

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

0

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

.

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II+-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

[目次]

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
	Support for the line of the set	
参考文献		 82

謝辞 ······ 92

[発表論文]

- 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.
- Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. (1990) Kinetic Studies of Chromaffin Granule H⁺-ATPase and Effect of Bafilomycin A₁. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 873-878.
- 3. Hanada, H., Noumi, T., Maeda, M., and Futai, M. (1989) Uni-site Catalysis by <u>Escherichia coli</u> F₁-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 <u>Escherichia</u> <u>coli</u> H⁺-ATPase. J. Biol. Chem., in press.
- 5. Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M. (1991) One Step Purification of <u>Escherichia</u> <u>coli</u> H⁺-ATPase (F_oF₁) 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_oF₁): 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), FoF1
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	<u>N, N'</u> -Dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	D,L-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether) <u>N</u> , <u>N</u> , <u>N'</u> , <u>N'</u> ,
	-tetraacetic acid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.
MES	2-(<u>N</u> -Morpholino)ethanesulfonic acid
MOPS	3-(<u>N</u> -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	<pre>base pair(s)</pre>
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。

Α	Adenosine					
С	Cytidine					
G	Guanosine					
Т	Thymidine					
Y	C or T	Н	А,	С,	or	Т
R	A or G	В	А,	Т,	or	С
М	A or C	V	G,	Α,	or	С
К	G ro T	D	G,	Α,	or	Т
S	G or C					
W	A or T	N	G,	Α,	Т,	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	A (Ala)	Lysine	K (Lys)
Valine V	V (Val)	Arginine	R (Arg)
Leucine I	L (Leu)	Cysteine	C (Cys)
Isoleucine I	(Ile)	Methionine	M (Met)
Serine S	S (Ser)	Phenylalanine	F (Phe)
Threonine 7	ſ (Thr)	Tyrosine	Y (Tyr)
Aspartic acid I) (Asp)	Tryptophan	W (Trp)
Asparagine N	(Asn)	Histidine	H (His)
Glutamic acid H	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FoF1 (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。<u>Streptococcus</u> <u>lactis、Streptococcus</u> <u>faecalis</u>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 ^m	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) ^{ta} Bafilomycin (< 0.1 μM) ^{ta}	N ₃ ⁻ DCCD (1 μM) [™] Oligomycin (0.2 μM) [™]	Vanadate DCCD (100 μM) ^α

(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Ca²⁺-ATPase(10)、酵母細胞膜のH⁺-ATPaseなどが知 られている。Ca²⁺-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<u>N</u>-ethylmaleimide (31、32、33)や NO₃⁻(34,35)で阻害されるのに対してF-ATPaseは Oligomycin(36)およびN₃⁻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N₃⁻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 F1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F1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 NaNO₃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 F1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F1 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B、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100μ M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 μ M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 -³²P]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)、<u>N. crassa</u>(50)、<u>Sulforobus</u> <u>acidocaldarius</u> (68)、<u>Mehtanosarcina</u> <u>barkeri</u>(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 <u>ras</u> ϕ 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)、<u>G-A-F-G-C-G-K-T</u>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) = 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Glycinerich sequence (G-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。

	٩.	
1	1	

В

Dc	243	V L G G T C A I P G A F G C G K T C I S Q A L S K Y S N S D	TVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPELTMT
Sc	245	VLGGTTCIPGAFGCGKTCISQSLSKYSNSD	AIIYVGCGERGNEMAEVLMEFPELYTE
Nc	237	VQGGTVAIPGAFGCGKTCISQSVSKFSNSD	VIVYVGCGERGNEMAEVLKEFPELSIE
Mb	219	AKGGTAAIPGPFGSGKTCTQQSLAKWSDTE	IVVYIGCGERGNEMADVLSEFPELE
Sa	224	AKGGTAAIPGPFGSGKTCTLQSLAKWSAAK	VVIYVGCGERGNEMTDELRSFPKLKDP
Ec B	140	AKGGKVGLEGGAGVGKTVNMMELIRNIALEHS	GYSVFAGVGERTREGNDEVHEMTDS

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-<u>G-E-</u> <u>R</u>-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。

ー方、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Glycinerich 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 μ Mおよび数100 μ 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F1を用いて詳細 に解析されている(64、65)。また、FoF1複合体でも同様の反応機構が示され ている(77)。ここにはF1の反応機構を2.1式に示した。

(2.1 式)



1分子のATPがF1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F1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、F1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F₁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10⁴ - 10⁵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 -³2P]ATPを用いたUnisite反応に過剰の非放射性ATPを加えるとF₁に結合した[γ -³2P]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F₁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F₁への総結合量が測定できる。

1 - 2 μ M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、¹⁸0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 μ M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

ゥシ・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 F₁は KY7485株 [<u>asn31</u>, <u>thi</u>, <u>rif</u>/λ <u>asn-5</u>(<u>cI857S7</u>、<u>bglR</u>、<u>asn</u>、 <u>unc</u>)/λ c<u>I857S7</u>] (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-HC1 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 $> 2 \vee 7 \vee 7 + \lor 0$ 数が異なる F-ATPase 0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-SO₄ pH 8.0、0.5 mM MgSO₄、1 mM KH₂ PO₄) と EDTAを含む緩衝液である TEP溶液(50 mM Tris-SO₄ pH 8.0、0.5 mM EDTA、1 mM KH₂ PO₄) 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 - 12μ gタンパク質/ml (5.3 - 16 nM)の 酵素と1 μ M - 1 mM [γ - 3^{2} 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 μ Mの V-ATPaseと 50 μ Mの [γ -³² P]ATPを 0.5 M MgCl₂、1 mM KH₂ PO₄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 KH₂ PO₄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F₁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F₁を混合して一定時間後に、5 mM ATP、1 mM KH₂PO₄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 μ Mの F_1 と 0.25 μ Mの $[\gamma - {}^{32}P]$ ATPを反応液(50 mM Tris-SO₄ pH 8.0、 0.5 M MgSO₄、1 mM KH₂PO₄) 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 xg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 MgCl₂、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 KH₂ PO₄、 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。 $[\alpha - 3^{2}P]$ ATP、 $[\gamma - 3^{2}P]$ 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、F₁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 MgSO₄、2 mM ATPと反応させTMP溶液(50 mM Tris-SO₄ pH 8.0、0.5 mM MgSO₄、1 mM KH₂PO₄)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、k₁(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F₁ 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k₁は酵素と[γ -³²P]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。F₁のk₁は酵素と [γ -³²P]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 -³²P]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 (x	k 1 10 ⁴ M ⁻¹ s-1)	Initial rate $(x \ 10^{-2} \ s^{-1})$
V-ATPase	< 0.1 ADP+ATP	81	4.0
$F_1 \rightarrow cc (TMP)$ $F_2 \rightarrow cc (TFP) \times 2 \rightarrow$	4.9 ADP	4.2	0.99
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-SO₄ pH 8.0、0.5 mM EDTA、1 mM KH₂PO₄)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、F1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、F1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F1と[α -³²P]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F1には3分子の[α -³²P]ADPと2分子の非 放射性の ADPが結合していた。さらに、このF1を2 mM ATP、0.5 mM MgSO4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 -³²P]ADPの結合量は速やかに減少した(1 mol/mol F1)(図2.1 -ATP)。 一方、ATPが存在しないときは、[α -³²P]ADPの結合量(3 mol/mol F1)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F1に新たに結合した3分子の[α -³²P]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、F1に結合したADP

2分子のATPが結合したF₁に2 mM [α -³²P]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 -³²P]ADPが結合してい るF₁が得られた。このF₁をATPを含まない緩衝液(50 mM Tris-SO₄、0.5 mM MgSO₄)(-ATP)とATPを含む緩衝液(50 mM Tris-SO₄、0.5 mM MgSO₄、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 -³²P]ADPを測定した。ATPを含まない緩衝液 中に放置したF₁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 -³²P]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 -³²P]ADPが交換し、1分子の[α -³²P]ADPと4分子のADPが結合していた。



Incubation time (minutes)

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 -³²P]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 F₁が得られた。この結果から、この部位は、ミトコンドリアF₁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F₁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F₁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F₁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F₁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F1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-SO₄ pH 8.0、0.5 mM MgSO₄、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 nucl	eotides	(mol/mol F1)
	A D P	A T P	Total
$F_1 \rightarrow cc(TMP)$	4.9	0.0	4.9
$F_1 \rightarrow cc(TEP) \rightarrow cc(TEP)$	1.2	0.9	2.1
$F_1 \rightarrow cc(TEP) \rightarrow cc(TEP) \rightarrow cc(TMP)$	2.3	0.0	2.3
$F_1 \rightarrow cc(TEP) \rightarrow cc(TEP) \rightarrow cc(TMP)$			
$\rightarrow Mg \cdot ATP \rightarrow cc (TM)$	P) 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100 μ M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 μ M (Km₁)、30 μ M (Km₂)、 300 μ M (Km₃)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。Km₁ (5 μ M)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 μ M[α -^{3 2}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 μ Mのヌクレオチドがほとんど結合していないV-ATPaseに0.05 μ M [γ -³²P]ATPを加えて分解反応を測定した。V-ATPaseと[γ -³²P]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 μ M ATP、(B)は100 μ M - 1 mM ATPの濃度範囲で、プロットした。反応は、 4 - 12 μ g/ml (5.3 - 16 nM)のウシ・クロマフィン顆粒 V-ATPaseを用い、 1 μ Mから1 mM ATPを含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、5 mM MgCl₂、 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P1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 10⁵ M⁻¹s⁻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 -³²P]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 [$\gamma - {}^{32}$ 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F₁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、F₁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 Unisite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 F₁と 5分子の ADPが結合している F₁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 F₁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 F₁の初速度
図 2.4 V-ATPaseとF1のuni-site反応

(A)は0.1 μ MのV-ATPaseと0.05 μ Mの [γ -³²P]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 μ M [γ -³²P]ATPと0.5 μ MのF₁を緩衝液(50 mM Tris-SO₄H、0.5 mM MgSO₄、1 mM KH₂PO₄、pH8.0)中で室温で反応させた。●はAcid quench、〇は Cold chaseの実験によって遊離したPiの量を示す。F₁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F1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 10⁴ M⁻¹s⁻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 10⁴ M⁻¹s⁻¹と 0.99 x 10⁻² s⁻¹だった。

(A)





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 k₁を測定した。2分 子のADPが結合したF₁は8.3 x 10^{-4} M⁻¹s⁻¹で、5分子のADPが結合したF₁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F₁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 μ M 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10⁴ - 10⁵倍に比べて10²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、10²倍と10⁴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F1のUni-site反応、つまり、2分子のADPが結合している

F₁のUni-site反応は5分子のADPの結合しているF₁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 A₁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_a-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N₃-、DCCDが知られている(1)。N₃-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、N³⁻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 sequence (<u>G</u>-X-X-X-X-<u>G</u>-<u>K</u>-<u>T</u>/<u>S</u>)(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 Na⁻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 A1



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Unisite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 LiC1を含む緩衝液(20 mM MOPS-Tris pH 7.0、1 M LiC1、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 Unisite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

ゥシ・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 μ g/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。(〇)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 ほ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[¹⁴C]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 μ M)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 (%)
x 4	51
x400	48
x40,000	48

lepicies enzyme (nM)



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 MgCl₂)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(〇) 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 μ M [¹⁴C]DCCDと 20 μ g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 μ M 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[¹⁴C]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。

+BM -BM

Origin→

16 kDa→

Free DCCD→

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Km₁ (5 μ M)、Km₂ (30 μ M)、Km₃(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Km₂、Km₃は検出できなかった。しかし、 低ATP濃度でのATPase活性[Km₁(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 -³²P]ATPを含む緩衝 液(50 mM MOPS-Tris pH 7.0, 0.5 mM MgSO₄、1 mM KH₂PO₄)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、(〇)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 10⁵ M⁻¹s⁻¹、存在下では4.1 x 10⁵ M⁻¹S⁻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F₁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)、<u>T. marmorata</u> 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

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

表4.1 V-ATPaseとF-ATPAseの反応機構の比較

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<u>c</u>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)、<u>T. marmorata</u>(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)。

	11	11	51	71
Mouse	MADIKNNPEYSSFFGVMGAS	SAMVFSAMGAAYGTAKSG	TGIAAMSVMRPELIMKSIIPVV	MAGIIAIYGLVVAVLI
Bovine	MSEA · · G · · · A · · · A · · · ·	A • • • • • L • • • • • • • • •	••••• <u>M</u> ••••••	
T. marmorata	MSTPGA · · · · A · · · · I · · ·	A		
S. cerevisiae	MTELC · V · AP · · · AI · CA	· · · I I · T S L · · · · · · · ·	$V \cdot \cdot C \cdot TC \cdot L \cdot \cdot D \cdot LF \cdot N \cdot V \cdot \cdot I$	[• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

	94	114	134	154
ANSLTDGIT	LYRSFLQLGAGLS	VGLSGLAAGFAIGIVGDAGVR	GTAQQPRLFVGMILILIF	AEVLGLYGLIVALILSTK
· · · · N · · · S		RSPSALLGTQGRA	<u>c</u>]	
· · · · · E D · S	• F K • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	
CY · · GQKQA	••• TG•I••••••		· S S · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·····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)、<u>N. crassa</u>(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)、<u>N. crassa</u>(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 <u>Sulfolobus acidocaldarius</u>(68) や <u>Methanosarcina barkeri</u>(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<u>Eco</u>RI linkerを連結し、 λgt11の<u>Eco</u>RI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 -³²P]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<u>Eco</u>RI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、 λ gtl1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 μ gのファージDNAと、2 μ M プライマー、0.5 unitsの <u>Taq</u> polymeraseを 含む 20 μ 1の反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3 、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、 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 <u>EcoRI-Sca</u>I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

<u>Hae</u>II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)、<u>N.</u> <u>crassa(50)の液胞のV-ATPase 72 kDaサブユニットと、S.</u> <u>acidocaldarius</u> (68)、<u>M. barkeri</u> (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 µ 1の反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3、50 mM KCl、 1.5 mM MgCl₂, 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。 $[\alpha - 3^2 P]$ dCTP (3,000 Ci/mmol)、 $[\gamma - 3^2 P]$ 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	
D.	carota MPSVYGDRLTTFEDSEKESEYGYVRKVSGPVVVADGMGGAAMYELVRVGHDNLIGEIIRLEGDSATIQVYE	71
Ν.	crassa MAPQQNGAEVDGIHT.KiYsed.I.vkq.vvinQ	65
s.	cerevisiae AIENARKEIKRISLedhAAiYsi.en.I.Ckvvidk	72
М.	barkeri MEVK.EiYrt.I.l-Q.Kdkneg.mv.qiL.Pkti	54
s.	acidocaldarius MVSE.R.Vr.nl.iRe.q.f.v.Y.sdLk.vt.ir.F	54
	P2	
Dc	ETAGLMVNDPVLRTHKPLSVELGPGILGNIFDGIORPLKTIAKRSGDVYIPRGVSVPALDKDTLWEFOPKKIGEGDLLTGGDLYAT	157
NC	vgGl.nvekeA.OsiiatrkkKTtmKVHiavwg.	150
Sc		158
Mb	ikboo Cyc Ccc l cc y y byllokM e=f a sDa bkk d k =Tykk Syk yTay	120
Sa	s.d.vkPg.K.Y.sGAli.k.y.ldsV.nsPfvairq.K.h.VvKsKvgPiIgv	138
Dc	VFENSLM-Q-HHVALPPDAMGKITYVAPAGQYSLKDTVLELEFQGVKKQFTMLQTWPVRTPRPVASKLAADTPLLTGQRVLDALFP	241
Nc	.yfi-SV.kiLR.r.tRi.EK.e.tveekivd.K.teyp.mva.e.Hs.nQ.f.v	235
Sc	i-SS.kiLRsr.Twie.t.dekivd.K.sdlYhvtesY	243
Mb	.Q.tVNi-ekiMvIS.t.sDi-Ks.nftvViCt.t-d.teLm.RRKatptRvM.ig	219
Sa	.Q.td.i-eriLinvH.tlkEl.re.d.tve.v.AVvdmn.DeIpVk.Y.kiYKeepVeItv	223
De		227
DC	SVLGGTCATPGAFGCGKTVTSQALSKISNSDTVVTVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTLPDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAARE	327
NC		320
Mh		302
MD		302
Sd		306
	← ₽9	
Dc	ASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMMADSTSRWAEALREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERNGSVTIVGAV	413
Nc	vQ.Mas	406
Sc	Q.KQ.Kis	414
Mb	vyLdlmsegeeseVaes.CEti.vi	386
Sa	sv.v.mQd.Llvdlgmeee.f.spseyr.IAnYas	392
-	← P10	
Dc	SPPGGDF5DPVTSATL51VQVFWGLDKKLAQRKHFPSVNWLISYSKYSTALESFY-EK-FDSDF1D1RTKAREVLQREDDLNEIVQ	497
Nc		490
Sc	atg.tg.ti.TSvtnv.nkds-NYpe.PV1.drMk.i.Snaee.eqv	498
Mb	eQnrkaAsraiNL.kds.ndwfAdn-Vap.yvPl.er.m.mT.se.q	471
Sa	tenrf.rPVsAr.y.aiiQgf.A.VdLvaQww-h.NV.pnwKem.dtMmkIe.rqr	477
DC	LVGKDALAETDKITLETAKLLREDYLAQNAFTPYDKFCPFYKSVWMMRNIIHFYNLANOAVERGAGMDGOKISYTLIKHRLGDLFY	583
NC	s.,sdsPdM.t.ikf.g.,gysDgiw.tEkLmmG.hdE.gk.iag.gnwkKvreATOOA	569
50	s sds dv.t.ik.f.g.gyst A iw tFD af SubdE gk annweklader with	577
Mh	e oddaall itrm . If a . H. V. Ave DaaVKilka mkwcda Md lke vou-tat klass ov akuk	557
60	Doo k ly a jkdaf Ke ydDi A coDO O ri I VI Ocodijek ydlikilDivan en Filpik	563
Jd	ee	505
Dc	RLVSQKFEDPAEGEDVLVGK-FKKLHDDLTSGF-RNLEDETR	623
Nc	q.K.LV.sqeKiCKyeAiqqqmLdKAsvI	607
Sc	AvS.S.,Fe.sR.,kEvH.ee.,LstmQeR,AEsTd	616
Mb	eedesMnaVLaQmd.E.As.rgR	582
Sa	TiKndelnkId.I.nK.Katds.Lkevs	592

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,	
P 1	IQVYE	AG <u>AAGCTT</u> HCARAGTNTMTGA <u>Hind</u> III	sense
P 2	VELGP	GTT <u>CCATGG</u> TNGARYTNGGNCCNGG <u>Nco</u> I	sense
P 3	YDGILVQ	CA <u>AAGCTT</u> HTAYGAYGGNTNTNCA <u>Hind</u> III	sense
P 4	K W P V R	TA <u>CTGCAG</u> MVNTGGCCNGTNMG <u>Pst</u> I	sense
P 5 F	GSCGK	CT <u>GGGCCC</u> TTYGGNTSNGGNAAR <u>Apa</u> I	sense
P 5 R	GACT	GA <u>CTGCAG</u> TYTTNCCNSWNCCRAA <u>Pst</u> I	antisense
P 7	PMNSTN	GT <u>GGTACC</u> GGCATRTTNSWNGTRTT <u>Kpn</u> I	antisense
P 8	RMLAEAW	CA <u>GGATCC</u> CKNADNGCYTCNGCCCA <u>BamH</u> I	antisense
P10	FDGGPP	GT <u>CTGCAG</u> AARTCNCCNCCNGGNGG 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)、Ncth. crassa(50)、Sctt酵母(49)、 Mbth M. barkeri(69)、Satt 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、 λ mvp1,3,5,128; II、 λ mvp8,20,163; III λ mvp4; IV、 λ mvp2)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、<u>T. marmorata</u>、<u>Drosophila</u>、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<u>NcoI、St ScaI、PtPvuII、At Apa</u>I、Nst <u>Nsp(7524)</u>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)。

AATTCCGGTATTTAGAGCGCAGCGCCTGACTGGCGGGGGTCGCTTTCCCATCCGCTGC -91

CTCGACGATCTTCGCTTGCCTCGCTCGCTGTCCCGTTGTCCTAGCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTGAGCTTGTCTTTTCCCTGCTGCAGAC -1 ATGGCTGACATCAAGAACAACCCCGAATATTCTTCGTTTTTCGGTGTCATGGGCGCCCCGTCGTCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCC 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)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)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) L Q L G A G L S Y G L S G L A A G F A I G I Y G D A G Y R G (120) ACTGCCCAGCAGCCTCGACTGTTCGTGGGCATGATCCTGATCCTCATCTTTGCGGAGGTGCTTGGCCTCTACGGTCTCATCGTGGCCCTA 450 TAQQPRLFVGMILILIFAEVLGLYGLIVAL (150) ILSTK * (155)CCCTAGAGTGCTCCTGTGTATAAGAATGAACTAGAGTTGTCATTTTTCTCTTCACTGGATGTTTATTATAAAAGATTTGACCTATTCAT 810 GCGTCTGTGGGAGCAGCTCCTGTCTCCCAACTATATAGTAATCATTAGTAGACTGTTGCCTTGTGGGGTTCCTGTTGCTGAGACTCCTTGG 900 ATGGAGCCACCCTTCCCCCTGCCCTGAACAGCCAGGGTGGAGGATAGAGTGCTACTGCTCCTCAGAGCTGGCTCCCAGCTGTGTCCAATA 990 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) <u>T.</u> <u>marmorata</u> electric lobes(59)、(5) <u>Drosophila</u>(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

	ldentity (%)	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

ldentity (%)	1	2	3	4	5	6
Mouse	_	91	93	94	84	72
Human	91	-	97	93	81	72
Bovine	93	97	-	93	81	72
Torpedo	94	93	93	-	81	72
Drosophila	84	81	81	81	-	73
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、 <u>c</u>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 <u>c</u>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 <u>c</u>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<u>c</u>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)、<u>T</u>. <u>marmorata</u> electric lobes(59)、<u>Drosophila(60)</u>、 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。





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。





Bovine c

DIDTAAKFIĢAGAATVGVAĢSGAGIGTVFĢSLIIGYARNPSLKQQLFSYAILGFALSEAMGLFCLMVAFĻILFAM 10 30 50 70
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番目の膜質通領域の中の(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)、<u>T.</u> <u>marmorata</u> 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、このの領域は酵母、<u>T. marmorata</u>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、 $\underline{\text{EcoRI}}$ 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 $\underline{\text{ScaI}}$ - $\underline{\text{Nsp}}$ (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。

脳の16 kDaサブユニットと完全に一致した。

(*)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

vp3 atcctctccacaaagtagaccctctccgagcccaccagcacagaatattatgtaaagaccacccctcctcattccagaacgaa . . . * vp4

vp3 cageetg acacatacgca cggggccgc cgcccccagtagttggtcttgtacatgc gcag vp2 ------ga-- -atat-- - tt------ga-- --------gc-t-tg -t---ag-tg----t----a---c--ag-t a---T H V L G S W P S V V D L L S V Q vp4 Q P D ----a-----t-t-agt-t---g-----c-----t vp6 acc--a---acaaat-t----c-g

vp4 -----c--C P R

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)、<u>N. crassa(50)、S. acidocaldarius</u> (68)、<u>M. barkeri(69)</u> 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 Glycinerich 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-<u>G</u>-<u>E</u>-<u>R</u>-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、Glycinerich sequence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	GAATTCGGGCACTTCTTTACTACACATCTATCACATCCACATATCGACTATACACGGTATAGACACACATCTAGGTTTTGATCAG M P S V Y G D R L ATCCGCAGAGTCGAGATCTGAAGCTGTTGATCTGATCTATCGATTTTATCTGAAAGATGGCTTCTGTGTATGGGGATCGATTA	90 (9) 180
Dc	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 ACTACGTTCGAAGACTCCGAGAAGGAGAGGAGGAGGAGTATGGTTACGTCCGTAAGGTATCCGGACCAGTTGTTGTCGCCGATGGAATGGGAGGG	(39) 270
Dc Mu	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 GCGGCTATGTATGAACTTGTTGGTGTGGACATGACAATCTTATTGGAGAAATTATTCGTTTGGAAGGAGATTCTGCTACAATCCAAGTT G	(69) 360
Dc Mu	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 TACGAAGAAACAGCTGGGTTGATGGTGAATGATCCTGTCCTTAGGACACAAGCCCCTATCTGTGGAGTTGGGTCCTGGAATTCTGGGA TTTCTG-A-ATTGGACC-ACC-CTGGTATCGCC	(99) 450
Dc Mu	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 AATATCTTTGATGGTATTCAGAGACCTTTGAAGACCATTGCTAAGAGATCAGGTGATGTCTATATCCCTCGCGGTGTCTCGGTACCAGCC GCC-TAC-TC-GATCAGC-GTCAGA-CCAAAG-ACA-AAAAT-TGT-TT A	(129) 540
Dc Mu	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 CTTGACAAAGACACACTATGGGAATTTCAGCCTAAAAAATAGGTGAAGGGGACCTTCTT ACAGGTGGAGATTTATATGCTACGGTC CAGC-G-G-T-TCAAATAC-GCACCTACGG-TT-GTAGA-ATC-CTCA-TGGATT . S R . I K I . S . N L R V G S H I I . G I .	(158) 627
Dc Mu	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 TTTGAGAATAGTTTAATGCAACATCATGTTGCTCTGCCTCTGATGCCATGGGAAAGATAACATATGTTGCTCCAGCTGGTCAATATTCA AATCTCCC-CCA-AA-CATGTTCACG-AAGAGCG-GTCA-CG-GCGA-TGAT N D I K . K I M R N R . S V I P . N . D	(188) 717
Dc Mu	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 CTAAAGGATACAGTTTTGGAGCTTGAATTTCAAGGCGTCAAGAAGCAATTTACTATGCTTCAGACTTGGCCCGTACGAACTCCCAGGCCT GC-TCCGTCG-CC	(218) 807
Dc Mu	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 GTTGCATCAAAGCTTGCCGCTGACACTCCTCTTCTCACAGGACAGCGTGTACTTGATGCCCTTTTCCCATCTGGTGGGGAACTTGT CA-TGAGGCCAATCACCT-G-TTCA-ACC	(248) 897
Dc Mu	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 GCAATTCCTGGTGCATTTGGTTGTGGAAAAACAGTCATTAGTCAGGCTCTTTCCAAGTATTCCAATTCTGACACTGTGGTTATGTTGGT T-CACCCC-CAGT-GTCCTACCAGGTCA-CA-CCC 	(278) 987
Dc Mu	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 TGCCGGGGAAAGAGGAAATGAAATGGCAGAGGTCCTTATGGATTTTCCTCAATTGACAATGACTCTCCCTGATGGCCGTGAAGAGTCTGTC TGCCG-T-TATCCGCCG-GC-CGAGG-TGAAA-TCA 	(308) 1077
Dc Mu	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 ATGAAACGTACTACACTTGTGGCCAACACTTCAAACATGCCTGTGGCTGGC	(338) 1167

Dc	Y F R D M G Y N Y S M M A D S T S R W A E A L R E I S G R L TACTTCAGAGATATGGGTTACAATGTTAGTATGATGGCAGATTCAACATCCCGATGGGCAGAAGCTTTAAGAGAAATTTCAGGGCGGATG	(368) 1257
Dc	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 GCAGAAATGCCTGCTGATAGTGGGTATCCTGCTTACTTGGCAGCTCGTTAGCGTCCTTCTATGAGCGTGCTGGTAAGGTGAAGTGCCTT	(398) 1347
Dc	G G P E R N G S Y T I Y G A Y S P P G G D F S D P V T S A T GGTGGACCAGAACGTAACGGTAGTGTTACTATCGTTGGTGCTGTTTCACCTCCAGGAGGAGATTTTTCTGACCTGTTACATCTGCCACA	(428) 1437
Dc	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 CTCAGCATCGTTCAGGTCTTTTGGGGTTTAGACAAAAAGTTGGCACAGAGGGAAACATTTTCCTTCTGTGAACTGGCTCATCTCCTATTCA	(458) 1527
Dc	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 Y L Q R AAGTATTCAACAGCATTGGAGTCCTTTTATGAGAAATTTGATTCAGACTTTATCGACATCAGGACAAAAAGCTCGTGAGGTTTTGCAGAGG	(488) 1617
Dc	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 GAAGATGATGATGAAATTGTCCAGCTGGTTGGGAAGGATGCTCTAGCAGAAACAGATAAAATTACCTTAGAGACTGCAAAGCTTTTA	(513) 1707
Dc	R E D Y L A Q N A F T P Y D K F C P F Y K S Y W M M R N I I AGGGAGGATTATCTTGCCCAGAATGCATTTACTCCATATGACAAATTTTGTCCTTTTTACAAGTCTGTTTGGATGATGCCCAATATTATC	(543) 1797
Dc	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 CATTTTTACAATCTGGCCAATCAGGCTGTGGGAGCGAGCG	(573) 1887
Dc	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 GGGGACCTTTTCTATCGCCTGGTTTCTCAGAAATTTGAGGATCCCGCTGAAGGTGAGGTGAGGTGTAGGGAAGTTCAAGAAACTTCAT	(603) 1977
Dc	D D L T S G F R N L E D E T R * GATGATCTTACATCTGGTTTCCGGAATCTTGAGGACGAGGACACGATGATTGAACATGTTAGGATAATGGTTATATTCCTTGAGAGGTGAT	(618) 2067
Dc	AATGATATGTATGCAGCGAAGATAAAATATTGTATTGTTTTGTTTTTGAGCCAGCC	2157
Dc	ATCTTGAAAGGGGCATCAGGGAGGGTTAGCCCAGGATTACCTACTTCCTGTTCACTGCCATAGCTGAAAATGGAATGCTAGGCATATAA	2247
Dc	TTTGTTAAAACCCGGGATGGCAGTCTTGTAAAATAGAACCTGTGATTTGCACTGGGGTAGCACCCTCCAAGTTTGTAATTTCTGTTTGGC	2247
Dc	TGCTCTGATATTGTTTTGTAGCGAGCATTATCTCAATAAATCTCCTGGAGATATTTATT	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)

+ -- +=++=+ + -= ---+===+-+=- +-++-=== += =-+**** Identity Mouse MPSVYGDRLTTFEDSEKESEYGYVRKVSGPVVVADGMGGAAMYELVRVGHDNLIGEIIRLEGDSAT<u>IQVYE</u> D. carota 71 MAPQQNGAEVDGIHT. KiYs......ed. 1. v.....k....q. v.. v. in.. q. AIENARKEIKRISLedhA....AiYs.....i. en. 1. C....k....v. v. v. id. k. N. crassa 65 S. cerevisiae 72 MEVK. EiYr.....t. 1. 1-Q.K..d..k..neg.m..v. qiL. Pkti..... M. barkeri 54 S. acidocaldarius MVSE. R. Vr. n. 1. i.... Re. q. f. v. Y. sdLk. v. . . t. i. . . r. F. . . . 54 -*=-- +**--+ M C Ncv.g.....G......l.n.y.....ek.eA.Qsi....iat....rkkK...T.-tmKV.Hia...vwg. 150 Sc Mb Sa Id * +===+ *=+-=**- -*=-= =+= * +=- = -==-==+= = + +-**** +**= -*+ = *+++*=*+**=*** . Nd. . . i-k-. kiM. . . Rnr. sv. . i. . p. n. dAs. v. e. . . ek. s. v. v. . . . QV. . . te. . p. nH. M VFENSLM-Q-HHVALPPDAMGKITYVAPAGQYSLKDTVLELEFQGVKKQFTMLQTWPVRTPRPVASKLAADTPLLTGQRVLDALFP 241 C .y...fi-SV.kiL...R.r.t..Ri.EK.e.tveeki..v..d.K.teyp.m.....v...a.e.Hs.nQ.f.v...... 235 Nc Sc Q. tVNi-e-. kiMv... IS. t. sDi-Ks. nftvV. iCt. t-d. tel. --. m. R.... R.... Ka.. tptR..v. M. i...g. 219 .Q. td. i-e-. riLi... nvH. tIkEl. re. d. tve. v. AVvdmn. DelpVk. Y. k... i... YKe..epVe.... I... tv. 223 Mb Sa Id M C Nc c.Q...TC......s..........aii......e..e.YTems-.Tk.pi..... Sc 328 Mb laK...A....p..s...tL.s.a.w.aakv.i.....tdE.rs..k.kDpW-t.k--p11L.i.... Sa 306 Id ASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMMADSTSRWAEALREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERNGSVTIVGAV 413 C Nc Sc Mb s...v.v.m.....Q..d.Llv......dlg..me...ee.f.s..ps...ey....r.IA..n..Y....as.. 392 Sa ld ++=++++=-+++ ==-+++-++=+=+=+=+=+= ==+-+ = =--- - ---- - + - -+ -+-SPPGGDFSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSVNWLISYSKYSTALESFY-EK-FDSDFIDIRTKAREVLQREDDLNEIVQ 497 C Nc Sc Mb Sate...n.rf.r...P.Vs...Ar.y.ai..iQgf.A.VdLvaQww-h.NV.pnwKem.dtMmk.l...e.rq.r 477 ld +++- =+ -=-+- = =-==+-=+-= -+-== + -=- = = = + LVGKDALAETDKITLETAKLLREDYLAQNAFTPYDKFCPFYKSVWMMRNIIHFYNLANQAVERGAGMDGQKISYTLIKHRLGDLFY 583s..sdsP....dM. t. ik.. f. q..gysD..q...iw. tE...kLmmG. hdE. qk. iaq. q-----nwkKvreATQ..QA 563 Scs..sds.....dv. t. ik. f. q. gyst. A. .. iv. tFD. .. af. SyhdE. qk. . an. . -----nwsk1AdsT. . vKh 577 ... s... pddqqlL..itrm... If.q.... H. V. Ays. . DqQYKilka. mkwGdA. Md. lks. vpv-tel. kLe-S. nV. akvK. 557 Mb ... Pee...k..lv..a...ikdaf.Ke..ydDl.A. ssPQ.Q.ri.L.YI...QsqdLisk.vPlkKILDkVgP.epEilRiK. Sa 563 Id - ----- - --RLVSQKFEDPAEGEDVLVGK-FKKLHDDLTSGF-RNLEDETR C 623 q. K. L... V. s., qeKiCK. -yeAiqqqmLdK. -Asvl.. Ne 607 Sc AvS. S. . Fe. sR. . kEvH. e-. e. . LstmQeR. AEsTd 616 ---ee. . desMnaVLaQmd. E. As. rgR Mb 582 Sa TiKndelnkld. I. nK. Kat-. ds. Lkevs 592

I E N I E V G N K V M G K D G R P R E V I K L P R G R E T M Y S V V Q K S Q H R A H K S D S S R E V P E L L K F T C N A T H E L V V R T P R S V R R L S R T I K G V E Y F E V I T F E M G Q K K A P D G R I V E L V K E V S K S Y P I S E G P E R A N E L V E S Y R K A S N K A Y F E W T I E A R D L S L L G S H V R K A T Y Q T Y A P I L Y E N D H F F D Y M Q K S K F H L T I E G P K V L A Y L L G L W I G D G L S D R A T F S V D S R D T S L M E R V T E Y A E K L N L C A E Y K D R K E P Q V A K T V N L Y S K V V R G N G I R N N L N T E N P L W D A I V G L G F L K D G V K N I P S F L S T D N I G T R E T F L A G L I D S D G Y V T D E H G I K A T I K T I H T S V R D G L V S L A R S L G L V V S V N A E P A K V D M N G T K H K I S Y A I Y M S G G D V L L N V L S K C A G S K K F R P A P A A A F A R E C R G F Y F E L Q E L K E D D Y Y G I T L S D D S D H Q F L L A N Q V V H N C F A K G T N V L M A D G S I E C

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<u>N. crassa</u>(43)、 Scは酵母(44)の72 kDaサブユニットおよびMbは<u>M. barkeri(62)、Satd 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。</u>

(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ボ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、NO₃-によって特異的に阻害され、N₃-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腱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16 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、<u>c</u>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。 Km₁ (5 μ M)、Km₂ (30 μ M)、Km₃ (300 μ M)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 F₁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、ぞれ 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サプ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

っの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 <u>c</u>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、<u>c</u>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、<u>c</u>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

- Futai, M., and Kanazawa, H. 1983. Structure and Function of Proton-translocating ATPase (F_oF₁): Biochemical and Molecular Biological Approaches. Microbiol. Rev. 47, 285-312.
- Walker, J. E., Saraste, M., and Gay, N. J. 1984. Nucleotide Sequence, Regulation and Structure of ATP-Synthase. Biochim. Biophys. Acta 768, 164-200.
- Senior, A. E. 1985. The Proton-ATPase of <u>Escherichia</u> <u>coli</u>. 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.
- Nakamoto, R. K., and Slayman, C. W. 1989. Molecular Properties of the Fungal Plasma Membrane [H⁺]-ATPase. J. Bioenerg. Biomemb. 21,621-632.
- Pederson, P. L., and Carafoli, E. 1987. Ion Motive ATPases.
 I. Ubiquitary, Properties and Significance to Cell Function. Trends Biochem. Sci. 12, 146-150.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nelson, N. 1989. Structure, Molecular Genetics, and Evolution of Vacuolar H⁺-ATPases. J. Bioenerg, Biomembr. 21, 553-571.
- 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 <u>VMA3</u> Gene Product, Subunit <u>C</u> of the Vacuolar Membrane H⁺-ATPase on Vacuolar Acidification and Protein Transport: A Study with <u>VMA3</u>-disrupted Mutants of <u>Saccharomyces cerevisiae</u>. J. Biol. Chem. 265, 18447-18453.
- 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 A₁, 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 <u>N, N'-dicyclehexylcarbodiimide-sensitive Mechanism. J. Biol.Chem.</u> 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 A₁ 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 <u>Neurospora crassa</u> and Comparison with the Tonoplast Membrane ATPase from <u>Zea mays</u>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 48-52.
- Moriyama, Y. and Nelson, N. 1987. Nucleotide Binding Sites and Chemical Modification of the Chromaffin Granule Proton ATPase. J. Biol. Chem. 262, 14723-14729.

- Moriyama, Y., and Nelson, N. 1989. Cold Inactivation of Vacuolar Proton-ATPases. J. Biol.Chem. 264, 3577-3582.
- Uchida, E, Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1985. Purification and Properties of H⁺-translocating ATPase from Vacuolar Membranes of <u>S. cerevisiae</u>. 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.
- 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 <u>Neurospora crassa</u> Contains an F₁-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 <u>a</u> of H⁺-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of <u>Saccharomyces</u> 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_oF₁-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, <u>VMA1</u>, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>. J. Biol. Chem. 265, 6726-6733.
- 50. Bowman, E. J., Tenney, K., and Bowman, B. 1988. Isolation of Genes Encoding the <u>Neurospora</u> Vacuolar ATPase; Analysis of <u>vma-1</u> 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 <u>Neurospora crassa</u> Vacuolar Membrane H⁺-ATPase: Analysis of <u>vma-2</u> Encoding the 57 kDa Polypeptide and Comparison to <u>vma-1</u>. 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.
- 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 <u>Torpedo</u> 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 <u>Drosophila</u> coding H⁺-ATPase. Nucleic Acids Res. 18, 6712.
- 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 Mg²⁺-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.

- 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 F₁,F₀-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 <u>Sulfolobus</u> <u>acidocaldarius</u> 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 <u>Methnosarcina</u> <u>barkeri</u>. ATPase Deduced from Cloned Genes: Similarity to Subunits of Eukaryotic Vacuolar and F_oF₁-ATPase. J. Biol. Chem. 264, 10954-10959.
- 70. Ida, K., Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T, and Futai, M. 1991 Catalytic Sites of F₁-ATPase of <u>Escherichia coli</u>: Lys-155 and Lys-201 of the β Subunit Are Located near the γ Phosphate Group of ATP in the Presence of Mg²⁺. 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 GlycinerichSequence of the β subunit of <u>Escherichia</u> <u>coli</u> 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 F₁-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 -³²P]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 F₁-ATPase from the <u>uncD412</u> Mutant of <u>Escherichia</u> <u>coli</u>. 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 <u>Escherichia coli</u> 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 MF₁-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 <u>Escherichia coli</u>: Increased Synthesis of Coupling Factor on Induction of Prophage λ <u>asn</u>. 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 <u>Escherichia</u> <u>coli</u>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 2725-2729.
- Penefsky, H.S. 1977. Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.
- Hanada, H., Noumi, T., Maeda, M., and Futai, M. 1989. Uni-site Catalysis by <u>Escherichia coli</u> F₁-ATPase with Different Numbers of Bound Nucleotides. FEBS Lett. 257, 465-467.
- Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M., and Futai, M. 1990. Kinetic Studies of Chromaffin Granule H⁺-ATPase and Effect of Bafilomycin A₁. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 873-878.
- Kironde, F. A. S., and Cross, R. L. 1987. Adenine Nucleotide Binding Sites on Beef Heart F₁-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 <u>Escherichia coli</u> 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.
- 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 F₁-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 F₁-ATPase from <u>Escherichia coli</u>. 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 <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 131-135.
- 105. Fillingame, R., H. 1990. Molecular Mechanics of ATP Synthesis by F₁F_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.

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。

