

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370059

研究課題名(和文) 構造・機能解析による回転分子モーターの起源の解明

研究課題名(英文) The elucidation of origin of rotor in rotary ATPase/synthases by functional and structural analysis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究で明らかになったこと

(1) べん毛モーターのFliJをV-ATPaseの回転素子であるA3B3と混合したところ、複合体を形成した。ATP分解活性がA3B3に比べ増大したことから、FliJが軸として働いていることが示唆された。改変したFliJの回転が観察できた。FliJが軸の起源であることが示唆された。(2) 触媒サブユニットAのドメイン交換キメラを作成した。ADP阻害が起こる頻度が、ヌクレオチド結合ドメインとC末ドメインの組み合わせで決まることがわかった。(3) V-ATPaseの中心回転軸がF-ATPaseのものとは大幅に異なることが再構成実験によりわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that FliJ of bacterial flagella motor is possibly an origin of the rotor in rotary ATPase/synthase such as V- or F-ATPases. Actually, FliJ shows a rotor like function in A3B3 based on both biochemical and structural analysis. This strongly suggests that the rotor domains of the rotary ATPases and the flagellar export apparatus share a common evolutionary origin. Domain-swapped chimeric V1 consisting of both *T. thermophilus* and *E. hirae* enzymes were generated. Analysis for these enzymes indicated that the interaction between the nucleotide binding and C-terminal domains of the catalytic A subunit critical in reduction of the ADP inhibition. Based on the reconstituted experiments, we proposed a model in which the relationship between V1-DF and Vo-C corresponds to that between a slotted screwdriver and a head of slotted screw, consistent with our previous result in which the central rotor apparatus is not the major factor for the association of V1 with Vo.

研究分野：生化学、生物物理学、構造生物学

キーワード：bioenergetics V-ATPase FoF1 ATP synthase molecular motor molecular evolution flagellar motor rotary motor

1. 研究開始当初の背景

(1) F-ATPase (F_0F_1) および V-ATPase (V_0V_1) は、回転触媒機構で ATP 合成・分解とプロトンの輸送をエネルギー共役させる回転分子モーターである。基本的な分子構造は類似しており、複数のサブユニットからなる外周固定子複合体と中心回転子複合体からなる (図 1)。回転子である F- または V-DF は、固定子である六量体と複合体を形成し、ATP 駆動性のモーター (F_1/V_1) を形成する。遺伝子融合実験より、先祖型の V-D と V-F 遺伝子が融合して F- が分子進化したらしいことが示唆された。

(2) 分担研究者の今田らは、べん毛モーターの FliJ を構造解析し、V-D や F- の棒状領域と似た構造を持つことを明らかにした。また、V-ATPase の A_3B_3 と FliJ を共発現させると ATPase 活性を持つ A_3B_3J 複合体が形成された。以上のことから、べん毛モーターの輸送装置と F/V-ATPase のサブユニットやドメインとの間に相関があることが示された。

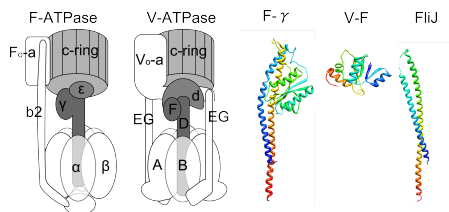


図 1. F/V-ATPase の模式図 (白色: 外周固定子複合体、灰色: 中心回転子複合体) と、F- γ 、V-D、べん毛の FliJ の結晶構造。

2. 研究の目的

(1) 回転子サブユニットの起源

前述のように、FliJ が F_1/V_1 の回転子の起源である可能性がある。FliJ が固定子に対して回転する回転子の役割を持つことを、回転 1 分子計測により証明する。べん毛由来の FliJ₆FliJ は、非常に不安定で ATPase 活性も低いため、比較的安定で ATPase もあるキメラ複合体 A_3B_3J の回転を証明する。F- の球状ドメインや V-F と似た構造を持つべん毛タンパク質として、CheY や FliA の球状ドメインがある。V-D や FliJ とのキメラサブユニットを作成し、回転子としての機能を 1 分子回転計測で証明する。サブユニット、およびドメイン間の機能互換性を調べ、且つ構造に基づいたホモロジー解析を組み合わせることで、回転子サブユニットの起源を明らかにする。

(2) 外周固定子の起源

V-ATPase の外周固定子は、EG 複合体と膜内

在性固定子サブユニットである V_0 -a の親水性ドメインから形成される (図 1)。電子顕微鏡による解析から複数本の外周固定子の存在が示唆されており、外周固定子が 1 本である F-ATPase のものとは異なる。また、F- にはない特徴的なバルジ構造が V-A に存在する (図 1)。べん毛モーターの FliH の結晶構造解析により、EG との間に構造相関性が高い部分があることがわかった。外周固定子の起源を、ドメインを欠失させたサブユニット、キメラサブユニット、キメラ複合体の形成・機能解析を通して明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 回転子の起源を明らかにするために、分子種間のキメラ回転子サブユニット、キメラ回転複合体を再構成し、1 分子回転計測、生化学計測により、回転子としての機能を検定する。構造解析や変異導入実験により、機能に必要なアミノ酸残基、モチーフを明らかにし、ホモロジー解析と組み合わせ、回転子の起源となるサブユニット、ドメイン候補を明らかにする。F-ATPase と V-ATPase の回転子の構造・機能解析を進め、両者の進化的関連を明らかにする。

(2) 外周固定子 EG の起源を明らかにするために、キメラ外周固定子から V-ATPase を再構成する。固定子としての機能を検定し、サブユニット・ドメインの機能互換性を検定する。再構成実験により、外周固定子が複合体形成に果たす役割を調べる。

4. 研究成果

(1) 研究代表者らによる V-ATPase の構造・機能解析により、F/V-ATPase の回転子や外周固定子を構成するサブユニット間の意外な進化的関連性がわかってきた。回転分子モーターを構成するサブユニット・ドメインから機能性キメラサブユニットおよびキメラ複合体を作成し、サブユニットおよびドメイン間の機能相関性を調べた。べん毛と V-ATPase のキメラモーターである A_3B_3J の ATP 駆動性回転を、レーザー暗視野観察系により金コロイド粒子を用いて 1 分子観察した。その結果、軸として完全に機能するものではないことがわかった。一方で、FliJ と同じ構造を持つ軸タンパク質を V_1 の回転子である D サブユニットから作り、 A_3B_3 と再構成させたところ、回転子として機能することがわかった。この事により、FliJ 様のタンパク質が回転分子モーターの軸の起源である可能性が示された。また、べん毛モーターの調節因子である CheY の配列を解析したところ、 V_1 -F サブユニットと部分的であるが、相関性が見られた。構造的にもこの部分が似

ていることが V_1 -F の構造解析論文で示されている。以上の結果から、FliJ のような棒状のタンパク質が軸の先祖として機能し、これに CheY を起源とする球状のタンパク質が会合して V_1 の DF 型の軸が分子進化した、ことが推察された(図2)。さらに V_1 -DF 型の軸で分子融合が起こり、 F_1 -ガンマが分子進化したと考える。この軸の分子進化の道筋が正しいならば、V-ATPase から F_0F_1 が分子進化した、すなわち V-ATPase のほうが F_0F_1 より古いタイプの回転分子モーターとなる。以上の研究成果を、PLoS One 誌上で発表した。

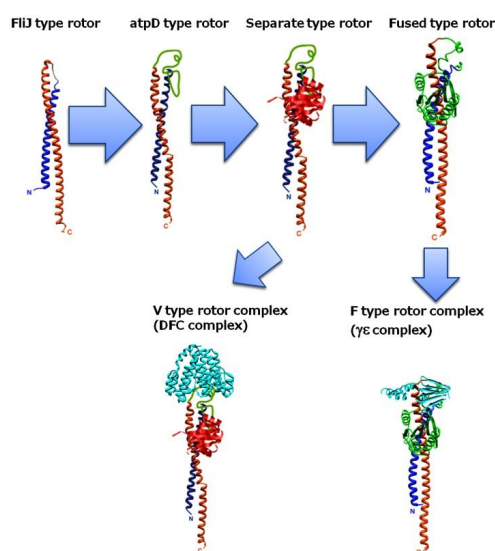


図2. F/V-ATPase の軸の進化経路。FliJ のような単純な棒状タンパク質が軸の起源だと考えられる。

(2) V-ATPase などの回転分子モーターでは、回転子タンパク質が強固な回転子複合体をつくり、これが分子の骨格を成すと予想されてきた。注意深く V-ATPase の構成タンパク質を混ぜあわせると、驚くべきことに回転子タンパク質の一部がない状態でも V-ATPase の基本構造が組み立てられた。回転分子モーターの組立原理における従来の常識を覆し、V-ATPase の構築に固定子が必須であることを明らかにした。この成果をまとめた論文が、2012 JBC best paper として選出された。

(3) V_1 部分の軸の変異体を作成し、発生するトルクを測定した。その結果、軸の球状部分である F サブユニットが完全なトルク発生に必須であることが明らかになった。一方で、ほぼ棒状した軸でも半分のトルクが出たことから、棒に付属しているループ等がトルク発生に関与していないことが示唆された。

(4) V_1 -ATPase が回転する際に、ADP が触媒サイトに留まることにより阻害型になる。こ

れを ADP 阻害と呼ぶ。好熱菌由来の V_1 は、この阻害によってほぼ不可逆的に不活性化するが、腸球菌由来の V_1 は、この阻害に陥らず連続的に ATP を分解する。アミノ酸配列の相同性が 70%以上と高く、構造もほぼ同じであり、この違いがどこに起因するかは未解明であった。そこでドメイン交換により、両方のドメインもつキメラ型 V_1 を作成し、それぞれのキメラ V_1 の ADP 阻害への感受性を調べた。触媒サブユニットの N 末領域(NT ドメイン)、ヌクレオチド結合ドメイン (NB 結合ドメイン)、C 末ドメイン (CT ドメイン)をドメイン交換したが、NB ドメインだけを腸球菌にしても ADP 阻害に感受性を示した。C 末ドメインのみの交換でも同じ性質を示したが、NB および CT ドメインを腸球菌のものに変換すると ADP 阻害不感受性になった。このことから両ドメインの相互作用が ADP 阻害感受性に重要な役割を果たすことが示された。さらに、このキメラはリン酸に対するアフィニティーが高くなっており、リン酸が ADP に先立って取れることで ADP 阻害が起こりやすくなることが明らかになった。

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 10 件)

Nakanishi A., Kishikawa J., Tamakoshi M., Yokoyama K. (2015) 査読有り

The ingenious structure of central rotor apparatus in V_0V_1 ; key for both complex disassembly and energy coupling between V_1 and V_0 .

PLoS One 10: 0119602

DOI: 10.1371/journal.pone.0119602

Kishikawa J., Nakanishi A., Furuike S., Tamakoshi M., Yokoyama K. (2014) 査読有り

Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase."

J. Biol. Chem. Vol. 289(1) pp403-412

DOI: 0.1074/jbc.M113.523498

Kishikawa J., Seino A., Nakanishi A., Tirtom NE, Noji H, Yokoyama K., Hayashi K. (2014) 査読有り

F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase. **Eur Biophys J.** 43, 415-422

DOI: 0.1007/s00249-014-0973

Tani K., Arthur C., Tamakoshi M.,

Yokoyama K., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., Gerle C (2013) 査読有り

Visualization of Two distinct states of disassembly in the bacterial V-ATPase from *Thermus thermophilus*.

Microscopy. Vol. 62(4) pp467-474

DOI: 10.1093/jmicro/dft0201

Kishikawa J., Ibuki T., Nakamura S., Nakanishi A., Minamino T., Miyata T., Namba K., Konno H., Ueno H., Imada K., Yokoyama K. (2013) 査読有り

Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and Flagellar protein export apparatus.

PLoS One Vol. 8(5) e64695

DOI: 10.1371/journal.pone.0064695

Tsuyama T., Kishikawa J., Han Y.W., Harada Y., Tsubouchi A., Noji H., Kakizuka A., Yokoyama K., Uemura T., Imamura H. (2013) 査読有り

In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures.

Anal. Chem. Vol. 85(16) pp7889-7896

DOI: 10.1093/jmicro/dft020

Tritom NE., Okuno D., Nakano M., Yokoyama K., Noji H. (2012) 査読有り

Mechanical Modulation of ATP-Binding Affinity of V_1 -ATPase.

J. Biol. Chem. Vol. 288, pp619-623

Kishikawa J., Yokoyama K. (2012) 査読有り
Reconstitution of Vacuolar type rotary H^+ -ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*.

J. Biol. Chem. Vol. 287(29), pp24597-24603

DOI: 10.1074/jbc.M112.367813

Uner NE., Nishikawa Y., Okuno D., Nakano M., Yokoyama K., Noji H. (2012) 査読有り

Single-molecule analysis of inhibitory pausing states of V_1 -ATPase **J. Biol. Chem.** Vol. 287(34), pp28327-28335

DOI: 10.1074/jbc.M112.381194

Kishikawa J., Fujikawa M., Imamura H.,

Yasuda K., Noji H., Ishii N., Mitani S., Yokoyama K. (2012) 査読有り

Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. **Microsc. Res. Tech.** Vol.75(1), pp15-19

DOI: 10.1002/jemt.21103

[学会発表](計20件)

BaBa Mihori, Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi, Nao Takeuchi, Shou Furuie, Ken Yokoyama

Torque generation mechanism in V_1 motor 日本生物物理学会年会, 札幌, 札幌コンベンションセンター 2014 9.19-20

横山謙

The ingenious structure of central rotor apparatus in V_0V_1 ; torque transmission mechanism in the central rotor of V_0V_1 . 日本生物物理学会年会シンポジウム, 札幌, 札幌コンベンションセンター 2014 9.19-20

Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi: Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase, European Bioenergetics Conference 於ポルトガル/リスボン大学 2014 7.12-13

岸川 淳一、中西 温子、波多野 友香、横山 謙: ドメインスワッピングによる V-ATPase の機能解析 /Functional analysis of V-ATPase using domain swapping techniques. 第14回日本蛋白質化学会年会 於 ワークピア横浜/横浜産貿ホール 2014 6.25-27

岸川淳一, 横山謙: V型回転分子モーターの合成型と分解型をわける分子基盤. 第三回分子モーター討論会, 東京都 東大, 2014 7.19-20

横山謙

V_1 と V_0 間の回転力の伝わり方. 分子モーター討論会, 大阪市 阪大, 2014 6.19-20

横山謙

Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase. ATPase symposium, 東京都 東大, 2014 5.14-15

中西温子, 岸川淳一, 横山謙: V-ATPase の中心回転軸におけるトルク伝達機構, 日本生体エネルギー研究会 39 第回討論会, 静岡市, 静岡コンベンションセンター2013 12.18-2

T.W. Ijiri, J. Kishikawa, H. Imamura, M. Sakiie, S. Ueno, Y. Iwao, K. Yokoyama, K. Sato: ATP quantification and live-imaging in *Xenopus laevis* oocyte. The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, 京都国際会館 Japan, 2013 10.28-30

J. Kishikawa, A. Nakanishi, S. Furuike, K. Yokoyama: Analysis of the MgADP-inhibition mechanism of V_0V_1 by domain swapping approach. The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, 京都国際会館 Japan, 2013 10.28-30

Nakanishi, J. Kishikawa, K. Yokoyama: Binding interface between rotor subunits with low binding affinity in V_0V_1 . The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, 京都国際会館 Japan, 2013 10.28-30

J. Kishikawa, A. Seino, A. Nakanishi, N.E. Tirtom, H. Noji, K. Yokoyama, K. Hayashi: F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase. The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan: Kyoto, 京都国際会館 Japan, 2013 10.28-30

中西温子, 岸川淳一, 横山謙: V-ATPase の中心回転軸におけるトルク伝達機構, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, パシフィコ横浜 2013 9.11-13

J. Kishikawa, A. Nakanishi, S. Furuike, M. Tamakoshi K. Yokoyama: Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, パシフィコ横浜 2013 9.11-13

横山謙: 膜輸送体研究の新展開. 第 4 回 膜輸送体研究会、富良野市、新富良野プリンスホテル、2012 12/29

中西温子, 岸川淳一, 横山謙: 好熱菌 V-ATPase の回転力伝達におけるドライバー様構造の役割, 日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会, 岡山市, 岡山大学 2012.12.22-24

岸川淳一, 中西温子, 横山謙: 好熱菌 V-ATPase の再構成とドメインキメラ V_1 を用いた ATP 合成/分解反応, 日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会, 岡山市, 岡山大学 2012.12.22-24

横山謙, 中西温子, 岸川淳一: ねじれに

よる回転分子モーターのエネルギー伝達機構の可能性, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012.12.14-16

岸川淳一, 中西温子, 横山謙: ドメインキメラを用いた V-ATPase の ADP 阻害機構の解明, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012.12.14-16

J. Kishikawa, K. Yokoyama: Reconstitution of Vacuolar type rotary H^+ -ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. The 17th European Bioenergetic conference: The Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany, 2012.9.15-20

〔その他〕

ホームページ

URL:<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokok/en/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

今田 勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学 理学研究科 教授
研究者番号: 40346143