

足場タンパク質NHERF1に着目したトランスポーターの細胞膜局在における概日リズム制御機構の解析

鶴留, 優也

<https://hdl.handle.net/2324/2236171>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (臨床薬学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 鶴留 優也

論文題名 : 足場タンパク質 NHERF1 に着目したトランスポーターの細胞膜局在における概日リズム制御機構の解析

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

序論

様々な生体機能に認められる概日リズムは、時計遺伝子と呼ばれる転写因子群が約 24 時間周期で発現の増減を繰り返すことで引き起こされる。薬物の体内動態を制御する代謝酵素の活性やトランスポーターの機能にも概日リズムが認められ、薬物の消化管吸収、代謝、腎排泄などは投与時刻の違いによって変化する。当研究室ではこれまでの基礎研究において、時計遺伝子が Cytochrome P450 や ABC トランスポーターの「転写」に概日性の変動を引き起こすことで、これらタンパク質の発現が時刻依存的に変動し、薬物の体内動態に投薬時刻の違いによる差異を生じさせることを明らかにしてきた。

一方、トランスポーターなど細胞膜におけるタンパク質の発現には、それを下支えする「足場タンパク質」が重要な役目を担っている。我々はマウスの肝臓、腎臓、小腸などの各臓器において、足場タンパク質のひとつである Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1 (NHERF1)の発現が概日リズムを示すことを見出した。そこで本研究では、NHERF1 の発現リズムによって膜タンパク質の発現や機能にも概日性の変動が引き起こされるのではないかとの仮説を提唱し、以下の第 1 章から第 3 章における研究を行った。

第 1 章 足場タンパク質 NHERF1 の発現リズムに基づいたトランスポーターの細胞膜局在における概日変動メカニズムの解析

第 1 章では NHERF1 の発現リズムが及ぼすトランスポーターの細胞膜局在に与える影響について解析を行った。マウスの肝臓から得られた細胞膜画分を対象に免疫沈降および質量分析 (LC/MS)を組み合わせ解析したところ、NHERF1 と結合する複数の膜タンパク質が同定された。そのなかで脂肪酸輸送トランスポーターのひとつである Fatty acid transport protein 5 (FATP5/*Slc27a5*)は、マウス肝臓膜画分において NHERF1 の発現リズムに応じて時刻依存的な結合を繰り返していることが明らかになった。FATP5 は、mRNA および細胞全体でのタンパク発現量に概日リズムが認められなかったものの、細胞膜における局在には概日性の変動を示し、脂肪酸(オレイン酸)取込み活性にも膜局在のリズムと対応した時刻による差異が観察された。また、培養したマウスの肝由来細胞に NHERF1 を強制発現させたところ、細胞全体での FATP5 のタンパク質および *Slc27a5* mRNA の発現量には変化は認められなかったが、細胞膜への FATP5 の局在は有意に増加し、オレイン酸の取込み量も増大した。

第2章 NHERF1をコードする *Slc9a3r1* 遺伝子の発現リズム制御機構の解析

第2章では NHERF1 をコードする *Slc9a3r1* 遺伝子の発現リズムの制御メカニズムについて解析した。マウス *Slc9a3r1* 遺伝子の転写開始部位から上流 5,000bp と下流 5,000bp には主要な時計遺伝子の応答配列は認められなかったが、これら領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成して検討を行ったところ、*Slc9a3r1* 遺伝子の転写活性は時計遺伝子 PER2 によって抑制されることが明らかになった。PER2 は *Slc9a3r1* 遺伝子の転写促進因子である p65 と結合し、その転写活性化を周期的に抑制することで *Slc9a3r1* 遺伝子の発現に概日リズムを引き起こしていた。実際、*Per2* 機能不全マウス (*Per2^{m/m}* マウス) においては、*Slc9a3r1* mRNA および NHERF1 タンパク質の発現リズムが消失し、いずれの時刻においてもその発現量は野生型マウスに比べて高値を示していた。また、*Per2^{m/m}* マウスの肝臓において、FATP5 の細胞全体での発現量には野生型マウスと際は認められなかったものの、細胞膜への局在や脂肪酸の輸送活性はいずれの時刻においても *Per2^{m/m}* マウスで高値を示していた。

第3章 足場タンパク質 NHERF1 の発現リズムに基づいた肝細胞物質輸送シミュレーションモデルの構築

第3章では第1章、第2章の結果を踏まえて、足場タンパク質の発現リズムに基づいた肝細胞物質輸送モデルの構築を行った。構築したモデルのシミュレートにより、PER2 やその制御下にある各因子の mRNA やタンパク質の発現が概日リズムを示し、FATP5 の基質の肝臓への取込み活性に時刻依存的な差異を表現することができたが、NHERF1 が膜へ局在化するには、その移行を制御する補助的因子も必要であることが示唆された。そこで、NHERF1 のリン酸化に着目して検討を行ったところ、胆汁酸がその有力候補として同定された。胆汁酸(コール酸)は AKT シグナルの活性化を介して NHERF1 の膜への局在を促進し、NHERF1 による膜タンパクの足場形成には *Slc9a3r1* 遺伝子の転写レベルにおける概日リズムとともに、肝臓内の胆汁酸含量の概日変動も重要な役割を担っていることが明らかになった。

結論

本研究の結果から、足場タンパク質の発現リズムが細胞全体のトランスポーターの発現量には影響を及ぼすことなく、膜への局在に時刻依存的な変動を引き起こし、その機能や基質となる化合物(薬物)の体内動態にも影響を及ぼすことを明らかにした。このことは、「膜タンパク質の細胞膜への局在リズム」という新たな概日時計の制御メカニズムの概念を提唱するものであり、トランスポーターや受容体などを標的とした製剤技術の開発や薬物治療の最適化への応用のみならず、生体リズムの異常によって引き起こされる様々な疾患の成因解明にも繋がる可能性がある。以上、本研究で明らかにした概日時計のメカニズム概念が、疾患の治療や予防に役立つことを期待したい。