

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850234

研究課題名(和文)液胞型ATPaseサブユニット間相互作用による機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the enzymatic reaction of vacuolar-type ATPase by isolation and characterization of mutants of bacterial sodium-translocating V-ATPase

研究代表者

河田 美幸 (Kawada, Miyuki)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10454498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：V-ATPaseは真核微生物や植物において、液胞の生理機能に必要不可欠なプロトンポンプである。V-ATPaseの機能制御は液胞機能の改良・改変による分子育種への応用に繋がると期待され、その反応機構の解明が待望されている。本研究では、真正細菌である腸球菌のナトリウム輸送性V-ATPaseをモデル酵素として、V-ATPaseの構造と反応機構に関する基本的情報の獲得を試み、V-ATPase膜内在性ローターリングを形成するNtpKサブユニットにおいて、細胞質側ループ領域に存在するE50残基が、本酵素活性において重要な役割を果たす可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Vacuolar-type ATPases (V-ATPases) structurally resemble F-ATPases and function as proton pump in acidic organelles and plasma membranes of eukaryotic cells as well as in bacteria. The *Enterococcus hirae* V-ATPase is a unique variant of V-ATPase, which recognizes sodium and lithium with near equal affinity and is indispensable for salt tolerance of this bacterium at alkaline pH. We previously indicated that NtpK(E139D) mutant strain lost tolerance to sodium but not to lithium, and suggested that the E139 residue is indispensable for the enzymatic activity of *E. hirae* V-ATPase. In an attempt to isolate the suppressor mutations for NtpK(E139D), we isolated two mutants, NtpK(E50K/E139D) and NtpK(V138I/E139D). Interestingly, the single point mutation of NtpK (E50K) or NtpK(E50D) decreased the activities of V-ATPase to approximately 50% of the wild-type, suggesting that E50 is one of the important residues for the enzymatic activity of *E. hirae* V-ATPase.

研究分野：生化学

キーワード：V-ATPase ナトリウム輸送性 腸球菌

1. 研究開始当初の背景

酵母などの真核微生物ならびに植物細胞の液胞は、生体高分子の分解、物質の貯蔵ならびに隔離作用、イオン恒常性の維持、植物細胞における空間充填作用など、様々な生理機能を担っている。液胞内腔は真核微生物においては液胞型 ATPase (V-ATPase)、植物細胞においては V-ATPase と H⁺-PPase によるプロトン輸送により酸性に保たれている。出芽酵母の V-ATPase サブユニット遺伝子破壊株は中性条件における生育不全を示し、トマトにおいても果実特異的な V-ATPase 発現抑制は果実の成熟不全および種子形成不全を引き起こすことが知られているように、V-ATPase は液胞の生理機能に必要な不可欠なプロトンポンプである。V-ATPase の機能制御は液胞機能の改良・改変による育種への応用に繋がるのが期待され、その反応機構の解明が待望されている。

V-ATPase は ATP 合成酵素 (F-ATPase) と近縁の多量体酵素であり、分子の回転により ATP 加水分解とイオン輸送とが共役する分子モーターである。F-ATPase については、その分子回転の直接観察などエネルギー共役機構に関する様々な研究が進んでいる。V-ATPase についても世界的に数多くの研究者が関わっているが、研究対象が主に真核生物の酸性オルガネラ膜上に存在するために精製標品の大量獲得が困難であること、複数サブユニットへの変異導入など遺伝子取り扱いが容易ではないこと等が理由であり、分子生物学的研究が進められているのは酵母 V-ATPase に限られている。また、酵母 V-ATPase を含めて、真核生物の V-ATPase は H⁺輸送性であるためにイオン輸送の定量的・反応速度論的解析が比較的難しく、その構造と機能に関する分子レベルの解析は十分に進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、真正細菌である腸球菌の細胞膜に存在する Na⁺輸送性 V-ATPase をモデル酵素として、V-ATPase の構造と反応機構に関する基本的情報の獲得を試みた。

腸球菌の V-ATPase は 9 個のサブユニットから構成され、V-ATPase の最小単位、プロトタイプといえる酵素であり、9 個全てのサブユニットが酵素活性に必須である。また、基質として Na⁺もしくは Li⁺を認識する点が最大の特徴であり、輸送活性の定量的評価を比較的簡単に行うことができる。

V-ATPase によるイオン輸送が行われるためには、ATP 加水分解により V_i 部分で発生した回転力が、中心軸 (NtpC, NtpD, NtpG) を介してイオン結合ローター NtpK に効率よく伝達される必要がある。中心軸の最下部では NtpC が NtpK リングと接触するが、NtpC に相当するサブユニットは F-ATPase には存在せず、V-ATPase の反応過程を特徴づけるサブユニットであると考えられる。NtpK・NtpC を中

心として、V-ATPase 複合体の構築および回転とイオン輸送の共役など、V-ATPase の機能制御に関わるサブユニット間相互作用を遺伝子工学的・生化学的手法により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

腸球菌 V-ATPase の NtpC の結晶構造は未解明のため、本酵素に近縁の *Thermus* 菌 H⁺-ATPase サブユニット C の結晶構造を参考に変異導入部位を決定した。NtpI の構造は解明されていない。

(i) 結晶構造に基づく NtpK リング NtpC 接触面への変異導入: NtpC と NtpK との接触面に位置するアミノ酸残基について部位特異的に変異を導入した。NtpC の分子下部領域、NtpK の細胞質側ループ (S47-E50, P125-E126)、について重点的に行った。

(ii) サプレッサー変異株単離による NtpK (NtpI) の必須残基および NtpK リング-NtpC 相互作用部位の同定: NtpK (E139D) は Na⁺輸送能の無い V-ATPase 活性消失型変異である [Kawano-Kawada M, *et al.*, *J Bacteriol*, 193: 3657-3661 (2011)]. E139D 変異を相補するサプレッサー変異は、イオン結合部位の構造変化以外に、イオン輸送と ATP 加水分解の共役(回転力の伝達)が変化した変異を含む可能性がある。ntpK 遺伝子へのランダム変異導入により NtpK (E139D) 変異を相補するサプレッサー変異株の単離を試みた。また、ntpI 遺伝子および ntpC 遺伝子へのランダム変異導入により、それぞれ V-ATPase 活性低下株、V-ATPase 複合体形成不能株のスクリーニングを行った。いずれも、アルカリ条件下における耐塩性を指標とし、同条件で生育できない変異株を単離した。

(iii) V-ATPase 複合体形成および活性の評価: i-ii で単離した変異株から膜画分を調製、イムノプロットにより各サブユニットの発現量を確認するとともに、V-ATPase 複合体を可溶化し、メタルアフィニティー精製により複合体形成への影響を生化学的に調べた。また Cys 残基を部位特異的に置換導入し、化学架橋実験による相互作用の実証を試みた。特に複合体形成能を保持しているが酵素活性が低下している変異については、研究協力者・柿沼の指導の下に、各サブユニット遺伝子破壊株を用いた相補系で Na⁺依存性 ATP 加水分解活性と Na⁺輸送活性に関する反応速度論的解析を進めた。

以上の方法により、V-ATPase によるイオン輸送に関わるアミノ酸残基の同定を行った。特に NtpK-NtpC 間相互作用、および V-ATPase の効率的な回転反応を特徴づけるアミノ酸残基の特定を試みた。

4. 研究成果

本酵素における輸送イオンの結合部位は、膜内在性のローターリングを形成する NtpK サブユニット上のアミノ酸残基、L61, T64,

Q65, Y68, Q110, E139 により構成され、これら 6 残基すべてが本酵素活性に重要である [Kawano-Kawada M, *et al.*, *J Bacteriol*, 194: 4546-4549 (2012)]. 特に第 4 膜貫通領域に存在する E139 残基は F-ATPase および V-ATPase のローターリングサブユニット間で保存された必須酸性アミノ酸残基であり、NtpK(E139D)変異型 V-ATPase は著しい活性低下を示す。また、細胞内外へのイオン輸送通路は NtpI サブユニットの膜貫通領域に存在し、R573 残基が NtpK の E139 残基と協同してイオン輸送に関わることを明らかにしているが [Kawano M, *et al.*, *J Biol Chem*, 277: 24405-24410 (2002)], イオン輸送経路を形成するその他の重要アミノ酸残基については明らかになっていない。そのほか、NtpK サブユニットと回転軸 (NtpC など) との相互作用についても、ほとんどが未解明であった。

腸球菌において、アルカリ条件下、高 Na⁺もしくは Li⁺濃度培地における生育には V-ATPase によるこれらイオンの排出活性が必須である。腸球菌 V-ATPase の NtpK(E139D)変異型酵素発現株は、アルカリ条件下、高 Na⁺濃度培地ではほとんど生育しないことが分かっている。NtpK(E139D)変異を抑圧する変異には、イオン輸送と ATP 加水分解の共役(回転力の伝達)が変化した変異を含む可能性が高い。ランダムに変異を導入した *ntpK*(E139D)発現ベクターを *ntpK* 株に導入し、アルカリ条件下、高 Na⁺濃度培地における生育の回復を指標として、E139D サプレッサー変異株のスクリーニングを行った。その結果、NtpK(E139D)変異を抑制する 2 つの変異、NtpK(E50K/E139D) および NtpK(V138I/E139D)を同定した。これらの二重変異株では、アルカリ条件下高 Na⁺濃度培地における生育が野生型 *ntpK*発現株の 70%程度にまで回復していた。しかし、解析を進めた結果、E50K/E139D 二重変異は完全なサプレッサー変異ではなく、E50K の単一変異によっても V-ATPase 活性が低下することが分かった。NtpK(E50K)変異型酵素発現株においては、アルカリ条件下高 Na⁺濃度培地における生育が野生型の約 50%程度まで抑制され、生細胞からの Na⁺排出活性も野生株の 50%程度に低下した。また、E50 残基をリジン以外のアミノ酸へ置換した単一変異株について V-ATPase 活性を調べた結果、アスパラギン酸もしくはグルタミンへの置換によってもリジン置換体と同様に酵素活性が低下したことから、E50 自身が本酵素活性に重要なアミノ酸残基であり、50 番目の残基はグルタミン酸であることが必須であると示唆された。E50 残基は NtpK リングと NtpC との境界面に位置する残基であるため、E50K 等の変異により NtpK のヘリックス 1-2 の構造(位置関係)が変化し、酵素活性が低下した可能性がある。

E50 残基の重要性が明らかになったことから、E50 残基を含む NtpK の細胞質側ループ 1 (S47, Q48, P49) およびループ 3 (P125, E126)

について部位特異的にアラニン置換変異体を作製し、酵素活性に対する変異の影響を調べたが、これらについては現在のところ活性に対する影響は観察されていない。

さらに NtpK サブユニット上のイオン選択性に関わるアミノ酸残基を明らかにするために、ランダム変異導入および高 Na⁺もしくは Li⁺濃度のアルカリ性寒天培地を用いたスクリーニングを行い、*ntpK*の発現量ではなく、V-ATPase 活性が低下した変異体を複数単離し、NtpK(E50D)および NtpK(G27R)変異が同定された。G27R 変異については *ntpK* および V-ATPase の発現量に影響しないことを確認しており、活性に対する影響を今後解析予定である。

また V-ATPase 活性に関連して、酵母液胞トランスポーターである Vba4 がアゾール系などの薬剤感受性に関与することを明らかにした。液胞トランスポーターの活性には V-ATPase によるプロトン輸送が大きく関与する。V-ATPase の Vo a サブユニット(腸球菌 V-ATPase NtpI に相当)のアイソフォームの違いによって抗菌薬感受性に影響する結果を得ており(未発表データ)、V-ATPase 活性と抗菌薬感受性との関係性についても研究を展開している。

本研究により、腸球菌 V-ATPase において膜内ローターリングを形成する NtpK サブユニットの細胞質側ループ領域が、酵素活性において重要な役割を果たす可能性が示された。今後、E50K および E50K/E139D 変異型酵素について引続き精製再構成系の構築を進め、V-ATPase 複合体形成および活性に対する評価を行う。現在までに E50K 単一、E50K/E139D 二重変異型酵素のいずれもが V-ATPase 複合体形成能を保持していることを確認しており、これら変異型酵素はイオン輸送と酵素の回転の uncoupling を起こしていると期待される。

また、NtpI および NtpC についてもランダム変異導入により V-ATPase 活性低下型変異株を複数単離している。NtpK, NtpC, NtpI いずれも各サブユニット遺伝子の破壊株および発現相補系は確立しているため、多重変異型酵素の生化学的解析を行うため、腸球菌 *ntpC/ntpK* もしくは *ntpI/ntpK* 二重遺伝子破壊株および NtpC/NtpK, NtpI/NtpK 二重変異型酵素の精製系を構築中である。これら精製変異型 V-ATPase を用いて、Na⁺依存性 ATP 加水分解活性、NtpK リングへの Na⁺結合能、Na⁺輸送活性など、引き続き反応速度論的解析を行い、回転とイオン輸送のエネルギー共役に関するパラメーターを取得することにより、最終的に V-ATPase の反応メカニズム解明を目指している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Miyuki Kawano-Kawada, Pongsanat Pongcharoen, Rieko Kawahara, Mayu Yasuda,

Takashi Yamasaki, Koichi Akiyama, Takayuki Sekito, Yoshimi Kakinuma, Vba4p, a vacuolar membrane protein, is involved in the drug resistance and vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, vol.80:279-287(2016)doi: 10.1080/09168451.2015.1083401.

〔学会発表〕(計7件)

1. 山地有紀奈, 丸橋優那, 大江怜奈, 西谷幸大, 関藤孝之, 河田美幸, 腸球菌ナトリウム輸送性 V-ATPase 膜内在性サブユニットの変異体解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学(京都府・京都市)

2. 河田美幸, 山地有紀奈, 西谷幸大, 関藤孝之, 柿沼喜己、腸球菌ナトリウム輸送型 V-ATPase における E50 および V138 残基の役割、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

3. 大江怜奈, 山地有紀奈, 丸橋優那, 西谷幸大, 関藤孝之, 河田美幸、腸球菌液胞型 ATPase ローターサブユニットにおける重要アミノ酸残基の同定、第 7 回愛媛微生物学ネットワークフォーラム、2016 年 10 月 29 日、松山大学(愛媛県・松山市)

4. 山地有紀奈, 河田美幸, 西谷幸大, 関藤孝之, 柿沼喜己、腸球菌 Na⁺輸送性 V-ATPase の活性に関わる NtpK サブユニットアミノ酸残基の同定、第 57 回日本生化学会 中国・四国支部例会、2016 年 5 月 28 日、高知大学医学部(高知県・南国市)

5. 河田美幸, 西谷幸大, 柿沼喜己、腸球菌 Na⁺輸送性 V-ATPase における NtpK E50 残基の役割、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

6. 河田美幸, 西谷幸大, 柿沼喜己、液胞型 ATPase 膜内在性ローターサブユニットの変異体解析、日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会、2015 年 9 月 17 日、愛媛大学農学部(愛媛県・松山市)

7. 河田美幸, 高橋寛子, 五十嵐一衛, 山登一郎, 村田武士, 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、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔その他〕

ホームページ : <http://a5340.webnode.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 美幸 (Kawada Miyuki)
愛媛大学・農学研究科・准教授
研究者番号 : 1 0 4 5 4 4 9 8

(4) 研究協力者

柿沼 喜己 (Kakinuma Yoshimi)