

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03648

研究課題名(和文)液胞型 ATPase の全体構造決定を突破口とした回転プロトン輸送機構の解明

研究課題名(英文)Structural analysis for vacuolar type ATPase to reveal molecular mechanism of rotary proton translocation

研究代表者

横山 謙 (YOKOYAMA, Ken)

京都産業大学・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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ATP合成酵素は、膜領域を通るプロトンの流れを回転運動に変換し、ATPを合成するエネルギー変換装置である。本課題研究では、好熱性細菌由来のV/A型ATP合成酵素の全体構造を、低温電子顕微鏡を使った単粒子解析で明らかにした。さらに3つの回転状態を同定し、回転する様子を再現した。次に、Vo部分だけを単離し、クライオ電顕による単粒子解析で、原子分解の密度マップを得ることができ、そこから膜内在性Voの両側からの明確なプロトン移動経路を明らかにした。V1部分およびVo部分の原子モデルからVoV1全体の全原子モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クライオ電子顕微鏡による構造解析は、近年急速に発展した分野であり、生命現象を原子レベルで理解することを可能にする強力な手法である。また、タンパク質を標的とした薬剤設計に有効で、たとえばコロナウイルスの膜タンパク質に対する薬剤開発も可能にする。我々は、早い段階でこの手法に着目し、国内でははじめて複雑な膜タンパク質複合体の構造解析に成功し、この分野の進展に大きく貢献する成果となった。

研究成果の概要(英文)：ATP synthase is an energy-converting molecular machine that converts the flow of protons through the membrane domain into rotational motion to synthesize ATP. In this study, the overall structure of V/A-type ATP synthase from thermophilic bacteria was clarified by single-particle analysis using cryo-electron microscopy. In addition, three rotation states were identified, enabled us to know motion of peripheral stalks during rotation. Then, the Vo portion was isolated and a density map of the atomic resolution was obtained by single-particle analysis using cryo electron microscope, indicating proton pathway from both sides of the membrane. Using these structures, we were able to construct an atomic model of the intact ATP synthase.

研究分野：生物物理学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 構造解析 生体エネルギー変換 V-ATPase ATP合成 エネルギー変換 分子モーター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

液胞型 ATPase (V_0V_1) は、細胞内のリソゾームなどの空胞系の膜に存在するプロトン ATPase で、水素イオン(プロトン)を空胞内に送り込むことで内部を酸性化し、タンパク質の修飾や、分解、エンドサイトーシス、などを支えている。 V_0V_1 は、ミトコンドリアや細菌の細胞に存在する ATP 合成酵素 F_0F_1 と進化的に近い関係にあり、構造も共通性が高く、両者は同様の回転触媒機構で機能すると考えられる。すなわち、可溶性の V_1 部分で起こる ATP の分解・合成と、膜内在性の V_0 部分でのプロトンの膜横断的な移動が、中心回転軸の回転によりエネルギー共役する(図1)。

真核生物の空胞膜から V_0V_1 を調製することが容易ではないため、その分子機構の理解や構造解析は遅れていたが、申請者のグループは、原核生物から V_0V_1 を初めて単離し、その V_0V_1 を材料として V_0V_1 が回転することを初めて証明した。なお、細菌由来の酵素を A type ATPase と呼ぶこともあり、現在では V/A type ATPase と呼ぶことが多い。

我々は、 A_3B_3 サブ複合体、中心回転軸を形成する V_0 -C、 V_1 -F サブユニットの結晶構造を原子分解能で解明し、プロトン透過を担う V_0 部分の L-ring 複合体の構造を、電子線結晶学で明らかにした。一方、研究を申請した段階では、 V_0 部分を含む V_0V_1 全体の構造解明は重要課題として残されていた。膜内在性部分の原子モデルが得られていないものの、プロトン輸送機構に関して、2チャンネルモデル(図2)が提唱されている。 V_0 部分で L-ring が回転するとプロトンが膜を横断して移動する。膜内在性の固定子部分(V_0 -I)にプロトンが入る穴と出る穴があり、L-ring のグルタミン酸残基に結合したプロトンが V_0 -I との接触界面ではずれ、穴から外に放出される。次に別の穴からプロトンが入り、空いたグルタミン酸残基に結合するとされる。

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析(SPA)は、急速凍結したタンパク質試料をクライオ電子顕微鏡で撮影し、その単粒子像から立体構造を計算する構造解析法である。最近、電子を直接検出できる CMOS カメラの登場により、SPA による構造決定の分解能が飛躍的に増加した(分解能革命)。この構造解析技術の発展は、構造生物学分野に革新をもたらし、結晶構造解析では困難であった超分子複合体の構造が、Nature, Science などの一流紙に数多く掲載されるようになった。ATP 合成酵素 F_0F_1 や V_0V_1 においても、6.5~7 Å 分解能の構造モデルがここ 1,2 年で相次いで報告され、予期されなかった横向きの膜貫通ヘリクスの存在が明らかになった。一方、膜内在性部分の分解能は 7 Å 程度で、膜内在性ヘリクスの同定とその大まかな配置の推測にとどまっている。2チャンネルモデルの焦点といえる 2 つの穴の実体について議論するには十分な分解能ではなく、アミノ酸残基の同定が可能な原子分解能に近い構造モデルが必要である。

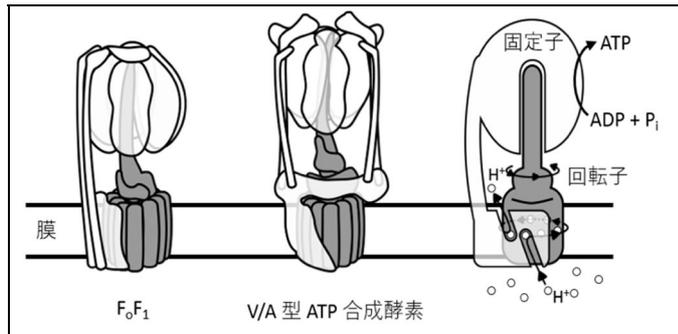


図1. 右 F_0F_1 および 中央 V 型 ATP 合成酵素の模式図. 左: 回転触媒機構の模式図. 膜間でのプロトン駆動力により回転子が回転すると、ADP がリン酸化されて ATP が合成される。

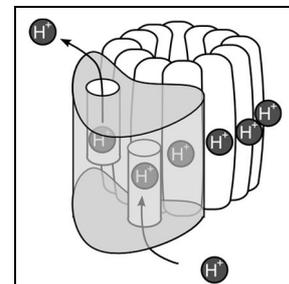


図2. 2チャンネルモデル: 灰色; V_0 -I の膜内在性部分、白色;L ring. 他の領域は省略

2. 研究の目的

本研究提案の目的は、クライオ EM を用いた SPA による構造解析により原子分解能もしくはそれに近い分解能の V_0V_1 の立体構造モデルを得ることで、プロトンが透過する経路を同定する。回転触媒機構の中枢を占めるもっとも大事な仕組み、回転するとなぜプロトンが能動輸送されるか（もしくはプロトンの透過によりなぜ回転するのか）を明らかにする。

Peter Mitchell が 1961 年に化学浸透圧説を提唱してから半世紀以上経つ。回転触媒機構によるプロトン透過機構の解明は、生体エネルギー分野における残された最大の課題となった。本研究で用いられる好熱菌由来の V_0V_1 は、生産性の高さ、酵素自体の安定性から構造・機能解析に適した試料であり、クライオグリッド中でも解離せず複合体を保つ。本研究により、 V_0V_1 の原子分解能モデルが得られれば、 V_0 部分でのプロトン透過に関わる領域の構造が明らかになる。構造情報に基づいた機能解析実験と組み合わせることで、回転触媒機構によるプロトン透過機構が明らかになり、生体エネルギー分野にとって大きな節目となる成果が期待される。

3. 研究の方法

(1) 試料調製およびクライオグリッド調製

蛋白質の構造解析の成否は、構造解析に用いる蛋白質試料の良し悪しで決まることが多い。好熱菌由来の V_0V_1 は、安定性が高く精製法も確立しており、構造機能解析に適している。膜蛋白質の可溶化に使う界面活性剤の選択も構造解析において重要なポイントとなる。可溶化には、安価な TritonX100 を用い、精製する過程で、*N*-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) に置換した。DDM は膜蛋白質の可溶化によく使われる中性の界面活性剤で、 V_0V_1 の可溶化にも適している。さらに、膜タンパク質への結合力が強く、限界ミセル濃度以下でも膜タンパク質の可溶化状態を保てる LMNG という界面活性剤に置換した。これは、界面活性剤の濃度を下げることで、安定してクライオグリッドを作成するためである。界面活性剤のミセルをほとんど含まない条件で、かつ分子長程度の氷厚の領域を含むクライオグリッドを作成し、クライオ EM 画像を撮影する。この時、分子同士が重ならず、且つ画像あたりの単粒子の数が十分あるように試料の濃度を調節する。電子を直接検出できる CMOS カメラ (Falcon II) を搭載した自動データ収集を容易に行えるクライオ EM (Titan Krios) により、クライオ EM 画像を数千枚撮影する。撮影されたクライオ EM 画像を CTF 補正、ドリフト補正した上で、画像解析した。

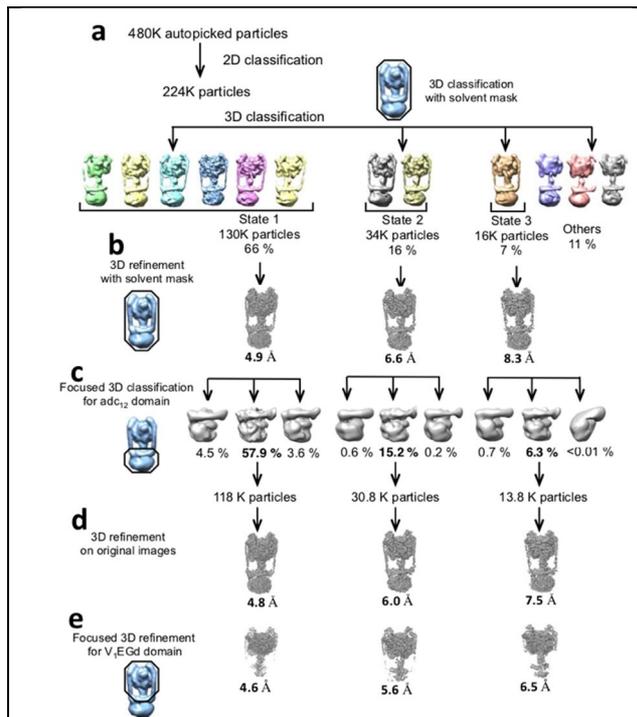


図 3. 単粒子解析の流れ図。クラス分けで、3つの構造を出し、その後、焦点化クラス分けで、 V_0 部分を無視した形で、 V_1 部分の構造精密化を進め、原子分解能に近い密度マップを構築した。

(2) RELION による画像解析と立体構造構築

クライオ EM を用いた SPA による立体構造決定のフローチャートを 図 3 に示す。ドリフト補正されたクライオ EM 画像から、画像解析プログラム RELION 2.0 により、単粒子画像を自動抽出した。1,000 枚程度のクライオ EM 画像から、 $1\sim 1.5 \times 10^5$ 個程度の単粒子画像を抽出できる。抽出した単粒子画像を分類し、似ている画像から 2 次元再構成像のクラスを作成した。S/N の良いクラスをつくる単粒子画像を選別し、選別された単粒子画像の向きを推定し、トモグラフィーで用いられる逆投影法により複数の立体構造を得る (3 次元クラス分け)。最も分解能の高い 3 次元クラスをつくる単粒子画像を使って 構造精密化を行った。今回、最終的に 3 つの回転状態に対応した密度マップを得ることができた。得られた密度マップから溶媒の密度を引くなどの処理により、構造を精密化し、サブユニットやサブ複合体の結晶構造を分子動力学計算で当てはめることで、原子モデルを構築した。

4. 研究成果

得られた構造から、以下のことが議論できた。

(1) 回転に伴う外周部分の動き

1 分子回転観察では、回転軸の回転運動を観察することができるが、回転にともなう他の部分の動きを捉えることができない。今回の構造解析で、回転状態に対応した 3 つの構造を得ることができた。これらの構造は、中心回転軸を構成する F サブユニットの向きで容易に区別できる (図 4)。また、 V_1 部分に存在する 3 つの触媒部位の順番も異なっていた。3 種類の構造をモーフィングすることで、回転に伴う外周固定子の動きを再現することができた。参考文献 1 (Nakanishi et al) の補助資料として動画が upload されており、それを参考にしていきたい。特に、外周固定子棒である 2 本の EG が大きく動いていることがわかった。 V_1 部分が 3 回対称なのに対して、 V_0 部分が 12 回対称であり、このギア比のミスマッチにより回転中に分子全体にねじれが生じ、そのねじれにともなう弾性エネルギーを緩和するために外周固定子が動くのだと解釈している。EG 以外にも、 V_0 部分を構成する a サブユニットの親水性部分の動きも再現された。一方で、a サブユニットの膜内在性部分はほとんど動いていない。これらの動きが、回転触媒機構

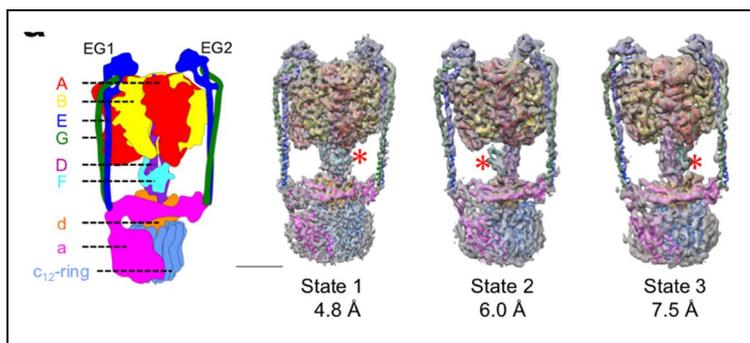


図 4. クライオ EM により決定された 3 つの回転状態に対応した構造。それぞれ、state1, state2, state3 と命名した。アスタリスクは中心回転軸を形成する F subunit の位置を示す。

にどのように貢献するのかは、分子動力学計算による解析が必要であり、今後の課題といえる。

(2) V_1 部分のヌクレオチド結合部位の構造

V_1 部分の 3 つの触媒部位の構造のうち、closed と命名した部位に ADP と考えられる密度が存在した。また、semi-closed と命名した部位にも ADP に対応する密度が確認された。一方、open と命名した部位には、密度が確認できず、ヌクレオチドが結合していないことが明ら

かになった(図 5).つまり、今回構造決定した V_0V_1 は 2つの ADP が結合している構造であった.これは、生化学実験から予想された ADP 阻害型に対応すると思われる.

すなわち、ATP が分解して生成した ADP が触媒部位に結合した状態が保持され、そのために新たな ATP の結合を妨げ、見かけ上 ATP を分解できない状態になっている.他の構造(state2, state3)にも ADP に相当する密度が確認できたことから、構造解析に使用した酵素標品が ADP 阻害型であることがわかった.

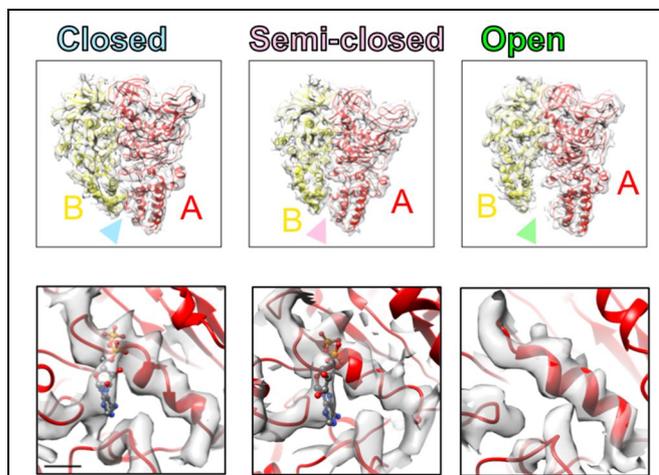


図 5. 触媒部位の構造.closed 部位および semi closed 部位に ADP と類推される密度が観察された.

(3) V_0 部分の構造

V_0 部分が V_1 部分に対して相対的に動いているため、 V_1 部分にくらべると分解能が上がらず、原子モデルの構築に至らなかった.そこで分子動力学計算をつかったモデル構築(MDFF)を行い、原子モデルを構築した.密度マップをみると、細胞質側には、大きな割れ目があり、ここが 2チャンネルモデルで提唱されている細胞質側の半チャンネルと思われる.一方、ペリプラズム側にも、割れ目が確認された(図 6).今回の構造では、プロトン輸送に重要な役割を果たす L サブユニットのグルタミン酸残基や、a サブユニットのアルギニン残

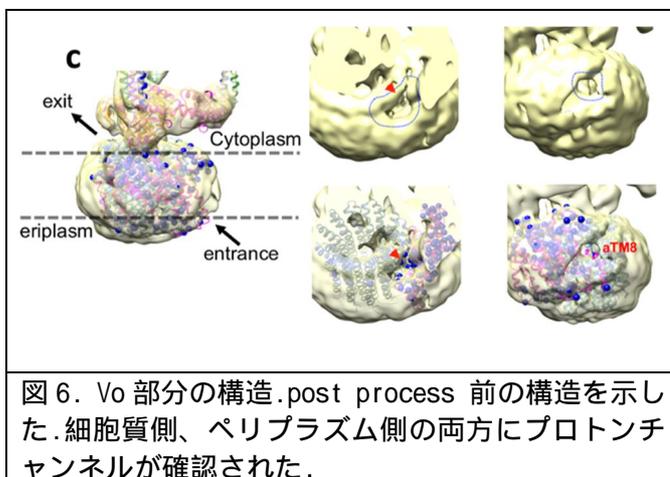


図 6. V_0 部分の構造.post process 前の構造を示した.細胞質側、ペリプラズム側の両方にプロトンチャンネルが確認された.

基の側鎖を明確に同定することはできなかったが、どうやらグルタミン酸残基とアルギニン残基間で塩橋を形成していることが示唆された.さらに分解能が上がれば、プロトン透過経路の全容が明らかになるとと思われる.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Tamakoshi Masatada, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Cryo EM structure of intact rotary H ⁺ -ATPase/synthase from <i>Thermus thermophilus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 02553-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-02553-6	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 Kishikawa Jun-ichi, Inoue Yuki, Fujikawa Makoto, Nishimura Kenji, Nakanishi Atsuko, Tanabe Tsutomu, Imamura Hiromi, Yokoyama Ken	4. 巻 13
2. 論文標題 General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0190213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0190213	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 岸川淳一、中西温子、光岡薫、横山謙	4. 巻 10
2. 論文標題 クライオ電子顕微鏡による液胞型 ATPase (VoV1) の構造解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 京都産業大学所報	6. 最初と最後の頁 99-101
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、表弘志、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 ヒト V-ATPase の発現系構築およびトモグラフィ解析の試み
3. 学会等名 第43回日本生体エネルギー研究会討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> 由来 V 型 ATP 合成酵素の単粒子解析
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による VoV1 の単粒子解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川 淳一、中西 温子、玉腰 雅忠、光岡 薫、横山 謙
2. 発表標題 Structural dynamics of V-ATPase via cryo-EM single molecule 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 Jun-ichi Kishikawa, Mihori Baba, Atsuko Nakanishi, Kaoru Mitsuoka, Ken Yokoyama
2. 発表標題 De novo designed axis works as a rotor of rotary motor
3. 学会等名 European Bioenergetics Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun-ichi Kishikawa, Atsuko Nakanishi, Masatoshi Murai, Kaoru Mitsuoka, Ken Yokoyama
2. 発表標題 Cryo-tomography and sub-tomogram averaging of dimeric F type ATP synthase at bovine sub-mitochondrial particle
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 謙
2. 発表標題 はじめてのクライオ電顕
3. 学会等名 第43回生体エネルギー研究会討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸川 淳一、中西 温子、光岡 薫、横山 謙
2. 発表標題 クライオ EM による好熱菌由来 V 型 ATP 合成酵素の単粒子解析
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 Single-particle analysis of V-type ATPase/synthase from Thermus thermophilus by cryo-EM
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸川 淳一、中西 温子、光岡 薫、横山 謙
2. 発表標題 低温電子顕微鏡を用いたトモグラフィ法によるミトコンドリア膜タンパク質複合体の構造解析の試み
3. 学会等名 第43回生体エネルギー研究会討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 Cryo-EM structure of intact rotary H ⁺ -ATPase/synthase from <i>Thermus thermophilus</i>
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、横山謙
2. 発表標題 Single-particle analysis of <i>Thermus thermophilus</i> VoV1 by Cryo-EM
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都産業大学所報 クライオ電子顕微鏡による液胞型 ATPase (VoV1) の構造解析 岸川淳一、中西温子、光岡薫、横山謙 (2017) 10巻 99-101 https://ksu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=9929&item_no=1&page_id=13&block_id=21</p> <p>研究室のホームページ ようこそ、生体膜エネルギー研究室へ http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokoken/index-j.htm</p>

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
研究 分 担 者	光岡 薫 (MITSUOKA Kaoru) (60301230)	大阪大学・超高圧電子顕微鏡センター・教授 (14401)	