

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82718

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05431

研究課題名(和文)植物液胞膜プロトンポンプのゲーティングメカニズムの構造生物学的解明

研究課題名(英文)Structural basis of a plant vacuolar proton pump.

研究代表者

三村 久敏(Mimura, Hisatoshi)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・人工細胞膜システムグループ・研究員(任期有)

研究者番号：30463904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物液胞膜のプロトン輸送性ピロリン酸分解酵素は膜タンパク質であり、ピロリン酸を分解し、プロトンを輸送するイオンポンプである。これまでに、1分子のピロリン酸の加水分解につき、1個のプロトンが能動輸送されるメカニズムを説明する酵素反応サイクルモデルが構築されている。本研究では、このモデルを検証し、より確かなものにするため、未だ立体構造が明らかになっていなかった状態について、X線結晶解析により立体構造を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物液胞膜プロトン輸送性ピロリン酸分解酵素の立体構造の解明を通し、イオンポンプ分子の機能の構造的・機構的特徴について、その理解を深めようとするものである。本酵素は研究対象として、次のような特徴をもつ。第一に、本酵素はピロリン酸を基質とする点でユニークなイオンポンプ分子である。第二に、酵素反応サイクル全体をカバーする複数の基本状態の立体構造を得られる可能性が高い。本研究を通して、イオンポンプ分子の構造生物学研究に新たな知見を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Proton-translocating inorganic pyrophosphatase is a membrane protein that hydrolyzes inorganic pyrophosphate and transport proton across the vacuolar membrane. An enzymatic reaction cycle has been built to explain the mechanism in which hydrolysis of one pyrophosphate is linked to the active transport of one proton. In this study, to verify this model and to make a more solid model, we solved the crystal structure of the state in which three-dimensional structures were not determined previously.

研究分野：生化学

キーワード：膜タンパク質 イオンポンプ 立体構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物液胞膜のプロトン輸送性ピロリン酸分解酵素 ( $H^+$ -PPase) は膜タンパク質であり、核酸やタンパク質合成の副産物として生成するピロリン酸 (PPi) を加水分解することにより、細胞質の  $H^+$  を液胞内腔へと能動輸送するプロトンポンプである。植物に広く分布し、細菌や古細菌、マラリア原虫等の病原性原生生物にも見つかる。これまでに研究代表者らは、植物液胞膜  $H^+$ -PPase の立体構造を X 線結晶解析で決定することに成功し、膜貫通ドメインに位置する  $H^+$  結合部位のゲート開閉が、PPi の結合と分解を通して引き起こされることを見いだした。これに基づき、1 分子の PPi の加水分解につき 1 個の  $H^+$  が能動輸送される仕組みを説明する酵素反応サイクルモデルを構築している。このモデルを検証し、より確かなものにするため、これまでに立体構造が決定されていない状態についても構造解析を推し進める必要があると考えた。本研究では、 $H^+$ -PPase の基質結合前の状態における結晶化、X 線結晶構造の決定に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究は、植物液胞膜  $H^+$ -PPase の立体構造解析を通じて、イオンポンプ分子の機能の構造的・機構的特徴について、その理解を深めようとするものである。 $H^+$ -PPase は研究対象として、次のような特徴をもつ。第一に、 $H^+$ -PPase は PPi を基質とする点でユニークなイオンポンプ分子である。他のほとんどのイオンポンプ分子がアデノシン三リン酸 (ATP) を基質とするのに対し、 $H^+$ -PPase は PPi を基質とするので、イオンポンプ分子の本質を理解するための良いレファレンスになると考えられる。第二に、これまでの研究を踏まえて、酵素反応サイクル全体をカバーする基本状態の立体構造を得られる可能性が高い。膜タンパク質の立体構造解析は一般的に難しいとされる。同一の酵素で反応サイクル全体をカバーする状態の立体構造が決定された例は多くなく、ごく少数のイオンポンプに限られている。

これまでに研究代表者らは、植物液胞膜  $H^+$ -PPase の分子機構の解明を目指し、X 線結晶解析による原子分解能での立体構造解析に取り組んできた。基質である PPi のアナログ分子を結合した基質結合状態と、基質の加水分解産物であるリン酸 (Pi) を結合した分解産物結合状態の結晶構造を決定することに成功している (図 1b, c)。 $H^+$ -PPase の構造は、80 kDa の単一ポリペプチドからなり、膜を貫通する 16 本の  $\alpha$  ヘリックスを含む単量体がホモ二量体を形成する。それぞれの単量体には、細胞質から液胞内腔へと輸送される  $H^+$  の結合部位が存在し、301 番目のグルタミン酸残基 (Glu301) がその機能の一端を担うと推測されている。16 本の膜貫通ヘリックスは、細胞質側から液胞内腔まで長く伸び、そのうちの分子の中央に位置する 6 本によって、膜貫通領域では Glu301 周辺の構造が形成され、細胞質側ドメインでは基質結合部位が形成されている。研究代表者らがこれまでに決定した結晶構造からは、 $H^+$ -PPase は基質の結合と分解を通して構造変化を起こすことが明らかになっている。本研究の目的は、 $H^+$ -PPase の立体構造が未だ明らかになっていない状態の結晶構造を決定し、酵素反応サイクルモデルの構造基盤を確立することとした。本研究では特に、基質結合前の状態の結晶構造決定を目指した。

### 3. 研究の方法

X 線結晶解析によって原子構造を決定するためには、解析対象とする膜タンパク質を高純度で精製し、結晶化する必要がある。 $H^+$ -PPase の精製は、植物体を出発材料として行った。まず、緑豆もやしから液胞膜を調製し、界面活性剤を用いて可溶化することにより、 $H^+$ -PPase を含む膜タン

パク質を抽出した。次に、 $H^+$ -PPase を特異的に認識するリコンビナント抗体断片を用いることにより、抗体断片に付加されたタグ配列を利用し、 $H^+$ -PPase と抗体断片の複合体をアフィニティー精製した。リコンビナント抗体断片は、大腸菌発現系を用いて生産した。 $H^+$ -PPase と抗体断片の複合体は、高塩濃度下でゲル濾過クロマトグラフィーを行うことにより、結合した抗体断片と  $H^+$ -PPase とを分離した。このようにして精製した  $H^+$ -PPase の結晶化は、蒸気拡散法によって行った。得られた結晶の回折データの測定は、大型放射光施設 SPring-8 (播磨) のビームライン BL41XU において行った。構造決定 (位相決定) は、基質結合状態の結晶構造を利用し、分子置換法 (MR) によって行った。

#### 4. 研究成果

本研究を通して、基質結合前状態の  $H^+$ -PPase を結晶化し、結晶構造を決定することに成功した (図 1a)。決定した基質結合前状態の立体構造は、これまでに決定されている立体構造とは明らかに異なっていた。基質結合状態、分解産物結合状態の構造と比較すると、分子の中央に位置する 6 本の膜貫通ヘリックスの場所は移動し、その構造も大きく変化していた。 $H^+$  の結合部位と推測される Glu301 周辺の微細な構造も変化し、形成に関与するアミノ酸残基の幾つかは側鎖のコンフォメーションが変化していた。その結果、水分子が侵入可能な Glu301 周辺の間隙構造も変化し、Glu301 への水分子の接近性が基質結合前状態、基質結合状態、分解産物結合状態の間で異なっていることが明らかになった。これにより、 $H^+$ -PPase における  $H^+$  の輸送は、Glu301 周辺の立体構造の変化を通して、水分子の配置が巧みに制御されることによって行われているとする新たな知見が得られた。基質結合部位に目を向けると、当然のことながら、基質結合前状態では基質の結合は観察されなかった。カチオンの結合のみが確認され、結合しているカチオンの数は基質結合状態、分解産物結合状態とは異なっていた。基質結合前状態の基質結合部位の構造は、基質が結合していないことにより、基質結合状態と分解産物結合状態とは大きく異なっており、その細胞質側は外側に向かって大きく開かれていた。その影響は、膜貫通ヘリックスを通して Glu301 周辺まで及んでいた。基質結合部位の構造変化は、膜貫通ヘリックスの構造変化を通して、Glu301 周辺の構造変化を引き起こしていることが明らかになった。

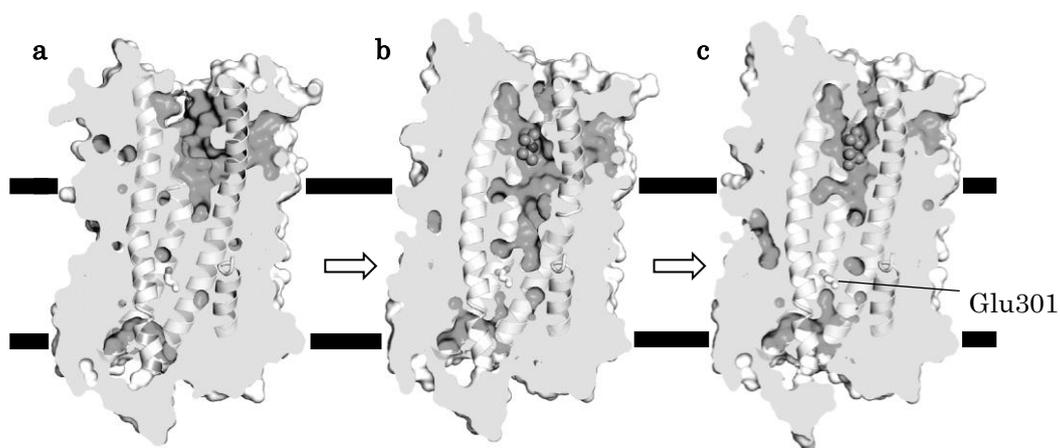


図 1. 植物液胞膜  $H^+$ -PPase の単量体の立体構造

a. 本研究で結晶構造を決定した基質結合前状態。b. 基質結合状態。c. 分解産物結合状態。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三村久敏、前島正義、豊島近
2. 発表標題 植物液胞膜H <sup>+</sup> -PPaseにおける細胞質側ゲートの開閉機構
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------