

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770091

研究課題名(和文) 基質非結合状態のプロトン輸送性ピロホスファターゼのX線結晶解析と作動機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase

研究代表者

三村 久敏 (Mimura, Hisatoshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30463904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：プロトン輸送性ピロホスファターゼは、ピロリン酸を分解することによって得られたエネルギーを利用し、膜を横切ったプロトンの輸送を行なう膜タンパク質である。本研究ではピロリン酸を結合していない状態の構造をX線結晶解析によって明らかにするため、植物の液胞膜から精製した酵素を用いてピロリン酸を加えない条件下で結晶化を行なった。結晶は、ピロリン酸を結合していない状態の酵素を特異的に認識する抗体断片を用いることにより、抗体断片が酵素に結合した複合体で得られた。最初の結晶はX線を4.1 分解能まで反射した。結晶化条件とクワイオ条件を最適化することにより、得られる分解能を3.2 まで向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Proton-translocating inorganic pyrophosphatase is a membrane protein that uses the energy from the hydrolysis of inorganic pyrophosphate to transport protons across biological membranes. This study used X-ray crystallography to determine the structure of this enzyme without bound pyrophosphate. The enzyme was purified from the plant vacuolar membrane and crystallized in the absence of pyrophosphate. Crystals were grown in a complex with an antibody fragment that specifically binds to the enzyme in the absence of bound pyrophosphate. The initial crystals showed a diffraction resolution of 4.1 angstrom. This resolution limit was improved to 3.2 angstrom by optimizing the conditions of crystallization and cryoprotection.

研究分野：生化学・構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膜タンパク質 プロトンポンプ 高等植物 結晶化 X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

(1) H⁺-PPase の生理機能

膜貫通型ピロホスファターゼ (M-PPase) はピロリン酸 (PPi) を基質として利用するイオンポンプである。PPi を分解して 2 個のリン酸 (Pi) を生じ、その分解エネルギーを利用して H⁺ または Na⁺ の能動輸送を行なう。H⁺ を運ぶタイプ (H⁺-PPase)、Na⁺ を運ぶタイプ (Na⁺-PPase)、H⁺ と Na⁺ を運ぶタイプ (H⁺/Na⁺-PPase) が存在する。生体膜を挟んで形成された H⁺ の濃度勾配を利用し、PPi を合成するタイプ (H⁺-PPi synthetase) も存在する。

研究対象であるプロトン輸送性ピロホスファターゼ (H⁺-PPase) は植物に広く分布し、一部の細菌や古細菌、マラリア原虫等の寄生性原生動物に存在するが、ヒトを含む動物には存在しない。H⁺-PPase の生理機能は主に高等植物における研究によって理解されてきた。植物細胞における H⁺-PPase はその大部分が液胞膜に局在し、大きく分けて二つの生理機能が理解されている。第一は細胞質からの PPi の除去であり、第二は液胞の酸性化である。

まず、第一の機能について説明する。H⁺-PPase の基質である PPi は、DNA や RNA、タンパク質、セルロースといった生体高分子の合成、脂肪酸の酸化、ショ糖の代謝等において生成される副産物である。細胞質に蓄積した PPi はこれらの細胞内反応を阻害するため、細胞内の PPi は速やかに分解されなければならない。動物細胞の場合、この役割は可溶性 PPase が担っている。可溶性 PPase によって分解された PPi のエネルギーは単に熱として放出される。一方、植物細胞の細胞質には可溶性 PPase の活性がほとんど検出されない。植物細胞における PPi は、主に液胞膜に局在する H⁺-PPase によって分解される。H⁺-PPase は細胞質における代謝を間接的に促進していると言える。

次に第二の機能について説明する。H⁺-PPase が局在する液胞は、成熟した植物細胞において体積の 90% 以上を占めることもある巨大なオルガネラである。液胞は植物細胞における物質の貯蔵庫として機能し、その内部には Na⁺ や Ca²⁺ 等の様々な無機イオン、糖、有機酸、アルカロイド等の二次代謝産物が蓄積され、野菜や果物の甘味や酸味を産み出している。液胞内に蓄積される様々な物質は、それぞれを特異的に認識する輸送体が液胞膜に局在し、それらの働きを通して細胞質から液胞内に運ばれる。輸送体の中には液胞内外の pH 差 (すなわち H⁺ の濃度勾配) を利用し、H⁺ を液胞内から細胞質に出す代わりに、液胞内に蓄積される予定の物質を細胞質から液胞内に入れるものが多く存在する。これを実現するため、一般的に植物細胞の細胞質の pH が 7.2 付近であるのに対し、液胞内の pH は 5.5 前後に維持されている。このような液胞の酸性化は液胞膜に局在する 2 種類の H⁺ ポンプ、V-ATPase と H⁺-PPase によって達成される。V-ATPase が利用するのは、生物にとって共通のエネルギー通貨であり、細胞にとって貴重な ATP である。これに対し、H⁺-PPase が利用するのは生体高分子の合成で副産物として生じ、

細胞にとっては不要な PPi である。芽生え期にあるような若い細胞では、生体高分子の合成は特に活発であり、大量の ATP が必要とされる。細胞の成長に合わせて液胞も当然大きくなるので、このような状況下の植物細胞は貴重な ATP を節約するため、副産物として大量に生成される PPi を液胞の酸性化のために利用する。H⁺-PPase は V-ATPase と共に液胞の酸性化に寄与し、植物細胞にとって重要な液胞機能を支えていると言える。

植物細胞における生理的な重要性に加え、応用面においても H⁺-PPase の重要性は知られている。例えば H⁺-PPase を過剰発現させた植物体は、おそらく液胞機能が強化されることにより、耐塩性や耐乾燥性が大きく向上する。さらに、細胞質への蓄積が細胞代謝を抑制することに繋がる PPi の除去効果により、生長促進やバイオマス増大の効果が期待されている。一方、寄生性原生動物では、H⁺-PPase は酸性カルシウムと呼ばれる細胞内オルガネラの膜に局在することが知られており、*in vitro* の実験からは、H⁺-PPase の酵素活性を特異的に阻害する PPi 類似物質がマラリア原虫の成長を抑制することが報告されている。そのため、マラリア原虫等の寄生性原生動物に対する薬剤開発において、H⁺-PPase の標的分子としての可能性が言及されている。

(2) H⁺-PPase の構造と反応サイクル

高等植物の H⁺-PPase は分子量約 8 万の単一ポリペプチドからなる。生化学的解析からは H⁺-PPase はホモダイマーを形成し、モノマーは 16 本の膜貫通ヘリックスを含むことが明らかにされてきた。2012 年に 2 種類の M-PPase の結晶構造が相次いで報告されている。ひとつはヤエナリ (*V. radiata*) 由来の植物液胞膜の H⁺-PPase であり、酵母で発現された (リコンビナント H⁺-PPase)。非分解性の PPi アナログである PNP を結合した構造が 2.35 Å 分解能で報告されている。もうひとつは高熱性細菌の *T. maritima* 由来の Na⁺-PPase である。同じく酵母で発現され、基質を結合していない状態の構造と 2 つのリン酸を結合した状態の構造が 2.6 Å と 4.0 Å 分解能で報告されている。M-PPase の単量体が 16 本の膜貫通ヘリックスから構成され、ホモ二量体を形成することが結晶構造からも確認された。さらに機能上の基本単位は単量体であり、活性部位は単量体に独立して存在することも明らかにされている。単量体の構造は 16 本の膜貫通ヘリックスが筒状に並んだ構造をしている。単量体の中心には種を越えて保存されたアミノ酸残基を多く含む 6 本の膜貫通ヘリックス (M5、M6、M11、M12、M15、M16) が位置する。この 6 本のヘリックスにより、単量体の細胞質側には PPi 結合部位が形成される。PPi 結合部位は、4 本のヘリックス (M5、M6、M12、M16) によって膜内から液胞内腔側にかけて形成されたカチオン排出チャンネルに繋がっている。これらの報告からは類似した反応サイクルのモデルが提案されている (図 1)。しかしながら、リコンビナント H⁺-PPase の構造は、

おそらくクリスタルパッキングの影響により、本来のコンフォメーションをとっていないように思われ、提案された反応サイクルもそのために間違っているように思われる。Na⁺-PPase の反応サイクルもまた、リコンビナント H⁺-PPase の構造を参照して提案されており、そのモデルは間違っているように思われる。これらの反応サイクルでは、細胞質側と液胞内腔側を隔てるひとつのゲートがあり、PPi の結合または分解によってそれが開き、H⁺または Na⁺の輸送が起こると提案されている。しかしながら、このモデルは、M-PPase のイオンポンプとしての性質の多くを説明することができていない。例えば、輸送されるカチオンはどのようにして選択されるのか、輸送の方向性はどのようにして決定されるのかという点である。H⁺-PPase は 1 分子の PPi の分解につき 1 個の H⁺を運び、10,000 倍の H⁺濃度勾配に逆らって H⁺輸送を行なうことができ、この反応は electrogenic である。これらの現象についても、このモデルは説明することができないように思われる。PPi 分解とカチオン輸送の間の共役機構についても説明されてはいない。

これらの報告とは独立して植物液胞膜の H⁺-PPase の結晶構造の決定に成功している。実験材料にはヤエナリの液胞膜から精製した酵素を用いた。複数の状態の構造決定に成功しており、特に重要であるのは PPi 結合状態と Pi 結合状態の構造である。PPi 結合状態は PPi の非分解性のアナログである PNP を結合している。Pi 結合状態は PPi の分解産物である Pi を 1 つ結合している。PPi 結合状態のコンフォメーションは、同じ PNP を結合しているにも関わらず、リコンビ

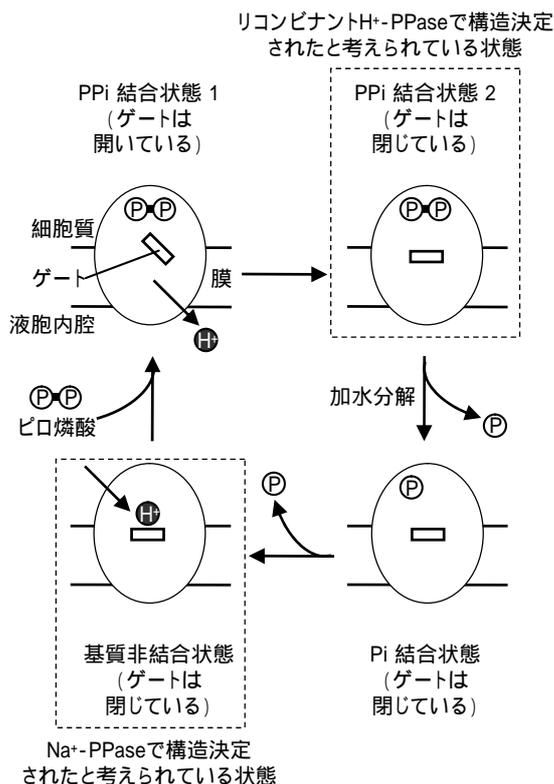


図 1 これまでに提案されている M-PPase の反応サイクル

ナント H⁺-PPase の構造とは異なっている。リコンビナント H⁺-PPase のコンフォメーションはむしろ Pi 結合状態の構造に近かった。PPi 結合状態と Pi 結合状態のコンフォメーションの比較からは、これまでに提案されたものとは異なる反応サイクルのモデルが推測された (図 2)。このモデルでは反応サイクルは基本的に 4 つの状態から構成され、1 分子の PPi の加水分解につき、1 個の H⁺が細胞質側から内腔側に膜を横切って輸送される。

2. 研究の目的

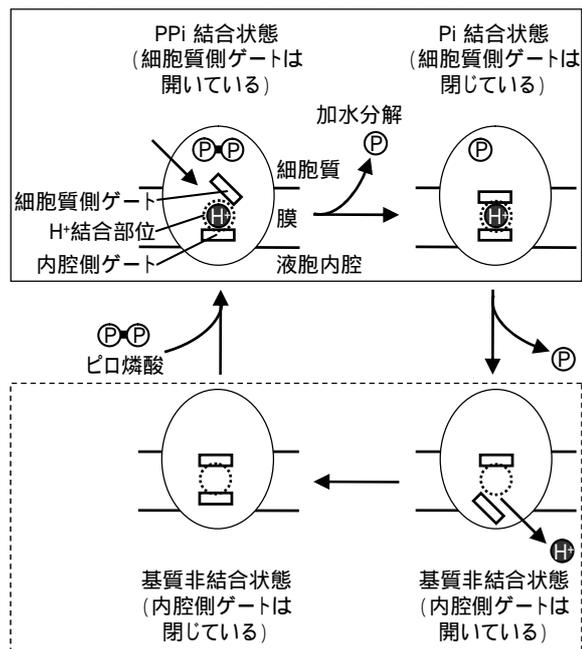
最終的な目標は H⁺-PPase の作動機構を理解することである。そのためには少なくとも反応サイクルの全ての状態の原子構造を X 線結晶解析により決定する必要がある。本研究ではその一環として、まだ構造決定されていない H⁺-PPase の基質を結合していない状態の結晶構造の決定を目的とした。残された状態の構造決定は、すでに発表されている反応サイクルを否定し、PPi 結合状態と Pi 結合状態の構造から推測される反応サイクルの正当性を確認するためにも重要である。

3. 研究の方法

(1) H⁺-PPase の精製

X 線結晶解析によって原子構造を決定するためには、解析対象とするタンパク質の結晶が必要である。結晶を作製するためには、対象とするタンパク質を高度に精製することが望ましい。H⁺-PPase の精製は、抗体断片を利用し、植物組織を材料として行なった。まず、緑豆もやしの胚軸から液胞膜を調製した。液胞膜は界面活性剤を加えることによって可溶化し、H⁺-PPase を含

これまでに結晶構造を決定したと考えられる状態



結晶構造から存在が予想される状態

図 2 PPi 結合状態と Pi 結合状態の結晶構造から推測される H⁺-PPase の反応サイクル

む液胞膜タンパク質の画分を抽出した。H⁺-PPase を特異的に認識する抗体の断片 (Fv) を大腸菌発現系であらかじめ合成しておき、液胞膜タンパク質画分に加え、H⁺-PPase と結合させた。Fv には Strep-tag が付加されており、これと Strept-tactin カラムとの間の特異的な相互作用を利用し、アフィニティー精製によって H⁺-PPase と Fv の複合体を単離した。PPi の類似物質と高濃度の塩を両方含む条件では H⁺-PPase と Fv の間の相互作用が弱まる性質を利用し、そのような条件のバッファーを用いて平衡化したゲル濾過カラムに通すことにより、H⁺-PPase と Fv を分離した。H⁺-PPase を含む画分を濃縮し、透析によってバッファー交換を行った後、結晶化のためのサンプルとした。

(2) H⁺-PPase の結晶化

基質を結合していない状態の H⁺-PPase を結晶化するため、2 つの条件を検討した。ひとつは H⁺-PPase と抗体断片の共結晶化である。もうひとつは H⁺-PPase 単体での結晶化である。共結晶化には、PPi が含まれるバッファーを用いると H⁺-PPase に反応しなくなる (すなわち、基質を結合していない H⁺-PPase のみを特異的に認識する) 抗体からパepsin 消化によって切り出された抗体断片 (Fab) を用いた。共結晶化に際し、Fab は精製したサンプルに直接加えた。結晶化はハンギングドロップによる蒸気拡散法によって行なった。

(3) X 線回折データの測定、解析

得られた結晶の回折データの測定は、大型放射光施設 SPring-8 (播磨) のビームライン BL41XU において行った。測定したデータは、分子置換法による構造決定に用いた。

4. 研究成果

(1) 基質を結合していない状態における H⁺-PPase の結晶化

抗体断片との共結晶化と単体での結晶化の両方で結晶が得られた (図 3)。抗体断片との共結晶化で得られた結晶の方が、X 線を当てた際に

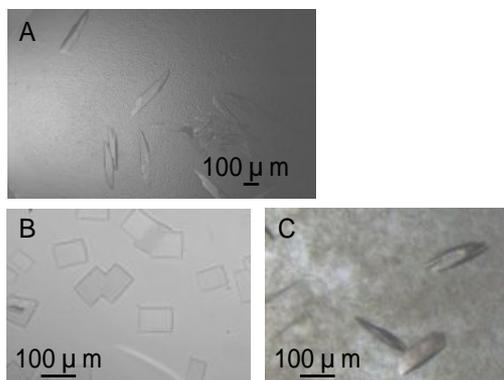


図 3 基質を結合していない状態の H⁺-PPase の結晶

A. H⁺-PPase と Fab の複合体の結晶。B, C. H⁺-PPase 単体の結晶。異なる結晶化条件において結晶が得られている。

得られる反射等の性質が優れていたため、こちらについて主に条件検討を進めた。H⁺-PPase と抗体断片の共結晶のうち、初期に得られたものは 4.1 程度の分解能を示した。結晶化条件とクライオ条件を広範囲に渡って検討したところ、分解能は 3.2 まで改良された。

(2) 基質を結合していない状態の H⁺-PPase の構造

構造決定は分子置換法によって行い、H⁺-PPase の PPi 結合状態の構造をサーチモデルとして用いた。電子密度マップからは H⁺-PPase の単量体 1 分子につき 1 分子の Fab の結合が確認された (図 4)。結晶化に用いた Fab は基質を結合していない状態の H⁺-PPase を特異的に認識するため、基質を結合していない状態の H⁺-PPase の構造が得られていると考えられる。現在はまだモデリングの途中であるが、H⁺-PPase の基質を結合していない状態の構造決定は、より信頼性の高い反応サイクルのモデルを確立することに繋がると期待される。反応サイクルからは、基質を結合していない状態には内腔側ゲートを開いている状態と内腔側ゲートを閉じている状態の 2 つが存在すると推測される (図 2)。今回決定された構造がどちらの状態を表しているかは現在のところまだ分かっていないが、残された状態が次の課題となるであろう。



図 4 基質を結合していない状態の H⁺-PPase と Fab の複合体の結晶構造
H⁺-PPase の単量体 (点線) につき 1 分子の Fab (実線) が結合している。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 久敏 (MIMURA, Hisatoshi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 30463904