

## 血管内皮細胞に含まれる分泌性膜小胞 Weibel-Palade 小体の形成機構の解明

山崎泰男

横浜薬科大学 国立循環器病研究センター

### 【研究の背景】

血管内皮細胞は血管の内腔を覆う単層の細胞群であり、平時に血液と接する唯一の非血液細胞である。血液の流動性を保つため、血管内皮細胞の細胞表面は抗血栓性物質に富んでいる。その一方で、血管内皮細胞は von Willebrand 因子 (VWF) とよばれる血小板粘着タンパク質を産生し、一次止血においても中心的な役割を果たす。合成された VWF は、Weibel-Palade 小体 (WPB) とよばれるオルガネラに貯蔵され、適時に血液中へ分泌され血小板を粘着する。WPB はゴルジ体で形成される分泌顆粒の一種であるが、その形成機構には不明な点が多い。我々は最近、WPB にはプロトンポンプ V-ATPase が局在することを見出し、その生理的意義の解明を目的に研究を行っている<sup>1)</sup>。

### 【目 的】

VWF は 2,813 アミノ酸残基の一本鎖タンパク質として合成された後、ジスルフィド結合の架橋により止血能の高い巨大なマルチマーに変換され WPB 内腔に貯蔵される。精製した組換えタンパク質を用いた再構成実験により、VWF のマルチマー化には酸性環境が必要であることが明らかにされているが<sup>2)</sup>、細胞内における必要な酸性環境の形成メカニズムについては全く不明である。プロトンポンプ V-ATPase は、少なくとも 13 のサブユニットから構成されるタンパク質複合体である<sup>3)</sup>。多くの細胞において、V-ATPase はエンドソームやリソソーム膜に局在し、内腔にプロトンを汲み入れることで、細胞内における局所的な酸性環境の形成に寄与している。WPB には V-ATPase が局在すること、さらに試験管内における VWF のマルチマー化には酸性環境が必要なことを考慮すると、WPB の内腔は酸性であると予想されるが、これまでに形成過程における WPB 内腔 pH の動的变化を観察した報告はない。そこで本研究では、WPB 内腔 pH を測定する方法を確立し、形成過程における WPB 内腔 pH の観察を試みた。同時に、WPB の形成における V-ATPase の要求性とプロトンポンプ活性との機能相関についても検討した。

### 【方 法】

WPB 内腔の pH 測定は、pH 感受性の蛍光タンパク質 ratiometric pHluorin を用いて行うこととした。ratiometric pHluorin は二波長励起一波長測光型の蛍光タンパク質で、暴露される pH によって二つの励起波長による蛍光強度比が変化する<sup>4)</sup>。はじめに、pH 感受性タンパク質を WPB 内腔に局在させるための局在化シグナルの探索を行った。適当な局在化ドメインが見つかったら ratiometric pHluorin との融合タンパク質を臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC に発現させ、内腔への局在の様子を超解像顕微鏡で確認した。pH センサーが完成したら、WPB の形成過程における内腔 pH の動的变化を、共焦点顕微鏡を用いてライブセルイメージングで解析した。

### 【結 果】

P-selectin は、WPB 膜に局在化する一本鎖膜タンパク質である。先行研究により、膜貫通ドメインを除いた P-selectin は WPB 内腔に局在することが報告されている。そこで、膜貫通ドメインを除いた P-selectin と EGFP の融合タンパク質 (luminal

P-sel-EGFP)を HUVEC に発現し、その局在を顕微鏡で観察した。その結果、膜貫通ドメインを含む野生型 P-selectin と EGFP の融合タンパク質 (P-sel<sup>WT</sup>-EGFP) が WPB 膜に局在しているのに対し、luminal P-sel-EGFP は WPB 内腔に局在しており、WPB 膜を含む細胞内の他の部位に局在は観察されなかった。以上の結果から、膜貫通ドメインを除いた P-selectin は WPB 内腔の特異的な局在化ドメインとして使用できると判断し、膜貫通ドメインを除いた P-selectin と ratiometric pHluorin の融合タンパク質 (luminal P-sel-pHluorin) を発現する組換えレンチウイルスを調製した。HUVEC に luminal P-sel-pHluorin を発現させると、期待した通り luminal P-sel-pHluorin は WPB に局在した。また、HUVEC に発現した luminal P-sel-pHluorin を pH5.5~pH7.5 の標準液に暴露すると、二つの励起波長により得られる蛍光強度比は pH と線形相関を示した。以上の結果から、luminal P-sel-pHluorin は WPB 内腔に局在する pH のセンサーとして使用できると結論した。次に、調製した pH のセンサーを発現する HUVEC を用いて、共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより WPB 内腔の pH を観察した。その結果、細胞辺縁部に局在する成熟 WPB の内腔 pH はほとんど変化しないが、核近傍から形成される新生 WPB の内腔は次第に酸性化していく様子が観察された。WPB を形成するトランスゴルジ網と WPB 内腔の pH を比較したところ、トランスゴルジ網の内腔 pH に比べ WPB の内腔の方がさらに酸性であることが判明した。以上の結果から、WPB の内腔は形成過程で次第に酸性化していくと結論した。次に、この酸性化における V-ATPase の寄与について検討した。V-ATPase の c サブユニットはプロトン輸送に必須なサブユニットであり、アイソフォームは存在しない。すなわち細胞内に c サブユニットが存在しないと機能的な V-ATPase は形成されない。そこで、shRNA を用いて V-ATPase の c サブユニットをノックダウンし、WPB の形成能を観察した。その結果、c サブユニットを枯渇した細胞では、WPB はトランスゴルジ網から WPB 様の出芽構造を形成するものの、WPB は細胞辺縁部にはほとんど観察されなかった。以上の結果から、V-ATPase による WPB 内腔の酸性化は WPB の形成に不可欠であると結論した。

## 【考 察】

我々は、V-ATPase の a1 サブユニットは WPB のトランスゴルジ網からの分離 (膜分離) に不可欠であることを報告しているが<sup>1)</sup>、a1 サブユニットの要求性と V-ATPase のプロトンポンプ活性との機能相関は不明であった。今回の研究成果により、V-ATPase のプロトンポンプ活性は WPB 内腔の酸性環境を形成する因子であり、内腔の酸性化は WPB の形成に不可欠であると結論できた。トランスゴルジ網は様々な分泌顆粒・分泌小胞を作り出すオルガネラであるが、内腔の酸性化がその形成に寄与する報告はない。以上を鑑みると、WPB は未知の分子機構によって形成されると考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

VWF は一次止血に中心的な役割を果たす分子であり、その機能不全は von Willebrand 病などの血液凝固異常を引き起こす。本研究により、これらの病態の理解および治療法開発に資する研究成果を得ることができたと考える。

## 【参考・引用文献】

- 1) Yamazaki Y, Eura Y, Kokame K. (2021) V-ATPase V0a1 promotes Weibel-Palade body biogenesis through the regulation of membrane fission. *Elife*. 10.7554/eLife.71526
- 2) Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE. (2008) Assembly of Weibel Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor *PNAS* 105:482-487.
- 3) Collins MP, Forgac M. (2020) Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes* 1862:183341.
- 4) Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins *PNAS* 95:6803-6808.