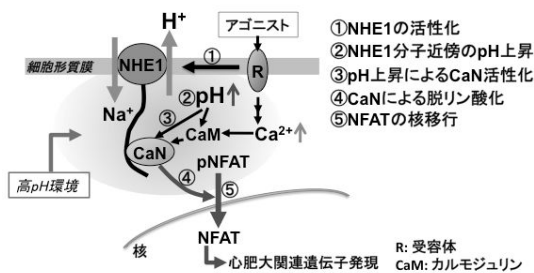


図1 NHE1 活性化による NHE1 に結合した CaN 活性化機構の模式図

この研究成果は、2 つの重要なインパクトを与えると考えられる。1 つは、心筋細胞において「細胞内 pH シグナル経路」が存在する可能性を示唆する事である。NHE1 の活性化が心肥大を促進する事は知られていたが、NHE1 の活性化に伴う H<sup>+</sup>の排出の効果は、生理的な重炭酸緩衝系では相殺され、グローバルな細胞内 pH の変化には至らないと考えられており、あまり重要視されてこなかった。今回の成果は、NHE1 分子近傍のローカルな pH 変化が最終的に遺伝子発現変化をもたらす事を示した点で重要であり、新しい病的肥大治療のターゲットとなる可能性がある。2 つめは、NHE1 のトランスポーター以外の役割が明らかになった事である。NHE1 の C 末端領域の後半 200 アミノ酸残基は NHE1 の活性制御には影響せず、その役割が不明であった。今回の成果は、pH 感受性の高い酵素である CaN を引きつける事で NHE1 自身の活性変化を下流のシグナル因子に伝えるためのプラットフォームとしての役割を持つ可能性を新たに示した。このことはまた、NHE1 の C 末領域には他の pH 感受性酵素が結合し、CaN と同様の制御を受ける可能性を示唆する。今後は、NHE1 を中心とする膜局所からの pH シグナル発信機構を、その構成因子などを明らかにし、心肥大における役割を解明したい。

##### 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4件)

Shimada-Shimizu, N., Hisamitsu, T., Nakamura, T.Y., Hirayama, N., Wakabayashi, S.: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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, doi: 10.1124/mol.113.089268, 査読有り

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

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

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

[学会発表](計15件)

久光 隆、若林 繁夫、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>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 鹿児島大学 2014.3.16-18

Hisamitsu, T., and Wakabayashi, S., Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 directly binds calcineurin and enhances downstream NFAT transcriptional activity., H<sup>+</sup> SSS : H<sup>+</sup> ion sensing, signaling and servo-control, IUPS Satellite Symposium, 2013.7.27-30, Oxford University, UK

久光 隆、若林 繁夫、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 はカルシニユ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、京都国際会館 2012. 3. 14 - 16

久光 隆、若林 繁夫、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 は脱リン酸化酵素カルシニユリンと直接結合し、その活性を調節する、第7回トランスポーター研究会 京都大学 2012. 6. 9 - 10

久光 隆、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 と Ca<sup>2+</sup>感受性脱リン酸化酵素カルシニューリンとの直接結合を介する新しい心肥大シグナル増幅経路、生理研研究会「細胞センサーの分子機構・相互連関・ネットワーク研究会」 岡崎生理学研究所 2012. 11. 29 - 30

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<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、京都国際会館、2011. 9. 21-24、

〔図書〕(計 1 件)

若林繁夫、久光 隆、武田壮一、トランスポートソームの世界 - 膜輸送研究の源流から未来へ -、京都廣川書店、414-419、2011、ISBN: 978-4-901789-66-0

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(3) 連携研究者

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

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