

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570162

研究課題名(和文) V-ATPアーゼ回転子固定子サブユニット間相互作用に関する遺伝子工学的研究

研究課題名(英文) Genetic approach on rotor and stator subunit interaction of sodium-translocating V-ATPase complex

研究代表者

柿沼 喜己 (KAKINUMA, YOSHIMI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80134394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸球菌 V-ATPアーゼは9つの種類のサブユニットから構成されているイオン輸送性回転酵素である。本酵素の分子メカニズムを明らかにするためには、各サブユニット間の相互作用の全体像を明らかにすることが必要不可欠である。触媒頭部及びイオン輸送性回転モーターの結晶構造を基盤として、各サブユニット遺伝子の変異株、大腸菌大量発現系などの利用を通じて、生化学的解析及び表面プラズモン解析などにより回転子固定子間のサブユニット間の相互作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Enterococcus hirae V-ATPase is an ion-transporting rotary enzyme that consists of nine kinds of subunits. In order to understand the molecular mechanism of this enzyme, it is essential to clarify the overall architecture and the interaction among these subunits. In this study, we succeeded in X-ray crystal structure analysis of the catalytic headpiece (V1-ATPase) and present ATP-hydrolytic rotatory mechanism of V1-ATPase. Furthermore, based on biochemical and surface plasmon resonance analyses on reconstitution of V1-ATPase complex and mutagenesis of V0 rotor ring subunit, the features of interaction among rotor and stator subunits of V-ATPase were revealed.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ナトリウム V-ATPアーゼ 腸球菌 イオン サブユニット

1. 研究開始当初の背景

(1) 液胞型プロトンポンプ(V-ATPase)は、リソソーム、ゴルジ装置、被覆小胞、シナプス小胞などの酸性小胞から、形質膜に至るまで幅広く生体膜に分布し、ATP合成酵素(F-ATPase)と同様にイオン輸送と共役して分子が回転する回転モーター分子である。V-ATPase機能亢進が骨粗鬆症の一因であり、一方、その機能欠損が数多くの酸性小胞疾患の一因であることなども明らかになり、治療薬開発に向けてV-ATPaseの分子構造及び反応機構に関する基礎情報の獲得が待望されている。しかし、V-ATPaseの研究対象は真核生物であり、精製標品の大量獲得が困難であること、オペロンを形成していないために複数のサブユニット遺伝子の取扱いが容易でないこと等の理由から分子レベルの解析の進展は必ずしも順調ではない。

(2) 申請者は、腸内連鎖球菌にH⁺ではなくNa⁺を輸送するV(V₀V₁)-ATPase(Na⁺輸送性V-ATPase)を発見した。本酵素はひとつのオペロン(ntp)の中の9個のntp遺伝子産物から構成される真核生物型のNa⁺輸送性V-ATPaseであることを生化学的・分子生物学的解析により証明し、大量発現系の構築を通じて、本酵素の大量精製法と再構成系を確立した。

全てのntp遺伝子(ntpA, B, C, D, E, F, G, I, K)の欠失変異株の作製及び遺伝子機能相補系も確立し、変異導入などによる分子生物学的解析を可能とした。V₀部分を構成するNtpK, NtpIサブユニットに関しては、変異導入によりntpK E139やntpI R573残基などがV-ATPaseによるイオン輸送反応に必要な不可欠であることを示し、変異酵素の分子的(酵素学的)性質を明らかにしてきた。イオン輸送反応の初発段階である基質(イオン)の結合を測定することは、H⁺輸送性ATPaseにおいては極めて困難であるが、Na⁺共役性である本酵素の特徴を生かして、イオン結合V₀部分へのNa⁺結合の測定にも成功している。

(3) V-ATPaseの反応機構の理解にはその分子構造情報が必要不可欠であり、腸内連鎖球菌V₀V₁-ATPase複合体のX線結晶構造解析を、東京理大・山登一郎教授、千葉大・村田武士教授(連携研究者)グループとともに進めてきた。その結果、Na⁺結合型のNtpKローター部分の結晶構造解析に世界で初めて成功し、引き続きLi⁺結合型、DCCD結合型ローター部分の構造を明らかにした。V-ATPase中心軸DF複合体の報告に続き、最近V₁部分A3B3DF複合体の結晶構造解析にも成功している。回転モーターとしてのメカニズムの解明には、イオン輸送に共役した分子回転を直接観察することが必要である。V₀部分にHis tagを導入した変異体の作製に成功し、一分子回転観察の試みを東大・野地教授らと行っている。

(4) V-ATPaseは主に細胞内酸性小胞に存在するために大量精製が困難であり、生化学的解析にも制約がある。ATP合成酵素やV-ATPase

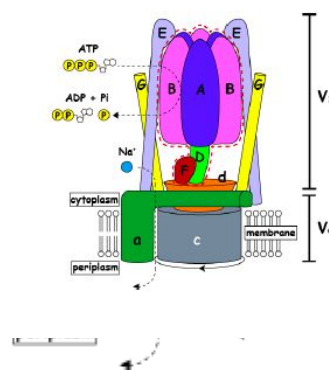
などのイオン輸送性回転モーターは、一般にH⁺輸送性であるために、エネルギー共役反応のイオンの作用を評価することも困難である。申請者が腸内連鎖球菌に発見したV-ATPaseは、そのNa⁺共役型である特徴を生かすことにより、ATP分解(合成)、イオン輸送、モーター分子回転が共役する膜酵素複合体としての真核生物型V-ATPase研究に貢献できる。本研究の研究成果は、H⁺輸送性F-, V-両ATPaseで共通するイオン輸送機構の理解に直結する。

2. 研究の目的

回転モーターとしてのV-ATPaseは、ATP結合部位A3B3とイオン通路部分NtpIを含む固定子部分(NtpA, NtpB, NtpE, NtpF, NtpI)とイオン結合ローターを含む回転子部分(NtpC, NtpD, NtpG, NtpKリング)から構成されると考えられる。本研究は、回転子、固定子を構成するマイナーサブユニット(NtpC, NtpD, NtpE, NtpF, NtpG)のV-ATPase複合体分子構築(サブユニット構造)上の役割と反応機構における役割を理解するために、サブユニット間の相互作用を明らかにすることを目的とする。さらに現在進行中の触媒部分V₁(A3B3D)のX線結晶構造解析情報を基盤に、A3B3と回転子NtpDとの機能的分子間相互作用を、生化学・遺伝子工学的手法を用いて明らかにし、ATP加水分解と分子回転とのエネルギー変換機構について総合的に評価する。

本研究計画では、遺伝子工学/分子生物学を背景にしたオーソドックスな生化学的解析を中心に研究を実施するが、分子構造情報は不可欠である。各サブユニットのX線結晶構造解析を推進する連携研究者・千葉大・村田武士博士グループと綿密な情報交換を踏まえて、各サブユニットのV-ATPase複合体構築上の役割、反応メカニズムにおける機能協働など、本研究を通じて、膜内回転モーター分子複合体の特性やイオン透過に関わる蛋白質に共通する原理の理解に繋がる明確な研究成果の獲得が期待できる。

3. 研究の方法



本酵素複合体のモデル図を上を示す。以前

の実験結果や他のV-ATPアーゼ複合体との部分的な類似性に基づき提案しているものであり、本研究の目的は、その真偽の検証を行うことでもある。

(1) V-ATPase 複合体の構造や各サブユニット間の相互作用を解析するためには、NtpA, B, C, D, E, F, G, I, K の9つの各サブユニットから構成される V-ATPase 複合体の再構成系を構築することが必要である。Ntp サブユニット間の相互作用を直接解析するためには、全てのサブユニットを精製することが前提となる。各サブユニット遺伝子の大腸菌大量発現系を構築し、大腸菌より精製を行うとともに、大腸菌 PURE system あるいは小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を利用して各サブユニット精製標品を取得するアプローチも平行して進める。

(2) 各サブユニット間相互作用の解析ためには、遺伝学的な解析が有用であり、V-ATPアーゼサブユニット間で保存されているアミノ酸残基を標的に個々の遺伝子に対して部位特異的変異の導入 (Cys 置換変異及び化学架橋実験) 等を行う。変異サブユニットを単離精製し、V1 複合体、中心軸複合体等の部分複合体の再構成を行う。精製サブユニット間の相互作用については、分析遠心法やピアコア (表面プラズモン解析) を用いた一分子蛍光法により解析を進める。

以上の結果明らかになった重要な変異サブユニットについては、その X 線結晶構造解析を連携研究者・村田が行う。

4. 研究成果

(1) 腸球菌V-ATPアーゼNtpK回転リングのX線結晶構造によると、共役イオンであるNa⁺やLi⁺の結合には、アミノ酸残基T64、Q65、Q110、E139、およびL61の5個の酸素原子、ion occlusionに関わるE139残基により安定化されたQ110、Y68、およびT64の側鎖の水素結合が関与している (PDBアクセッション番号2BL2と2CYD)。E139以外にイオン結合に重要な役割を担う4つのアミノ酸残基T64、Q65、Y68、Q110に対してアラニン置換変異体を作成しV-ATPアーゼの活性を調べた。その結果、Q65AとY68A変異体のV-ATPaseの活性は多少保持されたが、T64AとQ110A変異体の活性はごくわずかであった。この結果は、T64およびQ110はE139に加え連鎖球菌V-ATPアーゼのイオンカップリングのために不可欠であることを示している。

(2) 我々のグループはすでに腸球菌V-ATPアーゼの主要サブユニットA3B3複合体と中心軸DFサブユニット複合体から構成される触媒頭部V1-ATPaseの再構成系を構築している。それぞれ基質であるヌクレオチドの結合型、非結合型の状態で、A3B3複合体及びA3B3DF複合体の2.2から3.4オングストロームレベルのX線結晶構造解析に成功した。ヌクレオチド非結合型A3B3 複合体の構造自体が非対称性をもち、その非対称性が回転の方向性を決定して

いること、基質ヌクレオチドの結合による複合体のコンフォメーション変化が、右回り回転に伴ってcooperativelyに行われること、中心軸のDF複合体が結合することにより、より密なヌクレオチド結合部位が誘導されること、保存されているアルギニン残基によりATP触媒活性が促進されることなど、V-ATPアーゼの回転酵素としての本質的な分子反応メカニズムを示す構造解析に初めて成功した。

(3) 連鎖球菌V-ATPアーゼの触媒頭部V1を構成するA3B3複合体とA3B3DF複合体のX線結晶構造解析より、これらの複合体はA3B3とDサブユニット (中心回転軸DF) との相互作用に120個ものアミノ酸残基が関与することを明らかにした。A3B3複合体とDF二量体の境界領域に存在し保存性の高い10個のアミノ酸残基 (Aサブユニット1個、Bサブユニット2個、Dサブユニット7個) に対して、((D(L28N)、D(L29N)、D(R165A)、D(R166A)、D(RR165-6AA)、D(A169S)、D(L170N)、A(R475A)、B(V388A)、B(L389A)、A(R475A)D(RR165-6AA)、B(V388A)D(RR165-6AA)) などの単一あるいは重複して変異を導入し、ATPアーゼ活性と表面プラズモン共鳴測定による精製A3B3とDF変異体の結合親和性に対する影響を調べた。その結果、いくつかの変異体はA3B3とDFとの結合親和性の低下を伴って、ATPアーゼ活性の促進が観察された。その一方で、境界面での結合性の低下が、分子としての不安定さに繋がっているために、ATPアーゼ活性の不活化は野生株よりも早く観察された。この結果より、V1部分におけるA3B3とDFとの相互作用の強さが、V1複合体の安定性及び活性の安定性に寄与し、野生型A3B3DF (V1) の安定性が最適化されていると考えられた。

(4) V1 (A3B3DF) ATPase複合体のサブユニット相互作用について、さらにサブユニットAのC末端側に位置するアミノ酸残基に対する変異の影響を調べた。A(LV476-7AA)3B3DF、A(LV476-7AA)3B(L389A)3DF、A(LV476-7AA)3B3D(RR165-6AA)F、A(LV476-7AA)3B3D(L170N)F の変異体について調べた結果、サブユニットA(LV476-7AA)変異により、A3B3複合体と野生型DFあるいは変異DF二量体との結合親和性が、逆に上昇すること、その結果、野生型A3B3複合体に較べて、ATPアーゼの活性が低下することを見出した。この結果は、以前の結果と合わせて、回転中心軸DF二量体とA3B3複合体との接触面での結合性が、回転モーター分子としての活性及び分子としての安定性に直結していることが明らかになった。

(5) V-ATPase 回転モーターを構成する回転子複合体 (NtpK リング、NtpC、NtpD、NtpG サブユニット) 及び固定子複合体 (NtpA、NtpB、NtpE、NtpG、NtpI サブユニット) の形成に関わるサブユニット間相互作用の中で、NtpK リングと NtpC との相互作用を理解する上で重要な NtpK E139D 変異体に対する NtpK 分子内抑圧変異の単離に成功した。単離した変異体

の中には、NtpK の 1、2 番目の膜貫通部位間ループに存在する E50 残基、イオン結合部位である E139 に隣接する V138 残基が含まれていた。E50K/E139D 二重変異体では Na⁺依存性 ATP 加水分解活性が野生型の 70%程度に回復し、一方 V138I/E139D 二重変異体では野生型と比較して約 1.3 倍の高い ATP 加水分解活性を示した。いずれの抑圧変異株においても Na⁺排出活性の回復は部分的であり、ATP 加水分解活性と Na⁺排出活性とが一致せず、これらの残基は、イオン結合部位に対する構造変化を伴って、V1 部分における ATP 加水分解と V0 部分におけるイオン輸送とのエネルギー共役に作用することがわかった。

(6) 固定子としてイオン通路を形成する NtpI サブユニットの X 線結晶構造解析を進めるために、その結晶化条件を再検討した。NtpI サブユニットの C 末端に TEV プロテアーゼ部位、さらに RFP、His-tag を付加した融合タンパク質を作成し、出芽酵母で大量発現した。Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製過程の検討から、NtpI の安定性に界面活性剤の種類が極めて重要であることを明らかにした。

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)

Alan J, Yamato I, Arai S, Saijo S, Mizutani K, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Kakinuma Y, Murata T. Mutant LV(476-7)AA of A-subunit of *Enterococcus hirae* V1-ATPase: High affinity of A3B3 complex to DF axis and low ATPase activity. Springerplus. 2013 Dec 27;2:689. doi: 10.1186/2193-1801-2-689. eCollection 査読有

Alan MJ, Arai S, Saijo S, Suzuki K, Mizutani K, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Kakinuma Y, Yamato I, Murata T. Loose binding of the DF axis with the A3B3 complex stimulates the initial activity of *Enterococcus hirae* V1-ATPase. PLoS One. 2013 Sep 13;8(9):e74291. doi: 10.1371/journal.pone.0074291. eCollection 2013. 査読有

Arai S, Saijo S, Suzuki K, Mizutani K, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Yamato I, Murata T. Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V1-ATPase based on asymmetric crystal structures. Nature. 2013 Jan 31;493(7434):703-7. doi:

10.1038/nature11778. Epub 2013 Jan 13. 査読有

Kawano-Kawada M, Iwaki T, Hosaka T, Murata T, Yamato I, Homma M, Kakinuma Y. Mutagenesis of the residues forming an ion binding pocket of the NtpK subunit of *Enterococcus hirae* V-ATPase. J Bacteriol. 2012 Sep;194(17):4546-9. doi: 10.1128/JB.00714-12. Epub 2012 Jun 22. 査読有

[学会発表](計5件)

稲辺 宏輔, 山本 三沙岐, 柿沼 喜己, 村田 武土, 山登 一郎、腸内連鎖球菌 V 型 ATPase 遺伝子群による大腸菌 Na⁺/H⁺ アンチポーター変異、F-ATPase 変異の相補、第 40 回日本生体エネルギー研究会 愛媛大学 2014 年 12 月 12 日

稲辺 宏輔, 山本 三沙岐, 柿沼 喜己, 村田 武土, 山登 一郎、腸内連鎖球菌 V 型 ATPase の膜内在性サブユニットの精製条件の検討、第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2014 年 10 月 17 日

河田 美幸, 高橋 寛子, 五十嵐 一衛, 山登 一郎, 村田 武土, 柿沼 喜己、腸球菌 Na⁺輸送性 V-ATPase のイオン結合部位 NtpK(E139D) 抑圧変異株の単離、第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2014 年 10 月 16 日

鈴木 花野, 水谷 健二, 石塚 芳子, 寺田 貴帆, 白水 美香子, 柿沼 喜己, 岩田 想, 横山 茂之, 山登 一郎, 村田 武土、リン酸結合型 V₁-ATPase の X 線結晶構造解析、第 86 回日本生化学会大会発表 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜

松戸 翔平, Suhaila Rahman, 西條 慎也, 山本 三沙岐, 柿沼 喜己, 水谷 健二, 村田 武土, 山登 一郎、腸内連鎖球菌 V-ATPase 全体の大腸菌内発現と精製 第 86 回日本生化学会大会発表 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 喜己 (KAKINUMA YOSHIMI)
愛媛大学・農学部・教授
研究者番号: 80134394

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

村田 武士 (MURATA TAKESHI)

千葉大学・理学部・教授

研究者番号：8 0 4 1 5 3 2 2