説

# 高等動物オルガネラ局在性 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の 局在・活性・生理機能

大 垣 隆  $-^{1}$ , 松 下 昌  $\mathfrak{P}^{2}$ , 金 澤 浩<sup>2</sup>

高等動物の細胞膜およびオルガネラ膜には Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)が存在し, pH 等のイオン環境の調節に関与している.これまでに4種類のオルガネラ局在性 NHE が同 定され,それぞれ固有の細胞内局在をとることが示された.また,オルガネラ内部は固有 の酸性 pH に保たれており,NHE がその制御に関与することが示唆されている.内腔 pH はオルガネラの機能発現と密接に関わっており,それに関連した NHE の機能的役割が予 想される.また近年,幾つかの相互作用因子の同定が進み,オルガネラ局在性 NHE の細 胞内局在制御機構の一端が明らかになり始めた.さらには,細胞極性の維持との関連や, X 連鎖遺伝性精神遅滞との関連が報告され,生理的役割,高次生命機能についても徐々に 明らかになりつつある.これらの知見を述べるとともに,今後のオルガネラ局在性 NHE 研究を展望する.

## 1. はじめに

生命にとって細胞内イオン環境の制御は生存に必須であ る.Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE) は生体膜を介した Na<sup>+</sup> (場 合によっては Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>等のアルカリ金属カチオン) とプロ トンの交換輸送を担うイオン輸送性膜タンパク質であり, 細菌,酵母のような単細胞生物から,哺乳類等の高等動物 まで生物種を超えて広く存在している<sup>1~3)</sup>.NHE は二次能 動輸送系の輸送体である.二次能動輸送系は,ATPase に

Ryuichi Ohgaki<sup>1)</sup>, Masafumi Matsushita<sup>2)</sup>, and Hiroshi Kanazawa<sup>2)</sup> (<sup>1)</sup>Division of Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2–2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871 Japan; <sup>2)</sup>Membrane Biology Research Group, Department of Biological Sciences, Osaka University Graduate School of Science, 1–1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560–0043 Japan) 代表される一次能動輸送系により創り出されたある基質 (多くはイオン)の生体膜を介した電気化学ポテンシャル 勾配を駆動力として,別の基質輸送を担う.

高等動物 NHE の研究は、最初にクローニングされた細 胞膜局在性の NHE1,そして腎臓や小腸管腔の上皮細胞の アピカル膜に特異的な発現を示す NHE3 を中心に進展し てきた. 高等動物の細胞膜上には一次能動輸送系の Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPase が存在する. この ATPase により Na<sup>+</sup>の電気化 学ポテンシャル勾配が形成される(図1).細胞膜上の NHE はこの勾配を駆動力として Na<sup>+</sup>とプロトンの交換輸 送を行い、細胞内 pH や Na<sup>+</sup>濃度の調節、細胞容積の制御 等の生理的機能を発揮する<sup>2,4,5)</sup>.特に腎臓や小腸では, Na<sup>+</sup>や HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の再吸収に関わり、体液量・循環血液量と血 圧・酸塩基平衡を制御する重要な因子である<sup>6,7)</sup>.また, NHEの活性は、細胞増殖因子や細胞内 pH などさまざま な細胞内外刺激による調節を受ける. 重要な相互作用因子 の同定作業も進み、分子間相互作用ネットワークの全容理 解も大きく進展したといえる.相互作用の機能的意義はイ オン輸送活性の発現、細胞膜上での輸送体の安定性、刺激 に応答した活性調節など多岐に及ぶ<sup>2,4,8~11)</sup>.

しかし, 真核生物においては細胞内にも複雑な膜系が存 在する. 生体膜の仕切りによって細胞質と区別されるオル

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup>大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座生体システム 薬理学(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2)

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup>大阪大学大学院理学系研究科生体膜機能学研究室(〒 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1)

Localization, ion transport activity, and physiological function of mammalian organellar NHEs



図1 細胞膜局在性 NHE とオルガネラ局在性 NHE 高等動物には細胞膜局在性 NHE(上)とオルガネラ局在性 NHE(下) が存在している.細胞膜局在性 NHE(本)とオルガネラ局在性 NHE(下) 成される Na<sup>+</sup>の勾配を駆動力とした Na<sup>+</sup>とプロトンの交換輸送を担 う.オルガネラ局在性 NHE はオルガネラからのプロトン流出経路 を形成し、V-ATPaseと共にオルガネラの pH 制御に関わると考えら れる.生理的なプロトンのカウンターイオンは、主として細胞質に 豊富な K<sup>+</sup>であると考えられている.

ガネラである. 1990 年代の後半から,高等動物のオルガ ネラ局在性 NHE が次々にクローニングされた.すなわ ち,NHE には「細胞膜局在性 NHE」と「オルガネラ局在 性 NHE」が存在する(図1).オルガネラ局在性 NHE の 研究は,まだその緒についたばかりである.オルガネラ内 腔 pH 制御における NHE の役割や,高次の生理機能につ いて充分な知見の集積を見るには至っていない.しかし近 年,その生理機能に迫る幾つかの報告がなされた.重篤な 遺伝性疾患との関連も示され,医学的見地からも今後ます ます注目を集めることは想像に難くない.また,相互作用 因子の同定にも進展が見られ,細胞内動態の制御メカニズ ムの一端が,タンパク質間相互作用によって記述されつつ ある.本稿では,高等動物のオルガネラ局在性 NHE につ いて,筆者らの最新の知見を交えて述べる.

# 2. 高等動物 NHE (SLC9 ファミリー)

ヒト*NHE* 遺伝子は, HUGO Gene Nomenclature Committee の命名法に従って *SLC 9* ファミリーとされ,現在11 種類がこれに属している (*SLC 9A 1*~*SLC 9A 11*) (図 2A). 但し, sperm-NHE として知られる *SLC 9A 10* と,殆ど解 析が手付かずの *SLC 9A 11* は,他の *NHE* 遺伝子との塩基 配列上の相同性が有意に低く、分子進化上は遠縁にあたる ことが想定される.Saierらの提唱するTransport Protein Database の分類法<sup>12)</sup>に従って近年実施された網羅的遺伝子 系統解析では、ヒト*NHE1~NHE9*(*SLC9A1~SLC9A9*) およびその高等動物ホモログは cation-proton anitporter family 1 (CPA1) に属するのに対して、*SLC9A10* は Na<sup>+</sup>transporting carboxylic acid decarboxylase family (NaT-DC) に属し、その分子祖先を他の*NHE* とは異にすることが強 く示唆された<sup>1)</sup>.

NHE1~NHE9 タンパク質は、前述のように細胞内の局 在に基づいて大きく二つのクラスに分類される(図 2B). すなわち、細胞膜に局在する NHE1 から NHE5 までの5 種類の細胞膜局在性 NHE と、NHE6 から NHE9 までの4 種類のオルガネラ局在性 NHE である.この分類は、図 2A に示した系統樹上の距離とも良く一致する.厳密には NHE3 と NHE5 もエンドソーム上に一部発現が認められる が、ここでは機能的重要性が明らかにされた細胞内局在に 基づいてこれらを細胞膜局在性 NHE に含め、以降、詳細 は触れない.細胞膜局在性 NHE は、ほぼ全ての臓器で発 現を示す NHE1 を例外として、いずれもかなり臓器特異 的である.一方、オルガネラ局在性 NHE は、mRNA レベ



B)

		臓器発現特異性	細胞内局在	生理的機能
細胞膜局在性 NHE	NHE1	広範な臓器発現	細胞膜、バソラテラル膜(上皮)	<ul> <li>細胞内pH制御</li> <li>細胞容積調節</li> <li>細胞増殖</li> <li>細胞接着および遊走性</li> <li>Na<sup>+</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の再吸収</li> <li>体液量・血液循環量の調節</li> <li>疾患との関連         <ul> <li>直血再灌流障害</li> <li>高血圧</li> <li>先天性分泌性下痢</li> <li>癲癇</li> </ul> </li> </ul>
	NHE2	胃、小腸 > 骨格筋 >> 腎臓、脳、子宮、精巣	細胞膜: アピカル膜(上皮)	
	NHE3	小腸、胃 > 腎臓、胆嚢、精巣上体	細胞膜: アピカル膜、 リサイクリングエンドソーム(上皮)	
	NHE4	胃 >> 腎臓、脳	細胞膜: バソラテラル膜 (上皮)	
	NHE5	脳 (ニューロン)	細胞膜、シナプス小胞	
オルガネラ局在性 NHE	NHE6	広範な臓器発現	ソーティング/リサイクリング エンドソーム	
	NHE7	広範な臓器発現	トランスゴルジネットワーク 後期エンドソーム	- オルガネラpHの制御 - 疾患との関連
	NHE8	広範な臓器発現	ゴルジ体中間槽/トランス槽 アピカル膜(上皮)、感覚毛(蝸牛)	- アンジェルマン症候群様 X連鎖遺伝性精神遅滞
	NHE9	広範な臓器発現	ソーティング/リサイクリング エンドソーム	

**図2** ヒト NHE 遺伝子 (SLC9 ファミリー) の系統樹 (A) と発現・局在・機能 (B)

ルでの解析では比較的広範な臓器発現を示す.

# 3. オルガネラ局在性 NHE の細胞内分布

培養細胞を用いた細胞内局在解析では、それぞれのオル ガネラ局在性 NHE が異なった細胞内分布を示す(図 2B, 図 3A). NHE6 はクローニング当初は、ミトコンドリア膜 に局在するとされたが<sup>13)</sup>、その後、初期エンドソーム (ソーティング及びリサイクリングエンドソーム)局在へ と訂正された<sup>14)</sup>. NHE7 は主としてトランスゴルジネット ワークに局在し<sup>15)</sup>、一部は後期エンドソームに局在してい る.筆者らは NHE8 がゴルジ体の中間槽からトランス槽 に分布すること、また、NHE9 が NHE6 と同様に初期エン ドソームに局在することを報告した<sup>16)</sup>. 但し、両者の細胞 内局在は大部分が重複するものの,完全には一致しない. 我々は,NHE6とNHE9が,それぞれ細胞辺縁部のソー ティングエンドソームと,核近傍のリサイクリングエンド ソームにやや偏った分布を示すことを見出した.以上の細 胞内局在は,その殆どが適当なエピトープタグを付加した NHEを培養細胞に異所的に発現させた実験系から得られ た知見である点を,改めて付記しておきたい.背景とし て,内在性のNHEタンパク質を検出できる良質の抗体作 製が非常に困難である点が挙げられる.また強調しておき たい重要な事実として,オルガネラ局在性NHEは全体と してオルガネラ膜に偏った分布をしているものの,オルガ ネラ膜と細胞膜の間の膜輸送によって動的に両コンパート メント間を往来することが明らかになっている<sup>14,17)</sup>.



図3 オルガネラ局在性 NHE の細胞内分布と各オルガネラの内腔 pH A) オルガネラ局在性 NHE は分泌経路,エンドサイトーシス経路のオルガネラ膜上に,それぞれ特異的な細胞内分布を示す. NHE6 と NHE9 は初期エンドソーム系のソーティング/リサイクリングエンドソーム,NHE7 は TGN,NHE8 はゴルジ体の中間槽 とトランス槽に主に局在する.B) これらのオルガネラの内腔は固有の弱酸性~酸性 pH に保たれていることが知られている.分 泌経路はゴルジ体から分泌小胞へ,エンドサイトーシス経路は初期エンドソームからリソソームへと,どちらの経路も過程を進 行するに従ってより酸性化する.

一方で、まだ報告数こそ少ないが、生物個体内での知見 も幾つか存在する. これらの報告では NHE6, NHE8, NHE9の細胞膜への局在が示されており、培養細胞での局 在とは必ずしも単純に符合しない. 例えば、 ラット腎臓に おいては、近位尿細管上皮細胞のアピカル側刷子縁膜上に NHE8の発現が確認される<sup>18)</sup>.発現量はとくに幼若ラット において顕著に高い<sup>19)</sup>. ラット小腸上皮や、ラット腎臓上 皮由来の NRK 細胞においても同様の局在を示す報告があ る<sup>20,21)</sup>. さらに 2006 年には, Hill らによってカエル蝸牛の 内有毛細胞の感覚毛における NHE6 と NHE9 の発現が報 告されている<sup>22)</sup>.内有毛細胞では、脱分極に伴って電位依 存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを介した Ca<sup>2+</sup>の流入が起こる. 定常状 態を回復するためのCa<sup>2+</sup>の排出は、感覚毛のCa<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase (PMCA2) 依存的<sup>23)</sup>であるとされ,結果的に感覚 毛内が酸性化する. 有毛細胞が面している中央階を満たす のは K<sup>+</sup>濃度が高い内リンパ液である.以前から細胞外 K<sup>+</sup> 依存的に感覚毛内の pH を回復させる仕組みが想定されて いたが、その分子実体は明らかではなかった.彼らの報告 では、NHE6やNHE9が感覚毛上でそのプロトン排出を担 う輸送体の分子実体であることが強く示唆されている.後 に述べるようにオルガネラ膜局在性 NHE (NHE7 および NHE8) は K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送活性を持つことが示されている ため,基質特異性に関しては感覚毛で報告されているプロ トン排出活性と矛盾しないとみてよい.

以上のような報告は、特殊な機能と形態を備えた細胞膜 における局在を示すものであるが、オルガネラ膜局在性 NHE が全ての臓器・組織においてオルガネラ膜にのみ局 在するわけではないことを示している点で非常に興味深 い.筆者らは、これらの細胞においては、NHE の局在を 細胞膜に規定する特異的な分子間相互作用が存在している ものと予想している.具体的には NHE1 や NHE3 に見ら れるような、アクチン細胞骨格系、足場(scaffold)タン パク質、あるいは脂質マイクロドメインとの物理的相互作 用などが想定されよう<sup>2,4,10</sup>.

## 4. オルガネラ内腔 pH の制御と NHE

分泌経路, エンドサイトーシス-リサイクリング経路上 の NHE の分布を纏めると,図 3A のようになる.興味深 いのは,これらオルガネラの内部 pH が弱酸性~酸性の範 囲で固有の値をとるという事実である(図 3B)<sup>24)</sup>.分泌経 路では小胞体からゴルジ体,トランスゴルジネットワーク (TGN),分泌小胞と過程が進むごとにオルガネラ内部が より強い酸性 pH を示す.またエンドサイトーシス経路で も,初期から後期エンドソーム,リソソームへと段階を経 るに従い酸性化する.このような観察から,筆者らはそれ ぞれのオルガネラ特異的に局在する NHE が,それぞれの オルガネラに固有の内部 pH を規定する重要な因子の一つ であるという仮説を提唱した<sup>16</sup>.オルガネラ内腔が酸性に 保たれていることは,pH 勾配を利用した神経伝達物質の 取り込み,タンパク質の翻訳後修飾,リソソームにおける 酸性加水分解酵素の活性化,細胞内のタンパク質および脂 質輸送など多種多様なオルガネラの機能発現に重要である ことが知られる<sup>24</sup>.また,ウイルス感染過程との関連から 病理学的な研究対象にもなっている<sup>24</sup>.オルガネラ内の pH 調節におけるオルガネラ NHE の機能的重要性が立証 できれば,上記のような様々な生命現象との関連から,そ の生理機能の解明に迫る足掛かりとなりうる.

しかし現状では、オルガネラ内腔 pH 制御系の全体像の 理解が充分ではない(図4A).まず、オルガネラの膜には ATP 駆動性のプロトンポンプ, V-ATPase (vacuolar  $H^+$ -ATPase)が存在している.このプロトンポンプがオルガ ネラ内腔の酸性化の中心的な役割を担うことは、実験的に 充分な実証がなされた知見といえよう. V-ATPase による プロトンの汲み上げは起電性の輸送であるため、それ単独 で機能した場合、オルガネラ内部をプラスとする膜電位に よって内腔は充分に酸性化できない.しかし、実際にはオ ルガネラ膜は平衡状態において殆ど膜電位を維持していな いことが知られている.これは、この膜電位の抑制的作用 を相補する負電荷の移動が存在するためである.現在, Cl<sup>-</sup>チャネルやCl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体などのイオン輸送体がア ニオンの流入路を形成し、これを担っていると考えられて いる. さらに、V-ATPaseの阻害剤を用いた実験では、速 やかにオルガネラ膜を介した pH 勾配が消失することが示 されている<sup>25)</sup>. つまり, オルガネラの膜にはプロトンの流 出経路も存在しているものと考えられる. オルガネラ内の pH は、これら複数のイオン輸送体の活性のバランスに よって一定の範囲に保たれているのであろう24.26). そこで 筆者らは、NHE がプロトン流出経路を担う輸送体であり、 なおかつそれぞれが特異的に存在しているオルガネラの pH を規定する因子の一員として機能していると考えた.

この仮説を支持するデータとして,NHE8 や NHE9 を過 剰発現させた COS-7 細胞では,それぞれが特異的に分布 するゴルジ体もしくは初期エンドソームの pH が局所的に アルカリ側へシフトすることを見出した(図 4B)<sup>16)</sup>.これ らは輸送体量の増加による,オルガネラからのプロトン流 出の亢進を示唆する.また,筆者らの最新の論文<sup>27)</sup>では HepG2 細胞において NHE6 の過剰発現,ノックダウンの 両方の効果を確認した(図 4C).すなわち,前者ではエン ドソームのアルカリ化が,後者では酸性化が認められた. 発現抑制による酸性化は輸送体量の減少に伴うプロトン流 出量の減衰を原因とした現象と解釈できる.また他のグ ループからの報告では,酸性オルガネラに蓄積する蛍光色 素を指標に,NHE ノックダウン細胞におけるエンドソー ムpH の変化が定性的に解析された.HeLa 細胞で,NHE6 とNHE9 のどちらか一方のみをノックダウンしてもエン ドソーム pH は変化しなかったが,両者の発現を同時に抑 制した場合には,内腔 pH の酸性化が引き起こされた<sup>280</sup>. 重複する細胞内局在が示唆するように,NHE6 と NHE9 は 重複した相補的機能を有する可能性がある.HepG2 細胞 では HeLa 細胞とは異なり,NHE6 単独の発現抑制でも影 響が見られたが,これは,細胞間の NHE の発現量や機能 の相違に由来するのかもしれない.

以上のように、オルガネラ局在性 NHE の輸送体量の多 寡が、オルガネラ内腔の pH を左右することは複数の実験 的証拠から明らかである.しかしながら、それをもってオ ルガネラ pH の制御因子としての NHE の機能を立証した と結論するには不充分である.また、各オルガネラの pH が固有の値に保たれているという実験的事実を、オルガネ ラ特異的な NHE の局在によってのみ説明することはでき ない.次に述べるような還元的な生化学の手法によって、 各輸送系のイオン輸送特性が把握され、そこから pH 制御 システム全体のふるまいを各要素の活性の総和として理解 できるような、構成的実験系が確立されることが待たれ る.

## 5. イオン輸送活性

基質との反応によって生成物が産生される一般的な酵素 反応とは異なり、NHEのイオン輸送の結果生じるものは、 膜を介した基質の移動のみである.従って、そのイオン輸 送能の測定には、まず脂質二重膜で閉鎖された空間を作り 出す必要がある.そして、その膜上に組み込まれた NHE 依存的なイオンの取り込みあるいは排出を測定することに よって、輸送活性の評価が可能になる.

細胞そのものもまた脂質二重膜に囲まれた系であるた め、歴史的には細胞自体を用いて細胞膜局在性 NHE の活 性測定が行われてきた.しかし、細胞膜のさらに内側に存 在するオルガネラ膜というトポロジー上の制約により、単 純に細胞自体をオルガネラ局在性 NHE の実験系に適用す ることはできない.この点において例外的なのは NHE8 である.NHE8 は、極性を形成した NRK 細胞のアピカル 膜に局在することが明らかになったために、その内在性タ ンパク質由来の活性が測定された<sup>21)</sup>.ちなみに、この実験 系では Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送活性のみが検出された.Aedes aegypti NHE8<sup>29,30)</sup>や、後述する筆者らのマウス NHE8 のリポ ソーム再構成系<sup>16)</sup>では Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送活性に加えて K<sup>+</sup>/







第6膜貫通ヘリックス

となった. また彼らは基質である Na<sup>+</sup>のアロステリックな 効果を示すデータを得たが、これも筆者らの系では確認さ れなかった.以上のような輸送特性の相違が何に起因する のかは不明である.

また NHE7 に関して,界面活性剤で細胞膜を透過処理 し、TGN を含む内膜系へのアルカリカチオンの取り込み 活性が測定された<sup>15)</sup>. その結果, NHE7 が Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>などのアルカリカチオンに対して広い基質選択性を有 することが示された.細胞質は Na<sup>+</sup>(数 mM) に比べて K<sup>+</sup> (百数十 mM)の濃度が高いため、生理的な環境下で NHE7 が輸送するプロトンに対するカウンターイオンは、K<sup>+</sup>で ある可能性が高いと結論された.

厳密な生化学的アプローチの実現には、やはり精製タン パク質のプロテオリポソームへの再構成系が理想的であ る.しかし、複数膜貫通セグメントを持つイオン輸送性タ ンパク質は、大量発現系の構築や精製タンパク質標品の調

製などに多くの困難が伴い、技術的に容易ではない、筆者 らは、オルガネラ局在型 NHE のイオン輸送活性を測定す る in vitro 再構成系の確立を目的とし、出芽酵母 S. cere*visiae* の発現系を用いて解析に取り組んできた(図 5)<sup>16</sup>. C 末端に His タグを融合させたマウス NHE8 タンパク質を 発現させ、粗精製 NHE8 タンパク質をリポソームに組み 込み、pH 感受性蛍光指示薬のピラニンを用いてイオン輸 送活性を測定することに成功した. この報告で NHE8の 広い基質選択性、ミカエリス・メンテン型の反応特性を明 らかにした(図 5A). また Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>に対する  $K_{\rm M}$  値として, それぞれ 130 mM と 75 mM という値を得た. 相対的な V<sub>max</sub> は Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>でほぼ同じ値をとることがわかった (図 5B). 以上の結果から、NHE8の細胞内での効率的な輸送基質と なりうるのは(少なくともオルガネラ膜上では)、やはり K<sup>+</sup>であることが強く示唆された.次に,全ての NHE およ びホモログで完全に保存された酸性残基に注目した(図5) C).当時既に,NHE1では第6 膜貫通へリックス中のこれ らの残基が,イオン輸送に必須であることが知られてい た<sup>31,32)</sup>.筆者らは,これに相当する残基(220番目のグル タミン酸および225番目のアスパラギン酸)の重要性を, マウス NHE8でも検証した.それぞれの残基をグルタミ ンとアスパラギンに置換した酸性残基置換変異体 NHE8 では,活性がほぼ完全に消失していた.以上から,これら の残基の活性発現における重要性を,オルガネラ局在性 NHE として初めて示すことができた.現在までに,同様 の手技により NHE7 についてもイオン輸送活性の測定に 成功している.

しかし一方で,試行錯誤を重ねても NHE8 または NHE7 の単一精製タンパク質標品を調製することは叶わなかっ た.NHE6 は酵母細胞内で発現せず,NHE9 は粗精製後の タンパク質がプロテオリポソーム上で機能を示さないなど の課題も依然として克服できていない.それでもやはり, NHE8 再構成系が与える知見は, $K_{\rm M}$  値や活性に重要な機 能残基の評価など生化学的な測定系ならではの有用な情報 を含んでいる.今後,更なる改良を加え,NHE のイオン 交換輸送活性を生化学的な手法で立証し,さらに輸送体の 量と種類・駆動力となる pH あるいはアルカリ金属カチオ ンの膜内外の勾配・膜電位など基本的に全てのパラメー ターを任意に設定可能な系を構築して,pH 制御システム 全体における NHE の機能の解明に繋げたいと考えてい る.

## 6. オルガネラ局在性 NHE の相互作用因子

全ての NHE は特徴的な二つの領域から成る(図 6A). N 末側の推定 10~12 回の膜貫通へリックスからなる疎水 性領域(約 450~550 アミノ酸残基)と,細胞質に露出し た C 末側の長大な親水性領域(約 100~450 アミノ酸残基) である.疎水性領域はイオン輸送路を形成している.この 疎水性領域は,アイソフォーム間で比較的高度に保存され ている(図 6B).前述のように,NHE1において同定され た機能残基の機能的重要性が,NHE8 や,後に述べる NHE6 において保存されている事実も,細胞膜局在性 NHE とオルガネラ局在性 NHE のイオン輸送のメカニズム が少なからず共通であることを示唆する.

C 末側親水性領域は、アイソフォーム間でそのアミノ酸 配列に多様性が認められる(図 6B).全体的な傾向として は、細胞膜局在性 NHE に比べて、オルガネラ局在性 NHE の C 末端は比較的短い.またそのアミノ酸配列は、細胞 膜局 在性 NHE とオルガネラ局 在性 NHE 間で大きく異 なっている(NHE8 はなかでも際立って相同性が低い). CHP1 (calcineurin homologus protein 1)や NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor)など、これまでに同定された 細胞膜局在性 NHE の主要結合因子は基本的に全て C 末端 に結合する<sup>2.4.11</sup>. しかし, これらの因子の結合配列はオル ガネラ局在性 NHE には存在せず, また実際に直接的相互 作用も確認されない. このような点を考慮すると, オルガ ネラ局在性 NHE は, C 末端を介した特異的な分子間相互 作用を介して, 局在・機能の調節が調節されていることが 予想される.

# 6-1. **RACK**1

筆者らは NHE9 の C 末端をベイト (bait) にした酵母ツー ハイブリッドスクリーニングを実施し, RACK1 (receptor for activated c-kinase 1)を単離した<sup>17)</sup>. RACK1 は,活性化 状態のプロテインキナーゼ C (PKC)と特異的に結合し, 活性化状態を維持する正の制御因子として同定された. WD リピートと呼ばれるタンパク質結合モジュールを七つ 繰り返した,プロペラのような構造を持つ.この構造は三 量体 G タンパク質のβサブユニットとも類似する.その 後の解析により,PKC 以外にも様々な結合相手が報告さ れ,複合体形成の場を提供する足場タンパク質 (scaffold) であることが明らかとなっている.これまでに報告された 結合因子は,代謝酵素,キナーゼ,接着因子,受容体,イ オンチャネル,ウイルスタンパク質,足場タンパク質,リ ボソームタンパク質など実に多種多様である<sup>33)</sup>.

細胞の破砕液から RACK1 を共沈殿する結合解析実験に より、NHE9のC末親水性領域の中央部分にあるおよそ 50 アミノ酸程度の領域が RACK1 との結合に関与すること がわかった(図6B).この領域のアミノ酸配列は、既知の RACK1 結合配列との相同性を示さず、新規の結合配列で あることが示唆された.また、このRACK1結合領域は NHE6, NHE7 においても高度に保存されており、実際に RACK1 は NHE8 を除く NHE6, NHE7, NHE9 の C 末端断 片に共通して結合した.内在性のタンパク質を検出できる 抗体としては抗 NHE6 抗体のみが入手可能であったため、 以降の解析は NHE6 を対象に進めた. NHE6 と RACK1 の 共免疫染色で共局在の有無を検討したところ, 細胞内の ドット状の構造において部分的に両者の局在が一致した. このドット状の構造は、おそらく細胞辺縁部のソーティン グエンドソームか、もしくは RACK1 の局在が過去に示さ れているクラスリンピット34)のような細胞膜上の構造だと 考えられる.一方で,リサイクリングエンドソーム上に RACK1 は観察されなかった.続いて、結合の機能的意義 を明らかにする目的で, siRNA を用いて RACK1 のノック ダウン実験を実施した、そして、RACK1の発現が抑制さ れた細胞では、トランスフェリンの取り込みが顕著に減少 することを見出した.この表現型は、V-ATPaseの阻害剤 やイオノホアで人為的にエンドソームをアルカリ化させた 報告において見られる表現型と酷似していた<sup>35,36)</sup>.そこで RACK1 ノックダウン細胞における、オルガネラ内腔 pH のアルカリ化の有無を検討する目的で、エンドソーム pH

<ul> <li>A)</li> <li>「オン輸送路 (N末側疎水性領域)</li> <li>→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→→</li></ul>	細胞外またはオルガネラ内腔 生体膜 細胞質 細胞質 活性調節部位 (C末側親水性領域)	<ul> <li>図6 NHEの二次構造モデルとアミノ酸 配列アライメント</li> <li>A) NHE はN末側の疎水性領域とC末側の親水性細胞質領域からなる.疎水性領域は10~12回の膜貫通へリックスでイオンの輸送路を形成し,C末は活性調節部位として機能している.B) ヒトNHEのアミノ酸配列アライメント.疎水性領域はアイソフォーム間で比較的高度に保存されているのに対して,親水性領域(図中網掛け)は多様性に富んでいる.特に,細胞膜局在 性NHEとオルガネラ膜局在性NHEとの間で,その違いが顕著である.図にはRACK1 結合領域,SCAMP2 結合領域を下線で示した.</li> </ul>
NSHNEI - WILSGUIGUS PHAIPPBI HSHNEI - WILSGUIGUS PHAIPPBI HSHNEI MYGLGARG PDRGL HSHNEI - HALQNYYY-S WUC HSHNEI - HLAUNYY-S WUC HSHNES HLEPGDARPGSGRATGAPP- RLLLLPILLWGURVAAA HSHNES - HG- NSHNES - HG-	LIVVA VILLAV LISIGULSTVAST ISSEPPASI LIVVA VILLAV LISIGULSTVAST ISSEPPASI LIVVA VILLAV LISIGULSTVAST ISSEPPASI LIVVA LICSASSEL LISIGUA LIVVA LICSASSEL LISIGUA LIVVA LICSASSEL LISIGUA ASSESSANDEST VSKLARESHR SASSGAADEDSS MÆELATEREARESHR EKNAGER REPHTYNEGTIV - Q-SRVAJERDE VYGPQN QAVELLVFHFJ Q-SRVAJERDE VYGPQN	VYTAPEVTESSRVARSYTDIGARKEKAPULGIDYTHUKTEELSUATLACIANTEE : 10 HOESGG
HSHHEI : IVIPTIS	TPPF10         SVM_D         SVM_D <t< td=""><td>T I T N G LAMATI GUM AVCLVGGEQ-IMITS</td></t<>	T I T N G LAMATI GUM AVCLVGGEQ-IMITS
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$		NUSELF IV AN ISSUER STATUTED VARE VARE VARE VARE VARE VARE VARE VARE
HENRIEL : SVOCHLET FLOVET VASS-UNNATT LET LECLEDVL HERNEL : VOCHLET FLOVET OKE-DEN MAN GET LA GLENGI HERNEL : VOCHLET FLOVET OKE-DEN MAN GET LA GLENGI HERNEL : VOCHLET FLOVET OKE-DEN MAL GET LA GLENGI HERNEL : VOCHLET FLOVET OKE-DEN MAL GET LA GLENGI HERNEL : COCHLET GLENGI HERNEL : FLOVE SUCCESSION DESUL LOT IL TIFFU HERNEL : FLOVE S	ELO THERE IN THY MERICO FILM OF THE CONTROL OF AN AND AND AND AND AND AND AND AND AND	COLEMAN TWEN TWO WITH TANDEL AVENUE THE THOP LOWERS THE THOP LOWERTED 556 WELL TANK WITH TO FILE TITE AVENT DURING WENG THE TYPE LOWERTED VERTED 556 WELL TANDET TO THE
HSHHEI : ICÜHYGHHHKÖKLNENKKYVKKÜIAGERSKE-PQLIAP HSHHEI : VCÖHYGHHYKÖKLNENKKYVKKÜIAGERSKE-PQLIAP HSHHEI : ISÖQIGHNYLADIKSHÖKKISKILTERLERQEKSSIVSL HSHHEI : VCÖHYSHYCYDKYKÖKKKYKRIKTRIIIEKKILERSARSTOD HSHHEI : VCÖHYSHYCYDKEKKÖNKTRISTRIIIEKKILERSARSTOD HSHHEI : DODPPHNDSPQVLGOOPDSARSHEKTKÖSKMIFRH HSHHEI : DODPPHNDSPQVLGOOPDSARSHEKTKÖSKMIFRH HSHHEI :	HIGHEN QATELVES GUIGKIPS AV STVEN QNI	PALSKOKEEEIN
HSHHEI:         PYEEANNQMILLERQKARQLEQKINNYLL           HSHHEI:         TSEQAAEELLERRASLERSIENDSSLINEHRASTSTSRL           HSHHEI:         EDERQDEEIFHRTMERKLESFRSTKUS-           HSHHEI:         FORQDEEIFHRTMERKLESFRSTKUS-           HSHHEI:         FORQDEEIFHRTMERKLESFRSTKUS-           HSHHES:         AQEQDEEYFQQMIKRELSFRSTKMI	VVPAIKLDSPYMSRAREGLEPUTTDPAS SLERITYLLEEKLQKRETISILDONSSOSDADAUTVULIQEAAB QQKKAAKLYKESRAQKEINISSIPHIGULBEGRAQHITIK TYVSIPPAGRAGROW	PQ-SPESVDLVNIS LKG-KVLGLSRDPAKVAE-EDED- FV-SPESVDLVNIS LKG-KVLGLSRDPAKVAE- FV-SPESVDLVNIS LKG-KVLGLSRDPAKVAE- FV-SPESVDLVNIS LKG-KVLGLSRDPAKVAE- SPACIDA-FV-SPESVDLSRDV-SPESVDLSRDV-SPACIDA-FV-SPE SGLVG2A2GIT INFSLINGRAFSSGTQNNISGE- 
HSN HEI : HSN HSN HSN HSN HSN HSN HSN HSN HSN HSN		

— NHE7-SCAMP2結合配列



A) HeLa 細胞で RACK1 のノックダウンを実施し, pH 感受性色素を結合したトラ ンスフェリンを取り込ませてエンドソームの pH を測定した. RACK1 のノックダ ウンによって, プロトン流出の亢進を示唆するエンドソームのアルカリ化が確認さ れた. B) RACK1 のノックダウン細胞では, 細胞膜上の NHE6 量の減少とエンド ソーム上の増加が確認された. このことから RACK1 は図に示したいずれかの仕組 みによって NHE6 を細胞膜へ留まらせる機能があるものと思われる(①または②). また, NHE6 のイオン輸送活性そのものを抑制している可能性も考えられる(③).

の測定を実施した. pH 感受性の蛍光色素 FITC でラベル されたトランスフェリンでエンドソームを標識し、pHの 値を算出した.その結果,RACK1をノックダウンした細 胞では確かにオルガネラ pH がアルカリ側にシフトしてい ることを示した.また、筆者らは、HeLa細胞の全NHE6 のうちおよそ 20% 前後は細胞膜に存在していることも見 出し、同時に、NHE6 がオルガネラと細胞膜の間を恒常的 に往来していることをエンドサイトーシスの経時的観察か ら明らかにしている. RACK1 ノックダウン細胞における NHE6の局在と発現量を解析した結果、細胞全体の量は変 化しないが、エンドソーム膜上の NHE6 の量が増加して いることを見出した. すなわち, RACK1 ノックダウン細 胞では、NHE6の分布がオルガネラ側に偏っていることが わかった. したがって、エンドソームのアルカリ化は、エ ンドソーム膜上の NHE6 量が増加した(あるいは NHE9 も同様に影響をうけたかもしれないが)ことによってエン ドソーム内腔からのプロトンの流出が亢進したことが一因 であると考えられる. RACK1 は何らかの仕組みによって 細胞膜上に NHE6 を留まらせる役割を担うものと思われ る (図7B). これと類似する RACK1 の機能は、Cl<sup>-</sup>チャ ネルの CFTR<sup>37)</sup>, ABC トランスポーター MDR3<sup>38)</sup>といった 輸送体や、トロンボキサン A2 受容体の TPβ39 でも報告さ

れているが、その詳細な分子機構は不明である.また RACK1 が TRPC3 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3)<sup>40,41)</sup>や TRPM6 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6)<sup>42)</sup>などのイオ ンチャネルを調節する例も知られていることから、RACK1 が PKC 等のキナーゼによるリン酸化などを仲介して、 NHE6 のイオン輸送活性に抑制的に作用する可能性も充分 に残されている.

# 6-2. NHE7 結合タンパク質

NHE7 結合因子の同定は British Columbia 大学の Numata らによって精力的に進められてきた.これまでに SCAMP2 (secretory carrier-associated membrane protein 2)と caveolin が報告されている<sup>43,44)</sup>. SCAMP2 は,TGN-エンドソーム間 をサイクルする NHE7 に結合し,TGN への局在化を促進 する.NHE7 の C 末端にある SCAMP2 結合配列は,NHE6 の RACK1 結合配列に相当する部分と大幅に重複してい る.前述のように RACK1 は少なくとも *in vitro* で NHE7 に対しても結合能を示す.従って,NHE7 は細胞内局在に 応じて,異なる分子構成の複合体を形成しているのかもし れない.caveolin との結合はおそらく細胞膜において起こ る.細胞膜上には界面活性剤に対して感受性が異なる二つ の NHE7 プールが存在し,エンドサイトーシス等,細胞 内での NHE7 の挙動がこのプール間で異なることが示唆 されている.NHE7 と caveolin の結合が示されているのは 界面活性剤に不溶性の画分である.また NHE7 における caveolin 結合モチーフが,既知の結合モチーフとは異なる 未知のものである点が興味深い.質量分析による相互作用 因子の網羅的な探索では, Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン複合体, 中間系フィラメントのビメンチン,ヒアルロン酸結合性膜 タンパク質の CD44 などが同定された<sup>45)</sup>.Ca<sup>2+</sup>-カルモジュ リン複合体は NHE1 の結合因子としても報告されている ため<sup>46,47)</sup>,共通する活性調節の仕組みが存在するのかもし れない.

## 7. NHE6 の新たな生理機能

これまで高等動物のオルガネラ膜局在性 NHE の生理的 役割については,前述の蝸牛内有毛細胞における感覚毛内 pH 調節機能を示唆する報告がほぼ唯一のものであったと いってよい.しかし,ごく最近になって,新たな NHE6 の細胞内生理機能,高次生命現象との関連を示唆する知見 が得られたのでこれを紹介する.

## 7-1. HepG2 細胞における極性維持

最新の報告<sup>27)</sup>で筆者らは、解析対象を極性細胞に広げる 目的で、肝細胞由来 HepG2 細胞における NHE6 の細胞内 局在を観察した.この細胞は極性形成能を維持しており、 生体内の肝細胞と同様に胆管側膜(アピカル膜)と血管側 膜(バソラテラル膜)を形成する.隣接する細胞間のアピ カル膜によって仕切られた胆管様の構造は bile canaliculus (BC)と呼ばれる.実際に、生体内と同様に薬剤排出に関 わる種々の薬物輸送体や、その他の代謝酵素が選択的に BC に局在化する.またアクチン骨格に裏打ちされた微絨 毛も形成されることから, HepG2 細胞は肝細胞極性形成 の in vitro モデルとして利用されてきた. NHE6 は HepG2 細胞においてもやはりエンドソーム系に局在したが、興味 深いのは, sub apical compartment (SAC) と呼ばれる, 極 性細胞における特殊なリサイクリングエンドソームにも局 在が確認されたことであった. このオルガネラはアピカル リサイクリング経路およびトランスサイトーシス経路の中 心的拠点として、脂質およびタンパク質の選別輸送の場を 提供し、極性維持に重要であることが知られていた(図8 A)<sup>48,49</sup>. 筆者らは NHE6 が SAC を含む広範なエンドソー ム系の pH を制御しているとすれば、そのような脂質やタ ンパク質の極性輸送と関連した機能が存在するかもしれな いと期待した.

そこで、NHE6のノックダウンを実施した(図8B).す ると、NHE6の発現を抑制した細胞では、48時間後に形 成される BC 数が大幅に減少していた.一方で、オンコス タチン M (OSM) や、cAMP アナログの db-cAMP 処理で 誘導される、新規の BC 形成<sup>50</sup>には影響が見られなかっ た.またノックダウンから48時間経過後の細胞をあらた めて播種し、24時間以内に形成される新規BC形成数を 比較したが、これも差がやや顕著ではなくなっていた.以 上から、NHE6は新規BCの形成よりも、一度形成された BC構造の維持に関与していることが示唆された.そこで 分子機構を解明するべく、脂質及びタンパク質輸送の解析 を行った(図9A).NHE6ノックダウン細胞ではBCに負 荷した脂質プローブ(C6-NBD-Glc-Cer:NBDラベルされ たグルコシルセラミド誘導体)が速やかにバソラテラル側 へのトランスサイトーシスによって失われた.同様に、ア ピカル膜のタンパク質であるDPP4(dipeptidyl peptidase 4) もまた、BCから失われる傾向が強かった.以上の結果 は、NHE6の発現抑制によってアピカルリサイクリング経 路が異常をきたし、脂質やタンパク質などのアピカル膜成 分を維持できなくなったことを示唆している(図9B).

次に、NHE6の過剰発現がBC形成に与える影響を調べ る目的で,安定発現株を作成し,これを観察に用いた.併 せて実施したエンドソーム pH 測定では、ノックダウンで 酸性化、過剰発現でアルカリ化という全く逆方向の影響が 確認できたにも関わらず(図 4C),意外なことに,安定発 現株においてもノックダウンとほぼ同様の BC 維持に対す る抑制効果が確認された(図8C).またアピカル膜成分の 維持に対する異常も見られた(図 9A).酸性残基の置換を 行った NHE6 変異体の安定発現株では、エンドソームの 酸性化は認められず、また BC 維持への影響もみられな かった(図4および8C). つまり,NHE6量の増減それ自 体が極性の維持に影響するのではなく,活性依存的に起こ るエンドソーム内 pH の変動が影響したものと解釈でき る.以上の結果から、エンドソーム pH には最適なアピカ ルリサイクリングを実現し, BC の構造を安定的に維持で きる特定の至適範囲があるものと考えられる(図 9B). pH の変化が、リサイクリングの経路にどう影響するのか、具 体的に膜輸送のどのステップと関連するのか、分子レベル での仕組みの解明が今後の課題である. COP 小胞構成因 子<sup>51,52</sup>や Arf6, ARNO<sup>53,54</sup>などの輸送マシナリーの構成因子 が pH 依存的にエンドソームの膜ヘリクルートされるとい う報告があり、背景にはこれに類似する仕組みが存在して いるのかもしれない.

#### 7-2. X連鎖遺伝性精神疾患との関連

オルガネラ局在性 NHE の研究で近年最も大きなインパ クトを与えたのは、小頭症・癲癇・運動失調・言語障害な どアンジェルマン症候群様の症状を示す X 連鎖精神遅滞 疾患が認められる複数の家系において、複数種類の NHE6 の変異を同定した報告であろう<sup>55</sup>.アンジェルマン症候群 は数万に一人の割合で発症し、原因遺伝子は E3 ユビキチ ンリガーゼの UBE3A 遺伝子である.しかし 10~15% の 患者にはこの遺伝子座に異常が見られないことが知られて



図8 HepG2 細胞における NHE6 の細胞内局在と NHE6 発現量が極 性維持に与える影響

A) 極性を形成した HepG2 細胞において,NHE6 はエンドソーム系 のオルガネラに広範に分布している.特に,アピカル膜(BC)近 傍のアピカルリサイクリングエンドソームや,SAC(サブアピカル コンパートメント)など極性輸送の拠点になるオルガネラにも局在 する.B)NHE6のノックダウンを行い,BCの数を計数した.48 時間後にはノックダウンした細胞におけるBC数が半減した.しか し,OSM(オンコスタチンM)やdb-cAMPによって誘導されるBC の新規形成には影響が見られなかった.また細胞を再播種した 後,24時間で形成されるBC数には,それほど顕著な差は見られ なかった.以上の結果からNHE6はBCの新規形成よりもむしろ, 形成されたBCの構造維持に重要であることが示唆された.C) NHE6の過剰発現株でもノックダウンと同様の効果が確認された. NHE6のノックダウンと過剰発現はそれぞれエンドソームpHの酸 性化とアルカリ化を引き起こすことから(図4C),エンドソームの pHの異常がBC数の減少に関与していることが示唆された.



いた<sup>50</sup>. すなわち,NHE6 遺伝子の変異を発症の原因とし ている相当数の患者が潜在的に存在している可能性があ る.病態の詳細は明らかではないが,プロトン核磁気共鳴 造影法により,ある患者の大脳基底核においてグルタミン とグルタミン酸の蓄積を示す示唆的な結果が得られてい る.グルタミン酸の蓄積は進行性小脳変性症や癲癇とも関 連することが指摘されている.そのためNHE6の異常と の関連は不明であるが,グルタミン酸の蓄積が発症の引き 金となっている可能性があると著者らは指摘した.ちなみ

に、NHE6 ノックアウトマウスも多動や痙攣発作を示しや すくなることが知られており、類似点が見られる.また、 同疾患の患者で見出された変異タンパク質の一つである2 アミノ酸欠失体 NHE6 (255 番目と 256 番目のアミノ酸が 欠失)は、高度にユビキチン化を受けること、野生型に比 べてプロテアソームとリソソーム依存的な分解が亢進して いることが示された<sup>28)</sup>.すなわち変異体は安定に細胞内で 存在できず、野生型よりも迅速に分解を受けるものと思わ れる.



### 8. 終わりに

本稿では、オルガネラ局在性 NHE の細胞内局在・活 性・生理機能について最近の知見を述べた.詳細は殆ど触 れることができなかったが、出芽酵母のホモログである Nhx1pの研究が、高等動物の研究においても多くの面で先 導的役割を果たしてきたことを最後に述べておく.肝細胞 の極性維持や、遺伝性の精神遅滞との関連を示した最新の NHE6 研究から得られた知見は、このイオン輸送体ファミ リーがさらに多様な高次の生命現象に重要な役割を果たし ている可能性を示すものである.オルガネラ局在性 NHE は今後ますます多くの注目を集めることになると期待され る.

事業の大垣,松下両名へのサポートにより,オランダ王国 グローニンゲン大学の Dick Hoekstra 教授, Sven Ijzendoorn 博士との共同研究として実施致しました.同事業関係者の 皆様,並びに共同研究者の方々に深く感謝いたします.

## 献

文

- Brett, C.L., Donowitz, M., & Rao, R. (2005) Am. J. Physiol. Cell Physiol., 288, C223–239.
- Orlowski, J. & Grinstein, S. (2004) *Pflugers. Arch.*, 447, 549– 565.
- 3) 金澤 浩, 三井慶治, 松下昌史 (2007) 生化学, **79**, 569-578.
- Slepkov, E.R., Rainey, J.K., Sykes, B.D., & Fliegel, L. (2007) Biochem. J., 401, 623–633.
- 5) Malo, M.E. & Fliegel, L. (2006) Can. J. Physiol. Pharmacol., 84, 1081–1095.

- Kiela, P.R., Xu, H., & Ghishan, F.K. (2006) J. Physiol. Pharmacol., 57 Suppl 7, 51–79.
- 7) Bobulescu, I.A. & Moe, O.W. (2006) Semin. Nephrol., 26, 334–344.
- Matsushita, M., Sano, Y., Yokoyama, S., Takai, T., Inoue, H., Mitsui, K., Todo, K., Ohmori, H., & Kanazawa, H. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293, C246–254.
- Lin, X. & Barber, D.L. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93, 12631–12636.
- 10) Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2001) J. Biol. Chem., 276, 17367–17372.
- Donowitz, M., Cha, B., Zachos, N.C., Brett, C.L., Sharma, A., Tse, C.M., & Li, X. (2005) J. Physiol., 567, 3–11.
- 12) Chang, A.B., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C.V., & Saier, M.H., Jr. (2004) *Mol. Membr. Biol.*, 21, 171–181.
- 13) Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., & Orlowski, J. (1998) J. Biol. Chem., 273, 6951–6959.
- 14) Brett, C.L., Wei, Y., Donowitz, M., & Rao, R. (2002) Am. J. Physiol. Cell Physiol., 282, C1031–1041.
- 15) Numata, M. & Orlowski, J. (2001) J. Biol. Chem., 276, 17387–17394.
- 16) Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2005) J. Biol. Chem., 280, 1561–1572.
- 17) Ohgaki, R., Fukura, N., Matsushita, M., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2008) J. Biol. Chem., 283, 4417–4429.
- 18) Goyal, S., Vanden Heuvel, G., & Aronson, P.S. (2003) Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 284, F467–473.
- 19) Becker, A.M., Zhang, J., Goyal, S., Dwarakanath, V., Aronson, P.S., Moe, O.W., & Baum, M. (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol., 293, F255–261.
- 20) Xu, H., Chen, R., & Ghishan, F.K. (2005) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 289, G36–41.
- 21) Zhang, J., Bobulescu, I.A., Goyal, S., Aronson, P.S., Baum, M. G., & Moe, O.W. (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol., 293, F761–766.
- 22) Hill, J.K., Brett, C.L., Chyou, A., Kallay, L.M., Sakaguchi, M., Rao, R., & Gillespie, P.G. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 9944– 9955.
- Dumont, R.A., Lins, U., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., Kachar, B., & Gillespie, P.G. (2001) J. Neurosci., 21, 5066–5078.
- 24) Paroutis, P., Touret, N., & Grinstein, S. (2004) *Physiology* (*Bethesda*), 19, 207–215.
- (25) Kim, J.H., Lingwood, C.A., Williams, D.B., Furuya, W., Manolson, M.F., & Grinstein, S. (1996) J. Cell Biol., 134, 1387– 1399.
- 26) Demaurex, N. (2002) News. Physiol. Sci., 17, 1-5.
- 27) Ohgaki, R., Matsushita, M., Kanazawa, H., Ogihara, S., Hoekstra, D., & van IJzendoorn, S.C. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 1293–1304.
- 28) Roxrud, I., Raiborg, C., Gilfillan, G.D., Stromme, P., & Stenmark, H. (2009) *Exp. Cell Res.*, **315**, 3014–3027.
- 29) Kang'ethe, W., Aimanova, K.G., Pullikuth, A.K., & Gill, S.S. (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol., 292, F1501–1512.
- 30) Piermarini, P.M., Weihrauch, D., Meyer, H., Huss, M., & Beyenbach, K.W. (2009) Am. J. Physiol. Renal Physiol., 296, F730-750.
- 31) Fafournoux, P., Noel, J., & Pouyssegur, J. (1994) J. Biol. Chem., 269, 2589–2596.
- 32) Murtazina, R., Booth, B.J., Bullis, B.L., Singh, D.N., & Fliegel, L. (2001) Eur. J. Biochem., 268, 4674–4685.

- 33) McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., & Yarwood, S.J. (2002) Mol. Pharmacol., 62, 1261–1273.
- 34) Gallina, A., Rossi, F., & Milanesi, G. (2001) Virology, 283, 7–18.
- 35) Presley, J.F., Mayor, S., McGraw, T.E., Dunn, K.W., & Maxfield, F.R. (1997) J. Biol. Chem., 272, 13929–13936.
- 36) Nieland, T.J., Feng, Y., Brown, J.X., Chuang, T.D., Buckett, P. D., Wang, J., Xie, X.S., McGraw, T.E., Kirchhausen, T., & Wessling-Resnick, M. (2004) *Traffic*, 5, 478–492.
- 37) Auerbach, M. & Liedtke, C.M. (2007) Am. J. Physiol. Cell Physiol., 293, C294–304.
- 38) Ikebuchi, Y., Takada, T., Ito, K., Yoshikado, T., Anzai, N., Kanai, Y., & Suzuki, H. (2009) *Hepatol. Res.*, 39, 1091–1107.
- 39) Parent, A., Laroche, G., Hamelin, E., & Parent, J.L. (2008) *Traffic*, 9, 394–407.
- 40) Bandyopadhyay, B.C., Ong, H.L., Lockwich, T.P., Liu, X., Paria, B.C., Singh, B.B., & Ambudkar, I.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 32821–32830.
- 41) Woodard, G.E., Lopez, J.J., Jardin, I., Salido, G.M., & Rosado, J.A. (2010) J. Biol. Chem., 285, 8045–8053.
- 42) Cao, G., Thebault, S., van der Wijst, J., van der Kemp, A., Lasonder, E., Bindels, R.J., & Hoenderop, J.G. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 168–176.
- 43) Lin, P.J., Williams, W.P., Luu, Y., Molday, R.S., Orlowski, J., & Numata, M. (2005) J. Cell Sci., 118, 1885–1897.
- 44) Lin, P.J., Williams, W.P., Kobiljski, J., & Numata, M. (2007) *Cell. Signal.*, 19, 978–988.
- 45) Kagami, T., Chen, S., Memar, P., Choi, M., Foster, L.J., & Numata, M. (2008) *Mol. Membr. Biol.*, 25, 436–447.
- 46) Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J., & Shigekawa, M. (1994) J. Biol. Chem., 269, 13703–13709.
- 47) Wakabayashi, S., Ikeda, T., Iwamoto, T., Pouyssegur, J., & Shigekawa, M. (1997) *Biochemistry*, 36, 12854–12861.
- 48) van IJzendoorn, S.C., Maier, O., van Der Wouden, J.M., & Hoekstra, D. (2000) J. Cell Physiol., 184, 151–160.
- 49) Hoekstra, D., Tyteca, D., & van IJzendoorn, S.C. (2004) J. Cell Sci., 117, 2183–2192.
- 50) van der Wouden, J.M., van IJzendoorn, S.C., & Hoekstra, D. (2002) *EMBO J.*, 21, 6409–6418.
- 51) Aniento, F., Gu, F., Parton, R.G., & Gruenberg, J. (1996) J. Cell Biol., 133, 29–41.
- 52) Gu, F. & Gruenberg, J. (2000) J. Biol. Chem., 275, 8154– 8160.
- 53) Hurtado-Lorenzo, A., Skinner, M., El Annan, J., Futai, M., Sun-Wada, G.H., Bourgoin, S., Casanova, J., Wildeman, A., Bechoua, S., Ausiello, D.A., Brown, D., & Marshansky, V. (2006) Nat. Cell Biol., 8, 124–136.
- 54) Maranda, B., Brown, D., Bourgoin, S., Casanova, J.E., Vinay, P., Ausiello, D.A., & Marshansky, V. (2001) J. Biol. Chem., 276, 18540–18550.
- 55) Gilfillan, G.D., Selmer, K.K., Roxrud, I., Smith, R., Kyllerman, M., Eiklid, K., Kroken, M., Mattingsdal, M., Egeland, T., Stenmark, H., Sjoholm, H., Server, A., Samuelsson, L., Christianson, A., Tarpey, P., Whibley, A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Teague, J., Edkins, S., Gecz, J., Turner, G., Raymond, F.L., Schwartz, C., Stevenson, R.E., Undlien, D.E., & Stromme, P. (2008) Am. J. Hum. Genet., 82, 1003–1010.
- 56) Clayton-Smith, J. & Laan, L. (2003) J. Med. Genet., 40, 87– 95.