

「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その機能の解明」

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、分泌、情報伝達などに関与し、多彩な機能を果たしている。これらの内部は pH6.5 から4.5 になっており、酸性オルガネラと呼ぶにふさわしい。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(液胞型ATPase, V-ATPase)およびイオン・チャネルやトランスポーターなどによって、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目的としている。平成12年度は次のように研究を実施した。

V-ATPaseは輸送路部分(V_o)および表在性部分(V_i)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。V-ATPaseに関して得られた主な成果を以下にまとめる。(1)サブユニット構成および一次構造からV-ATPaseのモデルとなりうるF-ATPaseの反応機構を検討し、サブユニットと10-12分子のcサブユニットがひとつの機械的な単位として反応に伴って回転していることを示した。さらに(2)マウスと線虫を用いて検討し、H⁺の輸送に関与しているaサブユニットにはいずれも4種類のイソフォームが存在することを示した。マウスのイソフォームa1、a2、a3、a4のうちa3が破骨細胞の形成とともに誘導され、細胞形質膜に他のサブユニットと同時にV-ATPaseとして集合し、細胞外を酸性化していること、またイソフォームa4は腎臓の集合管に特異的に存在することを示した。(3)液胞、リソソーム、エンドソームなどの内部のpHの形成に関与するトランスポーターとして、Na⁺/H⁺Antiporter, SO₄²⁻トランスポーターを見出した。また液胞の膜電位がこれらトランスポーターによって調節されていることを示した。(4)4種類のaサブユニットの発現を阻害すると線虫は発生の特異的な時期に致死となった。またV-ATPaseはOocytegenesisとGastrulationに必須であった。これらの結果に対応してcサブユニット欠失マウスは64細胞期までは発生したが、子宮壁に着床し直後に致死となった。以上の結果はV-ATPaseの形成する酸性環境が初期発生にきわめて重要であることを示している。

さらに、酸性オルガネラとしてのリソソーム/エンドソームの形成に関与する新

しいマウスタンパク 3 種 (Syntaxin 7 , mVam6 , sorting nexin) を同定した。これらのタンパクは対応する酵母のタンパクの欠失を相補した。

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、リソソーム、ゴルジ装置、シナプス小胞、ミクロベジクルなどの中央液胞系 (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。酵母にはリソソームに対応するオルガネラとして液胞 (Vacuole) が存在している。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、細胞外からの物質の取り込み、ホルモンや伝達物質の細胞外への分泌、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、6.5から4.5であり、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 (細胞内異環境) を形成している。内部酸性pHは、液胞型H⁺ポンプ (V-ATPase) によるH⁺の内部への輸送、特異的なイオンチャネルやトランスポーターによるH⁺ やアニオンの移動によって形成されると考えられる。以下に平成12年度に実施した研究と得られた成果をまとめた。

(1) まずオルガネラの内部酸性化に中心的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。昨年度は V-ATPase とホモロジーの高いF-ATPase (FoF₁) のF₁ 部分の サブユニット、あるいはFo部分 のcサブユニット (10-12分子よりなるリングを形成している) が ATPの加水分解に伴って回転することを示した。さらに本年度は cサブユニット・リングが一つの機械的な単位として回転していることを明らかにした。

およびcサブユニットはV-ATPaseのそれぞれDおよびcサブユニットに対応している。またF-ATPase (ATP合成酵素) はサブユニット構成から各サブユニットの一次構造に至るまでV-ATPaseと類似している。したがって、上の結果はV-ATPaseのDcサブユニットも ATP分解に伴って回転する事を強く示唆している。

(2) 酵母の液胞にH⁺/Na⁺Antiporter (H⁺とNa⁺を逆方向に輸送) および SO₄²⁻ transporterが存在すること、H⁺/Na⁺AntiporterはK⁺、Li⁺、Rb⁺等も輸送することを示した。これらのトランスポーターはV-ATPaseと共役して液胞の内外の膜電位を一定に調節していると考えられる。同様のトランスポーターがリソソーム、エンドソーム等にも存在していると考えている。

(3) V-ATPaseは膜内在性部分 (V_o) および表在性部分 (V_i) 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。本研究ではV_o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、マウスと線虫について詳細に検討した。そ

の結果、H⁺輸送路を形成するcサブユニットでは、線虫にアミノ酸配列の60%が同一であるVHA-1とVHA-2の2つのイソフォームがあること、これに対しマウスではcサブユニットは1つの遺伝子からコードされていることを前年度までに既に明らかにした。

線虫およびマウスともに、aサブユニットには4種のイソフォームがあることを同定した。マウスのものに注目し、対応するcDNAを得た後にa1、a2、a3、a4と命名した。イソフォーム間のアミノ酸配列には約50%の同一性があった。さらにa1、a2、a3、a4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た。骨髄細胞およびRaw274.6細胞を用いて検討したところ、a3は破骨細胞の形成に伴って誘導され、他のサブユニットとともに細胞膜に特異的なV-ATPaseを形成した。この細胞膜への分子集合にMAP Kinaseを介する情報伝達系が関与していることを示唆する結果を得た。a4サブユニットは腎臓の集合管のα細胞とβ細胞の細胞膜に局在していた。このように細胞あるいは組織特異的に異なるaサブユニット・イソフォームを持つV-ATPaseが存在することが明らかになった。

- (5) 普遍的に存在すると考えられる酸性オルガネラは、個体の初期発生過程に必須なのか。この素朴な疑問に答えるべく、線虫およびマウスにおいてV-ATPaseを欠失させた。RNA interference (RNAi) 法を用いて線虫において、遺伝子が1つしかないcサブユニット、もしくはVo部分のvha1あるいはvha4を欠失させると、Embryoの発生はComma Stage (約200細胞期)で止まってしまった。またdsRNA (二重鎖RNA) を注入した線虫は24時間後にはSterileとなり、Oocytegenesisが阻害された。以上の結果は線虫の発生過程にV-ATPaseの形成する酸性オルガネラが必須であることを示している。
- (6) 線虫の4種のaサブユニット・イソフォームのうち、vha5、vha6、unc32遺伝子にコードされるイソフォームは発生の時期特異的に必須であった。すなわち欠失させると、unc32はEmbryo、vha6はL1期、vha5はL2期で致死となった。そこで改めてマウスにおいて、V-ATPaseの遺伝子発現が個体発生のどの段階から必要であるかを検討した。まずマウスのα(16kDa)サブユニット遺伝子(PLP)が1種類であることを確認し、欠失させた。PLP^{-/-}のマウスはBlastocyst(64細胞)までは発生し、子宮壁に着床後に致死となった。PLP^{-/-}の胚を電子顕微鏡で観察したところ、ゴルジ装置、リソソーム/エンドソームの形態が著しく変化していた。またエンドサイトーシスの活性を示さなかった。これらの結果は酸性オルガネラが哺乳動物の初期発生に必須であることを示している。
- (7) オルガネラとしてのリソソーム/エンドソームの形成機構を明らかにすることも本研究の大きな目的の一つである。本年度までに酵母の液胞形成変異株【Vam

(vacuolar morphology mutant)】を相補するマウスの cDNA をスクリーニングし、Sorting Nexin , mVam 2 , m Vam 6 , Syntaxin 7 の4種のタンパクを同定した。Syntaxin 7 はリソソーム/後期エンドソームに存在しており、ゴルジ装置からオルガネラへの小胞を介する物質輸送に重要であることを示した。同様に mVam 2 と mVam6 もエンドソームに存在していることを示した。これらのタンパクが酸性オルガネラの形成機構にどのように関与しているかを明らかにするべく、さらに研究を進めている。また a3 イソフォームを持つ V-ATPase が破骨細胞の細胞膜に、あるいは a4 イソフォームを持つ V-ATPase が腎臓の集合管細胞にアセンブリーする機構に上に述べた各種のタンパクが関与するかどうか、検討を進めている。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

T. Hirata, N. Nakamura, H. Omote, Y. Wada, and M. Futai (2000) Regulation and reversibility of vacuolar H⁺ ATPase. J. Biol. Chem., 275, 386-389.

N. Nakamura, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai (2000) Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. J. Biol. Chem., 275, 6523-6529.

T. Toyomura, T. Oka, C. Yamaguchi, Y. Wada, and M. Futai (2000) Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H⁺ ATPase : Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. J. Biol. Chem. 275. 8760-8765.

T. Oka, and M. Futai (2000) Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. 275, 29556-29561.

M. Futai, H. Omote, Y. Sambongi and Y. Wada (2000) ATP synthase (H⁺ ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. Biochim. Biophys. Acta, 1458, 276-288.

M. Futai, T. Oka, G.-H. Sun-Wada, Y. Moriyama, H. Kanazawa, and Y. Wada (2000) Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. J. Exp. Biol. 203, 107-116.

G. -H. Sun-Wada, S. Manabe, T. Yoshimizu, C. Yamaguchi, T. Oka, Y. Wada, and M. Futai (2000) Upstream regions directing tissue-specific expression of the GATA6 gene during mouse early development. J. Biochem. 127, 703-709.

N. P. Le, H. Omote, Y. Wada, M. K. Al-Shawi, R. Nakamoto and M. Futai (2000) The *Escherichia coli* ATP synthase α subunit Arg-376 : the catalytic site arginine does not participate in the hydrolysis/synthesis reaction but is required for promotion to steady state. Biochemistry (Washington) 39, 2778-2783.

Y. Sambongi, M. Tanabe, Y. Iko, I. Ueda, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada and M.

Futai (2000) Rotational catalysis by F-type ATPase. " Na/K-ATPase and Related ATPases " (Ed. by K. Taniguchi and S. Kaya) 57-63, Elsevier Science B. V.

Y. Sambongi, K. Takeda, T. Wakabayashi, I Ueda, Y. Wada & M. Futai (2000) *Caenorhabditis elegans* senses protons through amphid chemosensory neurons : Proton signals elicit avoidance behaviour. *NeuroReport*, 11, 2229-2232 .

I. Ueda, K. Miyawaki, T. Sugane, Y. Wada and M. Futai (2000) Cycloaromatization and DNA cleavage of novel non-conjugated aromatic enetetrayne systems. *Pharmazie*, 55, 192-195.

Y. Wada, Y. Sambongi, and M. Futai (2000) Biological nano motor, ATP synthase FoF₁ : From catalysis to γ & C₁₀₋₁₂ subunit assembly rotation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1459, 499-505.

Y. Sambongi, I. Ueda, Y. Wada and M. Futai (2000) A biological motor, proton-translocating ATP synthase: Multidisciplinary approach for a unique membrane enzyme. *J. Biomemb. Bioenerg.* 32, 441-448

G.-H. Sun-Wada, Y. Murata, A. Yamamoto, H. Kanazawa, Y. Wada and M. Futai (2000) Acidic endomembrane organelles are required for mouse postimplantation development. *Developmental Biology*, 228 315-325.

Y. Moriyama, M. Hayashi, H. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio, and A. Yamamoto. (2000) Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J. Exp. Biol.* 203, 117-125.

S. Yatsushiro, H. Yamada, M. Hayashi, A. Yamamoto, Y. Moriyama (2000) Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of L-glutamate in rat pinealocytes. *J. Neurochem.*, 75, 288-297.

S. Yatsushiro, M. Hayashi, M. Morita, A. Yamamoto, Y. Moriyama (2000) Glutamate receptor subunit 2 is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *J. Neurochem.*, 75, 1115-1122.

M. Hayashi, H. Yamada, T. Mitamura, T. Horii, A. Yamamoto, Y. Moriyama. (2000) Vacuolar H⁺-ATPase localized in plasma membranes of malaria parasite cells, *Plasmodium falciparum*, is involved in regional acidification of parasitized erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 275, 34353-34358.

S. Kamauchi, T. Fudemoto, J. Miki, H. Inoue, and H. Kanazawa (2000) Monoclonal antibodies recognizing surface residues of the β subunit from *Escherichia coli* F₁ ATPase : Functional importance of the epitope residues. *J. Biochem.*, 128, 629-635.

H. Inoue, Y. Tsuboi and H. Kanazawa (2001) Chimeric Na⁺/H⁺ antiporters of NhaA from *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* : Essential domains for pH sensor. J. Biochem., 129, 569 - 576.

二井將光(2000)ゲノム配列情報の中から、ファルマシア、36、671.

和田戈虹、村上秀昭、二井將光(2000)ヒスタミンH₂受容体遺伝子、別冊・医学のあゆみ、ヒスタミンの分子生物学29-33.

和田 洋(2000)個体と細胞の構築を支える細胞内小胞輸送、細胞工学別冊「植物細胞の分裂」152-159.