

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570178

研究課題名(和文)プロトン・ポンプの高次細胞機能の発現と疾病に関する研究

研究課題名(英文)The physiological function of V-ATPase and its pathological relationships

研究代表者

和田 戈虹(孫戈虹)(Sun-Wada, Ge-Hong)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：00314427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：液胞型プロトンポンプH⁺-ATPase (V-ATPase)は、多彩な酸性オルガネラの形成に重要な役割を持つ。本研究は、生体の血圧や電解質バランスを調節する組織レニン・アンジオテンシン系の活性化に關与する(プロ)レニン受容体(ATP6ap2)が、V-ATPaseのアセンブリーに必須であることを明らかにした。V-ATPaseの機能は、細胞生物学の分野のみならず、高血圧、糖尿病などの分野でも関心を集めている。さらに、V-ATPaseサブユニット改変マウスを用い、破骨細胞が骨を壊す様子を可視化することに世界で初めて成功し、骨疾患治療薬探索の新たな切り口になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The V-ATPases are a family of multi-subunit ATP-dependent proton pumps involved in diverse cellular processes, including acid/base homeostasis, receptor-mediated endocytosis, processing of proteins and signaling molecules, targeting of lysosomal enzymes, and activation of various degradation enzymes. These fundamental cellular activities are naturally related to higher order physiological functions in multicellular organisms. V-ATPases are involved in several physiological processes, including renal acidification, bone resorption, and neurotransmitter accumulation. We have shown that the Full-length ATP6ap2 is essential for the assembly of V-ATPase. We also we have identified 2 different populations of mature osteoclasts in situ, corresponding with the static – bone resorptive (R) and moving – nonresorptive (N) fractions, with the transition between these states critically controlled by RANKL and showing a strong correlation to the state of cell motility.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質 プロトンポンプ

1. 研究開始当初の背景

細胞内膜系のオルガネラ、すなわち、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、シナプス小胞、貯留小胞などに共通する大きな特徴の一つは、その内腔の pH が細胞基質に比して酸性度の高いことが挙げられる。オルガネラ内腔の酸性異常は、骨粗鬆症、大理石病、糖尿病、アシドーシス、ガン転移、感音性難聴、不妊症など、様々な疾病と密接に関連している。オルガネラの酸性化に中心的な役割を果たしているのは液胞型プロトンポンプ H^+ -ATPase (V-ATPase) である。

研究代表者らは、これまで、V-ATPase の生理機能を解析する研究を進めてきた。その結果、複数のイソフォームを同定し、発現様式を明らかにした(Sun-Wada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002a, 2002b, および 2003)。V-ATPase サブユニットの欠損変異マウスの解析から、オルガネラの酸性化は、タンパク質のプロセッシングや生理活性物質の蓄積などのオルガネラの機能発現のみならず、膜輸送にも重要であることが示唆された(Sun-Wada *et al. Dev. Biol.*, 2000)。また、V-ATPase のサブユニット a2 が低分子 GTPase Arf6 のグアニンヌクレオチド交換因子 (ARNO) と pH 依存的に結合を示すことを見だし、膜小胞の形成に関与することを示した (*Nat Cell Biol.*, 2006)。さらに、サブユニット・イソフォーム欠損変異マウスの解析から、V-ATPase がプロトンポンプの機能以外に、膜融合を促進する役割をもつことを明らかにした(Sun-Wada *et al. J. Cell Sci.*, 2006, 2009)。*Nature Cell Biol. News and View*、日経産業新聞、*J. Cell Sci.* の *This Issue* 等で注目されているように、本研究の成果の一部は、医学面に於いて、他の研究者に大きな示唆を与えるものと考えられる。最近、生体の血圧や電解質バランスを調節する組織レニン・アンジオテンシン系の活性化に関与する(プロ)レニン受容体が、V-ATPase のアセンブリーに必須であることを明らかにした (*Circ Res.*, 2010)。組織レニン・アンジオテンシン系が高血圧の発症や糖尿病による臓器障害の発症に関与するので、V-ATPase の機能は、細胞生物学の分野のみならず、高血圧、糖尿病などの分野でも関心を集めている。これらの研究成果が、ほ乳類液胞型プロトンポンプの高次生理機能と分子機構を明らかにするこ

とを目的とする本研究の基盤となるものである。V-ATPase が形成する酸性環境の動物細胞における生理学的役割に関する研究は、国内外で断片的に行われているが、本研究のような分子レベルから哺乳類の個体レベルまで系統的に機能を明らかにしようとする研究は未だ行なわれていない。

2. 研究の目的

本研究は、ほ乳類液胞型プロトンポンプの高次生理機能及びその分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)V-ATPase と低分子 GTPase Arf6 およびグアニンヌクレオチド交換因子(ARNO)と結合様式の解析

エンドサイトーシスが盛んな腎臓皮質より、エンドソーム膜画分を調製し、V-ATPase のサブユニット特異的な抗体を用い、免疫沈降を行う。免疫沈降画分を解析することにより、低分子 GTPase Arf6 と ARNO がそれぞれのサブユニットを介して V-ATPase と結合するかを明らかにする。次に、同定された V-ATPase サブユニットおよびその truncated form を HEK 細胞などに発現し、結合ドメインを明らかにする。また、エンドソーム特異的に局在する a2 サブユニットのみならず、リソソーム特異的に局在する a3、ゴルジ体に特異的に局在する a1 サブユニットと他の Arf family との相互作用も検証する。

(2)オルガネラ内部の酸性化と ARF・GEF の活性制御に関する解析

『V-ATPase と ARF・GEF との相互作用が膜輸送に必須か?』『オルガネラ内部の酸性化がこのような相互作用に影響するかどうか?』を明らかにするために、V-ATPase の阻害剤である Bafilomycin、concanamycin や、プロトン勾配の阻害剤である FCCP で処理した細胞の FITC-albumin の取り込みを *in vivo* で解析する。同時に、ARF・ARNO の V-ATPase との結合を、エンドソーム画分を調製し、免疫沈降法を用いて明らかにする。V-ATPase の assembly factor として機能する(プロ)レニン受容体も腎臓で高発現しており、プロレニン受容体欠損によるエンドソーム内腔の酸性化、V-ATPase の膜内在性ドメインと表在性ドメインの assembly の変化が ARF・ARNO の V-ATPase との結合に影響するかどうかを検証する。

さらに、Arf6 の活性化型および不活性化型変異体を用い、リクルートされるコートタン

パク質の構成を明らかにする。さらに、Histidine 残基の pH sensing 機能に着目し、site-directed mutagenesis より a2 サブユニットの C 末端およびエンドソーム内の His 残基に置換変異を導入する。変異体の Arf6 との pH 依存的な結合を検証することによって、pH sensing domain を同定する。

(3)(プロ)レニン受容体欠損の培養細胞系の構築

(プロ)レニン受容体をノックアウトしたマウスは胎生致死である。一方、イントロン内に loxP を導入した変異アレル、ATP6ap2floxed は機能を保っており、ホモ接合でも明らかな表現型を示さない。そこで、ATP6ap2floxed マウスの胎性 12.5 日目の胚より、常法に従って胚性繊維芽細胞 (MEF) の初代培養細胞を調整する。ATP6ap2floxed は Cre recombinase によって ATP6ap2 に変換される。Cre recombinase を発現する adenovirus (AdxCre) を MEF に感染させ、ATP6ap2 をホモでもつ MEF を作成する。Cre recombinase の活性と loxP 切り出しの効率を検証するため、Cre 依存的に LacZ を発現する ROSA26Sho をも持たせている。これまでの予備的な解析の結果、AdxCre を M.O.I = 10-50 程度で感染させた場合、感染後 24 時間で 90%以上の細胞が -galactosidase positive となり、4 日目で ATP6ap2 タンパク質が検出限界以下となることが分かっている。

(4)プロレニン刺激による細胞内オルガネラの酸性化およびシグナル伝達の解析

1 で樹立した MEF 細胞を用い、プロレニン存在下・非存在における V-ATPase の細胞内局在、アセンブリー状態を膜内在性及び表在性ドメインのサブユニットの抗体を用いて蛍光抗体法等で解析する。細胞内オルガネラ内腔の酸性 pH 変化を Lysosensor 染色で測定する。さらに、プロレニン刺激による ERK リン酸化が報告されているが、ATP6ap2 MEF では、そのシグナル伝達がどのように変化するか明らかにする。

4 . 研究成果

液胞型プロトンポンプ H⁺-ATPase (V-ATPase) は、多彩な酸性オルガネラの形成に重要な役割を持つ。本研究は、生体の血圧や電解質バランスを調節する組織レニン・アンジオテンシン系の活性化に参与する (プロ)レニン受容体 (ATP6ap2) が、V-ATPase のアセンブリーに必須であることを明らかにした。V-ATPase の機能は、細

胞生物学の分野のみならず、高血圧、糖尿病などの分野でも関心を集めている (*PLoS One* 2013)。さらに、V-ATPase サブユニット改変マウスを用い、破骨細胞が骨を壊す様子を可視化することに世界で初めて成功し、骨疾患治療薬探索の新たな切り口になると考えている (*J. Clin. Invest.* 2013)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Positive and negative regulation of developmental signaling by the endocytic pathway. Wada, Y. and Sun-Wada, G. H. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (査読有) in press (2013)
2. The role of individual domains and the significance of shedding of ATP6AP2/ (pro)renin receptor in vacuolar H⁺-ATPase biogenesis. Kinouchi, K., Ichihara, A., Sano, M., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Ochi, H., Fukuda, T., and Itoh, H. *PLoS One* (査読有) e78603 (2013)
3. Vacuolar proton pump (V-ATPase) and insulin secretion. Sun-Wada, G. H., Wada, Y. in “H⁺-ATPase activated by glucose; a possible link to diabetic complications”, Nakamura, S. ed, Pan Stanford Publishing Pte Ltd., Singapore, in press (2013)
4. Vacuolar-type proton pump ATPases: Acidification and pathological relationships. Sun-Wada, G. H., and Wada, Y. *Histol. Histopathol.* (査読有) 28, 805-815 (2013)
5. Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. Wada, Y., Sun-Wada, G. H., and Kawamura, N. *Autophagy* (査読有) 9, 252-254 (2013)
6. Critical roles of the PtdIns(3,5)P₂-producing enzyme phosphatidylinositol phosphate kinase III in embryogenesis and intestinal homeostasis. Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G. H., Kawamura, N., Iizuka, R., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H., and Sasaki, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (査読有) 110, 1726-1731 (2013)
7. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated control of osteoclast function. Kikuta, J., Wada, Y., Kowade, T.,

- Wang, Z., Sun-Wada, G. H., Nishiyama, I., Mizukami, S., Maiya, N., Yasuda, H., Kumanogoh, A., Kikuchi, K., Germain, R., and Ishii, M. *J. Clin. Invest.* (査読有) 123, 866-873 (2013)
8. mVam2 依存性エンドサイトーシスによるマウス胚発生における BMP (bone morphogenetic protein) シグナルの制御. 和田戈虹, 和田洋 *生化学* (review 査読無) 85, 806-809 (2013)
 9. elivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. Kawamura, N., Sun-Wada, G. H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., and Wada, Y. *Nat. Commun.* (査読有) 3, 1071 (2012) *Selected as the Journal's image of the issue.*
 10. SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages. Sakurai, S., Hashimoto, H., Nakanishi, H., Arai, S., Wada, Y., Sun-Wada, G. H., Wada, I., Hatsuzawa, K. *Mol. Biol. Cell* (査読有) 23, 4849-4863 (2012)
 11. Spatial restriction of bone morphogenetic protein signaling in mouse gastrula through the mVam2-dependent endocytic pathway. §Aoyama, M., §Sun-Wada, G. H., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Hamada, H., and Wada, Y. *Dev. Cell* (査読有) 22, 1173-1175 (2012) §*Equal contribution.*
 12. 和田戈虹, 和田 洋 (2012) マウスの初期胚における BMP シグナルのパターンは Vam2 に依存するエンドサイトーシス経路により制御されている ライフサイエンス新着論文レビュー 科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター (査読無)
 13. (Pro)renin receptor is essential for normal podocyte structure and function. Oshima, Y., Kinouchi, K., Ichihara, A., Sakoda, M., Kurauchi-Mito, A., Bokuda, K., Narita, T., Kurosawa, H., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Yamada, T., Takemoto, M., Saleem, M. A., Quaggin, S. E., Itoh, H. *J. Am. Soc. Nephrol.* (査読有) 22, 2203-2212 (2011)
 14. (Pro)renin Receptor is Essential for Expression of Slit Diaphragm Proteins in Murine Podocytes. Kinouchi, K; Ichihara, A; Oshima, Y; Kurauchi-Mito, A; Kurosawa, H; Sun-Wada, G.H.; Wada, Y; Yamada, T; Takemoto, M; Saleem, MA; Quaggin, SE; Itoh, H. *Hypertension* (査読有) 58, 55-56 (2011)
 15. The *a3* isoform vacuolar type H⁺-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. Nishisho, T., Hata, K., Nakanishi, M., Morita, Y., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Yasui, N., and Yoneda, T. *Mol. Cancer Res.* (査読有) 9, 844-855 (2011)
 16. Vacuolar H⁺-ATPase subunit *Voa1* and *Voa2* cooperatively regulate secretory vesicle acidification, transmitter uptake and storage. Saw, N. M., Kang, S. Y., Parsaud, L., Han, G. A., Jiang, T., Grzegorzczuk, K., Surkont, M., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Li, L., and Sugita, S. *Mol. Biol. Cell* (査読有) 22, 3394-3409 (2011).
 17. Generation of chicken monoclonal antibodies against the *a1*, *a2*, and *a3* subunit isoforms of vacuolar-type proton ATPase. Sun-Wada, G. H., Tabata, H., Kuhara, M., Kitahara, I., Takashima, Y., and Wada, Y. *Hybridoma* (査読有) 30, 199-203 (2011)
- [学会発表] (計 23 件)
1. 山中加也, 和田戈虹, 他. プロトンポンプV-ATPase α サブユニットアイソフォームのマウス初期胚における発現 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学 2013/10 12
 2. 殿村真優, 和田戈虹, 他. プロトンポンプV-ATPase G2アイソフォーム遺伝子欠損マウスの作製とその表現型 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学 2013/10 12
 3. 信貴美里, 和田戈虹, 他. リソソーム膜輸送におけるmVam2および低分子GTPase Arl8bとrab7の役割 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学 2013/10 12
 4. 川村暢幸, 和田戈虹, 他. マウス低分子量GTPase Rab7の初期胚発生における機能解析 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学 2013/10 12
 5. Wada Y and Sun-Wada, G. H. Unique endocytic pathway in early mouse embryos and its implication in signal regulation The 61st NIBB Conference: Cellular Community in Mammalian Embryogenesis Okazaki, Japan 2013/7 10-12
 6. Wada Y and Sun-Wada, G. H. THE STRUCTURAL ANALYSIS OF (PRO)RENIN RECEPTOR IN VACUOLAR H⁺-ATPase ASSEMBLY The World Conference of Nephrology 2013 Hong Kong 2013/06 02

7. P Wada Y and Sun-Wada, G. H. Physiological functions of subunit isoform a3 of proton pump V-ATPase Cold Spring Harbor Asia Conference: Membrane Protein Structure & Function 蘇州、中国 2013/5
 8. Wada Y and Sun-Wada, G. H. Microautophagic assembly of large vacuoles in mammalian embryonic tissues Cold Spring Harbor Asia Conference: Membrane Protein Structure & Function 蘇州、中国 2013/5
 9. Wada Y and Sun-Wada, G. H. □Rab7-dependent microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development EXPERIMENTAL BIOLOGY 2013 Boston, USA 2013/4
 10. Sun-Wada, G. H. Physiological functions of subunit isoforms of proton pump V-ATPase FAOBMB mini-symposium Iwate Medical university 2013/4 5
 11. 川村暢幸, 和田戈虹, 他. マウス初期胚におけるミクロオートファジーの解析 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 2012/10
 12. 宮崎宏美, 和田戈虹, 他. マウス初期胚 BMPシグナル制御におけるmVam2の役割 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 2012/10
 13. 古川阿弓, 和田戈虹, 他. マウス低分子量GTPase Rab7の機能解析(I)―細胞における変異表現型 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 2012/10
 14. 稲葉佳南, 和田戈虹, 他. マウス低分子量GTPase Rab7の機能解析(II)―初期発生の異常 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 2012/10
 15. 石川礼, 和田戈虹, 他. 液胞型プロトンATPase ATP6Vocサブユニット欠損胚の解析 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 2012/10
 16. Wada Y and Sun-Wada, G. H. Rab7-dependent microautophagy in gastrulating mouse embryo Cold Spring Harbor Asia Conference Shanghai, China 2012/9
 17. 和田戈虹, 他. (Pro)renin Receptor is essential for filtration barrier in glomerular podocyte 15th International & 14th European Congress of Endocrinology Florence, Italy 2012/5 05-09
 18. Wada Y and Sun-Wada, G. H. Delivery of endosome to vacuole via microautophagy in visceral endoderm of mouse embryo EMBO Workshop Lineage Commitments: Emphasis on extraembryonic-embryonic interfaces Leuven, Belgium 2011/10
 19. Wada Y and Sun-Wada, G. H. Endocytic regulation of BMP signalling during mouse gastrulation EMBO Workshop Lineage Commitments: Emphasis on extraembryonic-embryonic interfaces Leuven, Belgium 2011/10
 20. 和田戈虹, 他. ATP6AP2/ (プロ) レニン受容体はマウス腎系球体上皮細胞の発達に必須である 第84回日本内分泌学会学術総会 神戸 2011/4
 21. 和田戈虹, 他. X染色体上で調節される心筋細胞(プロ)レニン受容体の生理的機能 第84回日本内分泌学会学術総会 神戸 2011/4
 22. □和田戈虹, 他. Prorenin受容体の基礎と臨床 第75回日本循環器学会学術集会 横浜 2011/3
 23. 和田戈虹, 他. 細胞内酸性環境を維持する(プロ)レニン受容体の生理的な機能 第40回日本心脈管作動物質学会 高松 2011/2
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕出願状況(計 0 件)
- 〔その他〕
http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2704/2704_Researcher.html
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
 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