

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

特集 プロジェクト研究

二井 将 光*

Inside Acidic Organelles : Understanding roles of protons from molecular, organelle, cellular and animal levels

Key Words : オルガネラ, リソソーム, V-ATPase, プロトンポンプ

プロトン(H^+)の濃度(pH)あるいは濃度差(ΔpH)は生物において極めて重要な役割を果たしている。ATP合成酵素は最近から動植物のミトコンドリアや葉緑体に至るまで普遍的に存在し、 ΔpH と H^+ の輸送によって形成される膜電位($\Delta\phi$)を駆動力として生物のエネルギー貨幣ともいべきATPを合成している。身近なところでは、ヒトの胃の内腔が酸性でpHは約1になまることはよく知られている。私達はATP合成酵素や胃酸分泌酵素の構造・反応機構や遺伝子の転写調節などの研究に成果を上げてきた。

戦略的基礎研究事業のプロジェクトとして採択された「酸性オルガネラの形成とその機能に関する研究」は細胞内のオルガネラ(細胞内小器官)の内部のpHに注目している。

pH指示薬であるアクリジンオレンジを培養細胞に加えると、細胞質に黄からオレンジ色の蛍光を持つ多数の顆粒が観察される(図1)。これらの顆粒はエンドソーム、リゾーム、シナプス小胞などのオルガネラであり、蛍光はオルガネラ内部のpHが6.5~4.5という酸性であることを示している(図2)。内部のpHはエンドソームが6~6.5、リソソームが4.5というように特異的な値を示しており、オルガネラの機能に必須である。いずれのオルガネラも

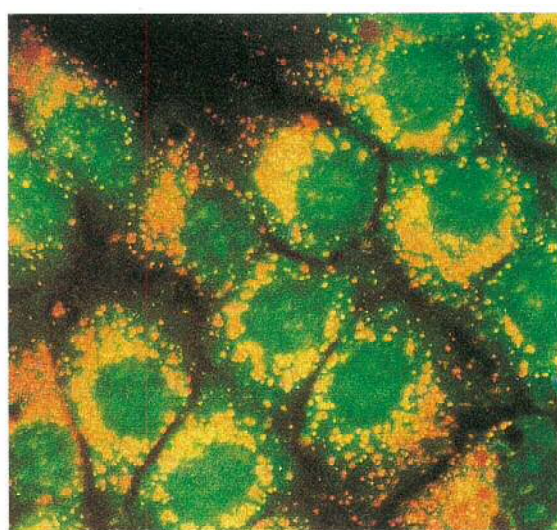


図1 動物細胞に存在する内部が酸性のオルガネラ
マウス肝細胞BNL CL. 株をアクリジンオレンジで染色した。黄からオレンジ色の蛍光を持つ顆粒が酸性オルガネラである。

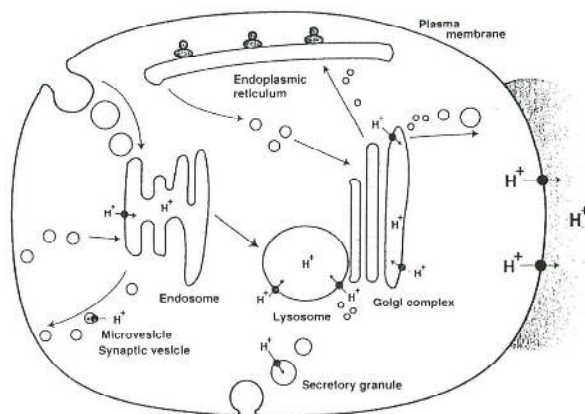


図2 細胞内に存在する酸性オルガネラ
細胞内に存在する多彩な酸性オルガネラを模式的に示した。



*Masamitsu FUTAI
1940年5月13日生
1964年東京大学薬学部卒業
現在、産業科学研究所・生体応答科学部門・生体膜分子学研究分野室、教授、薬博、生化学・分子生物学
TEL 06-6879-8480
FAX 06-6875-5724
E-Mail m-futai@sanken.osaka-u.ac.jp

エンドサイトーシス, エキソサイトーシスなどの細胞膜の動態を介して, 情報伝達, 栄養物質の取り込み, 感染防御などの多彩な機能に関与している。

このように書いてくると, 「内部の酸性 pH がなぜ必要なのか?」「なぜオルガネラによって内部 pH が異なるのか?」「どのような機構で内部の pH が形成され, どのように調節されているのか?」といった疑問がわいてくるのは当然である。しかし, 教科書あるいは総説を見ても, 納得のいく答えは得られない。私達の研究はこの素朴な疑問に対して普遍的な答えを得ることを目指している。すなわち生物の多彩な機能の根底にあるオルガネラの内部環境を細胞生物学, 生化学や分子生物学の手法を用いて明らかにしたいと考えている。

オルガネラの内部が酸性になるためには, H^+ が内部に輸送されなければならない。この役割を果たしているのは H^+ ポンプである。このポンプは酵母の液胞 (Vacuole) や動植物の液胞系のオルガネラに見出されたことから V-ATPase (液胞型 ATPase) とよばれている。V-ATPase はエネルギー貨幣である ATP を ADP とリン酸に分解し, 生じるエネルギーを駆動力として H^+ をポンプしている。V-ATPase の阻害剤を加えると, H^+ はポンプされなくなり, リソゾームやエンドソームの内部は中性になり, 各オルガネラの本来の機能は見られなくなる。

V-ATPase のサブユニット構造や反応機構は ATP 合成酵素とよく似ている (図 3)。ATP 合成酵素は F 型 ATPase とよばれ, 逆反応として ATP

を分解し H^+ を輸送することができる。V-ATPase としての特徴は H^+ 輸送路を形成しているサブユニットにある。私達は二つのサブユニット (110kDa, 16kDa) がプロトン輸送路であり同時に pH センサーの役割を果たしていると考えている。すなわち, 内部の pH が特定の値, たとえば 6 になったら, プロトン輸送路を閉じるような調節があるに違いないと考えている。

V-ATPase のもう一つの面白さは, いろいろなオルガネラに局在し, 細胞によっては最外層の細胞形質膜にも存在していることである。私達は二つのサブユニット 110kDa と 16kDa がそれぞれ複数種存在しており, オルガネラ内部 pH の特異性と V-ATPase の機能の多様性に関与していると考えている。そこで酵母, 線虫, マウスをモデル生物として用いて, 細胞あるいはオルガネラに特異的に V-ATPase が発現している機構を明らかにしたいと考えている。線虫では 16kDa サブユニットのイソフォームが細胞特異的に発現しているという結果, マウスでは 110kDa サブユニットのイソフォームが 3 種存在するという結果を既に得ている。また 16kDa サブユニットを発生の時期あるいは組織に特異的に欠失するマウスを得るべく努力している。これによって酸性オルガネラを介する生理機能を組織特異的に解析できるようになると考えている。

「どのような機構で内部の pH が形成されるのか」という疑問に戻ると, 実は V-ATPase だけでは説明できない。内部 pH の多様性を作り出しているものとしてアニオン・チャネル, 各種のトランスポーター, さらには各オルガネラの膜への特異的なタンパクを運んでいる因子も考えなければならない。V-ATPase は膜電位によって調節されている。したがって, あるオルガネラの内部に H^+ が輸送されると, 膜電位が形成され, H^+ はある程度以上は輸送されなくなる。しかし同時にアニオン・チャネルである Cl^- チャネルによって Cl^- が内部に輸送されると, 膜電位が低くなり H^+ はさらに輸送されるようになる。すなわちアニオン・チャネルが存在することによって, オルガネラの内部の pH はさらに酸性になる。実際にシナプス小胞では Cl^- チャネルが積極的な役割をしているという結果を得ている。これに対して酵母の液胞や副腎のクロマフィン小胞では, 異なる機構も働いているように見える。酸性オルガネラにどのようなアニオン・チャネルがあるのか,

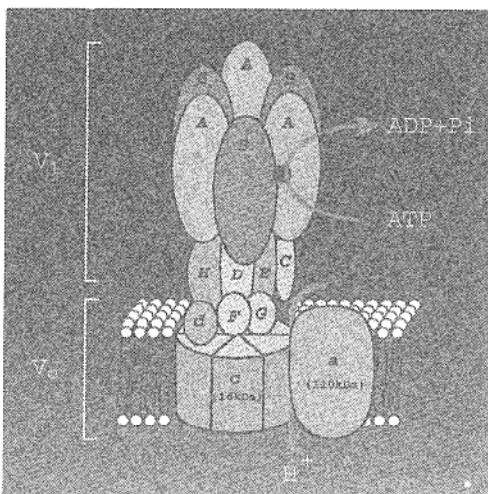


図 3 酸性オルガネラに存在する H^+ ポンプ V-ATPase 酸性オルガネラ膜に局在している V-ATPase のサブユニット構造を模式的に示した。

実体を明らかにすべく研究を進めている。

V-ATPaseのH⁺輸送路サブユニット, アニオン・チャンネル等を含めて, オルガネラ内部のpHを形成している因子が, どのようにして特定のオルガネラに組み込まれるのか, この機構も同時に明らかにしたいと考えている。オルガネラ形成機構の研究から, 「このオルガネラはエンドソームであり, リソゾームでもシナプス小胞でもない。」というのはどのようにして決定されているかを明らかにできると考えている。

私達は「内部が酸性であるオルガネラはどのような機構を持っているか。」および「新しい酸性オルガネラはあるか。」という方向からも研究を進めている。シナプス小胞をはじめとして, 松果体細胞やランゲルハンス島のβ細胞とα細胞に存在するMicrovesicleにV-ATPaseが存在すること, V-ATPaseの形成するH⁺の電気的なポテンシャル差を駆動力として伝達物質が濃縮されること, などを明らかにしてきた。これらの小胞が細胞膜と融合する機構にも新しい知見が得られようとしている。

さらに胃粘膜の壁細胞にはTubulovesicleとよば

れる小胞が存在している。この小胞には胃酸分泌酵素であるH⁺/K⁺ATPaseが存在しているが, V-ATPaseは存在しない。

Tubulovesicleはヒスタミン刺激によって胃内腔側の細胞膜に融合し, 細胞壁は酸を分泌する状態となることが知られている。この融合機構を詳しく明らかにし, V-ATPaseを持つオルガネラと比較したいと考えている。

以上のように素朴な疑問から出発したオルガネラ内部の酸性pHに対する研究を展開し, オルガネラの機能と形成機構を明らかにする方向で研究を進めている。私達の研究によって細胞生物学と生体エネルギー学という二つの分野を統合するような, 多くの知見を得ることができ, 多彩のオルガネラの実体が明らかにできると考えている。

本研究は産業科学研究所の生体膜分子学研究分野において和田助教授を始めとして研究室の職員と大学院生を中心として進められており, 生態情報制御学研究分野の山口教授, 森山助教授, 理学部の金澤教授, 薬学部の前田教授, 関西医大・生理学教室の山本講師のご協力を得ている。