

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06108

研究課題名（和文）液体論に根ざしたV1-ATPアーゼ回転メカニズムの描像構築

研究課題名（英文）Elucidation of the Rotational Mechanism of V1-ATPase Based on Liquid Theory

研究代表者

安田 賢司（Yasuda, Satoshi）

千葉大学・大学院理学研究院・特任准教授

研究者番号：40792081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：V型ATPアーゼ（A3B3DF複合体）の各ヌクレオチド結合状態の構造を用いて、水のエントロピーに注目した統計熱力学解析を行い、その回転メカニズムを解明に取り組んだ。A3B3DF複合体は各サブユニットとそれらの界面の原子の充填が不均一である。ATP加水分解サイクルの各段階でAサブユニットに結合するヌクレオチドとA3B3複合体の構造が変化し、それに伴い、水のエントロピーが最大化されるようにDF軸の一方方向の回転が引き起こされる。この回転を駆動するトルクは化学的自由エネルギーの入力なしに水によって生成され、ATPはトルク生成のトリガーとして必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATP駆動タンパク質は、ATPの化学エネルギーを力学エネルギーに変換して水の粘性抵抗に逆らい仕事をすると考えられているが、この描像に反する実験事実もあり統一的理解は得られていなかった。学術的意義として本研究は、これらの実験事実と矛盾しない水のエントロピーに着目した新たな駆動メカニズムの描像を提案するものであり、ATP駆動タンパク質の駆動メカニズム解明に大きな進展をもたらすと考えられる。また社会的意義として、本研究成果はナノサイズかつ高効率なモーターの産業利用や、関連する疾患の治療薬開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：A statistical thermodynamic analysis focusing on water entropy was conducted using the structures of the V-type ATPase (A3B3DF complex) in various nucleotide-bound states to elucidate its rotational mechanism. The A3B3DF complex exhibits ununiform atomic packing in each subunit and at their interfaces. During the ATP hydrolysis cycle, the nucleotide bound to the A subunit and the structure of the A3B3 complex change sequentially. These structural changes induce unidirectional rotation of the DF axis to maximize water entropy. It was revealed that the torque driving this rotation is generated by water without the input of chemical free energy, with ATP being essential as a trigger for torque generation.

研究分野：生物物理

キーワード：ATP駆動タンパク質 回転分子モーター V1-ATPase F1-ATPase ATP加水分解 形態計測学的手法 水のエントロピー

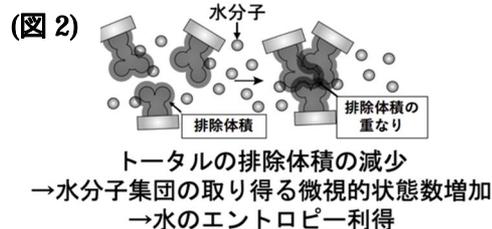
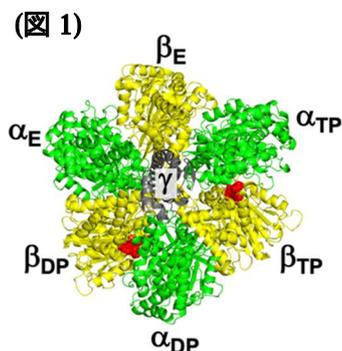
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ATP 駆動タンパク質は、ATP(アデノシン三リン酸)の加水分解により得られるエネルギーを用いて独自の機能を発揮するタンパク質である。一般に、ATPの化学エネルギーを力学エネルギーに変換することで水の粘性抵抗に逆らい仕事をしていると考えられているが、この描像に反する実験事実もあり統一の見解は得られていない。本研究で着目する回転分子モータータンパク質は、軸を回転させイオン輸送を行う ATP 駆動タンパク質であり、F型 ATPアーゼ、V型 ATPアーゼ等がある。この回転メカニズムの解明はナノサイズかつ高効率なモーターとしての産業利用や、分子モータータンパク質の関与する種々の疾患の治療薬の開発への応用も期待される極めて重要な課題である。

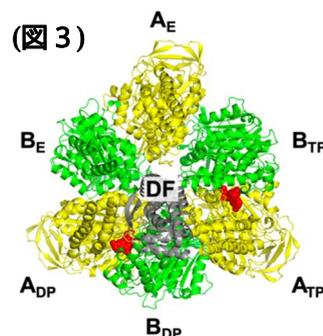
F型 ATPアーゼは ATP 合成酵素であり、回転に必要な最小単位は3つの非触媒 α サブユニット、触媒 β サブユニットとその中心軸 γ サブユニットからなる $\alpha\beta\gamma$ 複合体である(図1)。「 β サブユニットへの ATP の結合」→「加水分解」→「分解生成物 (ADP と P_i) の遊離」のサイクル(以下、加水分解サイクルと呼ぶ)を繰り返しながら γ 軸が回転する。多くの構造が得られている Catalytic dwell 状態では β_{TP} に ATP、 β_{DP} に加水分解直前の ATP、 β_E に P_i が結合する。 γ サブユニットが 120° 回転する間に、3つの β サブユニットの構造変化 ($\beta_{DP} \rightarrow \beta_E$, $\beta_{TP} \rightarrow \beta_{DP}$, $\beta_E \rightarrow \beta_{TP}$) が起こる。先行研究で水のエントロピーに着目し、「パッキングの不均一性と水のエントロピー効果により回転が引き起こされる」という、化学-力学変換とは異なる新たな描像を提案されていた (T. Yoshidome et al., J. Am. Chem. Soc., 133, 4030, 2011)。ここで、水のエントロピー効果とは主に以下の排除体積の減少によりもたらされる。タンパク質の主鎖や側鎖の存在は、水分子の中心が入れない空間を生成する。この空間の体積を排除体積という。タンパク質が密に充填すると、排除体積に重なりが生じトータルの排除体積が減少する。この結果水分子が並進移動に利用可能な空間の容積が増加し、水の並進配置エントロピーが増加する(図2)。

上記先行研究により、分子モーター回転メカニズムの俯瞰的な描像は得られた。しかし、F型 ATPアーゼは解明された立体構造の状態数が少なく、さらに詳細な回転メカニズムの解明が困難であった。



2. 研究の目的

本研究では、現在までにヌレオチド非結合型、AMP-PNP(ATPのアナログ)結合型、ADP結合型構造や、中心軸の無い構造など多様な状態の立体構造が報告されている V型 ATPアーゼ (A3B3DF) をターゲットとして水のエントロピー解析を行うことで、分子モーターの回転メカニズムの描像を構築することを目的とした。図3は AMP-PNP(ATPのアナログ)結合型構造の例である。F₁-ATPアーゼの α, β, γ サブユニットが V₁-ATPアーゼの B, A, DF サブユニットにそれぞれ対応している。



3. 研究の方法

一般に水のエントロピーの計算は水を連続体ではなく大きさを持つ粒子の集団として統計力学的に行う必要があるため、複雑な多原子構造を持つタンパク質に対しては大変な作業となる。本研究では積分方程式理論と形態計測学的手法を統合した独自の手法を駆使し、エントロピー解析を行なった。本手法ではタンパク質の立体構造を4つの幾何学的指標(排除容積、露出表面積、露出表面の曲率に関係した2つの量)で代表させ、水のエントロピーをタンパク質の構造変化に伴う4つの幾何学的指標の変化の線形結合で表す。構造を分子レベルで考慮しているにも拘らず、短時間で正確に水のエントロピーを計算できる手法である。

本研究では上記の種々のヌクレオチド結合状態の V₁-ATPアーゼの立体構造に対して各サブユニット及び各サブユニットの充填に伴う水のエントロピー変化を解析した。

4. 研究成果

4.1 A3B3 複合体及び A3B3DF 複合体の不均一な充填

様々なヌクレオチド結合状態に対する水のエントロピー解析の結果、以下のことが判明した。以下では、サブコンプレックス 1、サブコンプレックス 2、サブコンプレックス 3 を以下のように定義する (図 4)。

- サブコンプレックス 1: A_E, B_E, B_{TP} ,
- サブコンプレックス 2: A_{TP}, B_{TP}, B_{DP} ,
- サブコンプレックス 3: A_{DP}, B_{DP}, B_E .

・二つの ATP 分子が結合した A3B3DF 構造は最も安定した状態の一つであり、充填効率(PE)の順序は以下の通りである。

「サブコンプレックス 2 の PE」 > 「サブコンプレックス 3 の PE」 > 「サブコンプレックス 1 の PE」, 「 A_{TP} の PE」 > 「 A_{DP} の PE」 > 「 A_E の PE」 ... (式 1)

各サブコンプレックスの PE はその中の A サブユニットの PE によって決定される(図 5A)。

・二つの ADP 分子が結合した A3B3DF 構造においても、PE の順序は式 1 と同じである。

A_{TP} - B_{TP} および A_{DP} - B_{DP} ペアの界面の充填は、ATP 結合型と比較して緩く、さらに、3 つの A サブユニットおよびサブコンプレックスの PE も低い(図 5F)。

・二つの ATP が結合した A3B3 複合体は、DF サブユニットの結合より水のエントロピーの観点でさらに安定化される(図 5A, C)。

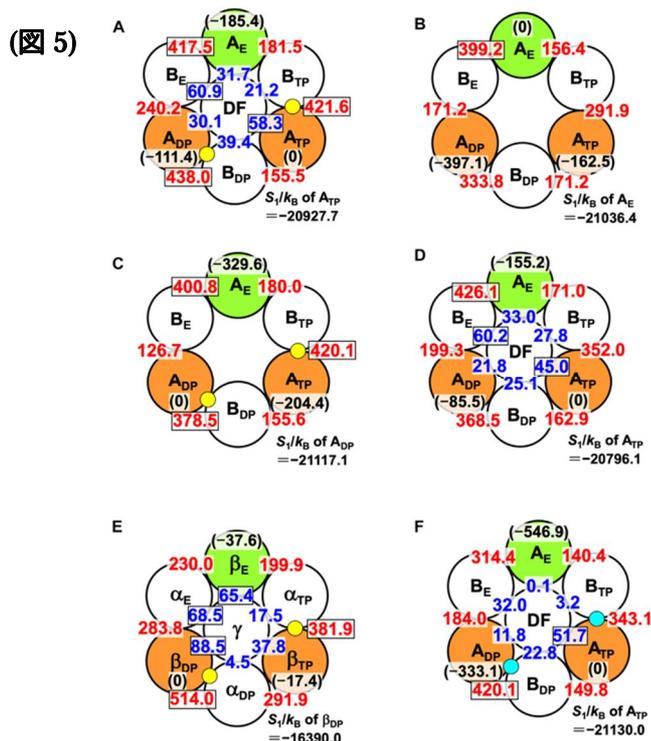
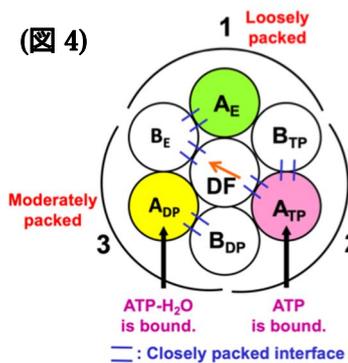
・ヌクレオチドが結合していない構造においても、PE の順序は式 1 と同じである(図 5B)。

A_{TP} - B_{TP} および A_{DP} - B_{DP} ペアの界面の充填は緩い。また、DF 軸の結合によって大幅に安定化される(図 5D)。

・上記の結果に基づき、A サブユニットの PE について以下の不等式を仮定することができた。(ATP-H₂O は ATP 加水分解反応直前の ATP、ATP(ATP-H₂O) は ATP と ATP-H₂O の中間体を意味している。また、A(Y) は化合物 Y が結合している A サブユニットの PE を示している。)

$A(ATP) > A(ATP(ATP-H_2O)) > A(ATP-H_2O) > A(ATP-H_2O) > A(ADP+Pi) > A(ADP) > A(\text{ヌクレオチド無し}) \dots$ (式 2)

・式 2 の順番は F_1 -ATPase に対して提案された順番と異なっていた(図 5E)。



4.2 水のエン트로ピー効果に基づく V₁-ATPase の軸の一方方向回転メカニズム

4.1 で得られた結果を元に、以下の軸の回転の描像を提案した(図 6)。

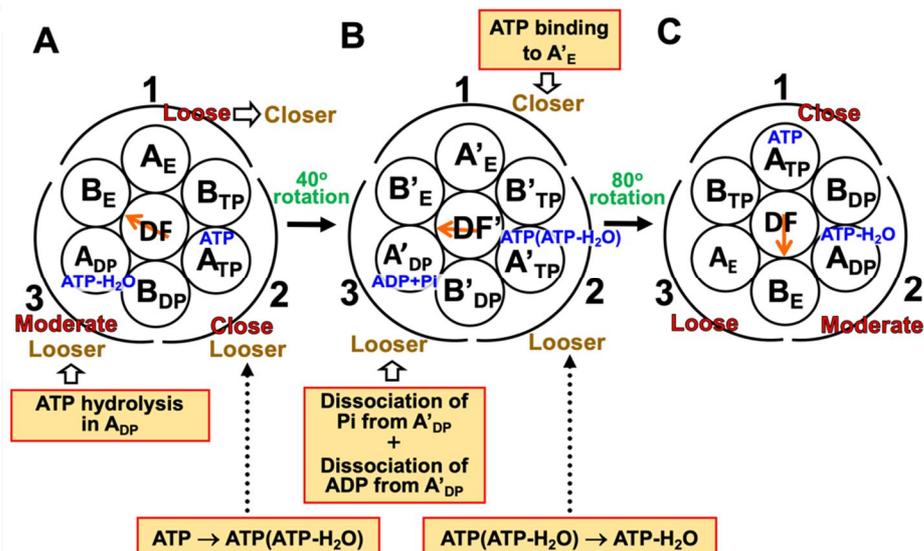
(1)安定状態の A₃B₃DF 複合体は状態(A)の構造をとっており、A_{DP}、A_{TP}、A_E にはそれぞれ ATP-H₂O が結合、ATP が結合、及び、何も結合していない。A_{DP} と A_{TP} でそれぞれ ATP 加水分解および ATP から ATP(ATP-H₂O)への変化が自発的に起こる。A_{DP} の PE は ATP 加水分解 (ATP-H₂O → ADP+Pi) によって低下する(式 2 の(ATP-H₂O) > A(ADP+Pi))。これによりサブコンプレックス 3 の PE も低下する。ATP の PE は ATP(ATP-H₂O)に変化し、ATP の PE が低下する (ATP(ATP-H₂O)が結合した A サブユニットを A'_{TP} と表記する)。この結果、サブコンプレックス 2 の PE も低下する。A_{DP} と A_{TP} の PE の低下を補償し、水のエン트로ピーを保つために A_E の PE の上昇が引き起こされる。これによりサブコンプレックス 1 の PE も上昇する。この A₃B₃ 複合体の充填構造の変化に従って、A₃B₃ 複合体と DF 軸の間の充填を保つように、状態変化(A) (B)の間に DF サブユニットが 40° 回転する。

(2)続いて、状態(B)の A'_{DP}、A'_{TP}、A'_E にはそれぞれ、ADP+Pi が結合、ATP(ATP-H₂O)が結合、および何も結合していない。Pi と ADP は A'_{DP} から解離し、その結果 PE が低下する (Pi 解離によって PE が低下し、ADP 解離によってさらに低下する)。A'_{DP} およびサブコンプレックス 3 の充填が緩くなる。A'_{TP} では ATP(ATP-H₂O) → ATP-H₂O の変化が起こり、その結果 PE が低下する。A'_{TP} およびサブコンプレックス 2 の充填が緩くなる。一方、ATP が A'_E に結合することで、PE が上昇する。そのため、A'_E およびサブコンプレックス 1 の充填が緊密になる。A₃B₃ 複合体の充填構造の変化に応じて、A₃B₃ 複合体と DF 軸の間の充填を保つように、(B) (C)の間に DF サブユニットが 80° 回転する。

(3)状態(C)では、A_{DP}、A_{TP}、A_E にはそれぞれ ATP-H₂O が結合、ATP が結合、および何も結合していない。サブコンプレックス 3、2、および 1 はそれぞれ A_{DP} A'_{DP} A_E、A_{TP} A'_{TP} A_{DP}、A_E A'_E ATP の変化が起こっている。A₃B₃ 複合体の充填構造の変化に伴い、水のエン트로ピーを最大化するように DF サブユニットが 120° 反時計回りに回転する。

この回転を駆動するトルクは化学的自由エネルギーの入力なしに水によって生成され、ATP はトルク生成のトリガーとして必要不可欠となっている。

(図 6)



上記の解析結果を含む本研究成果は、S. Yasuda et al., *Front. Mol. Biosci.* **10**, 1159603 (2023) に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasuda Satoshi, Hayashi Tomohiko, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Physical pictures of rotation mechanisms of F1- and V1-ATPases: Leading roles of translational, configurational entropy of water	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1159603	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 Yasuda Satoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 統計熱力学計算と進化分子工学を用いたGPCR安定化変異体の創出手法	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 252 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.252	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 Hamaguchi-Suzuki Norie, Adachi Naruhiko, Moriya Toshio, Yasuda Satoshi, Kawasaki Masato, Suzuki Kano, Ogasawara Satoshi, Anzai Naohiko, Senda Toshiya, Murata Takeshi	4. 巻 709
2. 論文標題 Cryo-EM structure of P-glycoprotein bound to triple elacridar inhibitor molecules	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149855 ~ 149855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149855	査読の有無 有
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 Sugaya Kanna, Yasuda Satoshi, Sato Shingo, Sisi Chen, Yamamoto Taisei, Umeno Daisuke, Matsuura Tomoaki, Hayashi Tomohiko, Ogasawara Satoshi, Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	4. 巻 31
2. 論文標題 A methodology for creating thermostabilized mutants of G protein coupled receptors by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4404	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 Yamamoto Taisei, Yasuda Satoshi, Kasai Rinshi S., Nakano Ryosuke, Hikiri Simon, Sugaya Kanna, Hayashi Tomohiko, Ogasawara Satoshi, Shiroishi Mitsunori, Fujiwara Takahiro K., Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	4. 巻 31
2. 論文標題 A methodology for creating mutants of G protein coupled receptors stabilized in active state by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4425	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安田 賢司、秋山 友希、木下 正弘、村田 武士
2. 発表標題 アミノ酸変異による最も耐熱性の高い外向きプロトンポンプ型ロドプシンの構築
3. 学会等名 量子生命科学会 第5回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱口紀江、安達成彦、野中雄仁、喜多俊介、今野翔、金岡優依、守屋俊夫、川崎政人、安田賢司、安西尚彦、林良雄、前仲勝実、千田俊哉、小笠原諭、内橋貴之、村田武士
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡構造解析と高速AFM観察から見えてきたABCトランスポーター (P-gp) の構造ダイナミクス
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱口紀江、安達成彦、守屋俊夫、川崎政人、安田賢司、安西尚彦、千田俊哉、小笠原諭、村田武士
2. 発表標題 Structural analysis of the multidrug efflux transporter P-glycoprotein bound by an inhibitor
3. 学会等名 Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda, Tomohiko Hayashi, Takeshi Murata and Masahiro Kinoshita
2. 発表標題 Physical pictures of rotation mechanisms of F1- and V1-ATPases: Leading roles of translational, configurational entropy of water
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Ueno, Riku Marui, Naruhiko Adachi, Norie Hamaguchi, Toshio Moriya, Masato Kawasaki, Akihito Ikeda, Satomi Inaba, Satoshi Yasuda, Toshiya Senda, Takeshi Murata, Hiroyuki Noji
2. 発表標題 Creation of ATP synthase with multiple torque generating units
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田 賢司、菅谷 幹奈、佐藤 慎吾、藤木 祐美、陳 思思、林 智彦、小笠原 諭、木下 正弘、村田 武士
2. 発表標題 統計熱力学計算と進化分子工学を融合した GPCR 耐熱化置換体の構築手法の開発
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 大生
2. 発表標題 A screening method for stabilized active GPCR mutants by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering
3. 学会等名 第2回蛋白質科学会 若手の会研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 大生、笠井 倫志、肥喜里 志門、藤原 敬宏、中野 僚介、菅谷 幹奈、安田 賢司、小笠原 諭、白石 充典、木下 正弘、村田 武士
2. 発表標題 理論計算と進化分子工学の融合によるリガンド結合非依存的に活性型ヘシフトする GPCR 変異体 のスクリーニング
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	木下 正弘 (Kinoshita Masahiro)		
研究協力者	村田 武士 (Murata Takeshi)		
研究協力者	林 智彦 (Hayashi Tomohiko)		

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
---------	---------