

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20770090

研究課題名（和文） V-ATPase による酸性オルガネラの局在制御機構

研究課題名（英文） regulation of acidic organelle localization by V-ATPase

研究代表者

後藤 奈緒美（松元奈緒美）(GOTO NAOMI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80403971

研究成果の概要（和文）：V-ATPase は水素イオンを生体膜透過させることにより、細胞内および細胞外の特定の環境を酸性化するのに必須な酵素であり、細胞内オルガネラの pH 制御や破骨細胞の骨吸収にも重要である。現在、構成の異なる複数の V-ATPase が報告されているが、本研究では、破骨細胞にはこれまで報告の無かった組合せの V-ATPase が発現している可能性が高いことを明らかにした。このことは、破骨細胞特異的な V-ATPase をターゲットとすることで、より特異性の高い薬の開発など、骨粗鬆症の治療に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：Vacuolar type ATPase (V-ATPase) consists of 13 different subunits, and transports protons using energy from ATP hydrolysis. V-ATPase has variety of subunit isoforms, consistent with the different pH in acidic compartment. Previously, we showed that a3, one of 'a' subunit isoforms, was induced during osteoclast differentiation. In this study, we found the induction of d2 isoform and its interaction with a3 in differentiated cells. This interaction suggests that osteoclasts have a novel combination of V-ATPase isoforms.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：V-ATPase、小胞分泌

1. 研究開始当初の背景

プロトン輸送 ATPase である V-ATPase (液胞型 ATPase) によるオルガネラの酸性化は、リソソーム酵素の活性化、エンドソームにお

けるレセプターとリガンドの解離、小胞輸送など多くの生理的現象において重要である。また、分泌小胞による細胞間シグナル伝達、破骨細胞からのリソソーム分泌による骨吸

収に必須な細胞外酸性環境形成、細胞傷害性 T 細胞のアズール顆粒（リソソーム様オルガネラの一種）分泌障害による免疫不全症発症なども知られている。このように、オルガネラの酸性化と細胞内局在の制御は細胞・個体機能発揮の上で必要不可欠であるにもかかわらず、オルガネラがそれぞれ特有の pH を有するメカニズムも含め、ほとんど解明されていない。

哺乳動物細胞の V-ATPase は 13 種のサブユニットからなり、6 種のサブユニットに組織およびオルガネラ特異的アイソフォームが存在する。当研究室は 5 種のサブユニットについてアイソフォームを世界に先駆けて報告しており、中でも a3 サブユニット（以下、「a3」と記載）については、破骨細胞において分化前は細胞内に存在しているが、分化刺激により次第に細胞膜へ局在することを明らかにしている。つまり、a3 を含むリソソームが分泌されることにより V-ATPase が細胞膜へ局在して骨吸収部位（骨吸収窩）を酸性化するとともに、骨吸収に必須なリソソーム酵素を骨吸収窩へ運ぶことを示した。興味深いことに、ディッシュ上で培養していた破骨細胞は極性をもたず、細胞膜全体に a3 が局在しているが、この状態の破骨細胞を骨の上でたった一日培養するだけで、破骨細胞は極性をもち、a3 をもつリソソームは骨側へのみ局在するようになる。このように、破骨細胞では非常にダイナミックなリソソームの局在変化が起きるが、その制御メカニズムは不明である。

また、a3 を欠損している oc/oc マウスは破骨細胞の機能不全に伴う大理石病を発症するが、当研究室は oc/oc マウスの膵 β 細胞でインシュリン分泌障害が起きることを見いだした。インシュリン分泌には V-ATPase 阻害剤の影響がなかったことから、インシュリン分泌における a3 の機能は V-ATPase のプロトン輸送活性だけでは説明できず、a サブユニットを含む V-ATPase の膜内在性部分 (V0) が膜融合に関与するという報告もあることから、a3 サブユニットの小胞分泌における役割も解明していく必要がある。また、当研究室はハーバード大学の Marshansky 研究室との共同研究により a2 サブユニットが膜融合に関与する GTPase (Arf6) と GEF (ARNO) を膜小胞へ pH 依存的にリクルートすることを明らかにしており、a サブユニットが pH センサーとなって膜融合を制御しているという仮説を提唱している。

以上のことから、a3 の細胞内局在変化による小胞およびリソソームの分泌機構について詳細な分子メカニズムを明らかにすることは、学問的にも非常に興味深い課題であり、臨床的にも重要な知見をもたらすものである。

2. 研究の目的

研究代表者は、破骨細胞分化におけるリソソームの pH (V-ATPase の活性) と局在の制御機構ならびに V-ATPase の a3 サブユニット欠損による膵 β 細胞のインシュリン分泌障害機構を解明すべく研究を行っている。このことにより、オルガネラの pH 調節や種々の伝達物質の分泌制御機構について学術的知見を得ること、さらには、高次生命現象と酸性オルガネラとの連関を分子レベルで解明し、酸性オルガネラの局在や機能の制御による疾患治療法開発を目指している。本研究課題では、破骨細胞分化およびインシュリン分泌のシグナルが (1)V-ATPase の活性や構造、(2)a3 の局在するオルガネラの変化、(3)V-ATPase の他因子との相互作用に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞に発現している V-ATPase アイソフォームの検討

破骨細胞分化前後の細胞より、mRNA およびタンパク質を回収し、mRNA についてはアイソフォームのあるサブユニット全てを、タンパク質に関しては検出可能であったものについて解析を行った。

(2)V-ATPase のサブユニット間の相互作用検討

抗 a3 抗体による免疫沈降実験を行い、免疫沈降産物をウェスタンブロットにより解析した。また、V-ATPase を構成する他のサブユニットに対する抗体を用いて、同様に免疫沈降実験を行った。

(3)a3 の局在するオルガネラの解析

a3 の局在するオルガネラを生化学的、細胞生物学的に解析を行った。具体的には、破骨細胞分化前後の除核上清画分を密度勾配遠心に処し、V-ATPase のサブユニットやオルガネラマーカータンパク質の回収パターンを調べた。a3 の局在する画分の純度が高ければ、プロテオーム解析を行うことで、a3 の局在するオルガネラや結合因子について詳細に解析が行えると考えた。また、免疫細胞染色により、a3 と共局在する V-ATPase サブユニットやマーカータンパク質の探索を行った。

(4)RAW264.7 細胞への V-ATPase 過剰発現系構築

V-ATPase の小胞輸送への関与を明らかにするため、small GTPase およびその変異体を発現させることによる a3 の局在への影響を調べることを計画した。また、V-ATPase の結合因子を探索するためにもタンパク質の過剰発現系は不可欠であった。そのためまず、RAW264.7 細胞への遺伝子導入効率の改善を行った。

(5) 膵β細胞における V-ATPase 結合因子探索系の構築

a3 はインシュリン分泌にも重要な役割を果たすことが示されているが、分子メカニズムは不明である。これを明らかにするためには a3 がどのようなタンパク質と相互作用しているのかを知る必要があるため、膵β細胞における a3 結合タンパク質の探索系構築を目指した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞に発現している V-ATPase アイソフォームの検討

破骨細胞分化前後の V-ATPase にどのような違いがあるのかを調べるため、生化学的および分子細胞生物学的解析を行った。まず、アイソフォームのあるサブユニット (B、C、E、G、a、d) の mRNA の発現を調べたところ、ユビキタスなサブユニットのみが発現しており、V1 部分のサブユニット構成には差のないことが示唆された。また、これらのサブユニットは、破骨細胞の分化により誘導されることがわかった。a、d サブユニットについては、それぞれ a3 と d2 の発現が誘導されることがわかった。a1、a2、d1 は発現しているものの、分化前後で変化はなく、a4 に関しては RT-PCR により検出できなかった。ウェスタンブロッティングにより破骨細胞分化前後における V-ATPase のタンパク質としての発現量変化も検討した。その結果、mRNA の発現量が増加していたものは、タンパク質量も増加していることを明らかにした。

(2) V-ATPase サブユニット間の相互作用検討

免疫沈降実験により、発現しているアイソフォームの組合せを明らかにしようと考えた。抗 a3 抗体により、免疫沈降実験を行い、解析したところ、破骨細胞分化前では、a3 は d1 サブユニットとのみ結合しているが、分化後においては、誘導されてきた d2 と結合することがわかった。mRNA の解析より、破骨細胞の V1 サブユニットは、ユビキタスなアイソフォームしか発現していないので、破骨細胞は、a3-d2-ユビキタスなアイソフォーム、という新しい組合せの V-ATPase を有していることがわかった。また、破骨細胞は、V0 部分が a3-d1、a3-d2 という少なくとも二種類の V-ATPase を発現していることが明らかとなった。他のサブユニットに対する抗体を用いて更に詳細に解析を進めようとする実験を行ったが、現時点では免疫沈降実験のできる抗体がなく、a3-d1、a3-d2 を含む V0 部分が V1 部分と本当に結合しているかという点は未解決である。また、d1 と d2 の局在するオルガネラを同定し、a3-d1、a3-d2 の V0 を持つ V-ATPase の機能の違いについて調べようと免疫細胞染色を試みたが、有意なシグナルを

得ることができなかった。さらに、a3、d1、d2 以外の V-ATPase サブユニットについても、抗体を持っているものについては細胞生物学的解析を行おうとしたが、様々な条件検討を行ったものの、a3 以外の V-ATPase サブユニットの局在を明らかにすることはできなかった。これは、抗体の力価だけに原因があるのではなく、V-ATPase は大きな複合体を形成しているため、抗原部位が抗体のアクセスできない場所にあるなどとして、免疫沈降および免疫染色ができないのではないかと考えられた。

(3) a3 の局在するオルガネラの解析

当研究室は、a3 の局在するオルガネラがリソソームであることを報告している。このオルガネラを解析するため、分化前後それぞれの破骨細胞の除核上清画分を用いて、密度勾配遠心法による細胞分画を行った。分化前後とも、基本的に小胞輸送系のオルガネラが回収される画分に a3 も回収されたので、プロテオーム解析は難しいと判断した。興味深いことに、a3 と共局在すると報告されたリソソームマーカーである LAMP-1 のタンパク質量が減少しており、分化前と比較して分化後は a3:LAMP-1 のタンパク質量比が非常に大きくなることが分かった。この結果は免疫細胞染色でも支持されたことから、a3 は分化前よりも LAMP-1 の割合が減少したオルガネラに局在しており、この状態であると細胞膜近辺へ移動できる可能性が示唆された。また、密度勾配遠心法による生化学的解析では、d1 と d2 が一部異なる回収パターンを示したことから、破骨細胞内では、d1 と d2 が異なる局在をしている箇所があると考えられた。

(4) RAW264.7 細胞への V-ATPase 過剰発現系構築

抗 a3 抗体以外での免疫沈降実験ができなかったことから、タグを付加した V-ATPase サブユニットを過剰発現させて実験を行うことを計画した。遺伝子導入の条件検討を行ったところ、遺伝子導入が困難と言われている RAW264.7 細胞に対して、GFP では 60% 程度の導入効率が得られる系を構築した。しかし、V-ATPase のサブユニットは安定に発現せず、RAW264.7 細胞で過剰発現系の実験を行うことは困難であることがわかった。

(5) 膵β細胞における V-ATPase 結合因子探索系の構築

RAW264.7 細胞では遺伝子導入による V-ATPase の過剰発現はできなかったが、膵β細胞では発現が認められた。遺伝子導入後に発現のタイムコースをとり、実験に最適な時間も確定した。今後、膵β細胞を用いて V-ATPase のサブユニット間の結合評価や相互作用因子の探索ができる可能性がある。こ

れは、insulin 分泌の分子メカニズムを明らかにするのに、よいツールになると思われる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Naomi Matsumoto, Mayumi Nakanishi-Matsui, Ikuko Taira, Masamitsu Futai
Characterization of organelles with V-ATPase a3 subunit in osteoclasts
JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit,
2009 年 7 月 24 日、岩手医科大学矢巾キャンパス

(2) 松元奈緒美、平郁子、中西真弓、二井將光
破骨細胞におけるV-ATPase a3 サブユニット局在オルガネラの解析
第 84 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：