

腎上皮細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の基底膜側局在機構および その病態生理学的意義の解明

喜多 紗斗美, 堀江 一郎, 岩本 隆宏

福岡大学医学部薬理学

概要 1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)は、心筋、平滑筋、神経、腎尿細管などに多く発現し、様々な細胞内 Ca^{2+} シグナルにおいて重要な役割を果たしている。近年、NCX1は細胞膜上のマイクロドメイン(ラフト、カベオラ等)に局在し、他のイオンチャネルやイオン輸送体などと機能的複合体を構成することで、時空間的に高次の細胞内 Ca^{2+} シグナルの形成に関わることが推測されている。腎尿細管において、NCX1は遠位尿細管(遠位曲部)の基底膜側に限局して発現し、能動的な Ca^{2+} 再吸収に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、NCX1の基底膜側への局在を決定する分子基盤やその制御機構については明らかになっていない。

現在推定されている NCX1 の構造は 9 回膜貫通型であり、膜貫通ヘリックス構造の中央部には活性制御を司る大きな細胞内ドメインが存在する。この細胞内ドメインには、 I_1 不活性化機構(Na^+ 依存性不活性化)に関わる XIP 領域や I_2 不活性化機構(Ca^{2+} 依存性不活性化)に関与する Ca^{2+} 結合部位(CBD1, CBD2)などが配置されている。我々は、NCX1 のソーティングシグナルもこの細胞内ドメインに存在する可能性が高いと考え、NCX1 の細胞内ドメインを bait 蛋白質とした酵母 Two-hybrid スクリーニングを実施し、NCX1 がアダプター蛋白質複合体サブユニット(AP サブユニット)と相互作用することを見出した。次に、AP サブユニットの GST 融合蛋白質と NCX1 細胞内ドメインの様々な領域の His タグ蛋白質を用いた GST-pull down アッセイにより AP 因子の結合部位の解析を行い、AP サブユニットが NCX1 細胞内ドメインの CBD1 に結合することが明らかとなった。さらに、CBD1 領域内の変異解析(Ala 置換)を行うことにより、その結合配列を同定した。興味深いことに、CBD1 と AP サブユニットとの相互作用は Ca^{2+} 濃度依存性であり、低 Ca^{2+} 濃度において結合量が増大した。最近、X 線結晶構造解析により NCX1 細胞内ドメインの三次元構造が解かれ、CBD1 に Ca^{2+} が結合すると細胞内ドメインが大きく構造変化することが明らかになってきた。したがって、AP サブユニットとの相互作用は NCX1 細胞内ドメインの立体構造に影響を及ぼし、このことが NCX1 の基底膜側への局在に関与する可能性が推察される。

1. 研究目的

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)は、細胞膜を介して 3 個の Na^+ と 1 個の Ca^{2+} を交換輸送する重要な Ca^{2+} トランスポーターである。この輸送は両方向性であり、通常、細胞膜を介する Na^+ 濃度勾配に依存して細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す役割を担っているが(Ca^{2+} 流出モード)、細胞内 Na^+ が増加する特殊な状況下では逆輸送(Ca^{2+} 流入モード)を行う。心臓に発現する 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)は、970 個のアミノ酸からなる分子量約 120K の糖蛋白質である。現在提唱されている NCX1 の分子モデルは 9 回

膜貫通型構造であり、その中央に相対向する膜ループ(α 領域)がイオン輸送通路を構成すると推定されている(**Figure 1**)。その細胞質側には活性制御を司る大きな細胞内ドメインが存在している。電気生理学的な解析から、NCX1 は細胞内 Na^+ と PIP_2 で調節される I_1 不活性化と細胞内 Ca^{2+} により調節される I_2 不活性化による二重の制御機構を持つことが知られている。前者の調節には細胞内ドメインの XIP 領域、後者の調節には Ca^{2+} 結合領域(CBD1, CBD2)が関与すると考えられている⁽¹⁾。

腎臓において、NCX1 は遠位尿細管(遠位曲部)の基

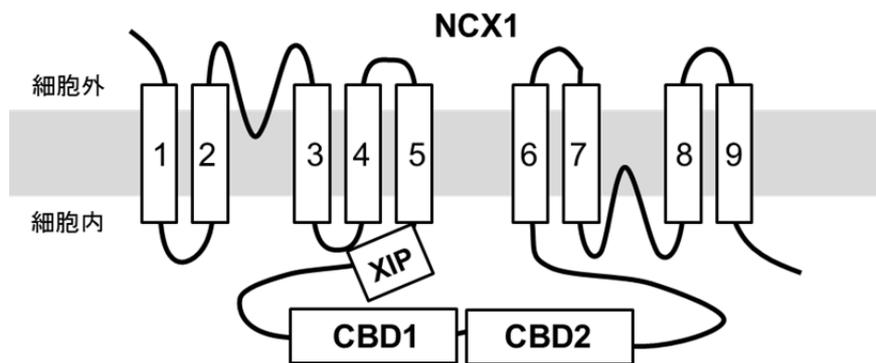


Figure 1. A nine-transmembrane model of NCX1 molecule

底膜側に限局して発現し⁽²⁾、能動的な Ca^{2+} 再吸収に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、NCX1 の基底膜側への局在を決定する分子基盤やその制御機構については明らかになっていない。腎尿細管では、各尿細管セグメントに特異的なイオン輸送体やイオンチャネルが頂上膜および基底膜の特定の膜ドメインに局在・集積し、互いに機能的に共役することにより、セグメント特有のイオン輸送機構を構築している。これまで、腎 Na^+ 輸送機構の解明には、腎尿細管に発現する Na^+ 輸送体の遺伝子異常やそれらの遺伝子改変マウスの研究が貢献してきた⁽³⁾。しかし、腎尿細管のイオン輸送体の局在機序およびその制御機構に関しては未だ不明な部分が多い。我々は、その分子基盤を同定する目的で、NCX1 の細胞内ドメインを bait 蛋白質としてマウス腎由来 cDNA ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングを実施した。その結果、NCX1 の細胞内ドメインがアダプター蛋白複合体サブユニット ($\mu 2$) に相互作用することを見いだした⁽⁴⁾。本研究では、この相互作用の分子機序を解析することにより、遠位尿細管における NCX1 の基底膜側への限局的なソーティング機構およびその生理学的・病態学的意義の解明を目指す。

2. 研究方法

2.1 GST-pull down アッセイによるアダプター蛋白複合体サブユニットに対する NCX1 分子内結合部位の同定

アダプター蛋白複合体サブユニット ($\mu 2$) の GST 融合蛋白質を作製し、NCX1 細胞内ドメインの様々な領域の His タグ融合蛋白質に対する GST-pull down アッセイを行った。

さらに、その結合モチーフを同定するため、CBD1 領域内の変異解析 (Ala 置換法) を実施し、アダプター蛋白複合体サブユニットに対する結合能を欠失した部位特異的変異型 CBD1 の検索を行った。

2.2 マウス腎皮質における NCX1 免疫染色

腎組織における NCX1 の局在部位を確認するため、雄性 C57BL/6J マウスより腎臓を摘出し、凍結切片を作製した。一次抗体として、抗 NCX1 ポリクローナル抗体を用いた。

2.3 培養腎尿細管上皮細胞を用いた野生型および変異型 NCX1 の局在解析

我々は、NCX1 の細胞外領域ペプチドに対する抗ニワトリ抗体を作製し、生細胞において細胞膜上の NCX1 を蛍光抗体により可視化する方法を確立している⁽⁵⁾。また最近、NCX1 の N 末細胞外領域に c-myc タグ (14 アミノ酸) を挿入した NCX1 発現系を構築し、蛍光標識抗 myc 抗体により、遺伝子導入した NCX1 を生細胞で観察する方法を考案している。これら手法を用いて、NCX1 の細胞局在解析を実施した。

具体的には、野生型 NCX1 およびアダプター蛋白複合体サブユニットに対する結合能を欠失した変異型 NCX1 を MDCK 細胞 (培養腎上皮細胞) に遺伝子導入し、上記の抗体を用いて蛍光免疫染色した。なお、基底膜側のマーカーとして、 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ を用いた。

2.4 NCX1 活性制御系におけるアダプター蛋白複合体サブユニット相互作用の生理的役割の検討

GST-pull down アッセイの結果よりアダプター蛋白複合体サブユニットは NCX1 細胞内ドメインの CBD1 領域に結合すると考えられたが、興味深いことに、この CBD1 領域

には NCX1 の Ca^{2+} 依存性活性化機構に関わる Ca^{2+} 結合部位が存在している。最近、NCX1 細胞内ドメインの構造解析により、CBD1 の Ca^{2+} 結合部位に Ca^{2+} が結合すると NCX1 細胞内ドメインが大きく構造変化することが明らかになってきた⁽⁶⁾。そこで、野生型および変異型 NCX1 を MDCK 細胞に遺伝子導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度と基底膜側への局在制御との関係について解析した。

3. 研究結果

3.1 アダプター蛋白複合体サブユニットに対する NCX1 上の結合部位の同定

アダプター蛋白複合体サブユニット ($\mu 2$) に対する NCX1 上の結合部位を同定するため、まずアダプター蛋白複合体サブユニットの GST 融合蛋白質と NCX1 細胞内ドメインの様々な領域の His タグ融合蛋白質を用いた GST-pull down アッセイにより、アダプター蛋白複合体サブユニットの結合部位を解析した⁽⁴⁾。その結果、アダプター蛋白複合体サブユニットは NCX1 細胞内ドメインの CBD1 領域に結合することが示された (Figure 2)。一方、アダプター蛋白複合体サブユニットは CBD1 領域と相同配列を有する CBD2 領域には結合しなかった。さらに、その結合部位を同定するため、CBD1 領域内のアミノ酸を Ala に置換した変異体を作製し、アダプター蛋白複合体サブユニットへの結合能を欠失した部位特異的変異型 CBD1 の検索を行ったところ、CBD1-Y422A 変異体ではその結合能が消失した。これらの結果より、NCX1 細胞内

ドメインの tyrosine 残基を有するモチーフ (DYE) がアダプター蛋白複合体サブユニットの結合配列として同定された。

3.2 アダプター蛋白複合体サブユニットに対する CBD1 相互作用の Ca^{2+} 依存性

Figure 2 の結果より、アダプター蛋白複合体サブユニットは CBD1 領域に結合すると考えられたが、この CBD1 領域には NCX1 の Ca^{2+} 依存性活性化機構に関わる Ca^{2+} 結合部位が存在することが知られている。また、最近の NCX1 細胞内ドメインの構造解析から、CBD1 の Ca^{2+} 結合部位に Ca^{2+} が結合すると NCX1 細胞内ドメインが大きく構造変化することが明らかになっている⁽⁶⁾。これらのことから、NCX1 とアダプター蛋白複合体サブユニットの相互作用は細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性に制御される可能性が推定された。そこで、NCX1 細胞内ドメインとアダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用における Ca^{2+} 濃度依存性について検討した。現在までに得られている結果から、CBD1 とアダプター蛋白複合体サブユニットの相互作用は低 Ca^{2+} 濃度で亢進し、高 Ca^{2+} 濃度で低下することが推定された (詳細は検討中)。

3.3 培養腎尿細管上皮細胞を用いた野生型および変異型 NCX1 の局在解析

マウス腎皮質における NCX1 の発現分布を抗 NCX1 ポリクローナル抗体で解析したところ、これまでの報告と一致して⁽²⁾、NCX1 は遠位尿細管の基底膜側に局在していることが確認された (Figure 3)。

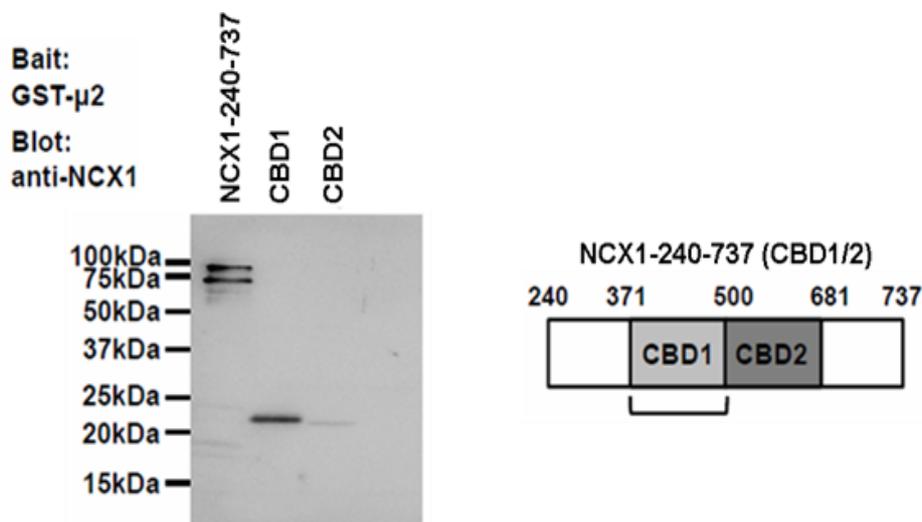


Figure 2. GST pull down assay and constructs of NCX1 fusion proteins

次に、NCX1 の細胞外領域ペプチドに対する抗ニワトリ抗体を用い、野生型および変異型 NCX1 を遺伝子導入した MDCK 細胞(培養腎上皮細胞)の蛍光免疫染色を行ったところ、**Figure 4** に示すように、野生型 NCX1 は主に細胞質に存在し、一部基底膜への発現がみられた。一方、アダプター蛋白複合体サブユニットへの結合能が消失する CBD1-Y422A 変異体を MDCK 細胞に遺伝子導入した場合、この変異体 NCX1 の基底膜への発現は野生型に比べて増加していた。これらの結果は、NCX1 とアダプター蛋白複合体サブユニットの相互作用が NCX1 の基底膜側への発現に関与することを示唆している。つまり、アダプター蛋白複合体サブユニットへの結合能が消失することにより NCX1 の基底膜側への発現が増加したことから、

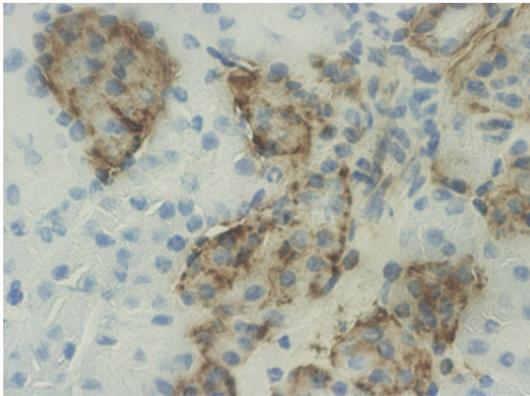


Figure 3. Immunohistochemical staining for NCX1 in murine renal cortex

NCX1 はアダプター蛋白複合体サブユニットと結合することにより NCX1 を細胞内に取り込む方向に働くものと考えられた(エンドサイトーシス)。

さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度と基底膜側への局在制御との関係について調べるため、これら野生型および変異型 NCX1 発現細胞に $1 \mu M$ のイオノマイシンを 1 時間処置した後に蛍光抗体染色を行い、NCX1 の基底膜側への発現の変化について比較した。その結果、CBD1-Y422A 変異体の基底膜側への発現はイオノマイシン処置をしてもほとんど変化が見られなかったのに対し、野生型 NCX1 の場合にはイオノマイシンにより基底膜への発現が明らかに増加した。CBD1 とアダプター蛋白複合体サブユニットとの結合は Ca^{2+} 濃度依存性であり、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下すると NCX1 とアダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用は強くなるために NCX1 の基底膜側への発現が減少し、逆に Ca^{2+} 濃度の増加によりアダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用が弱まり、NCX1 の基底膜側への発現が増加するものと推察された。

現在、NCX1 とアダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用が NCX1 の輸送活性に及ぼす影響について、 $^{45}Ca^{2+}$ 取り込み実験および電気生理学的手法により検討中である。

4. 考察および今後の課題

本研究において、NCX1 の細胞内ドメインがアダプター

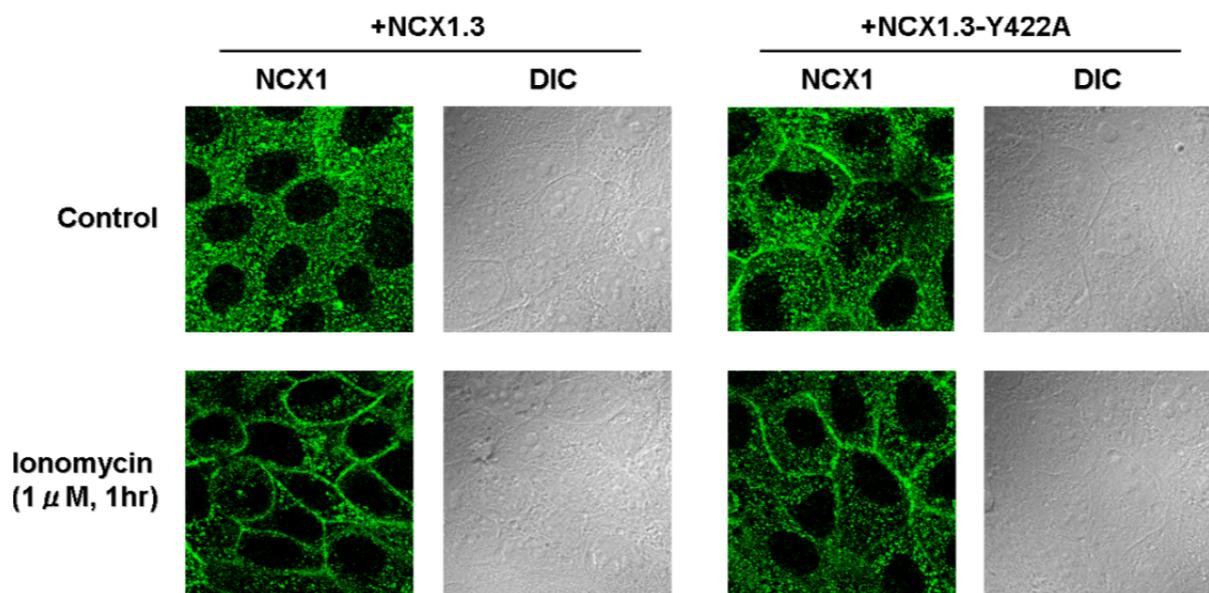


Figure 4. Immunofluorescence staining for NCX1 in murine renal cortex

蛋白複合体サブユニット($\mu 2$)と相互作用することを見出した。興味深いことに、この相互作用は遠位尿細管における NCX1 の基底膜側への限局的なソーティング機構に関与しているものと考えられた。また、NCX1 の CBD1 とアダプター蛋白複合体サブユニットの相互作用が低 Ca^{2+} 濃度で亢進し、高 Ca^{2+} 濃度で低下することから、この相互作用は NCX1 の基底膜側への合目的な機能発現の制御機構になることが推定された (Figure 5)。つまり、遠位尿細管細胞において、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下した時に NCX1 (Ca^{2+} 非結合型) は不活性化されるとともに、アダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用が亢進し、エンドサイトーシスにより基底膜側から除去される。一方、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した時に NCX1 (Ca^{2+} 結合型) は活性化されるとともに、アダプター蛋白複合体サブユニットとの相互作用が低下し、エンドサイトーシスの停止により基底膜側に集積することになる。さらに、この NCX1 のソーティング機構と Ca^{2+} 依存性活性制御機構は密接に関わっている可能性が考えられ、これらの機能的リンクの解明は今後の重要な検討課題である。

NCX1 の CBD1 領域にはソーティングシグナルとなる新規モチーフ (DYE) が存在している。今後、このモチーフの変異体を用いた局在解析および機能解析により、遠位尿細管における NCX1 の基底膜側へのソーティング機構の全容を解明したいと考えている。これらの研究成果は、尿細管セグメント特有のイオン輸送機構の構築原理およびその制御システムを統合的に理解する上で重要な知見

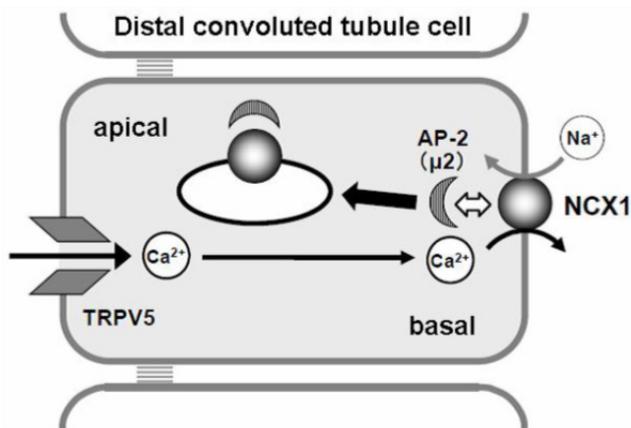


Figure 5. Proposed mechanism for $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -dependent localization of NCX1 in basolateral membrane of distal convoluted tubule cells

になるものと考えられる。

現在、アダプター蛋白複合体サブユニットへの結合能を欠失した変異型 NCX1 の遺伝子導入マウス (遠位尿細管特異的トランスジェニックマウスおよびノックインマウス) の作出に着手しており、今後、NCX1 の遠位尿細管基底膜側へのソーティング機構の生理学的・病態学的意義を個体レベルで解明することにより、未だ原因不明の疾患 (腎 Ca^{2+} 排泄異常、 Ca^{2+} 代謝異常、骨代謝異常など) の病態解明や新規治療薬の開発に結び付けたいと考えている。

謝 辞

本研究にご協力を頂いた伊豫田拓也氏、後藤雄輔氏 (同教室) に感謝します。また、本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いたソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

文献等

1. Iwamoto T, Watanabe Y, Kita S, Blaustein MP. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7: 188-198, 2007.
2. Lytton J, Lee SL, Lee WS, van Baal J, Bindels RJ, Kilav R, Naveh-Many T, Siler J. The kidney sodium-calcium exchanger. *Ann N Y Acad Sci*. 779:58-72, 1996.
3. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556, 2001.
4. 岩本隆宏, 伊豫田拓也, 堀江一郎, 喜多紗斗美 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体とアダプター蛋白質複合体因子の相互作用 平成 23 年度生理研研究会抄録 (平成 23 年 11 月)
5. Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M, Phosphorylation-dependent regulation of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem* 271: 13609-13615, 1996.
6. Hilge M, Aelen J, Foaer A, Perrakis A, Vuister GW. Ca^{2+} regulation in the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger features a dual electrostatic switch mechanism. *Proc Natl Acad Sci*. 106: 14333-14338, 2009.

Molecular Mechanism for Targeting of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger to Basolateral Membrane in Renal Epithelial Cells and Its Pathophysiological Significance

Satomi Kita, Ichiro Horie, Takahiro Iwamoto

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Summary

Na⁺/Ca²⁺ exchanger type 1 (NCX1) is ubiquitously expressed in the plasma membrane of various cell types including heart, smooth muscle, nerve and renal tubule. This transporter bidirectionally exchanges 3 Na⁺ with 1 Ca²⁺, depending on the electrochemical gradients across the plasma membrane. In renal tubule, NCX1 is localized to the basolateral membranes of distal convoluted tubule cells, and is considered to be involved in Ca²⁺ reabsorption. However, the molecular mechanisms for its membrane sorting remain to be elucidated. In the present study, we found that the intracellular domain of NCX1 interacts with the adaptor protein using yeast two-hybrid screening in murine kidney cDNA library. Using GST pull-down assays, we further identified the binding motif in NCX1 molecule. We also found that the mutations in the binding motif of NCX1 affect its membrane sorting in epithelial MDCK cells, suggesting the interaction between NCX1 and the adaptor protein plays a key role in NCX1 basolateral sorting.