

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890239

研究課題名（和文）骨粗鬆症を標的とする組織特異的プロトンポンプ ATPase 阻害役の探索

研究課題名（英文）Exploitation of tissue specific proton pump inhibitors

研究代表者

關谷 瑞樹 (SEKIYA MIZUKI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70509033

研究成果の概要（和文）：プロトン輸送 ATPase の駆動機構を明らかにすることを目的に F 型 ATPase をモデルとして一分子観察を中心とした解析を行った。解析は回転子の・サブユニットと固定子の・サブユニットの相互作用、及び回転の途中に見られる秒単位の休止に着目し、熱力学的解析を行った。その結果、・サブユニットの効率的な回転には、・・・サブユニット間の適切な相互作用が重要であることが示唆された。また、休止状態は連続して回転するときとは異なるエネルギー状態にあることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：I analyzed rotation mechanism of F-type ATPase using single molecule observation system in order to understand those of proton ATPases including V-type ATPase in osteoclast. Thermodynamic analysis of the rotation indicated that a specific  $\gamma$ - $\beta$  interaction in  $F_1$  sector is important for flat energy pathway during the rotation, and  $F_1$  requires  $\sim 2$ -fold higher activation energy for the transition from the active state (continuous rotation) to the inhibited state ( $\sim 1$  sec pausing) compared with that for normal steady-state rotation during the active state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：酵素、プロトン ATPase、V-ATPase、ATP 合成酵素、阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

骨格系を構成する骨の代謝は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により調節される。骨粗鬆症は加齢による骨形成の低下や閉経後の骨吸収の亢進などにより骨密度が低下する疾患であり、国内では 1000 万人以上が罹患している。しかし骨粗鬆症に対する有効な治療薬は開発されていない。破骨

細胞は骨吸収の際に骨表面で骨吸収窩と呼ばれる酸性環境を形成するが、酸性環境は特異的なアイソフォームをもつ V 型 ATPase により形成される。したがって、V 型 ATPase の触媒機構の解明、及び組織特異的阻害剤の探索は新たな骨粗鬆症治療薬の開発につながると思った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では以下のことを目的とした。

(1) 酵母及び哺乳類培養細胞を用いて破骨細胞特異的 V 型 ATPase 阻害剤を探索し、新規医薬品のシード化合物を見出すこと。

(2) プロトン輸送 ATPase について阻害剤や系統的な変異体を用いた解析を行い、回転を伴う触媒活性の分子メカニズムを解明すること。以下に詳細について記載する

(1) プロトン輸送 ATPase は F 型、V 型、P 型の 3 種に大別される。この中で V 型 ATPase は ATP を消費したプロトン輸送によりオルガネラ内部の酸性化などに関与する酵素である。V 型 ATPase は触媒活性を持つ  $V_1$  部分と膜内在の  $V_o$  部分で構成され触媒活性とプロトン輸送をサブユニットの回転により共役させている。

哺乳類細胞の V 型 ATPase は 13 種のサブユニットからなり、6 種のサブユニットには細胞やオルガネラに特異的なアイソフォームが存在する。膜貫通型  $a$  サブユニットには  $a1$ ,  $a2$ ,  $a3$ ,  $a4$  の 4 種のアイソフォームが存在する。その中で、一般的にリソソームに局在する  $a3$  が、破骨細胞への分化に伴って形質膜に運ばれ融合し、 $a3$  を持つ V 型 ATPase として形質膜に局在することも明らかになった。そこで、骨粗鬆症治療薬の標的として  $a3$  に着目した。

(2) 一方、F 型 ATPase は形質膜やミトコンドリアに局在し ATP を合成する酵素であり、ATPase 活性を持つ  $F_1$  部分 ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ ) と膜内プロトン輸送路を形成する  $F_o$  部分 ( $ab_2c_{10}$ ) からなる。V 型 ATPase と構造が類似しており、高効率ナノモーターとして広く研究されている。そこで、プロトン輸送 ATPase の触媒活性機構を解析するモデルとして F 型 ATPase にも着目した。

## 3. 研究の方法

粘性抵抗ができる限り小さい金ビーズをプローブとし、精製した各種変異 F 型 ATPase の回転を観察した。回転は  $120^\circ$  ずつのステップがあるが、変異による ATP 分解活性の減少に伴って、各ステップで回転が停止する確率が高くなるかどうか、停止時間に確率的なゆらぎがあるのか、回転速度にはゆらぎがあるか等について着目し、さらに詳しく検討した。

(1)  $\gamma \cdot \beta \cdot$  サブユニット間の相互作用による回転への影響

F 型 ATPase 変異体の解析は主に回転子の  $\gamma$  サブユニットの変異体である  $\gamma$  Met23Lys を中心に実施した。 $\gamma$  Met23Lys 変異体は野生型と比較して温度依存的に ATP 分解活性、プロトン輸送活性が低下することが報告されていた。そこで、野生型及び変異体の温度による回転速度・停止時間の変化について検討し

た。温度変化については、回転観察においてこれまでほとんど検討されていなかった。検討した結果から熱力学的解析を行い、高次構造と対応させた。

(2) 長い休止の解析

これまでに、 $F_1$  部分の回転の途中には秒単位の休止が存在することが示唆されていた。そこで、観察時間の延長により休止状態を定量的に評価し、メカニズムを解析した。さらに、内因性の阻害因子である  $\varepsilon$  サブユニットの添加による、回転への影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1)  $\gamma \cdot \beta \cdot$  サブユニット間の相互作用による回転への影響

$\gamma \cdot \beta$  サブユニットは  $120^\circ$  のステップを示しながら回転し、各ステップの間で野生型は平均 0.2 ms 停止した。停止している間に ATP が加水分解され、 $120^\circ$  回転している部分で生成物の解離と ATP の結合が起きると考えられる。熱力学的には、野生型の回転は停止部分と回転部分がほぼ同じ活性化エネルギーを持つことを明らかにした。この結果により、 $F_1$  の各反応段階では遷移状態へ移行する際の活性化エネルギーが低く一定に保たれており、 $\gamma \cdot \beta$  サブユニットは効率的に回転していることが示唆された。

また、 $\gamma \cdot \beta$  サブユニットの Met23 残基を Lys に置換した  $F_1$  の回転は、野生型と比較して停止部分で活性化エネルギー、エンタルピー、エントロピーのいずれもが上昇した。さらに、第二の変異として  $\gamma$  サブユニットの Glu381 を Asp に置換すると、 $F_1$  の停止時間と回転速度は野生型と同等に回復した。すなわち、 $\gamma$  Met23Lys 変異により停止部分で遷移状態への移行を妨げる新たな結合が  $\gamma$  23Lys と  $\gamma$  Glu381 の間で形成され、回転が阻害されたと推定された。したがって、 $\gamma$  サブユニットの効率的な回転には、 $\gamma \cdot \beta$  サブユニット間の適切な相互作用が重要と考えられる。研究成果は Journal of Biological Chemistry (2009, 284, 22401-22410) にて報告した。

(2) 長い休止の解析

観察時間の延長により、 $F_1$  は約 1 秒ごとに回転と停止を繰り返すことを明らかにした。連続回転している時は毎秒約 500 回転の高速で回転した。休止時間を含めた平均速度は毎秒約 160 回転であり、ATPase 活性から予想される回転速度と一致した。したがって、秒単位の休止によって ATP の加水分解は 60% 以上阻害されることが明らかになった。さらに、内因性の阻害因子である  $\varepsilon$  サブユニットの添加により、連続回転時間は変化せず休止時間は 3 倍に増加した。また、連続回転している時の回転速度は約 50% 低下した。このことから、 $\varepsilon$  サブユニットは回転速度を低下させるとともに、休止を延長させるこ

とによって、 $F_1$  による ATP の加水分解を抑制することが示唆された。さらに、休止について熱力学的解析を行い、休止状態は連続して回転するときとは異なるエネルギー状態にあることを明らかにした。破骨細胞におけるプロトンポンプ ATPase も共通するメカニズムを有する可能性が考えられる。研究成果は Journal of Biological Chemistry (2010, 285, 42058-42067) にて報告した。

#### 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 6 件)

1) Haruhisa Kikuchi, Kaori Okazaki, Mizuki Sekiya, Yasuyuki Uryu, Yasuhiro Katou, Kazunori Ueda, Shoichiro Kurata, Yoshiteru Oshima, Synthesis and innate immunosuppressive effect of 1,2-cyclopentanediol derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 2011, **46**, 1263-1273 査読有り

2) 中西真弓、關谷瑞樹、プロトンポンプ ATPase の回転触媒機構、日本応用酵素協会誌 2010, **45**, 11-18 査読無し

3) Mizuki Sekiya, Hiroyuki Hosokawa, Mayumi Nakanishi-Matsui, Robert K. Nakamoto, Marwan K. Al-Shawi, Masamitsu Futai, Single molecule behavior of inhibited and active state of *Escherichia coli* ATP synthase  $F_1$  rotation, *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 42058-42067 査読有り

4) Mayumi Nakanishi-Matsui, Mizuki Sekiya, Robert. K. Nakamoto, Masamitsu Futai, The mechanism of rotating proton pumping ATPases, *Biochim. Biophys. Acta* 2010, **1797**, 1343-1352 査読有り

5) Mizuki Sekiya, Robert K. Nakamoto, Marwan K. Al-Shawi, Mayumi Nakanishi-Matsui, Masamitsu Futai, Temperature dependence of single molecule rotation of the *Escherichia coli* ATP synthase  $F_1$  sector reveals the importance of  $\gamma$  subunit interactions in the catalytic dwell, *J. Biol. Chem.* 2009, **284**, 22401-22410 査読有り

6) Haruhisa Kikuchi, Mizuki Sekiya, Yasuhiro Katou, Kazunori Ueda, Takahiro Kabeya, Shoichiro Kurata, Yoshiteru Oshima, Revised structure and synthesis of celastramycin a, a potent innate immune suppressor, *Org. Lett.* 2009, **11**, 1693-1695 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

#### 2010 年度

1) Mizuki Sekiya, Hiroyuki Hosokawa, Robert K. Nakamoto, Marwan K. Al-Shawi, Mayumi Nakanishi-Matsui, and Masamitsu Futai, Thermodynamics of single molecule rotation of *Escherichia coli* F-ATPase. (FASEB Summer research conferences, Colorado, USA. 6月9日)

2) Mizuki Sekiya, Hiroyuki Hosokawa, Mayumi Nakanishi-Matsui, and Masamitsu Futai, The intrinsic inhibition mechanism of ATP hydrolysis in ATP synthase : Single molecule observation. (FAOBMB Symposium (OzBio2010), Melbourne. 2010年9月27日)

3) 關谷瑞樹, 細川浩之, Robert K. Nakamoto, Marwan K. Al-Shawi, 中西(松井)真弓, 二井將光, Single molecule detection of an intrinsic inhibited state of the *E. coli*  $F_1$  ATPase (BMB2010, 神戸ポートアイランド, 2010年12月9日)

4) 關谷瑞樹, 西山枝里, Robert K. Nakamoto, 中西(松井)真弓, 二井將光, Effect of  $\epsilon$  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) 關谷瑞樹, 中西(松井)真弓, 西山枝里, Robert K. Nakamoto, Marwan K. Al-Shawi, 二井將光, 大腸菌 ATP 合成酵素における  $\epsilon$  サブユニットの役割 (日本薬学会第 131 年会, 静岡, 3月30日 (東日本大震災のため中止))

#### 2009 年度

6) 關谷瑞樹、中西(松井)真弓、二井將光、ATP 合成酵素の回転における熱力学と  $\beta$ - $\gamma$  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)

7) Mizuki Sekiya, Thermodynamics of *Escherichia coli* ATP synthase  $F_1$  sector rotation and effects of  $\gamma$  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)

8) Mizuki Sekiya, 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)

9) Mizuki Sekiya, 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)

10) 細川浩之, 中西 (松井) 真弓, 関谷瑞樹,  
二井將光 Pauses of subunit rotation of  
*Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> Sector.  
(第84回日本生化学会大会, 神戸ポートア  
일랜드, 2009年10月22日)

11) 関谷瑞樹, Robert K. Nakamoto, Marwan  
K. Al-Shawi, 中西 (松井) 真弓, 二井將光  
ATP 合成酵素の回転における熱力学と  $\gamma$ -  
 $\beta$  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  
일랜드, 2009年10月23日)

12) 関谷瑞樹, 細川浩之, 中西 (松井) 真弓,  
二井將光, 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)

[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

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :