

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06514

研究課題名（和文）ATP合成酵素のプロトン駆動力から回転エネルギーへの変換機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of conversion from proton motive force to rotational energy in ATP synthase.

研究代表者

岸川 淳一（Kishikawa, Jun-ichi）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：80599241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATP合成酵素は、生体膜の内外に形成されたプロトン駆動力を回転エネルギーに変換することで、ATPを合成する。この酵素がどのようにプロトン駆動力を回転エネルギーに変換しているかは未だに不明である。本研究では、好熱菌由来ATP合成酵素を材料として、その高分解能構造からエネルギー変換機構の解明を目的とする。

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、ATP合成酵素の膜内在性ドメインの高分解能構造を得た。得られた構造から、プロトン輸送に重要な残基のプロトン化状態を明らかにすることができた。現在、得られた構造をもとに、分子シミュレーションを行うことで、エネルギー変換機構について議論を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATP合成酵素は、ATPの合成とプロトン輸送を回転によって共役するユニークなタンパク質である。親水性部分でATPの合成、膜内在性部分でイオンの輸送を行う。親水性部分は、一分子回転観察などにより詳細に調べられている。一方で、膜内在性でのプロトン輸送機構は不明な点が多かった。本研究で得られた知見は、この輸送機構の原子レベルでの解明に光を当てるものであり、学術的な意義が深い。また、回転分子モーターは非常に精密な機械と捉えることもでき、その機構が分かることは、生物工学的にも興味深い。

研究成果の概要（英文）：ATP synthase plays a crucial role in synthesizing ATP by converting the proton-motive force across inside and outside of membrane into rotational energy. We investigated the energy conversion mechanism of ATP synthase by analyzing the high-resolution structure of the transmembrane domain from a thermophilic bacterium. Through single particle analysis using cryo-electron microscopy, we determined the protonation state of key residues involved in proton transport. Molecular simulations were then conducted to explore the energy conversion process. Our findings provide insights into how ATP synthase converts proton-motive force into rotational energy, contributing to a deeper understanding of this fundamental process in bioenergetics. These insights have potential applications in bioengineering.

研究分野：構造生物学

キーワード：回転分子モーター V-ATPase クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

アデノシン3リン酸 (ATP) は、生物のエネルギー代謝の要となる重要な分子である。ヒトを含む好気的な生物や光合成を行う植物などでは、ATPのほとんどはATP合成酵素と呼ばれる膜タンパク質によって、合成される。自然界には大きく分けると、2種類のATP合成酵素が存在する。1つはF型ATP合成酵素 (F-ATPase、 F_0F_1) もう1つはV型ATP合成酵素 (V-ATPase、 V_0V_1) である。F-ATPaseはミトコンドリアの内膜やチラコイド膜、原核生物では細胞膜に存在する。一方、V-ATPaseは、古細菌や一部の真正細菌の細胞膜に存在する。これらの酵素の基本的な構造は共通で、親水性の F_1/V_1 部分と膜内在性の F_0/V_0 部分からなる。両者は、外周固定子と中心回転軸で接続されている。生体膜内外に形成されたプロトン駆動力 (pmf) により F_0/V_0 部分で中心回転軸複合体回転が引き起こされる。中心回転軸複合体の回転に伴い、 F_1/V_1 部分で構造変化が引き起こされ、そこでATPが合成される。つまり、 F_0/V_0 部分でのプロトン輸送と F_1/V_1 部分で行われるATP合成が回転により共役している (図1)。そのため、これらATP合成酵素は回転分子モーターとも呼ばれる。

F_1/V_1 部分だけを単離すると、ATPを加水分解して、中心回転軸を回転させるATP駆動型の回転分子モーターとして機能する。これまでの生化学的実験、1分子回転観察などの生物物理学的手法などにより、ATP加水分解による回転力発生機構は詳細に調べられてきた。また、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた単粒子解析による F_1/V_1 部分の構造解析も進んでいた。ATP存在下で構造解析を行うことで、中間体構造を捉える試みがなされていた。

一方、プロトン駆動力による膜内在性の F_0/V_0 部分での回転機構は不明な点が多かった。これは、 F_0/V_0 部分が膜タンパク質のため、高分解能構造を得ることが難しかった点が大きい。2020年、研究代表者は好熱菌 *Thermus thermophilus* のV-ATPaseの単離した V_0 部分のCryo-EMによる構造を初めて高分解能 (3.9Å) で報告した (Kishikawa *et al.*, *eLife* 2020)。得られた構造から、単離 V_0 の自己阻害機構を明らかにした。プロトン輸送の機構を明らかにするには、水分子を同定できる程度の分解能が必要であるが、報告した構造はその分解能に至っていなかった。また、研究開始当初の時点では、プロトン輸送を議論できるほどの高分解能構造は、 F_0/V_0 どちらも報告されていなかったため、高分解能での構造解析が求められていた。

2. 研究の目的

本申請研究では、ATP合成酵素の膜内在性部分である F_0/V_0 部分でのpmfによる回転力発生機構を明らかにすることを目的とする。回転力発生機構を明らかにするためには、プロトンが輸送される経路、それに関わる水分子、残基などを明らかにする必要がある。本申請研究では、好熱菌由来 V_0 を材料として、その高分解能構造を得ることで、上記の問いについて議論する。

3. 研究の方法

本申請研究では、Cryo-EMを用いた単粒子解析により好熱菌由来の V_0 部分の高分解能構造解析を行った。

(1) サンプルの調製 - 好熱菌 *Thermus thermophilus* の菌体を超音波処理で破碎し、その後、超遠心を行った。遠心後の沈殿を、細胞膜画分とし、界面活性剤DDMを含む緩衝液で懸濁し、細胞膜に含まれる膜タンパク質を可溶化した。懸濁溶液を再度超遠心し、上清を可溶化画分とした。目的のタンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製した V_0 は、ナノディスクに再構成した。精製した V_0 とナノディスク足場タンパク質であるMSP1E3D1、脂質であるPOPCをDDM存在下で混和した。その後、バイオビーズを用いて、溶液中から徐々にDDMを取り除くことで、ナノディスクに V_0 を再構成した。再構成した V_0 は、Cryo-EMによる撮影まで4で保存し、できるだけ早く使用した。

(2) Cryo-EMの撮影 - Cryo-EM撮影用の基盤 (グリッド) の作製を、Vitrobotで行った。作製したグリッドの撮影は、300 kV Cryo-EMであるTitan Kriosで行った。撮影に使用したTitan Kriosは、直接電子検出カメラK3、エネルギーフィルター、球面収差補正レンズが搭載されており、高分解能構造解析に適している。最終的に約9,000の動画撮影を行った。

(3) 画像解析および原子モデルの構築 - 画像解析は、単粒子解析ソフトであるCryosparcを

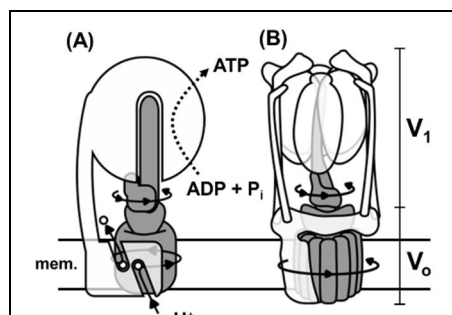


図1. ATP合成酵素の模式図 (A) と好熱菌由来ATP合成酵素の模式図 (B)。 (A) ATP合成酵素は、ATP合成の場である親水性ドメインと膜内在性ドメインからなる。膜内外に形成されたプロトン駆動力は回転力に変換され、中心回転軸 (灰色) が固定子 (白色) に対して回転する。回転が親水性ドメインに伝わり、ATPが合成される。(B)好熱菌ATP合成酵素 (TthV₀V₁) は、親水性ドメインV₁と膜内在性ドメインV₀からなる。

用いた。撮影した動画のブレ補正、コントラスト伝達関数の推定などを行ったあと、画像から粒子の抽出を行った。2次元、3次元のクラス分けを行い、抽出した粒子の取捨を行った。最終的に、約37万粒子を用い、3次元密度マップを再構成した。その結果、2.8 Å分解能の密度マップを得ることが出来た。得られた密度マップを元に原子モデルを構築した。初期構造は、以前申請者が構築したモデルとして、COOT、ISOLDE、Servalcatなどのプログラムを利用し、最終的なモデルを構築した。タンパク質に由来しない密度に対しては、実際に密度を確認し、手動で水分子（酸素原子）を置いた。

4. 研究成果

本研究では、好熱菌由来の V_0 の高分解能像を得ることで、pmfによる回転力発生機構を明らかにしようとするものである。そのために、Cryo-EMを用いた単粒子解析により、好熱菌 V_0 の構造解析を行った。その結果、全体の2.8 Å分解能の密度マップを得ることができた（図2）。部分的には、2 Å前半の分解能に至っていた。これは、現時点で公開されている V_0 の中では最も高分解能の密度マップである。膜貫通部分の周辺には、脂質由来と思われる密度も観察され、数カ所では比較的安定的に脂質が存在していることが強く示唆された。

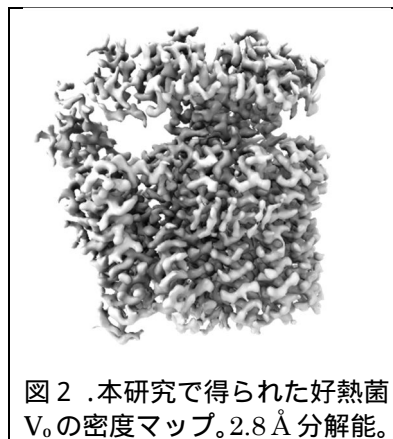


図2 .本研究で得られた好熱菌 V_0 の密度マップ。2.8 Å分解能。

得られた密度マップは、原子モデルを構築するのに十分な分解能であったので、密度をもとに V_0 のほぼ全長の原子モデルを構築することができた。プロトンの輸送に重要な固定子と回転子の界面についても、側鎖の向きが議論できるモデルを構築できた。また、プロトンの輸送経路と考えられる膜貫通領域には、タンパク質に対応しないいくつかの球状の密度が観察された。そこで、周辺の環境（溶液へのアクセスが可能か、親水性の度合い、近傍のアミノ酸側鎖の向き）を加味し、球状の密度のいくつかに対し、水分子を割り当てた。その結果、水分子を含む V_0 全体の原子モデルを構築することが出来た。

プロトンの輸送には、リング状に並んだ回転子サブユニット（ c サブユニット）に存在するグルタミン酸（E63）のプロトン化状態が重要であることが知られている。また、プロトンの輸送経路のほとんどは、膜内在性の a サブユニットで形成されていることも知られている。得られた構造では、12ある c サブユニットのうち1つが a サブユニットのアルギニン残基が静電的に相互作用していることがわかった。また、その c サブユニットと隣り合う2つの c サブユニットのE63はリングの外側を向いていることがわかった。これは、これらの残基が電荷を持っている、つまり、脱プロトン化していることを示している。したがって、アルギニン残基と相互作用している1つ、その隣り合う2つ、計3つの c サブユニットのE63が脱プロトン化しており、これらがプロトンの輸送に重要であることを示している。2つの c サブユニットが脱プロトン化しているというこれまでのモデルと異なるものである。得られた構造をもとに、新たなモデルを構築する必要がある。

V_0 の原子モデルに水分子をモデリングできたことにより、プロトンの輸送経路がより明確になった。水分子は、 a サブユニットのアルギニン残基を挟んで、細胞質側・細胞外側に存在していた。水分子や周辺の残基を介して、細胞外側から前述の c サブユニット付近までプロトンの輸送が可能である。また、 c サブユニットから解離したプロトンも細胞質側へ輸送が可能であることが示された。

本研究で得られた構造は、1つの安定構造である。回転子の回転角度がずれた（回転した）構造がえられることも期待したが、本研究では得られなかった。得られた安定構造1つから、回転という動的な反応機構を理解するのは難しい。そこで、現在、分子シミュレーションを得意とする研究者と共同研究を行っている。分子シミュレーションを用いて、 c サブユニットのE63のプロトン化状態などの条件を変えて、回転が起こるかどうかを検討中である。得られた構造と分子シミュレーションの結果を踏まえて、プロトン駆動力による回転力発生機構を議論したい。現在、本研究については、論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishikawa J., Nakanishi A., Nakano A., Saeki S., Furuta A., Kato T., Mistuoka K., Yokoyama K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28832-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 299
2. 論文標題 Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102884 - 102884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishikino Tatsuro, Takekawa Norihiro, Tran Duy Phuoc, Kishikawa Jun-ichi, Hirose Mika, Onoe Sakura, Kojima Seiji, Homma Michio, Kitao Akio, Kato Takayuki, Imada Katsumi	4. 巻 631
2. 論文標題 Structure of MotA, a flagellar stator protein, from hyperthermophile	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 78 - 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.09.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishikawa Jun-ichi, Ishikawa Moe, Masuya Takahiro, Murai Masatoshi, Kitazumi Yuki, Butler Nicole L., Kato Takayuki, Barquera Blanca, Miyoshi Hideto	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Na ⁺ -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31718-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Gerle Christoph, Kishikawa Jun-ichi, Yamaguchi Tomoko, Nakanishi Atsuko, ?oruh Orkun, Makino Fumiaki, Miyata Tomoko, Kawamoto Akihiro, Yokoyama Ken, Namba Keiichi, Kurisu Genji, Kato Takayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Structures of multisubunit membrane complexes with the CRYO ARM 200	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 249 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Atsuki, Kishikawa Jun-ichi, Nakanishi Atsuko, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis of unisite catalysis of bacterial F0F1-ATPase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgac116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岸川淳一、中西温子、古田綾、加藤貴之、難波啓一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 Mechanical inhibition of isolated Vo from V/A-ATPase for proton conductance.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸川淳一
2. 発表標題 好熱菌 V 型 ATPase の 単粒子解析から分かってきたこと
3. 学会等名 第 1 0 回分子モーター討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun-ichi Kishikawa
2. 発表標題 Single particle cryo-EM of prokaryotic V/A-ATPase during catalytic cycle
3. 学会等名 48th Indian Biophysical Society Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi, Atsuki Nakano, Ken Yokoyama
2. 発表標題 Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------