

令和 6 年 7 月 1 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03231

研究課題名(和文)クライオ電子顕微鏡による V型ATPaseの回転機構の解明

研究課題名(英文)Cryo-EM Study of Rotation Mechanism of V-type ATPase

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生命には回転することで働く回転分子モータータンパク質が存在する。生命のエネルギー通貨である ATP (アデノシン三リン酸) の生産や、イオンの輸送を通して細胞の恒常性を支える重要な膜タンパク質である。我々は、回転分子モータータンパク質である V/A-ATPase が回転する様子を、クライオ電子顕微鏡により撮影(スナップショット)し、スナップショットをつなぎ合わせることで、V/A-ATPase の回転を再現し、ATP を燃料として回転する仕組みを明らかにした。今まで提唱されてきたモデルをバージョンアップし、自然が作り出した驚異的な分子機械の仕組みを知ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ATP で駆動する分子モータータンパク質の仕組みに関する重要な知見を得ることができた。また、ユニサイト触媒の分子基盤、定常状態へと移行する過程を解明することができた。このナノサイズで機能する分子機械の仕組みを理解することで、将来のナノマシンの駆動部に応用できる人工分子モータータンパク質設計への応用が期待される。同じ方法で、他のタンパク質の仕組みを解明することが可能であり、今回の研究は、新しいタンパク質研究の世界を切り開く先駆けになる。

研究成果の概要(英文)：Life contains rotational molecular motor proteins that operate by spinning. These proteins are crucial membrane proteins that maintain cellular homeostasis through ATP (adenosine triphosphate) production and ion transport. Using cryo-electron microscopy (cryo-EM), we captured snapshots of the rotation of V/A-ATPase, a rotary molecular motor protein. By stitching these snapshots together, we revealed how V/A-ATPase rotates, fueled by ATP. This updated model provides valuable insights into the remarkable molecular machinery created by nature. Furthermore, we were able to elucidate the structural basis for the uni-site catalytic mechanism that occurs at one of the three catalytic sites.

研究分野：生物物理学

キーワード：ATP V-ATPase ATP synthase molecular motor CryoEM bioenergetics structure biology

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命のエネルギー通貨である ATP の大部分は、ATP 合成酵素が担う酸化的リン酸化により作られる。半世紀におよぶ研究により、ATP 合成酵素が、呼吸によって生じたプロトン駆動力により吸エルゴン反応である ATP 合成を進めること、そのエネルギー変換(プロトン駆動力 ATP 合成)が ATP 合成酵素内での回転運動により達成されることが明らかになった。この回転することで働く ATP 合成酵素は、複雑かつ精緻な構造からなり、生命が設計した驚異的なナノマシンの一つである。

ATP 合成酵素は、ミトコンドリアなどに存在する F 型 ATPase (FoF1) と、一部の原核生物に存在する V 型 ATPase (V-ATPase, V/A-ATPase) に大別できる。両者は同じ基本構造を持ち、中心回転軸とその周囲を囲む固定子複合体からなる(図 1)。プロトン駆動力により中心回転軸が固定子部分に対して回転することで、固定子に存在する触媒部位で ATP が合成される(回転触媒機構)。ATP 合成を担う回転触媒機構は、生命にとって最も重要な触媒反応の一つであり、またナノサイズのちっぽけなタンパク質がどうやって回ってエネルギー変換装置として働くかは、興味深く是非明らかにしたい「問い」である。

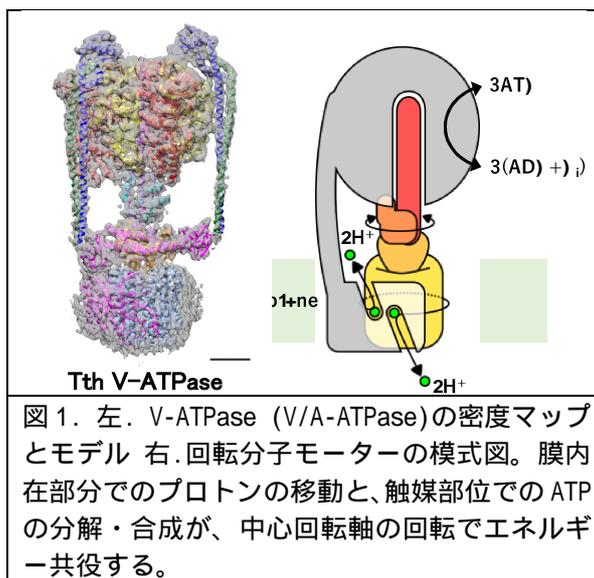


図 1. 左. V-ATPase (V/A-ATPase)の密度マップとモデル 右. 回転分子モーターの模式図。膜内部分でのプロトンの移動と、触媒部位での ATP の分解・合成が、中心回転軸の回転でエネルギー共役する。

ATP 合成酵素の全体構造の解明は、最近まで達成すべき課題として残されていたが、クライオ電子顕微鏡を使った単粒子解析法の進展により、ミトコンドリアや葉緑体の FoF1 の全体構造が決定された。また、我々のグループも含め、酵母やバクテリア由来の V-ATPase の構造も発表されている。しかしながら、発表されている V-ATPase の回転状態に対応した構造は、ADP が触媒部位に結合した ADP 阻害と呼ばれる構造であり、ATP を分解しながら回転している最中の構造ではない。ADP 阻害型の構造が、触媒サイクルの中間体構造であるかは、議論がわかれているが、この議論に決着をつけ、さらに ATP 合成酵素の触媒サイクルの全容を明らかにするには、回転している状態での複数の中間体構造を決定する必要がある。

2. 研究の目的

クライオ EM による単粒子解析は、近年目覚ましい発展を遂げ、X 線結晶構造解析とならぶ有力な構造決定法となった。しかし、その優位性は、複数の構造を同時に決定できる点にある。すなわち、結晶化条件に拘束されないで、容易に溶液条件を変えて構造解析でき、必ずしも阻害剤でタンパク質を安定化して解析する必要がない。したがって、本来の基質を加えて触媒サイクルが回っている状態での複数構造を捉えることができる。この動的構造解析ともいえる手法をタンパク質の機能解析に応用した例は少ないが、大きな動きで触媒サイクルを回す ATP 合成酵素の機構解明につなげることができる。また、溶液条件を変えて構造解析できることから、初期状態での構造も知ることができる。これにより、長年の疑問であった一つの触媒部位で起こる反応機構を解明し、回転触媒機構による ATP 合成の仕組みをより詳しく知ることが可能になる。

3. 研究の方法

今回用いる変異体 V/A-ATPase (TSSA 変異体)は、活性中心にあるスレオニン残基をセリン残基に、セリン残基をアラニン残基に変えたもので、阻害に関わる ADP の触媒部位に対する親和性が低下している。この変異体酵素の ATP 合成活性や分解活性など、基本的な性質は野生型の V-ATPase とほぼ同じであり、野生型 V/A-ATPase と同等と考えて良い。精製した TSSA 変異体 V/A-ATPase を、EDTA を含むリン酸緩衝液で透析することで、結合している ADP をほぼ完全に除くことができる。ヌクレオチドを含まない状態の V/A-ATPase (Vnucfree)をナノディスクに再構成し、単粒子解析することで、すべての触媒サイトが空の状態の構造 (ATP 結合待ち構造)を得ることができる。次に に対して 触媒待ち条件、加水待ち条件、ATP 結合待ち条件になるように反応液を加え反応させた後、瞬間凍結してクライオグリッドを作成した(図 1)。それぞれの反応条件でのクライオグリッドを、Titan Krios で撮影し、単粒子解析することで立体構造を得た。

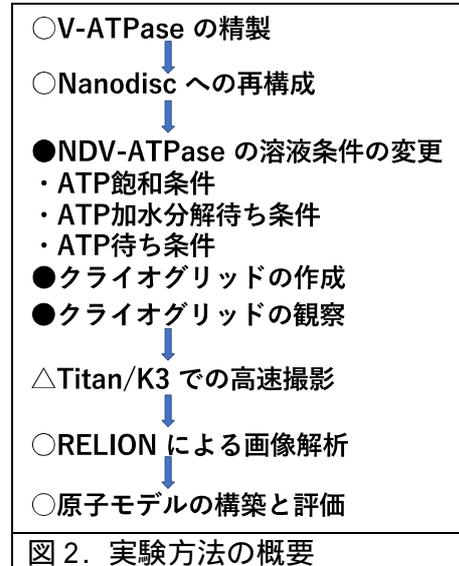
また、uni-site 触媒とよばれる初期状態での触媒機構を解明するために、透析処理によって内在性のヌクレオチドを取り除いた FoF1 を用い、FoF1 の量に対して約 1/3 量の ATP を加え、反応中に急速凍結した。得られた凍結グリッドをクライオ電子顕微鏡で撮影し、その画像を解析した。

4. 研究成果

(1)ATP 駆動による V/A-ATPase の回転機構の解明

触媒部分である V1 ドメインは、触媒部位を形成する 3 つの AB dimer が、回転軸サブユニットを取り囲んでいる。3 つの AB dimer は、ヌクレオチドの有りなしにかかわらず、開いた構造 (AB 開)、やや閉じた構造 (AB 準閉)、閉じた構造 (AB 閉) からなっていた。ATP 濃度が高い条件での構造では、すべての触媒部位に ATP もしくは、分解産物である ADP の密度が観察された (V3nuc)。ATP 濃度が低く、ATP 結合が律速段階になる条件では、AB 準閉、AB 閉にはヌクレオチドの密度が観察されたが、AB 開にはヌクレオチドの密度がなかった。このことは、AB 開に ATP が結合して V3nuc 構造になることを示す。このことは、全ての触媒部位がヌクレオチドで占められてから、軸の回転が起こることを示す。ATP の加水分解が遅くなる ATP アナログを基質として用いた条件で得られた構造では、AB 閉には ADP が、AB 準閉には ATP が結合していた (Vprehyd)。このことは AB 準閉の ATP の分解を待っている構造であることを示し、すなわち、AB 準閉の ATP が分解されるには AB 閉への構造変化が伴うことを示す。AB 準閉 AB 閉の構造変化は、軸の回転を伴うので、ATP の加水分解反応と軸の回転が共役していることを示唆する。ATP の加水分解反応は、熱散逸を伴う自発反応なので、軸の回転が触媒部位間の自由エネルギー差によって駆動されることを示唆する。

3 つの触媒部位で、ATP 加水分解の反応過程が別々かつ同時に起こり、それぞれの反応が軸タンパク質の回転と厳密に共役することで化学反応と軸の回転が共役していることがわかった (図 2)。今回の研究成果により、「2 つの触媒部位間での ATP 加水分解反応の自由エネルギー差が、



軸タンパク質の回転を推進する。」ことが明らかになった。

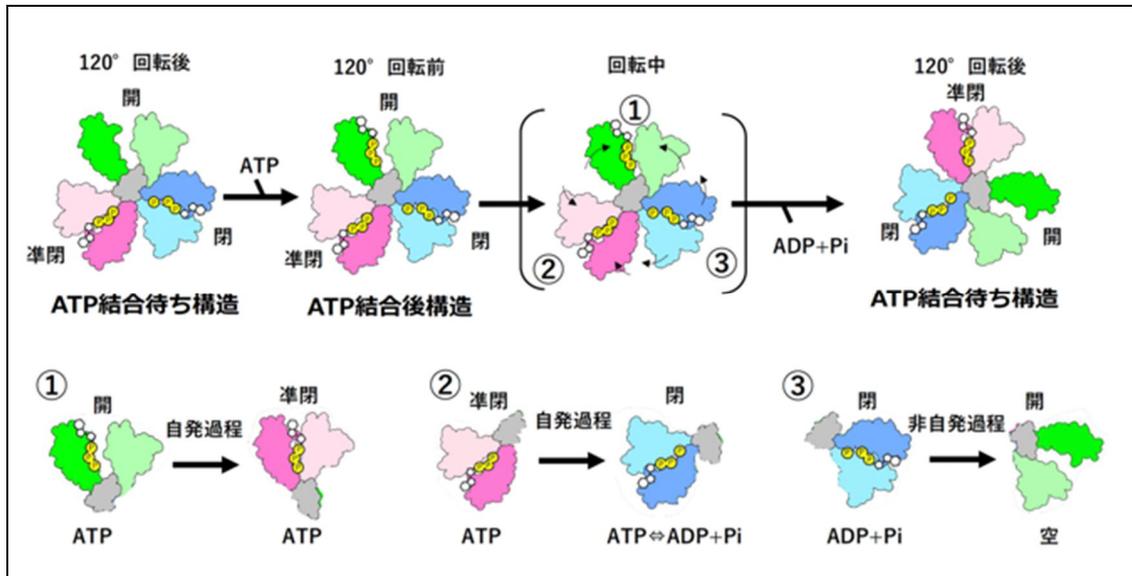


図 . ATP 結合待ち構造の触媒部位 (空) に ATP が結合して ATP 結合後構造になる。結合した ATP による開から準閉への構造変化、ATP が結合した準閉から ATP が加水分解される状態にある閉への構造変化、ADP と Pi が結合した閉が軸の回転により開になることで ADP と Pi が放出される。は、ATP が結合した準閉と、分解される状態にある ATP が結合した閉との間に、結合した ATP の状態による自由エネルギー差があり、自発過程になる。①~③の進行と軸の 120° 回転が協同することで、1 分子の ATP が分解され ATP 結合待ち構造に戻る。

(2) Uni-site 触媒機構の解明

今回の研究では、クライオ電子顕微鏡を用いることにより、ユニサイト触媒が起こる前後の構造を捉えることに成功した。クライオ電子顕微鏡による構造解析は、X 線結晶構造解析で得ることのできなかつた一過性の中間体構造を決定することができる。透析処理によって内在性のヌクレオチドを取り除いた FoF1 を用い、FoF1 の量に対して約 1/3 量の ATP を加え、反応中に急速凍結した。得られた凍結グリッドをクライオ電子顕微鏡で撮影し、その画像を解析することで、すべての触媒サブユニットにヌクレオチドが結合していない ND 構造と 1 つの触媒サブユニットに ADP が結合した US 構造 (ユニサイト構造) が得られた。ND 構造は、3 つの がすべて開いた構造をとっていた。US 構造では、 TP に ATP ではなく、加水分解後の ADP が結合していた。この結果から、ユニサイト触媒では、ATP は DP ではなく、 TP に結合し、 TP で加水分解が起こるとということが明らかになった。以上のことから、FoF1 にヌクレオチドが結合していない初期状態から定常状態までのモデル(図 2)を提案し、長年の議論に終止符を打つことができたと考えている。

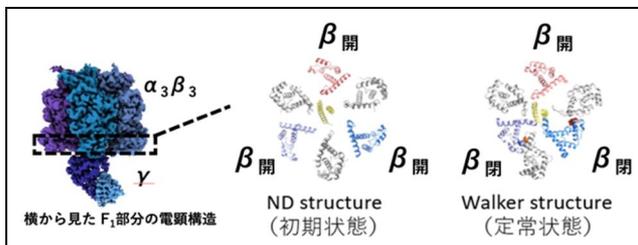


図 1 今回の研究で明らかになった F₁ 部分の構造。ヌクレオチドを持たない初期状態 (ND structure) では、3 つの が開構造をとる。Walker 構造では、3 つの は、閉、閉、開構造をとる。

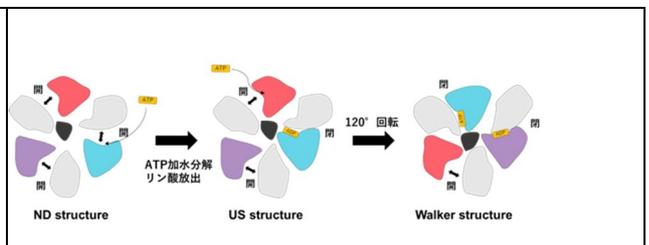


図 2. F₁ 部分のスタートアップ機構
初期状態 (ND structure) に ATP が結合すると、1 つの が閉じ、さらに、もう一つの ATP が結合し、120° 回転すると定常状態である Walker 構造に移行し、連続的に回転しながら ATP を加水分解する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 Kishikawa J., Nakanishi A., Nakano A., Saeki S., Furuta A., Kato T., Mitsuoka K., Yokoyama K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28832-5	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, Nakanishi Atsuko, Furuta Aya, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Tamakoshi Masatada, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Mechanical inhibition of isolated Vo from V/A-ATPase for proton conductance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.56862	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 Nakano Atsuki, Kishikawa Jun-ichi, Nakanishi Atsuko, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural basis of unisite catalysis of bacterial F0F1-ATPase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac116	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 -
1. 著者名 Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken	4. 巻 299
2. 論文標題 Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102884 ~ 102884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102884	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中西温子、岸川淳一、西澤知宏、光岡薫、横山謙
2. 発表標題 Structural intermediates in rotary V/A-ATPase from initial to steady state visualized by time-resolved cryo-electron microscopy.
3. 学会等名 第 59 回 日本生物物理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるATP合成酵素の回転機構の解明
3. 学会等名 第 94 回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯詩織、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によるATP S存在下V/A-ATPaseの中間体構造
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙
2. 発表標題 好熱菌FoF1の動的構造解析によって回転機構を明らかにする。
3. 学会等名 生体運動研究合同班会 名古屋大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 謙
2. 発表標題 構造スナップショットで解き明かすV型ATPaseの回転機構
3. 学会等名 生体運動研究合同班会 名古屋大学
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ようこそ 生体膜エネルギー研へ http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokoken/index-j.htm
--

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 (Mistuoka Kaoru) (60301230)	大阪大学・超高压電子顕微鏡センター・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------