

大阪大学産業科学研究所 所長・教授

二井 將光

「酸性オルガネラの形成とその機能の解明」

## 1. 研究実施の概要

動物細胞には内部が酸性のオルガネラ（分泌小胞、被覆小胞、リソソーム、エンドソーム、ゴルジ装置、シナプス小胞など）が存在している。また尿細管の表層細胞や骨組織の破骨細胞は外部に  $H^+$  を輸送し、酸性コンパートメント（たとえば骨吸収窩）を形成している。これらオルガネラとコンパートメントに密接な関連にあることから、研究代表者らは両者を合わせて酸性異環境と称することを提唱した。

本研究では酸性異環境が生体膜に囲まれた細胞学的な構造、および生理学的なイオン環境として形成される機構を明らかにすること、それぞれの酸性異環境の細胞生物学的な関連を明らかにすることを基本構想とした。

### 1) プロトンポンプ V 型 ATPase と作動機構

酸性異環境は V 型 ATPase（液胞型 ATPase）によるプロトンの輸送とイオンポンプ／チャネルによるイオンの輸送によって形成される。V 型 ATPase は  $V_1$ （膜表在部分）と  $V_o$ （膜内在部分）からなり、 $V_1$  は  $A, B, C, D, E, F, G, H$  の 8 種のサブユニット、 $V_o$  は  $a, c', c', c, d$  の 5 種のサブユニットからなっている。同様に多数のサブユニットからなるプロトンポンプに F 型 ATPase がある。すなわち  $F_1$  ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ ) と  $F_o$  ( $a, b, c$ ) のように F 型 ATPase も膜表在性と内在性部分の合計 8 種のサブユニットからなっている。2 つのプロトンポンプの異種サブユニット総数は 13 と 8 のように大きく異なり、アミノ酸配列から対応するサブユニットと考えられるものは 5 種類程度である。活性中心はそれぞれ  $\beta$  と  $A$  サブユニットに存在しており、触媒残基は同じと考えられる。そこで 2 種の ATPase の類似に注目し、液胞にプロトンの電気化学的ポテンシャル差を形成させ、ADP と  $P_i$ （リン酸）を加えると V 型 ATPase によって ATP が合成された。この結果は動物細胞の V 型 ATPase は ATP を合成するオルガネラには局在していないが、条件によっては ATP を合成しうることを示している。

本研究では F 型 ATPase の  $F_1$  部分を固定し、ATP を加えると  $\gamma$  サブユニットが回転することを示した。さらに変異を導入して、回転機構に対する一つのモデルを検討した。F 型 ATPase を  $\beta$  サブユニットを介してガラス表面に固定、ATP を添加すると、反応に伴って  $\gamma\epsilon c_{10-14}$  部分が回転することを示した。逆に、 $c_{10-14}$  の部分を固定しておくと、 $\alpha_3\beta_3$  部分あるいは  $a$  サブユニットが回転した。すなわち、F 型 ATPase は回転子と固定子が交換可能なナノスケールの分子モーターであることを実証した。次に本来の膜に局在している F 型 ATPase のサブユニットが回転することを示した。

それでは V 型 ATPase のサブユニットも ATP 分解に伴って回転しているのだろうか。この疑問に答えるために、酵母 V 型 ATPase の  $c$  サブユニットを固定すると、ATP の加水分解に伴って  $V_1$  部分が回転した。以上の結果は、F 型 ATPase および V 型 ATPase が回転を伴う作動機構によってプロトンを輸送していることを示唆している。

## 2) 多彩な酸性異環境

幅広い生理学的な役割を考えると、V 型 ATPase は動物個体にとって必須であると推定できる。

実際に V 型 ATPase の発現を阻止すると、線虫は予想したとおりに胚性致死になった。同様に、遺伝子が一つであることを確認し、*c* サブユニットを欠失させたところ、マウス胚は着床過程で致死となった。対応して各細胞から酸性オルガネラは消失し、ゴルジ装置をはじめとして内膜系のオルガネラの構造が大きく変化した。以上の結果は V 型 ATPase が酸性異環境を形成しており、動物の胚発生に必須であることを示している。

既に述べたように酸性オルガネラとしてリソソーム、エンドソーム、ゴルジ装置、シナプス小胞などが知られている。我々は V 型 ATPase の形成するプロトンの電気化学的ポテンシャル差によって、シナプス小胞のトランスポーターが駆動され、神経伝達物質が取り込まれることを明らかにした。また、内部酸性オルガネラには脂溶性アミンが取り込まれ、プロトン化するために蓄積することを示した。さらにサブユニットに対する抗体と V 型 ATPase の特異的な阻害剤であるコンカナマイシン/バフィロマイシンなどを駆使し、新しい酸性オルガネラを同定した。その一つである松果体細胞の小胞 (Microvesicle) は V 型 ATPase の形成するプロトンの電気化学的ポテンシャル差を駆動力としグルタミン酸を蓄積した。松果体細胞はこのグルタミン酸を開口放出し、メラトニンの生合成を調節している。同様の手法によって他の細胞、組織における新しい酸性異環境を同定し、生理的な役割を明らかにすることができた。

## 3) V 型 ATPase と多彩な酸性異環境

さらに『幅広い組織・細胞やオルガネラに多彩な酸性異環境を形成している V 型 ATPase が全て同じものとは考え難い』という発想から、cDNA ライブラリーを検索し、V 型 ATPase のサブユニットの多彩なイソフォームを発見した。線虫では、膜内在のサブユニット *a* (4 種) および *c* (2 種) のイソフォームが細胞特異的に発現しており、いずれかを欠失させると、線虫は異なる発生時期に致死となった。

マウスでは *a* サブユニットに *a1*, *a2*, *a3*, *a4* のイソフォームを、さらに膜と活性中心をつなぐストーク部分を構成する *C*, *E*, *G*, *d* にもイソフォームを見出した。各イソフォームは興味深い組織 (細胞) 分布を示した。たとえば、*G* サブユニットでは、普遍的な V 型 ATPase は *G1* を、シナプス小胞のものは *G2* を、尿細管表層細胞のものは *G3* を持っていた。さらに *E1* と *E2*, *C1* と *C2-a*, *C2-b*, *d1* と *d2* の各イソフォームは、細胞あるいはオルガネラに特異的なものと、普遍的に発現しているものがあつた。

これらの結果から、『V 型 ATPase は膜内在部分あるいはストーク部分のイソフォームを取り換え、細胞あるいはオルガネラにおける局在を変え、特異的な酸性異環境を形成している。』と結論した。さらに、本研究では *a3* イソフォームを時期/部位に特異的に欠失するマウスを作出した。また、*c* サブユニットを特定の細胞に於いて欠出させ、酸性オルガ

ネラの機能を任意に欠損させる系を作った。これらのアプローチによって、オルガネラの生理学的な役割を細胞特異的に解析できるマウスの系の完成が間近い。

#### 4) 酸性異環境の形成

さらに特異的なイソフォームを持つ V 型 ATPase には、分化に伴い細胞内の局在を変えるものがあつた。破骨細胞の細胞形質膜には a3 をサブユニットとする V 型 ATPase が局在した。破骨細胞様に分化する RAW264.7 細胞を調べたところ、a3 を持つ V 型 ATPase はリソソーム/エンドソームに局在した。また a1, a2, a4 イソフォームを持つ V 型 ATPase も RAW264.7 細胞の形質膜には存在しなかった。これは破骨細胞の前駆細胞の形質膜には V 型 ATPase が存在しないことを示している。破骨細胞に分化する過程でリソソーム/エンドソームが形質膜とその近傍に運ばれ、最終的に a3 を持つ V 型 ATPase が形質膜に局在するのが見出された。同時にリソソームの膜タンパクである lamp2 (Lysosome-Associated Membrane Protein 2) も同じ局在を示した。以上の結果は『リソソーム膜が破骨細胞の形質膜の少なくとも一部を形成する』ことを示す細胞生物学的に重要な発見である。

このようなオルガネラ間の連関・形成に関与するマウスの因子を明らかにするべく、酵母を用いて解析を進めた。酵母には著明な酸性オルガネラとして液胞が存在している。液胞形成変異株 (Vam) を相補するマウスの cDNA を検索し、リソソームとエンドソームの形成に関与する Syntaxin7, mVam2, mVam6, SNX1 (Sorting Nexin) 等のタンパクを同定した。さらに Syntaxin7, mVam2, mVam6 のノックアウト・マウスを得て、解析を進めている。

本研究は大阪大学・産業科学研究所の二井および、和田助教授の研究室を中心に行われ、以下の4つの研究室が協力した。

金澤 浩 教授 (阪大・理) の研究室は本研究の展開に際してイオン輸送に関連する研究に協力し、また V 型 ATPase のノックアウトマウスの作成と解析を産業科学研究所の二井および和田らと共同で行った。山本 章嗣 講師 (関西医大) は細胞内膜系のオルガネラ形成に関する研究を展開し、同時に電子顕微鏡による形態観察に協力した。岩本(木原)昌子 助手 (東大・総合文化) は F 型および V 型 ATPase の作動機構の研究に主に変異酵素の構築と解析の面から協力した。森山 芳則 博士は教授 (岡大・薬) 昇任後、酸性オルガネラの多様性に関し、解析を進め、本研究をサポートした。

## 2. 研究構想

本研究を開始した時点では酸性異環境が細胞内に局在する各種のオルガネラとして、あるいは細胞外のコンパートメントとして形成される機構を明らかにすることを目的とした。すなわち、細胞生物学的な膜に囲まれた構造と、同時に内部に生理学的な酸性環境が作られる機構に注目した。したがって、オルガネラ膜および形質膜の形成機構から、プロトン輸送するポンプおよび他のイオンポンプが内部イオン環境を形成するまでを対象とした。

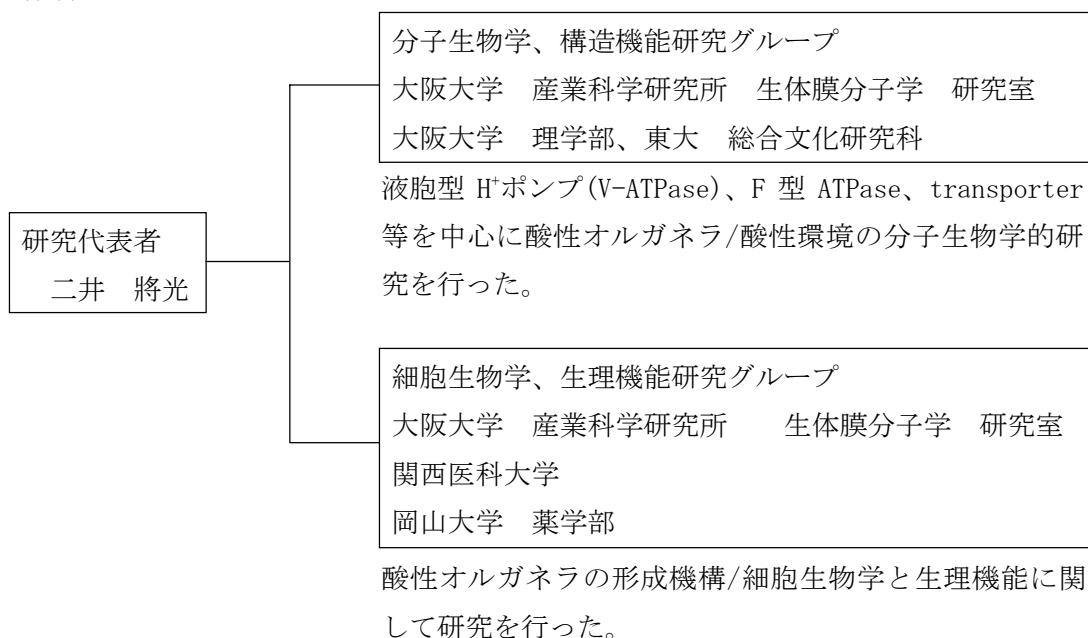
研究の実施は生化学・分子生物学的なアプローチを中心として担当した分子生物学・構

造機能研究グループ、及び生理学と細胞学・細胞生物学的なアプローチを担当した細胞生物学、生理機構研究グループの二つのサブグループの緊密な協力によった。学際的な研究の性質から、ほとんどの場合に研究発表と論文執筆は共同で行った。

研究の発展によって、酸性異環境を形成する主役であるプロトンポンプが極めて多彩なサブユニット構成を示すことが発見された。そこで、「どのように、そして、なぜプロトンポンプが多彩なのか」を明らかにすることが本研究の新しい目標となった。このような疑問を解明する過程に於いて、重要な細胞生物学的な知見が得られた。その一つは「破骨細胞の形質膜がリソソーム膜から形成される」ことをはっきりと示す発見である。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



#### 4. 研究期間中の主な活動

##### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 14 年 6 月 10 日	チーム内ミーティング	関西医科大学	5 名	V 型サブユニットの電子顕微鏡観察の方法について討論した
平成 13 年 12 月 20 日	チーム内ミーティング	大阪大学・産業科学研究所	5 名	本研究の方向性を詳しく討論した
平成 13 年 3 月 16-17 日	CREST Mini Symposium	大阪大学・银杏会館	200 名	外国人を招聘してシンポジウムを行った。幸いなことに別件で来日していた外国人の場合には旅費は出す必要がなかった。
平成 12 年 9 月 20-21、10 月 2 日	チーム内ミーティング	大阪大学・産業科学研究所	6 名	F 型および V 型 ATPase に関する詳しい討論をし、両プロトンポンプに関する次段階の実験計画をたてた
平成 11 年 2 月 5 日	チーム内ミーティング	大阪大学・産業科学研究所	8 名	V 型 ATPase の Poteolipid 遺伝子を欠くマウスは胚性致死となるが、初期発生段階での表現型と遺伝子型を詳細に検討した結果、blastocyst の段階までは発生しうることを示された。この結果に関してデータの紹介と討議を行った。
平成 11 年 2 月 16 日	チーム内ミーティング	大阪大学・産業科学研究所	4 名	初期発生段階において酸性化コンパートメントが顕著に発達し、その酸性度がダイナミックに変化することが光学顕微鏡レベルで示された。そこで電子顕微鏡観察により、詳細な観察を行う必要が生じた。野生型・proteolipid 欠損マウスの両方の初期胚における酸性コンパートメントについての詳細な観察データを討議した
平成 11 年 3 月 23 日	チーム内ミーティング	大阪大学・産業科学研究所	4 名	マラリア原虫の電子顕微鏡観察より、赤血球での寄生膜コンパートメントは酸性化されていることが示された。また、マラリアゲノムの解析から、膜動態に関与する膜融合因子 NSF が存在することが明らかとな

				った。これらの結果に関して討論を行った。
平成 10 年 8 月 1 日	チーム内ミーティング	千里ライ フセンタ ー会議室	約 50 名	酸性オルガネラの形成と多彩な機能に関する研究の推進のため、各研究グループでのこれまでの成果を交換し、今後の研究方向についての議論を行った。内容：分子生物学、構造機能グループより、和田、金澤から V 型 ATPase サブユニットの多様性、誘導型発現制御系の構築、V 型 ATPase サブユニットの欠損マウスの表現型について報告があった。また、細胞生物学、生理機能グループの森山、山本から内分泌制御における酸性オルガネラの関与、酸性オルガネラの形態的多様性、マラリア原虫での酸性オルガネラについて報告があった。各研究グループの成果を統合した今後の研究方向性が二井研究代表によって示された。
平成 10 年 1 月 28 日	チーム内ミーティング	大阪大学 先端的研 究オーブ ンセンタ ー会議室	約 40 名	趣旨：本研究プロジェクトの平成 10 年度の研究総括を行うために、平成 11 年度の研究結果の総合的な討論を行った。内容：岡(二井研)から V 型 ATPase の膜内在性サブユニットの多様性と構造に関する成果、表(二井研)から F 型 ATPase のエネルギー共役に関する成果が発表され、今後の研究方向を討論した。孫一和田から V 型 ATPase 欠損マウスの表現型の解析結果が報告された。中村(二井研)から酸性オルガネラ構築に関する分子が報告された。井上(金澤研)は高等動物の遺伝学解析の新しい系の導入について報告し、森山(岡山大)は松果体における新しい制御機構について討論した。山本(関西医科大)は、高感度免疫電子顕微鏡観察法を紹介した。

## 5. 主な研究成果

### (1) 論文発表

二井 将光、和田 洋グループ (国内8件、海外45件)

1. H. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio, M. Hayashi, T. Nishi, A. Yamamoto, M. Futai, A. Yamaguchi and Y. Moriyama. Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J. Neurosci.*, 18, 2056-2062 (1998).
2. M. Iida, K. Terada, Y. Sambongi, T. Wakabayashi, N. Miura, K. Koyama, M. Futai and T. Sugiyama. Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 428, 281-285 (1998).
3. T. Yoshimizu, H. Omote, T. Wakabayashi, Y. Sambongi and M. Futai. Essential Cys-Pro-Cys motif of *Caenorhabditis elegans* copper transport ATPase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1258-1260 (1998).
4. M. Hayashi, A. Yamamoto, S. Yatsushiro, H. Yamada, M. Futai, A. Yamaguchi and Y. Moriyama. Synaptic vesicle protein SV2B, but not SV2A, is predominantly expressed and associated with microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.*, 71, 356-365 (1998).
5. M. Futai, T. Oka, Y. Moriyama, and Y. Wada. Roles of single membrane organelles: factors establishing the acid lumenal pH. *J. Biochem.* 124, 259-267 (1998)
6. T. Oka, R. Yamamoto and M. Futai. Multiple genes for vacuolar-type ATPase proteolipids in *Caenorhabditis elegans*: a new gene, *vha-3*, has a distinct cell-specific distribution. *J. Biol. Chem.* 273, 22570-22576 (1998).
7. H. Omote, K. Tainaka, K. Fujie, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, M. Futai. Stability of the *Escherichia coli* ATP synthase FoF<sub>1</sub> complex is dependent on interactions between  $\gamma$ Gln-269 and the  $\beta$  subunit loop.  $\beta$  Asp-301-  $\beta$  Asp-305. *Arch. Biochem. Biophys.*, 358, 277-282 (1998)
8. M. Maeda, K. Hamano, Y. Hirano, M. Suzuki, E. Takahashi, T. Terada, M. Futai and R. Sato. Structure of P-type transporting ATPases and chromosomal locations of their genes. *Cell Structure and Function* 23, 315-323 (1998)
9. T. Wakabayashi, N. Nakamura, Y. Sambongi, Y. Wada, T. Oka and M. Futai Identification of the copper chaperone, *CUC-1*, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, *CUA-1*. *FEBS Lett.*, 440, 141-146 (1998).
10. H. Omote and M. Futai. Mutational analysis of ATPase: catalysis and energy coupling. *Acta Physiol Scand*, 163, Suppl 643, 177-183 (1998).
11. T. Oka, S. Murakami, Y. Arata, J. Hirabayashi, K. Kasai, Y. Wada and M. Futai. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch. Biochem. Biophys.*, 361, 195-201 (1999).
12. Y. Sambongi, T. Nagae, Y. Liu, T. Yoshimizu, K. Takeda, Y. Wada and M. Futai. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport*, 10, 753-757 (1999).
13. H. Murakami, G-H. Sun-Wada, M. Matsumoto, T. Nishi, Y. Wada and M. Futai. Human histamine H<sub>2</sub> receptor gene: Multiple transcription initiation and tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, 451, 327-331 (1999).
14. H. Omote, N. Sambonmatsu, K. Saito, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai. The  $\gamma$  subunit rotation and torque generation in F<sub>1</sub>-ATPase from wild-type or



- uncoupled mutant *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 7780-7784 (1999).
15. M. I. R. Petalcorin, T. Oka, M. Koga, K. Ogura, Y. Wada, Y. Ohshima, and M. Futai. Disruption of *clh-1*, a chloride channel gene, results in a wider body of *Caenorhabditis elegans*. J. Mol. Biol., 294, 347-355 (1999).
  16. Y. Sambongi, Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai. Mechanical rotation of *c* subunit oligomer in ATP synthase (FoF1): direct observation. Science, 286, 1722-1724 (1999).
  17. M. Futai and H. Omote. Mutational analysis of ATP synthase an approach to catalysis and energy coupling. Frontiers of Cellular Bioenergetics "Molecular Biology, Biochemistry, and Physiopathology" 399-421 (1999).
  18. M. Futai, H. Omote, Y. Sambongi and Y. Wada. ATP syntase (H<sup>+</sup> ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. Biochim. Biophys. Acta, 1458, 276-288 (2000).
  19. N. Nakamura, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai. Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes J. Biol. Chem., 275, 6523-6529 (2000).
  20. M. Futai, T. Oka, G.-H. Sun-Wada, Y. Moriyama, H. Kanazawa and Y. Wada. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. J. Exp. Biol. 203, 107-116 (2000).
  21. T. Hirata, N. Nakamura, H. Omote, Y. Wada, and M. Futai. Regulation and reversibility of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. J. Biol. Chem. 275, 386-389 (2000).
  22. G. -H. Sun-Wada, S. Manabe, T. Yoshimizu, C. Yamaguchi, T. Oka, Y. Wada, and M. Futai. Upstream regions directing tissue-specific expression of the GATA6 gene during mouse early development. J. Biochem. 127, 703-709 (2000).
  23. T. Toyomura, T. Oka, C. Yamaguchi, Y. Wada, and M. Futai. Three subunit *a* isoforms of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: Preferential expression of the *a3* isoform during osteoclast differentiation. J. Biol. Chem. 275. 8760-8765 (2000).
  24. N. P. Le, H. Omote, Y. Wada, M. K. Al-Shawi, R. Nakamoto and M. Futai. *Escherichia coli* ATP synthase  $\alpha$  subunit Arg-376: the catalytic site arginine does not participate in the hydrolysis/synthesis reaction but is required for promotion to steady state. Biochemistry (Washington), 39, 2778-2783 (2000).
  25. Y. Sambongi, M. Tanabe, Y. Iko, I. Ueda, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada and M. Futai. Rotational catalysis by F-type ATPase. Elsevier Science B. V., Na/K-ATPase and Related ATPases (Ed. by K. Taniguchi and S. Kaya) 57-63 (2000).
  26. Y. Sambongi, K. Takeda, T. Wakabayashi, I Ueda, Y. Wada and M. Futai. *Caenorhabditis elegans* senses protons through amphid chemosensory neurons: Proton signals elicit avoidance behaviour. NeuroReport, 11, 2229-2232 (2000).
  27. Y. Wada, Y. Sambongi, and M. Futai. Biological nano motor, ATP synthase FoF1: From catalysis to  $\gamma\epsilon c_{10-12}$  subunit assembly rotation. Biochem. Biophys. Acta., 1459, 499-505 (2000).
  28. Y. Sambongi, I. Ueda, Y. Wada and M. Futai. A biological molecular motor, proton-translocating ATP synthase: Multidiciplinary approach for a unique membrane enzyme. J. Biomemb. Bioenerg. 32, 441-448 (2000).
  29. T. Oka, and M. Futai. Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenohabdis elegans*. J. Biol. Chem. 275, 29556-29561 (2000).

30. G.-H. Sun-Wada, Y. Murata, A. Yamamoto, H. Kanazawa, Y. Wada and M. Futai. Acidic endomembrane organelles are required for mouse postimplantation development. *Dev. Biol.*, 228 315-325 (2000).
31. M. Tanabe, K. Nishio, Y. Iko, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, H. Omote, I. Ueda, Y. Wada, and M. Futai. Rotation of a complex of the  $\gamma$  subunit and *c* ring of *Escherichia coli* ATP synthase: the rotor and stator are interchangeable. *J. Biol. Chem.* 276, 15269-15274 (2001).
32. N. Nakamura, G.-H. Sun-Wada, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai. Association of mouse sorting nexin 1 oligomer with early endosomes. *J. Biochem.* 130, 765-771 (2001).
33. T. Oka, T. Toyomura, K. Honjo, Y. Wada, and M. Futai. Four Subunit *a* isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar  $H^+$ -ATPase: Cell-specific expression during development *J. Biol. Chem.* 276, 33079-33085 (2001).
34. G.-H. Sun-Wada, H. Murakami, H. Nakai, Y. Wada and M. Futai. Mouse *Atp6f*, the gene encoding the 23-kDa proteolipid of vacuolar proton translocating ATPase. *Gene* 274, 93-99, (2001).
35. Y. Iko, Y. Sambongi, M. Tanabe, A. Iwamoto-Kihara, K. Saito, I. Ueda, Y. Wada, and M. Futai. ATP synthase F<sub>1</sub> sector rotation; defective torque generation in the  $\beta$  subunit Ser-174 to Phe mutant and its suppression by second mutations. *J. Biol. Chem.* 276. 47508-47511 (2001).
36. T. Hirata, Y. Wada, and M. Futai. Sodium and sulfate ion transport in yeast. *J. Biochem.* 131,261-265 (2002).
37. K. Hayami, T. Noumi, H. Inoue, G.-H. Sun-Wada, T. Yoshimizu, H. Kanazawa. The murine genome contain one functional gene and two pseudogenes coding for the 16kDa proteolipid subunit of vacuolar  $H^+$  -ATPase. *Gene* 273, 199-206 (2001).
38. Y. Nakanishi, T. Saijo, Y. Wada and M. Maeshima, Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar  $H^+$ -pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 276, 7654-7660 (2001).
39. T. Oka, Y. Murata, M. Namba, T. Yoshimizu, T. Toyomura, A. Yamamoto, G.-H. Sun-Wada, N. Hamasaki, Y. Wada, and M. Futai. *a4*, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar  $H^+$ -ATPase subunit *a*. *J. Biol. Chem.*, 276, 40050-40054 (2001).
40. G. -H. Sun-Wada, Y. Imai-Senga, A. Yamamoto, Y. Murata, T Hirata, Y Wada and M. Futai A proton pump ATPase with testis-specific *E1* subunit isoform required for acrosome acidification. *J. Biol. Chem.*, 277, 18098-18105 (2002).
41. Y. Sambongi, H. Nitta, K. Ichihashi, M Futai, and I. Ueda. A novel water-soluble hantzsh 1, 4-dihydropyridine compound that functions in biological processes through NADH regeneration. *J. Org. Chem.*, 67, 3499-3501 (2002).
42. Y. Imai-Senga, G. -H. Sun-Wada, Y. Wada and M. Futai. A human gene, *ATP6E1*, encoding a testis-specific isoform of  $H^+$ ATPase subunit E. *Gene*, 289, 7-12 (2002).
43. Y. Murata, G.-H. Sun- Wada, T. Yoshimizu, A. Yamamoto, Y. Wada and M. Futai. Differential localization of V-type  $H^+$  pump with *G* subunit isoforms (*G1* and *G2*) in mouse neurons. *J Biol. Chem.* 277, 36296-303 (2002).
44. K. Nishio, A. Iwamoto-Kihara, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai. Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes:  $\alpha$  or  $\beta$  subunit rotation relative to the *c* subunit ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13448-13452 (2002).
45. G. -H. Sun-Wada, T. Yoshimizu, Y. Imai-Senga, Y. Wada and M. Futai. Diversity of mouse

- proton-translocating ATPase: Presence of multiple isoforms of the *C*, *d* and *G* subunits Gene, 302, 147-153 (2003).
46. 二井將光、脚光を浴びる ATP 合成酵素の構造と反応機構、細胞工学、17、174-175 (1998)
  47. 和田戈虹、村上秀昭、二井將光、遺伝子からみたヒスタミン H2 受容体、医学のあゆみ、188、173-178 (1999)
  48. 二井將光、酸性オルガネラの形成とその機能に関する研究：分子・オルガネラ・細胞・個体のレベルからプロトンを考える、生産と技術 51、212-214 (1999)
  49. 和田戈虹、村上秀昭、二井將光、ヒスタミン H2 受容体遺伝子、別冊・医学のあゆみ ヒスタミン研究の最近の進歩 29-33 (2000)
  50. 二井將光、三本木至宏、ATP 合成酵素：膜内在サブユニットが回転するナノモーター、日本応用酵素協会誌 35、1-10 (2000)
  51. 二井將光、三本木至宏、和田洋、ATP 合成酵素 (ATP を作るバイオナノマシーン) とプロトンポンプ ATPase、蛋白質・核酸・酵素、46「新世紀における蛋白質科学の進展」、1754-1763 (2001)
  52. 孫戈虹、和田洋、二井將光、酸性オルガネラの機能：動物の個体レベルから、蛋白質・核酸・酵素、46、2140-2146 (2001)
  53. 和田洋、高等生物の V-ATPase の多様性、蛋白質・核酸・酵素、47、1758-17596 (2002)

森山 芳則 (国内 5 件、海外 23 件)

1. A. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct. Funct. 23, 33-42, (1998).
2. Y. Moriyama, H. Yamada, M. Hayashi, T. Oda, and A. Yamaguchi. Identification of D-aspartate in rat pheochromocytoma PC12 cells. Neurosci. Lett. 248, 57-60, (1998).
3. H. Yamada, A. Ogura, S. Koizumi, A. Yamaguchi, and Y. Moriyama. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. J. Neuroscience 18, 4946-4952 (1998).
4. S. Ishio, H. Yamada, M. Hayashi, S. Yatsushiro, T. Noumi, A. Yamaguchi, Y. Moriyama. D-Aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. Neurosci. Lett. 249, 143-146 (1998).
5. S. Hu, H. Inoue, Y. Moriyama, K. Goto and T. Sawai. Immunoreactivity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human tissues using polyclonal rabbit antibodies against V-ATPase subunits. Acta Histochem. Cytochem. 31, 309-322 (1998)
6. S. Yatsushiro, H. Yamada, M. Hayashi, S. Tsuboi and Y. Moriyama. Functional expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in rat pinealocytes. Neuroreports 10, 1599-1603 (1999).
7. M. Hayashi, T. Itabashi and Y. Moriyama. D-Aspartate is present in human retinoblastoma Y79 cells. Neurosci. Lett. 267, 37-40 (1999).
8. M. Hayashi, M. Haga, S. Yatsushiro, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. J. Neurochem. 73, 2538-2545 (1999).
9. S. Ishio, H. Yamada, Cheryl M. Craft and Y. Moriyama. Hydroxyindole-o-methyltransferase is another target for L-glutamate-evoked inhibition of melatonin synthesis in rat pinealocytes.

- Brain Res. 850, 73-78 (1999).
10. S. Yatsushiro, H. Yamada, M. Hayashi, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Ionotropic glutamate receptors microvesicle-mediated exocytosis of L-glutamate in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 75, 288-297 (2000).
  11. S. Yatsushiro, M. Hayashi, M. Morita, H. Aso, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Glutamate receptor subunit  $\delta 2$  is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *J. Neurochem.* 73, 1115-1122 (2000).
  12. Hayashi, H. Yamada, T. Mitamura, T. Horii, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Vacuolar  $H^+$ -ATPase localized in plasma membranes of malaria parasite cells, *Plasmodium falciparum*, is involved in regional acidification of parasitized erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 275, 34353-34358 (2000).
  13. G. Kawa, A. Yamamoto, T. Yoshimori, K. Muguruma, T. Matsuda, and Y. Moriyama. Immunohistochemical localization of V-ATPases in rat spermatids. *Int. J. Androl.*, 23, 278-283 (2000)
  14. Takeda, M. Haga, H. Yamada, M. Kinoshita, M. Otsuka, S. Tsuboi and Y. Moriyama. Ionotropic glutamate receptors expressed in human retinoblastoma Y79 cells, *Neurosci. Lett.*, 294, 97-100 (2000)
  15. Y. Moriyama, M. Hayashi, H. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio and A. Yamamoto. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J. Exp. Biol.* 203, 117-125 (2000).
  16. H. Yamada, M. Otsuka, M. Hayashi, K. Hamaguchi, A. Yamamoto and Y. Moriyama.  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis of L-glutamate by  $\alpha TC6$ , clonal mouse pancreatic  $\alpha$  cells. *Diabetes* 50, 1012-1020 (2001)
  17. M. Hayashi, S. Taniguchi, Y. Ishizuka, Hye-Sook Kim, Y. Wataya, A. Yamamoto and Y. Moriyama. A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin a sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 15249-15255 (2001)
  18. K. Sakata, T. Yamashita, M. Maeda, Y. Moriyama, S. Shimada and M. Tohyama : Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem. J.* 356, 53-60 (2001)
  19. Nakatsuka, M. Hayashi, A. Muroyama, M. Otsuka, S. Kozaki, H. Yamada and Y. Moriyama. D-Aspartate is stored in secretory granules and released through a  $Ca^{2+}$ -dependent pathway in a subset of rat pheochromocytoma PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 276, 26589-26596 (2001)
  20. M. Hayashi, M. Otsuka, R. Morimoto, S. Hirota, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama. Differentiation-associated  $Na^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J. Biol. Chem.* 276, 43400-43406 (2001)
  21. H. Yamada, M. Hayashi, S. Uehara, M. Kinoshita, A. Muroyama, M. Watanabe, K. Takei and Y. Moriyama. Norepinephrine triggers  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis of 5-hydroxytryptamine from rat pinealocytes in culture. *J. Neurochem.* 81, 533-540 (2002).
  22. M. Hayashi, A. Yamamoto and Y. Moriyama. The internal pH of synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes in culture. *J. Neurochem.* 82, 698-704 (2002)

23. S. Tsuboi, Y. Kotani, K. Ogawa, T. Hatanaka, S. Yatsushiro, M. Otsuka and Y. Moriyama. An intramolecular disulfide bridge as a catalytic switch for serotonin N-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 277, 44229-44235 (2002)
24. 森山芳則、山田浩司、興奮性アミノ酸による松果体の自律性内分泌制御、*生化学*、70、(5) 376-380 (1998)。
25. 森山芳則、松果体細胞におけるグルタミン酸の入出力系とメラトニンの分泌制御、*蛋白質、核酸、酵素*、2 神経回路形成と機能発達、45、(3)、2月増刊、456-460 (2000)。
26. 森山芳則、グルタミン酸作動性パラ神経 Glutamatergic paraneuron、*ファルマシア* 37 (6) 496-500 (2001)
27. 林 美都子、森山芳則、細胞内物質輸送のダイナミズム V 小胞輸送 7 内分泌 p.161-169、*シュプリンガー・フェアラーク東京*、(1999)。
28. 森山芳則、シリーズ バイオサイエンスの世紀、第7巻「生体膜のエネルギー装置」分担執筆、液胞型 ATPase - 細胞の中に酸のプールを作るポンプ、89-101 共立出版 (2000. 10)

山本 章嗣 (国内 5 件、海外 17 件)

1. A. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki and Y. Yashiro. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23, 33-42. (1998)
2. R. Masaki, A. Yamamoto, K. Akagawa and Y. Tashiro, Important roles of the C-terminal portion of HPC-1/syntaxin 1A in membrane anchoring and intracellular localization. *J. Biochem.* 124, 311-318, (1998)
3. M. Ohashi, I. Miwako K. Nakamura, A. Yamamoto, M. Murata, S. Ohnishi and K. Nagayama, An arrested late endosome-lysosome intermediate aggregate observed in a Chinese hamster ovary cell mutant isolated by novel three-step screening. *J. Cell Sci.* 112, 1125-1138, (1999)
4. C. Yamamoto, H. Takemoto, K. Kuno, D. Yamamoto, A. T subura, K. Kamata, H. Hirata, A. Yamamoto, H. Kano, T. Seki and K. Inoue, Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatotology*, 30, 894-902, (1999)
5. T. Yoshimori, F. Yamagata, A. Yamamoto, N. Mizushima Y. Kabeya, A. Nara, M. Ishido, M. Ohashi, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi, SKD1, an AAA ATPase related to the yeast Vps4p, regulates morphology and transport function of early endosomes. *Mol. Biol. Cell.* 11, 747-763, (2000)
6. F. Kano, K. Takenaka, A. Yamamoto, K. Nagayama, E. Nishida, and M. Murata, Cdc2 and MEK are differently required for two steps of the Golgi fragmentation induced by *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 149, 357-368 (2000)
7. K. Hatsuzawa, H. Hirose, K. Tani, A. Yamamoto, R.H. Scheller, and Tagaya M. Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* 275, 13713-13720 (2000)
8. T. Kanazawa, S. Nakamura, M. Momoi, T. Yamaji, H. Takematsu, H. Yano, H. Sabe A. Yamamoto, T. Kawasaki and Y. Kozutsumi, Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite psychosine. *J. Cell Biol.* 149, 943-950 (2000)

9. T. Fukunaga, M. Nagahama, K. Hatsuzawa, K. Tani, A. Yamamoto and M. Tagaya, Implication of sphingolipid metabolism in the stability of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* 113, 3299-3307 (2000)
10. Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728 (2000)
11. N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Htano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiisa Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-668 (2001)
12. BY Kim, H. Kramer, A. Yamamoto, E. Kominami, S. Kohsaka and C. Akazawa, Molecular characterization of mammalian homologues of Class C Vps proteins that interact with syntaxin 7. *J. Biol. Chem.* 276, 29393-29402 (2001)
13. A. Yoshioka, R. Shirakawa, H. Nishioka, A. Tabuchi, T. Higashi, H. Ozaki, A. Yamamoto, T. Kita and H. Horiuchi, Identification of protein kinase Ca as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca<sup>2+</sup>-induced  $\alpha$ - and dense-core granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem.* 276, 39379-39385 (2001)
14. M. Fukuda, A. Yamamoto, and K. Mikoshiba, Formation of crystalloid endoplasmic reticulum induced by expression of synaptotagmin lacking the conserved WHXL motif in the C-terminus: Structural importance of the WHXL motif in the C2B domain. *J. Biol. Chem.* 276, 41112-41119 (2001)
15. I. Miwako, A. Yamamoto, T. Kitamura, K. Nagayama and M. Ohashi, Cholesterol requirement for insulin-like growth factor 2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport from multivesicular late endosomes to the Golgi. *J. Cell Sci.* 144, 1765-1776 (2001)
16. Y. Kiyozuka, H. Nakagawa, Y. Uemura, H. Senzaki, A. Yamamoto, T. Noguchi, H. Mizuta, K. Nakanishi, S. Nakano and A. Tsubura, Novel cell lines established from a human myxoid malignant fibrous histiocytoma arising in the uterus. *Cancer Genet Cytogenet.* 127, 7-15 (2001)
17. K. Kitagawa, K. Yagyu, A. Yamamoto, N. Hattori, K. Omori, X.T. Zeng, C. Inagaki, Molecular cloning and characterization of the Cl<sup>-</sup> pump-associated 55-kDa protein in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 363-371 (2001)
18. M. Sohda, Y. Misumi, A. Yamamoto, A. Yano, N. Nakamura and Y. Ikehara, Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J. Biol. Chem.* 276, 45298-45306 (2001)
19. A. Nara, N. Mizushima, A. Yamamoto, Y. Kabeya, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct. Funct.* 27, 29-37 (2002)
20. M. Nagahama, M. Suzuki, Y. Hamada, K. Hatsuzawa, K. Tani, A. Yamamoto and M. Tagaya SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Mol. Biol. Cell.* 14, 262-273 (2002)
21. 山本章嗣、吉森保、田代裕、V-ATPase と小胞輸送。細胞工学。17, 597-608, 1998。
22. 山本章嗣、柁木龍一、小胞体に留まるタンパク質とメンブレントラフィック。実験医学、17, 110-117, 1999

金澤 浩 (国内 8件、海外 4件)

1. A. Ekuni, H. Watanabe, N. Kuroda, K. Sawada, H. Murakami and H. Kanazawa Reconstitution of F<sub>1</sub>-ATPase activity from *Escherichia coli* subunits  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunit tagged with six histidine residues at the C-terminus. FEBS Lett., 427, 64-68. (1998)
2. H. Inoue, T. Noumi, T. Shimomura, N. Takimoto, T. Tsuchiya and H. Kanazawa, pH-dependent growth retardation by enhancement of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity of *Escherichia coli* : An application to isolation of antiporter defective mutants. Biol. and Pharm. Bull. 21, 1128-1133. (1998)
3. H. Inoue, T. Sakurai, S. Ujike, T. Tsuchiya, H. Murakami and H. Kanazawa, Expression of functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. FEBS Lett. 443,11-16 (1999)
4. H. Inoue, T. Noumi, M. Nagata, M. Mutakami, H. Kanazawa, Targeted disruption of the gene encoding the proteolipid subunit of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase leads to early embryonic lethality. Biochim. Biophys.Acta. 1413, 130-138. (1999)
5. S. Kamauchi, T. Fudemoto, J. Miki, H. Inoue and H. Kanazawa, Monoclonal antibodies recognizing surface residues of the  $\beta$  subunit from *Escherichia coli* F<sub>1</sub> ATPase : Functional importance of the epitope residues. J. Biochem., 128, 629-635 (2000)
6. H. Inoue, Y. Tsuboi and H. Kanazawa, Chimeric Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters of *NhaA* from *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*: Implications for domains of *NhaA* for pH sensing. J. Biochem., 129,569-576 (2001)
7. K. Hayami, T. Noumi, H. Inoue, G-H. Sun, T. Yoshimizu and H. Kanazawa, The murine genome contains one functional gene and two pseudogenes coding for the 16 kDa proteolipid subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Gene, 273、 199-206 (2001)
8. M. Matsumoto, Y. Miyake, M. Nagita, H. Inoue, D. Shitakubo, K. Takemoto, C. Ohtsuka, N. Nakamura and H. Kanazawa, A serine/threonine kinase which causes apoptosis like cell death interacts with a calcineurin B like protein capable of binding Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchanger 1, J. Biochem. 130, 217-225 (2001)
9. S. Kamauchi, K. Mitsui, S. Ujike, M. Haga, N. Nakamura, H. Inoue, S. Sakajo, M. Ueda, A. Tanaka and H. Kanazawa, Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (*Nha1p*), J. Biochem. 131, 821-831(2002)
10. U. Tokumoto, S. Nomura, Y. Minami, H. Mihara, S. Kato, T. Kurihara, N. Esaki, H. Kanazawa, H. Matsubara, and Y. Takahashi, Network of protein protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli* . J. Biochem., 131, 713-719 (2002)
11. N. Nakamura, Y. Miyake, M. Matsushita, S. Tanaka, H. Inoue, and H. Kanazawa, KIFB $\beta$ 2, capable of interacting with CHP, is localized in synaptic vesicles. J. Biochem. 132, 483 - 491 (2002),
12. H. Inoue, Y. Nakamura, M. Nagita, T. Takai, M. Masuda, N. Nakamura and H. Kanazawa Molecular cloning and characterization of calcineurin homologous protein isoform 2 (CHP2), a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger binding protein. J. Biochem., in press. (2002)

(2) 特許出願

なし

(3) 新聞報道等

①新聞報道

日本工業新聞、平成 11 年 11 月 26 日 “ATP 合成酵素の回転を実証”

日経産業新聞、平成 11 年 11 月 29 日 “c サブユニットも回転”

日刊工学、平成 11 年 11 月 29 日 “ATP 合成酵素の内部、新たな回転部分発見”

読賣新聞、平成 11 年 12 月 2 日 “生物のモーター”

②受賞

二井將光，和田洋，三本木至宏：平成 10 年度日本生化学会 JB 論文賞 “線虫のメンケ  
ス・ウイルソン病原因遺伝子産物と酵母 CCC2 変異株における機能”

二井將光：平成 15 年度日本薬学会賞 “多彩なプロトンポンプの作動機構／機能と酸性  
環境に関する研究”

三本木至宏：日本農芸化学会奨励賞、平成 13 年度 “プロトン情報の生物学的エネルギー  
変換に関する研究”

③その他

本研究で明らかにした F 型 ATPase の回転触媒機構が以下の著名な教科書に引用された。

Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> ed., Bruce Alberts *et al.*, Garland Science, page 828

Lehninger Principle of Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed., David L. Nelson *et al.*, Worth Publishers, page 717

(4) その他特記事項