

細胞の膜表面における局所的 pH の生理的重要性

～ Na⁺/H⁺交換輸送体の研究に基づく新たな概念の提案～

研究ノート

三井 慶治*, 松下 昌史**, 金澤 浩***

Physiological significance of surface pH on cellular membranes

Key Words : pH, Na⁺/H⁺ exchanger, endosome, multivesicular body.

1. はじめに

細胞内の pH 環境の制御は、生命維持の基本的要件である。実際に、細胞内の細胞質 pH は中性付近に、また細胞内小器官の内腔 pH もそれぞれ特有の弱酸性の値に維持されている(図 1A)。

このような細胞内 pH の制御には、H⁺ を膜を横断して輸送するいくつかのトランスポーター、ポンプ、チャネルが関与している。このうち、形質膜や細胞内小器官膜に存在する Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (Na⁺/H⁺

exchanger; NHE と省略) は主要な役割を果たす 1 つである。細胞の膜に存在するポンプによって形成される Na⁺ または H⁺ 勾配を駆動力として H⁺ または Na⁺ を駆動力イオンと反対の方向へ輸送する。NHE の遺伝子は、1989 年に Pouyssegur らにより初めてクローン化されたのを契機として、NHE ファミリーを形成する遺伝子の探索が活発に行われた¹⁾。現在までに、ヒトには比較的相同性の高い 9 つの NHE アイソフォーム (NHE1 ~ NHE9) の存在が報告されている²⁾。さらに、より相同性の低い NHE アイソフォームの存在も指摘されている²⁾。NHE1 ~ NHE5 は、主に形質膜に存在し、Na⁺ 勾配を駆動力に H⁺ を細胞外へ排出することで細胞質の pH を中性付近に維持するために必要である。また、腎臓の尿管上皮での Na⁺ の再吸収にも関与し、血圧の調節に重要な役割を果たしている。マウスでは、NHE1 の機能欠損がてんかんを引き起こすことから、神経系での機能も注目されている。

一方、筆者らは、NHE6 ~ NHE9 は、形質膜ではなく、主に細胞内小器官の膜に存在し、またそれぞれが異なる細胞内小器官の膜に分布していることを明らかにした³⁾。図 1A に示すような細胞内小器官の酸性環境は、小器官膜に存在する V-ATPase による内腔への H⁺ 取込みと、その結果生ずる H⁺ 勾配により細胞質側への H⁺ 排出が起きるが、この流入と排出のバランスによって適正に保たれると考えられている(図 1B)。筆者らは、小器官特有の NHE をロックダウンすることで小器官内腔 pH の酸性化、過剰発現することで小器官内腔 pH がアルカリ側に变化することを明らかにした^{3,4)}。これは、小器官に存在する NHE が内腔からの H⁺ 排出に寄与していることを支持している。しかし、これらの細胞内小器官膜に局在する NHE の細胞中の生理的役割については、形質膜に存在する NHE に比べて研究は



* Keiji MITSUI

1976年5月生
大阪大学 理学研究科 生物科学専攻博士後期課程修了(2004年)
現在、パナソニックヘルスケア社研究員 博士(理学)
E-mail: keiji-mitsui@gmail.com



** Masafumi MATSUSHITA

1976年5月生
大阪大学 理学研究科 生物科学専攻博士後期課程修了(2005年)
現在、大阪大学大学院 理学研究科 助教 博士(理学)
E-mail: mmatsu@bio.sci.osaka-u.ac.jp



*** Hiroshi KANAZAWA

1947年7月生
東京大学 薬学系大学院 博士課程修了(1976年)
現在、大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 薬学博士 教授
E-mail: kanazawa@bio.sci.osaka-u.ac.jp

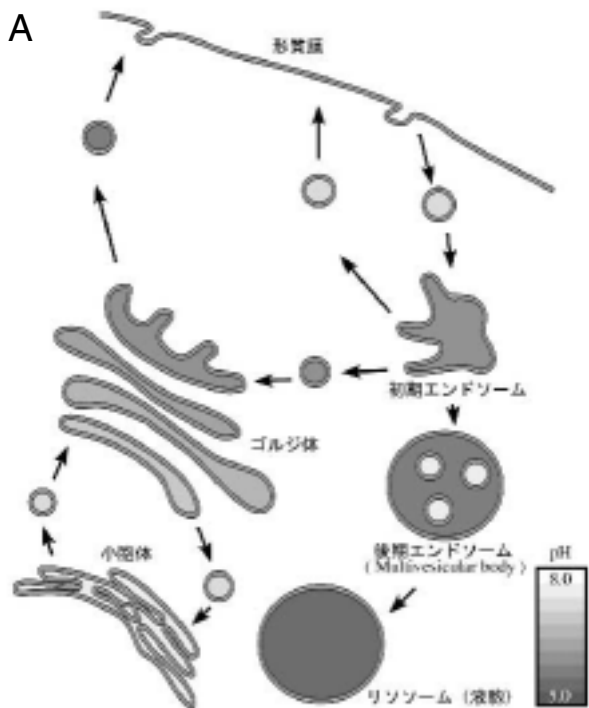


図 1. (A) 細胞内小器官の内部 pH. 細胞内小器官の内部 pH は、それぞれ固有の酸性値を保っている.

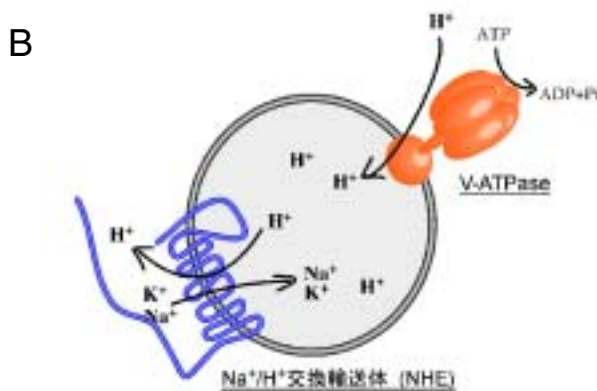


図 1. (B) 細胞内小器官の内部 pH 制御モデル. V-ATPase(ポンプ)による H⁺ 流入と NHE による H⁺ 排出のバランスによって適正な pH に維持される.

遅れており、それぞれがどのような役割を有するのか、不明な点が多く残されている。特にその生理機能と小器官内腔 pH との関連性などについて未解明なままとなっている。本小論では、出芽酵母を対象とした筆者らの成果⁵⁾を中心に、これら問題について、研究の現状と特に生理機能における新規な役割について述べたい。

2. Nhx1p と Multivesicular Body (MVB) 形成
筆者らの研究対象とした出芽酵母にも、2 つの

NHE が存在する。これらの NHE は、それぞれ形質膜と細胞内小器官膜(エンドソーム)に局在する。エンドソーム膜に局在する NHE は、Nhx1p と呼ばれ、ほ乳類細胞の NHE と高い相同性を有している⁶⁾。Emr や Stevens らは、Nhx1p の変異により、本来液胞で働く酵素分子(カルボキシペプチダーゼ Y) が誤って細胞外に分泌することを見出している^{7,8)}。このことは、Nhx1p がゴルジ体から液胞へのタンパク質輸送に関与していることを示している。しかし、Nhx1p がゴルジ体-液胞間のどのような輸送過程に寄与しているのか、エンドソーム pH との関連など、ほとんど明らかにされていない。

我々は、エンドソームでの輸送過程として特徴的な Multivesicular body (MVB) 形成について、Nhx1p との関連を調べた。MVB とは、内部に複数の小胞が存在するエンドソームの総称(図 1A)で、形質膜受容体の分解やある種の酵素分子の液胞内部への輸送に重要な役割を果たしている。出芽酵母において、液胞内で働く酵素分子であるカルボキシペプチダーゼ S (Cps1p) は、小胞体で膜貫通型タンパク質として合成されたのち、ゴルジ体からエンドソームに輸送され、そこで MVB 経路を介して内腔側の小胞に選別され、液胞内で可溶性酵素として成熟化する(図 2A)。正常細胞で Cps1p は、液胞内部に観察されるのに対して、Nhx1p の機能欠損細胞では、Cps1p の液胞近傍(異常エンドソーム)への蓄積が認められた(図 2B)。これまでの MVB 研究では、電子顕微鏡での直接的な MVB 構造の観察により、MVB 形成における異常の有無が判定されていた。しかし、この方法は MVB 形成に必須な因子の解析には十分であったが、MVB 形成へ部分的に関与する因子の解析には不向きであると思われた。定量性がないからである。そこで我々は、定量的に MVB

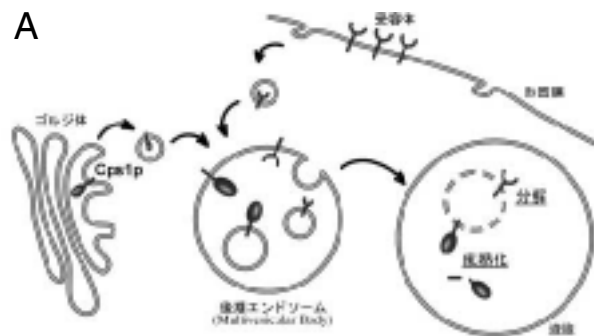


図 2. (A) 出芽酵母における Multivesicular body (MVB) 経路.

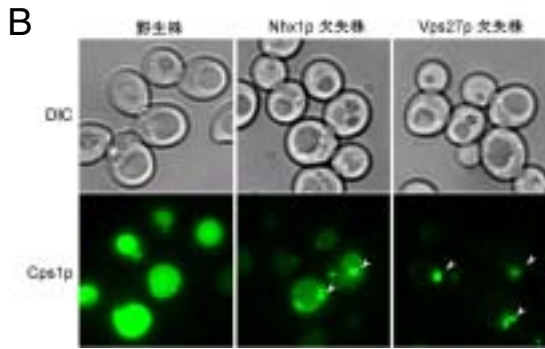


図2. (B) カルボキシペプチダーゼS(Cps1p)の細胞内局在. Cps1pのN末端にGFPを融合した融合タンパク質を酵母細胞に発現させ、蛍光顕微鏡により観察した.

形成を測定できる *in vitro* アッセイ系を開発した(図3A). 酵母細胞から調製した細胞抽出液に膜不透過性の蛍光試薬(HPTS)を添加しATPを加え37°Cで加温すると、HPTSはMVB形成を介して、特異的にエンドソーム小胞に取り込まれた(図3B). また、取り込まれない過剰なHPTS蛍光を蛍光クエンチャー(DPX)により消光させることで、エンドソームに取り込まれたHPTS蛍光のみを定量することに成

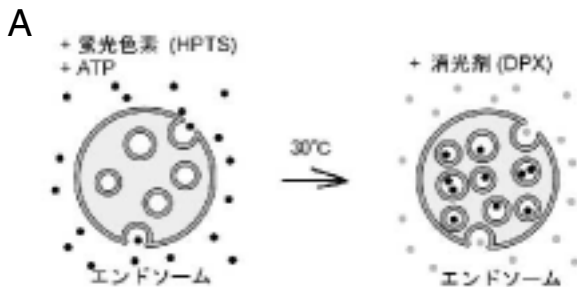


図3. (A) MVB形成の *in vitro* アッセイ系.

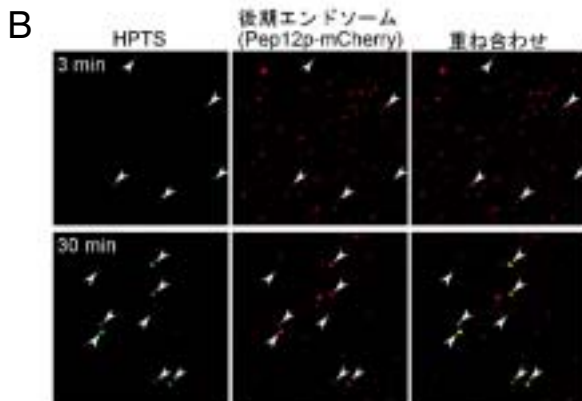


図3. (B) 酵母抽出液と蛍光色素(HPTS)を混合し、3 minまたは30 min加温後の蛍光像. 取り込まれたHPTS(緑)と後期エンドソームに存在するPep12p-mCherry(赤)との共局在が観察された.

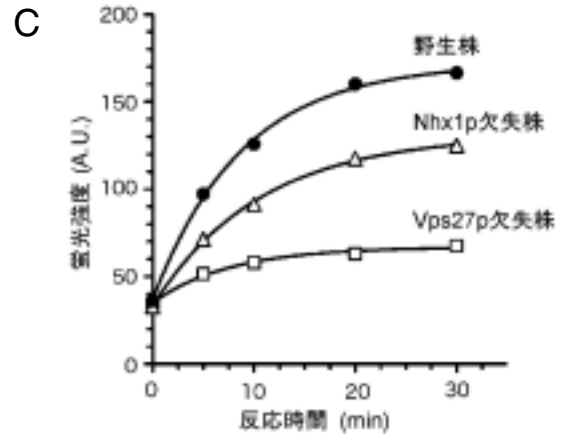


図3. (C) 取り込まれたHPTS蛍光量の時間変化. 各時間において、取り込まれたHPTS量を蛍光光度計により測定した.

功した(図3C). このエンドソームへのHPTS取り込みを指標にしてMVB形成を検討すると、Nhx1p欠失株のMVB形成能は野生株と比較して約40%減少していた(図3C). これらの結果は、Nhx1pがエンドソームでのMVB形成に関与していることを強く示唆している.

3. Nhx1pとESCRT複合体

酵母の遺伝学的・生化学的な解析によって、これまでにMVB形成に関わる多数の因子群が同定されている¹⁰⁾. 現在、図4Aに示すようなESCRT(endosomal sorting complexes required for transport)-0, I, II, IIIと呼ばれる4つの複合体がエンドソーム膜に集合し、それぞれが協調して役割を果たすことによって、エンドソーム内腔側への小胞形成や積荷タンパク質の選別を行っていると考えられている. 筆者らは、Nhx1pがESCRT複合体群の機能に関与することを新たに見出した⁵⁾. Nhx1p機能欠失株では、ESCRT-0(Vps27p)複合体の細胞内局在が変化し、エンドソーム膜結合が減少していた(図4B). ESCRT-0は、その構成要素Vps27p内のFYVEドメインと呼ばれる脂質結合モチーフとエンドソーム膜特異的に存在するフォスファチジルイノシトール3-リン酸(PI3P)との相互作用を介してエンドソーム膜に結合すると考えられている¹¹⁾. さらに興味深いことに、他のタンパク質において、FYVEドメインとPI3Pとの結合がpH依存的であることが報告されている¹²⁾. 我々は、酵母細胞を様々なpHのバッファーに懸濁し、そこにH⁺イオノフォアを加え

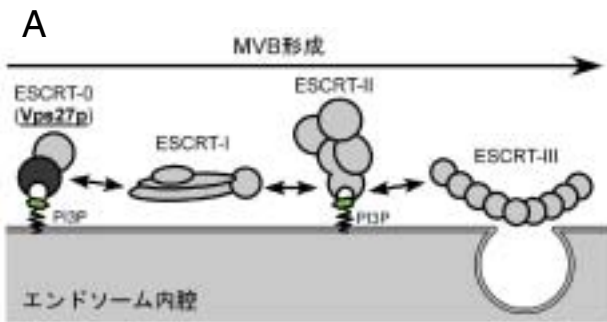


図4. (A) MVB 形成に関わる ESCRT 複合体 .

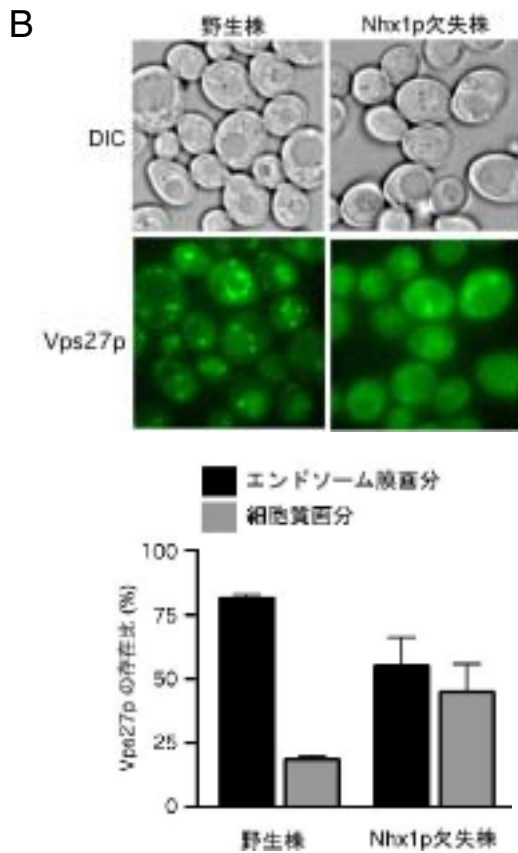


図4. (B) ESCRT-0(Vps27p) 複合体の細胞内局在とエンドソーム膜結合量. GFP を融合した GFP-Vps27p の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した. また, 細胞破碎液を遠心により, エンドソーム膜と細胞質に分画し, それぞれの画分における Vps27p の存在量をウエスタンブロッティング解析で調べた.

ることで, 細胞質 pH を強制的に変化させた. 中性 pH で, Vps27p はエンドソーム膜に結合せず大部分が細胞質に存在していたが, 酸性 pH (< 6.0) では, エンドソーム膜への結合が観察された. さらに, in vitro アッセイ系において反応液 (エンドソーム外部) の pH を変化させ, MVB 形成能を調べると, 反応液の pH が中性から酸性側にシフトするにつれ,

MVB 形成能が増大した. これらのことは, エンドソーム膜表面 pH の酸性化が, ESCRT-0 複合体のエンドソーム膜との結合の引き金となり MVB 形成を促進することに重要であることを示している. 一方, 人工脂質小胞と酵母から精製した ESCRT 複合体を用いた完全再構成系により MVB 形成に必須な最少因子が報告されている⁹⁾が, その中には Nhx1p は含まれておらず pH の重要性も指摘されていなかった. すなわち我々の結果から, Nhx1p による pH 環境の制御が MVB 形成に寄与していることが初めて明らかとなった.

4. まとめ

ここで, Nhx1p のイオン輸送活性と MVB 形成制御とが関連するという我々の発見の重要性についてさらに考察したい. 前述したように, 細胞内小器官に存在する NHE は, 小器官内腔側から H⁺ を細胞質側に排出することにより, 小器官内腔 pH のアルカリ化に寄与している. これまで, 細胞内小器官の内部 pH 制御が, NHE の生理機能として重要視されてきた. 出芽酵母の Nhx1p でも同様に, Nhx1p を欠失することでエンドソーム内腔 pH が酸性化することを我々は明らかにしている⁵⁾. しかし, MVB 形成は酸性 pH により促進されるため, Nhx1p 機能欠失による MVB 形成不全の原因に関して, エンドソーム内腔 pH の一層の酸性化では明らかに説明できない. そこで現在, MVB 形成における Nhx1p の役割として, 図 5A に示すようなモデルを考えている. Nhx1p は, エンドソーム内腔から

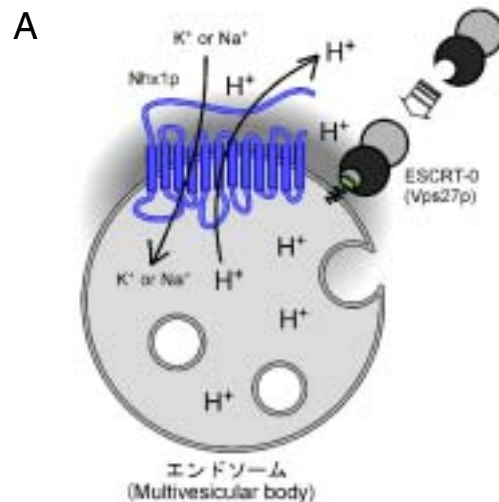


図5. (A) MVB 形成における Nhx1p の役割 .

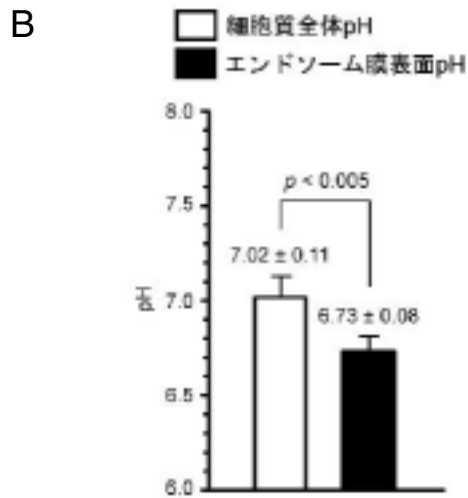


図5. (B) 細胞質全体 pH とエンドソーム膜近傍 pH . pH 測定用プローブ (pHluorin) を細胞質全体またはエンドソーム膜表面に発現させることによって, 細胞質全体 pH とエンドソーム膜近傍 pH を測定した .

H⁺を排出することで, 細胞質側のエンドソーム膜近傍 pH を酸性化する. この局所的なエンドソーム膜表面の酸性化は, ESCRT 複合体のエンドソーム膜への結合を促進することによって, 効率的な MVB 形成に関与している. H⁺は非常に小さく, 細胞内の拡散速度も速い. そのため, エンドソーム膜の表面近傍のような局所的な pH 環境が存在しうるので疑問であった. しかし我々は, エンドソーム膜表面の pH が細胞質全体より微小ながら低い pH を維持していることを明らかにした(図 5B). このことは, エンドソーム膜表面の局所的な pH 環境の存在や重要性を示した初めての成果である. おそらく小胞表面にマイナスの電場があって, H⁺は一過的に小胞表面近傍に局在すると推定される. この証明は今後さらに必要である. 最近, 筆者らは哺乳類細胞のエンドソーム膜に局在する NHE アイソフォーム(NHE6)が鉄受容体(トランスフェリン)のエンドサイトーシスに寄与することを報告した¹³⁾. このエンドサイトーシスにおいても, 細胞質側の膜表面にクラスリンなどのエンドサイトーシス関連因子がリクルートされることが重要である. このことは, NHE の機能として細胞内小器官内腔だけでなく, 細胞質側表面の局所的な pH 制御が NHE の一般的な生理機能として重要であることを示唆している. 今後, 細胞の膜表面 pH という新たな概念に基づく研究が, さらに発展することが期待される. 最近

NHE6 の遺伝的機能欠損の家系が見いだされ, 神経遅滞を引き起こすことを報告した¹⁴⁾. 分子レベルの研究が, 疾患の改善に結びつく日を期待したい.

参考文献

- Sardet, C., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1989) *Cell* **56**, 271-280
- Brett, C. L., Donowitz, M., and Rao, R. (2005) *Am. J. Physiol.* **288**, C223-C239
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K., and Kanazawa, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 1561-1572
- Ohgaki, R., Matsushita, M., Kanazawa, H., Ogihara, S., Hoekstra, D., and van Ijendoorn, S. C. D. (2010) *Mol. Biol. Cell* **21**, 1293-1304
- Mitsui, K., Koshimura, Y., Yoshikawa, Y., Matsushita, M., and Kanazawa, H. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 37625-37638
- Nass, R., and Rao, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21054-21060
- Bankaitis, V. A., Johnson, L. M., and Emr, S. D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9075-9079
- Rothman, J. H., and Stevens, T. H. (1986) *Cell* **47**, 1041-1051
- Wollert, T., and Hurley, J. H. (2010) *Nature* **464**, 864-873
- Hurley, J. H., and Hanson, P. I. (2010) *Nature Reviews* **11**, 556-566
- Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 413-423
- Lee, S. A., Eyeson, R., Cheever, M. L., Geng, J. M., Verkhusha, V. V., Burd, C., Overduin, M., and Kutateladze, T. G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13052-13057
- Lou, X., Matsushita, M., Numaza, M., Taguchi, A., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2011) *Am. J. Physiol.* in-press
- Takahashi, Y., Hosoki, K., Matsushita, M., Funatsuka, M., Saito, K., Kanazawa, H., Goto, Y., and Saitoh, S. *Am. J. Med. Genet. B.* (2011) **156**, 799-807