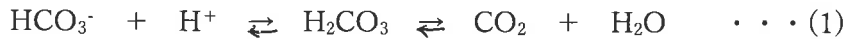


Calcineurin による脳型 NBCe1 特異的な細胞膜発現調節機構
—脳型 NBCe1 の中枢神経系における機能解明に向けて—

薬物治療学研究室 長谷川 尚美

我々の細胞内液は pH7.0 付近、細胞外液は pH7.4 付近にそれぞれ保たれている。この体液 pH 恒常性維持の中心にあるのが HCO₃⁻緩衝系(式 1)であり、起電性の Na⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A4 遺伝子産物:NBCe1)は、HCO₃⁻輸送機能を介して、pH 恒常性維持の一端を担っている。



脳内においても pH 環境は重要であり、昨今、精神疾患との関連性や、SLC4A4 遺伝子変異家系における精神遅滞、偏頭痛の発症、更には、自殺念慮が強い人での SLC4A4 遺伝子の発現量増加などが報告されており、NBCe1 が中枢神経系の pH 恒常性維持を介して健常な脳機能発揮に関与していることが強く示唆される。

脳に特異的に発現している脳型 NBCe1 (以下 NBCe1-C) は、小脳バーグマングリアなどのアストロサイトに主に発現しており、樹状に広がったアストロサイトの突起末端に特に豊富に局在・発現している。アストロサイトの突起はシナプスを被覆し、神経伝達に際して変化するシナプスの環境維持に重要な役割を果たしていることが解っており、そこに発現する NBCe1-C はシナプス間隙の pH 恒常性維持を担うと考えられるが、その分子メカニズムは不明である。NBCe1-C は5つある splicing variants の中で唯一異なる C 末端を持つことから、我々はこの C 末端がアストロサイトにおいて特別な機能を持つと考えた。そこで NBCe1-C が持つ特異的な C 末端が、アストロサイトでの NBCe1-C 機能発現にどのような役割を果たしているのかを解明する糸口として、本研究では NBCe1-C の特異的な C 末端に結合する分子の探索を行った。

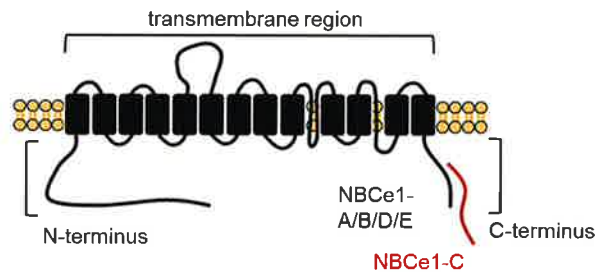
【結果】

1) NBCe1-C 特異的結合タンパク質の発見

NBCe1-C 特異的 C 末端に結合する分子を得るために、61 アミノ酸からなる NBCe1-C 特異的 C 末端 (Fig.1 赤字) 部分に GST をつけた fusion protein を作成し、マウス小脳のホモジネート液から pull down assay を行った。結果、Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素である calcineurin A サブユニット (CaNA) が結合分子として得られた。実際、培養細胞を用いた過剰発現系、及びマウス小脳で、NBCe1-C と CaNA α とが結合していることを免疫沈降法にて明らかにした。

2) CaNA α 結合領域の決定

CaNA α の結合が NBCe1-C 特異的 C 末端によるものかどうか確認するために、CaNA 結合配列である“PQIRIE” (Fig.1 水色) を欠損させた変異 NBCe1-C (Δ_{CN}NBCe1-C)



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

DVIPEKDKKKKEDEKDKKKKKKGLSDSDNDDSDCPYSEKVPISIKIPM
DIMEQQPFLSDSKPSDRERSPTFLERHTSC*

C-terminus of human NBCe1-C

DVIPEKDKKKKEDEKDKKKKKKGLSDSDNDDKEDHQHSLNATHHAD
KIPFLQSLGMPSPRPVVKVVPQIRIELEPEDNDYFWRSKGTETTL*

Fig.1 NBCe1の構造と、NBCe1-Cが持つ特異的C末端

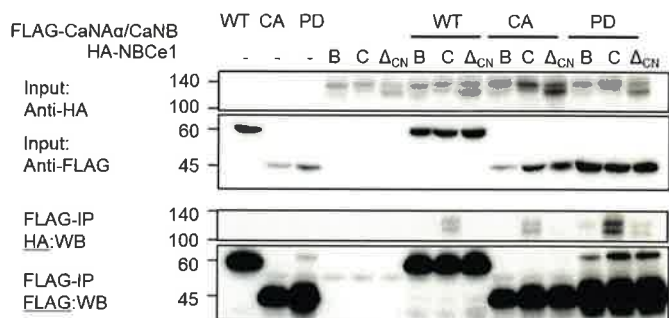


Fig.2 CaNAαとNBCe1-Cの結合部位を明らかにした

を作成した。過剰発現系を用いた免疫沈降法を行った結果、PQIRIEを有しないバリエーションであるNBCe1-Bと Δ_{CN} NBCe1-CにはCaNA α が結合しないことから、CaNA α がNBCe1-C特異的C末端に結合することを明らかにした(Fig.2)。加えて、恒常的活性化CaNA α (CA-CaNA α)、不活性型CaNA α (PD-CaNA α)どちらもNBCe1-Cが結合したことから、結合にはCaNA α の脱リン酸化活性が必要ないことが示された(Fig.2)。

3) NBCe1-C 細胞表面発現への影響

CaNA α がNBCe1-Cに与える影響を調べるために、HeLa細胞を用いてNBCe1-Cの細胞膜発現量の変化を観察した。CA-CaNA α を共発現させた際にNBCe1-Cの膜発現量が増加したのに対し、 Δ_{CN} NBCe1-CやNBCe1-Bでは膜発現量増加が見られなかった。また、PD-CaNA α にその作用は無かった(Fig.3)。さらに、NBCe1-C恒常的発現細胞を作製し、内在性のCaNAによる調節を検討したところ、Ca²⁺ ionophore処理によりNBCe1-Cの膜発現量は上昇し、CaNA阻害薬によってその上昇が抑えられた。これらの結果より、NBCe1-Cは、CaNAによる脱リン酸化によってその膜発現が促進されることが示唆された。

4) NBCe1-C トランスポーター活性への影響

CaNA α がNBCe1-CのHCO₃⁻輸送活性に影響を与えるかどうか調べたところ、CA-CaNA α 共発現時にHCO₃⁻輸送活性が上昇した。これはCaNA α によるNBCe1-Cの細胞表面発現促進によってHCO₃⁻輸送量が増加したためだと考えられる。

【考察】

NBCe1-Cは、その特異的C末端にCaNA α が結合し、脱リン酸化を受けることで細胞表面発現が制御されていることを明らかにした。NBCe1-Cがアストロサイト突起に特異的に発現していることを踏まえると、シナプス伝達に伴って生じたアストロサイト突起内のCa²⁺シグナルによるCaNA α の活性化を介して、NBCe1-Cの

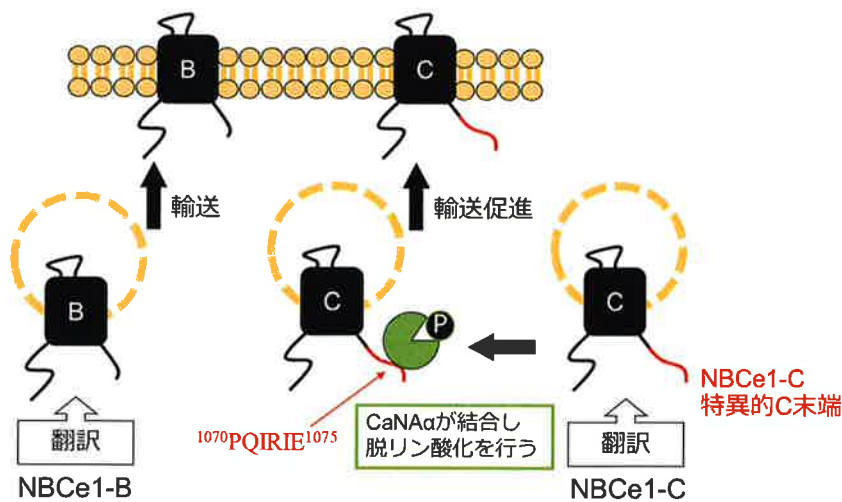


Fig.4 CaNA α によるNBCe1-C特異的な細胞表面発現の促進

HCO₃⁻輸送活性が制御されている可能性が示唆された。このことから、NBCe1-Cによるシナプス伝達と連動したアストロサイト内pH上昇メカニズムの存在を新たに提示することができた。

【本研究の誌上発表】

Calcineurin binds to a unique C-terminal region of brain isoform of NBCe1 and enhances its surface expression. Naomi Hasegawa, Naoya Hatano, Suguru Tohyama, Sayaka Kita, Ichiro Fujimoto, Katsuhiko Mikoshiba, and Akihiro Mizutani*