

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291009

研究課題名(和文) V1モーターの構造形成と機能制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the structural formation and functional regulation of the V1 rotary motor

研究代表者

村田 武士 (Murata, Takeshi)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80415322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000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。最近申請者らは、腸球菌A3B3複合体のX線結晶構造解析に成功した。驚くべきことに、同じ3つのABペアからなるA3B3複合体は、ATPに対して異なる3つの親和性をもつ非対称構造を形成していた。本研究では、A3B3複合体の協同的な構造形成と機能制御を明らかにすることを目的に、Aサブユニット、Bサブユニット、A1B1複合体、A3B3変異体の生化学的性質と結晶構造を明らかにした。得られた結果を総合して、V1モーターの構造形成と機能制御の分子機構モデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：V-ATPases function as ATP-dependent ion pumps, the hydrophilic V1 portion is known as 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 which is a three-fold assembly of the identical A1B1 pair, but showed asymmetrical hexamer ring structure. In this study, we elucidated the crystal structures and biochemical properties of the A-subunit, B-subunit, A1B1 complex, and A3B3 mutant. Based on these and previous findings, we propose a molecular mechanism model of the structural formation and functional regulation of the V1 rotary motor.

研究分野：構造生物学

キーワード：V-ATPase 回転分子モーター X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

V 型 ATPase は、触媒頭部 (A3B3 複合体) で ATP を加水分解し、軸部分の回転エネルギー変換を介してイオンを輸送するナノ分子モーター/イオンポンプである。最近申請者らは、腸球菌 A3B3 複合体の X 線結晶構造解析に成功した。驚くべきことに、同じ 3 つの AB ペアからなる A3B3 複合体は、ATP に対して異なる 3 つの親和性をもつ非対称構造を形成していた。

2. 研究の目的

本研究では、A3B3 複合体の協同的な構造形成及び機能制御の分子機構の解明を目的に、A サブユニット、B サブユニット、A1B1 複合体の結晶構造解析を行う。さらに得られた構造情報から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ことにより予想した分子機構を検証する。

3. 研究の方法

(1) A サブユニットの X 線結晶構造解析を行い、A₃B₃ 複合体と構造比較を行う。

(2) B サブユニットの X 線結晶構造解析を行い、A₃B₃ 複合体と構造比較を行う。

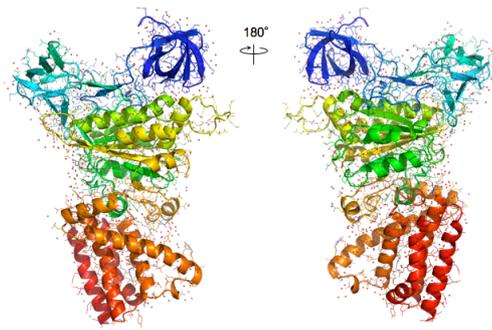
(3) A₁B₁ 複合体の X 線結晶構造解析を行い、A₃B₃ 複合体と構造比較を行う。

(4) 上記の構造比較から予想された重要残基の変異 A₃B₃ 複合体を作製し、機能構造解析を行う。

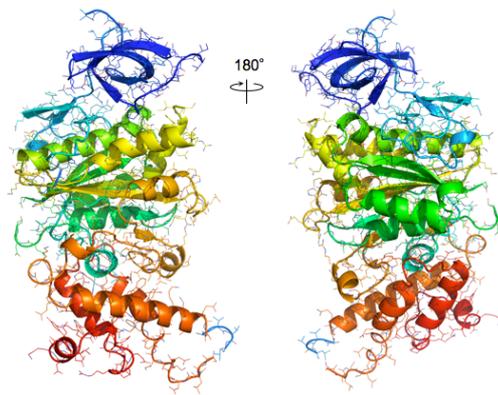
(5) 得られた構造と生化学的解析結果のすべてを総括することにより、V1 モーターの協同的な構造形成及び機能制御の分子機構のモデルを提案する。

4. 研究成果

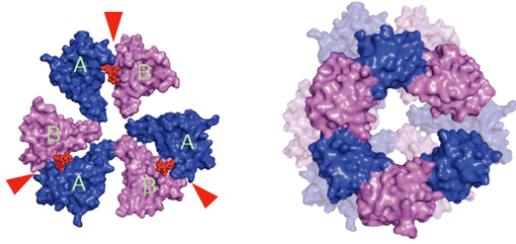
(1) A サブユニットの X 線結晶構造解析——ヌクレオチド非結合型 A サブユニットの結晶構造 (下図) を分解能 1.8 Å で決定した。ヌクレオチド結合型に関しては、ソーキング法や共結晶化法を用いて多くの結晶化条件で結晶化および X 線結晶構造解析を行ったが、得られた構造にはヌクレオチドが結合していなかった。得られたヌクレオチド非結合型 A サブユニットの構造は、A3B3 複合体に含まれる 3 つの A サブユニットの構造とすべて異なっていた。このことより、複合体形成により構造変化することが示唆された。



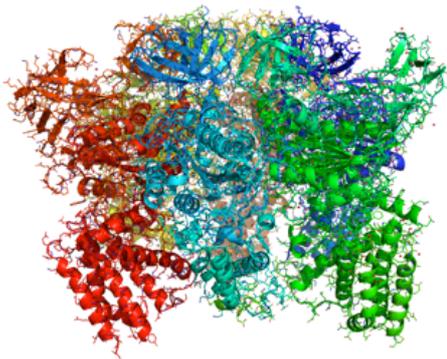
(2) B サブユニットの X 線結晶構造解析——以前の研究により、精製した B サブユニットはヌクレオチド結合能をもたないことが明らかになっている。そこで、ヌクレオチド非存在下で B サブユニットの X 線結晶構造解析を行った。V1 複合体の B サブユニット部分との分子置換法により位相を決定し、分解能 3.5 Å で B サブユニットの結晶構造 (下図) を決定した。得られた B サブユニットの構造は、A3B3 複合体に含まれる 3 つの B サブユニットの構造とすべて異なっていた。このことより、複合体形成により構造変化することが示唆された。



(3) A1B1 複合体の X 線結晶構造解析——β バレルの変異体を用いて A1B1 複合体と予想されるサンプルの結晶を得ることに成功した。X 線結晶構造解析を継続し、3.1 Å 分解能で結晶構造を決定した。得られた構造には 3 つの AMP-PNP が結合した擬似的な A3B3 複合体を形成 (下図左) していたが、N 末のバレルリングが崩壊していた (下図右)。本結晶構造中の A1B1 ユニットの構造とすべて異なり、A-B 間がより密にパッキングしていた。このことから AMP-PNP が結合した A3B3 の結晶構造中の A1B1 ユニットの構造は最安定構造を形成することができないと示唆された。このことが ATP のエネルギーによって A3B3 がスムーズに構造変化しうる根本原理である予想した。



(4) 変異 A3B3 複合体の作製及び機能構造解析—A3B3 複合体の構造形成に重要と考えられる B サブユニットのアルギニンフィンガーと呼ばれる残基 (R350) に関して、部位特異的変異導入を行い、A3B3 変異体 R350K を作製した。X 線結晶構造解析を行い、本変異体の結晶構造を 3.5 Å 分解能で決定した(下図)。得られた変異体の構造は野生型の構造と酷似していた。また、この変異体の ATPase 活性を測定したところ、ATP 加水分解能を失っていた。このことから、R フィンガーは A3B3 複合体の加水分解反応に必須であることが明らかになった。



(5) 3年間の研究により、A サブユニット、B サブユニット、AMP-PNP が結合した A1B1 複合体、A3B3 変異体 (R350K) の X 線結晶構造を解明した。また、各サンプルの ATPase 活性や DF 軸複合体との結合親和性などの生化学的性質を明らかにした。得られた結果を総合して、V1 モーターの構造形成と機能制御の分子機構モデルを以下に提案する。

A サブユニットと B サブユニットはヌクレオチド非存在下では相互作用しない。ATP や ADP が A サブユニットに結合 (親和性は 10 μM 程度) することにより構造変化し、B サブユニットと結合可能となる。この結合には B サブユニットに存在する R フィンガー (R350) が重要であり、ATP の加水分解にも必須の残基である。得られた A1B1 複合体は DF 軸複合体と結合能を持つようになる。さらに A1B1DF 複合体に 2 分子の A1B1 複合体が結合することにより V1 複合体が形成されるというモデルである。

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 8 件)

- ① Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Shintaro Maruyama, Kazumi Shimono, Fabiana L. Imai, Eiro Muneyuki, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato and Takeshi Murata (2016) Crystal structures of the ATP-binding and ADP-release dwells of the V1 rotary motor; Nat. Commun., 7, 13235 査読有, DOI: 10.1038/ncomms13235
- ② Ichiro Yamato, Yoshimi Kakinuma, and Takeshi Murata (2016) Operating principles of rotary molecular motors: differences between F1 and V1 motors; Biophys. Physico., 13, 37-44., 査読有, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_37
- ③ Ryota Iino, Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Kano Suzuki, Takeshi Murata (2015) Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase by crystal-structure and single molecule analyses; Curr. Opin. Struct. Biol., 31, 49-56, 査読有, DOI: 10.1016/j.abi.2015.02.013
- ④ Hideki Kandori, Yuji Furutani and Takeshi Murata (2015) Infrared spectroscopic studies on the V-ATPase; Biochim. Biophys. Acta, 1847, 134-141, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.07.020
- ⑤ Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Mayu Hara, Suhaila Rahman, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, Takeshi Murata and Ryota Iino (2014) Torque generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase; J. Biol. Chem., 289, 31212-31223, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M114.598177
- ⑥ Ryota Iino, Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Maya Hara and Takeshi Murata (2014) Molecular Structure and Rotary Dynamics of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase; IUBMB Life, 66, 624-630, 査読有, DOI: 10.1002/iub.1311
- ⑦ 村田 武士 (2014) 膜超分子モーター (V-ATPase) の分子メカニズム、実験医学, 羊土社, Vol. 32, No. 10 (増刊), 165-168 (1623-1626), 査読無, <https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103398/>
- ⑧ 鈴木花野, 村田 武士 (2014) 非対称結晶構造からみえてきた V1-ATPase の回転メカニズム、医学のあゆみ、医歯薬出版、

249, 551-552, 査読無,
<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=924906>

〔学会発表〕(計9件)

- ① 村田武士; ATPaseの構造と機能; 第90回日本細菌学会総会、2017年3月21日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
- ② 村田武士; 膜蛋白質の耐熱化と発現・精製; 日本蛋白質科学会ワークショップ、2016年6月7日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
- ③ 村田武士; 結晶構造からわかる回転機動分子の機能発現機構; 日本化学会第96春季年会特別企画講演、2016年3月27日、同志社大学(京都府・京田辺市)
- ④ Takeshi Murata; Ion transporting mechanism of V-ATPase、第53回日本生物物理学会シンポジウム、2015年9月13日、金沢大学(石川県・金沢市)
- ⑤ Takeshi Murata; Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* VI-ATPase、Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics、2015年6月22日、New Hampshire(アメリカ)
- ⑥ 村田武士; 創薬標的膜タンパク質の構造解析法について; 第56回日本生化学会中国四国支部例会、2015年5月29日、島根大学(島根県・松江市)
- ⑦ 村田武士; ヒト膜タンパク質の大量発現・精製・結晶化の技術開発; 平成26年度日本結晶学会年会シンポジウム、2014年11月3日、弥生講堂一条ホール(東京都・文京区)
- ⑧ 村田武士; Crystallization methods of membrane proteins; 第52回日本生物物理学会シンポジウム「次世代タンパク質結晶化手法」、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑨ 村田武士; 相関構造解析によるV1モーターの回転メカニズム; 第14回蛋白質科学会シンポジウム「構造生命科学をさきがける先端的基盤技術」、2014年6月25日、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計1件)

- ① Suhaila Rahman, Ichiro Yamato and Takeshi Murata (2016) Function and Regulation of Mammalian V-ATPase Isoforms, Regulation of Ca²⁺-ATPase, V-ATPases and F-ATPases, *Advances in Biochemistry in Health and Disease* 14, Springer International Publishing, Chapter 15, 283-299

〔その他〕

URL: <http://murata-lab.matrix.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 武士 (MURATA, Takeshi)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 80415322

(3) 連携研究者

水谷 健二 (MIZUTANI, Kenji)
横浜市立大学・生命医科学研究科・助教
研究者番号: 10525570

山登 一郎 (YAMATO, Ichiro)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号: 70111458