

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07939

研究課題名(和文)プロトンポンプによるイオン環境の形成とオルガネラ輸送の新展開

研究課題名(英文) Mechanism for ionic environment formation and organelle trafficking by proton-pumping V-ATPase

研究代表者

中西 真弓 (Nakanishi, Mayumi)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：20270506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、破骨細胞の分泌リソソームにおけるプロトンポンプV-ATPaseの役割の解明を目的とした。V-ATPaseの $\alpha 3$ イソフォームの遺伝子欠損マウスを用い、分泌リソソームの波状縁への輸送や、小胞輸送調節因子であるRab7のリソソームへの回収において $\alpha 3$ が不可欠であること、 $\alpha 3$ は不活性型のRab7と特異的に結合することなどを示した。Rab7は、 $\alpha 3$ との結合を介してリソソームへ回収され、活性化後に輸送を開始すると考えられる。分泌リソソームは、免疫細胞による細胞傷害やがん細胞の転移など多様な生命現象に関与することから、本成果は、こうした現象や関連疾患の理解を深め、新規治療法の開発へと発展する。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast secretory lysosomes move toward the plasma membrane and release their enzymes required for bone resorption. We have shown that $\alpha 3$ isoform of proton-pumping V-ATPase has an essential role in outward trafficking of secretory lysosomes. The $\alpha 3$ is lysosome-specific isoform of the α subunit that forms the proton pathway in V-ATPase. Using $\alpha 3$ -knockout mice, we found that $\alpha 3$ is indispensable for recruitment of Rab7, a small GTPase involved in lysosome trafficking. We also found that $\alpha 3$ specifically interacts with inactivated-form of Rab7. These results suggest that $\alpha 3$ recruits Rab7 to secretory lysosomes through their direct interaction. Secretory lysosomes are involved in various cell type-specific functions, such as secretion of pore-forming protein from cytotoxic T cells and metastasis of cancer cells. Thus, our findings will provide a new insight into these functions, and promote development of novel treatments for related diseases.

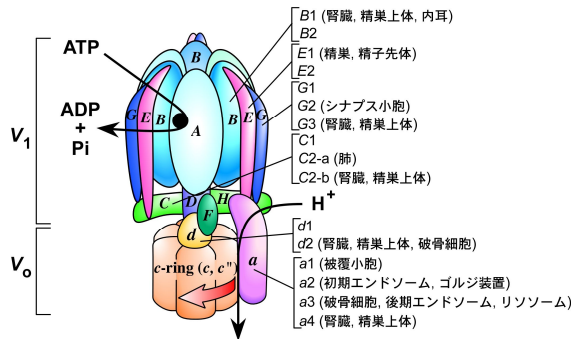
研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：プロトンポンプ 酸性環境 オルガネラ輸送 破骨細胞 ATPase

1. 研究開始当初の背景

(1) プロトンポンプであるV-ATPaseは、細胞内外のpHを調節することで酸性環境を形成している。このポンプは、局在する細胞やオルガネラによって構造が少しずつ異なっており、こうした構造的多様性が、多様な酸性環境を形成していると考えられる。

(2) マウスV-ATPaseの13種のサブユニットのうち、C、E、G、a、dサブユニットに、細胞あるいはオルガネラに特異的なイソフォームが存在している(下図)。たとえば、プロトン輸送路を形成しているaサブユニットには4種類のイソフォームがあり、a1イソフォームは被覆小胞に、a2は初期エンドソームやゴルジ装置に、a3は後期エンドソームやリソソームにそれぞれ局在している。我々は、破骨細胞への分化に伴い、発現が増加するa3イソフォームに注目し研究を進めた。



(3) 破骨細胞では、分化に伴いリソソームが形質膜へ移動・融合し、リソソーム酵素を分泌する。「分泌リソソーム」と呼ばれるこの仕組みにより、リソソームのV-ATPaseが形質膜へ輸送され、分泌された酵素が骨を分解するために適した酸性環境を形成する。分泌リソソームは、骨吸収だけでなく、免疫細胞による不要細胞の除去や、がん細胞の転移にも関与することが報告されている。しかし、その分子機構は充分解明されていない。

(4) われわれは、破骨細胞の分泌リソソーム

ームに局在するV-ATPaseは、a3イソフォームとd2イソフォームを含んでいることを報告した。また、a3遺伝子を欠失したマウスでは、分泌リソソームが形質膜へ向かって移動できないことを示した。また、野生型の破骨細胞では、細胞の縁に微小管の特徴的な集積が見られるが、a3欠損細胞では、そうした集積は観察されなかった。a3欠損マウスは、こうした破骨細胞の機能不全により、大理石病を発症していることを示唆した。以上の知見から、我々は、a3がリソソームの輸送において重要な役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、V-ATPaseのa3イソフォームに注目し、破骨細胞における分泌リソソームの分子機構の解明を目的とした。こうした研究は、骨吸収やホルモン分泌など小胞輸送に関わる生命現象、および、関連する疾患を分子レベルで理解することにつながるため、臨床的な観点からも重要である。

(1) 分泌リソソームにおけるa3の必要性を実証する。
a3が分泌リソソームの移動に必須であることについて、多角的に実証し本研究の信頼性を高める。

(2) a3が関わる分泌リソソームの分子機構を解明する。
分泌リソソームに關与する小胞輸送の調節因子を同定し、a3との関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分泌リソソームにおけるa3の必要性を実証するために
我々は、マウス脾臓マクロファージからin vitroで分化誘導した破骨細胞を用いて、分泌リソソームが細胞の縁に向かって移動し集積すること、a3を欠損した破骨細胞では、その集積が見られないことを示した。さらに、免疫電子顕微鏡法を用い、

マウスの生体内で分化した破骨細胞においても同様の結果が得られるか検討した。in vitro で分化誘導した破骨細胞において、リソソームの輸送を定量的に扱う方法を確立した。

複数のリソソーム・マーカーを用いて、同様の現象が観察されることを確認した。免疫染色法により、リソソーム以外のオルガネラの局在を野生型と a3 欠損細胞で比較した。

FITC-デキストランを取込ませることにより、エンドサイトーシスを野生型と a3 欠損マクロファージで比較した。

(2) a3 が関与する分泌リソソームの分子機構の解明をめざして

分泌リソソームの輸送に関わる因子を同定するために、小胞輸送の調節因子である Rab タンパク質のドミナント・ネガティブな不活性型を破骨細胞に発現させ、リソソーム輸送への影響を検討した。

免疫染色法により、 で同定した因子の局在を、野生型と a3 欠損細胞で比較した。免疫沈降法により、 で同定した因子と a3 の結合を検討した。

大理石病患者の a3 遺伝子について、変異が見られることが報告されている。骨代謝異常症の発症メカニズムの解明を目指して、欠損細胞に変異 a3 を発現させて、骨吸収活性や小胞輸送の調節因子との結合を検討した。

4. 研究成果

(1) 分泌リソソームにおける a3 の必要性

これまでは、マウスの脾臓マクロファージから培養皿上 (in vitro) で分化誘導した破骨細胞を用いて研究していた。そこで、マウスの生体内で分化した破骨細胞についても同様に a3 の機能が観察されるか検討した。リソソームの膜タンパク質である CD68 の局在を電子顕微鏡で観察したところ、野生型マウスの破骨細胞では骨側の形質膜に局在したが、a3 欠損細胞では形質膜にほとんど観察されなかった。すなわち、

マウスの生体内においても、分泌リソソームが形質膜へ向かって輸送されるために a3 が必要であることを示した。

分子機構を解明するには、in vitro で分化誘導した破骨細胞におけるリソソームの局在を定量的に扱う必要がある。そこで、蛍光抗体法で取得した破骨細胞の画像について、細胞の縁から中心に向かって 16 のセクションに分割し、各セクションにおける CD68 の蛍光強度を測定しグラフ化することで、リソソームの局在の定量化が可能となった。この方法により、リソソームの輸送における各 Rab タンパク質の関与などを明確に比較できるようになった。

リソソーム・マーカーとして CD68 を用いてきたが、他のリソソーム膜タンパク質である LAMP-1 を用いて検討した。CD68 を用いた場合と同様の結果が得られ、リソソームの輸送に a3 が必要であることが確認された。

免疫染色法により、初期エンドソームとゴルジ装置の局在に対する a3 の影響を検討した。これらのオルガネラの局在は、a3 の欠損により、変化することはなかった。したがって、a3 はリソソームに特異的に影響していることがわかった。これは、a3 がリソソームに特異的に局在していることに一致している。

細胞内に取り込んだ FITC-デキストランの量を比較することにより、エンドサイトーシスを比較した。a3 を欠損したマクロファージも野生型とほぼ同量のデキストランを取込んだことから、a3 はエンドサイトーシスには影響していないことがわかった。

(2) 分泌リソソームの分子機構

分泌リソソームの輸送に関わる小胞輸送調節因子を同定した。

小胞輸送の調節因子として知られる Rab タンパク質のうち、Rab7, Rab27A, Rab11B についてドミナント・ネガティブな不活性型を破骨細胞に発現させ、分泌リソソーム輸送への影響を検討した。Rab7 は後期エンドソームやリソソームの輸送に、Rab27A

は破骨細胞において分泌リソソームが形質膜と融合する過程に、Rab11A はリサイクリング・エンドソームの輸送に関わる。その結果、Rab7 だけが分泌リソソームの輸送に関わることが示された。

免疫染色法により、Rab7 や Rab27A は野生型の破骨細胞では分泌リソソームに局在するが、a3 欠損細胞では細胞質に拡散していることを明らかにした。これに対し、Rab11A の局在は a3 欠損の影響をほとんど受けなかった。この結果は、Rab7 や Rab27A の分泌リソソームへのリクルートに a3 が必要であることを示唆している。

さらに、これら Rab タンパク質の活性型を発現させたところ、活性型であってもリソソームに局在するために a3 が必要であることがわかった。a3 はこれらの Rab タンパク質の活性化や安定したリソソームへの局在に関与していると考えられる。

免疫沈降法により、Rab タンパク質と a3 を含む a イソフォームの結合を検討したところ、a3 は不活性型の Rab7 や Rab27A と特異的に結合した。a3 は不活性型を分泌リソソームへリクルートしていると考えられる。

骨代謝異常症の発症メカニズムの解明を目指して、a3 欠損破骨細胞に、大理石病患者由来の変異を持つ a3 を発現させることを試みた。その結果、検討した 2 種の変異 a3 は、いずれもタンパク質として検出されなかった。変異により a3 安定に発現できないことが原因で、破骨細胞の機能不全が起きていると考えられる。今後は、報告されている他の変異についても解析する予定である。

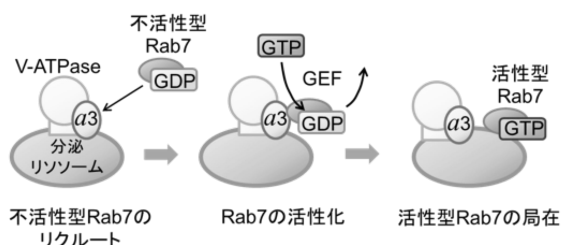
以上の結果により、a3 が分泌リソソームの輸送に必須の役割を持つこと、また、リソソームに対して特異的にはたらいっていることを実証した。

また、a3 が関わる分泌リソソームの分子機構として、a3 が不活性型の Rab7 や Rab27A を分泌リソソームにリクルートすることを示唆した。Rab7 と Rab27A は、何らかの因子により活性化された後、リソソーム膜に安定し

て局在するようになり、微小管を介したリソソームの輸送や形質膜との融合に関わると考えられる（下図）。a3 は、これら Rab タンパク質の活性型と結合しないものの、活性型がリソソームに留まるために必須である。我々は、本研究により、分泌リソソームの分子機構の一端を明らかにした。また、本成果に基づき、骨代謝異常症の発症機構の解析が可能となったことは大きな意味を持つ。

分泌リソソームは、骨吸収だけでなく、細胞傷害性 T 細胞による不要細胞の除去や、色素細胞におけるピグメントの形成、がん細胞の転移などにおいても重要な役割を果たすことが知られている。本研究の成果は、こうした生命現象や関連疾患に対する理解が深まり、新規治療法の開発につながるため、波及効果は極めて大きい。

本研究成果は、科研費による助成がなければ、達成し得なかったものである。心より感謝申し上げます。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

全て査読有り。

1. N. Matsumoto, M. Sekiya, K. Tohyama, E. Ishiyama-Matsuura, G.-H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai, M. Nakanishi-Matsui, Essential Role of the a3 Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment, *Sci. Rep.* 8 (2018) 6701 doi:10.1038/s41598-018-24918-7
2. 後藤奈緒美, 中西真弓, 破骨細胞への分化に伴う液胞型 ATPase の発現誘導と活性、

- 岩手医学雑誌, in press
3. M. Sekiya, Y. Shimoyama, T. Ishikawa, M. Sasaki, M. Futai, M. Nakanishi-Matsui, *Porphyromonas gingivalis* is highly sensitive to inhibitors of a proton-pumping ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, (2018) 837-841. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.066.
 4. M. Sekiya, Y. Sakamoto, M. Futai, and M. Nakanishi-Matsui, Role of α/β interface in F_1 ATPase rotational catalysis probed by inhibitors and mutations. *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 615-621. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.089.
 5. Takahashi K, Mashima H, Miura K, Maeda D, Goto A, Goto T, Sun-Wada GH, Wada Y, Ohnishi H. Disruption of Small GTPase Rab7 Exacerbates the Severity of Acute Pancreatitis in Experimental Mouse Models. *Sci. Rep.* 7 (2017) 2817. doi: 10.1038/s41598-017-02988-3.
 6. Hiasa M, Okui T, Allette YM, Ripsch MS, Sun-Wada GH, Wakabayashi H, Roodman GD, White FA, Yoneda T. Bone Pain Induced by Multiple Myeloma Is Reduced by Targeting V-ATPase and ASIC3. *Cancer Res.* 77 (2017) 1283-1295. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3545.
 7. M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, and M. Futai, ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (2016) 129-140. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.11.005.
 8. Cotter K, Liberman R, Sun-Wada GH, Wada Y, Sgroi D, Naber S, Brown D, Breton S, Forgac M. The $\alpha 3$ isoform of subunit a of the vacuolar ATPase localizes to the plasma membrane of invasive breast tumor cells and is overexpressed in human breast cancer. *Oncotarget*, 7 (2016) 46142-46157. doi: 10.18632/oncotarget.10063.
 9. Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase leads to G1 subunit upregulation in the brain. *Sci Rep.* 5 (2015) 14027. doi: 10.1038/srep14027.
 10. Sun-Wada GH, Wada Y. Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1847 (2015) 1166-72. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.06.010.
- 〔学会発表〕(計 12 件)
1. 松元奈緒美、關谷瑞樹、中西(松井)真弓、破骨細胞における分泌リソソームの局在に対する V-ATPase 阻害剤 (バフィロマイシン A1) の影響 (日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 27 日)
 2. 關谷瑞樹、泉澤信太郎、櫛桁安生、芳賀雅人、下山佑、佐々木実、木村重信、佐々木由香、岩本昌子、中西(松井)真弓、プロトン輸送 ATPase 阻害剤は虫歯菌 *Streptococcus mutans* の耐酸性を低下させる (日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 27 日)
 3. 關谷瑞樹、泉澤信太郎、櫛桁安生、芳賀雅人、下山佑、佐々木実、木村重信、佐々木由香、岩本昌子、中西(松井)真弓、*Streptococcus mutans* の耐酸性における F-ATPase の重要性 (ConBio2017、神戸、2017 年 12 月 7 日)
 4. 泉澤信太郎、關谷瑞樹、櫛桁安生、芳賀雅人、下山佑、木村重信、佐々木由香、岩本昌子、中西(松井)真弓、プロトン輸送 ATPase を標的とした抗う蝕化合物の探索 (日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 26 日)
 5. Harada H, Ida-Yonemochi H, Sahara Y, Ohshima H, Fujiwara N, Matsumoto N, Nakanishi-Matsui M, Otsu K, V-H⁺-ATPase- $\alpha 3$ -subunit contributes to elaborate highly calcifying enamel during amelogenesis (Enamel 9 symposium, Harrogate, 2016 年 10 月 31 日)
 6. 關谷瑞樹、山野辺春香、千葉瑛子、佐藤桃恵、河野富一、大橋暁香、小川智、山越博幸、岩淵俊治、二井將光、中西(松井)真

- 弓、 F_1 -ATPase の回転触媒機構に置ける / 相互作用の役割 (第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 27 日)
7. 松元奈緒美、関谷瑞樹、遠山稿二郎、孫(和田) 戈虹、和田洋、二井將光、中西(松井) 真弓、破骨細胞に特徴的なリソソームの局在における V-ATPase a3 イソフォームの関与 (第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 26 日)
8. 松元奈緒美、高橋翔平、工藤昂士、和田(孫) 戈虹、和田洋、二井將光、中西(松井) 真弓、大理石病患者由来 V-ATPase a3 イソフォーム変異の骨吸収活性への影響 (日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月 27 日)
9. 関谷瑞樹、高橋歩実、小田原大樹、下山佑、木村重信、中西(松井) 真弓、プロトン輸送 ATPase を標的とする抗歯周病化合物の探索 (日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月 27 日)
10. 関谷瑞樹、中山華緒里、鈴木彩香、二井將光、中西(松井) 真弓、 F_1 -ATPase の回転触媒機構に置ける / 相互作用の役割 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015 年 12 月 4 日)
11. 松元奈緒美、高橋翔平、工藤昂士、和田(孫) 戈虹、和田洋、二井將光、中西(松井) 真弓、破骨細胞における V-ATPase a3 イソフォームの機能評価 (第 54 回日本薬学会東北支部大会、矢巾、2015 年 9 月 26 日)
12. 関谷瑞樹、高橋歩実、小田原大樹、下山佑、木村重信、中西(松井) 真弓、プロトン輸送 ATPase の阻害剤による抗歯周病菌作用 (第 54 回日本薬学会東北支部大会、矢巾、2015 年 9 月 26 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 真弓 (NAKANISHI MAYUMI)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：20270506

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

後藤 奈緒美 (GOTO NAOMI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80403971

関谷 瑞樹 (MIZUKI SEKIYA)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：70509033

和田(孫) 戈虹 (GE-HONG SUN-WADA)
同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号：00314427

和田 洋 (YOH WADA)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：50212329

(4) 研究協力者

無し