

Fig. 9. Mass attenuation coefficient of gadolinium and the average photon energy of tantalum

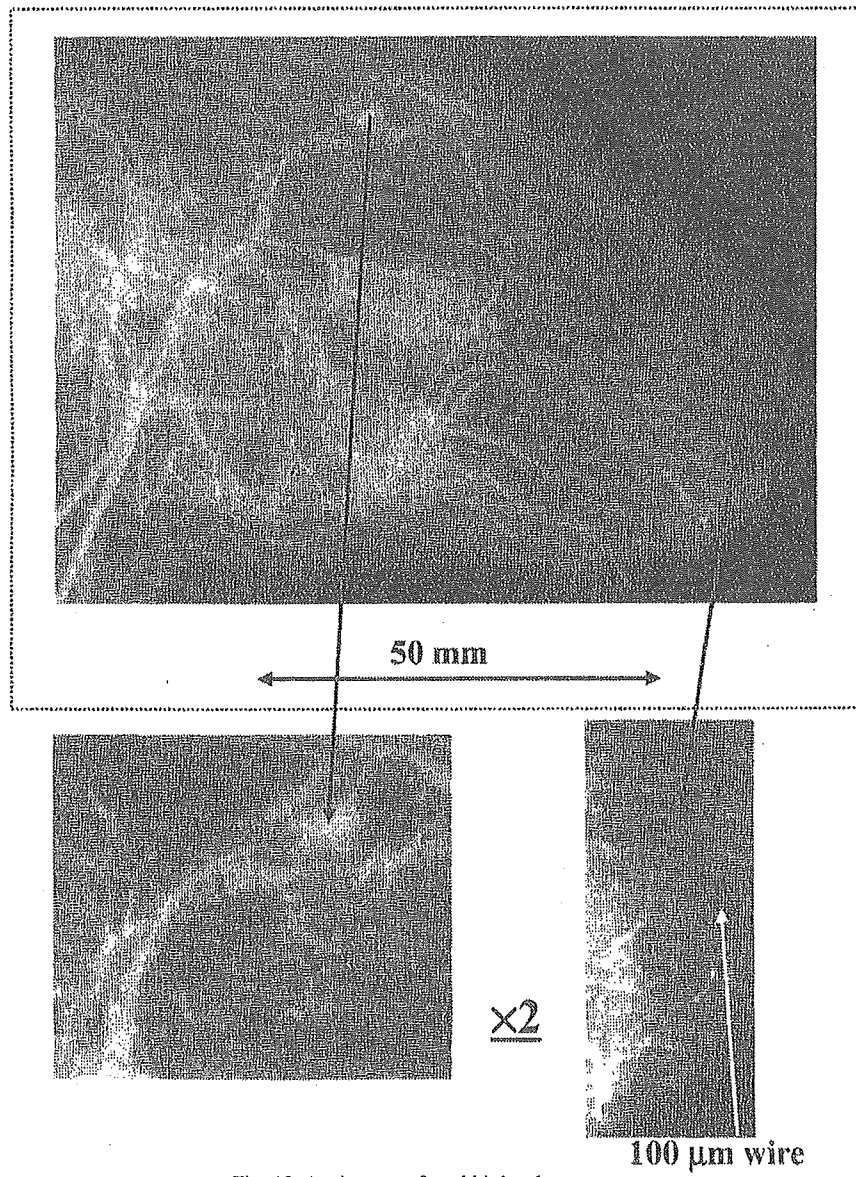


Fig. 10. Angiogram of a rabbit head

## 5. 制動X線の角度分布を用いた単色X線装置

定常的でクリーンなK系列特性X線を発生させるために、熱陰極（フィラメント）付きのX線管と制動X線の角度分布を用いた単色X線装置を製作した。この装置は高電圧電源、ターボ分子ポンプ、開放型のX線管等よりなる。管はターボ分子ポンプにより 0.5 mPa 程度に連続排気される。X線管の陽極には正の高電圧が印加され、陰極は接地されている。Fig. 11 はX線管の構造図で、フィラメントからの電子流は収束電極でターゲット先端に集められる。この実験では棒状ターゲットを使用した。管にはモリブデンターゲットを取付けたので、単色化のためのKエッジフィルターは 20  $\mu\text{m}$  厚のジルコニウムである。管電圧が 30 kV、管電流が 0.10 mA の条件におけるX線強度は、線源から 1.0 m の位置で 12.1  $\mu\text{Gy/s}$  で、クリーンな  $\text{K}\alpha$ 線が観測できた (Fig. 12)。Fig. 13 はウサギの大腿で、直径 15  $\mu\text{m}$  のヨウ素マイクロスフェアを使って造影した。マイクロスフェアは生体の造影ファントムを製作するのに有用である。フラッシュX線管と比較して、このX線管では高光子エネルギーのクリーンなK系列特性X線を得ることは難しい。

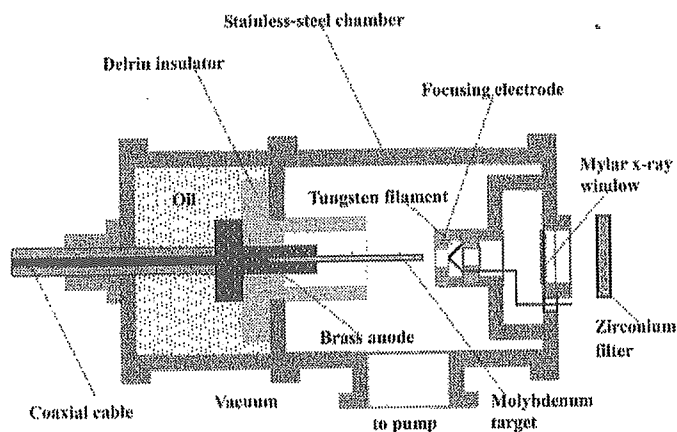


Fig. 11. Schematic drawing of the monochromatic x-ray tube.

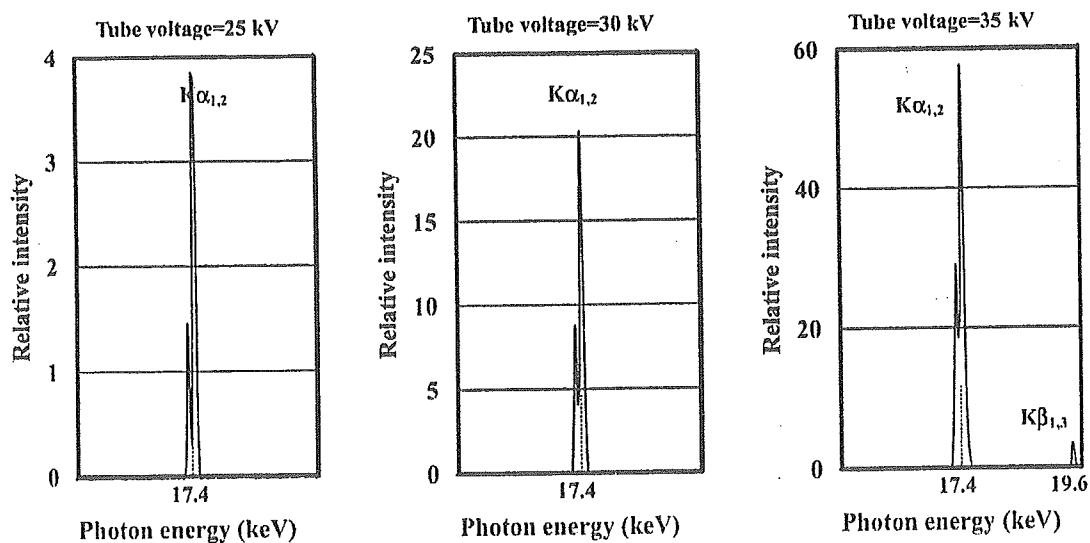


Fig. 12. X-ray spectra from the molybdenum target.

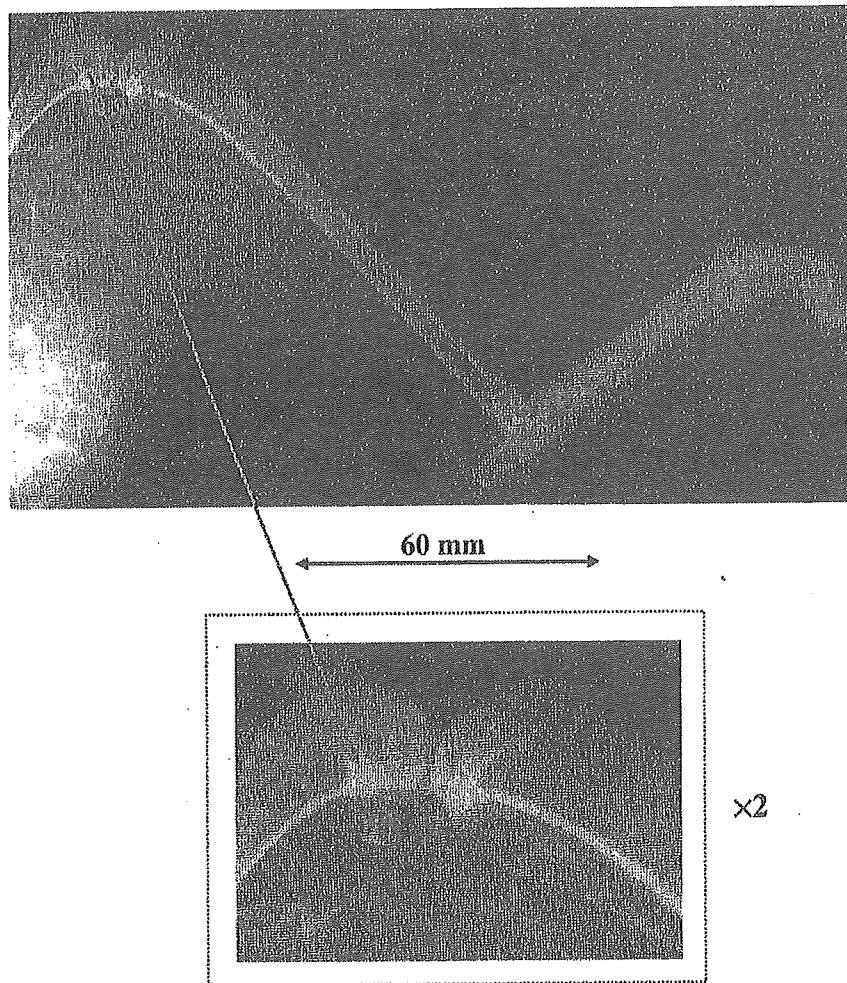


Fig. 13. Angiogram of a rabbit thigh.

#### 6. セリウムX線装置とヨウ素Kエッジ造影

コーンビームを用いてシンクロトロンと同等のヨウ素Kエッジ造影効果を得るため、 $K\alpha$ 線の平均光子エネルギーが 34.6 keV のセリウムX線管<sup>24,25)</sup>を製作し、高電圧電源と接続してポータブルX線装置を製作した。装置はメインコントローラーとコッククロフト・ウォルトン回路を組み込んだX線管ユニットからなる。メインコントローラーでは管電圧、管電流、そしてX線照射時間を調整できるが、コントローラーに接続したパソコンを用いても遠隔から制御できる。X線管の陽極は接地され、陰極に負の高電圧が印加される。X線管の焦点径は約 1 mm で、フィルター無し、そして硫酸バリウムフィルターを付けた場合のX線強度は、線源から 1.0 m の位置で、それぞれ 209 および 16.8  $\mu\text{Gy/s}$  であった。このとき、管電圧と電流は、それぞれ 60 kV と 0.5 mA であった。

Fig. 14 はセリウムX線管からのX線スペクトルで、管電圧が 60 kV のものである。図のようにシャープなK線が得られ、硫酸バリウムフィルターの挿入によって  $K\beta$ 線強度は著しく減弱した。ヨウ素マイクロスフェアを用いた犬の心臓の造影では、厚さ 100 mm の水ファントムを用いた場合にも、血管のコントラストはほとんど変化しなかった (Fig. 15)。

Tube voltage=60 kV

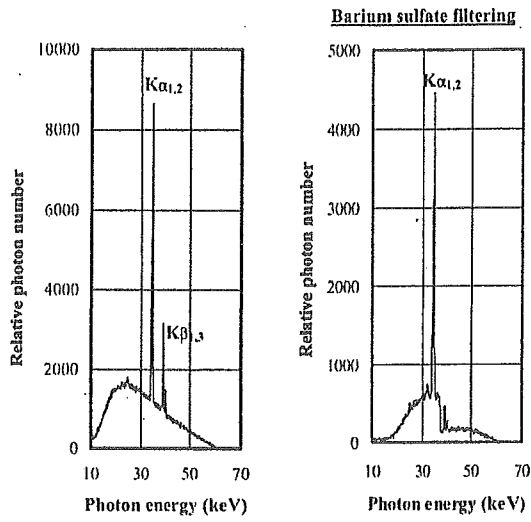


Fig. 14. X-ray spectra from a cerium target.

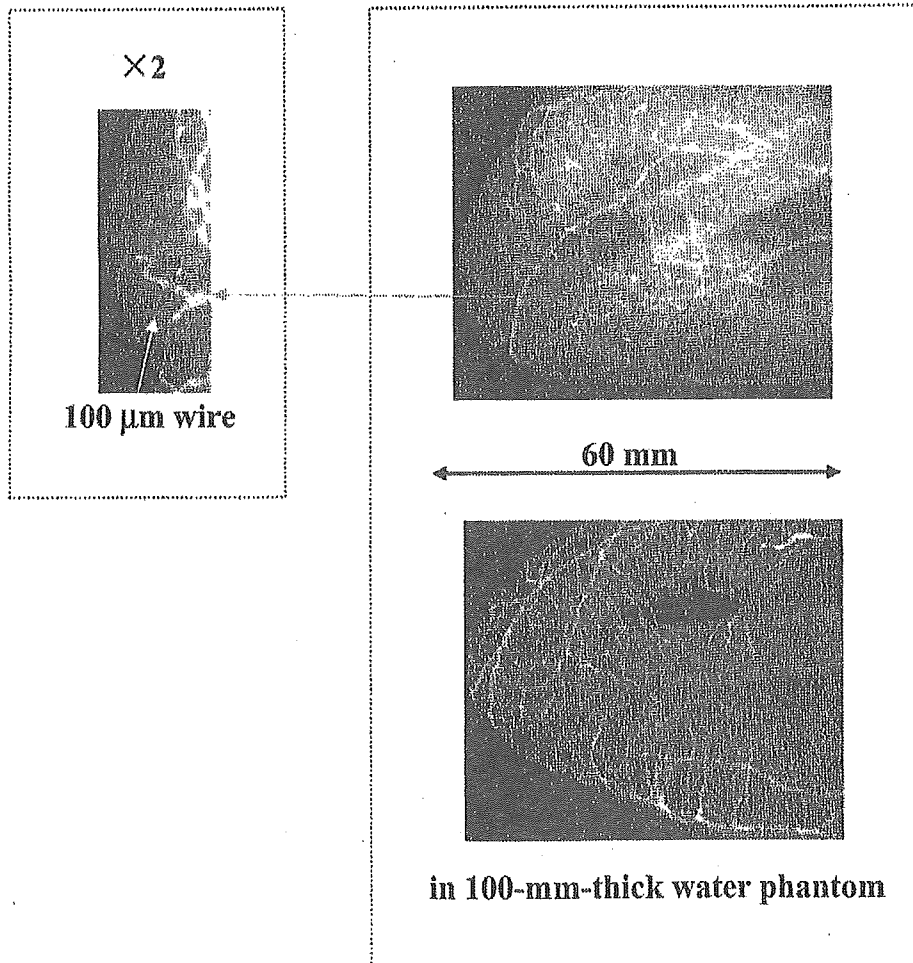


Fig. 15. Angiograms of a dog heart.

### 7. 制動X線の疑似単色化とデジタル拡大撮影

ターゲット材の融点等の問題から、セリウムを用いて微小焦点X線管を製作することは難しい。ここでは  $100\ \mu\text{m}$  タングステン管付きポータブルX線装置から発生する制動X線を疑似単色化し、ヨウ素造影に適したスペクトルにした後、3倍拡大撮影による造影を試みた。撮影には厚さ  $3.0\ \text{mm}$  のアルミニウムフィルターを用い、管電圧と撮影距離（X線源とイメージングプレート間）はそれぞれ  $60\ \text{kV}$  と  $1.5\ \text{m}$  であった。また管電圧と電流がそれぞれ  $60\ \text{kV}$  と  $0.5\ \text{mA}$  のとき、X線強度は線源から  $1.0\ \text{m}$  の位置で  $26.0\ \mu\text{Gy/s}$  であった。

撮影に使用したCRのサンプリングピッチは  $87.5\ \mu\text{m}$  であるが、8 LP ( $62.5\ \mu\text{m}$ ) の線が認識できた (Fig. 16)。また犬の心臓の造影でも  $100\ \mu\text{m}$  程度の血管が観察でき、線源側に厚さ  $100\ \text{mm}$  のアクリル板を用いた場合でも画像のコントラストはそれほど変化しなかった (Fig. 17)。

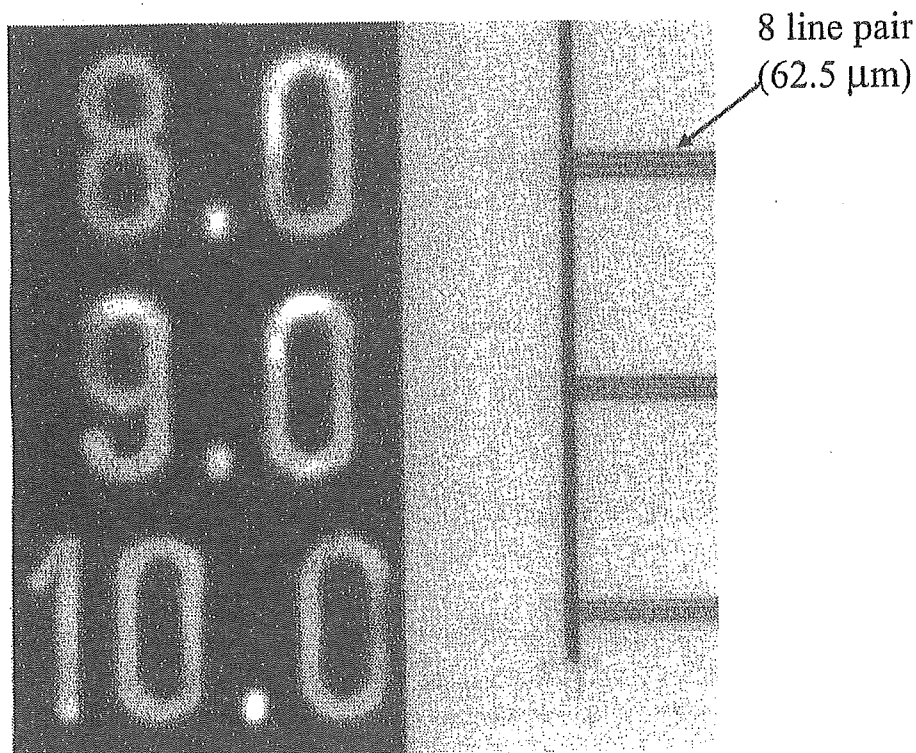


Fig. 16. Magnification radiogram of a test chart.

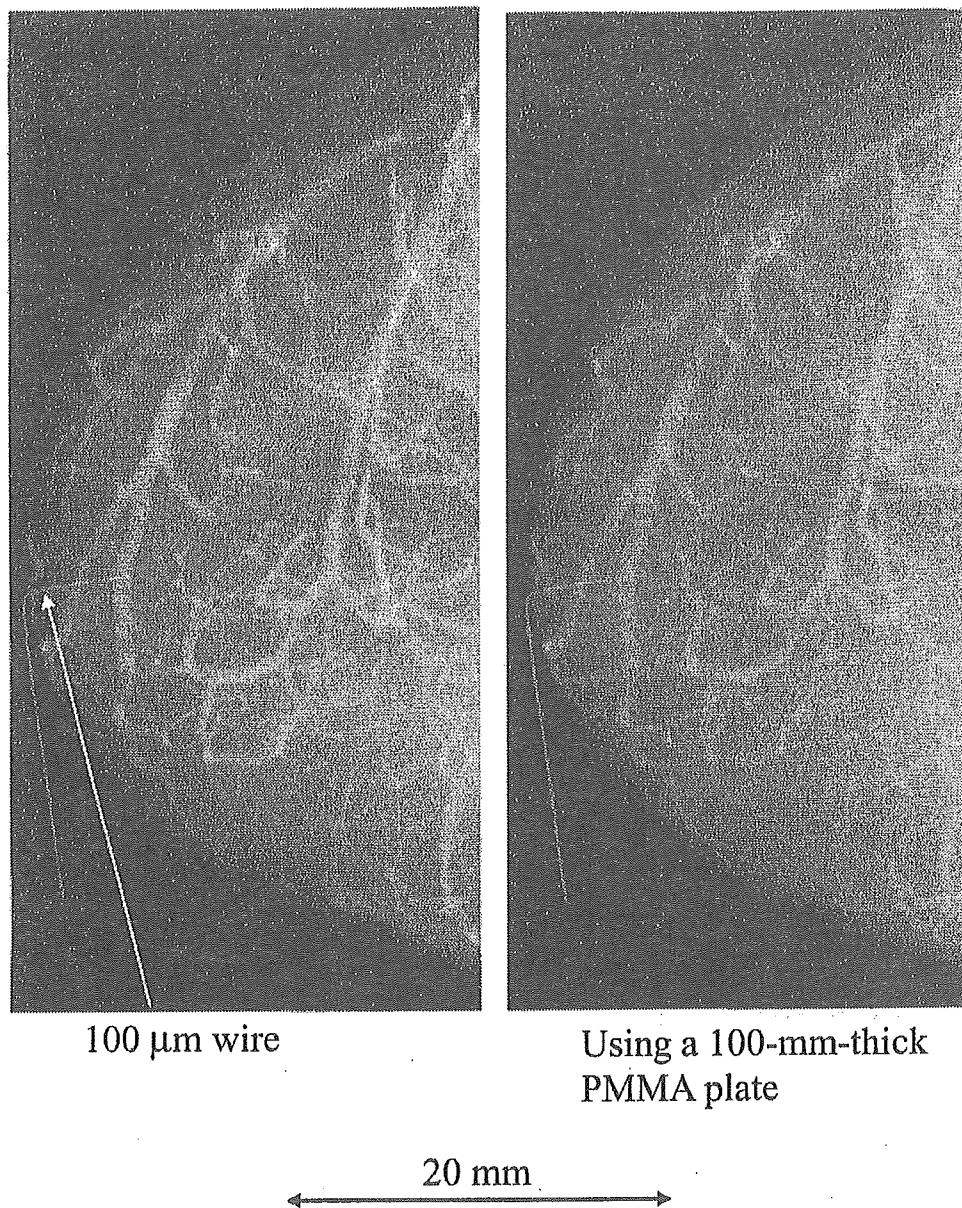


Fig. 17. Magnification angiograms of a dog heart.

#### 7. おわりに

低フォトンエネルギープラズマX線装置では充電電圧の増加により、高調波が観測された。これらの高調波は制動X線のプラズマ内での吸収により発生したと思われる。要するに、K系列特性X線の整数倍のフォトンエネルギーに相当する制動線がプラズマを透過し易いと想像される。次にモリブデン管付き高フォトンエネルギープラズマX線装置ではジルコニウムフィルターにより  $K\beta$ 線が吸収され難く、この現象は  $K\beta$ 線の線吸収係数が低下したためと思われる。

セリウムX線装置から発生するK系列特性X線はシャープで、前述のように硫酸バリウムのフィル

ターを用いた場合には  $K\alpha$ 線を有効に用いることができる。しかし  $K\beta$ 線も効率よく吸収されることから、酸化セリウムのフィルターも有用であると思われる。現在、回転陽極管を製作するための基礎実験を行っており、高線量率セリウム管も実現するかもしれない。

血管のコントラストは若干劣るが、アルミニウムフィルター等を使って発生する疑似単色制動X線も有効であった。さらに被曝線量を考慮する必要があるが、拡大撮影による空間分解能の向上、散乱線の低減、そして位相コントラスト効果の付加は、これからのデジタル撮影には必須であると思われる。100 W級の10  $\mu\text{m}$  フォーカス回転陽極管が実用化され、加えてkW級の100  $\mu\text{m}$  フォーカス管は製作可能であることから、特に高精細撮影を行う場合には小焦点管をお勧めする。

### 謝辞

本研究は文部科学省、厚生労働省、私学振興財団、JST、NEDO、そして岩手県からの研究助成金により遂行されている。

### 文献

1. J.J. Rocca, V. Shlyaptsev, F.G. Tomasel, O.D. Cortazar, D. Hartshorn and J.L.A. Chilla, "Demonstration of a discharge pumped table-top soft x-ray laser," *Phys. Rev. Lett.*, **73**, 2192-2195, 1994.
2. K. Yoshiaki, A. Nagashima, K. Nagashima, M. Kado, T. Kawachi, N. Hasegawa, M. Tanaka, A. Sasaki and K. Moribayashi, "X-ray lasers driven by optical lasers," *AIP Conference Proc.*, **506**, 613-620, 1999.
3. J.J.G. Rocca, J.L.A. Chilla, S. Sakadzic, A. Rahman, J. Filevich, E. Jankowska, E.C. Hammarsten, B.M. Luther, H.C. Kapteyn, M. Murnane and V.N. Shlyapsev, "Advances in capillary discharge soft x-ray laser research," *SPIE*, **4505**, 1-6, 2001.
4. S. Le Pape, Ph. Zeitoun, J.J.G. Rocca, A. Carillon, P. Dhez, M. Francois, S. Hubert, M. Idir and D. Ros, "Characterisation of an x-ray laser beam," *SPIE*, **4505**, 23-34, 2001.
5. C. Gerth, "Free-electron laser at the TESLA test facility at DESY: toward a tunable short-pulsed soft x-ray source," *SPIE*, **4505**, 131-145, 2001.
6. A. C. Thompson, H. D. Zeman, G. S. Brown, J. Morrison, P. Reiser, V. Padmanabahn, L. Ong, S. Green, J. Giacomini, H. Gordon and E. Rubenstein, "First operation of the medical research facility at the NSLS for coronary angiography," *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 625-628, 1992.
7. H. Mori, K. Hyodo, E. Tanaka, M. U. Mohammed, A. Yamakawa, Y. Shinozaki, H. Nakazawa, Y. Tanaka, T. Sekka, Y. Iwata, S. Honda, K. Umetani, H. Ueki, T. Yokoyama, K. Tanioka, M. Kubota, H. Hosaka, N. Ishizawa and M. Ando, "Small-vessel radiography in situ with monochromatic synchrotron radiation," *Radiology*, **201**, 173-177, 1996.
8. K. Hyodo, M. Ando, Y. Oku, S. Yamamoto, T. Takeda, Y. Itai, S. Ohtsuka, Y. Sugishita and J. Tada, "Development of a two-dimensional imaging system for clinical applications of intravenous coronary angiography using intense synchrotron radiation produced by a multipole wiggler," *J. Synchrotron Radiat.*, **5**, 1123-1126, 1998.
9. T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, A. W. Stevenson and S. W. Wilkins, "Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard x-rays," *Nature*, **373**, 595-597, 1995.
10. A. Momose, T. Takeda, Y. Itai and K. Hirano, "Phase-contrast x-ray computed tomography for observing

biological soft tissues," *Nature Medicine*, **2**, 473-475, 1996.

11. M. Ando, A. Maksimenko, H. Sugiyama, W. Pattanaşiriwisawa, K. Hyodo and C. Uyama, "A simple x-ray dark- and bright- field imaging using achromatic Laue optics," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L1016-L1018, 2002.

12. S. W. Wilkins, T. E. Gureyev, D. Gao, A. Pogany and A. W. Stevenson, "Phase-contrast imaging using polychromatic hard x-rays," *Nature*, **384**, 335-338, 1996.

13. A. Ishisaka, H. Ohara and C. Honda, "A new method of analyzing edge effect in phase contrast imaging with incoherent x-rays," *Opt. Rev.*, **7**, 566-572, 2000.

14. H. Ohara, C. Honda, A. Ishisaka and F. Shimoda, "Image quality in digital phase contrast imaging using a tungsten anode x-ray tube with a small focal spot size," *SPIE*, **4682**, 1-11, 2002.

15. E. Sato, K. Sato, T. Usuki and Y. Tamakawa, "Film-less computed radiography system for high-speed imaging," *Ann. Rep. Iwate Med. Univ. Sch. Lib. Arts and Sci.*, **35**, 13-23, 2000.

16. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications," *Jpn. J. Med. Imag. Inform. Sci.*, **20**, 148-155, 2003.

17. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma," *Jpn. J. Med. Phys.*, **23**, 123-131, 2003.

18. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma," *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 5236-5240, 2003.

19. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 713-720, 2004.

20. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Sato and K. Takayama, "Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma," *Opt. Eng.*, **44**, 049002-1-6, 2005.

21. E. Sato, M. Sagae, E. Tanaka, Y. Hayasi, R. Germer, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 7324-7328, 2004.

22. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Med. Phys.*, **32**, 49-54, 2005.

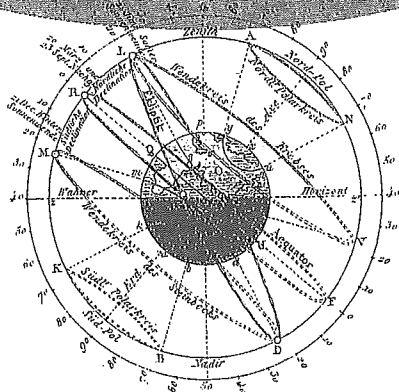
23. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Inoue, A. Ogawa, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays," *SPIE*, **5745**, 810-817, 2005.

24. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for angiography," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 699-704, 2004.

25. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator," *Med. Phys.*, **31**, 3017-3021, 2004.



【解説】



# トランスポータ研究のいま Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体を中心に

久光 隆, 若林繁夫

膜を隔てた物質輸送を行なうトランスポータはあらゆる生物の生存に根源的である。物質がタンパク質の間をどのように透過するのか？ 物質輸送がどのように制御されるのか？ これらのミステリーが結晶構造解析などによって今、解かれようとしている。最近の魅力的なトランスポータ研究を紹介するとともに、著者らが主として研究対象としている生体 pH 制御に重要な役割を担う Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体の構造と生理機能について最近の知見を解説する。

生命は、原始の海で膜によって閉じられた構造をつくることによって始まったとされる。これは、閉じられた空間によって物質が濃縮され、希薄溶液中ではなしえなかった低分子有機化合物から高分子化合物への化学反応が可能となったためであると考えられている。生命の誕生にはこのような外(海)とは区別された環境をつくり出すことが必須の条件であったと考えられる。進化の過程を経て今のような姿になった細胞には膜によって独立した空間がつけられ、さらに細胞内にはさまざまな細胞内小器官がまた同様の膜構造を形成している。細胞内においても細胞質側と細胞内小器官内とは環境が異なっ

ている。これら生体膜は主にリン脂質とタンパク質で構成されている。リン脂質は両親媒性の物質で、低分子の脂溶性化合物以外の水溶性有機化合物やイオンを透過させず、バリアーとして機能している。しかし細胞は、その生命活動を維持するために、それら物質の出入りを必要に応じて制御し、恒常性を保たなくてはならない。その物質の透過路を担うのが生体膜に存在するトランスポータ、チャンネル、ポンプに分類される一群の膜タンパク質である(図1)。本稿では、トランスポータに関する最近のブレイクスルー的な研究を概説したのち、一つの重要なトランスポータファミリーである Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE/SLC9) の構造・機能および生理的・病態的意義について、筆者らのこれまでの知見を中心に解説する。

## トランスポータの作動機構

トランスポータはすべての細胞および細胞内小器官において、無機イオン、栄養物質、薬物などさまざまな物質を輸送する。輸送基質の選択性が厳格かそうでないかは、トランスポータの種類によって異なる。トランスポータは、必要なものは取り込み、不要なものは排出するという単純明快な役割を担うことによって細胞ひいて

Recent Topics on Membrane Transporter, Particularly on the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Family  
Takashi HISAMITSU, Shigeo WAKABAYASHI, 国立循環器病センター 研究所循環分子生理部

用語解説

**アシドーシス:** 動脈血が生体機能を維持するのに必要な限界 pH (7.35) 以下に酸性化される状態。これに対してアルカリ化される状態はアルカローシスと呼ぶ。また、細胞生理学的用語として一般的に細胞内の酸性化をそう呼ぶこともある。

**システインスキャン変異解析:** タンパク質のシステイン残基を修飾する試薬には多くの種類があり使いやすいことから、タンパク質に系統的にシステイン変異を導入し構造や機能の解析をする手法。

**alternating access model:** トランスポータによる物質輸送を説明するモデルの一つで、タンパク質が膜を隔てて外側あるいは内側からのみ基質結合を許す2つのコンフォーメーションをとりうるとするモデル。

**調節性容積増加:** 細胞が高浸透圧にさらされて縮小しても自然にもとの容積に回復する現象で、regulatory volume increase (RVI) と呼ぶ。これに対して細胞膨張からの回復を調節性容積減少, regulatory volume decrease (RVD) と呼ぶ。前者は NHE や NKCC などのトランスポータが、後者は  $\text{Cl}^-$  チャンネルや  $\text{K}^+$  チャンネルなどが関与する。

は個体が生存するための根底をつくり出している。しかし、輸送の詳細なメカニズムは、まだ想像の域を出ていないのが現状である。ここでは、トランスポータによる輸送機構を理解するために、他の膜タンパク質であるチャンネル、ポンプで最も研究の進んでいるものを例に、その違いを比較してみることにする。

チャンネルは、主としてイオンの膜を隔てた電気化学勾

配に従った輸送を担い、ポアの開口確率を変えることで通すイオンの量を規定し、さまざまな細胞応答に寄与する。 $\text{K}^+$  チャンネルの基質特異性、透過機構の分子メカニズムが解明されたことに対し MacKinnon にノーベル化学賞が与えられたことは記憶に新しい。膜貫通領域 (TM) の 5 と 6 の間のポアループにある、すべての  $\text{K}^+$  チャンネルで保存されたイオン選択フィルターは、四量体のそれぞれの部位が中心軸に向き合うことで構成されている<sup>(1,2)</sup>。ここで水和水をはぎ取ることがイオン選択性の原理になるが、エネルギー障壁が大きく容易ではない。これを解決するため、 $\text{K}^+$  チャンネルはフィルター前後の水分子までも構造化し、フィルター内部ではそれと同様の環境を主鎖の酸素原子がつくり出し、脱水和した  $\text{K}^+$  の移行を容易にさせた。 $\text{K}^+$  と比ベイオン半径の小さい  $\text{Na}^+$  が透過できないのは、フィルター径が  $\text{Na}^+$  に対して大きすぎるので、フィルターが水と  $\text{Na}^+$  から水をはぎ取るだけのポテンシャルをつくり出せないからである。

ポンプは、ATP の水解エネルギーを利用して基質の電気化学勾配に逆らった輸送を担う (一次性能動輸送ともいう)。したがって、チャンネルとは異なり基質の輸送サイクル中に基質の逆流を防ぐために、必ず入口を閉めなくてはならない。輸送機構が複雑な分、単位時間あたりの輸送量はチャンネルに比べて低い。チャンネルと異なり、そのイオン輸送にはより複雑な構造変化が予想されたが、一連の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの結晶構造解析は、ポンプの輸

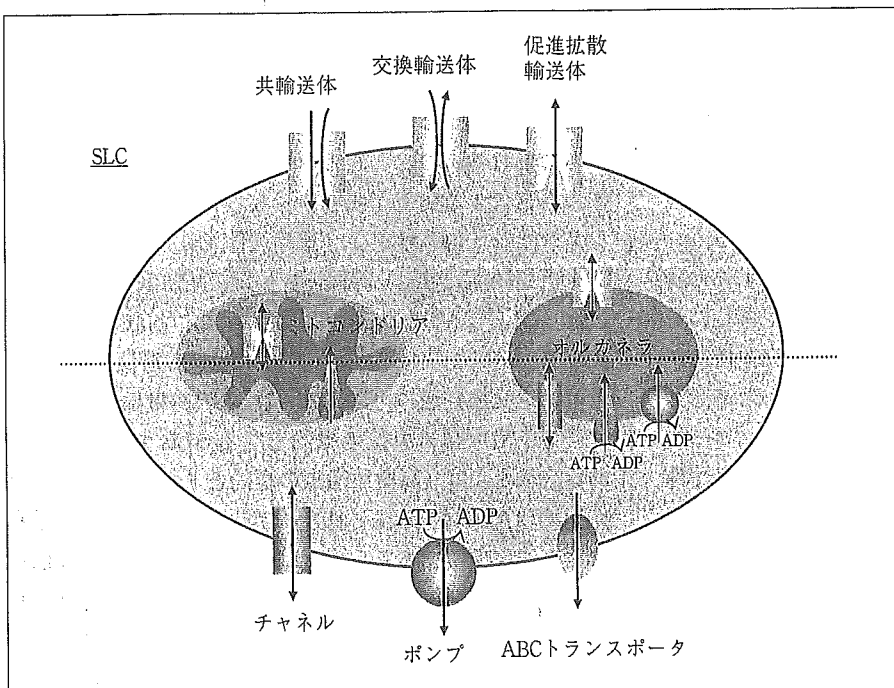


図1 ■細胞の膜輸送タンパク質  
輸送タンパク質は、すべての膜構造体にあると考えられる。SLCファミリーは様々な輸送形式をもつ輸送体タンパク質の集まりである。

送機構の理解を大きく前進させた<sup>(3,4)</sup>。輸送サイクル中に形成される中間体がそれぞれ結晶化され、それに伴うコンフォメーション変化が示された。それらワンショットの絵をつなぎ合わせると、Ca<sup>2+</sup>ポンプの輸送機構を視覚的に想像できる。確かに予想通り、輸送サイクルに合わせてATP水解に伴う親水性触媒ドメインの大きな首振り運動に連動してCa<sup>2+</sup>ゲートが開閉することが明らかにされたのである。

さて、トランスポータはチャネル、ポンプと機能的に別のグループであるが、輸送過程で基質が膜の片方からのみアクセスできるコンフォメーションをとる必要がある点ではポンプに似ている部分もある。トランスポータは構造上の特徴から大きく2つのグループに分けることができる。細胞内ATPにより駆動または制御されるABC (ATP-Binding Cassette) ファミリーとこれ以外のSLC (Solute Carrier) ファミリーである。ヒト遺伝子では、ABCトランスポータは7グループで49種類に、SLCトランスポータは43グループで319種類に分類されている。しかし、これらの中には生理機能や基質が不明なものも含まれる。ABCはその細胞質ループに保存性の高いATP結合モチーフをもち、トランスポータに分類されるものの、チャネルとしての機能をもつものやチャネルの制御因子としての機能をもつものなども含まれる。ABCファミリーの例としては、癌細胞の多剤耐性を付与するトランスポータMDR1 (ABCBサブファミリー)、嚢胞性線維症の原因遺伝子産物でCl<sup>-</sup>チャネルのCFTR (ABCCサブファミリー)、ATP感受性K<sup>+</sup>チャネルの制御因子であり糖尿病治療に用いるスルホニルウレア系薬剤の受容体であるSUR (ABCCサブファミリー) などがある。ABCを除くほぼすべてのトランスポータが属するSLCは、基質の電気化学勾配に従う促進拡散、およびポンプにより形成されたイオン濃度勾配を駆動力に基質の電気化学勾配に逆らう輸送(二次性能動輸送)を担うトランスポータファミリーである。

さて、チャネルとポンプに比べるとトランスポータ研究は遅れ気味であったが、この2~3年で目覚ましい進歩を遂げた。最近、トランスポータの三次元立体構造が相次いで報告された。大腸菌の異物排出トランスポータのAcrB<sup>(5)</sup>、ラクトース輸送体のLacY<sup>(6)</sup>、グリセロール三リン酸トランスポータのGlpT<sup>(7)</sup>、Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質輸送体の細菌ホモログLeuTAa<sup>(8)</sup>、大腸菌Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポータのNhaA<sup>(9)</sup>などである。なかでもLacYは、ラクトースとH<sup>+</sup>の共輸送体で、膨大な生化学データに基づいて最も理解の進んでいるトランスポータの一つで、結晶構造とあわせてその輸送機構の詳

細なモデルが提唱された。構造は、ペリプラズム側を完全に閉じ、細胞質側に親水性の内腔をもち、その中心部に基質が結合していることを示した。このことは、構造変化により基質結合部位が膜の異なった側からアクセスできるようになるという“alternating access model”の考え方と合致していた。さらに、この構造と架橋実験による結果をあわせ、開いた側の内腔からH<sup>+</sup>とラクトースが結合すると、反対側を開く構造変化を起こし、結合していたこれら基質が反対側に放出されるという輸送機構が提案された。この際、H<sup>+</sup>はチャージリレーによって運ばれるようである。結晶化されたLacYは不活性変異体であり、輸送に伴う構造変化を起こさないために構造が安定化し、結晶化できたと考えられる。NhaAの結晶化も活性をもたない酸性側pHで成功を収めている。これらの例から、おそらくすべてのトランスポータは膜を隔てて基質結合部位を内外に露出させるような大きな構造変化を起こすことが容易に想像される。

#### SLCファミリーの遺伝子群

SLCは、Human Genome Organization (HUGO)により分類されたトランスポータ遺伝子群である(図2)。SLCは、促進拡散輸送、イオン共役型共輸送あるいは交換輸送体より構成され、形質膜またはオルガネラ膜に発現する。個々のファミリーは、少なくとも20%以上のアミノ酸相同性をもつが、輸送する基質が異なっても同一ファミリーに分類される例もある。基質は多様であり、ペプチド、アミノ酸、核酸、脂肪酸、糖、イオン、また微量金属では亜鉛や銅、異物も輸送し、選択性も厳密なものから幅広いものまでである。このような多様性に富むSLCファミリーの中にはほとんど役割がわからないものも含まれる。いくつかのファミリーではそれらの遺伝子の異常による病気が明らかになっている。たとえば、システイン・塩基性アミノ酸輸送体(SLC7A9)異常は、シスチン尿症になる。高血圧症では、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体(SLC12A1)はBartter症候群の、NaCl共輸送体(SLC12A3)はGitelman症候群に関わる遺伝子である。アニオン交換輸送体(SLC26A4)の異常は難聴になる。

一方、治療薬の直接の標的となるSLCファミリーもある。たとえば、高血圧治療の標的として先のSLC12A1、SLC12A3は、それぞれサイアザイド系、ループ系利尿薬の作用部位である。また、Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質輸送体(SLC6ファミリー)は、抗うつ薬、抗けいれん薬のターゲットであり、神経伝達物質のシナプス間隙での濃度を上げることでその効果を示すと考えられてい

|  |     |
|--|-----|
| SLC1 The high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family                     | 7   |
| SLC2 The facilitative GLUT transporter family  | 14  |
| SLC3 The heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters                             | 2   |
| SLC4 The bicarbonate transporter family  | 10  |
| SLC5 The sodium glucose cotransporter family   | 11  |
| SLC6 The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family                    | 16  |
| SLC7 The cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated amino-acid transporter family | 13  |
| SLC8 The Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger family                                    | 3   |
| SLC9 The Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger family                                      | 9   |
| SLC10 The sodium bile salt cotransport family  | 5   |
| SLC11 The proton coupled metal ion transporter family  | 2   |
| SLC12 The electroneutral cation-Cl cotransporter family  | 9   |
| SLC13 The human Na <sup>+</sup> -sulfate/carboxylate cotransporter family                      | 5   |
| SLC14 The urea transporter family  | 2   |
| SLC15 The proton oligopeptide cotransporter family   | 4   |
| SLC16 The monocarboxylate transporter family   | 14  |
| SLC17 The vesicular glutamate transporter family   | 8   |
| SLC18 The vesicular amine transporter family   | 3   |
| SLC19 The folate/thiamine transporter family   | 3   |
| SLC20 The type-III Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family                             | 2   |
| SLC21/SLCO The organic anion transporting family   | 20  |
| SLC22 The organic cation/anion/zwitterion transporter family                                   | 18  |
| SLC23 The Na <sup>+</sup> -dependent ascorbic acid transporter family                          | 4   |
| SLC24 The Na <sup>+</sup> /(Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> ) exchanger family                | 5   |
| SLC25 The mitochondrial carrier family   | 29  |
| SLC26 The multifunctional anion exchanger family   | 11  |
| SLC27 The fatty acid transport protein family  | 6   |
| SLC28 The Na <sup>+</sup> -coupled nucleoside transport family                                 | 3   |
| SLC29 The facilitative nucleoside transporter family   | 4   |
| SLC30 The zinc efflux family   | 9   |
| SLC31 The copper transporter family  | 2   |
| SLC32 The vesicular inhibitory amino acid transporter family                                   | 1   |
| SLC33 The acetyl-CoA transporter family  | 1   |
| SLC34 The type-II Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family                              | 3   |
| SLC35 The nucleoside-sugar transporter family  | 23  |
| SLC36 The proton-coupled amino acid transporter family   | 4   |
| SLC37 The sugar-phosphate/phosphate exchanger family   | 4   |
| SLC38 The System A and N, sodium-coupled neutral amino acid transporter family                 | 6   |
| SLC39 The metal ion transporter family   | 14  |
| SLC40 The basolateral iron transporter family  | 1   |
| SLC41 The MgtE-like magnesium transporter family   | 3   |
| SLC42 The Rh ammonium transporter family (pending)   | 3   |
| SLC43 The Na <sup>+</sup> -independent, system-L-like amino acid transporter family            | 3   |
| Total  | 319 |

図2 ■ HUGO (Human Genome Organization) が策定した SLC ファミリーの分類表

右側にはそれぞれのファミリーを構成する輸送体の遺伝子数を示した。現在、43 ファミリー、319 遺伝子が登録されている。この数は現在も増え続けている。詳しい情報は <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/> にある。

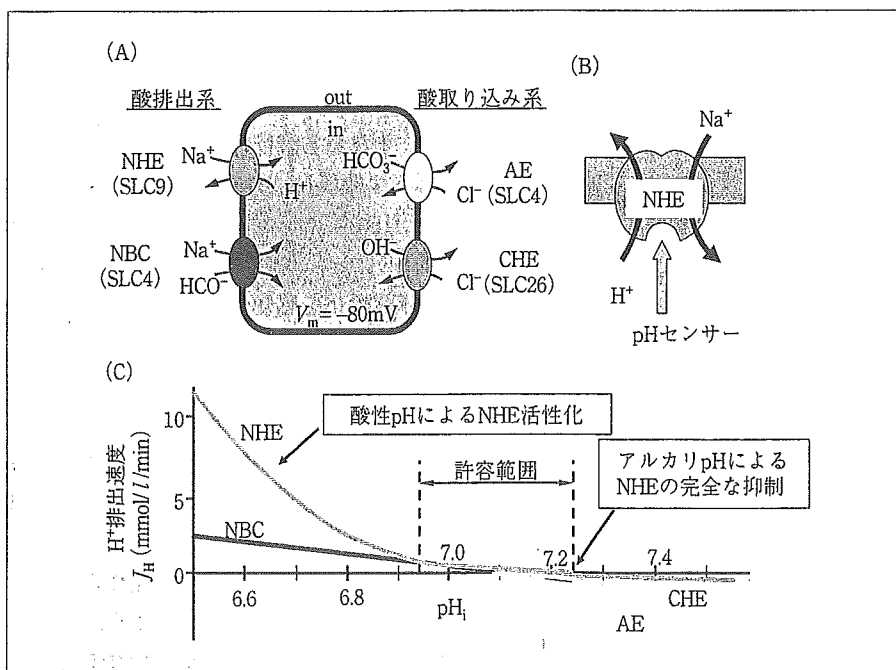


図3 ■ 細胞内 pH を制御する SLC メンバー

(A) 酸排出系 (NHE: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NBC: Na<sup>+</sup>/bicarbonate cotransporter) および酸取り込み系トランスポータ (AE: anion exchanger, CHE: Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger) を模式的に示した。 (B) NHE は Na<sup>+</sup> と H<sup>+</sup> を 1:1 の化学量論で交換する系ではあるが、細胞質側に pH センサーと呼ばれる付加的な H<sup>+</sup> 制御部位が存在する。 (C) NHE と NBC は細胞内の酸性化で活性化され、中性付近で活性を失う。逆に AE と CHE はアルカリ側で活性化される。これら複数のトランスポーターによって細胞内 pH は厳密に中性付近に維持される。

る。ヒトゲノム上には少なくとも5% (1,500以上) の膜輸送タンパク質関連遺伝子があると見積もられている。そのなかで SLC は、300 程度であるが、現在もその数は増えている。医薬品の多くが膜受容体阻害剤であることから、膜タンパク質はそのターゲットになりやすいと考えられ、その中でも最も理解の遅れている SLC ファミリーの今後の解析とともに多くの有用な医薬品が出てくることが期待される。

さて、生体イオン代謝、とりわけ本稿の主題の一つである細胞内 pH の制御は、細胞内代謝回転、筋収縮、分泌などさまざまな細胞機能の維持に必須な事柄である。そのため、生体は複数の pH 制御系、すなわち酸排出系としての  $\text{Na}^+$ /重炭酸イオン共輸送体 (SLC4) および  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  交換輸送体 (SLC9, NHE), 酸取り込み系としてのモノカルボン酸輸送体 (SLC16), アニオン交換輸送体 (SLC26) を備え、細胞内 pH を厳密に 7.2 付近に維持している (図 3)。とりわけ形質膜 NHE は、細胞内のわずかな酸性化によって著しく活性化されるという性質をもち、アシドーシスによる細胞死を防御している。

## NHE ファミリー

$\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を交換輸送するトランスポータは原核細胞から真核細胞まで、形質膜ならびに細胞内オルガネラ膜に広く存在する。たとえば植物では、そうしたトランスポータが細胞膜および液胞に存在し、 $\text{H}^+$  濃度勾配を利用し  $\text{Na}^+$  を細胞外または液胞内へ輸送することにより主に耐塩性に寄与していると考えられている。特にシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) では、細胞膜タイプを SOS, 液胞タイプを AtNHX と呼ぶ。動物細胞の NHE では TM が 12 個で、カルボキシル (C) 末端は細胞質側にある (後述) が、最近 AtNHX1 では TM が 9 個で、C 末端側が液胞内腔にあり、その C 末端にカルモジュリン様タンパク質が結合し、イオン選択性を担うことが報告された<sup>(10)</sup>。NHE1 にも C 末端にカルモジュリンが結合するが (後述) 機能は異なり大変興味深い。

哺乳類の NHE を分類した SLC9 ファミリーは、現在 9 つのアイソフォーム (NHE1~9, SLC9A1~9) が知られている<sup>(11,12)</sup>。1989 年に NHE1 が最初にクローニングされ<sup>(13)</sup>、その配列情報とゲノム情報に基づき他のアイソフォームが発見されてきた。現在、NHE1~5 が形質膜、NHE6~9 がオルガネラ膜に存在すると考えられており、それぞれの膜系で特有の機能をもつと予想されている。NHE1 と NHE6~8 は普遍的にあらゆる組織に発現するが、NHE6~8 の機能はよくわかっていない。NHE2

は、胃、小腸上皮細胞の管腔側、NHE3 は小腸、腎臓上皮細胞の管腔側に、NHE4 は胃上皮細胞の基底膜側に、NHE5 は中枢神経細胞に主として発現する。NHE3 と NHE5 に関しては、形質膜とエンドソーム間でリサイクリングされると考えられている。

これらアイソフォームの中で NHE1~4 のノックアウト (KO) マウスが作製され、それらの生理機能が明らかとなってきた。NHE2 の KO マウスでは、胃酸分泌細胞が加齢とともに極端に減少しており、結果として胃壁における酸分泌が著しく阻害されている<sup>(14)</sup>。NHE4 は胃酸分泌細胞の NHE2 とは異なる基底膜面にあるが、この KO マウスでは、酸分泌細胞の成熟が妨げられ結果的に酸分泌を抑制する。NHE4 は AE2 (SLC4A2) と共役して  $\text{NaCl}$  を取り込むことで細胞容積を維持し、酸分泌を支える役割があることが明らかとなった<sup>(15)</sup>。NHE3 の KO マウスでは、血圧の低下、腎臓や腸管での  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  の吸収低下が起こっている<sup>(16)</sup>。このマウスは、先天性の分泌性下痢の症状とよく似た表現型を示す。他方、自発的高血圧ラットでは NHE3 の発現および活性が上昇しており、おそらく  $\text{Na}^+$  吸収および再吸収を促進することで高血圧を呈する可能性がある。

## NHE1 の生理的・病態的役割

普通型 NHE1 (SLC9A1) には、基本的な 2 つの生理的役割がある。一つは、 $\text{H}^+$  排出経路として代謝産物などによる細胞内の酸性化からの保護であり、SLC4 (アニオン交換輸送体) などとともに細胞内の酸-塩基平衡を維持している (図 3)。二つめは、 $\text{Na}^+$  流入経路としての役割をもち、細胞が高浸透圧にさらされ縮小した際にそれに伴って  $\text{Cl}^-$  と  $\text{H}_2\text{O}$  が流入することで細胞容積を一定に維持する機構、すなわち調節性容積増加 (RVI) に関与する。このような機能は NHE1 にかかり特化しており、少なくとも NHE2, NHE3 では顕著ではない。細胞縮小刺激のみで NHE1 を活性化できるようなのである。NHE1 分子自身が体積変化を感知するメカニズム、さらに他のセンサータンパク質が存在するかなどは不明である。

このように、NHE1 は生体がさまざまな細胞機能あるいは生理機能を発揮するために必要な細胞内イオン環境を整備するという重要な役割を担うが、意外にも NHE1 をノックアウトしたマウスは正常に生まれる<sup>(17)</sup>。しかし生後徐々に、歩行性運動失調、てんかん様発作の症状を呈し、生後数週間でほとんどが死亡してしまう。原因となる分子機構の詳細は明らかではないが、少なくとも瘻

癲などの症状は海馬 CA1 神経の過興奮性が原因の一つと考えられる<sup>(18)</sup>。

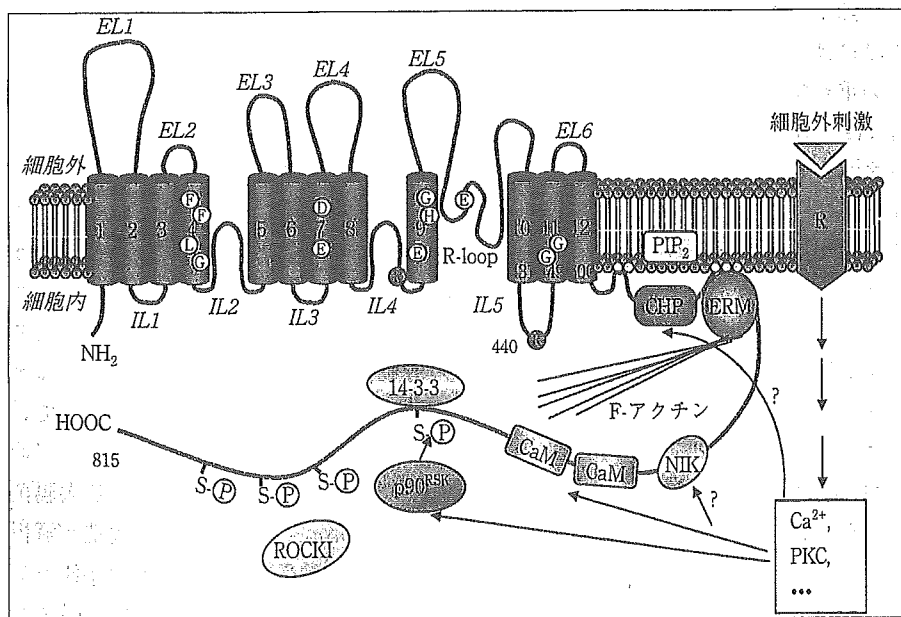
NHE1 の活性亢進は、虚血-再還流障害の増悪要因であることがよく知られている。この NHE1 の活性化は、虚血による低酸素状態がアシドーシスをひき起こし、NHE1 を活性化する。その酸排出に伴って流入した Na<sup>+</sup> が Ca<sup>2+</sup> 過負荷をひき起こし、心臓、中枢神経系などで細胞・組織障害に至る。動物を用いた心筋虚血-再還流病態モデルでは、NHE1 阻害剤は Na<sup>+</sup> および Ca<sup>2+</sup> 過負荷を抑制し、これら障害に有効であることが示されている<sup>(19)</sup>。NHE1 の持続的な活性亢進は、本態性高血圧にも関与している。しかし、ヒトや自発性高血圧ラットを用いた連鎖解析では、NHE1 遺伝子の異常は見いだされていない<sup>(20)</sup>。このことは、本態性高血圧病態下では、NHE1 は翻訳後調節により活性が制御される可能性を示す。さらに、NHE1 活性の阻害は、メカニズムは不明であるが、心肥大を抑制することが報告されている。

他方、NHE1 は、“アンカー”タンパク質としてアクチン繊維をつなぎ止め、細胞の形態維持、接着、遊走に寄与することが示唆されている。これは、NHE1 の C 末端側細胞質ドメインと細胞骨格系タンパク質が ERM ファミリー (ezrin, radixin, moesin) を介して相互作用するという結果に基づいており、この機能にはイオン輸送活性は必要ないことが示されている<sup>(21)</sup>。興味深いことに、NHE1 は繊維芽細胞ではそれが遊走しようとする進行方向側のラメリポディアに局在し、アクチン繊維の再構成に寄与することが報告されている<sup>(22)</sup>。アクチン繊維の

再重合はアルカリ化で促進することが知られているが、NHE1 がラメリポディアや focal adhesion 部位に局在することでアクチンファイバー形成を促進しているかもしれない。また、NHE1 は、心筋細胞では細胞と細胞の継ぎ目に当たる介在板や電気的興奮が最終的に細胞内に伝わる T 管に局在することが観察されている<sup>(23)</sup>。これらの膜系に存在するギャップ結合に関わるチャネルや Ca<sup>2+</sup> 遊離チャネルは pH 感受性であり、これらのことから NHE1 が心筋細胞の興奮-収縮連関に関与する可能性がある。

### NHE1 の構造と機能

NHE ファミリータンパク質は、比較的保存されたアミノ (N) 末端側の 12 個の膜貫通領域 (TM) を含むドメイン (~500 アミノ酸残基) と、相同性の低いカルボキシ (C) 末端側の細胞質ドメイン (~300 アミノ酸残基) の構造的・機能的に異なる大きな 2 つのドメインに分けることができる (図 4)。N 末端領域はアミロイド誘導体などの阻害剤結合部位をもち、イオン輸送を担う輸送体のいわば心臓部であるのに対して、C 末端領域は輸送を制御する調節ドメインとして機能すると考えられている<sup>(24)</sup>。C 末端領域は、その相同性の低さからも推察されるように、アイソフォーム間で異なった制御系を有することが明らかとなってきている。このように C 末端は、アイソフォームの個性を生み出す領域として大変興味深い。最近筆者らは、システインスキャン変異解析を



システインスキャン変異解析により明らかとなった最新のトポロジーモデルを示した。モデル中のアミノ酸残基 (一文字表記) はおよそその位置を示し、他のアミノ酸への置換が活性の低下または阻害剤感受性の低下を示したもの (白地)、細胞内 pH 感受性が酸性側シフトを示したもの (赤地)、アルカリ側シフトを示したもの (黄地) を表す。また、C 末端側細胞質ドメインと相互作用するさまざまな制御因子を示した。CHP: カルシニユリン B 様タンパク質、NIK: Nck 結合キナーゼ、ROCK1: Rho キナーゼ I、PIP<sub>2</sub>: イノシトールリン酸、PKC: プロテインキナーゼ C、14-3-3: アダプタータンパク質 14-3-3、CaM: カルモジュリン、IL: Intracellular Loop, EL: Extracellular Loop

図 4 ■ NHE1 の二次構造モデルとその相互作用タンパク質の模式図

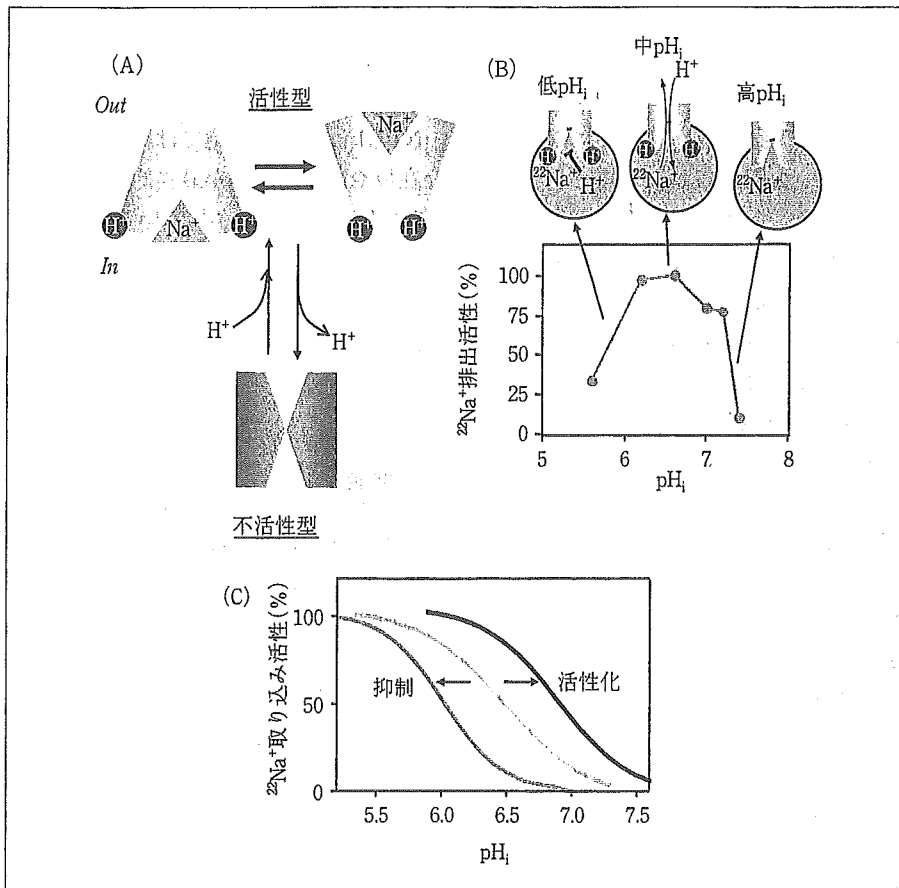


図5 ■ pH センサーの存在とその効果

(A) pH センサーへの H<sup>+</sup> の結合により NHE の活性化が起こることを示した概念図。(B) pH センサーの存在を示唆する細胞内からの <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> 排出 (NHE の逆回転) のベル型の細胞内 pH 依存性。細胞内 pH が低いときには、NHE は活性化状態にあるが、基質結合部位で <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> との競合が起こるため活性は低い (低 pH<sub>i</sub>)。中 pH<sub>i</sub> では、競合 H<sup>+</sup> が減少したため高い活性を示す。高 pH<sub>i</sub> では pH センサーから H<sup>+</sup> が遊離するために活性がなくなる。(C) pH センサーの H<sup>+</sup> 感受性を負に制御した場合 (コバルト色)、正に制御した場合 (黒) の NHE の細胞内 pH 依存性を示した。中間調の線は通常 pH 依存性を示す。

行ない、導入したシステイン残基が SH 標識試薬によって細胞内外のどちらから標識されるかを詳細に検討し、新しいトポロジーモデルを提唱した (図 4)<sup>(25)</sup>。このモデルでは、TM4-TM5 および TM8-TM9 をつなぐ細胞内ループの一部が、細胞内外の両方からアクセスできることが明らかとなり、イオン輸送路の一部である可能性が考えられた。事実、TM4 および TM9 には、イオン輸送活性、阻害剤結合に関わるいくつかの重要なアミノ酸残基が局在する。TM9 と TM10 の間には、疎水性の強いドメインが存在し、おそらくはチャネルタンパク質によく見られるような膜陥入型のポアループ様構造をとることによって、イオン輸送路を形成するのではないかと予想される。

NHE1 は Na<sup>+</sup> と H<sup>+</sup> を 1:1 のストイキオメトリーで反対方向に輸送する系である。NHE1 活性は単一の細胞外 Na<sup>+</sup> 結合部位が関与すると考えられる速度論的性質を示すが、一方細胞内 H<sup>+</sup> に対してはアロステリックな濃度依存性を示すので、2 個以上の H<sup>+</sup> 結合が関与すると考えられる。このことは、NHE1 の細胞質側に H<sup>+</sup> 輸送部位とは別の H<sup>+</sup> 制御部位あるいは“pH センサー”と呼ばれる H<sup>+</sup> 結合部位が存在することを示唆するが、NHE の各アイソフォームにそのような部位が存在する

かどうか判定するのは通常容易ではない。最近筆者らは、NHE の逆反応、すなわち細胞に負荷した <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> の流出を測定することによって、NHE1~3 アイソフォームにおける H<sup>+</sup> 制御部位の存在を明らかにした<sup>(26)</sup> (図 5)。また、pH センサーの制御に関わる保存されたアミノ酸残基 (NHE1 の R440 および G455) を同定した<sup>(27)</sup>。pH センサーは NHE 活性調節のまさに中心的概念であり、その存在は生理的にも重大な効果を生む。NHE 活性が純粋に細胞内外の Na<sup>+</sup> 濃度勾配に従うと仮定するならば、細胞内 pH は 8 を超えるほど高くなるはずであるが、7.2 付近に厳密に維持されるのは pH センサーから H<sup>+</sup> が遊離するからであり、また細胞内アシドーシスからの速やかな回復は pH センサーに H<sup>+</sup> が結合して NHE を活性化するからなのである。NHE に内蔵される pH センサーは、それ自体細胞のアシドーシス、アルカローシスから防御する巧妙な分子の仕掛けとなっている。

ごく最近、NHE のスーパーファミリーである大腸菌の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, NhaA の三次元結晶構造が解析され、これまでに生化学実験により予想された pH センサーによる基質輸送の活性化機構のモデルが提唱された<sup>(9)</sup>。これによれば、細胞質側にある H<sup>+</sup> 輸送部位とは

異なる pH センサー (TM9) からの  $H^+$  の解離に伴う TM9 の構造変化が, NhaA を不活性型から活性化型に変換し,  $Na^+$  結合部位を形成すると考えられる両膜貫通ヘリックス TM4 と TM11 への基質結合を可能にするというものである。一次構造は NhaA と NHE とでほとんど保存されていないが, 基本的には同様な活性化機構が関与すると考えられる。興味深いことに,  $Na^+$  結合部位を形成すると考えられる両膜貫通ヘリックス (TM4 と TM11) は膜中で分断された構造をとっている。同様の構造は, 筋小胞体の  $Ca^{2+}$  ポンプの  $Ca^{2+}$  結合部位<sup>(3)</sup> および細菌の  $Na^+/Cl^-$  依存性神経伝達物質トランスポータホモログの  $Na^+$  結合部位<sup>(8)</sup> でも観察されており, 膜トランスポータのイオン結合部位で共通に見られる構造である可能性がある。

NHE1 は, 細胞膜上でホモ多量体として存在することが示唆されているが, その詳細な意義は明らかとなっていない。多くのトランスポータで多量体であることが示されているが, 膜タンパク質という実験的な制約から, その生理的意義はタンパク質を大量に調製できる細菌のトランスポータなどを除いて, 必ずしも明らかでない。先の NhaA のより自然な状態に近いとされる二次元結晶構造は, それが二回対称軸をもつ二量体であることを示している。最近筆者らは, NHE1 のシステイン変異体を用いたクロスリンク実験によって NHE1 が三, 四量体などの多量体構造ではなく, 二量体で存在することを示した<sup>(28)</sup>。またいくつかの実験的証拠から NHE1 の二量体化が生理的な細胞内 pH における活性に必須であることを示した (投稿中)。

## NHE1 の活性制御

NHE1 は, ホルモン, 細胞増殖因子, 発癌因子, サイトカイン, 神経伝達物質,  $Li^+$  などのイオン, あるいは高浸透圧, ストレッチ, ずり応力といった機械的刺激など, ほとんどすべての細胞外刺激によって活性化を受け, 結果的に細胞内アルカリ化が生じることがよく知られている。この活性調節には, NHE1 の C 末端側に存在する長大な細胞質ドメインと多様なシグナル分子との相互作用が関与すると考えられている。筆者らは以前に, 細胞質ドメインのほぼ中央に  $Ca^{2+}$ /カルモデュリン (CaM) が  $Ca^{2+}$  依存的に結合することを発見した<sup>(29)</sup> (図 4)。CaM 結合部位は普通 NHE1 活性を阻害する自己阻害ドメインとして働き,  $Ca^{2+}$  動員による CaM 結合によってこの阻害が解除され NHE1 が活性化されるという説を発表した<sup>(30)</sup>。これを契機にして, カルシニユリ

ン B 様タンパク質 (CHP), アダプタータンパク質 14-3-3, ERM ファミリー, Nck 結合キナーゼ (NIK), Rho キナーゼ I (ROCKI), イノシトールリン脂質 ( $PIP_2$ ) など, さまざまな結合因子が同定されてきた (図 4)。増殖因子による NHE1 の活性化には,  $Ca^{2+}$  動員のほかに, リン酸化を介する経路が存在する。一つ明らかなことは, MEK-ERK シグナル経路を介してリボソーム S6 キナーゼ (p90rsk) が活性化され, NHE1 のセリン 703 をリン酸化し, 14-3-3 の結合が促進される, というのである。しかし, 上記のさまざまな制御因子のリン酸化を含めて, リン酸化による NHE1 の活性化の分子機構はまだ多くが不明のままである。NHE 活性制御の分子機構を解明することが困難な理由の一つは, 現在のところ細胞を用いる以外活性を測定することができないことによるであろう。最近, バッチピペットを用いて細胞を灌流し, NHE 活性におけるさまざまな制御因子の効果が直接検討された。それによれば, NHE1 は ATP (ATP アナログも可) や  $PIP_2$  によって直接活性化を受けることが示唆された<sup>(31)</sup>。

さまざまな刺激による NHE1 活性化は細胞内 pH 依存性をアルカリ側にシフトさせることによって起こる (図 5)。この制御機構に中心的な役割を果たすと考えられるのが pH センサーであり, 筆者らは最近, この pH センサーを正常に機能させることに NHE1 の二量体形成が必要であることを示唆した。さらに, これまでの膨大な追跡から pH センサーを制御するいくつかのドメインを同定した。その結果, 細胞膜直下の約 100 アミノ酸残基はほぼ全域にわたって pH センサーを生理的に機能させるために必須であることを明らかにした<sup>(32)</sup>。この領域には, CHP,  $PIP_2$ , ERM ファミリータンパク質が結合することが知られている (図 4)。

筆者らはこれまで, この CHP の役割を詳細に検討してきた。現在 CHP には 3 種類のアイソフォームが存在することが知られている。CHP1 はあらゆる組織に普遍的に発現するのに対して, CHP2 は癌細胞および小腸に特異的に発現し, CHP3 は主として心臓に発現する。CHP1~3 は N 末端側 (Gly2) がミリスチル化された, 4 つの EF ハンドモチーフをもつ  $Ca^{2+}$  結合タンパク質で, カルシニユリンの B サブユニットと相同性がある (図 6)。CHP は NHE アイソフォームの膜直下の C 末細胞質ドメイン (NHE1 ではアミノ酸 516~540) に強固に結合する。そのことは, GFP タグを結合した CHP1 あるいは CHP2 を細胞に発現させると NHE を共発現させた場合のみ形質膜に局在し, 変異 NHE を共発現させた場合には形質膜ではなく細胞質全体に分布するようになる



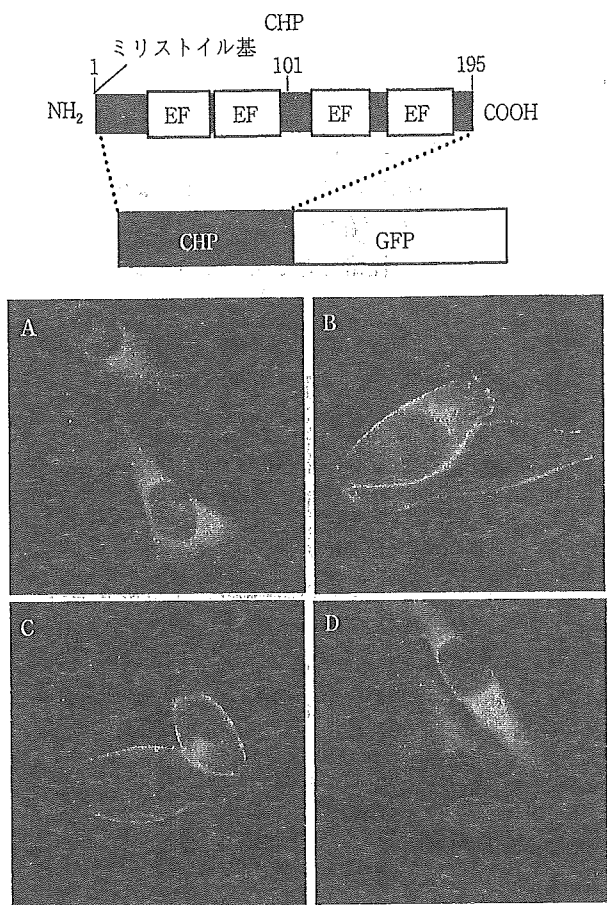


図6 ■ CHPの構造と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 標識 CHPの細胞内局在

NHEを欠損した細胞への CHP1-GFPの発現 (A). GFP 蛍光は細胞質全体に広がっている. NHE1を強制発現させた細胞への CHP1-GFP (B) あるいは CHP2-GFP (C) の共発現で, 細胞膜に局在するようになる. (D) NHE1の CHP結合部位に変異を入れた場合には, (A)と同様に形質膜への局在は失われる.

ことからわかる (図6).

筆者らは以前, 詳細な発現実験に基づいて, CHPが形質膜タイプの NHE1~3 (おそらくは NHE4 および NHE5 も) の活性発現に必要な不可欠な存在であることを明らかにした<sup>(33)</sup>. CHPを結合できない変異 NHEは形質膜に発現するものの, その活性は NHE/CHP複合体に比べて著しく低い (5~10%). また, アフリカツメガエル卵母細胞を用いた競合実験では, NHEから CHPを遊離させると卵母細胞 NHE活性は著しく減少した. これらの結果から, NHEが生理的活性を発揮するためには CHPの結合が必須であることが明らかになった<sup>(33)</sup>. したがって, さまざまな組織における NHE活性はほぼ NHE/CHP複合体によって発揮されるものと考えられる.

4つの EFハンドのうち,  $\text{Ca}^{2+}$  が結合するのは実際には C末端側の 2つだけである ( $K_d \sim 90 \text{ nm}$ ). CHPが

NHE1に結合すると  $\text{Ca}^{2+}$  親和性が増加し, CHP/NHE1複合体は生理的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ ) よりもはるかに低い  $\text{Ca}^{2+}$  に対する解離定数  $K_d \sim 2 \text{ nm}$ を示すようになる. したがって, CHPの EFハンドは  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとしては機能せず, 内在する  $\text{Ca}^{2+}$  は CHPの機能を保持する構造的な役割をもつと考えられる<sup>(34)</sup>. 他方, CHP2も生理的活性を発揮させる点では CHP1と共通しているが, CHP2は癌細胞の高い細胞内 pHの維持に関与することを示唆する結果を得ている<sup>(35)</sup>. 筆者らはいくく最近, CHP2とその NHE1結合領域との複合体の結晶構造を決定した. この複合体の三次元構造モデルから, CHPには中央に大きな疎水性の高い溝があり, そこに NHE1の CHP結合領域を形成する  $\alpha$ ヘリックスが疎水性残基の面を向けてみごとになすぼりと収まっていることが見いだされた. この“ホットドッグ様構造”はこのファミリーの多くの  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質で見られるが, それらの溝の形と大きさが厳密にターゲット分子を選択するうえで重要であることが推察された.

\*

本稿では, トランスポータ研究の最近の動向と SLC9ファミリーについて, 筆者らによって得られた知見を中心に述べてきた. ポストゲノム時代に始まったタンパク質結晶化競争でいくつかの細菌のトランスポータの結晶構造が解かれた. しかし, 筆者らが本稿で力説したように, 動物細胞のトランスポータは単一ポリペプチドで機能する例はむしろ少なく, 多くの場合活性調節因子, scaffoldingタンパク質, 他の膜タンパク質などと複合体を形成することによってようやく完全な生理機能を発揮できるのが普通である. これからのトランスポータ研究は疑いなく, 複合体の構造と機能を理解すべき時代に入る. その一つの研究のゴールとして, トランスポータ複合体結晶構造解明があるが, 道のりは険しいだろう.

謝辞: NHEに関する成果は国立循環器病センター研究所循環分子生理部で長きにわたって得られたものであり, 携わったすべての方々に感謝いたします.

#### 文献

- 1) J. H. Morais-Cabral, Y. Zhou & R. MacKinnon: *Nature*, 414, 37 (2001).
- 2) Y. Zhou, J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman & R. MacKinnon: *Nature*, 414, 43 (2001).
- 3) C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura & H. Ogawa: *Nature*, 405, 647 (2000).
- 4) C. Toyoshima, H. Nomura & T. Tsuda: *Nature*, 432, 361 (2004).
- 5) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita & A. Yamaguchi: *Nature*, 419, 587 (2002).

- 6) J. Abramson, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback & S. Iwata: *Science*, **301**, 610 (2003).
- 7) Y. Huang, M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer & D. N. Wang: *Science*, **301**, 616 (2003).
- 8) A. Yamashita, S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin & E. Gouaux: *Nature*, **437**, 215 (2005).
- 9) C. Hunte, E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan & H. Michel: *Nature*, **435**, 1197 (2005).
- 10) T. Yamaguchi, G. S. Aharon, J. B. Sottosanto & E. Blumwald: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16107 (2005).
- 11) S. Wakabayashi, M. Shigekawa & J. Pouyssegur: *Physiol. Rev.*, **77**, 51 (1997).
- 12) J. Orłowski & S. Grinstein: *Pflugers Arch.*, **447**, 549 (2004).
- 13) C. Sardet, A. Franchi & J. Pouyssegur: *Cell*, **56**, 271 (1989).
- 14) P. J. Schultheis, L. L. Clarke, P. Meneton, M. Harline, G. P. Boivin, G. Stemmermann, J. J. Duffy, T. Doetschman, M. L. Miller & G. E. Shull: *J. Clin. Invest.*, **101**, 1243 (1998).
- 15) L. R. Gawenis, J. M. Greeb, V. Prasad, C. Grisham, L. P. Sanford, T. Doetschman, A. Andringa, M. L. Miller & G. E. Shull: *J. Biol. Chem.*, **280**, 12781 (2005).
- 16) P. J. Schultheis, L. L. Clarke, P. Meneton, M. L. Miller, M. Soleimani, L. R. Gawenis, T. M. Riddle, J. J. Duffy, T. Doetschman, T. Wang, G. Giebisch, P. S. Aronson, J. N. Lorenz & G. E. Shull: *Nature Genet.*, **19**, 282 (1998).
- 17) S. M. Bell, C. M. Schreiner, P. J. Schultheis, M. L. Miller, R. L. Evans, C. V. Vorhees, G. E. Shull & W. J. Scott: *Am. J. Physiol.*, **276**, C788 (1999).
- 18) X. Q. Gu, H. Yao & G. G. Haddad: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C496 (2001).
- 19) M. Karmazyn, X. T. Gan, R. A. Humphreys, H. Yoshida & K. Kusumoto: *Circ. Res.*, **85**, 777 (1999).
- 20) S. N. Orlov, N. C. Adragna, V. A. Adarichev & P. Hamet: *Am. J. Physiol.*, **276**, C511 (1999).
- 21) S. P. Denker, D. C. Huang, J. Orłowski, H. Furthmayr & D. L. Barber: *Mol. Cell*, **6**, 1425 (2000).
- 22) S. P. Denker & D. L. Barber: *J. Cell Biol.*, **159**, 1087 (2002).
- 23) K. Petrecca, R. Atanasiu, S. Grinstein, J. Orłowski & A. Shrier: *Am. J. Physiol.*, **276**, H709 (1999).
- 24) S. Wakabayashi, P. Fafournoux, C. Sardet & J. Pouyssegur: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2424 (1992).
- 25) S. Wakabayashi, T. Pang, X. Su & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **275**, 7942 (2000).
- 26) S. Wakabayashi, T. Hisamitsu, T. Pang & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **278**, 43580 (2003).
- 27) S. Wakabayashi, T. Hisamitsu, T. Pang & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **278**, 11828 (2003).
- 28) T. Hisamitsu, T. Pang, M. Shigekawa & S. Wakabayashi: *Biochemistry*, **43**, 11135 (2004).
- 29) B. Bertrand, S. Wakabayashi, T. Ikeda, J. Pouyssegur & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **269**, 13703 (1994).
- 30) S. Wakabayashi, B. Bertrand, T. Ikeda, J. Pouyssegur & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **269**, 13710 (1994).
- 31) D. Fuster, O. W. Moe & D. W. Hilgemann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10482 (2004).
- 32) T. Ikeda, B. Schmitt, J. Pouyssegur, S. Wakabayashi & M. Shigekawa: *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 295 (1997).
- 33) T. Pang, X. Su, S. Wakabayashi & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **276**, 17367 (2001).
- 34) T. Pang, T. Hisamitsu, H. Mori, M. Shigekawa & S. Wakabayashi: *Biochemistry*, **43**, 3628 (2004).
- 35) T. Pang, S. Wakabayashi & M. Shigekawa: *J. Biol. Chem.*, **277**, 43771 (2002).

## プロフィール

白川 太郎 (Taro Shirakawa) <略歴>昭和58年京都大学医学部医学科卒業後、大阪大学医学部助手、米国オックスフォード大学医学部呼吸器講師、英国ウェールズ大学医学部助教授を経て、現在、京都大学大学院医学研究科教授<研究テーマと抱負>アレルギー遺伝子、代替医療、健康科学<趣味>温泉巡り

新藤 一敏 (Kazutoshi Shindo) <略歴>1987年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程修了/同年キリンビール(株)医薬探索研究所/2002年日本女子大学家政学部食物学科講師/2005年同助教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>生変換技術による新規有用物質の創製、食品関連新規生理活性物質の探索<趣味>ジョギング、ガーデニング

杉山 達夫 (Tatsuo Sugiyama) Vol. 32, No. 5, p. 345 参照、現在、中部大学生命健康科学研究所教授

外内 尚人 (Naoto Tonouchi) <略歴>昭和59年東京大学農学部農芸化学科卒業/61年同大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程修了/同年味の素(株)研究員/平成5年(株)バイオポリマー・リサーチ (出向)/14年(社)農林水産先端技術産業振興センター (出向)、現在にいたる。農博<研究テーマと抱負>遺伝子組換え作物・食品とその安全性について、国民理解の促進<趣味>全国各地への旅行。

西村いくこ (Ikuko Hara-Nishimura) <略歴>1979年大阪大学大学院理学研究科生理学専攻修士課程修了(理博)/1991年基礎生物学研究所助手/1997年同助教授/1999年京都大学大学院理学研究所教授、現在にいたる<研究テーマと抱負>植物細胞のオルガネラの機能的な分化メカニズムの解明。植物のオルガネラは環境や生長段階に応じて分化する。この能力が、移動できない植物の優れた環境適応力を支えていると言っても過言ではない。この様な、しなやかな植物の生き方に学びたいと

考えている。

久光 隆 (Takashi Hisamitsu) <略歴>2000年昭和大学大学院薬学研究所薬理学専攻修士課程修了後、上記研究室に1年間在籍を経て、国立循環器病センター研究所循環分子生理部、現在にいたる<研究テーマと抱負>NHE 活性制御機構、特にpHセンサーの解明、トランスポータの基質輸送機構<趣味>魚釣り、サイクリング、映画鑑賞、洗車

広瀬 直也 (Naoya Hirose) <略歴>平成7年東北大学農学部農芸化学科卒業/11年日本学術振興会特別研究員/12年東北大学大学院農学研究科博士課程修了/13年理化学研究所植物科学研究センター研究員、現在にいたる。この間、平成12年フランス国立農業研究所博士研究員<研究テーマと抱負>サイトカイニンの輸送と作用の制御機構の解明<趣味>建築遺跡巡りを兼ねた鉄道旅行

## PPARsの内因性リガンド

井上裕康

## Endogenous ligands for PPARs

Hiroyasu Inoue

Department of Food and Nutrition, Nara Women's University

## Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), a family of three nuclear receptors/transcription factors, are widely recognized as molecular targets for drugs against lifestyle-related disease. In spite of intensive search for natural ligands, no truly endogenous ligand has been identified as yet. Rather, these results have lead to the suggestion that PPAR may act as various lipid sensors. Namely, the ligand binding modes of PPARs would be similar to those of odorant receptors or substrate-binding modes of drug-metabolizing enzyme P450 family. In this brief review, free fatty acids, lipid mediators in arachidonate cascade and polyphenolic compounds such as resveratrol will be discussed as natural ligands for PPARs.

**Key words:** cyclooxygenase, PPAR, oleylethanolamide, resveratrol, polyphenol

## はじめに

PPARは生活習慣病に対する薬剤標的として注目を集めている。PPARはビタミンD受容体やグルココルチコイド受容体と同様、核内受容体ファミリーに属し、現在3種類のサブタイプ $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ( $\beta$ )が知られており、それぞれ異なった生理作用に寄与している<sup>1)</sup>。PPARのリガンド結合部位については結晶構造が決定され、ほかの核内受容体に比べ、リガンド結合ポケットが大きいと報告された<sup>2)</sup>。この特徴が様々な脂溶性の物質をリガンドとして結合するPPARの性質に関与しており、一般的なホルモンと受容体の関係とは異なっていると考えられる。したがって内因性リガンド候補は幾つか報告されてい

るが、'真の'内因性リガンドであるかどうかは明らかではない。考え方を変えると、'真の'内因性リガンドは単一には存在せず、薬物代謝系酵素であるP450の基質に対する結合様式や嗅覚受容体のリガンドに対する結合のように、様々な脂溶性物質を受容して、その情報を生体内に伝えている可能性も残されている。

一方、3つのPPARサブタイプのリガンド結合は異なっており、その相違がPPARの生体内での発現分布の相違とともにそれぞれの生理作用に寄与している。更にリガンド存在下でPPAR $\gamma$ は不安定化するのに対し、PPAR $\alpha$ は逆に安定化するとの報告があり、共通のリガンドに対しても異なるPPARは異なる働きをもつ可能性がある。

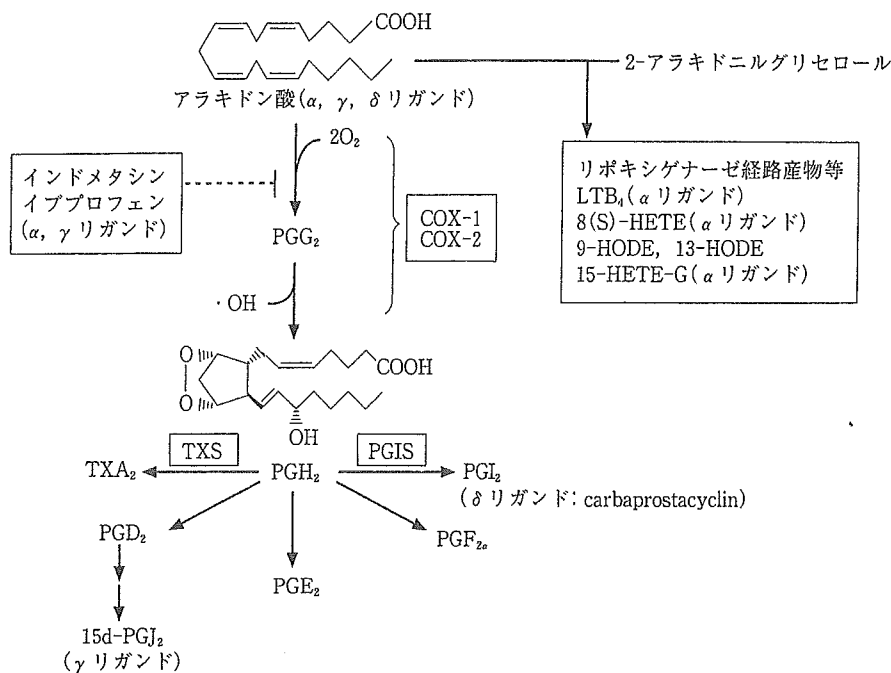


図1 シクロオキシゲナーゼ経路と PPAR リガンド

プロスタグランジン産生系などアラキドン酸代謝物、およびその阻害剤の中に、PPARのリガンドとして働くものがいくつか報告されている。ただし、これらはPPARに対する結合能で検出され、高濃度でのみ働くものも多い。したがって、これらが実際に生体内でPPARを介して機能しているかどうかは更に検討が必要である。

## 1. 脂肪酸

必須脂肪酸であるリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸はいずれのPPARに対しても生理的なりガンド候補となっている。パルミチン酸やステアリン酸など飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸はPPAR $\alpha$ により親和性が高い。これは生理的には肝臓での飽和脂肪酸の代謝にPPAR $\alpha$ が主に関与することを示唆している。構造上ではPPAR $\alpha$ の結合ポケットがPPAR $\gamma$ に比較して疎水性が高いことが報告されており、その性状が水酸化された遊離脂肪酸はPPAR $\alpha$ よりPPAR $\gamma$ に対して親和性が高いことを説明できるかもしれない。この知見に関連して、酸化LDLの構成成分である種々の物質が主にPPAR $\gamma$ のりガンドになることが報告されている。これらの脂肪酸に対するPPARの親和性はnMオーダーを示す合成りガンド類に対する親和性に比べると低

い。しかし細胞内で脂肪酸を基質とするアシルCoA合成酵素のKm値は20 $\mu$ Mであり、この値は脂肪酸のPPARに対する親和性と同程度である。また多種類の脂肪酸を組み合わせた細胞内の脂肪酸濃度は十分に高く、PPARが血中脂肪酸のセンサーとして働くとする考え方もある。一方、遊離脂肪酸は血液中ではアルブミンなどに結合しており、多量に細胞に入り込むことは考えにくい。したがって遊離脂肪酸が細胞内でのどのような機構で輸送されPPARのりガンドとして働くのか、今後の検討を要する。

## 2. プロスタグランジン(PG)とロイコトリエン類

図1にCOX経路および、リボキシゲナーゼ(LOX)経路でPPARのりガンドとして働く可能性があるものを示す。PGD<sub>2</sub>の代謝物である特殊なPG(15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub>以下、略して15d-PGJ<sub>2</sub>)はPPAR $\gamma$ の内因性りガンド候補として