

Calcineurin による脳型 NBCe1 特異的な細胞膜発現調節機構
—脳型 NBCe1 の中枢神経系における機能解明に向けて—

2019 年

長谷川 尚美

目次

略語集	5
序論	7
本論	15
第1節 実験材料と方法	15
i プラスミド	15
ii GST-pull down 法	16
iii 免疫沈降法	17
iv NBCe1-C 特異的抗体の作成	18
v 質量分析法	20
vi NFAT 核移行量の測定	20
vii 糖鎖切断反応	20
viii 細胞表面発現測定	21
ix 細胞内 pH 測定	22
x NBCe1-C リン酸化レベルの検出	24
xi 統計解析	24
第2節 結果	25
2-1. NBCe1-C 特異的結合タンパク質の発見と結合の証明	25
i NBCe1-C 特異的結合タンパク質の発見	25
ii NBCe1-C と CaNA α , β の結合の証明	27
2-2. calcineurin は NBCe1-C 特異的 C 末端に存在する CaNA 結合配列に結合する	29
i CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C(Δ_{CN} NBCe1-C)と、CaNA α 変異体の作製	29
ii NBCe1-C と CaNA α 変異体を用いた免疫沈降	31
2-3. Δ_{CN} NBCe1-C において糖鎖修飾が減少する	32
2-4. calcineurin は NBCe1-C の細胞表面発現を促進する	34
i NBCe1-C 過剰発現時の細胞内局在の観察	34
ii calcineurin 共発現時の NBCe1-C 細胞表面発現量の変化	36
2-5. calcineurin は NBCe1-C のトランスポーター活性を増加させる	38
i HeLa 細胞を用いた細胞内 pH 測定	38
ii calcineurin が NBCe1-C トランスポーター活性に及ぼす影響	40
2-6. calcineurin によって NBCe1-C は脱リン酸化を受ける	43
i calcineurin による、NBCe1-C と IRBIT の結合に対する影響	43

ii calcineurin 共発現による NBCe1-C リン酸化レベルの低下	44
2-7. 細胞内 Ca ²⁺ 濃度上昇依存的に NBCe1-C の細胞表面発現が促進する	45
i HA-NBCe1-C 安定発現 HeLa 細胞の樹立	45
ii 内在性 calcineurin の活性化に必要な実験条件の検討	46
iii alkaline phosphatase を用いた NBCe1-C 細胞表面発現増加の検出	48
第3節 考察	49
i NBCe1 の C 末端が持つ膜輸送における役割	49
ii CaNA 結合配列と脱リン酸化ターゲットについて	50
iii CA-CaNA α 共発現による CaNA 結合部位非特異的な細胞表面発現の増加	51
iv CaNA α 、 β ノックダウン法による NBCe1-C 細胞表面発現量の検討	51
v 細胞表面発現量増加のメカニズム	52
vi アストロサイトにおける NBCe1-C の役割	52
第4節 結論	54
謝辞	55
参考文献	56
本論文内容の誌上発表	63

略語集

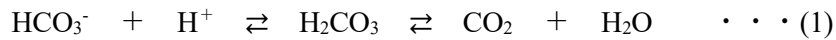
AE	anion exchanger
AID	autoinhibitory domain
ALP	alkaline phosphatase
CA	carbonic anhydrase
CA-CaNA	constitutively active calcineurinA subunit
CaNA	calcineurinA subunit
CaNB	calcineurinB subunit
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
ANOVA	analysis of variance
CBB	coomassie brilliant blue
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIA	depolarization induced alkalization
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
EIPA	S-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride
Endo H	endoglycosidase H
FCS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescence protein
GST	glutathione S-transferase
HA	hemagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IRBIT	inositol trisphosphate receptor binding protein released with IP ₃
IP	immunoprecipitation
IP ₃ R	inositol trisphosphate receptor
KO	knock out
LC/MS	liquid chromatography /mass spectrometry
MBP	maltose binding protein
NBCe1	electrogenic Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter 1
NBCn1	electroneutral Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter 1
NCBTs	Na ⁺ -coupled bicarbonate transporters
NDCBE	electroneutral Na ⁺ -driven Cl ⁻ /HCO ₃ exchanger

NFAT	nuclear factor of activated T cells
NHE	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-CaNA	phosphatase dead calcineurinA subunit
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PNGaseF	peptide-N-glycosidase F
PP1	protein phosphatase 1
ROI	region of interest
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SERT	serotonin transporter
TASK2	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel 2
TRESK	TWIK-related spinal cord potassium channel

序論

pH 調節トランスポーターと重炭酸イオンによる生体内 pH 恒常性の維持

生体内では常に、代謝によって酸が産生されており、CO₂ やアミノ酸の代謝物といった形で生じる酸は、肺と腎臓で処理され排泄されている。酸は H⁺を放出し、生体内に発生した H⁺はそのほとんどが重炭酸緩衝系で処理されている(式(1))。



HCO₃⁻と H⁺は、二次性能動輸送体に分類されるトランスポーターによって細胞内外に輸送され、主に、Na⁺や Cl⁻の濃度勾配により生じる電気化学ポテンシャル差を用いて HCO₃⁻もしくは H⁺を輸送する。輸送の形態として、二種類のイオンを逆の方向へ輸送する exchanger、二種類のイオンを同じ方向へ輸送する co-transporter によって行われる。pH 調節機能を持つ exchanger として代表的なものに、Na⁺濃度勾配に従って細胞外へ H⁺を放出する NHE (Na⁺/H⁺ exchanger)、Cl⁻濃度勾配に従って細胞内へ HCO₃⁻を取り込む AE (anion exchanger) が知られている。co-transporter には、Na⁺濃度勾配依存的に HCO₃⁻を細胞内へ取り込む NBC (Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter)が存在する。

細胞において、細胞外液（血漿と細胞間質）は約 pH7.4 (HCO₃⁻:22~26 mEq) であるのに対して、細胞内は約 pH7.0 (HCO₃⁻:10 mEq) と細胞外に比べ酸性状態を維持している。細胞内は、漏洩 K⁺ channel の存在により膜電位が陰性であるため、H⁺は細胞内へと移動されやすく細胞内は酸性に傾きやすい。また、代謝過程で産生される乳酸や CO₂ といった酸性物質によるところも大きい。H⁺による細胞内の過剰な酸性化を防ぐために、NHE による過剰 H⁺の細胞外への排出や、NBC や NDCBE (electroneutral Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger) による Na⁺/HCO₃⁻の細胞内への共輸送によって細胞内は適切な細胞内 H⁺濃度の維持を行っている。反対に、過剰なアルカリ化を防ぐ機構としては、Cl⁻濃度勾配に依存した HCO₃⁻排泄を AE が担っている (Fig.1)。

このようにして、細胞内 pH は種々の exchanger、co-transporter による H⁺/HCO₃⁻濃度の調節を受けることでその恒常性を保っている¹⁾。

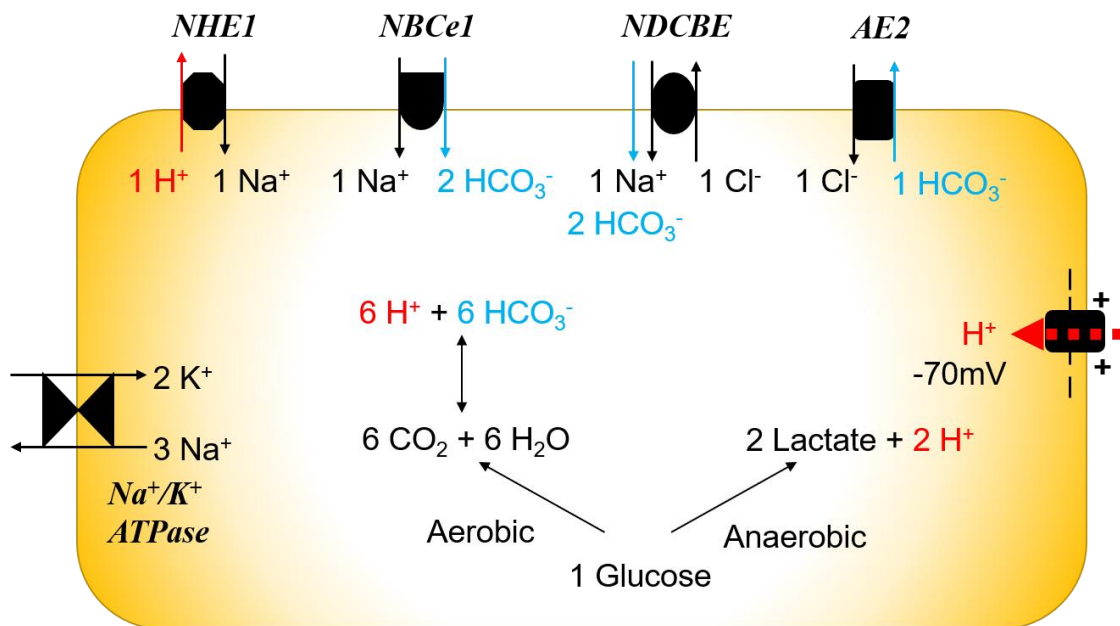


Figure 1 細胞内酸塩基平衡

H^+ または HCO_3^- を輸送するトランスポーターのイオンの輸送方向と比率、Glucose 1分子当たりから解糖系によって生じる H^+ の比率を示した。また、pH 調節トランスポーターによって細胞内に取り込まれた Na^+ の排出経路として Na^+/K^+ ATPase を例に示した。

血中 pH の維持に重要である腎臓では、尿細管細胞において原尿から血液への HCO_3^- 再吸収と尿細管細胞から原尿への H^+ の排出が、細胞の極性に従って exchanger、co-transporter により厳密に制御されている。近位尿細管において、糸球体ろ過により原尿中に排泄された HCO_3^- は、近位尿細管の管腔側膜に発現する NHE によって排泄されている H^+ と結合し、 H_2CO_3 になり、CAIV (carbonic anhydrase 4) により分解され CO_2 として細胞内に浸透する。次いで細胞内で CAII (carbonic anhydrase 2) により、 H_2CO_3 を経由して HCO_3^- と H^+ に再合成される。近位尿細管の基底側膜では、TASK2 (TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel 2)からの K^+ 漏洩により、膜電位が過分極状態にあるため、負電荷である HCO_3^- は基底膜に発現している NBC によって細胞外へ輸送され血液中に再吸収される。対して H^+ は、上述した管腔側膜の NHE により原尿中に再放出され、再び原尿中の HCO_3^- と結合する。遠位尿細管においては、細胞内で CAII により CO_2 と H_2O から H_2CO_3 が合成され、その後生じた HCO_3^- が基底側膜に発現する AE(anion exchanger)によって血液へと再吸収され、 H^+ は管腔側膜に発現する H^+ -ATPase などにより尿中へと排泄される。この結果、尿は酸性に、血液はアルカリ性に傾いた状態を保っている

(Fig.2)²。このように、各組織特異的な pH 調節機構が行われるには、 HCO_3^- 、 H^+ の各輸送体が、細胞の極性に応じて適切な場所に発現していることが重要である。

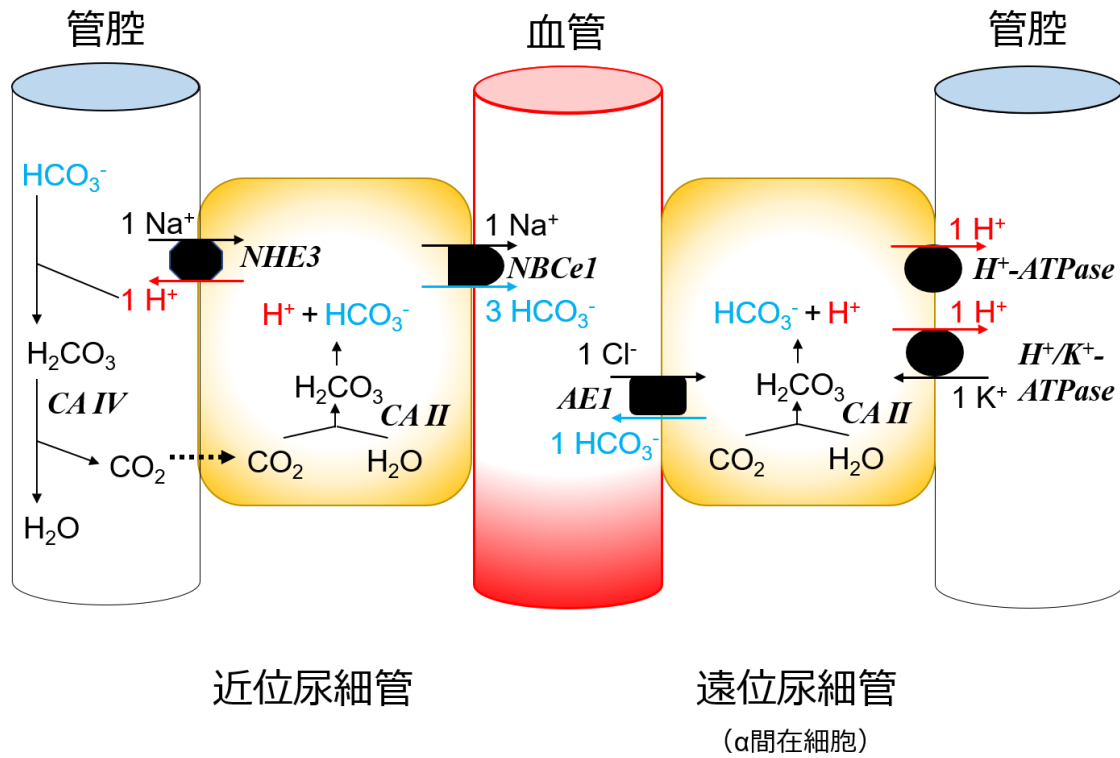


Figure 2 腎臓における酸排泄と炭酸の再吸収

近位尿細管細胞と、遠位尿細管の α 間在細胞で行われている HCO_3^- -再吸収機構の簡易的な模式図。 H^+ または HCO_3^- を輸送するトランスポーターのイオンの輸送方向と比率、CA による H_2CO_3 の分解・合成を示した。

シナプスにおける pH 環境の変動と恒常性維持

中枢神経は、神経ネットワークを形成するニューロン、ネットワークの隙間を埋めるアストロサイトで主に構成されており、さらにその隙間にオリゴデンドロサイトやミクログリア、毛細血管が入ることで、脳という器官を構築している。ニューロンやアストロサイトにおいても pH 調節に関わる exchanger や co-transporter の発現が確認されており、特にシナプスにおける pH 環境調節に関する知見が徐々に集まりつつある。前シナプスと後シナプスに挟まれたシナプス間隙は、神経伝達、すなわち神経伝達物質とその受容体との結合が生じる場で、極めて狭い空間である。そのため神経伝達に伴った H^+/HCO_3^- の移動による細胞内 pH 変化と同時に、細胞外（シナプス間隙）pH は容易に逆向きに変化し、これに対して迅速に恒常性維持を可能にする pH 調節機構の存在が求められる。なぜならば、前シナプスの神経伝達放出に関与するシナプスでは、 Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、 Ca^{2+} チャネルいずれも pH 感受性を持ち³、シナプス間隙 pH が 6.0 にまで低下すると pH7.4 の時と比べて神経伝達物質（グルタミン酸）の放出が 15% 低下することが報告されている⁴。また、後シナプスに発現する NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体はシナプス間隙 pH が高くなるとチャネル活性が亢進する^{5,6}。その結果、一般的に細胞外 pH の上昇により神経活動が活発になり、逆に pH が低下すると神経活動も低下する。このように、シナプス間隙の pH 環境が、神経伝達しいては神経活動に影響を与えるからである。

実際、シナプス周辺には上述したようなトランスポーターが発現している。NHE1 は脳全体での発現が確認されており、一般的な細胞と同様に、細胞内で発生する H^+ を細胞外に排出することにより定常状態の H^+ 濃度を維持していると考えられている⁷。他にも、ニューロンにおいて NBCn2 (electroneutral sodium bicarbonate cotransporter 2)⁸ や NDCBE⁹、NBCe1^{10, 11} といった HCO_3^- 輸送体の発現が報告されているが、詳細な機能に関しては未知な部分が多い(Fig.3)。一方、アストロサイトにおいては NBCe1 が HCO_3^- の輸送を主に担っていることがわかっている¹²。アストロサイトにおいて NBCe1 はシナプス伝達に付随するシナプス間隙の K^+ 濃度の上昇と、アストロサイトの脱分極によって活性化する。この現象を DIA (depolarization induced alkalization) といい、シナプス伝達とアストロサイト内アルカリ化が連動することを示している(Fig.3)。このように、シナプスにおいて、pH 環境の重要性と pH 調節トランスポーターの存在が示されているものの、敏速に発生するシナプス伝達によって生じる pH 環境変動に対応し、シナプス伝達と連動して pH 環境を維持するメカニズムは十分な知見が得られていない。

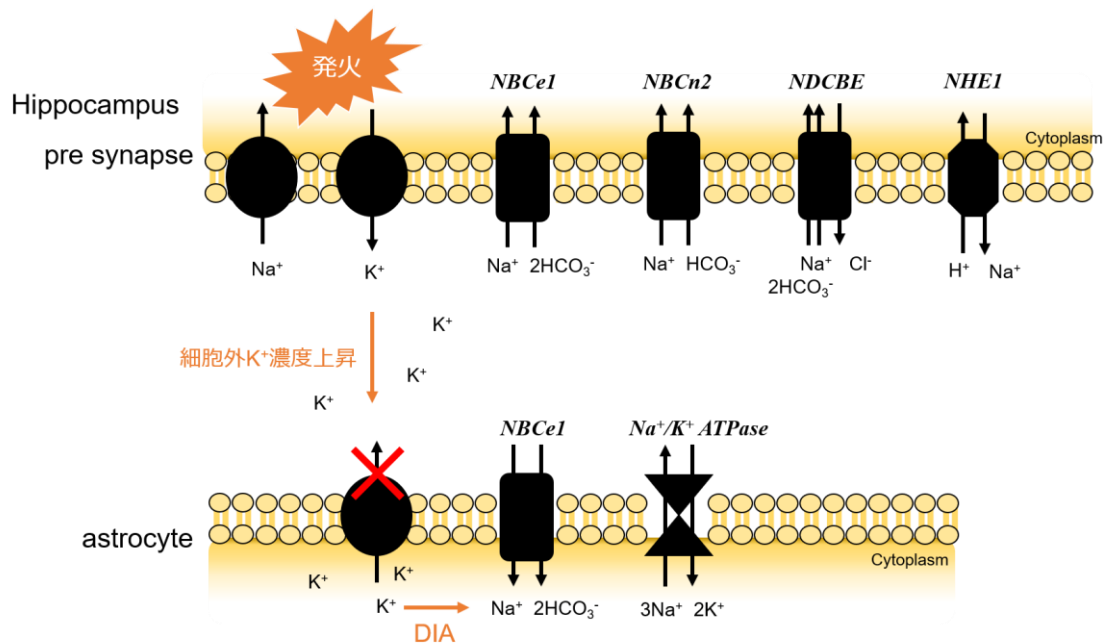


Figure 3 シナプスにおける pH 調節トランスポーターの発現

現在報告されている前シナプス、アストロサイトに発現する pH 調節トランスポーターの概略。黒い矢印は、イオンの輸送方向を示している。橙色の矢印は、細胞外 K^+ 濃度上昇により、アストロサイトの K^+ 排出が抑制され細胞内 K^+ 濃度が上昇し発生する DIA について示した。

NBCe1 の生理機能と高次脳機能との関連

上述したシナプスにおける pH 環境調節の重要性を裏付けるように、中神経系の疾患と pH 異常の関連を示す報告がある。統合失調症もしくは双極性障害の患者の死後脳を調べた 10 つのデータセットのメタ解析によると、どのデータセットでも患者の脳内 pH が健常者と比べて低下している傾向がみられた¹³。さらに、統合失調症モデルマウスである *schnurri-2-KO* マウス、*calcineurin* 脳特異的 KO マウス、*neurogranin-KO* マウス、双極性障害モデルマウスである *Camk2a heterozygous KO* マウス、自閉症モデルマウスである *Chd8 heterozygous KO* マウス、いずれのマウスにおいても乳酸の増加により脳ホモジネートの pH が低下していた¹³。また、ゲノム解析を用いて強い自殺願望を持つ患者をスクリーニングするための血液マーカーを探索した研究により、NBCe1(SLC4A4)遺伝子の増加が検出感度の一番高いマーカーとしてピックアップされている¹⁴。

NBCe1 の変異を有するヒトの家系において、NBCe1 をコードしている SLC4A4 遺伝子の変異で発見されているものは、nonsense 変異が 2 例(p.Gln29X¹⁵, p.Trp516X¹⁶), frame

shift 変異が 2 例 (p.Asn721ThrfsX30¹⁷, p.Ser982AsnfsX4¹⁸)、deletion 変異が 1 例 (p.Leu738del.¹⁹)、missense 変異が 11 例 (p.Arg298Ser^{20, 21}, p.Ser427Leu²², p.Thr485Ser²³, p.Gly486Arg²⁴, p.Arg510His^{18, 20, 25}, p.Leu522Pro²⁶, p.Ala799Val²³, p.Arg881Cys^{18, 23}, p.Gln913Arg²⁷, c.1076+3A>C, c.1772-2A>T²⁸)、3'非翻訳領域変異が 1 例(c.206G>A²⁹)報告されている。変異が与える影響は様々で、トランスポーター活性の消失、もしくは細胞膜移行の障害が生じる。すべての患者は、近位尿細管性アシドーシスを呈し、その内ほとんどの患者で目の異常（緑内障もしくは白内障）も伴う^{18, 20, 22, 23, 26, 29}。神経学的異常は一貫したものはないものの、患者のうち 6 人で片頭痛¹⁸、3 人で精神遅滞^{18, 20, 22, 23, 26, 29}、2 人が発達障害^{18, 20, 22, 23, 26, 29}を呈している(Fig.4)。また、NBCe1 変異マウスの表現型は、生後約 20 日で死亡し、その主な原因は代謝性アシドーシスであることが示されている³⁰。その他にも、歯列異常、成長障害、脾腫、低ナトリウム血症、骨形成障害、小腸における HCO₃⁻分泌異常が表現型として観察される(Fig.4)。これら表現型は代謝性アシドーシスを起因とした合併症であると考えられており、ヒトの症例でみられるような神経学的異常は報告されていないが、これは NBCe1 変異マウスが短命であるために神経学的異常を評価した報告が未だないこともあり、議論の余地が残っている。

このように NBCe1 遺伝子変異家系で、片頭痛、精神遅滞、発達障害といった神経学的障害が生じることからも、精神疾患と中枢神経系における pH 環境の重要性、そしてこれらの調節因子としての NBCe1 の役割が強く示唆され、NBCe1 を中心とした pH 調節機構の中枢神経系におけるさらなる機能解明が求められている。

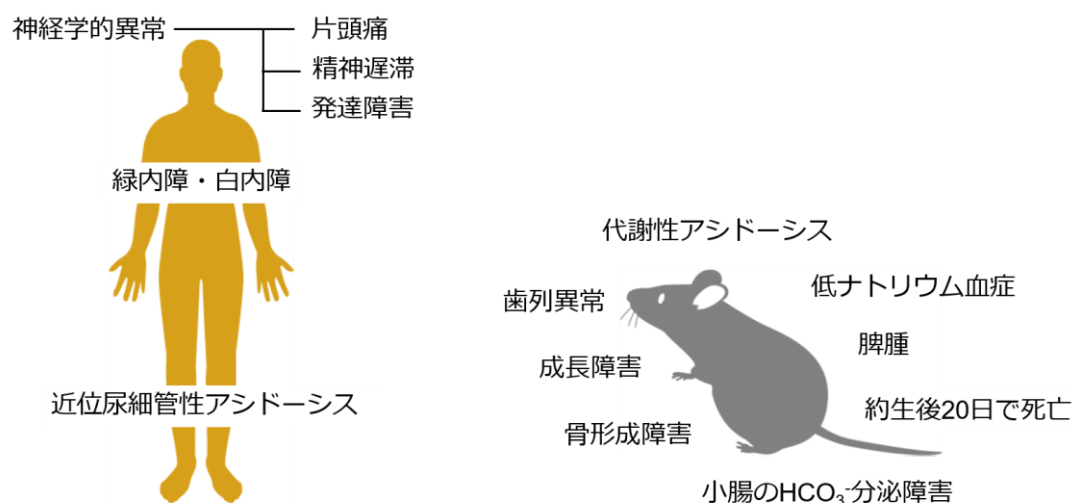


Figure 4 NBCe1 変異による機能障害

現在報告されている NBCe1 変異家系が持つ症状と、NBCe1-KO マウスの表現型。

NBCe1 の特徴と 5 つの splicing variants

NCBTs (Na^+ -coupled bicarbonate transporters)に属する SLC4A4 遺伝子には、二つの選択的転写開始点と、二つの選択的カセットエクソンが存在し、5 つの variants (NBCe1-A-E) が生じる。いずれの NBCe1 も、13 回膜貫通領域と細胞質側に面した N 末端及び C 末端領域という共通した構造を有する(Fig.5)^{31, 32}。NBCe1-A は腎臓の近位尿細管の基底膜に発現し、 HCO_3^- 再吸収に寄与している(Fig.2)。NBCe1-B は膵臓³³、気道³⁴、前立腺、結腸、甲状腺、脊髄、眼、脳と幅広い組織において発現しており、細胞内 HCO_3^- 濃度の調節を行っている。NBCe1-C は脳のアストロサイト特異的に発現しており^{35,36}、シナプス伝達に伴ってアストロサイト内の pH をアルカリ化させる。NBCe1-D/E は、N 末端領域において 9 アミノ酸が欠損したバリエーションであり、種々マウス組織においてその mRNA の発現のみが確認されている³⁷。

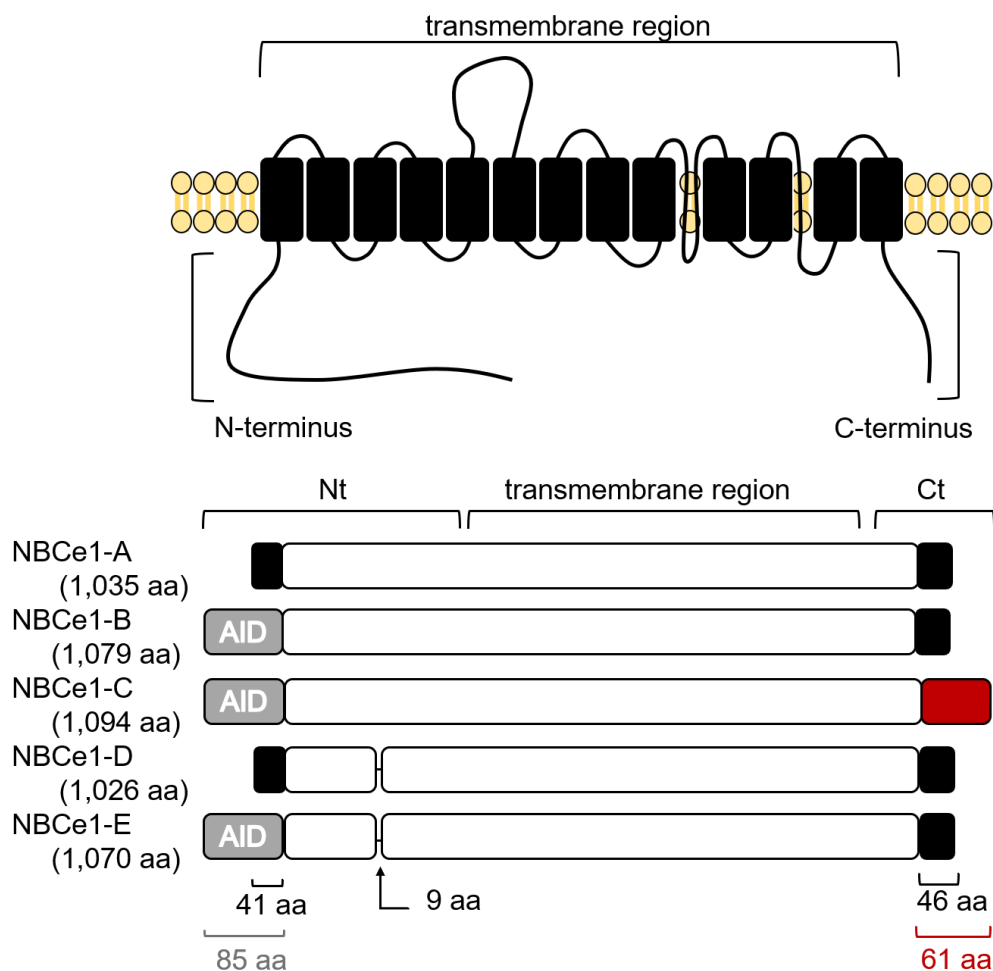


Figure 5 NBCe1 の構造と、スプライシングバリエーション

AID : 自己抑制配列。Aa : アミノ酸数。Nt : N 末端。Ct : C 末端。

N 末端と、C 末端に着目すると、NBCe1-A/D は近位プロモーター、NBCe1-B/C/E は遠位プロモーターのコントロール下で転写が制御されるため、異なる N 末端を有し、NBCe1-A/D は 41 アミノ酸、NBCe1-B/C/E は 85 アミノ酸の特異な配列を持つ(Fig.5)。このアミノ酸配列の違いは、NBCe1 のトランスポーター活性に多大な影響を与えており、NBCe1-B/C の N 末端は自己抑制ドメイン (AID) として機能し、抑制の解除を受けることでトランスポーターの機能を発揮できるようになる³⁸。対して、NBCe1-A の N 末端は AID として機能しないため、トランスポーター活性を恒常的に維持し、抑制状態の NBCe1-B/C に対して 4 倍から 5 倍の活性を有する³⁸。

NBCe1-B/C の AID による抑制を解除するものの一つに、IRBIT (inositol trisphosphate receptor (IP3R) binding protein released with IP3) との結合がある。IRBIT の N 末端側に存在する Ser 68, Ser 71, Ser 74, Ser 77 すべてのリン酸化依存的に NBCe1-B/C の N 末端 AID 領域近傍に結合する。これによって、AID の抑制は解除され、NBCe1-B/C の輸送活性は NBCe1-A と同等の強さまで活性化される³⁹。また、protein phosphatase 1 (PP1) によって IRBIT の Ser 68 が脱リン酸化されると NBCe1-B の活性が低下することから^{40,41}、NBCe1-B/C は IRBIT のリン酸化状態として反映される細胞内の環境変化によって、輸送活性が制御されると考えられている。

一方、5 つの variants の C 末端を比べると、NBCe1-C は C 末端側の exon24 が”splicing out”されているために、フレームシフト変異を起こすことで終止コドンの位置が変化し、他のバリエーションよりも長い異なったアミノ酸配列からなる C 末端を持つ⁴²(Fig.8)。NBCe1-C がアストロサイト特異的に発現していることから、この C 末端はアストロサイトで NBCe1 が機能する上で重要な役割を果たしていることが予想される。以上、NBCe1 の 2 種類の N 末端について、その生理的意義が解明されつつある傍ら、NBCe1-C が持つ特異的 C 末端(Fig.5)の役割については、報告が未だない。

NBCe1 は正常な脳機能を維持する重要な分子であると考えられるが、シナプスを囲むアストロサイト突起に発現する NBCe1-C が、実際どのようなメカニズムで神経伝達に応じた pH 環境調節を行っているのか、さらには、NBCe1-C による pH 環境調節の失調がなぜ脳機能に影響を与えるのかについては未だ解明されていない。本研究では、NBCe1-C のアストロサイト特異的な機能調節機構を示唆する、特異的 C 末端配列の機能を明らかにした。

本論

Calcineurin による脳型 NBCe1 特異的な細胞膜発現調節機構

第1節 実験材料と方法

i プラスミド

NBCe1-C の cDNA は、ヒト神経芽細胞株である IMR-32 からクローニングした (accession number AB470072)。ヒト NBCe1-B 発現プラスミドは関常司先生 (焼津市民病院) よりご提供いただいた。細胞外ループに HA (Hemagglutinin) タグを挿入した、HA-NBCe1-B、HA-NBCe1-C、HA- Δ_{CN} NBCe1-C は、先行研究を参考にし³⁸、^{613P} と ^{614E} の間に PCR 法を用いて挿入した (Table1)。HA タグの挿入によって、NBCe1 の細胞膜発現や輸送活性に影響はないことが確認されている。CaNA 結合部位 (¹⁰⁷⁰PQIRIE¹⁰⁷⁵) 欠損 NBCe1-C は、PCR 法を用いて作製した (Table1)。pHi 測定以外の実験において用いている NBCe1 は哺乳類細胞発現用ベクターである pcDNA3.1 を使用した。NBCe1-C 特異的 C 末端のリコンビナントタンパク質は、NBCe1-C の C 末端 (1034-1094 アミノ酸) の cDNA を、E.coli 発現用ベクターである pGEX6p (GE Healthcare) もしくは pMal-c2 (New England BioLabs) に挿入し、それぞれ GST 融合タンパク質、MBP 融合タンパク質として発現させ精製した。細胞内 pH 測定で用いたプラスミドは、HA タグを挿入していない NBCe1-C もしくは Δ_{CN} NBCe1-C を pIRES2-AcGFP ベクター (Clontech) に挿入して作成した。マウス calcineurin A α (PPP3CA, CaNA α) と calcineurin A β (PPP3CB, CaNA β) は、マウス小脳よりクローニングし (Reference sequence, NM_008913.5 and NM_001310426.1, respectively)、pcDNA3.1 ベクターに挿入した。その後、calcineurin の開始コドン ATG 直下に FLAG-tag (DYKDDDDK) を挿入し、FLAG-CaNA α 、FLAG-CaNA β を作製した (Table1)。pME18s 発現ベクターに挿入された恒常的活性化 FLAG-CaNA α (CA-CaNA α) と calcineurin B subunit (CaNB) は渡邊泰男先生 (昭和薬科大学薬理学研究室) よりご提供いただいた。不活性化型 CaNA α (PD-CaNA α) は、FLAG-CA-CaNA をベースとして活性に必要なアミノ酸に PCR 法にて点変異 (H151Q)⁴³ を加えることで作製した (Table1)。

Myc-NFATc1 発現プラスミドは御子柴克彦先生 (理化学研究所脳神経科学研究センター) よりご提供いただいた。

全ての cDNA は KOD-plus DNA polymerase (TOYOBO) を用いた PCR 法にて作製し、DNA シークエンス法にてすべての配列の確認を行った。

Table1 PCR 法で用いたプライマー

HA タグ挿入用 primers	
NBCe1-HA-plus-S	TAATCTGGAACATCGTATGGATACTCTGGGGCCAGTGTGGTG
NBCe1-HA-plus-AS	TACGATGTTCCAGATTACGCTTTGCCAACTATGTCTTCTACTG
CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C 作製 primers	
NBCe1-delete-S	AGAACTCCAGTAAAAGTTGTGCTTGAACCTGAAGACAATGAT
NBCe1-delete-AS	ATCATTGTCTTCAGGTTCAAGCACAACTTTTACTGGAGTTCT
FLAG-CaNA 作製 primers	
mPPP3CA-cloning-S	TGGAGATGTCCGAGCCCAAGGCGA
mPPP3CA-cloning-AS	GTGAACAGGAAGTGGTCACTGGAT
mPPP3CAex-FLAG-S	GGAGAATTCATGGACTACAAGACGATGACGACAA GATGTCCGAGCCCAAGGCGATTG
mPPP3CAex-AS	AAAGCGGCCGCGTGAACAGGAAGTGGTCACTGGAT
mPPP3CBex-FLAG-S	AAAGGATCCATGGACTACAAGGATGACGACGACAAG ATGGCCGCCCCGGAGCCGGCC
mPPP3CBex-AS	AAATTTCGAGTCACTGGGCACTATGGTTGCC
PD-CaNA α 作製 primers	
CaNA H151Q-S	TACTTCGCGGAAACCAAGAATGTAGGCACCTC
CaNA H151Q-AS	GAGGTGCCTACATTCTTGGTTTCCGCGAAGTA

ii GST-pull down 法

NBCe1-C の特異的 C 末端に GST を融合させたリコンビナントタンパク質 (GST-NBCe1-C/Ct) を E.coli 内に発現させ、その後精製を行った⁴⁴。成体マウスの全脳を teflon-glass ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズ buffer (Table2) 中でホモジェナイズし、1,000 x g、15 min、2 °C で遠心を行った。遠心後の上清を最終濃度 0.1% の SDS で可溶化し 100,000 x g、45 min、4 °C でさらに遠心をした後、上清を brain lysate とした。調製した brain lysate に、GST-NBCe1-C/Ct もしくは GST (control) を入れ 4 °C で 4 時間転倒混和を行い、グルタチオン Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare) を用いて GST 融合タンパク質とそれに結合した分子を回収し、wash buffer (Table2) にて洗浄、濃縮を行った。その後、SDS-PAGE 電気泳動にて濃縮したタンパク質を分離し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を用いて検出した。

Table2 buffer の組成

ホモジェナイズ buffer	wash buffer
0.32 M sucrose	20 mM HEPES-NaOH pH 7.5
10 mM HEPES-NaOH pH 7.5	100 mM NaCl
25 mM NaF	25 mM NaF
Protease Inhibitor Cocktail EDTA free (nacalai)	0.2% triton-X100

各 buffer は 4 °C で用いた。

iii 免疫沈降法

1) マウス小脳内在性タンパク質の免疫沈降

成体マウス小脳をホモジェナイズ buffer (Table2) 中ですりつぶし、1,000 x g 15 min、2 °C で遠心を行い、遠心後の上清をさらに 100,000 x g 45 min、4 °C で遠心を行った。沈殿した細胞膜画分を、最終濃度 0.2% tritonX-100 のホモジェナイズ buffer、1 ml で再懸濁し、30 min 転倒混和を行って可溶化した。細胞膜画分の可溶化物を、さらに 100,000 x g 45 min、4 °C で遠心を行うことで不溶物を沈殿させ、上清を membrane lysate とした。Membrane lysate に 1.5 µg の抗 CaNA α 抗体 (Table3)、もしくは 1.5 µg のマウス IgG (control) を入れ、1 時間 4 °C で転倒混和を行い、内在性 CaNA α と抗体を反応させた後、protein G Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を入れてさらに 4 時間 4 °C で転倒混和を行い回収した。Wash buffer (Table2) を用いて洗浄、濃縮を行った後、免疫沈降されたタンパク質を Western blot 法にて検出した (Table3)。

2) 培養細胞を用いた過剰発現系による免疫沈降

過剰発現系による免疫沈降法にはすべて HEK293T 細胞を用いた。

HEK293T 細胞を 6 well plate に播種し、翌日、TransIT 2020 Reagent (Mirus Bio) を用いて、各実験プラスミドの組み合わせ通りに transfection を行った。すべての実験において、CaNA のタンパク質安定性を確保するために、CaNB も同時に過剰発現させた。Transfection から 48 時間後、氷上で細胞を PBS で洗浄し、1 ml の lysis buffer (Table3) を用いて 20 min 可溶化を行った。その後、回収した lysate を 12,000 x g、20 min、4 °C で遠心し、その上清の一部を Input サンプルとした。残りの上清に、Anti-FLAG[®]M2 Affinity Gel (Sigma) もしくは Pierce anti-HA-magnetic ビーズ (Thermo Scientific) を入れ、4 時間、4 °C で転倒混和を行い回収した。その後、ビーズを wash buffer (Table2) を用いて十分に洗浄、最後に濃縮を行い、IP サンプルとした。調整した Input と IP サンプルを、Western blot 法にて検出した (Table3)。

Table3 buffer の組成と、Western blot 法で用いた抗体

Cell lysis buffer
20 mM HEPES-NaOH pH7.5 100 mM NaCl 25 mM NaF 0.2% Triton-X100 Protease Inhibitor Cocktail EDTA free (nacalai)
抗体 (希釈倍率、製造元、clone No.)
ECLTM Anti-mouse IgG-HRP (1/4000, GE Healthcare) ECLTM Anti-Rat IgG-HRP (1/4000, GE Healthcare) ECLTM Anti-rabbit IgG-HRP (1/4000, GE Healthcare) Anti-Human SLC4A4 rabbit polyclonal antibody (1/1000, Proteintech,11885-1-AP) Anti-PP2B- α mouse monoclonal antibody (1/1000, Santa Cruz biotechnology, D-9) Anti-DYKDDDDK tag mouse monoclonal antibody (1/1000, Wako,1E6) Anti-HA rat monoclonal antibody (1/1000, Roche,3F10) Anti-NBCe1-C specific rabbit polyclonal antibody (1/1000, see follows) Anti- β -actin mouse monoclonal antibody (1/1000, Santa Cruz biotechnology,C4)

iv NBCe1-C 特異的抗体の作成

iiで作製した NBCe1-C 特異的 C 末端のリコンビナントタンパク質(GST-NBCe1-C/Ct)を免疫抗原として、2週間間隔で計4回の免疫をウサギに行った。ウサギ血清から特異的抗体をアフィニティー精製する目的で、MBP-NBCe1-C/Ctを発現・精製後、Sepharose ビーズ (CNBr-activated Sepharose, GE Healthcare)に共有結合させ、アフィニティービーズを調製し、免疫後に回収したウサギ血清と混合した。抗原抗体反応を行った血清から、ビーズを回収後、十分に洗浄、濃縮を行い、100 mM Glycine-HCl (pH 2.5)を用いて抗体の溶出を行った。精製した抗体の感度と特異性を確かめるために、HEK293T 細胞に、pcDNA3.1 プラスミド (control)、NBCe1-B、NBCe1-C を過剰発現させ、細胞を回収後サンプルを調製した。精製した NBCe1-C 特異的抗体は、75 kDa 付近に、非特異的なバンドが現れるものの、NBCe1-B には全く反応せず、かつ感度良く NBCe1-C を検出することができた(Fig.6A)。次に、成体マウスの臓器をそれぞれホモジネートし、panNBCe1 抗体 (Anti-Human SLC4A4 rabbit polyclonal antibody)もしくは精製した NBCe1-C 特異的抗体を用いて検出を行ったところ、panNBCe1 抗体では、脳のほかに腎臓や小腸でもその発現が確認できたが、NBCe1-C では脳の各部位でのみ発現が確認された(Fig.6B)。以上の結果から、NBCe1-C 特異的抗体として十分に使用できる抗体を精製できたと判断した。

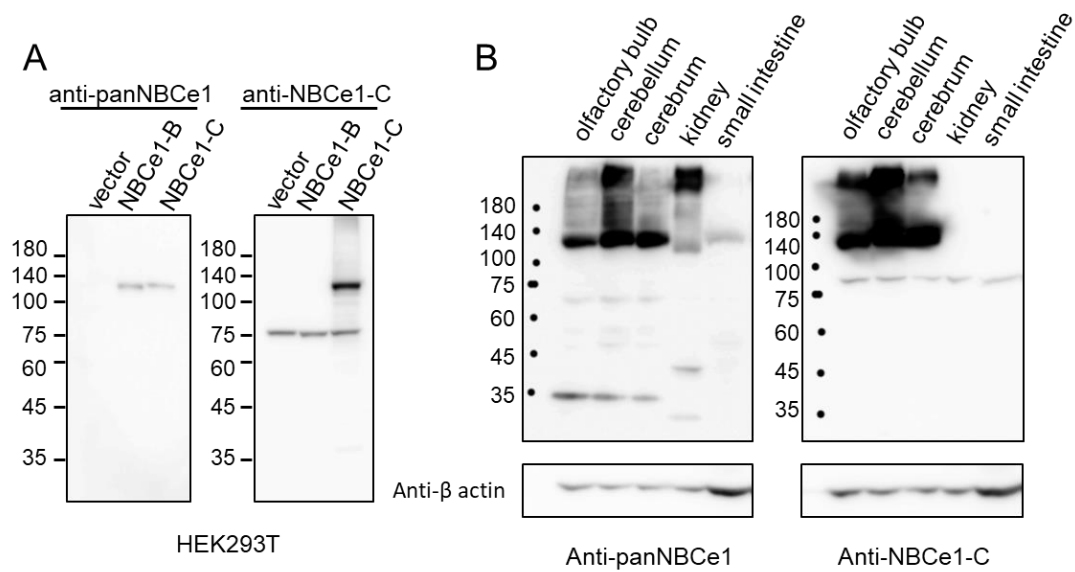


Figure 6 anti-NBCe1-C 抗体の特異性確認

- (A) HEK293T に過剰発現を行い、anti-SLC4A4 抗体 (anti-panNBCe1:左図)、anti-NBCe1-C 抗体 (右図) を用いて Western blot 法 を行った。Anti-NBCe1-C 抗体は NBCe1-C のみを認識した。
- (B) Western blot 法を用いて各マウス組織の検出を anti-SLC4A4 抗体(anti-panNBCe1:左図)、anti-NBCe1-C 抗体 (右図) を用いて行ったところ、anti-NBCe1-C 抗体は脳組織でのみ発現を認識し、さらに小脳における NBCe1-C の発現が海馬や嗅球に比べて多いことを示した。

v 質量分析法

LC-MS/MS 測定は先行研究⁴⁵に従って、波多野直哉先生(岡山大学)に実施して頂いた。MS/MS データは、LCMS solution software (Shimadzu) を用いて取得し、Mascot Distiller (Matrixscience)を用いて precursor peptide m/z、fragment ion m/z、intensity values を含むテキストファイルに変換した。Mascot (Matrixscience) MS/MS Ion Search を用いて検索し、検出されたペプチドは SwissProt データベースから抽出した。タンパク質の選別には、Mascot スコアが統計学的に有意な閾値以上であること、タンパク質との一致率が一番高いペプチドであることを基準とした。

vi NFAT 核移行量の測定

HeLa 細胞を 12 well plate に播種し、24 時間後、TransIT 2020 Reagent を用いて transfection を行った。7 時間後、poly-L-lysine (100 µg/mL, Sigma-Aldrich) コートを行った 12 mm glass coverslip に撒き直した。さらに 24 時間後、PBS で調製した 4% paraformaldehyde (PFA) で 15 分間固定し、PBS で調製した 0.1% TritonX-100 を用いて 5 分間膜透過処理を行い、その後 PBS で調製した 2% normal goat serum (2% NGS) (Wako) で細胞を処理した。内在性 CaNA の活性を用いた実験では、DMEM で調製した vehicle (0.1% DMSO) 、 2 µM 4-bromo A23187 (Abcam)、2 µM 4-bromo A23187 + 10 µM FK506 (Cayman Chemical) をそれぞれのサンプルに 5% CO₂ 下 37°C、4 時間反応させ、その後上記の処理を行った。室温で 2 時間、Myc 9 E10 抗体 (Santa Cruz biotechnology) を用いて myc-NFAT の認識を行い、抗体の洗浄後、Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibody (Thermo fisher)を用いて myc-NFAT を、DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, solution, DOJINDO) を用いて核を、phalloidin (CF®594 Phalloidin, Biotium) を用いて F-actin を蛍光標識した。核移行した NFAT を定量化するために、核における蛍光輝度/細胞質における蛍光輝度をそれぞれ DAPI、phalloidin のシグナルを基に ROI (Region of Interest)測定を行い算出した。

vii 糖鎖切断反応

HeLa 細胞を 6 cm dish に播種し、24 時間後、TransIT 2020 Reagent を用いて transfection を行った。さらに 24 時間後、細胞を回収し、糖鎖切断酵素 Endo H (Promega)、PNGase F (Promega)を用いてキットのプロトコール通りに処理を行った。切断酵素で処理後、western blot 法を用いて検出を行った。

viii 細胞表面発現量の測定

1) 免疫蛍光法と共焦点顕微鏡を用いた測定

HeLa 細胞を 12 well plate に播種し、翌日、TransIT 2020 Reagent を用いて、実験毎プラスミドの組み合わせ通りに transfection を行った。すべての実験において、CaNA のタンパク質安定性を確保するために、過剰発現させる際は CaNB も同時に発現させた。Transfection から 24 時間後、poly-L-lysine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) コートをを行った 12 mm glass coverslip に撒き直した。さらに 24 時間後、PBS で調製した 4% PFA で 15 分間固定し、PBS で調製した 2% NGS で細胞を処理した後、細胞膜表面に発現している NBCe1 を標識するために anti-HA 抗体を室温で 3 時間反応させた。PBS で細胞を十分に洗浄した後、PBS で調製した 0.1% TritonX-100 を用いて 5 分間膜透過処理を行い、その後 2% NGS で細胞を処理した。細胞に発現したすべての NBCe1 を標識するために anti-SLC4A4 抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS で細胞を洗浄した後、Alexa Fluor 594-conjugated anti-rat IgG antibody (Thermo fisher) と Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Thermo fisher) を用いて、細胞表面に発現した NBCe1 (Alexa Fluor 594) と発現したすべての NBCe1 (Alexa Fluor 488) を蛍光標識した。画像の撮影は、共焦点顕微鏡 A1R (Nikon instrument) を用いて、細胞上部から下部にかけて z-series 撮影を行い、取得した 20 枚の階層画像を NIS element software (Nikon instrument) を用いて最大輝度プロジェクション処理を行った。この処理により細胞全体の蛍光輝度を算出した。

2) Alkaline phosphatase を用いた測定

内在性 CaNA の活性を用いた実験を行うために、HA-NBCe1-C を安定発現させた HeLa 細胞を作製した。制限酵素を用いて直鎖状にした HA-NBCe1-C/pcDNA3.1 を transfection し、48 時間後、1 mg/ml G418 (nacalai tesque) を含んだ 10% FCS/DMEM に数日晒した。免疫染色法にて生存した細胞株における HA-NBCe1 の発現を確認した後、Anti-HA-tag mAb-Alexa Fluor® 488 (MBL) を用いて HA-NBCe1-C 発現細胞を選別し (SONY)、HA-NBCe1 安定発現 HeLa 細胞株を得た。HeLa 細胞 (control) と、HA-NBCe1-C 安定発現 HeLa 細胞を、96 well plate に播種し、24 時間後、DMEM で調整した vehicle (0.1% DMSO) 、 2 μM 4-bromo A23187 (Abcam)、2 μM 4-bromo A23187 + 10 μM FK506 (Cayman Chemical) をそれぞれのサンプルに 5% CO₂ 下 37°C 4 時間反応させた。その後、上記の免疫染色と同様に 4% PFA で 15 分間固定処理をし、2% NGS 処理を行った。刺激を行った片方のサンプルには細胞膜表面に発現する NBCe1 を標識するために、anti HA-tag 抗体を室温で 3 時間反応させた (surface サンプル)。もう片方のサンプルには発

現するすべての NBCe1 を標識するために、0.1% Triton X-100 で 5 分間膜透過処理を行った後、anti HA-tag 抗体を室温で 3 時間反応させた (total サンプル)。細胞を十分に洗浄した後、anti-rat IgG conjugated with alkaline phosphatase (1/10000, Sigma-Aldrich, A6066) を室温で 1 時間反応させた。HA 抗体に結合した alkaline phosphatase 活性の測定には、p-nitrophenyl phosphate as a substrate (Bio Rad, #1721063)を用いて酵素反応を行い、その後、Varioskan Flash (Thermo Scientific) を用いて 405 nm における吸光度を 3 分おきに測定し、得られた 9 分間の吸光度の上昇速度(ΔOD 405 nm/min)を酵素活性とみなした。Background の吸光度には、同時に同様の処理を並行して行った HeLa 細胞(control)の吸光度を用いた。

ix 細胞内 pH 測定

1) HeLa 細胞を用いた SNARF-1 による細胞内 pH 測定

細胞内 pH 測定は、共焦点顕微鏡(A1R, Nikon instrument)を用いて 488 nm で励起された SNARF-1 の 580 nm および 640 nm の蛍光波長の蛍光輝度の比を用いて算出した。12 well plate に播種した HeLa 細胞に、IRES-AcGFP/NBCe1 と、CA-もしくは PD- CaNA α 、CaNB を transfection し、24 時間後に、12 mm glass coverslip に撒き直した。この際、NBCe1 と CaNA α の共発現率が約 80%となるような DNA 濃度比で行った。さらに 24 時間後、細胞を normal buffer (Table4)で調製した 20 μ M SNARF-1 液を 37°C、30 分間、5% CO₂ 存在下で反応させた。その後、normal buffer を 9 分間還流させ、細胞外に残存する SNARF-1 を洗い流すとともに、細胞の平衡化を行った。細胞内 pH 測定の際、すべての還流液は温浴中で 37°C に保ちながら行った。細胞の平衡化後、撮影を開始し、1 分間 normal buffer を還流させた後、2 分間 Na⁺ が含まれていない buffer (Na⁺(-) buffer, Table4) を還流させ、続いて 2 分間 Na⁺ を含む buffer (Na⁺(+) buffer, Table4)を還流、その後 Na⁺(-) buffer に 2 分間戻した。

NBCe1-C の輸送活性は、Na⁺(-) buffer から Na⁺(+) buffer に置換された瞬間に生じ、SNARF-1 の蛍光輝度の比 (640 nm/580 nm)の増加率を輸送活性とみなした。

HCO₃⁻が含まれる buffer には、Na⁺/H⁺交換体を阻害するために、10 μ M S-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA, sigma)を入れた。

2) 細胞内 pH の calibration

SNARF-1 の蛍光輝度の比を、実測 pH に変換するために、H⁺ ionophore である nigericin を用いた calibration を行った。1)と同様に、HeLa 細胞を SNARF-1 処理した後、20 分間 pH calibration HEPES buffer pH 7.4 (nigericin を含まない) (Table4)を還流させ細胞の平衡化を行った。撮影を開始し、1 分間平衡状態を維持させた後、次に、nigericin の活性を阻害する Ca²⁺を除去するために Ca²⁺ free calibration buffer (Table4)を 5 分間還流させた。続いて、3 分間ごと pH calibration HEPES buffer pH 6.8、pH 7.2、pH 7.4、pH 7.6、pH 8.0 (Table4)の順で還流を行った。そこで得られた結果をもとに検量線を作成し、SNARF-1 の蛍光輝度の比と pH の値の変換を行った。

Table4 pH 測定で用いた buffer の組成

Normal buffer	Na ⁺ (+) buffer	Na ⁺ (-) buffer
140 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM glucose 10 mM HEPES pH 7.4 adjusted by NaOH	115 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM glucose 2.5 mM HEPES pH 7.4 adjusted by NaOH 25 mM NaHCO ₃ 10 μM EIPA 5% CO ₂ bubbling	115 mM NMDG-Cl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM glucose 2.5 mM HEPES pH 7.4 adjusted by NMDG 25 mM tetraethylammonium bicarbonate 10 μM EIPA 5% CO ₂ bubbling
pH calibration HEPES buffer		Ca ²⁺ free calibration buffer
126 mM NaCl 4.4 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1.1 mM CaCl ₂ 11 mM glucose 24mM HEPES pH 7.4, 6.8, 7.6 or 8.0 adjusted by NaOH (11 μM nigericin)		126 mM NaCl 4.4 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 0.63 mM EGTA 11 mM glucose 24 mM HEPES pH 7.4 adjusted by NaOH

x NBCe1-C リン酸化レベルの検出

NBCe1-C のリン酸化状態の検出は先行研究⁴⁶に基づいて行った。HEK293T 細胞に各 HA-NBCe1 と各 CaNA/B の transfection を行い、48 時間後、リン酸が含まれない培地で数時間培養を行った。その後、 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate (0.8 mCi/ml) (Perkin Elmer) を含んだ培地に交換し、4 時間培養を行った。 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate を取り込ませた細胞から HA-NBCe1-C を、HA(3F10)抗体と Protein Sepharose G を用いた免疫沈降法と同様の方法で濃縮し、SDS-PAGE を行いその放射活性を BAS500 bioimaging analyzer (Fuji Photo Film)を用いて撮影した。

xi 統計解析

すべての統計解析は R⁴⁷ を元に作成された EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った。共焦点顕微鏡を用いた細胞表面発現量の解析と pH_i 測定の解析時には、Smirnov-Grubbs test によって導き出された外れ値を除外し、Kolmogorov-Smirnov test を用いて正規分布の判定を行った。Kruskal-Wallis test を用いた場合は post hoc として Steel-Dwass test を用いて検定を行った。one-way analysis of variance (ANOVA)を用いた場合は、post hoc として Tukey HSD test を用いて検定を行った。すべての統計解析は、 $p < 0.05$ を有意水準として用いた。箱ひげ図(Fig.7)の作製には Excel 2016 を用いた。

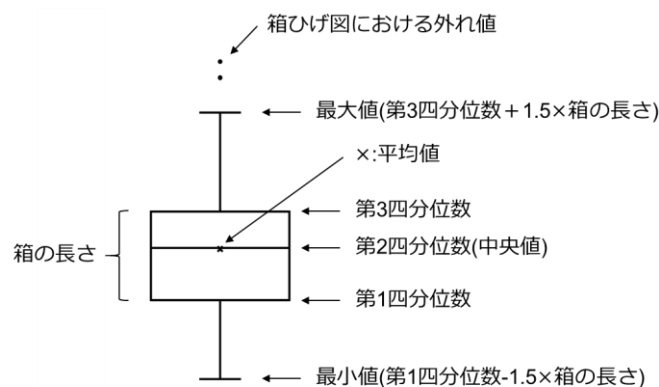


Figure 7 箱ひげ図の概説

第2節 結果

2-1. NBCe1-C 特異的結合タンパク質の発見と結合の証明

i NBCe1-C 特異的結合タンパク質の発見

NBCe1 は選択的スプライシングにより 5つのバリエーションを生じ、中でも、NBCe1-C は唯一 C 末端が異なる(Fig.5)^{31,32}。NBCe1-C は、アストロサイトに特異的に発現しており、複雑な構造をしたアストロサイト突起の細胞膜での発現が確認されているが³⁵、アストロサイトの細胞体で合成された NBCe1-C がどのようにして突起に運ばれているか等の分子メカニズムはいまだ明らかになっていない。NBCe1-C が持つと考えられる、アストロサイト特異的な機能調節機構を解明するための第一歩として、私は、NBCe1-C 特異的 C 末端に結合する分子を探索することとした。

NBCe1-C の特異的 C 末端 (Fig.8A、赤い領域)に GST を融合させたリコンビナントタンパク質 (GST-NBCe1-C/Ct)を精製し、マウス小脳ホモジネート液から GST-NBCe1-C/Ct 結合タンパク質を SDS-PAGE を用いて分離したところ、特異的結合タンパク質として約 59 kDa の部分に唯一バンドが確認された (Fig.8B、矢印)。このバンドを LC-MS/MS にて解析したところ、calcineurin α と β の触媒サブユニット(CaNA α もしくは β) が結合タンパク質として同定された(Table5)。その他の含有タンパク質は、すべて PDZ ドメインタンパク質であった。これは、NBCe1-C の C 末端先端の 4つのアミノ酸(ETTL) が PDZ ドメイン結合配列と推測されていたことから妥当な結果である^{32, 42, 48}。Calcineurin は脱リン酸化酵素であり、普遍的に発現するタンパク質だが、膜タンパク質との相互作用に関しては報告が少ない一方、pH 調節トランスポーターである NBCn1 と NHE に結合することから^{49, 50}、同様に NBCe1-C の機能調節に関わっている可能性が高いと考え、calcineurin について研究を進めた。

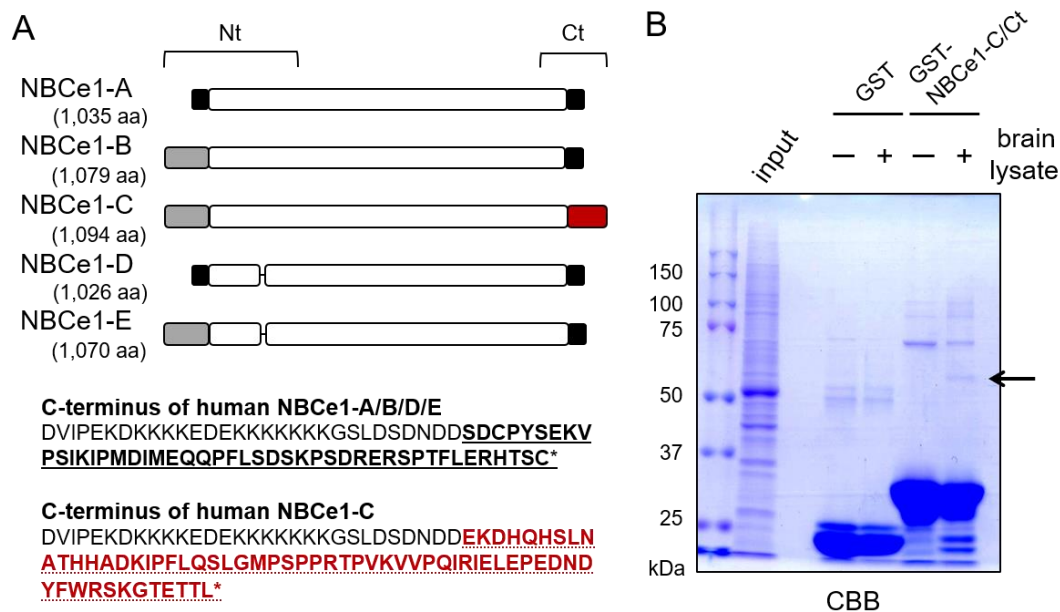


Figure 8 NBCe1-C/C 末端に特異的に結合するタンパク質の探索

- (A) NBCe1 の 5 つの splice variants の模式図 (上) と NBCe1-C 特異的 C 末端のアミノ酸配列 (下)。NBCe1-C は特に異なる C 末端を持ち、その異なる 61 アミノ酸配列を赤い領域で示した。
- (B) SDS-PAGE を用いてマウス小脳 brain lysate から得た GST-NBCe1-C/Ct 結合タンパク質を分離し、CBB 染色法にて検出した。Brain lysate を混合したサンプルにおいて、59kDa に特異的なタンパク質が得られた (矢印)。

Table5 GST-NBCe1-C/Ct 結合タンパク質の LC-MS/MS

Swiss Prot ID	Protein Name	Molecular weights	Mascot score
PP2BB_MOUSE	Catalytic subunit of calcineurin beta isoform	59,163	576
PP2BA_MOUSE	Catalytic subunit of calcineurin alpha isoform	58,606	571
MPP6_MOUSE	MAGUK p55 subfamily member 6	62,592	83
GOPC_MOUSE	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	50,631	74
SNTA1_MOUSE	Alpha-1-syntrophin	53,632	59
MPP2_MOUSE	MAGUK p55 subfamily member 2	61,517	46
SNX27_MOUSE	Sorting nexin-27	60,950	35

ii NBCe1-C と CaNA α 、 β の結合の証明

iでNBCe1-CのC末端特異的に結合する分子としてCaNA α と β が得られたため、まず初めに、HEK293T細胞を用いた過剰発現系にて、全長のNBCe1-CとCaNA α 、 β が結合しうるのかどうか検討した。免疫沈降法を行うために、NBCe1-CにはHA-tagを、CaNAにはFLAG-tagを挿入し、また、CaNAのタンパク質安定性を確保するために、CaNBを共発現させた。FLAGビーズを用いて、CaNA α を濃縮、沈殿させたところ、NBCe1-Cの共沈が確認できた(Fig.9A)。CaNA β についても同様に結合が確認できた(Fig.9B)。

過剰発現系での結合を確認することができたので、次に、マウス小脳における内在性タンパク質同士の結合が存在しうるかどうか検討した。過剰発現系において、CaNA β の結合も確認することができたが、今後の実験では、小脳においてCaNA α の発現が β に比べて優位であること⁵¹、アストロサイトのmRNAシーケンスデータベースにおいて、CaNA α のmRNAの発現が β より高いこと³⁶、を考慮し、CaNA α とNBCe1-Cの関係について着目することとした。マウス小脳から抽出した細胞膜画分を可溶化したサンプル(membrane lysate)から、CaNA α 抗体を使って内在性CaNA α を濃縮、沈殿させ、NBCe1-C特異的抗体を用いてWestern blot法による検出を行ったところ、NBCe1-Cの共沈を確認することができた(Fig.9C)。この実験により、マウス小脳において、NBCe1-CとCaNA α の複合体が実際に存在していることが明らかとなった。

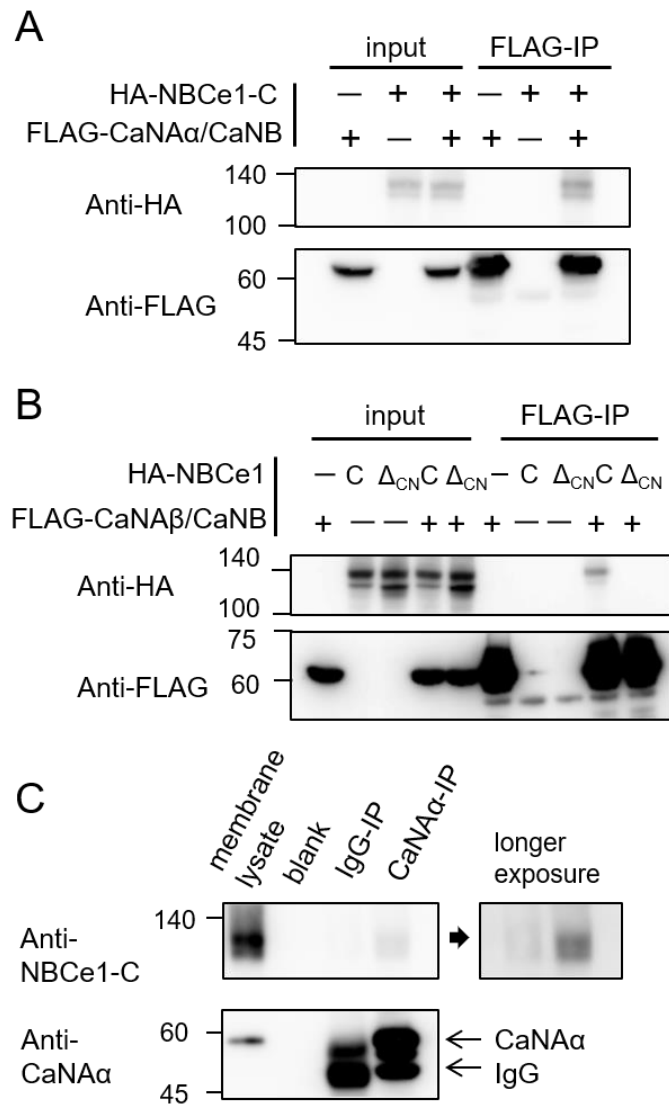


Figure 9 NBCe1-C と CaNA の結合を確認した

- (A) HEK293T 細胞を用いた過剰発現系にて、免疫沈降法を行い、全長の NBCe1-C と CaNA α の結合を確認することができた。
- (B) HEK293T 細胞を用いた過剰発現系にて、免疫沈降法を行い、全長の NBCe1-C と CaNA β の結合を確認することができた。(Δ_{CN} : CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C。後述)
- (C) マウス小脳の細胞膜画分を用いて免疫沈降法を行い、内在性の CaNA α と NBCe1-C の結合を確認することができた。

2-2. Calcineurin は NBCe1-C 特異的 C 末端に存在する CaNA 結合配列に結合する。

i CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C(Δ_{CN} NBCe1-C)と、CaNA α 変異体の作製

CaNA が結合する基質のほとんどは、PxIxIT、LxVP どちらかもしくは両方のアミノ酸配列を介して結合している⁵²⁻⁵⁴。NBCe1-C 特異的 C 末端に、結合モチーフに類似するアミノ酸配列が存在するかどうか目視で確かめたところ、PxIxIT に符合する“PQIRIE”というアミノ酸配列を見つけることができた。この6アミノ酸配列は、NBCe1-C 特異的 C 末端に存在し、対して、他の variants の C 末端には存在しない(Fig.8A)。さらに、この PQIRIE 配列はデータベース上で NBCe1-C を持つとされるすべての生物種で保存されていることが明らかとなった(Fig.10A)。以上の情報から、PQIRIE が CaNA の結合部位と予想し、この配列を削除した CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C(Δ_{CN} NBCe1-C)を作製した(Fig.10A)。

次に、CaNA α の脱リン酸化活性が NBCe1-C との結合に影響しうるか検討するために、恒常的に活性化した CaNA (CA-CaNA α)と、CA-CaNA を基にして脱リン酸化活性中心に必要なアミノ酸を点変異(H151Q)させた不活性型 CaNA (PD-CaNA α) を作製した(Fig.10B)。

作製したこれらの CaNA α 変異体が、期待した酵素活性を示すかどうかを、CaNA の基質としてよく知られている NFAT (nuclear factor of activated T cells)を共発現させることで調べた。NFAT は、CaNA によって脱リン酸化されると、SDS-PAGE 上の移動度が増大し、脱リン酸化を受けると核へ移行する⁵⁵。この NFAT の変化を、western blot 法と、免疫染色法を用いて観察した。myc-NFAT を CA-CaNA α と共発現させたところ、その SDS-PAGE 上での移動度が増大し、PD-CaNA α と共発現させた場合は変化しなかった(Fig.10C)。また、免疫染色にて NFAT の核移行を観察したところ、CA-CaNA α を共発現させた細胞では NFAT の核~核周囲への集積が強く観察され、PD-CaNA α との共発現では、核での NFAT のシグナルが減少していた(Fig.10D)。

以上の結果より、恒常的活性化型 CaNA α と不活性型の CaNA α は相応の脱リン酸化活性を示し、これらを用いて以下の実験を行った。

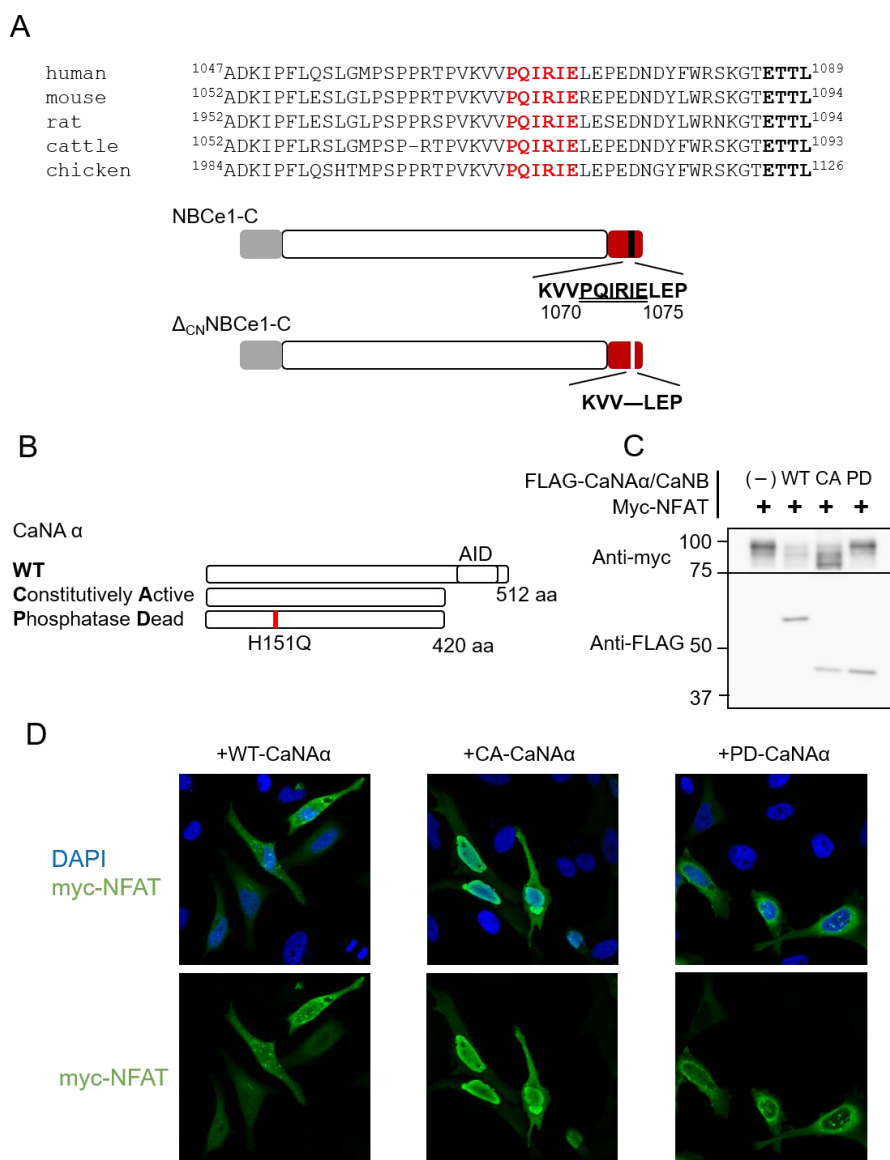


Figure 10 CaNA 結合部位欠損 NBCe1-C(Δ_{CN} NBCe1-C)と、CaNA α 変異体の作製

(A) 上段: 生物種ごとの NBCe1-C の特異的 C 末端配列の一部。CaNA 結合配列である PQIRIE を赤で示し、PDZ ドメイン結合配列を太字で示した。それぞれのアミノ酸配列は GenBank accession number NM_001134742.1 (human), NM_001136260.1 (mouse), XM_006250791.3 (rat), XM_015471675.2 (cattle), XM_025150084.1 (chicken)から抜粋した。

下段: PQIRIE を削除した NBCe1-C 変異体の模式図。

(B) 実験で用いた CaNA α 変異体の模式図。AID: 自己抑制配列

(C) HeLa 細胞を用いた CaNA 変異体の共発現による、myc-NFAT の SDS-PAGE の移動度の変化。

(D) HeLa 細胞を用いた CaNA 変異体の共発現による、myc-NFAT の細胞内局在の変化。

ii NBCe1-C と CaNA α 変異体を用いた免疫沈降

CaNA 結合部位と予想した配列の確認と、CaNA α 変異体の影響をそれぞれ調べるために、HEK293T 細胞を用いた過剰発現系にて免疫沈降を行った。FLAG タグを挿入した野生型 CaNA (WT-CaNA α) を FLAG タグで免疫沈降を行ったところ、NBCe1-C の共沈を確認することができた。対して、C 末端の配列が異なる NBCe1-B、 Δ_{CN} NBCe1-C は共沈しなかった(Fig.11)。この結果より、予想通り、NBCe1-C の特異的 C 末端に存在する PQIRIE 配列が CaNA 結合部位であることと、CaNA が NBCe1-C 特異的に結合することが明らかとなった。CaNA α 変異体による影響は、CA-CaNA α 、PD-CaNA α どちらで免疫沈降を行った際でも、NBCe1-C の共沈量が野生型-CaNA α に比べて変化しなかったことから、NBCe1-C と CaNA α の結合に、CaNA の脱リン酸化活性は影響しないことが明らかとなった(Fig.11)。

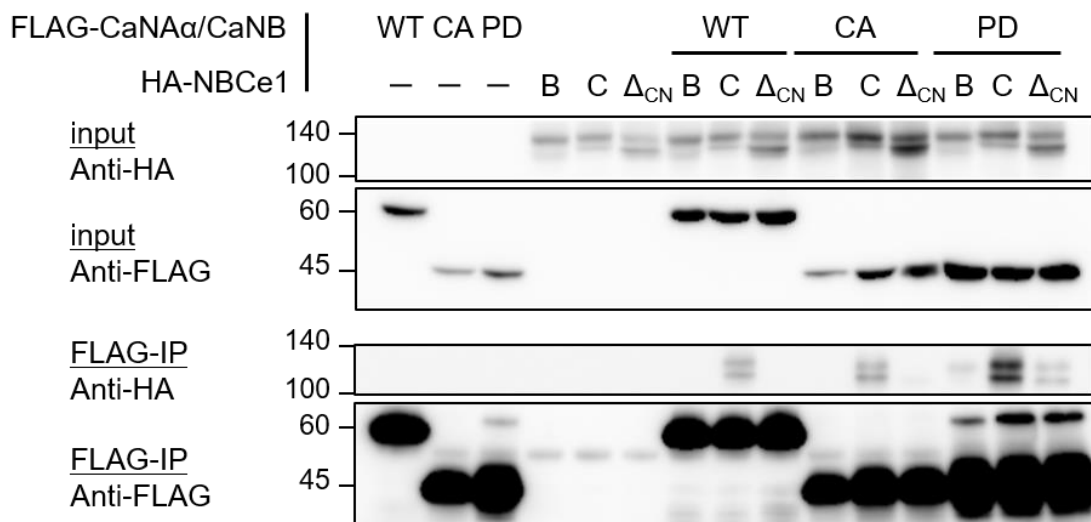


Figure 11 CaNA 結合配列の決定と、結合に対する CaNA 酵素活性の影響

HEK293T 細胞を用いた過剰発現系において免疫沈降を行った。

FLAG ビーズを用いて FLAG-CaNA α を濃縮し、NBCe1 の共沈を確認した。

B: NBCe1-B, C: NBCe1-C, Δ_{CN} : Δ_{CN} NBCe1-C, WT: full length CaNA α , CA: CA-CaNA α , constitutively active form, PD: PD-CaNA, phosphatase dead form.

2-3. $\Delta_{CN}NBCe1-C$ において糖鎖修飾が減少する

$\Delta_{CN}NBCe1-C$ を western blot 法を用いて検出した際、2本現れる NBCe1 のバンドのうち、分子量の小さいバンドが、NBCe1-B、NBCe1-C と比べて強く現れる (Fig.11)。また、この2本のバンドは、過剰発現を行ってから時間が経過するごとに、分子量の小さいバンドから大きいバンドの方へと発現量が推移していく様子が観察することができ、NBCe1-B と NBCe1-C では過剰発現 24 時間後の時点では上下のバンドに差は見られないが、31~52 時間後の間で上のバンドにほぼすべての NBCe1 がシフトした様子が見られる (Fig.12A)。このことから、上下のバンドは膜タンパク質の成熟過程と対応する糖鎖修飾の有無によるものと考え、HeLa 細胞に発現させた NBCe1-B、NBCe1-C、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ を回収し、試験管内で2種類の糖鎖切断酵素と反応させた (Fig.12B)。糖鎖の種類に関係なく切断を行う PNGaseF (peptide-N-glycosidase F) で処理をした場合、どの NBCe1 も一様に分子量が低下し、NBCe1 の2本のバンドは、どちらも糖鎖修飾を受けていることがわかった。対して、単純マルトース型糖鎖のみを切断することができる EndoH で処理をした場合、分子量の大きい上のバンドに変化は見られず、分子量の小さい下のバンドのみ一様に分子量が低下した。このことから、分子量の大きい上のバンドはゴルジ体における膜タンパク質の成熟化によって複雑糖鎖を持つこと、下のバンドは成熟前の単純マルトース型糖鎖のみを持つことが明らかとなった。このことから、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ は糖鎖修飾が遅延していることが示唆された。しかし、Fig11 において CaNA との共発現においても NBCe1-C の上下のバンドに発現量の変化は観察されないことから、少なくとも、CaNA の作用で糖鎖修飾が大きく調節される可能性は低いことが考えられ、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ の糖鎖修飾の変化は C 末端部位のアミノ酸を欠損させたことによる二次的なものによる可能性が高いと考えた。

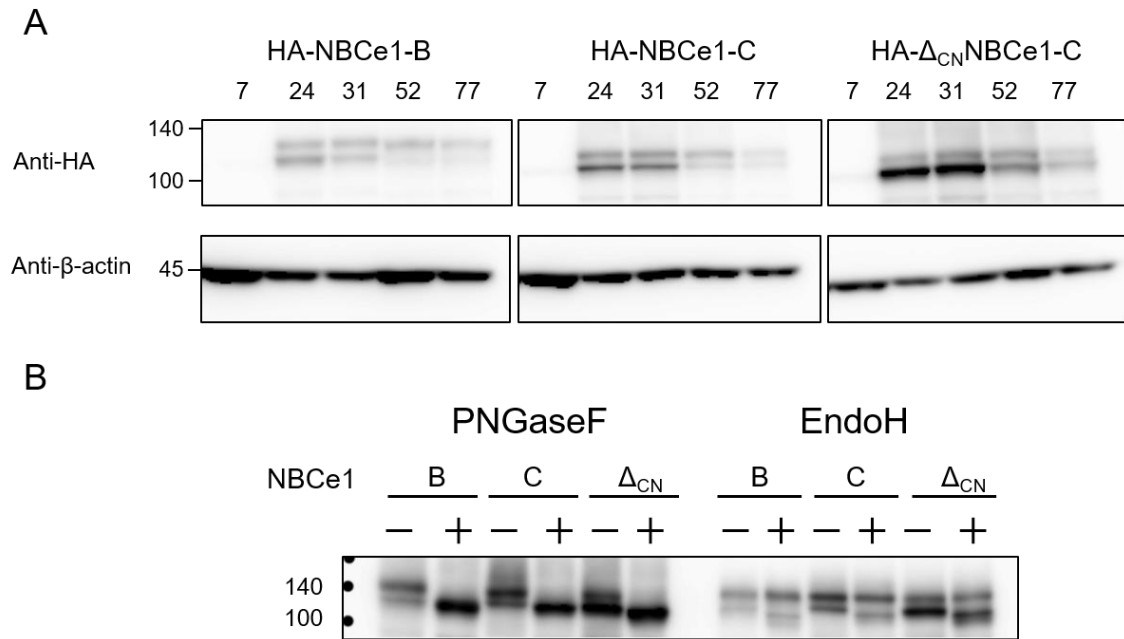


Figure 12 Δ_{CN} NBCe1-C における糖鎖修飾の減少

(A) HeLa 細胞に HA-NBCe1 をそれぞれ過剰発現させ、時間ごとに回収し、western blotting 法を用いて分子量の変化を観察した。

(B) western blotting 法を用いて糖鎖切断酵素処理後の NBCe1 の分子量の変化を調べた。

PNGase F; peptide-N-glycosidase F, oligosaccharides. Endo H; Endoglycosidase H.
 B; NBCe1-B, C; NBCe1-C, Δ_{CN} ; Δ_{CN} NBCe1-C.

2-4. calcineurin は NBCe1-C の細胞表面発現を促進する。

i NBCe1-C 過剰発現時の細胞内局在の観察

これまでの実験で、CaNA α はその脱リン酸化活性の有無にかかわらず、NBCe1-C に結合することを示した。CaNA と NBCe1-C の結合の生理的意義を理解するために、NBCe1-B、NBCe1-C、 Δ_{CN} NBCe1-C それぞれを HeLa 細胞に過剰発現させ、細胞内局在を観察した。共焦点顕微鏡を用いて撮影を行う際、焦点位置によって局在の見え方が変化してしまうため、実験の均一性を確保するために、細胞の下部から上部にかけて連続撮影し、最大輝度プロジェクション処理を行うことで焦点位置に左右されない一枚の画像とした。そのため NBCe1 は本来細胞膜に発現するパターンを示すが、細胞下端の細胞膜のシグナル、各階層の細胞の縁が合成されることで細胞膜の局在パターンが細胞全体に一樣に広がるように観察される。NBCe1-B、NBCe1-C では細胞全体に広がる局在を示すことに対して、 Δ_{CN} NBCe1-C では、細胞内部に集積する様子が観察された(Fig.13A)。

この発見により、私は CaNA α の結合が NBCe1-C の細胞膜発現に影響を与える可能性を考え、細胞表面に発現した NBCe1 の数値化を行った。細胞表面に発現する NBCe1 のみを認識するために、細胞外に露出するループに HA タグを挿入した NBCe1 を過剰発現させ、個々の細胞の全発現量に対する細胞表面発現量の割合を算出した。NBCe1-B と NBCe1-C に比べて、 Δ_{CN} NBCe1-C では、細胞表面発現量が有意に減少していた(Fig.13B)。

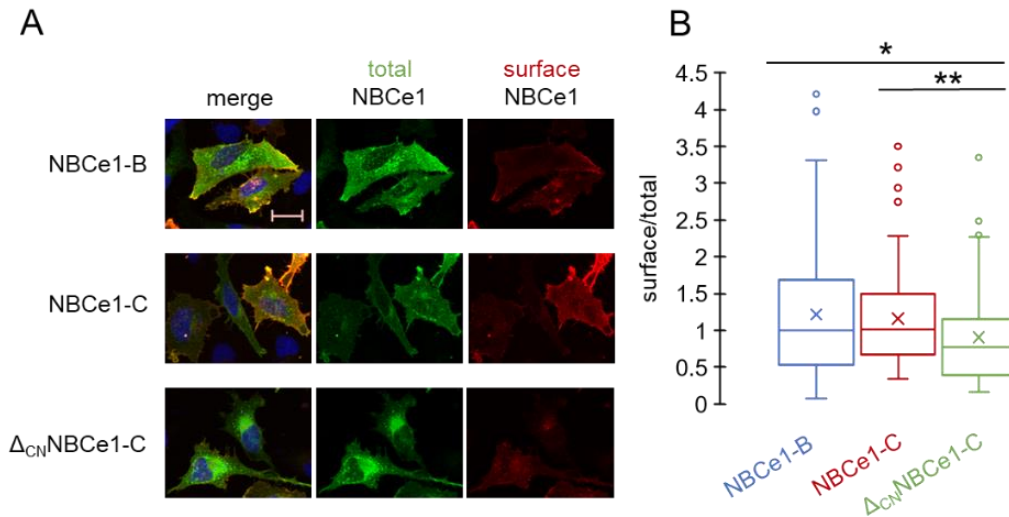


Figure 13 NBCe1 の細胞内分布と細胞表面発現量の数値化

(A) 各 NBCe1 を HeLa 細胞に過剰発現させ、二重染色法にて細胞表面発現量を可視化した。細胞表面に発現する NBCe1 は HA 抗体を用いて染色し (赤)、細胞全体に発現する NBCe1 は SLC4A4 抗体を用いて染色した (緑)。

Scale bar:25 μ m.

(B) NIS software を用いて、細胞表面発現輝度と全発現輝度の比を算出し、細胞表面発現量を統計的に解析した。細胞は独立した実験を三回行い、各実験の NBCe1-B サンプルの中央値を代表値とみなして全サンプルの標準化を行い、収集した(NBCe1-B: n=90, NBCe1-C: n=94, Δ_{CN} NBCe1-C: n=88)。

Kruskal-wallis test p=0.0046。* と **はそれぞれ Steel-Dwass post-test における p<0.05、p<0.01 を表している。

ii calcineurin 共発現時の NBCe1-C 細胞表面発現量の変化

iにおいて、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ の細胞膜発現量が減少していたことから、次に、CaNA α 変異体を用いて、CaNA α の酵素活性がNBCe1-C の細胞膜表面発現量に影響を与えるかどうかを確かめた。NBCe1-B、NBCe1-C、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ それぞれに、CA-CaNA α もしくはPD-CaNA α を共発現させ、iと同様の方法を用いて細胞膜発現量の統計学的解析を行った。CA-CaNA α を共発現させた際、どのNBCe1においても細胞膜表面発現の増加がみられるが、NBCe1-Bと $\Delta_{CN}NBCe1-C$ がそれぞれ1.2倍($p<0.05$)、1.3倍($p<0.05$)の増加量であったのに対し、NBCe1-Cは1.9倍($p<0.001$)と有意な増加を示した(Fig.14A,B)。さらに、PD-CaNA α は、NBCe1-Cに結合するにもかかわらず、細胞膜表面発現を増加させることはできなかった(Fig.14A,B)。これらの結果より、CaNA α はNBCe1-C特異的に細胞表面発現を促進し、加えて、これには結合だけではなくCaNA α の脱リン酸化活性が必要であることが明らかとなった。

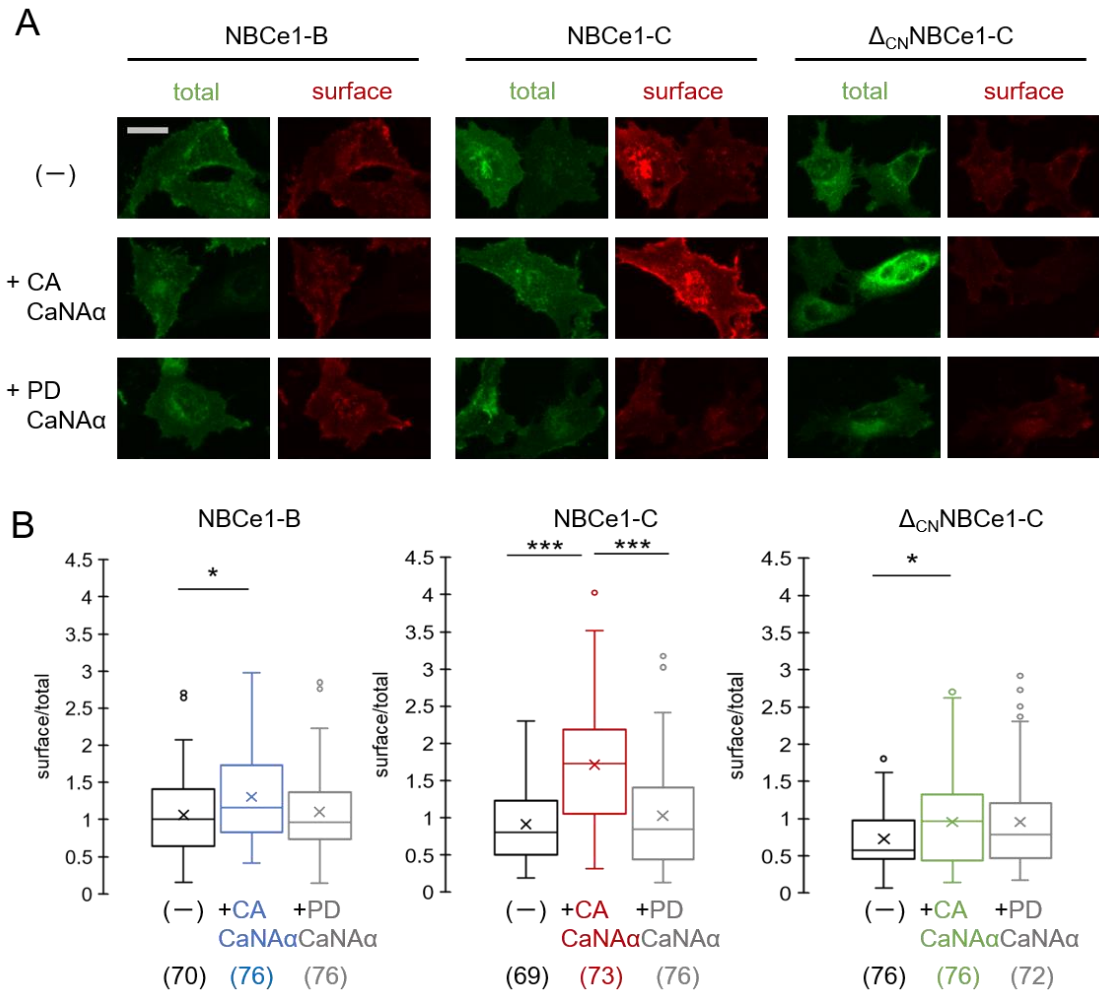


Figure 14 CaNAα は NBCe1-C の細胞表面発現を促進する

- (A) HeLa 細胞を用いてそれぞれの NBCe1 における、CaNAα 変異体共発現時の細胞膜表面発現量の変化を観察した。方法は Fig.13 と同様の方法を用いた。Scale bar:25 μm.
- (B) Fig.13 と同様の方法を用いて統計学的解析を行った。独立した実験を三回行い、各実験の NBCe1-B サンプルの中央値を代表値とみなして全サンプルの標準化を行い、収集した(カッコ内の数字はサンプル数を示している)。Kruskal-wallis test, NBCe1-B:p=0.03, NBCe1-C:p=1.43×10⁻¹⁰ Δ_{CN} NBCe1-C:p=0.04 。* と***はそれぞれ Steel-Dwass post-test における p<0.05 と p<0.001 を表している。

2-5. calcineurin は NBCe1-C のトランスポーター活性を増加させる。

i HeLa 細胞を用いた細胞内 pH 測定

2-4. で calcineurin が NBCe1-C の細胞表面発現を促進させることが明らかとなったことから、NBCe1 のトランスポーター活性が calcineurin の影響を受けるかどうかを確かめることにした。細胞内 pH 変化の観察は、蛍光 pH 指示薬 SNARF-1 を用いて行った⁵⁶。Nigericin を用いたキャリブレーションを行い、SNARF-1 の蛍光輝度比を pH に変換し測定系を確立した(Fig.15A)。培養細胞を用いて NBCe1-C のトランスポーター活性を測定した研究が未だないため、まず初めに、先行研究と同様の実験系で NBCe1-C のトランスポーター活性を測定できるかどうか確認を行った。

NBCe1 の輸送活性は Na^+ が含まれない buffer ($\text{Na}^+(-)$) から、 Na^+ を含む buffer ($\text{Na}^+(+)$) に置換し $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ の共輸送を誘起させることで観察した。 $\text{Na}^+(+)$ に置換した際の pH の増加が control 細胞 (Fig.15B 黒線:(-)) に対して NBCe1-C 発現細胞において顕著であり、30 秒ほどで pH が 7.5 まで上昇した(Fig.15B 赤線)。NHE 阻害剤である EIPA 存在下で行っているため、グラフで示される Na^+ 依存的な細胞内 pH 上昇は NHE 由来のものではない。Control 細胞での緩やかな pH 上昇は、恐らく HeLa 細胞に発現する内在性の NCBTs 由来のものと考えられる。今回用いた実験系で、問題なく NBCe1-C による細胞内 pH の上昇を観察でき、pH 上昇の傾きを NBCe1 の正味の輸送活性として捉えられる系を確立できた。

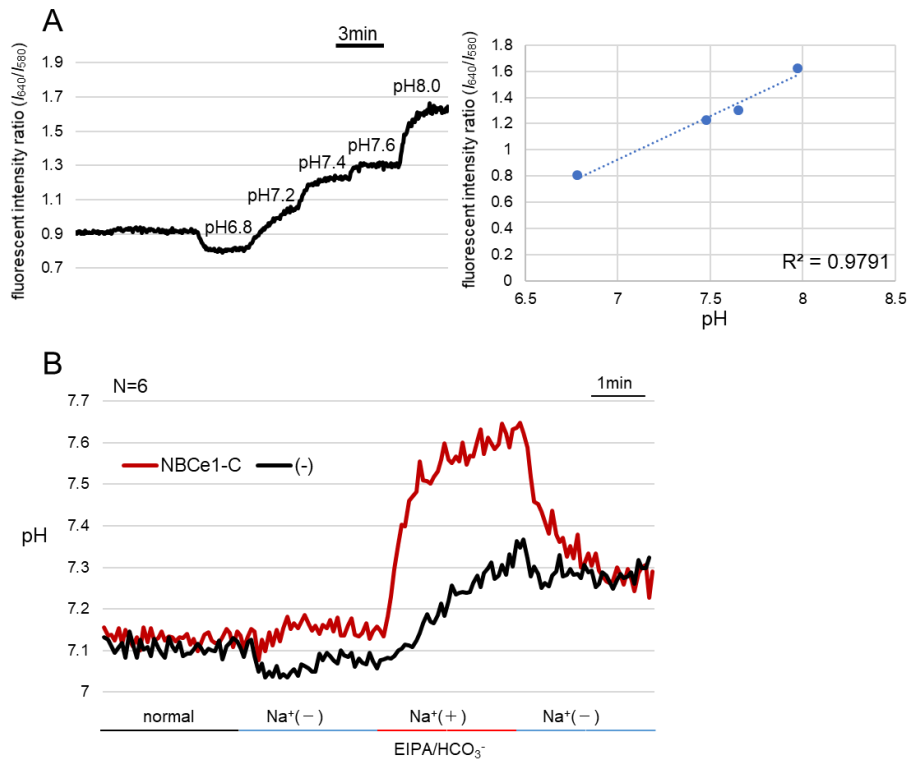


Figure 15 HeLa 細胞を用いた NBCe1-C のトランスポーター活性の測定

- (A) Nigericin を用いた pH キャリブレーション。各 pH-buffer を順々に暴露した際の実測値 (左)と、各 pH-buffer 毎の蛍光輝度比の平均を代表値として作成した検量線 (右)。実測値は 18 個の細胞の数値を平均化して作成した。
- (B) 検量線を基に、蛍光輝度比の実測値を pH に変換した。グラフの下部は還流している buffer の名前と範囲を示している。サンプルは 1 回の測定で同じ画面上に存在する 6 個の細胞の数値を平均化して作成した。

ii calcineurin が NBCe1-C トランスポーター活性に及ぼす影響

過剰発現時した NBCe1-C のトランスポーター活性を確認することができたため、次に、CA- もしくは PD-CaNA α 共発現時の NBCe1-C トランスポーター活性に対する影響を調べた。NBCe1 の活性は、Na⁺(+)buffer に置換後 22 秒間の pH 上昇率として表した。 Δ_{CN} NBCe1-C は NBCe1-C に匹敵するトランスポーター活性を有した (Fig.16A)。しかし、有意ではないものの、NBCe1-C に比べて、NBCe1-C の活性が低下傾向にあった (NBCe1-C:0.020 Δ ratio/sec vs Δ_{CN} NBCe1-C:0.018 Δ ratio/sec, p=0.059)。CA-CaNA α 共発現によって NBCe1-C の活性は有意に上昇したが(1.15 fold, p<0.05)、 Δ_{CN} NBCe1-C に影響を及ぼさなかった(1.06 fold, p=0.88)。PD-CaNA α 共発現では、NBCe1-C の活性を増加させることなく、CA-CaNA α 共発現時と比べて、有意に活性が低かった(0.78 fold reduction compared to that of CA-CaNA co-expression, p<0.005) (Fig.16B)。各実験において、NBCe1 の発現量が CaNA α の共発現によって変化しないことから、NBCe1-C 輸送活性の増加は、NBCe1-C の細胞表面発現量の促進に伴う HCO₃⁻輸送量の増加に起因すると考えられる。このことから CaNA α の結合は、NBCe1-C の輸送活性に必須ではないものの、細胞表面発現量増加によって細胞内 HCO₃⁻濃度の上昇を加速させ、この作用には PD-CaNA α 共発現では NBCe1-C 輸送活性亢進が見られないことから、CaNA α の脱リン酸化活性が必要であることが明らかとなった。

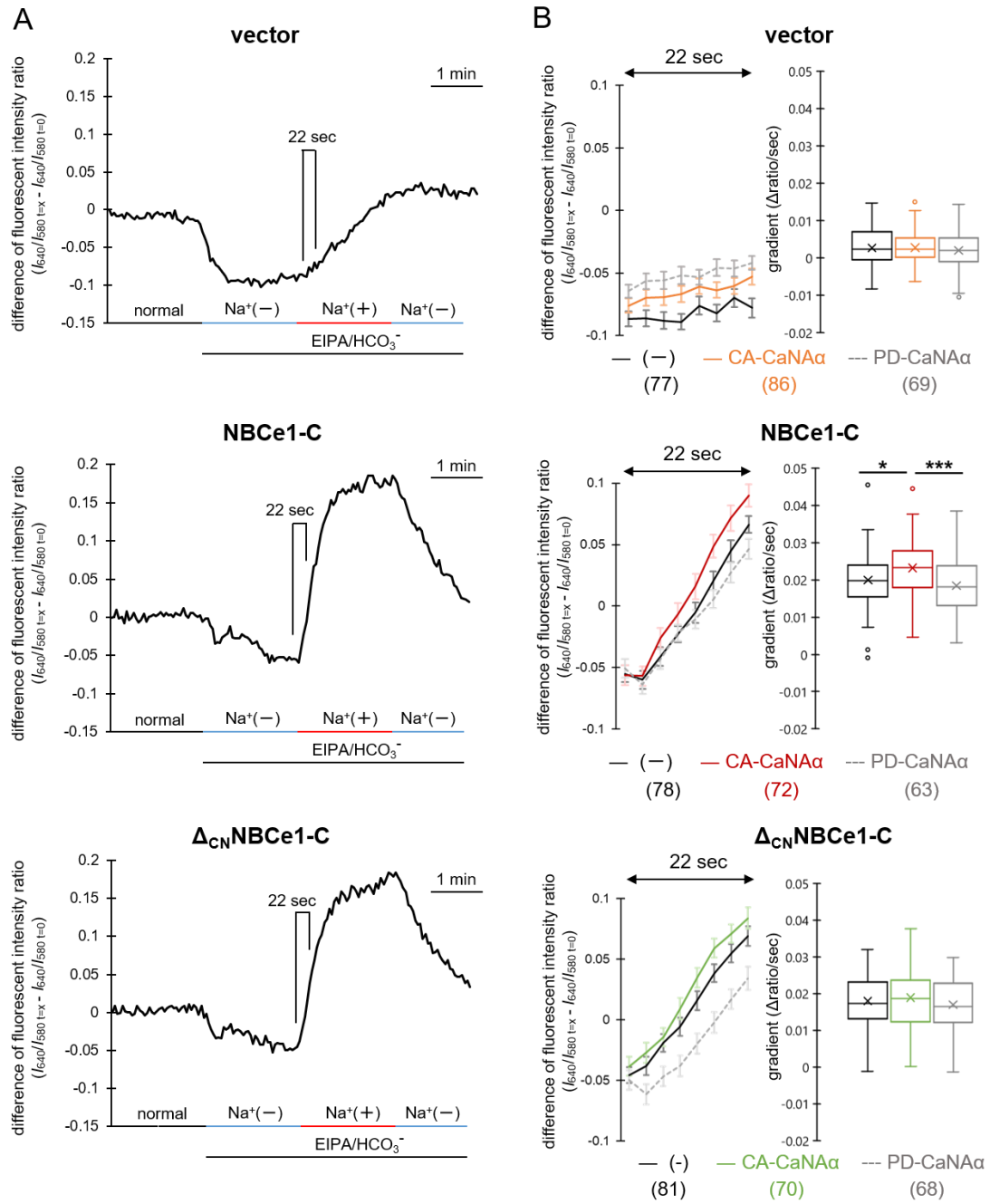


Figure 16 CA-CaNA α 、PD-CaNA α 共発現時の NBCe1 の活性変化

- (A) HeLa 細胞を用いた過剰発現系による NBCe1 活性の測定。細胞内 pH の変化は、pH 指示薬である SNARF-1 の蛍光輝度比の変化を指標とした。数値は各細胞の測定開始時の輝度比に対する増加量を算出し標準化を行った (difference of fluorescent intensity ratio)。各グラフの下部に還流 buffer のタイムコースを示した。Na⁺ (-) から Na⁺ (+) へ還流 buffer が切り替わった際に生じた細胞内アルカリ化を NBCe1 の活性とし、グラフの傾きが直線である 22 秒間の近似直線の傾きを活性値として算出した。
- (B) CaNA α 変異体の共発現による NBCe1 活性の変化を示した。左のグラフは (A) のグラフ内に示した 22 秒間を抽出して表したもので、右の箱ひげ図は NBCe1 の活性 (gradient) を示している。細胞は 5 回の独立試行から収集した(カッコ内の数字はサンプル数を示している)。* と***はそれぞれ Tukey-HSD post-test における $p < 0.05$ と $p < 0.001$ を表している。

2-6. calcineurin によって NBCe1-C は脱リン酸化を受ける

i calcineurin による NBCe1-C と IRBIT の結合に対する影響

前述したように、NBCe1-C のトランスポーター活性は N 末端に IRBIT が結合し、AID による抑制が解除されることで発揮される³⁸。また、IRBIT と NBCe1-C の結合には、IRBIT のリン酸化が重要である。CaNA α が IRBIT と NBCe1-C の相互作用に影響を与えることで、NBCe1-C の輸送活性を変化させている可能性を検討するために、CA-CaNA 共発現時の NBCe1-C、或いは Δ_{CN} NBCe1-C と IRBIT の結合を免疫沈降法を用いて確認を行った。 Δ_{CN} NBCe1-C は、NBCe1-C と同程度 IRBIT と結合すること、さらに、CA-CaNA を共発現しても、IRBIT と NBCe1-C との結合に変化を及ぼさなかった。この時、IRBIT と CA-CaNA の結合は確認することができなかった(Fig.17)。この結果より、calcineurin による NBCe1-C の細胞表面発現の促進やそれに伴う輸送活性の上昇は、IRBIT とは独立して、つまり、N 末端の持つ機能とは独立して、NBCe1-C の特異的 C 末端と calcineurin の相互作用によって生じることが示唆された。

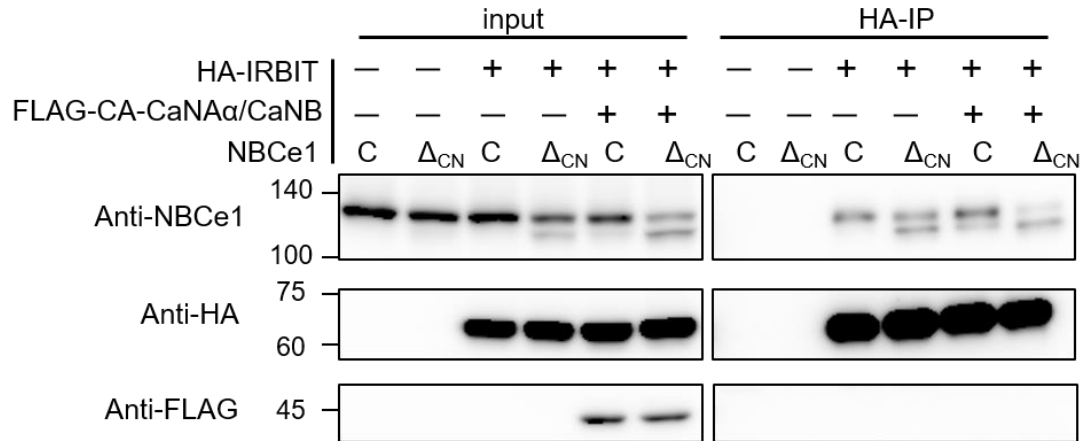


Figure 17 CA-CaNA α 共発現時の、NBCe1-C と IRBIT の結合への影響

HEK293T 細胞に、図示した組み合わせの遺伝子導入を行い、HA 抗体を用いて HA-IRBIT の免疫沈降を行った。C; NBCe1-C、 Δ_{CN} ; Δ_{CN} NBCe1-C。

ii calcineurin 共発現による NBCe1-C リン酸化レベルの低下

iで calcineurin による NBCe1-C の輸送活性の促進が IRBIT との結合変化によるものではなかったことから、NBCe1-C が直接 calcineurin の基質である可能性が高まったため、次に、NBCe1-C 自身のリン酸化レベルの変化について検討を行った。 ^{32}P を用いて放射性標識を行いリン酸化レベルの確認を行ったところ CA-CaNA α を共発現させた NBCe1-C では、単独発現時と比べてリン酸化レベルが 25%低下していた。NBCe1-B と $\Delta_{\text{CN}}\text{NBCe1-C}$ では、逆に、CA-CaNA α 共発現によりリン酸化レベルがむしろ増加する傾向を示した (Fig.18)。この結果より、NBCe1-C は CA-CaNA α によって脱リン酸化を受けている可能性が得られ、NBCe1-C の細胞表面発現が、calcineurin によるリン酸化/脱リン酸化のスイッチによって制御されていることが示唆された。

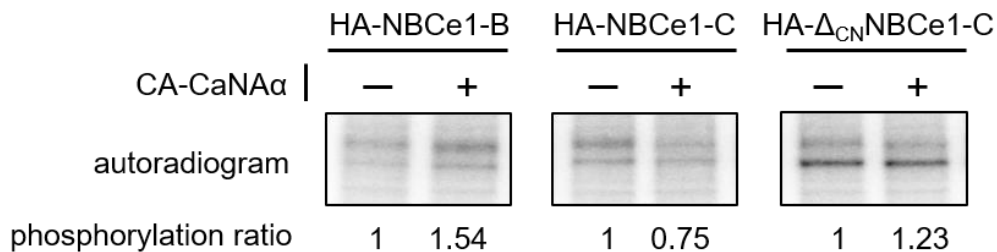


Figure 18 CA-CaNA α 共発現による NBCe1-C リン酸化レベルの変化

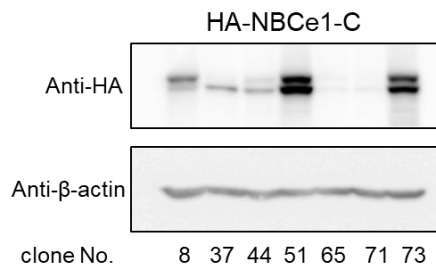
HEK293T 細胞に過剰発現を行い、 ^{32}P を代謝依存的に取り込ませた後、HA-NBCe1 を免疫沈降法を用いて濃縮・洗浄を行い、SDS-PAGE にて分離し、活性を測定した。Western blot 法を用いて NBCe1 の発現量を数値化し、 ^{32}P 標識された NBCe1 量の比を算出し、それぞれ CA-CaNA α を共発現させていない時の数値を 1 とし標準化を行った。

2-7. 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇依存的に NBCe1-C の細胞表面発現が促進される

i HA-NBCe1-C 安定発現 HeLa 細胞の樹立

これまでに、過剰発現系を用いた実験によって、NBCe1-C の細胞表面発現が calcineurin によって促進されることを明らかにした。次に、内在性 calcineurin を用いて生理的な環境下で CaNA が NBCe1-C の細胞表面発現を促進するかどうか確かめることとした。Calcineurin は Ca^{2+} /CaM 依存性脱リン酸化酵素であるため、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで内在性 calcineurin を活性化させられる系の確立を行った。まず初めに、NBCe1-C が十分量発現している細胞株が存在しないため、HA-NBCe1-C 安定発現 HeLa 細胞 (HA-NBCe1-C 発現細胞) を樹立した。G418 を用いてセレクションを行い、いくつかのクローンを単離することができた(Fig.19A)。その中から、HA-NBCe1-C 発現細胞の割合が 90%を超えていて、かつ発現量が十分に多い株を実験に使用した(Fig.19B)。

A



B

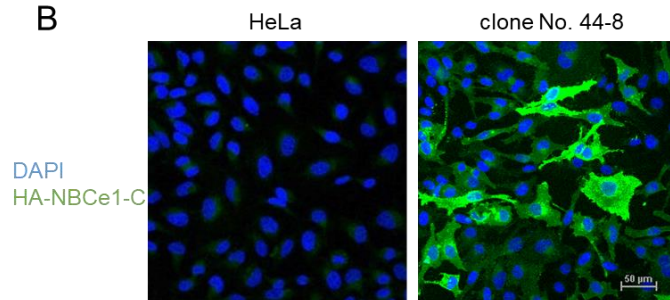


Figure 19 HA-NBCe1-C 安定発現 HeLa 細胞の樹立

- (A) HeLa 細胞に、pcDNA3.1/HA-NBCe1-C を過剰発現させ、G418 を用いて安定発現細胞株のスクリーニングを行った。第一段階のスクリーニングにより、HA-NBCe1-C 発現量の確認を western blot 法にて行ったところ、7つの安定発現細胞株を得ることができた。
- (B) 安定発現が持続した 44 番のクローンを cell sorter を用いて二段階目のスクリーニングを行い、HA-NBCe1-C 発現細胞が 90%以上存在するクローンを樹立することができた。

ii 内在性 calcineurin の活性化に必要な実験条件の検討

次に、HeLa 細胞において内在性の calcineurin の活性化が十分に生じる反応条件を検討した。HeLa 細胞に myc-NFAT を過剰発現させ、Ca²⁺ ionophore である A23871 を用いて持続的に Ca²⁺濃度を上昇させたサンプルと、A23871 による刺激と同時に FK506 による calcineurin の阻害を行ったサンプルを用意し、myc-NFAT の核移行を観察した。細胞に発現する全 myc-NFAT に対して核に局在する割合を算出したところ、CA-CaNA α を発現させた際のような劇的な変化ではないものの、2 μ M A23871 を 4 時間刺激した際に有意に myc-NFAT の核移行が増加した。加えて、10 μ M FK506 を同時に処置すると、2 μ M A23871 による核移行を抑制することができた(Fig.20)。myc-NFAT を用いて、内在性 calcineurin の活性化を確かめることができたため、HA-NBCe1-C 発現細胞を用いて、同様の処理を行い、NBCe1-C の細胞表面発現の変化を観察した。

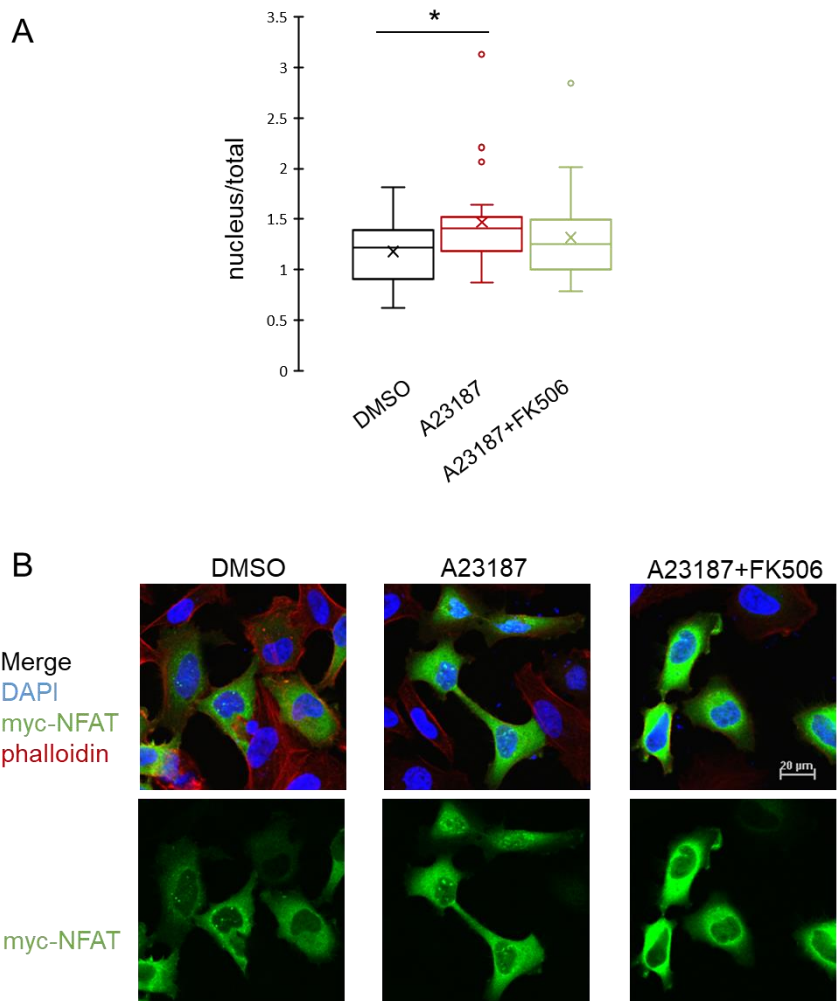


Figure 20 内在性 calcineurin 活性化による myc-NFAT の核移行量増加

(A) HeLa 細胞に myc-NFAT を過剰発現させ、NFAT の核移行量を指標とし細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的な内在性 calcineurin 活性の評価を行った。

DMSO: vehicle control; 0.1% DMSO, A23187: 2 μM A23871, FK506: 10 μM FK506.
 サンプルは 1 回の独立試行から抽出した (DMSO:n=21, A23187:n=25, A23187+FK506:n=21)。

Kruskal-wallis test, $p=0.0304$ 。*は Steel-Dwass post-test における $p<0.05$ を表している。

(B) (A) の数値化に用いた免疫染色画像の一部。

iii alkaline phosphatase を用いた、NBCe1-C 細胞表面発現増加の検出

HA-NBCe1-C 発現細胞を用いて細胞表面発現量の数値化を行う際、過剰発現時と比べ一個あたりの細胞に発現する NBCe1-C の量が少ないので、細胞表面に発現した NBCe1-C を alkaline phosphatase (ALP) 標識抗 HA 抗体を用いて検出した。4 時間の 2 μ M A23187 処理によって有意に NBCe1-C の細胞表面発現量が増加した(1.31 倍, $p < 0.05$)。一方、2 μ M A23187 と同時に 10 μ M FK506 で処理をすると、細胞表面発現の増加が抑制された(Fig.21A)。細胞全体に発現する全 NBCe1-C 量を検出したサンプルでは、2 μ M A23187 処理によって酵素活性が増加しなかったことから(Fig.21B)、HA-NBCe1-C 発現細胞において、細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的な calcineurin の活性化によって細胞表面発現が促進されることが示唆された。

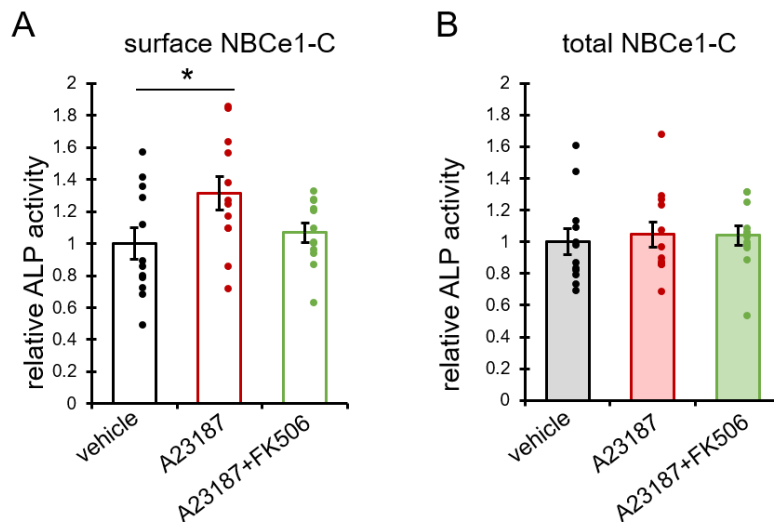


Figure 21 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって NBCe1-C の細胞表面発現が増加した

- (A) HA-NBCe1-C 発現細胞において、NBCe1-C の細胞表面発現に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と calcineurin 阻害剤の影響を調べた。細胞表面発現量は ALP 活性測定法を用いて、細胞表面に露出した HA タグを ALP 標識することで検出した。
- (B) 細胞の膜透過処理を行い、細胞全体の NBCe1-C を ALP 標識させて検出を行った。DMSO: vehicle control; 0.1% DMSO, A23187: 2 μ M A23187, FK506: 10 μ M FK506. サンプルは 3 回の独立試行にて集めた(n=12)。Error bar は SEM を表している。 One-way ANOVA (membrane NBCe1-C: $F=3.377$, $p < 0.05$, total NBCe1-C: $F=0.115$, $p > 0.05$)。* は Tukey-HSD post-test における $p < 0.05$ を表している。

第3節 考察

本研究において私は、NBCe1-C 特異的 C 末端に存在する PQIRIE 配列に calcineurin catalytic subunit (CaNA)が結合すること、さらに、CaNA α が脱リン酸化活性依存的に NBCe1-C の細胞表面発現を促進し、HCO₃⁻輸送量を増加させることを示した。この CaNA α による制御は、C 末端のみが異なる NBCe1-B では行われなことから、NBCe1-C は、脳、特にアストロサイト内において、細胞内 Ca²⁺/calcineurin 経路によって細胞表面発現が制御されることが示唆された。

i NBCe1 の C 末端が持つ膜輸送における役割

膜タンパク質の輸送には非常に多くのタンパク質が関わり、厳密にコントロールされている。例として、極性細胞における膜タンパク質の極性輸送があげられ、先行研究において、NBCe1-A と NBCe1-B が極性輸送により側底膜に選択的に局在することが示されている⁵⁷⁻⁶⁰。加えて、細胞内に露出する N 末端や C 末端に、変異を導入した NBCe1-A/B は側底膜に発現できなくなる報告がある^{18, 61, 62}。NBCe1-A の C 末端を徐々に削ることで、側底膜への局在に必須な配列を特定した報告⁶¹では、C 末端から 50 アミノ酸を切除した場合、NBCe1-A の細胞表面発現が抑制され、26 アミノ酸だけ切除した場合は、極性を失い頂端膜にも発現するようになる。つまり、NBCe1-A/B が持つ C 末端は、50 アミノ酸の中に細胞表面発現に必要な情報を、26 アミノ酸の中に極性発現に必要な情報をそれぞれ持ち、特に C 末端の“QQPFLS”配列が側底膜標的配列として機能していることが明らかとなっている⁶¹。

NBCe1-A/B が発現する上皮細胞系の細胞に対して、アストロサイトやニューロンははるかに複雑な形態をしている。上皮細胞内における極性輸送の分子メカニズムが、ニューロンでも応用されている例は多いが⁶³、ニューロン独自の極性輸送機構が存在することも明らかになりつつある^{64, 65}。アストロサイトに発現する NBCe1-C も極性輸送により突起末端への局在が制御される可能性は十分にあるが、NBCe1-A/B が持つ QQPFLS 配列を NBCe1-C は持たない(Fig.23)。その代わりに、着目すべき配列として PDZ ドメイン結合配列に分類される ETTL 配列を持つ(Fig.23)。PDZ ドメインを持つタンパク質は、足場タンパク質として知られており、膜タンパク質や可溶性タンパク質の空間配置を固定する役割を持ち、特にポストシナプスにおいてシナプス強度を制御する上で必須である^{66, 67}。アストロサイトにおいて PDZ ドメイン含有タンパク質に関する研究は乏しく、さらなる機能解明が求められているが、アストロサイト突起内で、NBCe1-C が PDZ ドメインを足場として細胞膜上での局在を制御されうる可能性が考えられる。

C-terminus of human NBCe1-A/B/D/E

DVIPEKDKKKKEDKDKKKKKKGLDSDNDSDDCPYSEKVP^{50aa}SIKIPMD
IMEQQPFLSDSKPSDRERSPTFLERHTSC*

C-terminus of human NBCe1-C

DVIPEKDKKKKEDKDKKKKKKGLDSDNDDEKDHQHSLNATHHAD
KIPFLQSLGMPSPRTPVKVVPQIRIELEPEDNDYFWR^{ETTL}SKGTETTL*

Figure 23 NBCe1 の細胞内に露出する C 末端のアミノ酸配列

NBCe1-A/B/D/E が持つ C 末端と、NBCe1-C 特異的 C 末端（赤）を示した。

QQPFLS: basolateral targeting signal。

PQIRIE: CaNA 結合配列。ETTL: PDZ ドメイン結合配列。

ii CaNA 結合配列と脱リン酸化ターゲットについて

本研究において、CaNA 結合配列が NBCe1-C の特異的 C 末端に存在する PQIRIE 配列であることを明らかにした。CaNA 結合配列として知られているモチーフは、PxIxIT と LxVP が知られている^{52,53}。CaNA に結合する基質としてよく知られている NFAT と TRESK(TWIK-related spinal cord potassium channel)はその両方を持ち、二つの結合配列が CaNA の結合する位置と脱リン酸化部位の効率的な標的化を可能としている⁶⁸⁻⁷⁰。NBCe1-C においては、C 末端以外相同である NBCe1-B や、PQIRIE 配列を欠損させた Δ_{CN} NBCe1-C に CaNA α が結合しないことから、CaNA 結合配列は PxIxIT のみであると考えられる。これはすでに calcineurin と結合することが知られている NBCn1 や SERT (serotonin transporter) と同様である^{49,71}。このように、calcineurin が結合する輸送体が幾つか報告されているが、それらが calcineurin の脱リン酸化基質になるのか否かについて、その脱リン酸化部位まで決定するレベルで言及されている報告はない。今回の NBCe1-C についても、CaNA によって脱リン酸化レベルが減少することを明らかにしたものの、脱リン酸化部位の決定までには至っていない。CaNA の立体構造解析から、活性中心と PxIxIT 結合部位まではおよそ 32A 離れているとされており^{72,73}、NBCe1-C の PQIRIE モチーフからアミノ酸の数として少なくとも 10 残基は離れた S/T が、脱リン酸化部位になると考えられる。また、最近の研究から、もう一つの CaNA 結合配列である LxVP 配列は、従来考えられていたより認識が緩く、 π - Φ -L-x-[VPL]-[PK]という配列であれば、CaNA 結合配列と機能しうることが示唆されており⁷⁴、これに適合する配列が NBCe1 の N-末領域に存在する。こうしたことを考慮すると、CaNA による NBCe1-C の脱リン酸化部位は、N-末の細胞質領域である可能性もある。2-6,(i)において、CaNA が NBCe1-C と IRBIT の結合に影響を与えないことが示唆されたが、IRBIT 自身のリン酸

化状態の検討は行っていない。CaNA が NBCe1-C の N 末端に結合している IRBIT を基質としている可能性は否定できないため、今後 IRBIT のリン酸化状態が CaNA の共発現によって変化しうるかどうかが検討する必要がある。

また、-ETTL 配列中の T 残基も候補部位であり、PDZ ドメイン結合配列中、及びその近傍のリン酸化によって PDZ ドメイン蛋白質との結合が制御されることが示されていることから⁷⁵、CaNA α による-ETTL の脱リン酸化によって、NBCe1-C と PDZ ドメインタンパク質との結合が調節される可能性は、今後検討する価値がある。今後、脱リン酸化部位を特定することで、NBCe1-C の細胞表面促進メカニズムを解明していきたいと考えている。

iii CA-CaNA α 共発現による、CaNA 結合部位非特異的な細胞表面発現の増加

本研究において、CA-CaNA α 共発現時に NBCe1-C の細胞表面発現が顕著に促進されることを示した。しかし、NBCe1-C には劣るものの、NBCe1-B、 Δ_{CN} NBCe1-C とともに CA-CaNA α 共発現時に細胞表面発現が増加した。この原因として考えられるのが、calcineurin によるエンドサイトーシスの阻害である。Calcineurin は、ニューロンにおいてシナプス小胞のエンドサイトーシスに関わることが報告されており^{76,77}、また、calcineurin が直接タンパク質相互作用を及ぼさないとしても、エンドサイトーシスに関わる経路や遺伝子発現を変化させることが知られている⁷⁸⁻⁸⁰。

さらに、calcineurin が lysosomal biogenesis responses に重要な制御因子である TFEB/TFE3 を活性化させることが近年報告され^{81,82}、小胞輸送やタンパク質分解等の細胞機能に影響を及ぼしていることが明らかとなっている。CA-CaNA α の過剰発現による NBCe1-B と Δ_{CN} NBCe1-C の細胞表面発現増加は、こうした calcineurin の細胞内膜輸送機構への”general”な影響であると思われる。

iv CaNA α 、 β ノックダウン法による NBCe1-C 細胞表面発現量の検討

HeLa 細胞には、内在的に calcineurin が発現しているため、常に calcineurin の影響を少なからず受けてしまう。タクロリムスは、FKBP と複合体を形成することで calcineurin を阻害することから、この阻害剤の効果は FKBP を介したものである可能性がある。そこで、siRNA を用いて、CaNA α 、CaNA β それぞれ、もしくは両方を同時にノックダウンさせ NBCe1-C の細胞表面発現量の変化を検討した。しかし、CaNA α 、 β をノックダウンすると、NBCe1 のタイプ関係なしに過剰発現効率が上昇してしまうこと、さらに、細胞増殖能が亢進するといった副次的作用が見られた。そのため、細胞表面発現量の変化を評価できないと判断し、検討を断念した。

v 細胞表面発現量増加のメカニズム

本研究において、CaNAによりNBCe1-Cの細胞表面発現が促進されることが明らかとなった。細胞表面発現量が増加する要因には、1) ゴルジ体から細胞表面への輸送が促進される、2) 細胞表面上において安定化する、3) 膜タンパク質のリサイクリングが促進される、等が考えられる。1) に関して、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ の糖鎖修飾が未熟であることから、 $\Delta_{CN}NBCe1-C$ の細胞表面発現量が低下している要因である可能性があるが、CaNA共発現によりNBCe1-Cの糖鎖修飾に変化が見られないことから、NBCe1-Cの細胞表面発現が促進される要因であるとは考えにくい。2) に関して、安定化に寄与する分子として足場タンパク質があげられる。実際、NBCe1-CのC末端には足場タンパク質が持つPDZドメインに結合する配列が存在しているため、NBCe1-C-足場タンパク質-CaNAの相互作用が要因となる可能性が十分に考えられる。1)、2)、3)に共通して、CaNAが膜タンパク質の細胞表面発現に関わる報告がほとんどないため、NBCe1-Cの細胞表面発現促進のメカニズムを明らかにすることで、CaNAの新たな役割を発見できると考えている。

vi アストロサイトにおけるNBCe1-Cの役割

NBCe1-Cはアストロサイト特異的に発現し、ヒトのNBCe1変異家系において神経学的異常が報告されていることから、中枢神経系において何らかの役割を担っていると考えられる。NBCe1-KOマウスは、代謝性アシドーシスにより短命であるため³⁰、神経学的異常を評価した報告はない。現在、NBCe1-KOマウスの脳スライスを用いた系により、NBCe1-Cの機能として細胞内アルカリ化に重要であることが報告されており¹²、加えて神経伝達に応答したNBCe1によるアストロサイト内アルカリ化によってアストロサイトの解糖系が亢進することも示されている⁸³(Fig.22)。

神経伝達に伴ってNBCe1の活性が調節されるメカニズムとして、一つは、発現量増加によるものがすでに報告されている⁸⁴。これに対して、今回の発見は、神経活動によってアストロサイト内 Ca^{2+} が上昇し、CaNAが活性化、NBCe1-Cの脱リン酸化によって細胞表面発現が亢進することで、 HCO_3^- 輸送活性を増加させるという非常に速い反応を可能にするメカニズムの存在を示唆しており、このように、シナプスにおけるNBCe1の神経活動に伴った活性調節が、2つの時間軸の異なるメカニズムで行われ、シナプスでのpH環境維持に関与しているのではないかと考えている。

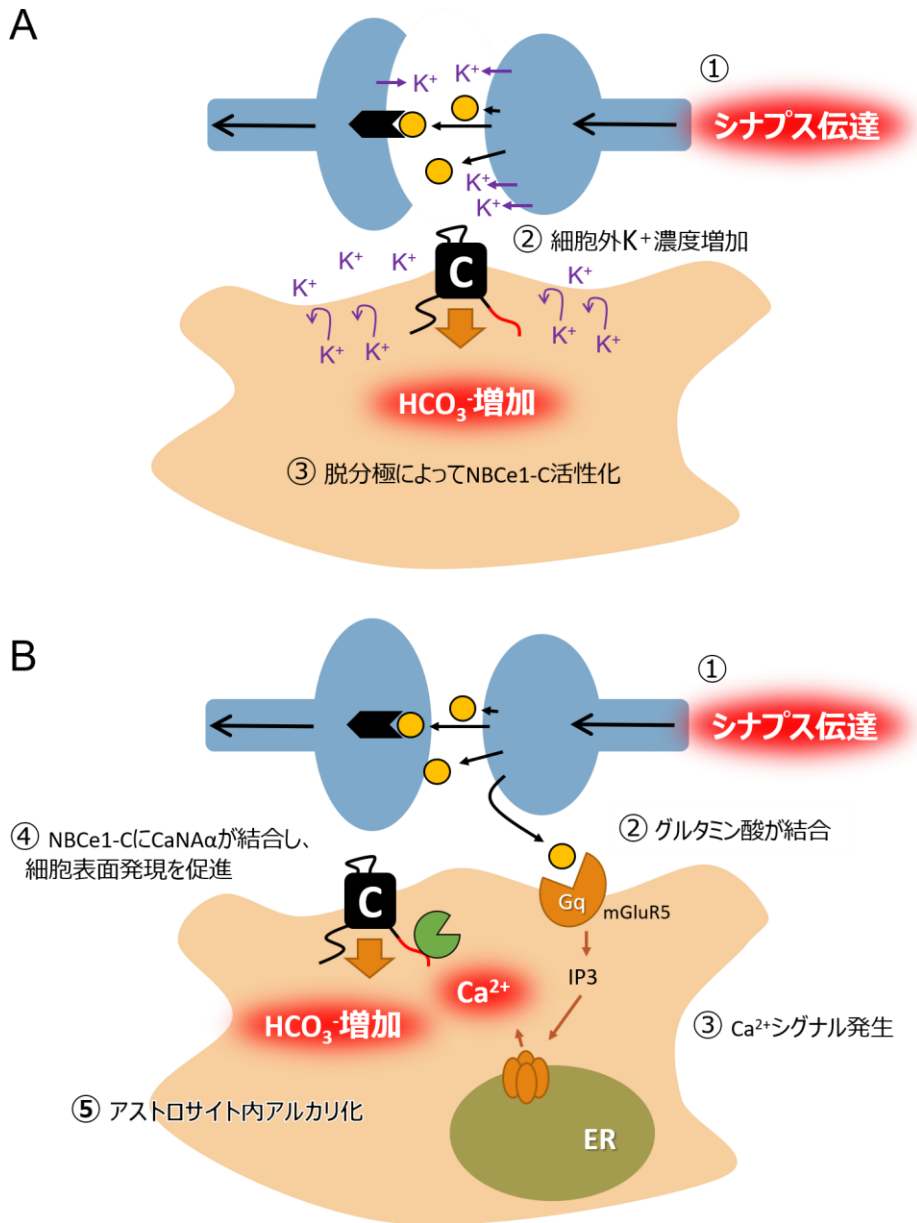


Figure 22 アストロサイト突起における NBCe1 の役割とその仮説

(A) 現在示唆されている、神経伝達に連動した NBCe1 による DIA の模式図。

①シナプス伝達により細胞外（シナプス間隙） K^+ が上昇。②NBCe1 が活性化し、DIA が発生。③アストロサイト内の pH が上昇する。

(B) (A)で示したアストロサイトにおける NBCe1-C の役割に、本研究にて示唆された CaNA による NBCe1-C の制御を加えた仮説。

①シナプス伝達により、②グルタミン酸などの神経伝達物質が放出され、③アストロサイト突起膜上の受容体に結合し、細胞内 Ca^{2+} シグナルが発生。④CaNA により NBCe1-C の細胞表面発現量増加。⑤NBCe1-C によりアストロサイト内がアルカリ化する。

第4節 結論

本研究において私は、NBCe1-C がアストロサイト特異的に発現し、シナプス間隙やアストロサイト内の pH 環境を制御するメカニズムを解明すべく、その糸口として NBCe1-C が他のバリエーションにはない特異的な C 末端を持つことに着目した。結果、NBCe1-C 特異的な C 末端に calcineurin が結合し、NBCe1-C の細胞表面発現量を制御することが明らかとなった(Fig.23)。シナプス間隙に接するアストロサイト突起は、シナプスが多様性を持つようにアストロサイト突起の環境も多様になる。私は、アストロサイト突起に発現する NBCe1-C が、calcineurin を介してアストロサイト内 Ca^{2+} シグナルの強弱を感じ取り、 Ca^{2+} シグナルと pH 環境調節機能を協調させていると考えている。加えて、アストロサイトにおける NBCe1-C の存在は、シナプスの環境を良好に保つために必要であり、NBCe1 に関連する神経・精神症状は正常なシナプス伝達の減少によって生じる神経ネットワークの不調によるものであると考えている。

今回の実験は、すべて HeLa 細胞への発現系を用いた *in vitro* での検討に限られている。PQIRIE 配列、ETTL 配列ともに、進化的に強く保存されている配列であるため、アストロサイトにおいて二つの配列を持つ NBCe1-C の存在は、生体内で重要な意義を持っている可能性がある。今後は、さらに *in vivo* に近い実験系を用い、実際、生体内で Ca^{2+} シグナル、calcineurin による NBCe1-C の細胞表面発現の促進が成されているか実証していく必要が求められる。そして、NBCe1-C の pH 環境調節機能のメカニズム解明を通して、精神疾患や神経変性疾患の病態解明や治療へとつなげていきたいと考えている。

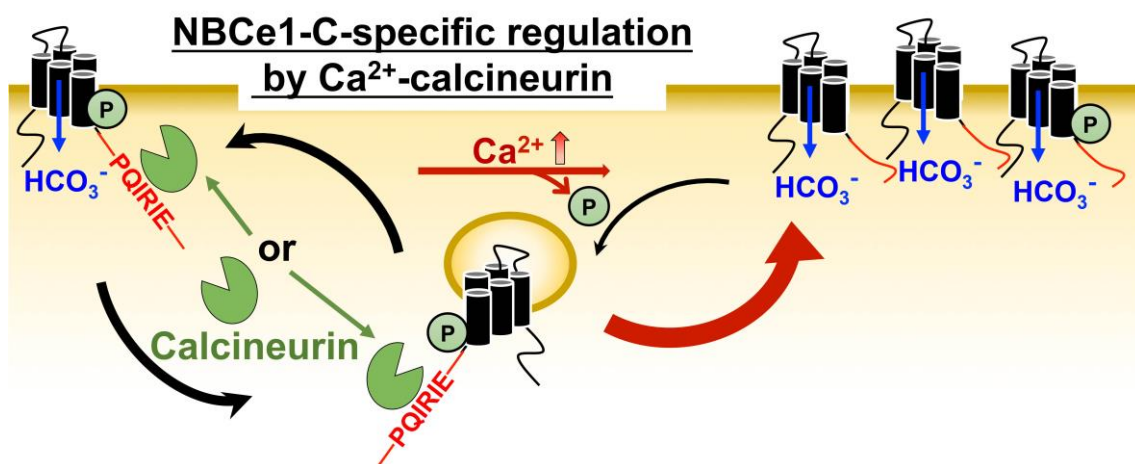


Figure 23 Ca^{2+} /calcineurin による NBCe1-C 特異的な細胞表面発現の調節

CaNA(calcineurin)が、細胞表面上もしくは輸送小胞上の NBCe1-C 特異的な C 末端に結合し、 Ca^{2+} 濃度上昇に伴い、CaNA が活性化し NBCe1-C を脱リン酸化することで、細胞表面発現を促進する。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 薬物治療学研究室 水谷顕洋 教授に深く心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

研究の基礎技術や基礎知識に関して多くの御助言を頂きました薬物治療学研究室 濱田浩一 講師、松田真悟 助教に深く感謝いたします。

本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬理学研究室 渡邊泰男 教授に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 衛生化学研究室 石井功 教授 および 昭和薬科大学 生化学研究室 伊東進 教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究において公私にわたってご協力して頂きました、薬物治療学研究室 小島拓之 特任助教、大学院生 伊藤諒氏、遠山卓氏、卒業生・学部生 柏木舞氏、佐藤沙弥香氏、森滉貴氏、白鳥瞳氏、竹中遥菜氏、喜多紗矢佳氏、小川和輝氏、堀内彩香氏、太田早紀氏、太田貴裕氏、岡山ゆうな氏に心より感謝致します。

最後に、長年にわたる研究室生活を支えてくださった家族に心より感謝致します。

参考文献

1. Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orlowski, J., Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (1), 50-61.
2. Hamm, L. L.; Nakhoul, N.; Hering-Smith, K. S., Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* **2015**, *10* (12), 2232-42.
3. Tombaugh, G. C.; Somjen, G. G., Effects of extracellular pH on voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol* **1996**, *493* (Pt 3), 719-32.
4. Fedorovich, S. V.; Kaler, G. V.; Konev, S. V., Effect of low pH on glutamate uptake and release in isolated presynaptic endings from rat brain. *Neurochem Res* **2003**, *28* (5), 715-21.
5. Tang, C. M.; Dichter, M.; Morad, M., Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87* (16), 6445-9.
6. Traynelis, S. F.; Cull-Candy, S. G., Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* **1990**, *345* (6273), 347-50.
7. Sardet, C.; Franchi, A.; Pouyssegur, J., Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* **1989**, *56* (2), 271-80.
8. Jacobs, S.; Ruusuvuori, E.; Sipilä, S. T.; Haapanen, A.; Damkier, H. H.; Kurth, I.; Hentschke, M.; Schweizer, M.; Rudhard, Y.; Laatikainen, L. M.; Tyynelä, J.; Praetorius, J.; Voipio, J.; Hübner, C. A., Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (1), 311-6.
9. Schwiening, C. J.; Boron, W. F., Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *J Physiol* **1994**, *475* (1), 59-67.
10. Rickmann, M.; Orlowski, B.; Heupel, K.; Roussa, E., Distinct expression and subcellular localization patterns of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (SLC 4A4) variants NBCe1-A and NBCe1-B in mouse brain. *Neuroscience* **2007**, *146* (3), 1220-31.
11. Svichar, N.; Esquenazi, S.; Chen, H. Y.; Chesler, M., Preemptive regulation of intracellular pH in hippocampal neurons by a dual mechanism of depolarization-induced alkalization. *J Neurosci* **2011**, *31* (19), 6997-7004.
12. Theparambil, S. M.; Ruminot, I.; Schneider, H. P.; Shull, G. E.; Deitmer, J. W., The electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in cortical astrocytes. *J Neurosci* **2014**, *34* (4), 1148-57.
13. Hagihara, H.; Catts, V. S.; Katayama, Y.; Shoji, H.; Takagi, T.; Huang, F. L.; Nakao, A.; Mori, Y.; Huang, K. P.; Ishii, S.; Graef, I. A.; Nakayama, K. I.; Shannon Weickert, C.; Miyakawa, T., Decreased Brain pH as a Shared Endophenotype of Psychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology* **2018**, *43* (3), 459-468.
14. Niculescu, A. B.; Levey, D. F.; Phalen, P. L.; Le-Niculescu, H.; Dainton, H. D.; Jain, N.; Belanger, E.; James, A.; George, S.; Weber, H.; Graham, D. L.; Schweitzer,

R.; Ladd, T. B.; Learman, R.; Niculescu, E. M.; Vanipenta, N. P.; Khan, F. N.; Mullen, J.; Shankar, G.; Cook, S.; Humbert, C.; Ballew, A.; Yard, M.; Gelbart, T.; Shekhar, A.; Schork, N. J.; Kurian, S. M.; Sandusky, G. E.; Salomon, D. R., Understanding and predicting suicidality using a combined genomic and clinical risk assessment approach. *Mol Psychiatry* **2015**, *20* (11), 1266-85.

15. Igarashi, T.; Inatomi, J.; Sekine, T.; Seki, G.; Shimadzu, M.; Tozawa, F.; Takeshima, Y.; Takumi, T.; Takahashi, T.; Yoshikawa, N.; Nakamura, H.; Endou, H., Novel nonsense mutation in the Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J Am Soc Nephrol* **2001**, *12* (4), 713-8.

16. Lo, Y. F.; Yang, S. S.; Seki, G.; Yamada, H.; Horita, S.; Yamazaki, O.; Fujita, T.; Usui, T.; Tsai, J. D.; Yu, I. S.; Lin, S. W.; Lin, S. H., Severe metabolic acidosis causes early lethality in NBC1 W516X knock-in mice as a model of human isolated proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int* **2011**, *79* (7), 730-41.

17. Inatomi, J.; Horita, S.; Braverman, N.; Sekine, T.; Yamada, H.; Suzuki, Y.; Kawahara, K.; Moriyama, N.; Kudo, A.; Kawakami, H.; Shimadzu, M.; Endou, H.; Fujita, T.; Seki, G.; Igarashi, T., Mutational and functional analysis of SLC4A4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch* **2004**, *448* (4), 438-44.

18. Suzuki, M.; Van Paesschen, W.; Stalmans, I.; Horita, S.; Yamada, H.; Bergmans, B. A.; Legius, E.; Riant, F.; De Jonghe, P.; Li, Y.; Sekine, T.; Igarashi, T.; Fujimoto, I.; Mikoshiba, K.; Shimadzu, M.; Shiohara, M.; Braverman, N.; Al-Gazali, L.; Fujita, T.; Seki, G., Defective membrane expression of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (36), 15963-8.

19. Kari, J. A.; El Desoky, S. M.; Singh, A. K.; Gari, M. A.; Kleta, R.; Bockenhauer, D., The case | Renal tubular acidosis and eye findings. *Kidney Int* **2014**, *86* (1), 217-8.

20. Igarashi, T.; Inatomi, J.; Sekine, T.; Cha, S. H.; Kanai, Y.; Kunimi, M.; Tsukamoto, K.; Satoh, H.; Shimadzu, M.; Tozawa, F.; Mori, T.; Shiobara, M.; Seki, G.; Endou, H., Mutations in SLC4A4 cause permanent isolated proximal renal tubular acidosis with ocular abnormalities. *Nat Genet* **1999**, *23* (3), 264-6.

21. Igarashi, T.; Sekine, T.; Inatomi, J.; Seki, G., Unraveling the molecular pathogenesis of isolated proximal renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13* (8), 2171-7.

22. Dinour, D.; Chang, M. H.; Satoh, J.; Smith, B. L.; Angle, N.; Knecht, A.; Serban, I.; Holtzman, E. J.; Romero, M. F., A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J Biol Chem* **2004**, *279* (50), 52238-46.

23. Horita, S.; Yamada, H.; Inatomi, J.; Moriyama, N.; Sekine, T.; Igarashi, T.; Endo, Y.; Dasouki, M.; Ekim, M.; Al-Gazali, L.; Shimadzu, M.; Seki, G.; Fujita, T., Functional analysis of NBC1 mutants associated with proximal renal tubular acidosis and ocular

abnormalities. *J Am Soc Nephrol* **2005**, *16* (8), 2270-8.

24. Suzuki, M.; Vaisbich, M. H.; Yamada, H.; Horita, S.; Li, Y.; Sekine, T.; Moriyama, N.; Igarashi, T.; Endo, Y.; Cardoso, T. P.; de Sá, L. C.; Koch, V. H.; Seki, G.; Fujita, T., Functional analysis of a novel missense NBC1 mutation and of other mutations causing proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch* **2008**, *455* (4), 583-93.

25. Shiohara, M.; Igarashi, T.; Mori, T.; Komiyama, A., Genetic and long-term data on a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis. *Eur J Pediatr* **2000**, *159* (12), 892-4.

26. Demirci, F. Y.; Chang, M. H.; Mah, T. S.; Romero, M. F.; Gorin, M. B., Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (SLC4A4) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). *Mol Vis* **2006**, *12*, 324-30.

27. Myers, E. J.; Yuan, L.; Felmler, M. A.; Lin, Y. Y.; Jiang, Y.; Pei, Y.; Wang, O.; Li, M.; Xing, X. P.; Marshall, A.; Xia, W. B.; Parker, M. D., A novel mutant Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 in a case of compound-heterozygous inheritance of proximal renal tubular acidosis. *J Physiol* **2016**, *594* (21), 6267-6286.

28. Horita, S.; Simsek, E.; Simsek, T.; Yildirim, N.; Ishiura, H.; Nakamura, M.; Satoh, N.; Suzuki, A.; Tsukada, H.; Mizuno, T.; Seki, G.; Tsuji, S.; Nangaku, M., SLC4A4 compound heterozygous mutations in exon-intron boundary regions presenting with severe proximal renal tubular acidosis and extrarenal symptoms coexisting with Turner's syndrome: a case report. *BMC Med Genet* **2018**, *19* (1), 103.

29. Patel, N.; Khan, A. O.; Al-Saif, M.; Moghrabi, W. N.; AlMaarik, B. M.; Ibrahim, N.; Abdulwahab, F.; Hashem, M.; Alshidi, T.; Alobeid, E.; Alomar, R. A.; Al-Harbi, S.; Abouelhoda, M.; Khabar, K. S. A.; Alkuraya, F. S., A novel mechanism for variable phenotypic expressivity in Mendelian diseases uncovered by an AU-rich element (ARE)-creating mutation. *Genome Biol* **2017**, *18* (1), 144.

30. Gawenis, L. R.; Bradford, E. M.; Prasad, V.; Lorenz, J. N.; Simpson, J. E.; Clarke, L. L.; Woo, A. L.; Grisham, C.; Sanford, L. P.; Doetschman, T.; Miller, M. L.; Shull, G. E., Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* **2007**, *282* (12), 9042-52.

31. Kurtz, I.; Zhu, Q., Structure, function, and regulation of the SLC4 NBCe1 transporter and its role in causing proximal renal tubular acidosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2013**, *22* (5), 572-83.

32. Parker, M. D.; Boron, W. F., The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters. *Physiol Rev* **2013**, *93* (2), 803-959.

33. Muallem, S.; Loessberg, P. A., Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acinar cells. I. Characterization of H⁺ and HCO₃⁻ transporters. *J Biol Chem* **1990**, *265* (22), 12806-12.

34. Shan, J.; Liao, J.; Huang, J.; Robert, R.; Palmer, M. L.; Fahrenkrug, S. C.;

- O'Grady, S. M.; Hanrahan, J. W., Bicarbonate-dependent chloride transport drives fluid secretion by the human airway epithelial cell line Calu-3. *J Physiol* **2012**, *590* (21), 5273-97.
35. Majumdar, D.; Maunsbach, A. B.; Shacka, J. J.; Williams, J. B.; Berger, U. V.; Schultz, K. P.; Harkins, L. E.; Boron, W. F.; Roth, K. A.; Bevensee, M. O., Localization of electrogenic Na/bicarbonate cotransporter NBCe1 variants in rat brain. *Neuroscience* **2008**, *155* (3), 818-32.
36. Zhang, Y.; Chen, K.; Sloan, S. A.; Bennett, M. L.; Scholze, A. R.; O'Keefe, S.; Phatnani, H. P.; Guarnieri, P.; Caneda, C.; Ruderisch, N.; Deng, S.; Liddelow, S. A.; Zhang, C.; Daneman, R.; Maniatis, T.; Barres, B. A.; Wu, J. Q., An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* **2014**, *34* (36), 11929-47.
37. Liu, Y.; Xu, J. Y.; Wang, D. K.; Wang, L.; Chen, L. M., Cloning and identification of two novel NBCe1 splice variants from mouse reproductive tract tissues: a comparative study of NBCe1 genes. *Genomics* **2011**, *98* (2), 112-9.
38. McAlear, S. D.; Liu, X.; Williams, J. B.; McNicholas-Bevensee, C. M.; Bevensee, M. O., Electrogenic Na/HCO₃ cotransporter (NBCe1) variants expressed in *Xenopus* oocytes: functional comparison and roles of the amino and carboxy termini. *J Gen Physiol* **2006**, *127* (6), 639-58.
39. Shirakabe, K.; Priori, G.; Yamada, H.; Ando, H.; Horita, S.; Fujita, T.; Fujimoto, I.; Mizutani, A.; Seki, G.; Mikoshiba, K., IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (25), 9542-7.
40. Lee, S. K.; Boron, W. F.; Parker, M. D., Relief of autoinhibition of the electrogenic Na-HCO₃ cotransporter NBCe1-B: role of IRBIT vs. amino-terminal truncation. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302* (3), C518-26.
41. Ando, H.; Kawai, K.; Mikoshiba, K., IRBIT: a regulator of ion channels and ion transporters. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1843* (10), 2195-204.
42. Bevensee, M. O.; Schmitt, B. M.; Choi, I.; Romero, M. F.; Boron, W. F., An electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol* **2000**, *278* (6), C1200-11.
43. Mertz, P.; Yu, L.; Sikkink, R.; Rusnak, F., Kinetic and spectroscopic analyses of mutants of a conserved histidine in the metallophosphatases calcineurin and lambda protein phosphatase. *J Biol Chem* **1997**, *272* (34), 21296-302.
44. Ando, H.; Mizutani, A.; Matsu-ura, T.; Mikoshiba, K., IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J Biol Chem* **2003**, *278* (12), 10602-12.
45. Izuchi, Y.; Takashima, T.; Hatano, N., Rapid and Accurate Identification of Animal Species in Natural Leather Goods by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass Spectrom*

(Tokyo) **2016**, 5 (1), A0046.

46. Ando, H.; Mizutani, A.; Kiefer, H.; Tsuzurugi, D.; Michikawa, T.; Mikoshiba, K., IRBIT suppresses IP3 receptor activity by competing with IP3 for the common binding site on the IP3 receptor. *Mol Cell* **2006**, 22 (6), 795-806.
47. Kanda, Y., Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **2013**, 48 (3), 452-8.
48. Liu, Y.; Yang, J.; Chen, L. M., Structure and Function of SLC4 Family HCO₃⁻ Transporters. *Front Physiol* **2015**, 6, 355.
49. Danielsen, A. A.; Parker, M. D.; Lee, S.; Boron, W. F.; Aalkjaer, C.; Boedtkjer, E., Splice cassette II of Na⁺,HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 (slc4a7) interacts with calcineurin A: implications for transporter activity and intracellular pH control during rat artery contractions. *J Biol Chem* **2013**, 288 (12), 8146-55.
50. Hisamitsu, T.; Nakamura, T. Y.; Wakabayashi, S., Na⁺/H⁺ exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biol* **2012**, 32 (16), 3265-80.
51. Kuno, T.; Mukai, H.; Ito, A.; Chang, C. D.; Kishima, K.; Saito, N.; Tanaka, C., Distinct cellular expression of calcineurin A alpha and A beta in rat brain. *J Neurochem* **1992**, 58 (5), 1643-51.
52. Li, H.; Rao, A.; Hogan, P. G., Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* **2011**, 21 (2), 91-103.
53. Roy, J.; Cyert, M. S., Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal* **2009**, 2 (100), re9.
54. Nygren, P. J.; Scott, J. D., Regulation of the phosphatase PP2B by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* **2016**, 44 (5), 1313-1319.
55. Aramburu, J.; Garcia-Cózar, F.; Raghavan, A.; Okamura, H.; Rao, A.; Hogan, P. G., Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* **1998**, 1 (5), 627-37.
56. Hong, J. H.; Yang, D.; Shcheynikov, N.; Ohana, E.; Shin, D. M.; Muallem, S., Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, 110 (10), 4105-10.
57. Schmitt, B. M.; Biemesderfer, D.; Romero, M. F.; Boulpaep, E. L.; Boron, W. F., Immunolocalization of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in mammalian and amphibian kidney. *Am J Physiol* **1999**, 276 (1 Pt 2), F27-38.
58. Thevenod, F.; Roussa, E.; Schmitt, B. M.; Romero, M. F., Cloning and immunolocalization of a rat pancreatic Na⁺ bicarbonate cotransporter. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, 264 (1), 291-8.
59. Yang, D.; Shcheynikov, N.; Zeng, W.; Ohana, E.; So, I.; Ando, H.; Mizutani,

- A.; Mikoshiba, K.; Muallem, S., IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃⁻ secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest* **2009**, *119* (1), 193-202.
60. Romero, M. F.; Chen, A. P.; Parker, M. D.; Boron, W. F., The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol Aspects Med* **2013**, *34* (2-3), 159-82.
61. Li, H. C.; Worrell, R. T.; Matthews, J. B.; Husseinzadeh, H.; Neumeier, L.; Petrovic, S.; Conforti, L.; Soleimani, M., Identification of a carboxyl-terminal motif essential for the targeting of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBC1 to the basolateral membrane. *J Biol Chem* **2004**, *279* (41), 43190-7.
62. Azimov, R.; Abuladze, N.; Sassani, P.; Newman, D.; Kao, L.; Liu, W.; Orozco, N.; Ruchala, P.; Pushkin, A.; Kurtz, I., G418-mediated ribosomal read-through of a nonsense mutation causing autosomal recessive proximal renal tubular acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **2008**, *295* (3), F633-41.
63. Bonifacino, J. S., Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol* **2014**, *204* (1), 7-17.
64. Lasiecka, Z. M.; Winckler, B., Mechanisms of polarized membrane trafficking in neurons -- focusing in on endosomes. *Mol Cell Neurosci* **2011**, *48* (4), 278-87.
65. Bentley, M.; Banker, G., The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* **2016**, *17* (10), 611-22.
66. Feng, W.; Zhang, M., Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* **2009**, *10* (2), 87-99.
67. Zeke, A.; Lukacs, M.; Lim, W. A.; Remenyi, A., Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol* **2009**, *19* (8), 364-74.
68. Park, S.; Uesugi, M.; Verdine, G. L., A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97* (13), 7130-5.
69. Czirjak, G.; Enyedi, P., The LQLP calcineurin docking site is a major determinant of the calcium-dependent activation of human TRESK background K⁺ channel. *J Biol Chem* **2014**, *289* (43), 29506-18.
70. Gal, M.; Li, S.; Luna, R. E.; Takeuchi, K.; Wagner, G., The LxVP and PxIxIT NFAT motifs bind jointly to overlapping epitopes on calcineurin's catalytic domain distant to the regulatory domain. *Structure* **2014**, *22* (7), 1016-27.
71. Seimandi, M.; Seyer, P.; Park, C. S.; Vandermoere, F.; Chanrion, B.; Bockaert, J.; Mansuy, I. M.; Marin, P., Calcineurin interacts with the serotonin transporter C-terminus to modulate its plasma membrane expression and serotonin uptake. *J Neurosci* **2013**, *33* (41), 16189-99.
72. Li, H.; Rao, A.; Hogan, P. G., Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J Mol Biol* **2004**, *342* (5), 1659-74.
73. Grigoriu, S.; Bond, R.; Cossio, P.; Chen, J. A.; Ly, N.; Hummer, G.; Page,

- R.; Cyert, M. S.; Peti, W., The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol* **2013**, *11* (2), e1001492.
74. Sheftic, S. R.; Page, R.; Peti, W., Investigating the human Calcineurin Interaction Network using the $\pi\phi$ LxVP SLiM. *Sci Rep* **2016**, *6*, 38920.
75. Sundell, G. N.; Arnold, R.; Ali, M.; Naksukpaiboon, P.; Orts, J.; Guntert, P.; Chi, C. N.; Ivarsson, Y., Proteome-wide analysis of phospho-regulated PDZ domain interactions. *Mol Syst Biol* **2018**, *14* (8), e8129.
76. Cousin, M. A.; Robinson, P. J., The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci* **2001**, *24* (11), 659-65.
77. Sun, T.; Wu, X. S.; Xu, J.; McNeil, B. D.; Pang, Z. P.; Yang, W.; Bai, L.; Qadri, S.; Molkenkin, J. D.; Yue, D. T.; Wu, L. G., The role of calcium/calmodulin-activated calcineurin in rapid and slow endocytosis at central synapses. *J Neurosci* **2010**, *30* (35), 11838-47.
78. Gooch, J. L.; Guler, R. L.; Barnes, J. L.; Toro, J. J., Loss of calcineurin Aalpha results in altered trafficking of AQP2 and in nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Sci* **2006**, *119* (Pt 12), 2468-76.
79. Bhattacharyya, S.; Biou, V.; Xu, W.; Schluter, O.; Malenka, R. C., A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci* **2009**, *12* (2), 172-81.
80. Fonseca, A. C. R. G.; Carvalho, E.; Eriksson, J. W.; Pereira, M. J., Calcineurin is an important factor involved in glucose uptake in human adipocytes. *Mol Cell Biochem* **2018**, *445* (1-2), 157-168.
81. Medina, D. L.; Di Paola, S.; Peluso, I.; Armani, A.; De Stefani, D.; Venditti, R.; Montefusco, S.; Scotto-Rosato, A.; Prezioso, C.; Forrester, A.; Settembre, C.; Wang, W.; Gao, Q.; Xu, H.; Sandri, M.; Rizzuto, R.; De Matteis, M. A.; Ballabio, A., Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* **2015**, *17* (3), 288-99.
82. Raben, N.; Puertollano, R., TFEB and TFE3: Linking Lysosomes to Cellular Adaptation to Stress. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2016**, *32*, 255-278.
83. Ruminot, I.; Gutierrez, R.; Pena-Munzenmayer, G.; Anazco, C.; Sotelo-Hitschfeld, T.; Lerchundi, R.; Niemeyer, M. I.; Shull, G. E.; Barros, L. F., NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K^+ . *J Neurosci* **2011**, *31* (40), 14264-71.
84. Kang, T. C.; An, S. J.; Park, S. K.; Hwang, I. K.; Suh, J. G.; Oh, Y. S.; Bae, J. C.; Won, M. H., Alterations in Na^+/H^+ exchanger and Na^+/HCO_3^- cotransporter immunoreactivities within the gerbil hippocampus following seizure. *Brain Res Mol Brain Res* **2002**, *109* (1-2), 226-32.

本論文の誌上発表

Naomi Hasegawa, Naoya Hatano, Suguru Tohyama, Sayaka Kita, Katsuhiko Mikoshiba, and Akihiro Mizutani. **Calcineurin binds to a unique C-terminal region of brain isoform of NBCe1 and enhances its surface expression.** *BPB reports* 2(1):7-18 (2019)