

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370042

研究課題名（和文）電子顕微鏡による複合体1及びV-ATPaseの構造解析

研究課題名（英文）Structural studied of Complex I and V-ATPase by Electron microscopy

研究代表者

横山 謙 (YOKOYAMA KEN)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70271377

研究成果の概要（和文）：好熱菌由来 V-ATPase および、膜内在性のローターリングの 二次元結晶を作成した。Intact V-ATPase の再構成像を構築したが分解能が低く、結晶化条件を検討している。ローターリングに関しては、クライオ電子顕微鏡像からの3次元再構成により 70分解能のモデルが構築できた。原子分解能を出すために結晶シートのスタッキングを解消する条件検討を実施している。呼吸鎖複合体Iのヒスタグ精製系を構築し、単粒子解析の結果 intact であることが判明した。膜に包埋した機能状態での単粒子解析を進める。

研究成果の概要（英文）：We have prepared a 2-D crystal of rotor ring from VoV1. We are reconstituting 3D model of the rotor ring from images by cryo electrol microscopy. For Complex I, his-tagged purification system was constructed using homologus recombination method. Single particle analysis revealed the obtained Complex I is intact.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	47,00,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ATP・呼吸・構造・活性酸素・電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内膜にある呼吸鎖複合体および ATP 合成酵素のエネルギー共役により、

ATP の大部分が生産される。呼吸による ATP 合成という重要な現象を理解するためには、

個々の呼吸鎖の詳細な構造情報が必要である。呼吸鎖複合体 II, III, IV の結晶構造は、すでに決定された。しかし、呼吸鎖複合体 I に関しては、膜表在性部分の結晶構造が報告されているものの、膜内在性部分の構造情報は乏しく、サブユニット配置ですら明らかでなかった。また、ATP 合成酵素 F_0F_1 の膜表在部分である F_1 の高分解結晶構造が報告されているものの、全体の構造情報は、電子顕微鏡を用いた単粒子解析によるものに限られている。加えて、プロトン輸送に関わる膜内在性のローターリングの原子分解能構造の報告例はない。 F_0F_1 と同様に、ATP 合成酵素やプロトンポンプとして働く液胞型 ATPase (V-ATPase) に関しては、その重要性に関わらず、構造に関する情報はさらに限られている。研究代表者らが中心になって構成するサブユニットやサブ複合体の部分構造の大部分が決定された。後は intact な状態での構造情報を明らかにすることが残された課題である。

2. 研究の目的

構造解析に適した好熱菌由来 V-ATPase および呼吸鎖複合体 I の精製系を確立する。高分解能電子顕微鏡を用いた構造解析技術により、V-ATPase および呼吸鎖複合体 I のプロトン輸送機構解明につながる質の高い構造情報を得る。

3. 研究の方法

(1) 複合体 I の精製系の構築と単粒子解析

V-ATPase のヒスタグ精製系作成時に用いた相同組み替えにより、膜内在性部分が解離しない条件を確定し、均一標品を得る精製条件を確立する。膜内在性部分からなる複合体を精製するために、膜サブユニットにヒスタグを導入した組み替え株を作成する。ホロ酵素のおよび膜内在性複合体の精製系を確立す

る。単粒子解析によりホロ複合体であることを確認する。安定的な試料の供給体制が構築された後に、継続的に複合体の単粒子解析を行い、複合体の全体像およびサブユニット配置を確定する。

(2) 電子線結晶学によるローターリングの構造解析

良質なローター複合体の 2 次元結晶シートが得られれば原子分解能の構造情報を得ることも可能である。2 次元結晶の場合、脂質の位置も明らかにできる可能性があり、質の高い構造情報を得ることが期待される。徹底的な条件検討を行い、スタックの少ない 2 次元結晶シートを作成する。良好な 2 次元結晶シートが得られたならば、規定の方法に従い、2 次元結晶像からの 3 次元像の再構成を行う

4. 研究成果

(1) 複合体 I の精製系の構築と単粒子解析

膜内在性部分を含む複合体 I の精製条件の検討を行った。好熱菌の遺伝子内にマーカー遺伝子を指標として、相同組換により変異部分を挿入することができる。この方法により、部位特異的変異やタグ領域をオリゴマーの特定のサブユニット遺伝子に導入した。

膜内在性のサブユニット 13 の C 末端にヒスタグを導入した。発現・精製条件を検討した。精製された標品が、膜内在性部分に結合して NADH 酸化活性を阻害するアセトゲニン感受性を示した。可溶性部位のみではアセトゲニンの感受性を示さない。このことは、膜内在性部分を含む完全な複合体 I が精製されたことを示す。

精製試料をネガティブ染色で電子顕微鏡観察した結果、ホロ複合体を含む標品であることが判明した。引き続き単粒子解析により平均化像の解析にとりかかる予定であったが、

Sazanov らの結晶構造が 2010 に発表され (Efremov et al, Nature)、分子構造やサブユニット配置等が解明されたため単なる構造解析の実施をペンディングした。今後は、ナノディスクやバイセル等の脂質二重膜に包埋した状態での機能的な構造変化を、単粒子解析によって明らかにしていく。提唱されているピストン運動によるプロトン輸送が起こるのかを、構造面から検証する。

(2) 電子線結晶学によるローターリングの構造解析

条件検討を重ねた結果、重なりが少なく電子線結晶構造解析に適した 2D 結晶シートが得られるようになった。また、別の結晶系も得られている。得られた電子線解析像から 7 Å レベルの電子線構造が再構成されている。

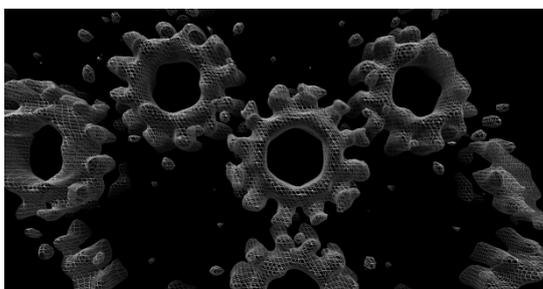
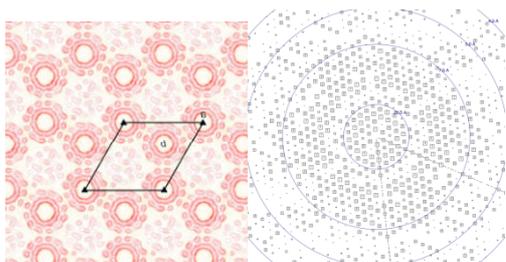


図 1 左：ローターリングのプロジェクトマップ、右：電子線反射像

図 2 ローターリングの 7 Å レベルの電子線構造再構成像 (未発表)

原子分解能の構造情報を得るためには、より重なりが少ない 2 次元結晶シートを作成する必要がある。条件検討を進めて、脂質が見える分解能の構造情報を決定する。

(3) intact V-ATPase の電子線結晶構造解析
intact V-ATPase の 2 次元結晶シートが再現性よく得られているが、分解能が上がらない。その原因は、結晶中の V-ATPase の V_1 部分が解離することにある。 V_1 部分と V_0 部分の解離を抑制するために、 V_1 部分と V_0 の EG 外周固定子を S-S で結合させる。ゲノム挿入システムにより特異的にシステイン残基をいれた V-ATPase を作成した。この S-S 導入変異体 V-ATPase が intact V-ATPase の構造決定の決め手になるはずである。

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 6 件)

① J. Kishikawa, M. Fujikawa, H. Imamura, K. Yasuda, H. Noji, N. Ishii, S. Mitani, and K. Yokoyama, Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*, *Microsc. Res. Tech* 2012 Jan;75(1):15-9. doi:10.1002/jemt.21103

② Furuike, S., Nakano, M., Adachi, K., Noji, H., Kinoshita Jr., K., and Yokoyama, K., Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag free probe, *Nature Communications*, 査読有, Vol 2, 2011, 223-239, doi:10.1038/ncomms1215

③ Takeda M, Ikeda C, Shimabukuro K, Yoshida M, Yokoyama K., Mechanism of inhibition of Tributyltin chloride of the V type Molecular Motor, *Biophysical J*, 査読有, Vol 96, 2009, 1210-1217, doi:10.1016/j.bpj.2008.10.031

④ K. Taguchi, H. Mitsuoka, K. Yokoyama, Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from *Thermophilus thermophilus* encapsulating substrate inside the cavity, *Structure*, 査読有, Vol18, 2009, 287-293

⑤ Kanno R, Koike-Takeshita A, Yokoyama K., Taguchi H, Mitsuoka K., Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from *Thermophilus thermophilus* encapsulating substrate inside the cavity, *Structure*, 査読有, Vol18, 2009, 287-293, doi.org/10.1016/j.str.2008.12.012,

⑥ Maher MJ, Akimoto S, Iwata M, Nagata K, Hori Y, Yoshida M, Yokoyama S, Iwata

S, Yokoyama K., Crystal structure of A3B3 complex of V-ATP from *Thermus thermophilus*, EMBO J、査読有、Vol28、2009、3771-3779、doi:10.1038/emboj.2009.310

〔学会発表〕(計4件)

①岸川 淳一, 伊吹 達也, 南野 徹, 難波 啓一, 中西 温子, 宮田 知子, 今田 勝巳, 横山 謙, 回転分子モーターの軸サブユニットの分子進化、第37回日本生体エネルギー研究会討論会、2011.12.20、京都市

②J. Kishikawa, M. Fujikawa, H. Imamura, K. Yasuda, H. Noji, S. Mitani, and K. Yokoyama, ATP concentration change in *Caenorhabditis elegans*, The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan, 2011.12.14、Yokohama

③古池 晶, 木下 一彦, 横山 謙, 無負荷回転プローブによる好熱菌 V_0V_1/V_1 のステップ解析、36回 日本生体エネルギー研究会、2010.11.19、大阪

④Furuike S, Nakano M, Adachi K, Noji H, Kinoshita K Jr, Yokoyama K, Resolving stepping rotation of V-ATPase with an essentially drag-free probe, 16th European Bioenergetics conference, 2010.7.18、ポーランド

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokoken/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 謙 (YOKOYAMA KEN)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70271377

(2) 研究分担者

光岡 薫 (MITSUOKA KAORU)

産業技術総合研究所・バイオメディシナル
情報研究センター・研究チーム長

研究者番号：60301230

(3) 連携研究者

なし