

戦略的創造研究推進事業  
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体  
の構築と利用」

研究課題「高効率ナノモーターとしての  
プロトンポンプの研究」

研究終了報告書

研究期間 平成 15 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月

研究代表者氏名：二井 將光  
(岩手医科大学・薬学部・教授)

## 1. 研究実施の概要

プロトンポンプ ATPase は、ATP 合成と酸性環境の形成という生物の最も基本的な反応に関与しているナノマシンである。本研究は、プロトンポンプ ATPase を対象とし、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）および細胞生物学的役割（酸性環境の形成）を明らかにすることを目的としている。プロトンポンプとしては、2つの ATPase、F-ATPase（ATP 合成酵素）と V-ATPase（液胞型 ATPase）に注目している（図 1）。

基本的な F-ATPase は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $c$  の 8 種のサブユニットから、V-ATPase は、 $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $E$ 、 $F$ 、 $G$ 、 $H$ 、 $a$ 、 $c$ 、 $c'$ 、 $c''$ 、 $d$  の 13 種のサブユニットからなっている。前者では、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  サブユニット複合体が膜表在  $F_1$  部分を、 $ab_2c_{10}$  複合体が膜部分にプロトン輸送路  $F_0$  を形成している。V-ATPase では、 $A_3B_3CDEFGHH$  サブユニット複合体が  $V_1$  部分を、 $a d c_4 c' c''$  がプロトン輸送路  $V_0$  を形成している。生物によっては、付加的な機能を持つ他のサブユニットが存在することが知られている。

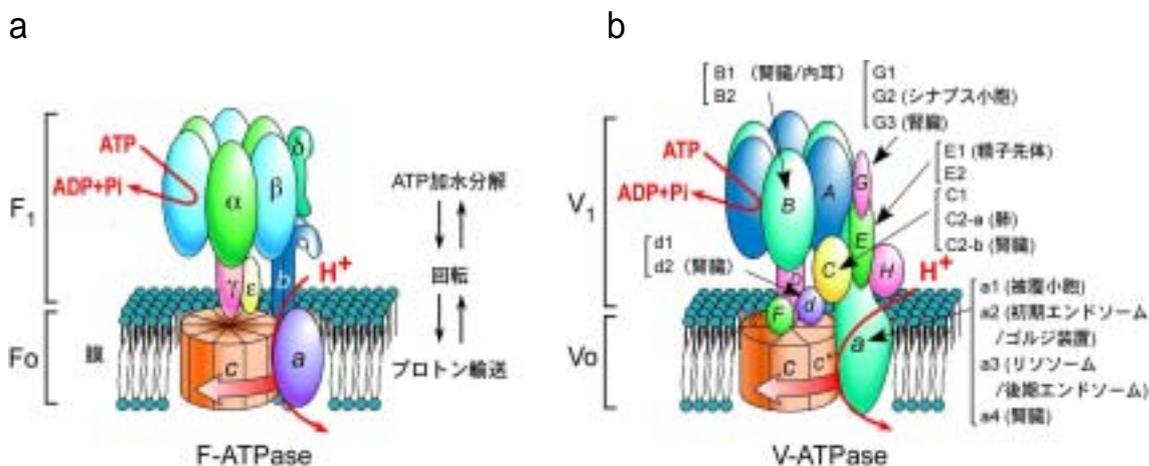


図 1 F-ATPase と V-ATPase

(a) F-ATPase を模式的に示す。膜内在である  $F_0$  部分と膜から突出した  $F_1$  部分から構成されている。ATP の加水分解あるいは合成は、 $\epsilon\gamma c_{10-14}$  の回転を介してプロトン輸送と共役している。(b) V-ATPase を模式的に示す。F-ATPase と同様に  $V_0$  と  $V_1$  の二つのドメインからなる。組織（細胞）特異的、あるいはオルガネラ特異的に局在するイソフォームを示した。サブユニットの回転方向を太い矢印（膜内）で示した。

V-ATPase と F-ATPase を比較すると、一次構造から  $\alpha$  と  $B$ 、 $\beta$  と  $A$ 、 $c$  と  $c$ 、 $c''$ （図 1b）等のサブユニットが対応している。また、触媒機構、プロトン輸送

機構は基本的に同じと考えられる。研究代表者らは二つの ATPase を対比しながら研究を進め、F-ATPase の触媒反応に関与する残基を明らかにし、同時に、V-ATPase に対応する残基があること、いずれも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プロトンポンプであること、等を明らかにしてきた。

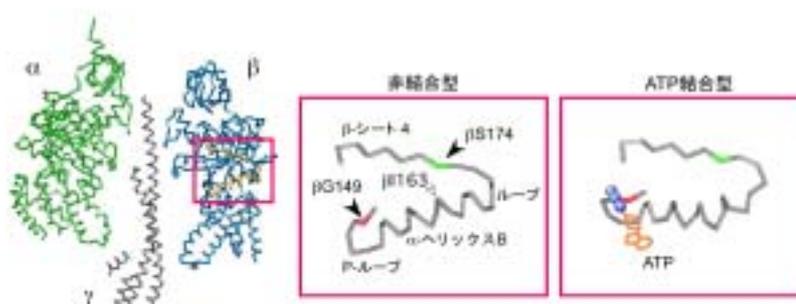


図2 βサブユニットの P-loop / α-helix-B / loop / β-sheet4 ドメイン

本研究で注目したβサブユニットの P-loop / α-helix-B / loop / β-sheet4 ドメインを示す。この領域は、ATP 結合型のβと非結合型のβで、高次構造が大きく変化する。β Ser174、β Gly149、β Ile163 の位置を矢印で示した。

これらの実績と背景を踏まえて、本研究では、F-ATPase の ATP 分解に伴う回転機構を明らかにすることを一つの目的としている。まず、プロトン輸送と回転の共役、さらに回転の駆動機構について研究を始め、プロトン輸送と回転は反応として分離できることを示した。また、系統的に変異を導入した  $F_1$  を用いて、回転の駆動にはβサブユニットの P-loop / α-helix-B / loop / β-sheet4 ドメイン (Gly149-Glu181) が関わっていることを明らかにした(図2)。さらに、反応・回転機構を解析していく過程で、 $F_1$  部分のγサブユニットが ATP 加水分解により高速に回転すること、回転には確率的なゆらぎがあること、を示した。一分子ずつで観察していくと、多くの分子が長時間(10~100 ミリ秒)停止し、再び回転を始めた。これは  $Mg \cdot ATP \rightarrow Mg \cdot ADP + Pi$  という  $F_1$  の ATP 加水分解反応が、生成物である  $Mg \cdot ADP$  により阻害されることに対応している。

V-ATPase と F-ATPase を比較すると、c サブユニットの構造、c が構成するリングの構造とストーク部分のサブユニット構成に大きな差があることが知られている(図1)。また、研究代表者らは、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た。イソフォームには細胞、あるいはオルガネラに特異的なもの、どの細胞にも分布するもの、の二種類があった。本研究で

は、イソフォームによる ATPase の機能の違いと、細胞あるいはオルガネラの局在に対するイソフォームの関与を明らかにするべく研究を進めた。マウス腎、睾丸、輸精管、ホルモン分泌細胞等でイソフォームの分布と役割を検討した。

イソフォームによって、V-ATPase は多様なものとなり、異なる細胞やオルガネラに分布している。しかし、多様なサブユニット構成の為に、一つの組織から一種類の V-ATPase を調製するのは難しい。そこで、酵母を用いてイソフォーム間の機能を比較した。すなわち、対応するサブユニットを欠損させた酵母に、マウスのイソフォーム cDNA を導入し、形成されるマウス・酵母ハイブリッド V-ATPase を解析し、イソフォームの機能を推定した。C サブユニットのイソフォーム  $C_1$ 、 $C_2$ -a、 $C_2$ -b によって  $H^+$  輸送活性と  $K_m$  が変わることに、イソフォーム  $E1$  の解析から、E サブユニットが V-ATPase 全体のアセンブリーに重要であることを示した。

また、V-ATPase の膜貫通 a サブユニットそのものが、オルガネラの局在や動態に関与していることを示した。すなわち、近位尿細管（腎臓）の表層細胞のエンドサイトーシスの過程で、初期エンドソームには  $a_2$  イソフォームを持つ V-ATPase が局在していた。初期エンドソームからリソソームに至る段階に於いて、c サブユニットが GTPase である Arf6 を、また  $a_2$  イソフォームが GDP / GTP exchange factor である ARNO (ADP-ribosylation factor nucleotide site opener) をリクルートすることを示した。また、膵臓のβ細胞では、分泌顆粒が形質膜と融合しインスリンが分泌されるためには、 $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase が必要であることを明らかにした。

このような研究を通じて、プロトンポンプの回転反応機構、プロトンポンプの局在による多様な酸性環境の形成と機能について重要な成果が得られた。

## 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

研究代表者の二井、分担者の和田および孫—和田は、本研究を開始した時点に於いて大阪大学・産業科学研究所の同じ研究室に所属していた。研究を構想するに当たって、討論を重ね、共同で本研究の実施に当たることとした。二井は、平成 16 年に大阪大学を定年退職し、研究室全体を東京都・品川区の微生物化学研

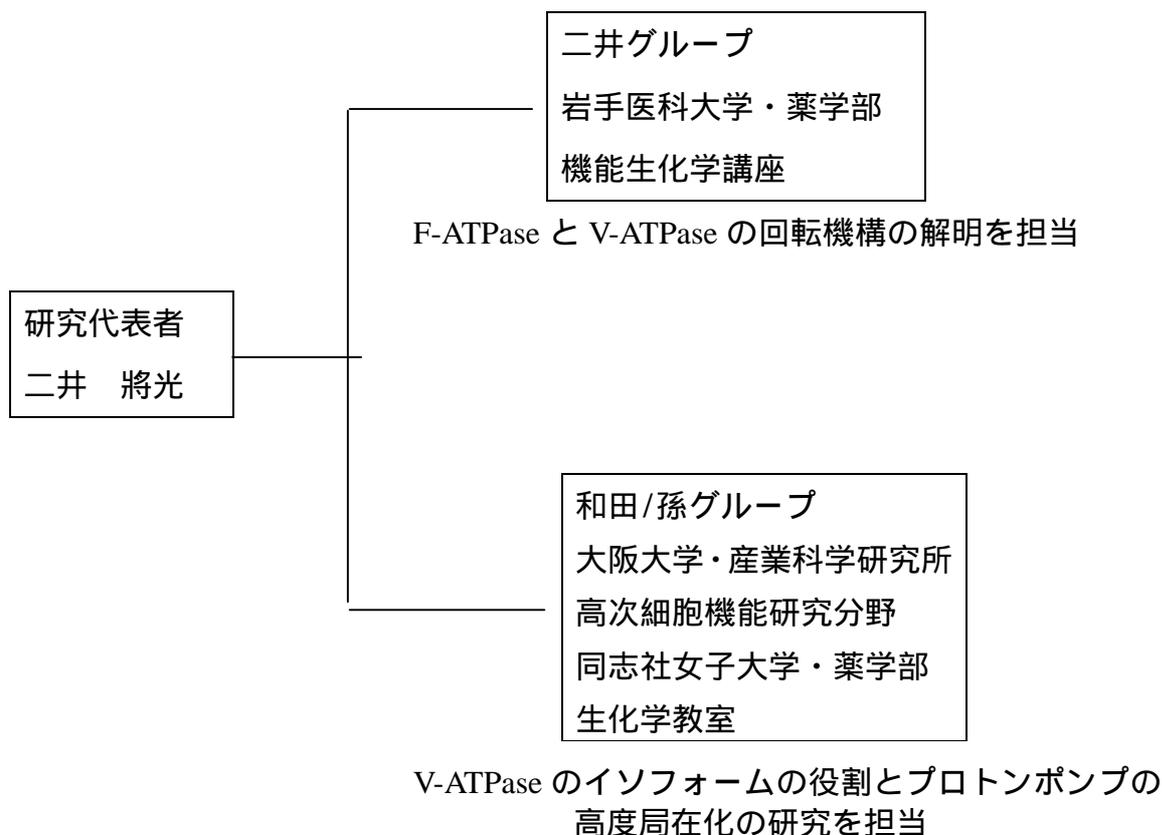
究センターに三年間、さらに平成 19 年に岩手医大に移設した。また、孫—和田は、同志社女子大学・薬学部の准教授に昇任し、助手 2 名を採用し新しい研究室を立ち上げ、引き続き本研究に主要な役割を果たした。和田は、大阪大学に止まり、独立に本研究をサポートした。したがって、三研究室の密接な共同研究によって、本研究は推進されていた。

F-ATPase に関しては、二井グループを中心に和田の協力により、従来のアクチンをプローブとし回転を観察する系と同時に、金粒子を用いる系を初年度に開発した。中西が中心となって、金粒子の回転に確率的なゆらぎがあることを 2 年度に見出し、その解析が 3 年度以降の新しいプロジェクトとなった。さらに 3 年度以降には、系統的に変異を導入した  $F_1$  の回転を金粒子をプローブとして解析した。変異を迅速に導入する為に、長浜バイオ大学・岩本准教授の支援を得た。 $\beta$  サブユニットの構造に注目し、Lys155 / Thr156 と Glu181 / Arg182 の触媒残基をつなぐドメインである P-loop /  $\alpha$ -helix-B / loop /  $\beta$ -sheet4 (Gly149 ~ Glu181) (図 2) が、回転を駆動する機構を明らかにするべく研究を進めた。このような研究を通じて、アクチンフィラメントをプローブとしては、明らかにできなかった変異  $F_1$  の回転機構を示すことができた。さらに、 $\gamma$  サブユニットの回転に対して  $\varepsilon$  サブユニットの阻害効果を実証した。

また、2 年度にオックスフォード大学・物理学教室の Richard Berry 博士からの共同研究の申込があり、有意義な協力関係を保っている。彼らのプロジェクトに、研究代表者が各種の  $F_1$  を提供すると同時に、最近では彼らからデータ処理・計算法について示唆を得ている。Berry 博士と教室員 (Pilizota、Bilyard) が二井の研究室を数回にわたって訪れ、研究の進め方を協議した。また、19 年度には二井がオックスフォード大学に出向き、データの取扱いと計算法全般について打ち合わせた。共同研究の一部は Biophys. J. に発表した。

ナノマシンが機能する場所に局在する機構、すなわち V-ATPase の細胞内局在、細胞特異性に関しては、和田 / 孫グループが中心になって研究を進め、二井グループがこれに参画し、鞏上体、腎を中心に V-ATPase の多様性を検討すると同時に、膵臓  $\beta$  細胞のインスリン分泌、腎細胞のエンドサイトーシスについて検討した。いずれの系に於いても、V-ATPase のどのような機能を必要とするかを明らかにするべく研究を進めた。また、Cambridge 大学の F. Karet 博士、Harvard 大学の V. Marshansky 博士から共同研究の申し出が 2 年度にあり、ナノマシンとしての V-ATPase の局在と生理的役割に関する研究体制の一部とした。

## (2) 研究実施体制



## 3. 研究実施内容及び成果

3.1 F-ATPase の  $\gamma$  サブユニットの回転機構（岩手医大・薬学部・二井グループ） 以下の報告に於いて、各グループは現在の所属で示している。

### (1) 研究実施内容及び成果

F-ATPase の  $F_1$  部分にアクチン・フィラメントをプローブとして導入し、 $\gamma$  サブユニットの回転を見る、これが F-ATPase の回転を実証した初めての実験として大きな成果だった。しかし、回転速度は ATP 分解（定常状態）から推定される値よりも、はるかに遅かった。そこで、粘性抵抗の小さなプローブとして直径 40、60、80、100、200 nm の金粒子を  $\gamma$  サブユニットに結合した。レーザー照射下に暗視野顕微鏡で回転を観察し、毎秒 4,000 ~ 8,000 フレームの高速カメラを用いて記録した。250 ミリ秒間にわたって観察すると、回転速度は粒子が大きくなると減少したが、40 nm あるいは 60 nm の粒子を結合させた場合には ~ 400 rps

(revolution per second) ときわめて高速だった (図 3a)。この値は、定常状態の ATPase 活性から推定できる値の 10 倍程度だった。すなわち、ミリ秒スケールで見ると、回転している粒子は 10 %程度であることを示している。

さらに 2 秒間にわたって観察すると、0.5 秒 ~ 0.1 秒程度の長い停止時間があることが明らかになった。これは、 $Mg \cdot ADP$  によって ATP 加水分解 ( $Mg \cdot ATP \rightarrow Mg \cdot ADP + Pi$ ) が阻害される為と考えられる。また、10 ミリ秒ごとに回転速度を算出する、あるいは一回転に要する時間を算出しヒストグラム (図 3b、c) で示す、という二つの方法によって回転を検討した。図 3b および図 3c に見るように、一分子の  $F_1$  の回転には確率的なゆらぎがある。

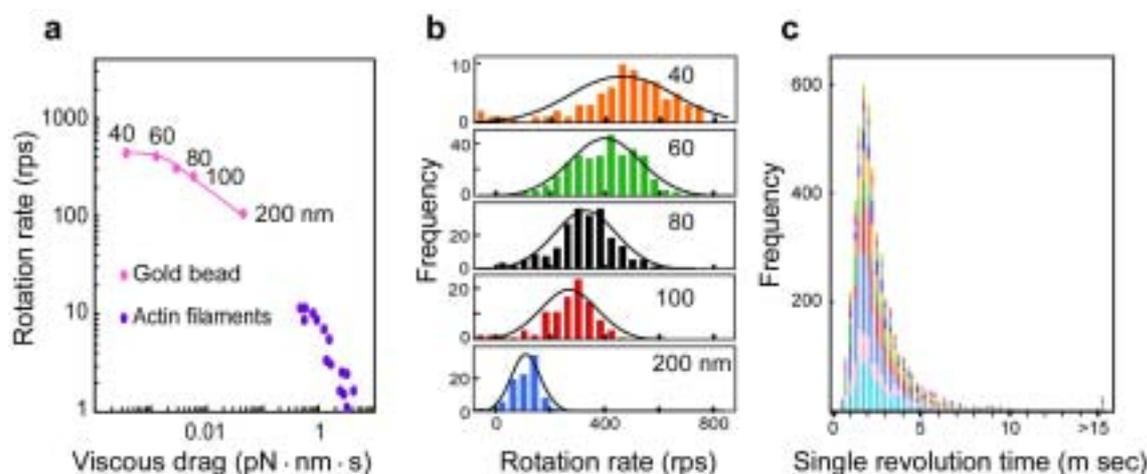


図 3  $F_1$ -ATPase の回転

a, プロープにより生じる粘性抵抗と平均回転速度。金粒子の直径 (40 - 200 nm) によって、回転速度が遅くなることを示した。b, 10 ミリ秒毎の速度のヒストグラム。回転を経時的に記録した後に 10 ミリ秒毎に区切って速度を求め、ヒストグラムに表した。グラフは正規分布で近似した。c, 一回転 ( $360^\circ$ ) にかかる時間。60 nm の金粒子をプロープとして回転を 2 秒間観察し、一回転にかかる時間を算出してヒストグラムとした。10 個の  $F_1$  分子の回転を異なる色で表し、まとめた。

$\gamma$  サブユニットの回転を観察する系を用いて、図 2 に示した P-loop から  $\beta$ -sheet4 に至るドメインの役割を、変異を導入して解析した。 $\beta$ -Sheet4 の Ser174 の変異は数多くとられてきた。174 位に置換する残基が大きくなるにつれて活性は減少し、 $\beta$ Ser174Phe (Ser174 Phe) および  $\beta$ Ser174Leu (Ser174 Leu) 変異では、ATPase 活性は 1/10 程度になった。直径 60 nm の金粒子をプロープとして、 $\beta$ Ser174Phe 変異と野生型の  $F_1$  を経時的に比較すると、変異  $F_1$  の回転が遅いことは明らかである (図 4a)。変異  $F_1$  が一回転に要する時間は ~6 倍程度に、回転が止まる時間

は 10 倍ほど長くなっていた ( 図 4b )。  $\beta$ Ser174Phe のこの性質は、  $\beta$ Gly149Ala のような P-loop 上の第二の変異によって抑圧され、  $\beta$ Ser174Phe /  $\beta$ Gly149Ala の回転は野生型とほぼ同様になった。また、  $\beta$ Ser174 の向側に位置する  $\alpha$ -helix-B 上にある  $\beta$ Ile163 ( 図 2 ) を Ala に置換すると、野生型の  $F_1$  に近い回転となった。以上の結果は、 P-loop /  $\alpha$ -helix-B / loop /  $\beta$ -sheet4 が回転の駆動に重要であることを示している。このドメインは活性中心残基である  $\beta$ Lys155、  $\beta$ Thr156 と  $\beta$ Glu181、  $\beta$ Arg182 をつないでいる。したがって、加水分解後の構造変化が  $\gamma$  サブユニットの回転を駆動していると考えられている。

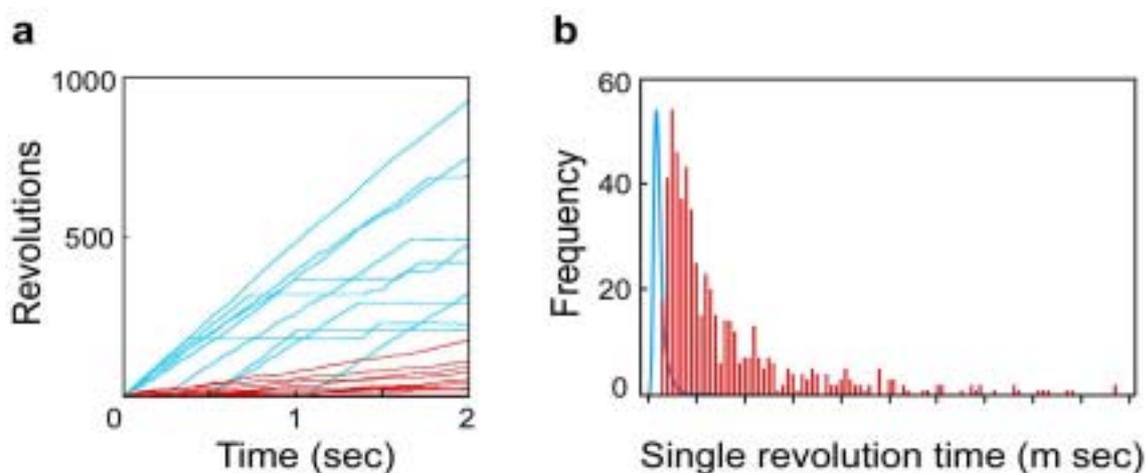


図 4  $\beta$ Ser174 変異型  $F_1$  の回転  
a, 野生型および変異株  $F_1$  の回転。野生型 ( 水色 )  $\beta$ Ser174 を Phe に置換した変異型 ( 赤 ) の回転を経時的に記録した。b, 変異型の回転時間のヒストグラム。一回転にかかる時間を算出し、ヒストグラムにまとめた。野生型の近似曲線を水色で示す。野生型の幾何平均は 2.3 m sec、変異型は 14 m sec であった。

以上の結果は、Nakanishi-Matsui *et al* ( 2006 )、Nakanishi-Matsui *et al* ( 2007 )、Kashiwagi *et al* ( 2007 ) に発表している。また、回転のゆらぎについては詳しく考察した ( Nakanishi-Matsui and Futai, 2006 )。

また、新しい実験系として、オックスフォード大学 Richard M. Berry 博士らとの共同研究により、さらに回転観察系を発展させた。  $F_1$  あるいは鞭毛に導入したビーズを光ピンセットのハンドルとして用い、モーターの速度や、回転時に角度依存に変化する力の大きさを測定する高精度実験系を構築した。現時点で、この実験系を用いて  $F_1$ -ATPase と大腸菌鞭毛モーターについて予備的結果を得ている ( Pilizota, *et al*, 2007 )。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

定常状態の酵素反応は、 $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  等で表現されており、溶液中の全ての酵素分子が、速度論的に同じ反応を行っていることを前提としている。これは、一分子観察から得られる ATPase 像とは別のものである。本研究で、一分子の回転を経時的に観察していくと、停止したり、速度が時間によって変わることが明らかになった。すなわち、一分子の F-ATPase の回転には、確率的なゆらぎが見られ、定常状態の溶液中の ATPase 反応は多数の分子の平均であることを示唆した。以上の点は、Nakanishi-Matsui and Futai(2007)に於いて討論した。酵素反応のゆらぎという面で、本研究の成果は生化学の教科書にある酵素の概念に対して改訂を求めている。今後、他の酵素分子に関しても一分子の解析が進み、同様の成果が得られることが期待される。

$\beta$ -sheet4 上の変異  $\beta$ Ser174Phe が P-loop の第 2 の変異  $\beta$ Gly149Ala によって抑圧された。また、同様に  $\beta$ Ser174Phe 変異が  $\alpha$ -helix-B の第 2 の変異  $\beta$ Ile163Ala によって抑圧された。これらの結果は、P-loop /  $\alpha$ -helix-B / loop /  $\beta$ -sheet4 の部分が回転を駆動する為に重要であり、おそらくこのドメインの高次構造が変化するステップに参与していることを示している。以上の成果は金粒子をプローブとして、初めて得られたものである。さらに系統的に変異を導入し、回転を解析することによって  $F_1$  の回転機構が明らかになると期待される。

## 3.2 F-ATPase の $\gamma\epsilon c_1$ の回転とプロトンの輸送

(岩手医大・薬学部・二井グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

F-ATPase ( $F_0F_1$ ) に於いて、 $F_1$  部分  $\gamma$  サブユニットの回転はどのようにして  $F_0$  部分に伝達されるのか、研究代表者らは、 $\gamma\epsilon c_{10}$  の 3 つのサブユニットからなる複合体が ATP の分解に伴って回転していることを証明した。実際に F-ATPase を精製し、 $\alpha$  サブユニットを介してガラス面に固定し、 $c$  サブユニットにアクチンプローブを結合させる、あるいは  $c$  サブユニットで F-ATPase を固定し、 $\alpha$  サブユニットにプローブをつけた (図 5a, b)。いずれの場合にも ATP を加えると、加水分解に伴ってプローブの回転が観察できた。さらに平面膜の断片を調製し、 $c$  サブユニットを介してガラス表面に固定し、 $\alpha$  サブユニット、あるいは  $a$  サブユニットにプローブをつけた場合にも、ATP 加水分解に依存した回転が観察できた。このように研究代表者のグループによって、F-ATPase が実際に膜内で回転してい

ることを実証することができた。

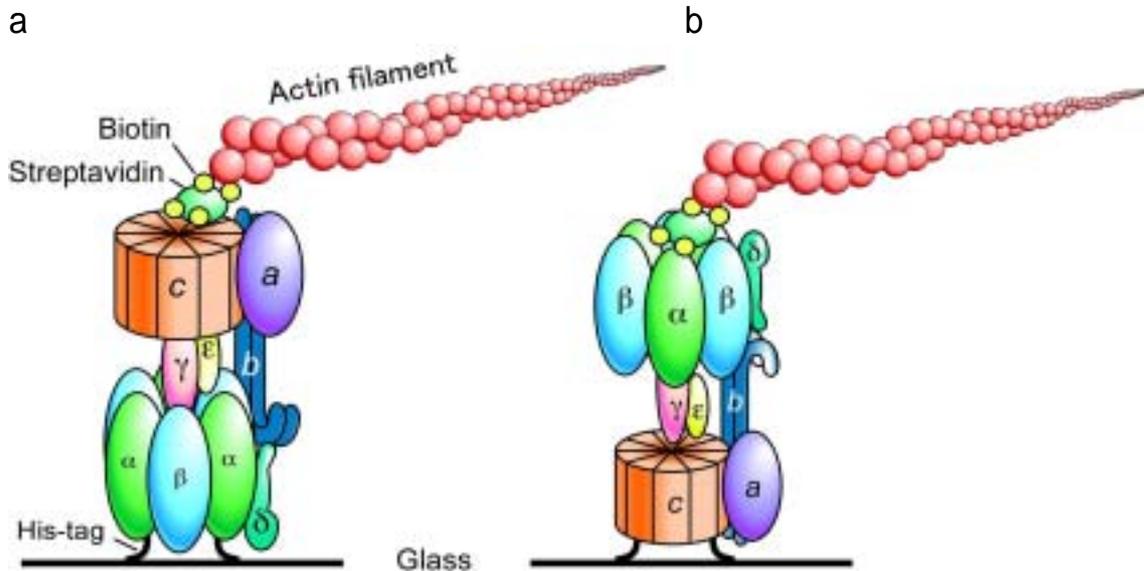


図5 FoF<sub>1</sub>の回転観察

αサブユニット (a) あるいは c サブユニット (b) に導入した 6 残基のヒスチジンを介して、FoF<sub>1</sub> をガラス表面に固定した。プローブとして蛍光標識したアクチン・フィラメントを、c サブユニット (a) あるいは α サブユニット (b) に結合させた。

そこで、本研究では『ATP 加水分解 サブユニットの回転 プロトンの輸送』という全過程を考え、プロトンの輸送がサブユニットの回転と共役しているかを検討した。プロトンの輸送には、c サブユニットの *cAsp61* と a サブユニットの *aArg210* が関与している (図 6a)。 *cAsp61* のカルボキシル基が *aArg210* 残基の近傍に来ることによって H<sup>+</sup> が外れ、輸送されると考えられている。二つの残基に *cAsp61Asn*、*cAsp61Gly*、*aArg210Lys*、*aArg210Ala* の変異を導入したところ、いずれも ATP 加水分解に伴うプロトンの輸送はなくなった。

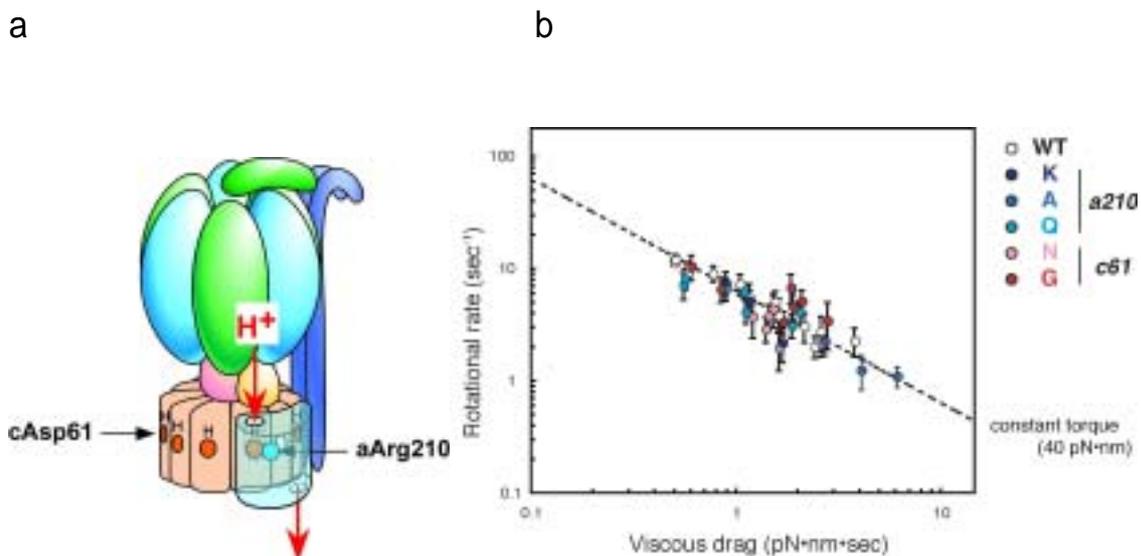


図6 プロトン輸送路の変異と回転

(a) プロトン輸送路。F-ATPaseのプロトン輸送路を模式的に示した。 $a$ サブユニットのプロトン輸送路に入った $H^+$ は、 $c$ サブユニット  $cAsp61$  のカルボキシル基をプロトン化する。その後、回転によりこのカルボキシル基が  $a$  サブユニット  $aArg210$  残基の近傍に来ることにより  $H^+$  が外れ、膜の反対側へ輸送されると考えられている。(b) プロトン輸送路変異株の回転。プロトン輸送できない変異株の回転を観察し、発生するトルクの大きさを比較した。wild type、黒色；  $aR210K$ 、紺色；  $aR210A$ 、青色；  $aR210Q$ 、水色；  $cD61N$ 、ピンク色；  $cD210G$ 、赤色。点線は発生するトルクが  $40pN \cdot nm$  で一定であるときの粘性抵抗と回転速度の関係を示している。

次に、ATP加水分解に伴う回転を見たところ、いずれの $H^+$ 輸送路の変異によっても野生株のレベルであった。すなわち、各変異株から平面膜断片を調製し、アクチン・フィラメントを $\alpha$ サブユニットに結合させたところ、ATP添加後にいずれも回転した(図6b)。そこで、粘性抵抗の小さいプローブとして直径60nmの金粒子を用いて検討した。回転速度は、 $cASP61$ の変異によって有意に減少した。これは、回転の停止時間が長くなったことによると考えられている。すなわち、 $H^+$ 輸送ができないF-ATPaseであっても、膜内で回転しうるが、速度は遅くなることを示した。なお、 $c$ サブユニットあるいは $\alpha$ サブユニットを介してガラス面に固定した場合のいずれに於いても、金粒子は回転した。

以上の結果の一部は、Hosokawa *et al* (2005) に発表した。金粒子を用いた結果に関しては、現在、論文を執筆している。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

得られた成果は、精製したF-ATPaseによるATP加水分解と回転は $H^+$ の輸送に

よって調節されているが、all or none の調節ではないことを示している。すなわち、『ATP の加水分解 サブユニットの回転 H<sup>+</sup>の輸送』に至る過程の中で、『H<sup>+</sup>の輸送が阻害されると回転が止まる』というような調節機構が、精製 F-ATPase では部分的に観察された。さらに、F-ATPase が本来の膜、あるいはリポソームの脂質二重膜に埋め込まれている時に、どのように H<sup>+</sup>輸送が回転を調節しているか興味深い。閉じた膜系でプロトンが膜小胞内部に輸送され、膜電位あるいは pH 勾配が形成された時に、回転が阻害されるという調節機構がみられる可能性がある。このような機構があるかどうか、詳しく検討を始めた。

本研究によって、F-ATPase の制御を考える上で、重要な知見が得られ、今後の研究方針が示唆されたと考える。

### 3.3 マウス / 酵母ハイブリッド V-ATPase のアセンブリー (岩手医大・薬学部・二井グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

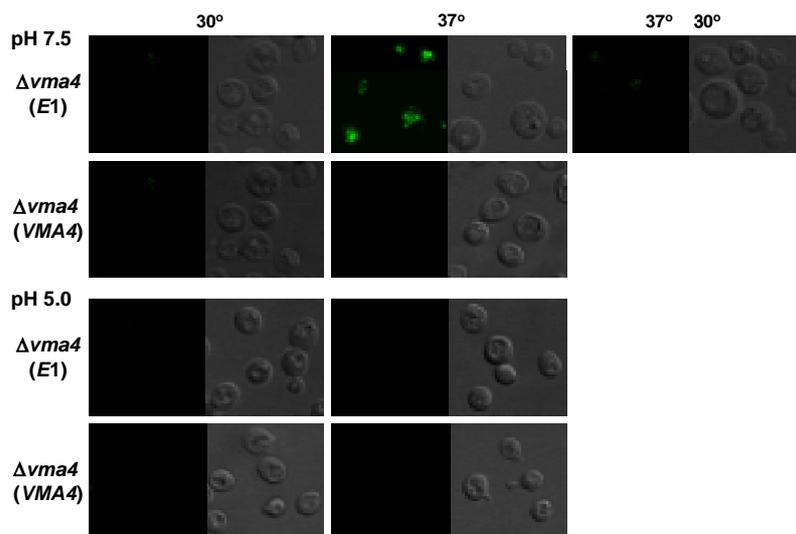
研究代表者らは、マウスの V-ATPase のサブユニットには多様なイソフォームが存在することを明らかにしてきた(図1)。E サブユニットには精巢(精子)に特異的な E1 イソフォームと、いずれの細胞にも局在する E2 イソフォームの二種があることを見出した。さらに、2つのイソフォームの機能を酵母を用いて検討した。すなわち、マウス E1、あるいは E2 と酵母 V-ATPase のハイブリッドの性状を検討した。

酵母の E サブユニット欠損株 (*vma4*) は、酸性 pH では生育できるが、中性 pH では生育できない。これは、V-ATPase のサブユニット欠損株の一般的な性質である。一方、*vma4* 株に、E1 の cDNA、あるいは E2 の cDNA を導入すると、いずれも 30 で生育することができた。ところが、37 では E1 の cDNA を導入した酵母は生育できなかった。しかし、pH 5.0 では生育した。すなわち、マウス E1 と酵母のハイブリッド酵素は、pH 7.0、37 の条件では ATP 加水分解に伴って、H<sup>+</sup>を輸送できないことを示唆している。

E1 / 酵母ハイブリッド V-ATPase について詳細に検討し、以下の点を明らかにした。(a)ハイブリッドを持つ酵母を 37、pH 7.0 の条件で培養すると、V<sub>o</sub>のサブユニット a のエピトープに抗体が近づけるようになった(図7)。すなわち、V-ATPase のサブユニット間の相互作用が変化し、構造が変わったと考えられる。

しかし、37 °C、pH 5.0、あるいは 30 °C、(pH 5.0、pH 7.0) という条件では、この現象は観察できなかった。したがって、構造変化は培地の pH に依存していた。

(b) 37 °C、pH 7.0 で培養し、破菌し、V<sub>1</sub> の A サブユニットの抗体によって沈殿させると、V<sub>0</sub> の a サブユニットも同様に沈殿した。すなわち、V<sub>1</sub> と V<sub>0</sub> は結合していると考えられる。また、同条件の細胞から液胞を調製すると、30 °C の場合と同量の各サブユニットが検出された。



(図7) E1/酵母ハイブリッド V-ATPase の pH と温度に依存したサブユニット構造変化  
 図に示した条件 (pH 5.0 あるいは 7.5, 温度 30°C あるいは 37°C, 15 分) で処理した野生株 [*vma4* (*VMA4*)] および E1/酵母ハイブリッド酵母株 [*vma4* (*E1*)] をホルムアルデヒドで固定し、酵母 V-ATPase サブユニット a 抗体、および FITC 標識された 2 次抗体を反応させた。共焦点顕微鏡により観察したところ、*vma4* (*E1*) 株を pH 7.5、37°C で処理した時のみ緑色蛍光が見られた (最上段中央のパネル)。この結果は、ハイブリッド V-ATPase が pH 7.5、37°C において、サブユニット a エピトープに抗体が反応し得るような不完全なアセンブリー構造をとっていることを示している。

得られた結果は、「V-ATPase の膜に於ける状態は 37 °C、pH 7.0 で大きく変化するが、V<sub>1</sub> と V<sub>0</sub> は結合したままである」ことを示している。また、酵母をグルコースのない条件で培養すると、V<sub>1</sub> と V<sub>0</sub> が解離することが知られているが、E1 / 酵母ハイブリッドでは、観察されなかった。すなわち、ハイブリッド ATPase のサブユニット複合体としての性状は酵母本来のものとは異なった。

以上の結果は、酵母本来の E サブユニットがマウス E1 に変わることによって、V-ATPase 複合体の性状が 37 °C、pH 7.0 という条件で変わったことを示している。すなわち、E サブユニットが pH に依存した V-ATPase のアセンブリーに関与していると推定できる。本研究は原著論文 (Hayashi *et al*, *in press*.) としてまとめた。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

既に述べたように、V-ATPase のサブユニットには多くのイソフォームがあり (図1) 多彩な内部酸性オルガネラが存在することと対応している。しかし、イソフォームは生化学的な研究の障害となってきた。同じ細胞や組織に異なるイソフォームを持つ V-ATPase が局在している為に、特定の V-ATPase の生化学的な性質を検討することは極めて難しい。上に述べた成果は、マウス E1 と E2 イソフォームの生化学的な差異を、cDNA を導入してできたマウス / 酵母ハイブリッド V-ATPase の性質として明らかにした興味ある成果である。

マウス・イソフォームの役割や性状を知る為に、酵母サブユニットとのハイブリッドを作ることは V-ATPase 研究の方法論になったと考えている。変異を持つ E1 イソフォームの解析、病因遺伝子の解析などにも応用できる手法として期待できる。

このアプローチを発展させて、マウスの他のイソフォームの機能を解析することが可能である。しかし、イソフォーム以外のサブユニットが酵母のものであることが本研究の限界となっている。この点を改善するために、酵母の V-ATPase の全てのサブユニットをマウスのものに置き換えるという意欲的な試みを始めている。

### 3.4 マウス V-ATPase の多様な局在と機能

(同志社女子大・薬学部・孫グループ / 阪大・産研・和田グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

多様な V-ATPase の機能とサブユニット・イソフォームとはどのように対応しているか、ユニークな V-ATPase がオルガネラに局在する理由はどうしてか、等の疑問に答えるのは容易ではない。解決に向かう第一歩として、各イソフォームの局在を検討している。本研究では、ラット睾丸 (Pietrement *et al*, 2006)、マウス内分泌組織 (Sun-Wada *et al*, 2007)、マウス腎 (Sun-Wada *et al*, 2006; Juret *et al*, 2005) 等について検討し、それぞれ興味ある結果を得た。これらの成果には、ハーバード大学・Massachusetts General Hospital の腎臓グループと共同で行った研究が含まれている。また、同じグループとの共同研究から、V-ATPase がエンドサイトーシスの後の輸送小胞の動態に関与していることを示すことができた (Hurtado-Lorenzo *et al*, 2006)。

共同研究の体制は、e-mail による討論を中心に、抗体の送付、送られてきた標

本の検討を行った。同時に、必要に応じて共同研究者が来日し、共同実験と協議を行った。また研究代表者、分担者がゴードン会議や FASEB Conference で渡米した折に、研究室を訪問して協議した。それぞれ得られた主な成果を以下にまとめた。

#### 1) ラット辜上体に於ける V-ATPase イソフォーム

辜上体および輸精管の表層細胞 (Narrow Cell および Clear Cell) に局在する V-ATPase は、夫々の内腔の pH を酸性に保つ上で重要である。酸性 pH は、精子の成熟と保存に必要である。本研究では、ラットの辜上体と輸精管の表層細胞に於いて、サブユニット・イソフォーム  $C1$ 、 $C2$ 、 $G1$ 、 $G3$ 、 $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_4$ 、 $d_1$ 、 $d_2$  が局在することを示した。表層細胞の形質膜および内腔側には  $a_2$  を除く、全てのサブユニット・イソフォームが局在していた。 $a_2$  は、細胞内のゴルジ以外のオルガネラに局在していた。結果は、表層細胞の形質膜には多量の V-ATPase が局在しており、酸分泌が活発であることと一致していた。 $d_1$  イソフォームは、内腔側の形質膜に他のサブユニットよりもはるかに多く発現しており、V-ATPase のサブユニットとして以外の役割を持っていることを推定した。辜上体イソフォームの分布は、腎尿細管のものと類似していた。

#### 2) マウス内分泌組織に局在する V-ATPase イソフォーム

エキソサイトーシスやエンドサイトーシスなどの『オルガネラと形質膜の融合を伴う現象』には、オルガネラ内腔の酸性 pH とともに、V-ATPase の  $V_o$  部分の膜内に局在している  $a$  サブユニットそのものが重要な役割を果たしていると考えられる。同様に、輸送小胞とエンドソームやリソソームの融合にも内腔酸性 pH が必要と考えられる。

内分泌細胞には、エキソサイトーシスによるホルモンの分泌に関与する分泌顆粒、あるいは分泌小胞が存在している。いずれの分泌小胞の内腔も、V-ATPase によって酸性 pH に保たれている。そこで、どの  $a$  サブユニット・イソフォームを持つ V-ATPase が、分泌機能に関与しているか、検討した。研究分担者、孫—和田らは、 $\beta$ 細胞のインスリン分泌顆粒には  $a_3$  をサブユニットとする、V-ATPase が局在することを示した(本報告書 3.5 参照)。他の分泌顆粒の V-ATPase にも、 $a_3$  イソフォームが局在しているのは興味深い。次に、副腎、上皮小体、下垂体の分泌顆粒の  $a$  サブユニット・イソフォームを検討した。いずれも、 $a_3$  イソフォームの局在を強く示す結果が得られた。この結果は、ホルモンのエキソサイトーシ

ス ( controlled exocytosis ) の過程に、 $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase が関与していることを示唆している。

### 3 ) V-ATPase サブユニットによる膜融合因子のリクルート

近位尿細管の表層細胞では、尿から蛋白質を回収する過程として受容体を介したエンドサイトーシス ( receptor-mediated endocytosis ) が活発に行われている。初期エンドソームの内腔は酸性 pH に保たれており、回収された蛋白は輸送小胞によりリソソームまで輸送され、アミノ酸にまで分解される。ハーバード大学・腎臓グループとの共同研究によって、輸送小胞の形成される過程を詳しく解析した。その結果、V-ATPase は、初期エンドソーム内腔を酸性にすると同時に、 $c$  サブユニットが低分子 GTPase である Arf6 を、 $a_2$  イソフォームが GDP / GTP exchange factor ( GEF ) である ARNO ( ADP - ribosylation factor nucleotide site opener ) を結合し、エンドソームからリソソームへの輸送小胞の形成に関与していることを示唆した ( 図 9 )。このリクルートにはエンドソーム内腔の酸性 pH が必要であり、関与する  $a_2$  と  $c$  サブユニットはいずれも膜を貫通しており、エンドソームの内部酸性 pH を認識していると考えられる。

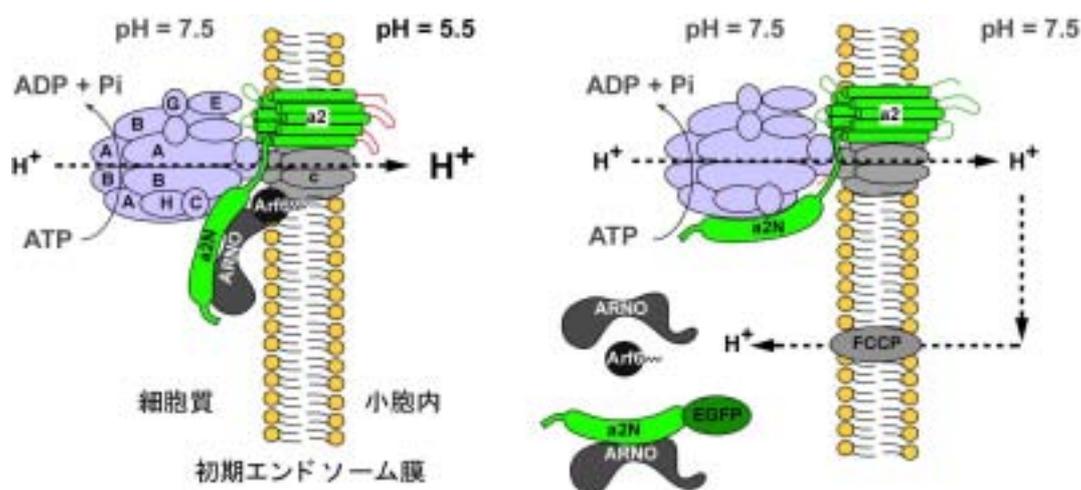


図 8 V-ATPase のイソフォーム：腎臓上皮細胞に於ける機能

$a_2$  を持つ V-ATPase は、近位尿細管上皮細胞の初期エンドソームに局在する。 $a_2$  のアミノ末端は酸性 pH に依存して ARNO と、 $c$  サブユニットは Arf6 とそれぞれ結合し、輸送小胞の形成に関与する。この結合は、脱共役剤である FCCP、あるいは、 $a_2$  の可溶性のアミノ末端部分によって阻害された。

### ( 2 ) 研究成果の今後期待される効果

V-ATPase の多様なイソフォームが機能していることを、睪上体、輸精管、尿細

管に於いて示した。近位尿細管から集合管に至る一つの器官に於いて、『なぜ V-ATPase がこのように多様であるか』は今後明らかにする課題である。分泌小胞、分泌顆粒という同じ機能を持つオルガネラに焦点を当てると、いずれも  $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase に局在していることを示した。一般に 3T3 細胞、RAW 細胞等では、 $a_3$  はリソソームに見出されていることを既に観察してきた。リソソームと分泌顆粒の関連について研究する、という新しい領域が開けたと考えている。

関連して研究代表者らは、破骨細胞に於いて  $a_3$  を持つ V-ATPase はリソソームが形質膜に移動し、融合することを示唆した。この役割を持つリソソームは、分泌型リソソームと呼ぶにふさわしい。さらに、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスに関わる機能的なオルガネラである輸送小胞の形成そのものに、V-ATPase の膜サブユニットが関与していることが明らかになった。

V-ATPase の多様性に関する成果は、プロトンポンプの病的状態や遺伝疾患を明らかにし、さらに V-ATPase をターゲットとする薬物を探索する上で、重要な示唆を与えるものと考えている。小胞輸送と V-ATPase の関連を示す共同研究は医学的に重要であり、News and View、This Week in ST、などにも取り上げられた。

### 3.5 インスリン分泌に於ける V-ATPase の役割

(同志社女子大・薬学部・孫 / 阪大・産研・和田グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

インスリンは膵ランゲルハンス島・ $\beta$ 細胞から、分泌顆粒のエキソサイトーシスによって分泌される。上で調べた他のホルモン分泌顆粒と同様に、 $a$  サブユニット  $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$ 、 $a_4$  イソフォームの中で、インスリン分泌顆粒には  $a_3$  が発現している(3.4(1)(2)を参照)。

V-ATPase の形成する分泌顆粒の内腔の酸性 pH は、エキソサイトーシスとプレプロインスリンからインスリンが形成される過程に必要であると考えられてきた。そこで、 $a_3$  を欠失するマウスについて検討したところ、oc/oc マウスでは血中にインスリンは分泌されなかったが(図9)インスリンはプロセスされていた。そこで株化された膵 $\beta$ 細胞である $\beta$ TC 細胞を用いて、インスリンのエキソサイトーシスに分泌顆粒の内腔の酸性 pH が必要であるかどうか検討した。

正常の V-ATPase を持つ $\beta$ TC 細胞の培養液に、阻害剤である Bafilomycin を加えると分泌顆粒の内腔の pH は中性付近になった。しかし、インスリンは分泌された。この結果は、インスリンの分泌に酸性 pH そのものではなく、 $a_3$  をサブユニ

ットとする V-ATPase が必要であることを示している。以上の結果は、Sun-Wada *et al* (2007) として発表した。和田、青山らは *oc / oc* マウスを保持し、同時に開発した迅速に遺伝子欠失を作る手法 (Aoyama *et al*, 2005) によって  $a_3$  欠失マウスを作成し本研究に貢献している。

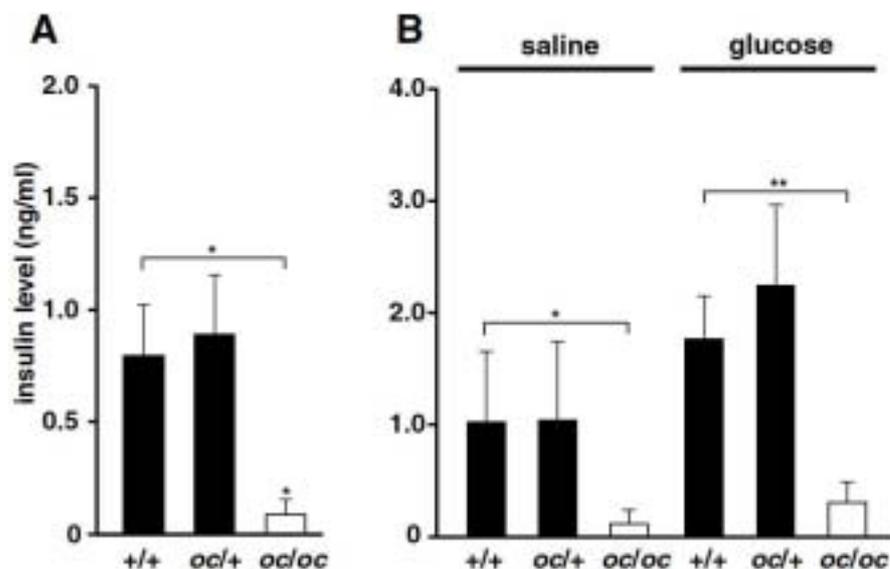


図9  $a_3$  イソフォーム欠失変異 (*oc/oc*) マウスのインスリン血中濃度  
通常食 (A) あるいは、絶食 (B) の野生型 (+/+)、ヘテロ (*oc/+*)、*oc/oc* マウスから血液を清回収、インスリンの血中濃度を測定した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$

## (2) 研究成果と今後期待される効果

インスリン分泌顆粒のエキソサイトーシスに、 $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase が関わっていることが明らかになった。 $a_3$  遺伝子を欠損するマウスでは、実際にインスリンは分泌されなかった。 $a_3$  遺伝子は、ヒト染色体のインスリン依存糖尿病 (insulin-dependent diabetes melitus) 原因遺伝子の近傍にマップされており、 $a_3$  イソフォームの変異が、実際に糖尿病として同定されている可能性がある。したがって、糖尿病の病因解明の為に重要な成果として、J. Cell Sci. の編集者によって本研究成果の応用面が期待されている。さらに、V-ATPase が形成するオルガネラ酸性 pH ではなく、 $a_3$  イソフォームを持つ V-ATPase そのものが、分泌に関わっていることは極めて興味深い。上に述べたように、エンドサイトーシスの輸送小胞の形成過程で、 $a_2$  イソフォームが ARNO と *c* サブユニットが Arf6 と直接結合する。インスリン分泌顆粒の過程で、形質膜との融合過程に関わる因子と V-ATPase との相互作用があるかどうか、興味深い。 $a_3$  イソフォームに関する本研

究の成果は、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスの機構の解明に向けて新しい分野を開くものと期待される。

#### 4. 研究参加者

##### 二井グループ (F-ATPase の回転機構の解明およびサブユニットの役割の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
二井 将光	微生物化学研究センター 岩手医科大学 薬学部	特別研究員 教授・学部長	F-ATPase の回転機構の解明の研究	H15,10～H19,3 H19,4～H20,3
細川 浩之	微生物化学研究センター 岩手医科大学 薬学部	大学院生(東京大学・大学院薬学系研究科)	F-ATPase 回転機構の解明	H15,10～H19,3 H19,4～H20,3
島村 幸子	大阪大学産業科学研究所	チーム事務員	事務処理全般	H15,12～H16,3
山本 章嗣	長浜バイオ大学	教授	V-ATPase の細胞生化学	H15,10～H20,3
岩本(木原)昌子	長浜バイオ大学	准教授	変異導入による回転機構の解析	H15,10～H20,3
齊藤 究	金沢大学大学院自然科学研究科	助手	回転機構の物理的解析	H15,10～H18,3
平 郁子	微生物化学研究センター	CREST 研究員	V-ATPase のイソフォームの細胞内分析	H16,4～H19,3
林 和洋	微生物化学研究センター 岩手医科大学 薬学部	CREST 研究員	V-ATPase の回転機構	H16,4～H19,3 H19,4～H20,3
高井 紀子	微生物化学研究センター	研究補助員	実験データ処理	H16,4～H19,3
不破 京子	微生物化学研究センター	チーム事務員	事務処理全般	H16,4～H19,3
若林 朱里	岩手医科大学 薬学部	チーム事務員	事務処理全般	H19,4～H20,3
中西 真弓	微生物化学研究センター 岩手医科大学 薬学部	CREST 研究員 准教授	F-ATPase と V-ATPase の回転	H16,7～H19,3 H19,4～H20,3
柏木 幸子	微生物化学研究センター 岩手医科大学	CREST 技術員	F-ATPase の回転	H16,11～H19,3 H19,4～H20,3

	薬学部			
生方 寿治	微生物化学研究センター	研究補助員	V-ATPase の回転機構	H18,1 ~ H19,3
工藤 円	岩手医科大学薬学部	研究補助員	V-ATPase の局在	H19,4 ~ H20,3
松元(後藤) 奈緒美	岩手医科大学薬学部	助教	V-ATPase の多様性と F-ATPase の回転	H19,4 ~ H20,3

和田 / 孫グループ (V-ATPase のイソフォームの役割とプロトンポンプの高度局在化の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
和田 洋	大阪大学・産業科学研究所	准教授	V-ATPase の特異的な生理機能獲得機構	H15,10 ~ H20,3
山本 章嗣	長浜バイオ大学	教授	V-ATPase の細胞生化学	H15,10 ~ H20,3
孫 戈虹	同志社女子大学薬学部	准教授	V-ATPase イソフォームの回転機構の解明	H15,10 ~ H20,3
豊村 隆男	就実大学・薬学部	助教	V-ATPase KO マウスの解析	H15,10 ~ H20,3
青山(大塚) 美奈子	大阪大学・産業科学研究所	CREST 技術員	V-ATPase の特異的な反応機構	H17,4 ~ H20,3
村田 佳子	"	産研 COE 研究員	V-ATPase のイソフォームの生理的役割	H15,10 ~ H16,3
福山 章紀	"	研究補助員	V-ATPase のイソフォームの細胞内分布	H15,10 ~ H16,3
加賀田 繁	"	大学院生 (大阪大・理学研究科)	V-ATPase の KO マウス	H16,4 ~ H17,3
Eviriyanti Agung	"	大阪大学工学部 4年生	V-ATPase の KO マウス	H16,4 ~ H17,3

## 5. 招聘した研究者等

氏名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Richard Berry（Oxford Univ. 教授）	プロトンポンプに関する共同研究が提案され、Discussionを行った。一部は、後に共著論文として発表した。さらに細菌の鞭毛の回転機構に関するセミナーを行った。	都内ホテル	H16.7.5～ H16.7.7
Tomoko Ohnishi (Johnson Foundation Univ. of Pennsylvania 教授)	プロトン輸送に関する Discussion の為	"	H17.11.5～ H17.11.6
V. Marshansky（MGH, Harvard Univ. 准教授）	共同研究と実験 セミナー発表(一部は二つの共著論文として発表した)	"	H18.6.26～ H18.7.14
T. Pilizota（Oxford Univ. 大学院生）	共同実験	"	H18.12.11～ H18.12.12
M. Forgac（Tuft Univ. 教授）	プロトンポンプに関する Discussion とセミナー発表	"	H18.12.20
T. Bilyard（Oxford Univ. 大学院生）	プロトンポンプに関する Discussion とセミナー発表	"	H18.8.31
Barry P. Rosen（Wayne State Univ.）	別件で来日中であった重金属イオン ATPase の権威である Rosen 博士に、本研究の方向性に関して Discussion をしてもらった。中西、林、柏木、細川が実際に研究データを示し、批判的討論をした。同時に Rosen 博士は重金属イオン輸送 ATPase に関するセミナー発表を行った。	盛岡市内ホテル	H19.7.24～ H19.7.27
V. Marshansky (MGH, Harvard Univ.)、Robert K. Nakamoto (Virginia Univ.)、G. Grüber (Nanyang Technological Univ.)	本研究の成果について評価を受けると同時に、シンポジウムを開き討論した。(本報告書7.研究期間中の主な活動、参照)	岩手医科大学矢巾キャンパス	H19.10.25～ H19.10.27

## 6. 成果発表等

### (1) 原著論文発表(国内雑誌0件、国際誌16件)

- 1) G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai: Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim. Biophys. Acta.* 1658, 106-114 (2004)
- 2) G. H. Sun-Wada, Y. Kamei, Y. Wada, M. Futai: Regulatory elements directing gut expression of the *GATA6* gene during mouse early development. *J. Biochem.* 135,

165-169 (2004)

- 3) H. Hosokawa, M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, K. Hayashi, I. Taira, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai: ATP-dependent rotation in mutant ATP synthases lacking proton transport. *J. Biol. Chem.* 280, 2379-23801 (2005)
- 4) M. Aoyama, K. Agari, G. H. Sun-Wada, M. Futai, Y. Wada: Simple and straightforward construction of a mouse gene targeting vector using *in vitro* transposition reactions. *Nucleic Acids Res.* 33, pp e52 (2005)
- 5) F. Jouret, C. Auzanneau, H. Debai, G. H. Sun-Wada, C. Pretto, E. Marbai, F. E. Karet, P. J. Courtoy, O. Devuyst: Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3235-3246 (2005)
- 6) 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. Reprod.* 74, 185-194 (2006)
- 7) 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 F<sub>1</sub> sector. *J. Biol. Chem.* 281, 4126-4131 (2006)
- 8) G. H. Sun-Wada, T. Toyomura, Y. Murata, A. Yamamoto, M. Futai, and Y. Wada: The *a*3 isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cell. *J. Cell Sci.* 119, 4531-4540 (2006)
- 9) A. Hurtado-Lorenzo, M. Skinner, J. El Annan, M. Futai, G. H. Sun-Wada, S. Bourgoin, J. Casanova, A. Wildeman, S. Bechoua, D. A. 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)
- 10) M. Nakanishi-Matsui and M. Futai: Stochastic proton pumping ATPases: From single molecules to diverse physiological roles. *IUBMB-Life* 58, 318-322 (2006)
- 11) 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.* 329, 239-248 (2007)
- 12) G. H. Sun-Wada, H. Tabata, and N. Kawamura: Selective assembly of subunit isoforms in mouse kidney. *J. Bioenerg. Biomemb.* 37, 415-420 (2006)

- 13) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, T. Ubukata, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai*: Rotational catalysis of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector: stochastic fluctuation and a key domain of the  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* 282, 20698-20704 (2007)
- 14) *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.* 93, 264-275 (2007)
- 15) *S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai*: Effects of mutations in  $\beta$  subunit hinge region on ATP synthase F<sub>1</sub> sector rotation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 227-231 (2008)
- 16) *K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai*: Unique assembly of a hybrid yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase containing mouse testis-specific E1 isoform. in press.
- 17) *V. Marshansky and M. Futai*: The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Current Opinion in Cell Biology.* in press.

( 2 ) その他の著作物 ( 総説、書籍など )

- 1) *M. Futai, G. H. Sun-Wada, Y. Wada*: Proton translocating ATPases: Introducing unique enzymes coupling catalysis and proton translocation through mechanical rotation (Handbook of ATPases, M. Futai, Y. Wada and J. H. Kaplan eds) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 237-260 (2003)
- 2) *G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai*: Vacuolar-type proton ATPases: Subunit isoforms and tissue-specific functions (Handbook of ATPases, M. Futai, Y. Wada, J. H. Kaplan eds) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 379-394 (2003)
- 3) *M. Futai*: Our research on proton pumping ATPase over three decades: their biochemistry, molecular biology and cell biology *Proc. Japan Academy* 82, 375-438 (2006)
- 4) *M. Nakanishi-Matsui and M. Futai*: Stochastic rotational catalysis of proton pumping F ATPase. *Royal Soc. Philosophical Transactions Biol. Sci.* in press.

- 5) 二井將光、孫一和田虹戈、和田洋：プロトンポンプ ATPase と多彩な酸性異環境 薬学雑誌 124, 243-260 (2004)
- 6) 中西真弓、二井將光：エネルギー代謝；ATPase タンパク質科学（後藤祐児・桑島邦博・谷澤克行 編 化学同人社）447-464 (2005)
- 7) 中西真弓、二井將光：プロトンポンプ ATPase：一分子から多彩な機能まで 生化学 79, 512-519 (2007)
- 8) 平郁子、中西真弓、二井將光：破骨細胞に骨吸収窩を形成するプロトンポンプ 生体の科学 58, 211-218 (2007)

(3) 学会発表（国際学会発表及び主要な国内学会発表）  
招待講演（国内会議 1 件、 国際会議 11 件）

- 1) *M. Futai*  
ATP synthase : Rotational catalysis in membrane. Gordon Research Conference, Molecular & Cellular Bioenergetics. ( New Hampshire, USA ) June 20 - 25, 2004.
- 2) *M. Futai*  
V-ATPase and F-ATPase: Rotary molecular motors. Oxford/Kobe Seminar : UK-Japan Collaboration in Bionano Technology. ( 神戸 ) July 1-3, 2004.
- 3) *M. Futai*  
Plenary lecture: Role and function of V-ATPase. European Bioenergetics Conference. ( Pisa, Italy ) August 21-26, 2004.
- 4) *M. Futai*  
Plenary lecture: Rotating V-ATPase. Annual Meeting for Biochemistry and Molecular Biology. (Muenster, Germany) September 18-22, 2004.
- 5) *M. Futai*  
Transport ATPase as Nanomotors: Chair's Introduction. FASEB Summer Research Conference on "Transport ATPase: Genomics, Mechanisms and Relevance to Disease" (Vermont, USA) July 20, 2005.
- 6) *M. Futai*  
Studies on F- and V-ATPase Nanomotors. FASEB Summer Research Conference on "Transport ATPase: Genomics, Mechanisms and Relevance to Disease" (Vermont, USA) July 20, 2005.

- 7) *M. Futai*  
Stochastic rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: toward understanding rotation mechanism. Gordon Conference on “ Molecular and Cellular Bioenergetics” (Andover, New Hampshire, USA) July 11 – 16, 2006.
- 8) *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 F<sub>1</sub> sector and its mutations in the ATP-binding region. 14<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference ( Moscow, Russia ) July 22 - 27, 2006.
- 9) 二井將光、中西真弓、孫戈虹  
プロトン ATPase: ゆらぎと多様性の中で. シンポジウム: 生体膜を透過する仕組みとは何か: 膜輸送ナノマシンの構造・機能とその制御(大阪) August. 6-8, 2006
- 10) *M. Futai*  
V-ATPase. The Second Workshop of the UK-Japan Nanobiotechnology Collaboration ( 東京 ) December 5 - 6, 2006.
- 11) *M. Nakanishi-Matsui and M. Futai*  
Stochastic ATP synthase F<sub>1</sub> motor: a key domain of the β subunit. The second Workshop of the UK-Japan Nanobiotechnology Collaboration ( 東京 ) December 5 - 6, 2006.
- 12) *M. Futai*  
Possible rotation mechanism of *E. coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector. The Third Workshop of the UK-Japan Nanobiotechnology Collaboration ( Oxford, UK ) July 18 - 22, 2007.

口頭発表 ( 国内会議 8 件、 国際会議 3 件 )

- 1) *G. H. Sun-Wada, T. Toyomura, Y. Murata, Y. Wada, M. Futai*  
A diverse proton pump V-ATPase: from lysosome, osteoclast to acrosome. 日本生化学会 October 16, 2004.
- 2) *K. Nishino, H. Hosokawa, A. Iwamoto-Kihara, A. Yamamoto, Y. Wada, M. Futai*  
Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes. 日本生化学会 October 16, 2004.

- 3) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, H. Hosokawa, Y. Wada, and M. Futai*  
High-speed rotation of *E. coli* F<sub>1</sub>-ATPase  $\gamma$  subunit. 日本生化学会 (神戸)  
October 20, 2005.
- 4) *H. Hosokawa M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, M. Futai*  
ATP-dependent rotation of mutant ATP synthase with defective proton pathway. 日本生化学会 (神戸) October 20, 2005.
- 5) 中西真弓、二井將光  
F 型 ATPase の回転に対するプロトン輸送変異と イプシロン・サブユニットの影響. 日本生体エネルギー研究会第 31 回討論会(名古屋) December 21, 2005.
- 6) *C. Pietrement, G. H. Sun-Wada, S. Breton, M. Futai, D. Brown*  
Specific distribution of the C1, G1, d1, and d2 V-ATPase subunit isoforms in rat kidney. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Pediatric Nephrology (Istanbul, Turkey) September 10 – 13, 2005.
- 7) *A. H.-Lorenzo, M. Skinner, Annan. J. El, M. Futai, G. H. Sun-Wada, S. Bourgoïn, J. Casanova, A. Wildeman, D. A. Ausiello, D. Brown, V. Marshansky*  
V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. Experimental Biology Annual Meeting (San Francisco, USA) April 1 - 5, 2006.
- 8) *A. H.-Lorenzo, M. Skinner, Annan. J. El, M. Futai, G. H. Sun-Wada, S. Bourgoïn, J. Casanova, A. Wildeman, D. A. Ausiello, D. Brown, V. Marshansky*  
Novel role of V-ATPase in scaffolding and recruiting cytosolic small GTPases and regulation of the protein degradative pathway. 14<sup>th</sup> European Bioenergetic Conference (EBEC) (Moscow, Russia) July 22 – 27, 2006.
- 9) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, T. Ubukata, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai*  
Stochastic rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector: mutations in the  $\beta$ ; subunit catalytic domain. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) December, 11 – 15, 2007.
- 10) *S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai*  
Effects of mutations in  $\beta$  subunit hinge region on ATP synthase F<sub>1</sub> sector rotation. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同

大会 ( 横浜 ) December, 11 – 15, 2007.

- 11) *K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai*  
Unique assembly of hybrid vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with mouse testis-specific *E1* isoform. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 ( 横浜 ) December, 11 – 15, 2007.

ポスター発表 ( 国内会議 10 件、 国際会議 6 件 )

- 1) *T. Toyomura, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai*  
V-ATPase with *a3* isoform is localized to the secretory vesicle in pancreatic beta HC9 cell. 日本生化学会 October 16, 2004.
- 2) *Y. Murata, G. H. Sun-Wada, M. Namba, Y. Wada, M. Futai*  
Presence of a unique proton-pumping ATPase in mouse kidney. 日本生化学会 October 16, 2004.
- 3) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, H. Hosokawa, Y. Wada, M. Futai*  
High speed rotation of *E. coli* F<sub>1</sub>-ATPase  $\gamma$  subunit. 日本生化学会 ( 神戸 ) October 20, 2005.
- 4) *K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, M. Futai*  
Role of the V-ATPase subunit *E* on energy coupling and assembly / disassembly on VoV<sub>1</sub> complex. 日本生化学会 ( 神戸 ) October 20, 2005.
- 5) *H. Tabata, M. Futai, Y. Wada, G. H. Sun-Wada*  
Differential localization of *a* subunit isoforms of V-ATPase in melanocyte. 日本生化学会 ( 神戸 ) October 20, 2005.
- 6) *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 F<sub>1</sub> sector: the  $\epsilon$  subunit-sensitive rotation. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology (San Francisco, U.S.A.) April 1 - 5, 2006.
- 7) *I. Fujii-Taira, Y. Wada, G. H. Sun-Wada and M. Futai*  
Translocation of V-ATPase with lysosomes during osteoclast-like cell differentiation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) June 18 – 23, 2006.

- 8) *H. Hosokawa, M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai*  
 Observation of rotation of ATP synthase under low viscous drag. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) June 18 – 23, 2006.
- 9) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, and M. Futai*  
 ATP synthase F<sub>1</sub> sector with the  $\beta$  subunit Ser174 mutation exhibits stepping rotation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) June 18 – 23, 2006.
- 10) *S. Kashiwagi, M. Nakanishi-Matsui, H. Hosokawa, D. J. Cipriano, S. D. Dunn, and Y. Wada, M. Futai*  
 Stochastic rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) June 18 – 23, 2006.
- 11) *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 F<sub>1</sub> sector and its mutations in the ATP-binding region. 14<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference (Moscow, Russia) July 22 – 27, 2006.
- 12) *K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, and M. Futai*  
 Assembly of mouse isoform E1/yeast hybrid vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase. 日本分子生物学会2006フォーラム (名古屋) December 8, 2006.
- 13) *M. Nakanishi-Matsui, S. Kashiwagi, T. Ubukata, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai*  
 Stochastic rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector: mutations in the  $\beta$ ; subunit catalytic domain. BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) December, 11 – 15, 2007.
- 14) *S. Kashiwagi, A. Iwamoto-Kihara, M. Nakanishi-Matsui, and M. Futai*  
 Effects of mutations in  $\beta$  subunit hinge region on ATP synthase F<sub>1</sub> sector rotation. BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) December, 11 – 15, 2007.
- 15) *H. Hosokawa, K. Sekimizu, M. Nakanishi-Matsui and M. Futai*  
 Rotation of ATP synthase with *c* subunit cAsp61 replacement. BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜)

December, 11 – 15, 2007.

16) *K. Hayashi, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, and M. Futai*

Unique assembly of hybrid vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with mouse testis-specific E1 isoform. BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) December, 11 – 15, 2007.

17) 藤原将祐、南出由希、佐々木由香、大橋一晶、岩本(木原)昌子、二井将光、前田正知

Diversity of Fo c subunit in bacterial ATP synthase. (ATP合成酵素のFoのcサブユニットの多様性について.) BMB2007 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜) December, 11 – 15, 2007.

(4) 特許出願

国内出願 (0件)

海外出願 (0件)

(5) 受賞等

受賞

The best poster presentation 39th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Nephrology. September 10-15, 2005.

新聞報道

日経産業新聞 (平成18年1月31日)

タイトル「たんぱく質再吸収 腎臓の機能解明 酵素が作用」

その他

- 1) Nature Cell Biol. 8, 107–109, 2006. “News and View” *Chiara Recchi and Philippe Chavrier* V-ATPase: a potential pH sensor.

二井グループとMassachusetts General HospitalのKidney Nephrology Groupとの国際共同研究に対する評価の記事

- 2) STKE (Signal Transduction Knowledge Environment) 322, 63, 2006 “This Week in ST”

二井グループとMassachusetts General HospitalのKidney Nephrology Groupとの国際共同研究の発表(Nature Cell Biol. 8, 124, 2006.)に対する評価記事

3 ) Recent Protein Trafficking Top-Ranked Publication ( Protein Trafficking, Transporting and Sorting Research, 3.12, 2006) 上記の共同論文が採用された

4 ) J. Cell Science, 119, 2006 “In This Issue” , J. Bradbury, Pumping out insulin. Sun-Wada *et al.*に対する評価記事

## 7. 研究期間中の主な活動（ワークショップ・シンポジウム等）

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H16.12.3	研究発表 総括討論	微生物化学 センター	8名	各研究グループの研究状況を把握し、さらに発展させる為に、各メンバーが研究発表を行い、詳しい討論をした
H17.12.2 2~23	CREST ミ ーテ ィン グ	微生物化学 センター	9名	CREST チーム内の各研究グループの研究状況を把握し、さらに発展させる為に、各メンバーが1年間の研究を発表し討論した。
H18.2.22 ~23	同上	”	9名	同上
H19.10.2 6~27	シンポジ ウム	岩手医大 矢巾キャン パス	10月26日（公 開）：約70名  10月26日（非 公開）：20名	CREST チームメンバー、共同研究者および関連分野の研究者が集まってシンポジウムを開催した。海外からはハーバード大学 V. Marshansky 教授、バージニア大学 Robert K. Nakamoto 教授、Nanyang Technological 大学 G. Grüber 教授の参加を得た。シンポジウムの翌日には、非公開で研究会を行い各研究者の評価を受けると同時に、共同研究の協議を行った

## 8. 研究成果の展開

### （1）他の研究事業への展開

研究代表者は、本研究の期間中には科研費等へは応募をしていない。しかし、成果を踏まえ、国内の他の研究競争資金に応募する予定である。数年間の共同研究の結果を踏まえた NSF の研究費に、ハーバード大学 V. Marshansky 博士を代表者、二井を consultant とした研究費が採択されている。また、共同研究者、和田博士および孫 和田博士は文科省科学研究費に採択されている。これら共同研究者の他の研究事業への展開を、下記のようにまとめた。なお、二井は本研究の

展開によって、応用酵素研究会より助成金を受けている（下記）。

記

1) NIH/NIDDK Program Project Grant

Principal Investigator: V. Marshansky

Consultant: M. Futai

Title of the Project: “Cellular Biology of Renal Function and Disease”

Budget: \$ 334,000/year

2) Pilot & Feasibility Grant (Boston Area Diabetes Endocrinology Research Center)

Principal Investigator: V. Marshansky

Consultant: M. Futai

Title of the Project: “V-ATPase and Regulation of the Protein”

Budget: \$4,000/year

3) H. 15 ~ 19

科学研究費補助金 特定領域研究 和田洋

「発生・分化を担うエンドソーム・リソソームのメンブレンダイナミクス」

10,700 千円

4) H. 18

公益信託林女性自然科学者研究助成基金 孫 和田戈虹

「分泌制御における液胞型プロトンポンプ」

1,300 千円

5) H. 18 ~ H. 19

科学研究費補助金 基盤研究（C） 孫 和田戈虹

「細胞、組織、そして個体におけるプロトン・サーキットの研究」

4,130 千円

6) H.19～H.20

科学研究費補助金 特定領域研究 孫 和田 戈虹

「酸性オルガネラの pH 感知・制御メカニズムと膜のダイナミクス」

6,600 千円

7) H17～18

日本応用酵素協会 研究助成金 二井 將光

「プロトンポンプ ATPase (H<sup>+</sup>ATPase) の作動機構と多様性に関する研究」

2,000 千円

## (2) 実用化に向けた展開

本研究は基礎的な生物学の研究であり、成果を得た研究者自身が直ちに実用化へと展開させる性質のものではない。しかし、Nature Cell Biol.の News and View、日経産業新聞、J. Cell Sci.の This Issue 等で、注目されているように本研究の成果の一部は、医学面に於いて、他の研究者に大きな示唆を与えるものと考えられる。また、回転を中心とした F-ATPase の研究成果は、ナノバイオロジーの基礎研究として、応用へのポテンシャルが高い。

## 8. 他チーム、他領域との活動とその効果

### (1) 領域内の活動とその効果

研究領域会議は、研究の方向性、結果の論文発表などを考える上で常に有益なものであった。F-ATPase サブユニットの回転を解析する上での Discussion は、課題の解決につながるものもあった。また、領域内の他の研究者の成果をじっくりと聞き、討論したことは本研究に資するところが大きかった。

### (2) 領域横断的活動とその効果

共同研究とした活動はなかったが、領域内外の進展には常に注目してきた。

## 10. 研究成果の今後の貢献について

### (1) 科学技術の進歩が期待される成果

F-ATPase と V-ATPase という二つのプロトンポンプを平行して同じ研究グループが研究する利点は、一つのポンプで得た知見や方法論を他のポンプの理解に直ちにつなげられることである。F-ATPase の一分子回転測定の結果は、同じ方法を応用して V-ATPase の阻害剤の探索に使える微量化システムの開発につながることを期待される。薬剤開発のシステムとして解決すべき問題が多く、フロンティアの開拓と言える一面を持っている。

V-ATPase の研究は、創薬分野にも大きなインパクトのあるものと考えられる。研究成果はインスリン依存糖尿病の理解とともに、骨粗鬆症に効果のある薬物の開発につながると考えている。また、F-ATPase の阻害薬物が創薬のリード化合物となる可能性が考えられる。すなわち、結核菌や肺炎菌の F-ATPase は、ヒトを含む他の生物のものとは大きく異なっており、これらの菌の感染症を考えた F-ATPase の阻害剤そのものの開発が期待される。

### (2) 社会・経済の発展が期待される成果

F-ATPase および V-ATPase の基礎的な研究成果は、直ちに社会・経済の発展に貢献するものではない。しかし、上で述べたように、科学の広い応用面につながる多くの成果が得られており、今後の発展が期待される。

## 11. 結び

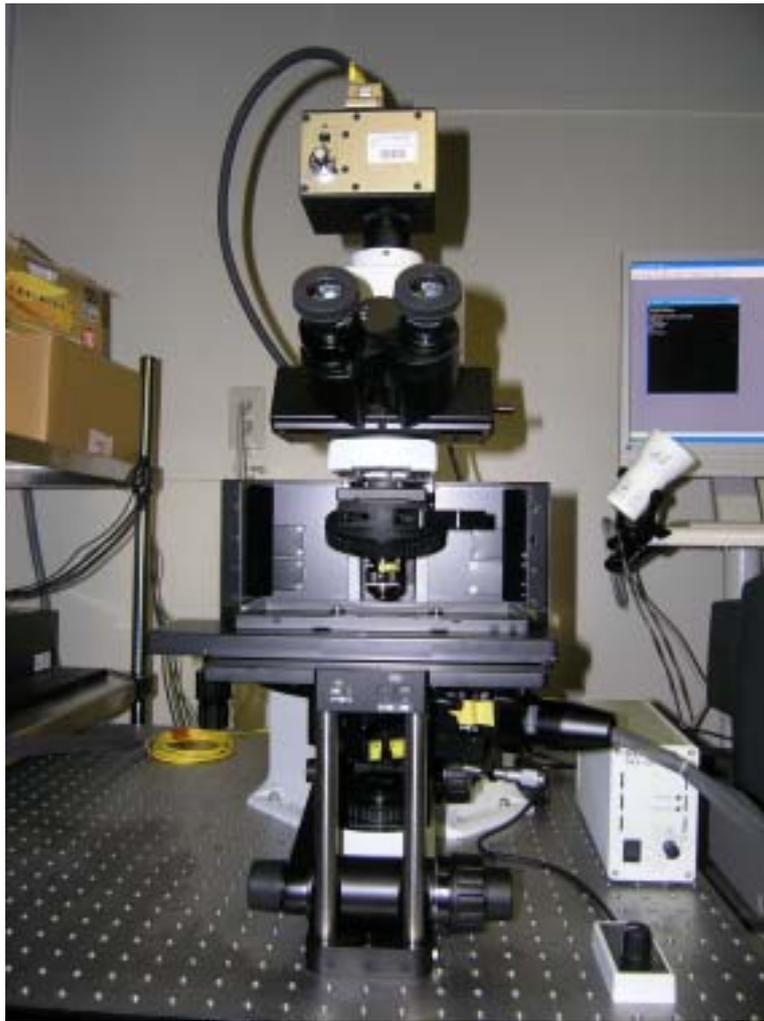
プロトンポンプ F-ATPase の回転機構を明らかにし、理解する、さらに同様に回転機構によりプロトンを輸送する V-ATPase の多様性と細胞内局在を明らかにし、細胞内外の酸性環境の機能に対する理解を進める、この2点が本研究の目標とするところであった。F-ATPase の回転の確率的なゆらぎ、 $\beta$ サブユニット P-loop /  $\alpha$ -helix-B / loop /  $\beta$ -sheet4 ドメインが回転を駆動する等の結果は、F-ATPase のみならず酵素全般の理解につながるものである。

V-ATPase に関する本研究の成果は、多様なサブユニットの機能と局在するオルガネラの理解につながる。同時に、内部酸性オルガネラの生理的な理解を広げる

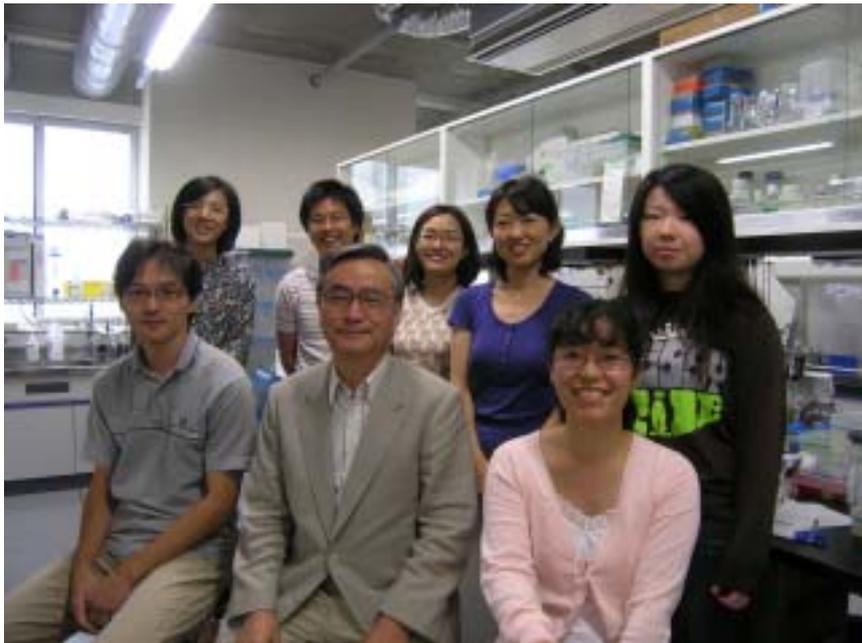
ものである。V-ATPase と酸性環境の研究が、疾病の理解と創薬につながるものと期待できる。

代表者のプロジェクトの運営については、問題とするところはなく、チーム全体の研究遂行は、順調にいったと考えている。また、研究費の使い方は適正に行われたと確信している。設備費(備品費)で作成した暗視野顕微鏡、CCD カメラ、レーザー光源よりなる回転観察システムは、連日の実験に駆使されている。(写真1)

研究期間中に本研究に参加した研究者(CREST 研究員)のうちで、助教(助手)に採用されたもの2名(平、豊村)、准教授に採用されたもの2名(孫一和田、中西)がおり、また2名(柏木、細川)は本研究の成果により博士論文を執筆した。このように、本研究は若手研究者の育成に貢献したと考えている。現時点で研究に参加している研究者(写真2)は女性が多く、戦略的創造研究推進事業は、若手研究者、特に女性研究者の育成に大きな貢献をしていると考えている。



(写真1)



(写真2)