

X線結晶構造解析から明らかになる腸球菌 Na⁺ 輸送性 V-ATPase の回転メカニズム

西條慎也¹, 山登一郎², 村田武士^{3,4}

¹ 高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所, ² 東京理科大学基礎工学部,

³ 千葉大学大学院理学研究科, ⁴ JST, PRESTO

X-ray crystallography unraveled the rotation mechanism of Na⁺ translocating V-ATPase

Shinya SAIJO¹, Ichiro YAMATO², Takeshi MURATA^{3,4}

¹ Institute of Materials Structure Science, KEK,

² Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science,

³ Graduate School of Science, Chiba University, ⁴ JST, PRESTO

Abstract

V₁-ATPase は ATP の加水分解のエネルギーを利用して、中心軸である DF 複合体がヘテロ六量体からなる A₃B₃ 複合体の内部で回転する分子モーターである。本研究では、ATP アナログ結合型および非結合型の A₃B₃ 複合体の構造から、ATP の結合により起こる構造変化を明らかにし、さらに、ATP アナログ結合型および非結合型の V₁-ATPase (A₃B₃DF 複合体) の構造から、DF 複合体の結合により起こる A₃B₃ 複合体の構造変化を明らかにし、ATP が分解される部位を推定した。これらの構造が示す非対称性から、V₁-ATPase の回転機構のモデルを提案した。

1. はじめに

細胞の内外のイオン環境を適切に維持することは生物の生存に必須である。イオン環境の恒常性を維持するためには、細胞の生体膜に存在するイオン輸送性タンパク質、その中でもイオン輸送性 ATPase が重要な役割を果たしている。イオン輸送性 ATPase は、細胞におけるエネルギー通貨である ATP (アデノシン三リン酸) の加水分解のエネルギーを利用してイオンを輸送するタンパク質であり、細胞膜に存在する P-ATPase、ミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜に存在する F-ATPase、主に真核細胞のオルガネラに存在する V-ATPase (Vacuolar ATPase, 液胞型 ATPase) が知られている。F-ATPase はプロトンの濃度勾配と膜電位を用いて ATP 合成をおこなう ATP 合成酵素である。一方、V-ATPase はこのエネルギーを利用して、真核生物において酸性オルガネラ膜にてプロトンを送り込み内部の pH を酸性に保っている。V-ATPase は細胞膜にも存在し、細胞間マトリックスの pH を酸性化することで骨吸収やがんの悪化・転移にも関与している [1]。そのため、ヒト V-ATPase は骨粗鬆症やがんなどの多くの疾病にかかわる創薬ターゲットとしても注目されている。

V-ATPase と F-ATPase の構造には類似点が多く、共通の祖先を持つと考えられている。ATP 分解 (合成) 活性を持つ親水性の V₁ 部分あるいは F₁ 部分と、イオンポンプである膜内在性の V₀ 部分あるいは F₀ 部分とが、中心軸と周辺固定子により繋がった共通構造をもつ。触媒機能をもつ V₁-ATPase および F₁-ATPase は回転分子モーターであることが知られている。F₁-ATPase については、X線結晶構

造解析 [2] や 1 分子観察 [3] など数多くの研究がなされてきた。一方、V₁-ATPase に関しては、ATP 合成酵素として機能する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の V-ATPase を用いて研究は先導されてきた。A₃B₃ 複合体の結晶構造 [4] (分解能 2.8 Å) や、V₁-ATPase (A₃B₃DF 複合体) の結晶構造 [5] (分解能 4.5 ~ 4.8 Å), 1 分子観察 [6] から、F₁-ATPase との違いが明らかになってきたが、V₁-ATPase の詳細な回転機構の理解に必要な高分解能での結晶構造の解明が待たれていた。

筆者らは、腸球菌 (*Enterococcus hirae*) から発見された V-ATPase の類縁酵素について、分子生物学的、生化学的、構造生物学的な研究を展開し、この酵素が Na⁺ 輸送性

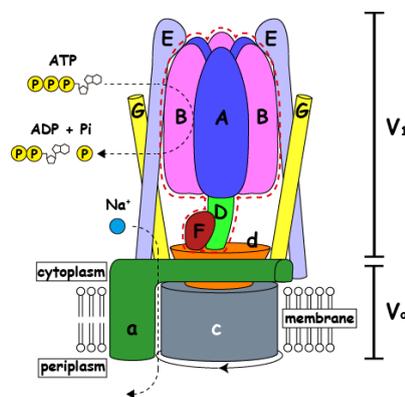


Figure 1 Schematic model of *E. hirae* V-ATPase. V₁-ATPase is indicated with the dotted line (red).

V-ATPaseであることを明らかにした (Fig. 1) [7]。本研究では、V-ATPaseの回転機構の解明を目的として、V₁-ATPaseを構成するサブユニット (A, B, DF) について、発現系、精製系、再構成系を構築し、得られた複合体のX線結晶構造解析 [8] を行った。

2. V₁-ATPaseの発現と結晶の改善

1995年以降、筆者らは腸球菌からV₁-ATPase (A₃B₃DF複合体) を大量発現、精製することに成功し、V₁-ATPaseのX線結晶構造解析を目的として結晶化を進めてきた。結晶は短期間で得ることができたが、試料に中心軸であるDF複合体が解離したタンパク質が混在していたため、放射光を利用しても6 Å程度と回折能は低く、結晶構造解析を行うことは不可能であった。次に、大腸菌発現系を用いてAサブユニットおよびBサブユニットをそれぞれ個別に発現、精製をおこない、A₃B₃複合体を再構成することに成功したが [9]、結晶化スクリーニングに必要な大量調

製を行うことが困難であった。最終的に大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて共発現させることでA₃B₃複合体の大量調製に成功し、この高純度のタンパク質試料を用いることにより良質の結晶を得ることができた。同様に、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いた共発現によってDF複合体の大量調製をおこない、DF複合体単独での結晶構造解析にも成功した [10]。これらの高純度のA₃B₃複合体とDF複合体からのV₁-ATPase (A₃B₃DF複合体) の再構成条件を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した。その結果、安定に精製できる条件 (酸性、Mg²⁺の添加) を見出すことに成功し、この標品を用いることでV₁-ATPaseについても良質の結晶を得ることができた。

3. A₃B₃複合体の構造

ATPやADPなどのヌクレオチドの非存在下で得られたヌクレオチド非結合型A₃B₃複合体の結晶構造を分解能2.8 Åで決定した (PDB ID: 3VR2, Fig. 2a)。触媒サブユ

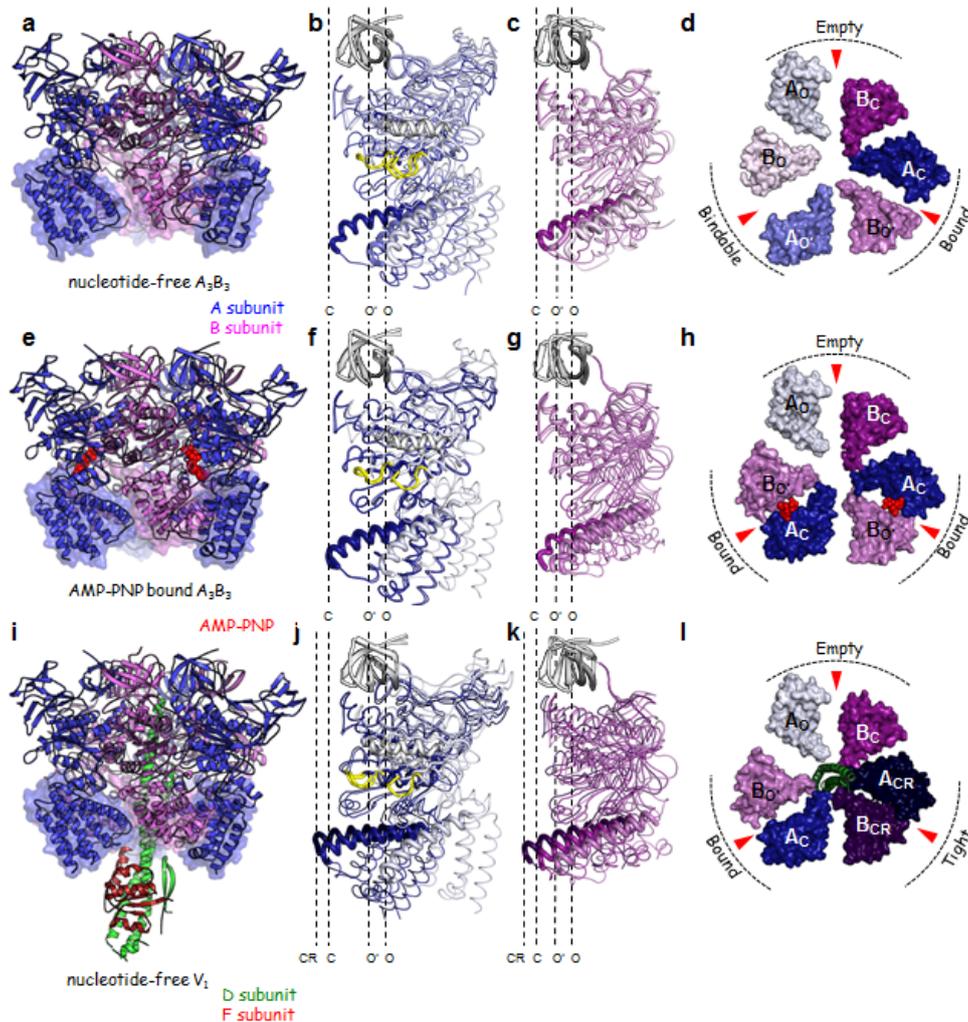


Figure 2 Structure of the A₃B₃ and A₃B₃DF complexes.

a, Side view of the nucleotide-free A₃B₃ structure. **b**, **c**, Superimposed structures at the N-terminal β-barrel (white) of the three structures of A (**b**) and B (**c**) in the nucleotide-free A₃B₃. Open (O and O') and closed (C) conformations of A and B are shown in light and darker colors, respectively. **d**, Top view of the C-terminal domain (shown in a as transparent surface) of the nucleotide-free A₃B₃ from the N-terminal β-barrel side. The triangles indicate the nucleotide-binding sites. **e**–**h**, Structures of the AMP-PNP-bound A₃B₃, and **i**–**l**, Structures of the nucleotide-free A₃B₃DF complex, viewed and colored as in **a**–**d**.

ニットである A サブユニットと非触媒サブユニットである B サブユニットがそれぞれ 3 つ、互い違いに配置したヘテロ六量体リングから構成されていた。どちらのサブユニットも N 末端側にある β バレル、中間にある α/β ドメイン、C 末端側にあるヘリカルドメインから構成されているが、ヘテロ六量体リングの同一の 3 つのサブユニット構造に違いがあることが明らかになった。ヘテロ六量体リングのなかで固定されている N 末端側の β バレルについてそれぞれを重ね合わせたところ、A サブユニットのうち 1 つは A_3B_3 複合体のリングの中心にむかいシフトしている closed 構造 (A_C) をとり、残り 2 つの A サブユニットは互いによく似た open 構造 (A_O および $A_{O'}$) をとっていた。同様に、B サブユニットも 1 つは closed 構造 (B_C) を、2 つは open 構造 (B_O および $B_{O'}$) をとっており、 A_3B_3 複合体は非対称な構造であった。3 箇所あるヌクレオチド結合部位は A_OB_C ペア、 $A_{O'}B_{O'}$ ペア、 $A_CB_{O'}$ ペアのあいだに位置し、A サブユニットの P ループ、A サブユニットのアーム領域の N 末端側に存在する Glu261 および Arg262、B サブユニットの Arg フィンガーとよばれる領域にある Arg350 から構成されているが、ヌクレオチドと結合していないにもかかわらず、これら 3 つのヌクレオチド結合部位も異なるコンホメーションをとっていた。

次に、ATP とどのように結合するかを明らかにするため、ATP アナログである AMP-PNP の存在下で結晶化させたヌクレオチド結合型 A_3B_3 複合体の構造を分解能 3.4 Å で決定した (PDB ID: 3VR3, Fig. 2b)。3 箇所のヌクレオチド結合部位のうち 2 箇所に AMP-PNP が結合していた。AMP-PNP と結合していない AB ペアはヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の A_OB_C ペアにもっとも類似したコンホメーションをとっており、AMP-PNP に対する親和性が低いと考えられたため、この A_OB_C ペアを empty 型と名づけた。また、AMP-PNP と結合していた 2 つの AB ペアの構造は互いによく似ており、また、ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の $A_CB_{O'}$ ペアとも、AMP-PNP と相互作用していた側鎖の構造のほかはよく似ていた。この $A_CB_{O'}$ ペアはヌクレオチドを結合している状態の構造であると考えられたので bound 型と名づけた。ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の $A_{O'}B_{O'}$ ペアは、ATP の存在下ではこれと結合し bound 型に構造変化すると考えられた。そこで、この $A_{O'}B_{O'}$ ペアはヌクレオチドと結合できるという意味で bindable 型と名づけた。それでは、この bindable 型はどのようにして ATP を認識、結合し bound 型へと構造を変化させるのだろうか？ ATP の γ リン酸と相互作用する Arg262 と Arg350 との距離は、bindable 型と bound 型とで類似していた。一方、empty 型では Arg262 と Arg350 との距離が近づいており、この距離の違いがヌクレオチドに対する親和性の違いを生んでいる可能性が示唆された。

このように、 A_3B_3 複合体は ATP と結合できない型 (empty 型)、ATP と結合することができる型 (bindable 型)、ATP と結合している型 (bound 型) の 3 つの異なる AB ペアから構成されていることが明らかになった。ATP の存在下で

は bindable 型と bound 型に ATP が結合し 2 つの bound 型ができるが、もともとあった bound 型において ATP が分解されると、bound 型は empty 型に、empty 型は bindable 型に変化して A_3B_3 複合体ははじめの構造にもどると考えられた。つまり、もとの A_3B_3 複合体の構造から 120 度回転させた構造にずれていくことになる。以上の考察から、 V_1 -ATPase が ATP のエネルギーを使って一方向に回転するしくみを、 A_3B_3 複合体の非対称構造から理解することができた。

4. V_1 -ATPase 複合体の構造

ヌクレオチド非結合型の V_1 -ATPase (A_3B_3DF 複合体) の結晶構造を分解能 2.2 Å で決定した (PDB ID: 3VR4, Fig. 2c)。 A_3B_3 複合体と同様に、非対称な六量体を形成する A サブユニットと B サブユニットの中心の空洞部分に、中心軸である D サブユニットと F サブユニットが挿入された構造をとっていた。D サブユニットは DF 複合体のみの結晶構造 [10] よりもまっすぐな構造で、六量体の内部に挿入されているコイルドコイル構造の α ヘリックスは A_3B_3 複合体の内部にある多くの残基と相互作用していた。 V_1 -ATPase のもつ ATPase 活性を促進させるのに重要な D サブユニットの短い β ヘアピンと F サブユニットの C 末端領域は、B サブユニットの C 末端ドメインと相互作用していた。

ヌクレオチド非結合型の A_3B_3 複合体と V_1 -ATPase (A_3B_3DF 複合体) の立体構造を比較することにより、DF 複合体との相互作用により引き起こされる構造変化を理解することができた。ヌクレオチド非結合型 A_3B_3DF 複合体には、1 つの empty 型 (A_OB_C ペア) と 1 つの bound 型 ($A_CB_{O'}$ ペア) が存在していた。しかしながら、empty 型どうしの位置を基準とした場合、ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の bindable 型は A_3B_3DF 複合体ではヌクレオチドがなくても bound 型に変化していた。この構造変化はヌクレオチド結合型 A_3B_3 複合体において AMP-PNP との結合により起こった変化と非常によく似ていた。残りの AB ペアは A_3B_3 複合体には存在しない、よりコンパクトなコンホメーションに変化していた。このコンホメーションを closer 構造 (A_{CR} および B_{CR})、この $A_{CR}B_{CR}$ ペアを tight 型と名づけた。ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の bound 型が DF 複合体との相互作用により tight 型へと変化したものと考えられた。

tight 型のヌクレオチド結合部位では B_{CR} の Arg フィンガー (Arg350) がアーム領域の Arg262 に接近していた。この Arg350 の構造変化がヌクレオチドとの結合にどのような影響をあたえているかを知るため、ATP アナログである AMP-PNP と結合したヌクレオチド結合型の V_1 -ATPase (A_3B_3DF 複合体) の構造を分解能 2.7 Å で決定した (PDB ID: 3VR6)。AMP-PNP は bound 型と tight 型の 2 箇所に結合し、empty 型には結合しなかった。ヌクレオチド結合型 A_3B_3 複合体での結果と同様に、empty 型ではヌクレオチドに対する親和性が低いものと考えられた。AMP-PNP の

γ リン酸と Mg^{2+} はヌクレオチド結合型 A_3B_3 複合体と同様に、Aサブユニットの Lys238, Thr239, Arg262 と Bサブユニットの Arg フィンガー (Arg350) と相互作用していた。ヌクレオチド結合型 V_1 -ATPase の tight 型および bound 型のヌクレオチド結合部位を比較したところ、tight 型において Arg フィンガー (Arg) が γ リン酸に対し 1.6 Å 近づき、 γ リン酸それ自体も Glu261 に対し 0.7 Å 移動していた。Glu261 は出芽酵母の V_1 -ATPase においては ATPase 活性に必須で [11], F_1 -ATPase においても γ リン酸の酸素原子と水を介し相互作用している [12]。以上の結果から、DF 複合体との相互作用により起こる Arg フィンガーの動きが ATP 加水分解のきっかけとなることが示唆され、今回、得られたヌクレオチド結合型 V_1 -ATPase の結晶構造は ATP 加水分解待ちの中間状態をとらえているものと考えられた。

5. 回転機構のモデル

本研究で得られた結晶構造をもとに、 V_1 -ATPase の回転機構のモデルを提案する (Fig. 3)。ヌクレオチド結合型 V_1 -ATPase では bound 型と tight 型の2箇所に ATP が結合している。tight 型に結合した ATP は Arg フィンガーが γ リン酸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はスタートする。ATP が加水分解されると A_3B_3 複合体には定常状態であるヌクレオチド非結合型の構造にもどるような構造変化が促進されると考えられる。つまり、tight 型は empty 型へと構造変化し、ヌクレオチドに対する親和性が低下した結果、ADP とリン酸の遊離が起こる。一方、empty 型は ATP との結合の可能な bindable 型へと構造変化を起こし、 A_3B_3 複合体はヌクレオチド非結合型の状態になる方向へと進む。しかしながら、tight 型と DF 複合体は強く結合しているため、 A_3B_3 複合体の構造変化は抑制されると考えられ、実際には、これらの中間状態に変化すると予想している。つき

に、bindable 型あるいは中間状態の AB ペアと ATP とが結合することにより A_3B_3 複合体はヌクレオチド結合型の構造に変化し、2つの bound 型に ATP が結合し、これにより DF 複合体は回転する。最後に、もともとあった bound 型が DF 複合体との相互作用により tight 型へと構造変化し、Arg フィンガーが γ リン酸に近づいて、はじめの構造から 120 度ずれた構造になる。

6. おわりに

本研究では、腸球菌に由来する V -ATPase について、ヌクレオチド非結合型およびヌクレオチド結合型の A_3B_3 複合体および V_1 -ATPase (A_3B_3 DF 複合体) の結晶構造を明らかにした。

ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の構造自体が非対称性を持ち、その非対称性が回転の方向性を決定していることや、DF 複合体との結合により tight 型への構造変化が引き起こされ ATP 加水分解のトリガーとなることなどが示唆され、 V_1 -ATPase の新しい回転機構のモデルを提案することができた。腸球菌 V -ATPase の知見をもとに、反応中間体の結晶構造解析や分子動力学シミュレーション、1分子観察などの関連構造解析を進めている。また、創薬ターゲットであるヒト V -ATPase に関する研究も進行中である。

謝辞

本稿で紹介した研究における X線回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリーの BL-1A, NE3A, NW12A および SPring-8 の BL41XU を用いて行われました。また、文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金、ターゲットタンパク研究プログラム、ならびに JST 戦略的創造研究推進事業さきがけ「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」の支援を受けて実施されたものです。ここに謝意を表します。

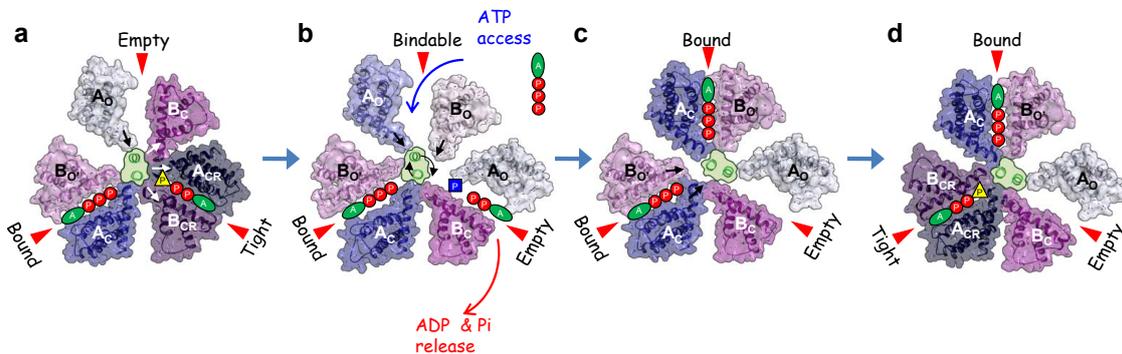


Figure 3 Rotation model of V_1 -ATPase.

Top view of the C-terminal domain viewed as in Fig. 2d, h and i. ATP with triangle “P” in a and d represents an ATP molecule that is committed to hydrolysis. The rectangle “P” in b represents a phosphate molecule after ATP hydrolysis. a, The AMP-PNP-bound V_1 : Two ATPs are bound in the “Bound” and “Tight” forms at first. The reaction is triggered by the ATP hydrolysis in the “Tight” form. b, The nucleotide-free A_3B_3 : By the conversion to ADP and phosphate, the conformation of the A_3B_3 part in V_1 -ATPase may return to nucleotide-free A_3B_3 (ground structure of A_3B_3 complex) in a cooperative manner. The “Tight” form changes to the “Empty” form with the release of ADP and phosphate and the “Empty” form changes to the “Bindable” form. c, The AMP-PNP-bound A_3B_3 : By new ATP binding to the “Bindable” form, the conformation changes to A_3B_3 , which has two “Bound” forms with two ATP, and then the DF rotates. d, The “Bound” form from the beginning changes to the next “Tight” form, induced by DF binding and the V_1 -ATPase returns to the initial state with 120° rotation.

引用文献

- [1] M. Forgac, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **8**, 917 (2007).
- [2] J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker, Nature, **370**, 621 (1994).
- [3] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita. Nature **386**, 299 (1997).
- [4] M. J. Maher, S. Akimoto, M. Iwata, K. Nagata, Y. Hori, M. Yoshida, S. Yokoyama, S. Iwata, and K. Yokoyama, EMBO J., **28**, 3771 (2009).
- [5] N. Numoto, Y. Hasegawa, K. Takeda, and K. Miki, EMBO Rep., **10**, 1228 (2009).
- [6] H. Imamura, M. Takeda, S. Funamoto, K. Shimabukuro, M. Yoshida, and K. Yokoyama, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 17929 (2005).
- [7] S. Arai, S. Saijo, K. Suzuki, K. Mizutani, Y. Kakinuma, Y. Ishizuka-Katsura, N. Ohsawa, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, S. Iwata, I. Yamato, and T. Murata, Nature, **493**, 703 (2013).
- [8] T. Murata, K. Igarashi, Y. Kakinuma, and I. Yamato, J. Biol. Chem., **275**, 13415 (2000).
- [9] S. Arai, I. Yamato, A. Shiokawa, S. Saijo, Y. Kakinuma, Y. Ishizuka-Katsura, M. Toyama, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, S. Iwata, and T. Murata, Biochem. Biophys. Res. Commun., **390**, 698 (2009).
- [10] S. Saijo, S. Arai, K. M. M. Hossain, I. Yamato, K. Suzuki, Y. Kakinuma, Y. Ishizuka-Katsura, N. Ohsawa, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, S. Iwata, and T. Murata, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 19955 (2011).
- [11] Q. Liu, X. H. Leng, P.R. Newman, E. Vasilyeva, P. M. Kane, and M. Forgac, J. Biol. Chem., **272**, 11750 (1997).
- [12] M. W. Bowler, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, J. Biol. Chem., **282**, 14238 (2007).

(原稿受付日：2013年10月17日)

著者紹介

西條慎也 Shinya SAIJO



物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 研究員

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-864-6105

FAX: 029-864-6105

e-mail: shinya.saijo@kek.jp

略歴：2005年東京工業大学生命理工学研究科博士後期課程修了，理化学研究所リサーチアソシエイト，高輝度光科学研究センター協力研究員，東京理科大学基礎工学部助教を経て2013年より現職。博士（理学）。

最近の研究：タンパク質の放射光X線小角散乱。

山登一郎 Ichiro YAMATO



東京理科大学基礎工学部 教授

〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

TEL: 03-5876-1717 ex.1902

FAX: 03-5876-1639

e-mail: iyamato@rs.noda.tus.ac.jp

略歴：1977年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了，東京大学理学部助手，スイス・バーゼル大学バイオセンター研究員，東京理科大学基礎工学部助教を経て1995年より現職。薬学博士。
最近の研究：生体エネルギー論，インシリコ生物学。

村田武士 Takeshi MURATA



千葉大学大学院理学研究科 准教授

〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

TEL: 043-290-2794

FAX: 043-290-2794

e-mail: t.murata@faculty.chiba-u.jp

略歴：2000年東京理科大学大学院基礎工学研究科博士課程修了，英国・MRC博士研究員，理化学研究所基礎科学特別研究員，京都大学医学部助教を経て2009年より現職，工学博士。

最近の研究：膜タンパク質の構造機能解析。