

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-166612
(P2004-166612A)

(43) 公開日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
C 1 2 N 9/16

F I

C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 9/16 Z N A B

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
4 B O 5 0

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2002-337212 (P2002-337212)
(22) 出願日 平成14年11月20日 (2002.11.20)

(71) 出願人 503360115
独立行政法人 科学技術振興機構
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(74) 代理人 100093230
弁理士 西澤 利夫
(72) 発明者 今村 博臣
神奈川県横浜市青葉区柿の木台32-13
コーポカワハラ
203
(72) 発明者 吉田 賢右
神奈川県藤沢市片瀬海岸
1-9-13-1103
(72) 発明者 横山 謙
東京都町田市本町1165-2B

最終頁に続く

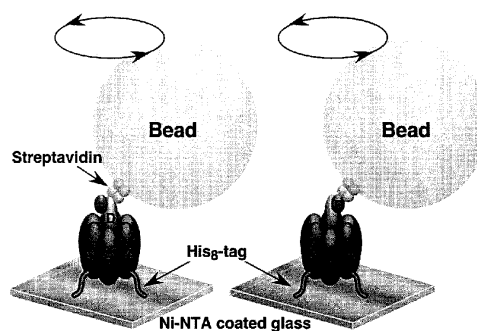
(54) 【発明の名称】 回転モーター分子 V₁-ATPase

(57) 【要約】

【課題】 従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供する。

【解決手段】 V₀ V₁-ATPaseのV₁部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子V₁-ATPase。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

V₁。V₁-ATPaseのV₁部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項2】

耐熱性を有する請求項1の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項3】

好熱菌*Thermophilus*由来である請求項2の回転モーター分子V₁-ATPase。

10

【請求項4】

Aサブユニットに相当する配列番号3のポリペプチド3個、Bサブユニットに相当する配列番号4のポリペプチド3個、Dサブユニットに相当する配列番号5のポリペプチド1個を有する複合体である請求項3の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項5】

配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方を有する請求項4の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項6】

AサブユニットおよびBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている請求項1から5のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

20

【請求項7】

AサブユニットのN端に結合したHisタグを介して基板上に固定されている請求項6の回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項8】

Dサブユニットにジョイント部材が結合している請求項1から7のいずれかの回転モーター分子V₁-ATPase。

【請求項9】

配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方のCys残基にジョイント部材を結合している請求項8の回転モーター分子V₁-ATPase。

30

【請求項10】

AサブユニットおよびBサブユニットにおける全てのCys残基が非Cys残基に置換されている請求項9の回転モーター分子V₁-ATPase。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、マイクロマシンやナノマシンの駆動部（ナノアクチュエータ）等として有用な新規回転モーター分子V₁-ATPaseに関するものである。

【0002】

40

【従来の技術】

分子サイズの大きさで機械的な動きをするマイクロマシンやナノマシンの開発が注目されている。このようなマイクロマシンやナノマシンは、例えば、分子コンピューターの配線を加工する分子ロボットや体内で治療作業を行う医療用ロボットとして有望視されているからである。

【0003】

マイクロマシンやナノマシンを作成するためには、個々の要素デバイス（センサ、アクチュエータ、ミニチュア機械）や、それらの組立方法（マイクロマシンングやナノマシンング）に至るまで、様々な技術開発が必要とされている。特に、マイクロマシン駆動部であるマイクロアクチュエータやナノアクチュエータ（回転モーター）の開発は、マシンの自

50

律運動にとって不可欠であり、様々な微細加工技術を利用したモーターデバイスの開発が進められている。しかしながら微細加工技術を応用した方法で作成できるマイクロアクチュエータは、小さいものでも100 μm程度であり、マイクロマシンやナノマシンに装備するには、モーター装置の更なる微少化が求められている。

【0004】

そこで、微細加工技術によってモーターを構築するのではなく、回転運動能を有する単一分子をモーターとして利用することが提案されている。

【0005】

一般に、モーターとして利用できる分子は、外部エネルギーを回転運動に変換する動力機構があること、および1方向の回転を実現できることの2点を満たすことが求められている。そして、このような条件を満たす低分子有機化合物としては、例えば(3R, 3'R) - (P, P) - trans - 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4' - octahydro - 3, 3' - dimethyl - 4, 4' - bipheanthrydiene (非特許文献1)とTriptycyl(4) helicene (非特許文献2)が知られている。前者は、炭素 - 炭素二重結合を挟んで左右対称的な形を持っているが、立体的な込み合いのためねじれた構造となっている。これに適当な熱や光を加えると4つのプロセスを経て1方向に回転させることができる。また2回の光反応と熱異性化反応で1サイクルを完了し、1方向のみに進行する。すなわち、この有機化合物は、熱異性化反応と光反応とによって回転運動を行う。光反応による回転は非常に速い(ピコ秒レベル)が、熱異性化反応による回転には数分以上かかるため、実用化に適していない。また、駆動力が極めて弱いという問題点を有してもいる。一方、後者はフォスゲン付加反応とウレタン結合形成、開裂という化学反応を利用して分子の1方向の回転を示す。しかしながら、この分子は繰り返し回転ができないという、アクチュエータとしての致命的な欠陥を有している。

【0006】

一方、マイクロマシンやナノマシン等に利用可能な単一分子モーターとしては、鞭毛モーター(非特許文献3、4)、ATP合成酵素(非特許文献5)、ミオシンモーター(非特許文献6、7)、微少管系モーター(非特許文献8)、核酸合成酵素の運動タンパク質(非特許文献9)等の生体分子も知られている。

【0007】

このうち、ATP合成酵素は、真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核細胞膜などに普遍的に存在する膜タンパク質であり、細胞の消費するATPの大部分を合成している。ATP合成酵素(F_0F_1 -ATP合成酵素)は分子量約50万にも及ぶ巨大膜タンパク質複合体であり、膜中に存在する F_0 部分と膜の外に存在する F_1 部分からなる。 F_0 部分は膜をプロトン(H^+)が通過するために通り道になっており、 F_1 部分にはATPを合成/加水分解する触媒部位がある。 F_1 部分の分子量は約38万であり、例えばバクテリア由来のATP合成酵素における F_1 部分のサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3$ である。とサブユニットはどちらにも似たようなATP結合部位を有するが、触媒活性は β サブユニットにある。両者は交互に並んでリングを形成しており、この $\alpha_3\beta_3$ リングの中心部にサブユニットが存在している。サブユニットは $\alpha_3\beta_3$ リングの頂上に結合し、ATP加水分解活性を制御している。サブユニットはサブユニットに結合している。一方、 F_0 部分は分子量約10万であり、そのアミノ酸組成は、プロトンの移動に必須なグルタミン酸およびアスパラギン酸を多く含んでいる。サブユニット組成は $a_1b_2c_9$ であり、 c サブユニットは膜の中でリング状に配列し(c リング)、それに a サブユニットと、膜の外に長く突き出した腕を持つ b サブユニット2個が結合している。従って、 F_0F_1 -ATP合成酵素は、 F_1 部分と F_0 部分とが、 c -リング、 b_2 の2箇所結合している。さらに特筆すべきは、この F_0F_1 -ATP合成酵素分子が2種類のトルク発生装置を備えている点である。一つは F_1 部分に存在するATP駆動型装置であり、他方は F_0 部分に存在するプロトン駆動型装置である。すなわち、 F_0 部分がプロトンを細胞膜内に取り込む場合には c リングが時計回りに回

10

20

30

40

50

転し、プロトンを細胞膜外に排出する場合にはcリングは反時計回りに回転する。一方、 F_1 部分は、ATP合成時にはそのサブユニットがF。側からみた場合に時計回りに回転し、ATP分解時には反時計回りに回転する。そして、このような2種類のトルク発生装置を備えることによって、ATP合成酵素が生み出すトルクは数十ピコニュートン・nmであり、分子モーターとしての十分な駆動力を有している。また水系で作動するため体内でのアクチュエータとして最適であり、アクチンを十分に動かす力があるために生体内の蛋白質、糖質、脂質、核酸を操作することも可能である。

【0008】

そしてこの出願の発明者らは、このF。 F_1 -ATP合成酵素分子を改良して、広範な回転速度の制御が可能な改変型F。 F_1 -ATP合成酵素分子とその利用発明を既に発明し、特許出願している(特願2002-148232:出願日2002年5月22日)。また、最近になって、 F_1 -ATP合成酵素分子に亜鉛結合部位を導入し、亜鉛によって回転の開始・停止を制御することのできる回転モーター分子が報告されてもいる(非特許文献10)。

10

【0009】

【非特許文献1】

Nature 401:152-155, 1999

【非特許文献2】

Nature 401:150-152, 1999

【非特許文献3】

Microbiol. 6:1-18, 1967

20

【非特許文献4】

Nature 245:380-382, 1973

【非特許文献5】

Nature 386:299-302, 1997

【非特許文献6】

Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:1057-1063, 1994

【非特許文献7】

Curr. Opin. Cell Biol. 7:89-93, 1995

30

【非特許文献8】

Cell 42:39-50, 1985

【非特許文献9】

Nature 409:113-119, 2001

【非特許文献10】

Nature Materials 1:173-177, 2002

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、様々な回転モーター分子がマイクロマシンやナノマシン等の駆動部材として提案されており、回転の形態や回転数、トルク、回転の制御方法等においてそれぞれに特徴を有している。従って、実際にマイクロマシンやナノマシンを作成するためには、その用途やマシン構成に応じて多くの候補分子から適切なものを選択する必要がある。しかしながら、これまでに報告されている回転モーター分子のそれぞれは、マイクロマシンやナノマシンの他種多様な用途や構成の全てに対応可能であるとは言い難い。そのため、マイクロマシンやナノマシン等の開発に当たっては、回転モーター分子のラインナップを一つでも多く充実させることが望まれている。

40

【0011】

従って、この出願は、従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供することを課題としている。

【0012】

50

また出願は、その回転運動をさらに円滑なものにするために、さらには回転運動の伝達手段等を分子に付加するために改良された新規回転モーター分子を提供することを課題としてもいる。

【0013】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、 V_0 V_1 - A T P a s e の V_1 部分を構成する A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個を有する複合体分子であって、A T P 存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子 V_1 - A T P a s e を提供する。

【0014】

この発明の V_1 - A T P a s e は、触媒部位の A サブユニットを含み、A と B サブユニットは交互に配列し、 F_0 F_1 - A T P a s e の σ_3 σ_3 のように六量体の円筒を形成するものであって、D サブユニットは A_3 B_3 の円筒の中央の空洞を埋めており、F サブユニットは、D サブユニットに結合しており、D サブユニットと F サブユニットは、回転子（回転シャフト、回転軸）として働く。

10

【0015】

この発明の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e は、耐熱性分子であることを一つの態様としており、その場合に好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の分子であることを好ましい態様としている。

【0016】

さらにこの好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e は、A サブユニットに相当する配列番号 3 のポリペプチド 3 個、B サブユニットに相当する配列番号 4 のポリペプチド 3 個、D サブユニットに相当する配列番号 5 のポリペプチド 1 個を有する複合体であることを一つの好ましい態様としている。

20

【0017】

さらにこの発明の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e は、配列番号 3 における第 2 3 2 番目 S e r 残基の A l a 残基への置換、および第 2 3 5 番目 T h r 残基の S e r 残基への置換の少なくとも一方を有する改変型分子であることを別の態様としている。

【0018】

この改変された V_1 - A T P a s e は、触媒部位である A サブユニットを改変することにより M g A D P 阻害が解消され、A T P 加水分解活性が亢進する。すなわち野生型 V_1 - A T P a s e は M g A D P 阻害によって回転が抑制される傾向にあるが、M g A D P 阻害が解消された変異型 V_1 - A T P a s e は、効率よい回転運動を示す。

30

【0019】

またさらに、この発明の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e は、A サブユニットおよび B サブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子であることを別の態様としている。そしてこの場合には、A サブユニットの N 端に結合した H i s タグを介して基板上に固定されていることを好ましい態様としている。

【0020】

この発明の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e はまた、D サブユニットにジョイント部材が結合していることを別の態様としている。そしてこの場合には、配列番号 5 における第 4 8 番目 G l u 残基を置換した C y s 残基、および第 5 5 番目 G l n 残基を置換した C y s 残基の少なくとも一方の C y s 残基にジョイント部材を結合していること、さらには A サブユニットおよび B サブユニットにおける全ての C y s 残基が非 C y s 残基に置換されていることをそれぞれ好ましい態様としている。

40

【0021】

すなわち、この発明の回転モーター分子 V_1 - A T P a s e は、細菌や真核生物のオルガネラ（液胞、リソソーム、ゴルジ体、細胞膜、被覆小胞、分泌顆粒等）に存在する V 型（液胞膜型）A T P a s e (V_0 V_1 - A T P a s e) の、 V_1 部分（A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個からなる複合体）である。従来、 F_0 F_1 -

50

A T P 合成酵素が回転モーター分子として機能することは知られていたが、この V_0V_1 -A T P a s e の V_1 部分 (V_1 -A T P a s e) が回転運動することは全く知られていなかった。この発明の V_1 -A T P a s e は、A サブユニット 3 個および B サブユニット 3 個によって構成される「筒状体」の内側に位置する D サブユニットが回転シャフトとして機能することを初めて見出して完成されたものである。

【0022】

なお、 V_0V_1 -A T P a s e の V_1 部分は D サブユニットに F サブユニット 1 個を結合しているが、この発明の V_1 -A T P a s e はこの F サブユニットを結合した分子をも包含する。また、この発明の V_1 -A T P a s e は野性型だけでなく、前記のとおり各種変異体をも包含する。さらに、前記の非特許文献 10 に開示されているような亜鉛認識部位の導入変異体をも包含する。

10

【0023】

以下、発明の実施形態を示し、前記各発明について詳しく説明するが、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995 等の記載を参考にすることができる。

20

【0024】

【発明の実施の形態】

この発明の回転モーター分子 V_1 -A T P a s e は、各種細菌や真核生物が産生する V_0V_1 -A T P a s e の V_1 部分 (V_1 -A T P a s e) であり、この V_1 -A T P a s e をコードするポリヌクレオチド (DNA 断片、RNA 断片。好ましくは cDNA 断片。以下「 V_1 -A T P a s e ポリヌクレオチド」と記載することがある) を用いて遺伝子工学的に製造することができる。すなわち V_0V_1 -A T P a s e をコードするポリヌクレオチド (cDNA 断片) の配列は公知のデータベース (例えば GenBank データベース : URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等) において多数公開されており、これらの配列情報を利用したプローブハイブリダイゼーション法や PCR 法によって既存の cDNA ライブラリー等から容易に取得することができる。

30

【0025】

そして、この V_1 -A T P a s e ポリヌクレオチドを公知の遺伝子工学的な方法で発現させることによって、A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個からなる複合体 V_1 -A T P a s e を取得することができる。例えば、例えば、RNA ポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに V_1 -A T P a s e ポリヌクレオチドを組換え、この組換えベクターをプロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、回転能を有する V_1 -A T P a s e をインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。また、 V_1 -A T P a s e ポリヌクレオチドを適当な宿主-ベクター系において発現させれば、回転モーター分子 V_1 -A T P a s e を大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞などで生産することができる。例えば、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターにポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、この形質転換体

40

50

を培養すれば、その培養物から目的の V_1 -ATPase 分子を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。さらに、ポリヌクレオチドを真核細胞で発現させる場合には、ポリヌクレオチドをプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製し、このベクターをトランスフェクトした真核細胞から目的の V_1 -ATPase 分子を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞HEK293、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現させた V_1 -ATPase を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

10

【0026】

またこのこの発明の回転モーター分子 V_1 -ATPase は、工業的な利用の観点から、耐熱性分子であることが好ましい。従って、65 以上で生育する *Thermus* 属、*Methanococcus* 属や *Sulfolobus* 属等の細菌由来の V_1 -ATPase ポリヌクレオチドを使用することが好ましい。さらに、70 以上でも生育することができる好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の V_1 -ATPase ポリヌクレオチドを使用することが特に好ましい。この *Thermus thermophilus* 由来の V_1 -ATPase ポリヌクレオチドは配列番号1に示した塩基配列を有している。この *Thermus thermophilus* 由来の V_1 -ATPase ポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド(Fサブユニット)、配列番号3のポリペプチド(Aサブユニット)、配列番号4のポリペプチド(Bサブユニット)および配列番号5のポリペプチド(Dサブユニットからなる複合体)をコードしている。従って、配列番号1の334-4196 nt配列を前記の遺伝子工学的方法により発現させることにより、Aサブユニット3個、Bサブユニット3個およびDサブユニット1個からなる耐熱性 V_1 -ATPase を得ることができる。また配列番号1の1-4196 nt配列を発現させることによって、DサブユニットにFサブユニット1個を結合した耐熱性 V_1 -ATPase を得ることができる。

20

30

【0027】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPase のさらに別の好ましい態様は、配列番号3における第232番目Ser残基のAla残基への置換、および第235番目Thr残基のSer残基への置換の少なくとも一方、さらに好ましくはこれらの置換の両方を有する改変型分子(以下、両方の置換を有する分子を「TSSA変異体」と記載することがある)である。すなわち、真核細胞の V -ATPase と異なり、*T. thermophilus* 等の細菌由来の V_1 -ATPase は触媒の代謝回転の間、いわゆるMgADP阻害によって反応が中断するという傾向を有しており(*J Biol Chem* 273, 20504-20510, 1998)、通常はATPを基質として加えてから5分以内このADP抑制を示し、約10分間でATP加水分解を停止する。そこでこの出願の発明者らは幾つかの変異体を作成してADP抑制の効果を検討した結果、前記のTSSA変異体が、ATPを基質として加えてから1時間もATP活性を持続させることを見出した。

40

【0028】

50

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPase のさらにまた別の好ましい態様は、AサブユニットまたはBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子である。すなわち、この固定によって、Dサブユニットの回転を効率よく伝達することが可能となる。このようなAおよび/またはBサブユニットの基板への結合は、例えば共有結合を用いた各種の方法によって行うことができるが、好ましくは、AサブユニットのN端にHisタグ(ヘクタヒスチジン)を結合させ、このHisタグをNi-NTAスライドに結合する方法(Nature 386:299-302, 1997; FEBS Letters 470:244-248, 2000)を採用することができる。

【0029】

この発明の回転モーター分子 V_1 -ATPase はまた、Dサブユニットにジョイント部材が結合していることを別の好ましい態様としている。この場合の「ジョイント部材」とは、 V_1 -ATPase におけるDサブユニットの回転運動を他の部材(例えば、ギアや運動機関のシャフト等)に伝達するための部材である。またこのジョイント部材は他の部材との連結用としてではなく、 V_1 -ATPase の回転を観察するための「プローブ」、あるいは「プロペラ」としても利用することができる。このようなジョイント部材としては、例えば後記実施例に例示したようなビーズを複数個連結したもの(マイクロスフェア)や、あるいはアクチンフィラメント(Nature 386:299-302, 1997)等の微細繊維を利用することができる。そして、このようなジョイント部材は、DサブユニットのCys残基に、例えばマレイミド、ジスルフィド結合等によって結合することができる。ただし、配列番号5にアミノ酸配列を示したThermophilus thermophilus由来 V_1 -ATPase のDサブユニットにはCys残基が存在しないため、適当な非Cys残基をCys残基に置換する必要がある。そこでこの発明は、配列番号5における第48番目Glu残基を置換したCys残基、および第55番目Gln残基を置換したCys残基の少なくとも一方(好ましくは両方)のCys残基にジョイント部材を結合していることを好ましい態様とする。また、Dサブユニット以外のCys残基(Aサブユニットの合計9個、Bサブユニットの合計3個)にジョイント部材が結合しないように、これらのCys残基を他の残基(例えばSer残基)に置換することが好ましい。

【0030】

また、ジョイント部材はDサブユニットではなく、Dサブユニットに結合したFサブユニットに結合させることもできる。その場合には、例えば配列番号2のアミノ酸における第28番目Serおよび/または第35番目Ser残基をCys残基に置換し、これらのCys残基にジョイント部材を結合させればよい。

【0031】

なお、前記の各変異体 V_1 -ATPase は、 V_1 -ATPase ポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸残基をコードするトリプレットを、ミューテーション・キット等を使用する方法、変異導入型のPCR法、ポリヌクレオチド合成法(例えば、Nucleic Acid Res. 25:3440-3444, 1997等)によって置換し、この変異型ポリヌクレオチドを遺伝子工学的的方法によって発現させることによって取得することができる。

【0032】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0033】

【実施例】

1. 材料と方法

1-1. タンパク質の調製

T. thermophilus HB8由来 V_1 -ATPase のA、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列をlacプロモーター支配下に保持しているプラスミッドpUCV1によって形質転換した大腸菌株BL21-CodonPlus-RP(S

10

20

30

40

50

tragine)を用いて V_1 -ATPaseを発現させた。なお、A、B、D、Fの各サブユニットをコードするDNA配列には以下の変異体作成のための改変を加えた(アミノ酸位置は配列番号2-5に対応する)。

I: V_1 -ATPase (A-His₈-tags / Cys / A-S232A / A-T235S / D-E48C / D-Q55C)

- (1) AサブユニットのN端にHisタグを結合(A-His₈-tags)
- (2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換(Cys)
- (3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換(A-S232A)
- (4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換(A-T235S)
- (5) Dサブユニットの第48番目GluがCysに置換(D-E48C)
- (6) Dサブユニットの第55番目GlnがCysに置換(D-Q55C)

10

II: V_1 -ATPase (A-His₈-tags / Cys / A-S232A / A-T235S / F-S28C / F-S35C)

- (1) AサブユニットのN端にHisタグを結合(A-His₈-tags)
- (2) AおよびBサブユニットの全てのCys残基がSer残基に置換(Cys)
- (3) Aサブユニットの第232番目SerがAlaに置換(A-S232A)
- (4) Aサブユニットの第235番目ThrがSerに置換(A-T235S)
- (7) Fサブユニットの第28番目SerがCysに置換(S28C)
- (8) Fサブユニットの第35番目SerがCysに置換(S35C)

形質転換細胞を、0.3M NaClを含む20mM imidazole / HCl (pH 8.0) に懸濁し、65℃で30分間熱処理をした後、熱に不安定なタンパク質を除き、 Ni^{2+} -affinity column (Amersham) に供して0.3M NaClを含む0.5M imidazole / HCl (pH 8.0) で溶出した。緩衝液をかえ、限外濾過(VIVA-Spin, VIVA science) し、RESOURCE Q column に供した。 V_1 -ATPaseを含む部分をSuperdex 200 column (Amersham) にかけて、コンタミネーションしているタンパク質を除去した。精製された V_1 -ATPaseを2モル過剰の6-[N'-[2-(N-maleimido)ethyl]-N-piperazinylamido]hexyl D-biotinamide (biotin-PEAC₅-malaimide, Dojindo) でビオチン化した。25℃で15分間インキュベーションした後、タンパク質をPD-10 Column (Amersham) に供し、未反応試薬を除いた。DおよびFサブユニットのビオチン化は、streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham) を用いて、ウエスタンブロッティングにより確認した(図2)。

30

1-2. 回転観察

5 μ lのフローセルを、2枚のカバースリップ(50nm厚のスペーサーを介在)から作成した。底のガラス表面は Ni^{2+} -nitrilotriacetic acidでコートし、ビオチン化した V_1 -ATPase(0.1-1 μ M)を緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, and 0.5% (w/v) BSA)からなるA溶液中でフローセルに注入し、Hisタグをガラスに結合させて V_1 -ATPaseを固定した。

40

【0034】

0.1% (w/v) のStreptavidinでコートしたビーズ(ϕ = 0.56 μ m, Bangs Laboratories inc.) 溶液をフローセルに満たし、未結合ビーズは洗浄除去して、biotin-streptavidine結合によってDまたはFサブユニットにビーズを結合した。

【0035】

V_1 -ATPase分子の回転は、所定濃度のATP中(0.2mg/ml creatine kinase と2.5mM creatine phosphate ATP再生システム中)で、ビーズの回転を明視野顕微鏡(IX70, Olympus、倍率1

50

000)を使用して観察した。また回転の状態はCCDカメラでビデオ記録した。なお、この V_1 -ATPaseの回転観察システムは、 F_1 -ATPaseの回転システム(Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13649-54, 2001)と同様である。すなわち、回転はDまたはFサブユニットに結合したビーズにより、斜めに結合された形で観察された(図2)。

1-3. その他のアッセイ

タンパク質濃度はUV測定によって行った。ATP加水分解活性は、pyruvate kinaseとlactate dehydrogenaseとをカップリングさせたNADH酸化により測定した。2. 結果

2-1. 回転の観察

V_1 -ATPase (A-His₈-tags / Cys / A-S232A / A-T235S / D-E48C / D-Q55C) および V_1 -ATPase (A-His₈-tags / Cys / A-S232A / A-T235S / F-S28C / F-S35C) の2つの変異体について回転を観察した。2つの変異体は、同じようなMichaelis-MentenタイプのKineticsを示し、 $K_m = 0.3 - 0.5$ mM, V_{max} (turnover rate) = ~ 10 sec⁻¹を示した。これらの数値は、野生型のF_oF₁-ATP合成酵素と同程度であった(J Biol Chem 273, 20504-1014, 1998)。

2-2. Dサブユニットの回転

ATPを含む緩衝液をフローセルに注入させる場合に、 V_1 -ATPaseのDサブユニットに結合したビーズの回転が観察された(図3A-3D)。一つのフローセルでは、5-10個の回転ビーズが観察された。

【0036】

回転は一方向であり、 F_1 -ATPaseの回転方向と同様に、細胞膜側からみると常に反時計回りであった。ATPを含まない緩衝液中では、ブラウン運動との区別のつく一方向の回転は観察されなかった。

【0037】

アジド(Azide)は F_1 -ATPaseのATPase活性も回転も阻害するが(Nature 386, 299-302, 1997)、 V_1 -ATPaseのATPase活性は阻害していないことが知られている(J Biol Chem 265, 21946-50, 1990)。変異体 V_1 -ATPaseの回転についても同様であり、アジド(Azide)は4mM ATP存在下(図3A、B)や0.1mM ATP存在下での V_1 -ATPaseの回転に影響を与えなかった。

【0038】

4mM ATP存在下での平均回転数は、約2.6 rps (revolutions per sec: 回転数/秒)以下であった。1mM ATP存在下での平均回転数は約2.4 rps以下であった。1回転に3分子のATPが使用されると仮定すれば、回転速度は、バルクの酵素反応速度論(~ 10 ATPsの加水分解/秒)から観察されるATP加水分解速度に良く一致している。また、0.5mM ATPでは平均回転数は約2.2 rpsと低下している(図3C)

2-3. Fサブユニットの回転

Fサブユニットに結合したビーズ回転も観察された。4mM ATP濃度の条件では、1~3個の回転ビーズが観察された(図4)。回転方向も常に反時計回りであった。回転速度は、約2.5 rpsであり、Dサブユニットの回転速度と同程度であった。

【0039】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、新規の回転モーター分子としての V_1 -ATPaseが提供される。また、この回転モーター分子 V_1 -ATPaseのさらに実用的形態としての各種変異体 V_1 -ATPaseが提供される。これらは、マイクロマシンやナノマシン等の作成に大きく寄与する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A Rotary Motor molecule V1-ATPase

10

<130> NP02447-YS

<140>

<141>

<160> 5

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4199

<212> DNA

<213> *Thermus thermophilus*

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<220>

<221> CDS

<222> (334)..(2067)

40

<220>

<221> CDS

<222> (2081)..(3514)

<220>

<221> CDS

<222> (3528)..(4196)

<400> 1

gtg agg atg gcg gtg atc gcc gat ccc gag acc gcc cag ggg ttc cgg 48
 Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15

ctc gcg ggc ctc gag ggc tac ggg gcc tct tcg gcg gag gag gcc caa 96
 Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln
 20 25 30

agc ctc ctg gaa acc ctc gtg gag cgg ggc ggc tac gcc ctg gtg gcc 144
 Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala
 35 40 45

gtg gac gag gcg ctc ctc ccc gac ccc gag cgg gcg gtg gag cgc ctc 192
 Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu
 50 55 60

atg cgg ggc agg gac ctc ccc gtg ctc ctg ccc atc gcg ggg ctg aag 240
 Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys
 65 70 75 80

gag gcc ttc cag ggg cac gac gtg gaa ggc tac atg cgg gag ctg gtg 288

10

20

30

40

Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val
 85 90 95

agg aag acc atc ggc ttt gac atc aag ctg tagaatggag ggacg atg atc 339
 Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu Met Ile
 100 105

caa ggg gtg atc cag aag atc gcg ggc ccg gcg gtg atc gcc aag ggc 387
 Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala Lys Gly
 110 115 120

atg ctc ggg gcc cgc atg tac gac atc tgc aag gtg ggc gaa gag ggc 435
 Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu Glu Gly
 125 130 135 140

ctc gtg ggc gag atc atc cgc ctg gac ggg gac acg gcc ttc gtc cag 483
 Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe Val Gln
 145 150 155

gtc tac gag gac acc tcg ggc cta aag gtg ggg gag ccc gtg gtc tcc 531
 Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val Val Ser
 160 165 170

acg ggg ctt ccc ttg gcg gtg gag ctc ggc ccc ggg atg ctg aac ggc 579
 Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu Asn Gly
 175 180 185

atc tac gac ggc atc cag cgc ccc ctg gag cgc atc cgg gag aag acg 627
 Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu Lys Thr

10

20

30

40

190	195	200		
ggg atc tac atc acc cgg ggc gtg gtg gtc cac gcc ctg gac cgg gag			675	
Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp Arg Glu				
205	210	215	220	
aag aag tgg gcc tgg acg ccc atg gtc aag ccc ggg gac gag gtg cgg			723	10
Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Arg				
	225	230	235	
ggg ggt atg gtc ctg ggc acg gtg ccc gag ttc ggc ttc acc cac aag			771	
Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr His Lys				
	240	245	250	
atc ctg gta ccc ccg gac gtg cgg ggc cgg gtc aag gag gtg aag ccc			819	
Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val Lys Pro				
	255	260	265	
gcc ggg gag tac acc gtg gag gag ccg gtg gtg gtc ctc gag gac ggc			867	
Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu Asp Gly				
	270	275	280	30
acc gag ctc aag atg tac cac acc tgg ccc gtt cgc cgg gcg agg ccc			915	
Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala Arg Pro				
285	290	295	300	
gtg caa agg aag ctt gac ccc aac acc ccc ttc ctc acg ggg atg cgc			963	
Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly Met Arg				40
	305	310	315	

atc ctg gac gtc ctc ttc ccc gtg gcc atg ggg ggc acc gcc gcc atc	1011	
Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala Ala Ile		
320 325 330		
cct ggg ccc ttc ggc agc ggc aag acc gtg acc cag cag tcc ctg gcc	1059	
Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser Leu Ala		10
335 340 345		
aag tgg tcc aac gcc gac gtg gtg gtc tac gtg ggc tgc ggg gag cgg	1107	
Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly Glu Arg		
350 355 360		
ggg aac gag atg acc gac gtg ctc gtg gag ttc ccc gag ctc acc gac	1155	20
Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu Thr Asp		
365 370 375 380		
ccc aag acg ggg ggg ccc ttg atg cac cgc acc gtc ctc atc gcc aac	1203	
Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile Ala Asn		
385 390 395		30
acc tcc aac atg ccc gtg gcc gcc cgc gag gcc agc atc tac gtg ggc	1251	
Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr Val Gly		
400 405 410		
gtg acc atc gcc gag tac ttc cgc gac cag ggc ttc tcc gtg gcc ctc	1299	
Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val Ala Leu		40
415 420 425		

atg gcc gac tcc acg agc cgc tgg gcc gag gct ttg cgc gag atc tct 1347
 Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu Ile Ser
 430 435 440

agc cgc ctc gag gag atg ccc gcc gag gag ggc tac cgc ccc tac ctc 1395
 Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro Tyr Leu
 445 450 455 460

10

gcc gcc agg ctc gcc gcc ttc tac gag cgg gcg ggc aag gtc atc acc 1443
 Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val Ile Thr
 465 470 475

ctg ggc ggc gag gag ggg gcg gtg acc atc gtg ggg gcc gtc tcc ccg 1491
 Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val Ser Pro
 480 485 490

20

ccg ggc ggc gac atg tcc gag ccc gtg acc cag tcc acc ttg agg atc 1539
 Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu Arg Ile
 495 500 505

gtg ggg gcc ttc tgg cgg ctt gac gcc tcc ctg gcc ttc cgc cgc cac 1587
 Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg Arg His
 510 515 520

30

ttc ccc gcc atc aac tgg aac ggc tcc tac agc ctc ttc acc tcc gcc 1635
 Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Ser Ala
 525 530 535 540

40

ctt gac ccc tgg tac cgg gag aac gtg gcc gag gac tac ccc gag ctc 1683

655	660	665		
ttt gag gag gcc atg aag gag atc cag ggg gcc ttc aag gcc ctg gcc	2067			
Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala Leu Ala				
670	675	680		
taaaggggga gag atg gac ctt ctg aag aag gag tac acg ggc atc acc	2116			10
Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr				
685	690	695		
tac atc tcg ggg cct ctt ctc ttc gtg gag aac gcc aag gac ctg gcc	2164			
Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala				
700	705	710		
tac ggg gcc atc gtg gac atc aag gac ggc acg ggc cgg gtc cgc ggc	2212			20
Tyr Gly Ala Ile Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly				
715	720	725		
ggc cag gtg att gag gtc tcc gag gag tac gcc gtc atc cag gtg ttt	2260			
Gly Gln Val Ile Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe				
730	735	740		30
gag gaa acc act ggg ctg gac ctg gcc acg acc agc gtg agc ctg gtg	2308			
Glu Glu Thr Thr Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val				
745	750	755	760	
gag gac gtg gcc cgg ctt ggg gtc tcc aag gag atg ctg ggc cgc cgc	2356			
Glu Asp Val Ala Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg				40
765	770	775		

ttc aac ggc atc ggc aag ccc ata gac ggc ctg ccg ccc atc acc ccg	2404	
Phe Asn Gly Ile Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro		
780 785 790		
gag aag cgg ctc ccc atc acc ggc ctt ccc tta aac ccc gtg gcc cgg	2452	
Glu Lys Arg Leu Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg		10
795 800 805		
agg aag ccg gag cag ttc atc cag acg ggc atc tcc acc att gac gtg	2500	
Arg Lys Pro Glu Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val		
810 815 820		
atg aac acc ctg gtc cgg ggg cag aag ctt ccc atc ttc tcc ggc tcg	2548	20
Met Asn Thr Leu Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser		
825 830 835 840		
ggg ctt ccc gcc aac gag atc gcc gcc cag atc gcc cgc cag gcc acg	2596	
Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr		30
845 850 855		
gtg cgc ccc gac ctc tcc ggg gag ggg gag aag gag gag ccc ttc gcc	2644	
Val Arg Pro Asp Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala		
860 865 870		
gtg gtc ttc gcc gcc atg ggg atc acg cag cgg gag ctc tcc tac ttc	2692	
Val Val Phe Ala Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe		40
875 880 885		

atc cag gag ttt gag cgc acc ggg gcc ctg agc cgc tcc gtc ctc ttc 2740
 Ile Gln Glu Phe Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe
 890 895 900

ctg aac aag gcg gac gac ccc acc att gag cgc atc ctc acc ccc cgc 2788
 Leu Asn Lys Ala Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg
 905 910 915 920

10

atg gcc ctc acc gtg gcc gag tac ctg gcc ttt gag cac gac tac cac 2836
 Met Ala Leu Thr Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His
 925 930 935

gtc ctc gtc atc ctc acg gac atg acc aac tac tgc gag gcc ttg cgg 2884
 Val Leu Val Ile Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg
 940 945 950

20

gag atc ggg gcc gcc cgc gag gag atc ccg ggc cgc cgc ggt tac ccc 2932
 Glu Ile Gly Ala Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro
 955 960 965

ggc tac atg tac acc gac ctg gcc acc atc tac gag cgc gcc ggg gtg 2980
 Gly Tyr Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val
 970 975 980

30

gtg gag ggg aag aag ggg agc gtg acc cag atc ccc atc ctc tcc atg 3028
 Val Glu Gly Lys Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met
 985 990 995 1000

40

ccc gac gac gac cgc acc cac ccc atc ccc gac ctc acg ggc tac atc 3076

Pro Asp Asp Asp Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile			
1005	1010	1015	
acc gag ggg cag atc cag ctc tcc cgg gag ctc cac cgc aag ggc atc			3124
Thr Glu Gly Gln Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile			
1020	1025	1030	
tac ccg ccc att gac ccc ttg ccc tcc ctc tcc cgg ctc atg aac aac			3172
Tyr Pro Pro Ile Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn			
1035	1040	1045	
ggc gtg ggc aag ggc aag acc cgg gag gac cac aag cag gtc tcc gac			3220
Gly Val Gly Lys Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp			
1050	1055	1060	20
cag ctc tac tcc gcc tac gcc aac ggg gtg gac atc cgg aag ctc gtg			3268
Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val			
1065	1070	1075	1080
gcc atc atc ggc gag gac gcc ctc acg gag aac gac cgc cgt tac ctc			3316
Ala Ile Ile Gly Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu			
1085	1090	1095	30
cag ttc gcc gac gcc ttt gaa cgg ttc ttc atc aac cag ggg cag cag			3364
Gln Phe Ala Asp Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln			
1100	1105	1110	
aac cgc tcc att gag gag agc ctg cag atc gcc tgg gcc ctc ctc tcc			3412
Asn Arg Ser Ile Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser			
1115	1120	1125	40

atg ctg ccc cag ggc gag ctc aag cgc atc tcc aag gac cac atc ggc 3460
 Met Leu Pro Gln Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly
 1130 1135 1140

aag tac tac ggc cag aag ctg gag gag atc tgg ggc gcg ccc cag gcc 3508
 Lys Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala
 1145 1150 1155 1160

10

ctg gac taagggaggg tag atg agc cag gtg agc ccc acc cgg atg aac 3557
 Leu Asp Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn
 1165 1170

ctt ctg cag agg cgg ggg cag ctc cgc ctg gcg cag aag ggg gtg gac 3605
 Leu Leu Gln Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp
 1175 1180 1185

20

ctc ctc aag aag aag cgg gac gcc ctg gtg gcc gag ttc ttc ggc ctg 3653
 Leu Leu Lys Lys Lys Arg Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu
 1190 1195 1200

gtg cgg gag gcc atg gag gcc agg aag gcc ctg gac cag gcg gcc aag 3701
 Val Arg Glu Ala Met Glu Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys
 1205 1210 1215 1220

30

gag gcc tac gcc gcc ctc ctc ctg gcc cag gcc ttt gac ggg ccg gag 3749
 Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu
 1225 1230 1235

40

gtg gtg gcg ggg gcg gcc ctt ggg gtc ccg ccc ctc gag ggg gtg gag 3797
 Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu
 1240 1245 1250

gcg gag gtg gag aac gtc tgg ggg agc aag gtg ccg agg ctc aag gcc 3845
 Ala Glu Val Glu Asn Val Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala
 1255 1260 1265

10

acc ttc ccc gac ggg gcc ctc ctt tcc ccg gtg ggg acc ccg gcc tac 3893
 Thr Phe Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr
 1270 1275 1280

acc ctc gag gcc agc cgg gcc ttc cgc cgc tac gcc gag gcc ctg atc 3941
 Thr Leu Glu Ala Ser Arg Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile
 1285 1290 1295 1300

20

cgg gtg gcc aac acc gag acc cgc ctg aag aag atc ggg gag gag atc 3989
 Arg Val Ala Asn Thr Glu Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile
 1305 1310 1315

aag aag acc acg cgg cgg gtg aac gcc ctg gag cag gtg gtg atc ccg 4037
 Lys Lys Thr Thr Arg Arg Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro
 1320 1325 1330

30

ggg atc cgc gcc cag atc cgc ttc atc cag cag gtc ctg gag cag cgg 4085
 Gly Ile Arg Ala Gln Ile Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg
 1335 1340 1345

40

gaa cgg gag gac acc ttc cgc ctc aag cgc atc aag ggc aag att gag 4133

	85	90	95	
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu				
	100	105		
<210> 3				
<211> 578				10
<212> PRT				
<213> <i>Thermus thermophilus</i>				
<400> 3				
Met Ile Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala				
1	5	10	15	
Lys Gly Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu				20
	20	25	30	
Glu Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe				
	35	40	45	
Val Gln Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val				
	50	55	60	
Val Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu				30
	65	70	75	
Asn Gly Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu				
	85	90	95	
Lys Thr Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp				
	100	105	110	
Arg Glu Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu				
	115	120	125	
Val Arg Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr				40
	130	135	140	

His Lys Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val	
145	150 155 160
Lys Pro Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu	
	165 170 175
Asp Gly Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala	
	180 185 190
Arg Pro Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly	10
	195 200 205
Met Arg Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala	
	210 215 220
Ala Ile Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser	
225	230 235 240
Leu Ala Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly	
	245 250 255
	20
Glu Arg Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu	
	260 265 270
Thr Asp Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile	
	275 280 285
Ala Asn Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr	
	290 295 300
Val Gly Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val	30
305	310 315 320
Ala Leu Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu	
	325 330 335
Ile Ser Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro	
	340 345 350
Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val	
	355 360 365
	40
Ile Thr Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val	

370	375	380		
Ser Pro Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu				
385	390	395	400	
Arg Ile Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg				
	405	410	415	
Arg His Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr				
	420	425	430	
Ser Ala Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro				
	435	440	445	
Glu Leu Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu				
	450	455	460	
Gln Glu Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu				
465	470	475	480	
Arg Leu Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln				
	485	490	495	
Gln Asn Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala				
	500	505	510	
Tyr Gly Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala				
	515	520	525	
Ala Ile Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val				
	530	535	540	
Leu Glu Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro				
545	550	555	560	
Ala Tyr Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala				
	565	570	575	
Leu Ala				

10

20

30

40

<211> 478

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 4

Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr Tyr Ile Ser Gly	
1 5 10 15	10
Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala Tyr Gly Ala Ile	
20 25 30	
Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly Gly Gln Val Ile	
35 40 45	
Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe Glu Glu Thr Thr	
50 55 60	
Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val Glu Asp Val Ala	20
65 70 75 80	
Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg Phe Asn Gly Ile	
85 90 95	
Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro Glu Lys Arg Leu	
100 105 110	
Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg Arg Lys Pro Glu	
115 120 125	30
Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val Met Asn Thr Leu	
130 135 140	
Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser Gly Leu Pro Ala	
145 150 155 160	
Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr Val Arg Pro Asp	
165 170 175	
Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala Val Val Phe Ala	40
180 185 190	

Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Ile Gln Glu Phe	
195	200 205
Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe Leu Asn Lys Ala	
210	215 220
Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg Met Ala Leu Thr	
225	230 235 240
Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His Val Leu Val Ile	
	245 250 255
Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ala	
	260 265 270
Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro Gly Tyr Met Tyr	
	275 280 285
Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val Val Glu Gly Lys	
	290 295 300
Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met Pro Asp Asp Asp	
305	310 315 320
Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Gln	
	325 330 335
Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Pro Ile	
	340 345 350
Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn Gly Val Gly Lys	
	355 360 365
Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp Gln Leu Tyr Ser	
	370 375 380
Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val Ala Ile Ile Gly	
385	390 395 400
Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu Gln Phe Ala Asp	
	405 410 415
Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln Asn Arg Ser Ile	

10

20

30

40

	420		425		430										
Glu	Glu	Ser	Leu	Gln	Ile	Ala	Trp	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Leu	Pro	Gln
	435		440		445										
Gly	Glu	Leu	Lys	Arg	Ile	Ser	Lys	Asp	His	Ile	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gly
	450		455		460										
Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Trp	Gly	Ala	Pro	Gln	Ala	Leu	Asp		
465			470		475										

10

<210> 5

<211> 223

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

20

<400> 5

Met	Ser	Gln	Val	Ser	Pro	Thr	Arg	Met	Asn	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg	Gly
1			5				10					15			
Gln	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	Lys	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Arg
		20					25					30			
Asp	Ala	Leu	Val	Ala	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Val	Arg	Glu	Ala	Met	Glu
		35				40					45				
Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Asp	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Leu
	50				55					60					
Leu	Leu	Ala	Gln	Ala	Phe	Asp	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Ala
	65			70					75					80	
Leu	Gly	Val	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Val
			85					90					95		
Trp	Gly	Ser	Lys	Val	Pro	Arg	Leu	Lys	Ala	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Ala
			100				105						110		

30

40

Leu	Leu	Ser	Pro	Val	Gly	Thr	Pro	Ala	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Arg	
	115						120					125				
Ala	Phe	Arg	Arg	Tyr	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Arg	Val	Ala	Asn	Thr	Glu	
	130					135					140					
Thr	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Thr	Arg	Arg	
145					150					155				160		
Val	Asn	Ala	Leu	Glu	Gln	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Ile	Arg	Ala	Gln	Ile	
				165					170					175		10
Arg	Phe	Ile	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Gln	Arg	Glu	Arg	Glu	Asp	Thr	Phe	
		180						185						190		
Arg	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	
		195						200						205		
Glu	Gly	Gly	Arg	Pro	Asn	Pro	Gln	Val	Glu	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu		
	210						215							220		20

【図面の簡単な説明】

【図1】 V_1 -ATPaseの回転観察の状態を示した模式図である。矢印は回転方向を示す。

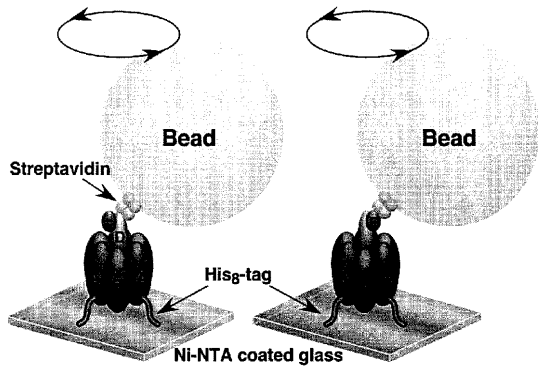
【図2】DまたはFサブユニットのビオチン化を確認したウェスタンブロット分析の結果である。左側(レーン1-4)はCBB染色、右側(レーン5-8)はalkaline phosphatase-streptavidineコンジュゲート染色である。レーン1および5はDサブユニットがビオチン化された V_1 -ATPase、レーン2および6はビオチン化されたFサブユニットを持つ V_1 -ATPase、レーン3および7はビオチン化されていない V_1 -ATPase、レーン4および8は分子量マーカである。

30

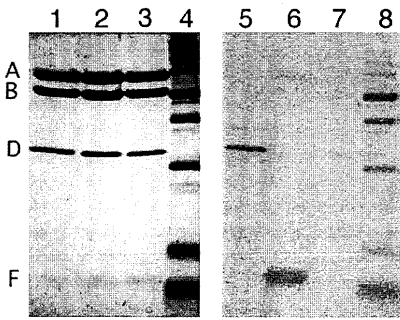
【図3】Dサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を測定した結果である。Aは4 mM ATP、0.5 mM sodium azide存在下でのビーズの回転である。B-Dはsodium azide非存在下で、Bは4 mM ATP、Cは0.5 mM ATP、Dは0.2 mM ATP溶液中でのビーズ回転の結果である。

【図4】Fサブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を、4 mM ATP溶液中で測定した結果である。

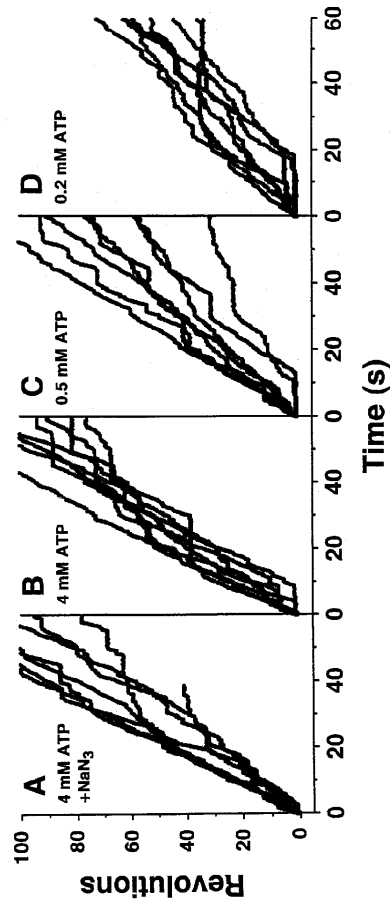
【 図 1 】



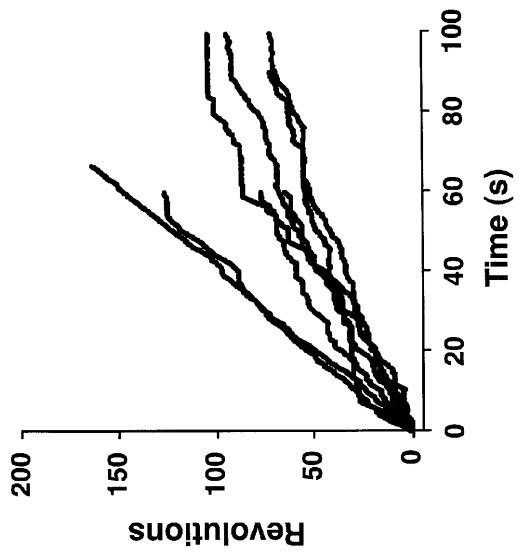
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA11 CA02 DA06 HA01 HA06
4B050 CC04 DD02 FF05 FF12 FF14 LL01