

日本学士院賞 受賞者 二井 將光



専攻学科目 生化学・薬学

生年	略歴	専攻学科目
昭和十五年五月		生化学・薬学
昭和三九年三月	東京大学薬学部製薬化学科卒業	
同 四四年三月	東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了	
同 四四年三月	薬学博士	
同 四五年一〇月	米国ウイスコンシン大学マツカールドルがん研究所博士研究員	
同 四七年三月	米国コーネル大学生化学分子生物学研究室研究員	
同 五二年一〇月	岡山大学薬学部教授	
同 六〇年四月	大阪大学産業科学研究所教授	
平成一六年四月	大阪大学名誉教授	
同 一九年四月	岩手医科大学薬学部長・教授（現在に至る）	

## 薬学博士二井將光氏の「生物エネルギー

### 生産（転換）機構の研究」に対する授賞

#### 審査要旨

「生物がいかにしてエネルギーを生産し、どのように使っているか」という疑問に答え、そのメカニズムを明らかにするべく、二井將光氏は研究を続けてきた。生物のエネルギーは、葉緑体が炭酸ガスと水を糖（グルコース）と酸素に変えることから始まる。多くの生物は、グルコースから解糖系を通じて還元力を取り出し、電子伝達鎖が形成する $H^+$ の勾配によって、ATP合成酵素(F-ATPase)を駆動し、ATP（アデノシン三リン酸）を合成している。ATPは生物のエネルギー通貨とよばれ、生物機能の中心に位置している。同氏の研究は、生物がATPを生産する（合成する）過程を明らかにした。同時に、ATPの加水分解のエネルギーを使う（転換する）過程、特に、多様なプロトン輸送ATPaseが細胞の内外に酸性の場所を形成する分子機構の解明に深く関わってきた。二井氏の業績は以下の三つの研究に集約される。

#### 1. ATP合成酵素(F-ATPase)の構造と反応機構の解明

二井氏は、「ATPを合成する機構は動物から細菌まで共通であり、遺伝学の確立している大腸菌を用いることによって、大きな進展がある」と考え、ほとんど研究されていなかった大腸菌のATP合成に注目した。まず、大腸菌の細胞膜を用いてエネルギー代謝を解析する系を確立し、F-ATPaseの研究を開始している。一九八一年までにF-ATPaseを構成する蛋白質の全遺伝子を同定、全構成蛋白質のアミノ酸配列を世界に先駆けて明らかにした。F-ATPase八種のサブユニット蛋白質の構造と機能を推定するという大きな成果をあげた。これは遺伝子工学が登場する直前の成果であり、現在では考えられないほどの創意工夫と時間を必要とした。複雑な膜蛋白質の塩基配列（アミノ酸配列）が、全て決定された初めての例であり、遺伝子を用いて膜蛋白質の構造と機能を研究するという方法論を確立した。

次に、F-ATPaseを細胞膜から精製し、構成している各蛋白質を分離し、もう一度集めて元の複合体を作り細胞膜へ戻すという実験によって、F-ATPaseが八種類のサブユニット蛋白質( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $c$ )からなる膜酵素であることを証明した。さらに、生化学および遺伝学の手法を駆使して各サブユニットの機能とお互いの配置を示した。保存アミノ酸配列に注目して、系統的にアミノ酸

残基を置換し、活性の変化を解析するという手法によって、 $\beta$ サブユニットに局在する触媒中心のグルタミン酸やスレオニンなどの残基、および $H^+$ の輸送路を形成するアスパラギン酸と、アルギニン残基を明らかにした。これらの結果は、一九九四年に発表されたX線構造をはじめとして、多くの研究者により確認された。

さらに、精製したF-ATPase、あるいは膜局在F-ATPaseの反応を一つ分子ずつ観察した。F-ATPase全体の中で $ye_0$ の三種のサブユニットが形成する部分が、高速で回転しながら次々に化学反応を行う機構を提唱した。同時に、F-ATPaseが確率的に速度を変えながら回転する活性状態と、停止する阻害状態を平均一秒間隔で繰り返し続ける酵素であることを示した。これは酵素反応に新しい概念を提出したものである。ある種の細菌のF-ATPaseがヒトのものとは大きく異なることが最近明らかになり、感染症薬開発のターゲットとなると考えられる。基礎的な研究が創薬に及ぼす波及効果である。

## 2. ATP加水分解による $H^+$ の輸送機構の解明

生物はATPをどのように使っているか。この疑問に対して、二井氏はいろいろな方向から研究を進めてきたが、特に注目してきたのは、ATPを加水分解して得られるエネルギーを使って $H^+$ を輸送するATPaseである。

一つは、胃酸を分泌している $H^+/K^+$ -ATPaseの研究である。二井氏はこの酵素の遺伝子を同定し、塩基配列を決定することにより、二つのサブユニットのアミノ酸配列を明らかにした。反応機構やATP結合部位に至るまで、この酵素が $Na^+/K^+$ -ATPaseに類似していることを示した。また、胃壁細胞に局在する特異的な転写因子が関与し、 $H^+/K^+$ -ATPaseの遺伝子が読まれ、胃壁細胞の形質膜に局在することを明らかにした。

二つ目は、V-ATPaseの研究である。二井氏はマウスを主な材料に、内部が酸性のオルガネラ（細胞内器官）に注目した。酵母の液胞（Vacuole）に局在するV-ATPase（Vacuolar ATPase）に対応する酵素がオルガネラ膜に存在し、内部を酸性にしていること、F-ATPaseとは構造と反応機構がよく似ているが、V-ATPaseはATP合成酵素ではなくATPを加水分解し、サブユニットの回転を伴う機構によって $H^+$ を輸送していることを明らかにした。

## 3. $H^+$ を輸送するV-ATPaseの生理学的意義の解明

ATPの加水分解のエネルギーによって $H^+$ を輸送する機構は、生物にとってきわめて重要なものである。しかし、 $H^+$ 輸送の組織や細胞に於ける生理学的意義は、ほとんど注目されていなかった。

これに対して、二井氏は哺乳動物の肺や腎臓、精子、神経等にお

いて、少しずつ構造の異なるイソフォームを持つ V-ATPase を発見し、それぞれが多様な生理機能を持つことを示した。<sup>a</sup> サブユニットには、<sup>b1</sup>, <sup>b2</sup>, <sup>b3</sup>, <sup>b4</sup> のイソフォーム、<sup>c</sup> サブユニットには <sup>d1</sup>, <sup>d2</sup> のイソフォームを見出した。破骨細胞の骨に面した形質膜には <sup>b3</sup> と <sup>d2</sup> イソフォームを持つ V-ATPase が局在していた。この V-ATPase は  $H^+$  を分泌し、骨表面を酸性にし、骨吸収を通じて骨代謝の恒常性に関与している。したがって、<sup>a3</sup> イソフォームを欠失すると、骨が異常に硬くなる大理石病を発症する。さらに、破骨細胞が形成される過程で、この特異的な V-ATPase が形質膜に局在するようになることを示した。この発見によって、形質膜の V-ATPase が骨粗鬆症薬の新しいターゲットになることが明らかになった。同様なアプローチによって、E<sub>c</sub>C および G サブユニットのイソフォームを持つ V-ATPase に関しても、それぞれの役割を明らかにしている。

また、二井氏は神経、脾臓、甲状腺、等にある分泌顆粒に、特異的な V-ATPase が存在し、それぞれの顆粒の内部を酸性にし、インスリンなどのホルモンや神経伝達に関わるグルタミン酸やセロトニンの分泌に関与することを発見した。逆に細胞が蛋白質などを取り込む過程、例えば腎臓の細胞が尿中から蛋白質を回収し、リソソームに運びアミノ酸にまで分解する過程にも V-ATPase の形成する酸性 pH が必須であることを明らかにした。したがって V-ATPase

の欠損によって酸性 pH が形成できなくなると、分泌や取り込みができなくなり、多くの疾病の原因となる。

生物のエネルギーの根本に関わる ATP の生産と ATP エネルギー転換機構を、二井氏は系統的に研究し、その解明を分子から細胞へと展開した。また、ATP の加水分解によって形成される酸性 pH が、細胞生物学的に極めて重要であり、疾病にも深く関わっていることを示した。研究成果は、生化学や細胞生物学の原著論文や国際的な教科書に広く引用されている。

#### 主要な論文・著書目録

##### 【原著論文】

1. Futai, M. (1977) Reconstitution of ATPase activity from the isolated  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits of the coupling factor,  $F_1$ , of *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 79, 1231–1237.
2. Kanazawa, H., Miki, T., Tamura, F., Yura, T. and Futai, M. (1979) Specialized transducing phage  $\lambda$  carrying the genes for coupling factor of oxidative phosphorylation of *Escherichia coli*: Increased synthesis of coupling factor on induction of prophage  $\lambda$ asn. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76, 1126–1130.
3. Dunn, S. D. and Futai, M. (1980) Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase. **J. Biol. Chem.** 255, 113–118.
4. Kanazawa, H., Tamura, F., Mabuchi, K., Miki, T. and Futai, M. (1980) Organization of unc gene cluster of *Escherichia coli* coding for proton-translocating ATPase of oxidative phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**

- USA, 77, 7005–7009.
5. Futai, M., Nounni, T. and Maeda, M. (1989) ATP synthase ( $H^+$ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. **Ann. Rev. Biochem.**, 58, 111–136.
  6. Takeyama, M., Ihara, K., Moriyama, Y., Nounni, T., Ida, K., Tomioka, N., Iwai, A., Maeda, M. and Futai, M. (1990) The glycine-rich sequence of the  $\beta$  subunit of *Escherichia coli*  $H^+$ -ATPase is important for activity. **J. Biol. Chem.**, 265, 21279–21284.
  7. Maeda, M., Oshiman, K., Tamura, S. and Futai, M. (1990) Human gastric ( $H^+$  +  $K^+$ )-ATPase gene: Similarity to ( $Na^+$  +  $K^+$ )-ATPase genes in exon/intron organization but difference in control region. **J. Biol. Chem.**, 265, 9027–9032.
  8. Moriyama, Y. and Futai, M. (1990) Presence of 5'-hydroxytryptamine (serotonine) transport coupled with vacuolar type  $H^+$ -ATPase in neurosecretory granules from bovine posterior pituitary. **J. Biol. Chem.**, 265, 9165–9169.
  9. Moriyama, Y., Iwanoto, A., Hanada, H., Maeda, M. and Futai, M. (1991) One-step purification of *Escherichia coli*  $H^+$ -ATPase (FoF<sub>1</sub>) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. **J. Biol. Chem.**, 266, 22141–22146.
  10. Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type  $H^+$ -ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. **J. Biol. Chem.**, 266, 17707–17712.
  11. Omote, H., Maeda, M. and Futai, M. (1992) Effects of mutations of conserved Lys-155 and Thr-156 residues in the phosphate-binding glycine-rich sequence of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, 267, 20571–20576.
  12. Nakamoto, R. K., Maeda, M. and Futai, M. (1993) The  $\gamma$  subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase: mutations in the carboxyl-terminal region restore energy coupling to the amino-terminal mutant  $\gamma$ Met23 $\rightarrow$ Lys. **J. Biol. Chem.**, 268, 867–872.
  13. Tamura, S., Wang, X., Maeda, M. and Futai, M. (1993) Gastric DNA binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 10876–10880.
  14. Moriyama, Y., Yamamoto, A., Yamada, H., Tashiro, Y., Tomochika, K., Takahashi, M., Maeda, M. and Futai, M. (1995) Microvesicles isolated from bovine posterior pituitary accumulate norepinephrine. **J. Biol. Chem.**, 270, 11424–11429.
  15. Takeyasu, K., Omote, H., Netikadan, S., Tokunasu, F., Iwanoto-Kihara, A. and Futai, M. (1996) Molecular imaging of *Escherichia coli* FoF<sub>1</sub>-ATPase in reconstituted membranes using atomic force microscopy. **FEBS Lett.**, 392, 110–113.
  16. Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwanoto-Kihara, A., Ueda, I., Yangida, T., Wada, Y. and Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (FoF<sub>1</sub>): direct observation. **Science**, 286, 1722–1724.
  17. Sun-Wada, G.-H., Murata, Y., Yamamoto, A., Kanazawa, H., Wada, Y. and Futai, M. (2000) Acidic endomembrane organelles are required for mouse post-implantation development. **Developmental Biol.**, 228, 315–325.
  18. Toyomura, T., Oka, T., Yamaguchi, C., Wada, Y. and Futai, M. (2000) Three subunit  $\alpha$  isoforms of mouse vacuolar  $H^+$ -ATPase: Preferential expression of the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. **J. Biol. Chem.**, 275, 8760–8765.
  19. Oka, T., Murata, Y., Namba, M., Yoshimizu, T., Toyomura, T., Yamamoto, A., Sun-Wada, G.-H., Hamasaki, N., Wada, Y. and Futai, M. (2001)  $\alpha 4$ , a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar  $H^+$ -ATPase subunit  $\alpha$ . **J. Biol. Chem.**, 276, 40050–40054.

20. Nishio, K., Iwamoto-Kihara, A., Yamamoto, A., Wada, Y. and Futai, M. (2002) 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.
21. Murata, Y., Sun-Wada, G.-H., Yoshimizu, T., Yamamoto, A., Wada, Y. and Futai, M. (2002) Differential localization of the vacuolar  $H^+$  pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. **J. Biol. Chem.**, **277**, 36296–36303.
22. Sun-Wada, G.-H., Inai-Senga, Y., Yamamoto, A., Murata, Y., Wada, Y. and Futai, M. (2002) A proton pump ATPase with testis-specific *E* 1 subunit isoform required for acrosome acidification. **J. Biol. Chem.**, **277**, 18098–18105.
23. Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Okajima, T., Wada, Y. and Futai, M. (2003) Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of G and c subunit. **J. Biol. Chem.**, **278**, 23714–23719.
24. Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Oka, T., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y. and Futai, M. (2003) From lysosomes to plasma membrane: Localization of vacuolar type  $H^+$ -ATPase with the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. **J. Biol. Chem.**, **278**, 22023–22030.
25. Nakanishi-Matsui, M., Kashiwagi, S., Hosokawa, H., Cipriano, D.J., Dunn, S.D., Wada, Y. and Futai, M. (2006) Stochastic high-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector. **J. Biol. Chem.**, **281**, 4126–4131.
26. Hurtado-Lorenzo, A., Skinner, M., Annan, J.E., Futai, M., Sun-Wada, G.-H., Bougoin, S., Casanova, J., Wildeman, A., Bechoua, S., Ausiello, D.A., Brown, D. and Marshansky, V. (2006) V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. **Nature Cell Biology**, **8**, 124–136.
27. Futai, M. (2006) Our research on proton pumping ATPase over three decades: their biochemistry, molecular biology and cell biology. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B**, **82**, 416–438.
28. Hayashi, K., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y., Nakanishi-Matsui, M. and Futai, M. (2008) Defective assembly of a hybrid vacuolar  $H^+$ -ATPase containing the mouse testis-specific *E* 1 isoform and yeast subunits. **Biochim. Biophys. Acta**, **1777**, 1370–1377.
29. Marshansky, V. and Futai, M. (2008) The V-type  $H^+$ -ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. **Current Opinion in Cell Biology**, **20**, 415–426.
30. Sekiya, M., Hosokawa, H., Nakanishi-Matsui, M., Al-Shawi, M.K., Nakamoto, R.K. and Futai, M. (2010) Single molecule behavior of inhibited and active states of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> rotation. **J. Biol. Chem.**, **285**, 42058–42067.