

「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

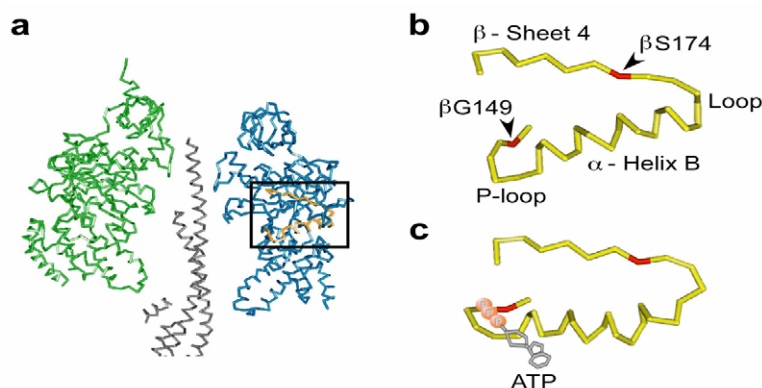
プロトンポンプである F-ATPase (ATP 合成酵素) と V-ATPase (液胞型 ATPase) に注目し、サブユニットの回転を伴うナノモーターであることを実証してきた。過去の実績を踏まえ、ATP 加水分解に伴う回転の機構とプロトン輸送の共役、サブユニットのアセンブリーの機構、マウス V-ATPase の多様な役割、プロトンポンプ活性とホルモン分泌の共役などの解明に向け研究を進めている。本年度に得られた主な成果として、F-ATPase の F₁ 部分を用い、 γ サブユニットに導入した金粒子の高速回転を観察した。さらに回転には“ゆらぎ”があることを示し、 β サブユニットに各種の変異を導入し回転の開始と停止に重要なドメインを固定した。同時に、V-ATPase の a2 イソフォームおよび a3 イソフォームに特定のオルガネラに局在する為のシグナルがあること、E サブユニットは膜内部分と表在部分が結合する為により重要であること、多様な酸性オルガネラに対応して、各サブユニットにはユニークなイソフォームがあること、などの成果を示し得た。今後さらに研究を続け、回転を伴うプロトンポンプの機構と機能するオルガネラへの局在機構として成果をまとめる。

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 の作動機構、触媒中心、反応機構、プロトン輸送機構などは基本的に同じところが多い。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てきた。

本年度は 2 つの ATPase のうちで、F-ATPase の F₁ 部分の回転を金粒子をプローブとして解析した。直径 60 nm の金粒子の回転を、1 回転に要する時間と、回転速度を中心に解

析したところ、いずれの場合にもゆらぎが観察できた。また、高速回転は、 120° づつのステップ間の速度と次のステップまでの待ち時間 (dwell) によって速度が決まること、ADP・Mg の阻害によってさらに秒単位で回転が停止すること、が明らかとなった。また、回転は図に示した β サブユニットの β ・シート/ループ α ヘリックス/P ループ部分の構造変化によって駆動されると考えられる。実際に β ・シートに位置する Ser174 残基の変異 (Ser174Phe, Ser174Leu) によって回転速度は10分の1にまで低下し、変異によって 120° ステップ間の時間が極端に遅くなった。次に P ループの Gly149Ala という二番目の変異によって回転速度は野生型にまで回復した。二つの変異の結果は、回転の駆動される上で β シートから P ループに及ぶドメインの重要性を示している。変異によって ATPase 活性とともに回転速度が低下するという結果は、アクチンフィラメントを用いた場合には得られなかった。一分子観察におけるプローブの重要性を示している。



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 V_0 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、特定のオルガネラに V-ATPase を局在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は *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、膵 β 細胞のインスリン分泌顆粒には *a3* イソフォームをサブユニットする V-ATPase が局在している。*a3* イソフォームの欠失マウスのランゲルハンス島からはインスリンは分泌されなかった。しかし、バフィロマイシン、コンカナマイシン等によって V-ATPase を阻害し、 β 細胞の分泌顆粒内の pH を中性にした場合にはインスリンの分泌は見られた。すなわち、V-ATPase の顆粒内の酸性 pH よりも *a3*

イソフォームそのものが、顆粒が形質膜と融合し、インスリンが分泌される為に必須であることを示した。

また、本研究では多様なプロトンポンプが果たす生理学および細胞生物学的な役割について研究を進めている。各種分泌組織に局在する V-ATPase イソフォームを同定し、特異性を明らかにする計画である。

3. 研究実施体制

(1)「F-ATPase」と「V-ATPase」生化学グループ

①研究者名

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)

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。

(2)「V-ATPase」ナノモーターの形成と生理学グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- *C. Pietrement, G.-H. Sun-Wada, N. D. Silva, M. McKee, V. Marshansky, D. Brown, M. Futai, and S. Breton*, Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol. Reptot*, **74**, 185-194 (2006).
- *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, H. Hosokawa, D. J. Cipriano, S. D. Dunn, Y. Wada and M. Futai*, Stochastic high-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector. *J. Biol. Chem.*, **281**, 4126-4131 (2006).
- *G. H. Sun-Wada, T. Tbyomura, Y. Murata, A. Yamamoto, M. Futai, and Y. Wada*, The a₃ isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic β cell. *J. Cell Sci.*, **119**, 4531-4540 (2006).
- *A. Hurtado-Lorenzo, M. Skinner, J. El Annan, M. Futai, G.-H. Sun-Wada, S. Bourgoïn, J.. Casanova, A. Wildeman, S. Bechoua, DA. Ausiello, D. Brown 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-Matsui, and M. Futai** Stochastic proton pumping ATPases: From single molecules to diverse physiological roles. *IUBMB-Life* **58**, 318-322(2006)
- **M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, T. Ubukata, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai**, Rotational catalysis of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector: stochastic fluctuation and a key domain of the β subunit, *J. Biol. Chem.*, *in revision*.
- **T. Pilizota, T. Bilyard, F. Bai, H. Hosokawa, M. Futai, and R. M. Berry** A programmable optical angle clamp for rotary molecular motors. *Biophys. J.*, *in press*.
- **G.-H. Sun-Wada, H. Tabata, N. Kawamura, M. Futai, and Y. Wada** Differential expression of *a* subunit isoforms of vacuolar-type proton pump ATPase in mouse endocrine tissue. *Cell Tissue Res*, *in press*.