

「生命活動のプログラム」

平成9年度採択研究代表者

二井 将光

(大阪大学産業科学研究所 所長・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(pH 6.5~4.5)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、細胞外への分泌、情報伝達などに関与し、多彩な機能を果たしている。酸性オルガネラの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、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13年度は次のように研究を実施した。

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 のモデルとなる F-ATPase(FoF1)の反応機構を検討し、 γ サブユニットと10-12分子の *c*サブユニットがひとつの単位として反応に伴って回転していることを膜標品を用いて示した。(2)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 として集合する機構を詳しく検討した。またイソフォーム *a4* が腎臓の集合管の介在細胞に特異的に存在することを示した。(3)V-ATPase の *C* サブユニットに *C1*、*C2*、*E*サブユニットに *E1*、*E2*、*G*サブユニットに *G1*、*G2*、*G3*、*d*サブユニットに *d1*、*d2* のイソフォームが存在することを明らかにした。*E2* が普遍的な組織に存在するのに対し、*E1*は精原細胞と精子のアクロソームに、*G1* が普遍的であるのに対し、*G2* は神経細胞のシナプス小胞に局在し、*G3* は腎臓の近位尿細管に存在した。いずれも各イソフォームを持つ V-ATPase として局在することを確認し、同時にイソフォームの機能を解析した。

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)について詳しく解析を進め、オルガネラ形成における役割と同時に個体における役割を明らかにするべく研究を始めた。Syntaxin 7 に関してはノックアウトマウスを作出した。

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、マイ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、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酸性 pH(6.5~4.5) 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ている。平成 13 年度に実施した研究と得られた成果をまとめた。

- (1) オルガネラの内部酸性化に中心的役割を担っている V-ATPase に関して詳細な研究を実施した。V-ATPase とホモロジーの高い F-ATPase (FoF₁)の F₁部分のγサブユニットと 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)が一つの機械的な単位として回転していることを膜分画を用いて明らかにした。同時に Fo 部分の a サブユニットと c サブユニットが相対的に回転していることを示した。可溶化や精製操作を全く行っていない膜標品において、これらの結果が得られたことは重要である。γ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ことを踏まえ、V-ATPase のサブユニットの ATP 分解に伴う回転を実証する系を構築した。
- (2) 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っている。本研究では Vo を形成し、H⁺の輸送と調節に関与するサブユニットに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た。昨年度までに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。そこでマウス a1, a2, a3, a4に注目した。a4は腎臓の集合管のα細胞とβ細胞の形質膜にのみ局在していた。3T3 細胞、Raw 274.6 細胞において a2 は Golgi に、a3 はリソソームに局在した。破骨細胞のモデルとなる Raw 274.6 細胞では、a3 は破骨細胞の形成に伴って、他のリソソーム膜タンパクとともに細胞形質膜に局在した。この結果はリソソームが直接的に破骨細胞の形質膜の形成に関与することを示唆している。さらに形質膜への分子集合に関与する情報伝達系に関して詳しく検討した。なお、いずれのイソフォームも V-ATPase のサブユニットであることを示した。
- (3) 多彩な局在を示す V-ATPase には、さらに各サブユニットにイソフォームがあるのではないかと考え検討したところ、Cサブユニットに C1と C2, Eサブユニットに E1 と E2, Gに G1, G2, G3, dに d1と d2のイソフォームが存在することを示した。いずれも一つのイソフォーム(C1, G1, E2, d1)は Ubiquitous type として普遍的に各組織に分布していた。これに対し C2は腎と肺に、E1 は精原細胞と精子アクロソームに、G2 は神経細胞のシナプス小胞に、G3 は腎臓に、d2 は腎臓に特異的に見出された。
- (4) アクロソームの V-ATPase は E1と a 2 イソフォームを持っていた。新しく見出したマウス・イソフォームは、いずれも酵母において機能した。この系を用いてキメラ V-ATPase を比較すると E2 のものは温度感受性を示し、E1 と E2 を持つ V-ATPase はいずれも酵母のものに比較し基質親和性が増加した。
- (5) 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。昨年度までに酵母の液胞形成変異株【vam 変異(vacuolar morphology mutant)】を相補するマウスの cDNA をスクリーニングし、Sorting Nexin, mVAM2, mVam6, 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、ゴルジ装置からオルガネラへの小胞輸送に重要であることを示した。本年度は mVam2 と mVam6 のオルガネラ形成に於ける役割を明らかにし、同時に Syntaxin 7 のノックアウトマウスを作出した。また $\alpha 3$ イソフォームを持つ V-ATPase が破骨細胞の形質膜に Syntaxin 7 とともに移動することを確認した。

3. 研究実施体制

(1) 分子生物学、構造・機能研究グループ

グループリーダー: 和田 洋(大阪大学産業科学研究所 助教授)

研究項目: H⁺ポンプの分子: 細胞生物学

(2) 細胞生物学、生理機能研究グループ

グループリーダー: 孫 戈虹(大阪大学産業科学研究所 助手)

研究項目: H⁺ポンプの分子生化学

4. 研究成果の発表

(1) 論文

- T. Oka, Y. Murata, M. Namba, T. Yoshimizu, T. Toyomura, A. Yamamoto, G.-H. Sun-Wada, N. Hamasaki, Y. Wada, and M. Futai, $\alpha 4$, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H⁺-ATPase subunit *a*, J. Biol. Chem. **276**, 40050-40054 (2001)
- T. Oka, T. Toyomura, K. Honjo, Y. Wada, and M. Futai, Four subunit *a* isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase: cell-specific expression during development, J. Biol. Chem. **276**, 33079-33085 (2001)
- G.-H. Sun-Wada, H. Murakami, H. Nakai, Y. Wada and M. Futai, Mouse *Atp6f*, the gene encoding the 23-kDa proteolipid of vacuolar proton translocating ATPase, Gene, **274**, 93-99, (2001)
- N. Nakamura, G.-H. Sun-Wada, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai, Association of mouse sorting nexin 1 oligomer with early endosomes, J. Biochem. **130**, 765-771 (2001)
- M. Tanabe, K. Nishio, Y. Iko, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, H. Omote, I. Ueda, Y. Wada, and M. Futai, Rotation of a complex of the γ subunit and *c* ring of *Escherichia coli* ATP synthase: the rotor and stator are interchangeable, J. Biol. Chem. **276**, 15269-15274 (2001)
- Y. Iko, Y. Sambongi, M. Tanabe, A. Iwamoto-Kihara, K. Saito, I. Ueda, Y. Wada and M. Futai, ATP synthase F1 sector rotation; defective torque generation in the β subunit Ser-174 to Phe mutant and its suppression by second mutations, J. Biol. Chem. **276**, 47508-47511 (2001)
- T. Hirata, Y. Wada, and M. Futai, Sodium and sulfate ion transport in yeast vacuole, J. Biochem. **131**, 261-265 (2002)
- K. Hayami, T. Noumi, H. Inoue, G.-H. Sun-Wada, T. Yoshimizu, H. Kanazawa, The murine

genome contains one functional gene and two pseudogenes coding for the 16kDa proteolipid subunit of vacuolar H⁺-ATPase, *Gene*, **273**, 199–206 (2001)

- Y. Nakanishi, T. Saijo, Y. Wada and M. Maeshima, Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7654–7660 (2001).
- H. Inoue, Y. Tsuboi, and H. Kanazawa, Chimeric Na⁺/H⁺ antiporters of NhaA from *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*: Implications for domains of NhaA for pH sensing, *J. Biochem.*, **129**, 569–576 (2001)
- M. Matsumoto, Y. Miyakae, M. Nagita, H. Inoue, D. Shitakubo, K. Takemoto, C. Ohtsuka, N. Nakamura, and H. Kanazawa, A serine/threonine kinase which causes apoptosis like cell death interacts with a calcineurin B like protein capable of binding Na⁺ / H⁺ exchanger 1, *J. Biochem* **130**, 217–225(2001)
- M. Hayashi, M. Otsuka, R. Morimoto, S. Hirota, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto, Y. Moriyama : Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems, *J. Biol. Chem.* **276**, 43400–43406 (2001)
- H. Yamada, M. Otsuka, M. Hayashi, S. Nakatsuka, K. Hamaguchi, A. Yamamoto, Y. Moriyama, Ca²⁺-dependent exocytosis of L-glutamate by αTC6, clonal mouse pancreatic α-cells, *Diabetes*, **50**, 1012–1020 (2001)
- S. Nakatsuka, M. Hayashi, A. Muroyama, M. Otsuka, S. Kozaki, H. Yamada, Y. Moriyama, D-Aspartate is stored in secretory granules and released through a Ca²⁺-dependent pathway in a subset of rat pheochromocytoma PC 12 cells, *J. Biol. Chem.* **276**, 26589–26596 (2001)
- N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657–668 (2001)
- M. Hayashi, S. Taniguchi, Y. Ishizuka, H-S. Kim, Y. Wataya, A. Yamamoto, and Y. Moriyama, A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocyte in the Brefeldin A-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 15249–15255 (2001)
- I. Miwako, A. Yamamoto, T. Kitamura, K. Nagayama, and M. Ohashi, Cholesterol requirement for insulin-like growth factor 2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport from multivesicular late endosomes to the Golgi. *J. Cell Sci.*, **114**, 1765–1776 (2001)
- B.Y. Kim, H. Kramer, A. Yamamoto, E. Kominami, S. Kohsaka and C. Akazawa, Molecular characterization of mammalian homologues of class C Vps proteins that interact with

- syntaxin 7. *J. Biol. Chem.* **276**, 29393–29402 (2001)
- Y. Kiyozuka, H. Nakagawa, Y. Uemura, H. Senzaki, A. Yamamoto, T. Noguchi, H. Mizuta, K. Nakanishi, S. Nakano, and A. Tsubura, Novel cell lines established from a human myxoid malignant fibrous histiocytoma arising in the uterus. *Cancer Genet Cytogenet.* **127**, 7–15 (2001)
 - A. Yoshioka, R. Shirakawa, H. Nishioka, A. Tabuchi, T. Higashi, H. Ozaki, A. Yamamoto, T. Kita, and H. Horiuchi, Identification of protein kinase C α as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca²⁺-induced α - and dense-core granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem.* **276**, 43400–43406 (2001)
 - M. Fukuda, A. Yamamoto, and K. Mikoshiba. Formation of crystalloid endoplasmic reticulum induced by expression of synaptotagmin lacking the conserved WHXL motif in the C-terminus: Structural importance of the WHXL motif in the C2B domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 41112–41119 (2001)
 - M. Sohda, Y. Misumi, A. Yamamoto, A. Yano, N. Nakamura, and Y. Ikehara, Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J. Biol. Chem.* **276**, 45298–45306 (2001)
 - K. Kitagawa, K. Yagyu, A. Yamamoto, N. Hattori, K. Omori, X.T. Zeng, C. I. Inagaki, Molecular cloning and characterization of the Cl⁻ pump-associated 55-kDa protein in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 363–371 (2001)
 - 二井 将光、三本木 至宏、和田 洋、ATP 合成酵素(ATP を作るバイオナノマシーン)とプロトンポンプ ATPase、蛋白質・核酸・酵素、146「新世紀における蛋白質科学の進展」、1754–1763(2001)
 - 孫(和田) 戈虹、和田 洋、二井 将光、酸性オルガネラの機能:動物の個体レベルから、蛋白質・核酸・酵素、46、2140–2146(2001)
- (2) 特許出願
なし