

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03638

研究課題名(和文) 回転軸のないV1モーターが一方方向に回転運動する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the unidirectional rotation of the rotor-less V1 rotary motor

研究代表者

村田 武士 (Murata, Takeshi)

千葉大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80415322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：V-ATPaseは、A3B3複合体でATPを加水分解し、軸DF部分の回転エネルギー変換を介してイオンを輸送するイオンポンプである。我々は、腸球菌A3B3複合体の結晶構造を明らかにし、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)によりA3B3複合体がATPアナログ依存に一方方向へ回転運動することを見出した。本研究では、A3B3複合体が一方方向に回転運動する分子機構の解明を目的に、ADP結合型およびATP結合型A3B3複合体やその変異体の結晶構造と生化学的性質を明らかにした。得られた結果を総合して、A3B3複合体の分子機構モデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によるA3B3複合体の分子メカニズムの解明は、V1モーターの協動的な反応機構の根本的な理解に重要であるばかりでなく、その他の分子モーターがもつ分子機構の一般原理の理解にも重要であると考えられる。また、V-ATPaseが関連するガン転移や骨粗鬆症などの重要な疾病原因の理解やその治療法についても進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：V-ATPases function as ATP-dependent ion pumps. The hydrophilic V1 portion is known as a rotary motor in which a central axis DF complex rotates inside a hexagonally arranged catalytic A3B3 complex using ATP hydrolysis energy. We previously succeeded in obtaining the crystal structures of the A3B3 complex and the dynamics showing a unidirectional rotation of the complex in the presence of ATP analog by high-speed AFM. In this study, we elucidated the crystal structures and biochemical properties of ADP bound and ATP bound A3B3 complex. Based on these and previous findings, we propose a molecular mechanism of the unidirectional rotation of the rotor-less V1 rotary motor.

研究分野：構造生物学

キーワード：V-ATPase 分子モーター 構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

V 型 ATPase は、細菌からヒトまで多くの生体膜中に存在し、ATP のエネルギーを使ってプロトンを運ぶことで膜内外の pH を調整している。V 型 ATPase はがん細胞や破骨細胞の細胞膜にも存在し、がん細胞の増殖・転移や骨粗鬆症に関与していることが報告されている。V 型 ATPase の分子機構を知ることは、これら疾病の理解に繋がり、V 型 ATPase の阻害剤は治療薬としても期待されている。V 型 ATPase は、親水性の  $V_1$  部分と膜内在性の  $V_0$  部分から構成されている (図 1)。触媒頭部 ( $A_3B_3$  複合体) で ATP が加水分解され、そのエネルギーを使って軸部分 (DGCK) が回転し、これに伴って  $V_0$  部分でプロトンが輸送される。

申請者らは、細菌(腸球菌)の V 型 ATPase がヒト V 型 ATPase と構造的にも機能的にもよく似ていることや、膜内在性の  $V_0$  部分でのイオン輸送に関する生化学的・構造生物学的性質を明らかにした。さらに、親水性の回転軸 DG 複合体や  $A_3B_3$  複合体、 $V_1$  複合体(「ATP 加水分解待ち」構造)の X 線結晶構造を明らかにした。その後、 $V_1$  複合体の「ATP 結合待ち」と「ADP 解離待ち」構造に対応する新しいスナップショット構造を明らかにした。そして、得られた構造と 1 分子回転計測の結果を統合することにより、 $V_1$  複合体の回転分子機構モデルを提案するに至った。

$V_1$  複合体ではヌクレオチド結合と回転軸結合の変化によって構造変化することが明らかになったが、生じた構造変化がどちらの影響であるか判別することができていない。一方、回転軸がない  $A_3B_3$  複合体ではヌクレオチド結合の変化が構造変化に直結するため、解釈が容易となる。しかも驚くべきことに、ヌクレオチドが結合していない  $A_3B_3$  複合体構造は、同じ 3 つの AB ペア(その境界面に ATP 結合部位が存在する)から構成されているにも関わらず完全に非対称であり、それぞれの AB ペアはすべて異なる立体構造を形成していた(図 2-a, b)。ATP 非分解性アナログ (AMP-PNP) 存在下で得た  $A_3B_3$  複合体の結晶構造では、AB ペアの 2 カ所に AMP-PNP が結合し、これにより一部の  $A_3B_3$  複合体の立体構造が変化していた(図 2-c, d)。以上の結果から、 $A_3B_3$  複合体は ATP がない状態で、ATP と結合できない型(ATP 非結合型)、ATP と結合することができる型(ATP 待機型)、ATP と結合している型(ATP 結合型)の ATP に対する異なる親和性をもつ 3 つの AB ペアから構成されていることが示唆された(図 2-a, b)。さらに、高速 AFM (連携研究者の内橋氏との共同研究)により、本  $A_3B_3$  複合体が ATP  $\gamma$ S 依存に一方方向に回転運動することを見出した(未発表)。しかし、それらの分子メカニズムは不明のままであった。

図 1. V 型 ATPase の構造モデル

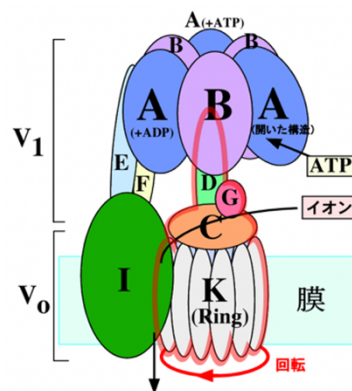
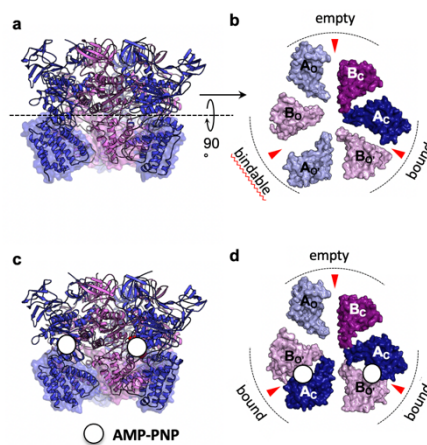


図 2. 腸球菌  $A_3B_3$  複合体の結晶構造



## 2. 研究の目的

本研究では  $A_3B_3$  複合体が一方方向に回転運動する分子メカニズムの解明を目的に、各種ヌクレオチド結合による  $A_3B_3$  複合体の反応中間体構造を明らかにする。これと同時に  $A_3B_3$  複合体のヌクレオチド結合やその親和性測定、ATPase 活性測定などの生化学解析や各種条件下での高速 AFM によるダイナミクス解析を行う。さらに、予想される重要残基の変異体を作製し、その構造機能解析を行う。以上の結果を統合することにより、 $A_3B_3$  複合体が持つ回転運動の分子機構を提案する。最終的には、すでに提案した  $V_1$  複合体の分子機構モデルと比較検討することにより、ヌクレオチドによる構造変化と回転軸による構造変化の役割を解明し、回転分子モーターが持つ本質的な作動原理を明らかにすることを研究目標とする。

## 3. 研究の方法

以下の手順と方法で研究を遂行した。

- (1) 各種ヌクレオチド存在下での  $A_3B_3$  複合体の X 線結晶構造解析
- (2) 各種条件下での  $A_3B_3$  複合体の生化学的解析

- (3) 各種条件下での  $A_3B_3$  複合体の高速 AFM 観察
- (4)  $A_3B_3$  複合体の重要残基変異体の構造機能解析
- (5)  $A_3B_3$  複合体が一方方向に回転運動する分子機構モデルの提案
- (6)  $V_1$  複合体と  $A_3B_3$  複合体の分子機構モデルの比較

#### 4. 研究成果

本研究で得られた成果を以下に記載する。

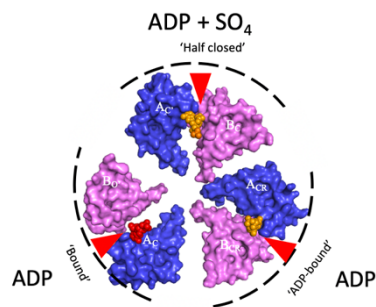
##### (1) 各種ヌクレオチド存在下での $A_3B_3$ 複合体の X 線結晶構造解析

以前の研究により AMP-PNP 結合型と非結合型の  $A_3B_3$  複合体の X 線結晶構造が得られている。本研究では、ADP や AMP-PNP、ADP、リン酸の組み合わせ混合条件下での  $A_3B_3$  複合体の X 線結晶構造解析を行った。

###### ① ADP 結合型 $A_3B_3$ 複合体の X 線結晶構造解析

2.7 Å 分解能で ADP 結合型  $A_3B_3$  複合体の X 線結晶構造解析に成功した (図 3)。ヌクレオチド結合サイトの 3 カ所すべてに ADP が結合したが、各 AB ペアはそれぞれ異なるフォームを形成していた。

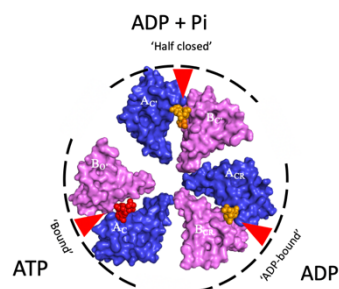
図3. 3ADP結合型 $A_3B_3$ 複合体の結晶構造



###### ② ATP+ADP 型 $A_3B_3$ 複合体の X 線結晶構造解析

ヌクレオチド非結合型  $A_3B_3$  複合体の結晶に ATP、ADP、Pi の混合物を長時間ソーキングすることにより ATP が 1 分子、ADP が 2 分子結合した  $A_3B_3$  複合体の結晶構造解析 (分解能 2.8 Å) に成功した。(図 4)。この構造は ADP が 3 カ所結合した結晶構造と酷似していた。以上のことから、本構造は「ADP 解離待ち」構造に相当することが示唆された。

図4. ATP+2ADP結合型 $A_3B_3$ 複合体の結晶構造



##### (2) 各種条件下での $A_3B_3$ 複合体の生化学的解析

###### ① 等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いたヌクレオチド結合親和性測定

ITC を用いて、 $A_3B_3$  複合体に対する各種ヌクレオチドの結合実験を行なった。そして  $A_3B_3$  複合体への低濃度ヌクレオチドの結合定数を明らかにした。高濃度のヌクレオチドを添加することにより、 $A_3B_3$  複合体の解離が起こる条件も明らかにした。

###### ② ATP 再生系や比色法を用いた ATP 加水分解活性測定

各種条件下での  $A_3B_3$  複合体の ATP 加水分解活性を調べた。ATP 濃度依存性を詳細に調べた結果、2 つ以上の  $K_m$  が存在することが明らかになった。また、ADP とリン酸による阻害効果について明らかにした。

##### (3) 各種条件下での $A_3B_3$ 複合体の高速 AFM 観察 (内橋氏との共同研究)

名古屋大学の内橋氏と共同研究により、ATP  $\gamma$ S 存在下での高速 AFM による腸球菌  $A_3B_3$  複合体の方向性を持った構造変化を捉えることに成功している。本研究では、生化学的解析で得られたヌクレオチドに対する親和性を指標に、ATP 濃度に依存した変化について観察した。そして、低濃度 ATP 存在下で一方方向性の回転運動を捉えることに成功した。

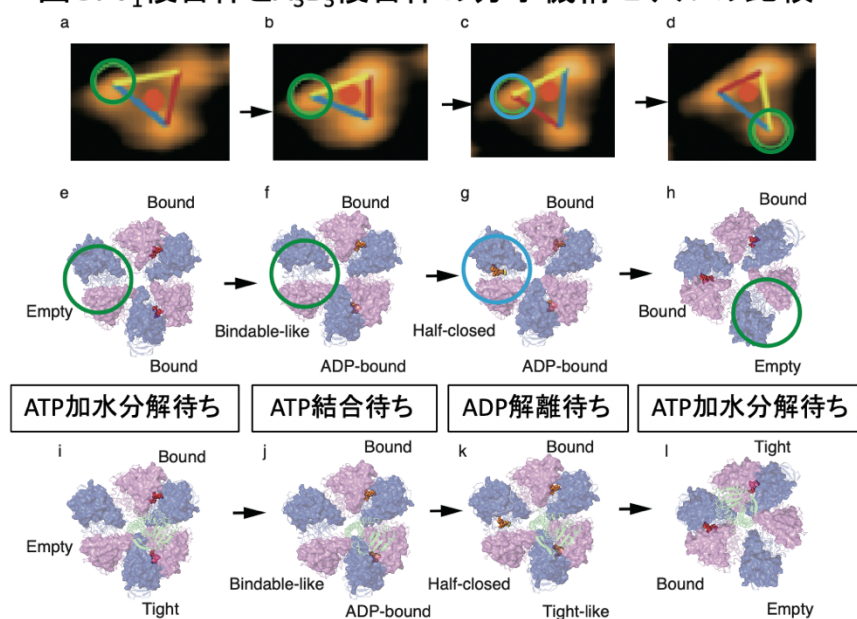
##### (4) $A_3B_3$ 複合体の重要残基変異体の構造機能解析

得られた情報から、N 末ドメインや ATP 結合部位のアミノ酸置換体を作製し、 $A_3B_3$  複合体の構造形成や構造変化に重要と考えられる残基である R350 を同定した。R350K 変異体を発現精製し、複合体形成能や基質結合能、ATPase 活性を明らかにした。さらに本変異体の X 線結晶構造解析にも成功した。得られた構造は野生型と異なり対称構造を形成しており、R350 が  $A_3B_3$  複合体の非対称構造形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

### (5) $A_3B_3$ 複合体が一方方向に回転運動する分子機構モデルの提案

ATP の結合が律速となる条件では、 $A_3B_3$  複合体の一方方向回転運動の頻度が低下していた。また、ATPase 活性は回転軸がある  $V_1$  複合体と比べ、1.5 倍に上昇していた。本研究で得られた構造生物学的・生化学的・生物物理学的解析結果のすべてを総括することにより、 $A_3B_3$  複合体の協同的な分子機構のモデルを提案した (図 5 a-h) (論文準備中)。

図5.  $V_1$  複合体と  $A_3B_3$  複合体の分子機構モデルの比較



a-d. 高速AFMで観察されたスナップショット構造

e-h.  $A_3B_3$  複合体の分子機構モデル

i-l.  $V_1$  複合体の分子機構モデル

### (6) $V_1$ 複合体と $A_3B_3$ 複合体の分子機構モデルの比較

回転軸がない  $A_3B_3$  複合体と  $V_1$  複合体の分子機構の大枠は同じであるが、回転軸が存在することで加水分解する場所が固定され、正確な一方方向回転運動を達成していることが示唆された (図 5 e-l)。回転軸は  $A_3B_3$  複合体の構造変化の中でただ単に回転しているだけでなく、回転分子機構を制御していることが明らかとなった。

本研究による  $A_3B_3$  複合体の分子メカニズムの解明は、 $V_1$  モーターの協同的な反応機構の根本的な理解に重要であるばかりでなく、その他の分子モーターがもつ分子機構の一般原理の理解にも重要であると考えられる。また、V-ATPase が関連するガン転移や骨粗鬆症などの重要な疾病原因の理解やその治療法についても進展することが期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jun Tsunoda, Chihong Song, Fabiana Lica Imai, Junichi Takagi, Hiroshi Ueno, Takeshi Murata, Ryota Iino, and Kazuyoshi Murata	4. 巻 8
2. 論文標題 Off-axis rotor in <i>Enterococcus hirae</i> V-ATPase visualized by Zernike phase plate single-particle cryo-electron microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 15632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI:10.1038/s41598-018-33977-9	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 Shintaro Maruyama, Kano Suzuki, Motonori Imamura, Hikaru Sasaki, Hideyuki Matsunami, Kenji Mizutani, Yasuko Saito, Fabiana L. Imai, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Ichiro Yamato & Takeshi Murata	4. 巻 5
2. 論文標題 Metastable asymmetrical structure of shaftless V1 motor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau8149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI:10.1126/sciadv.aau8149	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 Abhishek Singharoy, Chris Chipot, Toru Ekimoto, Kano Suzuki, Mitsunori Ikeguchi, Ichiro Yamato and Takeshi Murata	4. 巻 10
2. 論文標題 Rotational Mechanism Model of the Bacterial V1 Motor Based on Structural and Computational Analyses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Physiol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI:10.3389/fphys.2019.00046	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 該当する

1. 著者名 Iida Tatsuya, Minagawa Yoshihiro, Ueno Hiroshi, Kawai Fumihiro, Murata Takeshi, Iino Ryota	4. 巻 294
2. 論文標題 Single-molecule analysis reveals rotational substeps and chemo-mechanical coupling scheme of <i>Enterococcus hirae</i> V1-ATPase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17017 ~ 17030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.008947	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 村田武士、鈴木花野	4. 巻 38
2. 論文標題 さまざまな役割をもつヒトV-ATPaseの理解に向けて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 790-796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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17件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 村田武士
2. 発表標題 理論計算を用いた膜蛋白質の耐熱化法の開発
3. 学会等名 第4回蛋白質工学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 New methodologies for human membrane protein crystallography
3. 学会等名 Gordon Research Conference on IGF and Insulin System in Physiology and Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山 慎太郎、鈴木 花野、今村 元紀、佐々木 輝、松波 秀行、水谷 健二、齋藤 靖子、今井 ファビアナ・リカ、石塚(桂)芳子、染谷(木村)友美、白水 美香子、内橋 貴之、安藤 敏夫、山登 一郎、村田 武士
2. 発表標題 N 末端側 パレルドメインのクラウン構造が非対称性を生み、協働性を付与する
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fabiana L Yakushiji, Jun Tsunoda, Chihong Song, Hiroshi Ueno, Ryota Iino, Satoshi Ogasawara, Junichi Takagi, Kazuyoshi Murata, Takeshi Murata
2. 発表標題 Immobilization of conformational state of E.hirae V-ATPase complex using PA tag system for structural analysis
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 N-terminal b-barrel domain constraint gives rise the asymmetrical motor structure of V1-ATPase to provide cooperativity
3. 学会等名 Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田武士
2. 発表標題 回転分子モーターの酵素反応機構の完全理解に向けて
3. 学会等名 第一回量子生命科学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田武士
2. 発表標題 膜タンパク質の構造解析のボトルネックと解決策
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 Molecular mechanism of the structural formation of V1 rotary motor
3. 学会等名 第53回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田武士
2. 発表標題 X線を用いた膜タンパク質の結晶構造解析の展望
3. 学会等名 KEK物質構造科学研究所 設立20周年記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水 康輝、薬師寺 リカ ファビアナ、森山 克彦、後藤 義幸、村田 武士
2. 発表標題 バンコマイシン耐性腸球菌に存在するV-ATPaseを分子標的とした新規抗菌薬の開発
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouki Shimizu, Fabiana Lica Yakushiji, Katsuhiko Moriyama, Yoshiyuki Goto, Takeshi Murata
2. 発表標題 Na <sup>+</sup> -transporting V-ATPase is a new target for drug development against Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE)
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Bioenergetics) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 Development of new antibacterial drug targeting V-ATPase in Vancomycin-resistant Enterococcus
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Bioenergetics) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Maruyama, Motonori Imamura, Takayuki Uchihashi, Kazuya Nakamoto, Kenji Mizutani, Fabiana L. Imai, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Toshio Ando, Ichiro Yamato, Takeshi Murata
2. 発表標題 Combination of high-speed atomic force microscopy and X-ray crystallography reveals the mechanism of the rotary catalysis of a shaftless V1 motor
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Bioenergetics) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Maruyama, Motonori Imamura, Takayuki Uchihashi, Kazuya Nakamoto, Mizutani Kenji, Lica Fabiana Imai, Kano Suzuki, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Tomomi Someya-Kimura, Mikako Shirouzu, Ichiro Yamato, Toshio Ando, Takeshi Murata
2. 発表標題 The combination of high-speed atomic force microscopy and X-ray crystallography reveals rotary catalysis of a shaftless V1 motor
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Iida, Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Fumihiko Kawai, Takeshi Murata, Ryota Iino
2. 発表標題 Chemo-mechanical coupling scheme of rotary molecular motor Enterococcus hirae V1-ATPase revealed by single-molecule analysis
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Burton-Smith Raymond. N, Tsunoda Jun, Yamamori Yu, Miyazaki Naoyuki, Imai Fabiana L., Song Chihong, Tomii Kentaro, Iwasaki Kenji, Takagi Junichi, Ueno Hiroshi, Murata Takeshi, Iino Ryota, Murata Kazuyoshi
2. 発表標題 The off-axis rotor of Enterococcus hirae V-type ATPase by Volta phase contrast cryo-EM
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田武士
2. 発表標題 回転分子モータータンパク質によるプロトン輸送メカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会(招待講演)
4. 発表年 2019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
連携研究者	内橋 貴之 (Uchihashi Takayuki)  (30326300)	名古屋大学・理学研究科・教授  (13901)	
連携研究者	飯野 亮太 (Iino Ryota)  (70403003)	自然科学研究機構・分子科学研究所・教授  (63903)	