

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840053

研究課題名(和文) F1/V1-ATPaseの回転機構の比較による回転分子モーターの作動原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of operation mechanism of rotary molecular motors by comparison with the mechanisms of F1 and V1-ATPases.

研究代表者

上野 博史 (Ueno, Hiroshi)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：10546592

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)：ATPを分解して回転する腸内連鎖球菌の回転分子モーターV1-ATPaseの回転を1分子レベルで解析することに初めて成功した。このV1-ATPaseと別種のV1-ATPaseの回転との比較から、V1-ATPase共通の回転特性を見つけたことに成功した。さらにこのV-ATPaseのATP加水分解の素過程反応が起こる回転角度を明らかにした。これらの結果は分子モーターの作動原理の理解につながる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in analyzing the ATP-driven rotation of *Enterococcus hirae* V1-ATPase at single-molecule level for the first time. The detailed analysis of the rotation and the comparison with V1-ATPase from another species revealed the common rotary mechanism of V1-ATPase. Furthermore, we determined the rotary angle at which the elementary reactions of ATP hydrolysis occur. These results lead to a deeper understanding of operation mechanism of rotary molecular motors.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子計測 分子モーター

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とする V-ATPase は近年千葉大の村田らにより、ナトリウムを輸送する *E. hirae* の V-ATPase の V_1 部位(V_1 -ATPase)を用いて、 A_3B_3 と A_3B_3DF 複合体のヌクレオチド結合・非結合型両方の高分解能 (2~3 Å) の構造が報告されている。驚くべきことに、村田らが決定したヌクレオチド非結合状態における3つの触媒サブユニットの構造や、ヌクレオチド結合状態の触媒部位の構造は F_1 -ATPase と明らかに異なっていた。*Thermus thermophilus* 由来の V_1 -ATPase は、 F_1 -ATPase と同様に1分子計測により回転機構を調べた例が数報ある(今村 PNAS 2005、古池 Nat. Commun. 2011)。これらの実験結果から *Thermus thermophilus* 由来の V_1 -ATPase は ATP 結合と加水分解が同じ角度で起こることが分かっている。しかしながら、ATP が何個結合して回転するのか、結合した ATP がどの角度で分解されるのか、分解産物(ADP、リン酸)がどの角度で解離するのかなど V_1 -ATPase の詳細な回転機構については未だ明らかになっておらず、これら異種の分子モーターの回転機構を比較することはできていなかった。

2. 研究の目的

回転分子モーター- F_1/V_1 -ATPase の回転機構を詳細に調べ、その独自・共通の回転機構を構造にも照らし合わせ比較する事により、回転分子モーターの普遍的な作動原理を明らかにすることが本研究の全体構想である。具体的には、未だ詳細な回転機構が明らかでない回転分子モーター“ V_1 -ATPase”の回転の基本的性質の決定を行うと共に、基質の解離角度や加水分解の起こる角度などを調べ、 V_1 -ATPase の詳細な回転機構を明らかにする。そこで得られた知見をすでに詳細な回転機構が明らかになっている異種の回転分子モーター“ F_1 -ATPase”の知見と比較することにより回転分子モーターの基本となる作動原理の理解を目指す。

3. 研究の方法

金微粒子(40~80nm)を回転プローブに用い *E. hirae* の V_1 -ATPase(EhV_1)の高時間分解能の解析を行った(図1)。具体的には、ATP 濃度を K_m 以下の低濃度から飽和濃度まで変化させた実験を行った。そこから ATP 結合待ちの角度とその後の素過程反応 (P-O 開裂、リン酸解離、ADP 解離が候補) 待ちの角度を決定した。さらにその停止時間の解析から反応素過程の時定数を求めた。またポリスチレンビーズ(200~300nm)を回転プローブに用いて、揺らぎの定理からトルクの計測を行った。さらに、ATP 結合と加水分解両方が遅い変異体を作製し、その触媒サブユニットを野生型の3つの触媒サブユニットの1つと交換したハイブリッド V_1 -ATPase を作製し回転観察を行った。観察された ATP 結合待ちとその後の素過程反応待ちの停止の相対角度から、

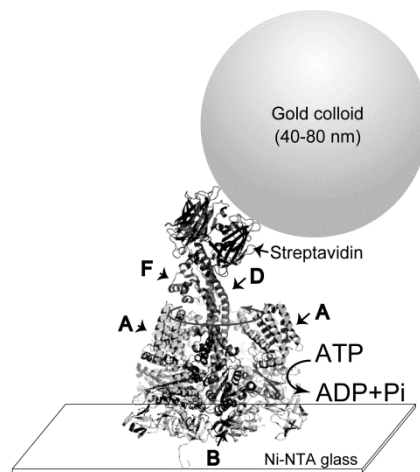


図1. 金微粒子を用いた *E. hirae* の V_1 -ATPase(A_3B_3DF)の回転観察

ATP 結合後に何度先でその後の素過程反応が起こるのかを決定した。さらに現在、回転と蛍光 ATP の結合・解離の同時観察を ATP と蛍光 ATP の混合溶液で行い、結合した蛍光 ATP が加水分解後に何度先で解離するのかを蛍光強度の変化から測定する実験を行っている。

4. 研究成果

1分子回転観察の結果、 EhV_1 の回転速度はシンプルなミカエリスメンテン式の変化をすることが分かった(図2)。

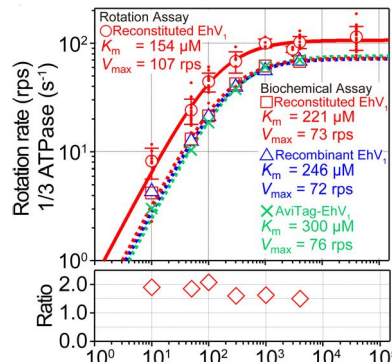


図2. *E. hirae* の V_1 -ATPase の回転速度 (○)と ATPase(□)の ATP 濃度依存性

また ATP 飽和の条件で EhV_1 はこれまで報告されている *Thermus thermophilus* 由来の V_1 (TtV_1) よりも早く回転し、 V_{max} の値は TtV_1 の約 1.7 倍の値となった。各 ATP 濃度での回転の挙動を詳細に解析したところ、 EhV_1 は ATP 濃度によらず常に 120° ステップで回転することが明らかとなった(図3)。これまでステップ検出・解析に成功している V_1 -ATPase は ATP 合成を生理的機能とする TtV_1 のみであった。イオン輸送を生理的機能とする V_1 -ATPase のステップ検出・解析に成功したのは今回が初めての例である。この結果は、“ATP 結合とその他の加水分解の素過程反応が同じ角度で起こる”ということが V_1 -ATPase の共通の作動機構であることを示す。

また面白いことに EhV₁ は TtV₁ では見られない”clear state”と”unclear state”の 2 状態の遷移を繰り返し回転することが分かった(図 4)。

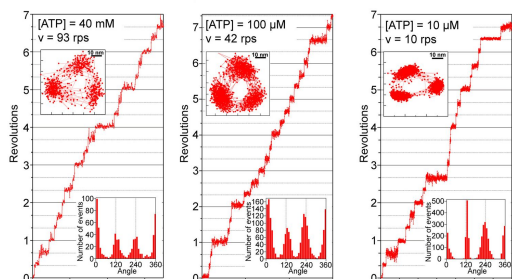


図 3. 様々な ATP 濃度での EhV₁ のステップ回転。ATP 飽和から濃度を K_m 以下に下げても常に 120°ステップで回転している。

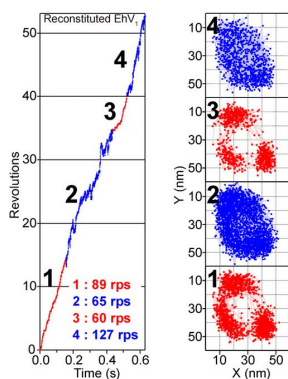


図 4. EhV₁ で観察される”clear state”(赤)と”unclear state”(青)。”unclear state”では回転プローブが回転中心に向かって大きく揺らいていることが分かる。左図は回転の時間変化、右図は重心の分布を示す。

この EhV₁ のトルク計測を行ったところ EhV₁ のトルクの値(13 pNm)はこれまで報告されている他の F₁-ATPase や V₁-ATPase の値(30-40 pNm)に比べて非常に低いものであった。さらにセカンドストックを持ち安定な構造を持つと考えられる EhV₀V₁ ではトルクが EhV₁ の約 2 倍(23 pNm)であることが分かった。これらの結果は EhV₁ の”unclear state”は回転軸である DF 複合体と固定子である A₃B₃ 複合体の相互作用が弱くなったトルクの低い不安定な状態であるということを示唆している。

次に ATP 結合とその後の素過程反応 (P-O 開裂、リン酸解離、ADP 解離) の起こる角度を決定するために、ATP 結合とその後の素過程反応の両者が遅くなる変異(F425E)を EhV₁ に 1 つだけ導入したハイブリッド EhV₁ を作製した(図 5 上)。F425E 変異体の ATP 結合速度は野生型の約 1/4000、開裂、ADP の解離、リン酸の解離の速度のいずれかは約 1/20 になっている(図 5 下)。そのためハイブリッド EhV₁ では、これらの反応素過程に対応する停止が長くなり、ATP 結合角度や他の反応素過程の停止角度が同定可能となる。

ハイブリッドの各停止点を停止時間が短

い順に short、middle、long とすると、30 mM ATP におけるそれぞれの停止時間の平均値は 1.2 ms (short)、8.9 ms (middle)、80.3 ms (long) であり、60 mM ATP では 1.5 ms (short)、11.4 ms (middle)、56.4 ms (long) となった(図 6)。

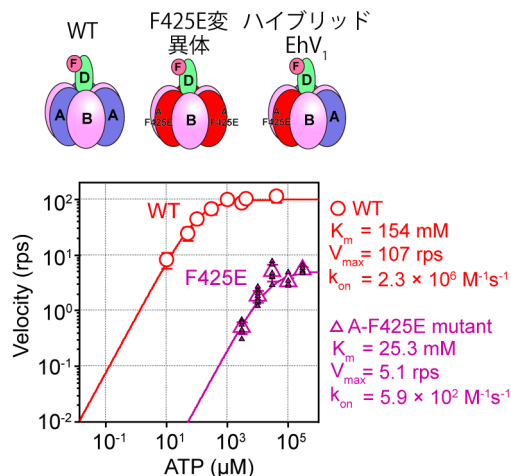


図 5. ハイブリッド EhV₁ の模式図(上)と F425E 変異体の回転速度の ATP 濃度依存性(下)。

short と middle の停止時間は ATP 濃度によってほとんど変化しなかったが、long は大きく変化した。この結果は long が F425E 変異体の ATP 結合待ちの停止に対応することを示している。また、middle は F425E 変異体のもう一つの遅い反応素過程に対応すると考えられる。

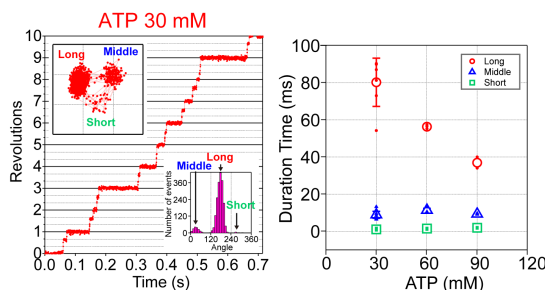


図 6. ハイブリッド EhV₁ の回転例(左)と各停止時間(long、middle、short)の ATP 濃度依存性(右)。

これらの結果から ATP の結合角度を 0°とした時、240°でその後の反応素過程(ATP の開裂、ADP の解離、リン酸の解離)が起こることが明らかになった。現在報告されている EhV₁ の結晶構造を考えると、P-O 解離が 240°で起こるとい説が有力である(図 7)。この回転機構と F₁-ATPase の回転機構を比較すると、サブステップの有無という違いはあるが、F₁-ATPase と V₁-ATPase は結合した ATP の P-O 開裂が次の ATP 結合によるステップの後に起こるとい共通の機構を持つことが分かる。しかしながら 240°で起こる反応素過程の数や正体については未だ不明である。そこで現在、蛍光 ATP と回転の同時観察を行って

おり、素過程反応のひとつである ADP 解離の角度の直接同定を進めている。

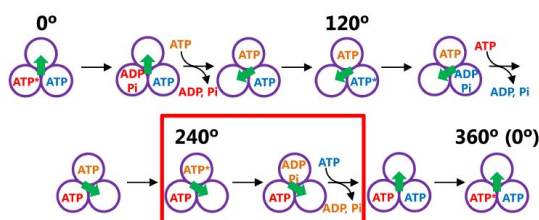


図 7. EhV₁ の回転モデル。0°で結合した ATP は 240°で加水分解される。その後同じ角度で分解産物の解離が起きる。

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 7 件)

- Ryota Iino, Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Kano Suzuki, Takeshi Murata. "Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses" *Curr. Opin. Struct. Biol.* 31, 49-56 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.sbi.2015.02.013.
- Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Mayu Hara, Suhaila Rahman, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, Takeshi Murata, Ryota Iino. "Torque Generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase" *J. Biol. Chem.* 45, 31212-23 (2014) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.598177.
- Ryota Iino, Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Mayu Hara, Takeshi Murata. "Molecular structure and rotary dynamics of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase" *IUBMB Life* 66, 624-30 (2014) 査読有
DOI: 10.1002/iub.1311.
- Yohsuke Kikuchi, Yusuke Naka, Hidemitsu Osakabe, Tetsuaki Okamoto, Tomoko Masaike, Hiroshi Ueno, Shoichi Toyabe, Eiro Muneyuki. "Thermodynamic Analyses of Nucleotide Binding to an Isolated Monomeric β Subunit and the $\alpha_3\beta_3\gamma$ Subcomplex of F₁-ATPase" *Biophysical J.* 105, 2452-8 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.10.018.
- Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Mayu Hara, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, Takeshi Murata, Ryota Iino. "Basic Properties of Rotary Dynamics of the Molecular Motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase" *J. Biol. Chem.* 288, 32700-7 (2013) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.506329.
- Rikiya Watanabe, Kumiko Hayashi, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji. "Catalysis-Enhancement via Rotary Fluctuation of F₁-ATPase" *Biophysical J.* 105, 2385-91 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.09.050.
- Jun-ichi Kishikawa, Tatsuya Ibuki, Shuichi Nakamura, Astuko Nakanishi, Tohru Minamino, Tomoko Miyata, Keiichi Namba, Hiroki Konno, Hiroshi Ueno, Katsumi Imada, Ken Yokoyama. "Common Evolutionary Origin for the Rotor Domain of Rotary ATPases and Flagellar Protein Export Apparatus" *PLOS One* 8, e64695 (2013) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0064695.

[学会発表](計 10 件)

- 上野博史、皆川慶嘉、宗行英朗、野地博行、村田武士、飯野亮太 "腸内連鎖球菌由来の V-ATPase の 1 分子回転計測" 分子研研究会 岡崎コンファレンスセンター (愛知県) 2015 年 4 月 20-21 日
- 上野博史 "ナトリウムを輸送する V-ATPase の 1 分子回転観察" 第 6 回膜輸送体研究会 ニュー富良野ホテル (北海道) 2014 年 12 月 26-28 日
- 上野博史、皆川慶嘉、原舞雪、山登一郎、野地博行、村田武士、飯野亮太、宗行英朗 "Rotor-Stator Interactions in V₁ and V_o from *Enterococcus hirae* V-ATPase" 第 52 回日本生物物理学会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014 年 9 月 25-27 日
- 皆川慶嘉、上野博史、原舞雪、野地博行、村田武士、飯野亮太 "The role of acid residues located at the catalytic site in the rotation of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase" 第 52 回日本生物物理学会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014 年 9 月 25-27 日
- 上野博史、皆川慶嘉、原舞雪、野地博行、村田武士、飯野亮太、宗行英朗 "Interactions between Rotor and Stator in *Enterococcus hirae* V-ATPase" Tokyo ATPase Workshop 東京大学弥生キャンパス武田ホール (東京) 2014 年 6 月 2-3 日
- 皆川慶嘉、上野博史、原舞雪、野地博行、村田武士、飯野亮太 "Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase" Tokyo ATPase Workshop 東京大学弥生キャンパス武田ホール (東京) 2014 年 6 月 2-3 日
- 上野博史、皆川慶嘉、山登一郎、村田武士、飯野亮太、宗行英朗 "Direct observation of the rotation of V₁-ATPase from *Enterococcus hirae*" 第 51 回日本生物物理学会 京都国際会館 (京都) 2013 年 10 月 28-30 日
- 吉田光、伊藤亜由美、伊藤丈太郎、政池知子、西坂崇之、鳥谷部祥一、上野博史、

- 宗行 英朗 “The relationship between F_1 -ATPase P-loop mutants and Pi release”第 51 回日本生物物理学会 京都国際会館 (京都) 2013 年 10 月 28-30 日
9. 長埜陸、小原清志、政池知子、上野博史、宗行 英朗 “Comparison of the nucleotide binding to the isolated β subunit and the F_1 -ATPase using the Stopped Flow method”第 51 回日本生物物理学会 京都国際会館 (京都) 2013 年 10 月 28-30 日
10. 皆川慶嘉、上野博史、石塚芳子、大沢登、寺田貴帆、白水美香子、横山茂之、野地博行、村田武士、飯野亮太 “Basic properties of rotary dynamics of *Enterococcus hirae* V_1 -ATPase motor protein”第 51 回日本生物物理学会 京都国際会館 (京都) 2013 年 10 月 28-30 日

〔図書〕(計 1 件)

上野博史, 鳥谷部祥一, 宗行英朗 FoF1 モーター 「DOJIN BIOSCIENCE SERIES 17 1 分子生物学」第 7 章 P88 - 100 化学同人 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 博史 (UENO, Hiroshi)

中央大学・理工学部物理学科・助教

研究者番号：10546592