

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570171

研究課題名(和文) 一分子観察による植物のプロトンポンプ V - A T P a s e の細胞内 pH 恒常性維持機構

研究課題名(英文) The functional analysis of vacuolar-type proton pump ATPase

研究代表者

岡本 晴子 (Haruko, Okamoto)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：40552899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：動植物の細胞内pHは、原形質膜および細胞内酸性オルガネラ膜に存在するプロトンポンプATPaseによって精密に制御される。本研究では、液胞型V-ATPase複合体の構成分子(サブユニット)がその作動性に関わる機構を分子レベルで明らかにした。まず一分子観察法を用いて回転解析を行い、世界で初めて真核生物のV-ATPaseの回転速度を解明した。また、動植物のEサブユニットに共通のアミノ酸配列が、V-ATPaseの温度依存的触媒活性に関わる事を発見した。

研究成果の概要(英文)：The proton (H⁺) pumping vacuolar-type ATPase (V-ATPase) is a rotary enzyme comprising multiple subunits that plays a pivotal role in forming intracellular acidic compartments in eukaryotic cells. We have recorded the rotation speed of the V-ATPase using a single molecule analysis system for the first time. We have also identified a temperature-sensitive amino acid motif that is conserved in mammalian V-ATPase E subunits.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の触媒機構

1. 研究開始当初の背景

液胞型(Vacuolar-type)V-ATPaseは、回転触媒機構により生体膜の内外にプロトンを輸送するイオンポンプで、13ものサブユニットが様々な混合比で会合する超複合体型酵素である。ATP加水分解能を有する膜表在(V_i)およびプロトン輸送を担う膜内在(V_o)の2つのドメインからなり、主にリソソームや液胞等の細胞内オルガネラ膜に局在するが、エンドサイトーシスによって形質膜にも存在し、細胞内外の酸性環境を制御して生命現象に不可欠な機能を持つ。V-ATPaseの機能の欠損は多くの重篤な疾患の原因となり、がん細胞の増殖・転移にも関与することから、重要な創薬ターゲットでもある。多くのサブユニットにより構成されることから、触媒部位のみならず多角的に標的に出来る可能性があり、其々のサブユニットの機能を解析することが必要とされている。しかしながら、ATP加水分解およびプロトン輸送に関わるサブユニット以外については、その機能がほとんど解明されていなかった。また、その回転触媒についても、どのくらいの速度で回転するのか?速度制御機構があるのか?などについて、全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

細胞質内pHの制御は生物のホメオスタシスにとって鍵となることからV-ATPaseの機能を制御する機構があると考えられる。遺伝子発現や*de novo*の翻訳および蛋白質発現のみならず、膜表在、膜内在のV_iV_oドメインの可逆的な解離による活性制御機構が報告されており、V-ATPaseのいくつかのサブユニットに細胞内環境を感受する機能が存在する可能性が考えられた。そこで、本研究は、まずV-ATPaseの細胞質内pHの制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的として、主に膜表在部位のサブユニットに注目して研究を行った。V-ATPaseの制御は、その回転速度にも及ぶと考えられる。そこで、本研究では、V-ATPaseの回転作動機構についても、一分子観察法を用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) V-ATPaseの一分子観察法

本研究では、顕微鏡による一分子観察の方法を用いて、ATP触媒に伴う回転ステッ

プを分解し、阻害剤による回転の動的阻害機構を解析することで、酵素の回転触媒機構を解明した。

具体的には、相同組み換えによって、V-ATPaseのサブユニットにヒスチジンおよびビオチン結合配列を導入する。V-ATPaseをニッケルコートしたガラスに接着させ、ビオチン化した金ビーズを付加してATPを加えた後、下方からレーザー光を照射し、その散乱光を超高速度CCDカメラを用いて暗視野顕微鏡下で録画した。散乱光の輝点の動きをビーズの回転として演算解析し、その回転速度および角度について解析した。また、ATPの濃度依存性についても解析して回転触媒速度を求め、ATPの加水分解に伴う回転ステップについては、ATP γ Sを用いて解析を行った。

(2) V-ATPaseの解離制御機構の解析

V-ATPaseサブユニットEについてアラニンスキャン、およびアミノ酸置換変異導入により変異体を作成し、これらの個体から液胞膜を精製してそのV-ATPase活性およびプロトン輸送活性を測定し、その機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) V-ATPaseの回転触媒機構の解析

まず、プローブの粘性抵抗と回転速度の関係から、V-ATPaseの回転軸のトルクを算出し、これがおよそ36pNmであることが解った。V-ATPaseのATPase酵素触媒活性については、溶液中でのV_{max}およびK_mが算出されている。本研究には一分子観察により演算解析した輝点の回転最高速度の平均を算出し、V_{max}およびK_mを算出したところ、これが溶液中で得られる活性値とほぼ一致した。一分子観察から推定されるATP触媒活性と生化学的に測定した値が、近いことから、回転速度が実測値に限りなく近いと考えられた。

(2) V-ATPaseサブユニット特異的な環境シグナル受容機構の解明

V-ATPaseのATP触媒エネルギーと回転運動およびプロトン輸送の共役は、触媒活性を持つサブユニットの構造変化により、膜内在のプロトン輸送ドラムと結合した中心軸サブユニットが回転する

ことで成り立つ。coiled-coil 構造によりロッド状のヘテロ 2 量体を形成する E と G サブユニットは、ATP 触媒活性サブユニットを外側から 3 カ所で支えており、これらの弾性が触媒部位に構造的なゆるみを与えることで ATP 触媒エネルギーと回転運動の効率的な共役を支えている。グルコース飢餓条件下において、V-ATPase の ATP 触媒活性部位 V₁ とプロトン輸送部位 V_o が解離し、エネルギー共役機能が失われてプロトン輸送が停止する。我々は、まず、V-ATPase の細胞外グルコース濃度依存的な触媒活性が、E サブユニットに依存する事を明らかにした。この結果は、すでに 2013 年 12 月号の JBC (雑誌論文③参照) に掲載されている。本研究により、E サブユニットの N 末端 E44 のアミノ酸側鎖による構造的柔軟さが、V-ATPase のグルコース依存的な活性制御機構に寄与する可能性が示唆された。V-ATPase 制御機能のうち、特にグルコース依存性は動植物共通に重要な機構であり、このようなメカニズムの解明は、分野を越えて大きな波及効果をもたらすであろう。さらに、動植物の E サブユニットに特異的なアミノ酸配列に、V-ATPase の温度依存的な解離会合を制御するエレメントを発見し、これらのアミノ酸が温度センサーとして働く可能性を見いだした。

これらの一連の研究結果と最近の知見を踏まえ、動植物の V-ATPase の機能について合わせて 3 報の総説を発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hsu-Liang Hsieh and Haruko Okamoto (2014) Molecular interaction of jasmonate and phytochrome A signaling *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/eru230 査読あり
- ② Vitaly Sineshchekov, Larissa Koppel, Haruko Okamoto, Masamitsu Wada (2014) *Fern Adiantum capillus-veneris* phytochrome 1 comprises two native photochemical types similar to seed plant phytochrome A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 130: 20-29 査読あり

- ③ Haruko Okamoto-Terry, Kaori Umeki, Mayumi Nakanishi-Matsui, and Masamitsu Futai (2013) Glu-44 in the amino-terminal α -helix of yeast vacuolar ATPase E subunit (Vma4p) has a role for VoV1 assembly. *Journal of Biological Chemistry* 288: 36236-36243 査読あり
- ④ Masamitsu Futai, Mayumi Nakanishi-Matsui, Haruko Okamoto, Mizuki Sekiya, and Robert K. Nakamoto (2012) Rotational catalysis in proton pumping ATPases: From E coli F₁-ATPase to mammalian V-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 1711-1721 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

- ① Haruko Okamoto and Masamitsu Futai. A functional analysis of vacuolar-type H⁺-pump ATPase subunit E in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (第 84 回日本生化学会年会 2011 年 9 月 22 日)
- ② 二井将光 フォーラム「生化学が支える生命科学」(第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 22 日)
- ③ 岡本晴子、二井将光 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase VoV1 複合体のグルコース依存的な解離における E サブユニットの機能 (第 37 回日本生体エネルギー研究会、京都、2011 年 12 月 21 日)
- ④ Haruko Okamoto and Masamitsu Futai The E subunit alpha helical domain including Glu-44 has a key role in yeast V-ATPase assembly and catalysis. (FASEB 2012 Snowmass, Colorado, USA, 2012 年 6 月 7 日)
- ⑤ Masamitsu Futai Rotational catalysis of *E. coli* F₁ ATPase: rotor/stator interaction (EBEC2012, Freiburg, ドイツ、2012 年 9 月 16 日)
- ⑥ Masamitsu Futai Proton pumping ATPases in biochemistry and cell biology (FAOBMB, Bangkok, タイ、2012 年 11 月 26 日)
- ⑦ 岡本晴子、梅木香里、二井将光 酵母

Saccharomyces cerevisiae, V-ATPase VoV1 複合体のグルコース依存的な解離における E サブユニットの機能 (第 38 回日本生体エネルギー研究会、岡山 2012 年 12 月 22 日)

- ⑧ 佐藤佑香、柿添藍、中西 (松井) 真弓、岡本晴子、二井將光 V-ATPase の回転触媒機構 (日本薬学会第 133 回年会、横浜、2013 年 3 月 28 日)
- ⑨ 後藤奈津美、柿添藍、中西 (松井) 真弓、岡本晴子、二井將光 V-ATPase の温度依存的制御機構における E サブユニットの機能 (日本薬学会第 133 回年会、横浜、2013 年 3 月 28 日)
- ⑩ 松元奈緒美、中西 (松井) 真弓、岡本晴子、二井將光 V-ATPase a3 イソフォームと破骨細胞に特徴的なリソソームの局在 (FAOBMB Mini-Symposium、岩手 矢巾、2013 年 4 月 6 日)
- ⑪ Haruko Okamoto, Ai Kakizoe, Mayumi Nakanishi-Matsui, Masamitsu Futai A single molecule based observation of the rotational catalysis of yeast vacuolar-type H⁺-ATPase (FAOBMB Mini-Symposium、岩手 矢巾、2013 年 4 月 6 日)
- ⑫ 岡本晴子、柿添藍、中西 (松井) 真弓、二井將光 出芽酵母 V-ATPase の回転触媒機構の解析 (第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013 年 9 月 13 日)
- ⑬ Vitaly Sineshchekov, Larissa Koppel, Haruko Okamoto, and Masamitsu Wada. Polymorphism of phytochrome 1 from the fern *Adiantum capillus-veneris* L. overexpressed in the transgenic Arabidopsis (European Plant Physiology Congress, Dublin, 22-26 June, 2014)

[図書] (計 2 件)

- ① Mayumi Nakanishi-Matsui, Sylvie Breton, Haruko Okamoto, Masamitsu Futai (2012) Roles and regulatory mechanism of proton pumping V-ATPase in spermatozoa and epididymis physiology. In Yoishi Nemoto, Norio Inaba (eds.) Testis Anatomy, Physiology, and Pathology. Hauppauge, US, Nova Publishers.
- ② Haruko Okamoto and Masamitsu Futai (2013) Vacuolar-type ATPases in animal and plant cells. In Roberts,

Gordon C.K. (ed.) Encyclopedia of Biophysics. Berlin, DE, Springer, 2719-2724

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本晴子 (Haruko Okamoto)

研究者番号 : 40552899

(2) 研究分担者

中西真弓 (Mayumi Nakanishi)

研究者番号 : 20270506

(3) 連携研究者

二井將光 (Masamitsu Futai)

研究者番号 : 50012646