

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 高効率ナノモーターとしてのプロトンポンプの研究
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

二井 将光 (岩手医科大学薬学部 教授)

主たる共同研究者

和田 洋 (大阪大学産業科学研究所 准教授)

3. 研究内容及び成果

### 3 - 1. 研究課題全体の研究内容

F 型、V 型  $H^+$ -ATPase は 1996 年のサブユニット回転のセンセーショナルな証明以来、分子モーターとしての研究が大いに進展した一方で生物学的役割は軽視されている。二井氏は回転証明の発表以前から 1 分子計測技術をもつ研究室との共同研究で回転運動の証明を目指していた。二井チームは、F-ATPase と V-ATPase の生物学的背景を重視している点、さらに、ホロ酵素としての二つの ATPase を上位の階層の機能からの視点で研究対象にしている点で、独自性がきわめて高い。この酵素はエネルギー代謝系で ATP 合成の機能を持つが生体の種々のオルガネラでプロトンポンプとして機能し、サブユニットのレベルで多様なアイソフォームを持ち、その組み合わせでその目的に応じて多彩な機能を担っている。

### 3 - 2. 各グループの研究成果

#### 二井グループ

$F_1$ -ATPase の高速サブユニット回転を、暗視野レーザー顕微鏡と高速カメラにより観察するための実験系を確立し、回転の詳細な解析、各種変異を導入した F-ATPase の解析を行った。一分子の回転を経時的に観察していくと、停止したり、速度が時間によって変わることが明らかになった。酵素反応を幾つかの化学状態の連鎖として記述していた従来の酵素反応理解に対して、酵素 1 分子の状態は単に化学的状态で記述できないことが明らかになった。これは、酵素活性をバルクで測定したのでは知ることが出来ない成果であり、さらに一分子酵素学へと発展することが期待される。また、変異導入による解析によって、サブユニットの活性中心周辺の領域が回転を駆動するのに重要であること等を明らかにした。-sheet4 上の変異 Ser174 が P-loop の第 2 の変異 G149A によって抑圧された。また、同様に Ser174 変異が -helix- の第 2 の変異 I163A によって抑圧された。これらの結果は、P-loop / -helix- / loop / -sheet4 の部分がトルク発生に重要であることを示している。

$c_{10}$  の 3 種のサブユニットからなる複合体が ATP の分解に伴って回転していることを証明した。F-ATPase を、サブユニットを介してガラス面に固定し  $c$  サブユニットにアクチンプローブを結合させる、あるいは  $c$  サブユニットで F-ATPase を固定し サブユニットにプローブをつけたいずれの場合にも加水分解に伴ってプローブの回転が観察できた。さらに平面膜の断片を調製し、 $c$  サブユニットを介してガラス表面に固定し、サブユニット、あるいは  $a$  サブユニットにプローブをつけた場合にも、ATP 加水分解に依存した回転が観察できた。F-ATPase が実際に膜内で回転していることを実証した。

V-ATPase サブユニットの多様性を網羅的に示し、細胞内外の多様な酸性環境に対応した V-ATPase が存在するという新しい概念を提示した。これは、生体ナノマシンの効率がどのように調節されているか、特異的なナノマシンが機能する場にどのようにして局在するか、等の基本的な生物学的疑問を解明するための礎となる発見であった。例えば、多様なアイソフォームを持つ E サブユニットが、 $V_1$  と  $V_o$  の会合状態を調

節していること、V-ATPaseのサブユニットがオルガネラ間の小胞輸送を調節していること等を示唆した。また、膵臓 細胞のインスリン分泌における機能を示した。

## 和田ノ孫グループ

ラット睾丸および輸精管の表層細胞 (Narrow Cell および Clear Cell) に局在する V-ATPase は、夫々の内腔の pH を酸性に保つ上で重要である。酸性 pH は、精子の成熟と保存に必要である。表層細胞に於いて、サブユニット・イソフォーム  $C1$ 、 $C2$ 、 $G1$ 、 $G3$ 、 $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_4$ 、 $d_1$ 、 $d_2$  が局在するしたが  $d_1$  イソフォームは、内腔側の形質膜に他のサブユニットよりもはるかに多く発現しており、V-ATPase のサブユニットとして以外の役割を持っていることを推定した。

内分泌細胞には、エキソサイトーシスによるホルモンの分泌に関与する分泌小胞が存在している。いずれの分泌小胞の内腔も、V-ATPase によって酸性 pH に保たれている。そこで、どの  $a$  サブユニット・イソフォームを持つ V-ATPase が、分泌機能に関与しているか、検討した結果、細胞、副腎、上皮小体、下垂体の分泌顆粒には  $a_3$  をサブユニットとする、V-ATPase が局在することを示した。この結果は、ホルモンのエキソサイトーシスの過程に、 $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase が関与していることを示唆している。

近位尿細管の表層細胞では、尿から蛋白質を回収する過程として受容体を介したエンドサイトーシスが活発に行われている。初期エンドソームの内腔は酸性 pH に保たれており、回収された蛋白は輸送小胞によりリソソームまで輸送され、アミノ酸に分解される。輸送小胞の形成される過程を詳しく解析した結果、V-ATPase は、初期エンドソーム内腔を酸性にすると同時に、 $c$  サブユニットが低分子 GTPase である Arf6 を、 $a_2$  イソフォームが GDP/GTP exchange factor である ARNO を結合し、エンドソームからリソソームへの輸送小胞の形成に関与していた。関与する  $a_2$  と  $c$  サブユニットはいずれも膜を貫通しており、エンドソームの内部 pH を認識していると考えられる。

インスリンは膵ランゲルハンス島 細胞から、分泌顆粒のエキソサイトーシスによって分泌される。上で調べたようにインスリン分泌顆粒には  $a_3$  が発現している。V-ATPase の形成する分泌顆粒の内腔の酸性 pH は、エキソサイトーシスとプレプロインスリンからインスリンが形成される過程に必要であると考えられてきた。そこで、 $a_3$  を欠失するマウスについて検討したところ、oc/oc マウスでは血中にインスリンは分泌されなかったが、インスリンはプロセスされていた。そこで、インスリンのエキソサイトーシスに分泌顆粒の内腔の酸性 pH が必要であるか調べるため阻害剤を培養液に加え内腔の pH を中性にした。しかし、インスリンは分泌された。この結果は、インスリンの分泌に酸性 pH そのものではなく、 $a_3$  をサブユニットとする V-ATPase が必要であることを示している。oc/oc マウスを保持し、同時に開発した迅速に遺伝子欠失を作る手法によって  $a_3$  欠失マウスを作成し本研究に貢献している。

## 4. 事後評価結果

### 4 - 1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

#### 外部発表件数

論文発表		著作物		招待講演		口頭発表		ポスター発表		特許	
国内	国際	国内	国際	国内	海外	国内	海外	国内	国際	国内	国際
0	16	4	4	1	11	8	3	10	6	0	0

このチームは15年度採択で期間が4年と短く、代表者の定年をはさみ2度の移転をした。それにもかかわらず、要点をついた質の高い成果を着実にあげており、発表された論文は数こそ多くはないが Nature Cell Biol. JBC など一流誌に質の高い論文を発表している。代表者の生化学の分野での世界的評価は高く、海外での招待講演も多い。課題名の「モーターとしての」に関しては、生物物理的観点からの研究が多いなかで現象論的な独自

の合理的な取り組みをしている点は評価されるし、採択の趣意はそれを狙って頂いた。勿論、この点でのメカニズム解明はこのチームに限らずその時期にはないことは明らかである。

#### 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

H<sup>+</sup>-ATPase の研究はサブユニット回転の証明以来、物理的に非常に興味深い問題として、研究が進展している。この領域でも、運動タンパク質としてメカニズム解明、工学的応用への興味で伊藤チームが成果をあげている。その反面、生物学的機能としての研究は日陰に追いやられた感がある。このチームは、1分子計測も手段として用い、従来からの生化学的立場から、豊富な生化学の蓄積の上でこの酵素を生物学的機能からの視点でF型、V型両方を目的に応じて使い分けて研究している。一般にはこの酵素はエネルギー代謝系の重要な要素として認識されているが、特にV型はこの成果で示されたように多岐に渡る生物学的機能を担っている。V型の構造が明らかになったのは比較的新しい。それらの機能はインスリン、ホルモン他の分泌機能に係るばかりでなく多くの病態に深く関係している。この分野は現在基礎研究の段階で性急に応用としての成果を問うのは妥当ではない。しかし、この研究で得られた成果、今後の進展は医療、創薬に大きく貢献する筈である。領域の課題の中でも応用への展開の可能性の大きなテーマである。最近では小胞輸送と V-ATPase の関連を示すこの成果が医学的な重要性から、News and View、This Week in ST、などに取り上げられた。今回得られた知見をもとに、外部機関や企業との連携もすでに進んでおり、今後の発展が大変期待できる。

#### 4 - 3 . その他の特記事項

数年間の共同研究の結果を踏まえた NSF の研究費に、ハーバード大学 V. Marshansky 博士を代表者、二井を consultant とした研究費が採択されている。また、共同研究者、和田博士および孫 和田博士は文科省科学研究費に採択されている。これら共同研究者の他の研究事業への展開を、下記のようにまとめた。なお、二井は本研究の展開によって、応用酵素研究会より助成金を受けている(下記)。

記

##### 1) NIH/NIDDK Program Project Grant

Principal Investigator: V. Marshansky

Consultant: M. Futai

Title of the Project: "Cellular Biology of Renal Function and Disease"

##### 2) Pilot & Feasibility Grant (Boston Area Diabetes Endocrinology Research Center)

Principal Investigator: V. Marshansky

Consultant: M. Futai

Title of the Project: "V-ATPase and Regulation of the Protein"

##### 3) H.15 ~ 19 科学研究費補助金 特定領域研究 和田 洋

「発生・分化を担うエンドソーム・リソソームのメムブレンダイナミクス」

##### 4) H.18 公益信託林女性自然科学者研究助成基金 孫 和田 戈虹

「分泌制御における液胞型プロトンポンプ」

##### 5) H.18 ~ H.19 科学研究費補助金 基盤研究(C) 孫 和田 戈虹

「細胞、組織、そして個体におけるプロトン・サーキットの研究」

##### 6) H.19 ~ H.20 科学研究費補助金 特定領域研究 孫 和田 戈虹

「酸性オルガネラの pH 感知・制御メカニズムと膜のダイナミクス」

##### 7) H17 ~ 18 日本応用酵素協会 研究助成金 二井将光

「プロトンポンプ ATPase(H<sup>+</sup>ATPase)の作動機構と多様性に関する研究」