

博士論文(要約)

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

皆川 慶嘉

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V₀部位から構成される。V₁はATPをADPと無機リン酸(Pi)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V₀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TtV₁以外のV₁の回転の詳細な観察は行われておらず、V₁特有の回転特性は明らかではなかった。更に、F₁では、化学力学共役スキームが詳細に調べられており、TF₁、ヒトF₁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、Piの解離)が起こるのかが明らかとなっている。対してV₁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 (EhV₀V₁)に着目した。EhV₀V₁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。EhV₀V₁の親水部位であるV₁ (EhV₁)の結晶構造は、X線結晶構造解析によってV₁では初めて高空間分解能で解明されている。そのため、EhV₁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EhV₀V₁とEhV₁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、EhV₁の基本的な回転特性について報告した。EhV₁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。EhV₁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、EhV₁の回転特性を得

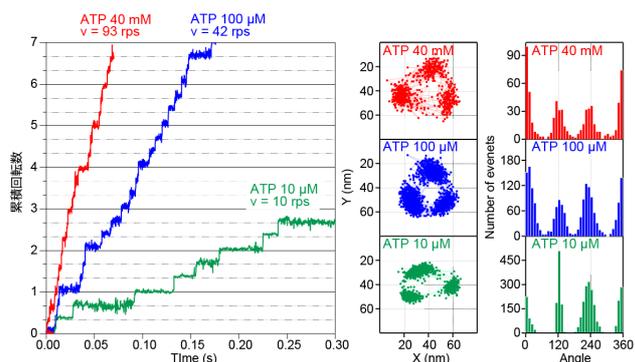


図1 EhV₁の回転中のステップと停止(参考文献1) A, 40 nm の金コロイドをプローブとして用いた際の EhV₁の 40 mM (赤)、100 μM (青)、10 μM (緑)における累積回転数の経時変化 B, 回転中の金コロイドの重心値のx-y平面上における軌跡 C, Aにおける回転角度の分布

るために解析を行った。明瞭な回転状態における EhV₁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 μM 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、TtV₁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(図 1)。この結果はサブステップの無い 120°のステップ回転が V₁の共通の特性であり、V₁は F₁とは違った化学力学共役スキームを持つ事が示された(1)。

第3章では EhV₀V₁と EhV₁の固定子と回転軸の相互作用について述べた。EhV₀V₁と EhV₁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、EhV₀V₁のトルク(23 ± 10 pNnm)は EhV₁のトルク(13 ± 3 pNnm)の倍と見積もられた(図 2)。一方で、50 nm の金コロイドを用いた低負荷条件において、EhV₁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(30~40pNnm)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(2)。

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が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がリジンに置換した 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”

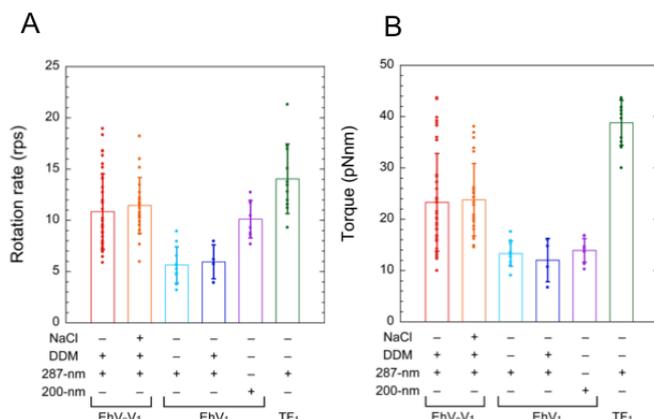


図2 EhV₀V₁とEhV₁の連続回転から決められた回転速度とトルク(参考文献2)

(A)EhV₀V₁(棒グラフ1,2)、EhV₁(棒グラフ3-5)、TF₁(棒グラフ6)の回転速度 (B)FTによって見積もられたトルク。グラフの下にNaClの有無、DDMの有無が示されている。また用いたレーザーは287 nmと200 nmの2種類。

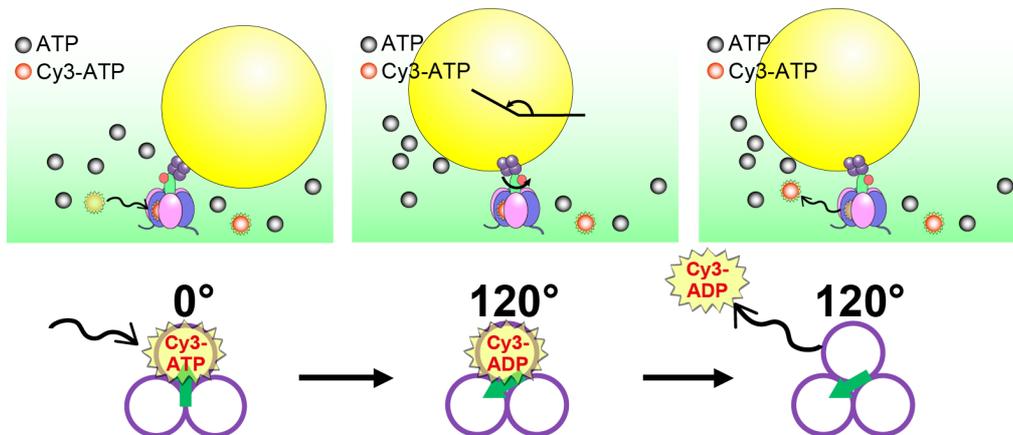


図 3 Cy3-ATP の蛍光と金コロイドの同時計測模式図
Cy3-ATP が 0°で結合し、120°で Cy3-ADP が解離するモデル

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(図 3)。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 分子回転計測の結果と 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述べた(図 4)。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。

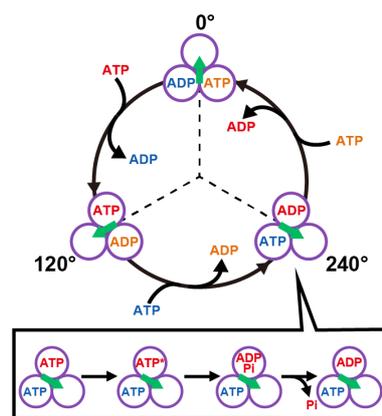


図 4 1 分子計測と結晶構造から予測される EhV₁ の化学力学共役スキームモデル

参考文献

1. Minagawa Y., Ueno H., Hara M., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamato, I., Muneyuki E., Noji, H., Murata, T., and Iino, R. (2013) Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V1-ATPase. *J Biol Chem* 288, 32700-32707
2. Ueno, H., Minagawa, Y., Hara, M., Rahman, S., Yamato, I., Muneyuki, E., Noji H., Murata T., and Iino, R. (2014) Torque generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase. *J Biol Chem* 289, 31212-31223