

論文の内容の要旨

論文題目 1分子計測を用いた分子モーター *Enterococcus hirae*由来V-ATPaseの回転機構に関する研究

氏名 皆川 慶嘉

(本文)

V型ATP加水分解酵素(V-ATPase)はATPの加水分解で得られるエネルギーを用い、細胞膜を介したイオンの能動輸送を行う回転分子モーターである。V-ATPaseは親水部位のV₁部位と細胞膜に埋め込まれたV_o部位から構成される。V₁はATPをADPと無機リン酸(P_i)に加水分解し、その際に得られる自由エネルギーを利用して回転するナノスケールの回転分子モーターである。A₃B₃複合体が固定子、DF複合体が回転軸となる。V₁で発生した回転トルクはV_oに伝達され、イオンの能動輸送を実現し、膜を隔てた電気化学ポテンシャルを生成する。この回転機構には未だ不明な点が多い。

V-ATPaseの回転運動はこれまで、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のV-ATPaseで観察されてきた。特にV₁部位(TtV₁)の回転はATPの濃度に依らず120°のステップと停止を繰り返しながら1回転することが分かっている。他方、V-ATPaseと構造が類似するF型ATP合成酵素の親水部位であるF₁の回転は好熱菌(thermophilic *Bacillus* PS3)由来F₁(TF₁)、大腸菌(*Escherichia coli*)由来F₁、ヒトミトコンドリア由来F₁(ヒトF₁)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来F₁を用いて詳細な観察が行われている。F₁はV₁と同様に120°毎のステップを示すが、120°ステップは幾つかのサブステップに分けられることが明らかとなっている。以上から、V₁はF₁とは違った回転機構で回転

していることが示唆されている。しかしながら、これまで TtV_1 以外の V_1 の回転の詳細な観察は行われておらず、 V_1 特有の回転特性は明らかではなかった。更に、 F_1 では、化学力学共役スキームが詳細に調べられており、 TF_1 、ヒト F_1 では回転軸が 1 回転する間にどの角度で ATP 加水分解のどの反応素過程(ATP 結合、ATP 開裂、ADP の解離、 P_i の解離)が起こるのかが明らかとなっている。対して V_1 では、化学力学共役は未だ明らかとなっていない。

本研究では *Enterococcus hirae* 由来 V-ATPase (EhV_0V_1) に着目した。 EhV_0V_1 はナトリウムを輸送基質としたイオンポンプとして働いている。 EhV_0V_1 の親水部位である V_1 (EhV_1) の結晶構造は、X 線結晶構造解析によって V_1 では初めて高空間分解能で解明されている。そのため、 EhV_1 は変異体を作製しやすく、また各反応素過程の中間状態の構造から化学力学共役スキームが予測可能となる。本論文では EhV_0V_1 と EhV_1 を対象として、1 分子計測によって回転機構及び化学力学共役機構を調べた結果をまとめた。本論文は以下の 7 章から構成されている。

第 1 章では、これまで他分子モーターで行われた 1 分子計測について詳細に述べた。

第 2 章では、 EhV_1 の基本的な回転特性について報告した。 EhV_1 の回転軸に可視化プローブである金コロイドを結合させ、全反射顕微鏡を用いて 1 分子回転計測を行った。 EhV_1 は回転中のステップと停止が明瞭に観察されるクリアな回転状態と、ステップと停止が不明瞭であるアンクリアな回転状態を遷移しながら回転した。少なくともクリアな回転状態ではタイトな化学力学共役が成り立っていると考え、 EhV_1 の回転特性を得るために解析を行った。明瞭な回転状態における EhV_1 の回転速度は ATP 濃度依存性を示し、ミカエリスメンテン式に従った。最大回転速度 (V_{max}) は 107 rps、ミカエリス定数 (K_m) は 154 μ M と見積もられた。 K_m の下から上までの様々な ATP 濃度で回転観察を行ったところ、 TtV_1 と同様に ATP 濃度に依らず 120°毎に 3 つの停止点を示しながら反時計周りに 1 方向回転した。この結果はサブステップの無い 120°のステップ回転が V_1 の共通の特性であり、 V_1 は F_1 とは違った化学力学共役スキームを持つ事が示された。

第 3 章では EhV_0V_1 と EhV_1 の固定子と回転軸の相互作用について述べた。 EhV_0V_1 と EhV_1 にそれぞれ可視化用のプローブとしてポリスチレンビーズ若しくは金コロイドを結合させ 1 分子回転計測を行った。まず、粘性抵抗の高いポリスチレンビーズ(直径 287 nm)を用いたときの長く回転している回転軌跡からトルクを求めた。トルクは熱力学的な法則である揺らぎの定理から求められ、 EhV_0V_1 のトルク (23 ± 10 pNnm) は EhV_1 のトルク (13 ± 3 pNnm) の倍と見積もられた。一方で、50 nm の金コロイドを用いた低負荷条件において、 EhV_1 のクリアな回転状態のステップトルク (27 ± 5 pNnm) は粘性の高い

プローブを使った際のEhV₀V₁のトルクと同等であった。この結果はEhV₁のアンクリアルな回転状態では低いトルクが発生しており、回転子と固定子の相互作用が弱くなっていること示している。また、全複合体EhV₀V₁では2つのペリフェラルストークによって回転子と固定子の相互作用が安定化されると解釈した。しかしながら、EhV₀V₁のトルクは他種のF-ATPaseやV-ATPaseのトルク(30~40pNm)と比べると明らかに低い。この低いトルクは低いエネルギー変換効率を示唆しており、生理的条件下でナトリウム駆動力を形成できるのか、EhV₀V₁はATP合成が可能なのかという疑問が残る。

第4章ではEhV₁の触媒サイトのATPと相互作用するアミノ酸残基に変位を入れて、ATP加水分解反応にどのような影響があるのか報告した。ATPのアデニン環と相互作用するフェニルアラニンをグルタミン酸に置換したA(F425E)変異体とA(F506)変異体は野生型に比べてATP結合速度が1/4000と1/40になっており、基質認識に深く関与していることが示された。また、A(F425E)変異体ではATP結合ではない他の反応素過程(ATPの開裂、ADPの解離、Piの解離)も遅くなっていた。更に、それら2つの変異体の120°のステップトルクは野生型と同等の値を示した。これらのことからトルク発生には寄与しないことが明らかとなった。F₁でも同様の結果が得られていることから回転分子モーターのアデニン環に相互作用するフェニルアラニンの役割が明らかとなった。

また、ATPのリン酸部位と相互作用するアルギニンをリジンに置換したB(R350K)変異体ではATP結合速度は野生型と変わらなかったが、V_{max}が1/360となっていた。更にADP高濃度条件下において、B(R350K)変異体は野生型では観察されなかったバックステップ現象を示した。この結果からADPの解離がV₁のトルク発生に関与していることが明らかとなった。

第5章では、野生型と変異体のハイブリッドEhV₁を作製し、その回転特性を評価した。まず、第4章で得られた2つの反応素過程が遅いA(F425E)変異体を野生型の3つある内の1つのAサブユニットに導入したハイブリッドEhV₁の作製に成功した。次に、金コロイドをプローブとして回転を観察した。ハイブリッドEhV₁は野生型と同様に120°のステップと停止を繰り返しながら回転したが、ステップ間の3つの停止点の停止時間はそれぞれ異なっていた。ハイブリッドEhV₁の各停止点を停止時間が短い順に”Short”、”Middle”、”Long”とすると、”Short”と”Middle”の停止時間はATP濃度によって変化しなかったが、”Long”は大きく変化した。この結果は”Long”がA(F425E)変異体のATP結合待ちの停止に対応していることを示している。また、”Middle”はA(F425E)変異体のもう1つの遅い反応素過程に対応すると考えられる。”Middle”は”Long”から240°回転した後の停止点であるため、ATPが0°で結合すると、もう1

つの遅い反応素過程は 240° で起こる事が示された。この結果は、 240° 回転するまで生成物が残っている事から、2つのヌクレオチドが結合した状態での回転を支持した。

第6章では、ATPの結合角度とADPの解離角度を同定した事について報告した。具体的には蛍光色素でラベルされているATPと回転軸に結合した金コロイドの回転を同時に計測した。Cy3-ATPが結合すると 120° のステップが観察され、結合している間に1度 120° のステップが起こり、生成物であるCy3-ADPが解離した後に 120° のステップが起こった。結果としてATPが 0° で結合すると、ADPは 240° 回転した後で解離することが明らかとなった。また、ATP結合後とADP解離後に 120° ステップが起きる事はこれら2つの反応素過程がトルク発生に寄与することを示している。

第7章では、第2章から第6章の結果を総括し、1分子計測の結果とX線結晶構造解析によって得られた結晶構造を合わせてEhV₁のF₁とは違った化学力学共役のモデルについて考察した。また、EhV₁とF₁の回転機構及び化学力学共機構の違いに関して、イオンポンプとATP合成酵素といった生理的機能の違いに起因すると解釈した。