

令和元年6月10日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07357

研究課題名(和文) V-ATPaseによるリソソームと微小管の局在制御機構

研究課題名(英文) Mechanism of V-ATPase-mediated positioning of lysosomes and microtubules

研究代表者

後藤 奈緒美(松元奈緒美)(Goto-Matsumoto, Naomi)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80403971

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)：破骨細胞による骨吸収には、リソソームが形質膜へ向かって移動することが必要である。この移動と破骨細胞に特徴的な微小管の分布に、プロトンポンプであるV-ATPaseのa3アイソフォームが必須であることを見出した。a3は、リソソームの移動に関わるRab7と特異的に結合してRab7をリソソームへリクルートすること、V-ATPaseにより形成された酸性環境は、Rab7がリソソームへ安定に局在するために重要であることを示した。また、骨と接着していない破骨細胞では、V-ATPaseは解離した不活性型で存在していることがわかり、骨との接着によりV-ATPaseを活性化する機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、分泌リソソームの移動メカニズムを分子レベルで解明した点に意義がある。分泌リソソームは骨吸収だけでなく、細胞傷害性T細胞や高転移性のがん細胞でも重要な役割を果たしており、骨代謝疾患の発症機構解明や治療法の開発に役立つだけでなく、免疫反応や転移の制御にもつながる成果である。オルガネラ輸送がV-ATPaseによりコントロールされていることを示した点も重要である。V-ATPaseはアイソフォームの違いにより構造的な多様性があり、Rabは哺乳動物で60種類以上同定されている。各V-ATPaseと相互作用するRabを明らかにすることで、オルガネラ輸送の全容解明につながる期待される。

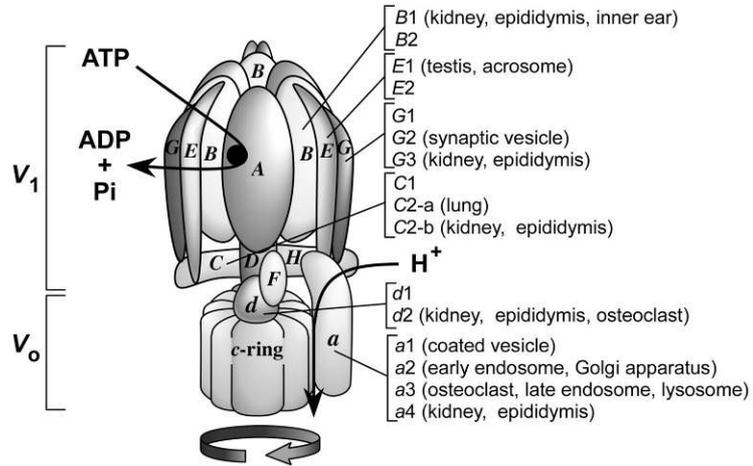
研究成果の概要(英文)：Bone resorption by osteoclast requires lysosome trafficking to plasma membrane. We found that a3 isoform of proton-pumping V-ATPase is essential for the lysosome trafficking and osteoclast-characteristic localization of microtubules. Furthermore, we demonstrated that a3 specifically interacts with GDP-bound Rab7, small GTPase involved in lysosome trafficking, and Rab7 is not localized to lysosomes in a3-knockout osteoclast. These results suggest that a3 recruits Rab7 to lysosome via its interaction with GDP-bound Rab7. We revealed that acidification by V-ATPase is necessary for localization of GTP-bound Rab7 to lysosome. We also showed that V-ATPase induced during osteoclast differentiation is inactive when osteoclasts were cultured on plastic dish, suggesting the mechanism for activation of V-ATPase after adhesion to bone.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム 破骨細胞 V-ATPase Rab

## 1. 研究開始当初の背景

液胞型 ATPase (V-ATPase) は、オルガネラ内部や特定の細胞外環境を酸性化するプロトンポンプである。V-ATPase は 13 のサブユニットから構成され、そのうち 6 種のサブユニットに細胞やオルガネラに特異的なアイソフォームが存在する。アイソフォームの組み合わせが異なる多様な V-ATPase があることにより、様々な酸性環境の形成が可能になると考えられている。また、プロトン輸送路を構成している a サブユニットには、4 種のアイソフォームがある。a3 アイソフォームについて、後期エンドソーム・リソソームに局在すること、破骨細胞への分化により誘導されることが知られている。



破骨細胞は、骨吸収を担う唯一の細胞であり、その機能低下は大理石病を、機能亢進は骨粗鬆症を引き起こす。破骨細胞の機能を制御することにより、骨粗鬆症や関節リウマチなどの予防や治療を行うことは、骨の健康を維持するために重要である。骨吸収には、V-ATPase が破骨細胞の形質膜に局在し、細胞外を酸性化することが不可欠である。前駆破骨細胞では、a3 を持つ V-ATPase はリソソームに局在している。分化に伴い、リソソームが微小管上を輸送されて骨側の形質膜と融合することにより、V-ATPase が形質膜に局在すると示唆されている。しかし、破骨細胞への分化により、リソソームが形質膜側へ輸送されるメカニズムは不明な点が多い。私たちは、破骨細胞が a3 と d2 という特異的なアイソフォーム構成の V-ATPase を有することを既に報告した。また、a3 遺伝子欠損マウスを用いて、a3 が破骨細胞におけるリソソームの輸送と特徴的な微小管の形成に必須であることを見出した。これらは、V-ATPase がオルガネラの局在および微小管の形成を制御していることを示す非常に興味深い知見であると考えた。

## 2. 研究の目的

a3 を欠損するとリソソームが輸送されなくなることから、a3 を介したリソソーム輸送の分子メカニズムを解明することを目的とした。そのために、以下のことを明らかにする。

- (1) リソソームの輸送に関わる因子の同定およびその因子と a3 の関連
- (2) a3 欠損破骨細胞において障害されている輸送メカニズムの解明
- (3) リソソームの輸送および微小管の局在における V-ATPase 活性の必要性

リソソームが形質膜へ向かって移動して融合する「分泌リソソーム」という機構は、破骨細胞だけでなく、細胞傷害性 T 細胞による不要物の除去や高転移性のがん細胞の転移にも重要な役割を果たしている。リソソームの輸送メカニズムを明らかにすることで、骨代謝異常症だけでなく、免疫疾患やがんの新たな治療法の開発にも貢献することを目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) リソソームの輸送に関わる因子の同定およびその因子と a3 の関連

リソソームの輸送に関わる因子として、オルガネラの輸送に関わる低分子量 G タンパク質である Rab に注目した。リソソームの輸送に関わる Rab (Rab7、Rab11B、Rab27A) について、不活性型となる GDP 型で固定される変異体と活性型となる GTP 固定型変異体を発現させることによるリソソームの局在への影響を検討した。また、それらの Rab が a3 と相互作用するのか、免疫沈降実験により調べた。

- (2) a3 欠損破骨細胞において障害されている輸送メカニズムの解明

a3 欠損破骨細胞において、リソソーム以外にも障害されている輸送経路がないか調べた。FITC-デキストランを用いてエンドサイトーシス経路を、サイトカインの分泌によりエキソサイトーシス経路を評価した。また、ゴルジ体や初期エンドソームの局在については免疫染色により、コレステロールの分布と量については fillipin 染色により検討した。(1)により、破骨細

胞におけるリソソームの輸送には Rab7 が関与することがわかったことから、Rab7 の局在に対する a3 の重要性についても調べた。

これまでは、*in vitro* で分化させた破骨細胞を用いて、a3 を欠損することによりリソソームの輸送が起きなくなることを示していた。そこで、生体内で分化した破骨細胞を対象に、免疫電子顕微鏡法により、リソソーム輸送に対する a3 の必要性を検討した。

### (3) リソソームの輸送および微小管の局在における V-ATPase 活性の必要性

破骨細胞への分化により、V-ATPase の量が増加することは知られていたが、その活性がリソソームの輸送に必要なかは不明であった。そこで、V-ATPase の会合状態と活性について検討した。また、破骨細胞を V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 で処理が、リソソームと微小管の局在へ与える影響を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) リソソームの輸送に関わる因子の同定およびその因子と a3 の関連

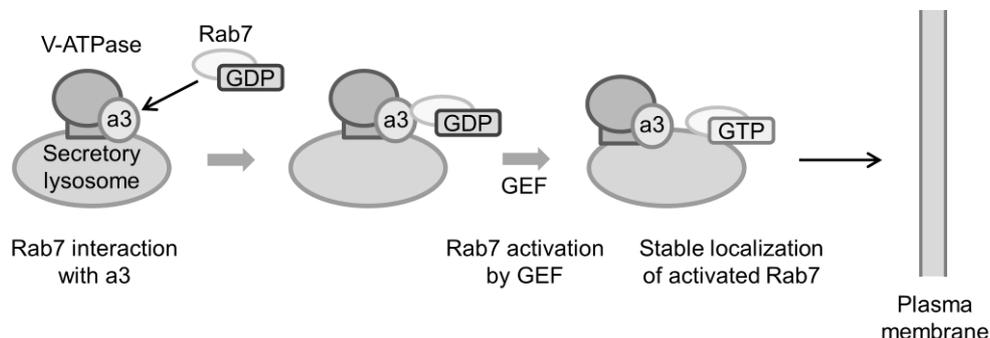
Rab7、Rab11B、Rab27A の野生型、GDP 型固定変異体および GTP 型固定変異体を破骨細胞に発現させたところ、GDP 型の Rab7 を発現させた時のみ、リソソームが細胞中央に集積したことから、破骨細胞における分泌リソソームの輸送には Rab7 が関与していることがわかった。また、a3 は野生型および GTP 型の Rab7 とはほとんど結合せず、GDP 型の Rab7 と特異的に結合した。a1、a2、a3 アイソフォームと Rab7 の結合を調べた結果、a3 が最も効率よく Rab7 を共沈させることも明らかにした。

### (2) a3 欠損破骨細胞において障害されている輸送メカニズムの解明

野生型マウスと a3 欠損マウスの上腕骨骨端部にあった破骨細胞に対して、免疫電子顕微鏡法によりリソソームの局在を調べた。リソソームの膜タンパク質である CD68 は、野生型マウスの破骨細胞では骨側の形質膜（波状縁）に局在したが、a3 を欠損した破骨細胞では波状縁への局在は観察されなかった。つまり、マウスの生体内で分化した破骨細胞においても、リソソームの形質膜への輸送に a3 が必須であることが示された。

*in vitro* で分化させた a3 欠損破骨細胞について、リソソーム以外のオルガネラの動態に影響があるか調べたところ、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスは野生型と同様に起きていること、ゴルジ体と初期エンドソームおよびコレステロールの分布も野生型と変わらないことが確認できた。これにより、a3 がリソソームの輸送へ特異的に働いていることが示唆された。

Rab7 の細胞内局在を調べたところ、a3 欠損破骨細胞では、Rab7 がリソソームへ局在できないことを見出した。すなわち、a3 は Rab7 がリソソームへ局在するために不可欠であることがわかった。このことから、a3 は GDP 型の Rab7 と結合することで Rab7 をリソソームへリクルートし、Rab7 は GTP 型へ変換された後、微小管に沿ってリソソームを輸送するというメカニズムが考えられる。興味深いことに、オルガネラへ局在することが知られている GTP 型の Rab7 であっても、a3 を欠損した破骨細胞ではリソソームに局在できなかった。GTP 型の Rab7 は a3 と結合しないことから、リソソームへ局在した GDP 型の Rab7 が GTP 型へ変換された後、安定にリソソームへ局在するためにも a3 が必要なのではないかと考えられた。



### (3) リソソームの輸送および微小管の局在における V-ATPase 活性の必要性

破骨細胞への分化により V-ATPase の量は増加するが、破骨細胞の V-ATPase 活性を測定したところ、活性は上昇しなかった。免疫沈降実験と細胞分画実験の結果、 $V_1$  と  $V_0$  が会合した活性型の V-ATPase は増加しないことがわかった。誘導された V-ATPase は不活性な解離した状態で存在していることが示唆される。この実験では、プラスチックディッシュ上で培養した破骨細胞を用いたことから、骨に接着した刺激により V-ATPase が会合する機構が予想された。

一方で、プラスチックディッシュ上で培養してもリソソームの輸送は起きることから、V-ATPase の活性がリソソームの輸送に必要なかが疑問となった。そこで、破骨細胞を V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 で処理をすることによる影響を検討した。

Bafilomycin A1 処理をしない細胞では、Lysotracker により酸性のオルガネラが観察され、割合は少ないけれども会合している V-ATPase によってオルガネラの酸性化は起きていることが確認できた。Bafilomycin A1 処理により酸性環境を消失させると、破骨細胞に特徴的なリソソームと微小管の形質膜近傍への局在が見られなくなった。Rab7 もリソソームへ局在できなくなっていた。Bafilomycin A1 処理は、Rab7 の a3 との結合、活性化には影響を与えなかったが、GTP 型に固定した Rab7 変異体がリソソームへの局在するのを抑制した。V-ATPase による酸性化は、GTP 型になった Rab7 が安定にリソソームへ局在するために重要であることが示された。Rab7 およびリソソームの局在と微小管の分布は、互いに影響しあっている可能性も考えられる。

本研究は、分泌リソソームの移動メカニズムを分子レベルで解明した点に意義がある。骨吸収に重要な分泌リソソームへの知見が深まったことで、骨代謝疾患の発症機構の解明や新たな治療法の開発に役立つ。分泌リソソームは、細胞傷害性 T 細胞や高転移性のがん細胞でも重要な役割を果たしており、免疫反応や転移の制御にもつながる成果である。さらに、オルガネラ輸送が V-ATPase によりコントロールされていることを示した点が極めて重要である。V-ATPase はアイソフォームの違いにより構造的な多様性があり、Rab は哺乳動物で 60 種類以上同定されている。各 V-ATPase と相互作用する Rab を明らかにすることで、オルガネラ輸送の全容解明に発展させることが可能だと考える。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Futai M, Sun-Wada GH, Wada Y, Matsumoto N, Nakanishi-Matsui M.  
Vacuolar-type ATPase: A Proton Pump to Lysosomal Trafficking.  
*Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* (査読有) in press.

(2) Matsumoto N, Nakanishi-Matsui M.  
Proton pumping V-ATPase inhibitor bafilomycin A1 affects Rab7 lysosomal localization and abolishes anterograde trafficking of osteoclast secretory lysosomes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 510:421-426 (2019)

(3) 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*. (査読有) 70:139-146 (2018)

(4) Matsumoto N, Sekiya M, Tohyama K, Ishiyama-Matsuura E, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M, Nakanishi-Matsui M.  
Essential Role of the a3 Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment.  
*Sci. Rep.* (査読有) 8:6701 (2018)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 松元奈緒美, 関谷瑞樹, 遠山稿二郎, 石山(松浦)絵里, 和田(孫)戈虹, 和田洋, 二井將光, 中西(松井)真弓.  
V-ATPase a3 アイソフォームは破骨細胞の分泌リソソームの細胞内輸送に必須である.  
第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)

(2) 松元奈緒美, 関谷瑞樹, 遠山稿二郎, 石山(松浦)絵里, 和田(孫)戈虹, 和田洋, 二井將光, 中西(松井)真弓.  
V-ATPase a3 アイソフォームのリソソーム輸送における機能.  
第 84 回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム (2018)

(3) 松元奈緒美, 関谷瑞樹, 遠山稿二郎, 石山(松浦)絵里, 孫(和田)戈虹, 和田洋, 二井將光, 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 (2018)

(4) Harada H, Ida-Yonemochi H, Sahara Y, Ohshima H, Fujiwara N, Matsumoto N, Nakanishi-Matsui M, Otsu K.  
V-H+-ATPase-a3-subunit contributes to elaborate highly calcifying enamel during

amelogenesis.

Enamel 9 symposium (2016)

(5) 松元奈緒美、關谷瑞樹、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  $\alpha 3$  イソフォームの関与。  
第 89 回日本生化学会大会 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中西 (松井) 真弓

ローマ字氏名：Mayumi Nakanishi-Matsui

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20270506

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：和田 洋

ローマ字氏名：Yoh Wada

所属：大阪大学

部局名：産業科学研究所

職名：准教授

研究者番号：50212329

研究協力者氏名：和田 (孫) 戈虹

ローマ字氏名：Ge-Hong Sun-Wada

所属：同志社女子大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号：00314427

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。