

「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 将光

((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、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。現在までの実績を踏まえ、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 においてはプロトン輸送による回転と ATP 加水分解に伴う回転は分離できること、金粒子を用いると高速回転が検出でき、回転速度には“ゆらぎ”があること、変異を導入し回転の開始と停止に重要なドメインを固定できたこと、などである。同時に V-ATPase の $\alpha 2$ イソフォームのアミノ末端には特定のオルガネラ (初期エンドソーム) に局在する為のシグナルがあること、多様な酸性オルガネラに対応して、ユニークなイソフォームがあることなど多くの成果を得た。

2. 研究実施内容

本研究は、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) を明らかにすること、生理的機能を踏まえて細胞生物学的役割 (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 の基本的な作動機構、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。

本年度は 2 つの ATPase のうちで、F-ATPase の回転を金粒子をプローブとして解析した。F-ATPase に導入した直径 200 nm から 40 nm の金粒子の回転を見たところ、回転速度には“ゆらぎ”があり、プローブの直径はゆらぎに影響しなかった。平均速度は粒子の大きさに伴って減少したが、直径 40 nm と 60 nm の粒子は同じ速度であった。さらにミリ秒の時間分解能で観察すると、ほぼ 10 % の粒子が回転していた。

また、F-ATPase が ATP の加水分解に伴って回転する為、プロトン輸送残基 cAsp61 およ

び、aArg210 は必須ではないこと、プロトン輸送と ATP 加水分解に伴う回転は反応過程として分離できることを示した。これに対して、F-ATPase は ATP 合成酵素としてプロトンの電気化学的ポテンシャルを駆動力に ADP とリン酸から ATP を合成している。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 (*ab₂* 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 *F₀* 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。このような研究を進める為の基礎実験を開始した。

V-ATPase を F-ATPase と比較すると、*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。本研究ではマウスの 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、膜部分 *V₀* を形成するサブユニット *a* の *a2* および *a3* イソフォームが、V-ATPase を特定のオルガネラに局在化させる為のドメインを持っていることを明らかにした。近位尿細管の表層細胞ではアルブミンをエンドサイトーシスによって細胞内に回収している。この回収機構に関与している初期エンドソームに *a2* をサブユニットとする V-ATPase が局在し、エンドソーム内の酸性 pH を形成し、他のオルガネラと融合すること、*a2* イソフォームのアミノ末端が膜融合因子 Arf6 (small GTPase) と ARNO を細胞質からリクルートすることを実証した。また、破骨細胞の形質膜の V-ATPase は *a3* イソフォームをサブユニットとしており、分泌型リソソームが形質膜と融合することによって局在することを示した。さらに、分泌型リソソームは他のリソソームとは異なることを明らかにした。

また、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。同時に、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のクローンを迅速に作成する方法を確立した。また、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。さらに、組織によって多彩な V-ATPase が分布している一例として、Epididymis に多様なイソフォームが局在していることを示した。

3. 研究実施体制

「F-ATPase」と「V-ATPase」生化学グループ

①研究分担グループ長：二井 将光((財) 微生物化学研究会微生物化学センター 二井 特別研究室、特別研究員)

②研究項目：V-ATPase サブユニットイソフォームと酸性オルガネラ

V-ATPase および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

これら研究項目の1部として Massachusetts General Hospital の D, Brown 教授、V. Marshansky 教授のグループと共同研究を行っている。

「V-ATPase」 ナノモーターの形成と生理学グループ

①研究分担グループ長：和田 洋 (大阪大学産業科学研究所、教授)

②研究項目：F-ATPase の ATP 合成／分解に伴う回転の解析、V-ATPase の生理的役割の解明

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文(原著論文)発表

- **H. Hosokawa, M. Nakanishi, S. Kashiwagi, K. Hayashi, I. Taira, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai,** ATP-dependent rotation in mutant ATP synthases lacking proton transport,. *J. Biol. Chem.* **280**, 2379-23801 (2005)
- **M. Nakanishi-Matui, S. Kashiwagi, H. Hosokawa, D. J. Cipriano, S. D. Dunn, Y. Wada, M. Futai,** High-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector: ε subunit-sensitive rotation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4126-4131 (2006)
- **C. Pietreman, G-H. Sun-Wada, M. Mckee, V. Marshansky, D. Brown, M. Futai, and S. Bretton,** Specific distribution of V-ATPase subunit isoforms in the rat epididymis, *Biol. Reprod.*, **74**, 185-194 (2006)
- **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)
- **A. Hurado, M. Skimmer, J. E. Annan, M. Futai, G-H. Sun-Wada, S. Bourgoïn, J. Casanova, A. Wildeman, S. Bechousa, D. A. Ausiello, D. Broun, and V. Marshansky,** V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway *Nature Cell Biol.*, **8**, 124-136 (2006)
- **M. Nakanishi-Matui and M. Futai,** Stochastic proton pumping ATPases: from single molecules to diverse physiological roles *IUBMB Life*, in press, 2006
- **F. Jouret, C. Auzanneau, H. Debai, G-H. Sun-Wada, C. Pretto, E. Marbai, FE. Karet, PJ. Courtoy, O. Devuyst,** Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H⁺-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol.* (2005) **16**:3235-3246
- **G-H. Sun-Wada, H. Tabata, and N. Kawamura,** Selective assembly of subunit isoforms in mouse kidney. *J. Bioenerg. Biomemb.* in press. (2006)