

研究ノート

マウス脳における液胞型プロトンポンプ V-ATPase G1 サブユニット遺伝子の発現量は転写後調節によって制御される

¹川村 暢 幸 ²茸谷 麻 帆 ³和田 戈 虹¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助教（有期）²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・6年次生³同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授G1 subunit of Vacuolar-type H⁺ pump (V-ATPase) expression level was controlled by a post transcriptional regulatory mechanism in the mouse brain.¹Nobuyuki Kawamura ²Maho Nabatani ³Kahon Wada¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Assistant Professor (contract)²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, A sixth-year undergraduate³Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

1. はじめに

プロトンポンプ ATPase (ATP の加水分解と共役しプロトン H⁺ を輸送する H⁺-ATPase) は、原核・真核の区別なく、生体において重要な役割を果たしている。プロトンポンプは大きく 3 種類に分類される。1 つ目は、胃酸分泌に関与している H⁺/K⁺-ATPase であり、P 型 ATPase に分類される。2 つ目は、真核細胞内のミトコンドリアや葉緑体に局在し、細胞に必要な ATP の大半を合成している F 型 ATPase である。3 つ目として、細胞内の多彩なオルガネラ (分泌小胞、被覆小胞、リソソーム、エンドソーム、ゴルジ装置、シナプス小胞、ラメラボディなど) の内腔や細胞外コンパートメント (骨吸収窩、尿管管など) を酸性にしている V 型 ATPase (V-ATPase) が挙げられる (Sun-Wada *et al.* 2003b)。細胞の内外に形成されて

いる酸性環境は、タンパク質分解、小胞輸送をはじめ免疫・神経機能・骨代謝・イオンホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている (Futai *et al.* 2000)。

V-ATPase はオルガネラや形質膜に存在するプロトンポンプであり、膜表在部分であり ATPase 活性を有する V₁ ドメイン (A, B, C, D, E, F, G, H の 8 つのサブユニットからなる) と膜内在部分でありプロトン輸送を行う V₀ ドメイン (a, c, c', d, e の 5 つのサブユニットからなる) から成り、それぞれ多数のサブユニットから構成される複雑な構造をしている (Hinton *et al.* 2009)。V-ATPase を構成するいくつかのサブユニットには、アイソフォームが存在することが知られている。マウスでは a, d, B, C, E, G サブユニットにアイソフォームが存在し (Fig.1)、組織やオルガネラにより異なるアイソフォームを持つ V-ATPase が発現している。

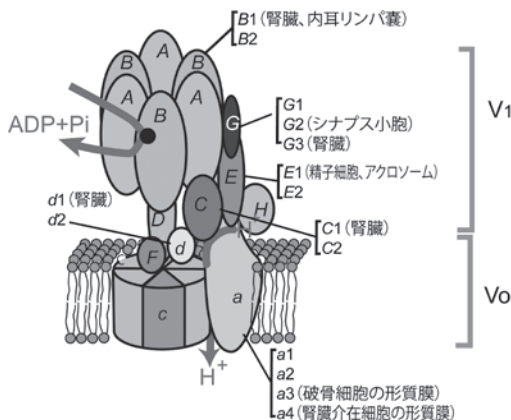


Fig.1 V-ATPase を構成するサブユニット

膜表在部分に存在する *G* サブユニットと *E* サブユニットは結合し、柱状のストークスを形成し、*V*₁ ドメインと *V*₀ ドメインを結合する。

本稿でとりあげる *G* サブユニットは、マウスでは 118 アミノ酸残基からなる 13-kDa のタンパク質であり、*E* サブユニットと結合しストークと呼ばれる柱状の構造体を形作り、*V*₁ ドメインと *V*₀ ドメインを結びつけ、ATP 加水分解によって得られたエネルギーを伝達する役割を担っている (Oot *et al.* 2012)。また、V-ATPase は細胞内の状況に応じて、ATP 加水分解とプロトン輸送の調節を行うが、これは、*V*₁ ドメインと *V*₀ ドメインの結合／解離を調節することによって行われているため、このストークスを形成する *G* サブユニットと *E* サブユニットは ATP 加水分解とプロトン輸送調節の中心的役割を担っていると考えられる。

哺乳類ゲノム中には 3 種類の *G* サブユニットアイソフォームをコードする遺伝子の存在が知られており、それぞれ、*ATP6V1G1*, *ATP6V1G2*, *ATP6V1G3* と呼ばれている (Sun-Wada *et al.* 2003c)。*ATP6V1G1* 遺伝子のコードする *G1* アイソフォームは様々な器官でユビキタスに発現しているが、*ATP6V1G2* 遺伝子のコードする *G2* アイソフォームは脳で特異的に (Murata *et al.* 2002)、*ATP6V1G3* 遺伝子のコードする *G3* アイソフォームは腎臓で特異的に発現している (Sun-Wada *et al.* 2002;

Sun-Wada *et al.* 2003a)。*G2* アイソフォームは脳の中でも神経細胞特異的に発現し、グリア細胞や星状膠細胞では発現していないことが知られている。

V-ATPase は神経細胞のシナプス小胞に発現しており、V-ATPase の形成するプロトン電気化学勾配は神経伝達物質のシナプス小胞への再充填に重要な役割を果たしている (Moriyama *et al.* 1993; Takamori *et al.* 2006; Saw *et al.* 2011)。また、シナプス小胞のシナプス前細胞原形質膜への融合に V-ATPase が関与することが報告されている (Hiesinger *et al.* 2005)。*G2* アイソフォームが神経細胞特異的に発現していることは、こうした特異的な機能に参与していると考えられるが、その点については今日まで明らかにされていない。また、ヒトやマウスをはじめとする実験動物において *ATP6V1G2* 遺伝子の変異に起因する疾患等も報告されていない。今回、我々は *Atp6v1g2* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し解析を行ったところ、*Atp6v1g2* 遺伝子欠損マウスは発生や成長、行動に異常を示さないことを見いだした。また、*Atp6v1g2* 遺伝子欠損マウスの脳において *G1* アイソフォームタンパク質の発現量が転写後調節によって顕著に上昇していることを見いだした。この結果は、脳における V-ATPase 活性の量的な調節が生理的に重要であることを示唆するものである。本研究で作製した *G2* 欠損マウスは、神経特異的な V-ATPase 機能をターゲットとする治療薬の評価モデルとして有用であると考えられる。

2. 方法

2-1. 抗体

V-ATPase *G1*, *G2*, *G3* アイソフォームに対する抗体は、各アイソフォームのペプチド配列を抗原として免疫したウサギから得た血清 (医学生物学研究所(株)に委託) から、同ペプチドを結合させたアフィニティカラムを用いて精製して得た。V-ATPase *a1* アイソフォームに対する抗体は、合成ペプチド配列を抗原として免疫

したニワトリから得た脾臓細胞とミエローマ細胞 (MuH1) とを融合させたハイブリドーマの培養上清 (医学生物学研究所(株)に委託) から、同ペプチドを結合させたアフィニティカラムを用いて精製して得た。マウス β -catenin に対する抗体は Becton Dickinson 社から購入した。HRP 標識した二次抗体は Jackson Immuno Research 社から購入した。

2-2. *Atp6v1g2* 遺伝子欠損マウス

Atp6v1g2 遺伝子欠損マウスの作製については、以前に報告した (Kawamura *et al.* 2015)。*Atp6v1g2* 遺伝子の遺伝子型決定は野生型アレル、欠損型アレルを特異的に増幅するプライマーと ExTaq (TaKaRa 社) を用いて PCR 法により行った。C57Bl/6 マウスは SLC 社より購入した。全ての動物実験は該当する法律・基準の事項に基づいて定めた、同志社女子大学動物実験指針に則って実験を行った。

2-3. イムノブロット法による V-ATPase サブユニットアイソフォームの定量

各遺伝子型マウスから抽出した脳と腎臓は 50mM Tris-HCl (pH7.4), 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride 溶液に Complete® プロテアーゼ阻害剤 (Roche 社) を加えた抽出液を用いてタンパク質を可溶化した。タンパク質濃度は BCA protein Assay Kit (Pierce 社) を用いて定量した。イムノブロットは以前に記載した方法により行い (Murata *et al.* 2002)、Western Blotting Substrate Plus system (Pierce 社) を用いて化学発光を LAS-4000 mini system (GE Healthcare 社) を用いて検出し、発光強度を ImageQuant TL ソフトウェア (GE Healthcare 社) を用いて定量、数値化した。

2-4. 定量的 real-time PCR 法による G サブユニットアイソフォーム mRNA の定量

各遺伝子型マウスから抽出した脳と腎臓は重量を測定した後、液体窒素を用いて急速凍結し

Table 1. 定量的 real-time PCR 法に用いた PCR primer の配列

遺伝子	primer 名称	配列
<i>Atp6v1g1</i>	G1-S201	5'-ccctcagcaatggcgagtcagtc-3'
	G1-A201	5'-tcagcctgggctctcttgg-3'
<i>Atp6v1g2</i>	VG2-S201	5'-aagcggcgagcggagaagtg-3'
	VG2-A202	5'-gccgcctgctgctct-3'
<i>Atp6v1g3</i>	VG3-S201	5'-agaaaagaaaagaaagcactga-3'
	VG3-A201	5'-tctatgcctatggacttggatgtg-3'
<i>Gapdh</i>	GAPDH-S1	5'-tcccgtagacaaaatggaaggt-3'
	GAPDH-A1	5'-tgtgccgtgaattgccgtgagt-3'

各アイソフォーム mRNA を特異的に増幅する PCR primer の配列を示した。上流側と下流側の primer 間にイントロンをはさみ、ゲノム DNA を鋳型とした増幅を抑制するように設計した。

凍結した組織から RNeasy mini kit (QIAGEN 社製) を用いて RNA を抽出し OD 計測法により定量した。抽出した 1500ng の RNA から SuperScript VILO cDNA synthesis kit (ThermoFisher Scientific 社) を用いて cDNA を合成した。*Atp6v1g1*, *Atp6v1g2*, *Atp6v1g3*, *Gapdh* 遺伝子について定量的 real-time PCR 法を行い (Kawamura *et al.* 2015)、ABI Prism7000 system (ThermoFisher Scientific 社) を用いて反応、検出を行った。用いた PCR primer 配列は Table 1 に示した。各サンプルの G アイソフォーム mRNA の相対発現量は $\text{ratio} = E_{\text{Gapdh}}^{(\text{CqGapdh})} / E_{\text{Gn isoform}}^{(\text{CqGn})}$ として計算し、各遺伝子型間における発現量の比を $\text{fold} = \frac{E_{\text{Gn isoform, genotypes}}^{(\text{Mean (CqGn, wild)} - \text{Mean (CqGn, genotypes)})}}{E_{\text{Gapdh, genotypes}}^{(\text{Mean (CqGapdh, wild)} - \text{Mean (CqGapdh, genotypes)})}}$ として計算した (Pfaffl. 2001)。

3. 結果

3-1. *Atp6v1g2* 遺伝子欠損マウスの表現型

我々は、G2 アイソフォームの生体内での役割について解明するため、*Atp6v1g2* 遺伝子を遺伝的に欠損したマウスを作製した。まず、*Atp6v1g2* 遺伝子のヘテロ欠損マウス (*Atp6v1g2*^{+/-}) は、発生・生育ともに正常で、交配による産仔にも異常は見られなかった。*Atp6v1g2*^{+/-} マウス同士を交配し、*Atp6v1g2* 遺伝子ホモ欠損マウス (*Atp6v1g2*^{-/-}) の作製

Table 2. *Atp6v1g2*^{+/+} マウス交配により得た仔マウスの遺伝子型

遺伝子型		
+/+	+/-	-/-
14	36	17
(21%)	(54%)	(25%)

得られた仔マウス (3~4 週齢) の尾から得たゲノム DNA を用いて PCR 法により遺伝子型を行った。

を行った。生まれた仔マウスは、生後 3 週齢で PCR 法により遺伝子型の決定を行ったところ、*Atp6v1g2*^{-/-} マウスの生存が確認され、発生過程や出生後の異常による致死性は認められ

なかった。また、各遺伝子型の産仔数は、ほぼメンデル則に則っていることが確認された (Table 2)。得られた *Atp6v1g2*^{-/-} マウスについては、1 年以上飼育を継続したが、行動異常や明らかな疾病への罹患は確認されなかった。

3-2. *Atp6v1g2* 遺伝子欠損マウスにおける G1, G2 アイソフォームタンパク質の発現量

G1 アイソフォームはユビキタスに発現し、G2 アイソフォームは脳特異的に発現し、G3 アイソフォームは腎臓特異的に発現する。我々

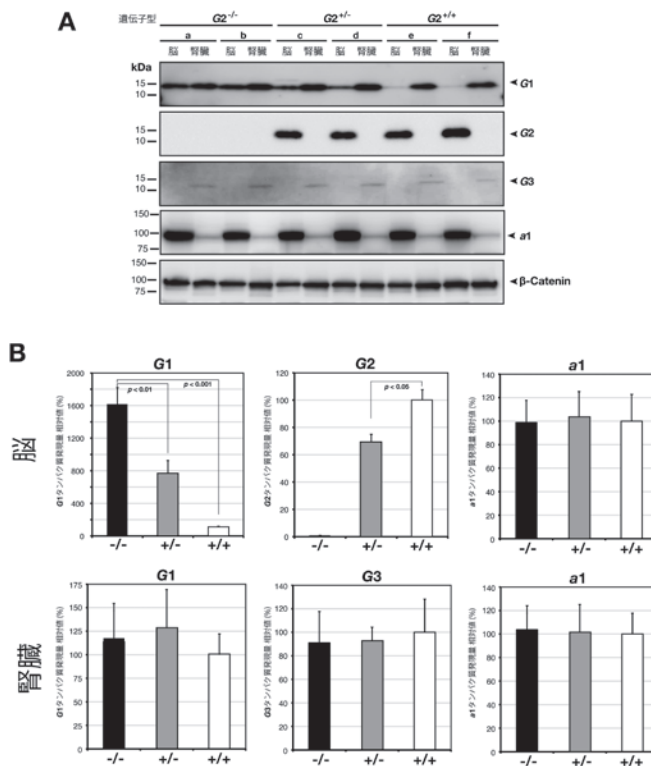


Fig.2 *Atp6v1g2*^{-/-} マウスに脳と腎臓における V-ATPase G サブユニットタンパク質の発現量

(A) *Atp6v1g2*^{+/+} マウス (レーン e, f)、*Atp6v1g2*^{+/-} マウス (レーン c, d)、*Atp6v1g2*^{-/-} マウス (レーン a, b) から得られた脳と腎臓の組織抽出液を電気泳動し、PVDF 膜に転写し、G1, G2, G3, a1 アイソフォームを特異的に認識する抗体を用いてイムノブロット法により各アイソフォームを検出した。V-ATPase ポンプアセンブリーの量を a1 アイソフォームを用いて比較した。泳動したタンパク質量の内部標準として β -catenin を用いた。

(B) 各シグナルの発光強度を数値化し、各アイソフォームの *Atp6v1g2*^{+/+} マウスでの発現量を 100% とした相対値を示した。各遺伝子型それぞれ、4 匹のマウスから組織抽出液を調製し、3 回ずつ独立に実験を行いばらつきをエラーバーで示した。

は、*Atp6v1g2*^{-/-} マウスにおける *G1*, *G2*, *G3* 各アイソフォームの発現量を確認するため、脳と腎臓の組織抽出液を用いてイムノプロット法により解析を行った (Fig.2)。その結果野生型マウスにおいては、*G1* アイソフォームは脳、腎臓両組織に発現しているが、脳での発現量は腎臓に比べて低く、*G2* アイソフォームは脳特異的に、*G3* アイソフォームは腎臓特異的に発現が見られた。*Atp6v1g2*^{-/-} マウスでは、脳における *G2* アイソフォームの発現が見られなくなっており、*Atp6v1g2* アリルが *G2* アイソフォームタンパク質の欠損を導くことが確認された。また *Atp6v1g2*^{+/-} マウスでは、*G2* アイソフォームタンパク質の発現量は野生型の約70% (有意) に低下していた。*G1* アイソフォームの腎臓における発現量は変化が見られないが、脳では、有意に発現量が上昇していた。*G3* アイソフォームの腎臓における発現量は変化が見られなかった。*V*₀ ドメインを構成する *a1* アイソフォームタンパク質の発現量は各遺伝子型間で変化しておらず、V-ATPase のポンプアセンブリー全体の量は各遺伝子型間で変化していないと考えられる。

3-3. *Atp6v1g2*^{-/-} マウスにおける *G1*, *G2* アイソフォーム mRNA の発現量

Atp6v1g2^{-/-} マウスでは、脳における *G1* ア

イソフォームタンパク質の発現量が上昇していた。転写段階においても同様の変化が見られるか否かについて、定量的 real-time PCR 法を用いて、*G1*, *G2*, *G3* 各アイソフォームをコードする遺伝子の mRNA 量を定量したところ、*G3* アイソフォームの mRNA 量は各遺伝子型間で差がなかった。この結果は、タンパク質レベルでの結果と一致する。*G2* アイソフォームの mRNA 量は *Atp6v1g2*^{-/-} マウスでは検出限界以下に低下、*Atp6v1g2*^{+/-} マウスでは *Atp6v1g2*^{+/+} に比べ、減少傾向にあることが明らかになった。*G1* アイソフォームの mRNA 量については、特に脳においてタンパク質量には大きな変化が見られたのに対し、遺伝子型間で発現量の差は見られなかった。

4. 考察

ほ乳類の生体内の細胞内外における酸性環境の機能は多岐にわたっているが、その酸性環境は構造的多様性を有する V-ATPase によって形成されている。V-ATPase のサブユニットアイソフォームの多様性はこうした多様な機能に対応するために進化的に獲得されてきたものと考えられる。ほ乳類では *G* サブユニットには3つのアイソフォームの存在が知られており、*G1* アイソフォームはユビキタスに、*G2* アイソフォームは脳の神経細胞特異的に、*G3* アイ

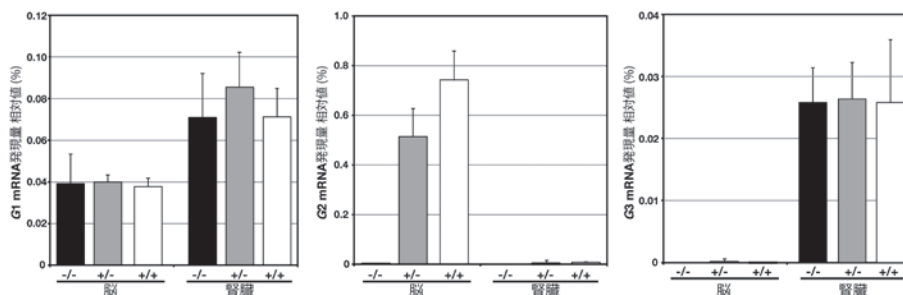


Fig.3 *Atp6v1g2*^{-/-} マウスに脳と腎臓における V-ATPase *G* サブユニット mRNA の発現量

各遺伝子型マウスの脳と腎臓から得られた total RNA を用いて cDNA を合成し、各アイソフォームの mRNA 発現量を定量的 real-time PCR 法により定量した。各アイソフォームの mRNA 発現量を *Gapdh* mRNA 発現量で標準化した相対量を示した。*Atp6v1g2*^{+/+} マウス 4 匹、*Atp6v1g2*^{+/-} マウス 3 匹、*Atp6v1g2*^{-/-} マウス 4 匹の組織から抽出した total RNA を用いて定量を行い、ばらつきをエラーバーで示した。

ソフォームは腎臓特異的に発現している。*G2*, *G3* アイソフォームはそれぞれ、神経細胞と腎臓に特異的な役割を担っていることが考えられ、今回我々は、*G2* アイソフォームを欠損させることによりその機能解析を試みたが、明確な表現型を見いだすことができなかった。これは、欠損した *G2* アイソフォームの機能を *G1* アイソフォームの発現量を上昇させることで代替した結果と考えている。

今回我々は、マウス脳において、*G2* アイソフォームを欠損しても、細胞内の V-ATPase の量や活性を監視し、その全量に変化しないよう調節されることを見いだした。*Atp6v1g2*^{-/-} マウスにおける *G1* アイソフォームの mRNA 量は各遺伝子型ではほぼ一定であったにもかかわらず、タンパク質の発現量は *Atp6v1g2*^{+/-} マウスでは野生型の約 8 倍、*Atp6v1g2*^{-/-} マウスでは野生型の約 16 倍に上昇していた。この結果から *G1* アイソフォームの発現量調節は転写レベルではなく、転写後調節により行われているものと考えられる。

腎臓や内耳リンパ嚢に特異的に発現する *B1* アイソフォームを欠損した腎髄質間細胞では、本来 *B1* アイソフォームが発現する細胞膜表面に *B2* アイソフォームを輸送することでその機能を代替していることが報告されているが、*B2* アイソフォームの発現量は mRNA レベル、タンパク質レベル共に遺伝子型によらず一定であり、転写や翻訳による発現量調節は、行われていないことが報告されている (Paunescu *et al.* 2007)。また、ファゴソーム内腔の酸性化に寄与する *a3* アイソフォームを欠損させた場合、*a1* あるいは *a2* アイソフォームにより部分的にその機能が代替されるが、完全には代替されないことが明らかになっている (Sun-Wada *et al.* 2009)。これら細胞内における V-ATPase の輸送メカニズムについては、V-ATPase と細胞骨格の相互作用によるとの報告がなされている (Zuo *et al.* 2006)。*G* サブユニットと共にストークスを形成する *E* サブユニットの *E1* アイソフォームに関しては、*E1* アイソフォーム

mRNA にリボヌクレオタンパク質である HuR が結合して、mRNA の安定性を高め、発現量の維持に寄与していることが明らかになっている (Jeyaraj *et al.* 2005)。また、*G1* アイソフォームタンパク質の分解について、rab7/RILP (Rab-interacting lysosomal protein) の制御によりプロテアソームへ輸送され分解されることが明らかになっている (De Luca *et al.* 2014)。

このように、V-ATPase のタンパク質発現量の調節や細胞内局在制御機構には、様々なメカニズムが関わっている。今回我々の提示する、*G1* アイソフォームの発現量が転写後調節により行われているという知見は、これまで他のアイソフォームを含め提唱されたことはなく、V-ATPase の発現量調節機構について新たな機構の存在を提示するものである。しかし、その詳細なメカニズムに関しては未解明のままであり、今後、この発現量調節メカニズムを明らかにすることで、*G2* アイソフォームの生体内での役割を明らかにしていくことが必要であると考えている。

5. 謝辞

本研究の一部は、2015 年度同志社女子大学研究助成金 (個人研究) により行われた。

6. 引用文献

- De Luca, M., L. Cogli, C. Progidia, V. Nisi, R. Pascolutti, S. Sigismund, P. P. Di Fiore and C. Bucci. (2014) RILP regulates vacuolar ATPase through interaction with the V1G1 subunit. *J Cell Sci.* 127(Pt 12): 2697-2708.
- Futai, M., T. Oka, G. Sun-Wada, Y. Moriyama, H. Kanazawa and Y. Wada. (2000) Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J Exp Biol.* 203(Pt 1): 107-116.
- Hiesinger, P. R., A. Fayyazuddin, S. Q. Mehta, T. Rosenmund, K. L. Schulze, R. G. Zhai, P. Verstreken, Y. Cao, Y. Zhou, J. Kunz and H. J. Bellen. (2005) The v-ATPase V₀ subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle

- exocytosis in *Drosophila*. *Cell*. 121(4): 607-620.
- Hinton, A., S. Bond and M. Forgac. (2009) V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch*. 457(3): 589-598.
- Jeyaraj, S., D. Dakhlallah, S. R. Hill and B. S. Lee. (2005) HuR stabilizes vacuolar H⁺-translocating ATPase mRNA during cellular energy depletion. *J Biol Chem*. 280(45): 37957-37964.
- Kawamura, N., G. H. Sun-Wada and Y. Wada. (2015) Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase leads to G1 subunit upregulation in the brain. *Sci Rep*. 5: 14027.
- Moriyama, Y., H. L. Tsai and M. Futai. (1993) Energy-dependent accumulation of neuron blockers causes selective inhibition of neurotransmitter uptake by brain synaptic vesicles. *Arch Biochem Biophys*. 305(2): 278-281.
- Murata, Y., G. H. Sun-Wada, T. Yoshimizu, A. Yamamoto, Y. Wada and M. Futai. (2002) Differential localization of the vacuolar H⁺ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J Biol Chem*. 277(39): 36296-36303.
- Oot, R. A., L. S. Huang, E. A. Berry and S. Wilkens. (2012) Crystal structure of the yeast vacuolar ATPase heterotrimeric EGC_{head} peripheral stalk complex. *Structure*. 20(11): 1881-1892.
- Paunescu, T. G., L. M. Russo, N. Da Silva, J. Kovacicova, N. Mohebbi, A. N. Van Hoek, M. McKee, C. A. Wagner, S. Breton and D. Brown. (2007) Compensatory membrane expression of the V-ATPase B2 subunit isoform in renal medullary intercalated cells of B1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(6): F1915-1926.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29(9): e45.
- Saw, N. M., S. Y. Kang, L. Parsaud, G. A. Han, T. Jiang, K. Grzegorzczuk, M. Surkont, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, L. Li and S. Sugita. (2011) Vacuolar H⁺-ATPase subunits Voa1 and Voa2 cooperatively regulate secretory vesicle acidification, transmitter uptake, and storage. *Mol Biol Cell*. 22(18): 3394-3409.
- Sun-Wada, G. H., Y. Imai-Senga, A. Yamamoto, Y. Murata, T. Hirata, Y. Wada and M. Futai. (2002) A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem*. 277(20): 18098-18105.
- Sun-Wada, G. H., Y. Murata, M. Namba, A. Yamamoto, Y. Wada and M. Futai. (2003a) Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J Biol Chem*. 278(45): 44843-44851.
- Sun-Wada, G. H., H. Tabata, N. Kawamura, M. Aoyama and Y. Wada. (2009) Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci*. 122(Pt 14): 2504-2513.
- Sun-Wada, G. H., Y. Wada and M. Futai. (2003b) Vacuolar H⁺ pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles. *J Bioenerg Biomembr*. 35(4): 347-358.
- Sun-Wada, G. H., T. Yoshimizu, Y. Imai-Senga, Y. Wada and M. Futai. (2003c) Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene*. 302(1-2): 147-153.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127(4): 831-846.
- Zuo, J., J. Jiang, S. H. Chen, S. Vergara, Y. Gong, J. Xue, H. Huang, M. Kaku and L. S. Holliday. (2006) Actin binding activity of subunit B of vacuolar H⁺-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 21(5): 714-721.

