

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650039

研究課題名(和文) 1分子 VoV1 によるプロトン輸送の測定

研究課題名(英文) Measurement of proton pump activity by single molecule of VoV1

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：VoV1 は、ATPを分解してプロトンを輸送する回転分子である。ATP 1分子の分解で輸送されるプロトンの数 (proton/ATP ratio, P/A 比)を求めるため、極微小体積のチャンバーを利用し、1分子 VoV1 のプロトン輸送活性を測定した。予想より低いP/A 比が見積もられたが、プロトンのリークが原因と考えられる。そこで、脂質分子にpH指示薬を結合させたリポソームを用いてプロトン輸送活性を測定し、P/A 比は 3-4 の間になった。初めて実験的に求められた VoV1 の P/A 比であり、この結果、V1 と Vo 間のエネルギー共役が tight であることが実験的に示された。

研究成果の概要(英文)：VoV1 is a rotary molecular motor which pumps protons across the membranes coupled to ATP hydrolysis reaction in V1 portion.

In this project, we first tried to measure proton pump activity of single molecular VoV1 using micro chambers system. The estimated proton/ATP ratio (P/A ratio) is much lower than the theoretical value of 4. This might be due to a leak of proton from the micro chambers. Then we measured the P/A ratio by using a liposome system including pHrode as a pH probe in the membranes. We estimated the P/A ration of 3-4. This result suggests the energy coupling between the V1 and Vo is tight.

研究分野：生化学、生物物理学、構造生物学

キーワード：V-ATPase ATP synthase proton pump molecular motor rotation

1. 研究開始当初の背景

(1) V-ATPase (V_0V_1) は、回転触媒機構で V_1 部分の ATP 合成・分解と V_0 部分でのプロトンの膜横断移動をエネルギー共役させる回転分子モーターである。 V_1 部分で ATP を 3 分子分解すると V_1 部分の回転軸が 360 度回り、これと繋がっている V_0 部分の回転リングも 1 回転する。好熱菌 *Thermus thermophilus* V_0V_1 では、 V_0 部分の回転リングにプロトン(水素イオン)結合部位が 12 あるので、3 ATP で 12 プロトンが輸送されると信じられている。ATP 1 分子あたり輸送されるプロトン数、Proton/ATP ratio (P/A 比) は、よって 4 と見積もられる。しかしながら、定量的にプロトン輸送活性を測定した例はなく、P/A 比はあくまで構造に基づいた理論値にすぎなかった。輸送を行うタンパク質におけるエネルギー変換効率は明らかにすべき重要な性質であり、そのためにも P/A 比を実験的に求める必要がある。

(2) 連携研究者の横川や東大の渡辺らによって作成されたマイクロチャンバーは、体積が小さいため 1 タンパク質分子が行う輸送の検出を可能にするシステムである。渡辺はこのシステムにより 1 分子プロトン輸送性 ATP 分解酵素計測を可能にした (Watanabe et al, 2014 Nat. Commu)。一方、リポソーム膜に直接 pH プローブを埋め込むことで、定量性の高いプロトン輸送活性測定系が可能になる。

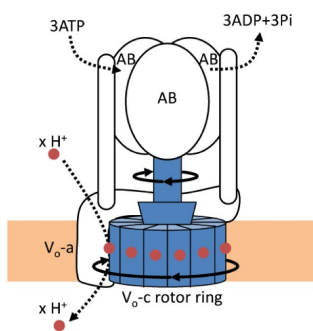


図1. *Thermus thermophilus* V_0V_1 の模式図。3ATP で 1 回転し、12 プロトンを輸送すると考えられる。

2. 研究の目的

前述のように、定量的にプロトン輸送活性を測定した例はない。本研究では、*T. thermophilus* V_0V_1 を材料に、定量的なプロトン輸送量測定系の構築を試みる。渡辺らが開発したマイクロチャンバーを脂質二重膜でシールした系は、1 ないし数分子のプロトン輸送タンパク質による輸送活性測定が可能である。この系を V_0V_1 に適応し、1 分子あ

たりのプロトン輸送活性を測定することで、P/A 比を見積もる。平行してリポソームを用いた定量的なプロトン輸送活性測定系の構築を行う。以上の系により定量的にプロトン輸送活性を測定し、ATP 分解活性と合わせて P/A 比を求める。P/A 比が理論値の 4 に近ければ、 V_1 と V_0 間のエネルギー共役が tight であるといえる。

3. 研究の方法

(1) 微細加工技術を応用したプロトン輸送測定系の構築

微細加工技術により作成した直径数マイクロメートルのチャンバーを用いる。アルミ箔膜からなるチャンバーでは、脂質二重膜を貼るのが困難なため、渡辺らの開発した高分子からなる薄膜上で作成したチャンバーを使用した。開口したチャンバーに pH 指示薬を含む緩衝液を入れる。チャンバー上に二重膜を貼るために、クロロホルムに溶かした脂質を載せ、次に水溶液を表面に流す。この方法でチャンバーが二重膜でシールされる(図2参照)。次にリポソームに再構成した V_0V_1 を添加し、膜融合により V_0V_1 をチャンバー上に張られた二重膜に融合させる。ATP を添加し、各チャンバーの pH 指示薬由来の蛍光変化を全反射型照明の蛍光顕微鏡で測定する。

(2) リポソームを用いたプロトン輸送活性の定量的測定系の構築

従来のプロトン輸送活性測定では、輸送タンパク質を再構成したリポソームを含む緩衝液に pH 指示薬を入れて蛍光変化を測定した。この条件では、溶液中の蛍光がバックグラウンドになり定量的な評価が困難であった。今回、pHrode という指示薬を脂質に結合させ、この脂質から作成したリポソームに V_0V_1 を再構成した。そのため、溶液中の蛍光がなく、蛍光変化によるリポソーム内の pH 変化を定量的に評価できる。プロトン輸送活性は時間あたりのリポソームに輸送されるプロトン数として算出した。リポソーム溶液の ATP 分解活性は、再生系を用いて測定した。プロトン輸送活性と ATPase 活性から P/A 比を求めた。

4. 研究成果

(1) マイクロチャンバーによる V_0V_1 のプロトン輸送活性の測定

渡辺らが開発したマイクロチャンバー系による 1 分子 V_0V_1 プロトン輸送活性を測定した。マイクロチャンバー内に閉じ込めた pH 指示薬の蛍光変化を全反射型蛍光顕微鏡で測定した。いくつかのチャンバーでは蛍光が見られることから、脂質二重膜によりチャンバーがシールされていることがわかる。次

にリポソームに再構成した V_0V_1 を融合させた。

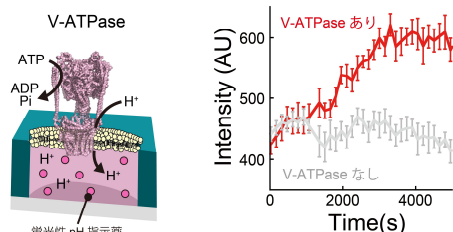


図2. 左: マイクロチャンパーによる V_0V_1 のプロトン輸送活性測定。実際はマイクロチャンパーが並んでいる。右: ATP 添加後のマイクロチャンパー内の蛍光減少。 V_0V_1 によるプロトン輸送に対応していると考えている。

基質飽和状態である 2mM ATP-Mg を添加したところ、いくつかのチャンパーで蛍光の現象が観察された。このことはチャンパーに貼られた膜上の V_0V_1 によりプロトンがチャンパー内に輸送されたことを示す。チャンパーの体積と pH 指示薬からチャンパー内に輸送されるプロトンの個数を見積もった。ATP 飽和条件で V_0V_1 が 1 分子有ると仮定した場合、P/A 比は、1 以下になった。予想される P/A 比 4 に比べると低い。プロトン（オキソニウムイオン）は pH 指示薬よりもはるかに小さい分子で、そのため脂質二重膜と基盤との隙間からリークしている可能性ある。そのためプロトン輸送活性が低く見積もられたと考える。この系で、1 ないし数分子単位での V_0V_1 のプロトン輸送の測定に成功したが、定量性の評価は難しく、系のさらなる改善が必要である。

(2) リポソームを用いたプロトン輸送活性測定による P/A 比の決定

今回用いた *T. thermophilus* V_0V_1 のプロトン輸送活性は、膜電位がないと活性が低い。そのため、カリウム/バリノマイシン系で膜電位を負荷した状態で測定した(図3)。リポソーム内の pH 変化を脂質に結合させた pHrode の蛍光変化で測定した。次式により蛍光変化を pH 変化に変換し、プロトン輸送速度を算出した。

$$pH^{in} = pK_a + \log_{10} \left\{ \frac{f_{in}(F_{max} - F_{pH7}) - (F - F_{pH7})}{(F - F_{pH7}) - f_{in}(F_{min} - F_{pH7})} \right\}$$

F : 蛍光強度 F_{max} : 最大の蛍光強度

F_{min} : 最小の蛍光強度 ΔF : 蛍光強度の変化量

F_{pH7} : pH7 のときの蛍光強度 (初期値)

q_{max} : 最大の量子効率 q_{min} : 最小の量子効率

f_{in} : 内側の pHrodo の割合

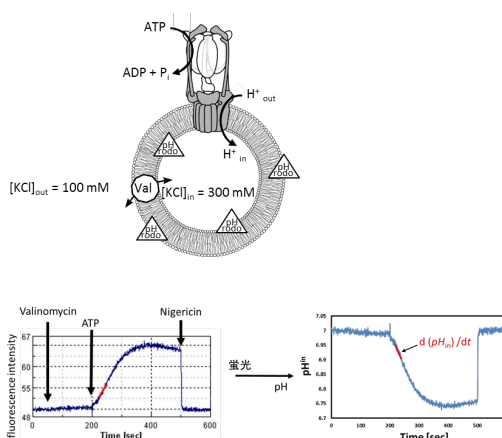


図3. 上: リポソームによる V_0V_1 のプロトン輸送活性測定。膜の内側の pHrode だけが蛍光変化すると考える。カリウムの濃度勾配とバリノマイシンによる膜電位を負荷する。左下: ATP 添加後の蛍光上昇。右下: pH 変化量に変換したもの。これがプロトン輸送活性に対応する。

今回リポソームの直径を 150 nm、 V_0V_1 のリポソームに対する向きを半々と仮定してプロトン輸送活性を算出した。リポソームの ATP 活性を測定し、25 C で P/A 比を求めた。その結果、 $P/A = 3.94 \pm 0.50$ が得られた。実験により初めて求められた P/A 比であり、構造から予想される P/A 比 4 に近い値となった。この結果は、 V_1 と V_0 間のエネルギー共役が tight であることを示唆する。

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3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 e0119602
doi:10.1371/journal.pone.0119602
- Hauer F, Gerle C, Fischer N, Oshima A, Shinzawa-Itoh K, Shimada, S Yokoyama K., Fujiyoshi Y, Stark H (2015) 査読有り
GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure*. pii: S0969-2126 (15) 00291-9.

doi:10.1016/j.str.2015.06.029.

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

[学会発表](計 10 件)

馬場みほ里、岸川淳一、竹内奈央、中西温子、横山謙: V₁ 回転軸のアミノ酸配列と形状の必要性 第 41 回日本生体エネルギー研究会討論会 東京大学(東京都 文京区) 2015 12.21-23

平田かえで、岸川淳一、中西温子、木下一彦、飯田直樹、横山謙: V-ATPase の H⁺/ATP 比の測定 BMB2015 於 神戸ポートアイランド(兵庫県 神戸市) 2015 12.1-4

中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙: クライオ電顕を用いた単粒子解析による V-ATPase 構造解析の試み BMB2015 於 神戸ポートアイランド(兵庫県 神戸市) 2015 12.1-4

Atsuko Nakanishi, Nao Takeuchi, Jun-ichi Kishikawa, Kaoru Mistuoka, Ken Yokoyama: Single particle analysis of *Thermus thermophilus* V-ATPase using an electron microscopy ATPase/synthase, 第 53 回日本生物物理学会年会 於 金沢大学(石川県 金沢市) 2015 9.13-15

BaBa Mihori, Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi, Nao Takeuchi, Shou Furuike, Ken Yokoyama
Torque generation mechanism in V₁ motor 日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市) 2014 9.19-20

横山謙

The ingenious structure of central rotor apparatus in V₀V₁; torque transmission mechanism in the central rotor of V₀V₁. 日本生物物理学会年会シンポジウム, 札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市) 2014 9.19-20

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, 東京大学(東京都 文京区), 2014 7.19-20

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(神奈川県 横浜市) 2014 6.25-27

横山謙

V₁ と V₀ 間の回転力の伝わり方. 分子モーター討論会, 大阪大学(大阪府 大阪市), 2014 6.19-20

横山謙

Molecular basis of ADP-inhibition of V type ATPase/synthase. ATPase symposium, 東京大学(東京都 文京区), 2014 5.14-15

[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: 7 0 2 7 1 3 7 7

(2) 連携研究者

横川 隆司 (YOKOKAWA, Ryuji)

京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 1 0 4 1 1 2 1 6