

Na⁺依存性イオン輸送体 NHE1 によるカルシニューリン活性化機構の解明

久光 隆, 若林 繁夫

国立循環器病研究センター分子生理部

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細胞の多様な物資の出入を調節する。イオントランスポーターNa⁺/H⁺交換輸送体1 (NHE1)は、形質膜に普遍的に存在し Na⁺と H⁺を輸送することで細胞内 pH、細胞内 Na⁺濃度を調節する。心臓では NHE1 の心肥大形成ホルモンによる慢性的な活性化は細胞内の Na⁺濃度上昇を介して心肥大・心不全を引き起こすが、そのメカニズムの全容は明らかではない。

申請者らは最近、NHE1 の新規相互作用因子として、タンパク質脱リン酸化酵素のカルシニューリン (CaN) を発見した。CaN は心肥大を仲介する中心的な分子として知られ、下流の転写因子 NFAT の活性化を介して肥大化関連遺伝子の発現を亢進させる。CaN は 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 活性化によるおそらく 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、これが NHE1 活性化による心筋細胞肥大化機構の一部であることが明らかとなった (*Mol Cell Biol* 2012, 助成番号 0836)。しかし、NHE1 を介した CaN 活性化の詳細な分子機構は未解明である。本研究では、NHE1 の活性化がどのように CaN/NFAT シグナルを活性化するのか、NHE1 と CaN との結合親和性が NFAT へのシグナル伝達効率を決定するという仮説を、NHE1 の CaN 結合領域に対する変異解析で検証した。

NHE1 本来の CaN 結合配列 (PVITID) をより親和性の高い配列 (PVIVIT) または低い配列 (PVI AVN) と置換すると NHE1 による CaN/NFAT シグナルは抑制された。同様に、NFAT 由来の配列 (PRIEIT, PSIQIT, または PSIRIT) に置換すると、これらの変異体と共沈する CaN 量は野生型と比べて増加し、CaN/NFAT シグナルも抑制された。さらに、PVITID 配列のアラニンによる一置換変異解析により、NHE1 本来の配列が最も効率よく CaN/NFAT シグナルを増幅できることが分かり、これらのことは NHE1 と CaN の適度な親和性が重要であることを示唆している。NHE1 本来の配列が持つ中間的な CaN 親和性が CaN の NHE1 の解離とその後の NFAT との結合に重要であると考えられる。

1. 研究目的

心臓は、高血圧・ホルモン刺激などの負荷が続くと適応のために肥大化するが、負荷が更に続くと病的肥大から心不全に至る。心不全は心臓病の最終病像で予後は極めて悪い。従って、病的肥大移行メカニズムの解明は、心不全克服の手段を考える上で大変重要である。病的肥大を仲介する因子の一つとして脱リン酸化酵素のカルシニューリン (CaN) が知られている¹⁾。CaN は細胞内 Ca²⁺ 上昇により活性化され、下流の転写因子 Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を脱リ

ン酸化し、これが核内に移行することで様々な肥大化関連遺伝子の発現を亢進させる。CaN は主に細胞質に存在するが、近年、Ca²⁺ を制御する膜蛋白質の近傍に局在化し、局所 Ca²⁺ による活性制御を受ける仕組みが存在することが分かってきた。このような膜に局在化した CaN が、その局在する標的の活性に依存した特異的なシグナル伝達を仲介することが予想される。私たちは近年、CaN と Na⁺ 依存性イオントランスポーター Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1 (NHE1) が直接結合することを見つけた。

NHE1 は、細胞の内外で形成される Na^+ 濃度勾配を駆動力として Na^+ と H^+ を交換輸送することで細胞内 pH、細胞内 Na^+ 濃度を調節する²⁾。心臓では心肥大形成を刺激するホルモンによる NHE1 の慢性的な活性化は細胞内の Na^+ 濃度上昇を介して心肥大・心不全を引き起こすが、そのメカニズムの全容は明らかではない。私たちは最近、NHE1 の新規相互作用因子として CaN を発見した。CaN は 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 活性化によるおそらく局所 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 (Fig. 1)、実際にこの機構が心筋細胞を肥大化させることを示し、これが NHE1 活性化による心筋細胞肥大化機構の一部であることを提案してきた³⁾ (助成番号 0836)。しかし、NHE1 に結合した CaN が活性化された後、どのようにして NFAT を脱リン酸化するか分かっていない。CaN による NFAT の脱リン酸化反応には両者の結合が必須であり、CaN は同一部位を介して NHE1 または NFAT と結合することから、CaN/NFAT 経路の活性化には CaN が NHE1 から一旦解離する必要がある。そこで私たちは、どのような機構で NHE1 から CaN が解離し、下流の NFAT にシグナルが伝わるのか、CaN の NHE1 から NFAT への移行

はそれぞれの結合親和性の差によって起こると予想し、検討した。

2. 研究方法

2.1 NHE1 発現プラスミドの作成とその発現細胞の取得

NHE1 発現プラスミドとして、C 末端に HA タグ配列 (YPYDVDPDYA) のコード配列を挿入したヒト由来の NHE1cDNA を pECE ベクターに組み込んだものを用いた。NHE1 の CaN 結合領域の改変は、目的の配列を含むプライマーを用いた PCR により NHE1 本来の配列 (PVITID) と置換することで行った。PVITID 部位は、ヒト NFAT の CaN 結合配列 (PRIEIT:NFATc1 および c2, PSIQIT:NFATc3, PSIRIT:NFATc4)、現在最も結合親和性の高いことが知られる人工配列 (PVITID) または最も結合親和性の低いことが知られる出芽酵母の Hph1p 由来の配列 (PVIAVN) との置換、またはアラニン等による一置換変異導入をおこなった。これらの発現プラスミドは内在性 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) にトランスフェクションし、 H^+ -killing 法により安定発現細胞株を得た。

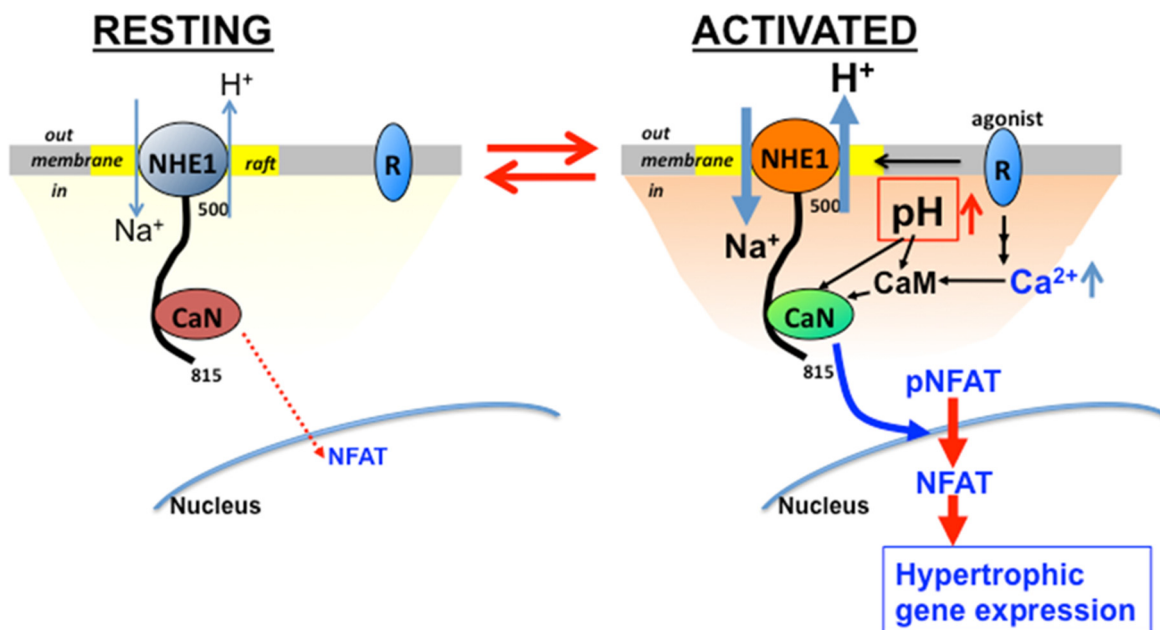


Fig. 1. Schematic representation of the activation of the CaN/NFAT pathway by NHE1

2. 2 NHE1 とその変異体の活性測定

NHE1 発現細胞の NHE1 活性は、細胞内酸性化による NHE1 の活性化に伴う $^{22}\text{Na}^+$ の取り込み量を指標に細胞内に蓄積した放射活性を測定することで定量した。NHE1 特異的な $^{22}\text{Na}^+$ 取り込み量は NHE1 阻害剤 (EIPA) 感受性の成分から求めた。細胞内の pH 固定は、細胞を K^+/H^+ 交換活性を持つイオノフォア nigericin を含み、 K^+ を任意の濃度に調節した緩衝液に浸けることで行った。NHE1 発現細胞を 24 穴プレートでコンフルエントになるまで培養し、5 時間無血清状態にした。その後 K^+ と nigericin を含む Na^+ -free HEPES 緩衝溶液 (pH 固定液) で 0.5 時間処置して細胞内 pH を固定後、 $^{22}\text{Na}^+$ を含む pH 固定液に 1 分間浸け、取り込まれた放射活性を測定した。

2. 3 ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ

細胞内の CaN 活性は、NFAT の転写活性を指標に調べた。NFAT 応答配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を含むプラスミドを NHE1 発現細胞に導入し、刺激後の発光量を測定した。NHE1 発現細胞を 96 穴プレートに播き、24 時間後に pGL4.30[luc2p/NFAT-RE/Hygro] と内部標準レポーターとして pGL4.75[hRluc/CMV] を無血清条件下で導入し、さらに 24 時間培養した。その後、10% 血清を含む培地で 17 時間刺激し Dual-Glo アッセイシステムにより発光量を定量した。

2. 4 免疫沈降実験

NHE1 発現細胞を培養し、これを 1% Triton X-100 を含む生理食塩溶液で可溶化し、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った。NHE1 と共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離後にイムブロッティングを行った。膜に転写された NHE1、共沈降した CaN をそれぞれ抗 HA 抗体、抗 CaNA サブユニット抗体で検出した。また、細胞内 pH を固定する必要がある実験では、前出の pH 固定液で 30 分間インキュベートした細胞を標本とした。

3. 研究結果

3. 1 NHE1 本来の CaN 結合部位を NFAT 由来の配列に置換すると野生型 NHE1 による CaN 活性増幅作用は抑制される

私たちはこれまでに、NHE1 による CaN 活性増幅作用には CaN の NHE1 への結合と NHE1 活性の両方が必要であることを示してきた³⁾。CaN 活性の指標となる NFAT の転写活性は、内在性 NHE1 を欠失した PS120 細胞に対して野生型 NHE1 を発現させた場合、約 2.5 倍程度上昇した (Fig. 2C)。ところが、基質輸送活性は野生型と同等であるが CaN 結合能を持たない NHE1 変異体 ($\Delta 715-720$)、または活性はないが CaN 結合能を持つ NHE1 変異体 (E262I) のどちらかを発現させた場合には、野生型 NHE1 でみられた CaN 活性増幅作

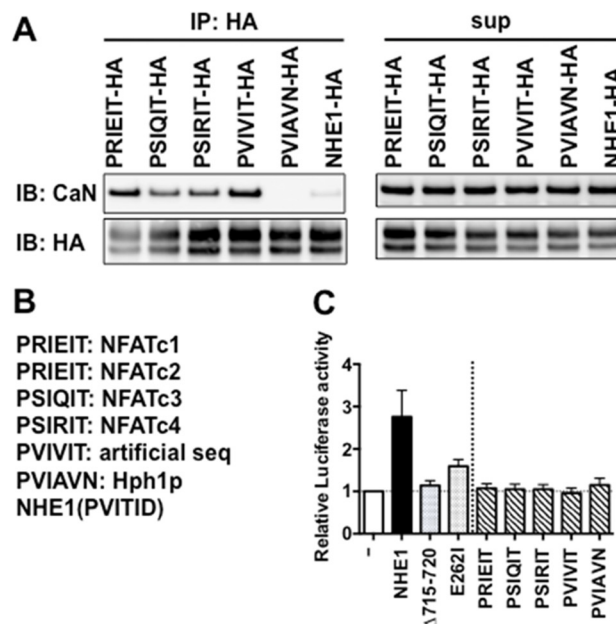


Fig. 2. Effect of substitutions of the PVITID with other CaN-binding sequences on the NFAT transcriptional activity

用は無かった (Fig. 2C)。これらのことは、NHE1 による CaN 活性化には、NHE1 の活性と CaN 結合能が必要であることを示している。しかし、NHE1 に結合した CaN が活性化された後、どのようにして NFAT を脱リン酸化するか分かっていない。CaN による NFAT の脱リン酸化反応には両者の結合が必須であり、CaN は同一部位を介して NHE1 または NFAT の CaN 結合モチーフ配列と結合することから、CaN/NFAT 経路の活性化には CaN が NHE1 から一旦解離する必要がある。そこで私たちは、どのような機構で NHE1 から CaN が解離し、下流の NFAT にシグナルが伝わるのか、CaN の NHE1 から NFAT への移行はそれぞれの結合親和性の差によって起こると予想し、検討した。

NHE1 本来の CaN 結合配列 PVITID を NFATc1-4 の CaN 結合配列 (PRIETI, PSIQIT または PSIRIT)、親和性が最も高いことが知られる人工配列⁴⁾ (PVIVIT)、または最も低いことが知られる出芽酵母由来の配列⁴⁾ (PVI AVN) に置き換えた NHE1 変異体それぞれを安定発現する PS120 細胞を作成した (Fig. 2B)。まず、これらの発現細胞を用いて NHE1 変異体と CaN の結合親和性に差があるかどうか、共免疫沈降実験で調べた。野生型 NHE1 と変異体間で共沈降する CaN 量を比較すると、野生型は PVIVIT 配列を持つものより少なく、PVI AVN 配列のそれよりも多かった (Fig. 2A)。この

結果は CaN 結合配列ペプチドと CaN 結合配列を含む NHE1 の C 末端側細胞質領域のフュージョン蛋白を用いた *in vitro* の競合的結合実験の結果³⁾ と矛盾しなかった。そして、NFAT 由来の配列を持つ NHE1 と共沈する CaN 量は、全ての配列で野生型よりも多かった (Fig. 2A)。これらの野生型 NHE1 とは異なる CaN 結合親和性を持つ NHE1 変異体の NFAT 転写活性を調べたところ、野生型よりも親和性が高くても、低くても、CaN 活性増幅作用は消失した (Fig. 2C)。

3. 2 NHE1 の CaN 結合配列 PVITID の 1 アミノ酸置換による CaN 活性増幅作用に及ぼす影響

私たちはさらに、NHE1 の PVITID 配列に 1 アミノ酸置換を施し、それら 1 アミノ酸置換体と共沈する CaN 量と NFAT 転写活性促進効果との関連性を観察した。作成した NHE1 変異体の基質輸送活性に異常が無いか、これらを発現する PS120 細胞を用いて NHE1 活性の細胞内 pH 依存性を野生型と比較したところ、全て野生型と同等であった (Fig. 3B)。CaN 沈降量において、野生型の PVITID と同程度の変異体はなかった (Fig. 3A)。アラニン置換体の PVITAD および PVITIA (下線は置換後の残基) は CaN 結合能を消失した (Fig. 3A)。野生型 NHE1 の PVITID 配列の中で CaN 結合モチーフのコンセンサス配列 (PxIxIT) と唯一異なるアスパラギン酸 (D) の置換体は CaN 結合能を失うこと

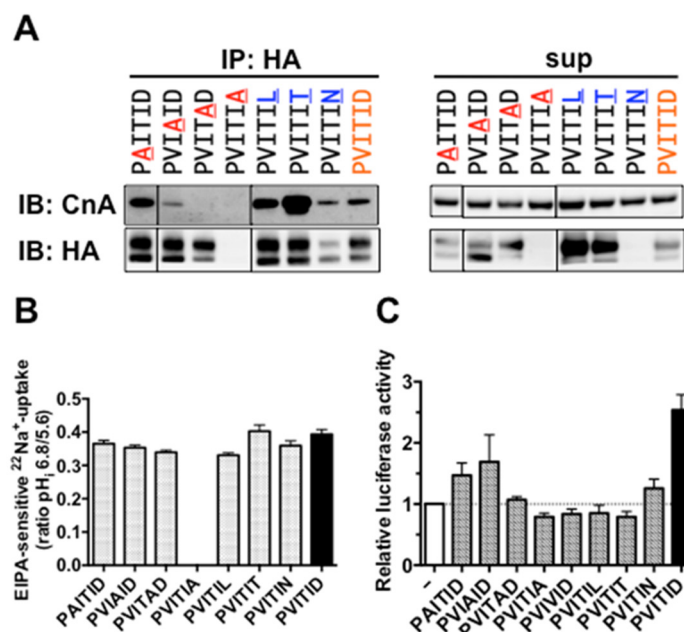


Fig. 3. Effect of single mutations in the PVITID sequence on the NFAT transcriptional activity

はなく、コンセンサスのスレオニン (T) では CaN 結合能が著しく向上した (Fig. 3A)。これら NHE1 の 1 アミノ酸置換体の NFAT 転写活性を調べたところ、Fig. 2 の結果と同様に、野生型よりも親和性が高くても、低くても、CaN 活性増幅作用は消失した (Fig. 3C)。

3.3 NHE1 と CaN の結合は pH 依存的である

私たちは、NHE1 活性化による NHE1 に結合した CaN の活性化機構として、受容体刺激により活性化した NHE1 が近傍の局所アルカリ化領域を形成し、これにより CaN が活性化され下流の NFAT を脱リン酸化させると考えている (Fig. 1)。そこで、NHE1 と CaN の結合に pH が影響するか調べた。

生きた細胞における NHE1 と CaN との結合の細胞内 pH 依存性を調べるために、細胞外緩衝液の K⁺濃度を適宜変更した溶液に K⁺/H⁺交換活性を持つ Nigericin を加えた液で細胞内 pH を固定し、その後通常の免疫沈降実験をおこなった。CaN の沈降量は、静止状態の細胞内 pH である 7.2 に対して酸性側、アルカリ性側両方で減少した (Fig. 4)。CaN 沈降量が特にアルカリ性側で減少したことは、NHE1 活性化後に CaN が遊離しやすくなることを示唆している。

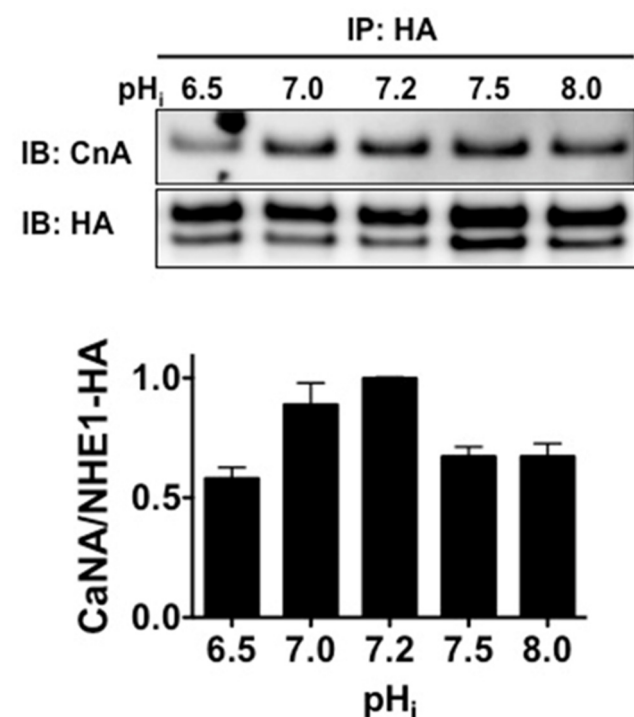


Fig. 4. pH-dependent interaction between NHE1 and CaN

4. 考察

私たちは今回、NHE1 に結合した CaN が NHE1 の活性化に伴い、おそらく NHE1 分子近傍の局所アルカリ化により活性化され下流の NFAT にシグナルを伝達する機構として、NHE1 と CaN または NFAT と CaN の結合親和性の差がシグナル伝達を促進するという仮説を検証した。生きた細胞でこの仮説を検証するために、NHE1 本来の CaN 結合配列に変異を導入することで結合親和性を変えた場合の CaN 活性増幅作用との関係を調べた。他の CaN 結合配列で置換した場合、または本来の配列に 1 置換変異を導入した場合いずれにおいても、本来の配列よりも CaN 結合親和性が弱くても、強くなっても CaN 活性増幅効率は減少した。私たちは、弱い場合には、CaN を活性化させるためにかかる時間を満たすために十分に留まることが出来ず、また強い場合には、結合した CaN の活性化は十分に起こるが解離がしにくくなることで下流の NFAT への結合効率が下がるためではないかと考えている。NHE1 による CaN 活性化機構において、NHE1 が本来持つ中間的な CaN 結合親和性が効率よくシグナルを伝えることに最も適していると考えられる。

NHE1 の CaN 結合配列は PVITID であり、コンセンサス配列 (PxIxIT) とは 6 番目のアミノ酸が T から D に変わっている。この D への変異が CaN 親和性に影響している可能性がある。D を T に、コンセンサス配列と同じになるよう変異導入すると CaN 結合親和性は著しく上昇した (Fig. 3A) ことから、D であることが適度な親和性を保つ一つの要因であると考えられる。NHE1 の PVITID 配列の最後の D は、少なくとも両生類までは種を超えて保存されており、また CaN も保存されていることから、それぞれの種で私たちが提案してきた NHE1 による CaN 活性増幅機構が何らかの生理的意義をもつ可能性がある。

細胞内における NHE1 と CaN の結合量は、静止状態の細胞内 pH7.2 よりもアルカリ性側で減弱した (Fig. 4) ことは、下流へのシグナル伝達効率の上昇に寄与すると考えられる。私たちは、NHE1 に結合した CaN の活性化には NHE1 の活性化にともなう NHE1 分子近傍のアルカリ化が重要であると考えており、この結果からアルカリ化が CaN の活性化と遊離を容易にしている

と考えられる。また、更に生理的な刺激として Gq 共役型の G 蛋白質共役型受容体刺激は、NHE1 を活性化することが知られるが、NHE1 からの CaN の遊離を促進する結果を得ている（未掲載）。詳細なメカニズムは不明であるが、NHE1 と CaN の結合も pH 依存的であり、NHE1 による CaN を介した NFAT 活性化に寄与すると考えられる。

5. 今後の課題

NHE1 の活性化に伴う NHE1 に結合した CaN の活性化には、NHE1 分子近傍のアルカリ化を想定しているが、私たちは未だこれを直接証明した証拠をもたない。H⁺は Ca²⁺と似て反応性が高く、細胞内に緩衝物質が豊富に存在するイオンであり、Ca²⁺と同様に H⁺ハンドリング蛋白質の近傍ではそれ以外の場所とは異なる動態を示すと考えられ、NHE1 が局所で高い pH 領域を形成することが示唆されている⁵。私たちは、NHE1 分子近傍に局在化する pH 測定プローブを作成し、グローバルな細胞質とは異なる pH 動態を示す局所 pH 領域の存在を証明しようと試みている最中であり、これまでの研究を例に“pH シグナル経路”の存在を示したい。

6. 文献等

1. Molkenkin, 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
2. Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J. (1997) Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 77, 51-74.
3. Hisamitsu, T., Nakamura, TY., Wakabayashi, S. (2012) Na⁺/H⁺ exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biol* 32, 3265-3280
4. Roy, J., Li, H., Hogan, PG., and Cyert, MS. (2007) A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function. *Mol Cell*. 25, 889-901.
5. Willoughby, D., Masada, N., Crossthwaite, AJ., Ciruela, A., and Cooper, DMF. (2005) Localized Na⁺/H⁺ Exchanger 1 Expression Protects Ca²⁺-regulated Adenylyl Cyclases from Changes in Intracellular pH. *J Biol Chem* 280: 30864-30872.

Analysis of the Mechanism Underlying Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1-Dependent Calcineurin Activation

Takashi Hisamitsu, Shigeo Wakabayashi

National Cerebral and Cardiovascular Center

Summary

Cardiac hypertrophy is caused by continuous stress, such as high blood pressure, and by neurohumoral factors, and mostly leads to heart failure, which has poor prognosis. Elucidating the mechanism by which hypertrophy leads to heart failure is very important in preventing the latter. Calcineurin (CaN), a Ca²⁺-dependent phosphatase, is a key molecule that regulates pathological cardiac hypertrophy. CaN dephosphorylates a downstream transcription factor NFAT, which in turn induces hypertrophic gene expression. Recently, we found that an Na⁺-dependent pH-regulating transporter NHE1 activated the CaN-NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy, which involved the direct binding of CaN to the 6-residue motif (PVITID) in the cytosolic domain of NHE1; we hypothesized that local pH increase produced by NHE1 enhanced the activity of CaN bound to NHE1 by sensitizing Ca²⁺ (grant No. 0836). However, it is unknown how CaN signal is transmitted from NHE1 to NFAT. CaN needs to be released from NHE1 after activation, because CaN-binding to NFAT is essential for its dephosphorylation, with CaN being able to associate with either NHE1 or NFAT at the same binding site. Therefore, we expected that the differences of binding affinity between CaN and NHE1 or NFAT allow CaN to move from NHE1 to NFAT. In this study, we performed detailed mutagenesis study of the CaN-binding site of NHE1. Substitution of the PVITID sequence with a high-affinity sequence (PVIVIT) or a low-affinity sequence (PVIAVN) abolished the CaN-NFAT signaling. In addition, substitution with other high-affinity sequences originating from NFATs (PRIEIT, PSIQIT, or PSIRIT) also abolished the signaling. Alanine-scanning mutagenesis revealed that the original NHE1 sequence showed optimal signal amplification, suggesting that the balanced affinity between NHE1 and CaN is critical for efficient signaling. We consider that such moderate interaction is important for the removal of CaN from NHE1, and for rebinding to downstream target NFAT after NHE1-dependent activation.