

動物細胞 Na^+/H^+ 交換輸送体：分子から疾患まで

若林 繁夫, 久光 隆, ユセフ・ベンアマー,
中村 (西谷) 友重, 岩田 裕子

細胞内 pH, Na^+ , 細胞容積の調節はあらゆる生物の生存に必須である。 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE, Na^+/H^+ exchanger, SLC9 ファミリーともいう) はこれらの細胞機能に関与する主要なトランスポーターの一つである。NHE によるイオン輸送はホルモン・増殖因子・浸透圧変化等さまざまな細胞外シグナルによって調節されている。NHE はイオン環境整備の担い手として重要であるばかりでなく, 細胞内情報伝達の形質膜における最終エフェクター分子としても興味深い研究対象となっている。また, NHE の顕著に発達した制御システムは心疾患や筋変性疾患などのさまざまな病態と密接に関連しており, その制御機構の解明は新しい治療戦略につながるという意味でも重要である。本稿では, NHE によるイオン輸送とその制御機構, 必須結合タンパク質カルシニューリン B 様タンパク質 CHP と NHE ペプチド複合体の結晶構造, 筋ジストロフィー症などの筋変性疾患との関連について, 著者らの最近の成果を中心に概説したい。

1. はじめに

トランスポーターは脂質二重層という壁を越えて物質を選択的に輸送するという驚くべき機能を持ったタンパク質である。生細胞, 膜小胞あるいは再構成リピッド小胞を用いて, たとえばラジオアイソトープでラベルした基質の取り込み実験をしたことがある人なら, 率直にそのような感想を持つに違いない。学生時代に心筋細胞を用いて $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み実験でその高い活性を目にして, この輸送がタンパク質によって行われていることを知ったとき, 「膜を隔てて, どうやってイオンが運ばれるのだろうか?」というなんとも魅惑的なテーマにはまっていった。今回の総説のテーマである Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) は Na^+ と H^+ を

交換輸送するトランスポーターであるが, 輸送のメカニズムもさることながら, それにもまして興味深いのはその巧妙な活性調節の機構であり, またそれがこの輸送体と疾患との関係を語るうえでの重要なベースにもなっている。今回の特集号では, 著者らが最近5年程の間で新たに得た知見を中心に概説し, NHE という魅力的なトランスポーターについて少しでも読者の皆さんに知って頂けたらと思う。

2. NHE の構造と機能

2-1. 分子種と生理機能

Na^+ と H^+ を交換輸送するトランスポーターは原核細胞から真核細胞まで, 形質膜・内膜を問わず, 細胞膜に広く存在する^{1,2)}。1989年にヒト NHE1 が最初にクローニングされ, NHE ファミリーに属する分子種としては本稿執筆時点で11のアイソフォームが報告されている (NHE1-11, SLC9A1-11)。NHE1-5 が細胞の形質膜, NHE6-9 がオルガネラ膜に存在すると考えられており, それぞれの膜系で特有の機能を持つと予想されている。NHE ファミリータンパク質分子は, 構造的・機能的に異なる大きな二つのドメインに分けることができる (図 1A)。すなわち, 膜貫通

国立循環器病センター研究所循環分子生理部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Mammalian Na^+/H^+ exchangers: from molecule to disease
Shigeo Wakabayashi, Takashi Hisamitsu, Youssef Ben Ammar, Tomoe Y. Nakamura-Nishitani and Yuko Iwata (Department of Molecular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

ヘリックスを含み、イオン輸送を担う約 500 残基からなる比較的保存されたアミノ (N) 末端側の膜結合ドメインと、イオン輸送を制御すると考えられる約 300 残基からなる相同性の低いカルボキシル (C) 末端側の細胞質ドメインである。最近見出された NHE10 および NHE11 では、通常細胞質ドメインと考えられていた C 末端側領域にさらに新たな膜貫通ドメイン、サイクリックヌクレオチド結合モチーフおよび膜電位センサーの存在が予想されており、その詳しい解析が待たれる。さて、著者らが主として扱っている NHE1 はあらゆる組織に普遍的に発現するタイプであり、細胞内 pH (pH_i)、細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$)、細胞容積の制御といったいわば細胞のイオン恒常性を維持する生理機能を持つ。さらに、NHE1 は、ホルモン、増殖因子や浸透圧変化などの外的シグナルによって活性化を受け、細胞内アルカリ化および $[Na^+]_i$ 上昇に寄与する。後述するように、この NHE1 の活性化は心疾患を含むさまざまな疾病におけるリスクファクターにもなり得るので、そのメカニズムの解明は病態を理解するうえでも重要である。外的シグナルによる NHE1 活性の調節は、細胞質ドメインに結合するさまざまな制御因子の結合・解離あるいはリン酸化などを通じて、最終的には後述する pH センサーの感受性変化によって起こると考えられているが、全貌はまだ明らかではない。

2-2. ダイマー形成

他の多くのトランスポーターと同様に、NHE1 がオリゴマーを形成することは以前から知られていた。アミノ基架橋剤 DSS 処理によって、NHE1 (および NHE3) は細胞膜上で容易に分子間架橋され、電気泳動上高分子量の位置に検出される³⁾。この架橋は C 末端細胞質ドメインを欠失した NHE1 でも起こるので、オリゴマー形成は膜貫通ドメイン間で起こると考えられた³⁾。しかし、NHE1 の機能におけるオリゴマー形成の意義は明らかでなかった。著者らは、Cys 残基を持たない NHE1 をベースに Cys 導入変異体を数多く作成し、それらの架橋剤に対する反応性を検討した。その結果、NHE1 が形質膜上で高次のオリゴマーではなくダイマーを形成することを確認した⁴⁾。さらに、細胞外の Ser375 を Cys に置換した NHE1 変異体では SH 架橋剤処理により NHE1 活性が著明に抑制されたことから、イオン輸送の際にそれぞれのサブユニットが何らかの構造変化を起こし、分子間架橋がその動きを制限したために輸送活性が阻害されたと考えた⁵⁾。このことはダイマー間の相互作用が活性調節を含む輸送活性に重要である可能性を提示している。この仮説をさらに検証するために、活性を持たない変異体 E262I を形質膜に発現させて内因性 NHE1 とのヘテロダイマーを形成させたとき、輸送活性はどうかを検討した。その結果、E262I の強いドミナントネガティブ効果が検出された⁵⁾(図 1B)。すなわち Na^+/H^+ 交換

活性を測定する一般的な方法である細胞内酸性化後の pH_i 回復速度は E262I の発現で著明に抑制され (a)、増殖因子 トロンピンによる pH_i 上昇 (NHE1 の活性化) は完全に消失した (b)。以上の結果は、ダイマー形成が NHE1 の輸送と制御に極めて重要であることを示唆している。別の実験から、ドミナントネガティブ変異体発現による活性阻害が起こるのは中性付近の生理的な pH_i の範囲内であり、 $pH_i < 6$ の細胞内 H^+ 濃度が充分高い時には起こらないことがわかった。このことから、ダイマー形成はイオン輸送そのものに必要なのではなく、pH センサー (次節で詳述) が正常な機能を発揮するのに必須であると考えられる。

2-3. pH センサー

恒温器が温度低下を感知して熱を発生して温度を保持するように、NHE1 の細胞質側には H^+ 輸送部位とは異なると予測される pH センサー部位が存在し、 pH_i 変動をモニターして輸送活性を調節し pH_i 恒常性を維持する巧妙な分子の仕掛けがある。pH センサーは NHE 活性調節のまさに中心的概念であり、その存在は生理的にも重大な効果を生む。NHE 活性が純粋に細胞内外の Na^+ 濃度勾配に従うと仮定するならば pH_i は 8 以上になるはずであるが、7.2 付近に厳密に維持されるのは pH センサーから H^+ が遊離するからであり、また細胞内アシドーシスからの速やかな回復は pH センサーに H^+ が結合して NHE を活性化するからである。pH センサーは、細胞のアシドーシス・アルカローシスを防御し、また種々のシグナルに応答して NHE 活性を変化させることを可能にする分子内制御装置である。

一般的に、NHE 活性は細胞を酸性化したのち、 $^{22}Na^+$ 取り込みまたは pH_i 回復をモニターすることによって測定できる。しかし、これら順モード (すなわち $[Na^+]_o/[H^+]_i$ 交換) 活性の pH_i 依存性では、 H^+ 輸送部位と H^+ 制御部位 (pH センサー) がともに細胞質側に存在すると想定されるため、それらを速度論的に区別することは困難である。他方、NHE の逆反応すなわち細胞に負荷した $^{22}Na^+$ の排出を測定すれば、輸送基質としての H^+ と制御因子としての H^+ の効果が逆になるため、これらを容易に区別することができる⁶⁾。図 2C に示すように、 $^{22}Na^+$ 排出活性は、細胞内輸送部位で起こると考えられる Na^+/H^+ 競合から予想される反応とは逆に pH_i 上昇とともに低下し、 $pH_i 7.5$ で完全に停止する (pH セットポイント)。この現象は、輸送部位とは異なる pH センサーが存在する重要な証拠の一つである。モデルで説明しよう。図 2A に示すように、細胞質側には輸送と制御に関わる 2 種類の H^+ 結合部位が存在すると考えられる。不活性型 I_1 は制御部位への複数個の H^+ (シミュレーションの結果では 3 個以上) 結合によって活性化型に変わり、NHE がイオン輸送活性を持つようになると想定される。この過程で、タンパク質の大幅な構造変化を

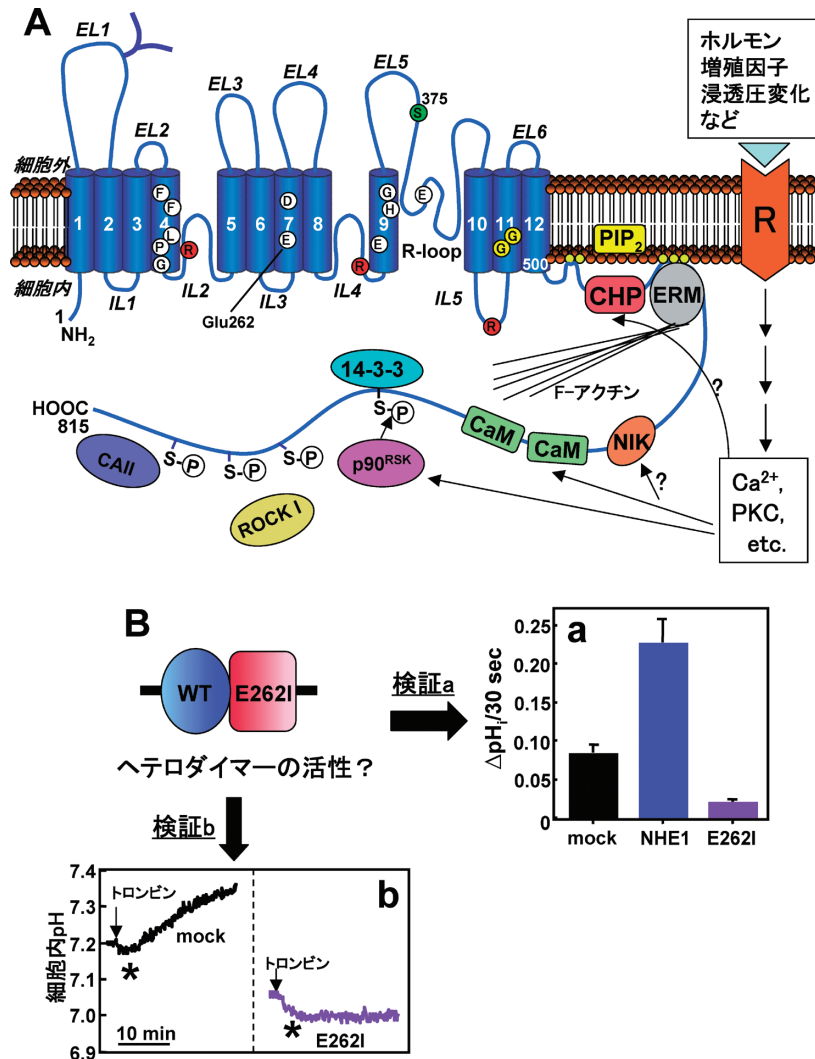


図1 NHE1の膜トポロジーモデルおよびダイマー形成の生理的意義に関する実験

(A) システイン走査変異解析により推察された膜トポロジーモデル。図中に示したアミノ酸残基は、変異導入が活性の低下または阻害剤感受性の低下をもたらしたもの(白)、細胞内pH感受性が酸性側シフトを示したもの(赤)、アルカリ側シフトを示したもの(黄)を表す。分子間架橋が活性低下をもたらしたCys導入部位(緑)。また、C末端側細胞質領域と相互作用する様々な制御因子を示した。CHP:カルシニューリンB様タンパク質、ERM:エズリン、ラディキシン、モエシン、NIK:Nck結合キナーゼ、CaM:カルモジュリン、14-3-3:アダプタータンパク質、ROCK1:RhoキナーゼI、CAII:炭酸脱水酵素II、EL:細胞外ループ、IL:細胞内ループ、R-loop, reentrant loop。R:受容体、PKC:プロテインキナーゼC。(B) 活性を持たない変異体E262Iのドミナントネガティブ効果を見る実験。(検証a) 内在性NHE1活性を持つ細胞(CCL39細胞)に発現マーカーとともに野生型NHE1(WT)あるいは変異体E262I(Glu262をIleに変異したもの)を発現させた。Na⁺/H⁺交換活性をNa⁺依存性pH_i回復の初期速度によって見積もった。pH_i回復速度はNHE1では増強され、E262Iでは内在性NHE1由来の活性が著明に抑制される。(検証b) NHE1は増殖因子であるトロンピンによる受容体刺激で活性化され、結果的にpH_iのアルカリ化が起こるが(左図)、E262Iを発現させるとこのアルカリ化は完全に消失した(右図)。トロンピン刺激後観察される一過性の細胞内酸性化(*)はIP₃産生に伴う細胞内Ca²⁺動員によって起こるが、E262Iを発現しても細胞内シグナリングは正常に起こることを示している。

伴うような不活性型I₂から活性型Aへの比較的遅い変換ステップが存在すると考えられる。興味深いことに、I₂→A変換はNHE1に比べてNHE3の方がかなり遅いとする実験データがある。

順モード活性のpH_i依存性はさまざまな要因によってアルカリ側あるいは酸性側にシフトすることが知られている

が、これは輸送・制御どちらの部位のH⁺親和性を変化させているのだろうか? 細胞内ATP枯渇の例で考えてみることにする。細胞内のATPを枯渇させるとpH_i依存性は酸性側に大きくシフトするが(図2B)、順モード活性だけに注目すると輸送・制御のどちらの部位の親和性を低下させてもpH_i依存性の酸性シフトが起こりシミュレーショ

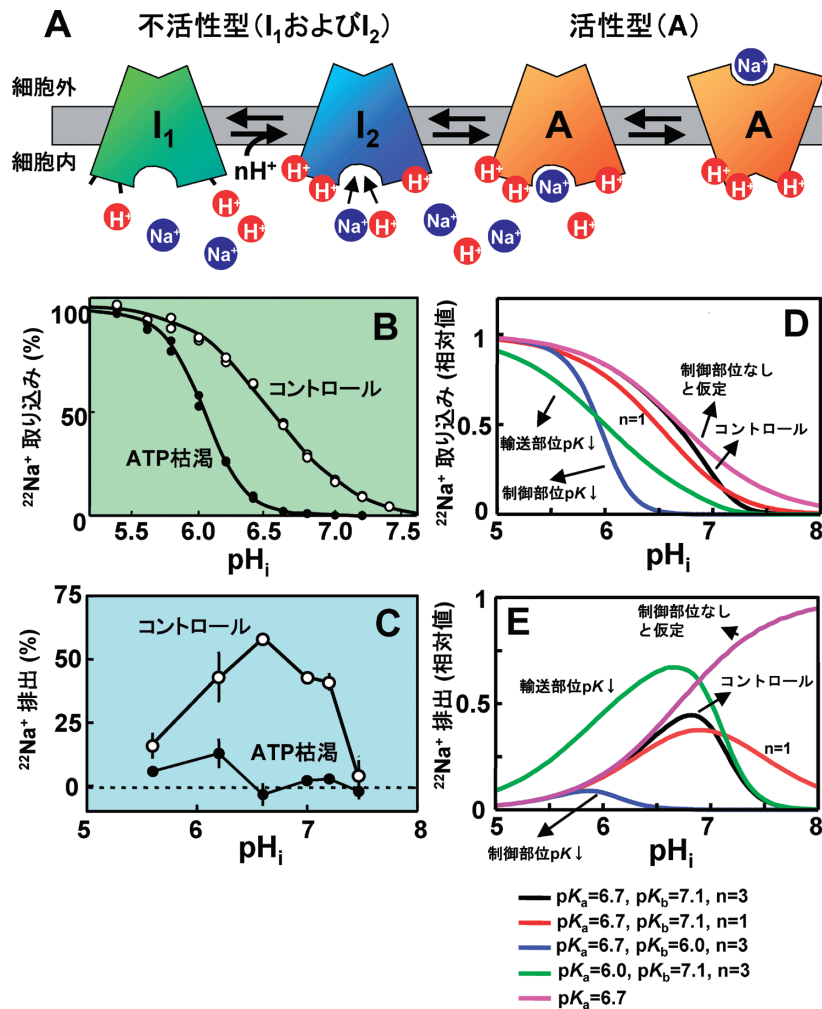


図2 NHE1がpHセンサー（H⁺制御部位）を有するという証拠

(A) H⁺によるNHE1活性化のモデル。NHE1にはNa⁺とH⁺が競合する輸送部位以外に複数のH⁺を感知する部位が存在し、H⁺結合による不活性化型 (I₂) から活性化型 (A) への構造変化が起こって初めてNa⁺/H⁺交換輸送が開始すると考えられる。図では、基質であるH⁺の輸送は省略している。(B)(C) 通常および細胞内ATPを枯渇した条件下で、²²Na⁺取り込みおよび²²Na⁺排出活性、すなわちNHE1の順モード ([Na⁺]_o/[H⁺]_i交換)あるいは逆モード ([Na⁺]_i/[H⁺]_o交換)活性を種々のpH_iで測定した。(D)(E) pHセンサーモデル(A)に定常状態速度論を適用し、順・逆モードのNHE1活性のpH依存性をシミュレーションした。輸送・制御部位のpH_iに対するpKをpK_a, pK_b、制御部位に関与するH⁺の個数をnとすると、順・逆モード活性ともpK_a=6.7, pK_b=7.1, n=3のとき実測値とよく合い(黒)、n=1では逆モードの急峻なH⁺による活性化が説明できない(赤)。また、制御部位が全くないと仮定すると、pH上昇に伴う逆モード活性のshut-offは観察されない(赤紫)。また、ATP枯渇は順モードのpH_i依存性を酸性側に大きくシフトさせ逆モード活性をほとんど消失させる(BおよびC)が、この現象は、輸送部位ではなく制御部位のH⁺親和性の大幅な低下で起こっていることがわかる(青)。なぜなら、輸送部位のH⁺親和性を低下させたシミュレーションでは実験事実とは反する大きな逆モード活性の上昇をもたらすはずだからである(E, 緑)。

ンで区別するのはそれ程容易ではない(図2D, 青 vs. 緑)。しかし逆モードを見ると、制御部位のH⁺親和性を低下させるとシミュレーションの結果はデータと合致するが、反対に輸送部位の親和性の低下は実験結果(図2C)とは全く反対に活性の大きな増加をもたらしてしまう(図2E, 青 vs. 緑)。このことは、NHE活性が輸送部位のH⁺親和性の変化ではなく、主として制御部位のH⁺親和性の変化によって調節されていることを示唆する。

pHセンサーの分子の実体は解明されていないが、これ

までの実験結果から細胞内ループに存在するArg440, Arg327, Arg180, C末端細胞質ドメインおよびそれに結合するカルシニユリンB様タンパク質CHPが重要であることが示唆されている(図1)⁷⁻¹⁰。輸送を担う膜貫通ドメインに連結して存在する細胞質側の何らかの大きな制御装置が存在し、その中の荷電残基がH⁺を感知することによって起こる構造変化がカチオン輸送部位に伝播し、交換輸送がonになると予想される。pH変化に応じてどのような構造変化が起こり、タンパク質が不活性化型から活性化型へ変換

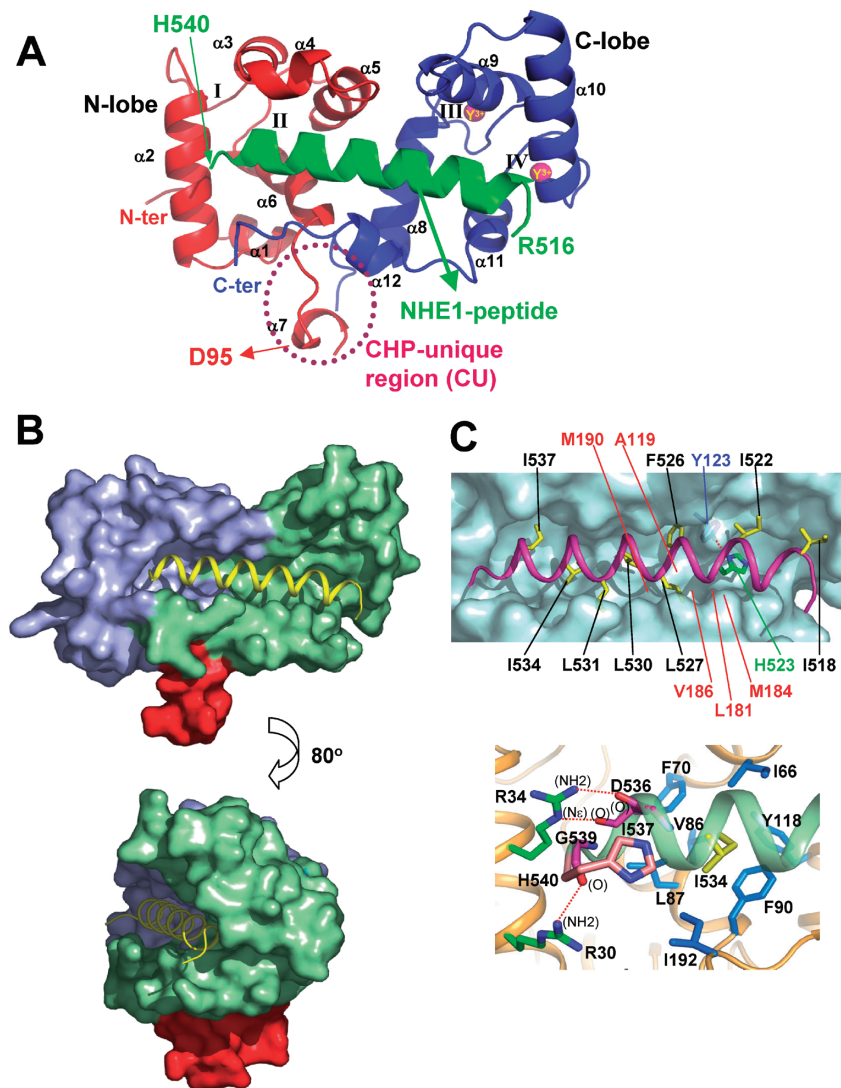


図3 CHP2/NHE1-ペプチド複合体の構造

(A) 複合体構造のリボン図。196 残基からなる CHP2 は N-lobe と C-lobe の大きなドメインからなり、中央に NHE1 ヘリックス (Arg516-His540) を結合する大きな溝がある。EF3 と EF4 には結晶化に使用した Y^{3+} イオンが結合している。CHP2 の中央に大きく突き出た CHP に特有の構造がある。(B) 複合体の空間充填図。NHE1 ヘリックスはリボンで示した。(C) CHP2-NHE1 相互作用の詳細。NHE1 の疎水性残基が CHP2 の残基からなる疎水性ポケットに収まっている。C-lobe では His523 と Tyr123 との水素結合、N-lobe では NHE1 側の Asp536, Ile537, Gly539 と CHP2 側の Arg30, Arg34 との水素結合が存在し、CHP2/NHE1 特異的相互作用に寄与する。

されるのかという疑問はすべての Na^+/H^+ アンチポーター*に共通した中心命題である。超高熱菌の Na^+/H^+ アンチポーター MjNhaP1 の二次元結晶では pH 変化に応じた膜貫通ヘリックスの相対位置の変化が検出された¹²⁾。また、大腸菌アンチポーター NhaA の結晶構造では、細胞質ループ内に荷電残基のクラスターが存在し、 H^+ 結合・解

離に応じて膜貫通ヘリックスの構造変化が起こりカチオン輸送部位が open すると想像されている¹³⁾。また、最近結晶構造が明らかにされた高度高熱菌のある種のトランスポーター (LeuT_{Aa})¹⁴⁾ で見られるような、Arg-Glu 残基間における塩橋 (salt-bridge) が NHE にも存在し、pH 依存的に細胞内ゲートの開閉を通じて $I_2 \rightarrow A$ 構造変化を起こしている可能性もある。

2-4. CHP の構造と機能

形質膜に発現するタイプの NHE1-NHE5 には Ca^{2+} 結合タンパク質である CHP が強固に結合することが明らかにされている¹⁵⁻¹⁷⁾。著者らの最近の解析によれば、NHE1 発

*: 動物細胞由来の NHE は交換輸送体 (exchanger)、逆に細菌由来のものはアンチポーターと呼ばれることが多く、本稿ではこの慣例にならった。しかし、 Na^+ と H^+ を交換輸送するという基本機能は同じであり、NHE がアンチポーターと呼ばれることもある。

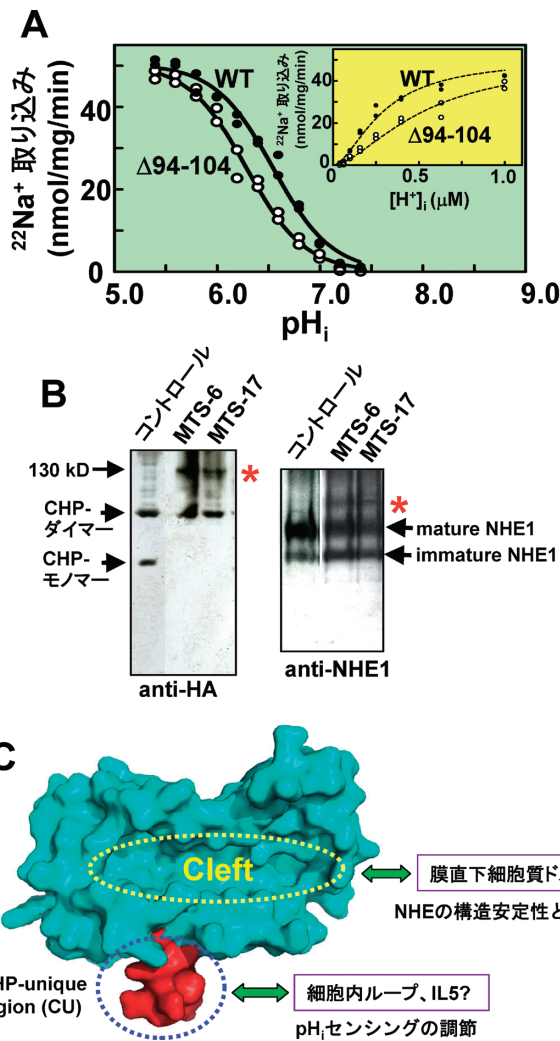


図4 CHP特有リンカー領域(CU)の解析
 (A) NHE1とともに野生型(WT)およびCU領域を欠失(残基94-104を除去した)させたCHP2を共発現し、²²Na⁺取り込み活性のpH_i依存性を測定した。Δ94-104共発現によってpH_i依存性が酸性側にシフトすることで、活性阻害が起こる。細胞内H⁺濃度依存性はHill定数が1を超えるシグモイドカーブになり、複数個の細胞内H⁺の関与が示唆される(挿入図)。 (B) CHP2とNHE1のCys変異体(HAタグ標識CHP2のD95CおよびNHE1のI441C)間で起こる分子間架橋。変異体を共発現した細胞から細胞膜を調製し、スベーターの長さの異なる2種類のMTS試薬で架橋反応を行うと、HA標識CHP2とNHE1以外に、分子量130kDの新しい架橋されたバンド(*)が検出された。この結果は、導入したCys同士が空間的に近い位置を取り得ることを示唆する。 (C) CHPにはNHEと相互作用し得る部位が少なくとも2箇所存在し、異なった領域間の相互作用を通じて二つの重要な生理的役割に関与することが示唆された。

現細胞から1分子当たり1分子のCHPがNHE1とともに精製されてくるので、NHE1ダイマー当たり2分子のCHPが常時NHE1に結合していると考えられる。現在CHPには少なくとも3種類のアイソフォームが存在することが知られている。CHP1はあらゆる組織に普遍的に発現するのに対して、CHP2はがん細胞および小腸に特異的に発現し、CHP3は主として心臓に発現する。CHP1-3はN末端側(Gly2)がミリスチル化された、四つのEFハンドモチーフを持つCa²⁺結合タンパク質で、カルシニューリン

のBサブユニット(CNB)と相同性がある。実際にCa²⁺が結合するのはCHP1/2ではEF3およびEF4であり、CHP3ではEF3のみである。NHEに結合したCHP1/2のCa²⁺親和性は極端に高いので(K_d=1-3nM)、EFハンドそれ自体がCa²⁺センサーとして機能するのではなく、恒常的にCa²⁺を結合させることによって構造安定性に寄与しNHEと強固に結合するのを助ける役割を果たすと考えられる¹⁰⁾。CHP1/2はNHEアイソフォームの膜直下のC末端細胞質ドメイン(NHE1ではアミノ酸516-540)に結合

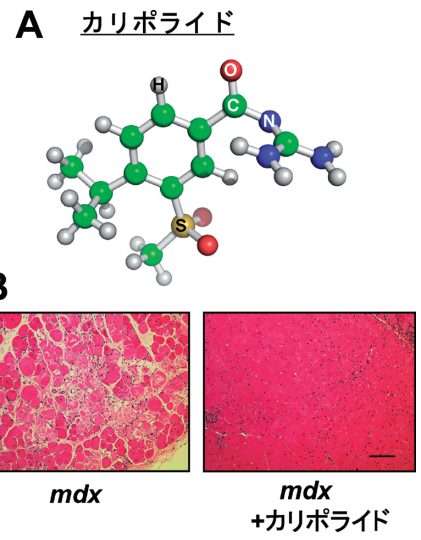


図5 筋ジストロフィー症マウスmdxにおけるカリポライドによる筋変性の改善
 (A) カリポライドの化学構造。 (B) mdxマウスにカリポライドを経口投与(3週間)すると、骨格筋変性の著明な改善が見られた。ヘマトキシリン/エオジン染色。スケールは100μm。

することによって NHE の構造を保持し、活性発現に必須な役割を担う¹⁵⁾。たとえば、CHP を結合できない変異 NHE は形質膜には発現するもののその活性は NHE/CHP 複合体に比べて著しく低く (5-10%)、活性の pH 依存性も極端に酸性側にシフトしている。他方、CHP2 も必須サブユニットとして生理的活性を発揮させる点では CHP1 と共通しているが、CHP2 はがん細胞の高い細胞内 pH の維持に関与することを示唆する結果を得ている¹⁷⁾。

著者らは最近、CHP2 とその NHE1 結合領域との複合体の結晶構造を、 Y^{3+} イオンの存在下、2.7Å の解像度で決定した¹⁸⁾。CHP2 には中央に大きな疎水性に富んだ溝があり、そこに NHE1 の CHP 結合領域を形成する α ヘリックスが疎水性残基の面を向けてみごとに収まっていることが見出された (図 3AB)。また、NMR によって解かれた溶液中の CHP1/NHE1 ペプチド複合体の構造においても、NHE1 の α ヘリックスが埋め込まれた同様な大きな溝の存在を確認できた¹⁹⁾。この“ホットドッグ様構造”は CNB およびそれに良く似た neuronal calcium sensor (NCS) ファミリーの多くの Ca^{2+} 結合タンパク質で見られるものである。CHP2 は全体で $55 \times 47 \times 28 \text{ \AA}$ のサイズを持ち、12 個の α ヘリックスと 4 個の β シートを含み、N-lobe と C-lobe の二つの大きなドメインからなる。CHP2 には N-および C-lobe をつなぐ比較的長いリンカー領域がタンパク質の外に突き出すような構造が存在する。こうした構造は CNB/NCS ファミリーの他のタンパク質には存在せず、著者らは CHP-unique (CU) region と呼んでいる (図 3A)。興味深いことに、この領域内の Asp95 は結晶中で隣接する CHP2 分子の Y^{3+} 原子に配位することによって、本来フレキシブルなこの領域を安定化することで構造を見ることができたということが判明した。この CHP2/NHE1 ペプチド複合体の結晶化はかなり難攻不落であったが、構造を解いてみてはじめてこの複合体がなぜ Y^{3+} イオンの存在下でのみ結晶化できたかという理由を知ることができた。

CHP の疎水性の溝には C-lobe \rightarrow N-lobe の方向に NHE1 の aa516-540 領域がそれぞれ N \rightarrow C 末端の配向性で埋め込まれている。NHE1 ヘリックスは保存性の高い Gly539 で N-lobe の壁に阻まれてほぼ直角に折れ曲がり、His540 から溝の外に出ることがわかった。さて、CNB/NCS ファミリーの Ca^{2+} 結合タンパク質が厳密に標的を認識する機構は何であろうか？ これまで CHP の他に CNA/CNB、KChIP1/ K^+ チャンネル Kv4 の計 3 例において複合体で構造が解かれているが、構造の比較からこの疑問に答える二つの事実が浮かび上がってくる。第一に疎水性溝の形と大きさである。すなわち、カルモジュリンが分子の持つ可塑性によって多種類の標的を認識できるのとは異なり、これら構造が解かれた CNB/NCS ファミリータンパク質では N-lobe/C-lobe 間の相互作用によって溝の形と大きさはあら

かじめかなり厳密に用意されており、そこに just-fit する標的のみが van der Waals 結合を介して相互作用するという点がまず挙げられる。標的ヘリックスの片側に存在する疎水性残基を受け入れるスペースも用意されている。第二に、点在する特異的な水素結合の存在である。C-lobe 側には NHE1 の His523 と CHP2 の Tyr123 との水素結合、N-lobe 側には Asp536、Ile537、Gly539 と CHP2 の Arg30、Arg34 との水素結合が存在し、NHE1 ヘリックスの配向性と位置が正確に決められている。

CHP には CNB/NCS ファミリーの他のメンバーにはない CU 領域があるが、これを切断 ($\Delta 94-104$) しても NHE1 との相互作用にはまったく影響しない。しかし CU 領域を欠失させると NHE1 活性の pH 依存性が酸性側にシフトすることがわかった (図 4A)。²²Na⁺ 排出実験などから、このドミナントネガティブ効果は pH センサーの H⁺ 感受性が下がったためであると考えられた。このことから、CU 領域は NHE1 本体の一部と相互作用することによって活性調節に関わるのではないかと考えられた。興味深いことに、CU 領域内の Asp95 の Cys 変異体と NHE1 の pH センシング機構に重要と考えられている領域 IL5 内の Ile441 の Cys 変異体を細胞に共発現し架橋剤で処理すると両タンパク質が架橋された新たなタンパク質バンドが出現した (図 4B)。そのような架橋は CHP2 の他の多くの Cys 変異体では観察されないので、IL5 は CU 領域と相互作用する領域である可能性が高い。これらの解析から、CHP には二つの大きな役割があると考えられる (図 4C)。第一に、NHE1 ファミリーの必須サブユニットとして疎水性 cleft との強い相互作用を通じて NHE を構造的に安定化させ (すなわち NHE の構造の一部として)、生理活性を発揮させるという点である。第二に CU 領域と NHE の細胞内ループとの弱い相互作用を介して NHE による pH センシングの制御に関わるという点である。しかし、特に後半の CHP の活性制御メディエーターとしての機能にはリン酸化を含めたまだ多くの謎が残されており今後の研究の進展が待たれる。

3. NHE と疾患

NHE1 ノックアウト (KO) マウスの解析により、NHE1 の神経系における重要性が明らかにされた。これらマウスは胎児期には正常な発達をとげるが、生後まもなく歩行性運動失調症やてんかん性痙攣発作などの神経変性症状を呈し、離乳前に死亡するケースが多い。NHE1 欠損による恒常的な細胞内アシドーシスおよび海馬 CA1 神経の過剰興奮がその原因の一つと考えられている。一方、脳や心筋における虚血-再灌流障害、また心肥大や心不全、がんなどの病態時に NHE1 の発現および活性の異常亢進が認められている。さらに NHE の特異的阻害剤がこれら疾患を軽

減することから、NHE1がこれら疾患の重要なメディエーターであるとする報告が数多くある。本章ではこれまで報告されてきたNHEと疾患（特に心疾患とがん）との関係を概説したのち、著者らが最近見出した筋ジストロフィーとの関係について記す。

3-1. NHEと疾患との関係

NHEと心疾患：心筋虚血-再灌流障害の際、NHE1の発現の上昇・活性の亢進が起こり、不整脈や心筋障害の誘発に寄与すると考えられている²⁰⁾。そのメカニズムとして、細胞内Ca²⁺依存性および非依存性の機構が提唱されている。まず虚血により、細胞内アシドーシスやATPレベルの低下、またNHEを活性化する種々の虚血代謝産物（各種ホルモン、過酸化水素など）の増加が起こる。細胞内アシドーシスはNHEを直接活性化しpH_iを回復させようとするが、それに伴い細胞内に大量のNa⁺が流入する。一方、ATPレベルの低下によりNa⁺, K⁺ ATPase活性が阻害されるためNa⁺が排出されず、細胞内にNa⁺が蓄積される。このことは特に再灌流におけるNa⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)の逆モードを介した細胞内Ca²⁺過剰負荷(Na⁺-dependent Ca²⁺ overload)を招き、種々の細胞障害を引き起こす。すなわち、NHE, NCX, Na⁺, K⁺ ATPase三者の相互作用によるイオン制御が虚血-再灌流障害の主な分子機構とする説である。実際、pH_i低下により細胞内Ca²⁺濃度上昇が認められること、またウアバイン(Na⁺, K⁺ ATPase阻害剤)により虚血-再灌流障害が悪化するがNHE阻害剤がこれを改善することなど三者の相互作用と障害との関連を示唆する報告がなされている。

他方、細胞内Ca²⁺非依存性のメカニズムとしては、再灌流時のNHEの活性化などによるpH_i上昇が細胞障害の主な原因とする説である（“pHパラドックス”と呼ばれることもある）。すなわち、虚血時のATP低下によりホスホリパーゼやプロテアーゼが活性化を受けやすくなるが細胞内が酸性のために実際には阻害されている。ところが、これらはアルカリ側に至適pHを持っているため再灌流に伴うpH_i上昇によって一気に活性化され、形質膜およびミトコンドリア膜の障害が起こる。

これら心筋虚血-再灌流障害に対し、NHE1の特異的阻害剤（カリボライド（図5A）、エニボライド）が、心機能の改善、過収縮の回避、不整脈の頻度減少、梗塞範囲の軽減、イオン代謝の改善などあらゆるパラメーターにおいて強力に心筋保護作用を示すことが数々の論文で報告されている。またその効果は虚血時および再灌流時の両方に投与するのが最も効果的であることから、NHE活性化による細胞障害において少なくとも上記二つのメカニズムが関与していることが示唆される。このようなNHE1特異的阻害剤の効果は臨床評価にまで応用され、冠動脈疾患を持つ患者を対象としたGUARDIAN trial (Guard During Ischemia

Against Necrosis) や急性心筋梗塞患者を対象にしたES-CAMI trialなどが実施されている。そしてGUARDIAN trialでは、全体としては阻害剤の効果は立証されなかったものの、一部、冠動脈バイパス手術を受けたハイリスク患者においては高濃度のカリボライドが有効という結果が出た。さらに前臨床試験において、NHE阻害剤が心筋梗塞後のリモデリングや、高齢や高血圧によって生じる心肥大・心不全なども軽減することが報告されている。

このようにNHE1の活性化は、急性の虚血-再灌流障害のみならず心肥大のプロセスにも関与している可能性がある。例えば、β₁アドレナリン受容体を高発現させたトランスジェニックマウスにおいてNHE1の発現や活性の亢進が認められ、これらの表現型である心肥大や心筋線維化、心不全がカリボライドにより軽減されること²¹⁾、またANP (atrial natriuretic peptide) 受容体欠損マウスにおける心肥大・心筋線維化もNHE阻害剤により軽減されること²²⁾などが報告されている。これらの結果は、NHE1がホルモンや増殖因子、伸展刺激など種々の心筋リモデリング誘発因子によって活性化されることから理解できる。またpH_iの変化そのものがタンパク質合成に影響を与えることからNHE1と細胞分裂・心肥大などの関連がうかがわれる。

NHEとがん：がんの形成、侵入、転移においてもNHE1の関連が指摘されている²³⁾。腫瘍細胞では、細胞内外のpH勾配が逆転しており、細胞内はアルカリ性、細胞外は酸性になっている。これはがん遺伝子依存的に活性化されるNHE1によるものと考えられている。細胞内アルカリ化は細胞の形質転換の初期より認められており、血清非存在化での細胞分裂を引き起こし、血管を有しない大量の細胞塊を形成させる。この状態はがん細胞による多量のH⁺排出とあいまってさらなるpH勾配の逆転、すなわちがん特有の微小環境の形成を促す。この微小環境は、細胞外マトリックスの消化やアクチンのリモデリングを誘発し、それぞれがんの侵入、転移に寄与すると考えられている。

3-2. NHEと筋ジストロフィー

筋ジストロフィー（筋ジス）とは筋線維の破壊・変性と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称である。発症年齢や遺伝形式、臨床的経過等から様々な病型に分類されるが、最も頻度の高いのはデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）であり、1987年に細胞骨格タンパク質であるジストロフィンがその原因遺伝子として特定された。DMD以外にも細胞骨格系タンパク質の異常に起因する筋ジスが数多く知られており研究も進められているが、いまだ筋細胞変性の詳しい分子メカニズムは明らかでなく、良い治療法がないのが現状である。

著者らはジストロフィン欠損で筋ジスを発症するマウス

(mdx) またはサルコグリカン欠損で筋ジスと心筋症を発症するハムスター (BIO14.6) をモデル動物として使用し、筋変性に効果的な薬の探索を行ってきた。最近 NHE の阻害剤 (カリポライドあるいは EIPA, 化学構造は図 5A 参照) が筋変性に対して有効であることがわかった。NHE 阻害剤投与群では非投与群に比べて筋変性の指標となる血中クレアチンキナーゼ (CK) 活性の有意な減少と組織へマトキシリン/エオジン染色で観察される筋変性の改善が認められた (図 5B)。また、金網にマウスをぶらさがらせるグリップテストで前足による体重支持時間を測定し骨格筋の機能的評価を行ったところ NHE 阻害剤投与群において筋機能改善が示された。このような NHE 阻害剤による筋変性の改善効果から、筋ジス筋では NHE が活性化されており $[Na^+]_i$ の上昇によって、前節で述べたような Na^+ -依存性 Ca^{2+} 過剰負荷が起これ、筋変性が引き起こされる可能性が考えられた。

そこで実際に筋ジス動物から調製した筋細胞を用いて、NHE 阻害剤の筋変性保護メカニズムを検討した。 $[Na^+]_i$ に影響を及ぼすと考えられる膜タンパク質、NHE および NCX はコントロールと筋ジス筋で量および局在に変化はなかった。筋細胞への Na^+ 取り込み実験を行ったところ全 Na^+ 取り込みの大部分 (65% 以上) が NHE の特異的阻害剤で抑制されたことにより筋細胞における Na^+ 流入に NHE の寄与が大きいこと、そして NHE を介する流入が筋ジス筋細胞で上昇していることが判明した。また筋ジス筋細胞では、コントロールに比べて $[Na^+]_i$ 上昇、 pH_i の上昇、NHE 活性の pH_i 依存性のアルカリ側へのシフトも観察されたことにより、NHE 活性が有意に上昇していることが判明した。筋ジス筋細胞では外液 Ca^{2+} 濃度を上げると (0.5→5.0mM) コントロールでは観察されない Ca^{2+} 流入の上昇が認められるが、この上昇はカリポライドであらかじめ処理することにより抑制され、また同じ処理により伸展刺激による筋ジス筋細胞からの CK 漏出も抑制された (岩田ら 投稿中)。これらの結果は、筋変性に導く細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に NHE の恒常的な活性化が大きく寄与することを示唆している。NHE 阻害剤の病態改善効果は、筋ジスの骨格筋で起こるイオン代謝異常の一断面を浮きぼりにさせるとともに新しい治療戦略を考える重要なステップになると思われる。

謝辞

本稿に記した内容は、国立循環器病センター研究所において最近 5 年間に行った研究に基づいております。現在は他の研究所に移られて活躍されている先生方を含めて、多

くの方々にご支援頂きましたことを深く御礼申し上げます。また結晶構造解析に関しては、当研究所の武田壯一博士との共同で行ったものであることをここに申し述べます。

文 献

- 1) Wakabayashi, S., Shigekawa, M., & Pouyssegur, J. (1997) *Physiol. Rev.*, **77**, 51-74.
- 2) Orłowski, J. & Grinstein, S. (2004) *Pflugers Arch.*, **447**, 549-565.
- 3) Fafournoux, P., Noel, J., & Pouyssegur, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269** (4), 2589-2596.
- 4) Hisamitsu, T., Pang, T., Shigekawa, M., & Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry*, **43**, 11135-11143.
- 5) Hisamitsu, T., Ben Ammar, Y., Nakamura, T.Y., & Wakabayashi, S. (2006) *Biochemistry*, **45**, 13346-13355.
- 6) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43580-43585.
- 7) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 11828-11835.
- 8) Lacroix, J., Poet, M., Maehrel, C., & Counillon, L. (2004) *EMBO Rep.*, **5**, 91-96.
- 9) Ikeda, T., Schmitt, B., Pouyssegur, J., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 295-303.
- 10) Pang, T., Hisamitsu, T., Mori, H., Shigekawa, M., & Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry*, **43**, 3628-3636.
- 11) Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C., & Pouyssegur, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2424-2428.
- 12) Vinothkumar, K.R., Smits, S.H., & Kuhlbrandt, W. (2005) *Embo J.*, **24**, 2720-2729.
- 13) Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., & Michel, H. (2005) *Nature*, **435**, 1197-1202.
- 14) Yamashita, A., Singh, S.K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005) *Nature*, **437**, 215-223.
- 15) Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 17367-17372.
- 16) Inoue, H., Nakamura, Y., Nagita, M., Takai, T., Masuda, M., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 148-155.
- 17) Pang, T., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43771-43777.
- 18) Ammar, Y.B., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., & Wakabayashi, S. (2006) *Embo J.*, **25** (11), 2315-2325.
- 19) Mishima, M., Wakabayashi, S., & Kojima, C. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282** (4), 2741-2751.
- 20) Karmazyn, M., Gan, X.T., Humphreys, R.A., Yoshida, H., & Kusumoto, K. (1999) *Circ. Res.*, **85**, 777-786.
- 21) Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K., & Lohse, M.J. (2002) *Circ. Res.*, **90**, 814-819.
- 22) Kilic, A., Velic, A., De Windt, L.J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H.A., van Eickels, M., Schlatter, E., & Kuhn, M. (2005) *Circulation*, **112**, 2307-2317.
- 23) Cardone, R.A., Casavola, V., & Reshkin, S.J. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 786-795.