

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成15年度採択研究代表者

二井 將光

((財)微生物化学研究会微生物化学研究センター 特別研究員)

「高効率ナノモーターとしてのプロトンポンプの分子機構解明」

## 1. 研究実施内容

本研究では、プロトンポンプATPaseについて分子レベルの作動機構（反応機構、サブユニットの回転とプロトン輸送）から細胞生物学的役割（酸性環境の形成）に至る研究を展開している。プロトンポンプとしては、2つのATPase、F-ATPase（ATP合成酵素）とV-ATPase（液胞型ATPase）に注目している。2つのプロトンポンプATPaseにおいて、基本的な作動機構、触媒中心、反応機構、プロトン輸送機構は基本的に同じと考えられる。さらに研究代表者らはF-ATPaseおよびV-ATPaseが膜に局在するホロ酵素としてサブユニットの回転を伴うプロトンポンプであること、を明らかにした。本研究では2つのATPaseのATP分解に伴う回転機構を明らかにし、F-ATPaseのATP合成に伴う回転を実証し、反応機構を明らかにする事を一つの目的としている。15年度はこのような研究の準備段階として位置付けられる。

まずF-ATPaseがATPの加水分解に伴って回転を続ける為にはプロトン輸送が必要であるかどうかを、プロトン輸送残基cAsp61に変異を導入し変異を持つF-ATPaseの回転を検討した。その結果プロトン輸送と回転は反応として分離できることを示した。

ATP合成酵素はプロトンの電気化学的ポテンシャルを駆動力としてADPとPiからATPを合成している。これはATP分解反応の単純な逆反応とは考えられない側面を持っている。ATP合成酵素としての作動機構を実証する為には、*c*サブユニット10分子が形成するリングが膜電位、あるいはpH勾配によって固定子部分 $ab_2$ サブユニットに対して相対的に回転することを示す必要がある。すなわちFoがプロトンの電気化学的ポテンシャルによって回転するモーターであることを実証する必要がある。本年度は、このような方向を進める為の基礎実験を開始し、膜断片を調製し、これをガラス面に固定する方法を主に検討した。また、V-ATPaseの回転がF-ATPaseと異なるかどうかを詳細に検討する為に新たに顕微鏡システムを設置し調整した。サブユニットの回転運動の測定が本研究の重要な部分を占めることから、この顕微鏡システムの確立は重要である。

基本的なF-ATPaseは8種のサブユニットから、V-ATPaseは13種のサブユニットから形成されている。生物によっては付加的な機能を持つ他のサブユニットが存在することが知られている。さらに、V-ATPaseとF-ATPaseを比較すると、特に*c*サブユニットの構造、*c*

が構成するリングの構造とストーク部分のサブユニット構成に大きな差があることが知られている。また、研究代表者らはV-ATPaseの*G*, *E*, *a*, *d*サブユニットにそれぞれイソフォームを見出した。さらに、本年度に検討したところ、V-ATPaseのストーク部分の*C*サブユニットにC2-aとC2-bのイソフォームを発見した。C2-aは肺にC2-bは腎に特異的であった。対応するサブユニットが欠損する酵母に発現させて活性を調べたところ、C2-aあるいはC2bを持つV-ATPaseはH<sup>+</sup>輸送活性（H<sup>+</sup>/ATP比）とK<sub>m</sub>が低いことを見出した。このような多様なV-ATPaseの作動機構の検討は興味深いものになると考えている

## 2. 研究実施体制

### V-ATPaseグループ

- ① 研究分担グループ長：孫 戈虹（大阪大学産業科学研究所、助教授）
- ② 研究項目：V-ATPaseサブユニットイソフォームと回転および酸性オルガネラの機能

### F-ATPaseグループ

- ① 研究分担グループ長：二井將光
- ② 研究項目：F-ATPaseのATP合成／分解に伴う回転の解析、顕微鏡システムの開発

### ナノモーターの形成と生理学

- ① 研究分担グループ長：和田 洋
- ② 研究項目：V-ATPaseサブユニットおよび膜小胞輸送因子の欠失（ノックアウト）マウスと酸性環境の生理機能の解析