

V 型 ATP アーゼの構造と機能

横山 謙 (V-ATP アーゼグループ、グループリーダー)

はじめに

V-ATPase は、真核生物の液胞、リソゾーム、エンドソーム、ゴルジ体等の内胞膜系および、破骨細胞や腎臓集合管の介在細胞、一部のガン細胞の細胞膜に存在する分子量 800 kDa の超分子複合体である(図1)。ATP の加水分解反応と共役したプロトンポンプとして働き、小胞内部や細胞間隙を酸性化する。

V-ATPase が作り出す酸性 pH は、タンパク質の分解、プロセッシング、オートファジー、情報伝達、癌細胞の浸潤、骨の再吸収等の重要な生理現象を担っている。近年の研究により、V-ATPase が単にプロトンポンプとしてだけでなく膜融合や pH センサーとしても働くことが示されている[1]。このように生体内で最も重要な酵素の一つであるにもかかわらず、その働く仕組みや構造に関する情報は限られていた。真核生物の V-ATPase が主に酸性小胞の膜に存在し、その大量

調製が困難なこと、解離等により失活しやすいこと、10 種類を超えるサブユニットから構成される複合体であるため大腸菌等を宿主とした発現系の構築が困難であること、が理由である。

一方、真核生物の V-ATPase の類縁酵素が一部の原核生物の形質膜に存在する。V-ATPase グループのグループリーダーである横山は、1990 年に高度好熱性細菌である *Thermus thermophilus* の形質膜に初めて真正細菌型 V-ATPase の存在を特定した [2]。 *T. thermophilus* 由来の V-ATPase は、9 つの異なるサブユニットから構成され、

親水性で ATPase 活性を持つ V_1 部分と、疎水性でプロトンチャネルである V_0 から成る(図2)。それぞれのサブユニットは真核生物の対応するサブユニットと一次構造上の相同

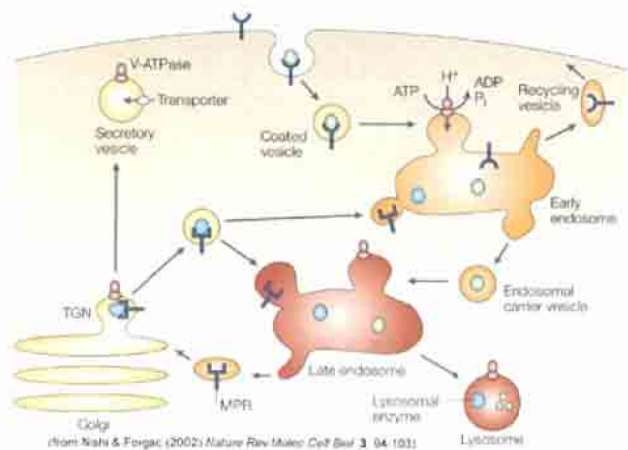


図 1. 真核生物における V-ATPase の分布と機能

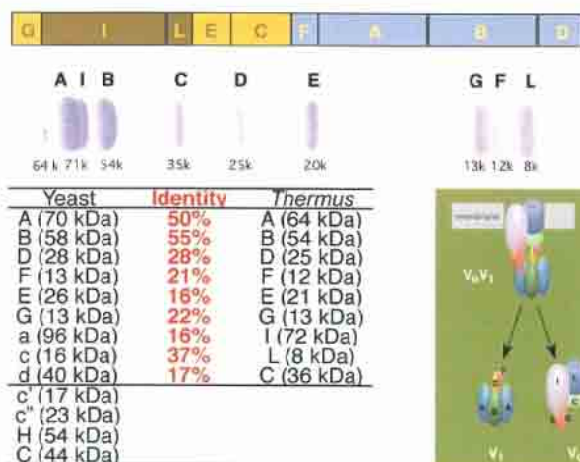


図 2. *T. thermophilus* V-ATPase のサブユニット構造

性を持ち、最も単純なサブユニット構成からなる V-ATPase であるといえる。真核生物の V-ATPase を材料とした場合の問題を克服するために、我々は、安定で酵素の大量精製ができ、発現系の構築も可能な高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来の V-ATPase を研究材料とし、下記の点にフォーカスし研究を進めた。

1. V-ATPase の回転の証明

V-ATPase は ATP 合成酵素である F_0F_1 と同様の回転触媒機構で働くと信じられてきた。1 分子観察技術を応用し、ATP 駆動性の回転を証明するとともに (項目 III-1)、V-ATPase 特有の回転機構を明らかにした (項目 III-2)。

2. V-ATPase のサブユニット配置の解明

いままで議論の余地があった V-ATPase のサブユニット配置を明らかにした (項目 III-3)。

3. 中心回転軸を構成するサブユニットの構造と機能

V-ATPase の中心回転軸を構成するサブユニット $V_o-d(C)$ (項目 III-4) 及びサブユニット F (項目 III-5) の構造を明らかにした。

4. V-ATPase のアッセンブリー経路

個々のサブユニットから V-ATPase が構成される経路を明らかにした (項目 III-6)。

5. V-ATPase の全体構造解明の試み

V-ATPase の全体構造を明らかにする道筋をつけた (項目 III-7)。

以上の研究により、生体内で最も重要な酵素の一つである V-ATPase の働く仕組みを解明する。また、「 F_0F_1 と V-ATPase という 2 種類の回転分子モーターが進化の過程で保存され、どの様に使い分けられているのか?」という疑問を解く鍵を得るとともに、回転分子モーターに共通した普遍的な動作機構の理解を前進させることも目的の一つである。

参考文献

- [1] Nishi, T. and Forgac, M. (2002) Nature's Marvelous Proton pump, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 94-103.
- [2] Yokoyama, K., Oshima, T., and Yoshida, M. (1990) *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase. Indication of eubacterial V-type ATPase, *J. Biol. Chem.* 265, 21946-21950.

V-ATPase の回転の証明

目的

V-ATPase は、一部のサブユニット間に F_0F_1 との相同性があり、外形が似ている等の理由により、同様の回転触媒機構で働くと想像されていた。しかしながら、回転を直接証明した報告はなかった。1分子観察の手法により、 V_1 -ATPase の ATP 駆動性回転を証明する。

研究成果

直接観察を試みた。図3に観察系の模式図を示す。触媒サブユニットである A サブユニットの N 末に導入されたヒスチジンタグにより酵素をガラス基盤に固定する。ローターと推定されていた D および F サブユニットにそれぞれシステイン残基を導入し、これを介して可視化プローブであるポリスチレン製のビーズを結合させる。A サブユニットには連続的な ATP 加水分解反応を促進する変異を導入した。その結果、ATP 存在下で多数の回転分子を発見

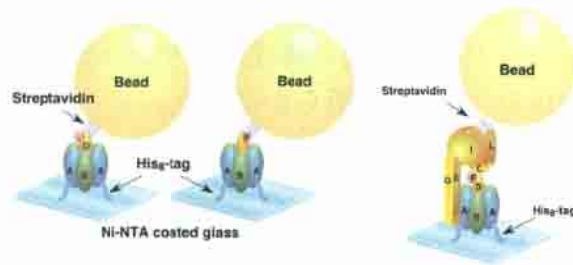


図3. V_1 および V_0V_1 の回転観察系の模式図

した (図3)。以上の結果により世界に先駆けて V-ATPase が回転触媒機構で働く

回転型分子モーターであることを証明した。次に膜内在部分である V_0 のローターリングの ATP 駆動性回転の観察を試みた。 V_1 の時と同様に、酵素の固定とビーズを結合させるための変異を 相同的組み替えを利用して V_0V_1 に導入した。ATP 存在下でローターリングに結合したビーズの回転を観察した。回転観察に使用した V_0V_1 は V_0 部分の特異的阻害剤である DCCD 感受性を示した。このことは観察された回転が機能的な V_0V_1 によることを示す。以上の結果により、V-ATPase が F_0F_1 と同様の回転触媒機構で働くことを証明するとともに、サブユニット D, F およびローターリングを構成するサブユニット L が A_3B_3 に対して回転子として機能することを確定した。

発表論文

- [III-1] *Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M., and Yokoyama, K. (2003) Evidence for rotation of V_1 -ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2312-2315.
- [III-3] *Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M., and Tamakoshi, M. (2003) Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase, *J. Biol. Chem.* 278, 24255-24258.

V₁ の回転機構

目的

ATP 駆動性モーターは、軸サブユニットの動き（メカノサイクル）と ATP の加水分解反応（ケミカルサイクル）を連動させている。これをメカノケミカルサイクルと呼ぶ。F₁ では ATP の結合で 軸サブユニットが 80 度進み、直後に ATP の加水分解が起こる。さらに 40 度ステップして 1 回の 120 度ステップが終了する。F₁ で観察されるメカノケミカルサイクルが ATP 駆動性モーターにおいて普遍的な現象かどうかを判定するために、V-ATPase のメカノケミカルサイクルを明らかにする。

研究成果

ATP γ S は ATP の基質アナログで、F₁/V₁ により γ 位のスルホニルエステル結合が加水分解される。しかし、その速度は、ATP の γ リン酸基の加水分解による解離速度にくらべて遅い。従って ATP γ S を基質とした場合、基質の加水分解の素過程が長くなり、その素過程に依存した待ち時間の解析が容易になる。我々は、V₁ の加水分解に依存した待ち位置と、基質の待ち位置との関係を ATP γ S を基質とした溶液交換実験により調べた。最初に基質飽和濃度の ATP γ S を含む緩衝液中で V₁ のステップ回転を観察し、停止位置を同定する。次に ATP 結合待ちが起こる低い基質濃度(10 μ M)の ATP を含む緩衝液をチャンバーの中に入れ、同一の分子の回転を観察することにより停止位置を決定する。停止位置を比較すると、ATP 結合待ちの停止位置と ATP γ S の加水分解に由来する待ち位置は、ほとんど同じであった (図 4)。V₁ では、ATP 結合に伴って起こる 120 度ステップが終了した後に、ATP の加水分解反応が起こる事を上記の実験結果は示唆している。つまり、V₁ は F₁ とは異なるメカノケミカルサイクルで働く回転分子モーターといえる。F₁ で観察される 80 度、40 度サブステップからなるメカノケミカルサイクルは、ATP 駆動性の回転分子モーターにとって本質的な機構でないといえるかもしれない。

発表論文

[III-6] *Imamura, H., Takeda, M., Funamoto, S., Yoshida, M., and Yokoyama, K. (2005) Rotation scheme of V₁-motor is different from that of F₁-motor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17929-17933.

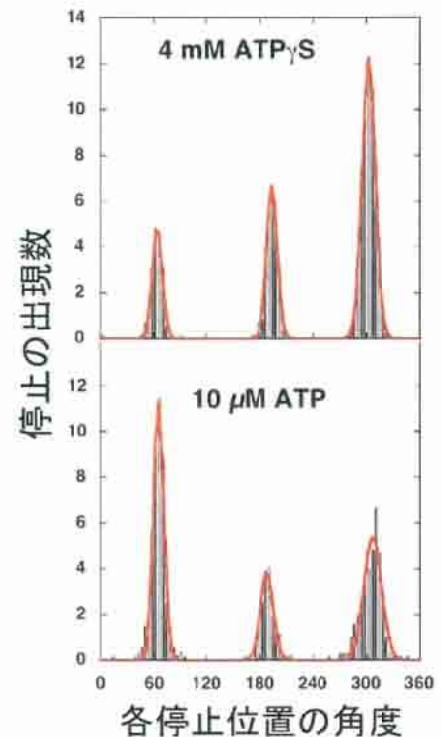


図 4. V₁ の停止位置の同定。上の図は、4 mM ATP γ S を基質としたときの各停止位置の相対角度をプロットしたもの。下の図は、同じ分子の ATP 結合待ちによる各停止位置の角度プロット。

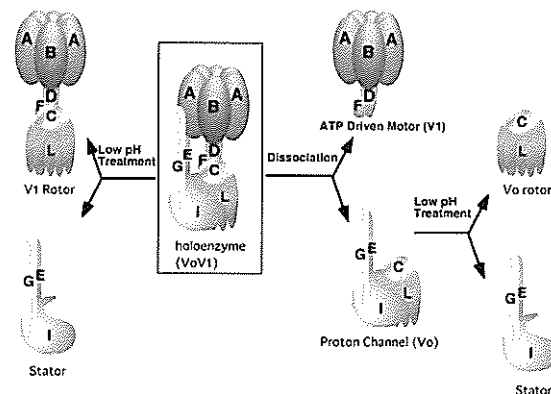
V-ATPase のサブユニット配置

目的

V-ATPase は多数の異なるサブユニットからなる複雑な膜タンパク質である。前述のように、調製の困難さから実験に必要な量の酵素を得ることは容易でなく、そのため各サブユニットの複体内での配置には議論の余地が残っていた。特に V_1 部分の回転軸を形成するサブユニットが D か E かという問題は未解決であった。サブユニットのホロ酵素内での配置を確定し、固定子サブユニット、回転子サブユニットを同定する。

研究成果

我々はホロ酵素からいろいろなサブ複合体を単離し、そのサブユニット構成を比較することにより、各サブユニットの相対関係を調べた(図 5) この結果、 V_0-d (C)サブユニットが L サブユニットからなるローターリングとの複合体を形成すること、I、E、G が複合体を形成することが明らかになった。ローターリングと複合体を形成する V_0-d は回転子サブユニット



に分類される。I サブユニットは固定子なので、E、G サブユニットも固定子に分類される。回転実験から D、F、L サブユニットが A_3B_3 に対して回転することが明らかになっている。従って、D、F、 V_0-d 、L サブユニットが中央回転軸を、I、E、G、が A_3B_3 とともに外周の固定子複合体を形成していることが明らかになった。

発表論文

[III-2] *Yokoyama, K., Nagata, K., Imamura, H., Ohkuma, S., Yoshida, M., and Tamakoshi, M. (2003) Subunit arrangement in V-ATPase from *Thermus thermophilus*, *J. Biol. Chem.* 278, 42686-42691.

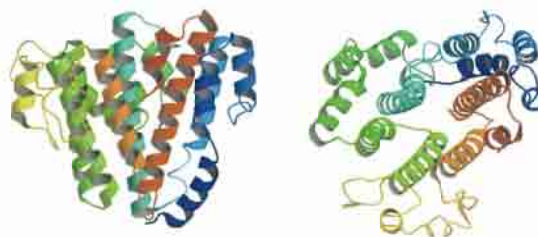
V_o-d サブユニットの構造と機能

目的

電子顕微鏡による解析によると、F₀F₁ の中心軸が約 50 Å なのに対し、V-ATPase のそれは 90 Å 以上の長さであり、中央に構造体が存在する。この構造体が V_o-d サブユニットによる事が示唆されていた。V-ATPase の中心回転軸を形成する V_o-d 結晶構造を明らかにし、その分子内配置および機能を議論する。

研究成果

英国 Imperial College の岩田研究室との共同研究により、当プロジェクトで発現、精製された V_o-d の結晶構造を 1.95 Å の高分解能で決定するのに成功した (図 6)。このサブユニットは、ほとんど α ヘリックスからなる新規のホールディングをとるタンパク質であった。中心の 50Å 長からなるヘリックスバンドルと、それを取り囲む外周の短いヘリックスからなる。疑似 3 回対称軸をもち、中央に空隙がある。まるでリムつきのコルク栓のような構造である。この V_o-d のホロ酵素内での方向性を決めるために、構造に基づいたシステイン導入と 2 反応性のクロスリンカーを用いたクロスリンク実験を行った。この結果、V_o-d の下部がローターリングの穴にはまり込み、3 回対称を持つ面が DF 複合体からなる V₁ 回転軸を受けているのが判明した。真核生物の V-ATPase では、V₁ 部分が V_o 部分から可逆的に脱離し、プロトンポンプ活性が消失するというダイナミックな調節機構が知られている。V_o-d のソケット様構造は、V₁ 回転軸の円滑な脱着に都合良い構造といえる。

図 6. V_o-d の結晶構造

発表論文

[III-5] *Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., Yokoyama, K., Iwata, S. (2004) Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 59-64.

サブユニット F の機能と構造

目的

サブユニット F は、サブユニット D とともに V_1 部分の回転軸を構成する。その位置的なアナロジーから F_0F_1 の ϵ サブユニットのホモログであろうと想像されてきた。このサブユニットの機能を生化学的手法で明らかにするとともに、その結晶構造を決定し機能を議論する。

研究成果

F サブユニットを欠く A_3B_3D 複合体を作り、 $V_1(A_3B_3D F)$ と比較することにより、サブユニット F の役割を議論した。 A_3B_3D の ATPase 活性は V_1 の半分であり、サブユニット F を結合させることにより ATPase 活性は上昇する。 $F_1-\epsilon$ サブユニットが ATPase 活性を抑える役割を持つのに対し、サブユニット F は活性を上昇させる役割を持つことが明らかになった。次に我々はサブユニット F の結晶構造を解いた。典型的な α/β タンパク質であり、驚くべきことに鞭毛モーターの回転制御因子である CheY と高い構造類似性を示した (図 7)。V-ATPase と鞭毛モーターという 2 つの回転モーターの生い立ちを考える上で大変示唆的な結果である。この構造情報をもとにデザインしたクロスリンク実験により、F サブユニットが D サブユニットと V_0-d サブユニットに接触していることがわかった。さらに 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) の手法をもちいて、ホロ酵素内での構造変化を調べたところ、静止状態と回転状態で F サブユニットの構造が異なることがわかり、このサブユニットが構造変化を伴う調節因子である可能性が示唆された。

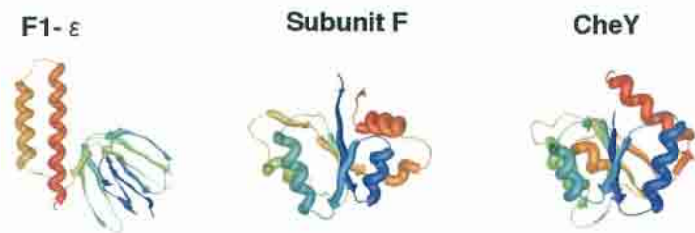


図 7. サブユニット F 及び、 $F_1-\epsilon$ 、鞭毛モーターの CheY の結晶構造

発表論文

- [III-4] *Imamura, H., Ikeda, C., Yoshida, M., and Yokoyama, K. (2004) The F subunit of *Thermus thermophilus* V_1 -ATPase promotes ATPase activity but is not necessary for rotation, *J. Biol. Chem.* 279, 18085-18090.
- [III-7] *Makyio, H., Iino, R., Ikeda, C., Imamura, H., Tamakoshi, M., Iwata, M., Stoch, D., Bernal, A. B., Yoshida, M., Yokoyama, K., and Iwata, S. (2005) Structure of a central stalk subunit F of Prokaryotic V-type ATPase /synthase from *Thermus thermophilus*, *EMBO. J.* 24, 3974-3983.

V-ATPaseのアッセンブリー経路

目的

V-ATPaseのような超分子複合体がどのように個々のサブユニットから構築されていくのかは大変興味深い問題である。V₁を構成するA、BサブユニットおよびDF複合体からの再構成経路およびATPの役割を明らかにする。

研究成果

単離したA及びBサブユニットを混合したところ、ATP依存的にA₃B₃複合体を形成した。また非分解性のATPアナログであるAMP-PNP存在下ではA₁B₁が形成された。これは反応中間体であると考えられる。A₃B₃画分にATPを加えるとモノマーに解離した。A₃B₃複合体にDF複合体を加えるとA₃B₃DF、すなわちV₁が再構成される。この時ATPは必要ない。さらにこのV₁を単離したV₀に加えると機能を保持したV₀V₁が再構成された。おもしろいことにA₃B₃、A₃B₃Dサブ複合体もV₀と結合し、A₃B₃-V₀、A₃B₃D-V₀複合体を形成する(図8)。Fサブユニットがない複合体はATPase活性を持つものの、ATP合成活性、プロトンポンプはない。サブユニットFがV₁とV₀部分の共役に必須な因子であることを示す。

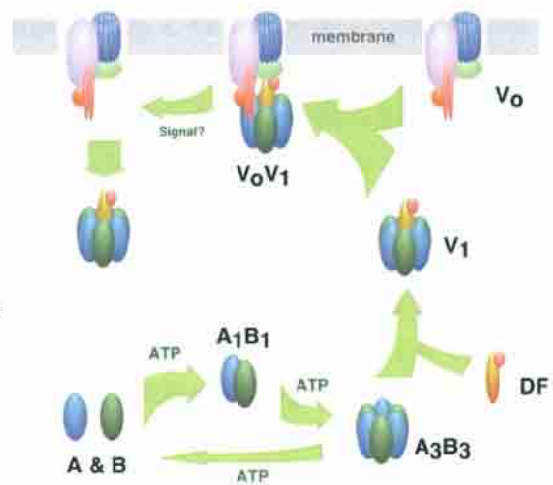


図 8. V-ATPase の再構成経路

発表論文

[III-8] *Imamura, H., Funamoto, S., Yoshida, M. and Yokoyama, K. (2006) Reconstitution *in vitro* of V₁ complex of *Thermus thermophilus* V-ATPase revealed that ATP binding to the A subunit is crucial for V₁ formation, *J. Biol. Chem.* 281, *in press*.

V-ATPase の全体構造解明の試み

目的

V-ATPase のメカニズムを詳細に議論するためには、その全体構造の解明は必要である。ホロ酵素の 2 次元結晶及び 3 次元結晶の作成を試みるとともに、サブユニットやサブ複合体の構造解析を行い、全体構造解明への道筋をつける。

研究成果

ホロ酵素の 2 次元および 3 次元の結晶作成に成功した。反射は得られるものの、原子分解能での構造の議論ができる段階にはない。また、サブユニット E、 V_0 部分のローターリング、及び A_3B_3 の結晶作成に成功している (図 9)。 A_3B_3 については、分子置換法によりその構造を解くことができた (図 10)。サブユニット A には F_1 - β にないバルジ構造がある。外周固定子である EG 複合体の結合に関与すると考えている。



図 9. ホロ酵素、サブ複合体、サブユニットの結晶

全体構造解明への展望

全体構造をいきなり原子分解能で解くのは容易ではない。幸い 6-7 Å の反射がホロ酵素の 3 次元結晶から得られている。サブユニット V_0 -d(C)、F、 A_3B_3 の高分解能結晶構造を使い分子置換法でモデルを組み立てる。現在 EG 複合体 V_0 ローターリングの結晶構造の解明に取り組んでいる。高分解能の部分構造と全体構造のモデルの組み合わせにより、原子分解能レベルの議論を可能にする構造情報を得る。

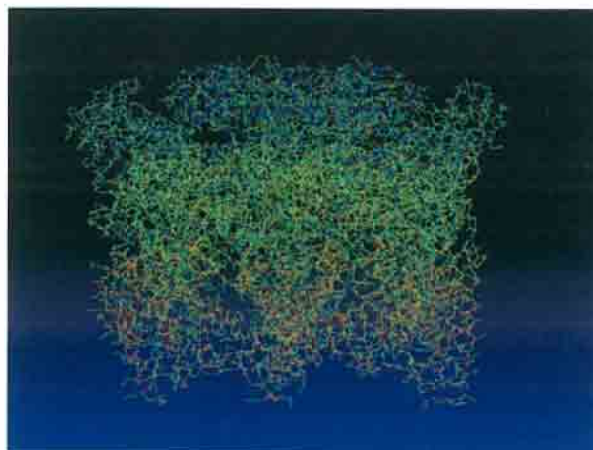


図 10. A_3B_3 複合体の結晶構造 (2.5Å)

発表論文

- [9] Gerle, C., Tani, K., Yokoyama, K., Tamakoshi, M., Yoshida, M., Fujiyoshi, Y., and Mitsuoka, K. (2006) Two-dimensional Crystallization and Analysis of Projection Images of Intact *Thermus thermophilus* V-ATPase, *J. Structural. Biology*, 153, 200-206.