

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06646

研究課題名（和文）リソソーム分泌の共通原理とオルガネラ輸送に普遍的なメカニズムの解明

研究課題名（英文）Common principle of secretory lysosome transport and universal mechanism of organelle trafficking

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・研究員

研究者番号：80403971

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：破骨細胞による骨吸収には「分泌リソソーム」が必要である。リソソームが形質膜に向かって輸送されるメカニズムについて、私たちはプロトンポンプであるV-ATPaseがオルガネラ輸送因子であるRab7をリソソームにリクルートすることを示していた。本課題では、a3がRab7の活性化因子であるMon1-Ccz1を介してRab7と結合することを明らかにした。また、a2アイソフォームがRab27と結合し、インスリン分泌に関与することも示唆した。さらに、大理石病患者由来のa3変異体、a1およびa2との比較から、a3が安定に発現してリソソームに局在し、Rab7と十分量結合することが重要であることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
分泌リソソームの細胞内輸送の中で、その開始ステップであるRab7のリクルートの詳細を明らかにできた。また、インスリン顆粒でも同様のメカニズムが関わっていることが示唆されたことから、V-ATPaseによるオルガネラ輸送が普遍的である可能性を提示できた。これは、V-ATPaseの構造的多様性の生物学的意義とオルガネラ輸送の全容解明につながると思う。また、オルガネラ輸送に関わる骨代謝疾患、免疫疾患やがんの治療法開発にも貢献できる成果である。

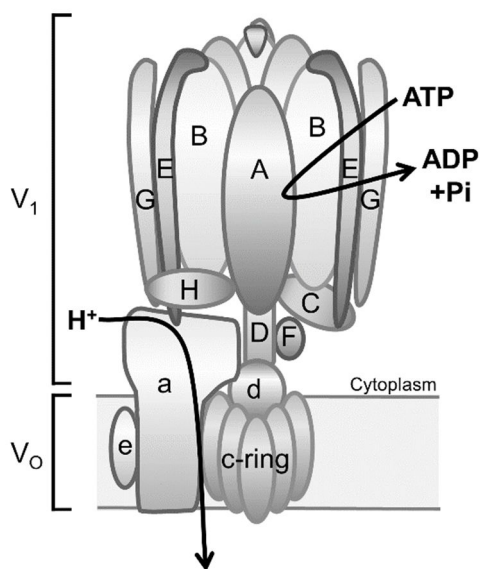
研究成果の概要（英文）：Osteoclasts require secretory lysosome to resorb bone. We have shown previously that a3 isoform of proton-pumping V-ATPase is essential for lysosome trafficking via the recruitment of Rab7, one of membrane trafficking factor. In this study, we demonstrated that the a3 isoform interacts with Mon1-Ccz1, a guanine nucleotide exchange factor (GEF), and that a3 is important for Mon1-Ccz1 localization to lysosomes, which mediates Rab7 recruitment to the organelle. We also suggest that a2 isoform interacts with Rab27, and that its interaction appears to be involved in the trafficking of insulin granules. These results provide a potential to elucidate the mechanism of V-ATPase-mediated organelle trafficking. Furthermore, we analyzed four kinds of osteopetrosis patient-derived mutation of a3 and other a subunit isoform, a1 and a2 by complementation assay using a3-knockout osteoclast, showing that the stability, lysosomal localization and the binding to Rab7 of a3 are important for its function.

研究分野：生化学、分子細胞生物学

キーワード：分泌リソソーム V-ATPase Rab GEF オルガネラ輸送 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

液胞型 ATPase (V-ATPase) は、プロトンを輸送することでオルガネラ内部や特定の細胞外環境を酸性化する酵素である。V-ATPase は 13 のサブユニットから構成されるが、そのうち 6 種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 は、様々な酸性環境の形成に寄与していると考えられている。本研究課題で注目している a サブユニットには 4 種のアイソフォームがあり、a3 アイソフォームは後期エンドソーム・リソソームに局在すること、破骨細胞の骨吸収に不可欠であることが知られている。a3 は膵細胞からのインスリン分泌にも関しているとの報告もある。しかし、複数存在するアイソフォームの生物学的意義・差異は明らかにされていない。1 つの細胞に複数種類の V-ATPase が存在するため、対象とする V-ATPase の解析が困難であることが理由の 1 つである。私たちは、a3 の欠損により a1 と a2 があっても破骨細胞による骨吸収ができなくなることに着目し、この細胞を用いれば a3 独自の機能を解析できると考えた。そこで、a3 を欠損した破骨細胞を分化誘導する実験系や、a3 欠損破骨細胞に野生型の a3 を発現させて骨吸収活性が回復する相補実験系を構築した。



破骨細胞は骨を分解する唯一の細胞である。破骨細胞が骨吸収をするためには、通常は細胞内にとどまっているリソソームが形質膜へ向かって移動し、形質膜と融合する「分泌リソソーム」が必要である。リソソームが分泌されることで形質膜に運ばれた V-ATPase が骨側の空間を酸性化して骨のミネラル分を溶解するだけでなく、分泌されたリソソーム酵素を活性化して骨の有機質を分解するからである。このように重要な役割を果たす分泌リソソームであるが、その細胞内輸送メカニズムの詳細は不明であったが、私たちは、V-ATPase の a3 アイソフォームがオルガネラ輸送のスイッチとして働く Rab7 をリソソームへリクルートすることを報告した (Matsumoto, *et al.*, *Sci. Rep.*, 2018) が、これは V-ATPase が酸性化だけでなくオルガネラ輸送にも関しているという意外な発見であった。しかし、a3 アイソフォームがどのように Rab7 をリクルートするのか、他の分泌リソソームでも同じメカニズムが働いているのかはわかっていない。また、a1、a2 などの他のアイソフォームがオルガネラ輸送に関与しているのかも興味深い課題として残っている。

2. 研究の目的

V-ATPase の a3 アイソフォームが小胞輸送因子である Rab7 をリソソームにリクルートするという知見を起点に、オルガネラ輸送機構の全容解明に発展させることを目的とする。また、リソソームだけでなく、各オルガネラに特異的なアイソフォーム構成の V-ATPase が、そのオルガネラ

の輸送にどう関わるのか、アイソフォームの生物学的意義を明らかにすることも目的とする。そのために、以下の方向性をもって研究を進める。

破骨細胞における a3 を介したリソソーム輸送機構の全容を解明する。

a3 欠損破骨細胞を用いた相補実験系により、a3 の機能に重要な性質や a1、a2 との差異を明らかにする。

V-ATPase によるオルガネラ輸送が普遍的なものなのか検討する。

3 . 研究の方法

a3 を介したリソソーム輸送機構の全容解明

Rab7 は低分子量 G タンパク質であり、グアニンヌクレオチドにより活性が調節されている。a3 と結合するのは GDP 型の Rab7 であることから、GDP 型を GTP 型にするグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により a3 との相互作用が調節されている可能性がある。そこで、破骨細胞において Rab7 の GEF として働くタンパク質を Rab7 の免疫沈降産物のプロテオーム解析などにより同定する。同定した GEF について、細胞内局在、a3 と Rab7 の相互作用に与える影響、発現抑制によるリソソーム分泌への影響を調べる。

a3 の機能に重要な性質や a1、a2 との差異の解明

a3 欠損破骨細胞に大理石病患者由来 a3 変異体を発現させて解析し、病因変異が a3 の機能に与える影響を明らかにすることで、リソソーム輸送において重要な a3 の性質を特定する。また、a1 および a2 を用いた相補実験により、a1、a2 と a3 の差異を明らかにする。

オルガネラ輸送の普遍的なメカニズムの解明

a1、a2 アイソフォームと相互作用する Rab タンパク質を、免疫沈降より網羅的に調べる。a1、a2 の発現を抑制することにより、局在の変化するオルガネラがないか、そのオルガネラは相互作用する Rab が局在するか、免疫染色や分画により明らかにする。

4 . 研究成果

a3 を介したリソソーム輸送機構の全容解明

HEK293T 細胞を用いた過剰発現系により、a3 と Mon1-Ccz1 が結合することを見いだした。a3 と Rab7 の結合は Mon1-Ccz1 存在下で亢進すること、Rab7 非依存的に Mon1-Ccz1 は a3 と結合することがわかった。a3 と Mon1-Ccz1 の結合領域を調べたところ、a3 は N 末端側の細胞質ドメインで、Mon1-Ccz1 は Longin ドメインで結合した。野生型破骨細胞ではリソソームに局在する Ccz1 が、a3 欠損破骨細胞では細胞質に散在したことから、Ccz1 がリソソームに局在するために a3 が必須であることも示した。つまり、a3 は Mon1-Ccz1 をリソソームに局在させることで Rab7 をリクルート・活性化していることが予想され、オルガネラ輸送の開始に関わる重要な知見を得ることができたと考えている。

a3 の機能に重要な性質や a1、a2 との差異の解明

< 大理石病患者由来 a3 変異体の解析 >

a3 の変異により大理石病を発症することが知られているが、その変異が病因となるかは示されていなかった。大理石病が劣性疾患であり、a3 を欠損した破骨細胞でないに変異の影響を検討できなかったからである。私たちは a3 欠損マウスのマクロファージから破骨細胞を誘導する系を構築し、a3 変異体の解析を可能にした。a3 変異体を解析することは、大理石病の発症機構の解明につながるだけでなく、分泌リソソームの輸送において重要な a3 の性質が分かると考えた。細胞質側にある 4 種の変異 (2 種の欠失変異と 2 種の変異) に注目して調べたところ、欠失変異体は破骨細胞において不安定であり、Rab7 はリソソームヘリクルートとリソソームの分泌が起きず、骨吸収ができなかった。そのため、これらの欠失変異は病因となることが示された。一方、変異体は安定に発現し、リソソームが分泌され、骨吸収もできた。用いた 2 種の変異のみでは病因とはならず、発症には他の変異が必要であることが示唆された。

< a1、a2 との比較 >

発現量、a アイソフォームの局在、Rab7 との結合、Rab7 のリソソームへのリクルート、骨吸収活性を評価したところ、a1 は a2 よりもリソソームに局在するが、Rab7 との結合量が少なかった。a2 はごく一部しかリソソームに局在しなかったが、Rab7 との結合量は a1 よりも多かった。a1 と a2 は a3 の 4 分の 1 程度しか発現していなかったが、一部の Rab7 をリソソームヘリクルートし、形質膜近傍へ輸送されるリソソームもあった。しかし、骨吸収活性は、a3 と比較して a1 が 10%、a2 が 0.5% 程度であり、形質膜に運ばれた V-ATPase の量を反映していた。これらのことから、リソソームの輸送には Rab7 をリクルートできるだけの量と結合力があればよいが、骨吸収活性には酸性化を担うための V-ATPase として十分な量が必要であることがわかった。

オルガネラ輸送の普遍的なメカニズムの解明

a1 および a2 アイソフォームと各種 Rab の結合を調べたところ、a2 が Rab27 と強く結合することがわかった。膵細胞で検討したところ、a2 と Rab27 はインスリン分泌に関わっていることが示唆され、V-ATPase によるオルガネラ輸送が普遍的なものである可能性を提示することができた。

その他の成果

本研究では、免疫沈降実験により V-ATPase の会合状態を調べる系を確立できたが、その系を用いて、細胞の老化に伴い V-ATPase の会合率が低くなっていることを明らかにできた (順天堂大学との共同研究)。また、破骨細胞への分化を抑制する化合物のスクリーニング系を構築し、クルクミンよりも分化を抑制する新たな誘導体を見つけることができた。

以上のことから、V-ATPase が GEF を介して Rab をリクルートすることでオルガネラ輸送を開始するというメカニズムが強く示唆された。今後はさらに詳細な解析を進め、V-ATPase によるオルガネラ輸送の制御機構の解明につなげたい。また、大理石病などの骨代謝疾患だけでなく、分泌リソソームの関わる疾患 (免疫疾患、がんなど) の治療法の開発に貢献できる結果を得られるようにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mayumi Nakanishi-Matsui, Naomi Matsumoto	4. 巻 -
2. 論文標題 V-ATPase a3 subunit in secretory lysosome trafficking in osteoclasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suda M, Shimizu I, Katsuumi G, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Matsumoto N, Yoshida Y, Mikawa R, Katayama A, Wada J, Seki M, Suzuki Y, Iwama A, Nakagami H, Nagasawa A, Morishita R, Sugimoto M, Okuda S, Tsuchida M, Ozaki K, Nakanishi-Matsui M, Minamino T	4. 巻 1
2. 論文標題 Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1117 ~ 1126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-021-00151-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suda Masayoshi, Shimizu Ippei, Katsuumi Goro, Hsiao Chieh Lun, Yoshida Yohko, Matsumoto Naomi, Yoshida Yutaka, Katayama Akihiro, Wada Jun, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Okuda Shujiro, Ozaki Kazuyuki, Nakanishi-Matsui Mayumi, Minamino Tohru	4. 巻 12
2. 論文標題 Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B regulates lysosomal integrity and lifespan of senescent cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10522-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松元奈緒美、中西（松井）真弓	4. 巻 73
2. 論文標題 破骨細胞における分泌リソソーム輸送の分子機構 ~リソソームのプロトンポンプによる小胞輸送因子のリクルート~	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 207 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naomi Matsumoto, Mizuki Sekiya, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Mayumi Nakanishi-Matsui	4. 巻 12
2. 論文標題 The lysosomal V-ATPase a3 subunit is involved in localization of Mon1-Ccz1, the GEF for Rab7, to secretory lysosomes in osteoclasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12397-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Fujimoto Yasuyuki, Haga Satoshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 169
2. 論文標題 Functional complementation of V-ATPase a subunit isoforms in osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 459 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoi Sugawara, Toshika Ohashi, Satoshi Ogawa, Naomi Matsumoto, Mayumi Nakanishi-Matsui, Satoru Tamura, Tomikazu Kawano	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of New Curcumin Analogs Inhibiting Osteoclastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-14282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Matsukawa Reina, Takahashi Shohei, Kudo Koshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 389
2. 論文標題 V-ATPase a3 isoform mutations identified in osteopetrosis patients abolish its expression and disrupt osteoclast function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111901 ~ 111901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.111901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松元 奈緒美、中西 真弓	4. 巻 92
2. 論文標題 分泌リソソームの細胞内輸送における液胞型ATPaseの役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 226 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 M. Nakanishi-Matsui, N. Matsumoto, M. Sekiya
2. 発表標題 Molecular mechanism underlying osteoclast secretory lysosomes mediated by vacuolar-type ATPase
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元奈緒美, 松川令奈, 高橋翔平, 工藤昂士, 和田(孫) 戈虹, 和田洋, 中西(松井) 真弓
2. 発表標題 大理石病患者由来V-ATPase a3アイソフォーム変異が破骨細胞の機能に与える影響
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津圭史、池崎晶二郎、後藤(松元) 奈緒美、中西(松井) 真弓、和田洋、孫-和田戈虹、原田英光
2. 発表標題 成熟期エナメル芽細胞におけるプロトンポンプの新規機能
3. 学会等名 62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田英光、池崎晶二郎、後藤（松元）奈緒美、中西（松井）真弓、和田洋、孫-和田戈虹、大津圭史
2. 発表標題 エナメル芽細胞におけるプロトンポンプはナノエンジンとして分泌小胞の輸送を担っているか？
3. 学会等名 第15回 ナノ・バイオメディカル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 關谷瑞樹、松元奈緒美、矢野志緒、河野喜久子、中西（松井）真弓
2. 発表標題 インスリン分泌小胞の輸送における V-ATPase a2 イソフォームの機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayumi Nakanishi-Matsui, Naomi Matsumoto, Mizuki Sekiya, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Koujiro Tohyama, Eri Ishiyama-Matsuura, Masamitsu Futai
2. 発表標題 V-ATPase a3 isiform is involved in trafficking of osteoclast secretory lysosomes
3. 学会等名 V-ATPase a3 isiform is involved in trafficking of osteoclast secretory lysosomes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松元奈緒美、關谷瑞樹、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
2. 発表標題 V-ATPase a3 アイソフォームが関与する分泌リソソームの細胞内輸送機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原葵、大橋暁香、小川智、後藤奈緒美、中西(松井)真弓、田村理、河野富一
2. 発表標題 破骨細胞への分化抑制作用を持つクルクミン類縁体の合成と活性評価
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原葵、大橋暁香、小川智、後藤奈緒美、中西(松井)真弓、田村理、河野富一
2. 発表標題 フェノール部位を持つクルクミン類縁体の合成、活性評価および構造活性相関
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.imu-pharm.jp/category/cs05/?post_type=result#actop 岩手医科大学薬学部機能生化学分野 研究成果・実績 https://www.imu-pharm.jp/category/cs05/?post_type=result#actop
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中西 真弓 (Nakanishi Mayumi) (20270506)	岩手医科大学・薬学部・教授 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	關谷 瑞樹 (Sekiya Mizuki) (70509033)	岩手医科大学・薬学部・助教 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関