

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21472

研究課題名(和文) 構造情報を突破口とした6量体ATPaseの構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of hexameric ATPases.

研究代表者

岸川 淳一 (KISHIKAWA, Jun-ichi)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：80599241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：6量体ATP分解酵素は生体内で様々な反応を担う重要な蛋白質である。6量体で形成されるリングがATP分解に伴い構造変化を起こすことで、基質の認識や切断を行う。その6量体の構造変化の機構は、いまだ不明な点が多い。電子顕微鏡による構造解析や1分子観察を用いて、その機構を明らかにすることを目的とした。

電子顕微鏡による構造解析により、6量体ATP分解酵素の1種であるV-ATPaseの状態の異なる3つ構造を明らかにした。この結果から、反応機構の一部を明らかにした。

人工的な基質を設計し、6量体ATPaseとの相互作用を観察した結果、両者の相互作用が厳密なものではなく、大雑把なものだということが分かった。

研究成果の概要(英文)： Hexameric ATPases, like AAA+-ATPase, play important roles in cell. The conformational changes of hexameric ATPases associated with ATP hydrolysis is essential for its function. However, the mechanisms of the conformational changes are remains unknown. In this study, I attempted to reveal the mechanism by single-molecule-analysis (SPA) using cryogenic electron microscopy and single molecule direct observation technique.

I solved three structures of V-ATPase, a kind of hexameric ATPase, by SPA. From this result, the catalytic mechanism of V-ATPase was partially revealed. In addition, to investigate the interaction between hexameric ATPase and its substrate, I designed artificial substrate and measured the interaction. As the result, it is strongly indicated that the interaction among them is rough rather than specific and robust.

研究分野：生物物理学

キーワード：6量体ATPase V-ATPase 回転分子モーター 単粒子解析 1分子観察 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内の様々な生理現象に関わる AAA+ ATPase に代表される 6 量体 ATPase の機能は非常に多岐に渡るが、そのコアとなる配列や構造は多くの共通点を持つ。6 量体で 1 つのリング状の複合体を形成する。6 量体リング(多くの場合は、ホモ 6 量体)の中心にはポアがあり、そのポアを DNA やタンパク質などの基質が通過する際に、DNA の開裂やタンパク質の切断を行う。単量体それぞれでの ATP の結合・分解エネルギーが単量体およびリングの構造変化を誘起し、反応を行う。各 ATP 結合サイトでの ATP 分解とそれともなう構造変化は、リング全体で協同的に起こっていると考えられているが、協同性を直接観察した例は 1 例のみである (Uchihashi et al. 2011, Science)。ホモ 6 量体 ATPase の観察例はなく、その協同性を観察することはこれまで困難であった。

(2) 近年、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) や高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) の技術的進歩により、タンパク質の挙動を直接観察することが可能になってきた。cryo-EM では、電子を直接検出するカメラの開発や解析技術の発展により、原子分解能での構造解析が可能になった。さらに、蛋白質を急速凍結により薄氷に包埋することで、より自然な状態の構造を観察することができる。HS-AFM では、微小な針で蛋白質を検知することで、蛋白質の動きをリアルタイムで観察することができる。これにより、1 分子での構造変化観察が可能になった。このように 6 量体 ATPase の協同性を直接観察できる技術的な基盤が整ってきた。

2. 研究の目的

cryo-EM や HS-AFM などの手法から得られる構造情報を突破口として、6 量体 ATPase の機能解析を行うことを目的とする。

6 量体 ATPase は生体内で様々な役割を果たしている。しかし、その構造と機能発揮の関連性は明らかになっていない。そこで、6 量体 ATPase がどのように動いているかという構造情報を調べることで、6 量体 ATPase の構造と機能の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 6 量体 ATPase、 V_1 -ATPase および V_0V_1 の cryo-EM を用いた単粒子解析

6 量体 ATPase の 1 種である V_1 -ATPase、 V_0V_1 の単粒子解析を行った。精製した V_1 -ATPase、 V_0V_1 を cryo-EM 観察用基板上にロードし、液体エタンで急速凍結した後、電子顕微鏡画像を撮影した。

撮影後、解析ソフト RELION などを用いて動画ドリフト補正や CTF 推定をおこなった。その後、撮影した画像から、蛋白質粒子の切り出しを行い、2 次元および 3 次元ク

ラス分けを行うことで質の良い蛋白質粒子を選択した。選択した蛋白質を用いて、構造の精密化を行うことで、3 次元密度マップを得た。密度マップを元に、部分的な結晶構造を当てはめ、分子動学的に計算したすることで全体の原子モデルを構築した。全体の分解能は、Gold standard FSC から、部分分解能は、Resmap を用いて計算を行った。

(2) 人工回転軸の設計とその回転観察による 6 量体 ATPase のエネルギーの発生機構の解析

6 量体 ATPase が機能する上で、6 量体リングの構造変化が基質 (DNA や蛋白質) に伝わる必要がある。リングと基質の相互作用はどのようなものが必要なのかを明らかにする。 V_1 -ATPase は、6 量体リングの構造変化が中心回転軸の回転として観察できる。そこで、繰り返し配列からなる人工的な回転軸を設計し、その回転軸が機能するかを評価することで、6 量体リングと回転軸 (基質) との相互作用を明らかにする。

4. 研究成果

(1) V_1 -ATPase および V_0V_1 の単粒子解析

単粒子解析によって高分解能の構造を得るためには、様々な角度からの蛋白質の単粒子像が必要である。しかし、精製した V_1 -ATPase の電子顕微鏡画像を撮影したところ、蛋白質単粒子の向きに偏りがあり、高分解能の構造は得られなかった。この単粒子の向きの偏りは、 V_1 -ATPase と水面との疎水的相互作用によると考えられた。そこで、観察用基板に炭素薄膜を張り、その薄膜をポリリジンで処理した。これにより、静電的相互作用で、 V_1 -ATPase を基板上に吸着させた。また、 V_1 -ATPase と水面の疎水的相互作用を弱めるために、サンプル溶液にごく薄い界面活性剤を添加した。これらの工夫により、向きの偏りが一部解消され、複数の向きからの単粒子像を撮影することができた。得られた単粒子像を用いて、最終的に 5.8 Å の 3 次元再構成像を得ることができた (図 1)。

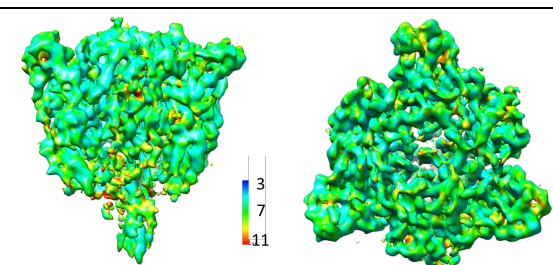


図 1. V_1 -ATPase の再構成像。局所分解能を疑似カラーで示した。全体的に 7 Å 前後の分解能の構造が得られた。

今回得られた構造では、回転軸部分の分解能が低かった。さらに分解能を高めるために、撮影条件の検討や単粒子像の追加を行っていく。また、1 種類の構造しか得られなかつ

たので、詳細なクラス分けなどを行うことで複数の状態構造を得ることを目指す。

V_0V_1 は、膜蛋白質であるため、界面活性剤で可溶化する必要がある。蛋白質溶液に界面活性剤が存在すると、電子顕微鏡画像のコントラストを下げてしまうため、できるだけ界面活性剤が少ない条件で撮影用基板を調製する必要がある。そこで、ごく薄い濃度 (<0.003%) でも V_0V_1 の可溶化状態を維持できる界面活性剤 LMNG を使うことでコントラストの良い画像を撮影できるようになった。撮影した電顕画像から抽出した約 22 万の単粒子を用いて、クラス分け及び構造精密化を行った結果、異なる回転状態を反映した 3 つの高分解能構造を得ることができた (図 2、論文、Nakanishi, Kishikawa et al. Nature Commun. 2018)。この 3 つの構造を比較することで、反応中の分子の動きを明らかにすることができた。また、サブユニット毎の構造解析では分からなかった複合体中でのサブユニット同士の相互作用も明らかになり、複合体がどのような力で形成されているのか示唆が得られた。

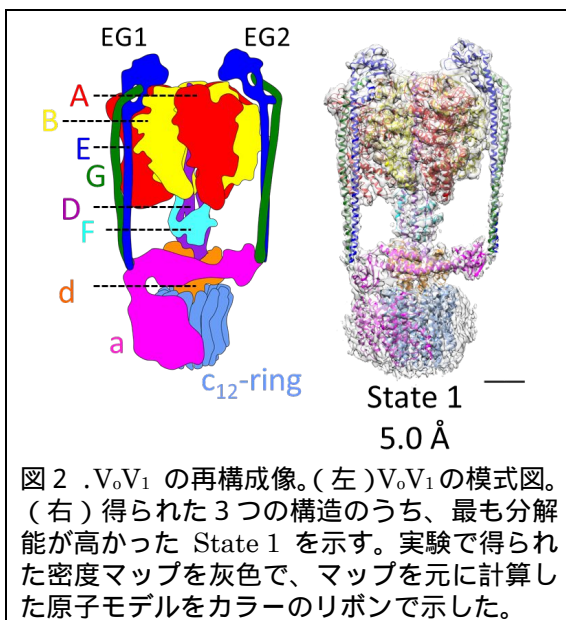


図 2 . V_0V_1 の再構成像。(左) V_0V_1 の模式図。(右) 得られた 3 つの構造のうち、最も分解能が高かった State 1 を示す。実験で得られた密度マップを灰色で、マップを元に計算した原子モデルをカラーのリボンで示した。

今後、原子分解能での構造を得るため、より高倍率での撮影やサンプル調製の条件を検討し、さらに解析を進めていく。また、詳細な分類を行うことで、今回得られた 3 状態の間を埋めるような構造の取得を目指す。

(2) 人工回転軸の設計とその回転観察

V_1 -ATPase は、6 量体リングの構造変化により、中心回転軸を回転させる。これまで、リングと回転軸の相互作用は厳密なものと考えられてきた。

まず、回転軸を外来の棒状蛋白質といれかえて、回転が観察できるか調べた。外来の棒状蛋白質として、べん毛を形成する FliJ を使用した。FliJ は、本来の回転軸と配列相同性は無いものの、構造はよく似ている。FliJ

を 6 量体リングと再構成させ、回転観察を行った結果、外来の FliJ でも 1 方向の回転が観察され、回転軸として機能できることが明らかになった (論文 Baba et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016)。この結果から、リングと回転軸の相互作用は厳密なものではない可能性が示唆された。

さらに、この可能性をより詳細に調べるために完全に人工的に棒状蛋白質を設計し、その蛋白質が回転軸として機能するかを調べた。コイルドコイルは、7 残基の基本構造 (ヘプタッド) からなり、疎水性残基と極性残基を規則的に配置することで、ヘリックス間の相互作用を形成する。ヘテロ 2 量体のコイルドコイルとなるように、ヘプタッドを 12 回繰り返したヘリックスを 2 種類設計した。設計した人工回転軸は、 V_1 -ATPase の 6 量体リングと共発現させることで複合体を形成させた。単純に設計した人工回転軸は、6 量体リングとの複合体形成効率が非常に低かった。以前の研究から、本来の回転軸の C 末端領域は回転そのものには影響しないが、複合体形成に重要であるという知見が得られていた。そこで、人工回転軸の片方のヘリックスの C 末端側に、本来の回転軸の C 末端領域を繋げることで効率の上昇を図った。

人工回転軸が期待通りに 6 量体リングの中心に刺さっているかを調べるために、クライオ EM を用いた単粒子解析を行った。その結果、リング構造の中心に、棒状の密度が観察され、人工回転軸が存在することが確認された。また、その人工回転軸複合体の ATP 分解活性を測定したところ、6 量体リングのみに比べ、大きく活性が上昇していた。これは、人工回転軸が回転軸として機能していることを示唆している (図 3)。

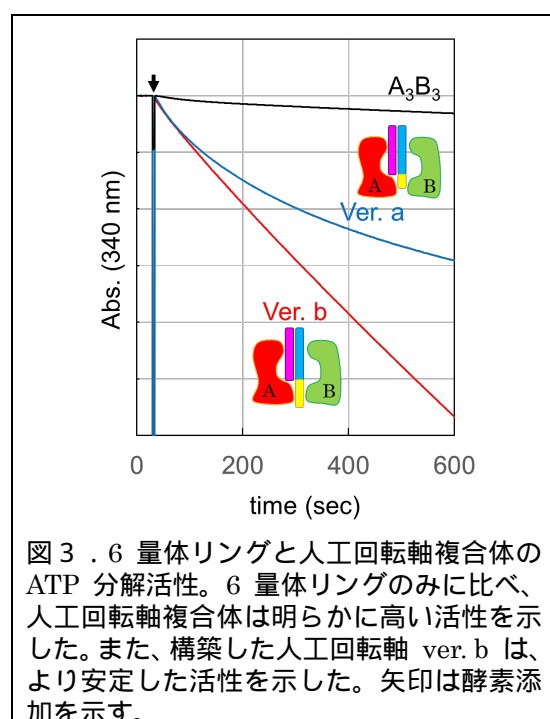


図 3 . 6 量体リングと人工回転軸複合体の ATP 分解活性。6 量体リングのみに比べ、人工回転軸複合体は明らかに高い活性を示した。また、構築した人工回転軸 ver. b は、より安定した活性を示した。矢印は酵素添加を示す。

そこで、実際の回転を観察したところ、回転速度は遅いながらも1方向の回転が観察された。これらの結果から、6量体リングと回転軸の相互作用は、大雑把なもので特異的な相互作用は必要ないことが強く示唆され、これは前述の結果と一致していた。一方で、回転時の回転力を測定すると、本来の回転軸に比べて、大きく低下していた。これは、6量体リングと人工回転軸の共役が上手くいっていないことを示唆している。本研究で設計した人工回転軸の形状は、まっすぐな棒状であると考えられる。しかし、本来の回転軸は弓状の構造をしており、この曲がった構造が、効率の良い共役に重要なのではないかと考えられる。この結果については現在論文を執筆中である。

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4件)

岸川 淳一 低温電子顕微鏡を用いた回転分子モーター V 型 ATPase の単粒子解析. *顕微鏡* (2018) 印刷中 査読あり

#Nakanishi A, #Kishikawa J (#共同筆頭著者), Tamakoshi M, Mitsuoka K, Yokoyama K., Cryo EM structure of intact rotary H⁺-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat Commun*. (2018) 9(1):89. 査読あり

<https://www.nature.com/articles/s41467-017-02553-6>

Kishikawa J, Inoue Y, Fujikawa M, Nishimura K, Nakanishi A, Tanabe T, Imamura H, Yokoyama K., General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels. *PLoS One*. (2018) 13(1):e0190213 査読あり

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190213>

Baba M, Iwamoto K, Iino R, Ueno H, Hara M, Nakanishi A, Kishikawa J, Noji H, Yokoyama K., Rotation of artificial rotor axles in rotary molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2016) 113(40):11214-11219. 査読あり
<http://www.pnas.org/content/113/40/11214.long>

[学会発表](計9件)

岸川 淳一、中西 温子、光岡 薫、横山 謙 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 第 43 回生体エネルギー研究会討論会、2017/12/20、むすびわざ館(京都・京都市)

岸川 淳一、中西 温子、光岡 薫、横山 謙

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 ConBio2017 招待講演 2017/12/6、神戸ポートアイランド(兵庫・神戸市)

岸川 淳一、馬場 みほ里、中西 温子、横山 謙 *de novo* 設計した人工コイルドコイルは回転子として機能する 第 55 回日本生物物理学会年会 2017/9/19、熊本大学(熊本・熊本市)

岸川 淳一、馬場 みほ里、中西 温子、横山 謙 Artificial design of rotary axis reveals the rotation mechanism of rotary motor. 第 17 回日本蛋白質科学会年会 招待講演 2017/6/22、仙台国際センター(宮城・仙台市)

Jun-ichi Kishikawa Single Particle Analysis of V-type ATP Synthase. The 1st A-BiS Symposium -Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences- 2017/2/19 岡崎コンファレンスセンター(愛知・岡崎市)

岸川 淳一 人工回転軸の設計とその回転 第 42 回生体エネルギー研究会討論会 2016/12/20、名古屋工業大学(愛知・名古屋市)

岸川 淳一、井上 勇奎、藤川 誠、中西 温子、今村 博臣、横山 謙 全身麻酔薬は細胞内 ATP レベルを減少させる. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

岸川 淳一、馬場 みほ里、中西 温子、横山 謙 *De novo* 設計軸の回転から明らかになったトルク発生機構. 第 54 回日本生物物理学会年会 招待講演 2016/11/25、つくば国際会議場(茨城・つくば市)

岸川 淳一、馬場 みほ里、中西 温子、横山 謙 *De novo* 設計人工軸の回転とそこから明らかになったトルク発生の仕組み. 第 16 回日本蛋白質科学会年会 招待講演 2016/6/9 福岡国際会議場(福岡・福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokoken/index-j.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸川 淳一 (KISHIKAWA, Jun-ichi)
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教
研究者番号: 80599241

(4)研究協力者

光岡 薫 (MITSUOKA, Kaoru)
内橋 貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)