



Title	Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体のカルシニューリン様タンパク質 CHPによる機能制御に関する研究
Author(s)	龐, 天翔
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42593
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ばん 天 翔
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 1 2 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体のカルシニューリン様タンパク質 CHP による機能制御に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 重 川 宗一 (副査) 教 授 三 木 直 正 教 授 倉 智 嘉 久

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE) はあらゆる生物・組織に普遍的に存在し、Na⁺・H⁺のイオン代謝、細胞容積調節に関わる重要なトランスポータである。動物細胞ではこれまでに生理機能、組織発現パターン、活性調節様式、阻害剤の効果が異なると考えられる 7 種類の NHE 遺伝子が同定されている。NHE は、ホルモン・増殖因子・高浸透圧など、種々の細胞外刺激によって調節を受けることが知られており、その調節機構もアイソフォームによって異なることが示唆されている。例えば、普遍型 NHE 1 にはカルモデュリン、腎臓上皮細胞に発現する NHE 3 には NHERF (NHE regulatory factor) が結合し、それぞれ Ca²⁺あるいは cAMP による活性調節に関与することが示唆されている。数年前、NHE 1 に結合するタンパク質としてカルシニューリン様タンパク質 (CHP) がクローニングされた。あらゆる組織に普遍的に発現する CHP は Ca²⁺結合モチーフ (EF-ハンド) を 4 個含み、アミノ末端 (Gly 2) がミリスチル化されたタンパク質であるが、その NHE における作動機構はまったく不明であった。本研究では、NHE における CHP の機能を詳細に検討した。

【方法ならびに成績】

私たちはまず、クローニングしたヒト CHP、ヒト NHE 1、ラット NHE 2-4 をコードする cDNA を用いて発現ベクター (pECE に導入) を構築したり、さまざまな MBP あるいは GST 融合タンパク質、His 標識タンパク質、蛍光 GFP 標識タンパク質を作成した。また、これらの融合タンパク質をウサギに免疫して抗体を作成した。これらさまざまな実験ツールを用いてオーバーレイアッセイ、共免疫沈降、pull-down アッセイ、GFP-CHP 融合タンパク質の細胞内局在を調べることによって、CHP と種々の NHE アイソフォームとの相互作用を検討した。また、NHE およびその CHP 結合部位に変異を導入した NHE をコードする cDNA を NHE を持たない変異繊維芽細胞 PS 120 にトランスフェクトし、その機能を調べた。また、NHE の CHP 結合部位をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、卵母細胞 NHE の活性を検討した。

以上の実験を行って、次の結果を得た。1) CHP は NHE 1 の C 末細胞質ドメインの膜ドメイン近傍の aa515-530 に結合する。2) CHP は NHE 1 だけではなく、NHE 2-4 アイソフォームの NHE 1 に相当する領域にも結合する。3) CHP-NHE 相互作用にはミリスチル化および Ca²⁺は必須ではない。4) NHE 1-3 の CHP 結合部位の疎水性残基に変異を導入すると CHP との相互作用は失われるので、相互作用には疎水結合が重要であると考えら

れる。5) これら CHP 結合できない変異 NHE でも形質膜には発現できるので、CHP 結合は NHE の形質膜発現には必須でない。6) しかし、CHP 結合できない変異 NHE は野生型 NHE に比べて著しく低い (5-10%) 活性しか示さなかった。7) 大腸菌から精製した NHE 1 の CHP 結合部位を含むタンパク質をアフリカツメガエル卵母細胞に大量に注入すると、内在性 CHP に競合的に結合し、内在性 NHE 1 から CHP を枯渇させることができる。8) その際、卵母細胞の内在性 NHE 1 活性は著しく (<10%) 阻害された。9) GFP-CHP は NHE を繊維芽細胞に発現したときのみ、形質膜に局在するようになった。10) ミリスチル化および Ca^{2+} 結合できない CHP も形質膜に局在し、NHE に結合した内在性 CHP と置換することが期待できるが、この際、NHE 活性は阻害されなかった。

【総括】

以上の結果から、各種 NHE アイソフォームが生理的な Na^+/H^+ 交換活性を発揮するには、共通のタンパク質、CHP の結合が必須であることが明らかになった。この機能にはミリスチル化、 Ca^{2+} 結合は必要でない。この仕事は、 Ca^{2+} 結合タンパク質が活性に必須な内在性因子として二次性能動輸送体に強固に結合することを示した最初の例であると思われる。

論文審査の結果の要旨

発表された論文では、細胞内の pH、Na 濃度、細胞体積調節に中心的な役割を担う細胞膜 Na/H 交換輸送系の活性調節におけるカルシニューリンホモログ蛋白質 (CHP) の役割を解明するため多くの実験が為され、以下の重要な結果が得られた。

1) CHP は Na/H 交換輸送系の 1 型のアイソフォーム (NHE 1) の C 末側細胞質ドメインで膜ドメイン近傍の aa 515 - 530 に結合する。2) CHP は NHE 1 だけではなく、他のアイソフォーム NHE 2 - 4 の NHE 1 での結合部位に相当する領域にも結合する。3) NHE 1 - 3 各アイソフォームの CHP 結合部位の疎水性残基に変異を導入すると CHP との相互作用は失われるので、相互作用には疎水結合が重要であると考えられる。4) CHP と NHE の相互作用にはミリスチル化および Ca^{2+} 結合は必須ではない。5) CHP 結合能を失った変異 NHE でも形質膜には発現できるので、CHP 結合は NHE の形質膜への発現には必須でない。6) しかし、CHP 結合できない変異 NHE は野生型 NHE に比べて著しく低い (5-10%) 活性しか示さない。7) 大腸菌から精製した NHE 1 の CHP 結合部位を含むタンパク質をアフリカツメガエル卵母細胞に大量に注入すると、内在性 CHP に競合的に結合し、内在性 NHE 1 から CHP を枯渇させることができる。8) その際、卵母細胞の内在性 NHE 1 活性は著しく (<10%) 阻害された。9) GFP-CHP は NHE を繊維芽細胞に発現したときのみ、形質膜に局在するようになった。10) ミリスチル化および Ca^{2+} 結合できない CHP も形質膜に局在し、NHE に結合した内在性 CHP と置換することが期待できるが、この際、NHE 活性は阻害されなかった。

以上の結果は、異なった生理機能に従事し、異なった活性調節を受ける NHE アイソフォームがそれぞれ生理的 Na/H 交換輸送活性を発現するためには、共通の Ca^{2+} 結合タンパク質 CHP の結合が必須であることを示したものであり、重要な発見である。この仕事は、 Ca^{2+} 結合タンパク質が活性に必須な内在性因子として二次性能動輸送体に強固に結合することを示した最初の例であると思われる。この論文は博士学位に値するものと認める。