

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770122

研究課題名（和文）腸内連鎖球菌ナトリウム輸送性V型ATPaseのイオン輸送機構の解明

研究課題名（英文）Ion transporting mechanism of V-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*

研究代表者

村田 武士（MURATA TAKESHI）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80415322

研究成果の概要：研究代表者らは腸内連鎖球菌に存在するNa⁺輸送性V型ATPaseの分子生物学的・生化学的・構造生物学的研究を展開し、膜タンパク質部分であるNtpKリングのX線結晶構造解析に成功していた。本研究では本酵素のイオン輸送機構の解明を目的に、Li⁺結合型及び阻害剤DCCD結合型のNtpKリングのX線結晶構造を明らかにした。これらの構造と生化学的解析から、本酵素のイオン結合／解離のメカニズムが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2007年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 330,000 | 4,030,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：V-ATPase、X線結晶構造解析、ポンプ、ナトリウム、モーター、複合体、膜タンパク質、*Enterococcus hirae*

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のメカニズムの本質的な理解のためには、その立体構造情報が不可欠である。しかし、その対象が膜タンパク質である場合には、大量発現・精製・結晶化のすべてにおいて難しく、構造生物学が遅れている。液胞（V）型ATPaseとF型ATPase（ATP合成酵素）は親水性の触媒頭部部分（V₁、F₁部分）とH⁺輸送を担う膜内在性部分（V₀、F₀部分）とから構成される分子的に近縁な巨大膜タンパク質（分子量

600 kDa以上）である。F型ATPaseの研究は、水溶性部分（F₁）のX線結晶構造が解かれたことによりそのメカニズムの研究が進み、ATPのエネルギーが中央サブユニットの回転という物理的な力に変換されることが明らかとなった。これよりF₁部分での回転とF₀部分でのH⁺輸送がどのように結びついているかが注目を集めているが、F₀部分の分子構造が得られていないため、その詳細なイオン輸送のメカニズムは現在でも未解明のままである。一方、V型ATPaseは様々なオルガネラの酸性化に寄与し、情報伝達物質、毒

物、薬剤の濃縮や、分泌タンパク質、ウイルス、ペプチドホルモンなどのプロセッシングや抗原の提示などの生理的、病的にきわめて重要な反応に関与しており、その研究が世界的にも盛んになっている。さらに最近、膜タンパク質部分 (V₀) が膜融合に直接関与していることが示され、注目を浴びている。しかし、研究対象が真核細胞であることより、V型ATPaseに関する分子生物学、生化学、構造生物学的研究はF型ATPaseに比べ遅れていた。

2. 研究の目的

研究代表者らは世界で初めて真正細菌である腸内連鎖球菌 (*Enterococcus hirae*) において Na⁺輸送性の典型的な真核細胞型の V型ATPaseを同定した。そして、ATPase オペロン全体を用いた増幅生産株を用いて本酵素の大量精製系及びリボソームへの再構成系を確立し、分子生物学・生化学的研究を展開してきた。そして最近、膜タンパク質部分である NtpK リングの詳細構造を得ることに V型 F型の両ATPaseとして初めて成功した。これより、共役イオンである Na⁺の結合・解離のメカニズムモデルを提案することができた。そこで本研究では以下の課題について明らかにすることを目的とする。

(1) Na⁺非結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---NtpK リングの構造から Na⁺非結合型では構造変化が起る可能性が考えられた。Na⁺結合能が低下している状態で NtpK リングを結晶化し、X線結晶構造解析を行う。Na⁺の結合・解離に構造変化を伴うかどうかは、そのメカニズムの理解に大変重要である。

(2) 阻害剤結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---V型ATPaseの特異的阻害剤は骨粗鬆症や大理石病などの新薬に繋がる可能性がある。現在知られている特異的阻害剤の多くはロータリーリングに結合し、回転を阻害すると考えられている。そこでそれら阻害剤結合型の NtpK リングの X線結晶構造解析を行い、阻害機構を明らかにする。

(3) Li⁺結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---本酵素は共役イオンとして Li⁺も結合できることが知られている。そこで Li⁺結合型の NtpK リングの X線結晶構造解析を行う。これにより、Na⁺と Li⁺の結合の違いや本酵素へのイオンの結合・解離について議論できると期待している。

(4) 生化学実験---研究代表者らはアイソトープ ²²Na⁺を使って V型 (F型) ATPaseとして初めて基質イオンの結合活性測定に成功している。そこで、本酵素全体または NtpK リングを用いて各種条件下で ²²Na⁺結合を測定する。得られる結果は本酵素でしか観測できない知見であり、イオン輸送のメカニズムの解明に重要である。

(5) 真核細胞 V型ATPaseのロータリーリングの X線結晶構造解析---酵母やショウジョウバエの V型ATPaseのロータリーリングは膜融合に直接的に関与することが報告されている。これら真核細胞由来のロータリーリングと NtpK リングは50%程度の配列類似性がある。そこで大腸菌を用いて真核細胞由来のリングを発現精製し、NtpK リングの構造を得たときと同様の技術を使って X線結晶構造解析を行う。

3. 研究の方法

(1) Na⁺非結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---精製した NtpK リングに DCCD を反応させ Na⁺結合に重要なグルタミン酸残基を修飾することにより、Na⁺結合能が大幅に減少すると期待できる。この標品を用いて Na⁺非存在下で結晶化及び構造解析を行う。Na⁺結合型 NtpK リング構造を用いて分子置換法が適応できると考えられるので、良質の結晶が得られれば短時間で構造解析が進むと予想している。

(2) 阻害剤結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---本酵素は PalA という V-ATPase の特異的阻害剤により阻害される。この阻害剤を用いて、ソーティング法または共結晶化し、X線結晶構造解析を行う。Na⁺結合型 NtpK リング構造を用いて分子置換法が適応できると考えられるので、良質の結晶が得られれば短時間で構造解析が進むと予想している。

(3) Li⁺結合型 NtpK リングの X線結晶構造解析---本酵素は共役イオンとして Li⁺も結合できることが知られている。Na⁺非存在下、Li⁺存在下で NtpK リングを結晶化し、X線結晶構造解析を行う。Na⁺結合型 NtpK リング構造を用いて分子置換法が適応できると考えられるので、良質の結晶が得られれば短時間で構造解析が進むと予想している。

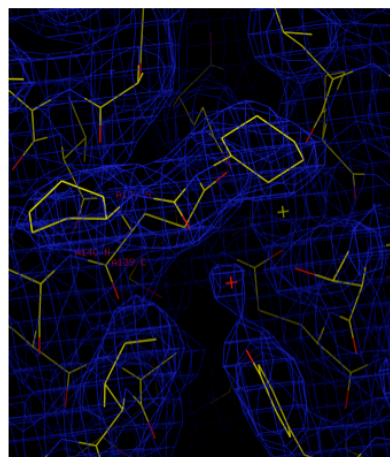
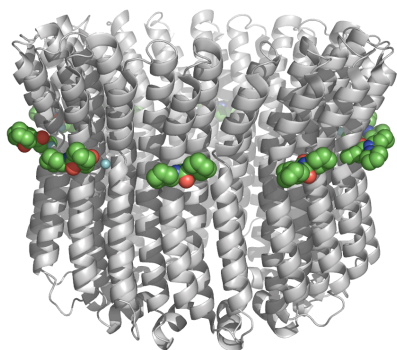
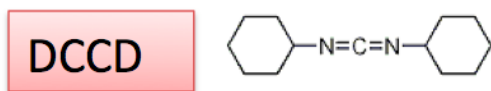
(4) 生化学実験---本酵素全体または NtpK リングを用いて各種条件下でアイソトープ ²²Na⁺の結合を測定する。

(5) 真核細胞 V型ATPaseのロータリーリ

リングの X 線結晶構造解析---ヒト由来の c サブユニットをクローニングし、大腸菌細胞、酵母細胞または大腸菌無細胞系を用いてそれぞれ発現を確認する。大量に発現している系を用いて、c リングを精製・結晶化し、X 線結晶構造解析を行う。大量発現さえすれば、NtpK リングの構造解析で得た技術を生かすことができるかと期待している。

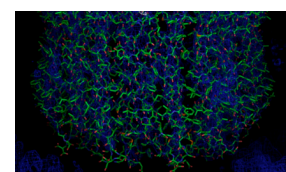
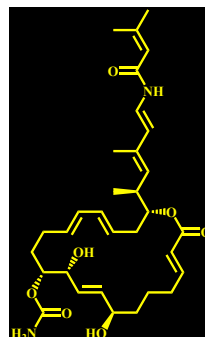
4. 研究成果

(1) Na⁺非結合型 NtpK リングの X 線結晶構造解析---精製した NtpK リングに DCCD を反応させ Na⁺結合に重要なグルタミン酸残基を修飾することにより、Na⁺結合能が大幅に減少していると考えられる。この状態で結晶化に成功し、解像度 2.8Å で X 線結晶構造を明らかにした。得られた構造は Na⁺結合に重要なグルタミン酸残基に DCCD が共有結合していた。これにより、DCCD の阻害機構が明らかになった。しかし、得られた構造も Na⁺結合型であった。これは結晶化溶液に 200 mM 以上の Na⁺が存在しているため、DCCD 結合により NtpK リングの Na⁺に対する親和性が低下しても結合したものと考えられた。そこで Na⁺を含まない結晶化試薬を用いて結晶化・構造解析を行った。得られた構造にも Na⁺が結合していることが示唆された。²²Na⁺を用いてその結合親和性を測定したところ、DCCD 反応前よりも 10 倍程度親和性が低下しているが、結晶化溶液中にわずかに存在する Na⁺を結合したものと考えられた。DCCD 反応後でもリングへの Na⁺の結合解離が可能であり、そのメカニズムは以前提案した側鎖開閉モデルを指示する結果であった。



Na⁺結合サイトの構造 DCCD が結合後も Na⁺イオンが結合している。

(2) 阻害剤結合型 NtpK リングの X 線結晶構造解析---本酵素は PalA という V-ATPase の特異的阻害剤により阻害される。ソーティング法によりこの阻害剤を NtpK リングと結合させて、X 線結晶構造解析を行った。しかし、PalA と考えられる電子密度は存在していなかった。次にこの阻害剤と NtpK リングとの共結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。しかし、得られた回折データの分解能が低く (4 Å 程度) PalA と考えられる電子密度を見つけることができなかった。



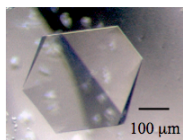
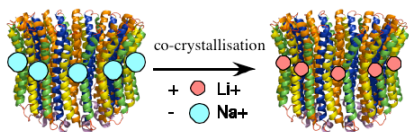
PalA と NtpK リングとの共結晶構造。PalA と考えら得れる電子密度は存在していなかった。

PalA の構造

(3) Li⁺結合型 NtpK リングの X 線結晶構造解析---本酵素は共役イオンとして Li⁺も結合できることが知られている。Li⁺存在下、Na⁺非存在下で NtpK リングの結晶を得た後、Na⁺結合型 NtpK リング構造情報を使って、分子置換法により位相を決定した。2.8Å 分解能で Li⁺結合型 NtpK リングの構造を解くことに成功した。本酵素の基質結合ポケットは、Li⁺を Na⁺結合のときと同じ残基を使って同様に結合していた。Na⁺のイオン半径は 1.16Å、Li⁺は 0.9Å である。Na⁺よりイオン半径の小さい Li⁺は、容易に結合ポケット内に入り込み、Li⁺---イオン結合残基間の距離を Na⁺のときよ

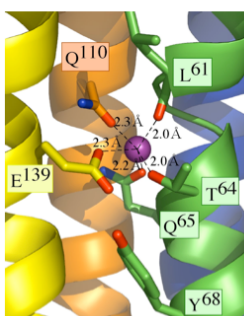
りもわずかに近づけることによりポケット内に安定に存在することができると考えられた。

リチウム存在下ナトリウム非存在下で得られた結晶

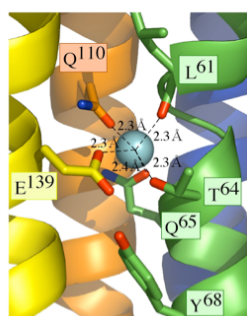


SPring8 BL26B1
Resolution : 61 - 2.69 Å
Space group: orthorhombic P2₁2₁2₁
Unit Cell dimensions: a=119.80 Å b=125.89 Å
c=210.82 Å α=β=γ=90°
Completeness (%) 95.38 (79.27)
Unique observations 81156
Redundancy 3.7 (1.6)
I/σ 8.2 (1.6)
R factor/R free 0.195/0.207

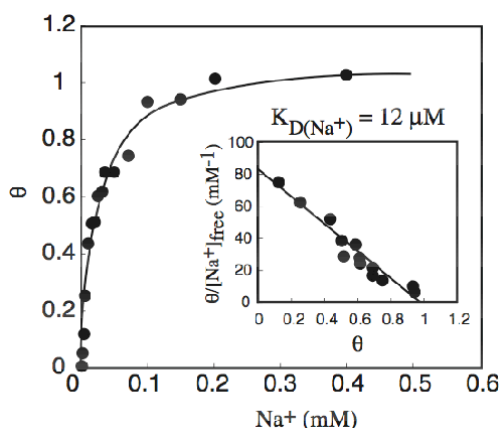
Li⁺ bound K ring



Na⁺ bound K ring



(4) 生化学実験---精製した NtpK リングを用いて各種条件下で ²²Na⁺ 結合を測定した。NtpK リングのみでも複合体と同様に ²²Na⁺ を結合した。Na⁺ 濃度依存性を測定することにより、NtpK リングの Na⁺ に対する親和性を測定したところ、全複合体と類似する K_D 値 (12 μM) を得た。このことより、本酵素の Na⁺ に対する親和性はリングの Na⁺ 結合サイトにより担われていることが示唆された。



²²Na⁺ 結合の Na⁺ 濃度依存性

(5) 真核細胞 V 型 ATPase のロータリーリングの X 線結晶構造解析---ヒト由来 c サブユニットをクローニングし、大腸菌無細胞

系を用いて発現させた。界面活性剤中で合成を行うことにより、c サブユニットを可溶性画分として回収することが可能であったが、得られた標品は精製することが難しく、リングを形成していないことが示唆された。そこで、界面活性剤を添加しない状態で合成を行い、沈殿として c サブユニットを回収し、有機溶媒 (クロロフォルム/メタノール) を用いて精製する系を確立した。水溶液中への移行を試みたが、すぐに凝集しリングとして可溶性画分として抽出することが難しかった。そこで有機溶媒中で NMR を測定し、構造解析を行ったところ、ヘリックス様の立体構造を保持していることが示唆された。しかし、シグナルの重複が多く、帰属が困難であった。

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 4 件)

- ① Takeshi Murata, Ichiro Yamato, Yoshimi Kakinuma, Mikako Shirouzu, John E. Walker, Shigeyuki Yokoyama, and So Iwata, Ion binding and selectivity of the rotor ring of the Na⁺-transporting V-ATPase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105, 8607-8612, 2008、査読有
- ② Misaki Yamamoto, Satoru Unzai, Shinya Saijo, Kazuki Ito, Kenji Mizutani, Chiyo Suno-Ikeda, Yukako Yabuki-Miyata, Takaho Terada, Mitsutoshi Toyama, Mikako Shirouzu, Takuya Kobayashi, Yoshimi Kakinuma, Ichiro Yamato, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, and Takeshi Murata, Interaction and Stoichiometry of the Peripheral Stalk Subunits NtpE and NtpF and the N-terminal hydrophilic domain of NtpI, of *Enterococcus hirae* V-ATPase, J. Biol. Chem., 283, 19422-19431, 2008、査読有
- ③ Atsushi Suenaga, Osamu Umezu, Tadashi Ando, Ichiro Yamato, Takeshi Murata, Makoto Taiji, Estimation of ligand binding free energies of F-ATPase by using molecular dynamics/free energy calculation, J. Comput. Chem. Jpn., 7, 103-116, 2008、査読有
- ④ Toshiaki Hosaka, Kazuma Takase, Takeshi Murata, Yoshimi Kakinuma, and

Ichiro Yamato, Deletion analysis of the subunit genes of V-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*, Journal of Biochemistry, 139, 1045-1052, 2006、
査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 水谷健二 Engineering of the rotor ring of the Na⁺ motive V-ATPase from *Enterococcus hirae* to examine the stoichiometry, 第46回日本生物物理学会、2008年12月3日、福岡
- ② 村田武士 V型ATPaseのイオン透過機構を考える、第45回日本生物物理学会、2007年12月23日、横浜
- ③ 村田武士、山登一郎、柿沼喜己 液胞型イオン輸送ATPアーゼの分子制御とメカニズム、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会(合同大会)、2007年12月15日、横浜
- ④ Takeshi Murata ION BINDING AND SELECTIVITY OF THE ROTOR OF THE V-TYPE NA⁺-ATPASE FROM *ENTEROCOCCUS HIRAE* Asian Crystallographic Association 2007、2007年11月6日、台湾(台北)
- ⑤ Takeshi Murata Ion transport mechanism of V-ATPase The SOKENDAI International Symposium (37th SERIKEN International Symposium; 2nd Symposium on the Partnership Project on Frontiers of Membrane Protein Research; Satellite Symposium of the 84th Annual Meeting of the Physiological Society of JAPAN)、2007年3月15日、Okazaki (Japan)
- ⑥ Takeshi Murata Structure of Li⁺ bound rotor ring of the V-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*, Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics、, 2006年6月 New Hampshire (アメリカ)
- ⑦ 村田武士 V型ATPaseの構造と機能 第6回蛋白質科学会、2006年4月26日、京都

[図書] (計2件)

- ① 村田武士、山登一郎、柿沼喜己、横山謙 (2007) 「V-ATPaseの新しい機能とその構造からみえてきたメカニズム」、蛋白質核

酸酵素 Vol. 52 No. 4, 335-341

- ② 村田武士、山登一郎、柿沼喜己 (2006) 「V型Na⁺-ATPaseの膜内在性ローターリングの構造：結晶構造から見えてきた回転モーターのイオン透過機構」、生物物理、Vol. 46, No. 6, 336-340

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 武士 (MURATA TAKESHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80415322