

機関番号 : 31201

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20370048

研究課題名 (和文) プロトンポンプ ATPase の作動機構と酸性環境の形成

研究課題名 (英文) Proton Pumping ATPase and Roles of Acidic pH

研究代表者名

二井 将光 (FUTAI MASAMITSU)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 50012646

研究成果の概要 (和文) : サブユニットの回転を伴うプロトンポンプ ATPase (ATP 合成酵素 F-ATPase とリソソーム型 V-ATPase) の機構を、生理学的条件に於いて生化学的・熱力学的に明らかにした。一分子ずつ観察すると、F-ATPase が阻害状態に入ることを示した。また、V-ATPase の小胞輸送と破骨細胞の形質膜形成に於ける役割を明らかにした。さらに、破骨細胞形成と多核細胞化は、別の情報伝達によることを示した。

研究成果の概要 (英文) : We have studied rotary mechanism of F-ATPase (ATP synthase) and V-ATPase (lysosome-type ATPase) under the physiological conditions. Significant results were obtained for biochemical and thermodynamic regulatory mechanism. We also studied roles of V-ATPase in vesicle trafficking and formation of osteoclast plasma membrane. Formation of multinuclear cells was studied together with osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野 : 生化学

科研費の分科・細目 : 生物科学・機能生物化学

キーワード : 1) V-ATPase 2) F-ATPase 3) 破骨細胞 4) リソソーム 5) 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、プロトンを輸送する ATPase (F-ATPase と V-ATPase) に関して、国内外に高く評価される業績を上げてきた。研究開始当初の特筆すべき成果は、膜酵素としての

F-ATPase と V-ATPase の回転機構の実証、V-ATPase の多様なイソフォームの同定、V-ATPase の生理的機能の実証、等である。本研究は、このような成果の上に計画し、実施された。

2. 研究の目的

オルガネラ内外に形成されるプロトンの電気化学的ポテンシャルと内部の酸性pHは、生物において重要な役割を果たしている。すなわち、ATP合成、物質輸送、エンドサイトーシス、分泌等にプロトンは関与している。組織のレベルでは骨吸収、イオン恒常性の維持、タンパクの再吸収、精子の成熟等に酸性pHが必要である。

このように酸性のpHを考えると、プロトンを輸送するATPase、F-ATPase(ATP合成酵素)およびV-ATPase(リソソーム型V-ATPase)が欠くことができない。

代表者らは、F-ATPaseの触媒中心と回転を伴う機構、V-ATPaseの多様性と生理機能、等に関して多くの新しい発見をし、国際的に高く評価されている。

代表者らは、F-ATPaseの3種のサブユニットからなる複合体($\delta \epsilon \gamma$)が回転し、反応を駆動していること、回転速度は確率的なゆらぎを伴うこと、 β サブユニットのヒンジ部分が回転を駆動していることを示した。また、V-ATPaseが触媒機構やサブユニットの回転など、F-ATPaseと非常によく似ていること、多彩な酸性環境に対応して数多くのイソフォームがあること等を示してきた

具体的には、次の点を明らかにすることを目的とした。

1) F-ATPaseによるサブユニットの回転を伴う機構を明らかにする。系統的に変異を導入し、高次構造と対比して回転を駆動する領域を証明し、ATP加水分解がサブユニットの回転を駆動する機構を明らかにする。また、マウスV-ATPaseを酵母に於いて発現させ、各イソフォームの回転に於ける役割を明らかにする。

2) V-ATPaseのオルガネラ膜、形質膜に局在化する機構を実証する。特に4種のイソフォームがあり、各々が異なるオルガネラに分布している膜貫通型の α サブユニットに注目し、V-ATPaseの局在化機構を実証する。 β 細胞のインスリン分泌、尿細管表層細胞のタンパク再吸収、破骨細胞の形成機構に注目して、オルガネラの輸送と膜融合に於ける α サブユニットの役割を明らかにする。同時に、分泌型リソソームの細胞形質膜への融合機構を明らかにする。

3) V-ATPase および F-ATPase の阻害剤を探

索する。特に、特異的イソフォームに注目する。阻害剤は二つのATPaseの研究上、重要である。

3. 研究の方法

一般的な生化学・分子生物学的手法に加えて、一分子観察もとり入れた。蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡や電子顕微鏡を駆使し、酸性環境の研究を推進した。回転は金粒子を用い、レーザー光を照射し暗視野顕微鏡下に観察した。同時に、F-ATPaseとV-ATPaseに複数の変異を導入し、あるいは阻害剤を添加し、高次構造を推定しながら回転機構に迫ることができた。

4. 研究成果

1) 回転を駆動する機構

金粒子40~60nmを用いた一分子観察により、F-ATPaseのサブユニットが回転する機構と調節機構について、新しい成果が得られた。

① γ サブユニットは、確率的にゆらぎながら回転している。速度は、ミリ秒のレベルで変化している。120°Cずつのステップで回転している。各ステップの活性化エネルギーは低く、スムーズに回転している。また、ほぼ1,000回転すると、阻害状態になる。阻害状態は約1秒間であり、回転を始める活性状態に入る為の活性化エネルギーは通常の回転を続けている場合の2倍の値となった。

② β サブユニットとの相互作用が γ サブユニットの回転に重要であることを示した。 γ のMet23残基は β サブユニットのDELSEED部分に接しており、Met23Lysの変異とこの変異を抑制する変異の解析により、Met23/DELSEED β/γ 相互作用がスムーズな回転に必須であることを示した。

β サブユニットのATP結合部位と触媒残基の形成するヒンジドメインについて、各種変異を系統的に導入し、回転を解析した。その結果、スムーズに回転する為にヒンジドメインの疎水性が重要であることが明らかになった。

F-ATPaseの触媒反応と調節機構について夫々の結果は、4つの原著論文に発表した。加えて反応機構について2つの総説を発表した。

③酵母の V-ATPase に注目し、サブユニット回転機構を解析した。V-ATPase の回転速度は F-ATPase の 1/4 ほどであり、また、数十回転すると阻害状態に入る。阻害状態では、F-ATPase とは異なり、アイドリングをしていた。この発見は、論文準備中である。

マウス V-ATPase のイソフォームの機能を酵母を用いて解析する系を確立した。その一例として、酵母の E サブユニットの遺伝子を欠失させ、これにマウスの E1 あるいは E2 イソフォームの cDNA を導入した。でき上がったハイブリッド ATPase を解析し、a サブユニットと E サブユニットの相互作用が明らかになった。原著論文一報を発表し、現在、他の論文を執筆中である。

④膜小胞の trafficking に於いて、V-ATPase が積極的な役割を果たしていることを示してきたが、総説としてこの考えをまとめ、発表した。

さらに、破骨細胞に分化するマクロファージについて検討を加え、細胞の多核化と破骨細胞への分化が異なる情報伝達系によって進行することを明らかにした。原著論文を準備している。

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 9 件)

- 1) H. Okamoto and M. Futai: Vacuolar type ATPases in animal and plant cells. Encyclopedia of Biophys. in press. (2011)
- 2) M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, R. K. Nakamoto, M. Futai: The mechanism of rotating proton pumping ATPases. Biochim. Biophys. Acta 1797, 1343-1352 (2010)
- 3) M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, M. Kojima, T. Nonaka, M. Futai: Roles of the β subunit hinge domain in ATP synthase F_1 sector: Hydrophobic network formed by introduced β Phe174 inhibits subunit rotation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 395, 173-177 (2010)
- 4) M. Sekiya, H. Hosokawa, M. Nakanishi-Matsui, M. K. Al-Shawi, R. K. Nakamoto and M. Futai: Single molecule behavior of inhibited and active states of

Escherichia coli ATP synthase F_1 rotation. J. Biol. Chem. 285, 42058-42067 (2010)

- 5) M. Sekiya, R. K. Nakamoto, M. K. Al-Shawi, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai: Temperature dependence of single molecule rotation of the *Escherichia coli* ATP synthase F_1 sector reveals the importance of $\alpha \cdot \beta$ subunit interactions in the catalytic dwell. J. Biol. Chem. 284, 22401-22410 (2009)
- 6) S. Kashiwagi, A. Iwamoto -Kihara, M. Nakanishi -Matsui, and M. Futai: Effects of mutations in β subunit hinge region on ATP synthase F_1 sector rotation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 227-231 (2008)
- 7) V. Marshansky and M. Futai: The V-type H^+ -ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 415-426 (2008)
- 8) M. Nakanishi-Matsui and M. Futai: Stochastic rotational catalysis of proton pumping F-ATPase. Phil. Trans. Royal Soc. B 363, 2135-2142 (2008)
- 9) K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Nakanishi -Matsui, and M. Futai: Unique assembly of a hybrid yeast vacuolar H^+ -ATPase containing mouse testis -specific E1 isoform. Biochim. Biophys. Acta 1777 (10), 1370-1377 (2008)

[学会発表] (計 31 件)

- 1) 後藤 (松元) 奈緒美, 破骨細胞に発現する V-ATPase のイソフォーム構成と ATPase 活性 (日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 30 日) ※東日本大震災の為中止。
- 2) 関谷瑞樹, 大腸菌 ATP 合成酵素における ϵ サブユニットの役割 (日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 30 日) ※東日本大震災の為中止。
- 3) 岡本晴子, A functional analysis of vacuolar H^+ ATPase subunit C in yeast (BMB2010, 神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 9 日)
- 4) 関谷瑞樹, Effect of ϵ subunit on F_1 rotation in *E. coli* ATP synthase (BMB2010, 神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 9 日)

- 5) 関谷瑞樹, Single molecule detection of an intrinsic inhibited state of the *E. coli* F₁ ATPase (BMB2010, 神戸ポートアイランド, 2010年12月9日)
- 6) 中西真弓, LPS (リポポリサッカライド) が誘導するマクロファージの細胞融合 (BMB2010, 神戸ポートアイランド, 2010年12月7日)
- 7) 関谷瑞樹, The intrinsic inhibition mechanism of ATP hydrolysis in ATP synthase: Single molecule observation. (FAOBMB Symposium (OzBio2010), Melbourne. 2010年9月27日)
- 8) 中西真弓, Different localization of specific V-ATPase between osteoclast and LPS-induced multinuclear cells. (FASEB Summer research conferences, Colorado, USA. 6月10日)
- 9) 関谷瑞樹, Thermodynamics of single molecule rotation of *Escherichia coli* F-ATPase. (FASEB Summer research conferences, Colorado, USA. 6月9日)
- 10) 二井將光, プロトンの生理学的役割について. (第87回日本生理学会、岩手、2010年5月21日)
- 11) 二井將光, What we have learned from single molecules: from the results of F-ATPase (F₀F₁). (Symposium on The Future of Biochemistry and Molecular Biology in the 21 Century, Seoul National University, Seoul. 2010年5月8日)
- 12) 関谷瑞樹, 大腸菌 ATP 合成酵素による ATP 加水分解反応の阻害機構 (日本薬学会第130年会, 就実大学(岡山), 2010年3月29日)
- 13) 後藤(松元奈緒美), 破骨細胞における V-ATPase a3 サブユニット局在オルガネラの解析 (第84回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2009年10月23日)
- 14) 関谷瑞樹, ATP 合成酵素の回転における熱力学と γ - β サブユニット間の相互作用の重要性 (第84回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2009年10月22日)
- 15) 中西真弓, Pauses of subunit rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ Sector. (第84回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2009年10月22日)
- 16) 関谷瑞樹, Thermodynamics of single molecule rotation of proton pumping ATPase (21st IUBMB and the 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 上海国際会議センター, 2009年8月6日)
- 17) 後藤(松元) 奈緒美, Characterization of organelles with V-ATPase a3 subunit in osteoclasts (JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年7月24日)
- 18) 岡本晴子, Effect of magnetic fields on blue-light receptor, cryptochrome γ -dependent responses in *Arabidopsis thaliana* (JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年7月24日)
- 19) 関谷瑞樹, Thermodynamics of single molecule rotation of *Escherichia coli* ATP synthase. (JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年7月24日)
- 20) 中西真弓, Subunit rotation of *E. coli* F₁-ATPase: Effects of mutations in the β subunit hinge domain. (JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年7月24日)
- 21) 関谷瑞樹, Thermodynamics of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector rotation and effects of γ subunit Met23 replacement. (Iwate International Symposium on Biochemical Approaches to Drug Discovery, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年5月15日)
- 22) 中西真弓, Mechanism of proton transport ATPases: rotation of ATP synthase F₁ sector. (Iwate International Symposium on Biochemical Approaches to Drug Discovery, 岩手医科大学矢巾キャンパス, 2009年5月15日)
- 23) 関谷瑞樹, ATP 合成酵素の回転における熱力学と β - γ サブユニット間の相互作用による影響 (生化学会東北支部会, 東北大学片平さくらホール, 2009年5月9日)
- 24) 関谷瑞樹, ATP 合成酵素の回転における β - γ サブユニット間相互作用の影響. (日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26日)
- 25) 関谷瑞樹, The effects of γ subunit Met23 replacement on ATP synthase F₁ sector rotation. (BMB2008, 神戸, 2008年12月10日)
- 26) 関谷瑞樹, ATP 合成酵素の β - γ サブユニット間相互作用による回転への影響. (第47回日本薬学会東北支部大会, 岩手, 2008年10月26日)

- 27) 中西真弓, Effects of mutations in the β subunit hinge domain on ATP synthase F_1 sector rotation. (Mini-Symposium on Proton Pumping ATPases -Iwate-Oxford Collaboration, 岩手医科大学, 2008年, 9月22日)
- 28) 関谷瑞樹, The effect of γ subunit Met23 replacement on ATP synthase F_1 sector rotation. (Mini-Symposium on Proton Pumping ATPases - Iwate -Oxford Collaboration, 岩手医科大学, 2008年, 9月22日)
- 29) 中西真弓, Rotation of ATP synthase F_1 sector with mutations in β subunit hinge domain. (Bio Nano Technology, 神戸, 2008年9月17日)
- 30) M. Futai, Effects of mutations in the beta subunit hinge domain on ATP synthase F_1 sector rotation. (33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference: Biochemistry of Cell Regulation, アテネ, 2008年7月1日)
- 31) M. Futai, Stochastic rotational catalysis of proton pumping F-ATPase. (Royal Society and JSPS Joint Symposium, ロンドン, 2008年6月15日, 招待講演)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二井 将光 (FUTAI MASAMITSU)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：50012646

(2) 研究分担者

中西 真弓 (NAKANISHI MAYUMI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20270506

後藤 (松元) 奈緒美 (GOTO NAOMI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80403971

関谷 瑞樹 (SEKIYA MIZUKI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：70509033

(3) 連携研究者

研究者番号：