

# 研究報告書

組織特異的なアイソフォームの関与する  
新しい細胞内ネットワークの解明

研究者氏名: 西 毅

(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

# 組織特異的なアイソフォームの関与する新しい細胞内ネットワークの 解明

西 毅

## 研究のねらい

細胞は細胞膜によって外界から隔離され、その生命活動を効率良く行なうために非常に厳密に pH を調節している。特に細胞内膜系においては、それぞれのコンパートメントにおいて微妙に異なる pH が維持されており、この pH の差が細胞の機能の維持、エンドサイトーシス、細胞内膜系への蛋白質の選別輸送、神経伝達物質を初めとする様々な物資やイオンの取込みなど、多様な生理現象に重要な役割を果たしている。しかし、この細胞内小胞の pH の調節の仕組みは未だに良く分かっていない。細胞がその pH を酸性に維持するためには絶えず濃度勾配に逆らったプロトンの輸送が必要である。これを行うのがプロトン輸送性 ATPase で、胃酸分泌酵素である H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase および 液胞型プロトン輸送性 ATPase (V-ATPase) などが知られている。

V-ATPase はいろいろな細胞内膜系、例えば、エンドソーム、リソソーム、クラスリン被覆小胞、シナプス小胞やクロマフィン顆粒等の分泌顆粒、酵母や植物の液胞等に存在し、ATP の加水分解のエネルギーを用いてプロトンを輸送することにより、それらの小胞内部を酸性に保っている。また、腎臓、破骨細胞、マクロファージなどでは細胞膜上に存在し、これが尿の酸性化、骨の分解、細胞内 pH の維持に関与している。V-ATPase は 13 種のサブユニットから成る酵素で、ATPase 活性を持つ V1 (サブユニット A から H) とそれに共役してプロトンを輸送する Vo (a, d, c, c', c'') の 2 つのドメインから成り立っている。

ほ乳類においては、これまで異なる細胞内顆粒や細胞膜に発現している V-ATPase のサブユニットはすべて同じものであると思われていたが、各サブユニットに複数のアイソフォームが存在し、これが細胞特異的または細胞内小胞特異的なこの酵素の機能に関与している可能性が明らかになってきた。特に a サブユニットは、多くのアイソフォームを持ち、その一つである a3 への変異が大埋石病の原因遺伝子であることが、この遺伝子の Knock-out マウス、oc/oc マウスや患者の遺伝子の解析から明らかになった。また a4 への変異が Renal acidosis の原因であることも明らかになった。これらの結果は a サブユニットのアイソフォームが V-ATPase の複合体をそれぞれの目的の場所への局在化に働いており、a3 および a4 の機能欠失の場合それぞれの細胞の端頂膜に V-ATPase が存在できないことが病気の原因であることを示唆している。この a サブユニットの局在の調節機構を明らかにすることで、これらの病気の治療に役立つ可能性がある。

さらに最近、V-ATPase のサブユニットではなく、病気や細胞の機能に必要な因子が V-ATPase のドメインやサブユニットに結合している例が数多く報告された。これらは V-ATPase との関係から V-ATPase 自身の活性の調節に関与するものと、それら蛋白質の機能発現に V-ATPase との相互作用が必要であるものに分けられる。前者に含まれるものにユビキチンリガーゼのサブユニットである Skp1p と RAVE および aldolase がありこれは酵母において飢餓状態に起きる V-ATPase の  $V_0$  からの  $V_1$  ドメインの解離を調節している可能性が報告された。後者には、HIV が細胞内に侵入するために必要な Nef、E5 oncoprotein、PDEF レセプター、インテグリンの  $\beta 1$  サブユニット、ecto-ATPase、PDZ ドメイン結合蛋白質である NHE-RF、アクチンフィラメント、カルシウムチャンネルなどの細胞間、細胞内外の情報伝達に関係している分子との直接結合することが報告された。また、これまで単独で細胞内膜系に存在することが分かっていたが、役割の明らかで無かった  $V_0$  ドメインが、酵母の液胞を用いた系でカルモジュリンと相互作用し膜融合の中心として働いていることが示された。このことは、 $a$  サブユニットのそれぞれのアイソフォームを含む V-ATPase の複合体と相互作用する因子を探ることが、それぞれ異なるコンパートメントでの異なる pH やその酸性環境を介した様々な生理現象の調節にかかわる因子、細胞内膜への蛋白質の局在に関与する因子を明らかにし、これまで関係があるとは思われていなかった現象との係わりを明らかにできると考えられる。本研究では、V-ATPase のサブユニットのアイソフォームの解析により、異なる細胞や細胞内小器官での V-ATPase の働きを明らかにし、それらの正常な機能および異常が引き起こす様々な病気との関係をも明らかにする事を目的とした。

## 研究成果

### 1) V-ATPase の新規サブユニットアイソフォームの同定(総説2、学会発表3)

異なる細胞における V-ATPase の働きを明らかにするために、新規サブユニットアイソフォームの同定を行なった。その結果、腎臓に強く発現するアイソフォームとして  $d1$  及び  $a4$  を明らかにした。 $d$  サブユニットのアイソフォームを酵母の V-ATPase と再構成して、酵素の性質を調べたところ、 $d$  サブユニットのアイソフォームによって V-ATPase の  $V_1$  部位で起こる ATP の加水分解活性と  $V_0$  部位でのプロトン輸送との間の共役が変化する事が分かった。これは同一の細胞内の ATP 濃度でも、異なるアイソフォームを持つ酵素による酸性化の度合いが異なることを示しており、 $d$  サブユニットが酸性度の調節サブユニットである可能性を示している。

### 2) V-ATPase のプロトン輸送機構(総説3、学会発表1、2)

この酵素は膜を介したプロトン輸送を行なう事が分かっているが、その詳細な機構についてはよく分かっていなかった。そこで、プロトン輸送路を形成する  $V_0$  のサブユニットのトポロジーをシス

テイン変異とビオチンマレイミドを用いて決定した。その結果、c''サブユニットについて新しい4回膜貫通モデルを提唱した。さらに、新に明らかにした構造と、これまでに同定してきた機能必須残基の位置情報をもとに、サブユニット間の膜貫通ヘリックスのプロトン輸送における相互作用を分子内架橋実験により調べた。その結果、プロトン輸送路を形成する a サブユニットの7番目の膜貫通ドメインの必須残基である Arg735 を含むヘリックスの 1/3 の面と、c' サブユニットの4番目の膜貫通ドメインでプロトンを結合する Glu145 を含むヘリックスの半分が相互作用する事を明らかにした。この事は a と c' を含むプロテオリピッドリングの境界面で、ヘリックスがねじれてプロトンの受け渡しを行なっている事が示唆された。

## 今後の展開

今後はアイソフォームの解析を進めることで、V-ATPase の機能におけるアイソフォームの役割を明らかにして、病気との関係を見いだしていく。さらに、本研究課題の主要な目的であった V-ATPase やそのサブユニットのプロトン輸送以外の機能への関わりを明らかにしていく。

## 研究成果リスト

### 論文(原著論文)発表

1. Y. Kubo, S. Sekiya, M. Ohigashi, C. Takenaka, K. Tamura, S. Nada, T. Nishi, A. Yamamoto and A. Yamaguchi: ABCA5 resides in lysosomes and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4138-4149, 2005
2. 西 毅: サブユニットアイソフォームによる V-ATPase の局在と活性の制御。 *生化学* 77: 354-358, 2005
3. 横山 謙、西 毅: 精巧で巧妙な仕組みを持つプロトンポンプ、V 型 ATPase。 *蛋白質核酸 酵素* 49: 2035-2043, 2004

特許出願 なし

### 学会発表

1. T. Nishi, S. Kawasaki-Nishi and M. Forgac: The first putative transmembrane segment of subunit c''(Vma16p) of the yeast V-ATPase is not necessary for function. Gordon Research Conference "Molecular and Cellular Bioenergetics" Boston, USA (2003)

2. S. Kawasaki-Nishi, T. Nishi and A. Yamaguchi: Analysis of the mechanism of proton translocation through the integral V0 domain of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium, Shiga (2004)
  
3. 西毅、西(川崎)晶子、山口明人、Michael Forgac: V-ATPase の d サブユニットは ATP 加水分解とプロトン輸送の共役に重要な役割を果たしている。第77回 日本生化学会大会 横浜 (2004)