

研究課題別評価

1 研究課題名: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

2 研究者氏名:西 毅

3 研究の狙い:

本研究では細胞内に広く存在している V-ATPase の持つ多彩なサブユニットアイソフォームに着目し、このアイソフォームの細胞機能への役割を明らかにすると共に、各々のアイソフォームと相互作用する因子を同定する事で、細胞内での生理的、物理的な相互作用ネットワークを明らかにして、新たな細胞機能や疾病への関わりを明らかにすることを目的とした。

4 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

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 V1 部位で起こる ATP の加水分解活性と Vo 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

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 Vo のサブユニットのトポロジーをシステム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。

5 自己評価:

本研究で得られた成果は、当初の目的の初期の段階、アイソフォームの同定とそれらアイソフォームの V-ATPase のプロトン輸送性 ATPase としての機能への関りを一部のものについて明らかにできた。しかし、中心的な課題である新しい機能への関わりと、細胞内の相互作用ネットワークの解明については結果が伴わず、全く進展することができなかったため、非常に悔いが残る結果となった。

6 研究総括の見解:

V-ATPaseの数多くのサブユニットにおけるアイソフォームの機能解析はかなりユニークな解析法と独自の戦略で攻めないと泥沼に陥る可能性が大きいと考えられる。所期の目的達成には遠く至らなかった感があるが、本研究期間に明らかにした新規アイソフォームを足がかりに、今後の発展を期待する。

7 主な論文等:

論文

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

総説

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

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⁺)-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)

特許出願

なし

受賞記録

なし