

平成22年5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590213
 研究課題名（和文） 破骨細胞の空胞型 H⁺-ATPase のポンプ電流の特性と活性制御機構の解明
 研究課題名（英文） Characteristics and regulatory mechanisms of H⁺ pump currents through the plasma membrane vacuolar H⁺-ATPases in osteoclasts
 研究代表者
 酒井 啓 (SAKAI HIROMU)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：90382192

研究成果の概要（和文）：破骨細胞は酸や蛋白分解酵素を分泌し骨を溶解する機能を備え骨リモデリングにおいて主要な役割を果たす細胞である。私達はホールセルクランプを用いて破骨細胞膜にあって酸分泌を担う空胞型 H⁺-ATPase (V-ATPase)による H⁺ポンプ電流を個々の細胞でリアルタイムに捉えることに成功した。この手法を用い様々な細胞内外 pH 環境・膜電位下での H⁺ポンプ電流を定量的に解析し、破骨細胞機能の生理的ネガティブフィードバックシグナルである細胞外 Ca による酸分泌制御の実態とその機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts resolve bone tissues by secreting acids and proteolytic enzymes and thus play significant roles in bone remodeling. We succeeded in a real-time measurements of proton currents through the plasma membrane vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) using the whole-cell clamp technique. The V-ATPase current was increased by intracellular acidification and depolarization, and inhibited rapidly by exposure to high concentrations of extracellular Ca²⁺, a negative feedback signal for osteoclast functions. The underlying mechanisms of the Ca²⁺-sensing responses were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：生理学、細胞・組織、シグナル伝達、プロトンポンプ、破骨細胞、骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

無機骨基質（ハイドロキシアパタイト：リン酸 Ca）は破骨細胞から分泌される酸によっ

て溶解される。骨と接する細胞膜は襞状の構造が発達し（ruffled membrane）、ここに高密度で発現する空胞型 H⁺-ATPase

(V-ATPase)が酸分泌の主体となる。一般に普及している pH 感受性色素による V-ATPase 活性の評価法は定量性に乏しく細胞条件による変動を正確に捉えることができない。私達はホールセルクランプ法を応用して培養マウス破骨細胞より細胞膜 V-ATPase を介する H⁺ポンプ電流を検出することに成功した (Sakai et al., J. Physiol. 2006)。この方法を用いると、細胞膜 V-ATPase 活性の電位や細胞内外環境による変動を個々の細胞においてリアルタイムで定量的に解析することができる。細胞膜 V-ATPase 活性は骨吸収機能に直結している。その制御機構の解明は骨リモデリングの理解を深め骨粗鬆症を初めとする骨病態やその治療に寄与すると期待される。

2. 研究の目的

(1) マウス培養細胞を用いて破骨細胞膜 V-ATPase 電流 (ポンプ電流) の解析法を確立し、さまざまな細胞条件下での電気的特性を明らかにする。(2) 破骨細胞機能抑制刺激である Ca-sensing 応答を手がかりに V-ATPase 活性の制御メカニズムを調べる。更に骨粗鬆症治療薬や骨基質材料の影響も検討する。

3. 研究の方法

破骨細胞の培養 : RAW-264 細胞あるいはマウス大腿骨髄細胞を破骨細胞分化誘導サイトカイン (soluble form of receptor activator of nuclear factor κB, sRANKL) 存在下に 5-18 日間培養し多核の破骨細胞を分化させた。ガラス、I 型コラーゲン、アパミクロンなど様々な基質条件を検討した。

ホールセルクランプ法 : プロトン (H⁺) 電流を検出するために、高濃度で存在する他のイオン (Na⁺, K⁺, Cl⁻) を NMDG, aspartate で置換し、更に高濃度 (100-120 mM) の pH buffer (HEPES, Mes) を添加し、細胞内外の pH 勾配を -1.8 - 1.8 の間で任意にコントロールした。V-ATPase の特異的インヒビター (Bafilomycin A₁, 200 nM) を投与し Bafilomycin-sensitive current として細胞膜 H⁺ポンプ電流を抽出した。また同時に記録される容量電流から膜容量を算出し細胞面積の指標とした。

共焦点顕微鏡下での蛍光イメージング法 : エンドサイトーシスの指標として膜を選択的に染色する脂溶性蛍光色素 (FM1-43, 2.5 μg/ml) を外液に添加し、10-40 mM Ca 刺激後の細胞内蛍光強度の時間経過を共焦点顕微鏡下で検出した。

4. 研究成果

(1) V-ATPase 電流解析法によるポンプ電流特性の解明

記録条件の検討 : 単位細胞面積辺りの H⁺電流密度は、マウス骨髄細胞由来破骨細胞と RAW264 細胞由来破骨細胞との間で有意差はなかった。培養プレートは、ガラス、コラーゲンコート、プラスチックの順に 1.5 倍程度電流密度が大きくなる傾向があった。また単核細胞が多数融合し多核の破骨細胞に分化する過程で、H⁺電流の総量は徐々に増加するが、電流密度は 3 核以上ではほぼ一定であり、V-ATPase の細胞膜へのリクルートメントが分化初期に完成していることが明らかになった。

V-ATPase 電流の特性 : 酸分泌を示す外向き H⁺電流は脱分極するほど、また細胞内外の pH 勾配が大きくなるほど増大した。様々な電位・pH 環境での結果から、イオンチャネルに比べると緩やかではあるが H⁺の電気化学ポテンシャルの影響下にあり、これらの要因の変動に伴って酸分泌能が変化していることが示された。一方、pH 勾配を逆転させても細胞内への酸流入は検出できず、骨吸収窩の強い酸性環境においても酸分泌が維持されることが明らかになった。

(2) 細胞膜 V-ATPase の Ca-sensing 応答。

V-ATPase 電流の抑制とエンドサイトーシス : 破骨細胞を高濃度 (5-40 mM) の細胞外 Ca に暴露すると 5-10 分以内に細胞膜 V-ATPase 活性と細胞膜容量が共に低下した。細胞によって変動の大きさにはばらつきがあったが、同一細胞の 2 つのパラメータの間には高い相関が見られた。膜容量減少 (細胞面積減少) がエンドサイトーシスによるものかどうかを判定するため、膜をラベルする脂溶性蛍光色素 (FM1-43) を添加したところ、刺激後次第に細胞内蛍光が増加した。これらの結果から、細胞外 Ca レベルの上昇に伴って V-ATPase 活性の減弱と共にエンドサイトーシスが促進されることが明らかになった。これらの細胞膜応答は細胞内外のイオン組成、ATP 濃度などを変えても生じ Ca への暴露が短時間 (10-20 分) であれば可逆的であった。細胞外 Mg を増加した場合も同様な結果が得られ、2 価イオンに対する細胞応答と考えられた。

エンドサイトーシスのダイナミン・

V-ATPase 依存性 : Ca 刺激によって促進されるエンドサイトーシスは siRNA の導入による dynamin 発現抑制や dynamin の阻害剤 (dynasore, dynamin-inhibitory peptide) で抑制され、ダイナミン依存性であることが明らかになった。また V-ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin A₁ によっても有意に抑えられた。更に、細胞膜 V-ATPase 電流振幅の大きい細胞ほど膜容量減少が大きくなることから、Ca によるエンドサイトーシスの促進に細胞膜 V-ATPase が積極的に関与することが推測された。

Ca-sensing 応答の細胞内シグナリング機構: 破骨細胞には G 蛋白関連の Ca-受容体の発現が報告されている。一般に Ca-受容体の下流シグナルと考えられている phospholipase C (PLC) の関与を検討した。PLC の阻害薬 (U73122)、PLC γ 2-subunit の siRNA (PLC γ 2-siRNA) によって Ca 応答 (ポンプ電流減少とエンドサイトーシス) は抑制された。また細胞内 Ca を高濃度(0.5-5 μ M)に固定、あるいは逆に Ca キレーター(20 mM BAPTA)によって低濃度に固定するとエンドサイトーシスは強く抑えられた。細胞膜 V-ATPase 電流応答も抑えられたが、その程度はエンドサイトーシスに比べ少なかった。更に Ca 応答はカルモジュリンの阻害剤(W7) やそのモノクローナル抗体(anti-CaM)でも顕著に抑制された。

これらの結果から細胞外 Ca 刺激によるエンドサイトーシスのシグナリング経路には、PLC、細胞内 Ca、カルモジュリンが関与することが示された。細胞膜 V-ATPase 電流の減少もこれらの経路を共有したが、エンドサイトーシスに比べるとその影響が少ない傾向が見られ、異なるシグナリング経路の存在も示唆された。

(3) そのほか。

骨粗鬆症治療薬 (ビスフォスフォネート) の初期効果: 第 2 世代ビスフォスフォネートの 1 つであるアレンドロネートを細胞外に投与すると 2-5 分という早い経過で V-ATPase 電流を抑制したが、細胞内に投与しても早期の抑制効果は見られなかった。これまでビスフォスフォネートはエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれメバロン酸代謝経路を阻害して抑制作用を発揮すると報告されてきたが、投与初期に細胞外からの直接作用によって酸分泌抑制が起こることを初めて明らかにした。アレンドロネートが細胞内に取り込まれると逆に初期の直接作用が消失する可能性がある。引き続いて起こる代謝を介する慢性の抑制効果と合わせて 2 相性の機能抑制効果があることが示唆された。

骨基質代替材料の検討: 研究過程で次第にクローズアップされたのは、破骨細胞が生体内で本来持っているはずの細胞極性を如何に再現させるかという問題である。V-ATPase の細胞膜へのリクルートメントは機能と密接に関連する「極性」獲得過程のひとつである。V-ATPase 電流を指標に「極性」の問題にアプローチできれば、研究の進展に寄与することは間違いない。また破骨細胞を骨基質の上で分化させるのが望ましい。しかし、光を透過しない骨スライスを用いると記録中の細胞の同定や形態変化の確認ができない。光透過性のある程度維持しながら極性を誘導しうる基質としての材料を求めて、ハイドロキシアパタイト/コラーゲンコート、アパミ

クロンなどを試験中であるが、それぞれに一長一短があり完成には至っていない、今後も引き続いて改良を重ね有用な培養基質を開発していきたいと考えている。

今回の研究の成果は、個々の細胞の細胞膜に存在する V-ATPase の機能をリアルタイムで正確に定量する方法を確立できたことに負っている。細胞膜 V-ATPase が思いのほか早い時間経過で変動すること、膜動態とよく連動すること、細胞外 Ca とビスフォスフォネートなどによる破骨細胞の機能抑制過程のごく初期に酸分泌能が消失することなど、細胞応答に直結したポンプ活性の変動を捉えることができた。また、豊富な予備実験によって今後の研究の指針を得たことも大きな成果であった。

以上の結果は国内および国際学会で発表した。またその一部は現在投稿中である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kuno, M., Ando, Morihata, H., Sakai, H., Mori, H., Sawada, M. and Oiki, S. Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel. *J. Gen. Physiol.* 査読有 134 (3), 2009, pp191-205.
- ② Morihata, H. Kawawaki, J., Okina, M., Sakai, H., Notomi, T., Sawada, M. and Kuno, M. Early and late activation of the voltage-gated proton channel during lactic acidosis through pH-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Archiv-Eur. J. Physiol.* 査読有 455(5), 2008, pp 829-838.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Kuno, M., Ando, H., Morihata, H., Sakai, H., Mori, H. & Oiki, S. Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel in microglia. *Biophysical Journal Abstract* : 2010. (54th Annual Meeting, 2/20-2/24, San Francisco, CA).
- ② 久野みゆき, 酒井啓, 森浦芳枝, 川脇順子, 大西景子. 破骨細胞において細胞外 Ca²⁺による誘発されるエンドサイトーシス機構. 平成 21 年度生理学研究所研究会。「シグナル伝達の動的理解を目指す新戦略」平成 21 年 10 月 1 - 2 日。
- ③ 久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井啓, 森啓之, 老木成稔. 電位依存性プロ

- トンチャネルの温度依存性を決定する諸因子。平成 21 年度生理学研究所研究会。「作動中の膜機能分子の姿を捉えるー静止画から動画へー」平成 21 年 9 月 3 - 4 日。
- ④ Sakai, H., Notomi, T., Moriura, Y., Kawawaki, J. & Kuno, M. Ca²⁺-stimulated inhibition of the plasma membrane vacuolar H⁺-ATPase in murine osteoclasts in association with facilitated endocytosis. 36th International Congress of Physiological Sciences, 7/27-8/1, 2009, Kyoto. J. Physiol. Sci. 59 (suppl 1) pp236.
- ⑤ Kuno, M., Ando, H., Morihata, H., Sakai, H., Mori, H., Shimizu, H., Iwamoto, I. & Oiki, S. Temperature-dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel in microglia. 36th International Congress of Physiological Sciences, 7/27-8/1, 2009, Kyoto. J. Physiol. Sci. 59 (suppl 1) pp400.
- ⑥ Sakai, H., Notomi, T., Moriura, Y., Kawawaki, J. and Kuno, M. Constitutive and Ca²⁺-stimulated turnover of the plasma membrane vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) in murine osteoclasts. Biophysical Journal Abstract, : 2009. (53th Annual Meeting, 2/28-3/4, Boston, Massachusetts).
- ⑦ 久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井啓, 森啓之, 清水啓史, 岩本真幸, 老木成稔。電位依存性プロトンチャネルのプロトン透過の温度依存性。2008 第 46 回生物物理学会年会。福岡、12 月 3-5 日。生物物理 Vol. 48 (Suppl) 3P-209
- ⑧ 酒井啓, 納富拓也, 久野みゆき。細胞外 Ca に応答する破骨細胞膜 V-ATPase のリサイクリング機構。第 26 回日本骨代謝学会学術集会平成 20 年 (2008) 10 月 29-31 日、大阪。プログラム抄録集 p207.
- ⑨ 久野みゆき, 納富拓也, 川脇順子, 森浦芳枝, 酒井啓。細胞膜プロトンポンプの turnover 制御機構。平成 20 年度生理学研究所研究会。「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」平成 20 年 10 月 2-3 日。
- ⑩ Sakai, H., Notomi, T. Moriura, Y., Kawawaki, J. and Kuno, M. Endocytotic process underlying calcium-induced inhibition of plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase in murine osteoclasts. *J Bone Min Res* 23 (Abstract): S267. 30th ASBMR Annual Meeting, 9/11-16, 2008, Montreal, Quebec).
- ⑪ 久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井啓, 森啓之, 清水啓史, 岩本真幸, 老木成稔。電位依存性プロトンチャネルにおけるプロトン透過の温度依存性 (Q₁₀ 値)。平成 20 年度生理学研究所研究会。「膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて」平成 20 年 9 月 4-5 日。
- ⑫ 久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井啓, 川脇順子, 森啓之, 清水啓史, 老木成稔。電位依存性プロトンチャネル：温度パルス法によるイオン透過の温度依存性解析 (A rapid temperature-pulse method revealed low energy barrier for permeation through the voltage-gated proton channel in microglia). 第 85 回日本生理学会大会：2008 年 (平成 20 年 3 月 25 日) 東京。
- ⑬ Morihata, H., Kawawaki, J., Okina, M., Sakai, H., Notomi, T. and Kuno, M. Early and Late Activation of the Voltage-Gated Proton Channel during Lactic Acidosis through pH-Dependent and -Independent Mechanisms. Biophysical Journal Abstract, : 2008. (52th Annual Meeting, 2/2-2/6, Long Beach, California).
- ⑭ 久野みゆき, 安藤博之, 森畑宏一, 酒井啓, 清水啓史, 老木成稔 (2007. 12) 電位依存性プロトンチャネルをプロトンはどうに透過するか？：プロトン透過の温度依存性。第 45 回生物物理学会年会 (横浜) 平成 19 年 12 月 21-23 日
- ⑮ 久野みゆき, 安藤啓之, 森畑宏一, 酒井啓, 清水啓史, 老木成稔。電位依存性プロトンチャネル：プロトン透過の温度依存性。平成 19 年度生理学研究所研究会。「膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて」平成 19 年 9 月 6-7 日。
- ⑯ 酒井啓, 森啓之, 久野みゆき。日本骨代謝学会 (平成 19 年 7 月 19-21 日) 大阪。破骨細胞の V-ATPase によるプロトン電流の検出とその調節機構。第 25 回日本骨代謝学会学術集会：2007 年 (平成 19 年 7 月 19-21 日) 大阪。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 啓 (SAKAI HIROMU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：90382192

(2) 研究分担者

久野 みゆき (KUNO MIYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00145773

(3) 連携研究者

無し。