

助成番号 0836

Na⁺/H⁺交換輸送体と新規相互作用タンパク質の生理的意義の解明

久光 隆, 若林 繁夫

国立循環器病センター研究所循環分子生理部

概要 細胞の内外で形成されるナトリウムイオン(Na⁺)の濃度勾配は、様々な細胞活動に根源的であり、これを駆動力とする多くの二次性トランスポーターが存在する。イオントランスポーター Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1 (NHE1) は、あらゆる細胞の形質膜に存在し Na⁺ と H⁺ を交換輸送することで、細胞内 pH、細胞容積、細胞内 Na⁺ 濃度の調節に寄与する。また最近では、NHE1 による NHE1 分子近傍の局所 pH の制御が、病態・生理学的に重要であることが示されている。NHE1 の活性制御にはそのカルボキシル(C)末端側細胞質領域とさまざまなシグナル分子との相互作用およびリン酸化が重要と考えられている。しかし、NHE1 活性制御の分子機構および相互作用因子の全容は明らかでない。

そこで今回私たちは、NHE1 分子を中心とした複合体を構成するタンパク質を網羅的に探索するために、HA タグ標識した NHE1 タンパク質を安定発現株から精製し、共精製されるものを質量分析により同定するという解析を行った。この方法で、NHE1 が CBB あるいは銀染色によって確認できるレベルまで精製でき、それとともに、既知の NHE1 結合タンパク質も含めて、少なくとも 5 種類以上のタンパク質が共精製された。そのうちの一つは、Ca²⁺ 依存的なセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CaN) であった。CaN は、*in vitro* の結合実験により、NHE1 の C 末端領域と直接結合することが明らかとなった。さらに、NHE1 における CaN 結合部位を詳細に検討した結果、CaN は主に NHE1 のアミノ酸残基 715 から 720 番目にある PVITID 配列を介して結合し、これは既知の CaN 結合モチーフ PXIXIT と相同性が高いことが判明した。この両者の相互作用の生理的意義を明らかにするために、まずは CaN 活性を阻害または亢進した場合の NHE1 活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、CaN が NHE1 活性を調節する可能性は低いことが示された。一方、*in vitro* の CaN 活性は、アルカリ pH で亢進することが明らかとなった。これは恐らく、アルカリ pH では、CaN 活性化因子であるカルモジュリンの Ca²⁺ 感受性が増加することに起因すると考えられた。この結果は、CaN の活性が細胞内 pH の変化によっても制御されることを示唆する。これらのことから私たちは、NHE1 に結合した CaN の活性は、NHE1 の活性変化に伴って形成される NHE1 分子近傍の局所 pH により制御を受ける可能性があるのではないかと考えた。今後、CaN 活性は NHE1 の活性依存的に制御され得るのか、もしそうならその生理的意義は何か、という問題を解決していく必要がある。

1. 研究目的

細胞の内外で形成されるナトリウムイオン(Na⁺)の濃度勾配は、様々な細胞活動に根源的であり、これを駆動力とする多くの二次性トランスポーターが存在する。イオントランスポーター Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1 (NHE1) は、あらゆる細胞の形質膜に存在し Na⁺ と H⁺ を交換輸送することで、細胞内 pH、細胞容積、細胞内 Na⁺ 濃度の調節に寄与する¹。NHE1 は、増殖因子、ホルモンなどの細胞外シグナル分子に加えて、高浸透圧、ストレッチなどの機械的刺激

を含む多種類の細胞外シグナルによって活性化を受けるトランスポーターである²。

NHE1 分子は、イオン輸送活性を担う N 末端側の膜貫通領域(aa 1-500)と活性制御を担う C 末端側の細胞質領域(aa 501-815)からなる。この活性制御には NHE1 のカルボキシル(C)末端細胞質領域とさまざまなシグナル分子との相互作用およびリン酸化が重要と考えられているが³、制御の分子機構および相互作用因子の全容は明らかでない。

そこで今回私たちは、NHE1 の新規相互作用タンパク質を、これまで汎用されてきた酵母ツーハイブリッド法ではなく、プロテオミクスの手法を用いることで広く探索し、NHE1 とそれらの相互作用による生理的意義を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 NHE1 の新規相互作用タンパク質の探索

今回私たちは、NHE1 の新規相互作用タンパク質を、NHE 活性を欠失した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免疫沈降した際に共沈してくるタンパク質を質量分析で同定することで探索した。解析の対象は、NHE 活性を欠失したハムスターの肺由来繊維芽細胞 (PS120 細胞) を用いた。この細胞に、ヒト由来 NHE1 の細胞質側 C 末端に HA タグ (YPYDV PDYA) を融合した NHE1-HA コンストラクトを強制発現し、安定発現株を分取した。この NHE1-HA 細胞を大量に培養し (25-cm x 25-cm の培養皿 20 枚分)、これを 1% triton X-100 を含む生理食塩溶液で可溶化し、抗 HA 抗体を結合したビーズを用いてアフィニティー精製を行った。NHE1-HA と共沈したタンパク質は、SDS-PAGE で分離後にゲルを銀染色し、コントロールとしてタグ標識していない NHE1 発現細胞を同様に処置した場合と、そのバンドの発現パターンを比較した。NHE1-HA 由来のサンプルを流したレーンにあって、NHE1 のそれにはないバンドを特異的結合タンパク質とした。このバンドのいくつかをゲルより切り取り、含まれるタンパク質を抽出・トリプシン消化後、LC-MS/MS によりペプチド配列を決定し、ペプチドデータベースと照合することで由来するタンパク質を同定した。

2.2 NHE1 と CaN との相互作用部位の決定

NHE1 の C 末端側細胞質領域を逐次欠失させた変異体に HA タグを融合したタンパク質を 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、CaN が共沈するか否かをイムノブロットで検出した。また、NHE1 と CaN との直接結合を、*in vitro* のプルダウンアッセイにより検討した。

2.3 NHE1 とその変異体の活性測定

NHE1 の活性または恒常的活性化型 CaN の共発現による NHE1 活性に及ぼす影響は、これらのコンストラクトを発現した PS120 細胞を用いて測定した。細胞内酸性化に

よる NHE1 の活性化は、NHE1 阻害剤 (EIPA) 感受性の $^{22}\text{Na}^+$ の取り込みを、細胞内に蓄積した放射活性を測定することで検出した。NHE1 の活性化に伴う細胞内 pH 変化を、細胞内に取り込ませた pH 感受性蛍光色素の BCECF の蛍光強度変化を蛍光顕微鏡を用いた画像解析により求めた。

2.4 *in vitro* での CaN 活性の pH および Na^+ 濃度依存性

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、反応系の溶液の pH、 Na^+ 濃度は適宜変更した。様々な pH における free- Ca^{2+} 濃度は、適切な量の EGTA を加えることで調製した。

2.5 NHE1 に結合した CaN の活性を検出する試み

NHE1 の細胞質側 C 末端領域に、R11 ペプチド配列 (19 アミノ酸残基) とこれに続く HA タグ配列を融合したコンストラクトを作成し、これを安定発現する細胞を分取した。この細胞の内在性 CaN をイオノマイシン (IM) で活性化することで、NHE1 に融合した R11 配列の脱リン酸化を促進し、NHE1 に結合した CaN 活性の指標とした。R11 配列のリン酸化程度は、抗 R11 リン酸化抗体を用いてイムノブロットによるバンド密度を画像解析で求めることで算出した。

3. 研究結果

3.1 NHE1 の新規相互作用タンパク質の同定

NHE1 は様々な細胞外刺激、ホルモンなどによる受容体刺激、機械刺激などによる活性制御を受けるが、これは NHE1 の C 末端側細胞質領域のリン酸化または相互作用タンパク質の結合によってなされる。これまで NHE1 の相互作用タンパク質のいくつかは、酵母のツーハイブリッド法により同定されてきた。しかしこの方法は、原理的に核内でのベイト・タンパク質に対するプレイ・タンパク質の結合を検出するもので、トランスポーターのような膜タンパク質の場合にはその細胞質可溶化領域をベイトにせざるを得ず、これが本来あるべき形質膜上での状態を反映してるとは言えず、これまで検出できなかった未同定の相互作用因子の存在が予想される。そこで今回私たちは、NHE1 分子を中心とした複合体を構成するタンパク質を網羅的に探索するために、HA タグ標識した NHE1 タンパク質を安定発現株から精製し、共精製されるものを質量分析に

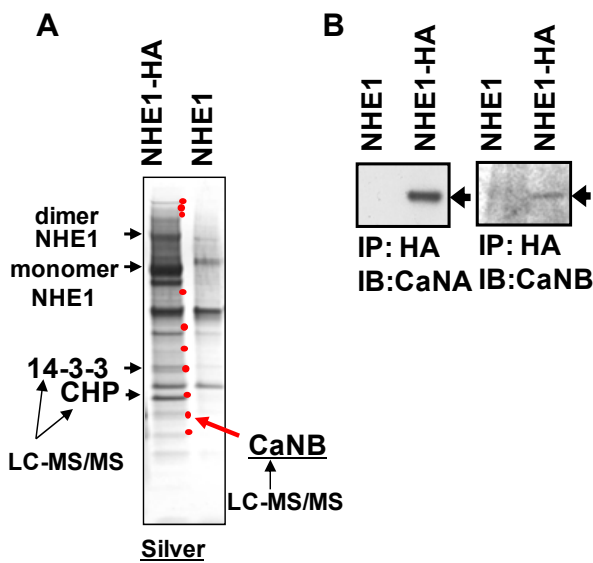


Fig. 1. 抗 HA 抗体樹脂によるアフィニティー精製の結果

より同定するという解析を行った。この方法で、NHE1 が CBB あるいは銀染色によって確認できるレベルまで精製でき、それとともに少なくとも 5 種類以上のタンパク質が共精製された (Fig. 1A)。そのうち二つは NHE1 との結合が既知の 14-3-3 および CHP1 であった (Fig. 1A)。さらに今回の実験では、未報告の新規 NHE1 結合タンパク質を 3 種類見出した。そのうちの一つは、Ca²⁺ 依存的なセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンのサブユニットカルシニューリン B (CnB) であった (Fig. 1)。

3. 2 カルシニューリン A/B 複合体 (CaN) が NHE1 に直接結合する

CaN は触媒部位を含むカルシニューリン A (CnA) と必須サブユニットである CnB が結合することで酵素活性を発揮できるようになる⁴。そこで、NHE1 に CnA が結合するかどうかを免疫沈降法により様々な条件で検討したところ、NHE1 には CnA および CnB の複合体として結合することが明らかとなった (Fig. 1B、その他は未掲載)。このことは、CaN が酵素活性を発揮できる状態で NHE1 と相互作用していることを示している。

次に、CaN は NHE1 のイオン輸送活性を担う膜貫通領域 (aa 1-500) か、またはその活性を制御する C 末端側の細胞質領域 (aa 501-815) に結合するかを、NHE1 の C 末端を逐次欠失した変異体を用いた免疫沈降実験により検討した。その結果、710 番目のアミノ酸残基以降を欠失

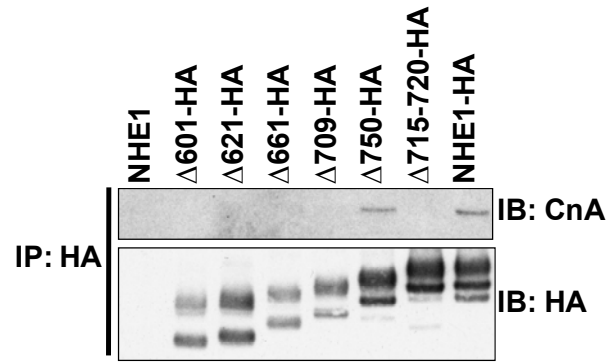


Fig. 2. NHE1 における CaN 結合部位の探索

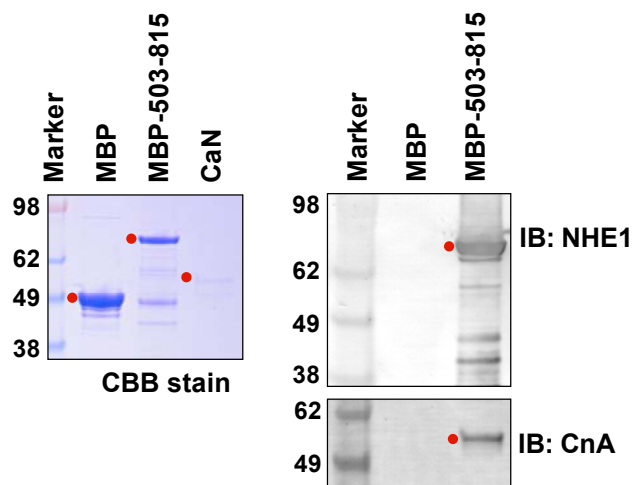


Fig. 3. NHE1 の C 末領域と CaN の *in vitro* 結合実験

した NHE1 変異体で CaN が共沈しなくなったことより、CaN は NHE1 の 710 番以降の領域で相互作用することが明らかとなった (Fig. 2)。

この相互作用が直接結合によるかを、*in vitro* での精製 CaN と、MBP と融合した NHE1 の C 末端領域 (MBP-503-815) とのプルダウン実験を行った。その結果、CaN は MBP-503-815 とプルダウンされたことから、CaN は直接 NHE1 に結合することが明らかとなった (Fig. 3)。

NHE1 のより詳細な CaN 結合部位を同定するために、NHE1 の 710 番以降のアミノ酸配列を調べてみると、既知の CaN 結合モチーフ (PXIXIT) をよく似た配列 (⁷¹⁵PVITID⁷²⁰) を見出した。免疫沈降実験の結果から、この 715-720 の領域が CaN との結合に必要なことが明らかとなった (Fig. 2)。

3.3 CaNの活性化または活性阻害がNHE1活性に及ぼす影響

NHE1とCaNとの結合の生理的意義を理解するために、CaN活性変化のNHE1活性に及ぼす影響を検討した。CaNを活性化した場合のNHE1活性に対する影響を、NHE1を強制発現したPS120細胞に恒常的活性化型のCaN(CA-CaN)を共発現した細胞を用いて、NHE1の活性化に伴う $^{22}\text{Na}^+$ の細胞内への取り込み量またはBCECFによる細胞内pH変化を測定することで検討した。NHE1は細胞内の酸性化により活性化を受けるが、このときのNHE1活性にCA-CaN発現は影響しなかった。逆に、NHE1を強制発現したPS120細胞の内在性CaN活性を阻害薬のFK-506またはcyclosporinで抑制した場合にも、細胞内酸性化に伴うNHE1の活性化に影響しなかった。一方、NHE1は、Gタンパク質共役型受容体の活性化またはPKCの活性化を介して、イオン輸送活性が上昇することが知られているので、このNHE1活性化に対するCaN活性の影響を ^{14}C -安息香酸の細胞内への取り込み量を測定することで検討した。これは、安息香酸が分子型の場合に細胞膜を透過し、イオン型の場合には膜を透過しないことを利用し、細胞内pHの変化をその蓄積量として見積もる方法である。コントロールとして、NHE1を強制発現したPS120細胞をトロンピン、ホルボールエステル、ATPなどで刺激すると、0.1 - 0.2 pHユニット上昇するが、CA-CaNを共発現した細胞においてもコントロールと同様のpH上昇を示した。これらの結果は、少なくとも検討した条件においては、CaN活性を亢進しても抑制しても、NHE1の活性には影響を及ぼさないことを示唆している。

3.4 NHE1の活性変化がCaN活性を制御する可能性についての検討

これまでの私たちの検討結果は、CaNがNHE1活性を制御する可能性は低いことを示唆する。そこで逆に、NHE1のイオン輸送活性の変化がCaN活性を制御するのではないかという仮説を検証することにした。すなわち、NHE1に結合したCaNがNHE1の活性化に伴うNHE1分子近傍のpH上昇または Na^+ 濃度の上昇により、何らかの機構を介して活性制御を受けているのではないかと考えた。

3.4.1 *in vitro*のCaN活性のpH依存性の測定

市販のCaN活性測定キットを用いて、反応溶液のpHが6.8、7.2、7.7の場合のCaN活性を測定した。その結果、pHが高いときにCaN活性が上昇することが明らかとなった(Fig. 4A)。CaNは、 Ca^{2+} による活性制御を受けるが、これは Ca^{2+} とカルモジュリンの複合体がCaN自身による自己阻害を解放することでなされると考えられている⁴。そして、カルモジュリンなどの Ca^{2+} 結合タンパク質の Ca^{2+} との結合は、一般的にpHが高いときに促進されることが知られている。私たちは、CaN活性のpH依存性は、高いpHにより Ca^{2+} -カルモジュリン複合体の形成が促進されこのこと由来するのではないかと予想した。そこで、CaN活性の上記の三つのpH条件における Ca^{2+} 濃度依存性を測定した。それぞれのpHでのfree- Ca^{2+} 濃度は、一定量の Ca^{2+} 濃度に対し適当なEGTAを加えることで調整した。その結果CaN活性は、同じ Ca^{2+} 濃度なら高pHのときに上昇することが明らかとなった(Fig. 4B)。さらにpHが7.7のときのCaN活性は、 Ca^{2+} 濃度が静止時の細胞内濃度に

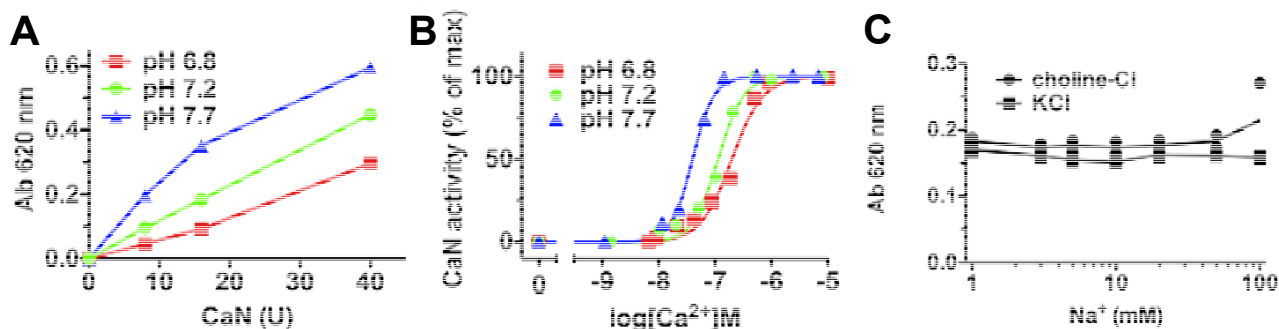


Fig. 4. *In vitro*のCaN活性のpH、 Ca^{2+} 、 Na^+ 依存性

近い 100 nM でもほぼ最大値を示すことが明らかとなった (Fig. 4B)。このことは細胞において、Ca²⁺ 濃度上昇を伴わなくても pH 上昇により CaN 活性が制御される可能性を示している。

3. 4. 2 *in vitro* の CaN 活性の Na⁺濃度依存性の測定

次に、CaN 活性の Na⁺ 依存性を検討した。反応溶液の一価カチオン濃度は Na⁺ と K⁺ または Choline⁺ を合わせて 100 mM となるように調製した。その結果、CaN 活性は Na⁺ 濃度によらずほぼ一定の値を示した (Fig. 4C)。このことは、CaN は Na⁺ によっては制御を受けないことを示唆している。

3. 5 NHE1 に結合した CaN 活性のみを測定する系の確立をめざして

CaN は可溶性の酵素であり細胞質に豊富に存在する。実際に NHE1 に結合する CaN はそのごく一部であり、NHE1 に結合した CaN の活性と細胞質に存在する CaN の活性を区別して測定することは非常に困難である。PKA の制御サブユニット RII は、リン酸化タンパク質であり、その Ser⁹⁶ は CaN により脱リン酸化を受けることが知られている⁵。CaN による脱リン酸化反応は、Ser⁹⁶ を含む 19 アミノ酸残基からなるペプチドでも十分なことから、これを NHE1 の C 末端側細胞質領域に融合し、そのリン酸化程度を抗リン酸化 RII 抗体を用いることで検出し、NHE1 に結合した CaN のみの活性を測定する系の確立を試みた。

Fig. 5A にコンストラクトの概要を示した。ΔPVITID は、CaN 結合領域を欠失した NHE1 である。これら二種類のコンストラクトをそれぞれを安定発現する PS120 細胞を用いて、イオノマイシン (IM) による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇による内在性 CaN の活性化をさせ、NHE1-RII または ΔPVITID-RII の RII 脱リン酸化程度を抗リン酸化 RII 抗体で検出した。その結果、CaN が結合できる NHE1-RII のみで RII の脱リン酸化が認められた (Fig. 5B)。従ってこのことは、NHE1 に結合した CaN のみの活性化を検出できたことを示唆する。

4. 考 察

私たちは今回、NHE1 の新規相互作用タンパク質の一つとして CaN を発見し、両者が NHE1 分子の⁷¹⁵PVITID⁷²⁰ を介して直接結合することを示した。この既知の CaN 結合モチーフとよく似た PVITID 配列は、NHE アイソフォーム

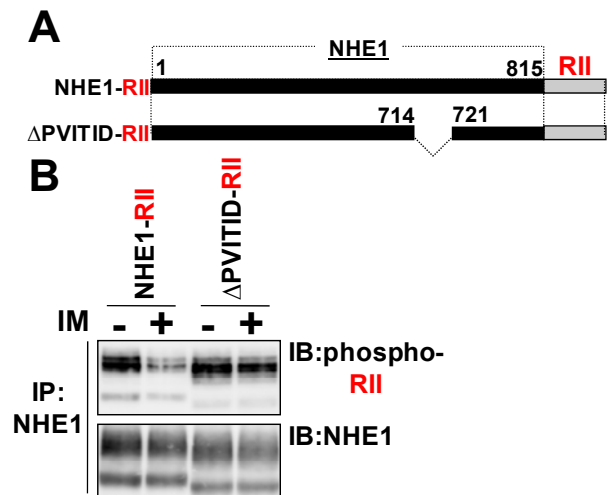


Fig. 5. NHE1 に結合する CaN の活性測定法

中の NHE1 および NHE10 の C 末端側細胞質領域に見出された。様々な種の NHE1 相同タンパク質に関して PVITID 配列のホモロジー検索をすると、この配列は硬骨魚類まで広く保存されている。NHE1 は普遍型アイソフォームであり、CaN もまた普遍的に存在することから、NHE1 と CaN の相互作用は個体全体に存在すると考えられ、重要な生理機能に寄与することが予想される。

NHE1 と CaN との結合の生理的意義を明らかにするために、まずは CaN 活性を促進または抑制した場合の NHE1 のイオン輸送活性に及ぼす影響を検討したが、少なくとも今回の実験条件では、無影響であった。NHE1 は、C 末端側細胞質領域のリン酸化を介して活性制御を受けることが報告されている。そして、CaN はこれを脱リン酸化する酵素ではないことも報告されており⁶、今回の結果はこれらと矛盾しない。

NHE1 活性の変化が NHE1 に結合した CaN 活性を制御できるかについては結論が出ていないが、NHE1 に結合した CaN の活性をモニターできる実験系が確立しつつあるので、今後検証が可能であると考えられる。私たちは、NHE1 の活性化に伴う NHE1 分子近傍の pH 変化が、これは細胞質の pH 動態とは異なると考えているが、NHE1 に結合した CaN 活性を調節することで何らかの生理機能に寄与しているのではないかと考えている。現に、*in vitro* の CaN 活性は pH 感受性であったこと (Fig. 4) からこの可能性を支持するものと考えている。

5. 今後の課題

NHE1とCaNとの新規相互作用の発見に至ってはいるが、その生理的意義は明らかでない。本助成研究で確立したようなNHE1に結合したCaNのみの活性を検出する系などを利用し、モデル細胞系を用いて、どのような生理的刺激により、a) NHE1に結合したCaNが活性化されるのか、b) 両者の結合が制御されるのか、などを明らかにする必要がある。

心臓においては、NHE1⁶またはCaNの恒常的活性化⁷は、心肥大に至る。両者に共通するシグナル伝達物質の一つは、Ca²⁺であり、NHE1活性化による心肥大形成は、心筋細胞のCa²⁺恒常性の維持に影響をすることが原因とされる⁶。このように、NHE1とCaNとの相互作用はCa²⁺動態と密接に関連する可能性があるため、その点を考慮しながら研究を進めていきたい。

文献等

1. Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J. (1997) Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 77, 51-74.
2. Orłowski, J., and Grinstein, S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447, 549-65.
3. Putney, L. K., Denker, S. P., and Barber, D. L. (2002) The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 527-52.
4. Rusnak, F., and Mertz, P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80, 1483-1521.
5. Misiak, A.J., Perreault, K., Holmes, C.F.B., and Fliegel, L. (2005) Protein phosphatase regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform I. *Biochemistry* 44, 5842-5852
6. Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., and Wakabayashi, S. (2008) Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 103, 891-899
7. Molkenin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228

No. 0836

Identification of Calcineurin as a Novel Interacting Protein for the Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1 and Its Functional Analysis

Takashi Hisamitsu and Shigeo Wakabayashi

Department of Molecular Physiology,
National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is activated in response to many kinds of extracellular signals such as hormones, growth factors and mechanical stress, which in turn result in amplification of certain physiological response via change in intracellular pH or Na⁺ concentration in the membrane microenvironment. To find the novel binding proteins to NHE1 involved in such regulation, we applied proteomics procedures. NHE1 protein was affinity-purified from PS120 cells stably expressing HA-tagged NHE1 with anti-HA antibodies-conjugated resin. We identified calcineurin (CaN), a Ca²⁺-dependent Ser/Thr phosphatase, as a new binding partner from the co-purified proteins with HA-tagged NHE1. CaN directly bound to the C-terminus of NHE1. Furthermore, we decided a main CaN binding region located in the NHE1 C-terminus, ⁷¹⁵PVITID⁷²⁰, which is highly homologous to PXIXIT sequence known as a CaN-binding motif. Cytoplasmic acidification-induced NHE1 activation was not affected in both inhibition of endogenous CaN with FK-506 or cyclosporin and overexpression of constitutively active form of CaN, suggesting that CaN may not extensively modulate NHE1 activity. On the other hand, *in vitro* CaN activity was higher at alkaline pH probably due to increased Ca²⁺ sensitivity in the CaN activator calmodulin, suggesting that CaN activity may be regulated by the change in pH in cells. Now, we hypothesize that the activity of CaN bound to NHE1 molecule is regulated by changes in microenvironmental pH near the NHE1 generated by activated NHE1. To test this hypothesis, we need to determine 1) whether the CaN activity is regulated in NHE1-dependent manner, and 2) how such modulation of CaN activity affects the physiological response.