

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440068

研究課題名(和文) シグナル伝達における酸性オルガネラの生理機能及びその分子機構の解析

研究課題名(英文) The function of acidic organelles in signal transduction

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内栄養状態を感知し、細胞の増殖や代謝、生存における調節因子mTOR複合体の活性化にV-ATPaseが関与している。mTORのシグナル伝達経路は細胞分化・増殖に直接関わっており、ガンの発生や浸潤、組織の再生のキーファクターである。本研究は、まず、浸潤性がん細胞の株化細胞やがん患者組織を用い、V-ATPaseの各サブユニットのがん細胞での発現量、局在を明らかにした。さらに、骨転移能の高いがん細胞において、酸性微環境形成の関与するV-ATPaseのサブユニット・イソフォームの同定し、分泌性リソソームと骨転移や骨痛との関連を明らかにした。これらの研究成果は、癌治療薬探索の切り口になると考えている。

研究成果の概要(英文)： The vacuolar-type proton ATPases (V-ATPases) are a family of ATP-driven proton pumps that acidify intracellular compartments and transport protons across the plasma membrane. We have shown that the $\alpha 3$ subunit of V-ATPase was involved in human breast cancer invasion.

We have also shown that we show that proton released via V-ATPase by bone-resorbing OCLs and JN3 MM cells create an acidic bone microenvironment that excites sensory neurons innervating bone via activation of ASIC3 to induce multiple myeloma bone pain. Further, blocking the generation of the acidic bone microenvironment and the activation of ASIC3 on sensory neurons significantly reduced multiple myeloma bone pain and could be a mechanism-based therapeutic approach for multiple myeloma bone pain.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：V-ATPase Cancer

1. 研究開始当初の背景

後期エンドソーム・リソソーム系オルガネラ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 の生理機能に関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, 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)。また、V-ATPase のサブユニット $\alpha 2$ 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出し、膜小胞の形成に関与することを示した (*Nat Cell Biol.*, 2006)。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・ポンプとしての機能以外に、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.* の *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(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 (*Circ Res.*, 2010)。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 (*J. Clin. Invest.* 2013)。これらの研究成果が、シグナル伝達における酸性オルガネラ

の生理機能と分子機構を解明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

細胞内栄養状態を感知し、細胞の増殖や代謝、生存における調節因子 mTOR 複合体の活性化に V-ATPase が関与することが報告されている。しかしながら、詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究は、mTOR シグナル伝達における酸性オルガネラの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. リソソームの酸性化と mTOR 経路の活性化制御

リソソームは細胞内の栄養状態(アミノ酸など)を感知する場として重要である。mTORC1 複合体は細胞内のアミノ酸濃度を感知して、細胞成長・代謝・タンパク質合成などの様々な細胞機能を制御する重要なシグナル因子であるが、その活性化はリソソーム膜上で起こる。mTORC1 複合体は低栄養条件下では不活性型として細胞質に存在するが、細胞内のアミノ酸濃度が上昇すると、リソソーム膜上の活性型 Rag 複合体 (GTP 型 RagA/B、GDP 型 RagC/D) と結合することでリソソームへ移行し、活性化される。研究代表者らは、これまで、ATP6ap2 が、V-ATPase 酵素のアセンブリーに必須であることを明らかにした。ATP6ap2 が欠損すると、V-ATPase の膜内在性ドメインの構成サブユニットが特異的に分解し、mTORC1 が不活性化され、オートファジーが誘導されることを見出した。この結果を出発点に、まず『V-ATPase のプロトン・ポンプ活性が mTORC1 の活性化に必須か?』を明らかにする。具体的には、V-ATPase の特異的な阻害剤である Bafilomycin や Concanamycin、イオノフォア FCCP で細胞内オルガネラ酸性化を阻害し、mTORC1 の活性を検証すると同時に、リソソーム膜に特異的に局在する V-ATPase の $\alpha 3$ サブユニット欠損細胞を用いて、V-ATPase のリソソームへの局在を特異的に阻害した場合、mTOR 経路の活性化がどのように変化するかを明らかにする。さらに、V-ATPase の回転触媒反応機構と mTORC1 の活性化との関連を解明する。

2. mTOR 経路シグナルの場としてのリソソーム

△の役割

mTOR シグナル系に關与する分子の多くはリソソーム膜上に局在する。細胞内のアミノ酸濃度を感知するセンサータンパク質の他に、多くの成長制御因子も TSC 複合体や Rheb を介して mTORC1 複合体をリソソームへ移行させることによって、mTOR シグナル経路を調節している。したがって、リソソーム自体が積極的に細胞機能を制御している可能性も示唆されている。そこで、本研究提案は、リソソーム欠損細胞を構築し、『リソソームの形態形成が mTOR 経路の活性化に必須であるか?』を明らかにする。これまで、研究代表者らは、ほ乳類細胞において、リソソームの生合成に必須な分子 mVam2 を欠損させると、リソソームが形成できないことを見出している。mVam2 などの欠損細胞を用いて、mTOR シグナル経路の場としてのリソソームの役割を明らかにしたい。

3 .mTOR のシグナル経路の個体レベルでの機能解析

ほ乳類の初期発生では、細胞の分化と形態形成が小さな胚の中で短時間の間に高度に秩序だって進行する。さらに、着床直後の胚は、胎盤が形成できておらず、その時期の栄養供給が後期エンドソーム・リソソーム系酸性オルガネラによる栄養物質の取込と分解に依存していると考えられているが、詳細なメカニズムはまだ明らかではない。『mTOR のシグナル経路が初期胚の各胚葉細胞でどのように活性化され、伝達されるか?』を明らかにする。

4 . 研究成果

mTOR のシグナル伝達経路は細胞分化・増殖に直接関わっており、ガンの発生や浸潤、組織の再生のキーファクターである。研究代表者らは、まず、浸潤性がん細胞の株化細胞やがん患者組織を用い、V-ATPase の各サブユニットのがん細胞での発現量、局在を明らかにした (*Oncotarget*. 2016)。さらに、骨転移能の高いがん細胞において、酸性微環境形成の關与する V-ATPase のサブユニット・イソフォームの同定し、分泌性リソソームと骨転移や骨痛との關連を明らかにした (*Cancer Res.*, 2016)。

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 10 件)

1. Targeting the vacuolar proton pump and acid-sensing ion channel 3 decreases multiple myeloma-induced bone pain. Hiasa M, Okui T, Allette YM, Ripsch MS, Sun-Wada G-H, Yoneda T. *Cancer Res.* (査読有) 77(6):1283-1295 (2017)
2. The $\alpha 3$ isoform of subunit a of the vacuolar ATPase localizes to the plasma membrane of invasive breast tumor cells and is overexpressed in human breast cancer. Cotter K, Liberman R, Sun-Wada G-H, Wada Y, Sgroi D, Naber S, Brown D, Breton S, Forgac M. *Oncotarget*. (査読有) 7(29):46142-46157 (2016)
3. Membrane dynamics in mammalian embryogenesis: Implication in signal regulation. Wada Y, Sun-Wada GH, Kawamura N, Yasukawa J. *Birth Defects Res C Embryo Today*. (査読有) 108:33-44 (2016)
4. マウス脳における液胞型プロトンポンプ V-ATPase G1 サブユニット遺伝子の発現量は転写後調節によって制御される。川村暢幸、茸谷麻帆、和田戈虹 同志社女子大学総合文化研究所紀要 33:209-215 (2016)
5. Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase leads to G1 subunit upregulation in the brain. Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. *Scientific Report*. (査読有) 10; 5:14027. doi: 10.1038/srep14027 (2015).
6. Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. Sun-Wada GH, Wada Y. *Biochim Biophys Acta*. (査読有) 1847:1166-72 (2015)
7. マウス初期胚発生において栄養供給・分化シグナルを制御するミクロオートファジーの機能。川村暢幸、和田戈虹、和田洋 *生化学* (review) 86 : 778-782 (2014)
8. Role of autophagy in embryogenesis. Wada Y, Sun-Wada GH, Kawamura N, Aoyama M. *Curr Opin Genet Dev*. (査読有) 27:60-66 (2014).
9. Significant roles of the (pro)renin receptor in integrity of vascular smooth muscle cells. Kurauchi-Mito A, Ichihara A,

Bokuda K, Sakoda M, Kinouchi K, Yaguchi T, Yamada T, Sun-Wada GH, Wada Y, Itoh H. *Hypertens Res.* (査読有) 37:830-835 (2014)

10. Diversity of proton pumps in osteoclasts: V-ATPase with a3 and d2 isoforms is a major form in osteoclasts. Matsumoto N, Daido S, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M, Nakanishi-Matsui M. *Biochim Biophys Acta.* (査読有) 1837:744-749 (2014)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) 遺伝子欠損変異マウスの解析。 島田侑実、樋渡舞、安川淳一郎、川村暢幸、和田洋、和田戈虹 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪薬科大学(高槻市) 2016/10
2. 小腸吸収上皮細胞における Rab7 遺伝子の機能。 瀧本亜耶、安川淳一郎、川村暢幸、和田洋、和田戈虹 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪薬科大学(高槻市) 2016/10
3. Neurons without G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase: A better source for enzyme structure and Functional studies Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. 3rd NovAliX Conference: Biophysics in Drug Discovery Strasbourg, France 2016/06/10
4. 液胞型 H⁺-ATPase c サブユニット遺伝子欠損変異マウスの解析。 中根美穂、安川淳一郎、川村暢幸、和田洋、和田戈虹 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪大谷大学(大阪、富田林市) 2015/10
5. 液胞型 H⁺-ATPase G2 サブユニット遺伝子欠損変異マウスの解析。 茸谷麻帆、安川淳一郎、川村暢幸、和田洋、和田戈虹 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪大谷大学(大阪、富田林市) 2015/10
6. Embryonic defect in *Atp6v0c* mutant mice lacking the vacuolar-type H⁺-ATPase c subunit. Sun-Wada GH, Wada Y. Keystone Symposia

on Molecular and Cellular Biology, Endoderm Lineages in Development and Disease (B2) (Keystone, Colorado USA) 2015/02

7. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Endoderm Lineages in Development and Disease (B2)

Microautophagy, a unique membrane dynamics, in rodent visceral endoderm is involved in the regulation of canonical Wnt pathway and morphogenesis. Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. Keystone, Colorado USA 2015/02

8. Upregulation of Vacuolar-type ATPase G1 Subunit by a Genetic Loss of Subunit G2 in Neuron. Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. 2014 年 10 月 The 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB Conference Biochemistry and Molecular Biology in Transition:from Basic to Translational The Academia Sinica · Taipei, Taiwan 2014/10 23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchers.html/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

(2)研究分担者

川村暢幸 (Nobuyuki Kawamura)
同志社女子大学・薬学部・特任助教
研究者番号: 30411086