

令和元年6月4日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07282

研究課題名(和文) Eh V-ATPaseのNa<sup>+</sup>選択ポンプ機構の構造基盤の解明研究課題名(英文) Study of structural basis of Na<sup>+</sup> selective pump mechanism in Eh V-ATPase

研究代表者

村田 和義 (Murata, Kazuyoshi)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：20311201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腸球菌 *Enterococcus hirae* (Eh) 由来のATP駆動型ナトリウムポンプであるV-ATPase (Eh V-ATPase) 全複合体の構造を電子顕微鏡単粒子解析により明らかにし、その選択性イオン輸送の分子機構を解明した。結果、Eh V-ATPaseでは回転子が膜内の回転リングの中心からズレた位置でこれに結合していることがわかった。また、Eh V-ATPaseのメジャーな構造状態は、好熱菌のV/A-ATPaseではマイナーな構造状態に相当することが明らかになった。さらに、Na<sup>+</sup>が回転するc-ringに受け渡される機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果によって、Eh V-ATPaseのNa<sup>+</sup>輸送性のためのエネルギー伝達機構の構造基盤を明らかにすることができた。今後さらに詳細な構造研究を進めることによって、V-ATPaseが関係する疾患の治療法や治療薬の開発において重要な情報を提供することができると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, the structure of the entire V-ATPase (Eh V-ATPase), an ATP-driven sodium pump from *Enterococcus hirae* (Eh), was revealed by electron microscopy single particle analysis, and the selective ion transport mechanism was elucidated. It was found that in Eh V-ATPase, the rotor was bound to the off-center position of the rotating ring in the membrane. In addition, the major structural state of Eh V-ATPase was found to correspond to the minor structural state of the thermophilic bacterium V/A-ATPase. Furthermore, the mechanism by which Na<sup>+</sup> is passed to the rotating c-ring is clarified.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 回転式ATPase クライオ電顕

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

V-ATPase は主として真核生物の細胞内胞膜 (Vacuole) に存在する ATP 駆動型プロトンポンプである。ATP の加水分解エネルギーを用いて小胞内を酸性化することにより、タンパク質の分解などの作用を担っている。本タンパク質複合体は ATP 活性をもつ可溶性の膜外領域 ( $V_1$ ) とプロトンを輸送する膜貫通領域 ( $V_0$ ) からなり、その構造が ATP 合成酵素である  $F_0F_1$  と似ていることから、これと共通の起源をもつ回転型酵素であると考えられてきた。V-ATPase は、このように生体内において重要な機能を果たしているだけでなく、物理化学的にも興味深い膜タンパク質であるが、主に酸性小胞に存在することや 10 種類、20 分子を超える複雑なサブユニット構造を持つ超分子複合体であることから、その全体構造の研究はあまり進んでいない。

近年、新しい生体分子構造解析手法として、クライオ電子顕微鏡単粒子解析が脚光を集めている。V-ATPase においても、同様の解析が進められており、現在、好熱菌の V-ATPase では 9.7 Å 分解能 (Lau et al. Nature 2012)、酵母の V-ATPase では 6.9 Å 分解能 (Zhao et al. Nature 2015) の構造が報告されている。これに対して  $Na^+$  を選択的に輸送する腸球菌由来の Eh V-ATPase はその全体構造解析が全く進んでいない。

### 2. 研究の目的

我々は近年、生理研で開発されたゼルニケ位相差電子顕微鏡法を応用することで、Eh V-ATPase 粒子の可視化に成功し、これを用いて約 3 万粒子から 23 Å 分解能で立体再構成像を得ることができた。本研究では、さらに高分解能の構造解析を進めるため、試料の調製、データ収集法、画像解析の各ステップ等を見直し、Eh V-ATPase に特異的な ATP 加水分解にカップルした  $Na^+$  膜選択ポンプ機構の構造基盤の解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料の調整

組み換え体 Eh V-ATPase を大腸菌の発現系により発現し、0.05%DDM を含む溶液中で Ni カラムにより精製して (Ueno et al., JBC 2014)、これを単粒子構造解析に用いた。

#### (2) PA-Tag による構造の固定化

Eh V-ATPase には連続した 3 つの構造状態が知られている。この構造変化が高分解能化を妨げる要因になっている。そこで、PA-Tag を挿入した Eh V-ATPase を作製し、これに抗体を反応させて、構造の固定化を行い、これを単粒子構造解析に用いた。

#### (3) 位相差クライオ電顕法

精製・可溶化された Eh V-ATPase を電顕グリッド上で氷包埋し、ゼルニケ位相板を搭載したクライオ電子顕微鏡でその高分解能のデータ収集を行った。また、これを電子直接検出器 (DED) でフレーム分割して記録した。

#### (4) Eh V-ATPase の立体再構成

Eh V-ATPase の画像を単粒子構造解析ソフトウェア Relion で解析し、その三次元構造を再構築した。

#### (5) ホモロジーモデリング

得られたマップを元にホモロジーモデリングによる分子構造の推定を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) Eh V-ATPase の立体構造

Eh V-ATPase の約 10 万粒子の解析から、最終的にクラス分けされた 6.5 万粒子を用いて 17.3 Å 分解能の立体構造マップを得た。得られたマップを他の V-ATPase の構造と比較したところ、好熱菌の V/A-ATPase におけるマイナーな構造状態に相当することが判明した。また、Eh V-ATPase では、 $V_1$  ドメインからのびる回転子が  $V_0$  ドメインの中心から外れた位置 (off-axis) に結合していることがわかった。これは Eh V-ATPase において初めて発見された構造である。

#### (2) PA-Tag Eh V-ATPase の立体構造

PA-Tag によって抗体を反応させた Eh V-ATPase の構造解析では、約 10 万粒子の解析から、最終的に 3.5 万粒子を用いて 19.9 Å 分解能の立体構造マップを得た。当初の目論見では、抗体の結合により構造を固定化し分解能を上げる計画であったが、そのようにはならなかった。ところが、興味深いことに得られた構造は、好熱菌 V/A-ATPase のメジャーな構造状態と一致した。これらの結果から、好熱菌の V/A-ATPase と Eh V-ATPase では動的な安定性が異なることが示唆された。

### (3)Na<sup>+</sup>選択ポンプ機構の構造基盤

構造未知の V<sub>o</sub>ドメインの a subunit について、相同性の高い好熱菌の a subunit の構造を鋳型として Eh V-ATPase a subunit のホモロジーモデルを作製し、そのマップ部分にフィットさせた。その結果、a subunit は接触する c-ring との間に疎水的なバリアを作っており、a subunit 側からエンターした Na<sup>+</sup>が c-ring に受け渡されてリングとともに一周し、再び a subunit の別の領域に結合して排出される仕組みが、構造の上から推定された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

宋 致弘, 村田和義, クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の動的構造解析 J. Comput. Chem. Japan 17(1) P.38-45. (2018) 査読有り

Murata K & Wolf M, Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. Biochim Biophys Acta 1862(2), 324-334. (2018) 査読有り

Tsunoda J, Song C, Imai FL, Takagi J, Ueno H, Murata T, Iino R, Murata K. Off-axis rotor in Enterococcus hirae V-ATPase visualized by Zernike phase plate single-particle cryo-electron microscopy. Sci Rep 8, 15632. (2018) 査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

「位相差クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いた腸球菌 V-ATPase の構造解析」角田潤, ソンチホン, 薬師寺 Lica Fabiana, 村田武士, 上野博史, 宮崎直幸, 岩崎憲治, 高木淳一, 飯野亮太, 村田和義 日本生物物理学会第 56 回年会 (ポスター) 2018 年

「位相差クライオ電子顕微鏡による腸球菌 V-ATPase の単粒子構造解析」角田潤, ソンチホン, 薬師寺 Lica Fabiana, 村田武士, 上野博史, 宮崎直幸, 岩崎憲治, 高木淳一, 飯野亮太, 村田和義 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会 (ポスター) 2018 年

「クライオ位相差電子顕微鏡による腸内連鎖球菌 V-ATPase 単粒子構造解析」角田潤, ソンチホン, 薬師寺 Lica Fabiana, 村田武士, 上野博史, 宮崎直幸, 岩崎憲治, 高木淳一, 飯野亮太, 村田和義 日本生物物理学会第 55 回年会 (ポスター) 2017 年

「Single Particle Analysis of EhV-ATPase by Phase-contrast Cryo-Electron Microscopy」Tsunoda J, Song C, Yakushiji FL, Murata T, Ueno H, Takagi J, Iino R, Murata K, Gordon Research Conference, 3DEM (Poster) (2017)

「クライオ位相差電子顕微鏡による腸内連鎖球菌 V-ATPase 単粒子構造解析」角田潤, ソンチホン, 薬師寺 Lica Fabiana, 村田武士, 上野博史, 宮崎直幸, 岩崎憲治, 高木淳一, 飯野亮太, 村田和義 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会 (ポスター) 2017 年

「クライオ電子顕微鏡による生体分子の構造解析」村田和義 医学生物学電子顕微鏡技術研究会第 33 回学術講演会 (招待講演) 2017 年

「Single Particle Analysis of EhV-ATPase by Phase-contrast cryo-Electron Microscopy」Tsunoda J, Song C, Yakushiji FL, Murata T, Ueno H, Takagi J, Iino R, Murata K, 第 54 回日本生物物理学会大会 (ポスター) 2016 年

「Single Particle Analysis of EhV-ATPase by Zernike-phase contrast cryo-Electron Microscopy」Tsunoda J, Song C, Yakushiji FL, Murata T, Ueno H, Takagi J, Iino R, Murata K, 47th NIPS International Symposium (Poster) (国際学会) 2016 年

「Single Particle Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Microscopy Combined with Direct Detector for Analyzing Membrane Proteins and their Dynamics」Murata K, 第 89 回日本生化学会大会 (招待講演) 2016 年

「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の単粒子構造解析」村田和義 日本バイオイメージング学会大 25 回学術集会 (招待講演) 2016 年

「腸内連鎖球菌 V-ATPase のクライオ位相差電顕単粒子構造解析」角田潤, 村田武士, 上野

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

「ナトリウムイオン輸送性 V-ATPase のユニークな構造をゼルニケ位相差クライオ電子顕微鏡で解析」

[http://www.nips.ac.jp/nips\\_research/2018/10/v-atpase.html](http://www.nips.ac.jp/nips_research/2018/10/v-atpase.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：村田 武士

ローマ字氏名：MURATA, Takeshi

研究協力者氏名：上野 博史

ローマ字氏名：UENO, Hiroshi

研究協力者氏名：飯野 亮太

ローマ字氏名：IINO, Ryota

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。