Osaka University Knowledge Archive

Title	Physiological functions of mouse vacuolar H+ -traslocating ATPase at early development and its isoform expressions in kidney and brain
Author(s)	村田, 佳子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1060
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【9】

氏　　名	村田佳子（むらた よしこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　18163　号
学位授与年月日	平成15年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Physiological functions of mouse vacuolar H^+-translocating ATPase at early development and its isoform expressions in kidney and brain （マウス液胞型 H^+-ATPase の生理機能の解析－初期発生および腎臓と脳における組織特異的イソフォームの役割）
論文審査委員	（主査） 教　授　前田　正知 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　馬場　明道　　教　授　松田　敏夫

論文内容の要旨

液胞型ATPaseは、酵母の液胞膜に存在する H^+ 輸送性ATPaseとしてはじめて発見され、vacuolar-type proton translocating ATPase、略してV-ATPaseと呼ばれている。V-ATPaseは多数のサブユニットからなる膜タンパク質で、ATPを加水分解し、そのエネルギーを駆動力としてオルガネラ内腔に H^+ を輸送している。また、膜内在性部分（Vo）と表在性部分（V_1）からなり、総分子量は約90万に達する。膜表在性の V_1 部分にATPase活性があり、*A*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F*、*G*、*H*の8種類のサブユニットからなる。膜内在性のVo部分は H^+ の輸送路形成を担っており、*a*、*c*、*c′*、*c″*、*d*のサブユニットから構成されている。

真核細胞に存在するリソソームやエンドソーム、ゴルジ装置、分泌小胞などのオルガネラ膜にV-ATPaseが局在しており、H^+ を汲み入れることによってオルガネラ内部を酸性にしている。この酸性環境は、無機イオン、アミノ酸、伝達物質などの濃縮、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの小胞輸送、タンパク質の分解・プロセッシングなどに重要であると考えられている。このように、V-ATPaseは生理的に重要な酵素なので、この酵素が欠損すると生育できなくなると予想される。実際、V-ATPaseを欠失した酵母は、酸性pHの培地では生育できるが、中性からアルカリ性pHでは生育できない。それでは哺乳動物ではV-ATPaseは必須であろうか？　この疑問に答えるため、V-ATPaseが機能しないマウスの初期発生過程を調べた。

V-ATPaseの *c* サブユニットはプロテオリピッド（PL16）とも呼ばれる極めて疎水性の高いタンパク質であり、V-ATPaseのVo部分に6～8分子存在すると考えられ、H^+ 輸送路の中心的な役割を果たしている。*c*サブユニットの遺伝子がヒトやマウスでは単一であることが報告されており、この遺伝子を欠失させるとV-ATPaseが機能しないと考えられるので、*c*サブユニットのノックアウトマウスに着目した。V-ATPaseの *c* サブユニットを欠失させたマウスの胚は胚盤胞（blastcyst）まで分化するが、受精後5.5日目の着床直後に異常な形態を示し、致死となった。以上の結果からV-ATPaseあるいはこのATPaseの形成する酸性環境が初期発生の着床の段階で必須な機能を持つことが示唆された。哺乳類の着床時は、ホルモン、増殖因子の刺激応答、細胞接着・浸潤、栄養供給など様々なプロセス、情報伝達を必要とする。これらの過程にV-ATPaseが関与していると考えられる。

分化した細胞においては、V-ATPaseは細胞内オルガネラの膜だけではなく、形質膜にも存在し、細胞外に H^+ を排出して細胞外環境を酸性に保つ役割を果たしている。例えば、破骨細胞や腎集合管介在細胞、膀胱や輸精管などの

上皮細胞では形質膜に局在して、それぞれ骨代謝、尿の酸性化/イオン恒常性の維持、精子の成熟などに必要な酸性環境の形成に寄与している。これらの機能に対応して、V-ATPase のサブユニットが骨吸収の異常による大理石病や、腎尿酸性アシドーシスを引き起こす原因遺伝子として、同定されている。

多彩な細胞内オルガネラ膜に V-ATPase が局在し、異なった酸性環境を形成している。こうした酸性環境は、それぞれが異なる固有の pH からなっている。どのようにして、V-ATPase が生体内における多彩な局在や酸性環境を形成できるのか？　組織によって異なるサブユニット・イソフォームがあり、V-ATPase の特異的な局在と機能を担っているからではないか？　このような観点から、サブユニット・イソフォームの多様性に注目した。異なる膜系への局在には膜内在性のサブユニットが関与しているとの仮説のもとに、まず、膜内在性 Vo のサブユニットを検討した。このうち、*a* サブユニットには酵母、ニワトリ、ウシ、マウス、ヒトにおいてイソフォームの存在が報告されている。酵母では２種類のイソフォーム、Vph1p と Stv1p があり、Vph1p を持つ V-ATPase は液胞に、Stv1p を持つものはゴルジ/エンドソームに発現している。また、マウスにおいて３種類のイソフォーム（*a*1、*a*2、*a*3）が存在し、細胞内の局在が異なる。したがって、V-ATPase の局在の決定に *a* サブユニットが関与しているのではないかと考えた。マウスから新規の *a*4 イソフォームを同定し、さらに *a*1、*a*2、*a*3 イソフォームが広範な組織で発現しているのに対し、*a*4 イソフォームが腎臓特異的に発現していることを見い出した。*a*4 は皮質集合管の形質膜に発現しており、プロトンを分泌する α 型介在細胞では頂端側に、重炭酸イオンを分泌する β 型介在細胞では基底側に局在していた。さらに、*a*4 はヒトの腎性尿細管性アシドーシスの原因遺伝子 *ATP6N1B* と高い相同性があり、*a*4 イソフォームを持つ V-ATPase が腎臓における酸－塩基平衡の調節に関与していることを示唆している。

膜内在性部分（Vo）のサブユニット・イソフォームに対して、V_1 部分のイソフォームの機能と局在を知る目的で、V_1 部分と Vo 部分のアセンブリーに重要な役割を果たしている *G* サブユニットに着目した。哺乳類において、脳に特異的なイソフォームの存在が報告されていたがその局在などは明らかにされていない。脳において V-ATPase が特に注目されるのは、神経細胞（ニューロン）のシナプス小胞の総タンパク質の約 20%を V-ATPase が占めている点、V-ATPase が作り出す酸性環境（膜電位と ΔpH）が神経伝達物質の濃縮に不可欠である点、また、神経細胞の細胞体（cell body）や樹状突起（dendrite）、グリア細胞にも存在している点である。そこで、マウスに脳特異的なイソフォームが存在するのではないかと考えた。実験結果、脳特異的に発現している *G* サブユニット・イソフォーム *G*2 を同定し、広範な組織に存在する *G*1 と比較するため、脳組織、神経細胞における発現様式について明らかにした。アストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリア細胞においては、*G*1 のシグナルは認められたが、*G*2 の発現は確認できず、*G*2 はニューロン特異的に発現していた。また、*a* サブユニットでは *a*3 のみが *G*2 と同じ局在を示し、*G*2 と *a*3 を含む V-ATPase がシナプス小胞内腔の酸性維持という機能を担っていると結論した。このように様々なイソフォームから構成される V-ATPase が、哺乳動物における多様な酸性環境の形成に関与していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

液胞型 ATPase は、酵母の液胞膜に存在する H^+ 輸送性 ATPase として初めて発見されたことから、vacuolar-type proton transporting ATPase、略して V-ATPase と呼ばれている。哺乳類において V-ATPase は形質膜やオルガネラ膜に存在し、特有な酸性環境の形成に寄与している。本研究においては、多様な細胞の多彩なオルガネラで何故 V-ATPase が酸性環境を形成できるかという点について、イソフォームの存在に注目して検討がなされた。

まず最初に V-ATPase、或いはこの ATPase の形成する酸性環境が初期発生の着床の段階で必須な機能を持つことを、唯一種類存在する c サブユニットを欠失させたマウスの解析を通して明らかにした後、膜内在性及び膜表在性のサブユニットのイソフォームを同定し、検討を進めた。マウス V-ATPase の膜内在性サブユニットの中では、腎臓特異的な新規 a4 イソフォームを同定した。a4 は腎臓の皮質集合管の形質膜に発現しており、プロトンを分泌する α 型介在細胞では頂端側に、重炭酸イオンを分泌する β 型介在細胞では基底側に局在していた。a4 はヒトの腎性尿細管性アシドーシスの原因遺伝子 ATP6N1B と高い相同性があり、a4 イソフォームを持つ V-ATPase が腎臓における酸－

塩基平衡の調節に関与している可能性を示唆した。さらに、膜表在性 G サブユニットに 2 種のイソフォームが存在することを明らかにした。G1 が広範な組織に発現しているのに対し、G2 はニューロンに特異的に発現していることを示した。さらに精製も行い、G2 と a3 を含む V-ATPase がシナプス小胞内腔の酸性維持という機能を担っていると結論した。

今回の研究成果は、様々なイソフォームから構成される V-ATPase が、哺乳動物における多様な酸性環境の形成に関与していることを明らかにした。本研究は、V-ATPase の生理作用の解明に大きく貢献し、博士（薬学）の学位に十分値するものである。