

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14706

研究課題名(和文) 基質濃度の可視化と制御によるV-ATPaseの回転イオン輸送機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of rotary ion transport mechanism of V-ATPase by visualization and control of substrate

研究代表者

上野 博史 (Ueno, Hiroshi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：10546592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナトリウム(Na<sup>+</sup>)を輸送基質とするEnterococcus hirae (E. hirae)のV-ATPase (VoV1)の大腸菌内発現系・精製系の最適化を行い、高活性なE. hirae VoV1を安定的に調製できる発現系・精製系の構築に成功した。このサンプルを用いたクライオ電子顕微鏡解析によりE. hirae VoV1全体の構造解析にも成功している。さらにこのVoV1を用いて、ATP駆動の回転の高時間分解能での検出にも成功した。E. hiraeのVoV1は外部のナトリウム濃度の低下に伴い回転速度が低下し、Voでのナトリウム結合を反映した多点の回転ステップを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

V-ATPaseはATP加水分解のエネルギーを用いてイオン(プロトンやナトリウム)を輸送する分子機械である。このV-ATPaseは膜小胞の酸性化や破骨細胞による骨吸収や癌細胞の転移にも関わることから創薬のターゲットとしても注目されている。そのためこの分子の回転イオン輸送を理解することは医学的にも重要であり、今回の研究がきっかけで明らかになったこのV-ATPaseの全体構造はこの分子をターゲットとした創薬につながると期待される。さらに今回明らかになったナトリウムイオンの結合を反映した回転挙動の検出は、回転によってイオン輸送を行う分子機械の理解につながり学術的にも重要な結果だと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we optimized the expression and purification system of Enterococcus hirae V-ATPase (E. hirae VoV1) using sodium ion as a transport substrate to obtain the highly active E. hirae VoV1. We succeeded in constructing an expression system / purification system that can stably obtain highly active E. hirae VoV1 and also succeeded in conducting the structural analysis of whole E. hirae VoV1 by electron microscopy using this sample. Furthermore, we detected ATP-driven rotation of E. hirae VoV1 with high time resolution (up to microsecond). E. hirae VoV1 rotated slowly when the external sodium concentration was decreased and showed multiple rotation steps reflecting sodium binding at Vo portion.

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 ATPase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とする V-ATPase ( $V_0V_1$ )は  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ )と同様に回転分子モーターとして知られ、ATP 駆動の回転を介してイオンを輸送する。この  $V_0V_1$  は、*Thermus thermophilus* 由来のプロトン ( $H^+$ ) 型の  $V_0V_1$  では回転が 1 分子計測されており、 $V_0$  の構造に起因する小さな回転ステップが報告されている (Furuike et al. Nat Commun 2011)。この角度は、 $H^+$  を結合する  $V_0$  の c サブユニットの数 (この論文の種では 12 個) に近いものであり ( $360^\circ/c12=30^\circ$ )、 $V_0$  での  $H^+$  輸送に関わる回転ステップだと考えられている。大腸菌の  $F_0F_1$  でも同様に、ATP 駆動の回転の 1 分子計測から  $F_0$  の c サブユニットの数 (大腸菌は 10 個) を反映した角度 ( $360^\circ/c10=36^\circ$ ) の回転ステップが報告されている (Ishmukhametov et al. EMBO J. 2010)。しかしながら、現状では  $V_0$  ( $F_0$ ) の構造に起因するステップらしきものが観察されているだけで、 $H^+$  濃度と相関のあるステップは観察されておらず、イオンの結合・解離や輸送と共役した  $V_0$  ( $F_0$ ) のステップは未だ直接実証されていなかった。

我々はこれまでに独自の全反射型レーザー暗視野顕微鏡を開発し (Ueno et al. Biophys. J. 2010)、金微粒子を回転プローブに用いた高時間分解能・高位置決定精度での 1 分子計測により回転分子モーターの回転機構の研究を行ってきた。最近ではこの顕微鏡を用いて平面支持膜内での  $F_0F_1$  の合成方向の回転を直接観察することにも成功している (Watanabe et al. Nat. Commun. 2013)。また最近、*Enterococcus hirae* (*E. hirae*) の  $V_1$  および  $V_0V_1$  全体の 1 分子回転計測にも成功していた (Minagawa & Ueno et al. JBC 2013, Ueno & Minagawa et al. JBC 2014)。

### 2. 研究の目的

我々がこれまで構築し、また本研究で構築する独自の 1 分子計測法および *E. hirae*  $V_0V_1$  を用いてこの回転分子モーターの回転イオン輸送機構を明らかにすることを目的とした。他のプロトン型の V-ATase や F-ATPase と異なり、*E. hirae*  $V_0V_1$  はナトリウム ( $Na^+$ ) を輸送基質としているため、異なる  $Na^+$  濃度での回転の挙動を詳しく調べれば  $V_0$  での基質結合解離や輸送と共役した回転ステップが検出できると考えた。

### 3. 研究の方法

まずサンプルに用いる *E. hirae*  $V_0V_1$  の大腸菌内発現系・精製系の最適化を行い、高活性な *E. hirae*  $V_0V_1$  を安定的に調製できる発現系・精製系を構築した。そのサンプルを用いたゼルニケ位相差クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った。さらに金微粒子を回転プローブに用いた高時間分解能・高位置決定精度での 1 分子計測を行い輸送基質  $Na^+$  依存的な回転の挙動を可視化した。

### 4. 研究成果

#### $E. hirae$ $V_0V_1$ の全体構造の解明

*E. hirae*  $V_0V_1$  を安定に再現性良く調製するために、大腸菌内発現系・精製系の最適化を行った。その結果、高活性な *E. hirae*  $V_0V_1$  を安定的に調製できる発現系・精製系の構築に成功した。このサンプルとゼルニケ位相差クライオ電子顕微鏡を用いて、*E. hirae*  $V_0V_1$  の単粒子像を得ることに成功した。さらに単粒子解析により立体構造を再構成し、*E. hirae*  $V_0V_1$  の全体構造を得ることに成功している (Tsunoda et al., Sci. Rep. 2018)。 $Na^+$  を輸送する V-ATPase のイオンポンプ ( $V_0$ ) 部分の構造が明らかになったのは、世界で初めてのことである。またこの *E. hirae*  $V_0V_1$  の中心に存在する回転子は軸から外れて  $V_0$  の回転子と結合していることが明らかになった (図 1)。

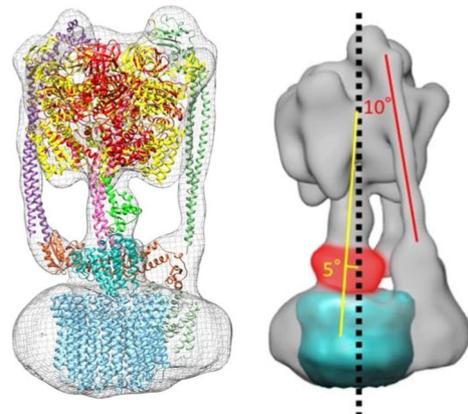


図 1. *E. hirae*  $V_0V_1$  の 3 次元構造

#### $Na^+$ 濃度依存的な *E. hirae* $V_0V_1$ の回転速度

*E. hirae*  $V_0V_1$  は  $Na^+$  濃度依存的に ATPase 活性が変化することが我々の研究から明らかになっている (Ueno et al., JBC 2014)。そこで我々は同様の  $Na^+$  濃度条件で金微粒子を回転プローブに用いた高時間分解能・高位置決定精度での *E. hirae*  $V_0V_1$  の 1 分子回転計測を行い、回転速度の  $Na^+$  濃度依存性を調べた。その結果、*E. hirae*  $V_0V_1$  は ATP 飽和濃度条件においても、 $Na^+$  濃度依存的に回転速度が変化することが分かった。しかも、その回転速度の変化は ATPase と同様に二相性を示した (図 2)。高親和性の  $Na^+$  結合 (数十  $\mu M$ ) に由来すると考えられる回転速度の上昇は、 $Na^+$  結合サブユニットである  $V_0$ -c サブユニットの  $Na^+$  解離定数 (15  $\mu M$ ) の領域で観察されたことから、この領域での回転速度の上昇は  $V_0$ -c サブユニットへの  $Na^+$  結合によって引き起こされていると考えられた。一方、数十 mM の高濃度領域での回転速度の上昇については、 $V_0$  内の低親和性の  $Na^+$  結合部位が関係していると興味深い、そのような報告例は無く原因は不明である。

### Na<sup>+</sup>濃度依存的な E. hirae V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> の回転ステップ

上述の通り、高親和性の Na<sup>+</sup>結合領域(数十 μM)での回転速度の上昇は V<sub>0</sub>-c サブユニットへの Na<sup>+</sup>結合によって引き起こされていると考えられたため、それよりも低濃度の Na<sup>+</sup>濃度では、V<sub>0</sub>での Na<sup>+</sup>結合が回転の律速反応になっていることが考えられた。そこでこの条件で回転を観察したところ V<sub>0</sub>由来の回転とみられる小さな回転ステップが観察された。この回転ステップは V<sub>1</sub>のみでは観察されず、E. hirae V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> の V<sub>0</sub> 部位の構造から予想される回転ステップサイズ (360°/c10=36°) と近い値であることから、観察されたステップ回転は V<sub>0</sub>でのナトリウム結合を反映したものであると考えられた。しかしながら、停止時間に比べて停止状態の角度揺らぎが大きいと解析が困難であり、最終的に定量的な解析までには至らなかった。

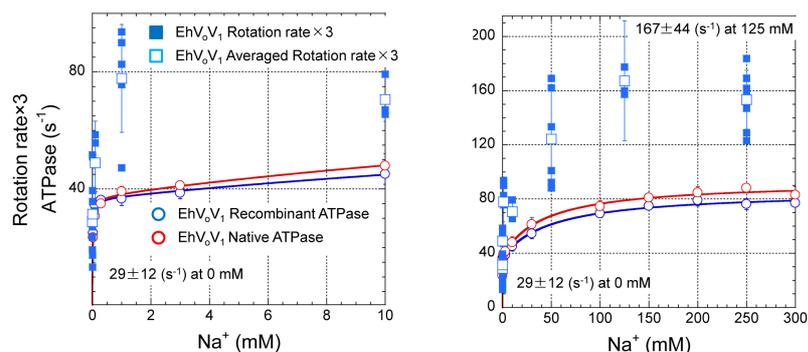


図 2. E. hirae V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> の回転速度の Na<sup>+</sup>濃度依存性

### 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 6 件)

1. Tsunoda J, Song C, Imai FL, Takagi J, Ueno H, Murata T, Iino R, \*Murata K, Off-axis rotor in *Enterococcus hirae* V-ATPase visualized by Zernike phase plate single-particle cryo-electron microscopy, *Sci. Rep.*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-33977-9 (2018) ( 査読有 )
2. \*Ueno H, Suzuki K, Murata T, Structure and dynamics of rotary V<sub>1</sub> motor, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 1789-1802, doi: 10.1007/s00018-018-2758-3 (2018) ( 査読有 )
3. \*Noji H, Ueno H, McMillan DGG, Catalytic robustness and torque generation of the F<sub>1</sub>-ATPase, *Biophys. Rev.*, 9, 103-118, doi: 10.1007/s12551-017-0262-x (2017) ( 査読有 )
4. Li J, He G, Ueno H, Jia C, \*Noji H, \*Qi C, \*Guo X, Direct real-time detection of single proteins using silicon nanowire-based electrical circuits, *Nanoscale*, 8, 16172-16176, doi: 10.1039/c6nr04103e (2016) ( 査読有 )
5. Baba M, Iwamoto K, Iino R, Ueno H, Hara M, Nakanishi A, Kishikawa JI, \*Noji H, \*Yokoyama K, Rotation of artificial rotor axles in rotary molecular motors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113, 11214-11219, doi: 10.1073/pnas.1605640113 (2016) ( 査読有 )
6. \*McMillan DG, Watanabe R, Ueno H, Cook GM, \*Noji H, Biophysical Characterization of a Thermoalkaliphilic Molecular Motor with a High Stepping-Torque Gives Insight into Evolutionary ATP Synthase Adaptation, *J. Biol. Chem.*, 291, 23965-23977, doi: 10.1074/jbc.M116.743633 (2016) ( 査読有 )

{ 学会発表 } (計 25 件)  
(研究代表者には下線)

1. Hiroshi Ueno, Rotation of *Fusobacterium nucleatum* F<sub>1</sub>-ATPase, Bilateral joint research project meeting in Otago, 2018
2. Hiroshi Ueno, Rie Koga, Tomoko Masaike, Nobuyasu Koga, Hiroyuki Noji, Rotation of the engineered F<sub>1</sub>-ATPase with non-catalytic α-type P-loops, 20th European Bioenergetics Conference, 2018
3. Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Mayu Hara, Hiroyuki Noji, Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
4. Ryo Watanabe, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Ryohei Kobayashi, Hiroyuki Noji, Rotation of

- hybrid F1-ATPases between bacterial and mammalian ones, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
5. Tomoyasu Sato, Hiroshi Ueno, Kumiko Hayashi, Rie Koga, Nobuyasu Koga, Hiroyuki Noji, Tomoko Masaike, Rotational torque and kinetics of F1-ATPase containing the catalytic subunit with a non-catalytic hinge, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  6. Jun Tsunoda, Chihong Song, Yakushiji Fabiana Lica, Takeshi Murata, Hiroshi Ueno, Naoyuki Miyazaki, Kenji Iwasaki, Junichi Takagi, Ryota Iino, Kazuyoshi Murata, Single Particle Analysis of EhV-ATPase by Phase-Plate electron cryo-microscopy, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  7. Rie Koga, Hiroshi Ueno, Tomoko Masaike, Hiroyuki Noji, Nobuyasu Koga, Impact of the sequence difference of P-loop on the conformational changes of F1-ATPase, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  8. Eiro Muneyuki, Yohei Nakayama, Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, On the timing of phosphate release in the ATPase reaction by TF1, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  9. Hiroshi Ueno, Rie Koga, Tomoko Masaike, Nobuyasu Koga, Hiroyuki Noji, Rotation of the engineered F1-ATPase with non-catalytic alpha-type P-loops, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  10. Mariel Zarco - Zavala, Duncan G.G McMillan, Suzuki Toshiharu, Hiroshi Ueno, Rikiya Watanabe, Francisco Mendoza - Hoffmann, Jose J. Garcia-Trejo, Hiroyuki Noji, Chemomechanical Coupling of the Paracoccus denitrificans F1-ATPase, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
  11. Hiroshi Ueno, Rotation mechanisms of rotary ATPases, Complex systems and Biological physics seminar, 2018
  12. Hiroshi Ueno, Rotation of the engineered F1-ATPase with alpha-type P-loop on catalytic beta subunit, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017
  13. Hiroshi Ueno, Single-molecule imaging of rotation of bovine mitochondrial F1-ATPase, Gordon Research Conference, Bioenergetics, 2017
  14. Tatsuya Iida, Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Takeshi Murata, Ryota Iino, Arginine finger mutant of Enterococcus hirae V1-ATPase shows unusual rotational behaviors, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  15. Senka Gi, Lica Fabiana Yakushiji, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Takayoshi Arai, Katsuhiko Moriyama, Hideo Togo, Takeshi Murata, Identification of accelerators on Na<sup>+</sup>-depending ATPase activity of Enterococcus hirae V-ATPase, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  16. Hironobu Yamashita, Kazuhito V Tabata, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Detection of enzymatic activity in femtoliter droplets using micro-Raman spectroscopy, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  17. Mariel Zarco Zavala, Duncan G G McMillan, Toshiharu Suzuki, Hiroshi Ueno, Francisco Mendoza-Hoffmann, Jose J. Garcia-Trejo, Hiroyuki Noji, Unveiling the chemomechanical coupling of F1 ATPase of Paracoccus denitrificans, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  18. Jun Tsunoda, Chihong Song, Fabiana Lica Yakushiji, Takeshi Murata, Hiroshi Ueno, Junichi Takagi, Ryota Iino, Kazuyoshi Murata, Single Particle Analysis of EhV-ATPase by Phase-contrast cryo-Electron Microscopy, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  19. Yota Kato, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Measuring metabolic activities in single bacterial cells by Raman microspectroscopy, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  20. Hiroka Narita, Hitoshi Hoshina, Hikaru Yoshida, Yohei Nakayama, Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, Eiro Muneyuki, The kinetics of Pi release in F1-ATPase investigated with P-loop mutations, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  21. Tsuyoshi Tono, Hiroyuki Terashima, Kazuhito Tabata, Hiroshi Ueno, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Hiroyuki Noji, Katsumi Imada, Fluorescence detection of the flagellar type III protein export using the inverted membrane vesicles, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  22. Duncan G. G. McMillan, Rikiya Watanabe, Hiroshi Ueno, Gregory M. Cook, Hiroyuki Noji, Probing the biophysical properties of a Thermoalkaliphilic F1 ATPase gives insight into adaptation and regulation, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016
  23. Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Takeshi Murata, Ryota Iino, Single-molecule simultaneous observation of rotation and nucleotide binding/release of Enterococcus hirae V1-ATPase, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016

24. Yota Kato, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Measuring metabolic activities in single bacterial cells by Raman microspectroscopy, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016
25. 上野 博史, 金ナノ粒子を用いた無負荷での V1-ATPase の回転とヌクレオチド結合解離の同時計測, 蛋白研セミナー・第6回分子モーター討論会, 2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 蛍光観察装置

発明者: 野地 博行、上野 博史、皆川 慶嘉

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-235614

出願年: 2016年

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 村田 武士

ローマ字氏名: (MURATA, takeshi)

研究協力者氏名: 野地 博行

ローマ字氏名: (NOJI, hiroyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。