

「生命活動のプログラム」
平成9年度採択研究代表者

二井 將光

(大阪大学産業科学研究所 教授)

「酸性オルガネラの形成と機能の解明」

1. 研究実施の概要

動物細胞の細胞質には、内部が酸性の各種のオルガネラが存在し、細胞外からの物質のとりこみ、情報伝達などに関与し、多彩な機能を果たしている。これらオルガネラの内部は pH 6.5~4.5 になっており、酸性オルガネラと呼ぶにふさわしい。研究代表者らは、ATP 合成酵素の研究によって得た実績の上に立ち、本研究を開始した。酸性オルガネラの多彩な機能を理解すると共に、遺伝子からオルガネラの形成機構と、H⁺ポンプ、イオン・チャネルなどによって内部酸性環境が形成される機構を明らかにすることを本研究の究極の目的としている。平成10年度は次のように研究を実施した。

酸性オルガネラのプロトンポンプである V-ATPase は輸送路部分(V₀)および表在性部分(V₁)を持ち、それぞれ多数のサブユニットから構成されている。この V-ATPase のモデルとなりうる H⁺ATPase の反応機構を検討した。さらにマウスと線虫を用いて検討し、H⁺の輸送に関与しているサブユニットには多彩なイソフォームが存在することを示した。すなわち 116kDa (a) サブユニットはマウスに a₁、a₂、a₃ の3種が存在した。a₃ が破骨細胞の形成とともに誘導され、細胞膜に他のサブユニットとともに集合し、細胞外を酸性化しているという興味深い結果を得た。

マウスの発生過程における酸性オルガネラの関与を明らかにするために、16kDa サブユニットを欠失させた。欠失マウスは 64 細胞期までは発生したが、子宮壁には着床しなかった。すなわち子宮壁への着床にオルガネラの内部酸性 pH が必須であることを示した。

また「V-ATPase をもつ未知の酸性オルガネラは存在しないだろうか」という素朴な発想から、マラリア原虫、松果体、受精卵などに新しい酸性オルガネラが存在することを示した。酸性オルガネラの内部環境の形成を中心に述べたが、これらに加えて酸性オルガネラの構造の形成についても新しい結果が得られた。

2. 研究実施内容

動・植物細胞の細胞質にはコーテッドベジクル、エンドソーム、ライソソーム、シナプス小胞、ミクロベジクルなど中央液胞系（細胞内膜系）のオルガネラが存在しており、細胞の分化に応じて多彩な機能を果たしている。各々のオルガネラは神経細胞、内分泌細胞等の分化した機能と対応して、特異的なトランスポーター、チャンネルを備えている。いずれのオルガネラもエンドサイトーシス、エキソサイトーシスなどの過程を介し、細胞外からの物質取り込み、情報伝達などに関与している。中央液胞系オルガネラの内部 pH は、6.0 - 6.5（エンドソーム）、4.5 - 4.8（ライソソーム）とオルガネラによって異なるが、いずれも 7 以下になっており、酸性オルガネラと呼ぶにふさわしい細胞内コンパートメント（異環境）を形成している。内部酸性 pH は、液胞型 H^+ ポンプによる H^+ の輸送、特異的なチャンネルによる Cl^- のとりこみ、トランスポーターによる H^+ の移動等によって形成されると考えられる。オルガネラによって内部 pH が異なる理由は、オルガネラ膜に存在する Cl^- チャンネル、液胞型 H^+ ポンプ、トランスポーター等の量的、かつ質的な差によっていると考えられる。

研究代表者らは、 H^+ ポンプ ATP 合成酵素【 H^+ ATPase (FoF1)】の研究によって積み重ねてきた実績の上に立ち、酸性オルガネラの研究を開始した。本研究では酸性オルガネラの多彩な機能を理解すると共に、遺伝子から構成タンパクのアセンブリーに至る（オルガネラの作られる）機構と、 H^+ ポンプ、チャンネル、トランスポーターなどによってオルガネラ内部酸性環境が形成される機構を明らかにすることを究極の目的としている。平成 10 年度はラット松果体細胞、マウス受精卵、マラリア原虫に新しい酸性オルガネラが存在することを見出し、酸性オルガネラが多彩な機能を持つことを確認した。同時に酸性化に中心的な役割を担っている液胞型 H^+ ポンプ (V-ATPase; Vacuolar-type H^+ ATPase) に関して詳細な研究を実施した。

V-ATPase は、酸性オルガネラに普遍的に存在し、酸性オルガネラの形成に中心的な役割を果たしている。V-ATPase の主要サブユニットの構成と量比、さらに一次構造は、FoF1-ATPase (ATP 合成酵素) と高い類似性を示している。従って FoF1 の基本的な研究の成果は V-ATPase においても当てはまると考えられる。実際に我々が見出した FoF1 において活性に直接関与するアミノ酸残基、反応の協同性に関与する残基、 H^+ 輸送に関わる残基、これらはいずれも V-ATPase (VoV1) においても保存されていた。従って ATP 分解と共役し、サブユニットの回転を伴うプロトン輸送が V-ATPase においても行われていると考えられる。実際に回転すると考えられるサブユニットが存在することを確認した。

V-ATPase は膜内在性部分 (Vo) および表在性部分 (V1) を持ち、それぞれ多数のサブユニットからなる複雑な膜タンパクである。Vo を形成しており、 H^+ の輸送とその調節に関与しているサブユニットには多彩なイソフォームが存在しているの

ではないかと考え、2つのモデル生物、マウスと線虫について詳細に検討した。その結果 16kDa (c) サブユニットおよび 116kDa (a) サブユニットにはイソフォームが存在する事を明らかにした。線虫の H⁺ 輸送路を形成する 16kDa サブユニットでは VHA-1 と VHA-2 の2つのイソフォームがあり、アミノ酸配列の 60% が同一であった。さらにもう1つの遺伝子 vha-3 があり DNA 配列は異なるが、vha-2 と同じ蛋白をコードしていた。これらのうち vha-1 と vha-2 はII型の構造を持つ巨大な分泌細胞に、vha-3 は腸管と表皮に発現していた。すなわち細胞特異的に異なるイソフォームが発現していた。これに対してマウスでは 16kDa サブユニットは1つの遺伝子からコードされていた。

さらに 116kDa (a) サブユニットでは線虫に4種、マウスに3種存在した。マウスのものに注目し、対応する cDNA を得た後に a1、a2、a3 と分類し、細胞内外の局在性を検討した。a1、a2、a3 のアミノ酸配列は約 50%の同一性があった。さらに a1、a2、a3 の細胞内の分布、細胞特異的な発現に関して、詳しい研究を展開している。a3 は破骨細胞の形成に伴って誘導され、細胞膜に特異的に局在した。a2 には多くの splicing variant が存在し、今後さらに興味ある成果が得られると考えている。もう一つの V_o 構成蛋白質である 23kDa (c') のサブユニットについて検討したところ、線虫、マウスともに1種類であった。これらサブユニットの機能、およびオルガネラ、細胞、さらには組織における局在性について検討を開始した。

上に述べたように個体において酸性オルガネラは普遍的に存在すると考えられる。しかし、線虫の成体においては抗体によって強く染色されるのはH型分泌細胞に限られていた。また線虫において遺伝子が1つしかない C サブユニットを欠失させると、Larval lethal になった。そこで、改めて哺乳類の個体の発生において、V-ATPase の遺伝子発現はどの段階から必要であるかを検討した。マウスの 16kDa 遺伝子 (PLP) が1種類であることを確認し、この遺伝子を欠失させた。ホモ欠失型 PLP^{-/-}のマウスが生まれなかったので、次にどこまで発生の過程をたどれるかを検討した。PLP^{-/-}のマウスはプラストシスト(64細胞)までは発生したが、子宮壁に着床しなかった。この結果は着床後の個体発生に V-ATPase の形成するオルガネラの内部酸性 pH が必須であることを示している。

酸性オルガネラに注目し、生物における基本的な役割と内部酸性化の機構とを明らかにするべく、さらに研究を進めている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

OH. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio, M. Hayashi, T. Nishi, A. Yamamoto, M. Futai, A. Yamaguchi and Y. Moriyama. Metabotropic glutamate receptors

- negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J. Neurosci.*, 18, 2056-2062 (1998)
- M. Iida, K. Terada, Y. Sambongi, T. Wakabayashi, N. Miura, K. Koyama, M. Futai and T. Sugiyama. Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 428, 281-285 (1998)
- T. Yoshimizu, H. Omote, T. Wakabayashi, Y. Sambongi and M. Futai. Essential Cys-Pro-Cys motif of *Caenorhabditis elegans* copper transport ATPase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1258-1260 (1998)
- M. Hayashi, A. Yamamoto, S. Yatsushiro, H. Yamada, M. Futai, A. Yamaguchi and Y. Moriyama. Synaptic vesicle protein SV2B, but not SV2A, is predominantly expressed and associated with microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.*, 71, 356-365 (1998)
- M. Futai, T. Oka, Y. Moriyama, and Y. Wada. Diverse roles of single membrane organelles : factors establishing the acid lumenal pH. *J. Biochem.*, 124, 259-267 (1998)
- T. Oka, R. Yamamoto and M. Futai. Multiple genes for vacuolar-type ATPase proteolipids in *Caenorhabditis elegans*: a new gene, vha-3, has a distinct cell-specific distribution. *J. Biol. Chem.*, 273, 22570-22576 (1998)
- H. Omote, K. Tainaka, K. Fujie, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada and M. Futai. Stability of the *Escherichia coli* ATP synthase FoF₁ complex is dependent on interactions between γ Gln-269 and the β subunit loop β Asp-301 ~ β Asp-305. *Arch. Biochem. Biophys.*, 358, 277-282 (1998)
- H. Omote and M. Futai. Mutational analysis of F₁F_o ATPase: catalysis and energy coupling. *Acta Physiol. Scand.*, 163, Suppl 643, 177-183 (1998)
- T. Wakabayashi, N. Nakamura, Y. Sambongi, Y. Wada, T. Oka and M. Futai. Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS Lett.*, 440, 141-146 (1998)
- M. Maeda, K. Hamano, Y. Hirano, M. Suzuki, E. Takahashi, T. Terada, M. Futai and R. Sato. Structure of P-type transporting ATPases and chromosomal locations of their genes. *Cell Structure and Function* 23, 315-323 (1998)
- T. Oka, S. Murakami, Y. Arata, J. Hirabayashi, K. Kasai, Y. Wada and M. Futai. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch. Biochem. Biophys.*, 361, 195-201 (1999)

- Y. Sambongi, T. Nagae, Y. Liu, T. Yoshimizu, K. Takeda, Y. Wada and M. Futai. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport*, 10, 753-757 (1999)
- I. Ueda, Y. Sakurai, T. Kawano, Y. Wada and M. Futai. An unprecedented arylcarbene formation in thermal reaction of non-conjugated aromatic enetetraynes and DNA strand cleavage. *Tetrahedron Letters*, 40, 319-322 (1999)
- H. Murakami, G. H. Sun-Wada, M. Matsumoto, T. Nishi, Y. Wada, M. Futai. Human histamine H₂ receptor gene: Multiple transcription initiation and tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, 451, 327-331 (1999)
- H. Omote, N. Sambonmatsu, K. Saito, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai. The γ subunit rotation and torque generation in F₁-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7780-7784 (1999)