

膜エネルギー代謝研究室 Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism

教授 横山 謙 Prof. Ken Yokoyama Ph.D.

1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要であり、生命がエネルギーを使いやすい形に変え、それを使う仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP は、主にミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素により作られる。作られた ATP は、生物が運動することや、生体分子の合成、分解、輸送などに使われる。たとえば、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。V-ATPase のように、ATP を使って基質を運ぶタンパク質は輸送体と呼ばれ、その仕組みは、それぞれの輸送体の構造を明らかにすることでだいぶわかってきたが、不明な点も残っている。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。この分子機械の仕組みを解明するには、その動きと形を見る必要があり、そのための手法として我々は、1 分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学を行ってきた。

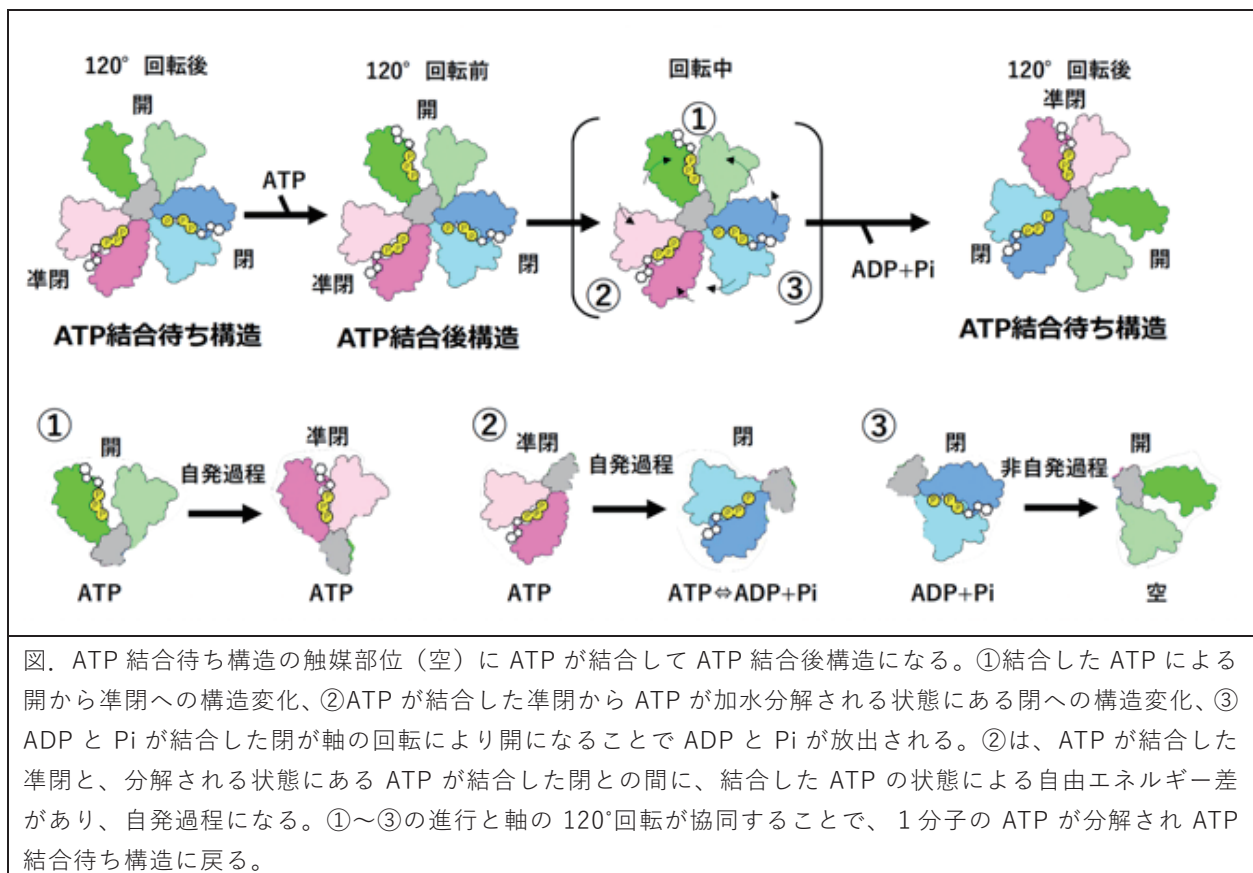
2. 本年度の研究成果

1) V/A-ATPase の動的構造解析

今回用いる変異体 V/A-ATPase (TSSA 変異体) は、活性中心にあるスレオニン残基をセリン残基に、セリン残基をアラニン残基に変えたもので、阻害に関わる ADP の触媒部位に対する親和性が低下している。この変異体酵素の ATP 合成活性や分解活性など、基本的な性質は野生型の V-ATPase とほぼ同じであり、野生型 V/A-ATPase と同等と考えて良い。精製した TSSA 変異体 V/A-ATPase を、EDTA を含むリン酸緩衝液で透析することで、結合している ADP をほぼ完全に除くことができる。ヌクレオチドを含まない状態の V/A-ATPase ($V_{nucfree}$) をナノディスクに再構成し、単粒子解析することで、すべての触媒サイトが空の状態の構造 (ATP 結合待ち構造) を得ることができる。次に に対して 触媒待ち条件、加水待ち条件、ATP 結合待ち条件になるように反応液を加え反応させた後、瞬間凍結してクライオグリッドを作成した (図 1)。それぞれの反応条件でのクライオグリッドを、Titan Krios で撮影し、単粒子解析することで立体構造を得た。

触媒部分である V_1 ドメインは、触媒部位を形成する 3 つの AB dimer が、回転軸サブユニットを取り囲んでいる。3 つの AB dimer は、ヌクレオチドの有りにしにかかわらず、開いた構造 (AB 開)、やや閉じた構造 (AB 準閉)、閉じた構造 (AB 閉) からなっていた。ATP 濃度が高い条件での構造では、すべての触媒部位に ATP もしくは、分解産物である ADP の密度が観察された (V_{3nuc})。ATP 濃度が低く、ATP 結合が律速段階になる条件では、AB 準閉、AB 閉にはヌクレオチドの密度が観察されたが、AB 開にはヌクレオチドの密度がなかった。このことは、AB 開に ATP が結合して V_{3nuc} 構造になることを示す。このことは、全ての触媒部位がヌクレオチドで占められてから、軸の回転が起こることを示す。ATP の加水分解が遅くなる ATP アナログを基質として用いた条件で得られた構造では、AB 閉には ADP が、AB 準閉には ATP が結合していた (V_{prehyd})。このことは AB 準閉の ATP の分解を待っている構造であることを示し、すなわち、AB 準閉の ATP が分解されるには AB 閉への構造変化が伴うことを示す。AB 準閉→AB 閉の構造変化は、軸の回転を伴うので、ATP の加水分解反応と軸の回転が共役していることを示唆する。ATP の加水分解反応は、熱散逸を伴う自発反応なので、軸の回転が触媒部位間の自由エネルギー差によって駆動されることを示唆する。

3 つの触媒部位で、ATP 加水分解の反応過程が別々かつ同時に起こり、それぞれの反応が軸タンパク質の回転と厳密に共役することで化学反応と軸の回転が共役していることがわかった (図 2)。今回の研究成果により、「2 つの触媒部位間での ATP 加水分解反応の自由エネルギー差が、軸タンパク質の回転を推進する。」ことが明らかになりました。このように精緻で巧みな仕組みで ATP 合成酵素が機能し、軸の回転により ATP が効率良く作りだされる自然の仕組みは、大変な驚異である。



3. Research projects and annual reports

Energy is necessary to sustain life. ATP, the energy currency of life, is produced mainly by ATP synthase in mitochondria. The ATP is used by living organisms for synthesis, degradation, and transport of biomolecules. For example, vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles and is responsible for various physiological phenomena through its acidification. How a molecular machine composed of tiny proteins, such as FoF1-ATP synthase and V-ATPase, converts the energy of ATP into transport and motion is a very interesting question and one of the life science problems to be solved. To elucidate the mechanism of this molecular machine, it is necessary to see its movement and shape, and we have been using single molecule observation and cryo-electron microscopy for structural biology to elucidate it.

We have obtained an important insight in molecular mechanism of rotary ATPase using cryoEM last year. The mutant V/A-ATPase (TSSA mutant) used in this study has changed the threonine residue in the active center to a serine residue and the serine residue to an alanine residue, resulting in reduced affinity for the catalytic site of ADP involved in inhibition. The basic properties of this mutant enzyme, such as ATP synthesis and hydrolysis activities, are almost the same as those of wild-type V-ATPase and can be considered equivalent to wild-type V/A-ATPase. Purified TSSA mutant V/A-ATPase can be dialyzed in phosphate buffer containing EDTA to almost completely remove bound ADP. The nucleotide-free state of the V/A-ATPase (V_{nucfree}) can then be reconstituted into nanodiscs and analyzed as single particles to obtain

a structure with all catalytic sites empty (ATP-binding waiting structure). Next, the cryogrids were prepared by adding the reaction solution to the cryogrid under the catalytic waiting, hydrolysis waiting, and ATP binding conditions, and then flash freezing the cryogrid (Fig. 1). The cryogrid under each reaction condition was subjected to data acquisition with a Titan Krios, and single-particle analysis was performed to obtain the three-dimensional structure. The V_1 domain, responsible for ATP hydrolysis, consists of three AB dimers that form the catalytic hexamer, surrounding the rotational axis subunit. three AB dimers, with and without nucleotides, consist of an open structure (AB_{open}), a slightly closed structure ($AB_{semi-closed}$), and a closed structure (AB_{closed}). In high ATP concentration, all catalytic sites were occupied with ATP or the degradation product ADP (V_{3nuc}). AB_{open} had no nucleotide density. This indicates that ATP binds to the AB_{open} to form the V_{3nuc} . This indicates that all catalytic sites are occupied by nucleotides before the rotation of the axis occurs. In the structure obtained under the condition of using ATP analogues as substrates, which slow down the hydrolysis of ATP, ADP was bound to the AB_{closed} and ATP to the $AB_{semi-closed}$ (V_{prehyd}). This indicates that the structure is waiting for the degradation of ATP in $AB_{semi-closed}$, i.e., the degradation of ATP in $AB_{semi-closed}$ is accompanied by a conformational change to AB_{closed} , suggesting a tight coupling of the ATP hydrolysis reaction with the axis rotation, since the conformational change from $AB_{semi-closed}$ to AB_{close} is accompanied by an axis rotation. The ATP hydrolysis is exergonic reaction, suggesting that the rotation is driven by the free energy difference between the catalytic sites. At the three catalytic sites, the reaction processes of ATP hydrolysis occur separately and simultaneously, and each reaction is strictly coupled with the rotation of the axis protein, indicating highly mechano-chemical energy conversion (Figure 2). This elaborate and ingenious mechanism by which ATP synthase functions and the natural mechanism by which ATP is efficiently produced by rotation of the axis is a tremendous marvel.

4. 論文, 著書など

1. **Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases.** Kishikawa J, Nakanishi A, Nakano A, Saeki S, Furuta A, Kato T, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. *Nature Communications* volume 13, Article number: 1213 (2022)

5. 学会発表など

1. Structural intermediates in rotary V/A-ATPase from initial to steady state visualized by time-resolved cryo-electron microscopy. 中西温子、岸川淳一、西澤知宏、光岡薫、横山謙 第 59 回 日本生物物理学会 年会 オンライン開催 11/2021 オンライン発表
2. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素の回転機構の解明 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2021 年 第 94 回 日本生化学会大会オンライン開催 12/2021 ポスター発表
3. クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による ATP γ S 存在下 V/A-ATPase の中間体構造 佐伯詩織、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 94 回 日本生化学会大会 オンライン開催 12/2021 ポスター発表
4. 好熱菌 FoF1 の動的構造解析によって回転機構を明らかにする。 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 口頭発表
5. 構造スナップショットで解き明かす V 型 ATPase の回転機構 横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 口頭発表

6. その他特記事項

1) 外部資金

1. 科学研究補助金 基盤研究 B

課題名：クライオ電子顕微鏡による V 型 ATPase の回転機構の解明 研究代表者：横山 謙 取得年度 R2-R4 (3 年)