

二つの回転分子モータータンパク質；V-ATPase と F_0F_1 の共通性と多様性

今村 博 臣, 横 山 謙

V-ATPase と F_0F_1 (F-ATPase) はともに回転触媒機構を持つ超分子複合体膜タンパク質であり, ATP の加水分解エネルギーと膜を介した電気化学的エネルギーの変換を行う。両者は進化的・構造的・機能的に非常に類似したタンパク質であると考えられてきた。最近の研究の進展, 特に1分子計測による回転解析やX線結晶構造解析によって, 両者は一定の共通性をベースにしているものの, 構造と機能の多くの面で異なる性質を持つ分子であることが明らかになってきた。本稿では, V-ATPase と F_0F_1 の間に見られる共通性と同時に多様性にも焦点を当てながら, 最近の研究成果を概説する。

はじめに

生物界には, 動くことを生業にする, もしくは動くことにより機能するタンパク質が多数存在する。たとえば筋肉タンパク質であるミオシンは, アクチン繊維の上を移動して筋原線維を収縮させることにより力を発生させる¹⁾。オルガネラの輸送や繊毛運動に関与するキネシンやダイニンも同様に微小管上を移動する²⁾。これらのタンパク質はATPの加水分解エネルギーを使って直線的に動くことから, リニアモータータンパク質とも呼ばれる。一方, くるくると回転する分子モーターも存在する。例えば, 細菌の形質膜には, 形質膜内外に形成されたプロトン駆動力により回転する鞭毛モーターが存在する³⁾。Boyerらは, およそ30年前にATP合成酵素である F_0F_1 が回転触媒機構で働く, すなわち回転分子モーターであることを予言していた⁴⁾。1997年になって軸部分のATP駆動の回転を直接観察する歴史的な研究結果が野地, 安田らにより発表され⁵⁾, Boyerと F_1 の結晶構造を決めたWalkerのノーベル賞受賞をもたらしたのは有名な話である。最近になって液胞型のプロトンポンプ(V-ATPase)もATPによって回転する分子モーターであることが筆者らのグループにより証明され

ている^{6,7)}。本稿では, 回転分子モーターであるV-ATPaseの最近の知見を紹介し, もう一つの回転分子モーターである F_0F_1 と比較することにより, その分子設計とメカニズムについて議論する。

1. V-ATPase と F_0F_1

1980年代初頭, 酵母の液胞, リソソームやウシ脳の被覆小胞, 植物の液胞などといった細胞内の様々な小胞の膜に, 既知のものとは性質の異なる新規のプロトンポンプが次々と発見された^{8~13)}。これらのプロトンポンプは独立に研究されていたのだが, 後に全て同じ分子であることが明らかとなり, 液胞型プロトンポンプもしくは液胞型ATPase (vacuolar-type ATPase, V-ATPase) と総称されるようになった(このあたりの歴史についてはBeyenbachとWieczorekによる総説¹⁴⁾に詳しい)。真核生物のV-ATPaseは小胞や細胞外の酸性化を通して, 小胞輸送やエンドサイトーシス, 膜を介した二次輸送, さらに骨の再吸収や抗原の分解に関与している¹⁵⁾。さらに最近では, プロトン輸送とは別に, V-ATPaseの膜内サブユニットが膜融合に直接関与していることを示す報告もある^{16~18)}。このように真核生物のV-ATPaseは様々な細胞の機能に非常に重要な役割を果たしている。一方, 1980年代後半に古細菌である*Sulfolobus acidocaldarius*の形質膜から F_0F_1 と異なるATPaseが単離され, 触媒サブユニットの一次構造が伝田らにより決定された¹⁹⁾。当時配列が決定されたばかりのニンジンおよび赤パンカビ由来のV-ATPase触媒サブユニットの配列と比較してみたところ, 驚くべきことに70%以上

大阪大学産業科学研究所高次細胞機能研究分野 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1)

Two rotary molecular motors, V-ATPase and F_0F_1
Hiromi Imamura and Ken Yokoyama (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

の高い相同性を示し、古細菌にも V-ATPase のホモログが分布することがわかった²⁰。V-ATPase は古細菌にとどまらず一部の真正細菌にも存在し、ナトリウムポンプ、もしくはプロトンポンプの逆反応である ATP 合成反応を行っている²¹⁻²³。これら原核生物の V-ATPase は古細菌 (Archaea) の頭文字をとって A-ATPase と呼ばれることもあるが²⁴、真核生物の V-ATPase と非常に似ており、真正細菌にも分布することから、筆者らはバクテリア型 V-ATPase という呼称を提唱している²⁵。V-ATPase は多くのサブユニットから構成され、700kDa を超える非常に大きな分子であるが、大きく二つの機能的部位に分けることができる。一方は水溶性の V_1 複合体で、ATP を加水分解する。もう一方が膜に埋まった V_0 複合体でプロトンの透過を担っている。

V-ATPase は進化的、構造的に ATP 合成酵素である F_0F_1 に似ている。 F_0F_1 は、ミトコンドリア内膜や葉緑体のチラコイド膜、大部分の真正細菌の細胞膜に存在し、呼吸や光合成によって形成されたプロトン濃度勾配を利用して ATP を合成している²⁶。真核生物の F_0F_1 は ATP 合成に特化しているが、嫌気性細菌には、プロトンポンプとして機能している F_0F_1 も存在する。 F_0F_1 も V-ATPase と同様に、ATP 加水分解をする F_1 とプロトンを透過する F_0 に分けることができる。

2. V-ATPase の回転の証明

F_1 が回転することが実証されて以降、 V_1 も回転モーターであると信じられて来たが、構造学的な研究の遅れからどのサブユニットが回転子を形成しているかさえわからない状態だった。筆者らは真正細菌である *Thermus thermophilus* 由来の V_1 を用い、D サブユニットと F サブユニットに結合させたビーズが ATP 依存的に回転する様子を顕微鏡下で観察することに成功し、 V_1 も回転分子モーターであることを証明した (図 1A)⁶。回転する方向は F_1 の軸サブユニットである γ と同じで、膜側 (F_0/V_0 側) から見ると ATP の加水分解に伴って反時計回りに回転していた。さらに F サブユニットがない状態で D サブユニットが回転することも確かめられ、 A_3B_3D 複合体が最小回転ユニットであることが明らかとなった²⁷。 V_1 が回転することから、 V_1 の回転軸とつながった V_0 のサブユニットも連動して回転するものと考えられた。 V_0 部分は膜に埋まっているため、V-ATPase 全体を膜から可溶化して精製すると性質が変化してしまう場合が多い (このことは F_0F_1 にもあてはまる)。筆者らは、可溶化条件を検討することで、膜に埋まった状態に近い V-ATPase を精製することに成功した。この精製 V-ATPase の c サブユニットにビーズを特異的に結合させて顕微鏡下で観察したところ、ATP 加水

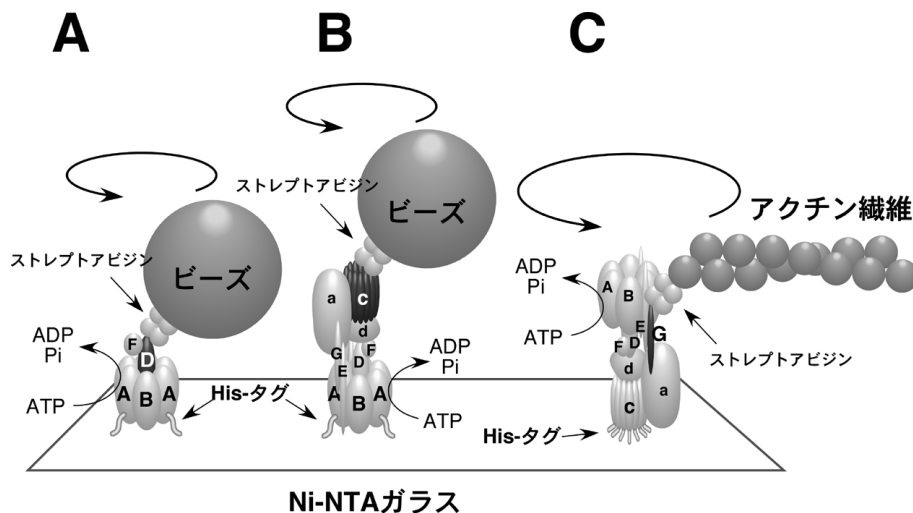


図 1 V-ATPase が回転分子モーターであることを示した実験

His タグを導入したサブユニットを介してガラス基盤に分子を固定化する。ガラス基盤はシラン化後、 Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) でコートされており、His タグタンパク質との強い相互作用を持つ。ビオチン化したサブユニットに可視化プローブとしてのビーズを結合させ、顕微鏡下でその回転を観察した。

(A) 筆者ら⁶による V_1 の回転計測。A サブユニットをガラス基板に固定し、D サブユニットと F サブユニットにポリスチレン製のビーズを結合させた。(B) 筆者ら⁷による V_0V_1 (ホロ V-ATPase) の回転計測。A サブユニットをガラス基板に固定し、c サブユニット (当時は L サブユニットと呼んでいた) にビーズを結合させた。(C) 平田ら²⁸による V_0V_1 の回転計測。筆者らとは逆に回転子である c サブユニットをガラス基板に固定し、G サブユニットに蛍光アクチン繊維を結合させた。

分解依存的に回転する様子が観察された (図 1B)⁷⁾. ほぼ同じ頃, 平田らも酵母の V-ATPase を用い, 筆者らとは異なるサブユニットに結合させた蛍光アクチン繊維の回転を顕微鏡下で観察したことを報告した (図 1C)²⁸⁾. これらの一連の実験から, V-ATPase が F_0F_1 と同様の回転分子モーターであり, 両者が共通の基本分子設計を持っていることがほぼ確実になった.

3. 回転分子モーターの基本設計

V-ATPase が主にプロトンポンプとして働き, F_0F_1 が主に ATP 合成をしているという違いはあるものの, どちらも, ATP の合成・分解という化学エネルギーと, プロトン駆動力という電気化学的エネルギーを変換する点で同じである. そして, 両者とも二つの独立した回転モーター部から構成されている (図 2). 一方は ATP を駆動力として回転するモーター (V_1/F_1), もう一方は膜に埋まったプロトンの流れを駆動力として回転するモーター (V_0/F_0) である. ホロ酵素複合体中では, 二つのモーター部は回転子部分と固定子部分でつながっている. 回転子同士だけでなく固定子同士がつながってお互いの相対位置を固定することで, 一方のモーターの回転力がもう一方のモーターに伝えられる. プロトン駆動力がない, もしくは弱い場合, V_1/F_1 モーターが ATP を加水分解して V_0/F_0 モーターがプ

ロトンにくみ上げる方向に回転する. 逆に十分のプロトン駆動力が V_0/F_0 部分に負荷されていると, V_0/F_0 部分で発生した回転力により V_1/F_1 モーター部分の回転子が ATP 分解時と逆方向に強制的に回転させられ ATP が合成される. つまり, 膜を介したプロトンの透過と ATP の加水分解・合成という全く異なる反応が回転運動によって仲介されているのである.

4. F_1 の回転触媒機構

F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体) は, 回転軸である γ サブユニットが三つの触媒サブユニット (β サブユニット) を含む六つのサブユニットで囲まれた構造をしている. ATP 濃度を十分に低くすると, 軸である γ サブユニットが停止・ 120° 回転・停止・ 120° 回転……を繰り返しながら回転する様子が観察される^{29,30)}. 停止時間は ATP 濃度に依存し, その停止時間の解析から, F_1 が 1 個の ATP を加水分解するごとに γ サブユニットが 120° 回転することがわかった. しかし, 個々の ATP 加水分解部位 (もしくは個々の ATP) に着目した場合は, 1 回の反応サイクルは 120° で終わるわけではない. 最初に決定された F_1 の結晶構造では, 三つの触媒サイトのうち一つは ATP (のアナログ) を, 一つは ADP を結合していて, 残りの一つはカラであった³¹⁾. つまり, それぞれのサイトでは 360° かけて一つの ATP を

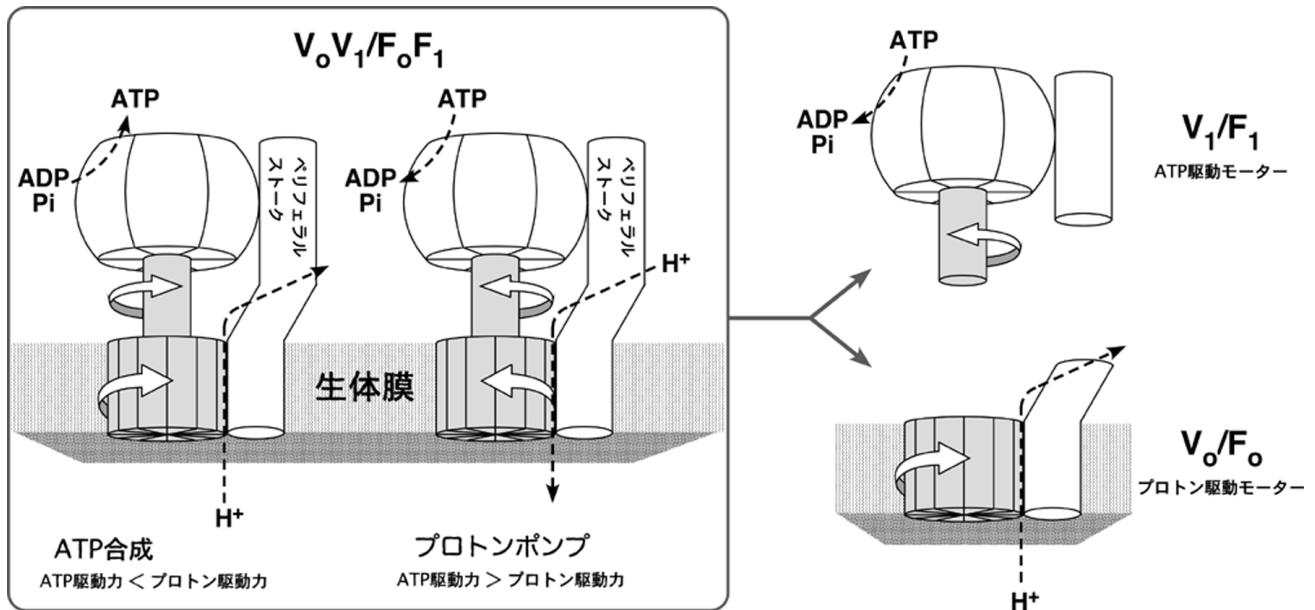


図 2 V-ATPase と F_0F_1 の基本設計

V-ATPase と F_0F_1 はともに二つの独立したモーター, V_1 (F_1) と V_0 (F_0) から構成されている. どちらのモーターも回転子 (灰色の部分) と固定子 (白色の部分) から構成される. V_1 (F_1) 部分は可逆的なモーターで, 単独では ATP を加水分解して反時計回りに回転するが, 回転子を外力によって強制的に時計回りに回転させれば反応が逆転して ATP を合成する. 一方, V_0 (F_0) 部分の回転方向と回転力はプロトン濃度勾配や膜電位の強さと方向に依存して変化する. 複合体中では回転子同士, 固定子同士が結合することで, 一方のモーターが発生する回転力がもう一方のモーターに伝わるようになっている. プロトン駆動力が弱い場合は ATP 駆動力がまさり, ATP が加水分解されてプロトンにくみ上げるが, プロトン駆動力が強い場合は, V_1 (F_1) モーターの回転子が逆回転して ATP が合成される.

加水分解するが、反応の位相が 120° ずつずれて進行しているため、見かけ上 120° の回転で1個のATPを加水分解すると考えられる(図3)。このように、 F_1 は 120° 回転を一つの単位とするステッピングモーターであるが、安田らはさらに詳細に回転を解析し、 120° 回転がさらに 90° と 30° の回転(最近では 80° と 40° と言われている)に分かれていることを明らかにした³²⁾。すなわち、ATPの結合を待っている位置を 0° とすると、ATPが結合した後に 80° 回転して2ミリ秒程度停止し、続いて 40° 回転して最初の位置から 120° 先のATP結合待ちの状態に戻るのである。停止時間の解析から 80° の停止の間にはATP濃度に依存しない二つの律速反応があることがわかった³²⁾。ATPの加水分解サイクルには少なくとも四つの反応素過程、すなわちATPの結合、ATPの加水分解、ADPの解離、リン酸の解離がある。ATP結合以外の三つの反応素過程のうち二つがこの 80° の停止中に起こっているようである。加水分解が遅い変異体 F_1 を用いた実験では、 80° における停止時間が野生型と比べて大きく伸びていた³³⁾。ATPのかわりに加水分解されにくいATPアナログを用いた場合も同様であった³³⁾。つまり、 80° の位置で起こる二つの律速反応のうち一つはATPからADPとリン酸への加水分解である(図3)。

西坂らは顕微鏡下で、 γ サブユニットの回転と同時に蛍光ATP(Cy3-ATP)の F_1 との結合・解離を観察した³⁴⁾。その結果、Cy3-ATPが F_1 に結合すると同時に γ サブユニットは 120° 回転した。ところが、続いてATPが結合すると一度に 120° 回転せず、しばしば 80° の位置でわずかな時間停止する様子が観察された。Cy3-ATPはATPよりも加

水分解されにくく、そのため停止が起こったと考えられた。この位置は結合から 200° の位置である。つまり、結合したATPは最初の 80° の停止位置で加水分解されるのではなく(ここで加水分解されるのは一つ前に結合していたATP)、 200° 回転したところで加水分解されることを示している。Cy3-ATP(実際にはCy3-ADP)は結合から 240° 回転した後も F_1 と結合していたが、次の 120° 回転と同時に F_1 から解離する様子が観察された。最近、Kabaleeswaranらによって報告された F_1 の結晶構造では三つの β サブユニットはそれぞれ、ATP、ADP、リン酸を結合していた³⁵⁾。この結果を基にすれば、リン酸はADPよりも後、すなわち 320° の位置で F_1 から解離する可能性が高い。

F_1 は回転の際に約 44pN nm のトルクを発生する²⁹⁾。これは、キネシンやミオシンなどの他のモータータンパク質が出す力に比べてかなり大きい³⁶⁾。 F_1 がATP1個を加水分解する(120° 回転する)際に、摩擦によって周囲の溶媒に散逸するエネルギーはおよそ 90pN nm で、生理的条件下におけるATP加水分解の自由エネルギー変化に匹敵するほどである^{29,36)}。ATPがカラの触媒部位に弱く結合すると F_1 の化学状態が変化し、それまで 0° の角度で安定であった γ サブユニットは不安定となり、 120° 先に新たにできた安定点まで移動する。この過程でATPと触媒部位の結合は徐々に強くなると考えられる^{37,38)}。そして、 120° 回転前と回転後における F_1 分子内部のポテンシャルの差が、 120° の回転によって散逸するエネルギーとなるはずである。 F_1 の結晶構造中では、触媒サブユニットである β サブユニットはヌクレオチドが結合していない状態ではC末端ドメインが開いた構造をとっているのに対し、ヌクレ

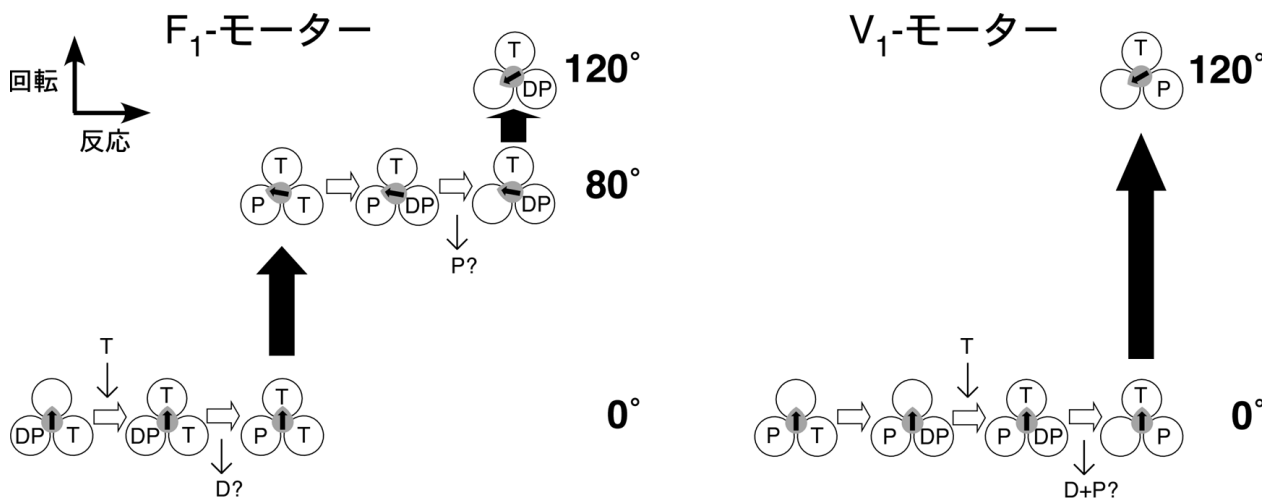


図3 回転とATP加水分解サイクルの関係

F_1 (左)と V_1 (右)の回転のモデルを示す。横軸方向は化学反応、縦軸方向は回転の進行を表している。三つの触媒部位での反応は 120° ずつで進行する。ATP(図中ではT)を結合する角度と加水分解する角度が F_1 と V_1 では異なることに注目。ADP(図中ではD)とリン酸(図中ではP)が解離する角度は V_1 ではまだ全く判っていない。 F_1 についてもまだ確実な証拠はほとんどない。図中のDPはADPとリン酸が結合している状態を表す。矢印は軸サブユニットの相対位置を表す。

オチド結合状態では γ サブユニットを押し出すように閉じた構造をとっている³¹⁾。単量体の β サブユニットにおいても、ヌクレオチドが存在しない時は開いた構造、存在している時は閉じた構造をとっていることが示されている³⁹⁾。ATPの結合による β サブユニットの構造変化が回転の駆動力であると考えて良さそうである。

F_1F_0 がATPを合成する際には、 F_0 からの力で F_1 の γ サブユニットが強制的に逆に回転させられることでATP加水分解の逆反応が進行すると考えられてきた。伊藤らは、 γ サブユニットに磁性ビーズを結合させた F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体)を多数用意し、磁気ピンセットを用いてビーズを加水分解時とは逆方向に回転させると、確かに溶液中のATP濃度が上昇することを見いだした⁴⁰⁾。さらに、Rondelezらは微小なチャンバーを使って1分子レベルで F_1 (この場合は $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体)の合成活性を計測する系を開発した。 γ サブユニットの逆回転により、1回転につき約3個のATPが合成されることを報告した⁴¹⁾。加水分解の際には1回転で三つのATPを消費することから、 F_1 はほぼ完全に可逆的なモーターだということが明らかになった。ただし、 ϵ サブユニットが存在しないと合成活性は大きく低下していた⁴¹⁾。

5. F_1 とは異なる V_1 の回転触媒機構

F_1 で観察されている回転メカニズムは、ATP駆動の回転分子モーターに普遍的なものなのか？ このことを判断するために、筆者らはもう一つの回転分子モーターである V_1 の回転を詳しく調べた⁴²⁾。回転軸であるDサブユニッ

トに結合させたビーズの回転をATP濃度を変えて観察すると、高濃度のATPでは、ビーズはスムーズに回転したが、 $10\mu\text{M}$ 以下では 120° ごとに停止しながらの回転が観察された(図4A)。この条件ではATPの結合が全体の反応をほぼ律速し、ATPの結合を待っている間停止していることになる(ATP結合待ち停止)。この停止時間を解析すると、停止は一つの律速反応のみで構成されていた。停止時間の解析から V_1 へのATPの結合速度定数はおよそ $4 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と F_1 ($2.5 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)のおよそ100分の1と大きく異なるものの、この結果は V_1 も F_1 と同様に1個のATPを消費するごとに 120° 回転することを示している。

では V_1 の回転メカニズムは F_1 と全く同じなのかというと、実は少し違っているようである。先に述べたように F_1 ではATPを結合する角度と加水分解する角度は 80° ずれている³³⁾(図3)。筆者らは V_1 がどの角度でATPを加水分解するか調べるために、 F_1 の実験でも用いられたATP γS という加水分解が遅いアナログを基質にして V_1 の回転を調べた。ATP γS を基質とすると、基質飽和条件でも 120° ごとに停止しながら毎秒0.16回転という非常にゆっくりとしたスピードで回転した。この場合の停止位置はATP γS が加水分解されるのを待っている位置である(加水分解待ち停止)。もしATP加水分解の位置が F_1 と同じであれば、この停止位置はATP結合待ちの停止位置と 80° ずれているはずである。そこで、 V_1 の回転観察中に、溶液を高濃度のATP γS から低濃度のATPに交換して、停止位置が変化するかどうか調べた。溶液交換後はATP結合待ちの位置で停止が見られるはずである。その結果、溶

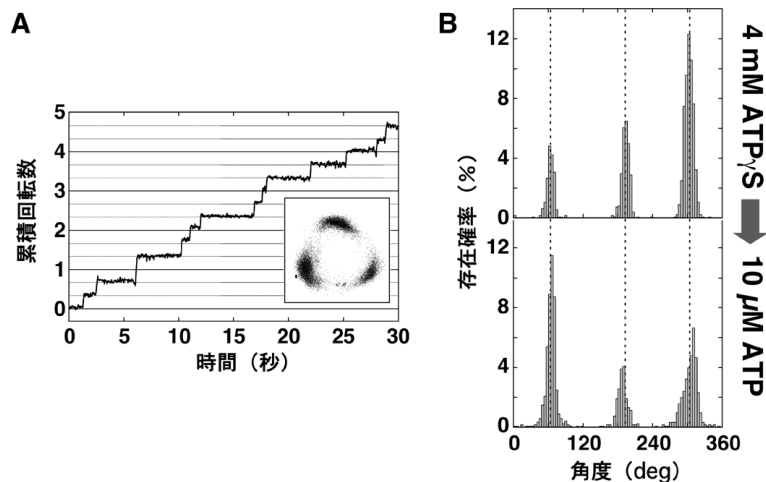


図4 V_1 の回転の性質を調べた実験

(A) $[\text{ATP}] = 1\mu\text{M}$ におけるDサブユニットの回転のタイムコース。 120° 回転するごとに停止している。枠内は回転の軌跡。(B) ATP加水分解角度とATP結合角度の比較。(上) ATP γS 飽和濃度(4mM)での各角度における滞在頻度。三つの停止位置にピークが現れている。(下) 続いて溶液を低濃度($10\mu\text{M}$)のATPに置換した後の各角度における滞在頻度。停止位置はほとんど変化していない。

液を低濃度 ATP に交換した後も、 V_1 が停止する位置にはほとんど変化が見られなかった (図 4B)。これは回転プロープであるビーズを D サブユニットではなく F サブユニットに変えても同じで、ビーズの結合位置によるアーティファクトではない。このことから、 V_1 では ATP の結合と加水分解が同じ角度で起こっていることが明らかとなった。この結果は、回転のためには必ずしも F_1 で見られるようなメカニズムは必須でないことを示している。

F_1 と V_1 の違いは加水分解の位置だけではなく、 V_1 が 120° 回転する際の角速度とビーズの粘性抵抗からトルクを見積もったところ、およそ 35 pN nm であった。一方、同じ条件で F_1 のトルクを見積もると約 46 pN nm となり、これまでに報告^{29, 43)}されていた値 (44 pN nm) とほぼ同じであった。つまり、 V_1 が発生するトルクはせいぜい F_1 の 4 分の 3 程度である。平田らも、酵母の V-ATPase (V_0V_1) が発生するトルクをおよそ 36 pN nm と算出している²⁸⁾。ATP 加水分解に伴って V_1 が出すトルクが F_1 より低いというのはどうやら V-ATPase の特徴の一つである。逆反応である ATP 合成の際には、 V_1 の回転子が V_0 側から力を受けて逆回転するが、トルクが低いと、その力が触媒部位の構造変化に転換されにくい可能性がある。実際に V_1 の ATP 合成反応の効率が F_1 と比べて低いのかどうかは、タンパク質によるエネルギー変換のメカニズムを考える上で今後の興味深い課題である。最近になって、 V_1 の触媒部位を形成する A および B サブユニット単独の結晶構造が決定されたが^{44, 45)}、それぞれ F_1 の β および α サブユニットと高い構造相同性を示した。それでは F_1 と V_1 の回転機構の違いを生み出しているのはどの部分なのだろうか？ F_1 の回転軸である γ サブユニットは、ATP 加水分解によって回転させられるだけの受け身の存在ではなく、三つの触媒部位の化学状態を規定すると考えられている²⁶⁾。そのことを考慮すると、二つの回転モーターの違いは γ サブユニットと D サブユニットの違いに起因すると考えるのが自然である。

このように、回転における F_1 と V_1 の性質の共通な部分と異なる部分が少しずつ明らかとなってきた。しかし、この二つの回転モーターに共通するメカニズムを知るためには、今後さらに深く両者の性質を調べる必要がある。ADP とリン酸の解離する角度は、両者ともまだはっきりわかっていない。本当に触媒サブユニットである β や A が発生する力だけで回転を説明できるのかも重要な問題である。 V_1 の F_1 と異なる回転メカニズムの分子基盤を議論するのに、D サブユニットの立体構造、特に V_1 複合体での立体構造の決定が必要である。

6. V_0/F_0 モーターの回転機構

V_0/F_0 部分のプロトン透過に重要な役割をしているのが

固定子である a サブユニットと回転子である c サブユニットである。c サブユニットはプロトン結合するサブユニットで、NMR によって決定された単量体構造では 2 本の膜貫通ヘリックスから構成されている⁴⁶⁾。複合体中では c サブユニットは複数集まりリング構造をとっていて、その数は生物によって異なり、だいたい 10 から 15 個である⁴⁷⁻⁵³⁾。プロトン結合する保存された酸性残基は c サブユニットリングの外側を向いていたが、完全に膜の内部に埋まっているために溶媒中からは直接アクセスできないようになっている。固定子である a サブユニットには膜の両側から c サブユニットの酸性アミノ酸にアクセスするハーフチャンネルが開いており、そのためプロトンが流れると c サブユニットリングが回転するとされている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。プロトンは膜を介した電位差および pH の差 (プロトン駆動力, PMF) を利用して流れる。最近、久野らのグループがパッチクランプ法によって破骨細胞の細胞膜 V-ATPase によるプロトン輸送を電流として直接測定することに成功しており、実際に電流が電位差と pH 差に大きく依存することを示している⁵⁷⁾。これまで F_0F_1 および V-ATPase において、c サブユニットリングの ATP 駆動性回転が 1 分子計測実験で確かめられている^{7, 28, 58, 59)}。また c サブユニットを固定子サブユニットとクロスリンクするとプロトンは透過しなくなる⁶⁰⁾。しかしながら、蛍光共鳴エネルギー移動を用いた間接的な実験⁶¹⁾はあるものの、c サブユニットリングが (ATP の力ではなく) プロトンの流れを利用して回転する様子を直接観察したという確実な報告はない。また、c サブユニットリングの立体構造は明らかになっているものの a サブユニットの立体構造は未だ明らかになっていない。そのため、 V_0/F_0 モーターでのプロトン駆動による回転のメカニズムに関する理解は遅れている。

7. 明らかになってきた全体構造の違い

V-ATPase と F_0F_1 では、多くの種類のサブユニットが集まって、精密機械のような複合体を作り上げている (表 1, 図 5)。原核生物の場合、V-ATPase は 9 種類、 F_0F_1 は 8 種類のサブユニットから構成されている。真核生物の酵素は原核生物の酵素よりもさらに多くの種類のサブユニットを持っている。ただし、バクテリア型酵素のサブユニットのほとんどは真核型酵素のサブユニットと一次構造上の相同性を有している⁶²⁾。原核型酵素のサブユニット組成が最も基本的な構成であり、真核型酵素だけに存在するサブユニットは付加的・補助的な機能を持つと考えられる。V-ATPase の A, B および c サブユニットはそれぞれ F_0F_1 の β , α , c サブユニットとアミノ酸配列上の相同性を有しており、どれも機能に重要なサブユニットである。V-ATPase では ATP 結合・加水分解に必須のアミノ酸残基の大部分は A サブユニットに存在していて、B サブユニッ

表1 V-ATPase 及び F₀F₁ を構成するサブユニットの機能と役割

	サブユニット*2		分子量 (kDa)*1	複合体中の コピー数	V _i /V _o /F ₁ /F _o への 帰属	機能・その他
	真核	バクテリア				
V-ATPase	A	A	68	3	V ₁	ATP 加水分解・合成 (触媒部位) F-ATPase の β サブユニットと相同性
	B	B	58	3	V ₁	ATP 加水分解・合成 (非触媒部位) アクチン繊維への結合能を有する F-ATPase の α サブユニットと相同性
	C	—	44	1	V ₁ , V _o どちらにも 属さない	アクチン繊維への結合能を有する ペリフェラルストークを構成?
	D	D	29	1	V ₁	V ₁ の回転軸を構成
	E	E	26	2?	V ₁ (真核) V _o (バクテリア)	ペリフェラルストークを構成
	F	F(G)	13	1	V ₁	V ₁ の回転軸を構成, ATPase 活性の促進
	G	G(F, H)	13	2?	V ₁ (真核) V _o (バクテリア)	ペリフェラルストークを構成
	H	—	54	1	V ₁	ATPase 活性を制御 ペリフェラルストークを構成?
	a	a(I)	96	1	V _o	プロトンチャンネルを形成 膜タンパク質
	c	c(K, L)	16	10-12*3	V _o	プロトン結合, 膜タンパク質 F-ATPase の c サブユニットと相同性
	c'	—	17	1?	V _o	プロトン結合, 膜タンパク質, 酵母で のみ見つかっている F-ATPase の c サブユニットと相同性
	c''	—	23	1?	V _o	プロトン結合, 膜タンパク質 F-ATPase の c サブユニットと相同性
	d	d(C)	40	1	V _o	V _o の回転軸を構成
	e	—	10	1?	V _o	機能不明
	F ₀ F ₁	α	α	55	3	F ₁
β		β	52	3	F ₁	ATP 加水分解・合成 (触媒部位) V-ATPase の A サブユニットと相同性
γ		γ	30	1	F ₁	F ₁ の回転軸を構成
δ		ε	15	1	F ₁	F ₁ の回転軸を構成
ε		—	7	1	F ₁	ATPase 活性の阻害 (バクテリア) F ₁ の回転軸を構成
OSCP		δ	21	1	F ₁	ペリフェラルストークとの結合
a		a	25	1	F _o	プロトンチャンネルを形成 膜タンパク質
b		b	25	1(真核) 2(バクテリア)	F _o	ペリフェラルストークを構成 膜タンパク質
c		c	8	10-15	F _o	プロトン結合, 膜タンパク質 V-ATPase の c サブユニットと相同性
d		—	19	1	F _o	ペリフェラルストークを構成
e		—	11	1?	F _o	機能不明
f		—	11	1?	F _o	機能不明
g		—	13	1?	F _o	機能不明
F6(h)		—	9	1	F _o	ペリフェラルストークを構成
A6L		—	6	1?	F _o	機能不明

*1 真核型酵素の分子量を示した。

*2 サブユニットの呼び名は生物種によって異なる場合がある。代表的なものについては括弧内に示した。

*3 バクテリア型の値。真核型は不明。

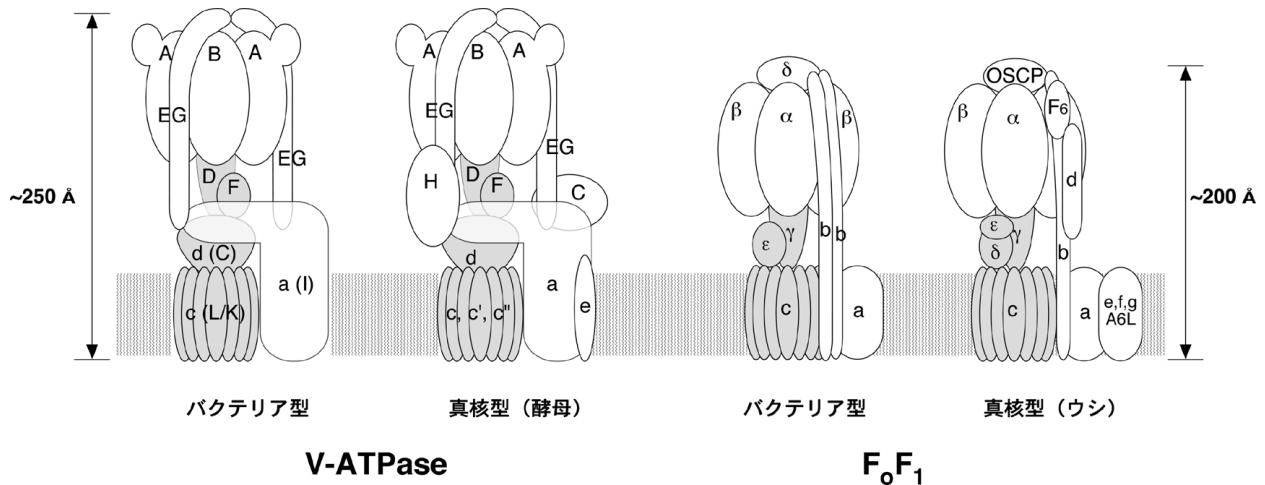


図5 V-ATPaseと F_0F_1 の全体構造の比較
回転子のサブユニットを灰色で、固定子のサブユニットを白色で示す。

トのアミノ酸残基も触媒部位の一部を形成している⁶³⁾。プロトンの透過に必須のcサブユニットの基本構造は2本の膜貫通ヘリックスだが、真核型V-ATPaseと一部のバクテリア型V-ATPaseは少し特殊で、2本のヘリックスが遺伝子重複の結果4本になっている^{64,65)}。さらに真核型V-ATPaseではcサブユニットには二つないし三つのアイソフォーム(c'およびc'')が存在する¹⁵⁾。酵母では三つあるアイソフォームの一つでも欠けるとV-ATPaseが機能しなくなることから、一つのcサブユニットリングの中に三つのアイソフォームが混在していると考えられている⁶⁶⁾。このように、V-ATPaseと F_0F_1 の間では一部のサブユニットにアミノ酸配列の相同性が見られ、二つの酵素が共通の祖先から進化してきた名残を留めている。これらのサブユニットは酵素の機能に決定的な役割を果たしているために進化の過程で保存されてきたと考えられる。

ところが、驚くべきことにその他のサブユニットの多くはアミノ酸配列に相同性が見られない。このことは、二つの酵素が進化の過程で多くの部品を取り替えてしまったことを意味している。例えばaサブユニットは、cサブユニットと一緒にプロトンチャンネルを形成している重要なサブユニットであるが、このサブユニットでさえもV-ATPaseと F_0F_1 の間でアミノ酸残基の相同性がまったく見られない。 F_0F_1 のaサブユニットは5本の膜貫通ヘリックスから構成されているが、V-ATPaseのaサブユニットには8本の膜貫通ヘリックスがあり、N末端側には F_0F_1 には見られない大きな可溶性ドメインが存在している^{67,68)}。ただ、どちらも膜貫通ヘリックス内の高度に保存されたアルギニン残基がプロトンの透過に重要であることが知られており、プロトンチャンネルの構造は両者で似ていると考えられている^{69,70)}。

回転子部分には顕著な違いが見られる。 F_0F_1 では F_1 の γ

および ϵ サブユニットが F_0 のcサブユニットと直接相互作用して回転子を形成している⁴⁷⁾(図5)。筆者らは一旦精製したV-ATPaseをばらばらにしていく過程で、それまで全く役割が知られていなかったdサブユニット(バクテリアではCサブユニットとも呼ばれる。表1参照)がcサブユニットリングに強く結合していることを見いだした⁶²⁾。dサブユニットは V_0 のサブユニットとして同定されたが、膜貫通ドメインはなく、そのためaサブユニットのN末端親水ドメインと結合していると考えられていた。しかし、筆者らの結果により、dサブユニットとcサブユニットリングが V_0 部分のローターリングを形成していることが明らかになった。また、筆者らの研究とは別にChabanらはV-ATPaseの電子顕微鏡単粒子解析の結果から、dサブユニットが回転子サブユニットであると提案した⁷¹⁾。筆者らのグループはさらにサブユニット間のクロスリンクによって、回転子である V_1 のDとF、そして V_0 のcサブユニットは直接相互作用せず、その間にdサブユニットが挟まるように存在していることを明らかにした⁷²⁾。dサブユニットに相当するサブユニットは F_0F_1 には存在しない。このサブユニットが V_1 と V_0 の界面に存在しているため、V-ATPase分子の長軸方向の長さは F_0F_1 と比べて50Åほど長い(図5)。dサブユニット以外の回転子サブユニットにも違いが見られる。後述するように、V-ATPaseのFサブユニットと F_0F_1 の ϵ サブユニットは、分子量や複合体中での配置がほとんど同じであるが、その機能も構造も全く異なっている。 V_1 の回転軸であるDサブユニットも、 F_1 の回転軸である γ サブユニットとアミノ酸配列の相同性を持たない。筆者らが1分子計測でDサブユニットが回転子であることを直接証明するまでは、DサブユニットとEサブユニットのどちらが γ の機能的ホモログであるかは議論が分かれていた^{73,74)}。現在では、Eサブ

ユニットは固定子であり、Gサブユニットと複合体を形成して、 V_1 と V_0 をつなぐペリフェラルストーク部分を構成していることが示されている^{62,75}。真核型V-ATPaseではさらにCサブユニットとHサブユニットがペリフェラルストークを構成していると考えられている⁷⁶⁻⁷⁹。最近になって真核型(ウシ)の F_0F_1 のペリフェラルストークの膜外部分については、立体構造のほぼ全容が明らかになった⁸⁰。それによるとウシミトコンドリアの F_0F_1 では、ペリフェラルストークのコアとなっているbサブユニットがN末端の膜貫通領域から1本の α ヘリックスとして F_1 側へ伸び、C末端側で F_1 のOSCPサブユニットと結合している。そして、 α ヘリックスでできた小さなdおよびF6サブユニットが、ペリフェラルストークを補強するようにしてbサブユニットに結合している(図5)。V-ATPaseに関しても、HサブユニットとCサブユニットの単独結晶構造、そして最近ではEサブユニットのC末端ドメインの結晶構造が明らかとなったが、その構造は F_0F_1 のどのサブユニットとも異なっていた⁸¹⁻⁸³。違いはそれだけにとどまらず、ペリフェラルストークは F_0F_1 では1本だけなのに対し⁸⁴、V-ATPaseでは複数存在することが電子顕微鏡単粒子解析の結果から強く示唆されている^{77,78,85,86}。

V-ATPaseと F_0F_1 は共通の祖先から進化したと考えられるが、ここで見てきたように共通の祖先を持つサブユニットは一部のサブユニットだけであり、多くのサブユニットにはかなり大きな違いが見られる。そして、これらのサブユニットが、V-ATPaseと F_0F_1 に見られる構造と機能の様々な違いを生み出しているはずである。特にV-ATPaseのペリフェラルストークは F_0F_1 と全く構造が異なりそうなので興味深い。 V_1 と V_0 の固定子の相対位置を固定するという目的からすると1本でも十分なはずのペリフェラルストークが複数ある意味は何なのだろうか? 今後の新たな研究の展開を待ちたい。

8. 両者の活性制御機構は大きく異なる

V-ATPaseや F_0F_1 は、生理的に大変重要なため細胞自身はこれらの酵素の活性を制御するための機構を備えている。よく知られているのが IF_1 タンパク質によるミトコンドリア F_0F_1 の阻害である⁸⁷。 F_0F_1 の反応は通常はミトコンドリア内膜を介したプロトン駆動力があるためにATP合成に大きく傾いているが、虚血などで酸素が乏しくなり膜電位が消失してくると反応がATPの加水分解に傾いてしまい、本来ATPを作り出すべきところを逆にATPを大量に消費してしまう。呼吸鎖がプロトンを運べなくなり、ミトコンドリア内部のpHが低下すると IF_1 は F_1 部分に結合して F_1 のATP加水分解を阻害し、 F_0F_1 による無駄なATP消費を抑える。 IF_1 は1本の α ヘリックスからできた分子量1万前後のタンパク質で、C末端同士が相互作用して二

量体となっている⁸⁸。2003年に F_1IF_1 複合体の結晶構造が報告され、 IF_1 のN末端 α ヘリックスがADPを結合した β サブユニットと γ サブユニットの間に入り込んでいることが明らかになった⁸⁹。触媒サイトと直接結合しているわけではないのが興味深い。これによって一つの β サブユニットの構造変化が阻害されて γ は回転できなくなり、ATP加水分解サイクルが停止すると考えられる(図6A)。バクテリアには IF_1 に相当するタンパク質は存在しないが、 F_1 を構成するサブユニットの一つである ϵ が似たような働きをしている。以前からバクテリアの ϵ サブユニットが F_1 のATP加水分解活性を阻害することが知られていたが⁹⁰⁻⁹²、最近になってその作用機序が明らかになってきた。 ϵ サブユニットは β サンドイッチ構造のN末端ドメインと2本の α ヘリックスからなるC末端ドメインから構成されている分子量14,000程度の小さいタンパク質で、N末端ドメインが γ サブユニットと結合している^{93,94}。C末端ドメインの α ヘリックスはかなりフレキシブルで、 ϵ 単独の結晶構造ではたたまれた構造だが、 γ サブユニットとの複合体の結晶構造では伸びた構造をしていた⁹⁴。伸びた状態ではちょうど ϵ の塩基性残基に富むC末端ヘリックスが β サブユニットのDELSEED領域と呼ばれる酸性残基に富んだ領域と相互作用することで β と γ の間に入り込む形になり、ATPの加水分解を阻害しているようである⁹⁵(図6B)。一方、ナトリウムポンプとしてATP加水分解方向に特化している*Clostridium*の F_0F_1 の ϵ サブユニットは、ATP加水分解活性阻害に関与するC末端ドメインが欠損している⁹⁶。最近の研究成果によると、 γ の回転が ϵ により、ATP加水分解に対応する角度で止まることが示された⁹⁷。また面白いことに、一部のバクテリアの ϵ はそれ自身がATPを結合し、細胞内のATPを検知するセンサーの役割を果たしていることが提唱されている^{98,99}。ATPが豊富にある時はATP結合型になってたたまれている ϵ のC末端ドメインが、ATP濃度が低下すると伸びた構造になり無駄なATP加水分解を防ぐようである(図6B)^{100,101}。上で述べたように、 ϵ にはATP合成活性を高める働きもあり⁴¹、その機能も興味深い。葉緑体の F_0F_1 には独特の活性制御機構が存在する。葉緑体 F_0F_1 の γ サブユニットには、他の F_0F_1 の γ サブユニットにはない挿入配列があって、その内部に二つのシステイン残基が存在する。光合成が盛んに行われている条件では、これらのシステインはチオレドキシシンによって還元されて F_0F_1 は活性型になってATPを合成する。一方、夜間では光が当たらずプロトン駆動力が消失するが、この条件では γ の二つのシステイン残基間のジスルフィド結合が生じ、 F_0F_1 は不活性化されATPの無駄な加水分解を防がれる^{102,103}(図6C)。

V-ATPaseの活性調節機構もいくつか報告されているが、最近特に注目されているのが V_1 部分と V_0 部分を可逆的に

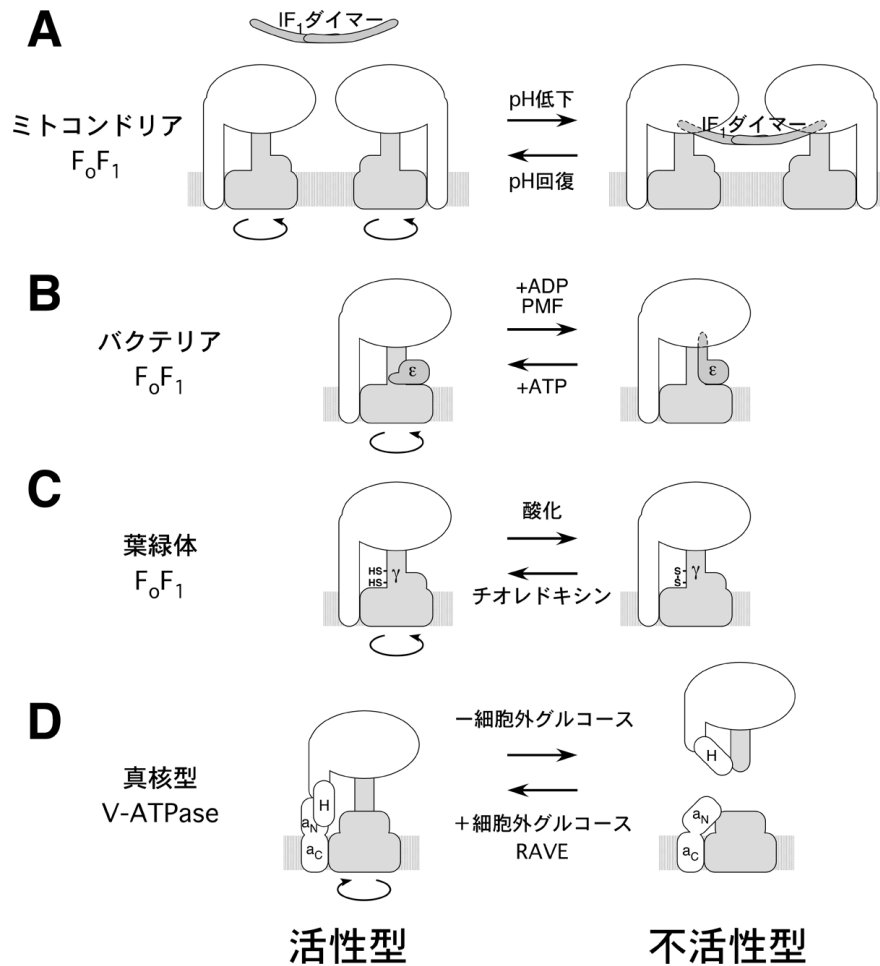


図6 V-ATPaseと F_0F_1 の活性制御機構

(A) IF₁タンパク質によるミトコンドリア F_0F_1 の活性制御。(B) εサブユニットの構造変化によるバクテリア F_0F_1 の活性制御。(C) γサブユニットの酸化還元による葉緑体 F_0F_1 の活性制御。(D) V_1 と V_0 の可逆的な脱着による真核型V-ATPaseの活性制御。(詳細は本文を参照)

脱着させるというメカニズムである(図6D)。この現象は1995年に酵母とタバコスズメガのV-ATPaseでKaneとおよびWieczorekのグループによって独立に発見された^{104,105}。酵母のV-ATPaseでは、グルコースが培地中から欠乏すると V_1 部分が V_0 からはずれ、ATP駆動のプロトン輸送が停止する。同様にタバコスズメガの幼虫のV-ATPaseも栄養飢餓状態にある脱皮期に V_1 部分が V_0 から外れてしまう。遊離した V_1 は栄養状態が戻れば再び V_0 と結合し、ATP駆動性のプロトン輸送が再開される。つまり、栄養状態に応じて可逆的に脱着を繰り返すことで活性を制御しているのである。最近になって哺乳類を含むいくつかの動物細胞のV-ATPaseでも同様の現象が報告されるようになった¹⁰⁶⁻¹⁰⁸。植物ではまだ報告が無いが、おそらく V_1 と V_0 の可逆的な脱着は真核型V-ATPaseに普遍的な活性制御機構と考えられる。 V_0 から遊離した V_1 はATP加水分解活性を失っていて無駄なATPの消費を抑えている。ところが V_1 のサブユニットの一つであるHサブユ

ニットが欠損すると、 V_1 単独でもATP加水分解活性を示すようになる¹⁰⁹。Hは固定子側のサブユニットであるが、遊離した V_1 では回転子であるD、Fサブユニットと相互作用することで回転を阻害すると提唱されている¹¹⁰(図6D)。バクテリア型V-ATPaseにはHサブユニットに相当するものが無く、 V_1 単独でもATPase活性を持っている。面白いことに、Hサブユニットは欠損させてもV-ATPaseの形成に影響が無い唯一のサブユニットであるが、Hサブユニットが欠損したV-ATPaseはATP加水分解活性を有さない¹¹¹。 V_1 が単独でATPを加水分解しないように V_0 も単独ではほとんどプロトンを通さない。この阻害機構についてはよくわかっていないが、 V_0 単独の電子顕微鏡像では固定子であるaサブユニットのN末端水溶性ドメインが回転子であるdサブユニットと相互作用しているように見える¹¹²。Hサブユニットの場合と同様にaサブユニットが回転を止めることでプロトンチャンネルを阻害しているのかもしれない(図6D)。 V_1 と V_0 の脱着を誘導するシ

グナル経路については、まだよくわかっていない。酵母の場合、細胞外グルコースによって誘導される既知のシグナル伝達経路を阻害しても V_1 と V_0 の脱着には影響を与えないことが知られている¹¹³⁾。 V_1 の V_0 への再結合には RAVE と呼ばれるタンパク質複合体が関与している¹¹⁴⁾。 RAVE のコンポーネントの一つに Skp1p という様々なシグナル伝達経路に関与しているタンパク質があるが、 V_1 の再結合に関しては Skp1p はシグナルの受け渡しには関与していないようである¹¹⁵⁾。 一方で、腎臓細胞の細胞膜に局在している V-ATPase では、PI3K を介したシグナル伝達の存在が報告されている¹⁰⁷⁾。 また、ハエの唾液腺細胞の頂端膜に局在している V-ATPase の解離が細胞外の cAMP によって誘導されるという報告もある¹⁰⁸⁾。

V_1 と V_0 の脱着の分子基盤もほとんどわかっていないが、少なくとも V_1 と V_0 の境界にあるサブユニットの一部は何らかの関与をしているはずである。筆者らのグループは回転子部分で V_0 と V_1 の境界に位置している F サブユニットと d サブユニットに着目し、その立体構造を X 線結晶構造解析によって決定した。 d サブユニットは α ヘリックスのみから構成される完全に新規のフォールドを有していた⁷²⁾。 F_1F_0 の場合、 F_1 の回転子である γ と ϵ サブユニットは直接 F_0 の c サブユニットリングと結合している。 一方、 V_0 の d サブユニットは、 V_1 側に対して大きな空洞が開いたお椀のような構造を持ち、 D および F サブユニットからなる V_1 の回転子を軸受けのようにささえている。 この構造は脱着に都合が良さそうに見える^{72,116)}。 一方、 F サブユニットは複合体中での位置とその分子量から前述した F_1F_0 の ϵ サブユニットと同様の機能と構造を有していると考えられてきたが、実際に決定した F サブユニットの立体構造は ϵ とは全く異なっていた¹¹⁷⁾。 実際に生化学的な実験から F サブユニットは、 ϵ のように ATP 加水分解活性を阻害する働きは持たず、逆に促進することがわかった²⁷⁾。 F サブユニットと最も似た構造を持っていたのがバクテリアの鞭毛のスイッチタンパク質である CheY であった。 CheY はリン酸化されると鞭毛基部の FliM に結合できるようになり、鞭毛の回転方向を逆転させる^{118,119)}。 F サブユニットにも CheY のリン酸化部位と似た領域があり、クロスリンク実験からこの場所が d サブユニットと非常に近いことが示唆されている¹¹⁷⁾。 この部分がリン酸化される、もしくは何かしらのリガンドが結合することで d サブユニットとの相互作用が変化し、 V_1 と V_0 の脱着を引き起こす可能性は十分考えられる。

おわりに

F_1 の回転が可視化されて以来、ATP 駆動性の回転メカニズムの理解は急速に進んだ。ただ、本稿で述べたように F_1 で観察されている現象は必ずしも ATP 駆動性の回転に

普遍的な必須のものとは言えない。もう一つの回転分子モーターである V_1 の回転機構を更に調べていくことは、ATP 駆動性の回転分子モーターの普遍的なメカニズムの理解を深めるのに必要であると我々は考えている。一方、プロトン駆動による回転メカニズムに関してはほとんど理解が進んでいないといってよい。プロトン駆動性モーター部分の結晶構造が完全に解かれてはいないと、プロトン駆動性の回転の可視化が成功していないためである。幸いにも V-ATPase に関しては全体構造解明への道筋がほぼつき、ここ数年以内に V_0 モーター部の構造生物学的な議論が可能になるであろう。プロトン駆動性回転の可視化については、プロトン駆動力を負荷した状態で 1 分子観察を行うという高いハードルをクリアしなければならない。我々もこのハードルを超えるべく日々研鑽しているところである。

それにしても、V-ATPase や F_1F_0 はなぜ回転しているのだろう。P-type ATPase やバクテリオロドプシン、Complex I などは回転しなくても立派にイオンポンプとして働いている。効率のよいエネルギー変換か、それとも微妙な調節機構か、なにか理由があって生物は回転触媒機構で働く酵素を創造したのだろう。この素朴な問いに答えるためにも回転分子モーターのメカニズムを徹底的に理解する必要があると考えている。

本稿で紹介した私たちの研究の多くは科学技術振興機構 ERATO ATP システムプロジェクトにおいて行われたもので、研究の推進にあたっては東京工業大学吉田賢右教授、英国インペリアルカレッジ岩田想教授をはじめ、多くの方々との協力を頂きました。関係の方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Huxley, H.E. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1403–1415.
- 2) Hirokawa, N. (1998) *Science*, **279**, 519–526.
- 3) 本間道夫 (2000) シリーズバイオサイエンスの新世紀 第7巻 生体膜のエネルギー装置 (吉田, 茂木編), pp. 181–193, 共立出版, 東京.
- 4) Boyer, P.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 39045–39061.
- 5) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature*, **386**, 299–302.
- 6) Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M., & Yokoyama, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2312–2315.
- 7) Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M., & Tamakoshi, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 24255–24258.
- 8) Kakinuma, Y., Ohsumi, Y., & Anraku, Y. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 10859–10863.
- 9) Ohsumi, Y. & Anraku, Y. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 2079–2082.
- 10) Forgac, M., Cantley, L., Wiedenmann, B., Altstiel, L., &

- Branton, D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1300–1303.
- 11) Stone, D.K., Xie, X.S., & Racker, E. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 4059–4062.
- 12) Ohkuma, S., Moriyama, Y., & Takano, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2758–2762.
- 13) Churchill, K.A. & Sze, H. (1983) *Plant Physiol.*, **71**, 610–617.
- 14) Beyenbach, K.W. & Wiczorek, H. (2006) *J. Exp. Biol.*, **209**, 577–589.
- 15) Nishi, T. & Forgac, M. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 94–103.
- 16) Peters, C., Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., & Mayer, A. (2001) *Nature*, **409**, 581–588.
- 17) Hiesinger, P.R., Fayyazuddin, A., Mehta, S.Q., Rosenmund, T., Schulze, K.L., Zhai, R.G., Verstreken, P., Cao, Y., Zhou, Y., Kunz, J., & Bellen, H.J. (2005) *Cell*, **121**, 607–620.
- 18) Liegeois, S., Benedetto, A., Garnier, J.M., Schwab, Y., & Labouesse, M. (2006) *J. Cell. Biol.*, **173**, 949–961.
- 19) Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T., & Yoshida, M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 6012–6015.
- 20) Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K., & Yoshida, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6661–6665.
- 21) Yokoyama, K., Oshima, T., & Yoshida, M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21946–21950.
- 22) Murata, T., Takase, K., Yamato, I., Igarashi, K., & Kakinuma, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 24885–24890.
- 23) Lolkema, J.S., Chaban, Y., & Boekema, E.J. (2003) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 323–335.
- 24) Grüber, G., Wiczorek, H., Harvey, W.R., & Müller, V. (2001) *J. Exp. Biol.*, **204**, 2597–2605.
- 25) Yokoyama, K. & Imamura, H. (2005) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 405–410.
- 26) Yoshida, M., Muneyuki, E., & Hisabori, T. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 669–677.
- 27) Imamura, H., Ikeda, C., Yoshida, M., & Yokoyama, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18085–18090.
- 28) Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Sun-Wada, G.H., Okajima, T., Wada, Y., & Futai, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 23714–23719.
- 29) Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr., & Yoshida, M. (1998) *Cell*, **93**, 1117–1124.
- 30) Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M., & Kinoshita, K., Jr. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7243–7247.
- 31) Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) *Nature*, **370**, 621–628.
- 32) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinoshita, K., Jr., & Itoh, H. (2001) *Nature*, **410**, 898–904.
- 33) Shimabukuro, K., Yasuda, R., Muneyuki, E., Hara, K.Y., Kinoshita, K., Jr., & Yoshida, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14731–14736.
- 34) Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., & Kinoshita, K., Jr. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 142–148.
- 35) Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J.E., Leslie, A.G., & Mueller, D.M. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5433–5442.
- 36) Kinoshita, K., Jr., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S., & Yoshida, M. (1998) *Cell*, **93**, 21–24.
- 37) Cross, R.L. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 270–275.
- 38) Oster, G. & Wang, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 482–510.
- 39) Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632–16638.
- 40) Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (2004) *Nature*, **427**, 465–468.
- 41) Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., & Noji, H. (2005) *Nature*, **433**, 773–777.
- 42) Imamura, H., Takeda, M., Funamoto, S., Shimabukuro, K., Yoshida, M., & Yokoyama, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17929–17933.
- 43) Sakaki, N., Shimo-Kon, R., Adachi, K., Itoh, H., Furuie, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., & Kinoshita, K., Jr. (2005) *Bioophys. J.*, **88**, 2047–2056.
- 44) Maegawa, Y., Morita, H., Iyaguchi, D., Yao, M., Watanabe, N., & Tanaka, I. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 483–488.
- 45) Schäfer, I.B., Bailer, S.M., Düser, M.G., Börsch, M., Bernal, R.A., Stock, D., & Grüber, G. (2006) *J. Mol. Biol.*, **358**, 725–740.
- 46) Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., & Fillingame, R.H. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8817–8824.
- 47) Stock, D., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (1999) *Science*, **286**, 1700–1705.
- 48) Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H., & Müller, D.J. (2000) *Nature*, **405**, 418–419.
- 49) Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Ftiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U., & Dimroth, P. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 229–233.
- 50) Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S., & Yoshida, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12159–12164.
- 51) Pogoryelov, D., Yu, J., Meier, T., Vonck, J., Dimroth, P., & Müller, D.J. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 1040–1044.
- 52) Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2005) *Science*, **308**, 654–659.
- 53) Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., & Dimroth, P. (2005) *Science*, **308**, 659–662.
- 54) Junge, W., Lill, H., & Engelbrecht, S. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 420–423.
- 55) Elston, T., Wang, H., & Oster, G. (1998) *Nature*, **391**, 510–513.
- 56) 村田武士, 山登一郎, 柿沼喜己(2006)生物物理, **46**, 336–340.
- 57) Sakai, H., Kawawaki, J., Moriura, Y., Mori, H., Morihata, H., & Kuno, M. (2006) *J. Physiol.*, **576**, 417–425.
- 58) Ueno, H., Suzuki, T., Kinoshita, K., Jr., & Yoshida, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1333–1338.
- 59) Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M., & Capaldi, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 898–902.
- 60) Suzuki, T., Ueno, H., Mitome, N., Suzuki, J., & Yoshida, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 13281–13285.
- 61) Diez, M., Zimmermann, B., Börsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C.A., & Gräber, P. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 135–141.
- 62) Yokoyama, K., Nagata, K., Imamura, H., Ohkuma, S., Yoshida, M., & Tamakoshi, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42686–42691.
- 63) 西 毅 (2005) 生化学, **77**, 354–358.
- 64) Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Nelson, H., & Nelson, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**,

- 5521-5524.
- 65) Kakinuma, Y., Kakinuma, S., Takase, K., Konishi, K., Igarashi, K., & Yamato, I. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 1063-1069.
 - 66) Hirata, R., Graham, L.A., Takatsuki, A., Stevens, T.H., & Anraku, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4795-4803.
 - 67) Valiyaveetil, F.I. & Fillingame, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 16241-16247.
 - 68) Leng, X.H., Nishi, T., & Forgac, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14655-14661.
 - 69) Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., & Forgac, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12397-12402.
 - 70) Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., & Forgac, M. (2003) *FEBS Lett.*, **545**, 76-85.
 - 71) Chaban, Y., Ubbink-Kok, T., Keegstra, W., Lolkema, J.S., & Boekema, E.J. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 982-987.
 - 72) Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., Yokoyama, K., & Iwata, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 59-64.
 - 73) Arata, Y., Baleja, J.D., & Forgac, M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 11301-11307.
 - 74) Grüber, G., Radermacher, M., Ruiz, T., Godovac-Zimmermann, J., Canas, B., Kleine-Kohlbrecher, D., Huss, M., Harvey, W.R., & Wiczorek, H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 8609-8616.
 - 75) Féthière, J., Venzke, D., Diepholz, M., Seybert, A., Geerloff, A., Gentzel, M., Wilm, M., & Böttcher, B. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40670-40676.
 - 76) Féthière, J., Venzke, D., Madden, D.R., & Böttcher, B. (2005) *Biochemistry*, **44**, 15906-15914.
 - 77) Venzke, D., Domgall, I., Köcher, T., Féthière, J., Fischer, S., & Böttcher, B. (2005) *J. Mol. Biol.*, **349**, 659-669.
 - 78) Wilkens, S., Inoue, T., & Forgac, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 41942-41949.
 - 79) Zhang, Z., Inoue, T., Forgac, M., & Wilkens, S. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 2006-2010.
 - 80) Dickson, V.K., Silvester, J.A., Fearnley, I.M., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2006) *EMBO J.*, **25**, 2911-2918.
 - 81) Sagermann, M., Stevens, T.H., & Matthews, B.W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7134-7139.
 - 82) Drory, O., Frolow, F., & Nelson, N. (2004) *EMBO Rep.*, **5**, 1148-1152.
 - 83) Lokanath, N.K., Matsuura, Y., Kuroishi, C., Takahashi, N., & Kunishima, N. (2007) *J. Mol. Biol.*, **366**, 933-944.
 - 84) Rubinstein, J.L., Walker, J.E., & Henderson, R. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6182-6192.
 - 85) Boekema, E.J., Ubbink-Kok, T., Lolkema, J.S., Brisson, A., & Konings, W.N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14291-14293.
 - 86) Bernal, R.A. & Stock, D. (2004) *Structure (Camb)*, **12**, 1789-1798.
 - 87) Green, D.W. & Grover, G.J. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 343-355.
 - 88) Cabezon, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2001) *EMBO J.*, **20**, 6990-6996.
 - 89) Cabezon, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 744-750.
 - 90) Nelson, N., Nelson, H., & Racker, E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7657-7662.
 - 91) Smith, J.B. & Sternweis, P.C. (1977) *Biochemistry* **16**, 306-311.
 - 92) Kato, Y., Matsui, T., Tanaka, N., Muneyuki, E., Hisabori, T., & Yoshida, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 24906-24912.
 - 93) Uhlin, U., Cox, G.B., & Guss, J.M. (1997) *Structure*, **5**, 1219-1230.
 - 94) Rodgers, A.J. & Wilce, M.C. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1051-1054.
 - 95) Hara, K.Y., Kato-Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T., & Yoshida, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23969-23973.
 - 96) Ferguson, S.A., Keis, S., & Cook, G.M. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 5045-5054.
 - 97) Konno, H., Murakami-Fuse, T., Fujii, F., Koyama, F., Ueoka-Nakanishi, H., Pack, C.G., Kinjo, M., & Hisabori, T. (2006) *EMBO J.*, **25**, 4596-4604.
 - 98) Kato-Yamada, Y. & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36013-36016.
 - 99) Kato-Yamada, Y. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6875-6878.
 - 100) Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 46840-46846.
 - 101) Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40130-40134.
 - 102) Nalin, C.M. & McCarty, R.E. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 7275-7280.
 - 103) Hisabori, T., Ueoka-Nakanishi, H., Konno, H., & Koyama, F. (2003) *FEBS Lett.*, **545**, 71-75.
 - 104) Kane, P.M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 17025-17032.
 - 105) Sumner, J.P., Dow, J.A., Earley, F.G., Klein, U., Jager, D., & Wiczorek, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5649-5653.
 - 106) Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., & Mellman, I. (2003) *Science*, **299**, 1400-1403.
 - 107) Sautin, Y.Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L., & Gluck, S.L. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 575-589.
 - 108) Dames, P., Zimmermann, B., Schmidt, R., Rein, J., Voss, M., Schewe, B., Walz, B., & Baumann, O. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3926-3931.
 - 109) Parra, K.J., Keenan, K.L., & Kane, P.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 21761-21767.
 - 110) Kane, P.M. & Smardon, A.M. (2003) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 313-321.
 - 111) Ho, M.N., Hirata, R., Umemoto, N., Ohya, Y., Takatsuki, A., Stevens, T.H., & Anraku, Y. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 18286-18292.
 - 112) Wilkens, S., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2005) *Micron*, **36**, 109-126.
 - 113) Parra, K.J. & Kane, P.M. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7064-7074.
 - 114) Seol, J.H., Shevchenko, A., & Deshaies, R.J. (2001) *Nat. Cell. Biol.*, **3**, 384-391.
 - 115) Smardon, A.M., Tarsio, M., & Kane, P.M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13831-13839.
 - 116) 横山 謙, 西 毅 (2004) 蛋白質 核酸 酵素, **49**, 2035-2043.
 - 117) Makyio, H., Iino, R., Ikeda, C., Imamura, H., Tamakoshi, M., Iwata, M., Stock, D., Bernal, R.A., Carpenter, E.P., Yoshida, M., Yokoyama, K., & Iwata, S. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3974-3983.
 - 118) Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A., & Danielson, M.A. (1997) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **13**, 457-512.
 - 119) Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L., Kustu, S., Berry, E.A., & Wemmer, D. E. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 52-56.