The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulation and Energy Coupling Mechanism of Yeast Vacuolar Acidification : Ion Transport-Coupled Acidification and Subunit Rotation of V-ATPase
Author(s)	平田, 智之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44052
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　平田智之（ひらた ともゆき）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学位記番号　第　17548　号

学位授与年月日　平成15年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

理学研究科生物科学専攻

学位論文名　Regulation and Energy Coupling Mechanism of Yeast Vacuolar Acidification : Ion Transport-Coupled Acidification and Subunit Rotation of V-ATPase
（酵母液胞の酸性化の制御とエネルギー共役：イオン輸送に共役した酸性化とV-ATPaseのサブユニットの回転）

論文審査委員　（主査）
教　授　二井　將光

（副査）
教　授　金澤　浩　　教　授　谷澤　克行　　助教授　和田　洋

論文内容の要旨

真核細胞には様々な酸性オルガネラが存在している。液胞型 H^+ 輸送性 ATPase（V-ATPase）と各種のイオン・トランスポーターやチャンネルなどのイオン輸送系が、オルガネラ内部を固有な酸性 pH に維持している。V-ATPase は ATP の加水分解に共役し、H^+ をオルガネラ内部へと輸送する酵素で、内外に H^+ の電気化学的ポテンシャル差（$\Delta\mu H$）を形成する。イオン輸送系は、$\Delta\mu H$ を駆動力としてイオンを輸送し、オルガネラ内部の pH に影響を与える。本研究では、酵母液胞の酸性化の制御とエネルギー共役に関して、(1) 酸性化に影響を与えるイオン輸送系と (2) V-ATPase の反応機構を検討した。

(1) 酵母の液胞は、新しい Na^+/H^+ 交換輸送系と硫酸イオン輸送系を持つ。

酵母の単離した液胞で、各種イオンが酸性化に与える影響を検討した。液胞内部に V-ATPase によって輸送された H^+ が、Na^+ に依存して液胞外に流出することを見いだした。V-ATPase が形成する $\Delta\mu H$ に依存して、液胞内に Na^+ が取り込まれたことから、Na^+/H^+ 交換輸送系が存在することが明らかになった。既に同定されている交換輸送体の遺伝子（*NHX1* と *NHA1*）を破壊しても、液胞での輸送は認められた。Na^+ とは対照的に、V-ATPase による H^+ 輸送は、硫酸イオン存在下で促進され、同時に膜電位（$\Delta\Psi$）の形成が抑えられた。V-ATPase が形成する $\Delta\mu H$ に依存して、液胞内部に硫酸イオンが輸送されたことから、硫酸イオン輸送系が存在することが明らかになった。その *Km*（70 μH）は既知の硫酸イオン輸送体と異なっていた。また、硫酸イオン輸送体のホモログをコードする遺伝子（*YGR125* と *YPR003*）を破壊しても、輸送は観察された。以上の結果から、新規の Na^+/H^+ 交換輸送系と硫酸イオン輸送系が液胞に存在することが明らかとなった。これらは、液胞内の酸性化を制御していると考えられる。

(2) V-ATPase のサブユニットは反応に伴い回転する。

V-ATPase は、構造や一部のサブユニットのアミノ酸配列において、F-ATPase（ATP 合成酵素）と似ている。しかし、これら2つの ATPase の生理的機能は全く異なる。また、相同性のないサブユニットも複数存在している。

F-ATPase のサブユニットは反応に伴い回転するが、２つの ATPase の違いを考えると、V-ATPase も分子モーターであるかどうかは興味深い。そこで、V-ATPase のサブユニットが反応に伴い回転するか、顕微鏡下で検討した。

V-ATPase を液胞膜から可溶化し、Ni-NTA コートしたガラス基盤上に、*c* サブユニットに導入した His-tag を介して固定した。ストレプトアビジンと、*G* サブユニットに導入した biotin-tag を介して、ビオチン化した蛍光アクチンフィラメントを結合させた。ATP を加えると反時計方向にフィラメントが回転した。V-ATPase の特異的な阻害剤であるコンカナマイシン A によって、回転は停止した。これらの結果から V-ATPase のサブユニットは、反応に伴い回転することが示された。サブユニットの回転は、ATP の加水分解によって得られるエネルギーを、触媒部位からプロトン輸送路に伝える際に重要だと考えられる。

以上の結果から、酵母液胞の酸性化には、Na^+/H^+ 交換輸送系、硫酸イオン輸送系、さらには、V-ATPase のサブユニットの回転と、新たなエネルギー共役機構が関与することが、明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

真核細胞には様々な酸性オルガネラが存在している。液胞型 H^+ 輸送性 ATPase（V-ATPase）と各種のイオン・トランスポーターやチャンネルなどのイオン輸送系が、オルガネラ内部を固有な酸性 pH に維持している。オルガネラ内部の酸性化の制御とエネルギー共役機構を理解する上で、V-ATPase の反応機構とイオン輸送系が重要であるという観点から、申請者は研究をすすめた。酵母液胞を材料として、酸性化に影響を与えるイオン輸送系を検討し、酵母の液胞は、新規の Na^+/H^+ 交換輸送系と硫酸イオン輸送系を持つことを明らかにした。これらの輸送系は、液胞内の酸性化を制御していると考えられる。さらに、V-ATPase の反応機構に関しても検討をすすめ、そのサブユニットが反応に伴い回転することを明らかにした。サブユニットの回転は、ATP の加水分解によって得られるエネルギーを、触媒部位からプロトン輸送路に伝える際に重要だと考えられる。以上の結果から、酵母液胞の酸性化には、Na^+/H^+ 交換輸送系、硫酸イオン輸送系、さらには、V-ATPase のサブユニットの回転と、新たなエネルギー共役機構が関与することが、明らかとなった。これらの成果は、博士（理学）の学位論文として十分価値があるものと認める。