

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590086

研究課題名(和文)細胞内イオン環境と小胞輸送におけるV-ATPaseの機能

研究課題名(英文)Role of V-ATPase in cellular ion environment and vesicle trafficking

研究代表者

中西 真弓(Nakanishi, Mayumi)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20270506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞への分化に伴い、リソソームが形質膜に向かって移動、融合することで、骨吸収に必要な酵素が分泌される。我々は、リソソームに局在するV-ATPase(液胞型プロトンポンプ)を構成する $\alpha 3$ イソフォームが、微小管に沿った小胞輸送を制御するGTP結合タンパク質と特異的に結合することを見出した。 $\alpha 3$ は活性型(GTP型)より不活性型(GDP型)の因子と強く結合した。また、リソソームの移動には、この因子が活性型であることが必要であった。 $\alpha 3$ 遺伝子欠損マウスの破骨細胞では、この因子はリソソームに局在しなかった。 $\alpha 3$ は、不活性型の小胞輸送調節因子をリソソームにリクルートしていると考えられる。

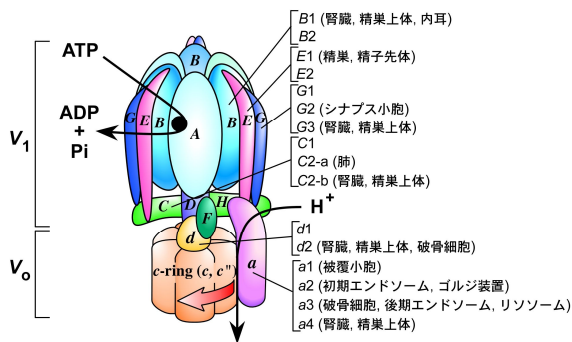
研究成果の概要(英文)：During differentiation into osteoclasts, lysosome moves to and fuses with plasmamembrane to secrete lysosomal enzymes necessary for bone resorption. We found that $\alpha 3$ isoform of V-ATPase on lysosomal membrane binds specifically to a GTP-binding protein that regulates vesicle trafficking along microtubules. The $\alpha 3$ showed stronger binding to inactive form of the factor than to active form. However, the factor should be active form to transfer lysosome to plasmamembrane. Furthermore, the factor was not located on lysosome in osteoclasts from $\alpha 3$ gene knockout mice. These results indicate that $\alpha 3$ recruits inactive form of the vesicle trafficking factor into lysosomal membrane.

研究分野：生化学、細胞生物学、生物物理学

キーワード：プロトンポンプ 酸性環境 破骨細胞 小胞輸送 一分子観察 ナノモーター 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

- (1) 細胞内外のイオン環境を適切に保つことは、多くの生命現象において不可欠である。プロトンポンプである V-ATPase は、オルガネラ内の pH を調節することでイオン環境の形成に寄与している。このポンプは、局在する形質膜やオルガネラによって構造が少しずつ異なっており、こうした構造的多様性が、多様な酸性環境を形成していると考えられるが、その機構はほとんど解明されていない。
- (2) マウス V-ATPase の 13 種のサブユニットのうち、C、E、G、a、d サブユニットに、細胞あるいはオルガネラに特異的なイソフォームが存在している(下図)。こうした知見から、申請者は、イソフォームの組み合わせによって、回転速度やトルクなどモーターとしての性質が異なる V-ATPase が、特定のオルガネラに輸送されることで、多様な酸性環境が形成されるという仮説を提唱している。



- (3) V-ATPase は、V₁ の ATP 分解活性と V₀ (膜内在性ドメイン) のプロトン輸送活性を、サブユニットの相対的な回転(DFdc サブユニットの ABCEGHa サブユニットに対する回転)によって共役しているナノモーターである。申請者らは、V-ATPase のサブユニット回転を酵素一分子で観察する実験系を確立した。
- (4) また、申請者らは、E サブユニットをマウスのイソフォーム(E1, E2)で置換した酵母 V-ATPase を用いて、イソフォームによって V₀ と V₁ の会合状態が異なることを示した。V₀ と V₁ の解離や会合による活性の制御が考えられる。
- (5) V-ATPase とオルガネラ内の pH は、小胞輸送の調節にも関係している。近位尿

細管上皮細胞の初期エンドソームに局在している V-ATPase の a2 および c サブユニットは、それぞれ低分子 GTPase やその調節因子と pH 依存に結合して、エンドサイトーシスを調節している。こうした知見から、a サブユニットの複数のイソフォームが、各オルガネラの輸送を制御すると考えている。

- (6) 破骨細胞では、分化に伴い a3 イソフォームを持つリソソームが形質膜へ移動し、リソソーム酵素を分泌する。同時に、a3 を含む V-ATPase が形質膜へ輸送される。a3 の遺伝子を欠失したマウスは、破骨細胞の機能不全を伴う大理石病やインスリン分泌異常を発症する。また、このマウスでは、破骨細胞への分化に伴うリソソームの形質膜への移動は観察されなかった。こうした知見から、a3 が、リソソームの輸送を制御すると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、V-ATPase の構造の違いによるポンプとしての性質の差異と、各 V-ATPase を特定の場所に輸送する機構を解析することにより、多様なイオン環境を形成する基本原理を解明することを目的としている。さらに、構造的に多様な V-ATPase が、オルガネラの輸送に関わると考え、その機構を実証する。こうした研究により、骨吸収やホルモン分泌など小胞輸送が重要である生命現象、および、関連する疾患を分子レベルで理解することを目指している。以下に具体的に述べる。

(1) 酸性環境形成機構の解明

イソフォーム構成の違いによる V-ATPase のモーターとしての性質の差異を明らかにする。
オルガネラ、あるいは、細胞特異的な V-ATPase の輸送機構を解明する。
V₀ と V₁ の会合状態の変化による活性調節機構を解明する。

(2) 小胞輸送における V-ATPase の機能の解明

破骨細胞への分化に伴い、リソソームが、形質膜に向かって移動する分子機構を解明する。
インスリン分泌や、がん細胞の細胞外酸性化など、V-ATPase の関与が示唆されている小胞輸送に注目し、分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、2つの方向性をもって進める。

(1) 酸性環境形成機構の解明

V-ATPaseのサブユニット回転を酵素一分子で観察する実験系を用い、イソフォームの組合せによるモーターとしての性質の違いを明らかにする。

破骨細胞に特異的なV-ATPaseに注目し、生化学的、細胞生物学的な手法により、形質膜に輸送される分子機構を解析する。

酵母のV-ATPaseを用いて、 V_0 と V_1 の会合状態を簡便に観察する実験系を確立した。この系を用いて、 V_0 と V_1 の会合状態に影響を及ぼす要因を同定する。さらに、 V_0 と V_1 の会合状態の調節に関わる領域を明らかにする。

(2) 小胞輸送におけるV-ATPaseの機能の解明

免疫沈降や局在の解析により、各V-ATPaseと相互作用する小胞輸送の調節因子を同定する。

破骨細胞からのリソソーム酵素の分泌、及び、膵臓細胞からのインスリンの分泌におけるV-ATPaseの役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酸性環境形成機構の解明

酵母V-ATPaseのサブユニット回転の一分子観察

これまでの研究から、cリングとDFdサブユニットが一体となって、他のサブユニットに対して相対的に回転していることが示されている。我々は、酵母V-ATPaseの回転を観察する実験系を構築した。cリングにヒスチジンタグを導入してガラス面に固定し、cリングに対して相対的に回転するGサブユニットにプローブとして直径100nmの金ビーズを導入した。暗視野レーザー顕微鏡と超高速カメラにより、ATP添加時のビーズの動きを観察した。

この実験系を用いて、本課題では、回転時に生じるトルクの大きさや回転速度を測定した。しかし、イソフォームの違いによる僅かな回転の違いを解析するには、空間解像度の改善が必要であった。酵素の調製方法などの実験条件を検討した結果、サンプルに含まれる界面活性剤が回転観察に影響することがわかった。そこで、適した界面活性剤の種類と濃度を決定し、酵素は精製することとした。引き続き、プローブを導入するサブユニ

ットやプローブの大きさを検討し、空間解像度の改善を図る。

破骨細胞に特異的なV-ATPaseの形質膜への輸送

これまでに、破骨細胞への分化に伴いa3とd2イソフォームの発現が誘導され、破骨細胞に特異的なV-ATPaseが形成されることを示した。この酵素が局在するリソソームは、分化に伴い形質膜に向かって移動・融合することで、V-ATPaseを形質膜へ輸送する。さらに、a3遺伝子欠損マウスを用いて、V-ATPaseの形質膜への輸送には、a3が必須であることも示していた。

本課題において、我々は、a3遺伝子欠損マウスのマクロファージから誘導した破骨細胞では、アクチンの局在は正常であるが、チュプリンの形質膜近傍の局在が消失することを見出した。また、野生型の破骨細胞では、分化に伴いアセチル化されたチュプリンの割合が増加するが、a3遺伝子欠損マウスでは、こうした増加が見られないことを明らかにした。a3は、チュプリンのアセチル化を介して、破骨細胞に特徴的な形質膜近傍の微小管の形成を介して、リソソームの輸送に関与していると考えられる。

V_0 と V_1 の会合状態の変化による活性調節

酵母においてV-ATPaseは、グルコースが培地中に存在しないと V_0 と V_1 が解離し、活性が低下することが知られている。我々は、これまでに、酵母のEサブユニットをマウスのものに置換したキメラV-ATPaseの解析により、グルコースによる会合状態の変化に、Eサブユニットが関与することを示した。さらに変異を導入した酵素を用いて、会合状態の調節に重要なEサブユニットのアミノ酸を同定した。

本研究課題では、温度によっても会合状態が変化することを見出した。また、温度による調節において重要な領域を限定し、グルコースによる調節に重要なアミノ酸とは異なることを明らかにした。

今後は、会合状態が回転に及ぼす影響を、一分子観察系を用いて詳細に解析し、多様な構造によりオルガネラ独自の酸性環境が形成される機構の解明に迫る。

(2) 小胞輸送におけるV-ATPaseの機能の解明

破骨細胞への分化に伴い、リソソームが形質膜へ向かって移動する現象に注目した。こ

れまでに、リソソームの移動には V-ATPase の a3 イソフォームが必須であることを示した。

本課題において、まず、a3 欠損マウスの破骨細胞でリソソームが移動できない原因が、確かに a3 遺伝子の欠損であることを確認した。a3 欠損マウスの脾臓から回収したマクロファージに a3 遺伝子を導入して分化を誘導したところ、リソソームが形質膜へ移動し、骨吸収活性のある破骨細胞が形成された。この実験系を用いて、大理石病患者から同定された変異 a3 の機能解析が可能となった。骨代謝異常症の発症機構の解明へと発展する成果である。

V-ATPase の阻害剤であるバフィロマイシン A1 を用いて、リソソームの移動には、V-ATPase が形成する酸性環境が必要であることを示唆した。また、a3 に FLAG タグを導入した免疫沈降法により、a3 と相互作用する小胞輸送の調節因子を探索した。その結果、微小管上の輸送を制御する GTP 結合タンパク質である Rab7 と結合することを見出した。しかし、バフィロマイシン存在下でも結合が検出されたことから、a3 と Rab7 の結合には酸性環境は影響しないと考えている。

a3 と Rab7 の結合を詳細に解析した結果、a3 は活性型 (GTP 型) よりも不活性型 (GDP 型) の Rab7 とより強く結合すること、Rab7 は a3 イソフォームに特異的に結合する (a1, a2 イソフォームとは殆ど結合しない) ことを明らかにした。さらに、a3 欠損マウスのマクロファージから分化誘導した破骨細胞では、Rab7 がリソソームに局在しないことを示した。また、野生型の破骨細胞に活性型、あるいは不活性型の Rab7 を強制発現したところ、リソソームの形質膜への輸送には、Rab7 が活性型であることが必要であることがわかった。

以上の結果は、破骨細胞への分化の過程で、a3 が不活性型の Rab7 をリソソームへリクルートしていることを示唆している。その後、Rab7 は活性化されてエフェクターと結合し、リソソームが微小管上を形質膜へ向かって輸送されると考えられる。我々は、V-ATPase が関与する小胞輸送の分子機構の一端を解明したと考えている。現在は、全容の解明に向けて、リソソームにおける Rab7 の活性化機構に注目して研究を進めている。

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 16 件)

Y. Sahara, S. Horie, H. Fukami, N. Goto-Matsumoto, M. Nakanishi-Matsui, Functional roles of V-ATPase in the salivary gland, *J. Oral. Biosci.*, **57** (2014) 102-109.

doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.11.002

N. Matsumoto, S. Daido, M. Futai, G.-H. Sun-Wada, Y. Wada, and M. Nakanishi-Matsui, V-ATPase with a3 and a2 isoforms is a major form in osteoclasts: diversity of V-ATPase in osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1837** (2014) 744-749.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.021.

Y. Sasaki, E. Nogami, M. Maeda, M. Nakanishi-Matsui, and A. Iwamoto-Kihara, A unique F-type H⁺-ATPase from *Streptococcus mutans*: an active H⁺ pump at acidic pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443** (2014) 677-682.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.025.

H. Oka, H. Hosokawa, M. Nakanishi-Matsui, S. D. Dunn, M. Futai, and A. Iwamoto-Kihara, Elastic rotation of *Escherichia coli* F₀F₁ having ε subunit fused with cytochrome b₅₆₂ or flavodoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446** (2014) 889-893.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.021.

Y. Motohashi, A. Ohashi-Kobayashi, M. Nakanishi-Matsui, Y. Fujimoto, and M. Maeda, Intracellular localization of ABC transporter TAPL differs between transient and stable expression. *Cellbio* **3** (2014) 50-59.

doi: 10.4236/CELLBIO.2014.32006.

M. Sekiya, E. Chiba, M. Satoh, H. Yamakoshi, Y. Iwabuchi, M. Futai, and M. Nakanishi-Matsui, Strong inhibitory effects of curcumin and its demethoxy analog on *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector. *Int. J. Biol. Macromol.* **70** (2014) 241-245.

doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.055.

M. Sekiya, H. Hisasaka, M. Futai, and M. Nakanishi-Matsui, Curcumin inhibited F₁-ATPase through a mechanism distinct from other polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452** (2014) 940-944.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.027.

M. Nakanishi-Matsui (corresponding author), M. Sekiya, S. Yano, and M. Futai, Inhibition of F₁ ATPase rotational catalysis by the carboxyl terminal domain of the subunit. *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 30822-30831.

doi: 10.1074/jbc.M114.578872.
K. Takada, K. Obayashi, K. Ohashi, A. Kobayashi-Ohashi, M. Nakanishi-Matsui, and M. Maeda, Amino-terminal extension of 146 residues of L-type GATA-6 is required for transcriptional activation but not for self-association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452** 962-966 (2014)
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.019.
K. Obayashi, K. Takada, K. Ohashi, A. Ohashi-Kobayashi, M. Nakanishi-Matsui, M. Araki, and M. Maeda, Increased electrophoretic mobility of long-type GATA-6 transcription factor upon substitution of its PEST sequence, *Adv. Biosci. Biotechnol.* **5** 1032-1042 (2014)
doi: 10.4236/abb.2014.513118
M. Nakanishi-Matsui (corresponding author), S. Yano, and M. Futai, Lipopolysaccharide-induced multinuclear cells: increased internalization of polystyrene beads and possible signals for cell fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440** (2013) 611-616.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.109.
H. Okamoto-Terry, K. Umeki, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai, Glu44 in the amino-terminal α -helix of yeast V-ATPase E subunit (Vma4p) has a role for V_0V_1 assembly. *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 36236-36243.
doi: 10.1074/jbc.M113.506741.
M. Nakanishi-Matsui (corresponding author), M. Sekiya, and M. Futai, Rotating proton pumping ATPases: Subunit/subunit interactions and thermodynamics. *IUBMB-Life* **65** (2013) 247-254.
doi: 10.1002/iub.1134.
M. Nakanishi-Matsui (corresponding author), S. Yano, N. Matsumoto, and M. Futai, Lipopolysaccharide induces multinuclear cell from RAW264.7 line with increased phagocytosis activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425** (2012) 144-149.
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.050.
M. Sekiya, R. K. Nakamoto, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai, Binding of phytopolyphenol piceatannol disrupts β/γ subunit interactions and rate-limiting step of steady state rotational catalysis in *Escherichia coli* F_1F_0 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 22771-22780.
doi: 10.1074/jbc.M112.374868.
T. Bilyard, M. Nakanishi-Matsui, C. S. Bradley, P. Teuta, H. Hosokawa, M. Futai, and R. M. Berry, High-resolution single

molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F_1F_0 -ATPase. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **368** (2012) 20120023.

doi: 10.1098/rstb.2012.0023.

中西が第一著者と同等の寄与がある(論文の脚注に明示)

[学会発表](計17件)

高橋歩実、關谷瑞樹、小田原大樹、下山祐、木村重信、中西(松井)真弓、プロトン輸送ATPaseを標的とする抗歯周病菌薬の探索、日本薬学会第135回年会(神戸)(2015)

關谷瑞樹、中山華緒里、中西(松井)真弓、ATP合成酵素の回転触媒機構における α - β 相互作用の役割、日本薬学会第135回年会(神戸)(2015)

松元奈緒美、岡本晴子、遠山稿二郎、孫和田戈虹、和田洋、中西(松井)真弓、破骨細胞への分化に伴うリソソームの局在変化におけるV-ATPase $\alpha 3$ イソフォームの関与、日本薬学会第135回年会(神戸)(2015)

原田英光、佐原資謹、堀江沙和、中西(松井)真弓、松元奈緒美、大島勇人、藤原尚樹、大津圭史、V- H^+ ATPaseの $\alpha 3$ イソフォームGFPマウスと遺伝子欠損マウスを用いた解析による歯の発生と骨改造の関係、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会(第18回歯の発生生物学と再生に関するシンポジウム)(神戸)(2015)

松元奈緒美、守家諒、遠山稿二郎、二井將光、中西(松井)真弓、破骨細胞におけるリソソームの局在変化におけるV-ATPase $\alpha 3$ イソフォームの役割、未来医療開発プロジェクト・シンポジウム(盛岡)(2014)

堀江沙和、中西(松井)真弓、佐原資謹、唾液腺におけるV-ATPaseの役割、第56回歯科基礎医学会学術大会(福岡)(2014)

關谷瑞樹、久坂亮介、西山枝里、千葉瑛子、佐藤桃恵、岩本(木原)昌子、二井將光、中西(松井)真弓、クルクミンによるATP合成酵素阻害メカニズムの解析、第86回日本生化学会大会(横浜)(2013)

岡本晴子、柿添藍、中西(松井)真弓、二井將光、出芽酵母V-ATPaseの回転触媒機構の解析、第86回日本生化学会大会(横浜)(2013)

中西(松井)真弓、矢野志緒、丘村航史、滝本彩香、二井將光、ATP合成酵素の回転触媒におけるεサブユニットC末端ドメインの役割、第86回日本生化学会大会(横浜)(2013)

久坂亮介、関谷瑞樹、千葉瑛子、佐藤桃恵、岩本(木原)昌子、中西(松井)真弓、二井將光、クルクミンによるATP合成酵素の阻害作用、日本薬学会第133年会(横浜)(2013)

千葉瑛子、佐藤桃恵、関谷瑞樹、久坂亮介、山越博幸、高山亜紀、柴田浩行、中西(松井)真弓、岩淵好治、二井將光、クルクミン類縁体によるATP合成酵素の阻害作用、日本薬学会第133年会(横浜)(2013)

後藤奈津美、柿添藍、中西(松井)真弓、岡本晴子、二井將光、V-ATPaseの温度依存的制御機構におけるEサブユニットの機能、日本薬学会第133年会(横浜)(2013)

佐藤佑香、柿添藍、中西(松井)真弓、岡本晴子、二井將光、V-ATPaseの回転触媒機構、日本薬学会第133年会(横浜)(2013)

丘村航史、中西(松井)真弓、滝本彩香、矢野志緒、二井將光、ATP合成酵素の回転に対するサブユニットC末端ドメインの影響、日本薬学会第133年会(横浜)(2013)

関谷瑞樹、Robert K. Nakamoto、中西(松井)真弓、二井將光、一分子観察によるポリフェノール類のATP合成酵素阻害機構、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(京都)(2012)

中西(松井)真弓、プロトンポンプATPaseの多様性と作動機構に関する研究、日本応用酵素協会第38回研究発表会(大阪)(2012)

堀江沙和、大宮麻美、小田島悠人、中西(松井)真弓、佐原資謹、マウス唾液腺におけるV-ATPaseの局在、第54回歯科基礎医学学会学術大会(郡山)(2012)

[図書](計1件)

M. Nakanishi-Matsui, S. Breton, H. Okamoto, and M. Futai, Roles and Regulatory Mechanism of Proton Pumping V-ATPase in Spermatozoa and Epididymis Physiology. Testis: Anatomy, Physiology and Pathology. Editors: Yoichi Nemoto and Norio Inaba, *Nova Science Publishers* (2012) pp53-72.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 真弓 (NAKANISHI MAYUMI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20270506

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

後藤(松元)奈緒美 (GOTO-MATSUMOTO NAOMI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80403971

(4) 研究協力者

二井 將光 (FUTAI MASAMITSU)
岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50012646

退職に伴い研究分担者より削除：

2013年7月24日

岡本 晴子 (OKAMOTO HARUKO)
岩手医科大学・薬学部・特任講師
研究者番号：40552899