

## 研究ノート

# マウス肺組織における液胞型プロトン・ポンプ (V-ATPase) $\alpha$ サブユニット・イソフォームの局在

田 畑 裕 幸

薬学部・医療薬学科

人 見 百合子

薬学部・医療薬学科・4年生

川 村 暢 幸

薬学部・医療薬学科

和 田 戈 虹

薬学部・医療薬学科

## 1. 概要

ゴルジ体、リソソーム、エンドソーム、および分泌小胞などのオルガネラ内腔は、ATPの加水分解に共役してプロトンを輸送する液胞型プロトン・ポンプ (V-ATPase) により酸性に保たれている。V-ATPaseは膜表在部分 ( $V_1$ ) と膜内在部分 ( $V_0$ ) の2つのドメインから成り、 $V_1$  ドメインは8種類のサブユニット (A、B、C、D、E、F、G および H) から構成され、ATP加水分解活性をもつ。一方、 $V_0$  ドメインは6種類のサブユニット ( $a$ 、 $c$ 、 $c'$ 、 $c''$ 、 $d$  および  $e$ ) から構成され、プロトンの輸送に機能する。V-ATPaseのサブユニットには複数のイソフォームが存在し、 $V_0$  ドメインの  $a$  サブユニットについては  $a1$ 、 $a2$ 、 $a3$ 、および  $a4$  の4種類のイソフォームが同定されている。 $a$  サブユニット・イソフォームに関するこれまでの研究から、 $a1$ 、 $a2$  および  $a3$  イソフォームは臓器に普遍的に発現するが、 $a4$  イソフォームは腎臓に特異的に発現することが分かった。また、 $a1$ 、 $a2$  および  $a3$  イソフォームの細胞内オルガネラにおける局在は、それぞれ異なることが明らかとなった (Sun-Wada *et al.*, 2004)。特に  $a3$  イ

ソフォームは骨密度が著しく増加する大理石病の原因遺伝子であるなど、生理的に重要であることが示されており (Scimeca *et al.*, 2000)、我々は  $a3$  イソフォームが後期エンドソームやリソソームに局在し、破骨細胞の酸分泌および膵臓のインスリン分泌の制御に関与することなどを明らかにしてきた (Toyomura *et al.*, 2003、Sun-Wada *et al.*, 2006)。

我々は最近、 $a3$  イソフォームの遺伝子産物を欠損させた  $a3$  イソフォーム欠損 (*Tcirg1<sup>Δ/Δ</sup>*) マウス由来の腹腔マクロファージにおいて、ファゴソーム内腔の酸性度と貪食能が低下することを報告し、マクロファージにおける  $a3$  イソフォームの重要性を示した (Sun-Wada *et al.*, 2009)。マクロファージは全身に広く分布するが、特に肺に存在する肺胞マクロファージは、常に外気と接触し刺激を受けている細胞であり、肺胞内細胞の90%以上を占め、経気道的に侵入する異物を貪食することにより、感染初期の生体防御機構において重要な働きをしているものと考えられている。肺胞マクロファージは、II型肺胞上皮細胞によって産生された肺サーファクタントの残留物質の分解・除去にも関与しており、その機能異常が、肺胞蛋白症、突発性間質肺炎および肺気腫などの疾患に関与すると考えられている。肺胞マクロファージの

ファゴソーム内腔も V-ATPase によって酸性化されており、この酸性化が V-ATPase の特異的な阻害剤である BafilomycinA1 で抑制されると、殺菌作用の著しい低下することが報告されている (Bidani *et al.*, 2000)。さらに、結核菌に代表されるマイコバクテリウム属の抗酸菌は、肺胞マクロファージファゴソームの酸性化を改変することにより感染を成立させていることが報告されている (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994, Russell *et al.*, 2001)。

今回、我々は肺胞マクロファージに着目し、ファゴソームの酸性化に関わる V-ATPase の構成を明らかにするために、 $\alpha$  サブユニット・イソフォームに対する特異的抗体を用いて組織免疫学的な解析を行った。その結果、 $a2$  イソフォームおよび  $a3$  イソフォームが肺胞マクロファージに特異的に発現することが明らかになった。

## 2. 方法

### 2-1. 抗体

V-ATPase の各  $\alpha$  サブユニット・イソフォームに対する抗体は、各  $\alpha$  サブユニット・イソフォームの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から得た (医学生物学研究所 (株) に受託)。Anti-Macrophage 抗体に対する抗体は、Inter-Cell Technologies 社から購入した。FITC および Cy3 で蛍光標識した二次抗体は Jackson ImmunoResearch 社から購入した。

### 2-2. *Tcirg1* アリル改変マウス

*Tcirg1* アリル改変マウスの作製については、以前に報告した (Sun-Wada *et al.*, 2009)。本研究では、 $a3$  イソフォームの遺伝子産物を欠損させた  $a3$  イソフォーム欠損 (*Tcirg1* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> ) マウスを用いた。

### 2-3. 凍結切片の作製

ジエチルエーテルで麻酔したマウスを 4% パ

ラホルムアルデヒドを含有した 0.1M カリウム-リン酸緩衝液 (pH7.2) で灌流固定し、肺を摘出した。摘出した肺は、4% パラホルムアルデヒドを含有した 0.1M カリウム-リン酸緩衝液 (pH7.2) 中、4°C で 12-16 時間浸漬固定し、0.1M カリウム-リン酸緩衝液 (pH7.2) で洗浄後、4°C で 10%、20% および 30% スクロースを含有した 0.1M カリウム-リン酸緩衝液 (pH7.2) に順次浸漬させ、スクロース置換を行った。凍結ブロックの作製は、O.T.C. compound (サクラファインテックジャパン (株)) に包埋し、液体窒素中で凍結することにより行った。凍結切片は凍結ブロックをクリオスタット (CM3050 S, Leica) を用いて厚さ 5  $\mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラスに貼り付け、乾燥後、-80°C で保存した。

### 2-4. 免疫染色

スライドガラスに貼り付けた凍結切片を Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、TSA block reagent (0.5% TSA blocking reagent (PerkinElmer, FP1020)、0.05% Tween 20、1% donkey serum および 0.01%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS) によるブロッキング処理を行った。各種一次抗体を 4°C で一晩反応させ、PBS で 3 回洗浄し、各種二次抗体を室温で 1 時間反応させ、PBS で 4 回洗浄した。さらに TOPRO-3 (Invitrogen) を室温で 10 分間反応させて核 DNA を染色した後、4% パラホルムアルデヒドを含有した 0.1M カリウム-リン酸緩衝液 (pH7.2) で固定し、封入した。 $a1$ 、 $a2$  および  $a3$  イソフォームに対する特異的な一次抗体は chick anti- $a1$  (OA051)、chick anti- $a2$  (OA560) および chick anti- $a3$  (OA049) を用い、二次抗体として FITC で標識された抗 chicken IgY 抗体を用いた。マクロファージのマーカーとして rabbit anti-Macrophage を用い、二次抗体として Cy3 で標識された抗 rabbit IgG 抗体を用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. マウスの肺組織における $\alpha$ サブユニット・イソフォームの発現

野生型のマウスの肺組織切片における  $\alpha$  サブユニット・イソフォームの発現部位について、マクロファージ特異的な抗体である anti-Macrophage と  $\alpha$  サブユニット・イソフォームに対する特異的な抗体 (anti- $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$ ) を用いて二重免疫染色を行った。その結果、anti- $\alpha 2$  および anti- $\alpha 3$  のシグナルは anti-Macrophage のシグナルを示す細胞に認められたが、その他の細胞には認められなかった (Fig. 1A-H)。この結果から、マウスの肺組織において、 $\alpha 2$  イソフォームおよび  $\alpha 3$  イソフォームは肺胞マクロファージ特異的に高レベルで発現していることが明らかになった。一方、anti- $\alpha 1$  のシグナルは anti-Macrophage のシグナルを示す細胞およびその周辺の細胞にも認められたことから、 $\alpha 1$  イソフォームは肺組織に普遍的に発現していることが分かった (Fig. 1I-L)。また、肺胞マクロファージにおいて、 $\alpha 2$  イソフォームおよび  $\alpha 3$  イソフォームは細胞質全体に観察されるのに対して、 $\alpha 1$  イソフォームは核周辺に局在していた。

#### 3-2. $\alpha 3$ イソフォーム欠損マウスの肺組織における $\alpha$ サブユニット・イソフォームの発現

我々はこれまでに、 $\alpha 3$  イソフォームを欠損したインスリン分泌細胞や色素細胞において、 $\alpha 2$  イソフォームの発現量や細胞内局在が変化することを報告している (Sun-Wada *et al.*, 2006, Tabata *et al.*, 2008)。そこで、 $\alpha 3$  イソフォームを欠損した肺胞マクロファージにおいて  $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  イソフォームの発現に変化がないか検証するため、 $\alpha 3$  イソフォーム欠損 (*Tcirg1* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> ) マウスの肺組織切片について、各  $\alpha$  サブユニット・イソフォームに対する抗体を用いた免疫染色を行った。*Tcirg1* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  マウスの肺組織切片では、野生型の肺組織切片と同程度数の anti-Macrophage シグナル陽性細胞が認められたが、いずれの細胞にも  $\alpha 3$  イソフォームのシグナルは認められなかった (Fig. 1M-P)。このことから、 $\alpha 3$  イソフォーム欠損マウスの肺組織には  $\alpha 3$  イソフォームが発現しない肺胞マクロファージが存在することが分かった。また、野生型マウスと *Tcirg1* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  マウスの  $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  イソフォームのシグナル強度や発現パターンに顕著な差は認められなかった (Fig. 1Q-X)。このことは、 $\alpha 3$  イソフォームを欠損したマウスの肺胞マクロファージにおいて、 $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  イソフォームの発現は変化していない可能性を示唆している。

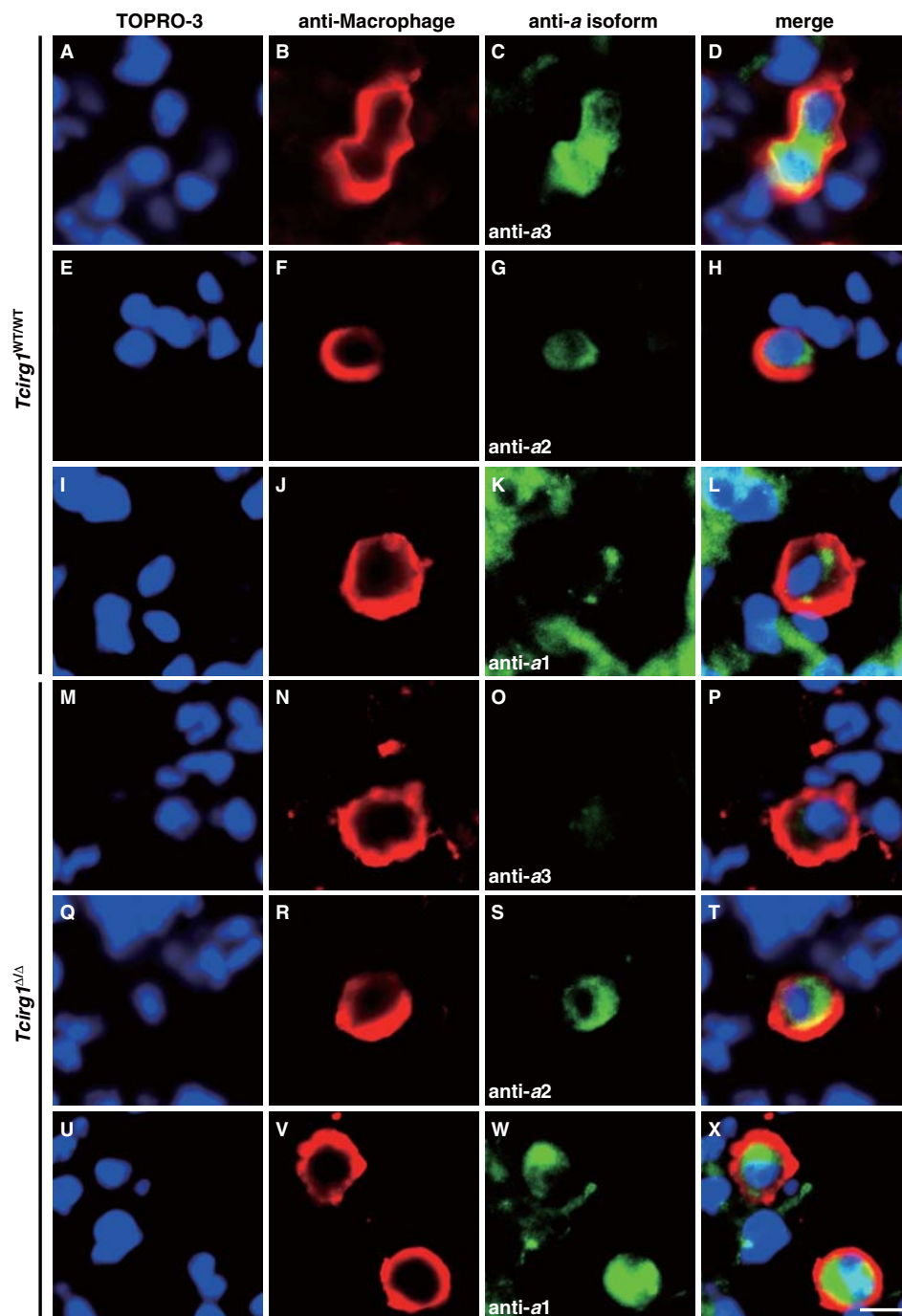


Fig.1 マウス肺組織における  $\alpha$  サブユニット・イソフォームの発現

野生型マウス由来 (A-L) および *Teirg1* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  マウス由来 (M-X) の肺組織切片を anti-Macrophage 抗体 (B, F, J, N, R, V), anti- $\alpha$ 3 抗体 (C, O), anti- $\alpha$ 2 抗体 (G, S), anti- $\alpha$ 1 抗体 (K, W) および Cy3 あるいは FITC で標識した 2 次抗体を用いて免疫染色した。核は TOPRO-3 で染色した (A, E, I, M, Q, U)。FITC シグナル (緑), Cy3 (赤), TOPRO-3 (青) の蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510) で取得した。Scale Bar : 5 $\mu$ m

#### 4. 考察

本研究により、マウス肺組織において、 $a2$  イソフォームおよび  $a3$  イソフォームは肺胞マクロファージ特異的に発現していることが明らかとなった。肺胞マクロファージにおける各  $a$  サブユニット・イソフォームの詳細な細胞内局在については、今後、解析していく必要があるが、破骨細胞や  $a3$  イソフォームに緑色蛍光タンパク質である GFP を融合させたトランスジェニック (*Tcirtg1<sup>loxGFP</sup>*) マウス由来の腹腔マクロファージを用いた解析から、 $a3$  イソフォームが後期エンドソームやリソソームからターゲットとなるオルガネラ膜まで輸送されることが示されており、肺胞マクロファージにおいても、 $a3$  イソフォームのダイナミックな輸送機構が存在する可能性がある (Toyomura *et al.*, 2003, Sun-Wada *et al.*, 2009)。一方、肺胞マクロファージに発現する  $a1$  イソフォームは核周辺に局在していたが、破骨細胞やインスリン分泌細胞において  $a1$  イソフォームがゴルジ体に局在することから、肺胞マクロファージにおいても、 $a1$  イソフォームは  $a2$  および  $a3$  イソフォームとは異なるオルガネラに局在し、機能すると考えられる。

*Tcirtg1<sup>Δ/Δ</sup>* マウスや  $a3$  イソフォーム遺伝子の自然発生突然変異マウスである *ocloc* マウスを用いたインスリン分泌細胞や色素細胞の解析では、 $a3$  イソフォームの欠失に対して、他の  $a$  サブユニット・イソフォームによる代償作用 (compensation) が生じた。本研究で *Tcirtg1<sup>Δ/Δ</sup>* マウスの肺組織における  $a1$  および  $a2$  イソフォームの発現に変化は認められなかったことから、 $a3$  イソフォームの欠失がマクロファージの生理機能に直接影響を与える可能性を示唆している。大理石病患者の多くは、敗血症、骨髄炎など複数の感染合併症を発症することが報告されている (Del Fattore *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 2000)。これらの感染症はマクロファージの機能不全に関連している可能性が考えられる。

以前我々は、V-ATPase の *C2a* イソフォームがⅡ型肺胞上皮細胞に特異的に発現することを示している (Sun-Wada *et al.*, 2003)。また、気道上皮細胞に *B1* イソフォームが特異的に発現することが報告されている (Miller *et al.*, 2005)。一方、嚢胞性肺繊維症患者において、肺繊維芽細胞オルガネラ内の酸性化が抑制されることや (Barriere *et al.*, 2009)、V-ATPase の特異的阻害剤である Bafilomycin A1 が肺胞マクロファージの細菌貪食および活性酸素の産生を抑制することが報告されている (Bidani *et al.*, 2000)。これらの知見と今回得られた  $a2$  および  $a3$  イソフォームが肺胞マクロファージに特異的に発現するという知見とを合わせると、V-ATPase は呼吸組織を構成する細胞ごとに異なるサブユニット・イソフォームからなる複合体を形成し、酸性環境を厳密に制御することによって、呼吸組織における生理機能の調節に関与していることが推察される。また、これらの知見は、リシューマニア原虫や抗酸菌などの病原微生物が示す酸性化回避のメカニズムの解明に役立つものと考えている。

#### 5. 参考文献

- Barriere H, Bagdany M, Bossard F, Okiyoneda T, Wojewodka G, Gruenert D, Radzioch D, Lukacs GL. (2009) Revisiting the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and counterion permeability in the pH regulation of endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 20 (13):3125-3141.
- Bidani A, Reisner BS, Haque AK, Wen J, Helmer RE, Tuazon DM, Heming TA. (2000) Bactericidal activity of alveolar macrophages is suppressed by V-ATPase inhibition. *Lung.* 178 (2):91-104.
- Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. (2007) Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone.* 42 (1):19-29.
- Miller RL, Zhang P, Smith M, Beaulieu V, Paunescu TG, Brown D, Breton S, Nelson RD. (2005) V-ATPase *B1*-subunit promoter drives expression of EGFP in intercalated cells of kidney, clear cells of epididymis and airway cells of lung in



- transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288 (5):C1134-1144.
- Russell DG. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (8):569-577.
- Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J, Robert C, Jaillon O, Poirier C, Gaudray P, Carle GF (2000) The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (*oc/oc*) mutants. *Bone* 26 (3):207-213
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263 (5147):678-681.
- Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y. (2009) Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J. Cell Sci.* 112:2504-2513.
- Sun-Wada GH, Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Futai M, Wada Y. (2006) The  $\alpha 3$  isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J. Cell Sci.* 119:4531-4540.
- Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. (2004) Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta.* 1658 (1-2):106-114.
- Sun-Wada GH, Murata Y, Namba M, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. (2003) 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.
- Tabata H, Kawamura N, Sun-Wada GH, Wada Y. (2008) Vacuolar-type H (+)-ATPase with the  $\alpha 3$  isoform is the proton pump on premature melanosomes. *Cell Tissue Res.* 332 (3):447-460.
- Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. (2003) From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* 278 (24):22023-22030.
- Wilson CJ, Vellodi A. (2000) Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Arch Dis Child.* 83 (5):449-452.