

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04366

研究課題名(和文) ナトリウムイオン輸送性V-ATPaseのエネルギー変換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of energy conversion mechanism of a Na⁺-transporting rotary ATPase

研究代表者

飯野 亮太 (IINO, RYOTA)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：70403003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸内球菌Enterococcus hirae由来V-ATPase (EhVoV1) は、生体膜を介してナトリウムイオンを能動輸送するポンプとして働く回転分子モーターである。親水性部のEhV1は、ATP加水分解反応の化学エネルギーを一方方向性の力学的回転運動に変換する。本研究では高速1分子計測により、EhV1の3つの触媒サイトに対応する120°毎の停止の間に存在する短い一過的な停止を初めて発見し、120°のステップは40°と80°のサブステップに分かれることを見出した。本研究で得られた様々な知見と先行研究のX線結晶構造解析の結果を合わせ、EhV1の化学力学共役スキームの完全なモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：Enterococcus hirae V-ATPase (EhVoV1) is a rotary molecular motor which functions as a sodium ion pump across the biological membrane. The hydrophilic portion EhV1 converts chemical energy of ATP hydrolysis into unidirectional mechanical rotation. To understand chemo-mechanical coupling mechanism of Enterococcus hirae V1 (EhV1), we conducted single-molecule rotation assay using 40-nm gold nanoparticle as a low-load probe. We found that 120° steps per ATP hydrolysis were further divided into 40° and 80° substeps. Based on the results obtained in this study and insight of the previous structural analysis by X-ray crystallography, we proposed a complete chemo-mechanical coupling scheme of EhV1.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

V-ATPase (V₀V₁) は ATP 加水分解のエネルギーを用いて主にプロトン (H⁺) を能動輸送し膜小胞の酸性化を行う分子機械である。膜小胞の酸性化だけでなく破骨細胞による骨吸収や癌細胞の浸潤でも重要な役割を担うことから、創薬のターゲットとしても注目されている重要な分子機械である。

V₀V₁ は F₀F₁-ATP 合成酵素 (F₀F₁) と同様に「回転触媒」を行う (Imamura PNAS 2003; Yokoyama JBC 2003)。ATP を加水分解して回転する V₁ の化学力学共役機構は F₁ と異なることが示されているが (Imamura PNAS 2005)、その詳細はいまだ明らかでない (Iino IUBMB Life 2014)。また、膜内在性の V₀ によるイオンの能動輸送の機構や、V₀V₁ 全複合体のエネルギー変換の機構はほとんど明らかになっていなかった。

腸内球菌 *Enterococcus hirae* 由来 V₀V₁ (図 1、EhV₀V₁) は、H⁺ではなくナトリウムイオン (Na⁺) を輸送するというユニークな性質を持ち、本菌の高塩濃度耐性の要因となる。我々は研究開始当初までに、単離した EhV₁ および EhV₀V₁ 全複合体の大腸菌での発現系の構築に成功し、ATP 加水分解駆動の回転運動の高速 1 分子計測に成功していた (Minagawa JBC 2013; Ueno JBC 2014)。

2. 研究の目的

我々が構築した大腸菌での発現系、および我々が開発してきた独自の 1 分子計測法を駆使し、Na⁺輸送性 EhV₀V₁ のエネルギー変換機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

金ナノ粒子を低負荷可視化プローブとした回転運動の高速イメージングによる 1 分子計測を行った。また、蛍光性 ATP (ADP) の結合 (解離) と金ナノ粒子の回転運動の 1 分子同時計測も行った。さらに、3 つの触媒サイトの 1 つだけに変異が入ったハイブリッド EhV₁ の 1 分子計測も行った。

4. 研究成果

ハイブリッド EhV₁ の 1 分子計測

固定子 A₃B₃ リングへの高濃度 ATP 添加とインキュベーション、回転子 DF 添加、および HPLC での ATP 除去による EhV₁ 再構成を利用し、3 つの触媒サイトの 1 つだけに変異が入ったハイブリッド EhV₁ の調製法を確立した。このハイブリッド EhV₁ を用いて高速 1 分子回転観察を行った。その結果、ロング、ミドル、ショートの長さの異なる停止を示す非対称な回転運動が観察された。停止の順番は反時計回りに常にロング→ショート→ミドルの順番であった。また、ATP 濃度の増加に伴いロングの停止のみが短くなった。この結果から、ロングが変異触媒サイトへの ATP 結合に対応することが明らかとなった。さらに、ミドルは変異触媒サイトへの ATP

結合以外の反応素過程に対応すると考えられた。これらの結果から、3 つの触媒サイトの 1 つに ATP が結合してから 240 度回転した後に他の素過程 (ATP 加水分解または生成物の解離) が起こることが示唆された。

蛍光 ATP (ADP) の結合 (解離) と回転の 1 分子同時計測

新規に構築した光学系を用い、蛍光性の Cy3-ATP (ADP) の結合 (解離) と回転運動を同時に 1 分子計測した。この結果、Cy3-ATP として結合した基質は Cy3-ADP に分解された後、240 度→360 度の回転ステップ時に解離することが明らかとなった。240 度→360 度へのステップと Cy3-ADP の解離のタイミングを詳細に解析した結果、このステップは Cy3-ADP の解離よりも先に起こることが明らかとなった。この結果から、EhV₁ の 1 つの触媒サイトへの ATP 結合と別の触媒サイトからの ADP 解離のタイミングがずれていることが示された。

EhV₁ のサブステップ (サブポーズ) の発見

以前に用いていた EhV₁ 試料には、精製用に回転子 F サブユニットに追加したアミノ酸残基や、ビオチン化のために回転子 D サブユニットに追加したアミノ酸残基が含まれていた。これらの試料の 1 分子計測では、回転子 DF の重心位置が大きく揺らぐアンクリア回転が観察されていた (Minagawa JBC 2013)。上記の余分なアミノ酸配列を除去した試料調製法を確立した結果、アンクリア回転は見られなくなり回転の挙動が安定した。次に、新たな試料で高速 1 分子計測を行った結果、X 線結晶構造解析から予想されていた 120 度毎の回転ステップに加え、一過的な短い停止 (サブポーズ) が存在することが明らかとなった (図 1)。全く予想していなかった新たな発見であり、これまでに考えていた EhV₁ の化学力学共役スキームの大幅な改訂が必要となった。

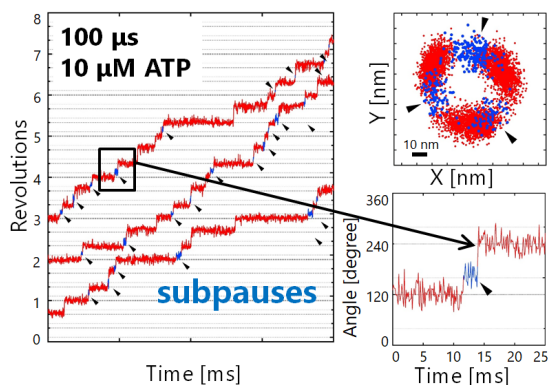


図 1. EhV₁ の回転運動におけるサブポーズ

EhV₁ の化学力学共役スキームの解明

上記で記したように、3 つの触媒サイトに対応する 120°毎の停止 (メインポーズ) の間に存在する短い停止 (サブポーズ) を初めて発見し、120°のステップは 40°と 80°のサブステップに分かれることを見出した。メイン

ポーズの停止時間の分布から、ATP 低濃度 (ATP 結合が律速となる条件) で 1 つの ATP 濃度依存的な時定数 (結合速度定数 $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) が得られたため、ATP はメインポーズの間に結合することが示された。また、ATP 高濃度のメインポーズで 2 つ (時定数 0.5ms および 0.7 ms)、サブポーズで 1 つの ATP 濃度非依存的な時定数 (2.5 ms) が得られた。これら 3 つの ATP 濃度非依存的な時定数は、ATP 解裂、ADP 解離、リン酸解離に対応すると考えられた。ATP_γS や ADP を用いた詳細な 1 分子解析より、ATP 解裂がメインポーズで、ADP 解離がサブポーズで起こることを示した。また、ATP 加水分解反応の残りの素過程であるリン酸解離は、残り 1 つのメインポーズの時定数に対応すると結論した。本研究で得られた上記の知見と先行研究の X 線結晶構造解析の結果を合わせ、EhV₁ の化学力学共役スキームの完全なモデルを提案した (図 2)。

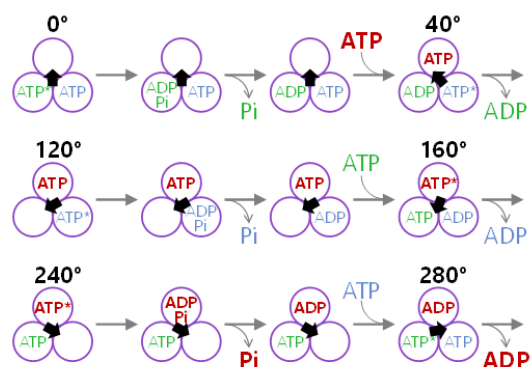


図 2. EhV₁ の化学力学共役機構のモデル

アルギニンフィンガー変異体 EhV₁ の 1 分子計測

触媒サイトに存在するアルギニン残基 (アルギニンフィンガー) は、ATP 加水分解反応の遷移状態を安定化し、リン酸結合の開裂を加速すると言われている。このアルギニンフィンガーに変異を導入し高速 1 分子計測を行った。その結果、ATP 高濃度では、一気に 240 度回転する、という特異な挙動が頻繁に観察された。加水分解が遅くなった結果、触媒サイト間の協調性が崩れ、化学反応の順番が守られていない、オルタナティブパスウェイが起きていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. #Uchihashi T, #*Watanabe YH, Nakazaki Y, Yamasaki T, Watanabe T, Maruno T, Ishii K, Uchiyama S, Song C, Murata K, *Iino R, *Ando T (#Equal

contribution), Dynamic structural states of clpB involved in its disaggregation function, *Nature Communications* 2018 印刷中 (査読有)

2. Nakamura A, Tasaki T, Okuni Y, Song C, Murata K, Kozai T, Hara M, Sugimoto H, Suzuki Kazushi, Watanabe T, Uchihashi T, Noji H, *Iino R, Rate constants, processivity, and productive binding ratio of chitinase A revealed by single-molecule analysis, *PCCP* 2018 20: 3010-3018. DOI: 10.1039/C7CP04606E (査読有)
3. *Iino R, Sakakihara S, Matsumoto Y, Nishino K, Large scale femtoliter droplet array for single cell efflux assay of bacteria, *Methods in Molecular Biology* 2018 1700: 331-341. doi: 10.1007/978-1-4939-7454-2_18 (査読無)
4. *Iino R, Iida T, Nakamura A, Saita E, *You H, *Sako Y, Single-molecule imaging and manipulation of biomolecular machines and systems, *BBA General Subjects* 2018 1862: 241-252. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.008 (査読有)
5. *飯野亮太. 基礎講座: 光学系構築・実践編 全反射蛍光顕微鏡による 1 分子イメージング. 応用物理 2018 印刷中 (査読有)
6. *飯野亮太. 基礎講座: 光学系構築・実践編 全反射蛍光顕微鏡を作ってみよう. 応用物理 2018 印刷中 (査読有)
7. *飯野亮太, 安藤潤, 中村彰彦, 金ナノプローブでタンパク質分子モーターのダイナミックな動きを観る. *JSMI Report* 2017 11: 11-16 (査読有)
8. *飯野亮太. 分子モーターの 1 分子イメージング. 生体の科学 2017 68: 388-389 (査読無)
9. #Baba M, #Iwamoto K, Iino R, Ueno H, Hara M, Nakanishia A, Kishikawa J, *Noji H, *Yokoyama K (#Equal contribution), Rotation of artificial rotor axles in rotary molecular motors, *PNAS* 2016 113: 11214-11219. DOI: 10.1073/pnas.1605640113 (査読有)
10. Nakamura A, Tasaki T, Ishiwata D, Yamamoto M, Okuni Y, Visootsat A, Maximilien M, Noji H, Uchiyama T, Samejima M, Igarashi K, *Iino R, Single-molecule imaging analysis of binding, processive movement, and dissociation of cellobiohydrolase *Trichoderma reesei* Cel6A and its domains on crystalline cellulose, *J. Biol. Chem.* 2016 291: 22404-22413. DOI: 10.1074/jbc.M116.752048 (査読有)

11. #Isojima H, #Iino R, Niitani Y, Noji H, *Tomishige M (#Equal contribution), Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1, *Nat Chem Biol* 2016 12: 290-297. DOI: 10.1038/nchembio.2028 (査読有)
12. *Matsumoto Y, Sakakihara S, Grushnikov A, Kikuchi K, Noji H, Yamaguchi A, Iino R, Yagi Y, Nishino K, A microfluidic channel method for rapid drug-susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS ONE* 2016. 11(2): e0148797. DOI: 10.1371/journal.pone.0148797 (査読有)
13. *Iino R, Sakakihara S, Matsumoto Y, Nishino K, Single-cell detection and collection of persister bacteria in a directly accessible femtoliter droplet array, *Methods in Molecular Biology* 2016;1333:101-9. DOI: 10.1007/978-1-4939-2854-5_9. (査読無)
14. Obayashi Y, Iino R, *Noji H, A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate, *Analyst* 2015. 140: 5065-73. DOI: 10.1039/c5an00714c (査読有)
15. Enoki S, Iino R, Niitani Y, Minagawa Y, Tomishige M, *Noji H, High-speed angle-resolved imaging of single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision, *Anal. Chem.* 2015 87: 2079-2086. DOI: 10.1021/ac502408c (査読有)
16. Yukawa A, Iino R, Watanabe R, Hayashi S, *Noji H, Key chemical factors of arginine finger catalysis of F1-ATPase clarified by an unnatural amino acid mutation, *Biochemistry*. 2015 54: 472-480. DOI: 10.1021/bi501138b (査読有)
17. *Iino R, Ueno H, Minagawa Y, Suzuki K, *Murata T, Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. 31: 49-56. DOI: 10.1016/j.sbi.2015.02.013 (査読有)
- 子討論会 2018年9月12-14日. 札幌(北海道大)
3. *飯野亮太, プラズモニックナノプローブを用いた生体分子の時分割1分子イメージング. 物理学会秋季大会 2018年9月10-11日. 京田辺(同志社大)
4. *Ryota Iino, Single-molecule analysis of protein molecular engines, The 79th Okazaki Conference: Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines August 31 - September 2, 2018, Okazaki Conference Center, Okazaki
5. *飯野亮太, Molecular machines: From motion to function and energy conversion. AMO 討論会. 2018年6月15-16日. 仙台(東北大学)
6. *Ryota Iino, Processive chitinase is a Brownian monorail operated by fast catalysis after peeling a rail from chitin crystal, Workshop on "Molecules, Materials, Devices and Systems", May 28-30, 2018, Columbia University, NY, USA
7. Ryota Iino, High-speed single-molecule imaging analysis of protein molecular motors with plasmonic nanoprobe, Seminar in IBS Center for Molecular Spectroscopy and Dynamics, April 23, 2018, Korea University, Seoul, Korea
8. *飯野亮太, タンパク質分子モーターの作動原理と設計原理の理解に向けて. 第4回生体分子科学シンポジウム. 2018年2月9日. 京都(京都大学)
9. *Ryota Iino, High-speed single-molecule imaging analysis of protein molecular motors probed by gold nanoparticles and nanorods, DAC seminar on dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems, November 24, 2017, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan
10. *Ryota Iino, Chitinase A is 1-nm stepping Brownian motor decomposing crystalline polysaccharide NANOTEC-IMS Joint Research Meeting, October 30, 2017, Pathum Thani, Thailand
11. *飯野亮太, 高速1分子イメージング解析で明らかとなったタンパク質分子モーターの化学力学共役機構 高分子討論会シンポジウム「柔らかな」生体および合成高分子系の解明と構築」2017年9月22日. 松山(愛媛大学)
12. *Ryota Iino, Chemo-mechanical coupling mechanisms of linear and rotary molecular motors revealed by high-speed single-molecule imaging analysis 第55回生物物理学会年会シンポジウム

[学会発表] (計 38 件)

1. *Ryota Iino, Single-molecular videography of protein molecular motors, Telluride Workshop on "Molecular Videography", September 18-21, 2018, Telluride, CO, USA
2. *飯野亮太, バイオマスを効率的に分解する生体分子モーターの作動原理. 高分

- 「Softness and functions of biological molecules under various environments」 2017年9月19-21日. 熊本(熊本大学)
13. *Ryota Iino and Akihiko Nakamura, Stepping motion and chemo-mechanical coupling of chitinase resolved by single-molecule analysis IUPAB 2017 "Molecular machinery" July 16-20, 2017, Edinburgh, UK
 14. *Ryota Iino, High-speed single-molecule measurement of molecular motors with metallic nanoprobe KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems" June 26-28, 2017. Sapporo, Japan
 15. *飯野亮太, 機動分子科学: 生体分子、人工分子を超えて, 第17回蛋白質科学会年会ワークショップ「機動分子科学」 2017年6月20-22日. 仙台(仙台国際センター)
 16. *飯野亮太, 金ナノプローブで生体分子モーターのダイナミックな動きを観る, 分子イメージング学会学術集会シンポジウム「生命の神秘に迫る分子イメージング」 2017年5月25-26日. 横浜(横浜港大さん橋ホール)
 17. *Ryota Iino, Chemo-mechanical coupling mechanisms of linear and rotary molecular motors revealed by high-speed single-molecule imaging analysis, Frontier Bioorganization Forum 2017: Dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems. April 24-26, 2017. Taipei, Taiwan
 18. *飯野亮太, 金ナノプローブでタンパク質1分子の動きはどこまで見えるか, 研究会「分子観察による生命の階層横断的な理解」 2017年3月21-22日. 岡崎(分子科学研究所)
 19. *Ryota Iino, Single-molecule dynamics of natural and engineered molecular motors, The 5th International Symposium on "Dynamical Ordering & Integrated Functions. January 21-22, 2017. Komaba, Japan
 20. *Ryota Iino, Watching dynamic motions of biological molecular machines, 7th RIES-Hokudai International Symposium. December 12-13, 2016. Sapporo, Japan
 21. *飯野亮太, 金ナノプローブを用いた生体分子モーターの高速・高精度1分子計測, 生理研研究会「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」～限界を超えるための顕微鏡技術～ 2016年11月17日. 岡崎(岡崎コンファレンスセンター)
 22. *飯野亮太, マイクロ・ナノデバイスを用いた1分子・1細胞ナノバイオ計測, MNC2016 技術セミナー「マイクロ・ナノバイオ技術の最前線」. 2016年11月8日. 京都(ANAクラウンプラザホテル京都)
 23. *Ryota Iino, Intermediate states during the stepping motion of kinesin-1 revealed by high-speed single-molecule imaging with gold nanoprobe, 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop. October 4, 2016. Kanazawa, Japan
 24. *飯野亮太, 金ナノプローブで生体分子の速いダイナミクスを観る, 第25回バイオイメーシング学会学術集会シンポジウム「ナノバイオイメーシング: 1分子から細胞までの先端手法」. 2016年9月6日. 名古屋(名古屋市立大)
 25. *飯野亮太, タンパク質分子機械を観る、操る、壊す、創る, 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会第28回サマースクール. 2016年7月16日. 蒲郡(西浦温泉ホテルたつき)
 26. *飯野亮太, Our approaches toward "real" engineering of protein molecular machines, 分子研研究会「超機能分子の創成: 合成、計測、数理が織りなす社会実装分子の戦略的設計と開発」. 2016年6月27日. 岡崎(岡崎コンファレンスセンター)
 27. *Ryota Iino, Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1, Biophysical Society Thematic Meeting: Engineering Approaches to Biomolecular Motors: From in vitro to in vivo. June 15, 2016. Vancouver, Canada
 28. *Ryota Iino, Biomass decomposition by cellulase observed at the single-molecule level, The symposium at Faculty of Science, Kasetsart University. June 3, 2016. Bangkok, Thailand
 29. *飯野亮太, 機動分子科学: 趣旨説明, 日本化学会第96春季年会特別企画シンポジウム「機能を動きで実現する機動分子の科学」. 2016年3月27日. 田辺(同志社大学)
 30. *飯野亮太, 金ナノプローブでタンパク質分子モーターのダイナミクスを観る, 新学術領域研究「柔らかな分子系」第15回ワークショップ『ダイナミクス観測からタンパク質の「柔らかさ」を観る』 2016年3月1日. 大阪(池田市 不死王閣)

31. *Ryota Iino, Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1, 8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation. February 15, 2016. Okazaki, Japan
32. *Ryota Iino, Single-molecule analysis of new molecular motors hydrolyzing crystalline polysaccharides, PACCON2016. February 10, 2016. Bangkok, Thailand
33. *Ryota Iino, Dynamics of linear and rotary molecular motors revealed by gold nanopores, Pacificchem 2015. Technical Symposia. Physical, Theoretical & Computational: Interplay between Chemistry and Dynamics in Biomolecular Machines. December 16, 2015. Honolulu, Hawaii
34. *Ryota Iino, Single-molecule analysis of energy conversion mechanism of molecular motor, IMS Workshop "Grand Design of Molecular Systems: Dynamic, Correlation and Harmony". October 8th, 2015. OCC, Okazaki, Aichi
35. *Ryota Iino, Single-molecule high-speed imaging analysis of ATP-driven molecular motors, 第53回生物物理学会年会シンポジウム「Formation of spatiotemporal dynamic ordering mediated by ATP hydrolysis」2015年9月14日. 金沢(金沢大学)
36. *Ryota Iino, High speed single-molecule measurement of conformational dynamics of molecular motors probed by gold nanorod, KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems". July 10, 2015. Miraikan, Obaiba, Tokyo
37. *Ryota Iino, Dynamic motions of individual molecular motors, IMS Asian International Symposium "Supramolecular Dynamics at the interface of Chemistry and Biology", June 12, 2015. IMS, Okazaki, Aichi
38. *飯野亮太, 回転型 ATPase によるイオンの輸送を考える, 分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」. 2015年4月21日. 岡崎(岡崎コンファレンスセンター)

[図書] (計1件)

1. *飯野亮太, 生体分子機械の作動原理, 自己組織化マテリアルのフロンティア

2015 67-74 (査読無、分担執筆)、フロンティア出版

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 亮太 (IINO, Ryota)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・教授

研究者番号 : 70403003

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :

(4) 研究協力者

飯田 龍也 (IIDA, Tatsuya)

村田 武士 (MURATA, Takeshi)

上野 博史 (UENO, Hiroshi)