

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15060

研究課題名（和文）一分子計測法で明らかにするV-ATPaseの機能と構造の相関

研究課題名（英文）Functional and Structural Relationship of V-ATPase Revealed by Single-Molecule Observation

研究代表者

大友 章裕 (Otomo, Akihiro)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：30886560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：回転型ATPaseの機能と構造の相関解明を目的として、ナトリウムイオン輸送性EhV-ATPaseの回転1分子計測、ATP合成能の検証に取り組んだ。EhV-ATPase全複合体の回転運動を可視化することに成功し、イオン輸送と関連したステップを明らかにした。新たに実験系を構築し、EhV-ATPaseがナトリウムイオンの電気化学ポテンシャルによってATPを合成することを初めて実証した。期待以上の成果としてATPase間の大規模配列比較に基づく変異導入により、EhV-ATPaseをプロトン輸送性へと機能転換することができた。これらの成果は生体内エネルギー変換の理解に貢献するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

回転型ATPaseは生体内エネルギー変換装置として生命科学のみならず、ナノテクノロジー分野においても重要なタンパク質である。これまで理解が不十分であった、イオン輸送部位の回転機構や機能の可逆性、イオン選択機構を明らかにした本成果は、新たな分子モーターの創生や細胞機能制御への展開が期待できる。定量的なナトリウムイオン輸送の検出やATP合成時の回転運動の可視化など今後の課題も明確になり、学術的にも意義が深い。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the correlation between the function and structure of rotary ATPases, I undertook observations of single-molecule rotation, ATP synthesis measurement, and functional conversion for the sodium-ion transporting EhV-ATPase. I successfully visualized the rotational motion of the entire EhV-ATPase complex, revealing steps associated with ion transport. A new experimental system was constructed, and for the first time, it was demonstrated that EhV-ATPase can synthesize ATP driven by the electrochemical potential of sodium ions. A comprehensive sequence comparison among ATPases allowed us to convert the function of sodium-ion transporting EhV-ATPase to proton transport. These achievements contribute to our understanding of energy conversion within living organisms.

研究分野：生物物理

キーワード：V-ATPase 1分子観察 ナトリウムイオンポンプ ATP合成酵素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とする腸球菌由来 V-ATPase (EhV₀V₁) は、ATP 加水分解駆動のナトリウムイオン (Na⁺) ポンプである (図 1 上)。EhV₀V₁ は 9 種類のサブユニットで構成される超複合体を形成し、可溶性の EhV₁ モーターでの ATP 加水分解反応と膜内在性の EhV₀ モーターでのイオン輸送とが、回転運動を介して連動する。これまでの構造研究により、EhV₁ では一回転あたり 3 つの ATP 加水分解を触媒するのに対して、EhV₀ では 10 個の Na⁺ が輸送されることが分かっている (図 1 下)。すなわち、EhV₀V₁ では一回転あたりに消費する ATP と輸送される Na⁺ の比は非整数 (3.3) となるが、この構造上のミスマッチが回転中にどのように解消されるかはよく分かっておらず、回転運動の素過程の解明が必要であった。これまでの研究で、単離した EhV₁ モーターを用いて ATP 加水分解時の回転の素過程が明らかになっている (Minagawa et al. *JBC* 2013, Iida et al. *JBC* 2019)。一方で、過去に行われた EhV₀V₁ の回転 1 分子観察では、EhV₀ の構造に起因するであろうステップ間の停止時間が短く、定量的な解析が困難であった (Ueno et al. *JBC* 2014)。したがって、Na⁺ 輸送と関連した素過程の解明が急務であった。

また、EhV₀V₁ と ATP 合成酵素 (F₀F₁) との構造類似性から、EhV₀V₁ は生体膜を介した Na⁺ の電気化学ポテンシャルによって ATP を合成すると期待されるが、EhV₀V₁ による ATP 合成の実証例はない。これを実証するためには、適切に Na⁺ 駆動力を印加して合成される ATP を検出する実験系の構築が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、V-ATPase における回転イオン輸送機構と機能の可逆性を明らかにするために、(1) Na⁺ 輸送が律速となる条件下で EhV₀V₁ 全複合体を用いた回転 1 分子観察を行い、Na⁺ の結合・解離や輸送と共役した EhV₀ のステップを実証すること、(2) Na⁺ 駆動力による EhV₀V₁ の ATP 合成の有無、すなわち EhV₀V₁ の可逆性を検証すること、の 2 つを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質試料の調製には、すでに構築されている大腸菌発現系を用いた (Ueno et al. *JBC* 2014)。EhV₁ の回転子 A-subunit に Avi-tag を導入し、表面にストレプトアビジンを修飾した直径 40 nm の金ナノ粒子を付加した。ガラス表面を Ni-NTA で修飾し、EhV₀ の回転子 c-ring に His-tag を導入することで、基板の上にタンパク質を固定化した。532 nm のレーザー光を用いた全反射型の暗視野顕微鏡によって、金ナノ粒子の散乱像を高速度カメラで取得し、ATP 添加後の回転 1 分子観察を行った。

実験を進めるにあたり、回転 1 分子観察に用いる試薬等から意図しない Na⁺ が混入することが分かった。そこで融合結合プラズマ発光分析法を用いて、様々な試薬中の Na⁺ 濃度を定量し、Na⁺ の混入が最小限になるよう工夫した。

ATP 合成能の検証のために、脂質二重膜からなるリポソームに界面活性剤で可溶化した EhV₀V₁ を再構成したプロテオリポソーム (PLs) を調製した。膜内外の Na⁺ 濃度勾配 (ΔpNa) と、カリウム-バリノマイシン拡散電位で形成される膜電位 ($\Delta \psi$) の和で記述される Na⁺ の電気化学ポテンシャル (Sodium motive force, SMF) を印加し、合成される ATP をルシフェリン-ルシフェラーゼ発光を検出することで定量した。

4. 研究成果

(1) EhV₀V₁ 全複合体を用いた回転 1 分子観察

過去の研究では、ステップ間の停止時間が短いために定量的な解析が困難であった。そこで EhV₀ のイオン輸送経路である固定子 a-subunit のイオン取り込み口に存在するグルタミン酸をアラニンに置換した変異体 aE634A を作製した。この変異体の回転速度は野生型の約 10 倍遅くなったが、野生型と同様 Na⁺ 濃度依存性を示した。この変異体の回転 1 分子観察を行い、金ナノ粒子の重心解析より得られた回転軌跡から、観察されたステップの大きさ、ステップ方向、ステップ間の停止時間の長さを解析した。

Na⁺ 輸送が律速となる条件 (低 Na⁺ 濃度、高 ATP 濃度) では、1 回転あたり 10 個の停止点と約 36 度のステップが得られた (図 2 左)。回転方向と逆向きにステップするバックステップはほと

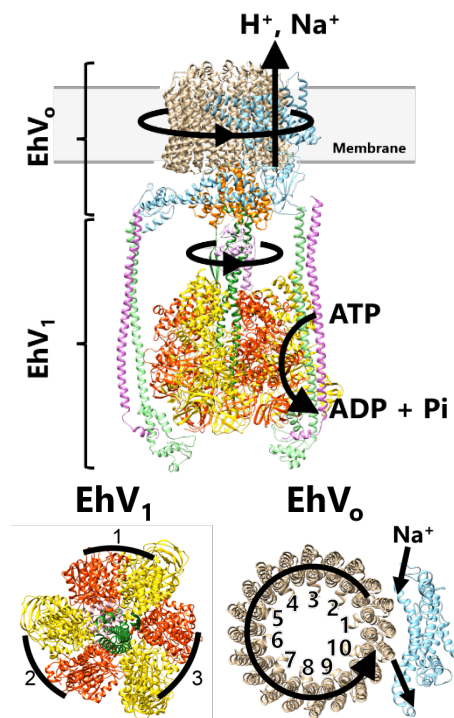


図 1. EhV₀V₁ の全体構造および EhV₁, EhV₀ の構造対称性 (Raymond et al. *Commun. Biol.* 2023) .

んど観察されなかった。異なる Na^+ 濃度下での観察により、ステップの大きさは Na^+ 濃度に依存せず約 36 度であること、ステップ間の停止時間の時定数が Na^+ 濃度に比例していることが分かった。1 回転あたり 10 個の停止点と約 36 度のステップは、 EhV_0 の回転子 c-ring のイオン結合数から見積もられる値と一致しており (図 1 下)、さらに停止時間の Na^+ 濃度依存性から、観察されたステップは c-ring のイオン結合部位への Na^+ の結合によって引き起こされることが明らかとなった。次に、 Na^+ と ATP 両基質の結合が律速となる条件 (低 Na^+ 濃度、低 ATP 濃度) での 1 分子観察を行ったところ、1 回転あたり 13 点の停止点が得られた (図 2 右)。興味深いことに、この条件下では 36 度よりも小さなバックステップと回復ステップが頻繁に観察された。 EhV_1 は 3 か所の ATP 結合 (触媒) 部位を持つため、13 点の停止点は EhV_0 への Na^+ の結合角と EhV_1 への ATP 結合角が互いにずれていることを意味しており、 EhV_1 と EhV_0 間の硬い共役成分を示唆する。36 度以下のバックステップ/回復ステップは EhV_1 と EhV_0 の互いの停止角への遷移を示していると考えられ、回転型 ATPase のイオン輸送において提案されているブラウンラatchet機構を支持する。本研究では初めて Na^+ 輸送に起因したステップを検出できたが、ここで用いたタンパク質試料は界面活性剤で可溶化した状態であるため、生体膜を介したイオン濃度勾配については考慮できていない。生理環境下での EhV_0V_1 の回転イオン輸送機構を明らかにするために、生体膜中での 1 分子観察や機能解析が今後の課題である。

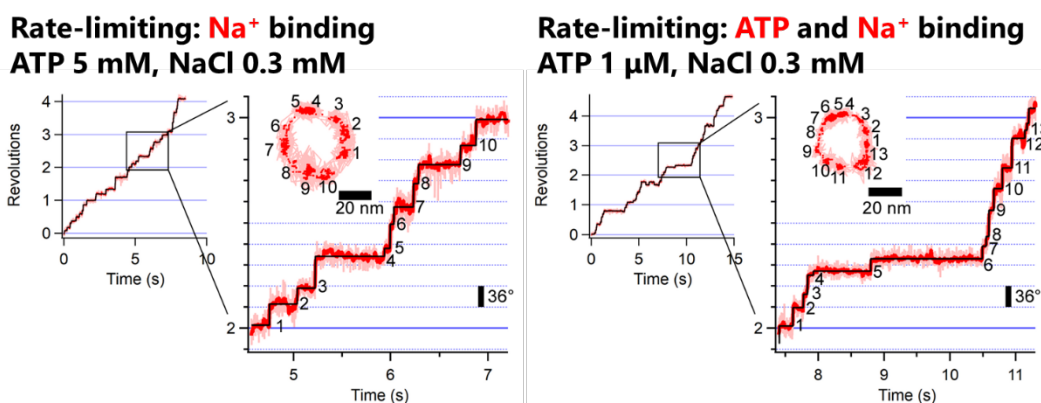


図 2. $\text{EhV}_0\text{V}_1\text{-aE634A}$ 変異体の回転軌跡。 Na^+ 結合が律速となる条件では一回転あたり 10 点の停止点が、 Na^+ と ATP 両基質が結合律速となる条件では 13 点の停止点が観察された。

(2) Na^+ 駆動力による EhV_0V_1 の ATP 合成

図 3 に示すように、大きなナトリウムイオン駆動力下 (269 mV, 10.5 $k_B T$) で、 EhV_0V_1 による ATP 合成を示す発光強度の増大が観測された。ATP 合成活性の ADP およびリン酸 (P_i) の基質濃度依存性により、ミカエリスメンテン定数 (K_m)、 k_{cat} を解析した。ADP、 P_i それぞれの K_m 値は 21 μM と 2.1 mM であった。これらの値は ATP 合成酵素である F_0F_1 や TtV_0V_1 とほぼ同等であり、ATP 合成時の基質の親和性に大きな違いがないことが明らかとなった。

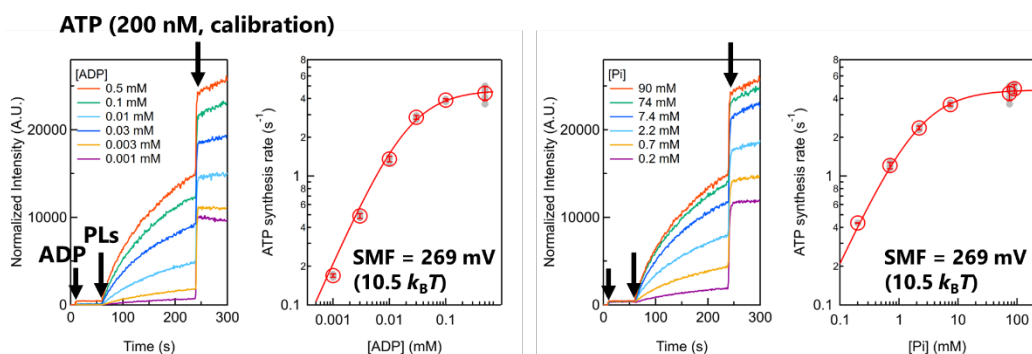


図 3. EhV_0V_1 の Na^+ 駆動力による ATP 合成活性測定のための ADP 濃度依存性 (左) と P_i 濃度依存性 (右)。プロテオリポソーム (PLs) 添加に伴う発光強度より ATP 合成活性速度を算出した。

次に、 $\Delta p\text{Na}$ と $\Delta\psi$ の駆動力としての反応速度論的等価性を調べた。図 4 に一定の $\Delta p\text{Na}$ を印加した際の $\Delta\psi$ 依存性 (赤) と一定の $\Delta\psi$ を印加した際の $\Delta p\text{Na}$ 依存性 (青) を示す。 $\Delta\psi$ に比べて $\Delta p\text{Na}$ の寄与はわずかに大きいものの、ATP 合成速度への両者の寄与はほぼ同等であると結論した。

最後に、 Na^+/ATP 比を決定するために、様々な ATP、ADP、 P_i 濃度下での、ATP 合成速度と加水分解速度が釣り合う熱力学的平衡点における SMF (SMF_{eq}) を求めた。得られた Na^+/ATP 比の値は 3.2 であり (図 5)、構造対称比から予想される値 (3.3) とほぼ一致した (図 1 下)。こ

のことは、 EhV_0V_1 では ATP 加水分解・合成と Na^+ 輸送が緊密に結合していることを示しており、熱力学的な EhV_0V_1 の可逆性が明らかとなった。

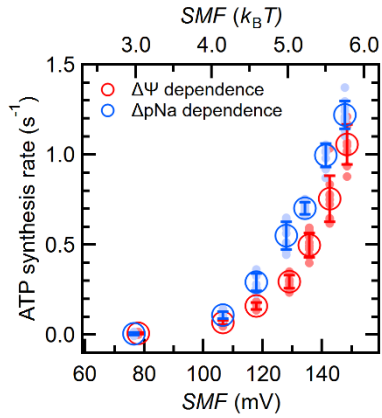


図 4. EhV_0V_1 の ATP 合成速度の膜電位依存性 (赤) と ΔpNa 依存性 (青) .

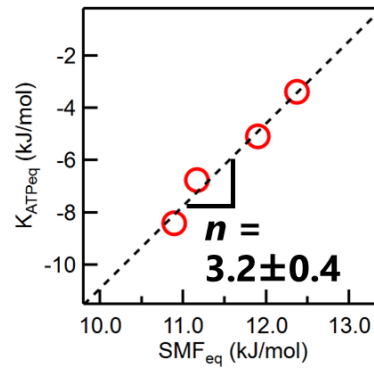


図 5. ATP 合成・加水分解速度が釣り合う熱力学的平衡点での ATP の化学ポテンシャルに対する SMF_{eq} のプロット. 傾き n は Na^+/ATP 比を示す.

以上、当初予定していた EhV_0V_1 全複合体を用いた回転 1 分子観察を行い、2 つのモーターの共役機構の一端を明らかにした。また、新たな実験系の構築により EhV_0V_1 の ATP 合成能を初めて実証することができた。さらに期待以上の成果として、様々な生物種由来の V_0V_1 、 F_0F_1 のイオン結合部位のアミノ酸配列を比較し、抽出した H^+ 輸送型の特徴を EhV_0V_1 に変異導入することで、 Na^+ 輸送型から H^+ 輸送型への機能改変に成功した。現在、この機能改変体の構造解析や回転特性、イオン輸送能を解析中である。これらの成果は回転型 ATPase における生体エネルギー変換機構の解明に大きく寄与する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Otomo Akihiro, Iida Tatsuya, Okuni Yasuko, Ueno Hiroshi, Murata Takeshi, Iino Ryota	4. 巻 119
2. 論文標題 Direct observation of stepping rotation of V-ATPase reveals rigid component in coupling between Vo and V1 motors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2210204119	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 Otomo Akihiro, Mizuno Misao, Inoue Keiichi, Kandori Hideki, Mizutani Yasuhisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein dynamics of a light-driven Na ⁺ pump rhodopsin probed using a tryptophan residue near the retinal chromophore	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v20.s016	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 Nishida Jun, Otomo Akihiro, Koitaya Takanori, Shiotari Akitoshi, Minato Taketoshi, Iino Ryota, Kumagai Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Sub-Tip-Radius Near-Field Interactions in Nano-FTIR Vibrational Spectroscopy on Single Proteins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 836 ~ 843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.nanolett.3c03479	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大友 章裕, Lucy Gao Hui Zhu, 山本 真由子, 大国 泰子, 飯野 亮太
2. 発表標題 Sodium motive force-driven ATP synthesis of EhV-ATPase
3. 学会等名 第12回分子モーター討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友 章裕, Lucy Gao Hui Zhu, 原島崇徳, 飯野 亮太
2. 発表標題 腸球菌由来V-ATPaseはナトリウムイオン駆動力でATPを合成する
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友章裕
2. 発表標題 1 分子散乱イメージングによる回転分子モーター V-ATPaseの回転機構の解明
3. 学会等名 第9回バイオダイナミクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友 章裕, Lucy Gao Hui Zhu, 山本 真由子, 大國 泰子, 原島崇徳, 飯野 亮太
2. 発表標題 腸球菌由来V-ATPaseはナトリウムイオン駆動力でATPを合成する
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第49回討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大友 章裕, Lucy Gao Hui Zhu, 山本 真由子, 大國 泰子, 飯野 亮太
2. 発表標題 腸球菌由来V-ATPaseはナトリウムイオン駆動力でATPを合成する
3. 学会等名 2023年度 生物物理学会中部支部討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiro Otomo, Ryota Iino
2. 発表標題 Integrated research on rotary V-ATPase approached by single-molecule observation, biochemical assay, and protein engineering
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Otomo, Tatsuya Iida, Hiroshi Ueno, Takeshi Murata, Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of rotary V-ATPase
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Otomo, Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of Na ⁺ -pumping V-ATPase
3. 学会等名 2022 East Asian Single-Molecule Biophysics Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友 章裕、原島 崇徳、飯野 亮太
2. 発表標題 生体内エネルギー変換機構の解明に向けた回転モータータンパク質改変体の創生
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第48回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友 章裕, Song Chihong, Raymo, N. Burton-Smith, 富井 健太郎, 村田 和義, 小嶋 誠司, 飯野 亮太
2. 発表標題 多重配列アライメントとスクリーニング法による新規モータータンパク質の創生
3. 学会等名 令和4年度 日本生物物理学会 中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友章裕、大國泰子、今弥生、飯野亮太
2. 発表標題 V-ATPaseのイオン結合部位を改造した新規モータータンパク質作製の取り組み
3. 学会等名 令和3年度日本生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友章裕、飯田龍也、上野博史、村田武士、飯野亮太
2. 発表標題 Enterococcus hirae由来V-ATPaseは”硬い”カップリングで対称性の不一致を気にせず回転する
3. 学会等名 第47回日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大友章裕、飯田龍也、上野博史、村田武士、飯野亮太
2. 発表標題 Direct Observation of Stepping Rotation of V-ATPase Reveals Rigid and Non-integer Coupling between Vo and V1 Motors
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------