

# 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。

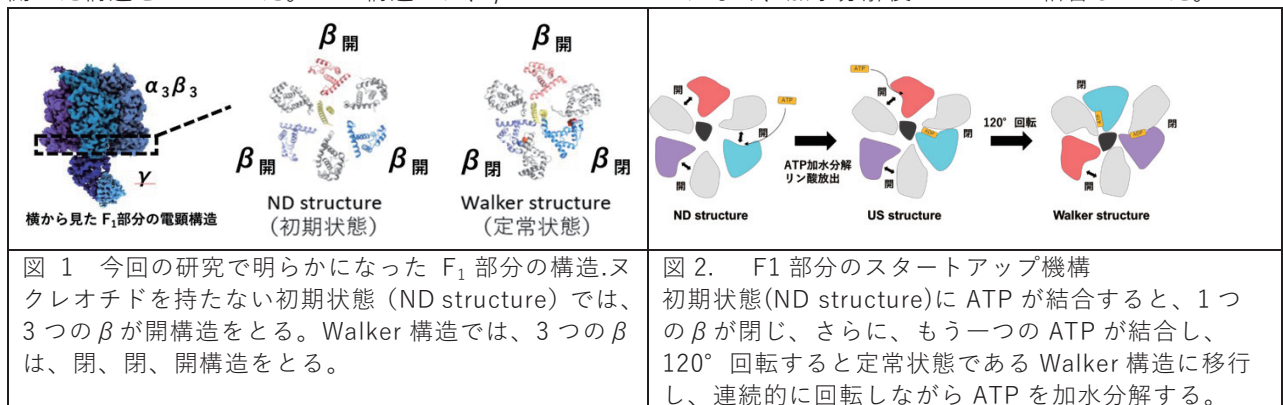
一方で、生命がエネルギーを利用する過程は、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を決めることも報告されている。我々は、エネルギー通貨である ATP の細胞内濃度と寿命との関係を、分子イメージングという手法で解明する研究に着手し、生体エネルギー学の視点から老化・寿命・疾病の問題に取り組んでいる。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) FoF1ATP 合成酵素の初期反応 (ユニサイト触媒) の解明

FoF1 には ATP が結合する 3 つの触媒部位があり (図 1)、すべての結合部位に ATP が結合した時に回転が連続的に起こる (定常状態)。しかし、最初の ATP が 1 つ目の触媒部位に結合したときに起こる触媒反応 (ユニサイト触媒) では、ATP に対する親和性が高く、かつその分解速度が遅いなど、特異な性質を示すことがわかってきた。多くの研究者が ユニサイト触媒機構の解明に取り組んできたが、未だユニサイト触媒と定常状態での触媒機構との関連はわかっていない。

今回の研究では、クライオ電子顕微鏡を用いることにより、ユニサイト触媒が起こる前後の構造を捉えることに成功した。クライオ電子顕微鏡による構造解析は、X 線結晶構造解析で得ることのできなかつた一過性の中間体構造を決定することができる。透析処理によって内在性のヌクレオチドを取り除いた FoF1 を使い、FoF1 の量に対して約 1/3 量の ATP を加え、反応中に急速凍結した。得られた凍結グリッドをクライオ電子顕微鏡で撮影し、その画像を解析することで、すべての触媒サブユニットにヌクレオチドが結合していない ND 構造と 1 つの触媒サブユニットに ADP が結合した US 構造 (ユニサイト構造) が得られた。ND 構造は、3 つの  $\beta$  がすべて開いた構造をとっていた。US 構造では、 $\beta$  TP に ATP ではなく、加水分解後の ADP が結合していた。



この結果から、ユニサイト触媒では、ATPは $\beta$ DPではなく、 $\beta$ TPに結合し、 $\beta$ TPで加水分解が起こることが明らかになった。以上のことから、FoF1にヌクレオチドが結合していない初期状態から定常状態までのモデル(図2)を提案し、長年の議論に終止符を打つことができたと考えている。

## 2) 時間分解能スナップショット解析による V/A-ATPase の活性化機構の解明

昨年度は、クライオ電子顕微鏡により、V/A-ATPase が ATP の加水分解で回転する様子を再現することに成功した (Nature Communications, 2022)。この研究成果から、3つある触媒部位で ATP の加水分解過程の1部が別々かつ同時に起こることで中心回転軸が回転し、効率よく ATP の加水分解エネルギーを回転力に変換することを明らかにした。言い換えると、3つの触媒部位に ATP が結合した状態になることが回転に必要である。しかしながら、ATP がない状態の V/A-ATPase に ATP が結合した場合、1分子の ATP だけで回転が起こる必要があり、このような1触媒部位による回転の報告はない。今回、初期状態の V/A-ATPase が連続的に回転できる状態に至るスターター機構を解明するために、時間分解能スナップショット解析を行った(図3)。ATP を完全に取除いた V/A-ATPase に対して、ATP 濃度が低い状態で反応させ 60 秒放置した後の溶液からクライオグリッドを作成した。この時、反応液には ATP の結合を遅くする硫酸イオンをわずかに加え、反応開始後すぐに ATP が V/A-ATPase に結合しないようにした。このグリッドからは、ATP が1分子結合した構造が得られたが、ATP が最初に結合する部位ではなく、閉じた部位に ATP が確認されたことから、最初に ATP が結合した後、 $120^\circ$ 回転した構造であることが示唆された。次に、高 ATP 濃度条件で V/A-ATPase を 5 秒反応させたもの、および 30 秒反応させた反応液からそれぞれクライオグリッドを作成した。5 秒反応させた反応液から得られた構造には、ATP が1分子結合した構造と2分子結合した構造が得られた。先程の構造と異なり、最初に ATP が結合する開いた部位に ATP が確認されたことから、 $120^\circ$ 回転する前の構造であることがわかった。ATP が2分子結合した構造でも開いた部位に ATP が結合していたことから、 $120^\circ$ 回転する前の構造である。30 秒反応させた反応液からは、1分子の ATP が開いた部位に結合した構造と、3つすべての部位に ATP が結合した構造が得られた。このことから、開いた部位に1分子の ATP が結合した構造の寿命が長く、2分子結合した構造の寿命が短いことが示唆された。

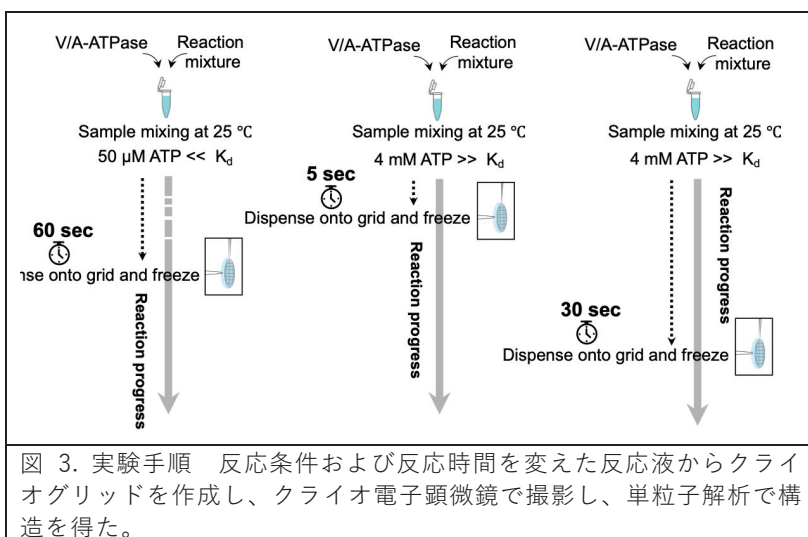


図 3. 実験手順 反応条件および反応時間を変えた反応液からクライオグリッドを作成し、クライオ電子顕微鏡で撮影し、単粒子解析で構造を得た。

以上の結果から、

1. 開いた部位に結合した ATP のみで  $120^\circ$ 回転するが、回転前構造の滞留時間が長い。
2. 開いた部位に加え、閉じた部位に ATP が結合した構造は、30 秒後には消失していることから、この構造の滞留時間が短く、すなわち、回転前構造の滞留時間が短い。
3. V/A-ATPase の全体構造は強固で、ATP が結合して  $120^\circ$ 回転が起こることで、次の部位に ATP が結合し、3分子の ATP が結合した定常状態になる。
4. V/A-ATPase の構造変化は離散的に起こり、FoF1 で見られた遷移的な開いた構造 (PNAS Nexus, 2022) を経ずに、基底状態から定常状態へ変化することが明らかになった(図4 参照)。

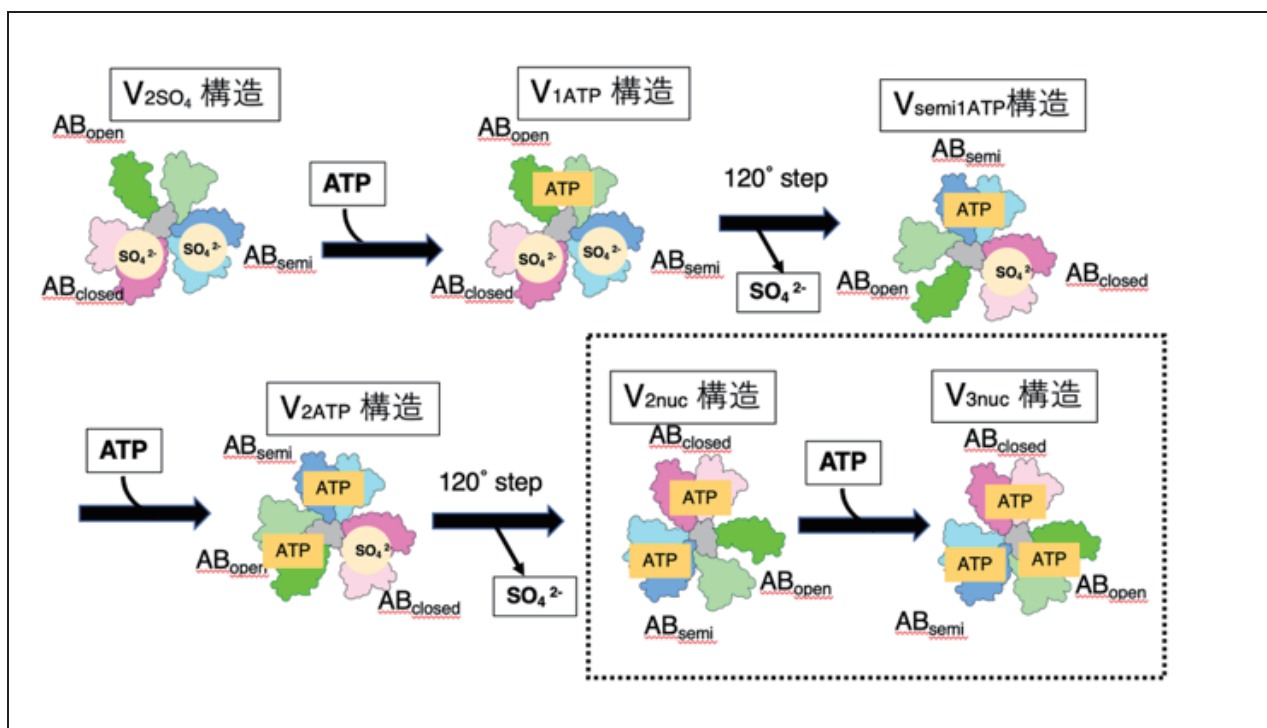


図 4. 基底状態にある V/A-ATPase の定常状態への遷移機構 最初の ATP が結合すると、一つの ATP だけで 120°回転が起こる ( $V_{1\text{semi1ATP}}$ )。120°回転することで、次の ATP の結合が可能になり、ATP が結合して 2 分子の ATP が結合した状態になる ( $V_{2\text{ATP}}$ )。さらに 120°回転することで、三番目の部位に ATP が結合できるようになり、ATP が結合することで、3 分子の ATP が結合した定常状態 ( $V_{3\text{ATP}}$ ) になる。

### 3. Research projects and annual reports

Energy is essential for the sustenance of life, and bioenergetics is a crucial scientific field that aims to understand how living organisms convert energy into usable forms and how it is utilized. ATP, the energy currency of life, is synthesized by ATP synthase, present in the mitochondria or bacterial plasma membranes. This produced ATP is used in various biological processes, including muscle contraction, and biomolecule synthesis and degradation. The vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles, which is responsible for different physiological phenomena by acidification. The mechanism of how tiny protein-based molecular machines convert ATP energy into transport and motion is a fascinating and important question that needs to be answered in the life sciences. To comprehend this mechanism, it is crucial to study the movement and shape of these molecular machines. To achieve this goal, we have utilized single-molecule rotation observation and structural biology with cryo-electron microscopy.

Our ultimate aim is to understand and explain how living organisms transform and utilize energy to sustain life. On the other hand, the process by which life utilizes energy is likely related to aging and age-related diseases. Several enzymes involved in energy metabolism are reported to be involved in life-span altering genes, and the amount of energy intake itself determines lifespan. We have started to study the relationship between the intracellular concentration of ATP, the energy currency, and lifespan using molecular imaging techniques. The results revealed a close relationship between aging, anesthetic effects, and metabolic control and ATP levels in the individual. Thus, we are addressing the issues of aging, lifespan and disease from the perspective of bioenergetics.

Based on these points, we have carried out three themes;

1. Molecular mechanism of rotary ATPase/synthases, V-ATPase and  $F_0F_1$ .
2. ATP homeostasis in living cells
3. Structural biology of membrane proteins involved in ATP homeostasis using Cryo-electron microscopy

Achievements in 2022

#### 1) Structural basis of unisite catalysis of bacterial $F_0F_1$ -ATPase

ATP synthases ( $F_0F_1$ -ATPase) are crucial for all aerobic organisms.  $F_1$ , a water-soluble domain, can catalyze both the synthesis and hydrolysis of ATP with the rotation of the central  $\gamma\varepsilon$  rotor inside a cylinder made of  $\alpha_3\beta_3$  in three different conformations (referred to as  $\beta_E$ ,  $\beta_{TP}$ , and  $\beta_{DP}$ ). In this study, we determined multiple cryo-electron microscopy structures of bacterial  $F_0F_1$  exposed to different reaction conditions. The structures of nucleotide-depleted  $F_0F_1$  indicate that the  $\varepsilon$  subunit directly forces  $\beta_{TP}$  to adopt a closed form independent of the nucleotide binding to  $\beta_{TP}$ . The structure of  $F_0F_1$  under conditions that permit only a single catalytic  $\beta$  subunit per enzyme to bind ATP is referred to as unisite catalysis and reveals that ATP hydrolysis unexpectedly occurs on  $\beta_{TP}$  instead of  $\beta_{DP}$ , where ATP hydrolysis proceeds in the steady-state catalysis of  $F_0F_1$ . This indicates that the unisite catalysis of bacterial  $F_0F_1$  significantly differs from the kinetics of steady-state turnover with continuous rotation of the shaft.

#### 2) Structural transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential binding of ATP to V/A-ATPase

Vacuolar/archaeal-type ATPase (V/A-ATPase) is a rotary ATPase that shares a common rotary catalytic mechanism with  $F_0F_1$  ATP synthase. Structural images of V/A-ATPase obtained by single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) during ATP hydrolysis identified several intermediates, revealing the rotary mechanism under steady-state conditions. Here, we identified the cryo-EM structures of V/A-ATPase corresponding to short-lived initial intermediates during the activation of the ground state structure by time-resolving snapshot analysis. These intermediate structures provide insights into how the ground-state structure changes to the active, steady state through the sequential binding of ATP to its three catalytic sites. All the intermediate structures of V/A-ATPase adopt the same asymmetric structure, whereas the three catalytic dimers adopt different conformations. This is significantly different from the initial activation process of  $F_0F_1$ , where the overall structure of the  $F_1$  domain changes during the transition from a pseudo-symmetric to a canonical asymmetric structure (PNAS NEXUS, pgac116, 2022).

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

1. Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding. Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K., Yokoyama, K. *J Biol Chem* 299: 102884-102884 (2023)
2. Structural basis of unisite catalysis of bacterial  $F_0F_1$ -ATPase. Nakano A, Kishikawa J, Nakanishi A, Mitsuoka K, and \*Yokoyama K. *PNAS Nexus* volume 1, pgac116 (2022)

##### 5. 学会発表など

1.  $F_1$ -ATPase の substep の正体 中野敦樹, \*横山謙 2023 年 生体運動研究合同班会議 東京大学 小柴ホール 2023/1/6 口頭発表

2. クライオ電子顕微鏡によるATP合成酵素FoF1の回転機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、横山謙 日本生体エネルギー研究会 第48回討論会 会場 京都大学 益川ホール 2022/12/15 口頭発表
3. 横山謙 クライオスナップショットによるV/A-ATPaseの回転機構の解明 日本顕微鏡学会 倉敷 川崎祐宣記念講堂, 第65 回シンポジウム 招待講演 11/2022
4. Vo 部分での回転によるプロトン輸送機構の分子基盤 西田結衣、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ・函館市民会館 2022/9/30 ポスター発表 2.
5. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素 FoF1 の化学力学共役機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ 2022/9/30 ポスター発表
6. 好熱菌 FoF<sub>1</sub>-ATPase のユニサイト触媒作用の構造的基盤 中野敦樹、青山桃子、岸川淳一、横山謙 第 60 回生物物理学会年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
7. FoF1-ATPase の非触媒部位の機能解明 Functional elucidation of the non-catalytic site of FoF1-ATPase 小林廉、中野敦樹、横山謙 日本生物物理学会第 60 回年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
8. ATP 合成酵素 FoF1 の ATP 駆動性回転における化学・力学共役機構の分子基盤 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 22 回日本蛋白質科学会年会 会場 つくば国際会議場 2022/6/8 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)

### 2) 学外貢献

#### 1. 科学研究費審査委員

#### 2. 論文査読 4 件 Nature, Structure, iScience, EMBO Journal

### 3) アウトリーチ活動

#### 1. オープンキャンパスでの研究紹介

