

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 5月28日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570144

研究課題名（和文） ナトリウム輸送性V-ATPアーゼのサブユニット構造に関する遺伝子工学的研究

研究課題名（英文） Genetic approach on subunit architecture of sodium-translocating V-ATPase complex

研究代表者

柿沼 喜己（KAKINUMA YOSHIMI）

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80134394

研究成果の概要（和文）：

腸球菌V-ATPアーゼは9つの種類のサブユニットから構成されているイオン輸送性回転酵素であり、本酵素の分子メカニズムを明らかにするためには、各サブユニット間の相互作用の全体像を明らかにすることが必要不可欠である。各サブユニットからのV-ATPアーゼ複合体の再構成に成功し、部分複合体の構造解析、特異的変異導入により解析から個々のサブユニットの構造と機能上の特徴が明らかになった

研究成果の概要（英文）：

Enterococcus hirae V-ATPase is an ion-transporting rotary enzyme that consists of nine subunits. In order to clarify the molecular mechanism of this enzyme, it is essential to clarify the overall architecture and the interaction among subunits. In this study, reconstruction of V-ATPase complex was succeeded from each subunit. Based on crystal structure of the subunit complexes and directed mutagenesis study, the features of individual V-ATPase subunits was revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ナトリウム、V-ATPアーゼ、腸球菌、イオン、サブユニット

1. 研究開始当初の背景

（1）液胞型プロトンポンプ（V-ATPアーゼ）は、リソソーム、ゴルジ装置、被覆小胞、シナプス小胞などの酸性小胞から、形質膜に至るまで幅広く生体膜に分布し、ATP合成酵素（F-ATPase）と同様にイオン輸送と共役して分子が回転する回転モーター分子で

ある。V-ATPアーゼ機能亢進が骨粗鬆症の一因であり、一方、その機能欠損が数多くの酸性小胞疾患の一因であることなども明らかになり、治療薬開発に向けてV-ATPアーゼの分子構造及び反応機構に関する基礎情報の獲得が待望されている。しかし、V-ATPアーゼの研究対象は真核生物であり、精製標品の大量獲得が困難であること、オペ

ロンを形成していないために複数のサブユニット遺伝子の取扱いが容易でないこと等の理由から分子レベルの解析は進展していない。

(2) 研究代表者は、腸内連鎖球菌に H⁺ではなく Na⁺を輸送する V(V₀V₁)-ATPase (Na⁺輸送性 V-ATPase) を発見した。本酵素はひとつのオペロン (ntp) の中の 9 個の ntp 遺伝子産物から構成される真核生物型の Na⁺輸送性 V-ATPase であることを、生化学的・分子生物学的解析により証明した。大量発現系の構築に成功し、本酵素の大量精製法と再構成系を確立した。全ての ntp 遺伝子 (ntpA, B, C, D, E, F, G, I, K) の欠失変異株の作製及び遺伝子機能相補系も確立し、変異導入などによる分子生物学的解析を可能とした。V₀ 部分を構成する NtpK, NtpI サブユニットに関しては、変異導入により ntpK E139 や ntpI R573 残基などが V-ATPase によるイオン輸送反応に必要不可欠であることを示した。イオン輸送反応の初発段階である基質(イオン)の結合を測定することは、H⁺輸送性 ATPase においては極めて困難であるが、Na⁺共役性である本酵素の特徴を生かして、イオン結合 V₀ 部分への Na⁺結合の測定にも成功している。

(3) V-ATPase の反応機構の理解にはその分子構造情報が必要不可欠であり、腸内連鎖球菌 V₀V₁-ATPase 複合体の X 線結晶構造解析を、東京理大・山登一郎教授、京大・医(現千葉大・理)・村田武士博士(連携研究者)グループとともに進めている。その結果、NtpK ローター部分の結晶構造解析に世界で初めて成功した。回転モーターとしてのメカニズムの解明には、イオン輸送に共役した分子回転を直接観察することが必要である。V₀ 部分に His tag を導入した変異体の作製にも成功しており、現在一分子回転観察を大阪大・野地教授らと進めている。

(4) 世界的に数多くの研究者が V-ATPase の研究を行っているが、真核生物 V-ATPase の構造とメカニズムに関わる分子情報の獲得は遅れている。古細菌などでも V-ATPase に類似した H⁺-ATPase が見い出されているが、構造・機能とも典型的な V-ATPase とは異なっている。昆虫・細菌 V-ATPase では V₁ 部分の構造解析などが進められているが、複合体全体の研究が進められているのは、酵母の H⁺輸送性 V-ATPase に限定されている。本酵素が真正細菌に見いだされ V 型でしかも Na⁺輸送性であることは画期的なことと受け止められており、本 ATPase は真核生物 V-ATPase の研究者のみならず、F 型、各種イオン ATPase、分子モーターの研究者からも注目されている。

2. 研究の目的

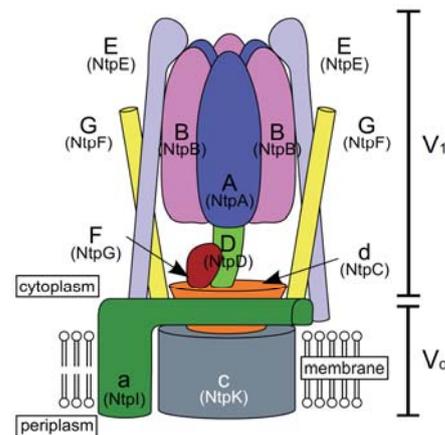
本研究は、独自の研究対象である Na⁺輸送性 V-ATPase の特徴を生かして、生命活動に必要不可欠でありイオン輸送性の回転酵素である液胞型 ATPase (V-ATPase) の分子構造と反応機構に関する基礎分子情報を獲得することを目的とする。

V-ATPase 複合体の分子構築の全体像を明らかにするために、マイナーサブユニットの構造と機能を解明することが重要であり、触媒部分 V₁ とイオン通路部分 V₀ を連結し V-ATPase 複合体を構築する中心軸及び固定軸を構成するサブユニット (NtpE, NtpF など) の V-ATPase 複合体分子構築上の役割を明らかにするとともに、サブユニット K (イオン結合性回転ローター)、I (イオンチャンネル) との機能的分子間相互作用の詳細を、生化学・遺伝子工学的手法、一分子蛍光解析などを中心に検討する。

3. 研究の方法

本酵素複合体のモデル図を示す。以前の実験結果や他の V-ATPase 複合体との部分的な類似性に基づき提案しているものであり、本研究の目的は、いわば、その真偽の検証を行うことでもある。

(1) V-ATPase 複合体の構造や各サブユニット間の相互作用を解析するためには、NtpA, B, C, D, E, F, G, I, K の 9 つの各サブユニットからの V-ATPase 複合体の再構成系を構築することが必要である。Ntp サブユニット



間の相互作用を直接解析するためには、全てのサブユニットを精製することが前提である。大腸菌におけるサブユニット遺伝子の大量発現系を構築し、大腸菌より精製するアプローチを行うとともに、大腸菌 PURE system あるいは小麦胚芽無細胞蛋白合成系を利用して精製標品を得るアプローチを進める。

(2) 各サブユニット間相互作用を知るためには、遺伝学的な解析が有用であり、V-

ATPアーゼサブユニット間で保存されているアミノ酸残基を標的に個々の遺伝子に対して部位特異的変異の導入(Cys置換変異及び化学架橋実験)等を行い、変異サブユニットを単離精製し、V1複合体、中心軸複合体等の部分複合体の形成を調べる。精製サブユニット間の相互作用については、分析遠心法や、ピアコア(表面プラズモン解析)を用いた一分子蛍光解析により進める。

以上の結果、重要な変異サブユニットのX線結晶構造解析を連携研究者・村田が行う。

4. 研究成果

(1) 腸球菌ナトリウム輸送性V-ATPアーゼのATPase触媒部分V1は、NtpA, NtpB, NtpD, NtpGサブユニットから構成されているが、各サブユニット間の相互作用の詳細については明らかになっていない。V1複合体形成に関わるサブユニット間相互作用を生化学的に解析するためにV1部分の再構成系の構築を試みた。NtpA, NtpB, NtpD-NtpG heterodimer それぞれを大腸菌大量発現系で精製し、マグネシウムイオンやヌクレオチド存在下に触媒活性を有するV1部分の形成を検討した。その結果、NtpAはヌクレオチド結合能を有しているが、NtpB, NtpD-NtpG heterodimerにはヌクレオチド結合を有しないこと、マグネシウム、ヌクレオチド存在下で、ATP加水分解活性を有するnative V1と同様なNtpA(3)NtpB(3)NtpD-NtpG(1:1)の複合体の形成に成功した。

(2) 腸内連鎖球菌(*Enterococcus hirae*)のV型ATPaseはNtpFIKEGABDの9つの種類にサブユニットから構成されており、真核細胞のV型ATPaseより簡単なサブユニット組成であることから、V型ATPaseのサブユニット集合の研究に有用である。E. *hirae*からのNtpK-ringの単独精製に加えて、大腸菌cell-free合成系でのNtpA₃B₃DG複合体、NtpEF複合体の再構成、NtpCの単独精製、さらにイオン輸送路を形成すると考えられている膜タンパク質NtpIの*S. cerevisiae*を用いた大量発現にも成功し、全ての精製サブユニットを用いたin vitroでのV₁V₀複合体の再構成の実験系を構築した。

(3) NtpK-ringへのNa⁺の結合はN,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)により影響を受け、Na⁺の結合の親和性がDCCD的作用により低下する。DCCD結合性NtpK-ringのNa⁺結合型、非結合型リングのそれぞれ2.4/3.1 Åの結晶構造解析に成功した。全てのNtpKモノマーのGlu139残基がDCCDにより修飾され、Na⁺の結合親和性を低下していると考えられた。NtpKリングの全体構造はDCCD結合により大きな構造変化は見られず、V-ATPアーゼによるNa⁺輸送反応におけるNtpKリングイオン結合部位のダイナミッ

クな構造変化はないことが示唆された。

(4) 腸内連鎖球菌液胞型ATPアーゼ(V-ATPアーゼ)のNtpKサブユニットのGlu139Asp変異体(kE139D)はpH10において塩化ナトリウムに対する耐性を失ったが塩化リチウムに対する耐性を保持していた。精製kE139D V-ATPアーゼ変異酵素はナトリウムイオンに比べてリチウムイオンに対して比較的高い比活性と親和性を保持していた。V-ATPアーゼのkE139残基は、その酵素活性のために不可欠であり、腸球菌の耐塩性に直結していることを明らかにした。

(5) V-ATPアーゼのV₀部分でNtpKリングとともにイオン輸送経路を形成するNtpIサブユニットの構造を明らかにする上で、NtpIに作用する特徴的なリガンドの作用機作の解明も有効なアプローチの一つである。V-ATPアーゼ/F-ATPase共通してトリブチルスズにより特異的に阻害を受けることから、NtpI(a)サブユニットにトリブチルスズ作用点であることが示唆されている。腸球菌V-ATPアーゼのNtpIサブユニットは他のV-ATPアーゼ/F-ATPaseと異なりトリブチルスズにより活性阻害を全く受けない特徴的な性質を有することを明らかにし、トリブチルスズ作用機作を考察する上で重要な知見のひとつを提示した。

(6) V-ATPアーゼによるATPの加水分解は、中心軸DサブユニットとFとdサブユニットで連結されているcリングで構成されている中央のローター複合体の回転を引き起こす。2.0Å分解能で腸内連鎖球菌のV-ATPアーゼのDF複合体の結晶構造の解析に成功した。Dサブユニットの構造は、V-ATPアーゼ活性の促進に効果があるユニークな短いβ-ヘアピン領域と長い左向きのコイルドコイルを含んでいた。Fサブユニットは、Dサブユニットの中央部分に結合されていた。A3B3触媒部分の複合体に入り込んで、活性調節部分として機能すると考えられるFサブユニットのC末端ヘリックスは、3つのヘリックスバンドルを形成することにより、Dサブユニットとの密接な結合に関与していた。DとFのサブユニットのいずれも、dサブユニットをcリングに結合するために必要であることがわかった。これらの知見から、V-ATPアーゼのローター複合体(DFdcリング)全体の構造モデルを提示した。

(7) V1触媒部分の単位であるNtpA₁-B₁複合体はAMPPNP存在下で安定であり、3.4 Åの分解能で結晶化に成功した。V1触媒部分であるNtpA₃-B₃-D複合体の結晶化に成功した。

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6件)

- ① Saijo S, Arai S, Hossain KM, Yamato I, Suzuki K, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Murata T. Crystal structure of the central axis DF complex of the prokaryotic V-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108(50):19955-19960. 査読有
- ② Mizutani K, Yamamoto M, Suzuki K, Yamato I, Kakinuma Y, Shirouzu M, Walker JE, Yokoyama S, Iwata S, Murata T. Structure of the rotor ring modified with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide of the Na⁺-transporting vacuolar ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 108(33):13474-13479. 査読有
- ③ K. M. Mozaffor Hossain, Satoshi Arai, Shinya Saijo, Yoshimi Kakinuma, Takeshi Murata, and Ichiro Yamato Expression and purification of the central stalk subunits of Na⁺-translocating V-type ATPase from *Enterococcus hirae* African Journal of Biotechnology Vol. 10(13), pp. 2406-2413, 2011 査読有
- ④ Kawano-Kawada M, Takahashi H, Igarashi K, Murata T, Yamato I, Homma M, Kakinuma Y. Significance of the glutamate-139 residue of the V-type Na⁺-ATPase NtpK subunit in catalytic turnover linked with salt tolerance of *Enterococcus hirae*. J Bacteriol. 2011 193(14):3657-3661. 査読有
- ⑤ Arai S, Yamato I, Shiokawa A, Saijo S, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Murata T. Reconstitution in vitro of the catalytic portion (NtpA3-B3-D-G complex) of *Enterococcus hirae* V-type Na⁺-ATPase. Biochem Biophys Res Commun. 2009 390(3):698-702. 査読有
- ⑥ Chardwiryapreecha S, Inoue T, Sugimoto N, Sekito T, Yamato I, Murata T, Homma M, Kakinuma Y. Tributyltin sensitivity of vacuolar-type Na(+)-transporting ATPase from *Enterococcus hirae*. J Toxicol Sci. 2009 34(5):575-579. 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① Miyuki Kawano-Kawada, Tomoki Iwaki, Toshiaki Hosaka, Takeshi Murata, Ichiro Yamato, Michio Homma, Yoshimi

Kakinuma, Mutagenesis of the residues forming ion-binding pocket of NtpK subunit of *Enterococcus hirae* V-ATPase, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月15日

- ② 西條慎也, 新井聡史, 山登一郎, 柿沼喜己, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, *Enterococcus hirae*由来V₁-ATPaseの結晶構造解析、第84回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2011年9月22日
- ③ 新井聡史, 西條慎也, 山登一郎, 柿沼喜己, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, 腸内連鎖球菌由来V-ATPaseのNtpA₃-B₃複合体の構造と非対称性形成機構、第84回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2011年9月22日
- ④ 水谷健二, 山本三沙岐, 山登一郎, 柿沼喜己, 本間道夫, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, Structure of the Na⁺ unbound rotor ring modified with N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide of the Na⁺-transporting V-ATPase 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド 2010年12月9日
- ⑤ 山本三沙岐, 水谷健二, 山登一郎, 柿沼喜己, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, V型ATPaseのサブユニット集合機構、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド 2010年12月9日
- ⑥ 新井聡史, 西條慎也, 山登一郎, 柿沼喜己, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, 腸内連鎖菌由来V₁-ATPaseのアセンブリーとNtpA₁-B₁中間複合体の構造解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド 2010年12月8日
- ⑦ 村田武士, 西條慎也, 新井聡史, 鈴木花野, 水谷健二, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 柿沼喜己, 山登一郎, 横山茂之, 岩田想, V₁-ATPaseの発現精製とX線結晶構造解析、第36回生体エネルギー研究会、大阪大学銀杏会館 2010年11月19日
- ⑧ 水谷健二, 山本三沙岐, 山登一郎, 柿沼喜己, 白水美香子, John E. Walker, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, 阻害剤DCCDが結合したV-ATPaseローターリングの構造、第36回生体エネルギー研究会、大阪大学銀杏会館 2010年11月18日
- ⑨ 山本三沙岐, 水谷健二, 山登一郎, 柿沼喜己, 石塚芳子, 寺田貴帆, 白水美香子, 横山茂之, 岩田想, 村田武士, V型ATPase

のサブユニット集合機構、第36回生体
エネルギー研究会、大阪大学銀杏会館
2010年11月18日

- ⑩ 山本 三沙岐、水谷健二、柿沼喜己、山登
一郎、岩田想、村田武士、腸内連鎖球菌V
型ATPaseの膜内在性サブユニット(NtpI)
の発現と精製、第47回日本生物物理学会
年会 アスティ徳島、2009年11月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)
愛媛大学・農学部・教授
研究者番号：80134394

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

村田 武士 (MURATA TAKESHI)
千葉大学・理学部・特任准教授
研究者番号：80415322