

「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研究」

### 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。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<sup>+</sup>ポンプ(V-ATPase)、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目的としている。平成11年度は次のように研究を実施した。

V-ATPaseは輸送路部分(V<sub>0</sub>)および表在性部分(V<sub>1</sub>)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F-ATPaseの反応機構を検討し、cサブユニットが複合体として反応中に回転していることを示した。さらにマウスと線虫を用いて検討し、H<sup>+</sup>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。すなわち線虫に2種のcサブユニットを、マウスには3種のaサブユニット・イソフォームa1、a2、a3を同定した。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ともに集合し、細胞外を酸性化しているという結果を得た。

マウス受精卵に多数の酸性オルガネラが存在し、blastocyst以降に形態的に大きな変化をすることを見出した。これに対応するように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、子宮壁には着床しなかった。同様に線虫において検討したところ、V-ATPaseがoocytegenesisとgastrulationに必須であった。これらの結果は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唆している。

さらに、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タンパク3種を同定した。

### 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、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。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、6.5 ~ 4.5 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<sup>+</sup>ポンプ（V-ATPase）によるH<sup>+</sup>の輸送、特異的なチャネルやトランスポーターによるH<sup>+</sup>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11年度に実施した研究と得られた成果をまとめた。

まず酸性化に中心的役割を担っている液胞型 H<sup>+</sup>ポンプ（V-ATPase、Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase）に関して詳細な研究を実施した。本年度は V-ATPase とホモロジーの高い F-ATPase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) の F<sub>1</sub> 部分の c サブユニット、あるいは F<sub>0</sub> 部分の c サブユニットが ATP の加水分解反応に伴って回転することを示した。および c サブユニットは V-ATPase の D および c サブユニットに対応している。したがって上の結果は V-ATPase のサブユニットも ATP 分解に伴って回転する事を強く示唆している。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一次構造まで V-ATPase と類似している。

さらに酵母の液胞にシロイヌナズナの H<sup>+</sup>輸送性ピロフォスファターゼ (PPase) を発現させた。PPase によるピロリン酸の分解に伴って H<sup>+</sup>の電気化学的ポテンシャルを形成させたところ、液胞に存在する V-ATPase は逆反応である ATP 合成反応を行った。このように 2 つのプロトンポンプを持つ液胞を用いて V-ATPase は膜電位 ( ) によって調節されるが、H<sup>+</sup> 濃度によっては調節されないことを示した。

V-ATPase は膜内在性部分 (V<sub>0</sub>) および表在性部分 (V<sub>1</sub>) 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。V<sub>0</sub> を形成しており、H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 輸送路を形成する c サブユニットについて検討したところ線虫では 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。これらのイソフォームは細胞特異的に発現していた。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た。

さらに a サブユニットでは線虫に 4 種、マウスに 3 種を同定した。マウスのものに注目し、対応する cDNA を得た後に a1、a2、a3 と命名した。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た。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に局在した。

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であるのか。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) 法を用いて線虫に遺伝子が1つしかないcサブユニット、あるいはV<sub>0</sub>部分の*vha1* あるいは *vha4* を欠失させると、embryoの発生はcomma stage (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。こ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。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cサブユニット(16kDa)遺伝子(PLP)が1種類であることを確認し、欠失させた。PLP<sup>-/-</sup>のマウスはプラストシスト(64細胞)までは発生したが、子宮壁には着床しなかった。着床できなかった胚を電子顕微鏡レベルで検討したところ、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。以上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。

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。本年度は酵母の液胞形成変異株を相補するマウスのcDNAをスクリーニングし、mVAM 2, mVAM 6, Syntaxin 7の3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トラフィックに重要であることを示した。同様にmVAM2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研究を進めている。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

H. Omote, N. Sambonmatsu, K. Saitoh, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada, and M. Futai (1999) The c subunit rotation and torque generation in F<sub>1</sub>-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 96. 7780-7784.

Y. Sambongi, Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai (1999) Mechanical rotation of c subunit oligomer in ATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): direct observation. Science, 286, 1722-1724.

M. Futai and H. Omote (1999) Mutational analysis of ATP synthase: an approach to catalysis and energy coupling. in "Frontiers of Cellular Bionenergetics: Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology" (Ed. by S. Papa), 399-421, Kluwer Academic/ Plenum Publishers.

N. P. Le, H. Omote, Y. Wada, M. K. Al-Shawi, R. K. Nakamoto, and M. Futai (2000)

*Escherichia coli* ATP synthase subunit Arg-376: the catalytic site arginine does not participate in the hydrolysis/synthesis reaction but is required for promotion to the steady state. *Biochemistry*, 39, 2778-2783.

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

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

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

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<sup>+</sup>-ATPase: Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.*, 275, 8760-8765.

M. I. R. Petalcorin, T. Oka, M. Koga, K. Ogura, Y. Wada, Y. Ohshima, and M. Futai (1999) Disruption of *clh-1*, a chloride channel gene, results in a wider body of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, 294, 347-355.

Y. Sambongi, T. Nagae, Y. Liu, T. Yoshimizu, K. Takeda, Y. Wada, and M. Futai (1999) Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport*, 10, 753-757

H. Murakami, G.-H. Sun-Wada, M. Matsumoto, T. Nishi, Y. Wada, and M. Futai (1999) Human histamine H<sub>2</sub> receptor gene: Multiple transcription initiation and tissue specific expression. *FEBS Lett.*, 451, 327-331

T. Nakamura, Y. Maeda, T. Oka, H. Tabata, M. Futai and T. Kawai. (1999) Atomic force microscope observation of plasmid DNA with restriction enzyme. *J. Vac. Sci. Technol.*, B17(2), 288-293

T. Oka, S. Murakami, Y. Arata, J. Hirabayashi, K. Kasai, Y. Wada and M. Futai (1999) Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch. Biochem. Biophys.*, 361, 195-201

I. Ueda, Y. Sakurai, T. Kawano, Y. Wada and M. Futai. (1999) An unprecedented arylcarbene formation in thermal reaction of non-conjugated aromatic entetraynes and DNA strand cleavage. *Tetrahedron Letters*, 40, 319-322.

H. Inoue, T. Noumi, M. Nagata, H. Murakami, H. Kanazawa. (1999) Targeted

disruption of the gene encoding the proteolipid subunit of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase leads to early embryonic lethality. *Biochem. Biophys. Acta.* , 1413, 130-138

二井將光 (1999) 酸性オルガネラの形成とその機能に関する研究：分子・オルガネラ・細胞・個体のレベルからプロトンを考える、*生産と技術* 51、212-214.

和田戈虹、村上秀昭、二井將光 (1999) 遺伝子からみたヒスタミンH<sub>2</sub>受容体、*医学のあゆみ*、188、173-178.

三本木至宏、若林篤光 (1999) 生体の銅イオン恒常性の調節機構、細胞内の銅イオン輸送をになう分子装置と神経系のはたらき、*化学と生物* 37、427-429.

和田 洋 (1999) リソソームと液胞- 米田悦啓、中野明彦編 *細胞内物質輸送のダイナミズム* 133-140 シュプリンガーフェアラーク/東京.