

機関番号：34311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570142

研究課題名（和文） 膜輸送における液胞型プロトンポンプの生理機能

研究課題名（英文） The Physiological function of V-ATPase involved in membrane traffick

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

研究成果の概要（和文）：

本研究において、研究代表者がハーバード大学医学部との共同研究で、V-ATPase のサブユニットが低分子 GTPase Arf6 のグアニンス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いだした。V-ATPase の a3 サブユニットの欠損マウスを用い、細胞生物学、病理学的に解析した。V-ATPase がファゴソームの酸性化が殺菌作用に必須であること、骨形成に必須であることが示された。さらに、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。

研究成果の概要（英文）：

Acidification inside membrane compartments is a common feature of all eukaryotic cells. The acidic milieu, generated by the V-ATPase, is involved in many physiological processes including secretion, protein processing, and others. Using subunit-specific knockout mice, we have shown that the function of V-ATPase is involved in insulin secretion, bone resorption and macrophage functions. We have also revealed that the (pro)renin receptor functions as an assembly factor of the V-ATPase complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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

動物細胞内においては、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。これらのオルガネラ膜に ATP の加水分解エネルギーに共役して、内腔へ H<sup>+</sup> を能動的に輸送する、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) が存在する。しかしながら、「酸性 pH がどのように膜輸送を調節しているか?」「プロトンポンプ分子が膜輸送に直接関与している?」に関しては、未だ解明されていない。

研究代表者らは、これまで、V-ATPase の生理機能を詳細に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ン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)。最近、研究代表者らは、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、膜小胞の形成関与することを示した (*Nat Cell Biol.*, 2006) (図 1)。また、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)。これらの研究成果が、膜輸送における液胞型プロトンポンプの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。

## 2. 研究の目的

本研究は、膜輸送における液胞型プロトンポンプの機能と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) 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 の特異的な阻害剤である Bafilomycin や concanamycin で細胞内オルガネラ酸性化を阻害すると、receptor-mediated endocytosis が阻害され、取り込まれた受容体がリソソームまで輸送されないことが知られている。このことは、エンドソームやリソソーム内部の pH を感知し、膜輸送を制御する因子の存在を強く示唆している。研究代表者は、まず第一に、V-ATPase のサブユニットが膜輸送に関与する低分子 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結果を出発点に、『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。具体的には、タンパク質再吸収の機能を持つ、apical endosome が非常に発達している腎臓近位尿細管上皮細胞を材料として用いる。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。さらに、結合阻害活性をもつ V-ATPase サブユニットの truncated form を強発現し、FITC-albumin エンドサイトシスに対する影響を解析する。次に、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、特異的なイソフォーム欠損マウスより初代培養細胞を調製し、酸性 pH が形成されないオルガネラ膜へのコートタンパク質の集合状態を調べる。

### (2) V-ATPase の膜融合マシーンとしての機能に関する解析

V-ATPase の膜内在性ドメインはプロトン輸送経路として機能する。しかし、マウスβ細胞を用いたインスリン分泌の解析から、小

胞内部の酸性化を阻害剤などで阻害しても、インスリンが分泌されるが、膜内在性ドメインを欠損した $\beta$ 細胞では、インスリンの分泌が著しく低下することが明らかとなった。本研究は、膜融合に関与する膜内在性ドメインのサブユニットを同定すると同時に、SNAREなど他の膜輸送に関わる分子との相互作用を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 研究代表者がハーバード大学医学部との共同研究で、V-ATPaseのサブユニットが低分子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いだした。平成20年度は、色素細胞や内分泌系組織におけるV-ATPaseの局在と機能を解析し、V-ATPaseが貯留小胞やエンドソームなどを含むオルガネラの内部の酸性pH-senserとして機能することを強く示唆する結果を得た。さらに、V-ATPaseサブユニット・イソフォームa3とpH感受性型緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパクのノックイン・マウスを用い、オルガネラ膜輸送および酸性pHをGFPのみならず、個体レベルで酸性コンパートメントを可視化し、プロトンの動態を追跡する系を構築した。

(2) 平成21年度は、マクロファージ細胞を用いて、V-ATPaseのa3サブユニットがリソソーム系細胞内オルガネラ、ファゴソームに特異的に局在し、ファゴソームの酸性化が殺菌作用に必須であることをa3ノックアウトマウス由来のマクロファージを用いて示した。さらに、a3-GFPノックインマウス由来のマクロファージ細胞を用い、ファゴソームの形成のダイナミズムをreal timeで観察した。

(3) 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。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。さらに、a3サブユニットイソフォームのノックアウト

マウスを用い、病理学的に解析した。骨形成異常による頭蓋骨視神経孔の狭窄が観察された。視神経の圧迫による神経細胞の細胞死が視覚障害の原因であることを示した。

#### 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. 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) in press (2010)
2. The (pro)renin receptor/*ATP6AP2* is essential for vacuolar  $H^+$ -ATPase assembly in murine cardiomyocytes. Kinouchi, K., Ichihara, A., Sano, M. Sun-Wada, G-H, Wada, Y., Kurauchi-Mito, A., Bokuda, K. *Circ Res.* (査読有) 107, 30-34 (2010)  
*With accompanying Editor's highlight: (P)RR/ATP6AP2 is essential for V-ATPase assembly.*
3. Optic nerve compression and retinal degeneration in *Tcirg1* mutant mice lacking the vacuolar-type  $H^+$ -ATPase *a3* subunit. Kawamura N, Tabata H, Sun-Wada, G-H, Wada Y. *PLoS One* (査読有) 5, E12086 (2010)
4. Vacuolar-type proton pump ATPases: Roles of subunit isoforms in physiology and pathology. Sun-Wada, G-H, Wada, Y. *Histol. Histopathol.* (査読有) 25, 1611-1620 (2010)
5. Localization of vacuolar-type  $H^+$  pump (V-ATPase) *a* subunit isoforms in mouse lung tissue. Tabata H., Kawamura, N., Hitomi, Y., Sun-Wada, G-H *Bulletin of the Institute for Interdisciplinary Studies of Culture Doshisha Women's College of Liberal Arts* (査読有) 27, 156-161 (2010)
6. Physiological functions of acidic compartments: Diverse roles of vacuolar proton pump ATPase. Sun-Wada, G-H

***Bulletin of the Institute for  
Interdisciplinary Studies of Culture  
Doshisha Women's College of Liberal Arts  
27, 16-23 (2010)***

[学会発表] (計 8 件)

1. 和田戈虹ら、Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos、The 16th International Conference of the International Society of Differentiation: From Stem Cells to Organisms、2010 年 11 月、奈良
2. 和田戈虹、V-ATPase とインスリン分泌の関連、第 130 回分泌セミナー、2010 年 11 月、東京
3. Y. Wada and G-H Sun-Wada、Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos、2010 年 10 月、Cold Spring Harbor Laboratory. 米国
4. 和田戈虹、V-ATPase の関わる高次機能：インスリン分泌と ファゴサイトーシスを例として、5th Shinanomachi Angiotensin Biology Conference、2010 年 7 月、東京
5. 木内謙一郎、市原淳弘、佐野元昭、和田戈虹、和田洋、三戸麻子、木田可奈子、成田達也、大島洋一、黒澤秀章、福田恵一、伊藤 裕、細胞内小器官における (プロ) レニン受容体の生理機能の解明、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月、神戸
6. 川村暢幸、田畑裕幸、和田戈虹、和田洋、液胞型プロトンポンプ V-ATPase a3 サブユニット欠損マウスにおける視神経圧迫と網膜構造、第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月、大阪
7. 田畑裕幸、川村暢幸、和田戈虹、和田洋、ファゴソーム酸性化における液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) のダイナミクス、第 57 回日本生化学会近畿支部会例会、2010 年 5 月、奈良
8. Y. Wada ら、Spatial restriction of BMP signalling in mouse gastrula by the

endocytic pathway、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Vertebrate Organogenesis、2010 年 4 月、Cold Spring Harbor Laboratory. 米国

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