

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

プロトン輸送性ピロホスファターゼ：低コスト化合物を利用するポンプ

広野 めぐみ, 三村 久敏, 瀬上 紹嗣, 中西 洋一, 前島 正義

プロトン輸送性ピロホスファターゼ (H^+ -PPase) は、ピロリン酸 (無機二リン酸) を基質とするイオンポンプである。 H^+ -PPase の活性は光合成細菌で1966年に発表され、植物では1980年代前半に液胞膜で検出された。そして1989年に植物の液胞膜から酵素が精製されてタンパク質としての実体が明らかになった。その後、植物のみでなくマラリア病原虫、アグロバクテリア菌などにも見出され、生理機能の解明が進んでいる。基質であるピロリン酸はDNA, RNA, タンパク質, セルロース, ショ糖等の合成過程で副産物として生成する。したがって高分子合成反応を持続するためには、ピロリン酸を除去することが不可欠である。植物では、この低コスト化合物を H^+ -PPase が加水分解除去し、かつ大きな液胞空間の酸性 pH を維持している。この数年の研究成果は、プロトンポンプとしての機能を支える分子構造の解明、そして生理機能の解明において顕著である。ここでは、主として構造機能協関を詳述し、細胞機能にも言及する。

1. はじめに

プロトン輸送性ポンプには、F型、P型、V型の3種がよく知られており、これに光エネルギーを利用するロドプシンが加わる。F型はATP合成酵素としての位置づけが明確である。V型ATPaseは真核生物では液胞やリソソームなどの酸性オルガネラに、そしてP型の H^+ -ATPaseは植物細胞に見られる酵素である。同じP型ATPaseでも動物細胞の細胞膜に局在するのは Na^+ , K^+ -ATPaseであり植物の細胞膜 H^+ -ATPaseと異なる。筆者らが対象としているプロトン輸送性ピロホスファターゼ (H^+ -PPase) も植物で見出された酵素である。したがって植物は、ミトコンドリアと葉緑体にF型、細胞膜にP型、液胞にV型 H^+ -ATPaseをもち、これに H^+ -PPaseが加わることになる。多様なプロトンポンプの存在は、植物が膜を介したプロト

ン濃度勾配を巧みに利用していることの反映でもある。ここでは H^+ -PPase に焦点をあてる。

H^+ -PPaseの研究は、1966年のBaltcheyfskyらの光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* での報告¹⁾がスタートと言える。もちろん当時は、分子実体は五里霧中の状態であった。光合成細菌では、光を受けて色素胞の膜の電子伝達系が作動し膜内外にプロトン勾配が形成され、それを利用してPPiが生成する。液胞膜の酵素とは逆方向の反応である。*R. rubrum*では、夜間にPPiを加水分解しプロトン勾配を形成する反応が進行し、膜に電気化学的ポテンシャル差を提供して細胞機能を支える。その十数年の後、1985年にトウモロコシ葉鞘の液胞膜を含む膜画分²⁾、あるいは赤カブ塊根の液胞膜³⁾でPPi依存性のプロトンポンプ活性が測定された。液胞膜にはすでに H^+ -ATPaseの存在も知られており、なぜ二つのプロトンポンプが存在するのかも議論となった。

その後、 H^+ -PPaseのタンパク質実体の解明に多くのグループが挑戦した。 H^+ -PPaseの単離・同定の最初の報告は、ヤエナリ (緑豆) の胚軸から精製された1989年である⁴⁾。高純度の液胞膜から完全精製された標品には73kDaのタンパク質のみが確認された。この分子が基質を加水分解しプロトンを能動輸送する。単一タンパク質でのイオン

名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

Proton-translocating inorganic pyrophosphatase: a proton pump using a low cost fuel

Megumi Hirono, Hisatoshi Mimura, Shoji Segami, Yoichi Nakanishi, Masayoshi Maeshima (Graduate School of Bio-agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan)

輸送はP型ATPaseとの関連を推測させるが、数残基の小さなモチーフを除いてはP型ATPaseとの一次構造の類似性は見られない。本酵素については、Ca²⁺-ATPase⁵⁻⁷⁾のような精緻な分子作動機構の理解には達していない。H⁺-PPaseの新規プロトンポンプとしてのユニークさは基礎科学としての新知見が期待され、後述するように低コストの基質を利用し、かつ単一タンパク質構成であるという特質は、応用展開への大きな可能性を秘めている。ここでは、H⁺-PPaseの機能を支える分子構造についての最新の知見を述べ、次に細胞機能について考察し低コスト基質を利用するH⁺-PPaseの存在意義を紹介したい。できるだけ新しい知見を紹介することとし、2000年以前の文献については総説^{8,9)}を参照して頂きたい。

2. 基質分解機能ドメイン

H⁺-PPaseはピロリン酸(PPi)を基質とするが、同じリン酸結合を含むATPやGTPを加水分解することはない⁴⁾。ただし、三リン酸、四リン酸を加水分解する活性が弱いながらも検出される¹¹⁾。このことは、基質が酵素によって包まれてしまう構造ではなく、少なくとも基質PPiの一方の端がオープンになっていることを示唆している。なおPPiの加水分解の過程で、リン酸が基質ポケット中のアミノ酸に転移するプロセスがあるか否かを示す実験はまだ報告されていない。つまり酵素反応の最初のステップの解明もこ

れからの大きな課題となっている。それでは、最初に基質ポケットについて述べる。

H⁺-PPaseの二つの機能のうち基質加水分解機能は測定しやすいので、その触媒機能に関与する部位を特定する実験を組んだ。基質Mg²⁺-PPi複合体は静電的な相互作用で酵素の基質ポケットに入ると推測される。そこでヤエナリ酵素を対象に、生物間で保存性の高い部分的を絞り、とくに荷電アミノ酸残基に注目し、アミノ酸置換変異導入の酵素DNAを作製し、酵母細胞で発現させ、液胞を含む膜画分を試料として活性を測定した。親水性領域中の保存性の高いアスパラギン酸やグルタミン酸残基は酵素機能に決定的な影響をもつことが判明した^{12,13)}(図1, ループe)。後述するようにヤエナリH⁺-PPaseは16の膜貫通領域(TM)で構成され細胞質側に8個の親水性ループをもつ。基質分解に必要なドメインは複数の親水性ループ(ループe, k, m, o)に分散していた。このことは触媒部位が複数のループから成る複合構造であることを示唆している。なお図1は植物、放線菌、光合成細菌の酵素に関する筆者ら^{11,13-17)}および他の研究グループ^{10,18-21)}の成果も含めた基質分解機能ドメインの概略図である。

H⁺-PPaseの基質であるピロリン酸は、タンパク質などの高分子合成過程で副産物として生成する。H⁺-PPase活性の発現にはMg²⁺とK⁺が不可欠である。細胞内のATPと同様に、PPiはMg²⁺との複合体として挙動し基質とな

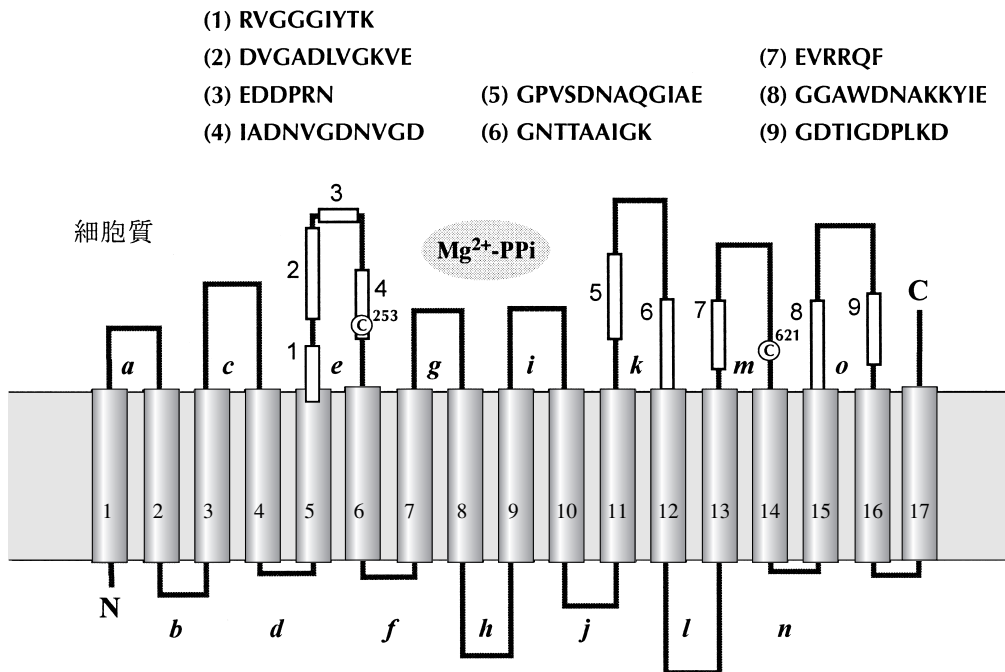


図1 H⁺-PPaseの基質加水分解機能を支えるドメインの概略
 機能ドメインのアミノ酸配列は上部に示した。いずれも細胞質側に露出していることが証明されている^{11,13,15)}。植物の液胞膜H⁺-PPaseでは17番目の膜貫通領域がない。放線菌酵素では、酸化状態でCys-253とCys-621が分子内ジスルフィド結合を形成し不活性型となり、還元条件下で活性型に可逆的に変換する¹⁷⁾。

る。Mg²⁺はMg-PPi複合体を形成するのみでなく、遊離のMg²⁺が酵素に結合することを示す結果がある。すなわち、H⁺-PPaseのトリプシンに対する感受性は遊離Mg²⁺を添加することで顕著に軽減する²²⁾ので、このことを指標として、変異導入したH⁺-PPaseにMg²⁺を添加してもトリプシンで分解される、つまりMg²⁺が結合しない変異酵素を検索した。Mg²⁺結合部位としてAsp-253, Glu-263が同定された。実験結果はこの二つの残基の間にあるLys-261がトリプシンによる切断サイトの一つであり分子表面にあることを推測させた。Lys-261を含めた3個の残基(図1のモチーフ2に含まれる)は、基質加水分解に必須であり生物種を超えて保存性が高い。Mg-PPiの結合部位と遊離Mg²⁺の結合部位は空間的に近接していると推測される。

3. 膜トポロジーモデル

植物のH⁺-PPaseは液胞膜に局在し、細胞質側でPPiを加水分解し、反対側の液胞内部では輸送されたH⁺を放出する。したがって細胞質側に触媒活性を支える構造と、その反応を膜ドメインのH⁺輸送経路に伝える構造が存在すると予想される。膜ドメインを決定し、膜外の多数の親水性ループのうちいずれが細胞質側に向いているかを決定するために、筆者らは放線菌のH⁺-PPaseを大腸菌で発現するシステムを確立し、システインスキヤニング法により膜トポロジーを決定した¹⁵⁾。

発現量と機能測定効率を考えると、植物由来の酵素ではなく、細菌型酵素を大腸菌で発現するほうが都合がよい。しかし放線菌H⁺-PPaseのDNAはGC含量が約70%と高い上にリピート配列が多く、遺伝子操作の障壁となることが予想された。そこでH⁺-PPaseの一次構造を変えずにGC含量を下げ、リピートを減らし大腸菌固有のコドン使用頻度を考慮した人工DNAを作製した。タンパク質としては野生型酵素そのものである。放線菌酵素は高温安定であり、活性の至適温度も高いというメリットもある²³⁾。

システインスキヤニング法では次の6ステップを経て膜配向性を検定した。(1)H⁺-PPase内在性の4個のシステインを、アラニンあるいはセリンに置換した酵素(Cys-less酵素)は活性を保持していることを確認し、さらに酵素精製を効率良く実施するためにHisタグを付加、(2)ハイドロパシー解析で推定される全ての親水性領域についてそれぞれ複数の残基を、Cys-less酵素を基に個別にシステインに置換、(3)システイン置換酵素39個のうち正常な発現と活性を示す35種を選択、(4)個々のシステイン置換酵素を発現する大腸菌細胞を試料として、まず膜非透過性のSH修飾試薬AMS(4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid)で処理し、次に膜透過性SH試薬BM(3-(N-maleimidylpropionyl)biocytin)で処理、(5)H⁺-PPaseを膜から可溶化し、Niアガロースゲルを用いて精製し

SDS-PAGEにて分離、(6)BMと反応したH⁺-PPase(細胞質側に残基が露出していることを意味する)を、ストレプトアビジンを用いるアフィニティブロッティング法で検出。完成した詳細な膜トポロジーモデル¹⁵⁾を模式化したものが図1である。

この実験により、膜ドメインが17個であること、多くの研究グループが指摘した基質分解機能ドメインはいずれも細胞質側に存在すること、そして細胞質側(計約300残基)と細胞外(約110残基)の親水性領域のサイズなど、分子構造の骨格が見えてきた。さらに機能発現に必須なアミノ酸残基を特定することにもつながった。なお放線菌H⁺-PPaseは植物等の酵素に比べてC端にTMが1個多く付加している(図1)。したがってH⁺-PPaseの基本型は16個のTMと考えるべきである。

4. 膜貫通領域と反応共役

H⁺-PPaseの機能を理解するには、基質分解と連動してH⁺を輸送する機構も解き明かす必要がある。H⁺輸送には膜貫通領域が重要となる。どの残基が機能に必須であるかを検討するには予見なしの実験が適切である。部位特異的変異導入は必須と推測されるアミノ酸残基をターゲットにして特定の残基と置換する方法であり、実験者の予見が入るが、このことを回避するためにランダム(無作為)変異導入法を採用した。放線菌H⁺-PPaseのcDNAを四分割し、各DNA断片に、アミノ酸変異の頻度を平均1残基となるようランダムに変異を生じさせた変異体ライブラリーを作製した。まず基質分解に必須なループeを含む第2領域のライブラリーを対象とし、約1,500種の変異体をスクリーニングした。図2にランダム変異および部位特異的変異導入酵素について、酵素活性を測定し機能への寄与を評価した結果を示す²⁴⁾。

基質分解活性は検出できるのに、H⁺ポンプ活性が著しく低下した変異酵素(ルーズカップリング)をみると、膜ドメインのGlu-193やArg-207などの荷電残基のみでなく、Phe-195(Leuに変異)やIle-293(Valに変異)などの中性残基も大きな影響をもつことが明らかになった。最近の研究から、膜タンパク質中のグリシンがGXXXGと連続した配列になっており、かつ異なる膜貫通領域に存在すると、グリシンフォールドと呼ばれるヘリックス間の強固なパッキングが成立する、つまりαヘリックス同士を強く結合させると言われている²⁵⁾。H⁺-PPaseでも複数の膜貫通領域中にGXXXG配列がみられ、図2にあるようにグリシンの変異が機能欠失となる例が多い²⁴⁾。これらの結果は、中性残基であっても膜貫通ヘリックスによる緻密な高次構造形成(ヘリックスのパッキング)あるいはH⁺輸送経路形成に大きく寄与していることを示している。フェニルアラニンは多くの膜貫通領域に含まれており、芳香族環がス

タッキングすることでヘリックス間の結合を維持していることも推測される。

部位特異的な変異導入の結果、TM10以降の第3領域の解析結果(広野ら, 未発表)も含めて総合的に判断すると、保存性の高いループeを支えるTM5において変異の影響が最も大きく、TM5が反応共役機構とH⁺輸送経路形成の両方に寄与しているものと推定される。TM5はH⁺-PPaseの大黒柱と位置づけられる。

興味深いのは、細胞質側の親水性ループ領域での変異が、基質分解よりもH⁺輸送に大きな影響をもたらしたことである。Ile-242やMet-256などがその例である(図2)。いずれも基質分解活性は100%維持しているのに、H⁺ポンプ活性は30%以下に低下した。これらの残基が基質分解からH⁺輸送への機能共役に関わっていることを強く示唆している。

基質分解とは反対の膜表面にあるAsp-281(ループf)も

変異により完全失活となった。また、膜貫通ヘリックスと親水性ループの境界部分に存在するプロリン(189, 287, 307残基目)の変異もH⁺ポンプ活性を大きく低下させた。タンパク質高次構造に可動性を与えるプロリンが反応共役に重要であると推定される。ループgのPro-307に近いSer-310, Ser-313のアミノ酸置換では活性への影響は全く見られず、このプロリンの重要性がクローズアップされている。

H⁺輸送に関わるのは酸性アミノ酸と推測される。図2での候補はAsp-259である。どの生物でも完全に保存されており、この残基をグリシンに置換すると完全に活性を失う。他の膜ドメインを考慮してもこのAsp-259の重要性が大きく、H⁺の受入部位を形成していると推測される。今回の解析を分子全体に広げることで、必須アミノ酸のリストを整備できる。そして構造-機能協関の理解のためには、高次構造を原子配置レベルで決定することが不可欠であ

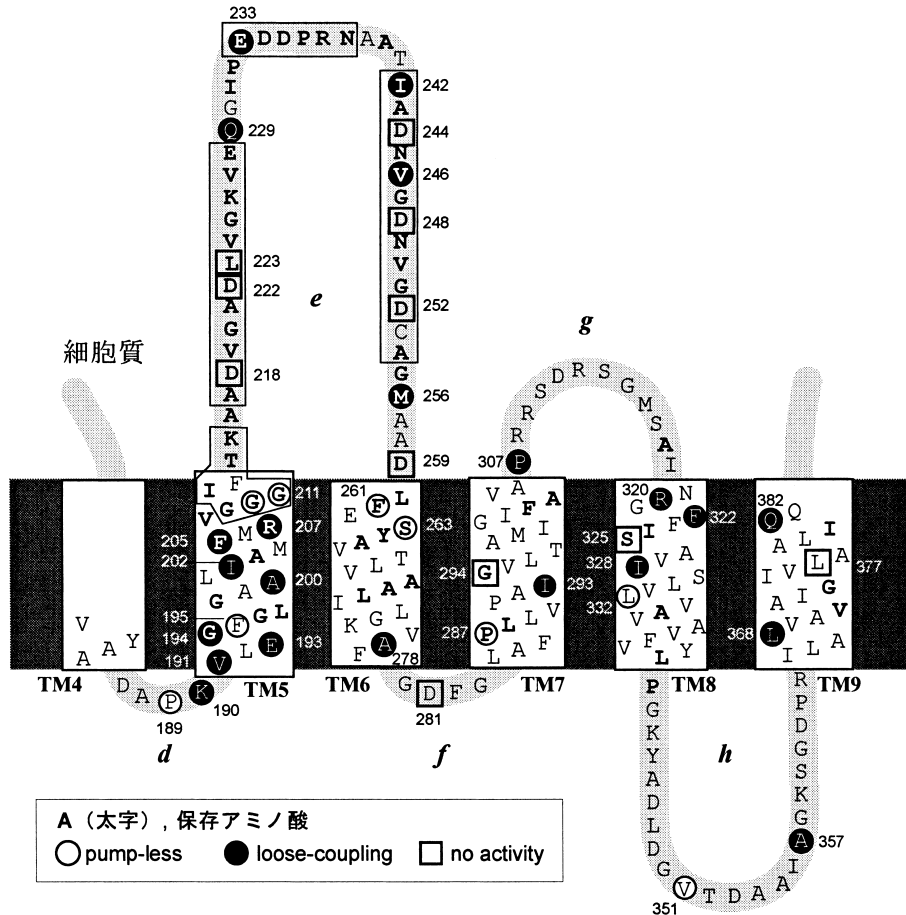


図2 放線菌 H⁺-PPase の中心部分で酵素機能に関与するアミノ酸残基

H⁺-PPaseの一次構造四分劃の第2領域(183-383残基)を1アミノ酸ずつランダムにアミノ酸置換し、基質分解、プロトンポンプ機能、ならびに両者の共役に関わるアミノ酸を檢定した²⁴⁾。一部部位特異的な変異導入の結果も含めた。アミノ酸の1残基の置換でポンプ機能を失った変異を○、ルーズカップリング変異を●、基質分解とポンプ活性の両方を失った変異を□で示した。膜貫通領域(TM)と親水性ループ領域(d~h)を示す膜トポロジーは文献¹⁵⁾による。アミノ酸の位置を数字で示した。

る。筆者らの一人、三村は東京大学豊島近教授との共同研究として H⁺-PPase の結晶化に取り組んでいる。

5. プロトン輸送の実測

H⁺-PPase による H⁺ 輸送は電位差形成的であるから、その機能をパッチクランプ法で解析することが可能である。植物 H⁺-PPase を酵母で発現する系とその酵母細胞の巨大化、巨大液胞の調製、そしてパッチクランプ法を組合せた手法を、東京大学矢部勇博士との共同研究により確立し、PPi 依存的な H⁺ 輸送を測定した¹⁴⁾。平均 420 万分子の H⁺-PPase を保持する直径 16.8 μm の巨大化酵母液胞は、PPi 依存的に 9.8 pA の電流を発生した。1.0 pA の電流は毎秒 600 万個の H⁺ の移動を意味する。全ての酵素が活性をもつと仮定すると、1 分子が毎秒 14 個の H⁺ を輸送する計算となる。必ずしも高い値ではないが、イオン輸送性トランスポーターの分子活性全般からみれば妥当と判断される。H⁺ 輸送機能のない可溶性ピロホスファターゼの場合は、より高い分子活性 10³/秒の値をもつ。H⁺-PPase では基質分解を H⁺ 輸送へと連動させるために、反応サイクル毎の構造変換が生じていると推測され、その変換速度が H⁺ 輸送速度を規定していると推定される。パッチクランプ法では基質濃度に応じて電流も増大するので、ミカエリス・メンテン型酵素として基質 Mg₂PPi に対する K_m 値 (4.6 μM) も求めることができた。酵母発現系とパッチクランプ法を組合せたこの実験手法は、人為的に変異させた H⁺-PPase の機能測定も可能であり、精度と応用性が高く、他のイオントランスポーターへの応用が期待されている。

6. 活性調節機構と細胞機能

放線菌 H⁺-PPase 内在性の 4 個のシステイン残基のうち細胞質側に存在する Cys-253 と Cys-621 (図 1 参照) は、酸化状態では分子内ジスルフィド結合を形成し、不活性型となる¹⁷⁾。還元すれば活性型に戻る可逆的な変化であり、生理学的なレベルでも酸化還元調節機構が働いている可能性が高い。すなわち、細胞代謝機能が低く細胞内還元レベルが低い場合は不活性型として待機し、逆に、代謝機能が上昇し ATP レベルが高い状態では、細胞は還元状態にあり高分子合成も活発化し PPi も多量に生成し、これを利用する H⁺-PPase が活性化することになり、生理学的には合理的である。しかし、放線菌の酸化還元調節物質の一つであるマイコチオール (東京大学作田庄平教授提供) の H⁺-PPase の還元作用は確認できなかった。植物酵素にもシステイン残基は存在するので、生物を問わず生理学的レベルでの酸化還元調節の機構解明が待たれる。なお、H⁺-PPase は生体膜中では二量体として存在している^{16, 26, 27)} が、上述のシステインは分子内ジスルフィド結合にのみ関与し、二量体形成に関与しないことも証明されている¹⁷⁾。

7. 細胞での機能

生理学的な役割については多くの報告があるが、構造と作動機構に関する本稿では詳述することはできないので、他のレビュー^{8, 9, 28)}を参照して頂きたい。

ここでは生化学的な視点での機能の概略を述べる。植物細胞における H⁺-PPase の機能は、液胞を酸性化すること、そして細胞質 PPi を消去することの二つである。液胞の酸性化は、生物界に普遍的な液胞型 H⁺-ATPase (V-ATPase) と協同的に行われる。V-ATPase は F 型 ATPase 同様の回転モーターであり、植物 V-ATPase では V₁ セクターに 8 個、V₀ セクターに 5 個のサブユニットをもつ高度に精密な複合体である²⁹⁾。V-ATPase では 1 ATP 分子あたり 2 個の H⁺ を輸送するが、H⁺-PPase では 1 PPi 分子あたり 1 個の H⁺ 輸送である。ATP 加水分解の標準自由エネルギー変化は -30.5 kJ/mol、PPi では -19.5 kJ/mol である。生理的条件下では、前者が約 -52 kJ/mol、後者が約 -41 kJ/mol と計算され、輸送する H⁺ の数を考慮すると理論的には、H⁺-PPase は V-ATPase を超える pH 勾配を形成することができる。なお、植物細胞の細胞質には遊離 PPi が 200 μM 程度、Mg²⁺ も数 mM のレベルで存在するので、先に述べた K_m 値などを考慮すると H⁺-PPase が最大活性を発揮できる条件にあるといえる。

この二つのプロトンポンプは同じ液胞膜に共局在し、液胞を酸性化し、液胞膜内外に電位差をもたらす (図 3)。形成された pH 勾配は、種々の二次能動輸送体、イオンチャネル機能のエネルギー的な駆動力となっている。溶質の液胞への集積と濃縮は、液胞拡大、ひいては膨圧の上昇と細胞成長の駆動力ともなっている。

細胞経済的にいえば装置構築コストが高い V-ATPase が存在するのは、供給の安定しているエネルギー通貨 ATP を利用できることのメリットが大きいためと推測される。一方、H⁺-PPase が基質とする PPi は、核酸やタンパク質、セルロースなどの高分子合成過程の副産物であり (図 3 参照)、基質供給コストはきわめて低い。したがって、H⁺-PPase の特徴は低コスト化合物を基質にする点にあり、植物を特徴づける大きな液胞の酸性 pH を低コストで維持できる。さらに不要な PPi を消去することで高分子合成反応を促進する意義も大きい。

事実、ヤエナリ (植物) の細胞の成長過程で液胞膜タンパク質あたりの V-ATPase 量を比較するとほぼ一定であるのに対して、H⁺-PPase の量は分裂後の若い細胞で多く、成熟にともなって減少する¹²⁾。成長途上の細胞では mRNA、タンパク質、セルロース等の活発な合成により副産物の PPi が多量に供給されており、これを利用できる H⁺-PPase の量が多いことは生理学的に合理的である。しかし、細胞内の PPi の供給量を反映した H⁺-PPase 量の調

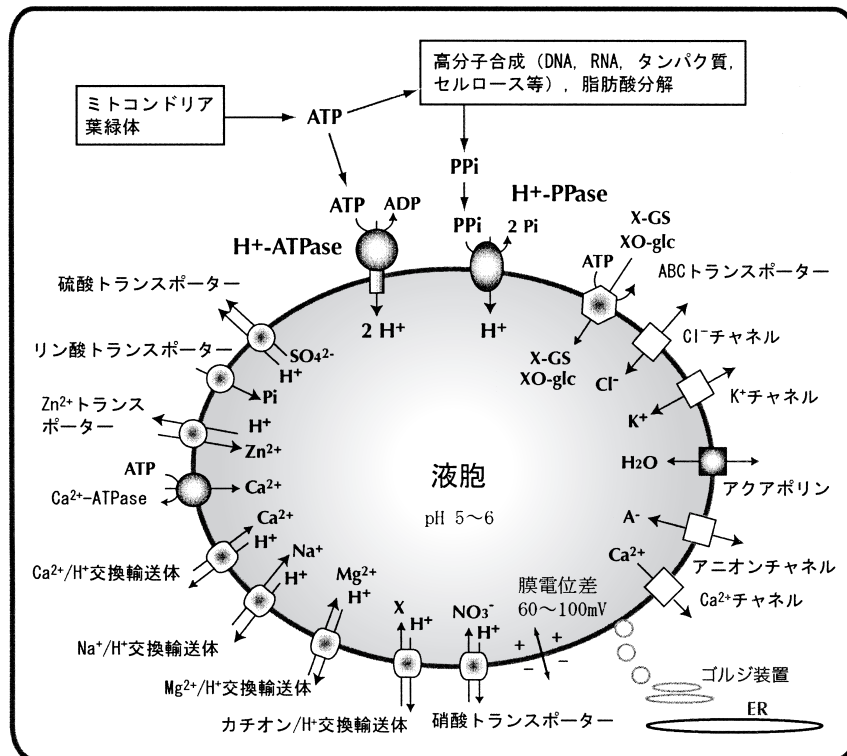


図3 植物細胞の液胞膜に局在する膜輸送システムと H^+ -PPase の機能

液胞膜に局在する二つのプロトンポンプ、 H^+ -PPase と H^+ -ATPase に加えて、カルシウムポンプ、ABCトランスポーター、二次能動輸送体、イオンチャンネル、水チャンネルを示した。プロトンポンプは液胞膜に電気化学的ポテンシャル差を形成し、他のトランスポーターとチャンネルに物質輸送の駆動力を与えている。液胞内の酸性条件を維持することもプロトンポンプの主要な機能である。

節の仕組みは不明である。

H^+ -PPase の生理機能を解明するために H^+ -PPase 遺伝子欠失株 (T-DNA 挿入変異株) での表現型を解析した。シロイヌナズナには H^+ -PPase の遺伝子が三つ存在するが、液胞膜型 (I 型) は 1 遺伝子のみである。他は II 型 H^+ -PPase と呼ばれ、PPi 依存性プロトンポンプ機能は保持するが、液胞ではなくゴルジ装置³⁰⁾ およびその関連小胞に局在し、そのタンパク質量は液胞型の 0.5% 以下と測定されている (瀬上ら, 未発表)。さて、たった一つしかない液胞型 H^+ -PPase 遺伝子を欠失した植物体は、野生株と同様に育った。植物にとって不可欠な酵素と考えていた筆者らにとっては驚く結果であった。そこで、育てる培地の成分を変えて実験してみた。通常の培地にはショ糖が含まれているが、ショ糖を除いた培地で育てると顕著に生育が遅れた (中西洋一ら, 未発表)。条件的表現型であるが、 H^+ -PPase の重要性を示している。

米国グループは H^+ -PPase の過剰発現株の表現型を解析し、耐塩性が上昇したことを報告している³¹⁾。さらに、細胞数の増加による葉の数や葉面積の増大、根の成長促進が確認された³²⁾。詳細な解析は、 H^+ -PPase は液胞酸性化のみでなく、細胞膜 H^+ -ATPase およびオーキシシン輸送体

(PIN1) の細胞膜への輸送を促進することにより、細胞壁空間の酸性化をもたらし、成長促進ホルモンであるオーキシシンの輸送を促進する役割を果たしていることを明らかにした。細胞壁空間は野生株での pH5.5 に対して過剰発現株では pH5.1 に低下しており、これが細胞壁成分の構造を緩める作用をする。すなわち、 H^+ -PPase の第三の機能として、間接的ではあるが細胞壁空間の pH 調節に働くことを意味している。

8. おわりに

どの細胞にとっても ATP がエネルギー代謝の主役であるけれど、その ATP が利用されたあとに残る PPi が、まだ高エネルギー化合物としてさらに利用されることは、細胞のエネルギー経済にとっても理にかなった仕組みである。PPi を利用するエネルギー転換装置としての H^+ -PPase を知ることは、たとえば分子進化的には大きな細胞空間を維持せざるを得ない植物がどのように進化してきたのかを知る手がかりを得ることであり、機能アミノ酸残基の同定や高次構造の原子配列レベルでの解明は新規プロトンポンプのからくりを見ることにつながる。この酵素が動物には存在せず、マラリア病原虫などの寄生原生動物に存在する

ことは、H⁺-PPase 特異的阻害剤の検索と作用機構の解明³³⁾が進めば、世界最悪と言われる伝染病の治療につながれる。低コスト化合物を利用するこのエネルギー転換酵素は、膜電池、PPi 検出装置などへの応用利用も可能である。H⁺-PPase の高次構造をもとにした作動機構の解明、PPi ワールドと関連した細胞機能の解明にさらに努力したい。

謝辞

本稿で述べたパッチクランプの研究は矢部勇博士（東京大学分子細胞生物学研究所）のご協力とご指導なくしては成立しなかった内容であり、現在も進行中の結晶構造解析は豊島近教授（東京大学分子細胞生物学研究所）のご協力とご指導のもとで進行していることを明記して感謝申し上げます。本研究は、特定領域研究「膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御」（代表、山口明人大阪大学教授）からの多大な支援、ならびに他の研究費の支援も受けて実施されたものです。

文 献

- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, H.W., & Klingenberg, M. (1966) *Science*, **153**, 1120-1124.
- Chanson, A., Fichmann, J., Spear, D., & Taiz, L. (1985) *Plant Physiol.*, **79**, 159-164.
- Rea, P.A. & Poole, R.J. (1985) *Plant Physiol.*, **79**, 245-256.
- Maeshima, M. & Yoshida, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20068-20073.
- Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) *Nature*, **418**, 605-611.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature*, **430**, 529-535.
- Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361-368.
- Maeshima, M. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1465**, 37-51.
- Maeshima, M. (2001) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 469-497.
- Drozdowicz, Y.M. & Rea, P.A. (2001) *Trends Plant Sci.*, **6**, 206-211.
- Takasu, A., Nakanishi, Y., Yamauchi, T., & Maeshima, M. (1997) *J. Biochem.*, **122**, 883-889.
- Nakanishi, Y. & Maeshima, M. (1998) *Plant Physiol.*, **116**, 589-597.
- Nakanishi, Y., Saijo, T., Wada, Y., & Maeshima, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 7654-7660.
- Nakanishi, Y., Yabe, I., & Maeshima, M. (2003) *J. Biochem.*, **134**, 615-623.
- Mimura, H., Nakanishi, Y., Hirono, M., & Maeshima, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 35106-35112.
- Mimura, H., Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 393-403.
- Mimura, H., Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 3625-3631.
- Belogurov, G.A. & Lahti, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 49651-49654.
- Schultz, A. & Baltscheffsky, M. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 141-151.
- Malinen, A.M., Belogurov, G.A., Salminen, M., Baykov, A.A., & Lahti, R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26811-26816.
- Van, R.C., Pan, Y.J., Hsu, S.H., Huang, Y.T., Hsiao, Y.Y., & Pan, R.L. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1709**, 84-94.
- Maeshima, M. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **196**, 11-17.
- Hirono, M., Mimura, H., Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 183-191.
- Hirono, M., Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* (in press).
- Bowie, J.U. (2005) *Nature*, **438**, 581-589.
- Maeshima, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 1157-1162.
- Satoh, M., Maeshima, M., Ohsumi, Y., & Yoshida, M. (1991) *FEBS Lett.*, **290**, 177-180.
- Martinoia, E., Maeshima, M., & Neuhaus, E. (2007) *J. Exp. Bot.*, **58**, 83-102.
- Sze, H., Schumacher, K., Müller, M.L., Padmanaban, S., & Taiz, L. (2002) *Trends Plant Sci.*, **7**, 157-161.
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2001) *FEBS Lett.*, **488**, 29-33.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., & Fink, G.R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11444-11449.
- Li, J., Yang, H., Peer, W.A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E.L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., & Gaxiola, R. (2005) *Science*, **310**, 121-125.
- Hirono, M., Ojika, M., Mimura, H., Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (2003) *J. Biochem.*, **133**, 811-816.