

平成21年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570135

研究課題名（和文） ナトリウム輸送性V-ATPアーゼ複合体の分子構築と機能解析

研究課題名（英文） Molecular architecture and function of V-ATPase complex

研究代表者

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80134394

研究成果の概要:腸球菌V-ATPアーゼは9つの種類のサブユニットから構成されているイオン輸送性回転酵素である。本酵素の分子メカニズムを明らかにするためには、各サブユニット間の相互作用の全体像を明らかにすることが必要不可欠である。各サブユニット遺伝子の欠失株、大腸菌大量発現系、無細胞の蛋白質合成系などの利用を通じて、親水性サブユニット間の相互作用が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ナトリウム、V-ATPアーゼ、腸球菌、イオン、サブユニット

1. 研究開始当初の背景

(1) 液胞型プロトンポンプ(V-ATPアーゼ)は、動物細胞のリソソーム、ゴルジ装置、被覆小胞、シナプス小胞などの酸性小胞から、形質膜にいたるまで幅広く生体膜に分布し、ATP合成酵素(F-ATPアーゼ)と同様にイオン輸送と共役して分子が回転する回転モーター酵素である。酸性小胞不全の数多くの症例の中で、V-ATPアーゼ機能欠損が疾

患の一因であるものが明らかになり、治療薬開発に向けてV-ATPアーゼの分子構造及び反応機構に関する基礎情報が待望されている。しかしながら、V-ATPアーゼの研究対象は真核生物であり、精製標品の大量獲得が困難であること、オペロンを形成していないために複数のサブユニット遺伝子の取扱いが容易でないこと等の理由から分子レベルの解析は進展していない。

(2) 申請者は、腸内連鎖球菌にH⁺ではなくNa⁺を輸送する真核生物型のV (V₀V₁)-ATPアーゼ (Na⁺輸送性V-ATPアーゼ) を発見した。本酵素はntpオペロンにコードされた真核生物型のNa⁺輸送性V-ATPアーゼであることを、生化学的・分子生物学的解析によりに証明した。オペロンの大量発現系の構築に成功し、本酵素の大量精製法と再構成系を確立した。V-ATPアーゼがオペロンの中の9個の遺伝子産物から構成されていることも明らかにした。全てのntp遺伝子(ntpA, B, C, D, E, F, G, I, K)の欠失変異株の作製及び遺伝子機能相補系も確立し、変異導入などによる分子生物学的解析を可能とした。イオン輸送反応の第一段階である基質(H⁺)の結合を測定することは、H⁺輸送性ATPaseにおいては極めて困難であるが、Na⁺共役性である本酵素の特徴を生かして、イオン結合V₀部分へのNa⁺結合の測定にも成功している。

(3) V-ATPアーゼの反応機構の解明にはその分子構造情報が必要不可欠である。V₀部分の結晶構造解析に関する共同研究を、J. E. Walker (MRC, イギリス) のグループと実施してきた。その結果、NtpK ローター部分の結晶構造解析に世界で初めて成功した。

(4) V-ATPアーゼの細胞生理上の重要性の認識に基づいて、世界的に数多くの研究者が本酵素の研究を行っている。しかしながら、真核生物におけるV-ATPアーゼの構造とメカニズムに関わる分子情報の取得は遅れている。古細菌などでもV-ATPアーゼに類似したH⁺-ATPaseが見い出されているが、構造・機能とも典型的なV-ATPアーゼとは異なっている。昆虫・細菌V-ATPアーゼではV₁部分の構造解析などが進められているが、複合体全体の研究が進められているのは、酵母のH⁺輸送性V-ATPアーゼに限定されている。本酵素が真正細菌に見いだされV型でしかもNa⁺輸送性であることは画期的なことで受け止められており、本ATPaseは真核生物V-ATPアーゼの研究のみならず、F型、各種イオンATPase、分子モーターの研究者からも注目されている。

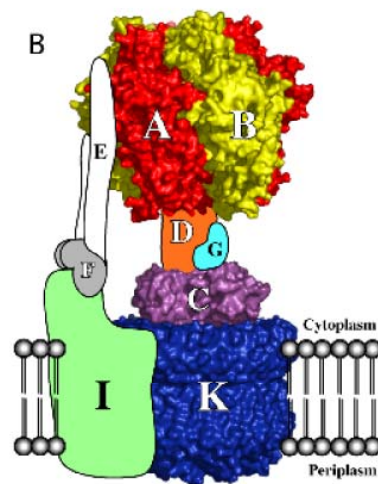
2. 研究の目的

本研究は、V-ATPアーゼ複合体の分子構築の全体像を明らかにするために、マイナーサブユニットの構造と機能を解明することを目的とする。V₁触媒部分を構成する主要サブユニットNtpA, NtpB、イオン通路V₀部分を構成するNtpK, NtpIサブユニットに関してはすでに研究がスタートしているが、マ

イナーサブユニットに関しては全く手がつけられていない。触媒部分V₁とイオン通路部分V₀を連結しV-ATPアーゼ複合体を構築する中心軸及び固定軸を構成するサブユニット(NtpE, NtpFなど)のV-ATPアーゼ複合体分子構築上の役割を明らかにするとともに、サブユニットK(イオン結合性回転ローター)、I(イオンチャネル)との機能的分子間相互作用の詳細を、生化学・遺伝子工学的手法、一分子蛍光解析などを中心に検討する。

3. 研究の方法

本酵素複合体のモデル図を示す。以前の実験結果や他のV-ATPアーゼ、F-ATPアーゼ複合体との部分的な類似性に基づき提案しているものであり、本研究の目的は、その真偽の検証を行うことでもある。



(1) NtpA, B, C, D, E, F, G, I, Kの9つの各サブユニット遺伝子の欠失株から細胞膜を調製し、界面活性剤により変異V-ATPアーゼ複合体を可溶化後、グリセロール密度勾配遠心法により複合体を分離する。各サブユニットに対する抗体(ペプチド抗体も利用)を用いて免疫化学的にV-ATPアーゼ複合体構築に対する各サブユニットの役割を明らかにし、分子モデルを検討する。全体構造の中での各サブユニット間の相互作用を調べることができる。

(2) Ntpサブユニット間の相互作用を直接解析するためには、全てのサブユニットを精製することが前提である。大腸菌におけるサブユニット遺伝子の大量発現系を構築し、大腸菌より精製するアプローチを行うとともに、大腸菌PURE systemあるいは小麦胚芽無細胞蛋白合成系を利用して精製標品を得るアプローチを進める。精製サブユニット間の相互作用については、分析遠心法や、ピアコア(表面プラズモン解析)を用いた一分子蛍

光解析により進める。

4. 研究成果

(1) 9つの各サブユニット遺伝子に欠失株をV-ATPaseの高誘導条件で培養後、細胞膜を調製し、ドデシルマルトシドにより変異V-ATPアーゼ複合体を可溶化し、Native PAGE及びグリセロール密度勾配遠心を行った。各サブユニットに対する抗体(ペプチド抗体も利用)を用いて免疫化学的にV-ATPアーゼ複合体の形成状態を調べた。その結果、Aサブユニットが複合体形成に必須であること、一方Bサブユニットは複合体形成に必ずしも必要でないことが明らかになった。その他のマイナーサブユニットの複合体形成における役割に関しては、補助的であった。

(2) 各サブユニット間の直接の相互作用を調べるために、無細胞の蛋白質合成系の利用は有益であり、小麦胚芽抽出液を用いてサブユニットの合成を試みた。現在までのところ、7種類の親水性サブユニット、A,B,C,D,E,F,Gについては、各サブユニットの合成効率に差があるものの成功した。タグ付きの組み換えサブユニットも同様に合成に成功しており、親和性カラムクロマトグラフィーにより、これらサブユニットの精製に有用である。

(3) 腸球菌にはF-ATPaseも発現しており、その存在は変異V-ATPアーゼ複合体の分子的な解析に都合が悪い。酸性感受性によりF-ATPaseの欠損株の単離が可能であることに基づいて、F-ATPase欠損株のスクリーニングを行い、5種類の欠損株の単離に成功した。

(4) イオン輸送性回転モーターのメカニズムを理解するためには、V-ATPアーゼ複合体におけるV_o部分の構造上の位置づけと分子間相互作用の詳細を明らかにする必要がある。腸球菌ナトリウム輸送性V-ATPアーゼのイオンチャネルであるIサブユニットと外周サブユニットであるEとFサブユニットとの相互作用について調べた。

はじめにPURE systemを用いた無細胞タンパク質合成系を利用することにより、サブユニットI(N末端部分)、E、F間で相互作用があることを明らかにした。

一分子蛍光分析によりサブユニット間相互作用に関わる結合定数、化学量論を検討するために、大腸菌遺伝子発現系を利用して、サブユニットI(N末端部分)、E、Fを大量精製した。その結果、サブユニットIとEとはFを介して結合しうること、化学量論的にはI:F:Eが1:1:1で結合することがわかった。本酵素複合体1分子当たりサブユニットEは3分子含まれる。触媒部分A₃B₃と同様にサブユニットEの1分子が固定

軸を形成しているかどうか興味深い。

(5) サブユニットIのN末端は親水性領域であり、C末端は膜貫通領域であるため、大腸菌遺伝子発現系による合成では凝集体を形成するために精製に適さない。各種リン脂質リポソームの添加により、小麦胚芽タンパク質合成系を改良することにより、全長サブユニットIの合成に成功し、今後全長サブユニットI、F、E間の分子間相互作用の解析に有用である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Yamamoto M, Unzai S, Saijo S, Ito K, Mizutani K, Suno-Ikeda C, Yabuki-Miyata Y, Terada T, Toyama M, Shirouzu M, Kobayashi T, Kakinuma Y, Yamato I, Yokoyama S, Iwata S, Murata T. Interaction and stoichiometry of the peripheral stalk subunits NtpE and NtpF and the N-terminal hydrophilic domain of NtpI of *Enterococcus hirae* V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 283(28):19422-19431. 2008. 査読有
- ② Murata T, Yamato I, Kakinuma Y, Shirouzu M, Walker JE, Yokoyama S, Iwata S. Ion binding and selectivity of the rotor ring of the Na⁺-transporting V-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(25):8607-8612. 2008. 査読有
- ③ 村田武士、山登一郎、柿沼喜己、横山謙、V-ATPaseの新しい機能とその構造からみえてきたメカニズム、蛋白質核酸酵素、52, 335-341, 2007, 査読有

[学会発表] (計 5件)

- ① Mizutani K, Suno-Ikeda C, Ohno R, Kakinuma Y, Yamato I, Iwata S, Murata T. Engineering of the rotor ring of the Na⁺ motive V-ATPase from *Enterococcus hirae* to examine the stoichiometry, 第46回日本生物物理学会年会、福岡国際会議場、2008年12月4日
- ② Yamamoto M, Unzai S, Saijo S, Ito K, Mizutani K, Kakinuma Y, Yokoyama S, Yamato I, Iwata S, Murata T. Stoichiometry and solution structure of the peripheral stalk subunits of *Enterococcus hirae* V-ATPase. 第46回日本生物物理学会年会、福岡国際会議場、2008年12月3日

- ③ 山本三沙岐、雲財悟、水谷健二、寿野(池田)千代、矢吹(宮田)有香子、山登一郎、柿沼喜己、大林尚美、寺田貴帆、外山光俊、白水美香子、岩田想、横山茂之、村田武士、腸内連鎖球菌V型Na⁺-ATPaseの外周固定子のサブユニット構成、第45回日本生物物理学会年会、パシフィコ横浜、2007年12月23日
- ④ 新井聡史、山登一郎、柿沼喜己、村田武士、腸内連鎖球菌ナトリウム輸送性ATPase、V1部分の精製、分解、再構成の検討、第45回日本生物物理学会年会、パシフィコ横浜、2007年12月23日
- ⑤ 村田武士、山登一郎、柿沼喜己、液胞型イオン輸送生ATPアーゼの分子制御とメカニズム、第80回日本生化学会・第30回日本分子生物学会合同年会、パシフィコ横浜、2007年12月15日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号 80134394

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし