

「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二井特別研究室 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. 研究実施の概要

プロトンポンプであるF-ATPase (ATP合成酵素) とV-ATPase (液胞型ATPase) に注目し、膜に局在する酵素としてサブユニットの回転を伴うナノモーターであることを実証してきた。ATP加水分解に伴う回転の機構とプロトン輸送の共役、サブユニットのアセンブリーの機構、マウスV-ATPaseの多様な役割、プロトンポンプ活性とホルモン分泌の共役等などの解明に向け研究を進めている。本年度に得られた主な成果は、F-ATPaseにおいてプロトン輸送とATP加水分解に伴う回転は分離できること、V-ATPaseのEサブユニットがアセンブリーに必須であること等である。同時にV-ATPaseと酸性オルガネラの細胞生物学的な役割について多くの成果を得た。

2. 研究実施内容

本研究では、プロトンポンプ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) と、細胞生物学的役割 (酸性環境の形成) を解明することを目的としている。プロトンポンプとしては、F-ATPase (ATP合成酵素) とV-ATPase (液胞型ATPase) に注目している。2つの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。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ナノモーター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ことを一つの目的としている。

まずF-ATPaseがATPの加水分解に伴って回転を続けるためにはプロトン輸送が必要であるかどうかを、cサブユニットのプロトン輸送残基cAsp61および、この残基のカルボキシル基の解離に必須と考えられるaArg210に変異を導入し、膜断片を用いてF-ATPaseの回転を検討した。その結果、プロトン輸送とATP加水分解に伴う回転は反応として分離できることを示した (論文印刷中)。

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加水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 F_0 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。このような方向を進める為の基礎実験を開始し、膜断片をガラス面に固定し、金粒子をプローブとして観察する顕微鏡システムを完成した。このシステムを用いてF-ATPase (F_1 部分) の γ サブユニットは $500\sim 600s^{-1}$ という高速で回転していることを明らかにした。

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、活性の調節に関与する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は大きな差がある。また、研究代表者らはマウスの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ている。本年度はEサブユニットに注目し、マウスのE1あるいはE2イソフォームをサブユニットとするマウス/酵母ハイブリッド酵素を構築した。ハイブリッド酵素の解析からEサブユニットがV-ATPaseの膜へのアセンブリーに必須であることを示した。

さらに本研究では多様なプロトンポンプが果たす生理学のおよび細胞生物学的な役割について研究を進めている。その為にプロトンポンプ・サブユニットと関連するアセンブリー因子を欠失したマウスを系統的に作出するべく実験を進めている。本年度は遺伝子欠失の為にクローンを迅速に作成する方法を確立した。またトランスジュニックマウスを用いてプロトンポンプ遺伝子の転写に関わるGATA6ファクターの発現調節領域を証明した。

同時にホルモン分泌機構の解明の一端として、*a*サブユニットの*a3*イソフォームが、インスリン分泌顆粒に局在しているV-ATPaseのサブユニットであることを示し、V-ATPaseが分泌顆粒内部を酸性にすることが分泌に必須であることを証明した。(論文印刷中)。

3. 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、助手)
- 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 (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)
- 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（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

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- M. Aoyama, K. Agari, G. -H. Sun-Wada, M. Futai, Y. Wada, Simple and straightforward construction of a mouse gene targeting vector using *in vitro* transposition reactions, *Nucleic Acids Res.* Vol. **33**, pp e52 (2005).
- G. -H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai, Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. **1658**, pp. 106-114 (2004).
- G. -H. Sun-Wada, Y. Kamei, Y. Wada, M. Futai, Regulatory elements directing gut expression of the *GATA6* gene during mouse early development, *J Biochem.* Vol. 135, pp. 165-169 (2004).