

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460091
研究課題名(和文) pH調節トランスポーターNHE1から発信される膜局所pHシグナルの形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of local pH signal mediated by pH-regulating transporter NHE1

研究代表者
久光 隆 (Hisamitsu, Takashi)

国立研究開発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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Na⁺/H⁺交換輸送体NHE1の活性化はNHE1に直接結合するカルシニューリンを介してその下流の転写因子NFATへシグナルを伝えることを示してきたが、本研究では、CaNとNHE1またはNFATとの結合親和性の差がシグナル伝達に重要であることを明らかにした。さらに、NHE1/CaN複合体がTRPC6チャネルと相互作用することを明らかにし、TRPC6がNHE1/CaN/NFATシグナルを増幅させ得ることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that activation of NHE1 was found to enhance the NFAT signaling via calcineurin (CaN) which directly interact with NHE1, leading to cardiomyocyte hypertrophy. In this study, we suggested that differences in binding affinity between CaN and NHE1 or NFAT are critical for the enhancement of NFAT signaling. Moreover, we showed that TRPC6 is a new member of NHE1/CaN complex, and found that overexpression of TRPC6 amplified the NHE1/CaN/NFAT signaling.

研究分野：細胞生理学

キーワード：Na/H交換輸送体 カルシニューリン 心肥大 pH

1. 研究開始当初の背景

心臓は、高血圧、神経体液性因子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 Na^+ や 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、 Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリン (CaN) とその下流の転写因子 NFAT を介する経路もその一つである (Molkentin, Cell 1998)。CaN は細胞内の 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 が電位依存性 Ca^{2+} チャネル、形質膜 Ca^{2+} ポンプ、または TRPC6 チャネルなどの Ca^{2+} ハンドリング分子近傍に局在化し、局所 Ca^{2+} 変化により活性制御されるという機構が提唱されている。一方、 Ca^{2+} と同様に反応性の高い H^+ は、生理的な重炭酸系により強く緩衝されているという実験結果から、肥大形成過程におけるシグナル因子としての可能性はあまり重要視されてこなかった。ところが申請者は最近、pH 制御輸送体が CaN を活性化し、これが病的肥大形成に関わることを見いだした。

Na^+/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、 Na^+ と H^+ を交換輸送することで細胞内 pH (pH_i) や細胞内 Na^+ (Na_i^+) 濃度を調節する。恒常的活性化型 NHE1 の発現は、マウス心臓の病的肥大を引き起こすに十分であり、その機構は NHE1 を介した細胞内 Na^+ 上昇による二次的な Ca^{2+} シグナルの破綻であった (Nakamura, Circ Res 2008)。しかし、病的肥大における pH_i の役割はよく分かっていない。申請者らは最近、CaN が NHE1 の C 末領域にある CaN 結合モチーフ (PxIxIT) と似た配列 (PVITID) に直接結合し、結合した CaN が NHE1 活性化によるおそく局所 pH 上昇によって活性化される、という全く新しい機構を提示し、実際にこの機構が心筋細胞を肥大化させることを示した (Mol Cell Biol 2012)。申請者は実際に *in vitro* の CaN 活性が静止時の細胞内 pH よりもアルカリ側で増強されることを明らかにした (Mol Cell Biol 2012)。このように肥大形成時に変化しないと考えられてきた細胞内 pH は、実は局所で変動し、pH シグナルとして細胞機能を調節していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、以下の疑問を明らかにすることを介して、病的肥大形成に関わる局所 pH シグナル形成機構の詳細を明らかにすることを目的とする。NHE1 に結合した CaN がどのように下流の NFAT にシグナルを伝えるのか、CaN と NHE1 または NFAT との結合親和性に着目して、その機構を解明する。

NHE1 と共局在することが分かってきた

TRPC6 を介した CaN 活性化を NHE1 が増幅するかどうか検討する。さらに、グローバル pH とは異なる NHE1 分子近傍に形成することが予想される局所 pH 領域の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 発現プラスミドの調製

ヒト NHE1 およびその変異体、ヒト TRPC6、pH 感受性蛍光タンパク質 deGFP4 あるいは他の関連遺伝子への変異導入は、基本的には PCR 産物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的手法により行った。

(2) 用いた培養細胞

内在性の NHE 活性を欠失した PS120 繊維芽細胞および恒常的活性化型 NHE1 を心臓特異的に発現するトランスジェニックマウスより調製した心臓を用いた。

(3) 共免疫沈降実験

HA タグを融合した NHE1 の C 末端領域に変異を導入した変異 NHE1 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、共沈物に内在性の CaN が含まれるかイムノプロットで検出した。

(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}C -安息香酸平衡法により測定した。

(5) 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 Ca^{2+} 濃度が一定となるように pH 系列を調製した。

(6) ショ糖密度勾配遠心

ラット心臓の 0.1% Triton X-100・生理食塩水可溶化物を、95-5% ショ糖溶液中で 200,000g、16 時間遠心後、溶液を分画し、ウェスタンブロットにより目的タンパク質がどの画分にあるか調べた。ラフト画分の陽性対照としてカベオリン 3 を利用した。

4. 研究成果

CaN による NFAT の脱リン酸化には CaN 結合モチーフ (PxIxIT) を介した両者の結合が

必須であるが、NHE1 による CaN の活性化には同様に NHE1 の細胞質領域のモチーフ配列 (PVITID) への直接結合が必要である。従って、NFAT の脱リン酸化のためには活性化された CaN は一端 NHE1 から離れる必要があるが、NHE1 に結合した CaN がどのようにして NFAT にシグナルを伝達するのかは不明であった。今回、NHE1 と CaN との結合親和性の変化が CaN/NFAT シグナルにどのように影響するか調べた。NHE1 本来の PVITID 配列の相対的な CaN 親和性を共免疫沈降実験で調べた。PVITID をヒトまたは酵母の NFAT 由来の結合配列に置換した変異 NHE1 発現細胞を用いて調べたところ、PVITID の CaN 親和性はちょうど中間的であることがわかった (データ示さず)。CaN/NFAT の活性増幅は NHE1 本来の CaN 結合配列の場合に最も高かった (図 1)。また、PVITID 配列の網羅的 Ala 変異体解析において、CaN 親和性が本来の配列よりかけ離れると、CaN/NFAT 活性増幅作用は消失した (データ示さず)。さらに、*in vitro* の CaN による NFAT の脱リン酸化反応は、より親和性の高い CaN 結合ペプチドによって抑制された (データ示さず)。以上の結果は、CaN と NHE1 との結合が中間的な親和性を持つことにより、効率よく NFAT ヘシグナルを伝達できることを示唆している。私達は、CaN が NHE1 から一旦解離するためには、CaN との親和性のより高い NFAT が NHE1/CaN 近傍へ近づくことが必要なのではないかと予想している。

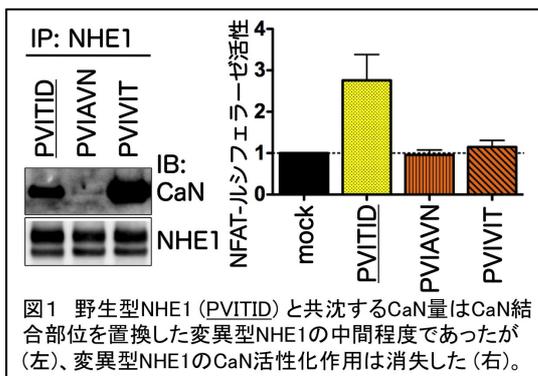


図1 野生型NHE1 (PVITID) と共沈するCaN量はCaN結合部位を置換した変異型NHE1の中間程度であったが(左)、変異型NHE1のCaN活性化作用は消失した(右)。

CaN の活性化には Ca^{2+} が必須であるが、病的肥大形成時における CaN 活性化にかかる Ca^{2+} 流入経路として、TRPC6 チャンネルが注目されている。私達は、1) NHE1 と TRPC6 が強制発現細胞において共沈すること (図 2A)、2) 心筋細胞の形質膜で両者はドット状に存在し (図 2B)、Triton X-100 可溶化物のシヨ糖密度勾配遠心により両者はラフト画分に存在すること (データ示さず)、3) NHE1 による CaN 活性化作用の一部は TRPC 阻害剤ルテニウムレッドで抑制される (データ示さず)、という結果を得ている。このような結果から私達は、NHE1/CaN/TRPC6 が脂質ラフトで複合体を形成し、活性化した NHE1 が TRPC6 による CaN 活性化を増幅する、という新しい機構の存在を予想し、現在 NHE1 およ

び TRPC6 を強制発現した細胞を用いて、NFAT ルシフェラーゼアッセイを行っている。

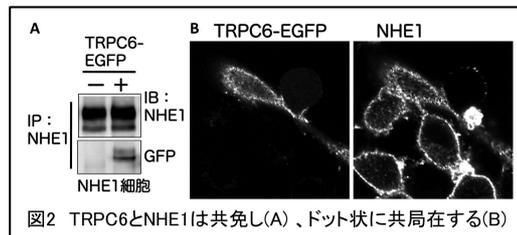


図2 TRPC6とNHE1は共免疫沈降(A)、ドット状に共局在する(B)

NHE1 活性化による膜局所の pH を測定した例はほとんどないが、精密に測定するには、pH プローブを NHE1 分子近傍に局在化させることが肝要と考えられた。私達は、必須サブユニット CHP1 が細胞内で常に強固に NHE1 と 1:1 で結合することから、CHP1 を pH プローブ (deGFP4) の運び屋として利用することを試みた。このプローブが、1) NHE1 発現細胞で膜に局在化することを確認した (データ示さず)。しかし現在のところ、NHE1 分子近傍の pH が NHE1 活性化に伴って上昇することを示す結果の再現が得られていない。

本研究成果は、以前私たちが提案した NHE1 を起点とする「細胞内 pH シグナル経路」の一部の機構解明に貢献することが出来たのではないかと考えている。NHE1 に結合して活性化した CaN が下流の NFAT にどのような機構で移行し活性化するのか、NHE1 または NFAT に対する CaN の結合親和性が重要である可能性が示唆された。さらに、NHE1/CaN 複合体は TRPC6 チャンネルを含む機能的にも共役したシグナル複合体を形成している可能性が示された。NHE1 と TRPC6 は共に、Gq 共役型肥大化ホルモン刺激で産生されるジアシルグリセロールにより活性化されることが知られるので、生体においても近傍の pH および Ca^{2+} 上昇は相乗的な CaN 活性化を引き起こす可能性がある。また、NHE1、TRPC6 共にカベオラに存在するので、カベオラに存在する他のタンパク質との相互作用も予想され、NHE1 を中心とするカベオラ等の膜局所からの 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することは重要であると考えられる。

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 1 件)

(1) Naoko Shimada-Shimizu, Takashi Hisamitsu, Tomoe Y Nakamura, Noriaki Hirayama, and Shigeo Wakabayashi Na^+/H^+ Exchanger 1 is Regulated Via its Lipid-Interacting Domain which Functions as a Molecular Switch: A Pharmacological Approach Using

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) TRPC6 の Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 によるカルシニューリン活性化作用への関与

久光 隆、西谷友重、中川 修、若林繁夫
第 93 回日本生理学会大会 札幌コンベンションセンター 2016.3.22-24

(2) 内皮細胞における ALK1 シグナル伝達系の新規下流因子の同定と発現調節機構の解析

久光 隆、荒木 睦、渡邊裕介、片山由美、藤田匡秀、中尾 周、中川 修
第 39 回日本分子生物学会年会 ポスター発表、パシフィコ横浜、2016.11.30-12.2

(3) Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの結合に対する G タンパク質共役型受容体刺激の効果

久光 隆、若林繁夫、中川 修
BMB2015 第 38 回 日本分子生物学会年会
第 88 回日本生化学会 合同大会 神戸ポートアイランド 2015.12.1-4

(4) Calcineurin homologous protein 1 interferes with calcineurin-dependent regulation of the renal Na-K-2Cl-cotransporter

Boldt, C., Paliege, A., Jankowski, V., Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Bachmann, S., Kerim Mutig, K.
Experimental Biology meeting, Boston/USA, March 28, 2015 (FASEB Journal 2015 29 No. 1 Supplement 960.25)

(5) 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 転写活性の増幅に重要である

久光 隆、若林繁夫
第 91 回日本生理学会大会 鹿児島大学
2014.3.16-18, ポスター

(6) Calcineurin homologous protein 1 regulates the renal Na-K-2Cl-cotransporter

Christin Dathe, Alexander Paliege, Vera Jankowski, Shigeo Wakabayashi, Takashi Hisamitsu, Sebastian Bachmann, and Kerim Mutig
KIDNEY WEEK 2014, Nov.11-16, Philadelphia, PA, poster presentation

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