OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	液胞型H+-ATPase(V-ATPase) : 反応機構および16kDa、72kDaサブユニットの構造
Author(s)	花田, 裕典
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3058255
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

(1)

液胞型H^+-ATPase (V-ATPase): 反応機構および16 kDa、72 kDaサブユニットの構造

大阪大学産業科学研究所　生合成化学工業部門

花田裕典

1991年　　学位論文

液胞型H^+-ATPase (V-ATPase): 反応機構および16 kDa、72 kDaサブユニットの構造

大阪大学産業科学研究所　生合成化学工業部門

花田裕典

1991年　　学位論文

[目次]

発表論文 ····· 1

略語および略号 ····· 2

第1章 序論 ····· 4
1.1 V-ATPase(液胞型H^+-ATPase)の細胞内局在性と機能 ····· 4
1.2 V-ATPaseの構造と酵素化学的性状 ····· 10
1.3 本研究の目的 ····· 14

第2章 V-ATPaseの反応機構 ····· 15
2.1 緒言 ····· 15
2.2 材料および方法 ····· 20
2.3 結果と考察 ····· 23
2.3.1 V-ATPaseおよびATP合成酵素(F-ATPase)のヌクレオチド結合部位 ····· 23
2.3.2 V-ATPaseとF-ATPaseの反応機構の比較 ····· 28

第3章 BafilomycinによるV-ATPaseの阻害機構 ····· 36
3.1 緒言 ····· 36
3.2 材料および方法 ····· 39
3.3 結果と考察 ····· 40
3.3.1 BafilomycinのV-ATPaseに及ぼす影響 ····· 40
3.3.2 BafilomycinによるV-ATPaseの定常状態およびUni-site反応に対する阻害 ····· 47

第4章 マウス小脳のV-ATPase 72 kDa、16 kDaサブユニットに対応するのcDNA配列の決定 ····· 50
4.1 緒言 ····· 50
4.2 材料および方法 ····· 55
4.2.1 マウス小脳の16 kDaサブユニットに対応するcDNA配列決定 ····· 55
4.2.2 ヒト 16 kDaサブユニット遺伝子の構造の解析 ····· 56

4.2.3　マウス小脳の72 kDaサブユニットに対応する
cDNAの配列決定 ····· 56
4.2.4　その他の方法 ····· 59
4.3　結果と考察 ····· 60
4.3.1　マウス小脳の 16 kDaサブユニットに対応する
のcDNA配列 ····· 60
4.3.2　ヒト 16 kDaサブユニットの遺伝子の構造 ····· 69
4.3.3　マウス小脳の 72 kDaサブユニットに対応する
のcDNA配列 ····· 72

第5章　総括と展望 ····· 78

参考文献 ····· 82

謝辞 ····· 92

[発表論文]

1. Hanada, H., Hasebe, M., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. (1991)
   Molecular Cloning of cDNA Encoding the 16 kDa Subunit of Vacuolar H^+-ATPase from Mouse Cerebellum.
   Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 1062-1067.

2. Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. (1990)
   Kinetic Studies of Chromaffin Granule H^+-ATPase and Effect of Bafilomycin A_1.
   Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 873-878.

3. Hanada, H., Noumi, T., Maeda, M., and Futai, M. (1989)
   Uni-site Catalysis by Escherichia coli F_1-ATPase with Different Numbers of Bound Nucleotides.
   FEBS Lett. 257, 465-467.

4. Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., Futai, M. (1991)
   Mutation in Ser-174 and the Glycine-rich Seqence (Gly-149, Gly-150 and Thr-156) in the β Subunit of Escherichia coli H^+-ATPase.
   J. Biol. Chem., in press.

5. Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M. (1991)
   One Step Purification of Escherichia coli H^+-ATPase (F_oF_1) and Its Reconstitution into Liposomes with Neurotransmitter Transporters.
   J. Biol. Chem., in press.

6. Futai, M., Hanada, H., Moriyama, Y., and Maeda, M. (1991)
   Proton Translocating ATP Synthase (F_oF_1): Understanding Its Molecular Structure and Function.
   New Era of Bioenergetics (Mukohata, Y., ed.), Academic Press, New York, in press.

[略語、略号]

V-ATPase	液胞型H^+-ATPase、Vacuolar type H^+-ATPase
F-ATPase	ATP合成酵素(ATP synthase), F_oF_1
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ADP	Adenosine 5'-diphoshate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
ITP	Inosine 5'-triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5'-triphosphate
dATP	Deoxyadenosiine 5'-triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate
DCCD	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	D,L-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether)N, N, N', N', -tetraacetic acid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-Morphorino)propanesulfonic acid
Tricine	N-Tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
SDS	Sodium dodecyl sulfonate
BSA	Bovine serum alubmin
HPLC	High performance liquid chromatogrphy
PCR	Polymerase chain reaction
Pi	Inorganic phosphate

bp	base pair(s)
kb	kilo base pair(s)
kDa	kilo dalton(s)

ヌクレオチドをIUPAC-IUBに従って以下のように略称し、塩基配列を一文字表記した。

A	Adenosine
C	Cytidine
G	Guanosine
T	Thymidine

Y	C or T	H	A, C, or T
R	A or G	B	A, T, or C
M	A or C	V	G, A, or C
K	G ro T	D	G, A, or T
S	G or C		
W	A or T	N	G, A, T, or C

アミノ酸残基はIUPAC-IUBに従って以下のように略称した。

Glycine	G (Gly)	Glutamine	Q (Gln)
Alanine	A (Ala)	Lysine	K (Lys)
Valine	V (Val)	Arginine	R (Arg)
Leucine	L (Leu)	Cysteine	C (Cys)
Isoleucine	I (Ile)	Methionine	M (Met)
Serine	S (Ser)	Phenylalanine	F (Phe)
Threonine	T (Thr)	Tyrosine	Y (Tyr)
Aspartic acid	D (Asp)	Tryptophan	W (Trp)
Asparagine	N (Asn)	Histidine	H (His)
Glutamic acid	E (Glu)	Proline	P (Pro)

第1章　序論

1.1　V-ATPase(液胞型H^+-ATPase)の細胞内局在性と機能

オルガネラ(細胞内小器官)や細胞膜の内側あるいは外側にH^+が輸送され、その結果生じた膜を介するH^+の電気化学的ポテンシャル差によって駆動される反応が、細菌から哺乳動物まで広く知られている。これらの反応の中でATPのかかわる反応が特に生物学上重要な位置を占めている。これまでに、ATP分解/合成と共役してH^+を輸送する酵素、H^+ 輸送性ATPase(H^+-ATPase)はミトコンドリア内膜、葉緑体チラコイド膜、バクテリア細胞膜などに存在するATP合成酵素F_oF_1 (F型 ATPase、F-ATPase)(総説1、2、3、4)、および胃壁細胞に存在する(H^++K^+)-ATPase(5)や酵母細胞膜に存在するH^+-ATPase(6)などリン酸化中間体(Phosphorylated intermediate) を形成することからP型ATPase(P-ATPase)と呼ばれる2種類が知られていた(表1.1) (7、8)。

F-ATPaseは分子量約500,000で8種類以上のサブユニットから構成される複雑な構造を持つ。この酵素は酸化的リン酸化、あるいは光リン酸化によるATP合成の最終段階を司り、呼吸鎖あるいは光電子伝達鎖が形成した膜系内外のH^+の電気化学的ポテンシャル差と共役してATPを合成している。生体内で消費される大部分のATPは、このF-ATPaseによって合成されている。F-ATPaseの構造(触媒サブユニットの一次構造、サブユニット組成と量比等)は異種生物の間で保存されている。また、F-ATPaseは逆反応を行うことができる、すなわちATPを分解してH^+を輸送することができる。Streptococcus lactis、Streptococcus faecalis等の一部の嫌気性細菌のF-ATPaseはこのATP分解のみを行っている(1)。

表1.1　V-ATPase、F-ATPase、P-ATPaseの性状の比較

ATPase	V-ATPase	F-ATPase	P-ATPase
Function	ATPase	ATP synthase	ATPase
Location[1]	Endomembrane systems (H^+-ATPase)	Mitochondria, Chloroplasts, Bacterial plasma membranes (H^+-ATPase)	Gastric membranes (H^++K^+-ATPase) Fungal plasma membranes (H^+-ATPase) Plasma membranes (Na^++K^+-ATPase)
Molecular weight	750,000	500,000	100,000
Phosphorylated intermediate	No	No	Yes
Inhibitor	NEM NO_3^- DCCD (10 μM)[2] Bafilomycin (< 0.1 μM)[3]	N_3^- DCCD (1 μM)[2] Oligomycin (0.2 μM)[3]	Vanadate DCCD (100 μM)[2]

(1)各ATPaseの極在位置は例を示した。
(2)50 %阻害に要する濃度を示した。
(3)各阻害剤の完全阻害に要する濃度を示した。

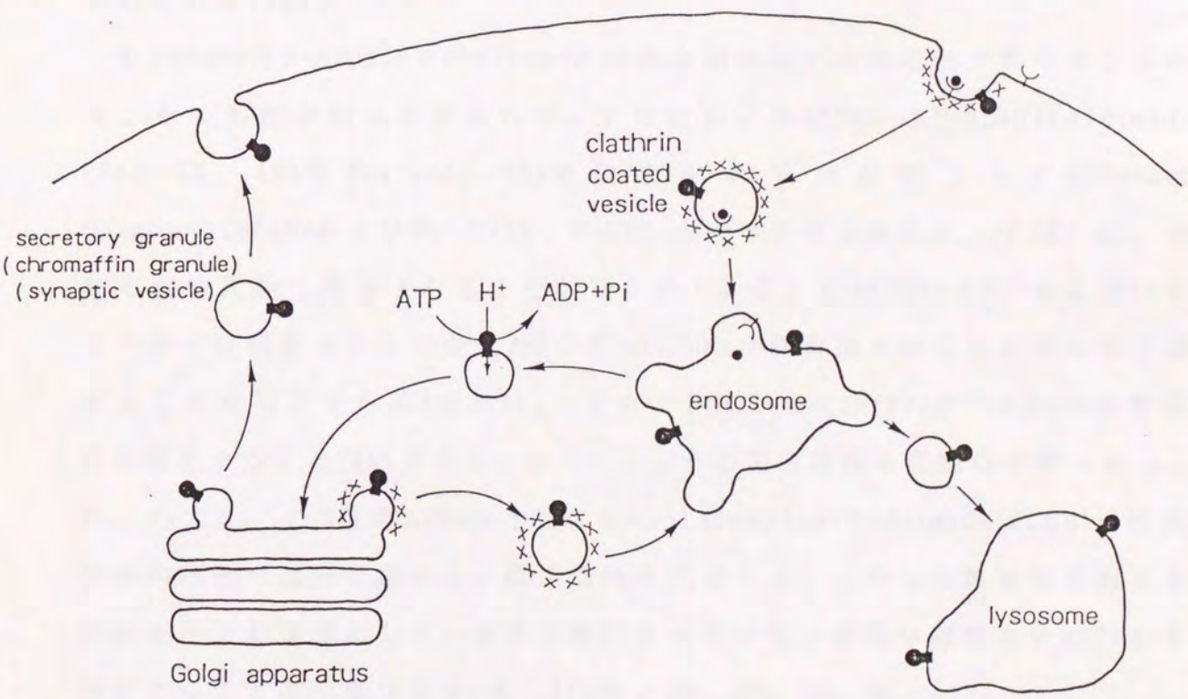
リン酸化中間体を形成するP-ATPaseは胃壁細胞に存在する(H^++K^+)-ATPaseの他に、神経、腎臓、肝臓などの細胞膜に広く分布している(Na^++K^+)-ATPase(9)や筋小胞体のCa^{2+}-ATPase(10)、酵母細胞膜のH^+-ATPaseなどが知られている。Ca^{2+}-ATPaseは分子量約140,000の単一のサブユニットからなり、(H^++K^+)-ATPasや(Na^++K^+)-ATPasでは分子量約100,000のαサブユニットと呼ばれる触媒サブユニットと、機能がまだ不明のβサブユニットから構成されている(11、12、13、14)。

最近、これらの既知の2種類のH^+-ATPaseのいずれにも属さない一群のH^+-ATPaseが見いだされた(総説15、16、17、18)。このATPaseを本論文ではV-ATPase(液胞型ATPase)と呼ぶことにする。V-ATPaseは酵母、植物の液胞や動物細胞ではリソゾーム、クラスリン被覆小胞(Clathrin-coated vesicles)、エンドソーム、クロマフィン顆粒、シナプス小胞などの細胞内膜系(Endomembrane systems、Vacuoles)に属するさまざまなオルガネラに存在していることが報告されている　(図1.1)(16)。V-ATPaseはATPの分解に共役してH^+を輸送し、小胞内を酸性化し、電気化学的ポテンシャル差を形成している。小胞内の酸性pHは液胞やリソゾームなどでは小胞内の酵素反応に、エンドソームではリガンドの受容体からの解離(19)に、植物の液胞や分泌顆粒に置いては物質(Solute)の濃縮(15、20)、ゴルジ体ではタンパク質の修飾や配分に(16)等に重要である。この他、ウィルスの感染(21)、毒素(ジフテリア毒等)の作用発現(22)、マクロファージによる殺菌(23、24)、骨新生(25)などじつに多くの生物現象がV-ATPaseと密接な関係にあることが続々と明らかにされている。

シナプス小胞は神経細胞終末に存在し、神経伝達物質を蓄積している。神経細胞の興奮によってシナプス小胞がシナプス前膜に融合し、神経伝達物質をシナプス間隙に放出して(Exocytosis)、シナプス後膜に興奮が伝達される。

図1.1　V-ATPaseの局在性と機能

リソゾーム、エンドソーム、クラスリン被覆小胞、ゴルジ体、シナプス小胞などのオルガネラを総括して細胞内膜系(Endomembrane systems)と呼ばれている(15、16、17、18)。これらのオルガネラにはいずれもV-ATPaseが存在し、ATPの分解に共役してH^+を小胞内部に輸送する。形成された酸性pHや電気化学的ポテンシャル差はそれぞれのオルガネラの機能に重要であることが知られている。しかし、これらのオルガネラに存在するV-ATPaseは免疫化学的に交さすることが確かめられている。しかし、これらV-ATPase全てが同一のものかあるいは複数のものが存在するのか、明らかになっていない。



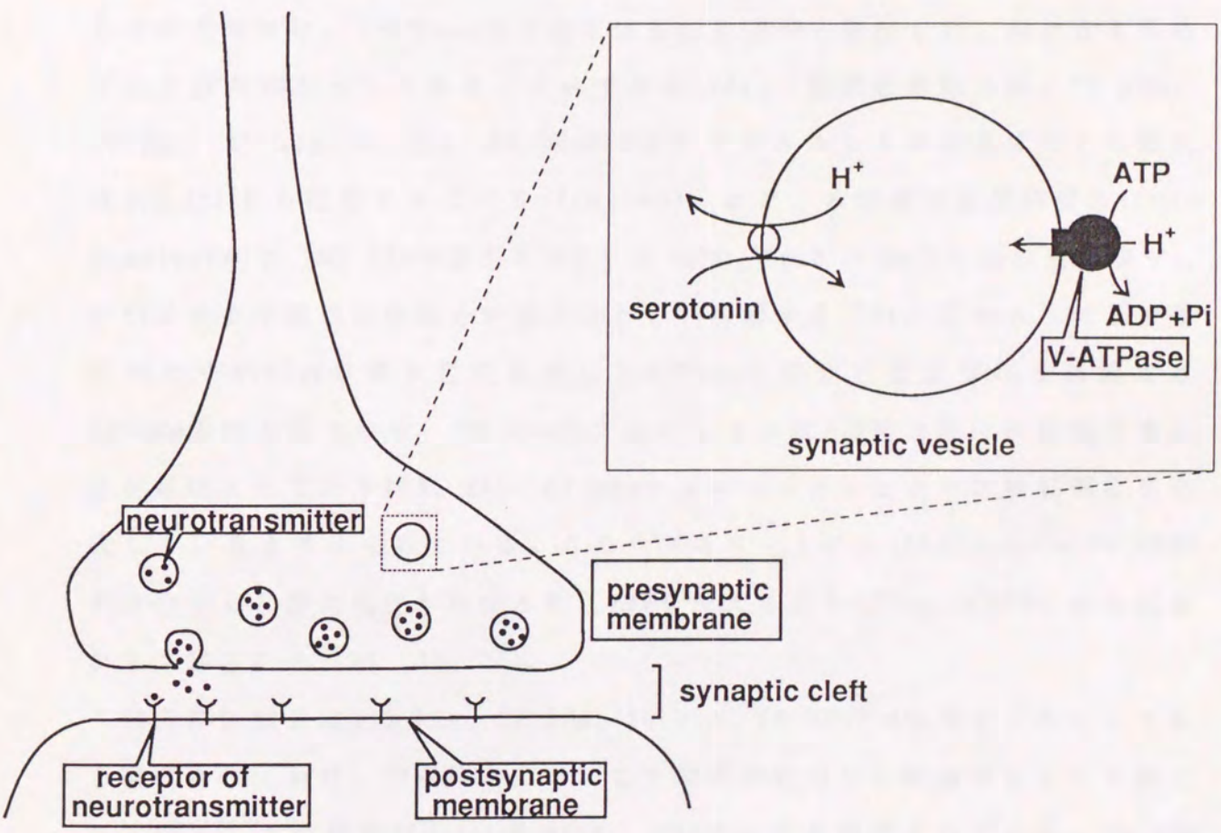
Forgac M. 1989. Physiol. Rev. 69, 765-796. (16)の図を修正した。

この化学伝達においてもV-ATPaseは重要な機能を果たしている。すなわち、シナプス小胞にはV-ATPaseが大量に存在し、膜タンパク質の20 %以上を占めており、小胞内外にH^+の電気化学的ポテンシャル差を形成する(26)。このH^+の電気化学的ポテンシャル差を駆動力として、セロトニン、グルタミン酸、γ-アミノ酪酸(GABA)などの神経伝達物質は小胞内に輸送されることが、ごく最近明らかにされた。(図1.2)(26、27、28、29)。また、副腎髄質のクロマフィン細胞のホルモン分泌顆粒のクロマフィン顆粒においても、V-ATPaseが形成したH^+の電気化学的ポテンシャル差に依存してアドレナリン、ノルアドレナリンなどのモノアミン性のホルモンが顆粒内に蓄積されることが報告されている(30)。

V-ATPaseはF-ATPaseやP-ATPaseとは阻害剤に対する感受性が異なることから、その存在が明らかにされた。すなわち、V-ATPaseはN-ethylmaleimide(31、32、33)やNO_3^-(34, 35)で阻害されるのに対してF-ATPaseはOligomycin(36)およびN_3^-で(1)、P-ATPaseはバナジン酸によって(7、8)、それぞれ特異的に阻害されることが知られている。V-ATPaseはN_3^-およびバナジン酸では阻害されないので3種のH^+-ATPaseは阻害剤の感受性によって区別することが可能である(表1.1)。また、Bafilomycin(37)がV-ATPaseを特異的に阻害すること(38)が報告されているがその阻害機構の詳細は不明である。V-、F-、P-、の3種のATPaseともにDicyclohexylcarbodiimide(DCCD)が酵素の膜内在性の部分に結合し、酵素活性を阻害する。これらの阻害剤に対する性状を一つの指標にして、今まで検討されていない細胞や組織のV-ATPaseを同定することが可能である(表1.1)(26、28、29、39、40、41)。

図1.2　シナプスとシナプス小胞における神経伝達物質の輸送機構

シナプスにおけるシナプス小胞による神経伝達物質(Neurotransmitter)の輸送機構を模式的に示した。V-ATPaseと神経伝達物質輸送担体を示した。精製したシナプス小胞において、グルタミン酸、セロトニン、γ-アミノ酪酸などの神経伝達物質はV-ATPaseがATPを分解してH^+を輸送した結果、形成される電気化学的ポテンシャル差に依存して、シナプス小胞内に輸送されることが示されている(26、27、28、29)。V-ATPaseの阻害剤Bafilmoycinを加えると神経伝達物質の輸送は阻害される。



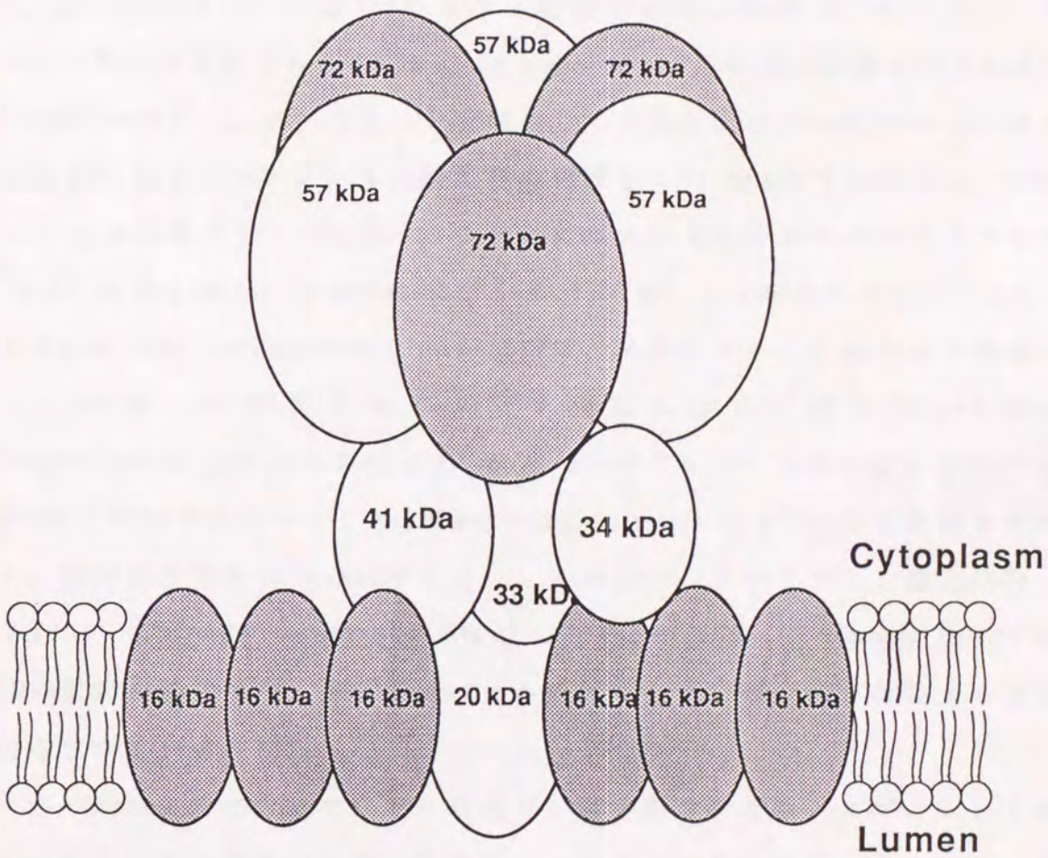
1.2 V-ATPaseの構造と酵素化学的性状

V-ATPaseは酵母・液胞、ウシ・副腎クロマフィン顆粒やウシ・脳クラスリン被覆小胞などから精製されている(35、42、43)。V-ATPaseは膜内在性部分と表在性部分から構成されている(図1.3)(16、17、18)。 Neurospora crassaの液胞膜を電子顕微鏡で観察すると、亜ミトコンドリア粒子(Submitochondrial particle)においてF-ATPaseの膜表在性部分F_1が観察されるのと同様に、V-ATPaseの膜表在性部分を膜から突出した、大きさも極めてF_1と似た部分として見ることができる(44)。 膜表在性部分は、72 kDa、57 kDa、41 kDa、34 kDa、33 kDaの5種のサブユニットの複合体でその量比は3:3:1:1:1と推定されている (18、45)。また、本酵素は低温感受性(Cold sensitive)で、Mg·ATPの存在下で0.1 M $NaNO_3$や0.3 M NaClを含む溶液中で、0 °Cにすると膜表在性部分が複合体として解離する(34)。このようにして得られたV-ATPaseの膜表在性部分はF-ATPaseの膜表在性部分F_1とは異なりATPase活性を持たない。72 kDaサブユニットにはATP結合部位が存在することが示唆されており(33、46)、57 kDaサブユニットとともに触媒部位を形成していると考えられている。このサブユニットにN-ethylmaleimide(NEM)が結合すると酵素活性が阻害され、ATPを加えるとV-ATPaseはNEMによる阻害から保護される (31、32、33)。

膜内在性部分は115 kDa、39 kDa、20 kDa、16 kDaの4種のサブユニットから構成されており、H^+通路として、また膜表在性部分の結合部位として機能している。その量比は1:1:1:5-6(18、45)であると推定されている。16 kDaサブユニットは疎水性が高くProteolipidと呼ばれている。このサブユニットにDCCDが結合すると酵素活性が阻害され、H^+通路を形成していると考えられている(47)。115 kDa、39 kDa、20 kDaサブユニットは機能は明らかに

図1.3　V-ATPaseの構造

V-ATPaseの構造を模式的に示した。膜表在性部分は72 kDa、57 kDa、41 kDa、34 kDa、33 kDaサブユニットから構成されている。その量比は3:3:1:1:1 であることが推定されている(18、45)。膜内在性部分は115 kDa、39 kDa, 20 kDa、16 kDaサブユニットから構成され、その量比は1:1:1:5-6 と考えられている(18、45)。 72 kDと57 kDaサブユニットはF-ATPaseの β 、α サブユニットとその一次構造が類似し、触媒部位を形成すると考えられている。膜内在性部分の16 kDaサブユニットはH^+輸送路を形成していると考えられており、DCCDが結合して酵素活性を阻害する。115 kDa、39 kDaサブユニットはアクセサリーサブユニットと考えられているがその機能は明らかでない(18)。また、この2種のサブユニットを持たないV-ATPaseも存在することから、この図では省略した(18)。



なっていない(18)。

このように見てくるとV-ATPaseはF-ATPaseと酵素化学的にきわめて類似していることがわかる。すなわち、F-ATPaseも低温感受性であり、膜表在性部分を膜内在性部分から解離させることができる。F-ATPaseの膜表在性部分F_1も5種のサブユニットからなり、その量比も3:3:1:1:1 である。ニンジン(48)、酵母(49)、N. crassa(50)のV-ATPaseの72 kDaサブユニットおよび酵母(51)、N. crassa(52)、ウシ脳・クラスリン被覆小胞(53)の57 kDaサブユニットのcDNAが配列が決定され、72 kDa、57 kDaサブユニットの一次構造がそれぞれ、F-ATPaseのβ、αサブユニットと類似していることが示されている。保存的な置換を考慮した推定アミノ酸配列の相同性は72 kDaサブユニットとβサブユニットの間で24 - 28 %、57 kDaサブユニットとαサブユニットで、18 - 23 %である。また、F-ATPaseのβ、αサブユニットをはじめp21 rasタンパク質(54、55)、Adenylate kinase(56)などヌクレオチドを結合する酵素の多くに共通して存在するグリシン残基に富んだ配列(Glycine-rich sequence)(2) G-X-X-X-X-G-K-T/Sが72 kDaサブユニットにもG-A-F-G-C-G-K-Sの形で保存されており、F-ATPaseではG-G-A-G-V-G-K-Tの形で保存されている。膜内在性部分の16 kDaサブユニットは ウシ・クロマフィン顆粒(57)、酵母(58)、Torpedo marmorata electric lobes (59)、Drosophila(60)からcDNA配列が決定され、F-ATPaseのcサブユニットと類似性が存在することが指摘されている。(57)

V-ATPaseとF-ATPaseではその機能や、阻害剤の感受性、サブユニットの構造が異なるが膜表在性と内在性部分から構成されることなど、上に述べたように両者で類似している点が多い。したがって、二つのATPaseの反応機構は類似しているのではないかと考えることは不自然ではないだろう。しかし、V-ATPaseについての反応機構はほとんど検討されていない。特に、動物由来

のものについては、精製酵素を用いた反応機構の解析は全く報告されていない。

これまでに、ウシ・クロマフィン顆粒(18、61、62)、ウシ・クラスリン被覆小胞(17)、酵母液胞(15)のV-ATPaseでは、ATPの他にGTPやITPを基質にできることや、数100μMのKm値を1個以上持つことが報告されている。F-ATPaseには基質ATPに対して高親和性の触媒部位が1個、低親和性の部位が2個、合計3個の触媒部位が存在し、これらの部位が協同して触媒反応を行うことが知られている(63、64、65)。ウシ・クロマフィン顆粒やウシ・クラスリン被覆小胞のV-ATPaseでは活性部位が存在すると考えられている膜表在性部分は72 kDaおよび57 kDaサブユニットがそれぞれ3分子づつ存在している(18、45)ことから、触媒部位が3ヶ所存在し、これらの部位間で協同的な触媒反応を行っていることが推定できる。しかし、実際にV-ATPaseがF-ATPaseのような複数の触媒部位による協同的な触媒反応を行っている示す結果は不明である。

V-ATPaseでは電気化学的ポテンシャル差によってATP分解活性が影響を受けないことから、ATP分解とH^+輸送はF-ATPaseと比べてtightに共役していないことが示唆されている(66)。このことは、V-とF-ATPaseの膜表在性部分と内在性部分の相互作用が異なることを示している。しかし、F-ATPaseで示されているような膜表在性部分と内在性部分のATP分解反応とH^+輸送の共役機構に関する知見はV-ATPaseでは得られていない。したがって、V-ATPaseとの反応機構を明らかにし、F-ATPaseと比較することによって二つのATPaseの反応機構を統一的に理解することができるだろう。

1.3 本研究の目的

本研究では、V-ATPaseの触媒反応の解析し、複数の触媒部位による協同的な触媒反応を行うことが知られているF-ATPaseの反応機構と比較した。材料は、ウシ・副腎髄質のクロマフィン顆粒から精製したV-ATPaseを用いた。クロマフィン顆粒は比較的短時間に大量かつ高純度のV-ATPaseの精製法が確立している唯一の材料である。V-およびF-の2種のH^+-ATPaseの定常状態および非定常状態での触媒反応を解析し、(1)ヌクレオチド結合部位が何個存在するのか、また、それらの結合部位の性状を検討し、(2)複数の触媒部位が存在するか、(3) 高親和性の触媒部位が存在するのか、(4) 触媒部位間の協同的な触媒反応を行われるのか、 (5)膜表在性部分と内在性部分の共役機構はどのようになっているのかの五つの問題点を中心にV-ATPaseの性状をF-ATPaseと比較検討した。さらに、特異的阻害剤Bafilomycinの阻害機構も合わせて、詳しく検討した。

次に小脳のV-ATPaseのサブユニットの一次構造を明らかにした。シナプス小胞には大量にV-ATPaseが存在し、神経伝達物質の小胞内への輸送、蓄積に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、その構造は知られておらず、リソゾーム、クロマフィン顆粒などの他の細胞内膜系に存在するV-ATPaseと同一なのかあるいは異なるのか興味深い。また、V-ATPaseの反応機構や、H^+輸送機構を解析する上で、触媒部位を構成することが考えられている72 kDaサブユニットと、H^+輸送路を形成すると考えられている16 kDaサブユニットの一次構造の情報は重要である。本研究では遺伝学的な手法が進んでおり、将来の研究を発展させることができるマウスを用い、その小脳由来cDNAライブラリーから16 kDaおよび72 kDaサブユニットのcDNAクローンを単離し、構造を決定した。

第2章　V-ATPaseの反応機構

2.1　緒言

V-ATPaseはF-ATPaseやP-ATPaseに比べて、酵素化学的な解析が進んでいない。特に、動物細胞由来の酵素はその精製法が確立されていなかったことから、粗膜画分を用いた研究がほとんどであり、例えば、数100 μMのKmを1個持つ(61、62)こと以外、その構造や反応機構はほとんど検討されていない。近年、ウシ・クロマフィン顆粒から(42)、またほぼ同じ頃に酵母液胞(35)やウシ・脳・クラスリン被覆小胞(Clathrin coated vesicles)(43)からV-ATPaseが精製され、その性状の解析がすこしづつ進んでいる。[α-^{32}P]ATPによる光標識実験からクロマフィン顆粒のV-ATPaseの72 kDaサブユニットには高親和性のATP結合部位が存在することが示唆された(33)。また、酵母のV-ATPaseの反応速度論的な解析から高親和性の触媒部位が存在することが示唆されている(46、67)。しかし、V-ATPaseに関して、複数のATP結合部位や触媒部位が存在するのか、協同的な触媒反応を行うのかどうかは知られていない。

V-ATPaseの各サブユニットの構造は次々に明らかにされており、今までにニンジン(48)、酵母(49)、N. crassa (50)、Sulforobus acidocaldarius (68)、Mehtanosarcina barkeri(69)のV-ATPaseの72 kDaサブユニットの一次構造が決定されている。これらの72 kDaサブユニットにはF-ATPaseのβおよびαサブユニット(1、2)、p21 rasタンパク質(54、55)、Adenylate kinase(56)などのヌクレオチドを結合する多くの酵素に共通して存在するGlycine-rich sequece (2)、G-A-F-G-C-G-K-Tが1ヶ所保存されている(図2.1

図2.1　V-ATPaseの72 kDaサブユニットおよびF-ATPase βサブユニットに存在するglycine rich sequences付近のアミノ酸配列

(Dc)ニンジン(48)、(Sc)酵母(49)、(Nc) N. crassa (50)の72 kDaサブユニットと、(Mb) M. barkeri (69)、(Sa) S. acidocaldarius (68)のATP合成酵素のLarge subunit、大腸菌F-ATPaseのβサブユニット(4)のアミノ酸配列を列べて比較した。保存性の高い領域(A、B)を四角で囲った。領域AはGlycine-rich sequence (G-X-X-X-X-G-K-T/S)とよばれ、ヌクレオチドを結合する酵素の多くに保存されている(2)。領域BはV-ATPaseでは全ての生物種で保存されており、G-E-R配列はF-ATPaseのβサブユニットでも保存されている。左にアミノ酸の残基番号を示した。

```
                                A                                  B
Dc      243  VLGGTCAIPGAFGCGKTCISQALSKYSNSD    TVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPELTMT
Sc      245  VLGGTTCIPGAFGCGKTCISQSLSKYSNSD    AIIYVGCGERGNEMAEVLMEFPELYTE
Nc      237  VQGGTVAIPGAFGCGKTCISQSVSKFSNSD    VIVYVGCGERGNEMAEVLKEFPELSIE
Mb      219  AKGGTAAIPGPFGSGKTCTQQSLAKWSDTE    IVVYIGCGERGNEMADVLSEFPEL--E
Sa      224  AKGGTAAIPGPFGSGKTCTLQSLAKWSAAK    VVIYVGCGERGNEMTDELRSFPKLKDP
Ec β    140  AKGGKVGLFGGAGVGKTVNMMELIRNIAIEHSGYSVFAGVGERTREGNDFYHEM---TDS
```

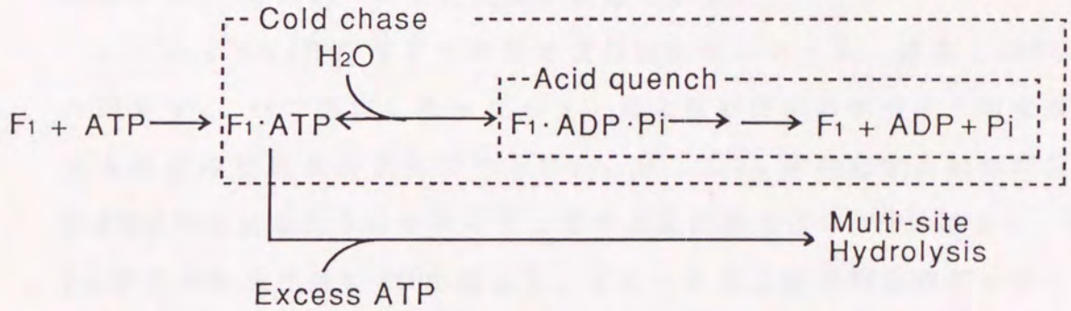
領域A)。 また、このGlycine-rich sequenceからカルボキシル末端側にはV-ATPaseの 72 kDaサブユニット間で完全に保存されている領域、G-C-G-G-E-R-G-N-E-M配列が存在し、F-ATPaseのβサブユニットと対応する位置に部分配列であるG-E-Rが保存されている。(図2.1 領域B) 大腸菌のF-ATPaseのβサブユニットでは系統的な変異の導入によってGlycine-rich sequenceが触媒部位を形成していることが示唆されている(70、71、72)。したがって、72 kDaサブユニットのGlycine-rich sequenceも同様の機能を持つことが考えられる。 57 kDaサブユニットはF-ATPaseのαサブユニットと相同性が存在することから、72 kDaサブユニットとともに触媒部位を形成していると考えられている。しかし、57 kDaサブユニットにはGlycine-rich sequenceは保存されていない。V-ATPaseには72 kDaサブユニットと57 kDaが3分子ずつ存在することから、1分子のV-ATPaseには3ヶ所のヌクレオチド結合部位が存在することが考えられている。しかし、実際の結合部位の個数あるいはその性状は知られていない。

一方、F-ATPaseには、6ヶ所のヌクレオチド結合部位が存在することが知られている。これは、α、βサブユニットを合わせると合計6個のGlycine-rich sequenceが存在することとよく一致する。それらのヌクレオチド結合部位のうち、3ヶ所は、1 - 2 mMのMg·ATP存在下で定常状態反応を行うと反応液中のヌクレオチドと交換することから、触媒部位であることが示されている。触媒部位はβサブユニットあるいは、αとβサブユニットの境界付近に存在することが示唆されており、速度論的にはATPの解離定数が10^{-9} Mである高親和性部位と、数10 μMおよび数100μ MのKm値で検出できる2ヶ所の低親和性部位に分けられる (64、65)。非触媒部位に結合している3分子のヌクレオチドは定常状態反応を行っても溶液のヌクレオチドとは交換しない(73、74、75、76)。これらのヌクレオチドは酵素の安定性に関与することが

示唆されているが(1)、触媒反応に果たす役割について明らかになっていない。

F-ATPaseの反応機構は3ヶ所存在する触媒部位が協同的な反応を行うことや高親和性の触媒部位の反応機構が、精製した膜表在性部分F_1を用いて詳細に解析されている(64、65)。また、F_oF_1複合体でも同様の反応機構が示されている(77)。ここにはF_1の反応機構を2.1式に示した。

(2.1 式)



1分子のATPがF_1の高親和性の触媒部位に結合して分解する非定常状態でのATP分解反応(Uni-site反応)を解析すると、ATPはF_1と複合体を形成し、解離はほとんど起きない。触媒部位に結合したATPのADPと無機リン酸(Pi)に分解されるときの平衡定数は1 - 2であり、この反応における自由エネルギーの変化は非常に小さいことが推定されている。ADPあるいはPiのどちらが先に酵素から遊離するのかは明らかになっていないが、両者の解離速度は非常に遅い。この状態で過塩素酸を加えて反応を停止し遊離したPiを測定する実験をAcid quenchとよび、F_1に結合しているがADPとPiに分解されているATPおよび遊離したADPとPi、すなわち、ATPの総分解量が測定できる。先に述べた

ようにATPとF_1の複合体に過剰のATPを加えて、他の2ヶ所の触媒部位にATPが結合する条件(Multi-site反応)にすると高親和性部位に結合していたATPの分解は10^4 - 10^5倍に促進される。後から加えたATPが高親和性部位に結合していたATPより先に分解されることがないことから反応経路はただ一つであることが示されている(63、78、79)。すなわち、[γ-^{32}P]ATPを用いたUni-site反応に過剰の非放射性ATPを加えるとF_1に結合した[γ-^{32}P]ATPは、ほぼ完全に分解される。この様な実験をCold chaseと呼んでいる。この実験によってUni-site条件でF_1に結合しているATP、ADP+Pi、および遊離したADPとPiを含め、ATPのF_1への総結合量が測定できる。

1 - 2 μMのATP存在下での定常状態反応においても、酵素とATPの複合体の段階で、^{18}Oで標識したγ位のリン酸と反応液中の水分子との交換反応からも同様の結果が示されている(63)。従って3ヶ所存在する触媒部位が独立にATP分解反応を行うのではなく、まず高親和性部位にATPが結合し、2ヶ所、3ヶ所目の触媒部位にATPが結合し、それらの部位間の相互作用によって正の協同性を持つ反応を行うとが考えられている(63、64、65)。

V-ATPaseはその構造がF-ATPaseに類似していることから、反応機構も類似していると考えられている。酵母のV-ATPaseにおいては高親和性のATP結合部位が存在することと、F-ATPaseのUni-site反応に類似した反応を行うことだけから、複数の触媒部位が協同的な反応を行なっていることを結論している(46)。 しかし、酵母のV-ATPaseのヌクレオチド結合部位の個数やその性状は不明である。また、定常状態の反応において複数のKmが存在することを確かめていないことから、V-ATPaseがF-ATPaseのようにMulti-site反応においてATPase活性が他の触媒部位に結合するATPによって促進されているのかどうか不明である。従って現在までの実験結果から酵母のV-ATPaseが複数の触媒部位を持ち協同的な反応を行っていると結論することには無理があると

考えられる。

動物のV-ATPaseにおいては数100 μMのKm値が1ヶ所存在すること(61、62)以外は何も明かになっていない。本章では、クロマフィン顆粒から精製したV-ATPaseと大腸菌から精製したF-ATPaseのヌクレオチド結合部位と性状を解析し、その触媒反応に与える影響を検討した。また、V-ATPaseの速度論的な解析を行い、複数の触媒部位存在し、それらが正の協同性を持つ触媒反応を行うかどうかを検討した。

2.2 材料および方法

ウシ・クロマフィン顆粒のV-ATPaseはATPを含まない緩衝液を用いて常法に従って調製し、約2 units/mgの標品を得た(42)。緩衝液(10 mM MES-Tricine pH 7.0、5 mM チオグリセロール)に懸濁したウシ・クロマフィン顆粒膜を1 %のPolyoxy-ethylene 9-laurylether で可溶化した。250,000 x gで遠心した上清をハイドロキシアパタイトカラムを用いてクロマトグラフィーを行った。素通り画分を集め、コール酸を終濃度 2 %になるように加えた後、10 %飽和になるように固形硫安を加え攪拌した。懸濁液を250,000 x gで遠心して表面の白濁した層を回収し、10 mM MES-Tricine pH 7.0、5 mM モノチオグリセロール、1 % Polyoxyethylene 9-laurylether を含む10 - 30 %グリセロールの不連続密度勾配溶液に重層し、450,000 x gで4時間、遠心した。ATPase活性を持つ画分を回収して、-70 ˚Cに保存した。

大腸菌 F_1 は KY7485株 [asn31, thi, rif/λ asn-5(cI857S7、bglR、asn、unc)/λ cI857S7] (80)から常法に従って精製し(81)、比活性が120 units/mg以上の標品をATPを含む緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0、 1.0 mM ATP、

0.5 mM EDTA、1 mM DTT、10 % Glycerol)中で-80 °Cで保存したものを用いた。

結合ヌクレオチドの数が異なるF-ATPaseの触媒部分F_1は、酵素溶液をMg^{2+}を含む緩衝液であるTMP溶液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 mM $MgSO_4$、1 mM KH_2PO_4)とEDTAを含む緩衝液であるTEP溶液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 mM EDTA、1 mM KH_2PO_4)のそれぞれでで平衡化した遠心カラム(Sephadex G-50、fine、0.5 x 5.5 cm)を通し調製した(82、83)。

V-ATPaseの活性は、ATP濃度を酵素濃度の100倍以上に設定して定常状態に近似し、測定した。実際には、4 - 12μg タンパク質/ml (5.3 - 16 nM)の酵素と1 μM - 1 mM [γ-^{32}P]ATPを含む反応溶液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、50 mM NaCl、0.1 mg/ml BSA)中で37 °Cで測定した。遊離したPiはモリブデン酸との複合体として沈殿させ、0.2 N NaOHに溶解後、固相シンチレーター、Ready Cap (Beckmann)に吸収させて放射活性を測定した(84)。

V-ATPaseのUni-site活性は100 μMのV-ATPaseと50 μMの[γ-^{32}P]ATPを0.5 M $MgCl_2$、1 mM KH_2PO_4を含む緩衝液50 mM Tris-MOPS pH 7.0中で室温(25 - 27 °C)で反応させた後、0.3 N 過塩素酸、5 mM ATP、1 mM KH_2PO_4を加えて反応を停止した (Acid quench)。V-ATPaseに結合したATPの結合はHexokinaseによってGlucose-6-phosphateに変換できないATP量として測定した(85)。ATPとF_1を混合して一定時間の後に反応溶液に16.7 mM Glucose、67 units/mlのHexokinaseを加え10 秒間反応させて、酵素に結合していない[γ-^{32}P]ATPをGlucose-6-phosphateに変換した。2 N 過塩素酸を加え反応を停止し、95 °Cで10 分間熱処理した。遊離したPiはモリブデン酸アンモニウムとの複合体として沈殿させ、上清(Hexokinase inaccesible ATP)を回収し、固相シンチレーター、Ready Cap (Beckmann)に吸収させ放射活性を測定した。

また、ATPとF_1を混合して一定時間後に、5 mM ATP、1 mM KH_2PO_4を加えて

1分間、さらに保温した後、0.3 N 過塩素酸で反応を停止させて遊離のPiを測定した(Cold chase)。遊離のPiはモリブデン酸アンモニウムと複合体を形成させ沈殿に回収し、0.2 N NaOHに溶解し、中和した後に固相シンチレーター Ready Cap (Beckmann)に吸収させ放射活性を測定した。

F-ATPaseの膜表在性部分F_1のUni-site活性は0.5 μMのF_1と0.25 μMの[γ-^{32}P]ATPを反応液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 M $MgSO_4$、1 mM KH_2PO_4)中で室温(25 - 27 °C)で測定した。一定時間後にV-ATPaseと同様の条件で反応を停止させ、Acid quenchとCold chaseの実験を行った(64、65、86)。

V-ATPaseの結合アデニンヌクレオチドは、酵素溶液を70 °C、10分間、熱処理した後、氷上に5分間放置し、14,000 x gで10分間遠心して、タンパク質を除去した後定量した。ATP量は上清を等量のLuciferinおよびLuciferase混合液(40 mM HEPES-NaOH pH 7.75、1.6 μg Luciferase、0.7 mM D-Luciferin、20 mM $MgCl_2$、4 mM EDTA、0.36 mM DTT、0.3 mM AMP)を加え、混合した後、15秒後から45秒後までの発光を積算して求めた。ADPとATPの総量は上のように得られた上清に 50 μg/ml Pyruvate kinase、7 mM Phosphoenolpyruvateを加えて37 °Cで20分放置してADPをATPに変換した後、同様にLuciferin-Luciferase混合液を加えて発光を測定することによる定量した。F-ATPaseの結合ヌクレオチドの測定には、遠心カラムを通した酵素溶液を70 °Cで10分間熱処理した後、氷上に5分間放置した。さらに、12,000 x gで遠心してタンパク質を除去した後、上清をHPLCを用いたイオンペアー・クロマトグラフィーにより分離し、259 nmの吸光度からAMP、ADP、ATP濃度を定量した。アデニンヌクレオチドの分子吸光係数は13,500である。クロマトグラフィーにはC18 カラム(MS Pack 0.46 x 15 cm)と溶出液(50 mM KH_2PO_4、0.6 mM Tetra-N-butyl-ammonium bromide、11 - 13 % Methanol、pH 6.4)を用い、流速 0.4 ml/minの条件で行った(83)。放射性のヌクレオチドは、

[α -^{32}P]ATPと酵素の混合溶液をTMP溶液あるいはTEP溶液で平衡化した遠心カラムに通したのち、固相シンチレーター、Ready Capを用いて放射活性を測定し、定量した。

タンパク質濃度はSchaffnerとWeissmannの方法(87)、Bradfordの方法(88)とSmithの方法(89)で、BSA (Pierce)を標準にして測定した。3種の定量法による差はほとんどなかった。[α -^{32}P]ATP、[γ -^{32}P]ATPは NEN/DuPont Research Productから、購入した。

反応速度論的な速度を計算する際の酵素濃度は、V-ATPase、F_1の分子量はそれぞれ750 kDa、380 kDaと仮定し、タンパク質濃度から計算した。

2.3 結果と考察

2.3.1 V-ATPaseおよびF-ATPaseのアデニンヌクレオチド結合部位

ウシ・クロマフィン顆粒のV-ATPaseはF-ATPaseと異なりATPを含まない溶液を用いて低温(4 °C)でも安定に精製することができる。V-ATPaseの最終比活性は1 mM MgATP存在下での定常状態では約 2 units/mgタンパク質であり、クロマフィン顆粒膜からの活性の回収率は約20 %だった(42)。このようにして精製したV-ATPaseには、ヌクレオチドがほとんど結合していなかった(0.1 mol/ mol V-ATPase)(表2.1)。この酵素溶液を0.5 mM $MgSO_4$、2 mM ATPと反応させTMP溶液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 mM $MgSO_4$、1 mM KH_2PO_4)で平衡化した遠心カラムに通して遊離のヌクレオチドを除去した。しかし、この条件でV-ATPaseに有意に結合したヌクレオチドは検出できな

表2.1　V-ATPaseとF-ATPaseのUni-site反応における、k_1(ATPの結合定数)とATPの分解速度(Initial rate)

V-ATPaseはATPを含まない溶液で調製した。ATPを含む緩衝液中で保存したF_1をTMP溶液あるいはTEP溶液で平衡化した遠心カラム(cc)を通し、結合ヌクレオチドの分子数を変化させた。(x2)はカラムを2回通したことを表す。V-ATPaseのk_1は酵素と[γ-^{32}P]ATPを混合して反応させた後、Hexokinaseを用いてGlucose-6-phosphateに変換されないATP量から計算した。F_1のk_1は酵素と[γ-^{32}P]ATPを混合して反応させた後5 mMの過剰のATPを加えた後、過塩素酸を加えて反応を停止させたときのPiの遊離量から計算した(Cold chase)。ATP分解の初速度(Inital rate)は酵素と[γ-^{32}P]ATPを混合して反応させて過塩素酸を加えて反応を停止させたときのPiの遊離量をプロットし直線性の保たれる範囲での初速度を目測で見積もった(図2.5)。

Enzyme	Bound nucleotides	k_1 (x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$)	Initial rate (x 10^{-2} s^{-1})
V-ATPase	< 0.1 ADP+ATP	81	4.0
F_1→cc(TMP)	4.9 ADP	4.2	0.99
F_1→cc(TEP)x2→cc(TMP)	2.1 ADP	8.3	3.0

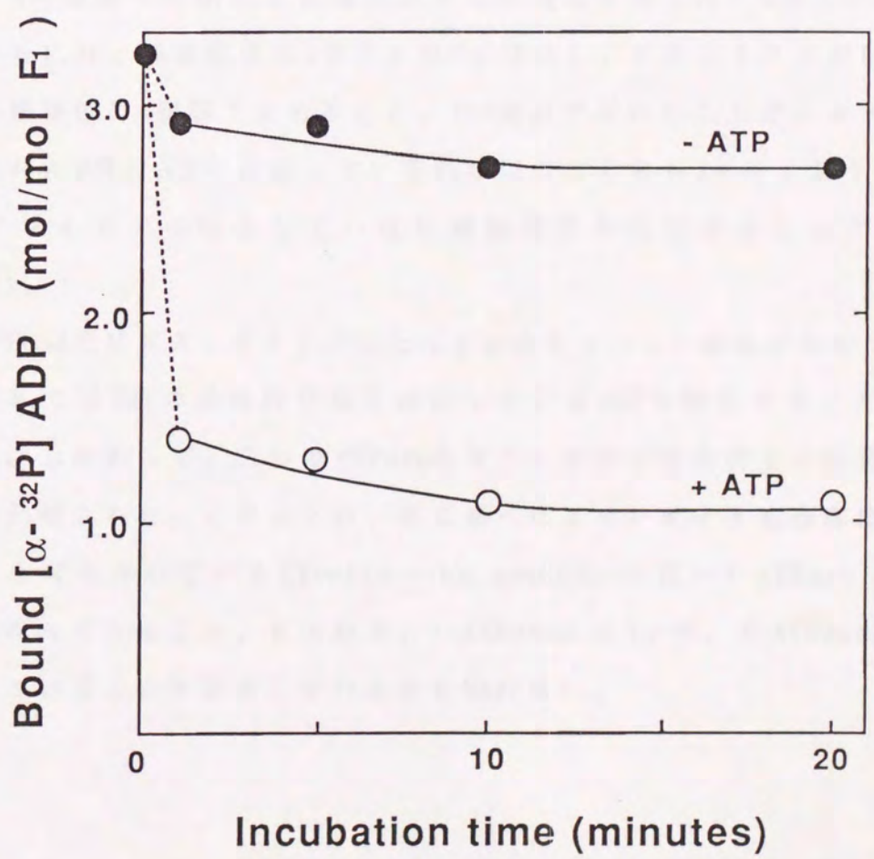
かった。

これに対して、ATPを含む緩衝液中で保存したF_1を、TMP溶液で平衡化した遠心カラムを通すと5分子のADPが結合していた。ヌクレオチドが結合していなかったV-ATPaseと比較するために、F_1に結合しているヌクレオチドの分子数を減少させることを試みた。TMP溶液で平衡化した遠心カラムに数回通してもF_1に結合したADPの量はほとんど減少しなかった。同様の酵素溶液をEDTAを含むTEP溶液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 mM EDTA、1 mM KH_2PO_4)で平衡化した遠心カラムに2回通したときは、F_1にはADPとATPが1分子ずつ結合していた。さらに、TMP溶液で平衡化した遠心カラムに通すと、結合していたATPが分解し2分子のADPが結合しているF_1が得られた。これ以上、結合ADPの量を減少させることはできなかった(表2.1)。

V-ATPaseと異なり、F_1から結合ADPを除去することはできなかった。V-およびF-の二種のATPaseの反応機構を比較検討する際に結合ヌクレオチドの個数の差が反応機構に影響を与えることが考えられる。そこで、F_1のヌクレオチド結合部位の性状を解析した。TEP溶液で平衡化して得られた2分子のADPが結合しているF_1と[α-^{32}P]ATPを用いてMulti-site反応を行った。反応後TMPで平衡化した遠心カラムを通したF_1には3分子の[α-^{32}P]ADPと2分子の非放射性のADPが結合していた。さらに、このF_1を2 mM ATP、0.5 mM $MgSO_4$と反応させMulti-site反応を行わせた後、TMP溶液で平衡化した遠心カラムを通すと、[α-^{32}P]ADPの結合量は速やかに減少した(1 mol/mol F_1)(図2.1 -ATP)。一方、ATPが存在しないときは、[α-^{32}P]ADPの結合量(3 mol/mol F_1)はほとんど減少しなかった。(図2.1 +ATP) この結果から、2分子のADPが結合したF_1に新たに結合した3分子の[α-^{32}P]ADPのうち、1分子は触媒反応に関与しない非触媒部位に結合しており、また、Multi-site反応を行わせることによって外液の非放射性のヌクレオチドと置き変わった2分子のヌク

図2.2　Muti-site反応中に外液ヌクレオチドと交換する、F_1に結合したADP

2分子のATPが結合したF_1に2 mM [α-^{32}P]ATPをを加え反応させた後、TMPで平衡化した遠心カラムに通すと2分子のADPと3分子の[α-^{32}P]ADPが結合しているF_1が得られた。このF_1をATPを含まない緩衝液(50 mM Tris-SO_4、0.5 mM $MgSO_4$)(-ATP)とATPを含む緩衝液(50 mM Tris-SO_4、0.5 mM $MgSO_4$、2 mM ATP)(+ATP)中で反応させ、横軸に示した時間にTMP溶液で平衡化した遠心カラムに通した酵素に結合している[α-^{32}P]ADPを測定した。ATPを含まない緩衝液中に放置したF_1は結合ヌクレオチドの量はほとんど変化せず、3分子の[α-^{32}P]ADPと2分子のADPが結合していた。ATPを含む緩衝液で反応させた後にTMP溶液で平衡化した遠心カラムを通した酵素の結合ヌクレオチドは減少し、2分子の[α-^{32}P]ADPが交換し、1分子の[α-^{32}P]ADPと4分子のADPが結合していた。



レオチドは触媒部位に結合していたことが示唆された。

Multi-site反応で交換しなかった、1個の[α-^{32}P]ADPはTEP溶液で平衡化した遠心カラムを2回通すことで除去され、2分子の非放射性ADPが結合したF_1が得られた。この結果から、この部位は、ミトコンドリアF_1で示されている、EDTA存在下でヌクレオチドが解離する非触媒部位(90)と良く似た部位であることがわかった。また、ミトコンドリアF_1では50 % glycerolを含む緩衝液でゲルろ過を行うと全くヌクレオチドが全く結合していない酵素が調製できるが(91)、同様の操作を大腸菌F_1で行っても2分子のADPが結合していた。この結果は、Issartelらが大腸菌のF_1で報告していることと一致した(表2.2)(92)。

2分子のADPが結合したF_1に過剰のMg·ATPを加えてMulti-site反応を行わせた後、TMP溶液で平衡化した遠心カラムに通して得られた5分子のADPが結合しているF_1は、触媒部位に2分子のADPが結合し、ヌクレトチドが結合していない触媒部位は1個以下であること、TEP溶液で平衡化した遠心カラムを通して得られた2個のADPが結合しているF_1には少なくとも2ヶ所、おそらく3ヶ所のヌクレオチドの結合していない触媒部位が存在することが示された(表2.2)。

V-ATPaseではヌクレオチドがほとんど結合していない酵素が調製できたが、大腸菌F_1では2個の非触媒部位に結合しているADPを除去することができなかった。したがって、二つのATPaseのヌクレオチド結合部位の性質は異なることが示唆された。このことは、既に述べたヌクレオチド結合部位を形成していると考えられているGlycine-rich sequenceの数がV-ATPaseとF-ATPaseでは異なっていること、すなわち、V-ATPaseには3ヶ所、F-ATPaseには6ヶ所存在していることと関係しているかも知れない。

表2.2　結合ヌクレオチドの分子数の異なるF_1の調製

F_1をTMP溶液あるいはTEP溶液で平衡化した遠心カラムを通すと結合クレオチドの分子数が変化した。ccは遠心カラムを、括弧内は平衡化に用いた溶液を示している。(Mg·ATP)はF_1を緩衝液(50 mM Tris-SO_4 pH 8.0、0.5 mM $MgSO_4$、2 mM ATP)中で室温、5分間反応させたことを示している。

Preparation	Bound nucleotides (mol/mol F_1)		
	ADP	ATP	Total
F_1→cc(TMP)	4.9	0.0	4.9
F_1→cc(TEP)→cc(TEP)	1.2	0.9	2.1
F_1→cc(TEP)→cc(TEP)→cc(TMP)	2.3	0.0	2.3
F_1→cc(TEP)→cc(TEP)→cc(TMP) →Mg·ATP→cc(TMP)	2.3	0.0	2.3

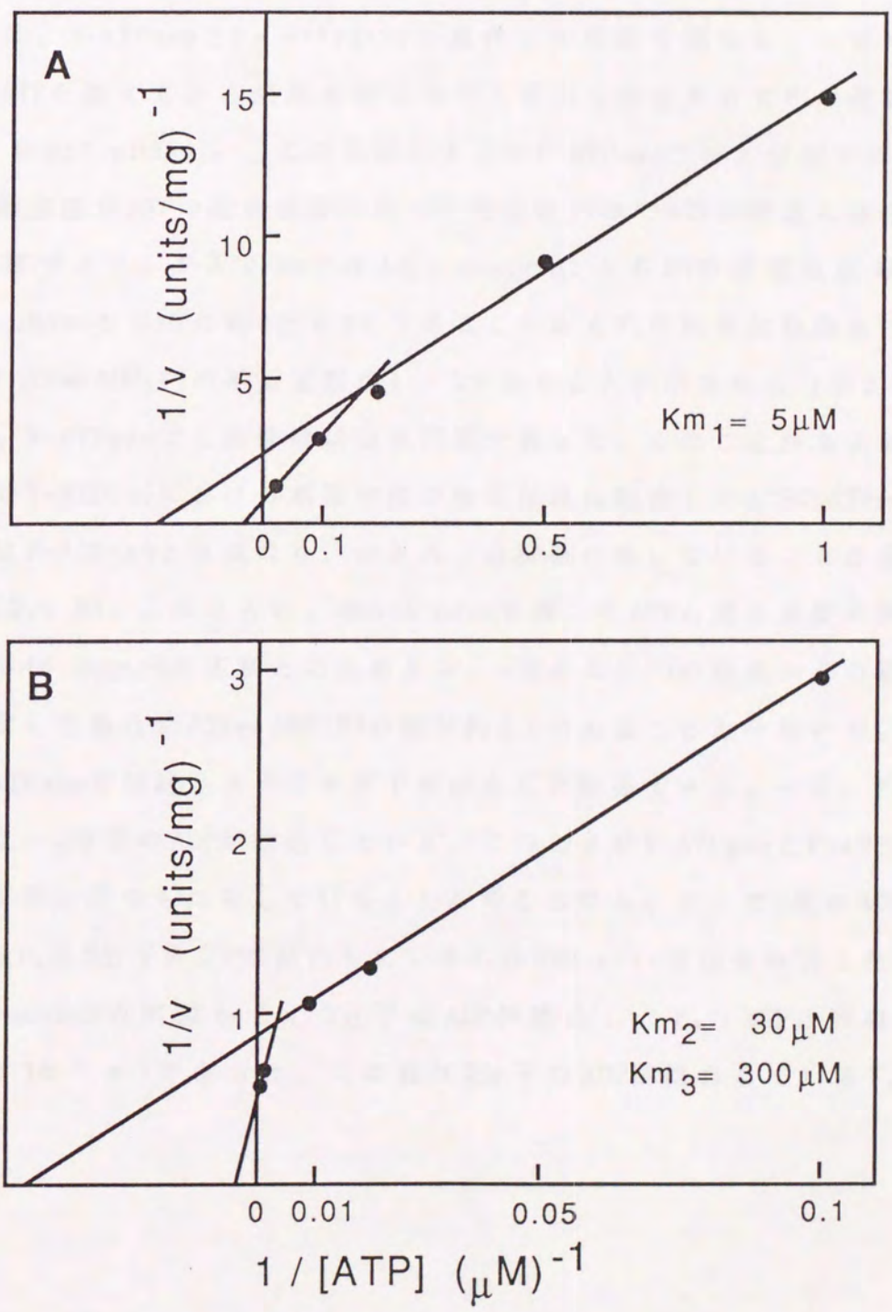
2.3.2　V-ATPaseとF-ATPaseの反応機構の比較

クロマフィン顆粒のV-ATPaseの定常状態におけるATP分解を解析した。Piの遊離量を時間に対してプロットし直線性が保たれる範囲でその初速度を計算した。これまで、クロマフィン顆粒のV-ATPaseのKm値は数100μMのものが1個存在することが示されていた(61、62)。しかし、この値は粗膜画分を用いて得られたもので、クロマフィン顆粒から精製した酵素を用いて詳細に検討すると、単純なMichaeris-Menten型の反応ではなく複数のKm値が存在した　(図2.3)。4回以上の測定を繰り返した結果、5 μM (Km_1)、30 μM (Km_2)、300 μM (Km_3)の3個の見かけのKm値が得られた。それぞれに対応するVmax値は、0.47、1.2、2.6 units/mgだった。Eadie-Hofsteeプロットを行ってもほぼ同様の結果が得られた。Km_1 (5 μM)の値は、高親和性のATP結合部位が存在することが示唆し、約10 μM[α-^{32}P]ATPによって72 kDaサブユニットが光標識されることを示し、高親和性部位の存在を示唆したMoiyama and Nelsonの実験結果と一致した(33)。クロマフィン顆粒のV-ATPaseに3個のKm値が存在することは複数の触媒部位が存在し、各部位間で協同して触媒反応を行っていることが示唆された。

F-ATPaseの高親和性の触媒部位はUni-site反応によって解析されている。上で示唆されたV-ATPaseの高親和性の触媒部位の性状を解析するために、V-ATPaseにおけるUni-site反応を解析して、F-ATPaseと比較した(図2.4)。0.1 μMのヌクレオチドがほとんど結合していないV-ATPaseに0.05 μM[γ-^{32}P]ATPを加えて分解反応を測定した。V-ATPaseと[γ-^{32}P]ATPを混合して一定時間反応させた後、HexokinaseとGlucoseを含む溶液を加えてGlucose-6-phosphateに変換されないATP量からV-ATPaseに結合したATPおよび分解されたATPの総量を測定した。加えたATPは60秒以内にほとんどすべて酵素に結

図2.3　ウシ・クロマフィン顆粒 V-ATPaseのATP分解速度のATP濃度依存性

ATP濃度とATP分解速度の逆数から、KmおよびVmaxを求めた。(A)は1 - 100 μM ATP、(B)は100 μM - 1 mM ATPの濃度範囲で、プロットした。反応は、4 - 12 μg/ml (5.3 - 16 nM)のウシ・クロマフィン顆粒 V-ATPaseを用い、1 μMから1 mM ATPを含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、5 mM $MgCl_2$、50 mM NaCl、0.1 mg/ml BSA)中で37 ˚Cで行った。



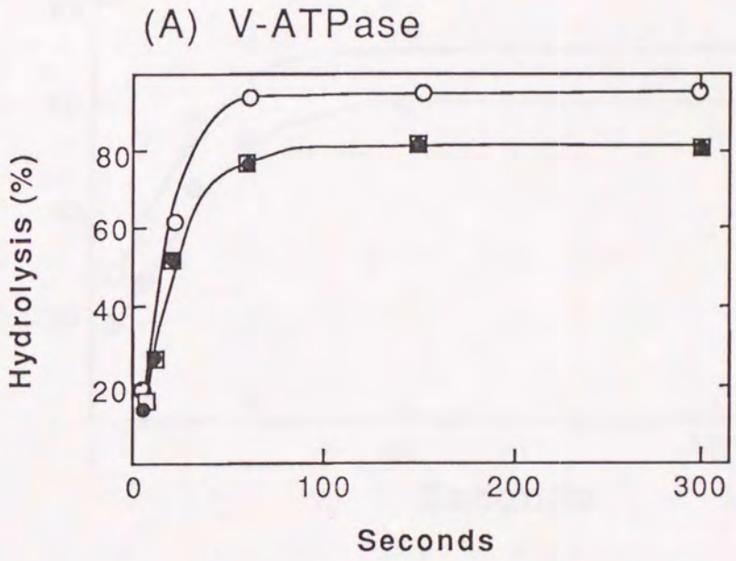
合した。その結合速度はADPおよびPiの遊離速度がATPの結合速度より充分遅いと仮定したとき、8.1 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$だった(図2.4、表2.2)。このことはV-ATPaseがF-ATPaseと同様に高親和性の触媒部位を持つことを示唆する。V-ATPaseと[γ -^{32}P]ATPを混合して反応させた後、過塩素酸を加えて反応を停止させてATPの分解量を測定した (Acid quench)。Acid quenchから得られたATPの分解速度は 4 x 10^{-2} s^{-1}だった(表2.1)。

次に、V-ATPaseと[γ -^{32}P]ATPを混合して反応を開始し、一定時間後に過剰のATPを加えてから過塩素酸を加えて反応を停止させてPiの遊離量を測定した (Cold chase)。 この実験によってF-ATPaseでは、分解されたADPとPiの遊離速度がATPの結合速度に比べて充分遅いのでATPが酵素に結合する速度が計算できる。F-ATPaseではAcid quenchによるPiの遊離速度および量はCold chaseのものの約3分の2のであることからF_1の高親和性部位に結合したATPのATP↔ADP·Piの平衡定数が1 - 2であることが示された (図2.4 A)。しかし、V-ATPaseでは両曲線はほぼ同様であった。このことからクロマフィン顆粒のV-ATPaseにおける高親和性の触媒部位に結合したATPのATP↔ADP·Piの平衡はF-ATPaseとは異なり、ほとんど分解側に傾いていることを示唆している(図2.4 B)。このことは、Hexokinaseを用いたATPの結合速度の測定した実験とAcid quenchの実験との比較から、ADPおよびPiの酵素からの遊離が遅いと仮定した場合にATP↔ADP·Piの比が約0.1であることと一致する。

V-ATPaseでは結合ヌクレオチドをほとんど除去できた。一方、F_1には除去できない2分子のADPが結合している。このことがV-ATPaseとF-ATPaseのUni-site反応に差をもたらしていることが考えられる。そこで2個のADPが結合しているF_1と5分子のADPが結合しているF_1のUni-site活性を検討した(図2.5)。Acid quenchの実験から、2分子のADPが結合したF_1のATP分解の初速度は3.0 x 10^{-2} s^{-1}であった。この値は5分子のADPが結合しているF_1の初速度

図 2.4　V-ATPaseとF_1のuni-site反応

(A)は0.1 μMのV-ATPaseと0.05 μMの[γ-^{32}P]ATPを緩衝液で、室温で反応させた。(●)横軸に示した時間に過塩素酸を加えて反応を停止したときのPiの遊離量を(Acid quench)、同様に、(○)HexokinaseとGglucoseを加えて遊離のATPをGlucose-6-phosphatePに変換し、酵素に結合したATPおよび分解されらATPの総量を計算した。(□)反応後、5 mMの過剰のATPを加えて1分間反応させてから過塩素酸を加えて、反応を停止させたときのPiの遊離量をプロットした(Cold chase)。用いたV-ATPaseの結合ヌクレオチドは0.1分子以下だった。(B)は0.25 μM [γ-^{32}P]ATPと0.5 μMのF_1を緩衝液(50 mM Tris-SO_4H、0.5 mM $MgSO_4$、1 mM KH_2PO_4、pH8.0)中で室温で反応させた。●はAcid quench、○はCold chaseの実験によって遊離したPiの量を示す。F_1はTEP溶液で平衡化した遠心カラムを2回、さらにTMP溶液で平衡化した遠心カラムに通し、2分子のADPが結合したものを用いた。



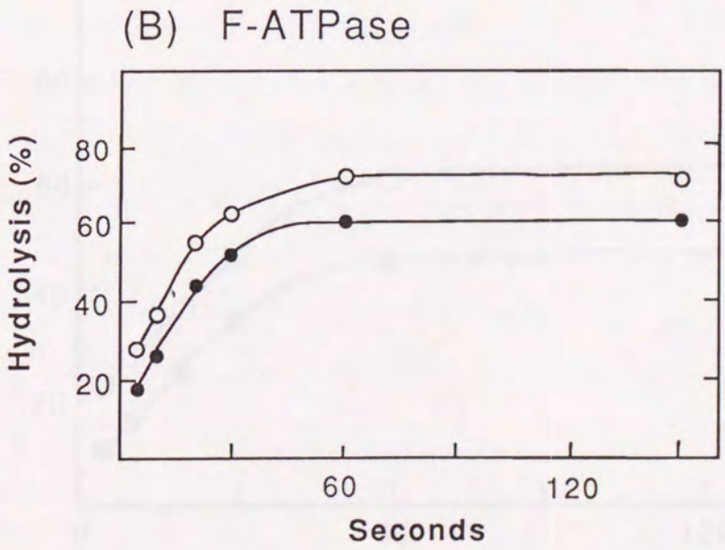
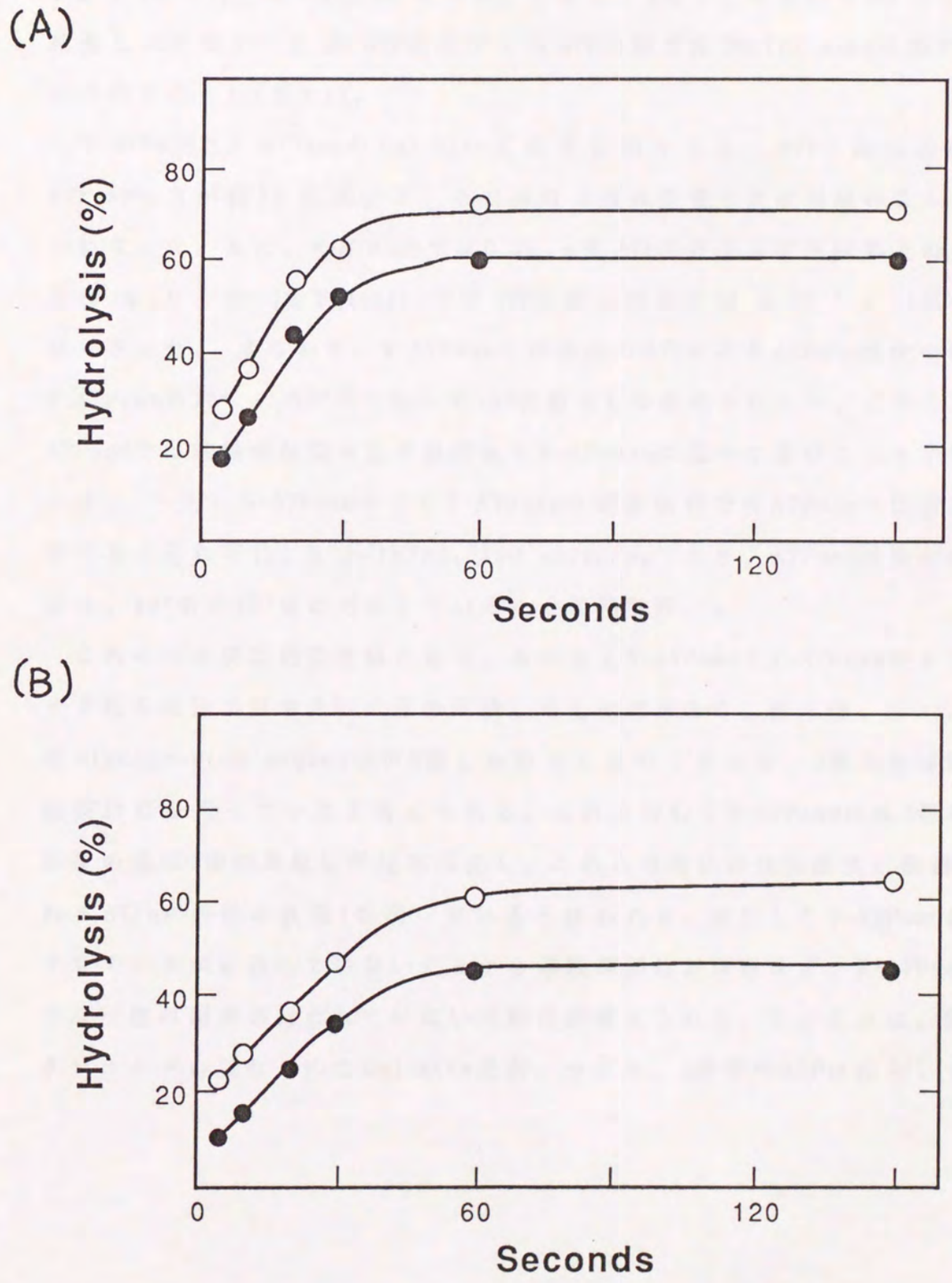


図2.5　2分子あるいは5分子のADPが結合したF_1のUni-site反応

(A)は2分子のADPが、(B)は5分子のADPが結合したF_1のUni-site反応を示した。(●)はAcid quenchの、(○)はCold chaseによって遊離したPiの量をプロットした。2分子のADPが結合したF_1のATPの結合速度k_1およびATP分解の初速度はそれぞれ、8.3 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$と3.0 x 10^{-2} s^{-1}だった。5分子のADPが結合したF_1では、4.2 x 10^4 M-1s-1と0.99 x 10^{-2} s^{-1}だった。



0.99 x 10^{-2} s^{-1}より3倍速かった。過剰量のATPを加えて結合したATPを全て分解してしまう(Cold chase)の実験からATP結合定数 k_1を測定した。2分子のADPが結合したF_1は8.3 x 10^{-4} $M^{-1}s^{-1}$で、5分子のADPが結合したF_1の4.2 x 10^{-4} M^{-1} s^{-1}の約2倍だった。しかし、2分子、あるいは5分子のADPが結合したF_1の1 - 2 mM ATP存在下でのATP分解活性(Multi-site反応)はほとんど同じだった(表2.1)。

V-ATPaseとF-ATPaseのUni-site反応を比較すると、ATPの結合速度はV-ATPaseの方が約10 倍速いが、その分解速度は両者でほぼ同様のことが明らかになった。また、V-ATPaseでは0.05 μM ATP存在下の定常状態での分解速度(6 x 10^{-2} s^{-1})とUni-siteでのATP分解の初速度(4 x 10^{-2} s^{-1})がほぼ同様であった。 すなわち、V-ATPaseでは過剰のATPによるATPase活性の促進はF-ATPaseの10^4 - 10^5倍に比べて10^2倍程度しか促進されない。このことはV-ATPaseでは触媒部位間の正の協同性がF-ATPaseに比べて低いことを示唆している。 一方、V-ATPaseおよびF-ATPaseの定常状態でのATPaseの比活性を比較するとそれぞれ、2 units/mg、100 units/mgであり、ATPase活性の促進の度合、10^2倍と10^4倍に対応していることは興味深い。

これらの速度論的な定数の差は、おそらくV-ATPaseとF-ATPaseのヌクレオチド結合部位の数や性状の差を反映したものであろう。例えば、V-ATPaseにはGlycine-rich sequenceが3個しか存在しないことから、3個の触媒部位が触媒反応を行っていると考えられる。これに対してF-ATPaseには3個の触媒部位の他に3個の非触媒部位が存在し、これらの部位が触媒活性の制御(すなわちATPase活性の促進)を司っていると思われる。精製したV-ATPaseにはヌクレオチドが結合していないことから非触媒部位が存在せず、F-ATPaseのような活性の制御が行われていない可能性が考えられる。このことは、結合ヌクレオチドの異なるF_1のUni-site反応、つまり、2分子のADPが結合している

F_1のUni-site反応は5分子のADPの結合しているF_1に比べてATP結合速度や分解速度が約2倍速いことから結合ヌクレオチド数がUni-site活性を変化させていることと矛盾しないだろう。

第3章　Bafilomycin A_1によるV-ATPaseの阻害機構

3.1　緒言

特異的な阻害剤の作用機構を解析することによって酵素の構造や反応機構をある程度推定することができる。V-ATPaseの阻害剤としてSH修飾試薬のN-ethylmaleimide (NEM)、Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)、NO_3^-などが知られている(15、16、17、18)。NEMによる阻害はATPを加えると保護されることから、触媒部位付近にシステイン残基が存在すること、またDCCDによって阻害されることから疎水性の高い領域に反応に重要なカルボキシル基を持つアスパラギン酸あるいはグルタミン酸残基が存在することが示唆されている。一方、F-ATPaseの阻害剤としてN_3^-、DCCDが知られている(1)。N_3^-はF-ATPaseの1ヶ所の触媒部位のみで行われるUni-site反応は阻害せず、3ヶ所の触媒部位が協同して行うMuiti-site反応を阻害することが示されている(86)。また、DCCDは膜内在性部分のcサブユニットの59番目のグルタミン酸残基(酵母F-ATPaseの場合)に結合してATPase活性およびH^+通路としての機能を阻害することが知られている。しかし、阻害剤に対する感受性は1残基の変異で変化することがあるので注意が必要である。例えば、大腸菌F-ATPaseに部位特異的変異を導入して、βサブユニットのGlycin-rich sequenceに含まれる149番目のグリシン残基をセリン残基に置換した場合、N^{3-}に対する感受性が10分の1以上減少することが示されている (72)。

ヌクレオチドを結合する多くの酵素に保存されているGlycine-rich seqeuence (G-X-X-X-X-G-K-T/S)(2) の5番目の残基はV-ATPaseの72 kDaサブユニットではシステイン残基として、F-ATPase βサブユニットではバリン

残基として保存されている(第2章、図2.1)。大腸菌F-ATPaseのバリン残基をV-ATPaseと同じシステイン残基に置換すると、SH修飾試薬 NEMによって阻害されることが示されている(72)。したがって、V-ATPase 72 kDaサブユニットのGlycine-rich sequence中のシステイン残基にNEMが結合して活性を阻害していることが考えられる。このように阻害剤による影響を解析することで V-ATPaseとF-ATPaseの構造や反応機構の相違を検討することができる。

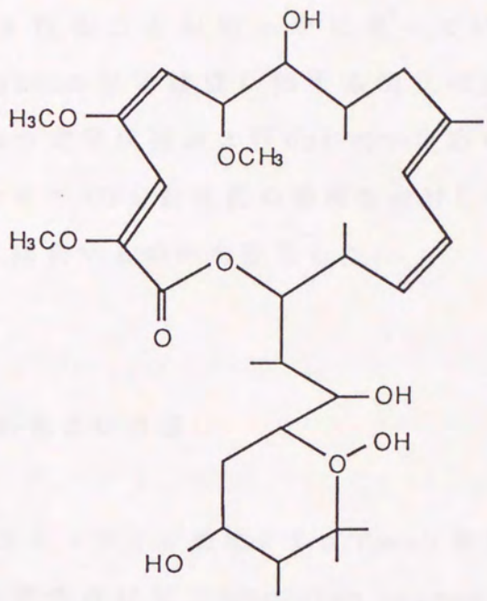
上に述べたようにV、F-ATPaseの阻害剤であるNEMやN_3^-は特異性が必ずしも高くなく、また、阻害にはいずれも高濃度が必要である。これに対しBafilomycinはV-ATPaseを比較的低濃度で阻害することが知られている(38)。クロマフィン顆粒(38)、N. crassaの液胞(38)、クラスリン被覆小胞(17)などのV-ATPaseに数10nMのBafilomycinを加えると、その触媒活性は、ほぼ完全に阻害される。一方、他の2種のATPaseでは、大腸菌Kdp-ATPaseおよびウシ・脳の$(Na^+ + K^+)$-ATPaseなどのP-ATPaseは50 μ Mの Bafilomycinを加えても50 %以上のの活性が残存し、ミトコンドリアのF-ATPaseでは10 μ Mの Bafilomycinを加えても阻害されない(38)。特に、大腸菌のF-ATPaseは約1 mMの Bafilomycinを加えても全く阻害されない(38)。Bafilomycin(37)の構造はミトコンドリアのF-ATPaseの特異的阻害剤Oligomycin(36)と類似している。両阻害剤は員数が異なるがいずれも主要な骨格としてラクトン環を持つマクロライド系の抗生物質である(図3.1)。構造や反応機構が類似しているV-ATPaseとF-ATPaseに対する阻害剤の構造が類似していることは興味深い。しかし、BafilomycinとOligomycinはそれぞれ、V-ATPaseとF-ATPaseを厳密に認識しており、おそらく両阻害剤のラクトン環の員数や側鎖の違いが酵素に対する特異性を決定していることが考えられる。

OligomycinのF-ATPaseに対する阻害機構はこれまで詳細に解析されている(36、77)。ミトコンドリアF-ATPaseの膜内在性部分に結合して膜表在性部分

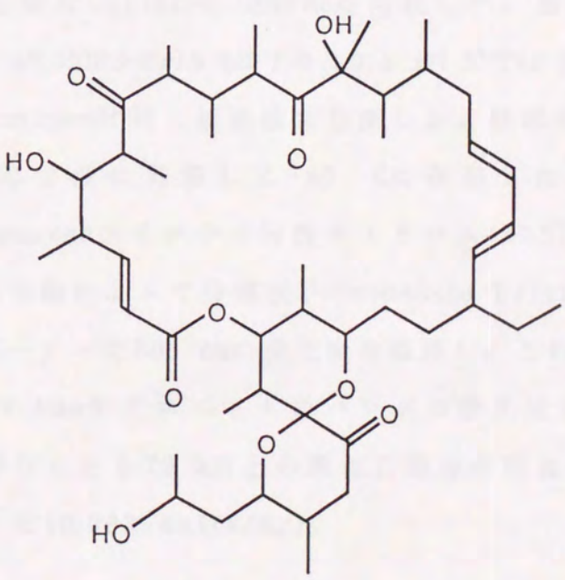
図3.1 BafilomycinとOligomycinの構造

BafilomycinとOligomycinは員数、側鎖が異なるが、いずれもラクトン環を持つマクロライド系の抗生物質で、その主要な骨格は類似していると言える。

Bafilomycin A_1



Oligomycin B



の触媒活性を阻害することが示唆されている。また、第2章で述べたUni-site反応をOligomycin共存下で行うと、高親和性の触媒部位へのATPの結合が阻害されることが明らかになっている。しかし、V-ATPaseに対するBafilomycinの阻害機構に関する知見は全く報告されていない。本章ではV-ATPaseの定常状態およびUni-site反応に及ぼすBafilomycinの影響を解析し、合わせてATP分解反応の機構を検討した。また、Bafilomycinが酵素のどの部分に結合するのかを推定した。

3.2 材料および方法

ウシ・クロマフィン顆粒のV-ATPaseは第2章の方法に従って精製し、膜表在性部分と膜内在性部分(Depleted enzyme)を調製した。精製したV-ATPaseをLiClを含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、1 M LiCl、0.5 mM EGTA, 0.5 mM DTT)に懸濁し、氷上に2時間放置して180,000 x gで遠心して上清に表在性部分、沈殿にDepleted enzymeを回収した。膜表在性部分は硫安沈殿後、緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、0.5 mM DTT)に溶解して-80°Cに保存した。Depleted enzymeは同じ緩衝液に懸濁した。懸濁液を180,000 x gで遠心して沈殿を同じ溶液に懸濁して-80 °Cに保存した。調製した表在性部分、Depleted enzymeをドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離後、Coomassie Brilliant Blue R250で染色し、デンシトメーターで600 nmの吸光度を積算し、それぞれの精製度を測定した。72 kDaと57 kDaサブユニットのバンドの吸光度から見積もると、Depleted enzymeは少なくとも70 %以上の膜表在部分が除去されており、そのATPase活性はなかった(0.003 units/mg)。

BafilomycinはDMSOに溶解して反応液に加えた。反応溶液中のDMSO濃度は2 %以下になるように加えた。このDMSO濃度ではV-ATPaseのATPase活性はほとんど変化しないことを確かめた。 定常状態でのATPase活性およびUni-siteにおける活性の測定法は第2章 2.2で述べた。

3.3 結果および考察

3.3.1 BafilomycinのV-ATPaseの反応に及ぼす影響

ウシ・クロマフィン顆粒のV-ATPaseのBafilomycinに対する感受性および特異性を検討した。BafilomycinとV-ATPaseの濃度を変化させて1 mM ATP存在下での定常状態のATPase活性を測定したところ図3.2および図3.3で示したように BafilomycinとV-ATPaseの濃度比に依存した阻害曲線が得られた。酵素濃度を変化させても、両者の濃度比(Bafilomycin/V-ATPase)が1の時は約50 %、濃度比5以上では90 %以上のATPase活性が阻害された。プロトン輸送活性も、ほぼ同様の濃度で阻害された。また、反応溶液中に1 mg/ml BSAや300 μg/mlのダイズ・リン脂質(精製したV-ATPaseの溶液に含まれているリン脂質量の300倍に相当)を共存させても、同様の阻害曲線が得られた。このような結果からBafilomycinはリン脂質や、タンパク質に非特異的に結合して阻害しているのではなく、V-ATPaseに特異的に結合して活性を阻害していることが明らかになった。また、BafilomycinとV-ATPaseの濃度比に依存した定量的な阻害曲線が得られたことから、Bafilomycinの解離定数は10 nM以下で、1分子の結合で活性は完全に阻害されることが予想された。

Bafilomycinの解離定数を推定するために、また阻害が可逆的であるのか

図3.2　Bafilomycinによる V-ATPaseの定常状態のATPase活性の阻害

Bafilomycin存在下に、ウシ・クロマフィン顆粒 V-ATPaseの濃度を変化させて定常状態のATP分解活性を測定した。横軸のBafilomycin と酵素濃度の比(Bafilomycin/V-ATPase)に対して、縦軸に相対的なATP分解活性をプロットした。(○)は酵素濃度が130 nM、(△)は43 nM、(□)は13 nMでの阻害曲線を示した。ATP分解活性は、Bafilomycin を加えずに測定した活性(約2 unit/mg)に対する相対的な値で表した。Bafilomycin/V-ATPaseが1のとき、約50 %、5以上のとき90 %以上のATP分解活性が阻害されている。従って、おそらくBafilomycin 1分子がV-ATPase 1分子に結合して完全阻害していることが考えられる。V-ATPaseの濃度は分子量750 kDaと仮定してタンパク質濃度から計算した。

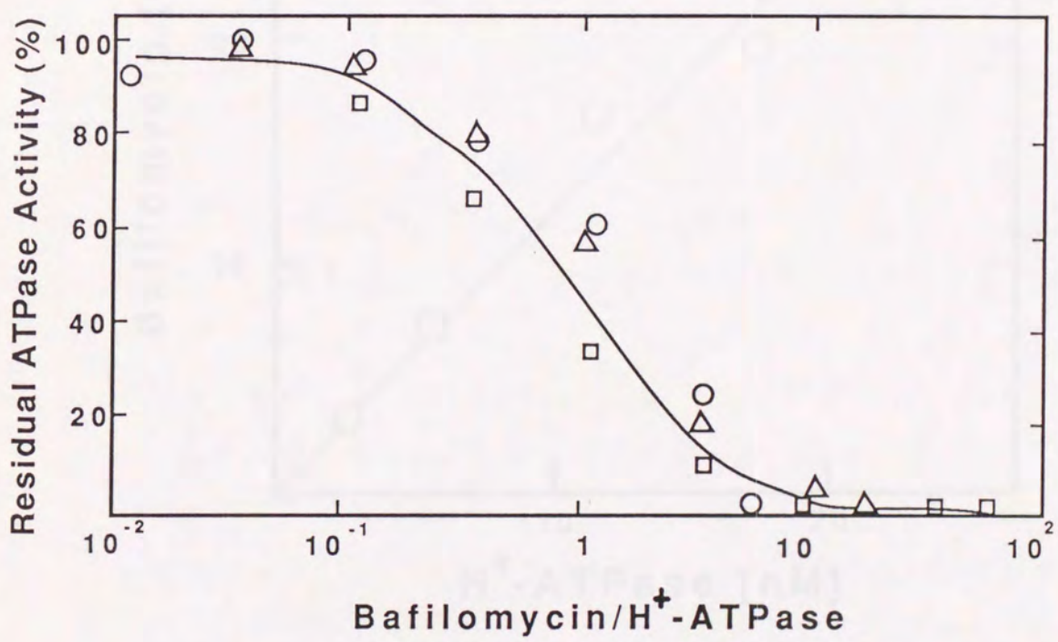
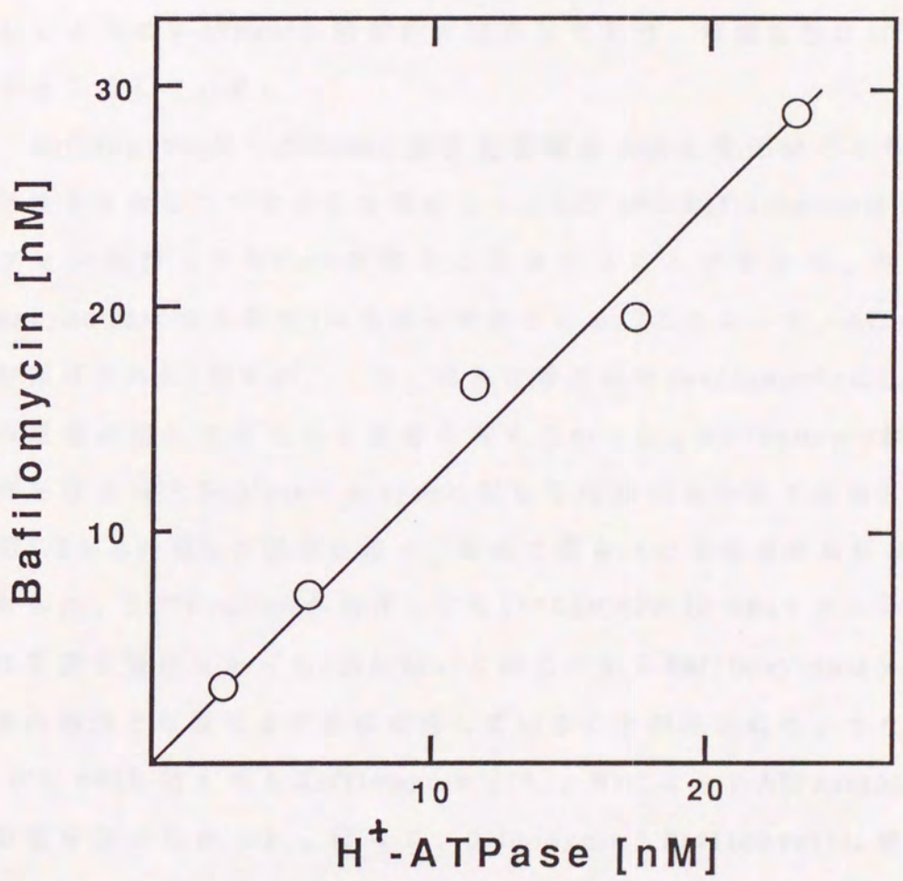


図3.3 V-ATPaseの活性を50 %阻害するbafilomycn濃度の酵素濃度依存性

図3.2と同様の実験を行って、横軸に示したV-ATPase濃度に対して活性を 50 %阻害するBafilomycin濃度をプロットした。すなわち、V-ATPaseと同じ濃度のBafilomycinを加えるとほぼ50 %の活性が阻害された。



を検討した。250 nMの酵素を含む溶液に300 nMになるようにBafilomycinを加え (1.2 mol Bafilomycin/mol V-ATPase)、氷上で10分間放置したところ、約50 %のATPase活性が阻害された。遊離のBafilomycinを除くためにこの酵素溶液を100倍容量の緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、0.5 mM DTT)で希釈し、遠心して沈殿を回収した。この操作を2回繰り返しても、ATPase活性は回復しなかった(表3.1)。同様の操作をBafilomycin非存在下で行った場合V-ATPaseの活性はほとんど変化しなかった。この結果はBafilomycinがに示したようにV-ATPaseに特異的に結合しており、解離定数は10 nM以下であることを示している。

BafilomycinがV-ATPaseの膜表在性部分と内在性部分のどちらに結合して活性を阻害しているのかを検討した。125 nMのBafilomycinは10 nMのクロマフィン顆粒のV-ATPaseを完全に阻害することできるが、加えるDepleted enzyme(膜内在性部分)の濃度を増加させることによって、ATPase活性の阻害が保護された(図3.4)。一方、膜表在性部分はBafilomycinによるATPase活性の阻害に対してほとんど影響を与えなかった。BafilomycinがV-ATPaseの膜内在性部分とDepleted enzymeに対して同様の親和性で結合したと仮定して図3.2から計算した阻害曲線と、実験で得られた阻害曲線はほぼ同様だった。さらに、Bafilomycinが共存しても[^{14}C]DCCDの16 kDaサブユニットへの結合は影響を受けなかった(図3.5)。このことからBafilomycinはV-ATPaseのDCCD結合部位とは異なる部位に結合していることが示された。また、Oligomycin (70 nM)を加えてもBafilomycin (70 μM)によるV-ATPase(50 nM)の阻害は影響を受けなかった。従って、OligomycinとBafilomycinは構造が類似しているが、前者はV-ATPaseのBafilomycin結合部位には結合していないことが示唆された。

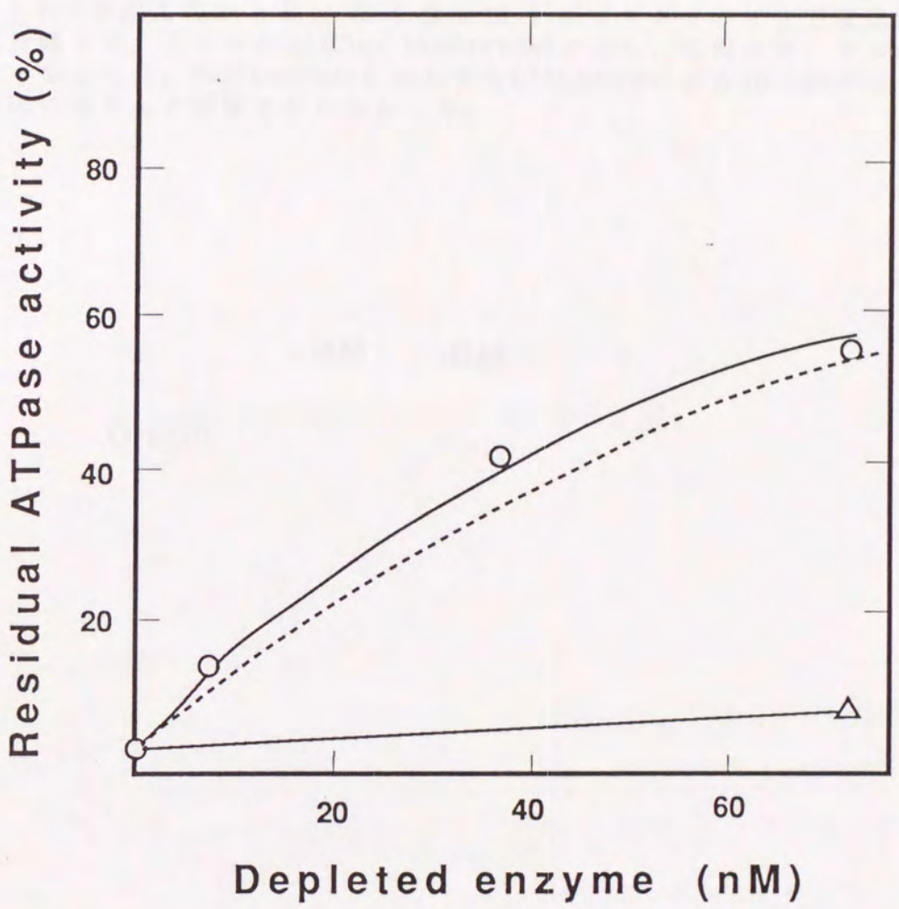
以上の結果から、BafilomycinはV-ATPaseの膜内在性部分に結合し、膜表

表3.1　Bafilomycinによる V-ATPaseの非可逆的な阻害

250 nMの V-ATPaseを含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris PH 7.0, 0.5 mM DTT)に300 nMになるようにBafilomycinを加えた。次に100倍容量の、同じ緩衝液で希釈(Dilution)した後、遠心して回収されたV-ATPaseのATPase活性を測定した。希釈の操作を2回繰り返してもATPase活性は回復しなかった。用いたV-ATPaseの比活性は0.8 -1.0 units/mgであり、この条件でV-ATPaseは約50 %阻害された。

Dilution	Residual ATPase activity (%)
x4	51
x400	48
x40,000	48

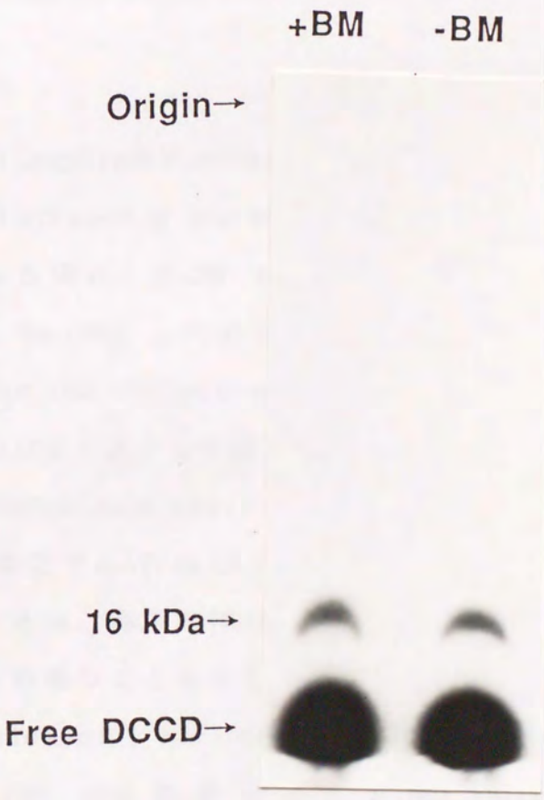
図3.4 BafilomycinによるV-ATPaseの阻害とdepleted enzyme（膜内在性部分）による保護効果



(A) 1 0 nMウシクロマフィン顆粒 V-ATPaseと、横軸に示した濃度の膜内在性部分を含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、5 mM $MgCl_2$)にbafilomycinを125 nM加えた後、ATPase活性を測定し、相対的な値を示した(○) depleted enzymeの濃度は115 kDa、39 kDa、20 kDa、16 kDaの各サブユニットの量比が1:1:1:1:5で、分子量は300 kDaと仮定してタンパク質濃度から計算した。点線は、BafilomycinがV-ATPaseの膜内在性部分と、膜表在性部分を除去したdepleted enzymeに同じ親和性で結合するとし、図2.1曲線から計算したものである。用いたV-ATPaseの比活性は1.4 units/mgで、depleted enzymeの活性はほとんどなかった相当する膜表在性部分を共存させた場合、保護効果はほとんど見られなかった(△)。

図3.5　DCCDによるV-ATPaseの修飾

200 μM [^{14}C]DCCDと20 μgのV-ATPaseを緩衝液(10 mM MOPS-NaOH pH 7.0)中、室温で1時間反応させた。(+BM)は反応液中に、1 μMのBafilomycinを加え、、(-BM)は加えなかった。SDSを含む10 %ポリアクリルアミド電気泳動によって分離した。ゲルをAmplifier (Amersham)に浸し、乾燥させ、フルオログラフィーをとった。Bafilomycinを加えても[^{14}C]DCCDによる16 kDaサブユニットの修飾はほとんど影響を受けなかった。



在性部分のATP分解活性を阻害するが考えらる。したがって、Bafilomycinは V-ATPaseの膜内在性部分に結合し、タンパク質間の相互作用によって活性中心のある膜表在性部分の構造を変化さると考えられる。同様の阻害機構として、OligomycinやDCCDがF-ATPaseの膜内在性部分に結合してATPase活性を阻害することが知られている(1、36)。

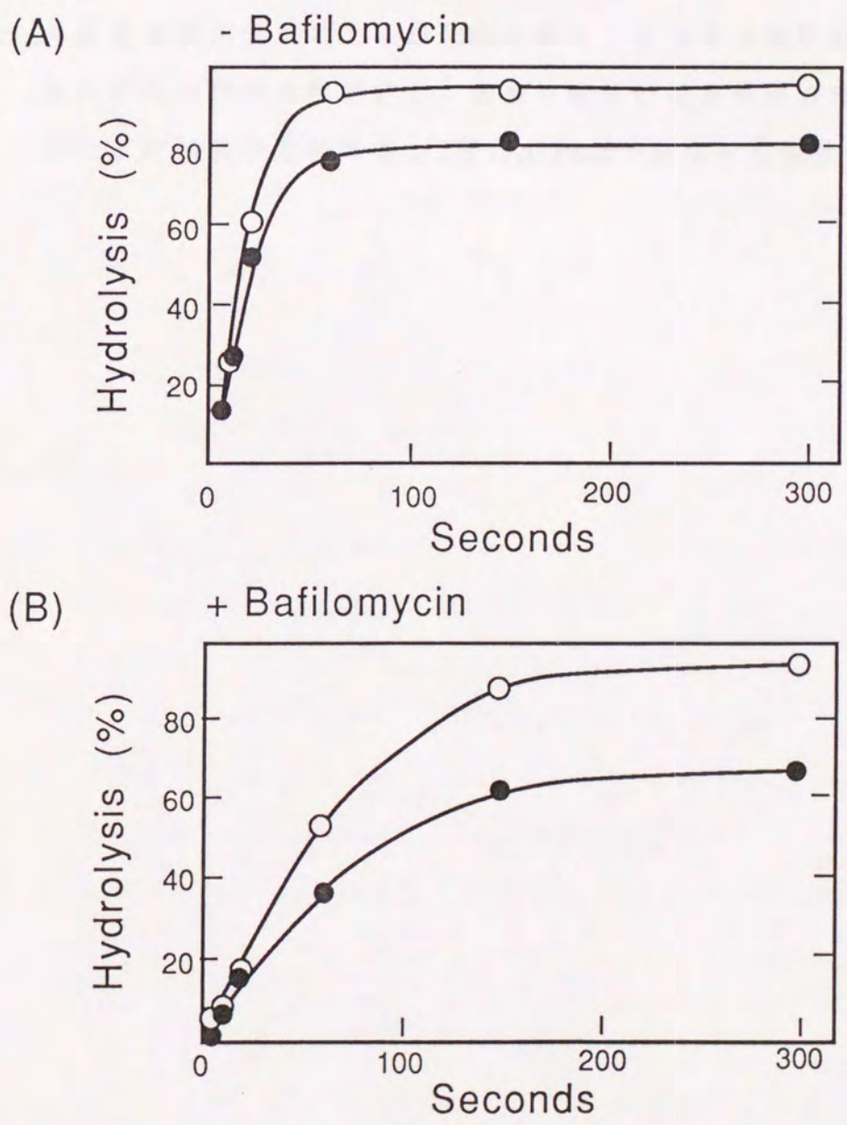
3.3.2 BafilomycinによるV-ATPaseの定常状態およびUni-site活性に対する阻害

BafilomycinがV-ATPaseの反応にどのような影響を与えているのか、定常状態のATPase活性およびUni-site反応の解析を行った。Bafilomycinを加えなかった場合、第2章 2.2.2で明らかになったようにKm_1 (5 μ M)、Km_2 (30 μ M)、Km_3(300 μ M)の3個のKm値が存在した。これに対して、5.3 nMの V-ATPaseに100 nMのBafilomycin (Bafilomycin/V-ATPaseの濃度比は19)を加え、1 mM ATPを基質として測定した定常状態のATPase活性は95 %以上阻害された。Lineweaber-Burk plotによる解析ではKm_2、Km_3は検出できなかった。しかし、低ATP濃度でのATPase活性[Km_1(5 μ M)のATPase活性]は60 %以上残っていた。このことは、高親和性の触媒部位によるATP分解反応はBafilomycinによって阻害され難いことを示している。

BafilomycinがATP分解のどの段階を阻害しているのかを明らかにするために、100 nMの酵素液に3 μ Mの Bafilomycinを共存させて(30 mol Bafilomycin /mol V-ATPase)、定常状態のATP分解活性は95 %以上阻害される条件でUni-site反応を解析した。図3.6で示したようにAcid Quenchの実験あるいはHexokinase を用いたV-ATPaseに結合しているATP量の測定をしたと

図3.6　Bafilomycin存在下でのV-ATPaseのuni-site反応

(A)はBafilomycin非存在下、(B)は3000 nM Bafilomycin存在下で100 nMのV-ATPaseのUni-site反応の結果を示した。測定は50 nM [γ-^{32}P]ATPを含む緩衝液(50 mM MOPS-Tris pH 7.0, 0.5 mM $MgSO_4$、1 mM KH_2PO_4)中で室温で行った。ATP結合量はHexokinaseを用いた実験から、Acid quenchは過塩素酸で反応を停止して遊離したPiの量を測定した(第2章、図2.5参照)。(●)はAcid quenchを行ったとき遊離したPiの量を、(○)はHexokinase inaccessible ATPを加えたATPに対する相対的な値を示した。ATP結合速度はBafilomycin非存在下で8.1 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$、存在下では4.1 x 10^5 $M^{-1}S^{-1}$だった。



ころ、ATP結合速度は60 %、分解速度は、15 %以上が残存した。このことからも、V-ATPaseの高親和性の触媒部位で行われる反応はBafilomycinに対して感受性が低いことが示された。おそらく、Bafilomycinは、高親和性の触媒部位で行われていると考えられるATP分解反応(Uni-site反応)にはあまり影響を与えず、複数の触媒部位の協同性に大きな影響を及ぼしてV-ATPaseを阻害すると考えられる。一方、F-ATPaseのUni-site反応の解析から、OligomycinやDCCDはATPの酵素への結合そのものを阻害することが報告されている(77)。したがって、OligomycinやBafilolmycinは酵素の膜内在性部分に結合し、酵素の構造変化を引き起こすが、膜表在性部分の触媒部位に対する阻害機構が異なることが示唆された。このことはV-ATPaseとF-ATPaseの触媒反応時の膜内在性部分と、表在性部分の相互作用の機構が異なり、ATPase活性とH^+輸送の共役機構が2種のATPaseで異なる可能性が考えられた。

第4章 V-ATPaseの16 kDaおよび、72 kDaサブユニットの一次構造の決定

4.1 緒言

V-ATPaseの反応機構や構造など多くの性状がF-ATPaseのものと類似していることは注目すべき点である(表4.1)。 前章までの実験の結果はV-ATPaseとF-ATPaseのいずれもが複数の触媒部位(おそらく3ヶ所)の協同的な反応を行っていることを示唆している。しかし、F-ATPaseでは活性を保持した膜表在性部分F_1が調製できるのに対して、V-ATPaseでは活性を持った膜表在性部分が得られない(34)。 本論文ではV-ATPaseにはヌクレオチドが結合していないこと(第2章、2.3.1)、また、Uni-site反応がBafilomycinに対して感受性が低いこと(第2章、3.3.2)等を示し、V-ATPaseの反応機構やH^+輸送との共役機構がF-ATPaseとは異なる性質を持つことを明らかにした。このような違いは両ATPaseのどのような構造の差から起きるのか非常に興味深い。また、H^+を輸送するATPaseの構造と機能を統一的に考えて行くためには特に、触媒サブユニットである72 kDaサブユニットと、H^+通路を形成していると考えられている16 kDaサブユニットの一次構造を理解することが重要である。一次構造に関して、これまで動物細胞において1種類の組織からV-ATPaseの各サブユニットのcDNAの配列が系統的に決定された例はない。

16 kDaサブユニットにはF-ATPaseのcサブユニットと同様に、DCCDが結合し、酵素活性を阻害することから、H^+通路を形成し、ATP分解反応とH^+輸送の共役機構に重要な機能を果たすことが示唆されている。ウシ・クロマフィン顆粒(57)、酵母(58)、T. marmorata electric lobes(59)のV-ATPaseの16 kDaサブユニットのcDNAが単離され、その配列が決定された時点でアミノ

表4.1　V-ATPaseとF-ATPaseの反応機構の比較

	V-ATPase	F-ATPase
Functions	ATP hydrolysis	ATP synthesis
Membrane Extrinsic Sector		
Catalytic Subunits (3 copies)	72 kDa 58 kDa	β α
Nucleotides	< 0.1	2.1 (mol/mol enzyme)
ATP Hydrolysis	Catalytic cooperativity ・Three Km values (5、30、300 μM) ・High affinity catalytic site	Catalytic cooperativity ・Three Km values (3、25、150 μM) ・High affinity catalytic site
Membrane Intrinsic Sector		
DCCD Binding Subunit (Proteolipid)	16 kDa	c
Inhibitor	Bafilomycin (10 nM)	Oligomycin (200 nM)

酸配列を列べて比較した(図4.1)。 Hydropathyから、いずれのサブユニットも4個の膜貫通領域が予想された。これらの領域のアミノ酸配列の相同性(Identity)は非常に高く、アミノおよびカルボキシル末端領域は相同性が比較的低かった。これらの領域の他に、3番目の膜貫通領域の後半からと4番目の膜貫通領域の手前までの保存性の低い領域は種によって変化する領域(Variable region)であるとが予想された(図4.1)、(58)。そこで、シナプス小胞のV-ATPaseの16 kDaサブユニットの構造、特にVariable regionが他の生物種と異なっているかどうか、また、Variable regionが本当に存在するのかどうかも興味深かった。

第3章で膜内在性部分にBafilomycinが結合して膜表在性部分の触媒活性を阻害することを示した。同様の阻害機構はOligomycinがミトコンドリアのF-ATPaseを阻害する場合に見られる(36)。酵母のOligomycin耐性変異株の中には、F-ATPaseのcサブユニットにマップされるものが多く単離されている(1、93)。 また、N. crassaのBafilomycin耐性変異株が単離され(Bowman 私信)、おそらくV-ATPaseの変異であると予想されている。したがって、V-ATPaseにおいてはBafilomycinによる阻害と16 kDaサブユニットの構造の関係は興味深い。

V-ATPaseは動物細胞ではクロマフィン顆粒、シナプス小胞、ゴルジ体などを含むさまざな細胞内膜系(Endomembrane systems)に存在していることが知られている(15、16、17、18)。各オルガネラに存在するV-ATPaseが全く同一のものなのか、あるいはIsoformが存在するのか興味深い。シナプス小胞の16 kDaサブユニットはクロマフィン顆粒の16 kDaサブユニットに対する抗体とは反応しないことが当研究室の森山芳則によって示されている(未発表)。この結果は小脳の16 kDaサブユニットがクロマフィン顆粒のものと異なることを示唆している。シナプス小胞には大量のV-ATPaseが存在し(26)、本酵素

図4.1　16 kDaサブユニットのVariable Region

ウシ・副腎(57)、、酵母(58)、T. marmorata(59)の16 kDaサブユニットの配列が決定された時点で四角で囲った領域がの保存性が低かった。この領域は生物種で変化する(Variable Region)と考えられていた。この図には本章で決定したマウス・小脳のサブユニットの配列も合わせて比較した。この領域はウシのサブユニットでのみ配列が異なり、他のサブユニットでは完全に保存されていた。したがって、ウシの配列が誤っていることを著者が示唆した。
(詳細は本文参照)。

```
                          10                  30                  50                  70
Mouse              MADIKNNPEYSSFFGVMGASSAMVFSAMGAAYGTAKSGTGIAAMSVMRPELIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLI
Bovine             MSEA··G···A···A·····A·····L·····M·····
T. marmorata        MSTPGA····A····I···A·····L·····
S. cerevisiae        MTELC·V·AP···AI·CA··II·TSL·····V··C·TC·L··D·LF·N·V··I·····S··V

                  90                  110                 130                 150
ANSLTDGIT--LYRSFLQLGAGLSVGLSGLAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLFVGMILILIFAEVLGLYGLIVALILSTK
····N···S--·····RSPSALLGTQGRAC·····
·····ED·S--·FK·····
CY··GQKQA--··TG·I·····SS·····L·NSRATQDVVC
```

が形成したH^+の電気化学的ポテンシャル差に依存して神経伝達物質を小胞内に輸送されることが明らかになっている(26、27、28、29)。

V-ATPaseの膜表在性部分は触媒活性を持ち、72 kDa、57 kDa、41 kDa、34 kDa、33 kDaサブユニットから構成されている。活性部位は72 kDaサブユニット上に存在することが示唆されている(33、46)、これまでに、ニンジン(48)、酵母(49)、N. crassa(50)の液胞のV-ATPaseの72 kDaサブユニットの構造が報告されているが、動物細胞の72 kDaサブユニットの構造は報告されていない。57 kDaサブユニットのcDNA配列は酵母(51)、N. crassa(52)、ウシ・クラスリン被覆小胞(53)などのものが決定されている。72 kDa、57 kDaサブユニットはそれぞれ、F-ATPaseのβ、αサブユニットと類似していることから、おそらく、触媒部位を構成していることが考えられている。おもしろいことに、古細菌に分類されるSulfolobus acidocaldarius(68)やMethanosarcina barkeri(69)のATP合成酵素の触媒部位を構成すると考えられている2種のサブユニットの一次構造がそれぞれ、V-ATPaseの72 kDa、57 kDaサブユニットの構造と類似していることが示されており、古細菌のいくつかは、V-ATPaseに分類されるATP合成酵素を持っていることは興味深い。

本章では、まずマウス・小脳の16 kサブユニットのcDNA配列を決定し、ヒト染色体ライブラリーから16 kDaサブユニットに対応する遺伝子をクローン化した。続いて、マウス・小脳の72 kDaサブユニットに対応するcDNAクローン化した。

4.2 材料および方法

4.2.1 マウス小脳のV-ATPase 16 kDaサブユニットに対応するcDNAのクローン化

マウス小脳から抽出したmRNAをRandom primerを用いて、Reverse transcriptaseによって常法によりcDNAを合成した。これにEcoRI linkerを連結し、λgt11のEcoRI部位に挿入し、ライブラリーを作成した (94) 。

プローブは、ウシ副腎髄質由来のV-ATPase 16 kDaサブユニットの後半部分をコードするcDNA配列から、塩基番号367 - 431、478 - 542の領域のAntisense鎖と、塩基番号422 - 486、533 - 597の領域のSense鎖の4本のオリゴヌクレオチドを合成した(57)。[γ-^{32}P]ATPを用いてT4 Polynucleotide kinaseによって5'末端を標識した。以下、常法に従って単離した陽性クローンからファージDNAを精製しEcoRIで切断した後、ポリアクリルアミド電気泳動によって分離した(95、96)。

アミノ末端付近の領域を持つcDNAクローンの単離には、λgt11のLeft armのEcoRI部位付近に対応するプライマー(GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)と塩基番号328 - 341の領域のAntisense鎖の配列から合成したプライマーを用いて、マウス小脳のcDNAライブラリーから調製したファージDNAを鋳型にしてPCR (Polymerase chain reaction)を行なった (図4.3)。 反応溶液の組成は、1 μgのファージDNAと、2 μM プライマー、0.5 unitsのTaq polymeraseを含む20 μlの反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3 、50 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$、0.2 mM dGTP、0.2 mM dATP、0.2 mM dTTP、0.2 mM dCTP、0.001 % Gelatin)で、94 °Cで1 分間の変性、55 °C、2分間のアニーリング、72 °C、3分間の伸長反応を1サイクルとし35サイクル繰り返した。PCR産物をEcoRIとScaIで

切断した後、ポリアクリルアミド電気泳動によって分離した。Immobilon N (Milipore)に電気的に転写しSouthern hybridizationで目的のフラグメントを同定した。用いたプローブは、mvp163のEcoRI-ScaI断片(図4.3)を鋳型にRandom priming法で調製した。以上のようにして得られた、cDNAはpBluescript KS M13(+)あるいはpBluescript II SK M13(+)に組み込み、Sanger法(97)で塩基配列を決定した。

4.2.2 ヒト 16 kDaサブユニットの遺伝子の解析

HaeIIで部分消化したヒト・肝臓DNAとEcoRI linkerを連結し、Charon 4AのEcoRI-EcoRI領域と置換することで挿入した後、ライブラリーを作成した(98)。マウス・小脳の16 kDaサブユニットのcDNAのScaI-Nsp(7524)I断片(図4.3)を鋳型にしてRandom priming法でプローブを作成した。常法に従って単離した陽性クローンから調製したDNAをEcoRIで切断し、0.8 %アガロース電気泳動で断片を分離した。DNA断片を溶出した後、pBluescript II SK M13(+)のEcoRI部位に挿入し、塩基配列を決定した。

4.2.3 マウス小脳の72 kDaサブユニットに対応するcDNAのクローン化とその配列決定。

マウス小脳のcDNAライブラリーから、PCRを用いて72 kDaサブユニットのcDNAをクローン化した。構造が決定されているニンジン(48)、酵母(49)、N. crassa(50)の液胞のV-ATPase 72 kDaサブユニットと、S. acidocaldarius (68)、M. barkeri (69)の触媒部分のαサブユニットのアミノ酸配列を比較

し、相同性の高い領域から塩基配列に逆翻訳して、プライマーとして用いた(図4.2)、(99)。 2 μgのファージDNA、5 μMプライマー、0.5 unitsのTaq polymeraseを含む20 μlの反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3、50 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$、 0.2 mM dGTP、0.2 mM dATP、0.2 mM dTTP、0.2 mM CTP、0.001 % gelatin)を、94 °Cで1分間の変性、47 °C、2分間のアニーリング、72 °C、3分間の伸長反応を1サイクルと35サイクル繰り返した。 このPCR産物を5 %ポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、アミノ酸配列から予想される長さに相当するDNA断片を回収した。Klenow fragment (E. coli DNA Polymerase I large fragment)で末端を平滑化したDNA断片を、pBluescript II SK M13(+)のEcoRV部位に挿入し、塩基配列を決定した。PCRで得られた部分cDNAを鋳型にしてRandom priming法によってプローブを作製し、常法にしたがって、4.2.1で用いたマウス・小脳由来のcDNAライブラリーから72 kDaサブユニットをコードするクローンを単離した。得られた陽性クローンのDNAを調製しEcoRIで切断した後、ポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、cDNAをpBluescript II SK M13(+)のEcoRI部位に挿入し塩基配列を決定した。

4.2.4 その他の方法

制限酵素、T4 DNA ligase、T4 polynucleotide kinase、Klenow fragmentは宝酒造、東洋紡、ニッポンジーンから購入した。Random priming kitはBoeringer-Mannheimから、Sequenaseは United State Biochem. Co.から、PCR kitは Perkin Elmer Cetusから購入した。 [α -^{32}P]dCTP (3,000 Ci/mmol)、[γ -^{32}P]ATP (5,000 Ci/mmol)はAmershamから購入した。他の試

図4.2　マウス・小脳の72 kDaサブユニットの単離に用いたプライマー

(A) 72 kDaサブユニットのアミノ酸配列の比較とプライマーの位置

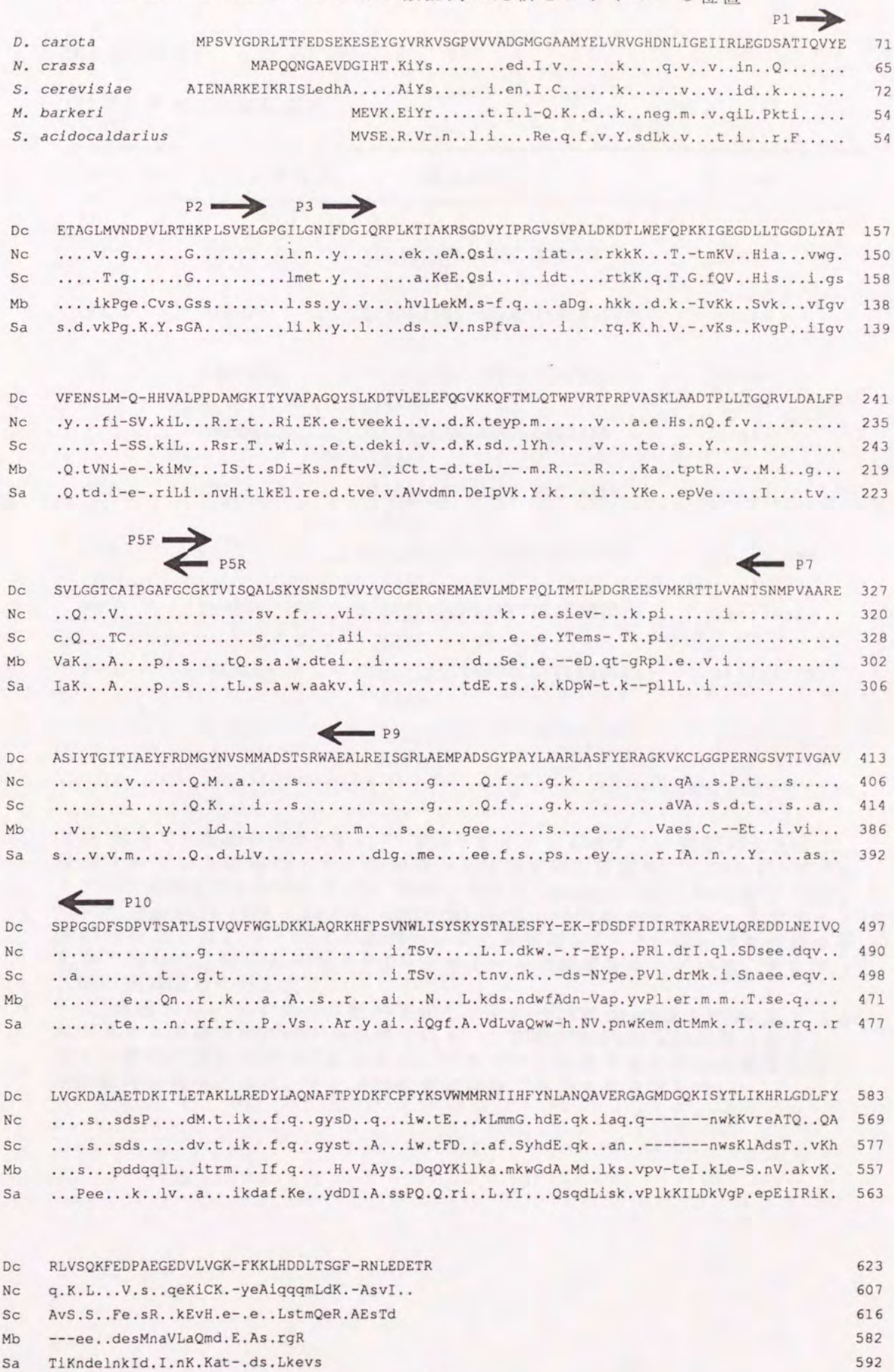


図4.2（続き）

(B)プライマーの塩基配列

プライマー	アミノ酸配列	塩基配列	Strand
		5' 3'	
P1	IQVYE	AGAAGCTTHCARAGTNTMTGA HindIII	sense
P2	VELGP	GTTCCATGGTNGARYTNGGNCCNGG NcoI	sense
P3	YDGILVQ	CAAAGCTTHTAYGAYGGNTNTNCA HindIII	sense
P4	KWPVR	TACTGCAGMVNTGGCCNGTNMG PstI	sense
P5F	GSCGK	CTGGGCCCTTYGGNTSNGGNAAR ApaI	sense
P5R	GACT	GACTGCAGTYTTNCCNSWNCCRAA PstI	antisense
P7	PMNSTN	GTGGTACCGGCATRTTNSWNGTRTT KpnI	antisense
P8	RMLAEAW	CAGGATCCCKNADNGCYTCNGCCCA BamHI	antisense
P10	FDGGPP	GTCTGCAGAARTCNCCNCCNGGNGG PstI	antisense

(A)今までに配列の決定された72 kDaサブユニットのアミノ酸配列を比較し、保存されている領域のアミノ酸配列から塩基配列を逆翻訳し、P1～P10のプライマーを合成した。Dcはニンジン (48)、NcはN. crassa (50)、Scは酵母 (49)、MbはM. barkeri (69)、SaはS. acidocaldarius (68)のサブユニットのアミノ酸配列を示した。ニンジンの配列と一致した残基を(･)で、保存的な置換を小文字で表した。矢印はP1からP10のプライマーの位置を示している。右にアミノ酸の残基番号を示した。

(B)合成したプライマーの配列を示した。P1-P5Fはsense鎖をPCRによってカルボキシル末端方向にcDNAが合成される。、P5R-P10はantisense鎖を合成し、アミノ末端方向にcDNAが合成される。プライマーには下線に示した制限酵素の認識配列を組み込んだ。アミノ酸配列はニンジンのものを示した。

薬は試薬特級、あるいは生化学用を用いた。

4.3 結果と考察

4.3.1 マウス小脳の16 kDaサブユニットのcDNA配列。

マウス・小脳のライブラリーから16 kDaサブユニットに対応するcDNAクローンを単離した。250,000個のプラークから10個の陽性クローンを得た。制限酵素断片を分析し、塩基配列を決定したところ、これらのクローンは4種類(I、λmvp1,3,5,128; II、λmvp8,20,163; III λmvp4; IV、λmvp2)に分けられた。また、PCRを用いて単離したアミノ末端領域をコードする二つのクローン(mvp6p、mvp9p)の配列を決定したが全く同じ配列であった。重複している領域の配列から、これらの6種のクローンが同一のmRNAに由来していることが確かめられた(図4.3)。 決定したcDNA配列は468bp、155アミノ酸残基の16 kDaサブユニットをコードしていた(図4.4)。

マウス小脳のV-ATPase 16 kDaサブユニットのcDNA配列は、これまでに構造の決定された5種の生物(ウシ、T. marmorata、Drosophila、酵母、ヒト腎臓)のサブユニットの塩基配列は 62 - 84 %の相同性が翻訳領域では見いだされた(表4.2 A)。 マウス・小脳のサブユニットを含めた6種の推定アミノ酸配列を比較すると、73 - 92 %の高い相同性が存在した(表4.2 B)。Hydropathy plotを行ない、いずれのサブユニットも4個の膜貫通領域が存在すると予測された。このような16 kDaサブユニットのTopologyと相同性を改めて検討すると、アミノ末端領域とカルボキシル末端領域、および2番目と3番目の膜貫通領域にはさまれた膜から突出していると予想された領域では相

図4.3 16 kDaサブユニットに対応するcDNAクローンと制限酵素地図。

(a)cDNAの制限酵素地図、(b)塩基配列を決定したクローンとそのSequence strategy。NはNcoI、SはScaI、PはPvuII、AはApaI、NsはNsp(7524)Iで切断される部位を示した。波線で示した矢印は翻訳される方向を、斜線で示した部分は翻訳領域を示している。

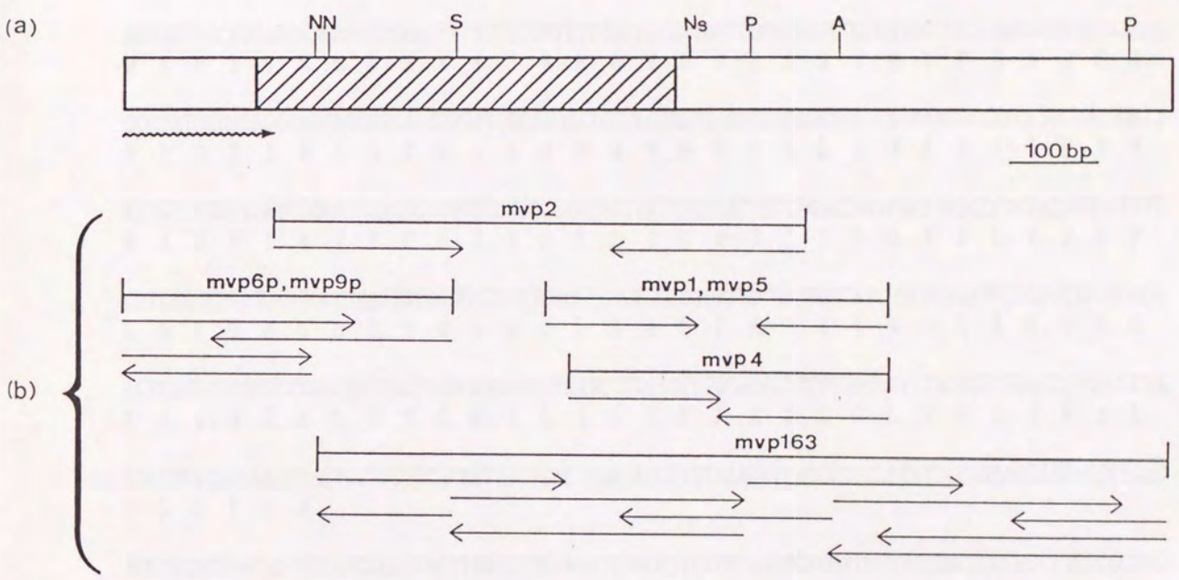


図4.4　マウス・小脳 16 kDaサブユニットに対応するcDNAの配列と推定アミノ酸配列。

ウシの16 kDaサブユニットとの相同性(57)および真核生物における開始コドン付近の相同性(100)から、Met-1を推定した。右の数字は塩基番号を、括弧内の数字はアミノ酸残基番号を示している。(*)は終止コドンを表し、3'末端付近にはpolyAシグナルが存在していた(下線)(101)。

```
                                                AATTCCGGTATTTAGAGCGCAGCGCCTGACTGGCGGGGTCGCTTTCCCATCCGCTGC  -91

CTCGACGATCTTCGCTTGCCTCCTCGCTCGCTGTCCCGTTGTCCTAGCCCGCCGCCGCCCGCTGAGCTTGTCTTTTCCCTGCTTGCAGAC   -1

ATGGCTGACATCAAGAACAACCCCGAATATTCTTCGTTTTTCGGTGTCATGGGCGCCTCGTCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCC   90
M  A  D  I  K  N  N  P  E  Y  S  S  F  F  G  V  M  G  A  S  S  A  M  V  F  S  A  M  G  A    (30)

GCCTATGGCACAGCCAAGAGCGGCACTGGCATCGCAGCCATGTCAGTCATGAGGCCAGAGCTGATCATGAAGTCCATCATCCCAGTGGTT  180
A  Y  G  T  A  K  S  G  T  G  I  A  A  M  S  V  M  R  P  E  L  I  M  K  S  I  I  P  V  V    (60)

ATGGCTGGGATCATCGCCATCTACGGCCTGGTGGTGGCAGTACTTATCGCTAACTCCCTGACTGATGGCATCACCCTCTACAGGAGTTTT  270
M  A  G  I  I  A  I  Y  G  L  V  V  A  V  L  I  A  N  S  L  T  D  G  I  T  L  Y  R  S  F    (90)

CTTCAACTGGGTGCTGGCCTGAGTGTGGGGCTGAGTGGCCTGGCTGCTGGCTTTGCCATTGGCATCGTCGGAGATGCTGGTGTTCGGGGC  360
L  Q  L  G  A  G  L  S  V  G  L  S  G  L  A  A  G  F  A  I  G  I  V  G  D  A  G  V  R  G    (120)

ACTGCCCAGCAGCCTCGACTGTTCGTGGGCATGATCCTGATCCTCATCTTTGCGGAGGTGCTTGGCCTCTACGGTCTCATCGTGGCCCTA  450
T  A  Q  Q  P  R  L  F  V  G  M  I  L  I  L  I  F  A  E  V  L  G  L  Y  G  L  I  V  A  L    (150)

ATCCTCTCCACAAAGTAGTCCTTTTCCACCATCAGTCACAGGATAGGATGTAAAGATCACCCCTCCTCATTCCAGAACGAACAGCCTGAC  540
I  L  S  T  K  *                                                                              (155)

ACATGCACGGGCAGCTGCCCCTCAGTAGTTGGTCTTGTAAATGTGCAGTGTCCTAGTGCCCATTGTCTGTCGCCCCCGCCTTGCCCCTAC  630

TGCACCGTGCTGTGGACATACGGGCCCACTCATCTCCCACCCAGGCCCCTGACCAGTGACGAAGTCAGCCTCTGGTTACCCCACCCATCG  720

CCCTAGAGTGCTCCTGTGTATAAGAATGAACTAGAGTTGTCATTTTTCTCTTCACTGGATGTTTATTTATAAAAGATTTGACCTATTCAT  810

GCGTCTGTGGAGCAGCTCCTGTCTCCCAACTATATAGTAATCATTAGTAGACTGTTGCCTTGTGGGGTTCCTGTTGCTGAGACTCCTTGG  900

ATGGAGCCACCCTTCCCCCTGCCCTGAACAGCCAGGGTGGAGGATAGAGTGCTACTGCTCCTCAGAGCTGGCTCCCAGCTGTGTCCAATA  990

AAAGTTCTCGGATGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                                          1025
```

表4.2　16 kDaサブユニットに対応するcDNA配列とアミノ酸配列の比較

(A) (1)マウス・小脳、(2)ヒト・腎臓(102) (3)ウシ・副腎(57)、(4) T. marmorata electric lobes(59)、(5) Drosophila (60)、(6)酵母(58)の、翻訳領域のcDNA配列を、ギャップを挿入して相同性が最も高くなるように並べた後、計算した。(B) 推定アミノ酸配列を、同様にして列べ相同性を計算した。

(A)　cDNA配列の相同性

Identity (%)	1	2	3	4	5	6
1 Mouse	—	87	86	80	74	62
2 Human	87	—	90	78	75	59
3 Bovine	86	90	—	76	73	60
4 Torpedo	80	78	76	—	75	65
5 Drosophila	74	75	73	75	—	68
6 Yeast	62	59	59	65	68	—

(B)アミノ酸配列の類似性

Identity (%)	1	2	3	4	5	6
1 Mouse	—	91	93	94	84	72
2 Human	91	—	97	93	81	72
3 Bovine	93	97	—	93	81	72
4 Torpedo	94	93	93	—	81	72
5 Drosophila	84	81	81	81	—	73
6 Yeast	72	72	72	72	73	—

同性が比較的低く、2、3、4、番目の膜貫通領域では相同性が非常に高いことが明らかになった(図4.5、図4.6)。

膜貫通領域の相同性が高いことは、酵母の液胞の変異株の結果と一致する。すなわち、Noumiらは酵母16 kDaサブユニットに変異を導入し膜貫通領域には他の残基と置換し得る残基が極めて少ないことを示している(103)。16 kDaサブユニットの膜貫通領域にはH^+輸送路とその構造を維持する上で必須のアミノ酸残基が多く存在しているために、保存性が高く、変異導入によって機能も失われるのであろう。これに比べて2番目と3番目の膜貫通領域の間にある、膜から突出していると予想された領域は、比較的保存性が低く他のアミノ酸残基に置換しても機能が失われないことが多い(103)。16 kDaサブユニットの膜から突出している部分は膜表在性部分のサブユニットを結合するために必要であると考えるが、このような機能のためにはある程度類似した構造であればよいのではないだろうか。

既に述べてきたようにV-ATPaseの16 kDaサブユニットはF-ATPaseのcサブユニットに対応すると考えられる。しかし、cサブユニットの分子量は16 kDaサブユニットの約2分の1である。この二つのサブユニットのアミノ酸配列と比較すると、16 kDaサブユニットの前半部分と後半部分のそれぞれがcサブユニットと類似した配列だった。これは、配列が決定されたすべての生物種の16 kDaサブユニットの塩基配列に見られる。すなわち、1分子の16 kDaサブユニットの中に2分子のcサブユニットと相同性が高い配列が見いだされた(図4.7)。このことは、16 kDaサブユニット遺伝子が、8 kDaの祖先タンパク質の遺伝子が重複した結果できたことを示唆している。また、この祖先タンパク質が重複しないで進化したのがcサブユニットの遺伝子であろう。

16 kDaサブユニットのカルボキシル末端側半分にはcサブユニットのDCCDが結合するGlu-59(酵母ミトコンドリアF-ATPaseの場合の残基番号)に対応す

図4.5　マウス・小脳 16 kDa サブユニットのHydropathy

マウス・小脳 16 kDaサブユニットの推定アミノ酸配列からHydropathy plotを行い、疎水的あるいは親水的な領域を予測した。この結果マウス 小脳の16 kDaサブユニットには4ヶ所の疎水性の高い領域が存在し、膜を4回横切ることが予測される(I、II、III、IV)。I、II、III、IVは図4.6に示した膜貫通領域として模式的に示した。

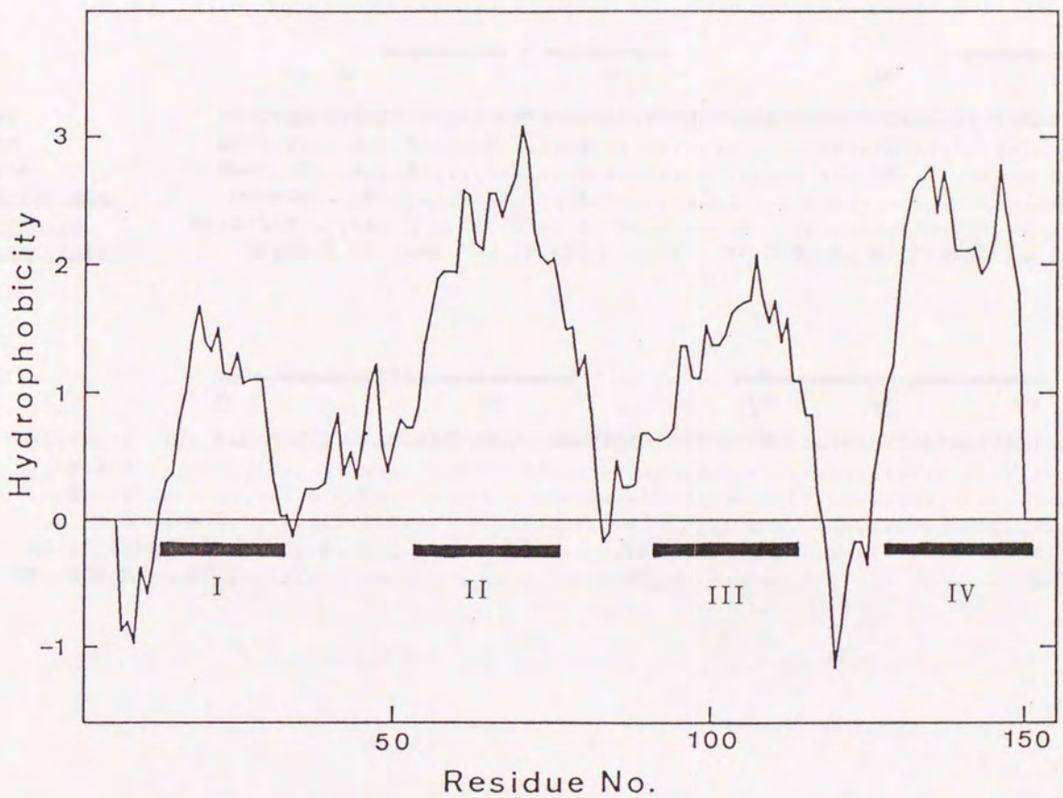


図4.6　16 kDaサブユニットのアミノ酸配列の比較。

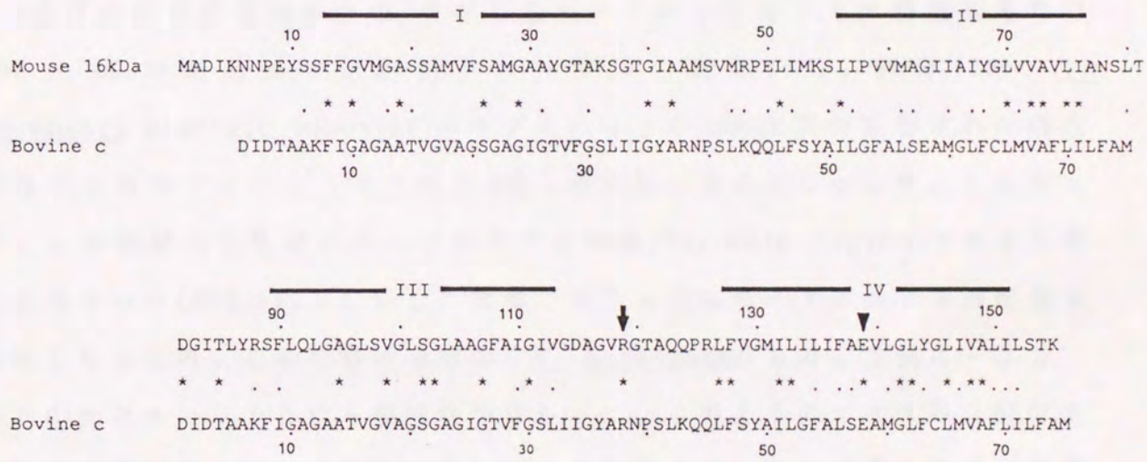
マウス・小脳 16 kDaサブユニットの推定アミノ酸配列を他の種(ウシ・副腎(57)、ヒト・腎臓(102)、T. marmorata electric lobes(59)、Drosophila(60)、酵母(58)の16kDa サブユニットの推定アミノ酸配列と比較した。マウス・小脳のサブユニットと一致するアミノ酸残基は(・)で表し、一致しないアミノ酸残基のみを示した。hydropathy plotと、二次構造予測から予測される、膜貫通領域(I、II、III、IV)を示した。2番目と4番目の膜貫通領域で類似性の高い領域を波下線で、DCCDが結合することが予想されるグルタミン酸残基を(▼)で示した。

```
                                  ──────── I ────────                          ──────── II ────────
                                 10         .         30         .         50         .         70
Mouse                  MADIKNNPEYSSFFGVMGASSAMVFSAMGAAYGTAKSGTGIAAMSVMRPELIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLI
Human                  MSES.SG...A...A.....A......L.......................Q.........................
Bovine                 MSEA..G...A...A.....A......L.......................M.........................
T. marmorata            MSTPGA....A....I...A......L.............................................
Drosophila           MSSEVSSD..I.GP.......A..II...L.............................................
S. cerevisiae           MTELC.V.AP...AI.CA..II.TSL..........V..C.TC.L..D.LF.N.V..I............S..V

                          ──────── III ────────                  ──────── IV ────────
                         90         .         110         .         130        ▼.         150
ANSLTDGIT  LYRSFLQLGAGLSVGLSGLAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLFVGMILILIFAEVLGLYGLIVALILSTK
....N.D.S  ...................................................................
....N...S  ...................................................................
.....ED.S  .FK...............................................................
.GA.EEPSKYS...G.IH.....A..F.................................................IY.Y..
CY..GQKQA  ..TG.I.............................SS............................L.NSRATQDVVC
```

図4.7　マウス・小脳 16 kDa サブユニットの推定アミノ酸配列と酵母F-ATPase cサブユニットのアミノ酸配列の比較。

マウス・小脳の16 kDa サブユニットの推定アミノ酸配列と、酵母F-ATPaseのcサブユニット(105)のアミノ酸配列を比較して並べた。予想した膜貫通領域を上に(I、II、III、IV)で示した。16 kDaサブユニットの前半、後半部分それぞれがcサブユニットと類似し、1個の16 kDa サブユニットは2個のcサブユニットが並んだ形であることがわかった。DCCDが結合すると予想されるGlu-139を(▼)で、膜表在性部分の結合に関与することを示唆したArg-129を(⬇)で示した。



る位置にGlu-139が保存されていた。このようなグルタミン酸残基はアミノ末端側半分には保存されていなかった。V-ATPaseの16 kDaサブユニットではこのGlu-139にDCCDが結合することが予想された。このグルタミン酸残基から20残基アミノ末端側の膜から突き出していると予測されている領域には、大腸菌F-ATPaseにおいて膜表在性部分との相互作用に重要であることが示唆されているArg-39(105)に対応する位置にArg-129が保存されていた。したがって、16 kDaサブユニットのこの領域が膜表在性部分のサブユニットとの相互作
用に関与することが示唆された。

3番目の膜貫通領域の中の(マウスのサブユニットのアミノ酸残基番号で107 - 120の領域はウシ副腎クロマフィン顆粒(57)、酵母(58)、T. marmorata electric lobes(59)のサブユニットのcDNA配列が報告された時点ではウシのサブユニットでは他の2種と相同性が見られなかった。したがって、この領域は生物種によって変化する領域(Variable region)であると考えられていた(図4.1)。しかし、本章でマウス小脳のサブユニットの配列を決定したところ、この領域は酵母、T. marmorataのものと完全に一致し、ウシのサブユニットとのみ相同性がなかった。このようにマウスから酵母まで完全に保存されている配列がウシでのみ異なっているとは考え難く、著者は原著論文(106)でウシ・クロマフィン顆粒のサブユニットの配列が誤っている可能性を指摘した。著者の指摘どおりにウシのサブユニットのcDNA配列が訂正され、この領域は全ての種で保存されていることが確認された。本研究で決定したcDNA配列がほ乳類で最初の正確な16 kDaサブユニットに対応するcDNA配列である。

4.3.2　ヒト 16 kDaサブユニットの遺伝子の構造

シナプス小胞、クロマフィン顆粒、リソゾームなどさまざまな細胞内膜系に存在するV-ATPaseが全く同一のものであるかどうかは興味深い。この疑問に答える第一歩として、16 kDaサブユニットが単一の遺伝子にコードされているかどうかを検討した。ライブラリーとして、現在までに当研究室でいくつかの遺伝子がクローン化されているヒト染色体ライブラリーを用いた(98)。約100,000個のプラークから6個の陽性クローン(vp1、vp2、vp3、vp4、vp5、vp6)を得た(図4.8)。

vp1はプローブとのハイブリダイゼーションが弱く、おそらく16 kDaサブユニットの遺伝子ではないと結論した。また、制限酵素断片の分析から、vp2とvp5は、ほぼ同一の遺伝子を含んでいることが明らかになったのでvp2、vp3、vp4、vp6について部分塩基配列を決定した。 vp3、vp2、vp4、vp6の決定した塩基配列のうち保存性が高い、4番目の膜貫通領域から下流の塩基配列と推定アミノ酸配列を並べて比較した(図4.9)。この領域のvp3の推定アミノ酸配列は第4章4.3.1で得られたマウス・小脳の16 kDaサブユニットの配列と全く同じだった。vp3の対するvp2、vp4、vp6の相同性は、66、74、84 %で高い相同性が存在した。したがって、ヒト16 kDaサブユニットの遺伝子は偽遺伝子を含めて4個以上存在することが示唆された。

vp3の推定アミノ酸配列がマウスの16 kDaサブユニットのアミノ酸配列と全く同じだったことから、この遺伝子が実際に発現しているサブユニットをコードしていると考えられ、この領域にはイントロンが存在しないことが示唆された。vp2、vp4の塩基配列はvp3と高い相同性があるが、アミノ酸配列を推定したとき読み枠が16 kDaサブユニットと一致せず、これらの遺伝子は偽遺伝子である可能性がある。vp2、vp3、vp4、vp6が転写されているかどう

図4.8　ヒトの16 kDa サブユニットの遺伝子を持つクローンのSouthern hybridizationによる解析。

左の写真は、EcoRIで消化したvp1-vp6のファージDNAを1 %アガロース電気泳動で分離しエチジウムブロマイドで染色した。右は、同様の操作後、Immobilon-N膜に電気的に転写し、Southern hybridizationを行った。プローブはマウス・小脳の16 kDaサブユニットのcDNAのScaI-Nsp(7524)I断片を用いた(図4.3)。上に示した番号はvp1からvp6のクローン名に対応する。白矢印はプローブとハイブリダイズしたDNA断片を示している。

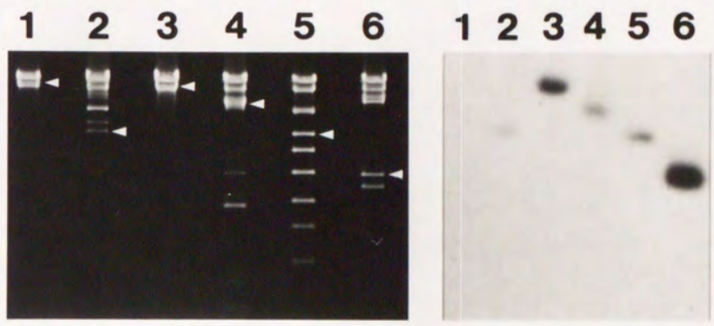
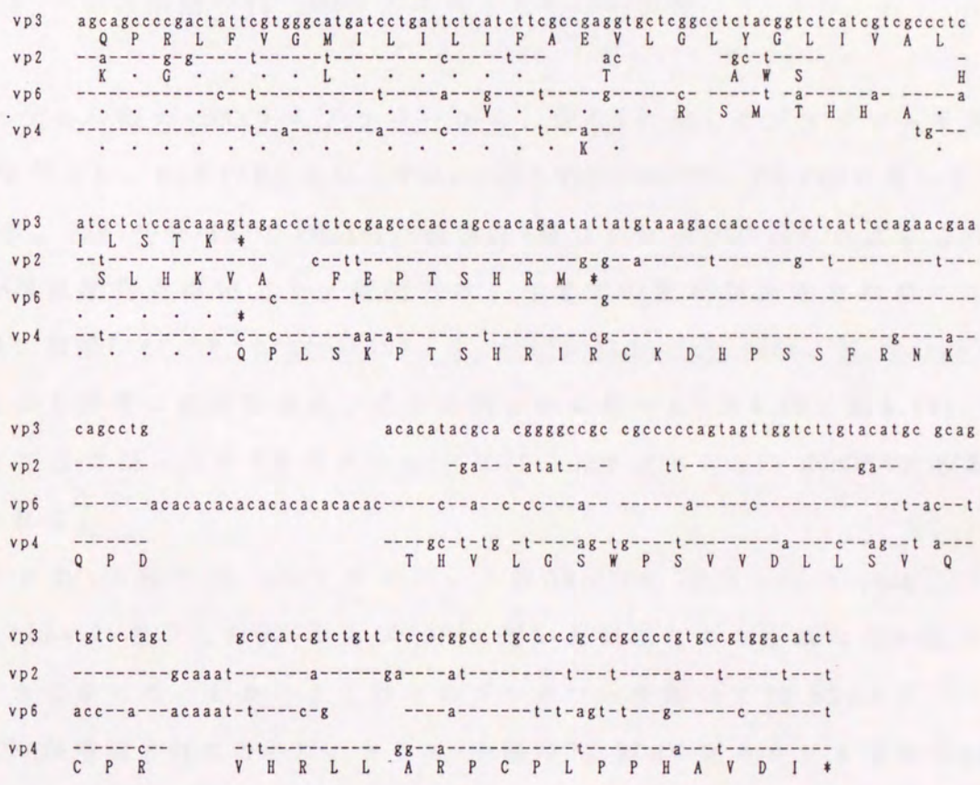


図4.9　ヒト16 kDaサブユニット遺伝子vp2、vp3、vp4、vp6の部分配列

vp2、vp3、vp4、vp6の部分塩基配列と推定アミノ酸配列を比較した。塩基配列は小文字で表し、vp2、vp4、vp6においてvp3と同じ塩基の場合は(-)で表した。アミノ酸配列は大文字で表し、vp3と同じ残基の場合(·)で表した。(*)で終止コドンの位置を示した。この領域のvp3のアミノ酸配列はマウス·小脳の16 kDaサブユニットと完全に一致した。



かさらに詳しい検討が必要である。また、イントロン/エクソンの並び方や、転写制御因子などの組織特異的発現に関与する配列が存在するのかどうか検討するためにさらに上流の配列を決定している。

4.3.3 マウス小脳の72 kDaサブユニットのcDNA配列

マウス小脳のcDNAライブラリーから、図4.1に示したプライマーを用い、PCRを行った。P1とP5Rを用いてVMA1-82PとVMA1-84Pが、P3-P5Rを用いてVMA1-11Pが、P5F-P7を用いてVMA1-12Pの合計4種のクローンが得られた。これらのcDNA塩基配列と推定アミノ酸配列は、今までに配列が決定されたニンジン(48)、酵母(49)、N. crassa(50)、S. acidocaldarius (68)、M. barkeri(69)のものと非常に相同性が高いことが明らかになった(図4.10、図4.11)。したがって上で得られた4種のクローンは72 kDaサブユニットのcDNAであると考えられる。

マウス・小脳の72 kDaサブユニットのGlycine rich sequenceは、プライマー(図4.2)で示したP5FおよびP5R)に用いた領域なので正確なcDNA配列が決定できなかった。しかし、これらのプライマーを用いて72 kDaサブユニットのcDNAが増幅されたことは、マウス・小脳の72 kDaサブユニットでもGlycine-rich sequenceの保存性が高いことが考えられた。また、Glycine-rich sequenceの下流、ニンジンのアミノ酸残基番号278 - 286のにはG-C-G-E-R-G-N-E-Mの配列があり、全ての生物種のサブユニットで保存されていた(図4.11)。この領域のG-E-R配列はF-ATPaseのβサブユニットでも、Glycine-rich sequecneから、ほぼ同じ位置に保存されていた(図4.11)ことは、この配列がATP結合部位の近傍に位置し、触媒反応になんらかの関与していると

図4.10　マウス・小脳の72 kDaサブユニットに対応する部分cDNA塩基配列

PCRを用いて単離されたマウス・小脳の72 kDaサブユニットに対応する部分cDNA(Mu)の塩基配列と(Dc)ニンジン(48)のサブユニットと比較した。ニンジンと同じ塩基は(-)で、同じアミノ酸残基を(・)で表し、異なった場合のみを示した。右に塩基番号とアミノ酸残基番号を示した。

```
Dc    GAATTCGGGCACTTCTTTACTACACATCTATCACATCCACATATCGACTATACATACACGTATAGACACACACATCTAGGTTTTGATCAG    90
                                                                    M  P  S  V  Y  G  D  R  L     (9)
      ATCCGCAGAGTCGAGATCTGAAGCTGTTGATCTGATCTATCGATTTTATCTGAATCTGAGAAGATGCCTTCTGTGTATGGGGATCGATTA   180

      T  T  F  E  D  S  E  K  E  S  E  Y  G  Y  V  R  K  V  S  G  P  V  V  V  A  D  G  M  G  G    (39)
Dc    ACTACGTTCGAAGACTCCGAGAAGGAGAGCGAGTATGGTTACGTCCGTAAGGTATCCGGACCAGTTGTTGTCGCCGATGGAATGGGAGGT   270

      A  A  M  Y  E  L  V  R  V  G  H  D  N  L  I  G  E  I  I  R  L  E  G  D  S  A  T  I  Q  V    (69)
Dc    GCGGCTATGTATGAACTTGTTCGTGTTGGACATGACAATCTTATTGGAGAAATTATTCGTTTGGAAGGAGATTCTGCTACAATCCAAGTT   360
Mu                                                                                    --G---
                                                                                      .  .

      Y  E  E  T  A  G  L  M  V  N  D  P  V  L  R  T  H  K  P  L  S  V  E  L  G  P  G  I  L  G    (99)
Dc    TACGAAGAAACAGCTGGGTTGATGGTGAATGATCCTGTCCTTAGGACACACAAGCCCCTATCTGTGGAGTTGGGTCCTGGAATTCTGGGA   450
Mu    --T--------TTC---TG-A-AT--TGGA--C--C--A--CC-C--TGGT--A--T--C--G--C---C-------C------A-----
      .  .  .  .  S  .  V  Y  .  G  .  .  .  .  .  G  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .

      N  I  F  D  G  I  Q  R  P  L  K  T  I  A  K  R  S  G  D  V  Y  I  P  R  G  V  S  V  P  A   (129)
Dc    AATATCTTTGATGGTATTCAGAGACCTTTGAAGACCATTGCTAAGAGATCAGGTGATGTCTATATCCCTCGCGGTGTCTCGGTACCAGCC   540
Mu    GCC--T----------A---------C--TC-GAT--CAGC-GTCAGA-CCAAAG-A----C-----CA-A--A---AAT-TGT-T--T
      A  .  .  .  .  .  .  .  .  .  S  D  .  S  S  Q  T  Q  S  I  .  .  .  .  .  N  .  S  .

      L  D  K  D  T  L  W  E  F  Q  P  K  K  I  G  E  G  D  L  L     T  G  G  D  L  Y  A  T  V   (158)
Dc    CTTGACAAAGACACACTATGGGAATTTCAGCCTAAAAAAATAGGTGAAGGGGACCTTCTT    ACAGGTGGAGATTTATATGCTACGGTC   627
Mu    --CAGC-G-G-T-TCAA----------ATA--C-GC----ACCTACGG-TT-GTAG--A-ATC-CT--------CA-T----GGATT---
      .  S  R  .  I  K  .  .  .  I  .  S  .  N  L  R  V  G  S  H  I  .  .  .  .  I  .  G  I  .

      F  E  N  S  L  M  Q  H  H  V  A  L  P  P  D  A  M  G  K  I  T  Y  V  A  P  A  G  Q  Y  S   (188)
Dc    TTTGAGAATAGTTTAATGCAACATCATGTTGCTCTGCCTCCTGATGCCATGGGAAAGATAACATATGTTGCTCCAGCTGGTCAATATTCA   717
Mu    AA---T--CTCCC-C--CA--C-CA-AA-CATGTT---C--ACG-AA--GA----GCG-G--T--CA-C--G--GC----GA-T---GAT
      N  D  .  .  .  I  K  .  K  I  M  .  .  .  R  N  R  .  S  V  .  .  I  .  .  P  .  N  .  D

      L  K  D  T  V  L  E  L  E  F  Q  G  V  K  K  Q  F  T  M  L  Q  T  W  P  V  R  T  P  R  P   (218)
Dc    CTAAAGGATACAGTTTTGGAGCTTGAATTTCAAGGCGTCAAGAAGCAATTTACTATGCTTCAGACTTGGCCCGTACGAACTCCCAGGCCT   807
Mu    GC-TCC---GTCG-CC--------------G---GT--G---G-GA-G--C-GC---G-C--AGTG-----T--G-GGCAGGTGC-----
      A  S  .  V  .  .  .  .  .  E  .  .  .  E  K  .  S  .  V  .  V  .  .  .  .  Q  V  .  .

      V  A  S  K  L  A  A  D  T  P  L  L  T  G  Q  R  V  L  D  A  L  F  P  S  V  L  G  G  T  C   (248)
Dc    GTTGCATCAAAGCTTGCCGCTGACACTCCTCTTCTCACAGGACAGCGTGTACTTGATGCCCTTTTCCCATCTGTGCTTGGGGGAACTTGT   897
Mu    --CA-TGAG-----GC----CAATCAC--CT-G--T--T--C---A-A--C--C--------------G-G---TCAG--A------AC-
      .  T  E  .  .  P  .  N  H  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  C  .  Q  .  .  .  T

      A  I  P  G  A  F  G  C  G  K  T  V  I  S  Q  A  L  S  K  Y  S  N  S  D  T  V  V  Y  V  G   (278)
Dc    GCAATTCCTGGTGCATTTGGTTGTGGAAAAACAGTCATTAGTCAGGCTCTTTCCAAGTATTCCAATTCTGACACTGTGGTTTATGTTGGT   987
Mu    --T--C--A--C--C--C--C-CA-----G--T--G---TCC---T----A---------C-----CAG----GTCA-CA-C-----C--C
      .  .  .  .  .  .  .  S  .  .  .  .  .  .  .  S  .  .  .  .  .  .  .  .  V  I  I  .  .  .

      C  G  E  R  G  N  E  M  A  E  V  L  M  D  F  P  Q  L  T  M  T  L  P  D  G  R  E  E  S  V   (308)
Dc    TGCGGGGAAAGAGGAAATGAAATGGCAGAGGTCCTTATGGATTTTCCTCAATTGACAATGACTCTCCCTGATGGCCGTGAAGAGTCTGTC  1077
Mu    -----T--G-----C--C--G-T-T----A--T--CCGC--C--C---G-GC-C--C---GAGG-T   -----GAAA-T------CA--
      .  .  .  .  .  .  .  .  S  .  .  .  R  .  .  .  E  .  .  .  E  V     .  .  K  V  .  .  I

      M  K  R  T  T  L  V  A  N  T  S  N  M  P  V  A  A  R  E  A  S  I  Y  T  G  I  T  I  A  E   (338)
Dc    ATGAAACGTACTACACTTGTGGCCAACACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGCGAGGCTTCAATTTATACAGGAATCACTATAGCAGAA  1167
Mu    -----GA-G--AG-G--G--A--------
      .  .  .  .  A  .  .  .  .  .
```

```
     Y  F  R  D  M  G  Y  N  V  S  M  M  A  D  S  T  S  R  W  A  E  A  L  R  E  I  S  G  R  L   (368)
Dc   TACTTCAGAGATATGGGTTACAATGTTAGTATGATGGCAGATTCAACATCCCGATGGGCAGAAGCTTTAAGAGAAATTTCAGGGCGATTG 1257

     A  E  M  P  A  D  S  G  Y  P  A  Y  L  A  A  R  L  A  S  F  Y  E  R  A  G  K  V  K  C  L   (398)
Dc   GCAGAAATGCCTGCTGATAGTGGGTATCCTGCTTACTTGGCAGCTCGTTTAGCGTCCTTCTATGAGCGTGCTGGTAAGGTGAAGTGCCTT 1347

     G  G  P  E  R  N  G  S  V  T  I  V  G  A  V  S  P  P  G  G  D  F  S  D  P  V  T  S  A  T   (428)
Dc   GGTGGACCAGAACGTAACGGTAGTGTTACTATCGTTGGTGCTGTTTCACCTCCAGGAGGAGATTTTTCTGACCCTGTTACATCTGCCACA 1437

     L  S  I  V  Q  V  F  W  G  L  D  K  K  L  A  Q  R  K  H  F  P  S  V  N  W  L  I  S  Y  S   (458)
Dc   CTCAGCATCGTTCAGGTCTTTTGGGGTTTAGACAAAAAGTTGGCACAGAGGAAACATTTTCCTTCTGTGAACTGGCTCATCTCCTATTCA 1527

     K  Y  S  T  A  L  E  S  F  Y  E  K  F  D  S  D  F  I  D  I  R  T  K  A  R  E  V  L  Q  R   (488)
Dc   AAGTATTCAACAGCATTGGAGTCCTTTTATGAGAAATTTGATTCAGACTTTATCGACATCAGGACAAAAGCTCGTGAGGTTTTGCAGAGG 1617

     E  D  D  L  N  E  I  V  Q  L  V  G  K  D  A  L  A  E  T  D  K  I  T  L  E  T  A  K  L  L   (513)
Dc   GAAGATGATCTGAATGAAATTGTCCAGCTGGTTGGGAAGGATGCTCTAGCAGAAACAGATAAAATTACCTTAGAGACTGCAAAGCTTTTA 1707

     R  E  D  Y  L  A  Q  N  A  F  T  P  Y  D  K  F  C  P  F  Y  K  S  V  W  M  M  R  N  I  I   (543)
Dc   AGGGAGGATTATCTTGCCCAGAATGCATTTACTCCATATGACAAATTTTGTCCTTTTTACAAGTCTGTTTGGATGATGCGCAATATTATC 1797

     H  F  Y  N  L  A  N  Q  A  V  E  R  G  A  G  M  D  G  Q  K  I  S  Y  T  L  I  K  H  R  L   (573)
Dc   CATTTTTACAATCTGGCCAATCAGGCTGTGGAGCGAGGAGCTGGTATGGATGGCCAGAAGATAAGTTATACCCTTATCAAGCATCGTCTA 1887

     G  D  L  F  Y  R  L  V  S  Q  K  F  E  D  P  A  E  G  E  D  V  L  V  G  K  F  K  K  L  H   (603)
Dc   GGGGACCTTTTCTATCGCCTGGTTTCTCAGAAATTTGAGGATCCCGCTGAAGGTGAGGATGTACTTGTAGGGAAGTTCAAGAAACTTCAT 1977

     D  D  L  T  S  G  F  R  N  L  E  D  E  T  R  *                                            (618)
Dc   GATGATCTTACATCTGGTTTCCGGAATCTTGAGGACGAGACACGATGATTGAACATGTTAGGATAATGGTTATATTCCTTGAGAGGTGAT 2067

Dc   AATGATATGTATGCAGCGAAGATAAAATATTGTATTGTTTAGTTTTGTTTTTGAGCCAGCCTGCACTATTCAATAATTGATCCTTATTTT 2157

Dc   ATCTTGAAAGGGGCATCAGGGAGGGTTAGCCCAGGATTACCTACTTTCCTGTTCACTGCCATAGCTGAAAATGGAATGCTAGGCATATAA 2247

Dc   TTTGTTAAAACCCGGGATGGCAGTCTTGTAAAATAGAACCTGTGATTTGCACTGGGGTAGCACCCTCCAAGTTTGTAATTTCTGTTTGGC 2247

Dc   TGCTCTGATATTGTTTTGTAGCGAGCATTATCTCAATAAATCTCCTGGAGATATTTATTT                                2397
```

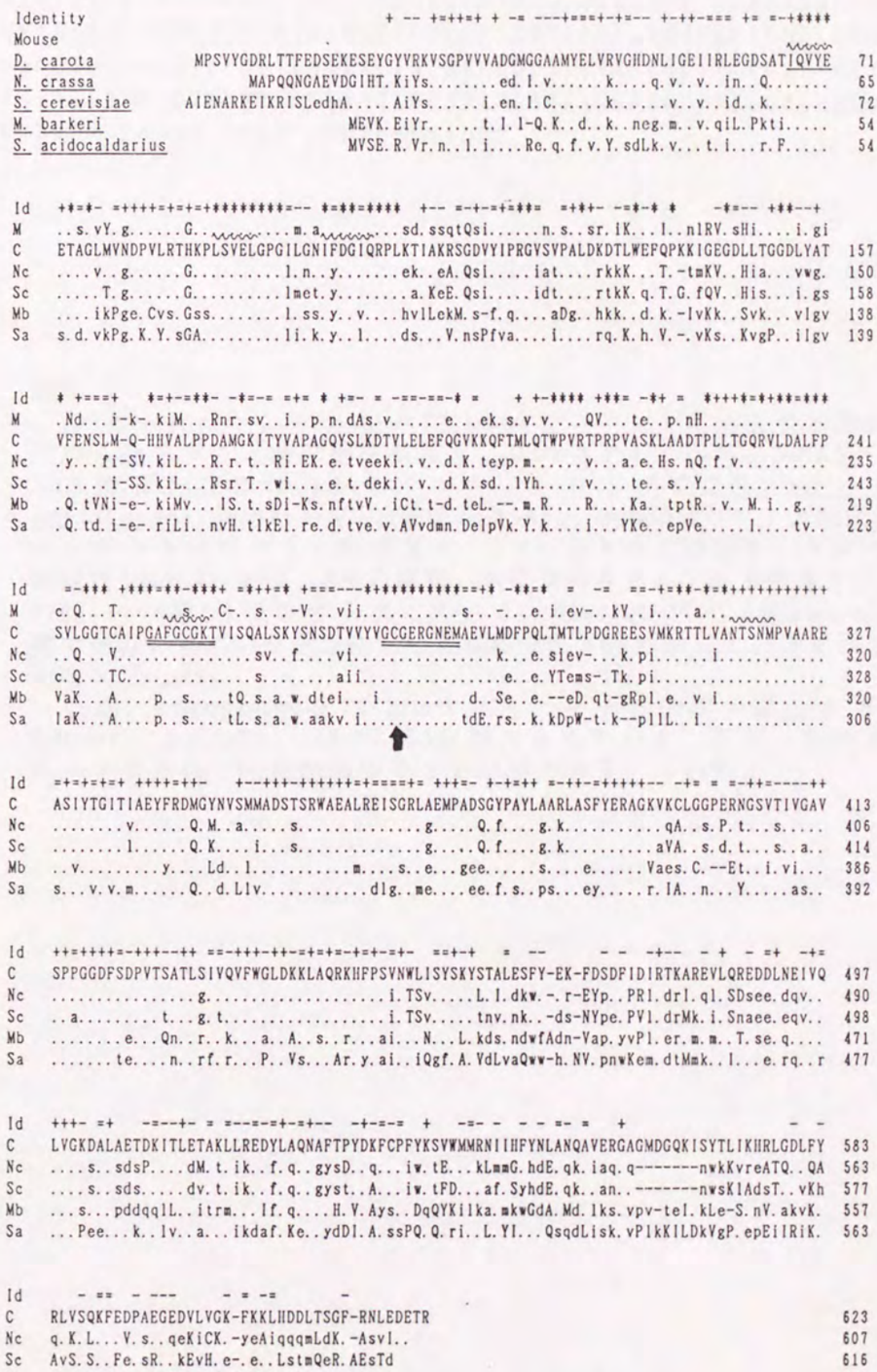
推定されている。

酵母の72 kDaサブユニットの遺伝子にはG-C-G-E-R-G-N-E-M配列中に454残基に相当する塩基配列が挿入されている(図4.11)。この挿入領域がコードする領域はSpacer Proteinと呼ばれ、転写、翻訳された後スプライスされることが示されている(49)。しかし、マウス小脳のサブユニットを含めて他の生物種でもこのような挿入配列は存在しないことが明らかになった。

PCRを用いたクローニングでは4 - 5残基のアミノ酸配列が決定されればプライマーを合成し、目的とするタンパク質のcDNAをクローニングすることができる手法である。しかし、PCRでは2種類のプライマーにはさまれた領域しかクローン化することができない。また、Taq polymeraseで合成したDNAは数100 bpに1 bpの確率で誤った塩基を取り込むことから正確なcDNA配列は決定できない。したがって、正確な配列を決定するために、また、プライマーではさまれていない領域の配列を決定するために、上で得られた4種類のcDNAをプローブにしてマウス・小脳のcDNAライブラリーを検索し、100,000個のプラークから4個の陽性クローンを得た。現在、これらのクローンのcDNA配列を決定している。

図4.11　マウス・小脳の72 kDaサブユニットの推定部分アミノ酸配列と他の生物種のサブユニットとの比較

(A)



(B)

IENIEVGNKVMGKDGRPREVIKLPRGRETMYSVVQKSQHRAHKSDSSREVPELLKFTCNA
THELVVRTPRSVRRLSRTIKGVEYFEVITFEMGQKKAPDGRIVELVKEVSKSYPISEGPE
RANELVESYRKASNKAYFEWTIEARDLSLLGSHVRKATYQTYAPILYENDHFFDYMQKSK
FHLTIEGPKVLAYLLGLWIGDGLSDRATFSVDSRDTSLMERVTEYAEKLNLCAEYKDRKE
PQVAKTVNLYSKVVRGNGIRNNLNTENPLWDAIVGLGFLKDGVKNIPSFLSTDNIGTRET
FLAGLIDSDGYVTDEHGIKATIKTIHTSVRDGLVSLARSLGLVVSVNAEPAKVDMNGTKH
KISYAIYMSGGDVLLNVLSKCAGSKKFRPAPAAAFARECRGFYFELQELKEDDYYGITLS
DDSDHQFLLANQVVVHNCFAKGTNVLMADGSIEC

図4.11 (続き)

(A)得られたマウス・小脳の72 kDaサブユニットに対応する部分cDNAの塩基配列から部分アミノ酸配列を推定し、Dcはニンジン(42)、NcはN. crassa (43)、Scは酵母(44)の72 kDaサブユニットおよびMbはM. barkeri(62)、SaはS. acidokaldarius(61)のATP合成酵素のlarge subunitのアミノ酸配列と比較した。ニンジンと同じアミノ酸残基を(・)で、保存的な置換を小文字で表した。(id)相同性(Identity)は、6種の生物、全てで保存されている残基を(*)で、5種(+)、4種(=)、3種(-)の場合を示している。Glycine-rich sequenceと、全ての生物種で保存されているG-E-R-G-N-E-M配列を下線で示した。右に残基番号(括弧内)を右に示した。

(B)S. cerevisiaeの72 kDaサブユニットは矢印の部分に下に示すようなSpacer protein (454残基)が挿入されている。転写、翻訳された後スプライシングされて成熟型になることが示されている(49)。

第5章　総括と展望

V-ATPaseはリソゾーム、ゴルジ体、クロマフィン顆粒やシナプス小胞などの細胞内膜系と呼ばれるオルガネラに存在し、ATP分解に共役してH^+を輸送し、小胞内を酸性化あるいは小胞内外に電気化学的ポテンシャル差を形成する。このようなV-ATPaseの役割は各オルガネラの機能に密接にかかわっている。V-ATPaseはBafilomycin、NEM、NO_3^-によって特異的に阻害され、N_3^-やバナジン酸で阻害されないことから、F-ATPaseやP-ATPaseとは異なるタイプのATPaseである。しかし、V-ATPaseとF-ATPaseの性状は阻害剤に対する感受性に差があるが多くの点で類似している。すなわち、触媒部位が存在すると考えられている膜表在性部分と、H^+通路として機能していると考えられている膜内在性部分から構成されている。また、触媒部位を構成していると考えられている72 kDaと57 kDaサブユニットや、H^+通路を形成していると考えられている16 kDaサブユニットの一次構造がそれぞれF-ATPaseのβ、α、cサブユニットと類似している。また、DCCDが膜内在性部分のサブユニットに結合して活性を阻害する。

このように、酵素化学的な類似点が多いV-ATPaseとF-ATPaseの構造や反応機構が類似しているのかどうか、H^+を輸送するATPaseの機構を統一的に理解する上でも興味深い問題だった。本論文において、V-ATPaseの反応機構を検討した結果その反応機構はF-ATPaseと共通点が存在すること明らかになった。Km_1 (5 μM)、Km_2 (30 μM)、Km_3 (300 μM)の3個のKm値が存在することから、複数の触媒部位が存在し、それらが協同して触媒反応を行うことを示唆し、また、V-ATPaseにはF-ATPaseと同様に高親和性の触媒部位が存在することを示し、さらに、V-ATPaseの阻害剤Bafilomycinは非常に低濃度(10 nM以

下)で膜内在性部分に結合し、活性を阻害することを示した。これと同様の機構でOligomycinがF-ATPaseを阻害することが知られている。

V-ATPaseではF-ATPaseのF_1のように、活性を持った膜表在性部分は調製されていない。本論文で示したようにF-ATPaseでは結合ヌクレオチドが結合していない酵素は調製できなかった。一方、V-ATPaseでは調製することができた。また、Uni-site反応の解析から過剰のATP存在下での活性の促進効果は約10^2倍でF-ATPaseの場合の10^4 - 10^5倍に比べて低かった。V-ATPaseではBafilomycinによって酵素へのATP結合は阻害されにくく、複数の触媒部位による協同的な反応をより強く阻害することを示唆した。一方、F-ATPaseの場合OligomycinはATPの結合を阻害することが報告されている。このことは、V-ATPaseとF-ATPaseでは阻害剤が酵素に結合して起こる構造変化に違いがあることを示している。例えば、放射性のBafilomycinを用いてその結合部位を明かにし、V-ATPaseのH^+輸送とATPase反応の共役機構を検討することができると考えている。

ゴルジ体、リソゾーム、エンドソームなどそれぞれの内部のV-ATPaseによって酸性pHに保たれている。酸性pHの度合は各オルガネラで異なり、それぞれの機能に密接に関与していることが示されている。この酸性pHの度合の差はV-ATPaseの性状、例えば活性の制御などの性状が異なる可能性が考えられる。本研究でクロマフィン顆粒の反応機構を検討したように、各オルガネラのV-ATPaseの応速度論的なパラメーターを比較することによってV-ATPaseの性状が異なるのかどうか検討することができる。また、第4章 4.3.2で16 kDaサブユニット遺伝子が複数存在することが示唆されたことから、V-ATPaseのIsoformが存在した場合、その性状の差を反応速度論的なパラメーターを比較検討することで明かにすることができるようになったと考える。

BafilomycinとOligomycinによるF-ATPaseとV-ATPaseの阻害機構の差は二

つのATPaseのどのような構造上の違いが原因で起こるのか興味深かった。そこで、H^+通路を形成している16 kDaサブユニットとATP結合部位が存在していることが示唆されている72 kDaサブユニットの一次構造を決定した。材料はV-ATPaseが大量に存在していることが示されているシナプス小胞を選び、マウス・小脳から72 kDaおよび16 kDaサブユニットcDNAクローンを単離し配列を決定した。

マウス・小脳16 kDaサブユニットは疎水性が高く膜を4回貫通することが予想された。膜貫通領域は進化の過程でその保存性が極めて高く、H^+通路を形成する上で必須の残基が数多く存在していることを示した。また、16 kDaサブユニットのcDNA配列はF-ATPaseのcサブユニットが2個並んだ形をしており、カルボキシル末端側半分には、cサブユニットのDCCD結合部位に対応する位置にグルタミン酸残基が保存されていた。これは、16 kDaサブユニットでは8 kDaの祖先タンパク質の遺伝子が重複し、cサブユニット重複せずに進化したと考えられる。このような、H^+通路を形成しているサブユニットの構造の差がBafilomycinとOligomycinの阻害機構の差となっているのかも知れない。

V-ATPaseはさまざまな細胞内膜系に存在することが知られているが、その構造が全く同一なのかあるいは異なるのか、また、何故シナプス小胞の存在する神経細胞に大量に存在するのか、その組織特異的な発現機構は明かでない。この問題を解決する第一歩として、16 kDaサブユニットの遺伝子が何種類あるのかを検討した。ヒト染色体ライブラリーを検索した結果、ヒト16 kDaサブユニットの遺伝子は、偽遺伝子を含めて少なくとも4種類存在することが示唆された。しかし、これらの遺伝子が発現しているかどうか、さらに詳細な解析が必要である。また、クローンのアミノ末端およびその上流領域の配列を決定することでイントロ/エクソンの並び方や、転写調節因子を含

めた組織特異的発現の機構を明かにすることができると考えている。

シナプス小胞のV-ATPaseの72 kDaサブユニットのcDNA配列の一部を決定し、これまでに配列が決定された他の生物種の72 kDaサブユニットと相同性が高いことを示した。とくに、Glycine-rich sequenceとその下流に存在するG-C-G-E-R-G-N-E-M配列の相同性を高いことが示した。さらに、アミノ末端及びカルボキシル末端領域のcDNA配列を決定することが必要である。本研究で得られたcDNAによって、今後、72 kDaサブユニットに対応する遺伝子の種類、構造、組織特異的な発現調節機構等を明らかにするための基礎ができた。また、遺伝学的な手法が他のほ乳類よりも進んでいるマウスを材料に選んだことにより、今後、V-ATPaseの性状および機能、さらに細胞内膜系における酸性化とH^+の電気化学的ポテンシャル差の意義を個体レベルで、また、細胞生物学的な見地で研究解析することができると考えている。

参考文献

1. Futai, M., and Kanazawa, H. 1983. Structure and Function of Proton-translocating ATPase (F_oF_1): Biochemical and Molecular Biological Approaches. Microbiol. Rev. 47, 285- 312.

2. Walker, J. E., Saraste, M., and Gay, N. J. 1984. Nucleotide Sequence, Regulation and Structure of ATP-Synthase. Biochim. Biophys. Acta 768, 164-200.

3. Senior, A. E. 1985. The Proton-ATPase of Escherichia coli. Curr. Top. Membr. Transp. 23, 135-151.

4. Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. 1989. ATP Synthase (H^+-ATPase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches. Ann. Rev. Biochem. 58, 111-136.

5. Sachs, G., Chang, H. H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., and Saccomani, G. 1976. A Nonelectrogenic H^+ Pump in Plasma Membrane of Hog Stomach. J. Biol. Chem. 251, 7690-7698.

6. Nakamoto, R. K., and Slayman, C. W. 1989. Molecular Properties of the Fungal Plasma Membrane [H^+]-ATPase. J. Bioenerg. Biomemb. 21,621-632.

7. Pederson, P. L., and Carafoli, E. 1987. Ion Motive ATPases. I. Ubiquitary, Properties and Significance to Cell Function. Trends Biochem. Sci. 12, 146-150.

8. Pederson, P. L., and Carafoli, E. 1987. Ion Motive ATPases. II. Energy Coupling and Work Output.. Ubiquitary, Properties and Significance to Cell Function. Trends Biochem. Sci. 12, 186-189.

9. Jorgensen, P. L. 1982. Mechanism of Na^+, K^+ Pump: Protein Structure and Conformations of the Pure (Na^++K^+)-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 694, 7-68.

10. Inesi, G. 1985. Mechanism of Calcium Transport. Ann. Rev. Physiol. 47, 573-601.

11. Hall, K., Perez, G., Anderson, D., Guitierrez, C., Munson, K., Hersey, S. J., Kaplan, J. H., and Sachs, G. 1990. Location of the Carbohydrates Present in the HK-ATPase Vesicles Isolated from Hog Gastric Mucosa. Biochem. 9, 701-706.

12. Toh, B.-H., Gleeson, P. A., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Callaghan, J. M. Golkorn, I., Jones, C. M., Martinelli, T. M., Mu, F.-T., Humphiris, D. C., Pettitt, J. M., Mori, Y., Masuda, T., Sonieszczuk, P., Weinstock, J., Mantamadiotis, T., and Baldwin, G. S. 1990. The 60- to 90-kDa Parietal Cell Autoantigen Associated with Autoimmune Gastritis Is a β Subunit of the Gastric H^+/K^+-ATPase (Proton Pump). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 6418-6422.

13. Mercer R. W. Schneider J. W., Savitz, A., Emanuel, J. R., Benz, E. J.,Jr., and Levenson, R. 1986. Rat -Brain Na, K-ATPase β -chain Gene: Primary Structure, Tissue Specific Expression, and Amplification in Oubain-Resistant HeLa C^+ Cells. Mol. Cell. Biol. 6, 3884-3890.

14. Young, R. M., Shull, G. E., and Lingrel J. B. 1987. Multiple mRNA from Rat Kidney and Brain Encode a Single Na+,K+-ATPase β Subunit Protein. J. Biol. Chem. 262, 4905.

15. Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R. and Wada, Y. 1989. Structure and Function of the Yeast Vacuolar Membrane Proton ATPase. J. Bioenerg. Biomemb. 21, 589-603.

16. Forgac, M. 1989. Structure and Function of Vacuolar Class of ATP-driven Proton Pumps. Physiol. Rev. 69, 765-796.

17. Stone, D. K., Crider, B. P., Sudhof, T. C., and Xie, X.-X. Vacuolar Proton Pump. J. Bioenerg. Biomemb. 21, 605-620.

18. Nelson, N. 1989. Structure, Molecular Genetics, and Evolution of Vacuolar H^+-ATPases. J. Bioenerg, Biomembr. 21, 553-571.

19. Basu, S. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. 1978. Characterization of LDL Receptor in Membrane Preparations from Human Fibroblast. J. Biol. Chem. 253, 3852-3856.

20. Umemoto, N., Yoshihisa, T., Hirata, R. and Anraku, Y. 1990. Roles of the VMA3 Gene Product, Subunit C of the Vacuolar Membrane H^+-ATPase on Vacuolar Acidification and Protein Transport: A Study with VMA3-disrupted Mutants of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 265, 18447-18453.

21. Helenius, A., Kartenbeck, K., and Simons. 1980. On the Entry of Semliki Forest Virus into BHK-21 Cells. J. Cell. Biol. 84, 404-420.

22. Umata, T., Moriyana, Y., Futai, M., Mekada, E. 1990. The Cytotoxic Action of Diphtheria Toxin and Its Degradation in Intact Vero Cells Are Inhibited by Bafilomycin A_1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-type H^+ ATPase. J. Biol. Chem. 265, 21940-21945.

23. Swallow, C. J., Grinstein, S., and Rotstein, O. D. 1988. Cytoplasmic pH Regulation in Macrophages by an ATP dependent and N, N'-dicyclehexylcarbodiimide-sensitive Mechanism. J. Biol.Chem. 263, 19558-19563.

24. Swallow, C. J., Grinstein, S., and Rotstein, O. D. 1990. A Vacuolar Type H^+-ATPase Regulation Cytoplasmic pH in Murine Macrophages. J. Biol. Chem. 265, 7645-7654.

25. Sundquist, K., Lakkakorpi, P., Wallmark, B., Vaananen, K. 1990. Inhibition of Osteoclast Proton Transport by Bafilomycin A_1 Abolishes Bone Resorption. Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 309-13.

26. Moriyama, Y., and Futai, M. 1990. H^+-ATPase, Primary Pump for Accumulation of Neurotransmitters, Is a Major Constituent of Brain Synaptic Vesicles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 443-448.

27. Moriyama, Y., and Futai, M. 1990. Energy Coupling of L-Glutamate Transport and Vacuolar H^+-ATPase in Brain Synaptic Vesicles. J. Biochem. (Tokyo) 108, 689-693.

28. Cidon, S., and Shira, T. 1989. Characterization of a H^+-ATPase in Rat Brain Synaptic Vesicles; Coupling to L-Glutamate Transport. J. Biol. Chem. 264, 8281-8288.

29. Moriyama, Y., and Futai, M. 1990. Presence of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) Transport Coupled with Vacuolar-type H^+-ATPase in Neurosecretory Granules from Bovine Posterior Pituitary. J. Biol.Chem. 265, 9165-9169.

30. Njus, D., Kelly, P. M., and Harnadek, G. J. 1986. Bioenergetics of Secretory Vesicles. Biochim. Biophys. Acta 853, 237-265.

31. Mandala, S., Taiz, L. 1986. Characterization of the Subunit Structure of the Maize Tonoplast ATPase. J. Biol. Chem. 261. 12850-12855.

32. Bowman, E.J., Mandala, S., Taiz, S., and Bowman, B. J. 1986. Structural Studies of the Vacuolar Membrane ATPase from Neurospora crassa and Comparison with the Tonoplast Membrane ATPase from Zea mays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 48-52.

33. Moriyama, Y. and Nelson, N. 1987. Nucleotide Binding Sites and Chemical Modification of the Chromaffin Granule Proton ATPase. J. Biol. Chem. 262, 14723-14729.

34. Moriyama, Y., and Nelson, N. 1989. Cold Inactivation of Vacuolar Proton-ATPases. J. Biol.Chem. 264, 3577-3582.

35. Uchida, E, Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1985. Purification and Properties of H^+-translocating ATPase from Vacuolar Membranes of S. cerevisiae. J. Biol. Chem. 260, 1090-1095.

36. Lardy, H., Reed, P., and Lin, C. -H. C. 1975. Antibiotic Inhibitors of Mitochondrial ATP Synthase. Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 34, 1707-1710.

37. Werner, G., Haegnenmaier, H., Baumgartner, A., and Zahner, H. 1984, Metabolic Products of Microorganisms. 224 Bafilomycins, a New Group of Macrolide Antibiotics; Production, Isolation, Chemical Structure and Biological Activity. J. Antibiot. 37, 110-117.

38. Bowman, E. J., Siebers, A., and Altendorf, K. 1988, Bafilomycins: A Class of Membrane ATPases from Microorganisms, Animal Cells, and Plant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7972-7976.

39. Moriyama, Y., and Nelson, N. 1989. H^+-translocating ATPase in Golgi Apparatus; Characterization as Vacuolar H^+-ATPase and Its Subunit Structures. J. Biol. Chem. 264, 18445-18450.

40. Moriyama, Y., and Nelson, N. 1989. Lysosomal H^+-translocating ATPase Has a Similar Subunit Structure to Chromaffin Granule H^+-ATPase Complex. Biochim. Biophys. Acta 980, 241-247.

41. Schweike, H., Klein, U., Schindlbeck, M., and Wieczorek, H. A Vacuolar-type ATPase, Partial Purified from Potassium Transporting Plasma Membranes of Tobacco Hornworm Midgut. J. Biol. Chem. 264, 11136-11142.

42. Nelson, N., Cidon, S., and Moriyama, Y. Chromaffin Granules Proton Pump. Method. Enzymol. 157, 619-633.

43. Xie, X.-S., Stone, D. K., Racker, E. 1988. Proton Pump of Clathrin-coated Vesicles. Method. Enzymol. 157, 634-646.

44. Bowman, B. J., William, J. D., Harris, T., and Bowman, E. J. 1989. The Vacuolar ATPase of Neurospora crassa Contains an F_1-like Structure. J. Biol. Chem. 264, 15606-15612.

45. Arai, H. Terres, G., Pink., S., and Forgac, M. 1988. Topography and Subunit Stoichiometry of the Coated Vesicle Proton Pump. J. Biol. Chem. 263, 8796-8802.

46. Uchida, E. Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1988. Characterization and Function of Catalytic Subunit a of H^+-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol.Chem. 263, 45-51.

47. Sun, X. -Z., Xie, X.-S., and Stone, D. K. 1987. Isolation and Reconstitution of the Dicyclohexylcarbodiimide-sensitive Proton Pore of the Clathrin-coated Vesicles Proton Translocating Complex.

J. Biol. Chem. 262, 14790-14794.

48. Zimniak, L., Dittrich, P., Gogarten, J. P., Kibak, H., and Taiz, L. 1988. The cDNA Sequence of the 69 kDa Subunit of the Carrot Vacuolar H^+-ATPase; Homology to the β-chain of F_oF_1-ATPase. J. Biol. Chem. 263, 9102-9112.

49. Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Anraku, Y. 1990. Molecular Structure of a Gene, VMA1, Encoding the Catalytic Subunit of H^+-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 265, 6726-6733.

50. Bowman, E. J., Tenney, K., and Bowman, B. 1988. Isolation of Genes Encoding the Neurospora Vacuolar ATPase; Analysis of vma-1 Encoding the 67 kDa Subunit Reveals Homology to Other ATPase. J. Biol. Chem. 263, 13994-14001.

51. Nelson, H., Mandiyan, S., and Nelson, N. 1989. A Conserved Gene Encoding the 57-kDa Subunit of the Yeast Vacuolar H^+-ATPase. J. Biol. Chem. 264, 1775-1778.

52. Bowman, B. J., Allen, R., Wechser, M. A., and Bowman, E. J. Isolation of the Gene Encoding the Neurospora crassa Vacuolar Membrane H^+-ATPase: Analysis of vma-2 Encoding the 57 kDa Polypeptide and Comparison to vma-1. 1988. J. Biol.Chem. 263, 14002-14007.

53. Sudhof, T. C., Fried, V. A., Stone, D. K., Jhonstone, P. A. and Xie, X.-S. 1989. Human Endomembrane H^+ Pump Strongly Resembles the ATP-synthetase of Archaebacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6067-6071.

54. Hell, A., Muller, G., Noda, L., Pinder, T., Scirmer, H., Schirmer, I., and von Zahen, I. 1974. The Amino-acid Sequence of Porcine Adenylate Kinase from Skeltal Muscle. Eur. J. Biochem. 43, 131-144.

55. Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C., Weinberg, R. A., Apageorge, A. G., Scolnick E. M., Dhar, R., Lowry, D. R., and Change, E.H. 1982. Mechanism of Activation of a Human Oncogene. Nature 300, 143-149.

56. Kuby, S. A., Pallmieri, R. H., Fischer, A. H., Wu, L. H., Maland, L., and Manship, M. 1984. Studies on Adenylate Triphospahate Transphosphorylases. Amino acid Sequence of Rabbit Muscle ATP-AMP Transphosphorylase. Biochemistry 23, 2393-2399.

57. Mandel, M., Moriyama, Y. Hulmes, J. D., Pan, Y.-C. E., Nelson, H., and Nelson, N. 1988. cDNA Sequence Encoding the 16 kDa Proteolipid of Chromaffin Granules Implies Gene Duplication in the Evolution of H^+-ATPases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85, 5521-5524.

58. Nelson, H., and Nelson, N. 1989. The Progenitor of ATP Synthases was Closely Related to the Current Vacuolar H^+-ATPase. FEBS Lett. 247, 147-153.

59. Birman, S., Meunier F.-M., Lesbats, B., Le Caer, J.-P., Rossier, J., and Israel, M. 1990. A 15 kDa Proteolipid Found in Mediatophore Preparations from Torpedo Electric Organ Presents High Sequence Homology with the Bovine Protonphore. FEBS Lett. 261, 303-306.

60. Meagher, L., McLean, P., Finbow, M. E. 1990, Sequence of a cDNA from Drosophila coding H^+-ATPase. Nucleic Acids Res. 18, 6712.

61. Johnson, R. G., Beers, M. F., and Scarpa, A. 1982. H^+ATPase of Chromaffin Granules; Kinetics, Regulation, and Stoichiometry. J. Biol. Chem. 257, 10701-10707.

62. Gronberg, M., and Flatmark, T. 1987. Studies on Mg^{2+}-dependent ATPase in Bovine Adrenal Chromaffin Granules with Special Reference to the Effect of Inhibitors and Energy Coupling. Eur. J. Biochem. 164, 1-8,

63. Boyer, P. D. 1989. A Perspective of the Biding Change Mechanism for ATP Synthesis. FASEB J. 3, 2164-2178.

64. Grubmeyer, C., Cross, R. L., and Penefsky, H. S. 1982. Mechanism of ATP Hydrolysis by Beef Heart Mitochondrial ATPase. Rate Constants for Elementary Steps in Catalysis at a Single Site. J. Biol. Chem. 12092-12100.

65. Cross, R. L., Grubmeyer, C., and Penefsky, H. S. 1982. Mechanism of ATP Hydrolysis by Beef Heart Mitochondrial ATPase; Rate Enhancements Resulting from Cooperative Interactions between Multiple Catalytic Sites. J. Biol. Chem. 12101-12105.

66. Moriyama, Y., and Nelson, N. 1987. The Purified ATPase from Chromaffin Granule Membrane Is an Anion-dependent Proton Pump. J. Biol. Chem. 262, 9175-9180.

67. Kasho, V. N., and Boyer, P. D. 1989. Vacuolar ATPase, like F_1,F_o-ATPases, Shows a Strong Dependence of the Reaction Velocity on the Binding of More than One ATP per Enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 8708-8771.

68. Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T., and Yoshida, M. 1988. The Membrane-associated ATPase from Sulfolobus acidocaldarius Is Distantly Related to F_1-ATPase as Assessed from the Primary Structure of Its α-subunit. J. Biol. Chem. 263, 6012-6015.

69. Inatomi, K., Eya, S., Maeda, M., and Futai, M. 1989. Amino Acid Sequence of the α and β subunits of Methnosarcina barkeri. ATPase Deduced from Cloned Genes: Similarity to Subunits of Eukaryotic Vacuolar and F_oF_1-ATPase. J. Biol. Chem. 264, 10954-10959.

70. Ida, K,. Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T, and Futai, M. 1991 Catalytic Sites of F_1-ATPase of Escherichia coli: Lys-155 and Lys-201 of the β Subunit Are Located near the γ Phosphate Group of ATP in the Presence of Mg^{2+}. J. Biol. Chem. 266, 5424-5429.

71. Takeyama, M., Ihara, K., Moriyama, Y., Noumi, T., Ida, K., Tomioka,N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. 1990. The Glycine-richSequence of the β subunit of Escherichia coli H^+-ATPase Is Important for Activity. J. Biol. Chem. 265, 21279-21284.

72. Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. Mutation in Ser-174 and the Glycine-rich Sequence (Gly-149, Gly-150 and Thr-156) in the β Subunit of Escherichia coli H^+-ATPase

73. Cross, R. L., and Nalin, C.M. 1982. Adenine Nucleotide Binding Sites on Beef Heart F_1-ATPase: Evidence for Three Exchangeable Sites That Are Distinct from Three Noncatalytic Sites. J. Biol. Chem. 257, 2874-2881.

74. Boulay, F., Dalbon, P., and Vignais, P. V. 1985. Photoaffinity Labeling of Mitochondrial Adenosinetriphosphatase by 2-Azidoadenosine 5'-[α-^{32}P]Diphosphate. Biochemist. 24, 7372-7379.

75. Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., and Senior, A. E. 1983. Properties of F_1-ATPase from the uncD412 Mutant of Escherichia coli. Biochem. J. 215, 343-350.

76. Perlin, D. S., Latchney, L. R., Wise, J. G., and Senior, A. E. 1984. Specificity of the Proton Adenosinetriphosphatase of Escherichia coli for Adenine, Guanine, and Inosine Nucleotides in Catalysis and Binding. Biochem. 23, 4998-5003.

77. Penefsky, H. S. 1985. Mechanism of Inhibition of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase by Dicyclohexylcarbodiimide and Oligomycin: Relationship to ATP Synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1589-1593.

78. Penefsky, H. S. 1988. Rate of Chase-promoted Hydrolysis of ATP in the High Affinity Catalytic Site of Beef Heart Mitocondrial ATPase. J. Biol. Chem. 263, 6020-6022.

79. Cunningham, D., and Cross, R. L. 1988. Catalytic Site Occupancy during ATP Hydrolysis by MF_1-ATPase; Evidence for Alternating High Affinity Sites during Steady-state Turnover. J. Biol. Chem. 263, 18850-18856.

80. Kanazawa, H., Miki, T., Tamura, F., Yura, T., and Futai, M. 1979. Specialized Transducing Phage λ Carrying the Genes for Coupling Factor of Oxidative Phoshorylation of Escherichia coli: Increased Synthesis of Coupling Factor on Induction of Prophage λ asn. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1126-1130.

81. Futai, M., Sternweis, P. C. and Heppel, L. A. 1974. Purification and Properties of Reconstitutively Active and Inactive Adenosinetriphosphatase from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 2725-2729.

82. Penefsky, H.S. 1977. Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.

83. Hanada, H., Noumi, T., Maeda, M., and Futai, M. 1989. Uni-site Catalysis by Escherichia coli F_1-ATPase with Different Numbers of Bound Nucleotides. FEBS Lett. 257, 465-467.

84. Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. 1990. Kinetic Studies of Chromaffin Granule H^+-ATPase and Effect of Bafilomycin A_1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 873-878.

85. Kironde, F. A. S., and Cross, R. L. 1987. Adenine Nucleotide Binding Sites on Beef Heart F_1-ATPase; Asymmetry and Subunit Location. J. Biol. Chem. 262, 3488-3495.

86. Noumi, T., Taniai, M., Kanazawa, H., and Futai, M. 1986. Replacement of Arginine 246 by Histidine in the β Subunit of Escherichia coli H^+-ATPase Resulted in Loss of Multi-site ATPase Activity. J. Biol. Chem. 261, 9196-9201.

87. Schaffner, W., and Wissmann, C. 1973. Rapid, Sensitive, and Specific Method for Determination of Protein Dilute Solution. Anal. Biochem. 56, 502-514.

88. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254.

89. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

90. Kironde, F. A. S., and Cross, R. L. 1986. Adenine Nucleotide-Binding Sites on Beef Heart F_1-ATPase; Conditions That Affect Occupancy of Catalytic and Noncatalytic Sites. J. Biol. Chem. 261, 12544-12549.

91. Garret, N. E., Penefsky, H. S. 1975. Interaction of Adenine Nucleotides with Multiple Binding Sites on Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 6640-6647.

92. Issartel, J. -P., Lunardi, J., and Vignais, P. V. 1986. Characterization of Exchange and Nonexchangeable Bound Adenine Nucleotide in F_1-ATPase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 261, 895-901.

93. Hoppe, J. and Sebald, W. 1984. The Proton Conducting F_o-part of Bacterial ATP Synthase. Biochim. Biophys. Acta 768, 1-27.

94. Furuichi, T., Yoshikawa, S. Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. 1989. Primary Structure and Functional Expression of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate-binding Protein P400. Nature, 342, 32-38.

95. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (eds.) 1989. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

96. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Strhul, K. (eds.) 1990. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons.

97. Sanger, F., Niklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

98. Maeda, M., Oshiman, K., Tamura, S., Futai, M. 1990, Human Gastric(H^++K^+)-ATPase; Similarity to (Na^++K^+)-ATPase Genes in Exon/Intron Organization but Difference in Control Region. J. Biol. Chem. 265, 9027-9032.

99. Innis, M., A., Gelfand, D., H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.) 1990. PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc.

100. Kozak, M. 1984. Compilation and Analysis of Sequences Upstream from the Translational Start Site in Eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res. 12, 857-872.

101. Breathnach, R., and Chambon, P. 1981. Organization and Expression of Eukaryotic Split Genes Coding for Proteins. Annu. Rev. Biochem. 50, 349-383.

102. Gillespie, G. A. J., Somlo, S., Germino, G. G., Weinstat-Saslow, D., and Reeders, S. T. 1991. CpG Island in the Region of an Autosomal Dominant Polycistic Kidney Disease Locus Defines the 5' End of a Gene Encoding a Putative Proton Channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4289-4293.

103. Noumi, T., Beltran, C., Nelson, H., and Nelson, N. 1991. Mutational Analysis of Yeast Vacuolar H^+-ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1938-1942.

104. Macino,G. and Tzagoloff,A.1979. Assembly of the Mitochondrial Membrane System: Partial Sequence of a Mitochondrial ATPase Gene in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 131-135.

105. Fillingame, R., H. 1990. Molecular Mechanics of ATP Synthesis by F_1F_o-Type H^+-Transporting ATP Synthases. The Bacteria vol. XII, 345-391.

106. Hanada, H., Hasebe, M., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. 1990. Molecular Cloning of cDNA Encoding the 16 kDa Subunit of Vacuolar H^+-ATPase from Mouse Cerebellum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 1062-1067.

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所 二井研究室で行いました。本稿を終えるに当たり、6年間にわたってご指導、ご鞭撻を賜りました二井將光教授に心から感謝致します。

本研究に対して多くの貴重なご助言を賜った大阪大学産業科学研究所 福井俊郎教授と大阪大学医学部 田川邦夫教授に感謝致します。マウス小脳のcDNAライブラリーを分与していただいた大阪大学蛋白質研究所の御子柴克彦教授に感謝致します。

本研究に対して終始ご指導およびご助言を賜りました、大阪大学産業科学研究所 前田正知助教授ならびに森山芳則助手に感謝致します。また、貴重なご助言をいただきました能見貴人先生(現 岡山大学助教授)に感謝致します。

田村茂彦助手をはじめ共同実験者の長谷部真久氏、二井研究室の先輩、後輩諸氏の協力に深く感謝致します。

最後に、あらゆる援助を惜しまなかった両親と妹に心から感謝します。