

大阪大学・産業科学研究所 生合成化学部門



研究室紹介

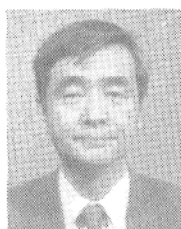
二井 將 光*

産業科学研究所の生物・有機化学研究部には生化学・分子生物学に関連する部門が二つあり、当部門はその一つである。職員構成は教授が二井將光，助教授が前田正知，助手が森山芳則，田村茂彦，教務職員が岩本昌子である。これに学術振興会特別研究員，学術振興会外国人研究員，および留学生をふくむ大学院生が研究室を構成している。

当部門は発足以来，細菌の生産する多糖類の研究を進めてきた。1985年の4月に二井が赴任し12月に前田助教授が加わってからは当部門の研究は，より生化学／分子生物学的方向に転換したと言える。現在は生物におけるエネルギー転換機構と転写制御機構を普遍的に理解することを目標に基礎的な面を重視し研究を続けている。さらにその中から産業科学研究所にふさわしい応用科学の芽を育てることができればと思っている。

主な研究テーマは H^+ ATPase (ATP合成酵素)の反応機構と H^+ 輸送の共役，胃酸分泌酵素の構造と遺伝子の転写制御機構，液胞型 H^+ ATPaseの構造と機能である。一貫してATPの合成／分解と共役した H^+ を輸送する酵素，オスモエンザイムとよびうる酵素を，中心においているところに研究室の一つの特色がある。以下にそれぞれの研究テーマと最近の成果を要約する。

*Masamitsu FUTAI
1940年5月13日生
1960年東京大学薬学部製薬化学科卒業
現在，大阪大学産業科学研究所，
生物・有機化学研究部生合成化学
工業部門，教授，薬学博士，生
化学・生体エネルギー学
TEL 06-877-5111



1. H^+ ATPase (ATP合成酵素)

ATP (アデノシン3リン酸)は生物がエネルギーを必要とする局面において，いわば通貨としての役割を果たしている。このATPは生体内で効率よく合成されつつ消費されている。例えば，ヒトの脳について計算すると，一日数kgにおよぶATPが合成され使われている。ATPの大半は真核細胞ではミトコンドリアと葉緑体で，細菌では細胞膜で合成されている。この機構はエネルギー転換と呼ぶにふさわしいものである。すなわちミトコンドリアと細菌膜では呼吸鎖が，葉緑体では光電子伝達鎖が H^+ の電気化学的ポテンシャル差を形成する。これを駆動力として H^+ ATPase (ATP合成酵素)がADPをリン酸化してATPを合成している。動植物から細菌に至るまで普遍的に存在している H^+ ATPaseを研究するために，私達は材料として主に大腸菌を用いている。 H^+ ATPaseは8種類のサブユニットが $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon a b_2 c_{10}$ のような比で集合したもので，全体で分子量は50万をこえるものである。全遺伝子のクローニング，塩基配列決定，サブユニットへの解体と再構成など，この酵素に関する基本的な研究を行なった後，研究室では現在，主に遺伝子操作を活用した手探りによって活性中心と H^+ 輸送との共役機構の研究を進めている。図1に示したのはATPaseの活性中心周辺のモデルである。これは変異とその抑圧変異の解析，親和標識，化学修飾などから得られたものである。ヌクレオチドを結合するタンパクに普遍的に存在する配列がこの活性中心において，重要な役割を持っている。Lys-155, Thr-156, Glu-181, Arg-182などは活性に必須な残基である。

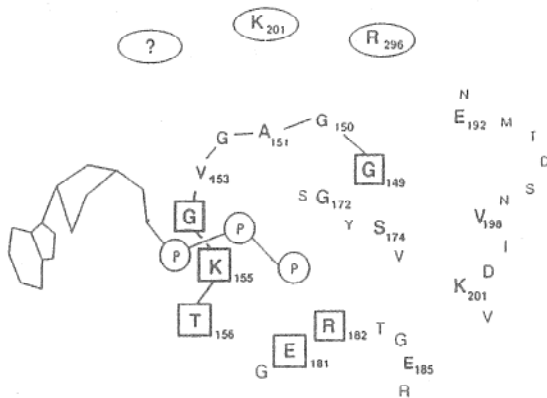
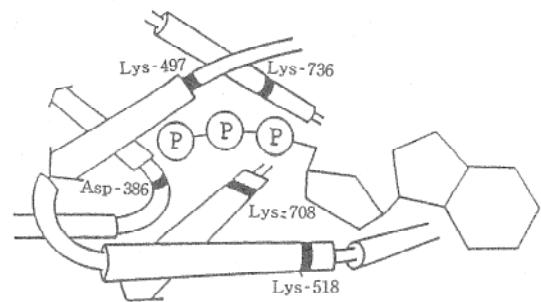


図1 F-ATPaseの活性中心

また最近、 γ サブユニットがATPaseの触媒反応と H^+ の輸送を共役させていることを見出している。このサブユニットにMet-23→Lys,あるいはMet-23→Argのような変異を導入するとATPを分解するが H^+ を輸送できなくなるしATPの合成もできなくなる。すなわち化学反応と H^+ 輸送の共役ができなくなってしまう。この変異は同じサブユニットのカルボキシル末端側の残基の第二の変異によって抑圧される。種々の実験からこのサブユニットの複数の α ヘリックスによって H^+ 輸送と化学反応の共役が調節されていると考えている。さらに葉緑体の γ サブユニットでは45残基の挿入配列があることを見出している。この部分が本酵素の光による活性化と、暗所における不活性化という植物にのみ見られる現象を司っている。この様な研究の途中経過は既にAnn. Rev. Biochemに総説としてまとめた。

2. 胃酸分泌酵素の反応機構と遺伝子の転写調節

私達の胃の内腔はpH 1附近、すなわち強酸性になっている。これは胃の壁細胞にある H^+/K^+ ATPaseが内腔側に H^+ を、細胞質側へ K^+ を輸送しているためである。壁細胞の同じ膜にはClチャンネルがあり、ここからClが分泌されている。私達は H^+/K^+ ATPaseの2つのサブユニット(α, β)のアミノ酸配列をcDNAの側から明らかにすると同時に化学修飾の実験を行った。その結果、活性中心の構造(図2)や H^+ 輸送路などについて多くの知見を得てい

図2 胃壁細胞 H^+K^+ -ATPaseの活性中心の推定構造

る。

さらにこのATPaseが何故、壁細胞にだけ発現しているのかを明らかにしようとしている。ヒト、ラット、ブタなど複数の生物の2つのサブユニットの遺伝子をクローン化し塩基配列を見ると、読み枠の上流に壁細胞に存在する核蛋白質が特異的に結合する(G/C)NGAT(A/T)という配列が見いだされた。さらにこの配列に結合する新しいDNA結合蛋白質GT1, GT2, GT3が存在することを示し、cDNAをクローン化することができた。これらの蛋白質のいずれがどのようにして、 H^+/K^+ ATPaseの遺伝子の転写を調節しているか、明らかにするべく研究を進めている。

3. 液胞型 H^+ ATPase

酵母の液胞に見出されて以来、動物細胞のリソソーム、エンドソーム等の細胞内の液胞系の膜に H^+ ATPaseが存在することが報告されている。このATPaseの活性中心および H^+ 輸送路を形成しているサブユニットはATP合成酵素の対応するものと相同性をもっているが、二つの酵素は異なるATPaseである。私達の研究室では古細菌であるメタン菌に液胞型ATPaseがあることを遺伝子の側から示した。サブユニットの一次構造を決定すると、古細菌のものは液胞のものと50~60%の相同性を示すことを明らかにした。さらに古細菌ではこのATPaseがATP合成をしていることを示唆した。

私達は液胞型ATPaseがエンドサイトーシスの過程に重要であること、尿の酸性化にかかわっていること、マクロライド抗生物質バフィ

生産と技術

ロマイシン, コンカナマイシンなどで特異的に阻害されることなどを明らかにしている. さらに液胞型 ATPase は神経終末のシナプス小胞に大量に存在すること, この ATPase の形成する H^+ の電気化学的ポテンシャル差を駆動力として神経伝達物質がシナプス小胞内部にとりこまれること, 神経遮断薬, 麻酔薬等の疎水性アミンが同様の機構でシナプス小胞にとりこまれることを示した.

遺伝子と cDNA の解析から, V-ATPase の H^+ 輸送路を形成しているサブユニットは ATP 合成酵素の対応するサブユニットと同じ祖先タンパクから遺伝子重複を経て作られるようになったと考えている. 液胞型 ATPase の ATP 合成酵素の β サブユニットに対応するサブユニット

には腎臓型と脳型のもが存在する, 腎臓型のもが転写されるための遺伝子上流のモチーフを同定し, ここに結合すると考えられる DNA 結合蛋白質を同定した.

4. おわりに

私達の研究は基礎的にはオスモエンザイム, 転写制御因子について明らかにし, 同時にマクロライド抗生物質や神経遮断薬の作用機構, 尿の酸性化の生理的意義など応用面に近い成果を得ている. さらに酵素の持つ触媒活性, 遺伝子転写制御, ダイナミックなオルガネラと生体膜の機能そのものを, あるいは, そこから生まれるアイデアをたとえば新しい材料の設計に応用することができればと考えている.

