

## V-ATPase 阻害剤による分化・細胞死誘導機構

著者	大熊 勝治
著者別表示	Ohkuma Shoji
雑誌名	平成10(1998)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1997-1998
ページ	6p.
発行年	1999-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00050626">http://doi.org/10.24517/00050626</a>

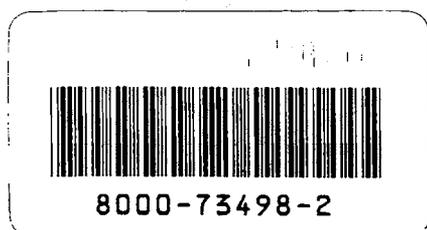


# V-ATPase 阻害剤による 分化・細胞死誘導機構

研究課題番号：09672220

平成9～10年度 科学研究費補助金  
(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成11年3月



大熊勝治  
(理学部自然科学研究科教授)

KAKEN  
1998  
15

V-ATPase阻害剤による  
分化・細胞死誘導機構

(課題番号：09672220)

平成9～10年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (C) (2) ) 研究成果報告書

平成11年 3月

研究代表者 大熊勝治

(金沢大学大学院自然科学研究科教授)

発行者 寄贈

平成9～10年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

課題番号 09672220

研究課題 V-ATPase阻害剤による分化・細胞死誘導  
機構

研究組織

研究代表者：大熊勝治（金沢大学大学院自然科学研究科教授）  
研究分担者：荒井國三（金沢大学薬学部助手）  
研究分担者：横山 謙（金沢大学薬学部助手）  
研究分担者：太田哲生（金沢大学医学部講師）  
研究分担者：畑中保丸（富山医科薬科大学和漢薬研究所助教授）

研究経費	平成9年度	2800	千円
	平成10年度	900	千円
	計	3700	千円

## はじめに

近年、細胞増殖・癌化・分化・細胞死等に対する空胞系酸性顆粒の役割が注目されている。我々は、これまでに、空胞系酸性顆粒のpH維持に機能しているプロトン・ポンプ(V-ATPase)の選択的阻害剤bafilomycin A<sub>1</sub>を用いて、増殖・癌化・分化・細胞死に対する酸性顆粒の寄与を検討してきた。まず、bafilomycin A<sub>1</sub>が各種細胞の増殖を阻害し、細胞死(アポトーシス)を引き起こすこと、同時に、PC12細胞を神経様細胞に、M1細胞をマクロファージ様細胞に、それぞれ分化誘導することを見いだした。我々はまた、ラット肝リソゾームのV-ATPaseの精製に成功し、そのプロトン輸送路の16kDaプロテオリピドのcDNAクローニングにも成功しているため、それらをプローブとして検討した結果、浸潤性悪性膀胱癌においては、16kDaプロテオリピドが異常に高発現していること、そしてbafilomycin A<sub>1</sub>はヌードマウスに移植した膀胱癌細胞の増殖を強力に抑制することを発見した。更に、最近、V-ATPaseのプロトン輸送のみを特異的に阻害するV-ATPaseの新たな脱共役剤として、プロジギオシンprodigiosin類を見い出した。本化合物は、様々なタイプのプロトンポンプを脱共役するが、細胞レベルでは酸性顆粒のV-ATPaseに主に作用する。驚くべきことに、本化合物はbafilomycin A<sub>1</sub>とは全く異なる構造であるにも関わらず、同様の分化・細胞死誘導作用を示した。V-ATPaseの重要性を示している。一方、細胞内pHは直接その生物作用発現に関与しないので、上記生物活性はV-ATPaseタンパク質固有の機能と考えられる。

本研究においては、(1) bafilomycin A<sub>1</sub>と比較しつつ、プロジギオシン類のプロトン輸送阻害機構を分子レベルで明らかにすること、(2) それらV-ATPase阻害剤の増殖阻害機構を明らかにすること、(3) V-ATPase阻害剤の分化・細胞死誘導機構を明らかにすること、(4) 各種癌細胞を用いて、V-ATPase阻害剤の癌特異性を明らかにすること、を目指した。

その結果、(1) プロジギオシン類は、リソゾームの酸性化を強力に阻害したがATPで駆動される膜電位形成は阻害しなかった。また、そのリソゾーム酸性化阻害活性発現には塩化物イオンを必要とした。更に、プロジギオシンは、塩化物イオン依存的に、V-ATPaseによって駆動されたリソゾーム内の酸性化を急速に元に戻し、かつ、外液酸性化に伴うリソゾーム内酸性化を促進した。また、プロジギオシン類は、(2) 主としてリポソームを用いた実験系で、トリブチルチンと同様に、塩化物イオン依存性リポソーム膨潤、外部塩化物イオン依存性のリポソーム内酸性化、内部塩化物イオン依存性のリポソーム内アルカリ化、塩化物イオンの有機溶媒層へ移行促進、pH依存的な塩化物イオンのリポソームへの取り込み、同時に観察されるリポソーム内酸性化、等を示した。以上の結果より、プロジギオシン類はそのH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter共輸送(OH<sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>交換)活性によりプロトンポンプを脱共役している可能性が示唆された。すなわち、プロジギオシン類は新規H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporterであることを初めて明らかにすることが出来た。さらに、(3) プロジギオシン類は、豚胃粘膜小胞のプロトンポンプ活性を、オメプラゾールと異なり

$K^+$ -ATPase活性を阻害することなく、強力 ( $I_{50} = 40-200$  pmol/mg 蛋白) かつ可逆的に阻害することも合わせて見出した。

また、bafilomycin  $A_1$ は、PC12細胞の神経突起伸展 (NOG) を誘導するが、その作用は塩化アンモニウムによって影響を受けないことから、pHは直接その神経突起伸展作用に関係しないと結論されていた。ところが、bafilomycin  $A_1$ 同様リソソームのpHを上昇させる新規 $H^+/Cl^-$ symporterであるプロジギオシン類もNOGを誘導することを発見した。そこで、両プロトンポンプ阻害剤によるNOG誘導作用におけるpHの関与について再検討を試みた。その結果、プロジギオシン類によるNOGは、新たなRNA及び蛋白質合成を必要とし、LiCl (MAPキナーゼ阻害剤) やオカダ酸 (セリン・スレオニンホスファターゼ阻害剤) に感受性であるが、K-252a (Cキナーゼ阻害剤) やH-89 (Aキナーゼ阻害剤) には非感受性で、ST-638 (チロシンキナーゼ阻害剤) 及びバナジン酸 (チロシンホスファターゼ阻害剤) で阻害され、W7 (カルモジュリン阻害剤) やONO-RS-082 (ホスホリパーゼ $A_2$ 阻害剤) でも阻害される等、その情報伝達経路はbafilomycin  $A_1$ の場合と酷似していることが示唆された。また、tambjamineグループのBE-18591も $H^+/Cl^-$ symporter活性を示し、胃粘膜プロトンポンプ阻害、破骨細胞分化の阻害、免疫細胞の増殖抑制、更にはNOG誘導やアポトーシス誘導作用を示したことから、これらの多彩な生理作用は $H^+/Cl^-$ symporter活性によることが示唆された。しかしながら、同じく $H^+/Cl^-$ symporter活性を示すtetrapyrroleは、増殖阻害や細胞死誘導作用はあるものの、NOG作用は示さなかった。別の空胞系プロトンポンプ阻害剤であるデストラキシンについても検討したところ、デストラキシンEのみNOG活性を示し、デストラキシンBは活性を殆ど示さなかった。以上の事より、pH変化はプロトンポンプ阻害剤によるNOG誘導の直接の引き金にはなっていないと結論した。

なお、バフィロマイシン類は、ヒト膀胱癌細胞にアポトーシスを誘導するが、ヌードマウスに移植した膀胱癌細胞でもアポトーシスを引き起こすことが分かった。in vivoでもアポトーシスを誘導したことは、臨床応用上、極めて重大な発見であり、今後の研究の伸展が待ち望まれる。バフィロマイシン類のアポトーシス誘導作用機構も、細胞内pHは直接関係しないことが分かっているが、その詳細はなお現在検討を続行中であり、現在の所、依然として不明である。

現在、空胞系プロトンポンプ阻害剤の作用機構の分子レベルで解明を目指して、なお引き続き研究を継続中である。特に、アフィニティープローブの作成の目処が立ってきたので、作用部位の解明に期待できそうである。

平成11年3月  
金沢大学大学院  
自然科学研究科  
教授 大熊勝治

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Ohta, T., Yamamoto, M., Numata, M., Iseki, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nagakawa, T., Miwa, K., Nakagawa, A., Morise, T., Ohkuma, S., and Terada, T. (1997) Differential expression of vacuolar-type  $H^+$ -ATPase between normal human pancreatic islet B-cells and insulinoma cells. *Intern. J. Oncol.* 11, 597-601.
2. Ohkuma, S., Sato, T., Okamoto, M., Matsuya, H., Arai, K., Kataoka, T., Nagai, K., and Wasserman, H.H. (1998) Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of  $H^+/Cl^-$  symport. *Biochem. J.* 334, 731-741.
3. Ohta, T., Arakawa, H., Futagami, F., Tajima, H., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nagakawa, T., Miyazaki, I., Kurashima, K., Numata, M., and Ohkuma, S. (1998) Bafilomycin  $A_1$  induces apoptosis in human pancreatic cancer cell line capan-1. *J. Pathol.* 185, 324-330.
4. Israël, M., Lesbats, B., Tomasi, M., and Ohkuma, S. (1998) Enhanced acetylcholine release from cells that have more 15-kDa proteolipid in their membrane, a constituent V-ATPase, and mediatoaphore. *J. Neurochem.* 71, 630-635.
5. K. Yokoyama, E. Muneyuki, T. Amano, S. Mizutani, M. Yoshida, M. Ishida, and S. Ohkuma (1998) V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* 273, 20504-20510.

### (2) 口頭発表

1. 横山 謙、宗行英明、天野豊巳、大熊勝治  
*Thermus thermophilus*  $V_1$ -ATPaseの不活性化とATP合成  
第71回日本生化学会大会（東京）、1998.10.
2. 西川あさ子、谷垣佳司、佐藤友彦、大熊勝治  
新規 $H^+/Cl^-$  symporterプロジギオシン類による神経突起伸展作用  
日本薬学会第119年会（徳島）、1999.3.
3. 越智隆洋、西川あさ子、谷垣佳司、佐藤友彦、大熊勝治、永井和夫、川島博行  
新規 $H^+/Cl^-$  symporter：BE-18591の多彩な生物活性  
日本薬学会第119年会（徳島）、1999.3.