

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)

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

薬剤学分野 3PS15030E 鶴留 優也

【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。我々はこれまでの基礎研究において、時計遺伝子が Cytochrome P450 やトランスポーターの「転写」に概日性的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としてきた¹。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。その足場タンパク質の中でも Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1 (NHERF1/*Slc9a3r1*)は多くの薬物輸送トランスポーターと結合することが知られている。近年、NHERF1 をコードする *Slc9a3r1* 遺伝子の mRNA の発現が概日リズムを示すことが報告されたが、その発現リズムによる膜タンパク質の細胞膜局在への影響は不明である。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局在や機能にも概日性的変動が引き起こされるのではないかと仮説を提唱し、研究を行った²。

【方 法】

動物および細胞：マウス肝がん由来細胞 (Hepa1-6) およびマウス線維芽細胞 (NIH3T3) は DMEM 培地中で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。ICR 雄性マウスおよび *Per2* 機能不全 (*Per2^{m/m}* マウス) 雄性マウスを使用し、自由摂食・摂水、明暗周期 (明期: Zeitgeber Time (ZT) 0 ~ ZT12) 条件下で飼育した。各実験における動物の取扱いは九州大学実験動物規定を遵守して行った。

細胞中タンパク質の分画：マウスから ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 の 6 時点のいずれかの時刻に肝臓を採取した。培養細胞あるいは組織をサンプルとし、超遠心法を用いて膜タンパク質分画を調製した。また核分画タンパク質は分画キットを用いて調製した。

タンパク質の発現および局在の評価：タンパク質の発現量については、一次抗体として抗 NHERF1 抗体、抗 FATP5 抗体、抗 p65 抗体、抗 p50 抗体、抗 β-ACTIN 抗体、抗 TBP 抗体および対応する二次抗体を用いてウェスタンブロット法を用いて評価した。泳動したタンパク質の均一性は SDS-PAGE 後の CBB 染色およびネガティブゲル染色で確認した。膜タンパク質の局在については、ZT6 および ZT18 の 2 時点に採取した肝臓から凍結切片を用いた免疫蛍光染色により評価した。各タンパク質の染色は Cy3 および FITC を、核染色には DAPI を使用した。

オレイン酸輸送活性の評価：ZT6 および ZT18 から肝臓を採取し薄切片を作成した。細胞あるいは組織切片を Krebs-Ringer 緩衝液に浸し、[1-¹⁴C]-oleic acid (終濃度 3.4μM) を添加し 15 分おきに細胞または組織を回収した。測定は液体シンチレーションカウンターを使用した。

免疫沈降法および質量分析法：ZT6 および ZT18 の 2 時点に調整した肝臓膜分画タンパク質に対し

て、抗 NHERF1 抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて NHERF1 と結合するタンパク質を同定した。免疫沈降のコントロールとして抗 IgG 抗体を用いた。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ: マウス *Slc9a3r1* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片を増幅したのち、マウス *Slc9a3r1* 遺伝子ルシフェラーゼレポーターベクターを作製した。NIH3T3 細胞に各種 Plasmid vector トランスフェクトし、ルミノメーターを用いてレポーターベクターのルシフェラーゼ活性を測定した。

肝細胞輸送シミュレーションモデルの構築: モデル構築用のシミュレーションソフトとして Physio Designer を用いた。関連する各因子に対して mRNA、細胞質・核内または細胞膜タンパク質での発現量を表現するモジュールを作製し、転写・翻訳・細胞質-核間の移行・細胞質-細胞膜の移行を表現する数式を組み込んで、FATP5 の基質となるエイコサペンタエン酸 (EPA) の肝臓への取り込み挙動を表すモデルを作製した。また、シミュレーション結果の妥当性を検証するため、ICR 雄性マウスから、ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 において肝臓をサンプリングし、mRNA 発現量をリアルタイム PCR で、細胞質・核・膜におけるタンパク質の発現をウエスタンブロット法で測定した。EPA の肝臓内への取り込み挙動は、マウスに EPA (50mg/kg) を尾静脈内投与して得られた解析結果と比較した。

統計解析: 多群間の比較には One-way analysis of variance (ANOVA) で解析後、Tukey-Kramer's test により検定を行った。独立した 2 群間の比較には Student's t-test を用いた。いずれの統計解析においても、有意水準は 5% とした。

【結果・考察】

1. 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

マウス肝臓における NHERF1 の細胞膜画分の発現には、明期にピークを示す有意な概日変動が認められた (Fig. 1A)。そこで、マウス肝臓の膜画分を対象に免疫沈降と LC-MS/MS を組み合わせることによって、NHERF1 によって細胞膜上での発現が下支えされるトランスポーターを探索したところ、複数の候補タンパクが同定された (Fig. 1B)。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、mRNA および細胞全体でのタンパク質発現量に時刻による差異は認められないものの、細胞膜上の局在は NHERF1 の発現リズムに応じた 24 時間周期の変動を示した (Fig. 1 C, D)。また、FATP5 の代表的基質であるオレイン酸の肝臓内への取り込みにも FATP5 の膜発現の概日リズムに応じて時刻の違いにより有意に変動した。

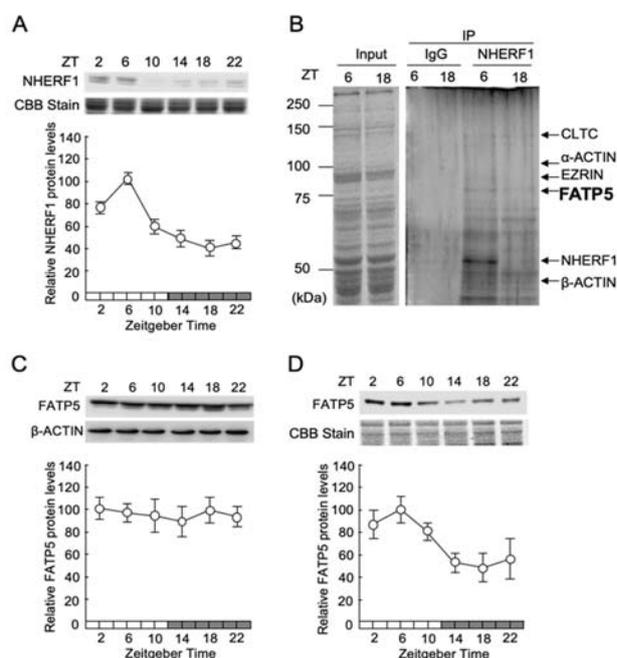


Figure 1 NHERF1 time-dependently interacts with FATP5 in the hepatic membrane fraction. (A) Temporal expression profiles of NHERF1 protein of mouse liver. (B) Immunoprecipitation analysis of NHERF1-interacting proteins in the hepatic membrane fraction of mice. (C, D) Temporal expression profiles of FATP5 protein in whole cell lysate (C) and in membrane fraction (D) of mouse liver. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 6-10). There was a significant 24-h variation in NHERF1 and FATP5 protein levels in the hepatic membrane fraction of mice. ($P < 0.001$; ANOVA).

さらに、培養したマウスの肝由来細胞に NHERF1 を高発現させたところ、細胞全体での FATP5 のタンパク発現量には変化は認められなかったが、FATP5 の細胞膜への局在が増加し、オレイン酸の取込み量も増大した。これらの結果から、NHERF1 の発現リズムはトランスポーターなど細胞膜に発現するタンパク質の局在に影響を及ぼし、その機能にも時刻依存的な変動を引き起こしていることが示唆された。

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

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すことが明らかになった (Fig. 2)。実際、*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、その発現量はいずれの時刻においても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差異は認められなかったが、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高値を示していた。

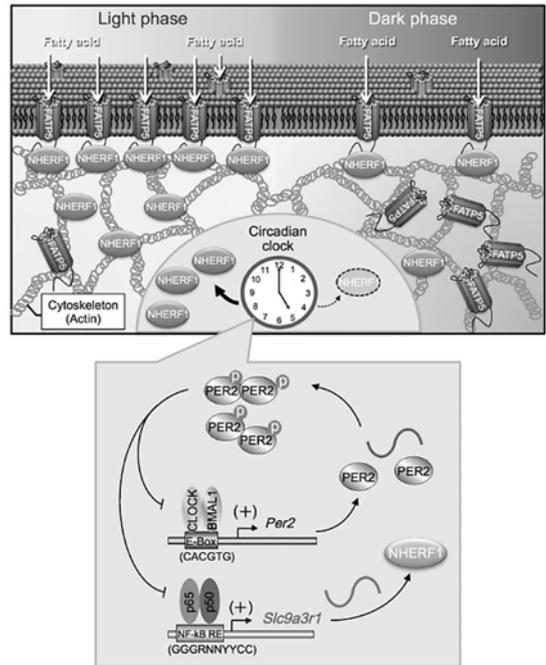


Figure 2 Schematic diagrams indicating NHERF1-regulated diurnal expression of FATP5 on hepatic plasma membrane.

以上の結果から、生体リズムの変化は NHERF1 の発現リズムに影響を及ぼし、トランスポーターの膜発現や輸送活性の概日リズムを変化させることが示唆された。実際に、*Per2^{m/m}* マウスを用いた検討の結果から、NHERF1 の発現リズムの変容は FATP5 による脂肪酸の細胞膜輸送活性にも影響することが明らかとなり、足場タンパク質の発現リズムは生体の恒常性維持にも寄与していると考えられた。

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

上記までの検討で、時計遺伝子 PER2 が NHERF1 の発現を制御し、FATP5 の膜発現と機能に概日リズムを生じさせることが明らかになった。そこでこの制御機構を基に、階層的な生体内の制御機構をシミュレートできる Physio Designer プログラムを用いて、時計遺伝子の機能を生体内物質輸送に反映させるモデルの構築を行った (Fig. 3)。時計遺伝子による NHERF1 の発現リズムと FATP5 の細胞膜局在リズムのシミュレーション結果は、マウスの肝臓において観察

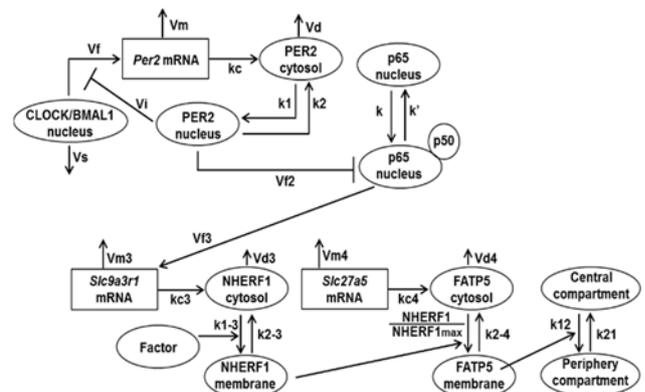


Figure 3 Construction of chronopharmacokinetic model of FATP5 substrate. Pharmacokinetic model of FATP5 substrate consists of two compartments.

された mRNA および各タンパク質の発現リズムと同様の位相を示した。また、FATP5 の基質を静脈内投与したと仮想した際の肝臓内濃度推移のシミュレーション結果は ZT14 投与時と比較して ZT2 投与時において高値を示し、マウスに EPA を投与して得られた肝臓中の薬物濃度推移と同様の挙動を示した(Fig. 4A, B)。これらの結果から、NHERF1 の発現リズム制御機構に基づいたトランスポーターの膜局在における時刻変動とその基質化合物の体内動態の投与時刻による差異を表現するモデルの構築に成功し、そのモデルの妥当性が示唆された。

一方で、構築したモデルのシミュレートの結果から、NHERF1 が膜へ局在化するには、その移行過程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】

これまでに明らかにされたトランスポーター発現の概日リズムに関するメカニズムは、転写・翻訳・分解過程に着目したものであり、mRNA やタンパクの発現量自体に時刻変動があることに基づいていた。本研究では、足場タンパク質 NHERF1 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することを明らかにした。

薬物の体内動態における投与時刻依存的な変化には、トランスポーターの概日変動が深く関与している。本研究の結果は、「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。本研究で明らかにしたメカニズムの概念が、トランスポーターの概日リズムを指標にした薬物療法や疾患の予防などに役立つことを期待したい。

【引用論文】

1. Oda M, Koyanagi S, **Tsurudome Y**, Kanemitsu T, Matsunaga N, Ohdo S. Renal circadian clock regulates the dosing-time dependency of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mol Pharmacol* 85: 715-722, 2014.
2. **Tsurudome Y**, Koyanagi S, Kanemitsu T, Katamune C, Oda M, Kanado Y, Kato M, Morita A, Tahara Y, Matsunaga N, Shibata S and Ohdo S. Circadian clock component PERIOD2 regulates diurnal expression of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 and its scaffolding function. *Sci Rep* 8: 9072, 2018.

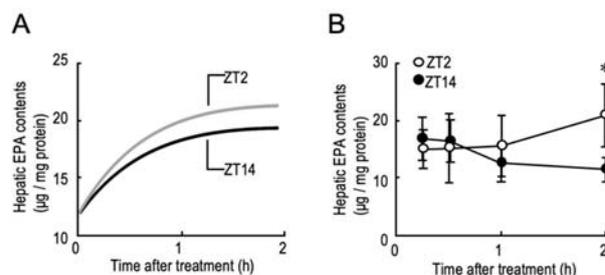


Figure 4 Simulation of time-dependent change in the disposition of FATP5 substrate. (A) Simulation of the time course of hepatic uptake of FATP5 substrate after its intravenous administration. The simulation was conducted based on the model describing in figure 2. (B) The time course of hepatic EPA concentration in mice after intravenous administration (50mg/kg) at ZT2 and ZT14. Each value is shown as the mean \pm S.E. (n=3). * P <0.05 compared between two groups.