

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390043

研究課題名(和文)破骨細胞膜に共存する空胞型プロトンポンプと電位依存性プロトンチャネルの機能

研究課題名(英文) Functions of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases and voltage-gated proton channels coexisted in the plasma membrane of osteoclasts

研究代表者

久野 みゆき (Kuno, Miyuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00145773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,100,000円、(間接経費) 1,830,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞の細胞膜に共存する起電性H<sup>+</sup>選択的トランスポート分子、V-ATPaseとH<sup>+</sup>チャネルがどのように機能的役割を分担しているかを、それぞれのH<sup>+</sup>電流を同一細胞でリアルタイムに同定し検討した。生理的な細胞内pH (>7.0)、膜電位 (<-20 mV) でV-ATPase優位だが、活性化閾値に達すると直ちにH<sup>+</sup>チャネル優位に切り替わること、V-ATPaseがH<sup>+</sup> channelを抑制的に制御すること、弱塩基やV-ATPaseによる細胞内pH上昇がdynamin依存性endocytosisによるH<sup>+</sup> channel内胞化を促進することを明らかにし、細胞内H<sup>+</sup>チャネルプールの存在を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts express two types of electrogenic H<sup>+</sup>-selective transport mechanisms at the plasma membrane, that is, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases (V-ATPases) and voltage-gated proton channels. Identifying these H<sup>+</sup> currents in single cells under the whole-cell clamp configuration, we showed that V-ATPases were predominant at physiological intracellular pH (>7.0) and membrane potentials (<-20 mV), but that H<sup>+</sup> efflux via the H<sup>+</sup> channels exceeded those of V-ATPases at voltages higher than the activation threshold, suggesting that the two mechanisms switch their roles quickly. The increase in intracellular pH via V-ATPases inhibited activation of nearby H<sup>+</sup> channels, but not vice versa. Elevation of intracellular pH, either by weak bases or V-ATPases, facilitated dynamin-dependent endocytic internalization of H<sup>+</sup> channels. The data presented an idea of the reserving pool for H<sup>+</sup> channels and suggested novel mechanisms for interaction between V-ATPases and H<sup>+</sup> channels in osteoclasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学 生体分子 細胞・組織 生理活性 シグナル伝達 プロトン

### 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の機能は骨基質の溶解と分解産物の処理である(骨吸収能)。その機能異常は骨リモデリングのバランスを崩し、骨粗鬆症、大理石病・免疫機能障害などさまざまな病態を引き起こす。形態的・分子生物学的・生化学的研究に比べ、細胞レベルでの機能調節機構の研究は立ち遅れており、破骨細胞のリアルタイムの行動様式とそのメカニズムの理解は不十分であった。破骨細胞の細胞膜には骨溶解に必要な酸分泌の主体となるV-ATPase(H<sup>+</sup>ポンプ)に加え、脱分極によって開口しH<sup>+</sup>を選択的に透過する電位依存性H<sup>+</sup>チャンネルが発現している。マクロファージ・好中球などではH<sup>+</sup>チャンネルが貪食(phagocytosis)を亢進することが知られているが、破骨細胞でH<sup>+</sup>チャンネルが果たす役割はわかっていない。H<sup>+</sup>動態は破骨細胞機能と直結するが、V-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルのH<sup>+</sup>透過機構、H<sup>+</sup>排出機構、活性化条件は大きく異なっている。V-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルの機能は異なる条件下で別々に研究されてきたが、両者がどのように機能的役割を分け合っているのか、同一細胞でリアルタイムに検討した研究はなかった。私達はV-ATPaseおよびH<sup>+</sup>チャンネルによるH<sup>+</sup>電流の性質に精通し、同一細胞で2種のH<sup>+</sup>電流を同定する技術を確立している国内外を通じて唯一の研究グループであった。

### 2. 研究の目的

破骨細胞の細胞膜に共存する機構の異なる起電性H<sup>+</sup>選択的トランスポート分子、V-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルが働く「時、場所、量」の変化がどのように破骨細胞機能を調節しているかを明らかにし、その実験過程でH<sup>+</sup>動態の研究に有用な材料・ツールを開発することを目的とした。当初目指した具体的な目標は、(1)共通の制御シグナル(pH、電位、温度、細胞骨格など)に対するV-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルの応答の切り替えや互いの干渉とそのメカニズムの解明、(2)破骨細胞の極性を再現できる骨代替基質と検証法の開発、(3)H<sup>+</sup>チャンネルの特性を利用したH<sup>+</sup>モニタリングツールの開発であった。研究過程で遭遇した現象をヒントに、課題の展開に必要なと思われる予備実験も出来る限り行った。結論に至っていないものもあるが、概ね進展させることができた。

### 3. 研究の方法

**細胞:**主にマウスマクロファージ系細胞株(264.7)からサイトカイン(sRANKL)存在下で分化させた培養破骨細胞を用いた。一部の結果は、他のマクロファージ系細胞(ミクログリア)やH<sup>+</sup>チャンネル遺伝子を一過性に発現させたCOS7細胞と比較検討した。

**ホールセルクランプ法:**Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>を除去し、高濃度のpH bufferを添加した内外溶液を用いてホールセルクランプを行い、同一細胞に

共存するV-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルのH<sup>+</sup>電流のリアルタイム定量解析を行った。細胞膜近傍の細胞内pHはH<sup>+</sup>チャンネルの逆転電位より算出し、細胞面積の指標としては膜容量を用いた。

**蛍光プローブを用いた実験:**膜マーカーとなる蛍光プローブ(FM1-43)を外液に添加しintactな細胞の膜動態を共焦点顕微鏡で検出した。また膜透過性pH感受性色素(SNARF-1AM)を負荷し細胞内pHを測定した。貪食行動の可視化および食胞pH変動の検出には蛍光色素(FITC)を結合させたzymosan particleを用いた。

いずれの実験も室温で行った。

### 4. 研究成果

#### V-ATPaseとH<sup>+</sup>チャンネルの応答切り替えと干渉:

V-ATPaseのH<sup>+</sup>排出能は-80 ~ 40 mV、細胞内pH 5.6 - 7.8と広いpHおよび電位領域で維持された。H<sup>+</sup>チャンネルの作動領域は限定的であったが、閾値より約20 mV脱分極するとそのH<sup>+</sup>排出能はV-ATPaseを凌駕した。V-ATPaseをbafilomycinでブロックすると2/3の細胞で細胞内pHの低下と共にH<sup>+</sup> channelが増強し、同時に平均-40 mVの脱分極が起こった。これらの結果はV-ATPaseが細胞内pH上昇と過分極を介し近傍のH<sup>+</sup>チャンネルの開閉を抑制的に制御していること示唆する。この制御効果は細胞内pHバッファー濃度を下げると大きくなった。以上より、V-ATPaseとH<sup>+</sup> channelの役割がpHと電位に依存して切り替わり、生理的な細胞内pH(>7.0)、膜電位(<-20 mV)ではV-ATPase優位であるが、細胞内pHが低下し脱分極すると直ちにH<sup>+</sup>チャンネル優位となること、V-ATPaseが近傍のH<sup>+</sup> channelの機能を抑制していることが証明できた。

#### H<sup>+</sup>チャンネルのpH依存性内胞化メカニズム:

外液にNH<sub>4</sub>Clを投与するとその濃度と投与時間によって細胞内pH上昇の程度と時間を可逆的にコントロールできる。H<sup>+</sup>チャンネルの逆転電位より細胞内pHをリアルタイムでモニターすると、NH<sub>4</sub>Cl投与で細胞内pH上昇が5分以上持続すると、NH<sub>4</sub>Cl除去によってpHが回復してもH<sup>+</sup>チャンネルコンダクタンスは一部しか回復しなかった。投与する濃度に依存して細胞内pH上昇およびH<sup>+</sup>チャンネルコンダクタンスの低下は増強したが、細胞内に負荷されるNH<sub>3</sub>およびNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の総和の濃度はほぼ一定と推定され、NH<sub>4</sub>Clの効果はアンモニアの蓄積ではなくpH上昇によると考えられた。またH<sup>+</sup>チャンネルコンダクタンスの低下は膜面積の指標である膜容量の減少を伴っており、endocytosisが示唆された。Intactな破骨細胞でも、NH<sub>4</sub>Cl投与で膜蛍光マーカー(FM1-43)の取り込みが促進された。以上の結果から、細胞内pHが6.5以上に5分以上曝されるとendocytosisに伴ってH<sup>+</sup>チャンネルの内胞化が始まりpH 7.5前後まで増強することが明ら

かになった。NH<sub>4</sub>Cl は外因性の pH 上昇刺激である。内因性の細胞内 pH 上昇機構である V-ATPase が H<sup>+</sup>チャネルの内胞化を促進させるかどうかを細胞内 pH (SNARF-1) と FM1-43 を用いて調べた。V-ATPase を bafilomycin A<sub>1</sub> でブロックすると細胞内 pH の低下と共に endocytosis が抑制され、破骨細胞の細胞膜に存在する V-ATPase による細胞内 pH 上昇が endocytosis を促進させる事を確認した。H<sup>+</sup>チャネル頻回刺激による細胞内 pH 上昇もチャネルの内胞化を誘起した。外因性、内在性いずれの pH 上昇刺激による endocytosis 促進も dynamin に依存した。同様の現象は脳内マクロファージとして働くミクログリアでも起こったが、H<sup>+</sup>チャネル遺伝子を一過性に発現させた COS7 細胞では見られなかった。以上の結果より、破骨細胞やミクログリアでは生理的な細胞内 pH で H<sup>+</sup>チャネルの約 40% は細胞内プールに存在し、刺激にตอบสนองして細胞膜に移動する事が推測された。予備プールの存在と膜動態 (Exocytosis/endocytosis) を介するリクルートは H<sup>+</sup>チャネル活性の新しい調節メカニズムである。

#### 貪食過程における V-ATPase と H<sup>+</sup>チャネルの役割 :

zymosan 粒子を投与すると膜電流が減少したが、主要イオンを NMDG-aspartate で置換した H<sup>+</sup>電流測定用の溶液では貪食が起らなかった。そこで、Ringer 液中の intact 細胞での実験を先行させ、pH 感受性の FITC でラベルした zymosan を破骨細胞に取り込ませて食胞 (phagosome) の pH 変動を共焦点顕微鏡下で経時的に検出した。食胞 pH は徐々に低下し (pH < 5.6) bafilomycin A<sub>1</sub> でブロックされたため、食胞酸性化に V-ATPase が寄与することを確認した。更に観察を続けると食胞 pH の急激な一過性上昇 (pH spike と命名) が生じ、食胞膜の H<sup>+</sup>濃度勾配を解消する機構の存在が示唆された。私達は食胞膜と破骨細胞膜の H<sup>+</sup> flux 機構には共通性が高いと推測している。そこで、現在、破骨細胞膜を pH < 5.6 に暴露した際に活性化される H<sup>+</sup>電流と pH spike を担う食胞膜 H<sup>+</sup> flux 機構との関連を調べている。H<sup>+</sup>電流と pH の関連を解明するためには、H<sup>+</sup>チャネル逆転電位による細胞膜近傍 pH、細胞内 pH および食胞 pH の同時測定が有力な手段となる。H<sup>+</sup>電流と蛍光プローブの同時測定を可能にする Photometry system を設置し、ピペット内に水溶性の pH 感受性色素 (SNARF) を加えた場合の pH 測定系をほぼ完成した。しかし、安定して測定できる細胞の大きさ、適切なピペット内液組成などは予備実験中である。更に蛍光マーカー (FITC) をつけた zymosan 貪食胞の pH の測定系も構築する予定である。これらのシステムを完成し細胞内 pH 動態解析の新規手法として確立することを目指している。

#### 破骨細胞の極性を再現できる骨代替基質と

#### 検証法の開発 :

培養破骨細胞を機能解析に用いる場合、念頭に置かなければならないのは生体内で見られる細胞極性が再現されているとは限らないという点である。plastic のカバーガラスに培養すると極性が生じることは報告されているが、前述した V-ATPase と H<sup>+</sup>チャネルの干渉は glass でも plastic でも有意な差は見られなかった。骨切片や Hydroxyapatite ペレットでは光透過性が低くクランプ下の細胞を視認できないため、今回の目的には合致しない。私達は、基質密度の低さを除けば、現在のところ魚鱗がもっとも有望な骨代替基質であると考えている。金魚あるいは鮭魚鱗上に破骨細胞を分化させ、V-ATPase および H<sup>+</sup>チャネル電流記録に成功した。魚鱗上に分化させた破骨細胞では V-ATPase と H<sup>+</sup>チャネルの干渉はガラス面に分化させた場合に比較し少なかった。各分子の抗体を用いて免疫細胞染色を行ったが、両分子の分布に顕著な局在は見られなかった。最適な染色条件に至っていない可能性も否定できないため、明確な結論には至っていないが、より微小環境での干渉機構が存在する可能性も示唆される。単に分子局在の物理的距離だけでなく、何らかの微視的環境が重要なのではないだろうか。私達はこれを V-ATPase と H<sup>+</sup>チャネルの「機能的距離」と捉え、その実態および干渉の促進・抑止機構を解明したいと考えている。

#### H<sup>+</sup>チャネルの特性を利用した H<sup>+</sup>モニタリングツール :

NH<sub>4</sub>Cl と同様に weak base である局所麻酔剤 (リドカイン、プリピカイン) を投与すると H<sup>+</sup>チャネル電流が可逆的に減少した。リドカイン、プリピカインは臨床的に重要な局所麻酔剤であり、投与時には細胞内外に分配されることが知られているが、細胞内に導入された薬剤の動態の定量的判定は難しかった。今回 H<sup>+</sup>チャネルの逆転電位から測定した細胞内 pH によって、細胞内での薬剤の濃度、除去過程の時間経過や lipid 製剤による除去促進効果も正確に判定できることが実証できた。細胞膜直下の pH を正確にリアルタイムで測定できるという H<sup>+</sup>チャネルの特性は、H<sup>+</sup>モニタリングツールとして非常に有用であることが示された。

#### 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)

Sakai H, Li G, Hino Y, Moriura Y, Kawawaki J, Sawada M and Kuno M (2013). Increases in intracellular pH facilitate endocytosis and decrease availability of voltage-gated proton channels in osteoclasts and microglia. *J. Physiol. (Lond)* 591.23: 5851-5866. 査読有.  
DOI: 10.1113/jphysiol.2013.263558

Hori K, Matsuura T, Mori T, Kuno M, Sawada M and Nishikawa K. (2013) The effect of lipid emulsion on intracellular bupivacaine as a mechanism of lipid resuscitation: An electrophysiological study using voltage-gated proton channels. *Anesthesia & Analgesia* 117(6):1293-1301. 査読有.  
DOI: 10.1213/ANE0000000000000011

Hasaka M, Mori T, Matsuura T, Narahashi T, Kuno M, Asada A and Nishikawa K (2012). Effects of general anesthetics on P2X<sub>4</sub> receptors in a mouse microglial cell line. *Neuroreport* 23(10):601-605. 査読有.  
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835509db

Matsuura T, Mori T, Hasaka M, Kuno M, Kawawaki J, Nishikawa K, Narahashi T, Narahashi T, Sawada M and Asada A. (2012). Inhibition of voltage-gated proton channels by local anaesthetics in GMI-R1 rat microglia. *J. Physiol. (Lond)*: **590.4**: 827-843. 査読有.  
DOI: 10.1113/jphysiol.2011.218149

久野みゆき. キーワード解説：プロトンポンプとプロトンチャンネル. 日本薬理学雑誌 138, 219-220, 2011. 金芳堂. 査読無.

酒井啓、森浦芳枝、納富拓也、川脇順子、大西景子、久野みゆき. 破骨細胞の初期 Ca-sensing 応答のシグナリング機構. 日本生理学雑誌 (表紙) 73 (1)、2011. 査読無.

[学会発表](計 21 件)

久野みゆき、李光師、日野佳子、森浦芳枝、川脇順子、酒井啓. 細胞内 pH 上昇によるエンドサイトーシスの促進と電位依存性プロトンチャンネルの内包化機構. 第 91 回日本生理学学会大会. 2014 年 3 月 16-18 日, 鹿児島.

Notomi T, Kuno M, Ezura Y, Noda M, Depolarizing Membrane Potential by PTH and VD3 Regulates RANKL-intracellular Transportation; A Novel Mechanism of PTH- and VD3-induced osteoclastogenesis, 第 35 回米国骨代謝学会. 2013 年 10 月 4-7 日, ボルチモア (米国).

久野みゆき、李光師、日野佳子、森浦芳枝、川脇順子、酒井啓. 細胞内 pH によるエンドサイトーシスとプロトンチャンネルの制御について. 平成 25 年度生理学研究所研究会. 2013 年 9 月 26-27 日, 岡崎.

久野みゆき、海住太郎. 酸性環境に暴露される細胞膜および lysosome 膜のプロトン flux 機構. 平成 25 年度生理学研究所研究会. 2013 年 9 月 5 6 日, 岡崎.

Hori K, Matsuura T, Hasaka M, Mori T, Kuno M, Nishikawa K. The recovery speed of lipid emulsion therapy largely depends on “lipid sink”: An electrophysiological study using voltage-gated proton channels. *Euroanesthesia* 2013 (ヨーロッパ麻酔学会). 2013 年 6 月 1-4 日, バルセロナ (スペイン).

堀耕太郎、松浦正、羽坂めぐみ、森隆、久野みゆき、西川精宣. Lipid rescue における “lipid sink” の効果発現時間について 電位依存性プロトンチャンネルによる検討 第 60 回日本麻酔科学会. 2013 年 5 月 23-25 日, 札幌.

Kuno M and Sakai H. Intracellular pH levels regulate the amount of available voltage-gated proton channels in the plasma membrane of murine osteoclasts. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (IBMS-JSBMR). 2013 年 5 月 2-6 日, 神戸.

久野みゆき、酒井啓、日野佳子、清水有希子、川脇順子. 電位依存性プロトンチャンネル pool size の細胞内 pH 依存性調節機構. 第 90 回日本生理学学会大会. 2013 年 3 月 27-29 日, 東京.

Liu S, Watanabe S, Shudou M, Kuno M, Maeyama K. Enhancement of CRACM1 expression in functionally aberrant Naive CD4<sup>+</sup> T cells in active rheumatoid arthritis. ACR/ARHP Annual Meeting. 2012 年 11 月 9-14 日, Washington (米国).

久野みゆき、酒井啓、日野佳子、清水有希子、川脇順子. 電位依存性プロトンチャンネル: active channel pool size の調節機構. 平成 24 年度生理研研究会. 2012 年 10 月 1-2 日, 岡崎.

松浦正、森隆、堀耕太郎、久野みゆき、澤田誠、西川精宣. リドカイン、プピバカインによるミクログリアのプロトンチャンネル抑制作用. 第 35 回日本神経科学大会. 2012 年 9 月 18 日, 名古屋.

堀耕太郎、松浦正、羽坂めぐみ、森隆、久野みゆき、西川精宣. 電位依存性プロトンチャンネルによる lipid rescue メカニズムの検討. 第 59 回日本麻酔科学会. 2012 年 6 月 7-9 日, 神戸. 優秀演題受賞.

久野みゆき、酒井啓、森浦芳枝、川脇順子、橋本志野. 破骨細胞膜における液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) とプロトンリークによる起電性の解析. 第 89 回日本生理学学会大会. 2012 年 3 月 29-31 日, 松本.

海住太郎、久野みゆき. Zymosan を投与した RAW264 細胞におけるファゴゾームの pH 変動. 第 89 回日本生理学会大会. 2012 年 3 月 29-31 日, 松本. ポスターアワード受賞

Sakai H, Moriura Y, Kawawaki J and Kuno M. Electrogenicity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases at the plasma membrane of osteoclasts. 第 56 回米国生物物理学会. 2012 年 2 月 25 - 29 日. サンディエゴ (米国).

Hori K, Matsuura T, Hasaka M, Mori T, Kuno M, Nishikawa K. "Lipid sink" mechanism of lipid rescue evidenced by voltage-gated proton channels. SCCM's 41st Critical Care Congress. 2012年2月4-8日. ヒューストン (米国).

久野みゆき, 酒井啓, 森浦芳枝, 川脇順子, 日野佳子. 酸性環境下における破骨細胞応答のメカニズム. 平成 23 年度生理学研究所研究会. 2011 年 9 月 29 - 30 日, 岡崎.

Notomi T, Kuno M, Ezura Y and Noda M. Establishment of opto-functional control system that control intracellular RANKL transport/secretion in osteoblast to enhance osteoclastogenesis based on photo-energy control for bone remodeling. 第 33 回米国骨代謝学会. 2011 年 9 月 16-20 日, サンディエゴ (米国).

久野みゆき, 森浦芳枝, 川脇順子, 日野佳子, 酒井啓. プロトンポンプとプロトンチャネル: proton flux による起電力と pH 変動. 平成 23 年度生理学研究所研究会. 2011 年 9 月 8 - 9 日, 岡崎.

納富拓也, 久野みゆき, 江面陽一, 野田秀樹. 光エネルギー変換による任意の時間・空間での RANKL 分泌制御法の確立. 膜電位変動による RANKL 分泌機構. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪.

<sup>21</sup> 酒井啓, 久野みゆき. 破骨細胞膜に共存する空胞型 H<sup>+</sup>-ATPase と電位依存性プロトンチャネルの pH および電位依存性応答. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪.

〔図書〕(計 1 件)

久野みゆき (分担執筆). 日本医事新報社, 「人体の正常構造と機能 (改訂第 2 版) - 神経系 2」2012. p680-687, 700-705, 738-739 (総ページ数 879).

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/molcelphysiol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

なし.

### (4) 研究協力者

海住太郎 (学部学生)  
李光帥 (大学院学生)  
川脇順子 (共同研究室職員)  
日野佳子 (研究補佐員)  
森浦芳枝 (研究補佐員)  
清水有希子 (研究補佐員)