

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370047

研究課題名(和文) V1 ATPaseモーターにおけるATP加水分解機構の立体構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of ATP hydrolysis mechanism of V1-ATPase motor

研究代表者

村田 武士 (MURATA, Takeshi)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80415322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円、(間接経費) 3,450,000円

研究成果の概要(和文)：V型ATPaseはATP合成酵素(F-ATPase)と類似した構造をもつナノ分子モーター/プロトンポンプである。本研究ではV型ATPaseのATP加水分解反応に伴った回転分子機構の解明を目的に、ヌクレオチド結合型及び反応中間体のV1-ATPaseのX線結晶構造解析や重要残基変異体の構造機能解析を行った。

まず、AMP-PNP結合型及びリン酸結合型V1-ATPaseのX線結晶構造を明らかにした。さらに、ヌクレオチド結合部位やDG複合体結合部位の部位特異的変異体を作製し、機能解析を行った。これらの結果に基づき、本酵素のATP加水分解反応に伴った回転反応の分子メカニズムモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：Vacuolar ATPases (V-ATPases) function as proton pumps in various membrane systems within the cells, which are involved in a number of processes such as bone resorption and cancer metastasis. The hydrophilic V1 portion is known as a rotary motor, in which a central axis DF complex rotates inside a hexagonally arranged catalytic A3B3 complex using ATP hydrolysis energy, although the molecular mechanism is not well defined due to a lack of high-resolution structural information.

We have established the in vitro expression, purification, and reconstitution of *Enterococcus hirae* V1-ATPase from the A3B3 and DF complexes. In this study, we solved the crystal structures of AMP-PNP-bound and Pi-bound V1-ATPase, and also characterized the several site-directed mutants. On the basis of these findings, we proposed the molecular mechanism of the rotary motor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子モーター 酵素反応 V-ATPase X線結晶構造解析 ATP

1. 研究開始当初の背景

V型 ATPase は真核細胞のほとんどの膜系に存在し、プロトンポンプとして働いて内部の酸性環境を作り出している。V型 ATPase は破骨細胞やがん細胞の細胞膜にも多く発現し、その酸性環境異常が骨粗鬆症やがん転移と関連していることが知られている。ヒト由来の V型 ATPase は精製系が確立されておらず、その生化学的研究は遅れていた。

我々は腸球菌由来の V1-ATPase の再構成条件を決定し、ヌクレオチド非結合型 V1-ATPase の高分解能 X線結晶構造解析に成功した。しかし、ヌクレオチド非結合型の構造から ATP 加水分解の詳細なメカニズムを理解するのは難しく、ヌクレオチド結合型の構造を得ることが重要と考え、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では V型 ATPase の ATP 加水分解反応に伴った回転分子機構の解明を目的に、各種 ATP アナログや各種リン酸アナログを用いて、ヌクレオチド結合型や反応中間体の V1-ATPase の結晶構造を明らかにする。そしてこれらの構造から予想される基質結合部位や回転反応に重要となる残基については変異体を作製し、構造機能解析を行う。得られた構造と生化学的解析結果から、本酵素の ATP 加水分解反応に伴った回転反応の分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

**(1) : ヌクレオチド結合型 V1-ATPase の X線結晶構造解析**

まず、ヌクレオチド非結合型の V1-ATPase に対して、各種ヌクレオチドの結合親和性を測定し、結晶化の際に過剰量として加えるべき濃度を決定する。そして、各種ヌクレオチドを含む結晶化溶液を作製し、この結晶に長時間ソーキングすることによりヌクレオチド結合型の構造が得られるかについて検討を行う。ソーキング法により結晶の質が悪くなった場合や、ヌクレオチドが挿入されなかった場合には、最適条件下で過剰量の各種ヌクレオチドと V1-ATPase を混合し、結晶化のスクリーニングを行う。良質の結晶が得られしだい、X線結晶構造解析を行う。

**(2) : 反応中間体構造を示す V1-ATPase の X線結晶構造解析**

まずは V1-ATPase に対して、リン酸アナログ (+ADP) の結合親和性を測定し、結晶化の際に過剰量として加えるべき濃度を決定する。そして、実験(1)

と同様に過剰量の基質存在下でソーキング法や共結晶化を行い、V1-ATPase 反応中間体の X線結晶構造解析を行う。

**(3) : ヌクレオチド結合部位の変異 V1-ATPase の機能構造解析**

得られた V1-ATPase の構造からヌクレオチド結合に重要と考えられる残基に関して、部位特異的変異導入を行う。得られた変異 V1-ATPase を精製し、ヌクレオチド結合活性や ATPase 活性への影響を調べる。

**(4) : DG 複合体結合部位の変異 V1-ATPase の機能構造解析**

得られた V1-ATPase の構造(特に遷移状態の構造)から、DG 複合体と A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 複合体の接触面に位置し、回転反応に重要と考えられる残基に関して、部位特異的変異導入を行う。得られた変異 V1-ATPase を精製し、A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 複合体と DG 複合体の結合の親和性や ATPase 活性への影響を調べる。

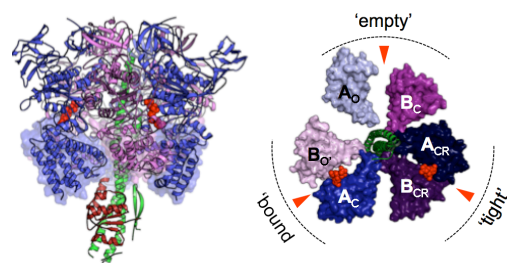
**(5) : 分子メカニズムモデルの提案**

上記で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、本酵素の ATP 加水分解反応に伴った回転反応の分子メカニズムモデルを提案する。

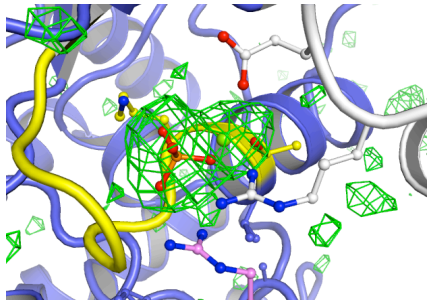
4. 研究成果

**(1) : ヌクレオチド結合型 V1-ATPase の X線結晶構造解析**

ピアコアを用いて V1-ATPase の AMP-PNP 結合を調べたところ、高い親和性 ( $K_D = 5 \text{ nM}$ ) で結合することが明らかになった。過剰量となる  $200 \mu\text{M}$  AMP-PNP 存在下で V1-ATPase の結晶化を行い、2 分子の AMP-PNP が結合した V1-ATPase の結晶構造を得ることに成功した (Nature 2013) (下図)。



さらに、リン酸をソーキング法により導入し、リン酸が tight 型に 1 分子結合した V1-ATPase の結晶構造を得ることに成功した (下図)。ATP 加水分解/合成の反応中間体構造に相当すると考えられた。



**(2) : 反応中間体構造を示す V1-ATPase の X 線結晶構造解析**

F1-ATPase や他の ATPase の構造研究において、ADP とリン酸アナログを用いることにより ATP 加水分解の反応中間体の構造が得られている。配位化学的性質として、アルミニウムとフッ素が平面上に配置され、その両側から酸素（タンパク質側鎖や ADP 等）が配位した構造を形成する。これにより  $AlF_x$  は加水分解反応の遷移状態に相当する構造を形成すると考えられている。そこで、ADP と  $AlF_3$  存在下で、V1-ATPase の結晶化スクリーニングを行った。微結晶が得られたが、構造解析が可能な分解能を示す良質の結晶は得られなかった。

**(3) : ヌクレオチド結合部位の変異 V1-ATPase の機能構造解析**

得られた V1-ATPase の構造からヌクレオチド結合に重要と考えられる残基の変異体を 3 種類作製した。これらの変異体の ATPase 活性や複合体の安定性を調べ、その成果を論文にまとめた (SpringerPlus 2013)。

**(4) : DG 複合体結合部位の変異 V1-ATPase の機能構造解析**

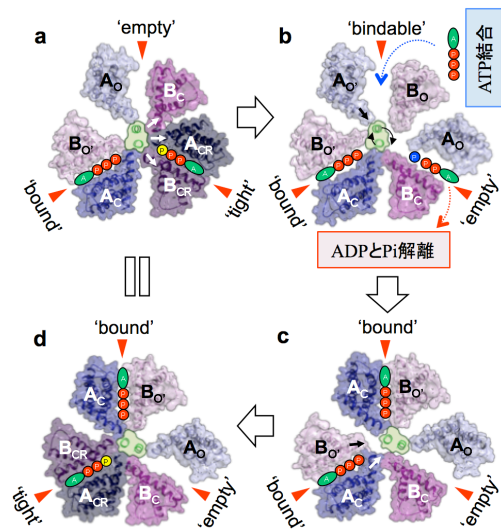
得られた V1-ATPase の構造から、DG 複合体と  $A_3B_3$  複合体の接触面に位置し、回転反応に重要と考えられる 5 種類の残基の変異体を作製した。これらの変異体の ATPase 活性や複合体の安定性を調べた結果、DG 複合体と  $A_3B_3$  複合体の結合に重要な残基の変異体は、野生型に比べ ATPase 活性の初速が上昇していたが、複合体の安定性は低下していた (PLoS ONE, 2013)。

**(5) : 分子メカニズムモデルの提案**

上記で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、本酵素の ATP 加水分解反応に伴った回転反応の分子メカニズムモデルを以下のように提案した (下図)。

(a) は bound form と tight form に ATP が結合している。tight form に結合した ATP は Arg-finger が  $\gamma$ -phosphate に近づいた分解

待ちの状態であり、この ATP が加水分解することにより反応がスタートする。ATP が加水分解されると、 $A_3B_3$  部分は定常状態の  $A_3B_3$  構造に戻るような構造変化が促進されると考えられる。つまり、tight form は empty form に構造変化し、ヌクレオチドの親和性が低下した結果、ADP と  $P_i$  の遊離がおこる。一方、empty form は ATP 結合が可能な bindable form に構造変化を起こし、V1-ATPase の  $A_3B_3$  部分はヌクレオチド非結合型  $A_3B_3$  の状態になる方向に進む (b)。しかしながら tight form と DF 複合体は強く結合しているため、 $A_3B_3$  部分の構造変化は抑制されると考えられ、実際には (a) と (b) の構造の中間状態に変化すると予想している。次に、bindable form あるいは中間状態の AB ペアへの ATP 結合によって  $A_3B_3$  部分の構造が変化し、2 つの bound form に ATP が結合し、これにより DF 複合体が回転する (c)。最後に、元々あった bound form が DF 複合体との相互作用により tight form に構造変化し、Arg-finger が  $\gamma$ -phosphate に近づき初めの構造に戻るというモデルである (a = d)。



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 9 件)
- ① \*Md. Jahangir Alam, Ichiro Yamato, Satoshi Arai, Shinya Saijo, Kenji Mizutani, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, Yoshimi Kakinuma and Takeshi Murata (2013) Mutant LV476-7AA of A-subunit of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase: High affinity of A3B3 complex to DF axis and low ATPase activity; *SpringerPlus*, 2, 689, 査読有
  - ② Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Mayu Hara, Yoshiko Ishizuka-Katsura,

- Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato, Eiro Munezaki, Hiroyuki Noji, \*Takeshi Murata and \*Ryota Iino (2013) Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase; *J. Biol. Chem.* 288, 32700-32707, 10.1074/jbc.M113.506329, 査読有
- ③ Md. Jahangir Alam, Satoshi Arai, Shinya Saijo, Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, Yoshimi Kakinuma, Ichiro Yamato and \*Takeshi Murata (2013) Loose Binding of the DF Axis with the A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> Complex Stimulates the Initial Activity of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase; *PLoS ONE*, 8, e74291, 10.1371/journal.pone.0074291.t002, 査読有
- ④ \*Suhaila Rahman, Ichiro Yamato, Shinya Saijo, Kenji Mizutani, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata and Takeshi Murata (2013) Biochemical and biophysical properties of interactions between subunits of the peripheral stalk region of human V-ATPase; *PLoS ONE*, 8, e55704, 10.1371/journal.pone.0055704.s007, 査読有
- ⑤ Satoshi Arai, Shinya Saijo, Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru, Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, Ichiro Yamato and \*Takeshi Murata (2013) Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase based on asymmetric crystal structures; *Nature*, 493, 703-707, 10.1038/nature11778, 査読有
- ⑥ Suhaila Rahman, Satoshi Arai, Shinya Saijo, Ichiro Yamato, and \*Takeshi Murata (2011) Sarkosyl is a good regeneration reagent for studies on vacuolar-type ATPase subunit interactions in Biacore experiments; *Anali. Biochem.*, 418, 301-303, 10.1016/j.ab.2011.07.009, 査読有
- ⑦ Min Zhou, Nina Morgner, Nelson P. Barrera, Argyris Politis, Shoshanna C Isaacson, Dijana Matak-Vinković, Takeshi Murata, Ricardo A. Bernal, Daniela Stock and \*Carol V. Robinson (2011) Mass Spectrometry of intact V-type ATPases reveals bound lipids and the effects of nucleotide binding; *Science*, 334, 380-385, 10.1126/science.1210148, 査読有
- ⑧ Shinya Saijo, Satoshi Arai, Khandoker M. M. Hossain, Kano Suzuki, Ichiro Yamato, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru, Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, and \*Takeshi Murata (2011) Crystal structure of the central axis DF complex of V-ATPase; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 19955-19960, 10.1073/pnas.1108810108, 査読有
- [学会発表] (計37件)
- ① Takeshi Murata Rotation mechanism of V-ATPase based on crystal structures、Gordon Research Conference (Protons and Membrane Reactions)、Ventura (アメリカ)、2014年2月27日
- ② 村田 武士 創薬につながる V-ATPase の構造と機能、第86回生化学会 シンポジウム、横浜、2013年9月12日
- ③ Takeshi Murata Rotation mechanism of V1-ATPase based on asymmetric crystal structures、International Conference on Structural Genomics 2013、Sapporo、2013年7月31日
- ④ Takeshi Murata Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V1-ATPase based on asymmetric crystal structures、Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics、New Hampshire (アメリカ)、2013年6月26日
- ⑤ Takeshi Murata Crystallization of membrane proteins using functional antibody fragments AsCA 12/CRYSTAL 28 and Bragg Centennial Symposium、オーストラリア (アデレード)、2012年12月3日
- ⑥ 村田武士 V1-ATPase の X 線結晶構造解析、第37回生体エネルギー研究会 (口頭発表)、京都、2011年12月22日
- ⑦ 西條 慎也 *Enterococcus hirae* 由来 V<sub>1</sub>-ATPase の結晶構造解析、第84回生化学会、京都、2011年9月22日
- ⑧ Takeshi Murata Crystal structure of V1-ATPase from *Enterococcus hirae*、Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics、New Hampshire (アメリカ)、2011年6月30日
- ⑨ 村田武士 V1-ATPase の結晶構造から見えてきた回転メカニズム、第11回日本蛋白質科学会ワークショップ、大阪、2011年6月9日

〔図書〕(計 8件)

- ① 村田武士 (2014) 回転分子モーターの動作原理—F1 モーターと V1 モーターの違い—、生物物理, 54 (2), 079-084
- ② Takaho Terada, Takeshi Murata, Mikako Shirouzu and Shigeyuki Yokoyama (2014) Cell-free expression of protein complexes for structural biology; Methods Mol. Biol. 1091, p 151-159.
- ③ 水谷健二、山本三沙岐、村田武士 (2013)V-ATPase の分子メカニズム、膜タンパク質構造研究, 化学同人, 35-43
- ④ 村田武士、野村紀通、小林拓也、岩田想 (2013)「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来、膜タンパク質構造研究, 化学同人, 1-10
- ⑤ 水谷健二、村田武士 (2013)骨粗しょう症に関与する分子モーターの回転メカニズムと創薬への取組み、アンチエイジングシリーズ3「骨研究最前線」, NTS, 119-122
- ⑥ 日野智也、岩田想、村田武士 (2012) 抗体を用いた膜タンパク質の結晶構造解析、新機能抗体開発ハンドブック, NTS, 389-394

〔その他〕

ホームページ等

<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・准教授  
研究者番号：80415322

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

西條 慎也 (SAIJO Shinya)  
東京理科大学・基礎工学部・助教  
研究者番号：80419001

### (4) 連携研究者

水谷 健二 (MIZUTANI Kenji)  
東京理科大学・基礎工学部・博士研究員  
研究者番号：10525570