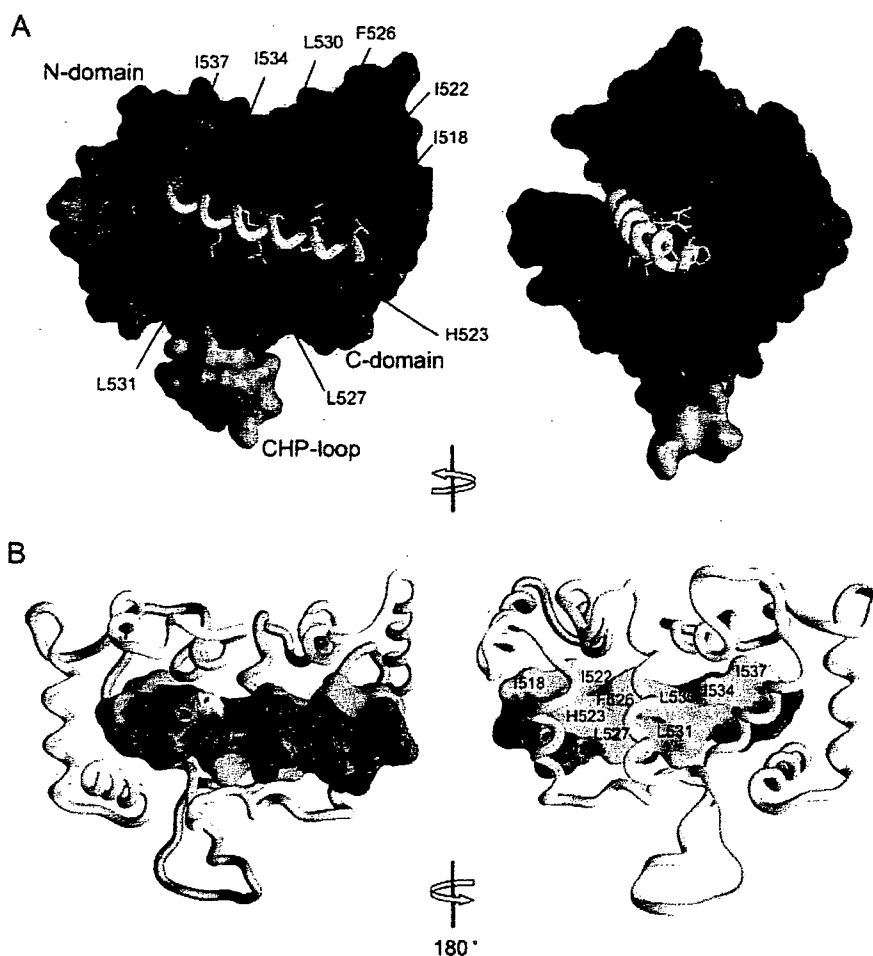


## Solution Structure of the NHE1-CHP1 Complex



**FIGURE 4. Molecular surface of the NHE1-CHP1 complex.** *A*, molecular surface of CHP1 and backbone tube representation of NHE1 with yellow stick that shows the hydrophobic side chains. The N- and C-terminal domains of CHP1 are colored in blue and magenta, respectively. *B*, molecular surface of NHE1 and backbone tube representation of CHP1. Hydrophobic, acidic, and polar residues are colored in yellow, red, and blue, respectively.

accommodate different targets. Although target multiplicity has been reported in the case of CHP1, it seems to possess more limited binding modes than CaM. One notable feature of CHP1 that illustrates its difference to CaM has to do with the interdomain interaction. This interaction restricts domain orientation, a phenomenon absent in CaM. In our CHP1 structure, residue Leu-62 of the N-terminal domain participates in a hydrophobic interaction with residues Val-138 and Met-141 of the C-terminal domain, and residue Ala-69 of the N-terminal domain interacts with residue Leu-122 of the C-terminal domain. A side-by-side interaction mediated by four EF-hands has also been reported to take place with voltage-gated potassium channel (Kv)-interacting protein (KChIP) (45) and with CNA-CNB (46, 47) (Fig. 5A).

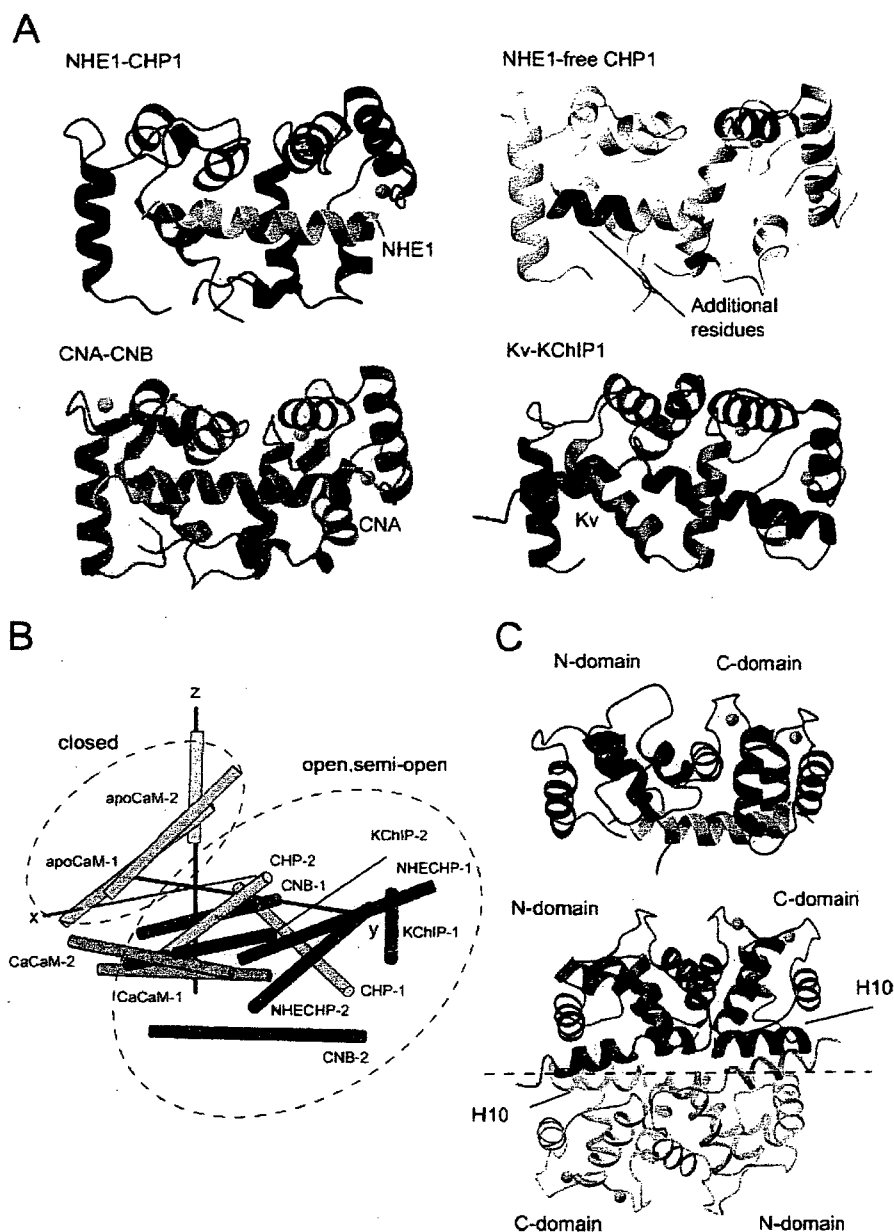
The atomic r.m.s. difference of well fitted parts between CHP1 complexed with NHE1 and CNB complexed with CNA (Protein Data Bank code 1AUI) is 2.7 Å, indicating that the fit is not very good, although the topology is identical with a high Z-score of 11.8 from a distance matrix alignment (DALI) search. The r.m.s. deviation value improves to 1.7 Å when only the N-terminal domains are superimposed, and it is 1.8 Å when only the C-terminal domains are superimposed. This indicates

that the higher r.m.s. deviation for both domains originates from an interdomain swiveling between NHE1-CHP1 and CNA-CNB, although both proteins bind cognate targets in a side-by-side manner. Similarly domain swiveling was observed between NHE1-bound and NHE1-free CHP1. Swiveling of the N- and C-terminal domains could create a binding surface for cognate targets.

**Comparison with Other EF-hands—** It is interesting to note that both EF-1 and EF-2 adopt an open conformation in NHE1-bound CHP1 without  $\text{Ca}^{2+}$ . This is especially evident when comparing the angles between the EF-hand helices. In Fig. 5B, a graphical view of the interhelical angles between the first and second helices of EF-1 and EF-2 of apoCaM (a typical closed conformation),  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (a typical open conformation, CNB), KChIP1, NHE1-bound CHP1, and NHE1-free CHP1 is displayed using a vector geometry mapping method (48, 49). The first helices of the EF-hands are superimposed along the z axis, and the spatial localization of the second helices are shown as a cylinder. This indicates that both EF-1 and EF-2 of NHE1-bound CHP1 adopt an open conformation, whereas EF-1 and EF-2 of NHE1-

free CHP1 adopt an open and semiopen conformation, respectively (Fig. 5B and supporting information S1). This implies that EF-1 and EF-2 adopt a constitutively open conformation. However, it should be noted that the hydrophobic cleft of the N-terminal domain of free CHP1, as revealed by the crystal structure, is plugged by additional linker residues (Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Glu-His) (23) derived from the expression vector, partly mimicking the NHE1 helix (Fig. 5A). Binding of the vector-derived linker might have facilitated adoption of the open and semiopen conformations of EF-1 and EF-2, respectively. Therefore, the possibility of a "closed to open" conformational transition of EF-1 and EF-2 remains to be evaluated.

The binding of EF-hands in an open conformation without  $\text{Ca}^{2+}$  to target molecules has been found following crystal structure investigations of a Kv-KChIP1 in which the Kv fragment is covalently linked to the C terminus of KChIP1 (45). In this case, the Kv fragment binds to EF-1 and EF-2 of the N-terminal domain of KChIP1 through hydrophobic interactions (Fig. 5A). Of particular note, KChIP1 forms a dimer utilizing the surface formed by the Kv peptides and helix 10 of the C-terminal domain of KChIP1 in contrast to NHE1-CHP1, which exists as a monomer (Fig. 5C). The interhelix angles of EF-1 and EF-2



**FIGURE 5. Structure comparisons.** A, ribbon representation of NHE1-CHP1, rat NHE1-free CHP1 (2CT9) in which additional residues from the expression vector interacting with the N-terminal domain (LAAALEH) are depicted in *magenta*, CNA-CNB (1AU), and Kv-KChIP1 (1S6C). Protein Data Bank entries are shown in parentheses. B, vector geometry mapping of EF-1 and EF-2 apocalmodulin,  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin, calcineurin B, Kv-KChIP1, NHE1-bound CHP1, and NHE1-free CHP1 are denoted as "apoCaM," "CaCaM," "CNB," "KChIP," "NHECHP," and "CHP," respectively. Hyphenated numbers 1 and 2 denote EF-1 and EF-2, respectively, for each protein. C, comparison of the KChIP1 dimer and CHP1 structures colored in *brown* and *blue*, respectively. Bound Kv and NHE1 are colored in *pink* and *green*, respectively. The dimer interface of KChIP1 is shown as a *dashed line*, and one molecule of the dimer is shown in *light colors*. KChIP1 and CHP1 are depicted in the same orientation. In A and C, the N- and C-terminal regions,  $\alpha A$ , and the CHP loop of CHP1 are not shown in the comparison for reasons of clarity.

are  $82^\circ$  and  $72^\circ$ , respectively (supporting information S1), which are slightly larger than those of CHP1. A dimeric interaction in addition to binding of the Kv fragment may contribute to broadening of the cleft constituted by EF-1 and EF-2.

CHP1 shares 18% sequence identity with KChIP1, and the folding topology is almost identical (Fig. 5A). However, the target recognition mechanism differs from that of KChIP1 as judged from the determined structures. KChIP1 belongs to the

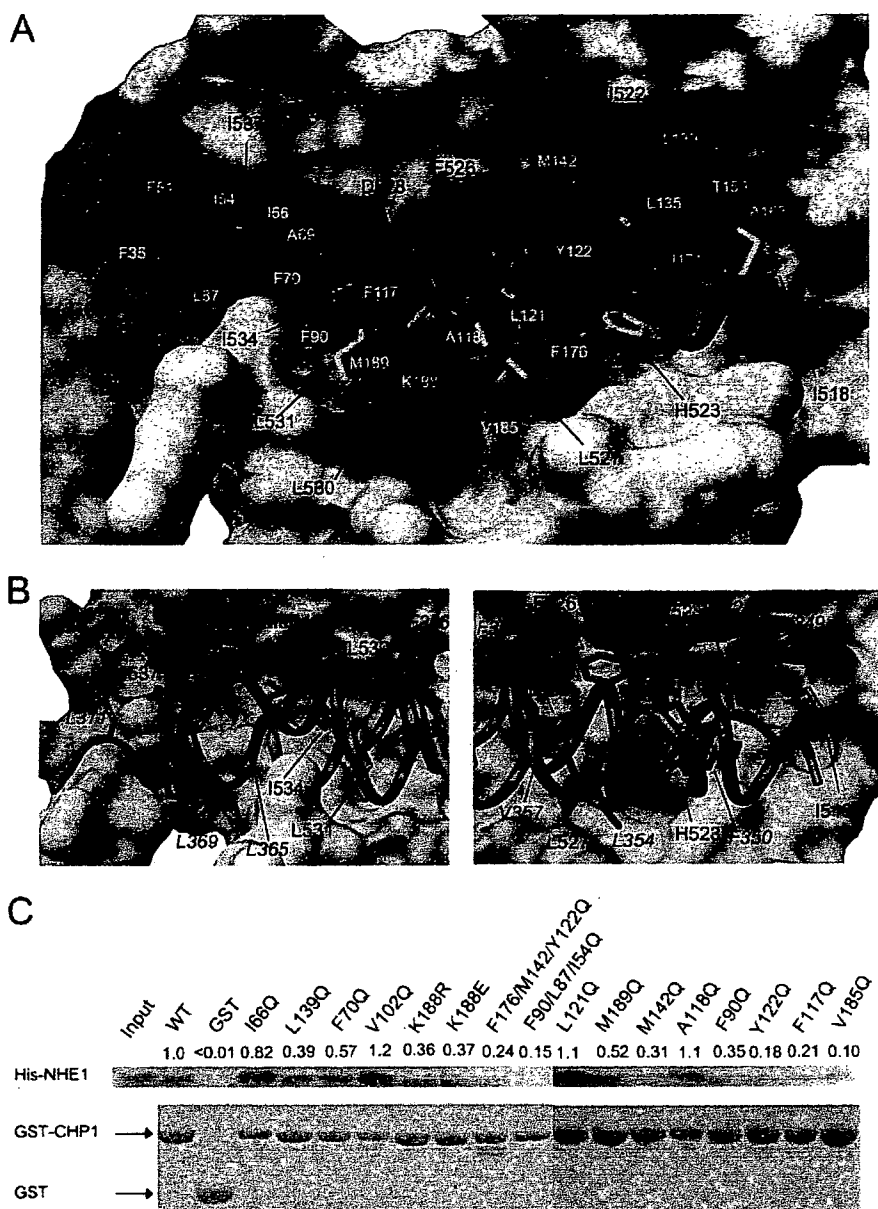
extensively studied NCS1 family, which act as important regulators of various functions among certain higher eukaryotes (50). We propose that the NHE1-CHP1 interaction represents a novel binding mode utilized throughout the four-EF-hand proteins, which constitute a distinct subfamily to the NCS1 family. Furthermore detailed comparison of the binding mode of CHP1 and CNB will be presented below.

**The CHP1-NHE1 Interface**—The protein-protein interface consists of an extensive hydrophobic concave CHP1 undersurface and an apolar NHE1 surface. The concave undersurface spans both the N- and C-terminal domains of CHP1. The total surface area buried at the interface is  $2338 \text{ \AA}^2$ , slightly smaller than the value of  $2625 \text{ \AA}^2$  for the interface between CNA and CNB (Protein Data Bank code 1AU). Approximately more than 90% of the total buried surface area between NHE1 and CHP1 is hydrophobic, similar to the complexed structure of CNA and CNB.

The interface formed between NHE1 and CHP1 includes methyl-containing and aromatic hydrophobic residues. The residues of the N-terminal domain of CHP1, Ala-69, Phe-90, Ile-66, Thr-86, Leu-87, Phe-35, and Leu-54, comprise a hydrophobic cleft that interacts with the apolar surface formed by the side chains of NHE1 residues Leu-530, Ile-534, and Ile-537. Additionally the side chain of NHE1 Leu-531 expands the hydrophobic area interacting with CHP1 Phe-90 (Fig. 6A). The C-terminal domain residues of CHP1, Ala-163, Thr-159, Leu-139, Leu-135, Tyr-122, Phe-176, Ile-171, Phe-117, Ala-118, and Leu-121, constitute a continuous hydrophobic cleft that interacts with the N-terminal portion of

NHE1 helix residues Ile-518, Ile-522, and Phe-526, which protrude at the apolar side. NHE1 residues Leu-527 and His-523 make additional hydrophobic contact with CHP1 residues Tyr-122, Phe-176, and Val-185 (Fig. 6A). These interface-forming hydrophobic residues are well conserved within NHE and CHP isoforms, reflecting the importance of these interactions (Fig. 1B). Furthermore the acidic side chain of Asp-528 at the center of NHE1 helix seems to form a salt bridge with the basic side

## Solution Structure of the NHE1-CHP1 Complex



**FIGURE 6. Noncovalent interactions at the NHE1-CHP1 interface and contribution to the overall stability of the complex.** A, molecular surface of CHP1 and backbone tube representation of NHE1 with yellow and red sticks that show hydrophobic and acidic side chains, respectively. Hydrophobic and basic surface residues of CHP1 are colored in orange and blue, respectively. B, superposition of NHE1-CHP1 and CAN-CNB (Protein Data Bank code 1AU). NHE1 and CNA are shown in green and magenta, respectively, and the molecular surface of only CHP1 is depicted for clarity. Complex-forming hydrophobic residues of NHE1 and CNA are shown as sticks and are labeled. CNA residues are represented in italics. The left-hand image and the right-hand image are close-up views of the N- and C-terminal domains. C, binding of His-NHE1 peptide to GST-CHP1 mutants in an *in vitro* pull-down assay. Bound peptide was separated via SDS-PAGE, blotted to a membrane, and then visualized using Ni-NTA-conjugated alkaline phosphatase (top). The amount of GST-CHP1 mutant used was estimated by Coomassie Blue staining (bottom) for calibration. The binding of NHE1 peptide to GST-CHP1 mutants was quantified and expressed as a ratio of binding of wild-type protein at the top of the gel images.

chain of CHP1 Lys-188. The presence of this interaction was observed in 10 of the final 20 NMR structures derived using the MONSTER server (51), which identifies interacting residues and assigns the nature of those interactions based on the structure. These residues are also conserved (Figs. 1, A and B, and 6A).

NHE1 binding orientation relative to CHP1 is probably established by surface complementarity that comprises the hydrophobic surfaces of NHE1 and CHP1. NHE1 side chains of

Ile-534 and Ile-537 protrude into the shallow cleft made by the CHP1 N-terminal domain. Meanwhile NHE1 aromatic side chains of His-523 and Phe-526 protrude into the deep cleft of the CHP1 C-terminal domain (Fig. 6A). This deep cleft allows enough space so that they can interact with the bulky side chains of NHE1. The difference between the shapes of the domains is critical for NHE1 binding orientation.

Notably the shape of the interaction surfaces of NHE1-CHP1 and CNA-CNB differs. The spatial arrangement of NHE1 and CNA residues that contribute to form the interaction surfaces differs for each (Fig. 6B). Only Val-349, Phe-350, and Val-357 of CNA are located at equivalent positions to Ile-522, His-523, and Leu-530 of NHE1 unlike other residues. Clearly Trp-352 and Phe-356 of CNA that interact with the roof of the hydrophobic cleft formed by CNB are missing in NHE1. Furthermore the interactions mediated by the C-terminal stretch region of CNA, where Leu-369 and Leu-371 protrude, are absent in NHE1. On the other hand, the corresponding residues to Phe-526 and Ile-518 of NHE1 are absent in CNA.

Consequently the interaction mechanism dominated by hydrophobic interactions through amphipathic helices and four EF-hands is common in both complexes, but their shape differs. This surface complementarity in terms of a knobs-into-hole mode of interaction defines the binding specificity of these proteins, although the folding topology is identical.

**Correlation with Mutagenesis Studies**—The solution structure of the CHP1-NHE1 complex is essentially consistent with previous mutagenesis studies concerning

NHE1. Co-immunoprecipitation experiments showed that the 4Q mutant of NHE1, in which Phe-526, Leu-527, Leu-530, and Leu-531 are substituted with glutamine, displayed no binding to CHP1, whereas the I518Q/I522Q NHE1 double mutant displayed some binding albeit with decreased affinity (3). Our structure determination revealed that Phe-526, Leu-527, Leu-530, and Leu-531 form a hydrophobic core that interacts with the center of the hydrophobic cleft of the C-terminal domain of

CHP1, whereas Ile-518 and Ile-522 interact with the rim of the hydrophobic cleft of the C-terminal domain of CHP1 (Figs. 4B and 6A). Deletion mutagenesis indicated that NHE1 (residues 510–575) retained binding affinity similar to the wild-type protein, implying that the juxtamembrane region of NHE1 comprising residues 503–509 is unimportant for CHP1 binding (3). These residues were found to be unstructured in the present study and form no direct contact with NHE1.

The binding activity of NHE1 (residues 530–656) lacking the N-terminal segment was found to be completely impaired (3). Our NHE1-CHP1 complex structure shows that an absence of residues preceding Leu-530 results in almost complete loss of interaction between NHE1 and the C-terminal domain of CHP1, whereas the many hydrophobic interactions mediated by NHE1 residues Leu-530, Leu-531, Ile-534, and Ile-537 are retained (Fig. 6A). This indicates that interaction of the N-terminal residues of NHE1 and the C-terminal domain of CHP1 is indispensable in maintaining the NHE1-CHP1 complex. Namely this part of the interaction plays a dominant role in NHE1-CHP1 complex formation.

CHP1 was subjected to site-directed mutagenesis in an effort to reveal detailed individual contributions of interfacial residues toward the overall stability of the NHE1-CHP1 complex. We selected three categories of residues in CHP1: 1) residues that comprise the floor of the hydrophobic pocket, Phe-70, Phe-90, Phe-117, Ala-118, Leu-121, Tyr-122, and Met-189; 2) residues forming the rim of the pocket, Ile-66, Leu-139, Met-142, and Val-185; and 3) a residue forming the salt bridge, Lys-188. A noninteracting solvent-exposed residue, Val-102, as the positive control and a triple mutation involving hydrophobic residues Phe-90/Leu-87/Leu-54 and Phe-176/Met-142/Tyr-122 as the negative control were prepared.

Dramatic effects were observed in terms of CHP1 binding to NHE1 with mutations F117Q, Y122Q, and V185Q (Fig. 6C). We expected the floor-forming residues located at the bottom of the cleft to be critical for the interaction, but the rim-forming residue Val-185 showed significant reduction similar to the negative control. Based on the solution structure of the NHE1-CHP1 complex, it was appeared that Phe-117, Tyr-122, and Val-185 were confined to the C-terminal domain of CHP1 and were packed against the apolar side of NHE1. This suggests that the C-terminal hydrophobic cleft represents a mutation hot spot, implying that it plays a key role in the NHE1-CHP1 interaction. This result is consistent with the NHE1 deletion result indicating that interaction between the N-terminal segment of NHE1 and the C-terminal domain of CHP1 is dominant. This represents a unique feature of the NHE1-CHP1 interaction.

Although mutation of residues possibly involved in salt bridge formation such as K188E and K188R resulted in a marked decrease in binding interaction, the effect was not strong, and the charge-reversing effect of K188E was unclear. Thus, it appears that although this salt bridge contributes to NHE1-CHP1 complex formation, it is not the main force possibly because this bond is exposed to solvent (Fig. 6A), and therefore solvation could weaken the strength of the interaction.

**Role of CHP1**—NMR investigations of NHE1 complexed with CHP1 revealed that the juxtamembrane region comprising res-

idues 503–517 was unstructured in solution. This region is rich in basic residues with a previous study reporting that NHE1 comprising residues 506–576 bound to PIP<sub>2</sub> *in vitro* (13). In addition, residues 513–520 and 556–564 might represent PIP<sub>2</sub> binding sites (13). Accordingly it is likely that this juxtamembrane region (residues 503–517) following the last transmembrane helix (H12, residues 478–499) is incapable of forming a continuous straight helical structure into the cytoplasm due to interaction with the membrane. Rather the overall structure of NHE1 presumably turns or bends toward the cytoplasmic membrane following a PIP<sub>2</sub>-mediated interaction. Assuming that flanking regions of the helix, residues 513–520 and 556–564, attach to the membrane (PIP<sub>2</sub>) (13), the helix and CHP1 should be located immediately beneath the cytoplasmic membrane.

Furthermore it has been reported that NHE1 acts as a scaffold protein linked to actin filaments via ezrin-radixin-moesin proteins in addition to possessing function as an ion exchanger (52, 53). Our NMR studies revealed that the cytoplasmic helix-forming residues of NHE1 comprise residues 518–537, which showed little overlap from the previously reported ezrin-radixin-moesin binding region (512–520 and 550–565). This ensures simultaneous binding of NHE1 to CHP1 and ezrin-radixin-moesin proteins.

The juxtamembrane region of NHE1 forms a particular tertiary or quaternary structure that is mediated by interactions with the membrane (PIP<sub>2</sub>), CHP1, and ezrin-radixin-moesin proteins. The overall structure of the juxtamembrane region might play an important role in NHE1 activity. The 90% loss in activity following CHP1 depletion might be due to disruption of the structure of the cytoplasmic region of NHE1 around the membrane. In fact, although this represents *in vitro* evidence, the amphipathic helix is disrupted in the absence of CHP1 based on the CD and NMR data (supporting information S2 and S3).

**Possible Mode of Regulation**—CHP1 deprivation resulted in impaired regulation of NHE1 following external stimuli, implying that CHP1 acts as regulator of NHE1 by involvement in the processing of intracellular signals derived from external stimuli. However, the regulatory mechanism remains unclear. Although it was reported that CHP1 is an *N*-myristoylated protein, CHP1 does not exert myristoyl switching in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner under normal physiological conditions because EF-3 and EF-4 constitutively bind Ca<sup>2+</sup> ions where *N*-myristoylation was not required for NHE1 binding, activation, or localization (14).

Of particular note, it was reported that CHP1 is a phosphorylated protein, although the phosphorylation sites were not determined. According to the phosphorylation prediction server NetPhos (54), the CHP1 sequence contains potential phosphorylation sites located at residues Thr-36, Ser-37, Ser-47, Ser-131, and Ser-172 (score, >0.8). Similarly the phosphorylation server Scansite (55) identified potential phosphorylation sites located at residues Thr-36, Ser-37, and Ser-172 (score, >0.5). From the determined NHE1-CHP1 structure, residues Thr-36, Ser-37, and Ser-172, predicted by both servers as potential phosphorylation sites, are located at the terminal part of the EF-hand helix or its flanking loop where the side chains of

## Solution Structure of the NHE1-CHP1 Complex

the aforementioned residues are exposed to the protein surface reinforcing the possibility of phosphorylation. Phosphorylation-induced conformational changes in CHP1 and the subsequent regulation of NHE1 activity are interesting areas that remain to be investigated.

**Conclusion**—We have determined the solution structure of the cytoplasmic region of NHE1 complexed with CHP1. Although previous biochemical analyses suggested that the hydrophobic residues of NHE1 were likely to interact with CHP1, the present study has delineated the structural basis for this interaction. The solution structure provides concrete evidence that the cytoplasmic region of NHE1 forms an amphipathic helix that interacts directly with the large concave undersurface of CHP1. This helix is disrupted in the absence of CHP1; thus the loss in activity following CHP1 depletion might be due to disruption of the structure of the juxtamembrane region of NHE1. Our structure provides a first step toward understanding the regulation of NHE1 activity. Moreover it revealed a novel target binding mechanism mediated by four EF-hands. These findings should facilitate future studies aimed at understanding the mechanism underlying recognition utilized by EF-hand proteins that are engaged in signal transduction pathways and many other molecular and cellular events. During the initial review of our manuscript, a study appeared that describes a crystal structure of the NHE1 peptide complexed with CHP2 containing  $Y^{3+}$  ions instead of  $Ca^{2+}$  (56).

**Acknowledgments**—We are grateful to Momoko Yoneyama, Hiroko Kinoshita, and Junko Tsukamoto of the Nara Institute of Science and Technology for technical assistance and Kokoro Hayashi for help in sample preparation.

### REFERENCES

1. Orlowski, J., and Grinstein, S. (2004) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 549–565
2. Lin, X., and Barber, D. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12631–12636
3. Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17367–17372
4. Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J., and Shigekawa, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13703–13709
5. Wakabayashi, S., Bertrand, B., Ikeda, T., Pouyssegur, J., and Shigekawa, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13710–13715
6. Dhanasekaran, N., Prasad, M. V., Wadsworth, S. J., Dermott, J. M., and van Rossum, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11802–11806
7. Hooley, R., Yu, C. Y., Symons, M., and Barber, D. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6152–6158
8. Voyno-Yasenetskaya, T., Conklin, B. R., Gilbert, R. L., Hooley, R., Bourne, H. R., and Barber, D. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4721–4724
9. Bianchini, L., L'Allemain, G., and Pouyssegur, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 271–279
10. Takahashi, E., Abe, J., Gallis, B., Aebersold, R., Spring, D. J., Krebs, E. G., and Berk, B. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20206–20214
11. Lehoux, S., Abe, J.-i., Florian, J. A., and Berk, B. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15794–15800
12. Yan, W., Nehrke, K., Choi, J., and Barber, D. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 31349–31356
13. Aharonovitz, O., Zaun, H. C., Balla, T., York, J. D., Orlowski, J., and Grinstein, S. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 213–224
14. Pang, T., Hisamitsu, T., Mori, H., Shigekawa, M., and Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry* **43**, 3628–3636
15. Barroso, M. R., Bernd, K. K., DeWitt, N. D., Chang, A., Mills, K., and Sztul, E. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10183–10187
16. Lin, X., Sikkink, R. A., Rusnak, F., and Barber, D. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36125–36131
17. Timm, S., Titus, B., Bernd, K., and Barroso, M. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 3473–3488
18. Matsumoto, M., Miyake, Y., Nagita, M., Inoue, H., Shitakubo, D., Take-moto, K., Ohtsuka, C., Murakami, H., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)* **130**, 217–225
19. Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue, H., and Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* **132**, 483–491
20. Pang, T., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43771–43777
21. Mailander, J., Muller-Esterl, W., and Dedio, J. (2001) *FEBS Lett.* **507**, 331–335
22. Perera, E. M., Martin, H., Seeherunvong, T., Kos, L., Hughes, I. A., Hawkins, J. R., and Berkovitz, G. D. (2001) *Endocrinology* **142**, 455–463
23. Naoe, Y., Arita, K., Hashimoto, H., Kanazawa, H., Sato, M., and Shimizu, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32372–32378
24. Yamazaki, T., Lee, W., Arrowsmith, C. H., Muhandiram, D. R., and Kay, L. E. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11655–11666
25. Matsuo, H., Kupce, E., Li, H., and Wagner, G. (1996) *J. Magn. Reson. B* **111**, 194–198
26. Muhandiram, D. R., and Kay, L. E. (1994) *J. Magn. Reson. B* **103**, 203–216
27. Clowes, R. T., Boucher, W., Hardman, C. H., Dornaille, P. J., and Laue, E. D. (1993) *J. Biomol. NMR* **3**, 349–354
28. Kay, L. E., Xu, G. Y., Singer, A. U., Muhandiram, D. R., and Formankay, J. D. (1993) *J. Magn. Reson. B* **101**, 333–337
29. Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Xu, R. X., and Fesik, S. W. (1993) *J. Biomol. NMR* **3**, 225–231
30. Neri, D., Szyperki, T., Otting, G., Senn, H., and Wuthrich, K. (1989) *Biochemistry* **28**, 7510–7516
31. Boucher, W., Laue, E. D., Campbell-Burk, S., and Dornaille, P. J. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2262–2264
32. Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., III, and Skelton, N. J. (1996) *Protein NMR Spectroscopy*, pp. 301–531, Academic Press, San Diego, CA
33. Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) *J. Biomol. NMR* **3**, 185–204
34. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR* **6**, 277–279
35. Goddard, T. D., and Kneller, D. G. (1999) *SPARKY3*, University of California, San Francisco
36. Herrmann, T., Guntert, P., and Wuthrich, K. (2002) *J. Mol. Biol.* **319**, 209–227
37. Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N., and Clore, G. M. (2003) *J. Magn. Reson.* **160**, 65–73
38. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486
39. Koradi, R., Billete, M., and Wuthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55
40. Nicholls, A., Sharp, K. A., and Honig, B. (1991) *Proteins Struct. Funct. Genet.* **11**, 281–296
41. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
42. Goda, N., Tenno, T., Takasu, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. (2004) *Protein Sci.* **13**, 652–658
43. Hoeflich, K. P., and Ikura, M. (2002) *Cell* **108**, 739–742
44. Bhattacharya, S., Bunick, C. G., and Chazin, W. J. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1742**, 69–79
45. Zhou, W., Qian, Y., Kunjilwar, K., Pfaffinger, P. J., and Choe, S. (2004) *Neuron* **41**, 573–586
46. Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., and Navia, M. A. (1995) *Cell* **82**, 507–522
47. Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W., Gastinel, L. N., Habuka, N., Chen, X., Maldonado, F., Barker, J. E., Bacquet, R., and Villafranca, J. E. (1995) *Nature* **378**, 641–644
48. Yap, K. L., Ames, J. B., Swindells, M. B., and Ikura, M. (1999) *Proteins* **37**,

## Solution Structure of the NHE1-CHP1 Complex

- 499–507
49. Yap, K. L., Ames, J. E., Swindells, M. B., and Ikura, M. (2002) *Methods Mol Biol.* **173**, 317–324
50. Burgoyne, R. D., and Weiss, J. L. (2001) *Biochem. J.* **353**, 1–12
51. Salerno, W. J., Seaver, S. M., Armstrong, B. R., and Radhakrishnan, I. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, W566–W568
52. Baumgartner, M., Patel, H., and Barber, D. L. (2004) *Am. J. Physiol.* **287**, C844–C850
53. Denker, S. P., Huang, D. C., Orłowski, J., Furthmayr, H., and Barber, D. L. (2000) *Mol. Cell* **6**, 1425–1436
54. Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362
55. Obenaus, J. C., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3635–3641
56. Ammar, Y. B., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., and Wakabayashi, S. (2006) *EMBO J.* **25**, 2315–2325



## 特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

動物細胞  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体：分子から疾患まで

若林 繁夫, 久光 隆, ユセフ・ベンアマー,  
中村 (西谷) 友重, 岩田 裕子

細胞内 pH,  $\text{Na}^+$ , 細胞容積の調節はあらゆる生物の生存に必須である。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (NHE,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, SLC9 ファミリーともいう) はこれらの細胞機能に関与する主要なトランスポーターの一つである。NHE によるイオン輸送はホルモン・増殖因子・浸透圧変化等さまざまな細胞外シグナルによって調節されている。NHE はイオン環境整備の担い手として重要であるばかりでなく、細胞内情報伝達の形質膜における最終エフェクター分子としても興味深い研究対象となっている。また、NHE の顕著に発達した制御システムは心疾患や筋変性疾患などのさまざまな病態と密接に関連しており、その制御機構の解明は新しい治療戦略につながるという意味でも重要である。本稿では、NHE によるイオン輸送とその制御機構、必須結合タンパク質カルシニューリン B 様タンパク質 CHP と NHE ペプチド複合体の結晶構造、筋ジストロフィー症などの筋変性疾患との関連について、著者らの最近の成果を中心に概説したい。

## 1. はじめに

トランスポーターは脂質二重層という壁を越えて物質を選択的に輸送するという驚くべき機能を持ったタンパク質である。生細胞、膜小胞あるいは再構成リピッド小胞を用いて、たとえばラジオアイソトープでラベルした基質の取り込み実験をしたことがある人なら、率直にそのような感想を持つに違いない。学生時代に心筋細胞を用いて $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み実験でその高い活性を目にして、この輸送がタンパク質によって行われていることを知ったとき、「膜を隔てて、どうやってイオンが運ばれるのだろうか？」というなんとも魅惑的なテーマにはまっていった。今回の総説のテーマである  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (NHE) は  $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を

交換輸送するトランスポーターであるが、輸送のメカニズムもさることながら、それにもまして興味深いのはその巧妙な活性調節の機構であり、またそれがこの輸送体と疾患との関係を語るうえでの重要なベースにもなっている。今回の特集号では、著者らが最近5年程の間で新たに得た知見を中心に概説し、NHE という魅力的なトランスポーターについて少しでも読者の皆さんに知って頂けたらと思う。

## 2. NHE の構造と機能

## 2-1. 分子種と生理機能

$\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を交換輸送するトランスポーターは原核細胞から真核細胞まで、形質膜・内膜を問わず、細胞膜に広く存在する<sup>1)</sup>。1989年にヒト NHE1 が最初にクローニングされ、NHE ファミリーに属する分子種としては本稿執筆時点で11のアイソフォームが報告されている (NHE1-11, SLC9A1-11)。NHE1-5 が細胞の形質膜、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持つと予想されている。NHE ファミリータンパク質分子は、構造的・機能的に異なる大きな三つのドメインに分けることができる (図 1A)。すなわち、膜貫通

国立循環器病センター研究所循環分子生理部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers: from molecule to disease  
Shigeo Wakabayashi, Takashi Hisamitsu, Youssef Ben Ammar, Tomoe Y. Nakamura-Nishitani and Yuko Iwata (Department of Molecular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

ヘリックスを含み、イオン輸送を担う約500残基からなる比較的保存されたアミノ(N)末端側の膜結合ドメインと、イオン輸送を制御すると考えられる約300残基からなる相同性の低いカルボキシル(C)末端側の細胞質ドメインである。最近見出されたNHE10およびNHE11では、通常細胞質ドメインと考えられていたC末端側領域にさらに新たな膜貫通ドメイン、サイクリックヌクレオチド結合モチーフおよび膜電位センサーの存在が予想されており、その詳しい解析が待たれる。さて、著者らが主として扱っているNHE1はあらゆる組織に普遍的に発現するタイプであり、細胞内pH(pH<sub>i</sub>)、細胞内Na<sup>+</sup>濃度([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>)、細胞容積の制御といったいわば細胞のイオン恒常性を維持する生理機能を持つ。さらに、NHE1は、ホルモン、増殖因子や浸透圧変化などの外的シグナルによって活性化を受け、細胞内アルカリ化および[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>上昇に寄与する。後述するように、このNHE1の活性化は心疾患を含むさまざまな疾病におけるリスクファクターにもなり得るので、そのメカニズムの解明は病態を理解するうえでも重要である。外的シグナルによるNHE1活性の調節は、細胞質ドメインに結合するさまざまな制御因子の結合・解離あるいはリン酸化などを通じて、最終的には後述するpHセンサーの感受性変化によって起こると考えられているが、全貌はまだ明らかではない。

## 2-2. ダイマー形成

他の多くのトランスポーターと同様に、NHE1がオリゴマーを形成することは以前から知られていた。アミノ基架橋剤DSS処理によって、NHE1(およびNHE3)は細胞膜上で容易に分子間架橋され、電気泳動上高分子量の位置に検出される<sup>3)</sup>。この架橋はC末端細胞質ドメインを欠失したNHE1でも起こるので、オリゴマー形成は膜貫通ドメイン間で起こると考えられた<sup>3)</sup>。しかし、NHE1の機能におけるオリゴマー形成の意義は明らかでなかった。著者らは、Cys残基を持たないNHE1をベースにCys導入変異体を数多く作成し、それらの架橋剤に対する反応性を検討した。その結果、NHE1が形質膜上で高次のオリゴマーではなくダイマーを形成することを確認した<sup>4)</sup>。さらに、細胞外のSer375をCysに置換したNHE1変異体ではSH架橋剤処理によりNHE1活性が著明に抑制されたことから、イオン輸送の際にそれぞれのサブユニットが何らかの構造変化を起こし、分子間架橋がその動きを制限したために輸送活性が阻害されたと考えた<sup>5)</sup>。このことはダイマー間の相互作用が活性調節を含む輸送活性に重要である可能性を提示している。この仮説をさらに検証するために、活性を持たない変異体E262Iを形質膜に発現させて内因性NHE1とのヘテロダイマーを形成させたとき、輸送活性はどうかを検討した。その結果、E262Iの強いドミナントネガティブ効果が検出された<sup>6)</sup>(図1B)。すなわちNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換

活性を測定する一般的な方法である細胞内酸性化後のpH<sub>i</sub>回復速度はE262Iの発現で著明に抑制され(a)、増殖因子トロンピンによるpH<sub>i</sub>上昇(NHE1の活性化)は完全に消失した(b)。以上の結果は、ダイマー形成がNHE1の輸送と制御に極めて重要であることを示唆している。別の実験から、ドミナントネガティブ変異体発現による活性阻害が起こるのは中性付近の生理的なpH<sub>i</sub>の範囲内であり、pH<sub>i</sub><6の細胞内H<sup>+</sup>濃度が充分高い時には起こらないことがわかった。このことから、ダイマー形成はイオン輸送そのものに必要なのではなく、pHセンサー(次節で詳述)が正常な機能を発揮するのに必須であると考えられる。

## 2-3. pHセンサー

恒温器が温度低下を感知して熱を発生して温度を保持するように、NHE1の細胞質側にはH<sup>+</sup>輸送部位とは異なると予測されるpHセンサー部位が存在し、pH変動をモニターして輸送活性を調節しpH<sub>i</sub>恒常性を維持する巧妙な分子的仕掛けがある。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pH<sub>i</sub>は8以上になるはずであるが、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を活性化するからである。pHセンサーは、細胞のアシドーシス・アルカローシスを防御し、また種々のシグナルに应答してNHE活性を変化させることを可能にする分子内制御装置である。

一般的に、NHE活性は細胞を酸性化したのち、<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>取り込みかまたはpH<sub>i</sub>回復をモニターすることによって測定できる。しかし、これら順モード(すなわち[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[H<sup>+</sup>]<sub>i</sub>交換)活性のpH<sub>i</sub>依存性では、H<sup>+</sup>輸送部位とH<sup>+</sup>制御部位(pHセンサー)がともに細胞質側に存在すると想定されるため、それらを速度論的に区別することは困難である。他方、NHEの逆反応すなわち細胞に負荷した<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>の排出を測定すれば、輸送基質としてのH<sup>+</sup>と制御因子としてのH<sup>+</sup>の効果が逆になるため、これらを容易に区別することができる<sup>6)</sup>。図2Cに示すように、<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>排出活性は、細胞内輸送部位で起こると考えられるNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>競合から予想される反応とは逆にpH<sub>i</sub>上昇とともに低下し、pH7.5で完全に停止する(pHセットポイント)。この現象は、輸送部位とは異なるpHセンサーが存在する重要な証拠の一つである。モデルで説明しよう。図2Aに示すように、細胞質側には輸送と制御に関わる2種類のH<sup>+</sup>結合部位が存在すると考えられる。不活性型Iは制御部位への複数個のH<sup>+</sup>(シミュレーションの結果では3個以上)結合によって活性化型に変わり、NHEがイオン輸送活性を持つようになると想定される。この過程で、タンパク質の大幅な構造変化を



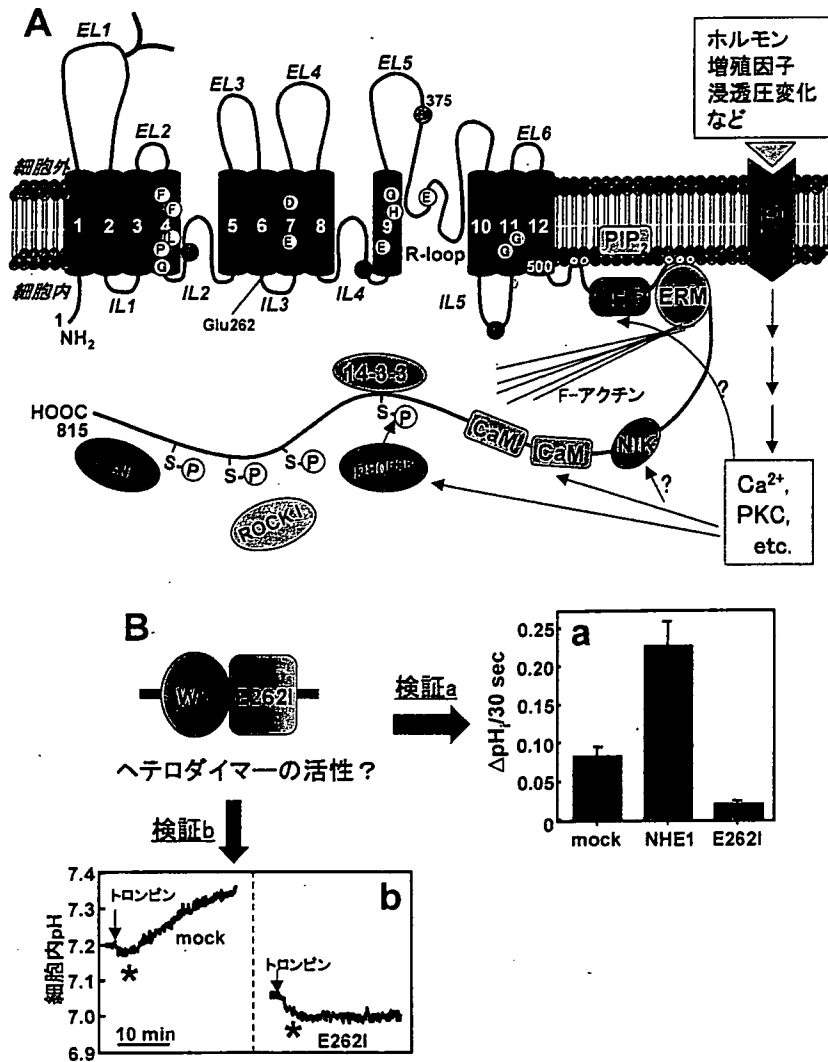


図1 NHE1の膜トポロジーモデルおよびダイマー形成の生理的意義に関する実験  
 (A) システイン走査変異解析により推察された膜トポロジーモデル。図中に示したアミノ酸残基は、変異導入が活性の低下または阻害剤感受性の低下をもたらしたもの(白)、細胞内pH感受性が酸性側シフトを示したもの(赤)、アルカリ側シフトを示したもの(黄)を表す。分子間架橋が活性低下をもたらしたCys導入部位(緑)。また、C末端側細胞質領域と相互作用する様々な制御因子を示した。CHP:カルシニューリンB様タンパク質, ERM:エズリン, ラディキシン, モエシン, NIK:Nck結合キナーゼ, CaM:カルモジュリン, 14-3-3:アダプタータンパク質, ROCK1:RhoキナーゼI, CAII:炭酸脱水酵素II, EL:細胞外ループ, IL:細胞内ループ, R-loop, reentrant loop. R:受容体, PKC:プロテインキナーゼC。(B) 活性を持たない変異体E262Iのドミナントネガティブ効果を見る実験。(検証a) 内在性NHE1活性を持つ細胞(CCL39細胞)に発現マーカーとともに野生型NHE1(WT)あるいは変異体E262I(Glu262をIleに変異したもの)を発現させた。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換活性をNa<sup>+</sup>依存性pH<sub>i</sub>回復の初期速度によって見積もった。pH<sub>i</sub>回復速度はNHE1では増強され、E262Iでは内在性NHE1由来の活性が著明に抑制される。(検証b) NHE1は増殖因子であるトロンピンによる受容体刺激で活性化され、結果的にpH<sub>i</sub>のアルカリ化が起こるが(左図)、E262Iを発現させるとこのアルカリ化は完全に消失した(右図)。トロンピン刺激後観察される一過性の細胞内酸性化(\*)はIP<sub>3</sub>産生に伴う細胞内Ca<sup>2+</sup>動員によって起こるが、E262Iを発現しても細胞内シグナリングは正常に起こることを示している。

伴うような不活性型I<sub>2</sub>から活性型Aへの比較的遅い変換ステップが存在すると考えられる。興味深いことに、I<sub>2</sub>→A変換はNHE1に比べてNHE3の方がかなり遅いとする実験データがある。

順モード活性のpH<sub>i</sub>依存性はさまざまな要因によってアルカリ側あるいは酸性側にシフトすることが知られている

が、これは輸送・制御どちらの部位のH<sup>+</sup>親和性を変化させているのだろうか? 細胞内ATP枯渇の例で考えてみることにする。細胞内のATPを枯渇させるとpH<sub>i</sub>依存性は酸性側に大きくシフトするが(図2B)、順モード活性だけに着目すると輸送・制御のどちらの部位の親和性を低下させてもpH<sub>i</sub>依存性の酸性シフトが起こりシミュレーショ

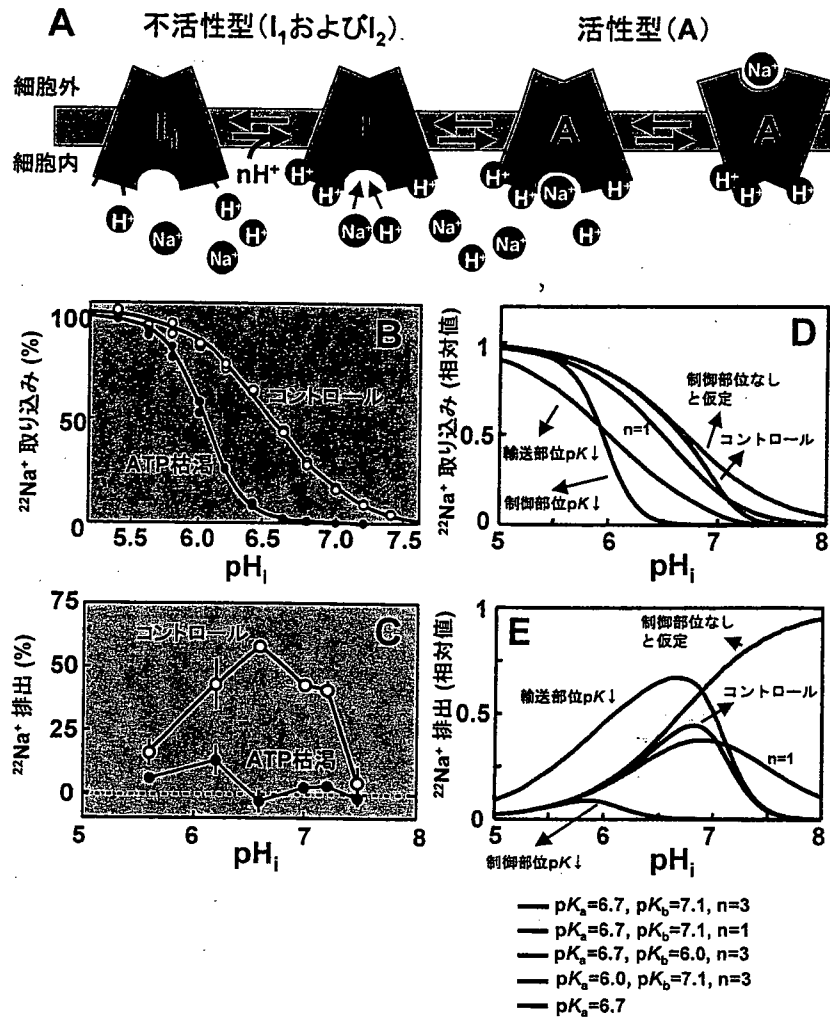


図2 NHE1がpHセンサー ( $H^+$ 制御部位) を有するという証拠

(A)  $H^+$ によるNHE1活性化のモデル。NHE1には $Na^+$ と $H^+$ が競合する輸送部位以外に複数の $H^+$ を感知する部位が存在し、 $H^+$ 結合による不活性化型 ( $I$ ) から活性化型 (A) への構造変化が起こって初めて $Na^+/H^+$ 交換輸送が開始すると考えられる。図では、基質である $H^+$ の輸送は省略している。(B)(C) 通常および細胞内ATPを枯渇した条件下で、 $^{22}Na^+$ 取り込みおよび $^{22}Na^+$ 排出活性、すなわちNHE1の順モード ( $[Na^+]/[H^+]$ , 交換) あるいは逆モード ( $[Na^+]/[H^+]$ , 交換) 活性を種々の $pH_i$ で測定した。(D)(E) pHセンサーモデル (A) に定常状態速度論を適用し、順・逆モードのNHE1活性のpH依存性をシミュレーションした。輸送・制御部位の $pH_i$ に対する $pK$ を $pK_s$ ,  $pK_o$ , 制御部位に参与する $H^+$ の個数を $n$ とすると、順・逆モード活性とも $pK_s=6.7$ ,  $pK_o=7.1$ ,  $n=3$ のとき実測値とよく合致 (黒),  $n=1$ では逆モードの急激な $H^+$ による活性化が説明できない (赤)。また、制御部位が全くないと仮定すると、pH上昇に伴う逆モード活性のshut-offは観察されない (赤紫)。また、ATP枯渇は順モードの $pH_i$ 依存性を酸性側に大きくシフトさせ逆モード活性をほとんど消失させる (BおよびC) が、この現象は、輸送部位ではなく制御部位の $H^+$ 親和性の大幅な低下で起こっていることがわかる (青)。なぜなら、輸送部位の $H^+$ 親和性を低下させたシミュレーションでは実験事実とは反する大きな逆モード活性の上昇をもたらすはずだからである (E, 緑)。

ンで区別するのはそれ程容易ではない (図2D, 青 vs. 緑)。しかし逆モードを見ると、制御部位の $H^+$ 親和性を低下させるとシミュレーションの結果はデータと合致するが、反対に輸送部位の親和性の低下は実験結果 (図2C) とは全く反対に活性の大きな増加をもたらしてしまう (図2E, 青 vs. 緑)。このことは、NHE活性が輸送部位の $H^+$ 親和性の変化ではなく、主として制御部位の $H^+$ 親和性の変化によって調節されていることを示唆する。

pHセンサーの分子の実体は解明されていないが、これ

までの実験結果から細胞内ループに存在するArg440, Arg327, Arg180, C末端細胞質ドメインおよびそれに結合するカルシニューリンB様タンパク質CHPが重要であることが示唆されている (図1)<sup>7-10</sup>。輸送を担う膜貫通ドメインに連結して存在する細胞質側の何らかの大きな制御装置が存在し、その中の荷電残基が $H^+$ を感知することによって起こる構造変化がカチオン輸送部位に伝播し、交換輸送がonになると予想される。pH変化に応じてどのような構造変化が起こり、タンパク質が不活性化型から活性化型へ変換

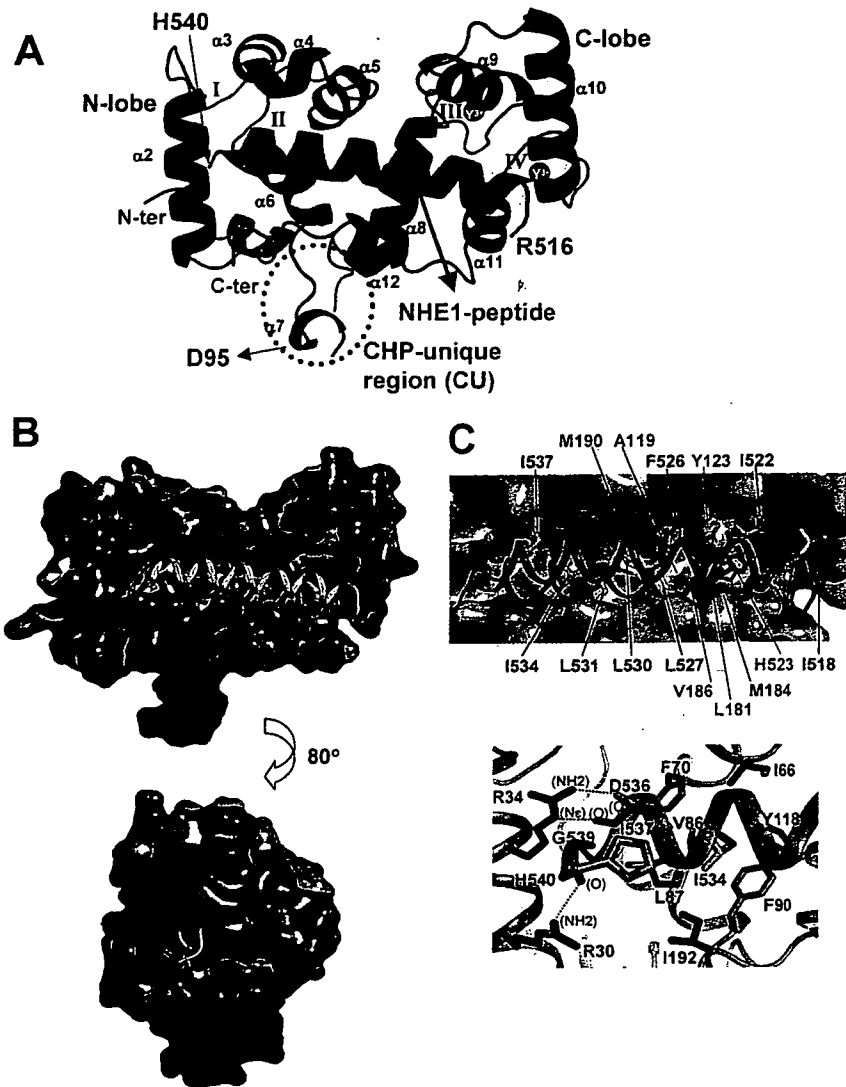


図3 CHP2/NHE1-ペプチド複合体の構造

(A) 複合体構造のリボン図。196 残基からなる CHP2 は N-lobe と C-lobe の大きなドメインからなり、中央に NHE1 ヘリックス (Arg516-His540) を結合する大きな溝がある。EF3 と EF4 には結晶化に使用した  $Y^{3+}$  イオンが結合している。CHP2 の中央に大きく突き出た CHP に特有の構造がある。(B) 複合体の空間充填図。NHE1 ヘリックスはリボンで示した。(C) CHP2-NHE1 相互作用の詳細。NHE1 の疎水性残基が CHP2 の残基からなる疎水性ポケットに収まっている。C-lobe では His523 と Tyr123 との水素結合、N-lobe では NHE1 側の Asp536, Ile537, Gly539 と CHP2 側の Arg30, Arg34 との水素結合が存在し、CHP2/NHE1 特異的相互作用に寄与する。

されるのかという疑問はすべての  $Na^+/H^+$  アンチポーター\*に共通した中心命題である。超高熱菌の  $Na^+/H^+$  アンチポーター MjNhaP1 の二次元結晶では pH 変化に応じた膜貫通ヘリックスの相対位置の変化が検出された<sup>12)</sup>。また、大腸菌アンチポーター NhaA の結晶構造では、細胞質ループ内に荷電残基のクラスターが存在し、 $H^+$  結合・解

離に応じて膜貫通ヘリックスの構造変化が起こりカチオン輸送部位が open すると想像されている<sup>13)</sup>。また、最近結晶構造が明らかにされた高度高熱菌のある種のトランスポーター (LeuT<sub>aa</sub>)<sup>14)</sup> で見られるような、Arg-Glu 残基間における塩橋 (salt-bridge) が NHE にも存在し、pH 依存的に細胞内ゲートの開閉を通じて  $I_2 \rightarrow A$  構造変化を起こしている可能性もある。

#### 2-4. CHP の構造と機能

形質膜に発現するタイプの NHE1-NHE5 には  $Ca^{2+}$  結合タンパク質である CHP が強固に結合することが明らかにされている<sup>15-17)</sup>。著者らの最近の解析によれば、NHE1 発

\*: 動物細胞由来の NHE は交換輸送体 (exchanger), 逆に細菌由来のものはアンチポーターと呼ばれることが多く、本稿ではこの慣例にならった。しかし、 $Na^+$  と  $H^+$  を交換輸送するという基本機能は同じであり、NHE がアンチポーターと呼ばれることもある。

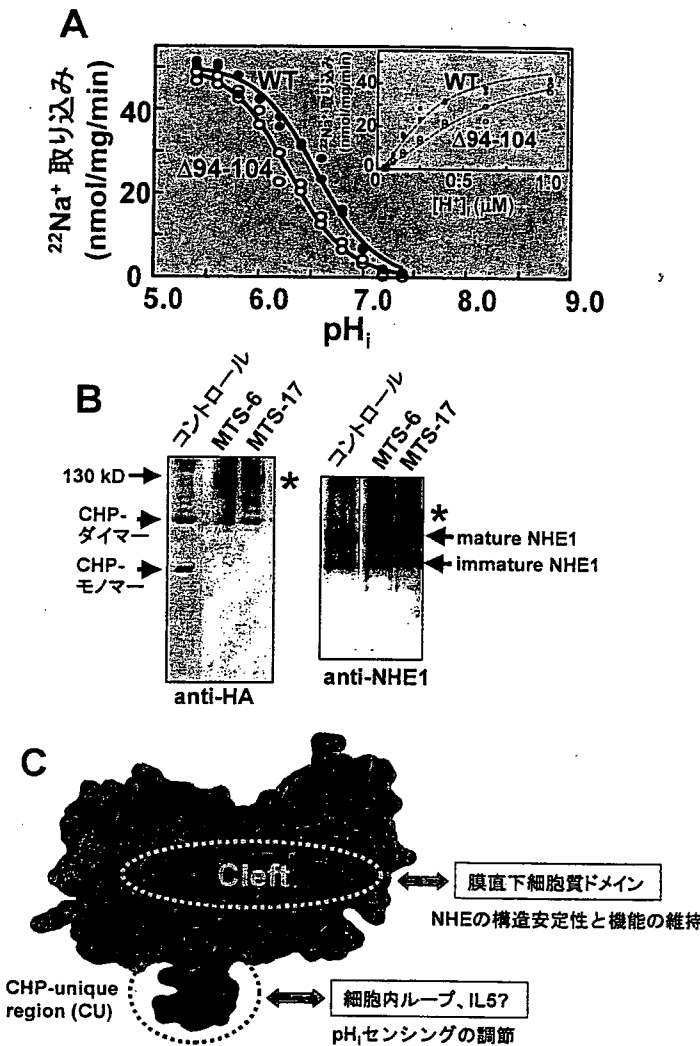


図4 CHP特有リンカー領域 (CU) の解析

(A) NHE1 とともに野生型 (WT) および CU 領域を欠失 (残基 94-104 を除去した) させた CHP2 を共発現し,  $^{22}\text{Na}^+$  取り込み活性の pH<sub>i</sub> 依存性を測定した. Δ94-104 共発現によって pH<sub>i</sub> 依存性が酸性側にシフトすることで, 活性阻害が起こる. 細胞内 H<sup>+</sup> 濃度依存性は Hill 定数が 1 を超えるシグモイドカーブになり, 複数の細胞内 H<sup>+</sup> の関与が示唆される (挿入図). (B) CHP2 と NHE1 の Cys 変異体 (HA タグ標識 CHP2 の D95C および NHE1 の I441C) 間で起こる分子間架橋. 変異体を共発現した細胞から細胞膜を調製し, スペースの長さの異なる 2 種類の MTS 試薬で架橋反応を行うと, HA 標識 CHP2 と NHE1 以外に, 分子量 130kD の新しい架橋されたバンド (\*) が検出された. この結果は, 導入した Cys 同士が空間的に近い位置を取り得ることを示唆する. (C) CHP には NHE と相互作用し得る部位が少なくとも 2 箇所存在し, 異なった領域間の相互作用を通じて二つの重要な生理的役割に関与することが示唆された.

現細胞から 1 分子当たり 1 分子の CHP が NHE1 とともに精製されてくるので, NHE1 ダイマー当たり 2 分子の CHP が常時 NHE1 に結合していると考えられる. 現在 CHP には少なくとも 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 はがん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, 四つの EF ハンドモチーフを持つ Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質で, カルシニューリン

の B サブユニット (CNB) と相同性がある. 実際に Ca<sup>2+</sup> が結合するのは CHP1/2 では EF3 および EF4 であり, CHP3 では EF3 のみである. NHE に結合した CHP1/2 の Ca<sup>2+</sup> 親和性は極端に高いので (K<sub>d</sub> = 1-3nM), EF ハンドそれ自身が Ca<sup>2+</sup> センサーとして機能するのではなく, 恒常的に Ca<sup>2+</sup> を結合させることによって構造安定性に寄与し NHE と強固に結合するのを助ける役割を果たすと考えられる<sup>10</sup>. CHP1/2 は NHE アイソフォームの膜直下の C 末端細胞質ドメイン (NHE1 ではアミノ酸 516-540) に結合

図5 カリポライド

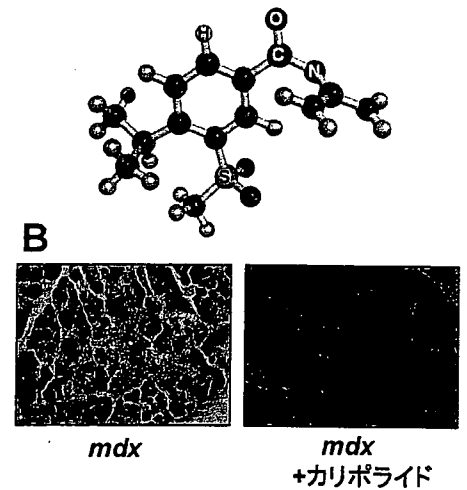


図5 筋ジストロフィー症マウス mdx におけるカリポライドによる筋変性の改善

(A) カリポライドの化学構造. (B) mdx マウスにカリポライドを経口投与 (3 週間) すると, 骨格筋変性の著明な改善が見られた. ヘマトキシリン/エオジン染色. スケールは 100μm.

することによってNHEの構造を保持し、活性発現に必須な役割を担う<sup>19)</sup>。たとえば、CHPを結合できない変異NHEは形質膜には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く(5-10%)、活性のpH依存性も極端に酸性側にシフトしている。他方、CHP2も必須サブユニットとして生理的活性を発揮させる点ではCHP1と共通しているが、CHP2はがん細胞の高い細胞内pHの維持に関与することを示唆する結果を得ている<sup>19)</sup>。

著者らは最近、CHP2とそのNHE1結合領域との複合体の結晶構造を、Y<sup>3+</sup>イオンの存在下、2.7Åの解像度で決定した<sup>19)</sup>。CHP2には中央に大きな疎水性に富んだ溝があり、そこにNHE1のCHP結合領域を形成するαヘリックスが疎水性残基の面を向けてみごとに収まっていることが見出された(図3AB)。また、NMRによって解かれた溶液中のCHP1/NHE1ペプチド複合体の構造においても、NHE1のαヘリックスが埋め込まれた同様な大きな溝の存在を確認できた<sup>19)</sup>。この“ホットドッグ様構造”はCNBおよびそれに良く似たneuronal calcium sensor (NCS)ファミリーの多くのCa<sup>2+</sup>結合タンパク質で見られるものである。CHP2は全体で55×47×28Åのサイズを持ち、12個のαヘリックスと4個のβシートを含み、N-lobeとC-lobeの二つの大きなドメインからなる。CHP2にはNおよびC-lobeをつなぐ比較的長いリンカー領域がタンパク質の外に突き出すような構造が存在する。こうした構造はCNB/NCSファミリーの他のタンパク質には存在せず、著者らはCHP-unique (CU) regionと呼んでいる(図3A)。興味深いことに、この領域内のAsp95は結晶中で隣接するCHP2分子のY<sup>3+</sup>原子に配位することによって、本来フレキシブルなこの領域を安定化することで構造を見ることができたということが判明した。このCHP2/NHE1ペプチド複合体の結晶化はかなり難攻不落であったが、構造を解いてみてはじめてこの複合体がなぜY<sup>3+</sup>イオンの存在下でのみ結晶化できたかという理由を知ることができた。

CHPの疎水性の溝にはC-lobe→N-lobeの方向にNHE1のaa516-540領域がそれぞれN→C末端の配向性で埋め込まれている。NHE1ヘリックスは保存性の高いGly539でN-lobeの壁に阻まれてほぼ直角に折れ曲がり、His540から溝の外に出ることがわかった。さて、CNB/NCSファミリーのCa<sup>2+</sup>結合タンパク質が厳密に標的を認識する機構は何であろうか? これまでCHPの他にCNA/CNB、KChIP1/K<sup>+</sup>チャネルKv4の計3例において複合体で構造が解かれているが、構造の比較からこの疑問に答える二つの事実が浮かび上がってくる。第一に疎水性溝の形と大きさである。すなわち、カルモジュリンが分子の持つ可塑性によって多種類の標的を認識できるのとは異なり、これら構造が解かれたCNB/NCSファミリータンパク質ではN-lobe/C-lobe間の相互作用によって溝の形と大きさはあら

かじめかなり厳密に用意されており、そこにjust-fitする標的のみがvan der Waals結合を介して相互作用するという点がまず挙げられる。標的ヘリックスの片側に存在する疎水性残基を受け入れるスペースも用意されている。第二に、点在する特異的な水素結合の存在である。C-lobe側にはNHE1のHis523とCHP2のTyr123との水素結合、N-lobe側にはAsp536、Ile537、Gly539とCHP2のArg30、Arg34との水素結合が存在し、NHE1ヘリックスの配向性と位置が正確に決められている。

CHPにはCNB/NCSファミリーの他のメンバーにはないCU領域があるが、これを切断(Δ94-104)してもNHE1との相互作用にはまったく影響しない。しかしCU領域を欠失させるとNHE1活性のpH依存性が酸性側にシフトすることがわかった(図4A)。<sup>22)Na<sup>+</sup>排出実験</sup>などから、このドミナントネガティブ効果はpHセンサーのH<sup>+</sup>感受性が下がったためであると考えられた。このことから、CU領域はNHE1本体の一部と相互作用することによって活性調節に関わるのではないかと考えられた。興味深いことに、CU領域内のAsp95のCys変異体とNHE1のpHセンシング機構に重要と考えられている領域IL5内のIle441のCys変異体を細胞に共発現し架橋剤で処理すると両タンパク質が架橋された新たなタンパク質バンドが出現した(図4B)。そのような架橋はCHP2の他の多くのCys変異体では観察されないため、IL5はCU領域と相互作用する領域である可能性が高い。これらの解析から、CHPには二つの大きな役割があると考えられる(図4C)。第一に、NHEファミリーの必須サブユニットとして疎水性cleftとの強い相互作用を通じてNHEを構造的に安定化させ(すなわちNHEの構造の一部として)、生理活性を発揮させるという点である。第二にCU領域とNHEの細胞内ループとの弱い相互作用を介してNHEによるpHセンシングの制御に関わるという点である。しかし、特に後半のCHPの活性制御メディエーターとしての機能にはリン酸化を含めたまだ多くの謎が残されており今後の研究の進展が待たれる。

### 3. NHEと疾患

NHE1ノックアウト(KO)マウスの解析により、NHE1の神経系における重要性が明らかにされた。これらマウスは胎児期には正常な発達をとげるが、生後まもなく歩行的運動失調症やてんかん性痙攣発作などの神経変性症状を呈し、離乳前に死亡するケースが多い。NHE1欠損による恒常的な細胞内アシドーシスおよび海馬CA1神経の過剰興奮がその原因の一つと考えられている。一方、脳や心筋における虚血-再灌流障害、また心肥大や心不全、がんなどの病態時にNHE1の発現および活性の異常亢進が認められている。さらにNHEの特異的阻害剤がこれら疾患を軽

減することから、NHE1がこれら疾患の重要なメディエーターであるとする報告が数多くある。本章ではこれまで報告されてきたNHEと疾患（特に心疾患とがん）との関係を概説したのち、著者らが最近見出した筋ジストロフィーとの関係について記す。

### 3-1. NHEと疾患との関係

NHEと心疾患：心筋虚血-再灌流障害の際、NHE1の発現の上昇・活性の亢進が起こり、不整脈や心筋障害の誘発に寄与すると考えられている<sup>20</sup>。そのメカニズムとして、細胞内Ca<sup>2+</sup>依存性および非依存性の機構が提唱されている。まず虚血により、細胞内アシドーシスやATPレベルの低下、またNHEを活性化する種々の虚血代謝産物（各種ホルモン、過酸化水素など）の増加が起こる。細胞内アシドーシスはNHEを直接活性化しpH<sub>i</sub>を回復させようとするが、それに伴い細胞内に大量のNa<sup>+</sup>が流入する。一方、ATPレベルの低下によりNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> ATPase活性が阻害されるためNa<sup>+</sup>が排出されず、細胞内にNa<sup>+</sup>が蓄積される。このことは特に再灌流におけるNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX)の逆モードを介した細胞内Ca<sup>2+</sup>過剰負荷(Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> overload)を招き、種々の細胞障害を引き起こす。すなわち、NHE、NCX、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> ATPase三者の相互作用によるイオン制御が虚血-再灌流障害の主な分子機構とする説である。実際、pH<sub>i</sub>低下により細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が認められること、またウアバイン(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> ATPase阻害剤)により虚血-再灌流障害が悪化するがNHE阻害剤がこれを改善することなど三者の相互作用と障害との関連を示唆する報告がなされている。

他方、細胞内Ca<sup>2+</sup>非依存性のメカニズムとしては、再灌流時のNHEの活性化などによるpH<sub>i</sub>上昇が細胞障害の主な原因とする説である（“pHパラドックス”と呼ばれることもある）。すなわち、虚血時のATP低下によりホスホリパーゼやプロテアーゼが活性化を受けやすくなるが細胞内が酸性のために実際には阻害されている。ところが、これらはアルカリ側に至適pHを持っているため再灌流に伴うpH<sub>i</sub>上昇によって一気に活性化され、形質膜およびミトコンドリア膜の障害が起こる。

これら心筋虚血-再灌流障害に対し、NHE1の特異的阻害剤（カリポライド（図5A）、エニポライド）が、心機能の改善、過収縮の回避、不整脈の頻度減少、梗塞範囲の軽減、イオン代謝の改善などあらゆるパラメーターにおいて強力に心筋保護作用を示すことが数々の論文で報告されている。またその効果は虚血時および再灌流時の両方に投与するのが最も効果的であることから、NHE活性化による細胞障害において少なくとも上記二つのメカニズムが関与していることが示唆される。このようなNHE1特異的阻害剤の効果は臨床評価にまで応用され、冠動脈疾患を持つ患者を対象としたGUARDIAN trial (Guard During Ischemia

Against Necrosis) や急性心筋梗塞患者を対象にしたES-CAMI trialなどが実施されている。そしてGUARDIAN trialでは、全体としては阻害剤の効果は立証されなかったものの、一部、冠動脈バイパス手術を受けたハイリスク患者においては高濃度のカリポライドが有効という結果が出た。さらに前臨床試験において、NHE阻害剤が心筋梗塞後のリモデリングや、高齢や高血圧によって生じる心肥大・心不全なども軽減することが報告されている。

このようにNHE1の活性化は、急性の虚血-再灌流障害のみならず心肥大のプロセスにも関与している可能性がある。例えば、β<sub>1</sub>アドレナリン受容体を高発現させたトランスジェニックマウスにおいてNHE1の発現や活性の亢進が認められ、これらの表現型である心肥大や心筋線維化、心不全がカリポライドにより軽減されること<sup>21</sup>、またANP (atrial natriuretic peptide) 受容体欠損マウスにおける心肥大・心筋線維化もNHE阻害剤により軽減されること<sup>22</sup>などが報告されている。これらの結果は、NHE1がホルモンや増殖因子、伸展刺激など種々の心筋リモデリング誘発因子によって活性化されることから理解できる。またpH<sub>i</sub>の変化そのものがタンパク質合成に影響を与えることからNHE1と細胞分裂・心肥大などの関連がうかがわれる。

NHEとがん：がんの形成、侵入、転移においてもNHE1の関連が指摘されている<sup>23</sup>。腫瘍細胞では、細胞内外のpH勾配が逆転しており、細胞内はアルカリ性、細胞外は酸性になっている。これはがん遺伝子依存的に活性化されるNHE1によるものと考えられている。細胞内アルカリ化は細胞の形質転換の初期より認められており、血清非存在化での細胞分裂を引き起こし、血管を有しない大量の細胞塊を形成させる。この状態はがん細胞による多量のH<sup>+</sup>排出とあまってさらなるpH勾配の逆転、すなわちがん特有の微小環境の形成を促す。この微小環境は、細胞外マトリックスの消化やアクチンのリモデリングを誘発し、それぞれががんの侵入、転移に寄与すると考えられている。

### 3-2. NHEと筋ジストロフィー

筋ジストロフィー（筋ジス）とは筋線維の破壊・変性と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称である。発症年齢や遺伝形式、臨床的経過等から様々な病型に分類されるが、最も頻度の高いのはデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）であり、1987年に細胞骨格タンパク質であるジストロフィンがその原因遺伝子として特定された。DMD以外にも細胞骨格系タンパク質の異常に起因する筋ジスが数多く知られており研究も進められているが、いまだ筋細胞変性の詳しい分子メカニズムは明らかでなく、良い治療法がないのが現状である。

著者らはジストロフィン欠損で筋ジスを発症するマウス

(mdx) またはサルコグリカン欠損で筋ジスと心筋症を発症するハムスター (BIO14.6) をモデル動物として使用し、筋変性に効果的な薬の探索を行ってきた。最近 NHE の阻害剤 (カリボライドあるいは EIPA, 化学構造は図 5A 参照) が筋変性に対して有効であることがわかった。NHE 阻害剤投与群では非投与群に比べて筋変性の指標となる血中クレアチンキナーゼ (CK) 活性の有意な減少と組織ヘマトキシリン/エオジン染色で観察される筋変性の改善が認められた (図 5B)。また、金網にマウスをぶらさがらせるグリップテストで前足による体重支持時間を測定し骨格筋の機能的評価を行ったところ NHE 阻害剤投与群において筋機能改善が示された。このような NHE 阻害剤による筋変性の改善効果から、筋ジス筋では NHE が活性化されており  $[Na^+]_i$  の上昇によって、前節で述べたような  $Na^+$ -依存性  $Ca^{2+}$  過剰負荷が起こり、筋変性が引き起こされる可能性が考えられた。

そこで実際に筋ジス動物から調製した筋細胞を用いて、NHE 阻害剤の筋変性保護メカニズムを検討した。 $[Na^+]_i$  に影響を及ぼすと考えられる膜タンパク質、NHE および NCX はコントロールと筋ジス筋で量および局在に変化はなかった。筋細胞への  $Na^+$  取り込み実験を行ったところ全  $Na^+$  取り込みの大部分 (65% 以上) が NHE の特異的阻害剤で抑制されたことにより筋細胞における  $Na^+$  流入に NHE の寄与が大きいこと、そして NHE を介する流入が筋ジス筋細胞で上昇していることが判明した。また筋ジス筋細胞では、コントロールに比べて  $[Na^+]_i$  上昇、pH<sub>i</sub> の上昇、NHE 活性の pH<sub>i</sub> 依存性のアルカリ側へのシフトも観察されたことにより、NHE 活性が有意に上昇していることが判明した。筋ジス筋細胞では外液  $Ca^{2+}$  濃度を上げると (0.5→5.0mM) コントロールでは観察されない  $Ca^{2+}$  流入の上昇が認められるが、この上昇はカリボライドであらかじめ処理することにより抑制され、また同じ処理により伸展刺激による筋ジス筋細胞からの CK 漏出も抑制された (岩田ら 投稿中)。これらの結果は、筋変性に導く細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に NHE の恒常的な活性化が大きく寄与することを示唆している。NHE 阻害剤の病態改善効果は、筋ジスの骨格筋で起こるイオン代謝異常の一断面を浮きばりにさせるとともに新しい治療戦略を考える重要なステップになると思われる。

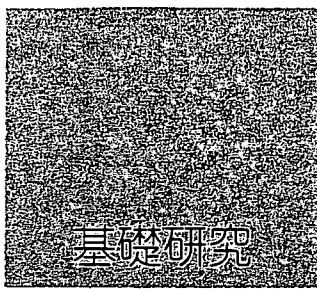
#### 謝辞

本稿に記した内容は、国立循環器病センター研究所において最近 5 年間に行った研究に基づいております。現在は他の研究所に移られて活躍されている先生方を含めて、多

くの方々にご支援頂きましたことを深く御礼申し上げます。また結晶構造解析に関しては、当研究所の武田壮一博士との共同で行ったものであることをここに申し述べます。

#### 参考文献

- 1) Wakabayashi, S., Shigekawa, M., & Pouyssegur, J. (1997) *Physiol. Rev.*, 77, 51-74.
- 2) Orłowski, J. & Grinstein, S. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 549-565.
- 3) Fafournoux, P., Noel, J., & Pouyssegur, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269 (4), 2589-2596.
- 4) Hisamitsu, T., Pang, T., Shigekawa, M., & Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry*, 43, 11135-11143.
- 5) Hisamitsu, T., Ben Ammar, Y., Nakamura, T.Y., & Wakabayashi, S. (2006) *Biochemistry*, 45, 13346-13355.
- 6) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 43580-43585.
- 7) Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T., & Shigekawa, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 11828-11835.
- 8) Lacroix, J., Poet, M., Maehrel, C., & Counillon, L. (2004) *EMBO Rep.*, 5, 91-96.
- 9) Ikeda, T., Schmitt, B., Pouyssegur, J., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)*, 121, 295-303.
- 10) Pang, T., Hisamitsu, T., Mori, H., Shigekawa, M., & Wakabayashi, S. (2004) *Biochemistry*, 43, 3628-3636.
- 11) Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C., & Pouyssegur, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2424-2428.
- 12) Vinothkumar, K.R., Smits, S.H., & Kuhlbrandt, W. (2005) *Embo J.*, 24, 2720-2729.
- 13) Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimoni, A., Padan, E., & Michel, H. (2005) *Nature*, 435, 1197-1202.
- 14) Yamashita, A., Singh, S.K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005) *Nature*, 437, 215-223.
- 15) Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 17367-17372.
- 16) Inoue, H., Nakamura, Y., Nagita, M., Takai, T., Masuda, M., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 148-155.
- 17) Pang, T., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 43771-43777.
- 18) Ammar, Y.B., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., & Wakabayashi, S. (2006) *Embo J.*, 25 (11), 2315-2325.
- 19) Mishima, M., Wakabayashi, S., & Kojima, C. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282 (4), 2741-2751.
- 20) Karmazyn, M., Gan, X.T., Humphreys, R.A., Yoshida, H., & Kusumoto, K. (1999) *Circ. Res.*, 85, 777-786.
- 21) Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K., & Lohse, M.J. (2002) *Circ. Res.*, 90, 814-819.
- 22) Kilic, A., Velic, A., De Windt, L.J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H.A., van Eickels, M., Schlatter, E., & Kuhn, M. (2005) *Circulation*, 112, 2307-2317.
- 23) Cardone, R.A., Casavola, V., & Reshkin, S.J. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, 5, 786-795.



基礎研究

## Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体の構造・機能と病態的意義

若林繁夫, 岩田裕子, 中村(西谷)友重, 久光 隆, ベンアマー・ヨセフ

### はじめに

心臓, 血管あるいは骨格筋の収縮・弛緩は, 筋肉細胞におけるイオン制御蛋白質と収縮装置の緊密な連携プレーによって行われる。特にCa<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>およびH<sup>+</sup>イオン濃度の制御は重要であり, その調節機構の破綻は筋収縮に重大な影響をもたらす。最終的には筋肉細胞は死を迎える。例えば, 細胞骨格系蛋白質の遺伝子が欠損して起こる拡張型心筋症や筋ジストロフィー症では, 形質膜の機械的脆弱性に基づく過剰なストレッチ刺激がイオントランスポート・チャネルの制御異常をもたらす。心筋・骨格筋共通の機構で細胞死シグナルを促進していることが明らかになりつつある。また, 同様なイオン輸送蛋白質の異常が心肥大・心不全発症にも関与することが明らかになってきた。イオン輸送系の中でNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)はあらゆる組織に普遍的に存

在し, 生体にとって最も基本的なpH制御を担う膜蛋白質である。他方, NHEが活性化されると細胞内Na<sup>+</sup>濃度上昇を介してNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX)の活性を間接的に変化させ, Ca<sup>2+</sup>過負荷をもたらすことによって様々な疾患に寄与する。

本稿では, 著者らが長年研究してきたこの輸送体分子の構造・機能について紹介したのち, 心疾患や筋ジストロフィー症におけるその病態的役割について述べる。

### I. NHEの構造・機能

生体を構成するあらゆる細胞において, 細胞内pH(pH<sub>i</sub>)は中性付近(~7.2)に維持されている。H<sup>+</sup>は細胞内が負に荷電した静止膜電位によって生まれる電気化学的ポテンシャル差のためにチャネルなどを介して細胞内に流入し, さらに代謝によって細胞内で大量に産生される。その酸排出のために, 生体はpHを制御する複数のトランスポートを用意し, その協同作業によってpH<sub>i</sub>を中性に保持する(図1)。その中心的な役割を担うのはNHEである。Na<sup>+</sup>とH<sup>+</sup>を交換輸送するトランスポートは原核細胞から真核細胞まで, 形質膜・内膜を問わず, 生体膜に広く存在する<sup>1,2)</sup>。NHEファミリーに属する分子種としては現在11のアイソフォームが報告されている(NHE1-11, SLC9A1-11)。NHE1-5が細胞の形質膜, 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持つと予想されている。NHEファミリー蛋白質分子は, 構造的・機能的に異なる

#### Key word

transporter regulation  
Na<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> overload  
muscular dystrophy  
cardiac hypertrophy  
heart failure

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger : structure, function and pathological implication

Shigeo Wakabayashi, Yuko Iwata, Tomoe Y Nakamura, Takashi Hisamitsu, Ben Ammar Youssef :

Department of Molecular Physiology,  
National Cardiovascular Center Research Institute  
国立循環器病センター研究所 循環分子生理学部



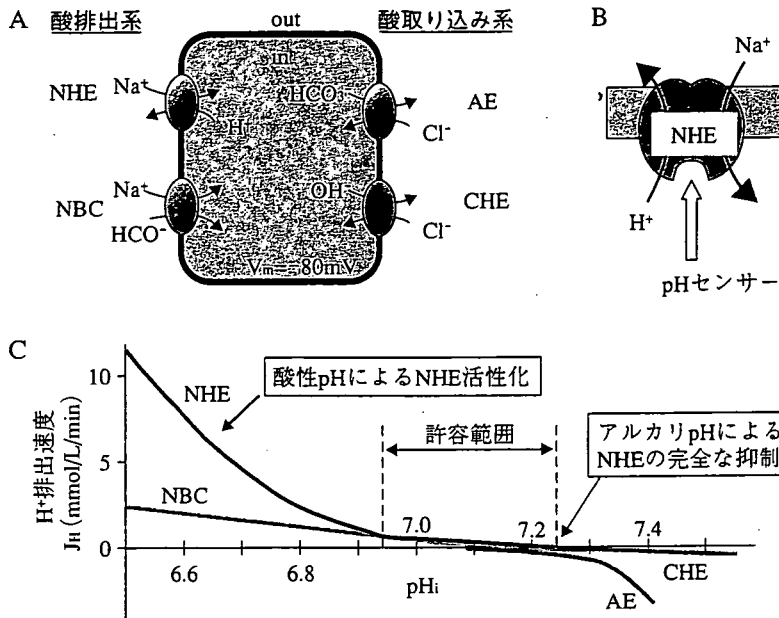


図1. トランスポーターによるpH制御

- A: 細胞膜に存在する代表的な酸排出系 (NHE:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NBC:  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter) と酸取り込み系 (AE: anion exchanger, CHE:  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  exchanger)。
- B: NHEは $\text{Na}^+$ と $\text{H}^+$ を1:1のストイキオメトリーで交換輸送するが、その分子内には活性制御を担う部位である“pHセンサー”が内蔵されていると考えられる。
- C: 細胞内が酸性化・アルカリ化すると、対応するトランスポーターが活性化し、 $\text{pH}_i$ を中性付近に引き戻す。こうして全ての細胞機能の根幹に関わるpH環境が整備される。

大きな2つのドメインに分けることができる(図2)<sup>3)</sup>。膜貫通ヘリックスを含み、イオン輸送を担う約500残基からなる比較的保存されたアミノ(N)末端側の膜結合ドメインと、イオン輸送を制御すると考えられる約300残基からなる相同性の低いカルボキシル(C)末端側の細胞質ドメインである。NHE1は形質膜上で二量体を形成するが、この二量体形成は活性調節に必須であると考えられる<sup>4,5)</sup>。

NHE分子種のうち、NHE1は循環器系組織を含むあらゆる組織に普遍的に発現するタイプであり、 $\text{pH}_i$ 、細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度 ( $[\text{Na}^+]_i$ )、細

胞容積の制御といった、いわば細胞のイオン恒常性を維持する生理機能を持つ。さらに、NHE1は、ホルモン、増殖因子や浸透圧変化などの外的シグナルによって活性化を受け、細胞内アルカリ化および $[\text{Na}^+]_i$ 上昇に寄与する。

後述するように、このNHE1の活性化は心疾患を含む様々な疾病におけるリスクファクターにもなり得るので、そのメカニズムの解明は病態を理解する上でも重要である。外的シグナルによるNHE1活性の調節は、細胞質ドメインに結合する様々な制御因子の

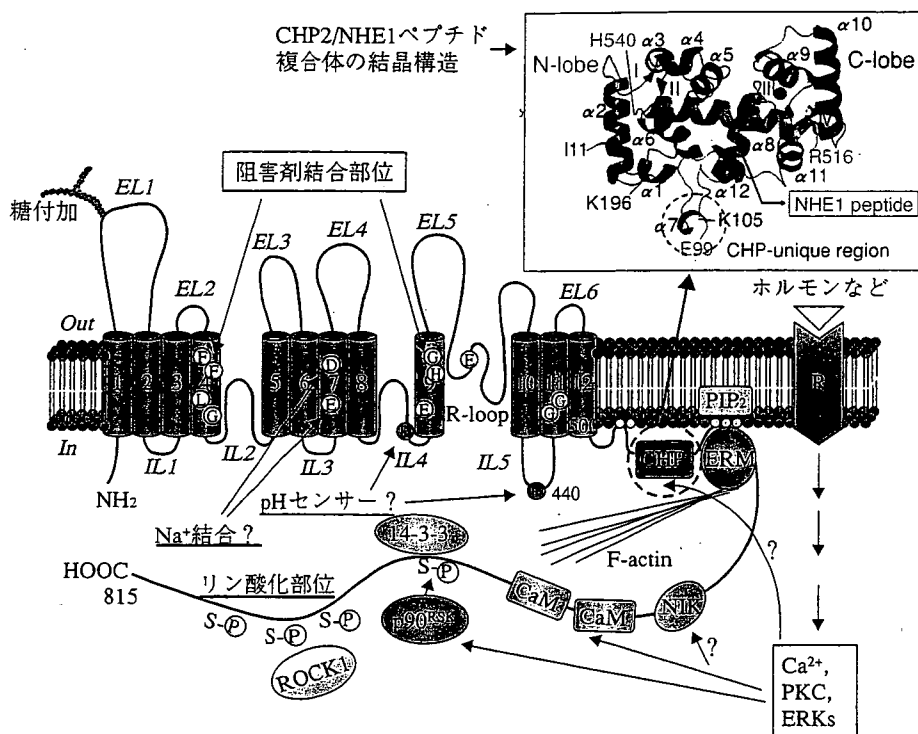


図2. NHE1分子および相互作用する蛋白質  
 挿入図は、NHEの必須制御因子であるCHP2とNHE1の細胞質領域との複合体の原子構造モデルである。NIK：Nck結合キナーゼ，ROCK1：RhoキナーゼI，PIP<sub>2</sub>：フォスファチジルイノシトール二リン酸，PKC：プロテインキナーゼC，ERK：細胞外シグナル制御キナーゼ，CaM：カルモジュリン，R：受容体，R-loop：再陥入ループ，EL：細胞外ループ，IL：細胞内ループ

結合・解離，あるいはリン酸化などを通じて，最終的には輸送体の細胞質側に内蔵するpHセンサーの感受性変化によって起こると考えられているが，全貌はまだ明らかではない。結合蛋白質のうちで，カルシニューリンB様蛋白質(CHP)は必須サブユニットして形質膜に存在するNHE1-5に常時結合している<sup>67)</sup>。現在，CHPには少なくとも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<sup>68)</sup>，CHP3は主として心臓に発現

するがその機能は明らかでない。CHP1-3はN末端側(Gly2)がミリスチル化され，4つのEFハンドモチーフを持つCa<sup>2+</sup>結合蛋白質である。NHEに結合したCHP1およびCHP2のCa<sup>2+</sup>親和性は極端に高いので(K<sub>d</sub>=1-3nM)，EFハンド，それ自体がCa<sup>2+</sup>センサーとして機能するのではなく，恒常的にCa<sup>2+</sup>を結合させることによって構造安定性に寄与しNHEと強固に結合するのを助ける役割を果たすと考えられる<sup>69)</sup>。CHP1/2は，NHEアイソフォームの膜直下のC末端細胞質ドメイン(NHE1ではアミノ酸516-540)に結合するこ

とによってNHEの構造を保持し、活性発現に必須な役割を担う<sup>7)</sup>。例えば、CHPを結合できない変異型NHEは形質膜には発現するものの、その活性はNHE/CHP複合体に比べて著しく低い。

最近、著者らは、CHP2とそのNHE1結合領域との複合体の結晶構造を、Y<sup>3+</sup>イオンの存在下、2.7Åの解像度で決定し、CHPとNHE1との相互作用を生むメカニズムを原子レベルで解明し、構造に基づいてpHセンシング機構の一端を明らかにした(図2)<sup>9)</sup>。

## II. NHEと心疾患

NHE1は心筋においても主要なH<sup>+</sup>排出機構であり、心筋収縮を阻害するアシドーシスなどの際、速やかに活性化されpH<sub>i</sub>を維持したり、その他[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>や細胞容積の調節など重要な恒常性維持を司っている。ところが、心筋の虚血-再灌流障害モデルにおいてNHE1の発現や活性の亢進が認められ、さらにNHE1の特異的阻害剤が障害を軽減することから、NHE1がこの疾患の重要なメディエータであるとする説が数多くある<sup>10,11)</sup>。実際、NHE1ノックアウト(KO)マウスでは心筋虚血-再灌流障害に対し抵抗性があることが報告されている<sup>12)</sup>。

この章では、虚血-再灌流障害にNHE1が関与するメカニズムおよびNHE1特異的阻害剤の臨床評価について、また心肥大・心不全とNHE1との関連について、著者らの結果を含めて述べる。

NHE1を介した心筋虚血-再灌流障害のメカニズムとして、主に細胞内Ca<sup>2+</sup>依存性の機構が提唱されている<sup>10,11)</sup>。まず虚血により、細胞内アシドーシスやATPレベルの低下、またNHE1を活性化する種々の虚血代謝産物(各種ホルモン、過酸化水素など)の増加が起こる。細胞内アシドーシスはNHE1を直接活性化しpH<sub>i</sub>を回復させようとするが、それ

に伴い細胞内に大量のNa<sup>+</sup>が流入する。一方、ATPレベルの低下によりNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase活性が阻害されるためNa<sup>+</sup>が排出されず、細胞内にNa<sup>+</sup>が蓄積される。このことは、特に再灌流におけるNCXの逆モードを介した細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷(Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> overload)を招き、種々の細胞障害を引き起こす。すなわち、NHE1、NCX、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase三者の相互作用によるイオン制御が虚血-再灌流障害の主な分子機構とする説である。実際、pH<sub>i</sub>低下により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が認められること、またウアブイン(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase阻害剤)により虚血-再灌流障害が悪化するが、NHE阻害剤がこれを改善することなど、三者の相互作用と障害との関連を示唆する報告がなされている。詳しくは触れないが、Ca<sup>2+</sup>非感受性の“pHパラドックス”と呼ばれるメカニズムも知られている。

これら心筋虚血-再灌流障害に対し、NHE1の特異的阻害剤(カリボライド、エニボライド)が、心機能の改善、過収縮の回避、不整脈の頻度減少、梗塞範囲の軽減、イオン代謝の改善など、あらゆるパラメーターにおいて強力に心筋保護作用を示すことが数々の論文で報告されている<sup>13)</sup>。NHE1阻害剤の効果は臨床試験においても評価され、冠動脈疾患を持つ患者を対象としたGUARDIAN trialや急性心筋梗塞患者を対象にしたESCAMI trialなどが実施された。これらは全体としては致死率、心筋梗塞発症率などにおいて阻害剤の効果は立証されなかったものの、GUARDIAN trialで一部、冠動脈バイパス手術を受けたハイリスク患者においてのみ、高濃度のカリボライドが有効という結果が出た。そこで近年、そのような患者を対象としたEXPEDITION trialが実施され、再灌流時のみならず虚血時にもカリボライドを投与した効果もあつてか、心筋梗塞発症率の顕著な減少が認められた。ただ脳血管障害のため、

致死率が上昇するなど予期せぬ結果も認められ、今後、より副作用の少ない阻害剤の開発が期待されている。

近年、NHE1の活性化が心肥大のプロセスにも関与している可能性が指摘されている(図3)。例えば、 $\beta 1$  アドレナリン受容体を高発現させたトランスジェニック (Tg) マウス<sup>14)</sup> や ANP (atrial natriuretic peptide) 受容体欠損マウス<sup>15)</sup> において、心肥大、心筋線維化および心不全が生じることが知られている

が、これら心筋ではNHE1の発現または活性の異常亢進が認められ、多くの病態がカリポライドにより軽減されることが報告されている。心肥大は一般に、各種受容体刺激などにより引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$  上昇、引き続き活性化されるカルシニューリン (CaN) や CaMK II 依存性のシグナル、あるいは MAP キナーゼ依存性経路により誘発、調節されると考えられている<sup>16)</sup>。しかし、上記マウスモデルでは、PKA や CaN, CaMK II など、多くのシグ

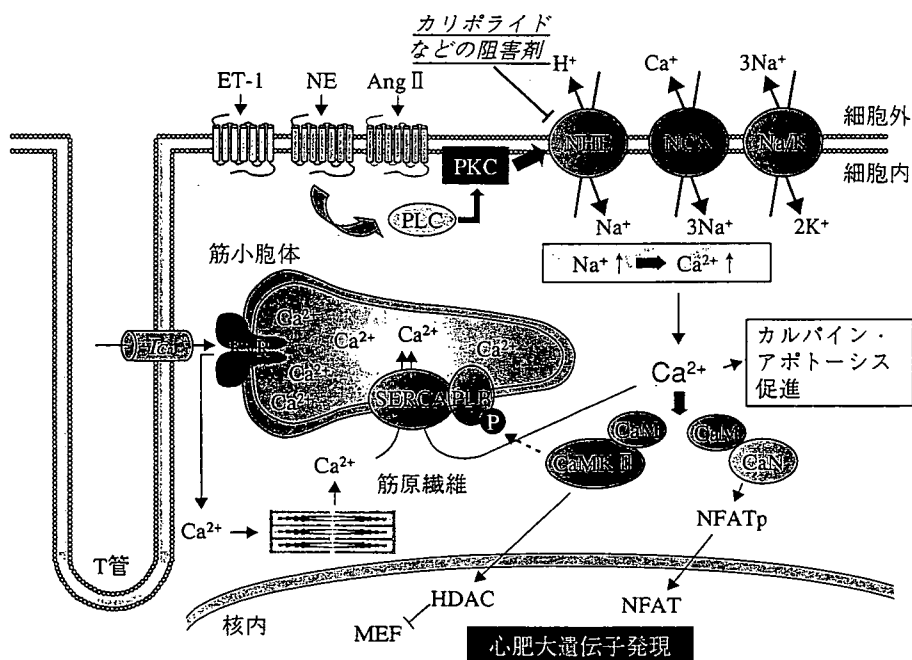


図3. 心筋細胞の $Ca^{2+}$ ハンドリング、リモデリングにおけるNHEの関与  
NHEの活性化に伴う $[Na^+]_i$ 上昇は形質膜NCXの活性を間接的に変化させ、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をもたらすことによって様々な心疾患のリスクファクターになり得る。エンドセリン(ET-1)、ノルエピネフリン(NE)、アンギオテンシンII(Ang II)などの種々のホルモンは受容体を介してNHEを活性化させ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をもたらす。下流の $Ca^{2+}$ 依存性心肥大シグナル分子を活性化して遺伝子発現変化を促し心筋リモデリングに寄与する。他方、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とそれに伴って起こる筋小胞体 $Ca^{2+}$ ストアの $Ca^{2+}$ 過負荷は、カルパインなどのプロテアーゼを活性化してアポトーシスを促進すると考えられる。カリポライドなどのNHE阻害剤が心肥大・心不全発症モデル動物の心臓の病態を大幅に改善するという多くのデータは、こうした細胞内シグナル伝達機構が背景にあると考えられる。