Osaka University Knowledge Archive

Title	Three Subunit a Isoforms of Mouse Vacuolar H+-ATPase : The a 3 Isoform is Responsible for Bone Resorption
Author(s)	豊村, 隆男
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42526
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	豊　村　隆　男（とよむら たかお）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　15985　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Three Subunit *a* Isoforms of Mouse Vacuolar H^+－ATPase : The *a*3 Isoform is Responsible for Bone Resorption （マウスの液胞型 H^+輸送性 ATPase の *a* サブユニット・イソフォーム－破骨細胞における *a*3 イソフォームの役割－）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　二井　將光 （副査） 教　授　近藤　寿人　　教　授　徳永　史生　　助教授　和田　　洋

論　文　内　容　の　要　旨

液胞型 H^+輸送性 ATPase（V-ATPase）は、ATP の加水分解にともない H^+輸送を行い、膜の内外に H^+の濃度勾配を形成する酵素として知られている。リソソームなどのオルガネラ内部は、V-ATPase や各種のイオン・チャンネル等によって固有の酸性 pH に調節されている。V-ATPase は触媒部位である V_1部分と、H^+輸送に関わる V_0部分からなり、それぞれが複数のサブユニットから形成されている。豊村君はV-ATPase のアセンブリーやソーティングに関与するとされる V_0領域の *a* サブユニットが pH 調節機構を担っていると考え、このサブユニットに着目し研究を進めてきた。

【三種の *a* サブユニット・イソフォームの同定】

マウス EST データベースより V_0の *a* サブユニットについて、酵母・ウシ・ヒトと高い相同性を示す cDNA を三種類見出した。三種類のクローンから予測される遺伝子産物（*a*1、*a*2、*a*3）はお互いに50%程度の相同性を示し、特にカルボキシル末端領域が高く保存されていた。また二次構造予測から、同じ疎水性領域を持つ事も示された。三種のイソフォームは、様々な組織で発現しており特異性は見られなかったが、組織ごとに発現量に差がみられた。

培養細胞 NIH3T3 を用いて *a* イソフォームの細胞内局在を調べた。蛍光抗体染色法により観察を行った結果、*a*1 は細胞質内全体に粒状に存在していた。*a*2 はゴルジ体に強く発現しており、*a*3 は後期エンドソーム及びリソソームに局在していた。すなわち、細胞内において三種のイソフォームは局在が異なっていた。

【破骨細胞における *a*3 イソフォームの発現】

V-ATPase はオルガネラだけでなく、特異的な細胞や組織において形質膜上に発現していることが知られている。骨代謝は「造骨」と「破骨」のバランスで成り立っており、前者を骨芽細胞が、後者を破骨細胞が担っている。破骨細胞は、形質膜の V-ATPase が細胞外を酸性化し、骨基質を破壊し、骨吸収を行う細胞である。この特異的な V-ATPase の局在にどの *a* イソフォームが関与しているか検討した。

破骨細胞の分化にともない、三種のイソフォームのうち、*a*3 の発現が強く誘導された。また、V-ATPase の親水性領域（V_1）を形成している *A* サブユニットも、*a*3 と同様に破骨細胞の分化にともない誘導された。蛍光抗体染色により、*a*3 は形質膜上に強い発現が見られ、微小管に依存した局在も観察された。すなわち、破骨細胞の分化にともない *a*3 イソフォームを構成サブユニットとする V-ATPase の発現が誘導され、微小管を利用して形質膜に輸送される事が示唆された。

微小管上を$a3$イソフォームを含めたV-ATPaseが輸送されるならば、キネシンやダイニンといったモーター分子の関与が考えられる。これらの分子はMAPKキナーゼにより活性が調節されていることが知られている。p38 protein kinaseを阻害すると破骨細胞の分化が抑制されることを見出し、その条件下で$a3$の局在を観察したところ、形質膜への移動は全く見られなかった。すなわち、$a3$イソフォームは微小管上をモーター分子を利用して移動する事が示唆された。

以上の結果より、マウスにはV-ATPaseのaサブユニット・イソフォームが三種類存在し、$a3$イソフォームが破骨細胞で強く発現しており、分化にともない形質膜へと移動することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

液胞型ATPase (vacuolar H^+-ATPase) は、リソソームやエンドソームといった多様なオルガネラの内部を特異的な酸性pHに保つ酵素である。豊村は、多様な酸性オルガネラの形成に液胞型ATPaseのサブユニット・イソフォームが関わっており、その機能・局在性を調節している、という独創的な視点に基づいて研究を進めた。その結果、マウスにおいて膜貫通タンパクであるaサブユニットが、$a1$、$a2$、$a3$の三種存在する事を見出した。さらに、破骨細胞において$a3$イソフォームの発現が分化にともない誘導され、細胞内オルガネラから細胞形質膜へと局在を変えることを発見した。これは、液胞型ATPaseの局在と特異的pHの形成とが、密接な関係にあることを明らかにしたと言える。これらの成果は、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。