

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590068

研究課題名（和文）一分子観察によるプロトンポンプ・V-ATPase の酸性環境制御機構の解析

研究課題名（英文）Study on acidic environment formation by V-ATPase using single molecule observation

研究代表者

中西 真弓（NAKANISHI MAYUMI）

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20270506

研究成果の概要（和文）：

我々は、破骨細胞の V-ATPase（液胞型プロトンポンプ）が、a3 と d2 イソフォームの組合せから成る特異的な構造を持つことを明らかにした。破骨細胞において、a3 を持つ V-ATPase はリソソーム膜に局在し、リソソームが形質膜へ移動して骨吸収の場を形成するのに必須であった。また、V-ATPase の作動機構を酵素一分子で観察する実験系と、触媒ドメインとプロトン輸送路の会合状態を検討する系を確立した。これらの実験系は、V-ATPase のイソフォーム構成の違いによる作動機構や活性調節の差異を解析し、多様な酸性環境の形成機構を解明するために不可欠である。

研究成果の概要（英文）：

We have found that osteoclast-specific V-ATPase (vacuole-type proton-pumping ATPase) is composed of a3 and d2 isoforms. V-ATPase with a3 isoform is localized on lysosomal membrane, and is essential for traffic of lysosomes to plasmamembrane. Secretion of lysosomal enzymes and acidification outside osteoclasts are important for bone resorption. On the other hand, we have established experimental systems to observe subunit rotation of single molecule V-ATPase and to examine assembly of the catalytic domain and the proton pathway. These systems are essential to elucidate molecular mechanism that creates various acidic environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000 円	540,000 円	2,340,000 円
2010 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
2011 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
総計	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロトンポンプ、一分子観察、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) プロトンポンプである V-ATPase は、形質膜や細胞内オルガネラ膜に局在し、ATP の加水分解を駆動力としてプロトンを輸送し、多彩な酸性環境を形成している。こうした酸性環境の制御は、

破骨細胞による骨吸収、膵臓β細胞からのインスリン分泌、尿細管における蛋白質の再吸収、神経細胞からの神経伝達物質の放出など多くの生命現象に必須であるにもかかわらず、各々のオルガネラが特有の pH を持つメカニズ

ムを含めて、ほとんど解明されていない。

- (2) 当研究室では、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することを示した。細胞やオルガネラにより異なる酸性環境は、イソフォームの組み合わせにより形成されるという興味深い仮説が立てられる。
- (3) F-ATPase (ATP 合成酵素) と V-ATPase は類似の構造を持ち、ATP の加水分解とプロトンの輸送をサブユニット間の回転により共役している。我々は、F-ATPase のサブユニット回転を酵素一分子で観察する実験系を世界に先駆けて確立し、従来の生化学的手法では知り得なかった酵素の性質、すなわち、毎秒平均 400 回という高速回転していること、回転速度にはゆらぐこと、回転と停止を約 1 秒毎に繰り返していることなどを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究課題は、独創的な一分子観察法により、細胞、あるいはオルガネラ特異的 V-ATPase の酸性環境形成機構を解明することを目的としている。さらに、骨吸収における V-ATPase の役割を解明し、酸性環境と骨吸収や分泌リソソームとの関連を分子レベルで明らかにする。以下に、具体的に述べる。

- (1) 破骨細胞における V-ATPase の役割の解明に向け、まず、破骨細胞の V-ATPase のイソフォーム構成を明らかにする。さらに、V-ATPase のサブユニットの遺伝子欠損マウスを用い、V-ATPase の細胞生物学的機能を解明する。
- (2) V-ATPase のサブユニット回転を酵素一分子で観察する実験系を構築し、破骨細胞に特異的な V-ATPase も含めて、イソフォーム構成の異なる V-ATPase の作動機構の違いを明らかにする。
- (3) V-ATPase の触媒ドメイン (V_1) とプロトン輸送路 (V_0) の会合状態をみる実験系を構築し、V-ATPase のイソフォーム構成による会合状態の差異を検討する。

(2) と (3) から得られる知見は、V-ATPase による多様な酸性環境の形成機構の解明につながる。

3. 研究の方法

3 つの方向性をもって進める。

- (1) 破骨細胞の各オルガネラや細胞膜における V-ATPase のイソフォームの構成を明らかにする。
まず、各イソフォームを特異的に認識する抗体を作製し、マウスの破骨細胞を用いたウエスタンブロット解析や免疫沈降法によりイソフォームの構成を解析する。また、RT-PCR 法により、破骨細胞における各イソフォームの発現を網羅的に解析する。

- (2) V-ATPase を一分子で観察する系により、イソフォームの構成による作動機構の差異を見出し、酸性環境形成機構を分子レベルで解明する。
そのために、V-ATPase と類似の構造を持つ F-ATPase について確立した一分子観察系を V-ATPase に応用し、回転速度、回転停止の頻度、阻害剤の影響など、イソフォーム構成の違いによる作動機構の差異を検討する。

- (3) 破骨細胞への分化に伴い、リソソームが形質膜に移動、融合し、リソソーム酵素を細胞外に分泌すると同時に骨との隙間を酸性化する。分泌リソソームにおける V-ATPase の役割を解明するため、オルガネラの酸性度、V-ATPase サブユニットの修飾、小胞輸送調節因子との相互作用、 V_0 と V_1 の会合状態などの分泌に伴う変化を検討する。また、その変化が、分泌リソソームの移動や細胞膜との融合に影響しているかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 破骨細胞における V-ATPase の役割。

① 破骨細胞に特異的な V-ATPase。

まず、破骨細胞で機能する V-ATPase のイソフォームの構成を解析した。各イソフォーム特異的な抗体を調製し、マウスのマクロファージ系株化細胞 RAW264.7 を用いてウエスタン・ブロット解析を行ったところ、破骨細胞への分化に伴い、a3 イソフォームと d2 イソフォーム (以下 a3 と d2) の発現が増加した (図 1、2)。また、a3 抗体を用いて免疫沈降したところ、分化前には d1 が共

沈したが、分化に伴い発現が誘導される d2 も共沈した (図 2)。さらに、リコンビナントの d1、d2 を標準としてウエスタン・ブロット解析したところ、破骨細胞における d1 と d2 の量比は、およそ 1:6 であった。このことは、破骨細胞において d2 が主なイソフォームであることを示している。

d2 が腎臓に強く発現しているイソフォームであることから、他の腎臓特異的なイソフォームの破骨細胞に於ける発現を RT-PCR により解析したところ、d2 以外の腎臓に特異的なイソフォームは発現していなかった。これらの結果は、破骨細胞への分化に伴い、これまでに報告されていないイソフォームの組み合わせからなる破骨細胞に特異的な V-ATPase が生じることを示している。これらの知見は、V-ATPase の作動機構を一分子観察で解析する、あるいは、サブユニットの修飾状態や相互作用する因子を検索するために必要不可欠な情報である。

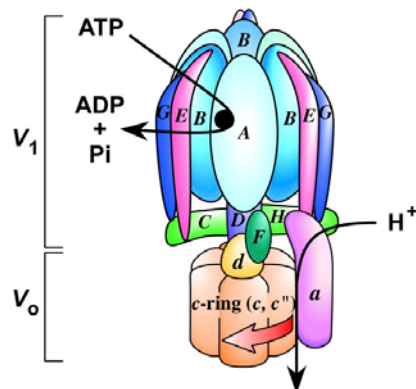


図 1 V-ATPase のサブユニット構造。13 種類のサブユニットのうち、B, C, E, G, a, d サブユニットがイソフォームを持つ。

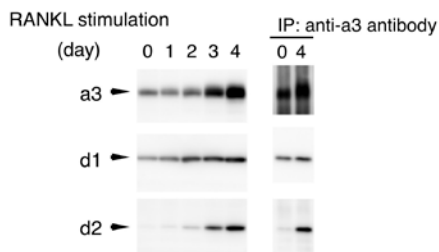


図 2 破骨細胞への分化に伴う a3 と d1, d2 イソフォームの発現と相互作用 (IP: 免疫沈降)。RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) の刺激によりマウスのマクロファージ由来の株

化細胞 RAW264.7 を破骨細胞に分化させた。

② リソソームの形質膜への移動と分泌における V-ATPase の役割。

破骨細胞では前駆細胞からの分化に伴いリソソームが形質膜に移動し、骨吸収に必要な蛋白質分解酵素等を分泌する。我々は、分化に伴い発現が増加する a3 イソフォームを持つ V-ATPase がリソソームに局在することを見出していた。一方、a3 遺伝子を欠損したマウスの前駆細胞は、野生型同様に破骨細胞に分化するが骨吸収活性が低い。我々は、a3 に特異的な抗体を用いた免疫染色法により、a3 遺伝子欠損マウスの破骨細胞では、リソソームが形質膜へ移動しないことを明らかにした。すなわち、a3 イソフォームは、リソソームの形質膜への移動に必須であることを示した。欠損マウスでは、リソソームが形質膜へ輸送されず、リソソームの持つ蛋白質分解酵素の分泌や細胞外の酸性化が起きないことにより、骨吸収活性が低下したと考えられる。

a3 イソフォームが小胞輸送に関与することから、今後は小胞輸送の調節因子との相互作用について検討する予定である。

(2) V-ATPase の回転触媒機構の一分子観察。

① 酵母 V-ATPase の一分子観察系の確立。V-ATPase は ATP を加水分解する触媒部分 (Vo) とプロトンを輸送する部分 (V1) からなっており、触媒活性とプロトンの輸送はサブユニット間の相対的な回転により共役している (図 1)。これまでの研究から、c リングと DFd サブユニットが一体となっており、他のサブユニットに対して相対的に回転することが知られている。V-ATPase のイソフォーム構成の違いによる回転触媒機構の差異を明らかにすることは、多様な酸性環境を制御する機構の解明につながる。

まず、酵母の V-ATPase を使い、ヒスチジン・タグを介してプロトン輸送部分をガラス面に固定し、この部分に対して相対的に回転する G サブユニットにプローブとして直径 100 nm の金ビーズを結合させ、回転を観察する系を確立した。この実験系を用いて、V-ATPase の回転速度は毎秒 200 回転であり、類似の構造を持つ F-ATPase と比べて半分程度であることを明らかにした。また、F-ATPase と同様に、

すべての分子が同じ速度で回転し続けているのではなく、秒単位で続く停止と連続回転を繰り返していることがわかった。さらに、F-ATPaseについても解析を進め、触媒ドメインの構造安定化や、 β と γ サブユニットの相互作用が回転を駆動するのに重要であることを示した。今後は、V-ATPaseの作動機構について、F-ATPaseと比較しつつ、詳細に解析を進める。

② イソフォームによる回転触媒機構の差異の解析。

酵母 V-ATPase について確立した一分子観察系を用いて、マウスの各イソフォームの回転への影響を検討することが可能となった。すなわち、遺伝子工学的手法により酵母のサブユニットを対応するマウスのものに置換したキメラ酵素を酵母に発現させ、液相から回収して回転を観察する。これまでに、E サブユニットをマウスの E1、あるいは E2 イソフォームに置換した酵母の調製は完了している。今後は、これらのキメラ酵素の回転観察と共に、破骨細胞に特異的なイソフォームのキメラ酵素を作製し、回転機構の違いを見出す。

(3) V_0 と V_1 の会合における細胞特異的イソフォームの役割。

V-ATPaseはグルコース非存在下では V_0 と V_1 の会合状態が変化し、活性が低下することが知られている。我々は、酵母のEサブユニットをマウスのサブユニットに置換したキメラV-ATPaseの解析により、グルコースによる V_0V_1 の会合にこのサブユニットが関与することを示した。さらに、Eサブユニットに変異を導入し、会合状態の調節に重要なアミノ酸を同定した。

現在、会合状態の変化が回転に及ぼす影響を酵素一分子の観察で検討するために、キメラ V-ATPase の一分子観察系の確立に取り組んでいる。

我々は、破骨細胞に特異的なV-ATPaseのイソフォームの構成を明らかにし、リソソームの形質膜への移動に必要であることを明らかにした。また、酵母のV-ATPaseを用い、サブユニット回転を酵素一分子で観察する系と、 V_0V_1 の会合状態を見る実験系を確立した。酵母のサブユニットをマウスの対応するイソフォームに置換したキメラ酵素をこれらの実験系に用いることにより、

V-ATPaseによる多様な酸性環境の形成機構の解明に迫ることが可能となった。

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6件)

- ① M. Futai, M. Nakanishi-Matsui, H. Okamoto, M. Sekiya, and R. K. Nakamoto, Proton pumping ATPase Rotational Catalysis; from F-ATPase toward Mammalian V-ATPase. *Biochim, Biophys. Acta*, 17th European Bioenergetics Conference (2012) In press.
- ② M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, M. Kojima, T. Nonaka, and M. Futai, Roles of the β subunit hinge domain in ATP synthase F_1 sector: hydrophobic network formed by introduced β Phe174 inhibits subunit rotation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395 (2010) 173-177
- ③ M. Sekiya, H. Hosokawa, M. Nakanishi-Matsui, M. K. Al-Shawi, R. K. Nakamoto, and M. Futai, Single molecule behavior of inhibited and active states of *Escherichia coli* ATP synthase F_1 rotation. *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 42058-42067
- ④ M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, R. K. Nakamoto, and M. Futai, The mechanism of rotating proton-pumping ATPases. *Biochim, Biophys. Acta* (2010) 1797, 1343-1352
- ⑤ 中西(松井)真弓、關谷瑞樹、プロトンポンプATPaseの回転触媒機構、日本応用酵素協会誌 No. 45 (2010) 11-18
- ⑥ M. Sekiya, R. K. Nakamoto, M. K. Al-Shawi, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai, Temperature dependence of single molecule rotation of the *Escherichia coli* ATP synthase F_1 sector reveals the importance of γ \square β subunit interactions in the catalytic dwell. *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22401-22410

[学会発表] (計21件)

- ① 松元奈緒美, 中西(松井)真弓, 二井將光, 破骨細胞に発現するV-ATPaseの機能, 未来医療開発プロジェクトキックオフミー

ディング (盛岡) (2010)

- ② 中西 (松井) 真弓, プロトンポンプATPaseの酸性環境形成機構の解明, 第36回応用酵素協会研究発表会 (大阪) (2010)
- ③ 中西 (松井) 真弓, 矢野志緒, 松元奈緒美, 二井將光, Different localization of specific V-ATPase between osteoclast and LPS-induced multinuclear cells. FASEB Summer research conferences (Colorado, USA) (2010)
- ④ 松元奈緒美, 平郁子, 中西 (松井) 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 (神戸) (2009)
- ⑤ 松元奈緒美, 中西 (松井) 真弓, 平郁子, 二井將光, Characterization of organelles with V-ATPase a3 subunit in osteoclasts, JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit (岩手医科大学矢巾キャンパス) (2009)
- ⑥ 中西 (松井) 真弓, 柏木幸子, 小島正樹, 野中孝昌, 二井將光, Subunit rotation of *E. coli* F₁-ATPase: Effects of mutations in the β subunit hinge domain, JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit (岩手医科大学矢巾キャンパス) (2009)
- ⑦ 松元奈緒美, 中西 (松井) 真弓, 二井將光, 破骨細胞が有する新規なイソフォーム構成のV-ATPase, 日本薬学会第132年会 (北海道大学) (2012)

[図書] (計1件)

- ① M. Nakanishi-Matsui, Sylvie Breton, Haruko Okamoto, and Masamitsu Futai. Roles and Regulatory Mechanism of Proton Pumping V-ATPase in Spermatozoa and Epididymis Physiology. Testis: Anatomy, Physiology and Pathology. *Nova Science Publishers* (2012) In press.

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・准教授
研究者番号: 20270506

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

二井 將光 (FUTAI MASAMITSU)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50012646
後藤 奈緒美 (GOTO NAOMI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号: 80403971

