

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来
 V_0V_1 の分子機構

2016 年

中西 温子

略語表

ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ADP	Adenosine 5'-diphosphate
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethanesulfonic acid
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
BSA	Bovine serum albumin
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside
OG	n-Octyl- β -D-glucoside
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
AES	alkyl ether sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylmide Gel Electrophoresis
ACMA	9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine

目次

略語表

1 章 研究の背景と目的

- 1-1 はじめに
- 1-2 V_oV_1 と F_oF_1 の局在とトポロジー
- 1-3 V_oV_1 の基本構造と性質
- 1-4 目的

2 章 ADP 阻害の分子機構の解明

- 2-1 概要
- 2-2 背景
- 2-3 結果
 - 2-3-1 ドメインスワップ変異体 V_1 の作成と精製
 - 2-3-2 ドメインスワップ変異体の ATP 加水分解活性
 - 2-3-3 V_{1-A011} の 1 分子観察による解析
 - 2-3-4 各変異体 V_oV_1 の ATP 合成活性とそのキネティクスパラメータの測定
 - 2-3-5 V_{1-A011} の P_i 親和性の解析
- 2-4 考察
- 2-5 方法

3 章 中心回転軸におけるトルク伝達機構について

- 3-1 概要
- 3-2 背景
- 3-3 結果
 - 3-3-1 V_1 、 V_1 -DF 及び V_o 、 V_o - CL_{12} の調製
 - 3-3-2 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験
 - 3-3-3 Native-PAGE による再構成実験
 - 3-3-4 FRET 実験
 - 3-3-5 中心回転軸変異体 V_1 と V_o の再構成実験

3-3-6 SH 変異体 V_0V_1 のATP合成実験

3-3-7 SH 変異体 V_0V_1 のプロトンポンプ、チャネル活性測定

3-4 考察

3-5 方法

4 章 V_0V_1 の構造解析

4-1 概要

4-2 背景

4-3 結果

4-3-1 V_1 の結晶化実験

4-3-2 V_0V_1 の結晶化実験

4-3-3 単粒子解析のための V_0V_1 の調製

4-3-4 DDM- V_0V_1 および LMNG- V_0V_1 の画像

4-3-5 LMNG- V_0V_1 の単粒子解析

4-4 考察

4-5 方法

5 章 結語

参考文献

謝辞

1 章 研究の背景と目的

1-1 はじめに

液胞型プロトン輸送性 ATP 加水分解酵素 (vacuolar H^+ -ATPase, 以下 V_0V_1 と記す) は、ゴルジ体、液胞、リソゾーム等の小胞膜に存在し、ATP の加水分解エネルギーを用いて水素イオン (プロトン) を小胞内へ輸送することにより、小胞内を酸性化する [1-3]。 V_0V_1 により酸性化された小胞は、細胞内膜輸送、タンパク質分解、エンドサイトーシス等の働きを担う [1]。また V_0V_1 は破骨細胞や癌細胞等、一部の特殊化した細胞の細胞膜にも存在し、細胞間隙を酸性化することにより、骨の分解、癌細胞の浸潤等に関与する。その重要性にもかかわらず、 V_0V_1 を真核生物の小胞膜から調製することが容易でないため、その機能や構造の理解は遅れていた。1990 年に好熱菌である *Thermus thermophilus* (*T.th*) から原核生物型の V_0V_1 が単離された [4, 5]。この V_0V_1 は、真核生物の酵素と比べ安定で、精製も容易であり、1 分子観察や構造解析に適していた。この V_0V_1 を用いることで、 V_0V_1 が回転触媒機構で働く回転分子モーターであること [6, 7]、その全体構造がミトコンドリアや細菌の細胞膜に存在する ATP 合成酵素 F_0F_1 と似ていることが明らかになった (図 1-1, a, b)。 V_0V_1 の基本構造は F_0F_1 と良く似ている一方、ほとんどのサブユニット間でアミノ酸配列の優位な相違がないため、 V_0V_1 と F_0F_1 は独立したカテゴリーに分類される (表 1-1)。

1-2 V_0V_1 と F_0F_1 の局在とトポロジー

細胞内共生説では、 V_0V_1 を持つ始原真核生物に F_0F_1 を持つプロテオバクテリアが共生したと提唱されている (図 1-2)。始原真核生物の形質膜に存在する V_0V_1 は V_1 が細胞質側を向いている (図 1-2, a)。形質膜が貫入しエンドサイトーシスによってできた小胞では、 V_1 が細胞質側を向くトポロジーとなっている (図 1-2, c, d, [8])。

一方、ミトコンドリアの F_0F_1 はプロテオバクテリアがエンドサイトーシスによって取り込まれた結果 (図 1-2, b)、 F_1 がミトコンドリアのマトリックス側を向くトポロジーとなっている (図 1-2, b, d)。この F_0F_1 と V_0V_1 のトポロジーから、始原真核生物は、真性細菌より古細菌に進化的に近縁であると考えられている。真性細菌に存在する V_0V_1 は遺伝子の水平伝播により古細菌から移ってきたとする考え方もあるが、もともと真性細菌には V_0V_1 と F_0F_1 の両方があったとす

る考え方もある [9]。

1-3 V_0V_1 の基本構造と機能

V_0V_1 は分子内で ATP 加水分解エネルギーを回転力（トルク）に変換することから、回転分子モーターと呼ばれる [6, 10, 11]。その基本構造は ATP を駆動力とする V_1 と、膜横断的にプロトンを移動させる力（プロトン駆動力）を駆動力とする V_0 からなる（図 1-1 参照）。ATP の加水分解によって V_1 -DF で発生するトルクにより、 V_0 - CL_{12} が V_0 -a に対して回転し、プロトンが輸送される。逆にプロトン駆動力が十分な場合、 V_0 で発生する逆方向のトルクが V_1 -DF へ伝達され、ATP が合成される。

V_0V_1 は ATP 分解・合成の可逆的反応を触媒するが、その機能は種間で違いがある。真核生物や腸球菌 *Enterococcus hirae* (*E.hi*) の V_0V_1 は、ATP を分解しプロトン、もしくはナトリウムポンプとして働く（図 1, c, ref.[1, 3, 12, 13]）。一方、*T.th* V_0V_1 は ATP 合成酵素として働く [14, 15]。 V_0V_1 の類縁酵素である F_0F_1 の大部分は ATP 合成酵素として働くが、乳酸菌などの嫌気性細菌の F_0F_1 はプロトンポンプとして働くことが報告されている [16]。このように、 V_0V_1 および F_0F_1 にはプロトンポンプとして働くものと、ATP 合成酵素として働くものがある。ATP 合成酵素として働く F_0F_1 や V_0V_1 において、ATP 分解を阻害する機構が報告されている [15, 17]。

V_0V_1 と F_0F_1 の基本構造は良く似ているが、中心回転軸の構造に違いがある（図 1, a, b）。 V_0V_1 の中心回転軸は、椀型をした C サブユニットが V_0 のローターリング (L_{12} -ring) に嵌り込み、DF 中心回転軸に対して軸受けの様に配置する [18, 19]。 F_0F_1 では、 F_1 の中心回転軸である $\gamma\epsilon$ が直接 F_0 のローターリングに結合する [20]。このような V_0V_1 の特徴的な構造は、 V_1 部分と V_0 部分の可逆的な脱着による調節機構に関与している可能性が指摘されている [18, 21]。

1-4 目的

本研究では好熱菌 V_0V_1 を材料として、 V_0V_1 の分子機構を解明するため以下の 3 つの課題に取り組んだ。

1) V_0V_1 や F_0F_1 のような ATP 分解・合成を触媒する可逆的な分子モーターにおいて、その回転方向は制御されている。ATP 合成酵素である *T.th* V_0V_1 は、ADP 阻害により ATP 分解活性が消失するが、ほぼ同じ構造、アミノ酸配列をもつ腸球菌の *E.hi* V_0V_1 は連続的に ATP を分解し、イオンポンプとして働く [3,

22]。 *T.th* および *E.hi* の V_1 のドメインからなるドメインスワップ変異体を解析することにより、ATP 合成に有利になると考えられる ADP 阻害の分子機構を解明する。

2) V_0V_1 は特徴的な中心回転軸構造を持つ。中心回転軸 DF を欠いた $V_1 (A_3B_3)$ が V_0 と再構成することから、この中心回転軸構造の結合力が弱いことが示唆された [21]。 V_1 と V_0 が容易に再構成する性質を利用して、エネルギー共役の鍵となる中心回転軸構造の結合力とトルク伝達の仕組みを考える。

3) V_0V_1 の分子機構を解明するには、原子分解能もしくはそれに近い構造情報が必要である。好熱菌から V_0V_1 が単離されて以来、 A_3B_3 サブ複合体、中心回転軸を形成する V_0 -C、 V_1 -F サブユニットの結晶構造が原子分解能で解明された [18, 19, 23]。プロトン透過を担う V_0 - L_{12} -ring 複合体の構造も電子線結晶学で明らかになった [24]。一方、 V_0V_1 の詳細な全体構造は明らかになっていない。 V_0V_1 全体構造解明の取り組みについて述べる。

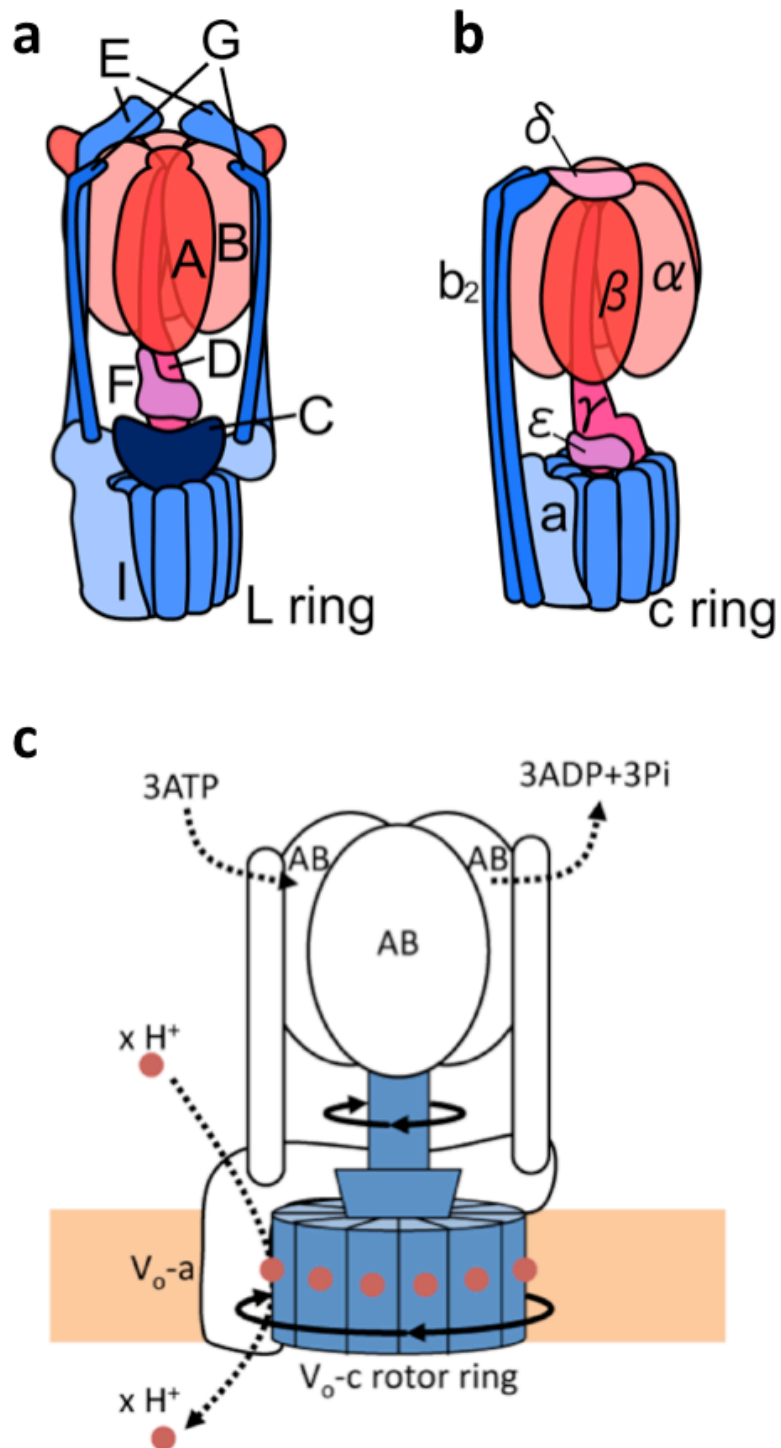


図 1-1 V₀V₁ と F₀F₁ の模式図 (a, b)。V₁/F₁ 部分を赤色、V₀/F₀ 部分を青色で示した。V₀ と V₁ は回転触媒機構により共役している (c)。

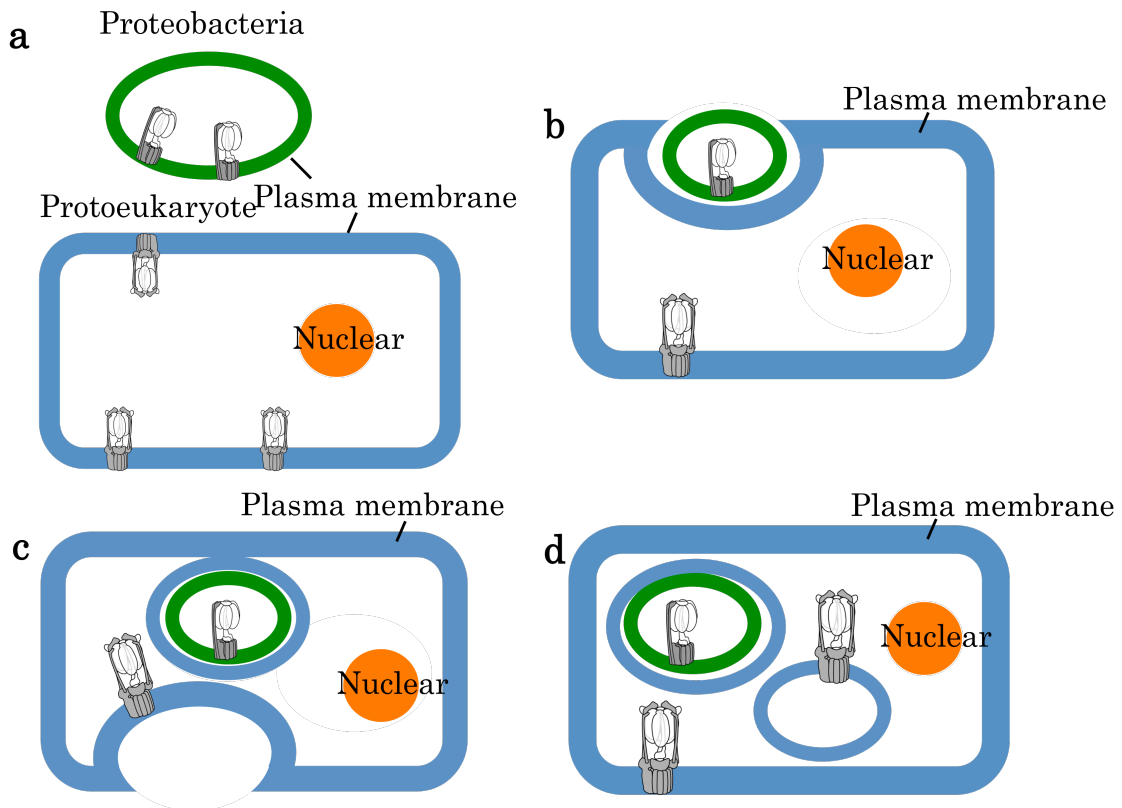


図 1-2 真核生物における V_0V_1 と F_0F_1 のトポロジー。プロテオバクテリアが嫌気的な始原真核生物にエンドサイトーシスにより取り込まれミトコンドリアになった (b, c)。一方、エンドサイトーシスにより V_0V_1 を持つ形質膜が貫入し、空胞系オルガネラが形成された (c, d)。このためミトコンドリア内膜にある F_0F_1 では F_1 がマトリックス側に、空胞系オルガネラに存在する V_0V_1 では V_1 が細胞質側に向くトポロジーをとる。

表 1-1. V_0V_1 と F_0F_1 を構成するサブユニットの機能

サブユニット ^{*2}		分子量 (kDa) ^{*1}	複合体中の コピー数	$V_1/V_0/F_1/F_0$ への 帰属	機能・その他
真核	バクテリア				
A	A	68	3	V_1	ATP 加水分解・合成（触媒部位） F-ATPase の β サブユニットと相同性
B	B	58	3	V_1	ATP 加水分解・合成（非触媒部位） アクチン繊維への結合能を有する F-ATPase の α サブユニットと相同性
C	—	44	1	V_1, V_0 どちらにも も属さない	アクチン繊維への結合能を有する ペリフェラルストークを構成？
D	D	29	1	V_1	V_1 の回転軸を構成
E	E	26	2?	V_1 (真核) V_0 (バクテリア)	ペリフェラルストークを構成
F	F (G)	13	1	V_1	V_1 の回転軸を構成, ATPase 活性の促進
G	G (F, H)	13	2?	V_1 (真核) V_0 (バクテリア)	ペリフェラルストークを構成
H	—	54	1	V_1	ATPase 活性を制御 ペリフェラルストークを構成
a	a (I)	96	1	V_0	プロトンチャネルを形成 膜タンパク質
c	c (K, L)	16	10-12 ^{*3}	V_0	プロトン結合, 膜タンパク質 F-ATPase の c サブユニットと相同性
c'	—	17	1?	V_0	プロトン結合, 膜タンパク質, 酵母でのみ見つかっている F-ATPase の c サブユニットと相同性
c''	—	23	1?	V_0	プロトン結合, 膜タンパク質 F-ATPase の c サブユニットと相同性
d	d (C)	40	1	V_0	V_0 の回転軸を構成
e	—	10	1	V_0	機能不明

F ₁ F ₀	α	α	55	3	F ₁	ATP 加水分解・合成（非触媒部位） V-ATPase の B サブユニットと相同性
	β	β	52	3	F ₁	ATP 加水分解・合成（触媒部位） V-ATPase の A サブユニットと相同性
	γ	γ	30	1	F ₁	F ₁ の回転軸を構成
	δ	ε	15	1	F ₁	F ₁ の回転軸を構成 ATPase 活性の阻害（バクテリア）
	ε	—	7	1	F ₁	F ₁ の回転軸を構成
	OSCP	δ	21	1	F ₁	ペリフェラルストークとの結合
	a	a	25	1	F ₀	プロトンチャンネルを形成 膜タンパク質
	b	b	25	1 (真核) 2 (バクテリア)	F ₀	ペリフェラルストークを構成 膜タンパク質
	c	c	8	10-15	F ₀	プロトン結合, 膜タンパク質 V-ATPase の c サブユニットと相同性
	d	—	19	1	F ₀	ペリフェラルストークを構成
	e	—	11	1?	F ₀	ダイマー形成
	f	—	11	1?	F ₀	膜ヘリクスを形成
	g	—	13	1?	F ₀	ダイマー形成
	F6 (h)	—	9	1	F ₀	ペリフェラルストークを構成
	A6L	—	6	1?	F ₀	機能不明

*1 真核型酵素の分子量を示した.

*2 サブユニットの呼び名は生物種によって異なる場合がある. 代表的なものについては括弧内に示した.

*3 バクテリア型の値. 真核型は不明.

2 章 ADP 阻害の分子機構の解明

2-1 概要

Thermus thermophilus (*T.th*) の V_0V_1 の ATP 加水分解活性は、ADP 阻害により抑制される [3]。このような機構は真核生物や腸球菌 *Enterococcus hirae* (*E.hi*) の V_0V_1 で報告されていない [22]。本研究では、ADP 阻害の分子基盤を明らかにするために、*T.th* および *E.hi* の V_1 のドメインからなるドメインスワップ変異体を解析した。*T.thV_1* の A サブユニットにあるヌクレオチド結合ドメインと C 末ドメインを *E.hiV_1* のドメインに交換した変異体 V_1 を解析したところ、ADP 阻害に対する感受性が失われていた。また、この変異体 V_1 では Pi に対する親和性が上がっていた。ATP 加水分解時の野生型 *T.thV_1* の Pi に対する親和性は低く、そのため ADP 阻害機構を獲得していることが示唆された。

2-2 背景

V_0V_1 は ATP 分解・合成を触媒する可逆的な分子モーターである [6, 10, 11]。真核生物や腸球菌 *E.hi* の V_0V_1 は、ATP の加水分解により V_1 で発生するトルクを V_0 へ伝達し、プロトンを送る [12, 13, 22]。一方、*T.th* の V_0V_1 は、呼吸により生じたプロトン駆動力 (PMF) により V_0 部分で発生するトルクを V_1 へ伝達し、回転軸を逆回転させることで ATP を合成する [3]。ATP 合成に十分な PMF がない時、ATP 分解酵素として働き、細胞内の ATP が消費される。ATP 合成酵素による ATP の消費を抑制するいくつかの機構が提唱されているが、その一つが ADP 阻害である (図 2-1, ref. [15, 17])。ADP 阻害とは、ATP の分解産物である ADP が固く触媒部位に結合し、ATP 加水分解反応を停止させる現象であり、様々な種の ATP 合成酵素において広く報告されている [15, 17, 25]。

T.thV_1 は、精製直後であっても ADP 阻害によりほとんど ATP 加水分解活性を示さない。ADP を除去しても、その ATP 加水分解活性は ATP の分解に伴い減少し、十数分でほぼ消失する [26]。一方、*E.hiV_1* は、*T.thV_1* とほぼ同じ構造、アミノ酸配列からなるが、ADP 阻害を受けず連続的に ATP を分解する [22]。本研究では、*T.thV_1* の特定のドメインを、ADP 阻害に対する感受性が異なる *E.hiV_1* 由来のドメインに交換したドメインスワップ変異体を作成し、それらを解析することで *T.thV_1* で起こる ADP 阻害の分子機構の解明を目指した。

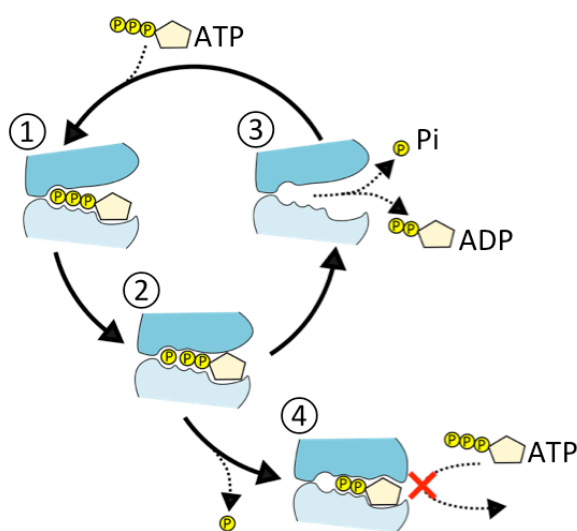


図 2-1

ADP 阻害の模式図。 V_1 において、ATP の加水分解は (① → ② → ③ → ④) の順番に進む。ADP が触媒部位に結合したままになると (① → ② → ④) 反応は停止する。*T.thV_0V_1* が合成方向へ回転すると ADP は解離する。

2-3 結果

2-3-1 ドメインスワップ変異体 V_1 の作成と精製

本研究では ADP 阻害に関わるドメインを特定するため、*T.th* V_1 と *E.hi* V_1 のドメインスワップ変異体を作成した。A サブユニットを NT (N-terminal) ドメイン、NB (Nucleotide-binding) ドメイン、CT (C-terminal) ドメインの3つのドメインに分け、ドメインスワップにより様々な変異体を構築した。発現系構築の詳細は 2-5 方法の章に記載した。交換したドメインの構造を示す (図 2-2)。以後作成した変異体は、*T.th* V_1 の NB ドメインを *E.hi* V_1 のドメインに交換したものを V_{1-A010} 、CT ドメインを *E.hi* V_1 のドメインに交換したものを V_{1-A001} 、NB ドメインと CT ドメインをドメインスワップしたものを V_{1-A011} と記載する。また NB ドメインとその近傍に位置する CT ドメインの2本のヘリックスを含めた領域をドメインスワップしたものを $V_{1-A010.1}$ と記載する (図 2-2, c, 右下)。ドメインスワップした A サブユニットを含む V_1 変異体を大腸菌 BL21-CodonPlus-RP 株 (Stratagene) で発現させ、Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した。精製した各変異体 V_1 の電気泳動図を図 2-3 に示す。各変異体 V_1 と A, B, D, F サブユニットを含み、その量比も同等であることから、正常な複合体として精製されていることが確認できる (図 2-3)。

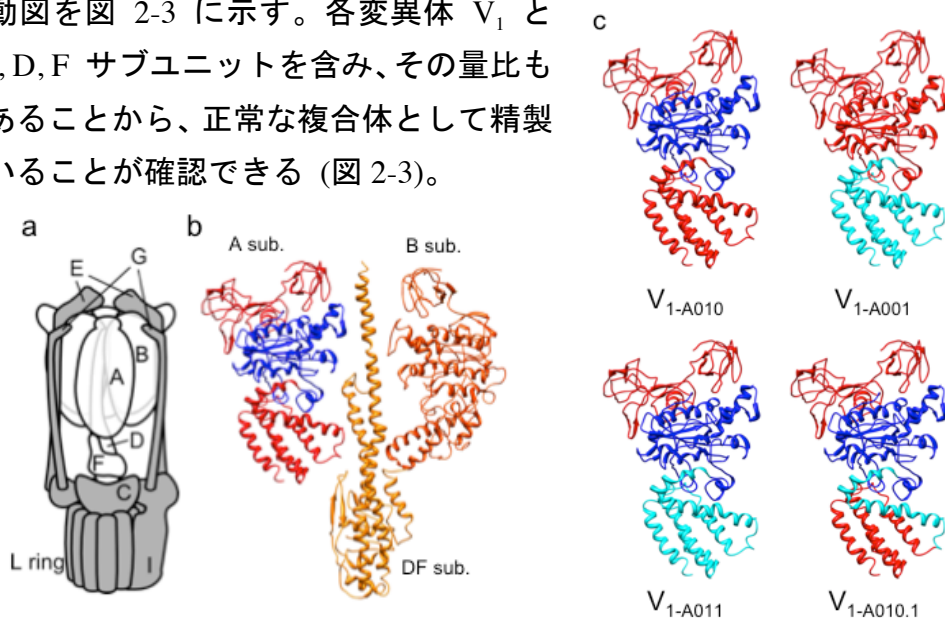


図 2-2 a, *T.th* V_0V_1 の分子モデル。白色が V_1 部分、灰色が V_0 部分を示す。b, V_{1-A010} の分子モデル。NB ドメインを青色で示した。c, V_{1-A010} 、 V_{1-A001} 、 V_{1-A011} 、 $V_{1-A010.1}$ の A サブユニットの分子モデル。*T.th* V_1 由来を赤、*E.hi* V_1 由来 NB ドメインを青色、CT ドメインを水色で示した。

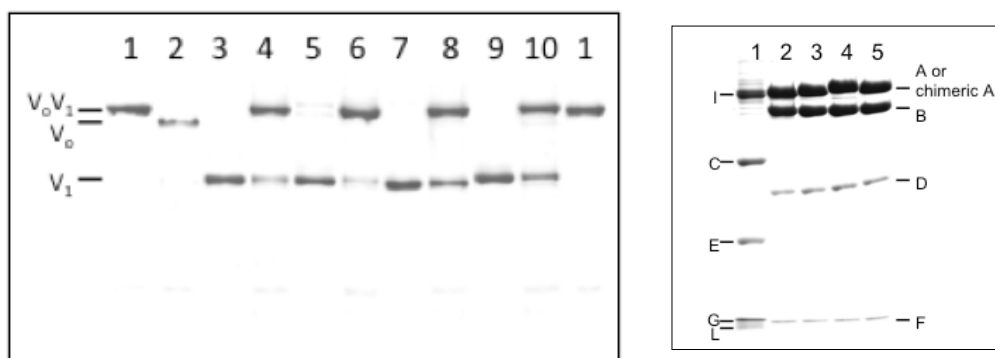


図 2-3 変異体 V_1 の Native-PAGE による複合体の確認 (左)。各レーンは 1; $T.thV_0V_1$ 、2; $T.thV_0$ 、3; $T.thV_1$ 、4; 再構成 $T.thV_0V_1$ 、5; V_{1-A010} 、6; 再構成 V_0V_{1-A010} 、7; V_{1-A011} 、8; 再構成 V_0V_{1-A011} 、9; V_{1-A001} 、10; 再構成 V_0V_{1-A001} を示す。精製した各変異体 V_1 の 15% SDS-PAGE (右)。タンパク質は CBB で染色した。各レーンは 1; $T.thV_0$ 、2; $T.thV_1$ 、3; V_{1-A010} 、4; V_{1-A011} 、5; V_{1-A001} を示す。

2-3-2 ドメインスワップ変異体の ATP 加水分解活性

作成した変異体 V_1 の ADP 阻害に対する感受性を調べるために、ATP 加水分解活性を enzyme coupling assay で測定した。ATP の加水分解と共役して NADH が酸化され 340 nm の吸光が減少する。活性測定の詳細は、2-5 方法の章に示した。

図 2-4 にそれぞれの変異体 V_1 の活性測定の結果を示す。NB ドメインを ADP 阻害に陥らない $E.hiV_1$ 由来のものにスワップした V_{1-A010} は、非常に低い ATP 加水分解活性を示した (図 2-4, 上段, 黒線)。ADP 除去処理により活性は上昇したが、時間とともに減少し、反応開始後 10 分で活性はほぼ消失した (図 2-4, 上段, 赤線)。この結果は、 V_{1-A010} が ADP 阻害に陥りやすいことを示す。一方、NB ドメイン、CT ドメイン両方を $E.hiV_1$ 由来のものに変えた変異体 V_{1-A011} は、連続的な ATP 加水分解活性を示した (図 2-4, 中段)。NB ドメインとその近傍に位置する CT ドメインの 2 本のヘリックスを含めた領域を $E.hiV_1$ 由来のものに変えた変異体 $V_{1-A010.1}$ も連続的な活性を示した (図 2-4, 中段)。一方で、CT ドメインのみを $E.hiV_1$ 由来のものに変えた変異体 V_{1-A001} は、ほとんど ATP 加水分解活性を示さなかった。ADP 除去処理を行うことにより、弱い活性を示した (図 2-4, 下段)。

次に、それぞれの変異体 V_1 の K_m 、 V_{max} の値を求めた (図 2-5, 表 2-1)。 V_1 TSSA 変異体 (TSSA- V_1) は、A サブユニットのヌクレオチド結合部位に変異を

導入したもので、ヌクレオチドに対する親和性が減少している [26]。そのため ADP がヌクレオチド結合部位から解離しやすく、ADP 阻害に対する感受性が減少する。実際、ATP に対する K_m は、WT に比べて大幅に高い (表 2-1)。一方、 V_{1-A011} の K_m は、WT や他の変異体 V_1 と比べ低くなっており、ATP に対する親和性が増加していることを示唆している (表 2-1)。

以上の結果から、1) NB ドメイン、もしくは CT ドメインの性質だけでは、ADP 阻害への感受性は決まらない。2) NB ドメインと CT ドメインの組み合わせが *E.hiV₁* 由来の場合、ADP 阻害感受性は消失する。しかし、ADP が解離しやすくなり ADP 阻害感受性が消失したわけではない。3) NB ドメインとその近傍に位置する CT ドメインの 2 本のヘリックスの組み合わせが ADP 阻害感受性に重要な役割を果たす、ということが示唆された。

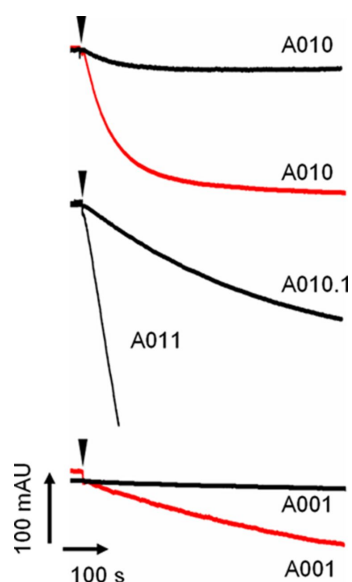


図 2-4 各変異体 V_1 の ATP 加水分解活性のタイムコース。図の右に各変異体の名前を示す。横軸は時間、縦軸は NADH の吸光波長である 340 nm の変化量を示す。 V_{1-A010} と V_{1-A011} については、ADP を除去処理後の活性を赤色で示した。

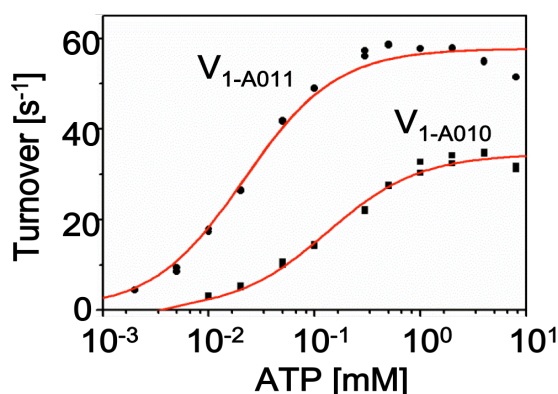


図 2-5 V_{1-A010} と V_{1-A011} の Michaelis-Menten プロット。ATP 濃度を変化させた条件下で V_{1-A010} と V_{1-A011} の ATP 加水分解活性を測定した。横軸は ATP 濃度、縦軸は 1 秒当たり加水分解された ATP の数 (Turnover rate) を示す。

表 2-1 Michaelis-Menten プロットから計算した K_m 、 V_{max} の値。

V_{max} (s^{-1})	K_m (μM)
------------------------	-------------------

$TthTSSAV_1^{a)}$	55.8 ± 0.3	587 ± 21
$TthV_1^{a)}$	39.9 ± 0.3	205 ± 7
V_{1-A010}	34.4 ± 0.6	132 ± 1
V_{1-A011}	57.7 ± 0.8	21 ± 0
V_{1-A001}	5.0 ± 0.2	160 ± 34

^{a)} Values from Ref. 26

2-3-3. V_{1-A011} の 1 分子観察による解析

1 分子回転観察は、個々の酵素の動きを見ることで反応素過程の数や、それぞれの素過程における速度定数を求めることができる [6, 10, 26]。 V_{1-A011} の 1 分子回転観察を行うため、回転軸である D サブユニットに観察プローブを結合させるためのシステイン残基を導入した (E48C、Q55C)。このシステインをビオチン化することにより、ストレプトアビジンでコートしたビーズが分子に結合する。 V_1 をガラス基盤に固定し、光学顕微鏡でビーズの動きを観察した (図 2-6 参照)。実験方法の詳細は 2-5 方法の章に記載した。

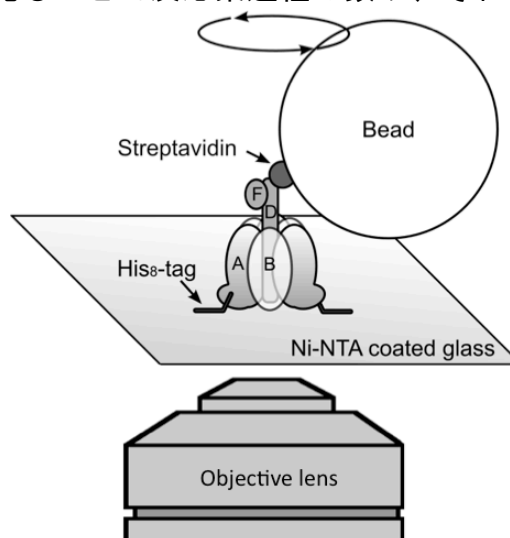


図 2-6 V_1 の回転観察実験の模式図。

ATP の添加により、ビーズは反時計回りに回転した。ビーズの回転速度は ATP 濃度が 1 mM 以上では飽和し、1 秒あたり 10 回転した。ATP 濃度が減少するにつれ回転速度も減少し、120 度毎の停止が観察された。これは、ATP の結合を待っているために起こる停止で、ATP 結合待ち dwell と呼ばれる [26]。ATP 濃度 2 μM および 0.5 μM での回転の様子を図 2-7 a に示す。ATP 濃度が 0.5 μM の時、2 μM の時より長い dwell time が観察された。ATP 濃度 2 μM および 0.5 μM での dwell の頻度分布を示したヒストグラムを図 2-7 b, c に示す。 V_1 の ATP 加水分解反応を 1 次反応に近似したとき、ATP 結合待ちの時間 (dwell time, t) と dwell time の数 (y) は指数関数 $y = \exp(-k_{\text{on}}[\text{ATP}]t)$ にフィッティングされた (図 2-7, b, c, 赤線)。これより求めた k_{on} は、ATP 濃度 2 μM の時 $(3.5 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、0.5 μM の時 $(5.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ で、ほぼ同じであっ

た。また、 V_{1-A011} の k_{on} は、 $T.thV_1$ の k_{on} (1.26 ± 0.04) $\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ とほぼ同じであった。ヌクレオチド結合部位の変異導入により、ヌクレオチドに対する親和性が減少している TSSA- V_1 の k_{on} は、 $(1.93 \pm 0.03) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ で、 V_{1-A011} より約 10 倍低い [26]。以上の結果は、 V_{1-A011} の k_{on} が $T.thV_1$ の k_{on} とほぼ同じで、ATP に対する親和性が同じであることを示す。ヌクレオチドに対する親和性低下とは異なる機構により、 V_{1-A011} は ADP 阻害を回避していることが示唆された。

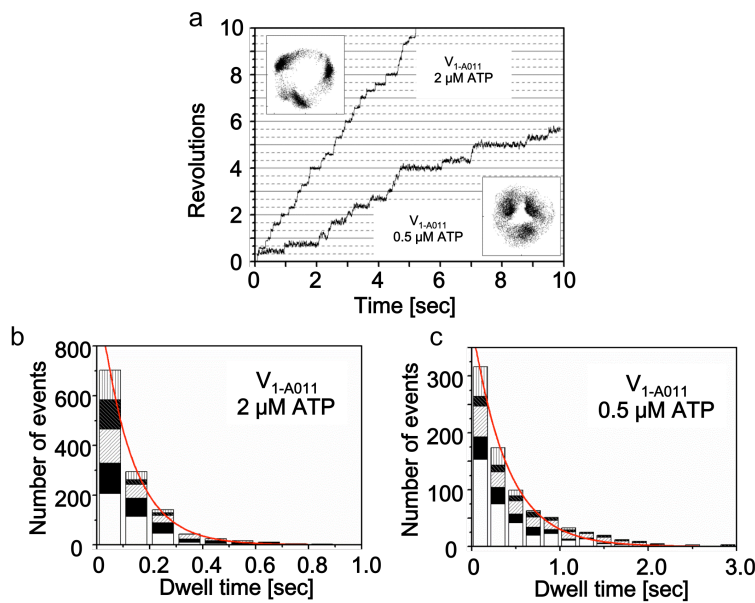


図 2-7 V_{1-A011} の 1 分子回転観察による解析。

a : V_{1-A010} と V_{1-A011} の 1 分子観察実験のタイムコース。回転ビーズの重心分布図を図中に示した。横軸は時間、縦軸はビーズの回転数を示す。
b, c : V_{1-A011} の dwell time 解析。ヒストグラムの濃淡の違いは異なる分子のデータを示す。各々の

ヒストグラムのフィッティングカーブを赤色で示した。

2-3-4 各変異体 V_0V_1 の ATP 合成活性とそのキネティクスパラメーターの測定

$T.thV_0V_1$ は、*in vitro* で V_0 と V_1 から再構成される [21]。大腸菌から精製した変異体 (V_{1-A101} 、 V_{1-A001} 、 V_{1-A011}) と $T.th$ の形質膜から精製した V_0 を混合することにより、再構成変異体 V_0V_1 を調製した。複合体形成は Native-PAGE により確認した (図 2-3, 左)。

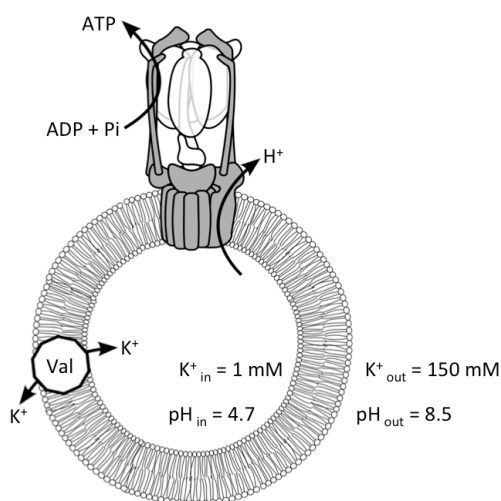


図 2-8 ATP 合成実験系の模式図
 図中にリポソーム内外の pH 及び K^+ 濃度条件を示した。図中の Val はバリノマイシンを示す。

測定には凍結融解法によりリポソームに再構成した V_0V_1 を使用した [24]。まず、再構成リポソームを pH 4.7 の酸性緩衝液に浸し、内部を酸性化する。そして pH 8.5 のアルカリ性の緩衝液からなる反応液に再構成リポソームを加え、プロトン濃度勾配を負荷する。また、リポソームの内外に K^+ の濃度差を与え、バリノマイシンの添加により、外向きのプロトン駆動力を負荷する。実験系の模式図を図 2-8 に示す

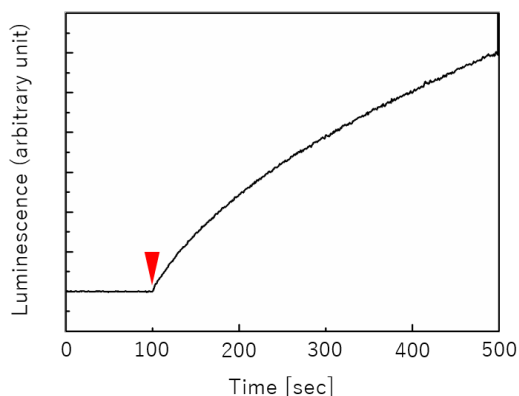


図 2-9 V_0V_{1-A011} を再構成したリポソームによる ATP 合成活性のタイムコース。横軸は時間、縦軸は luciferin/luciferase の蛍光強度を示す。

合成された ATP により luciferin/luciferase による蛍光が上昇した。図 2-9 に V_0V_{1-A011} による ATP 合成活性を示す。リポソームの添加を赤色三角で示した。 V_0V_{1-A011} を含む再構成リポソームに pH 勾配および K^+ ・バリノマイシンによる膜電位を負荷した状態で、ADP もしくは P_i を反応液に添加すると、蛍光の上昇が観察された。これは、 V_0V_{1-A011} により ATP が合成されたことを示す。初期の傾きから各条件における ATP 合成速度を求め、Michaelis-Menten プロットから ADP および P_i に対する K_m 、 V_{max} を求めた (図 2-10, 表 2-2)。

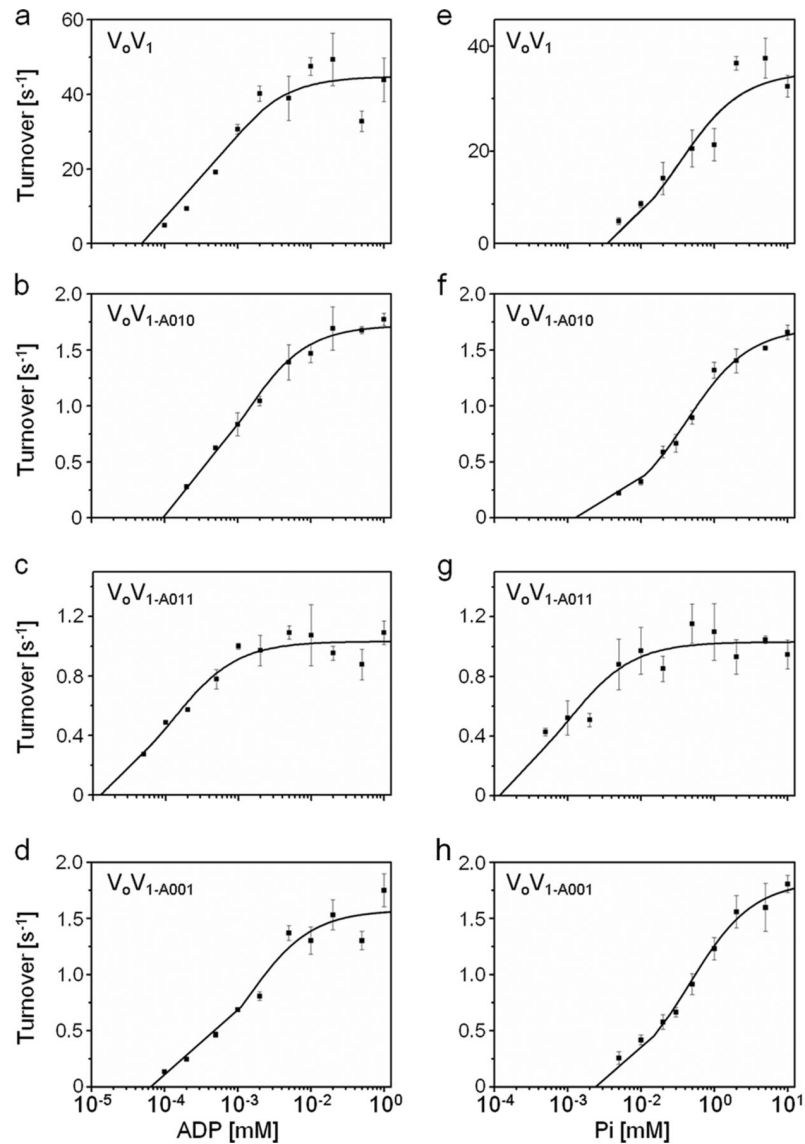


図 2-10 再構成変異体 V_oV_1 の ATP 合成反応における Michaelis-Menten プロット。a-d は、基質濃度を ADP としたとき、e-h は基質濃度を Pi としたときのプロットを示す。各条件において、反応に十分な Pi (10 mM) または ADP (1 mM) を加え実験を行った (詳細は 2-5 方法の章を参照)。ADP に対する $K_{m(\text{ADP})}$ 、 $V_{\max(\text{ADP})}$ 、Pi に対する $K_{m(\text{Pi})}$ 、 $V_{\max(\text{Pi})}$ の値を表 2-2 に示す。

表 2-2 Michaelis-Menten プロットから計算した ADP に対する $K_{m(\text{ADP})}$ 、 $V_{\max(\text{ADP})}$ 、

Pi に対する $K_m(\text{Pi})$ 、 $V_{\max}(\text{Pi})$ の値。

		V_{\max} (s^{-1})	K_m (μM)
$TthV_oV_1$	ADP	44.8 ± 2.1	5.4 ± 1.3
	P_i	35.1 ± 2.3	322 ± 90
V_oV_{1-A010}	ADP	1.7 ± 0.1	10.9 ± 0.2
	P_i	1.7 ± 0.0	402 ± 39
V_oV_{1-A011}	ADP	1.0 ± 0.037	1.3 ± 0.3
	P_i	1.0 ± 0.0478	10.6 ± 3.5
V_oV_{1-A001}	ADP	1.6 ± 0.1	13.5 ± 2.3
	P_i	1.8 ± 0.1	457 ± 68

好熱菌の膜から調製した V_oV_1 の ATP 合成の V_{\max} は 50 s^{-1} 程度であるが、今回測定した再構成変異体 V_oV_1 の V_{\max} はいずれも $1 \sim 2 \text{ s}^{-1}$ 程度と低かった。低い原因は不明である。再構成体の中に V_o と V_1 間で脱共役している分子が多数含まれている可能性がある。 K_m 値に注目してみると、ADP 阻害感受性を示す WT V_oV_1 、 V_oV_{1-A010} 、 V_oV_{1-A001} とも同様の値であった。特に Pi に対する K_m はいずれも $300 \sim 450 \mu\text{M}$ と高い値を示した。一方、ADP 阻害に対する感受性が低い V_{1-A011} の再構成体 V_oV_{1-A011} は、他の V_oV_1 とは大きく異なる K_m を示した。特に、Pi に対する K_m は $\sim 10 \mu\text{M}$ 程度であり、他の V_oV_1 に比べ 40 倍以上低い。これは、A011 変異により Pi に対する親和性が大幅に上がっていることを示唆する。以上の結果から、ADP 阻害に対する感受性と Pi に対する親和性との間に強い相関があることが示唆された。

2-3-5 V_{1-A011} の Pi 親和性の解析

ATP 合成実験により、 V_{1-A011} の Pi に対する親和性が大幅に上昇していることが示唆された。次に、 V_{1-A011} の ATP 加水分解反応における Pi の影響を多分子系及び無負荷プローブを用いた 1 分子観察実験で調べた。Pi は V_1 の生成物であるが、 $\sim 10 \text{ mM}$ ではほとんど V_1 の ATP 加水分解活性を阻害しないことが報告されている [26]。実際、今回作成した ADP 阻害感受性を示す変異体 V_1 は 10 mM Pi の存在下で ATP 加水分解活性の阻害は観察されなかった。一方、ADP 阻害感受性をほとんど示さない V_{1-A011} の活性は Pi により顕著に阻害さ

れた ($IC_{50} = \sim 10$ mM, 図 2-11)。これは V_{1-A011} の P_i に対する親和性が上昇していることを示す。

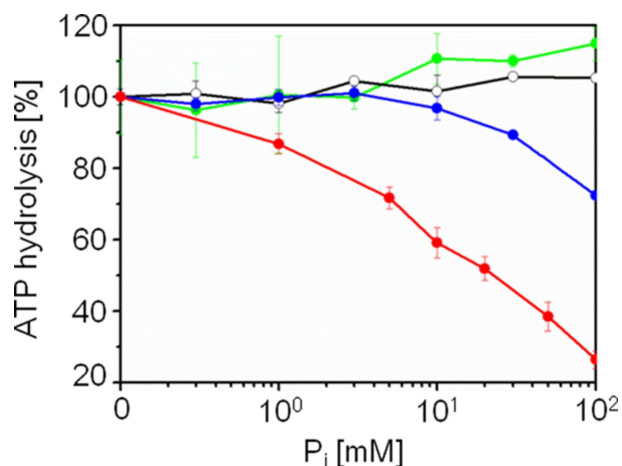


図 2-11 ATP 加水分解における変異体 V_1 の P_i に対する感受性。 P_i 濃度 0 mM の ATP 加水分解活性を 100 % としたとき、各 P_i 濃度条件下における相対活性を示した。横軸を P_i 濃度、縦軸を ATP 加水分解活性とした。 $T.thV_1$ (黒色) V_{1-A001} (緑色)、 V_{1-A010} (青色) V_{1-A011} (赤色)。

回転観察プローブとして直径 40 nm の金コロイドを使用することにより、溶液中でプローブに生じる粘性抵抗の影響を受けることなく、分子の動きを観察できる [26]。これより、ごく短い dwell time の解析が可能になる。 P_i によってどの素過程が阻害されるかを検討するため、 V_{1-A011} の無負荷プローブを用いた 1 分子観察実験を行った。ごく短い dwell を観察するため、4000 ~ 8000 frames s^{-1} のフレームレートでデータを取得した。基本的な回転観察実験系は、ビーズを使った実験と同様に行った。図 2-12 に V_{1-A011} の無負荷プローブによる 1 分子観察実験の結果を示す。 V_1 の V_{max} 条件における速度は ~ 30 s^{-1} で、ATP 加水分解の turnover に換算すると ~ 90 s^{-1} 程度になる。一方、 V_{max} 条件で P_i を終濃度 20 mM 加えると、回転速度は約半分になった (図 2-12 a, b)。c 及び d は ATP 飽和条件での dwell を伴った回転を示す。ATP 飽和条件では、ATP 結合待ち dwell はほぼ無視できるので、ここで観察される dwell は、ATP の分解もしくは生成物である ADP、 P_i の解離に由来すると考えられる。 P_i を 20 mM 加えて観察した場合 (d)、明らかに c に比べて dwell time が伸びている。一方、新たな停止は現れていないので、もとの停止位置で起こる素過程が P_i を加えることにより伸びていることを示唆する。以上の結果は、 V_{1-A011} では 120 度毎に起こる停止位置で P_i の解離が起こり、 P_i の添加により P_i の解離時間が長くなることを強く示唆する。

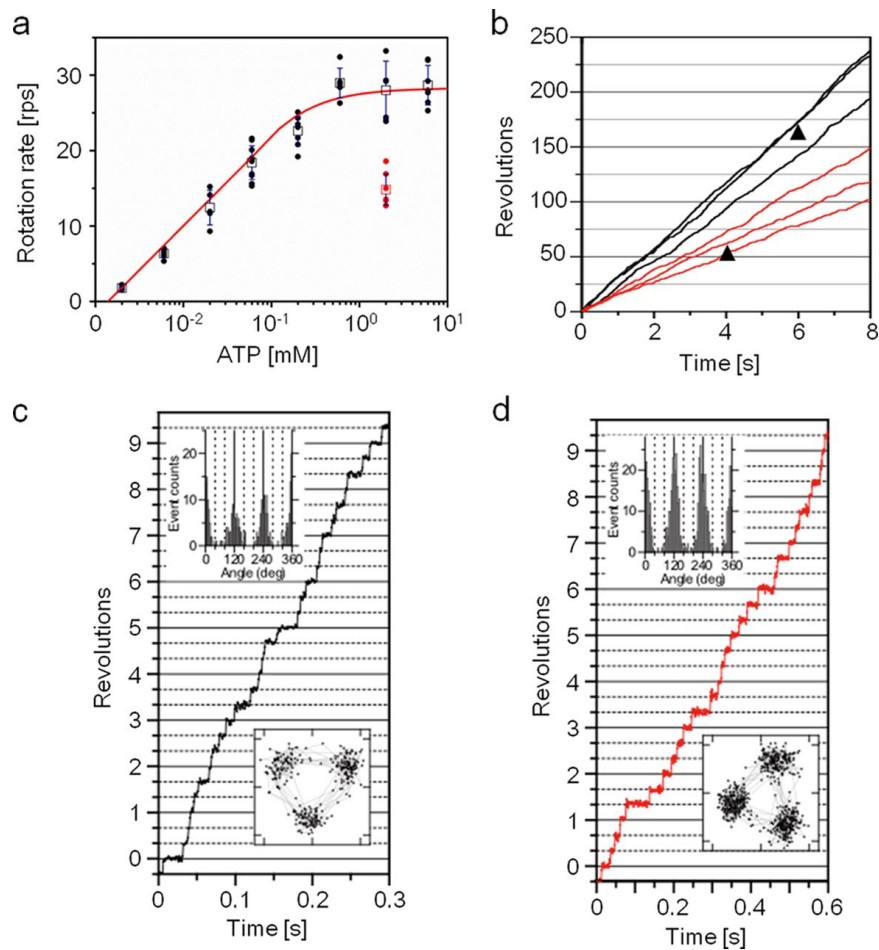


図 2-12 金コロイドによる V_{1-A011} の 1 分子回転観察。a は各 ATP 濃度に対するビーズの回転速度の Michaelis-Menten プロット。20 mM Pi 存在下条件の回転速度を赤色の点、Pi 非存在下条件の回転速度を黒色の点で示した。赤色の線は黒色の点を Michaelis-Menten 式でフィッティングした時のフィッティングカーブを示す。b はビーズの回転数を示し、20 mM Pi 存在下条件の結果を赤色、Pi 非存在下条件の結果を黒色の線で示した。c (Pi なし) と d (20 mM Pi) は、b の黒色三角で示したポイントの拡大図を示す。図中に止まり位置のヒストグラムと重心分布図を示す。

2-4 考察

*T.thV*₁ は、ADP 阻害によってほぼ不可逆的に ATP 加水分解活性が消失するが、*E.hiV*₁ は阻害に陥ることなく連続的に ATP を分解する [3, 22, 26]。アミノ酸配列の相同性が 70 % 以上と高く、構造もほぼ同じであり、この違いがどこに起因するかは未解明であった。本研究では、ADP 阻害感受性が異なる 2 種類の *V*₁ からドメインスワップした *V*₁ を構築し、ADP 阻害に必要な仕組みの同定を試みた。ADP 阻害は、触媒部位から ADP が離れなくなることにより起こる [15, 17, 25]。従って、触媒部位のある NB ドメインが ADP 阻害の鍵であると考えられた。しかし、NB ドメインのみを *E.hiV*₁ 由来にした *V*_{1-A010} は、強い ADP 阻害感受性を示した。また、CT ドメインのみを *E.hiV*₁ 由来にした *V*_{1-A001} も ADP 阻害感受性を示した。一方で、NB および CT ドメインを *E.hiV*₁ のものに置換すると ADP 阻害不感受性になった (図 2-2, 4)。このことから両ドメインの相互作用が ADP 阻害感受性に重要な役割を果たすことが考えられる。また多分子系、および 1 分子観察実験による ATP 分解、合成の解析により、*V*_{1-A011} での ADP 阻害不感受性と Pi に対する親和性の上昇との相関性が強く示唆された。

*T.thV*₁ の結晶構造から、*T.thV*₁ の 3 つの A サブユニットは、複合体中で各々異なる構造をとることが分かっている (図 2-13, a, 表 2-3, [27])。一方、*E.hiV*₁ の結晶構造では、3 つの A サブユニットのうち、ヌクレオチドと結合している *E.hiA*_{T1} と *E.hiA*_{T2} の構造はほぼ同じで、これら 2 つの構造は ATP と結合している *T.thA*_T の構造と良く似ていた (表 2-4, 5)。ヌクレオチドを含んでいない *E.hiA*_O と *T.thA*_O の構造も良く似ていることから (表 2-5)、*T.thA*_D だけが *T.thV*₁ 特有の構造であることが分かる。図 2-13 c に *T.thA*_D と *T.thA*_T の P-loop 領域を重ね合わせた図を示す。*T.thA*_T では触媒残基 Lys²³⁴ と ADP の β 位の Pi との距離が 3.8 Å であるのに対し、*T.thA*_D では 2.9 Å とより近付いていた。このため、*T.thA*_D の触媒部位は新たに Pi が結合出来ないような構造に変化していると考えられる (図 2-13, c e, f)。一方、*E.hiA*_{T1} と *E.hiA*_{T2} の P-loop 領域を重ね合わせたとき、このような構造変化は起こらない (図 2-13, d)。A サブユニットの NB および CT ドメインを *E.hiV*₁ のものとドメインスワップしている *V*_{1-A011} は、触媒部位が *T.thA*_D ではなく *E.hiA*_T に近い構造をとると考えられる。このため NB ドメインの Pi 結合サイトの性質が変化し、Pi に対する親和性が上昇したことが考えられる。

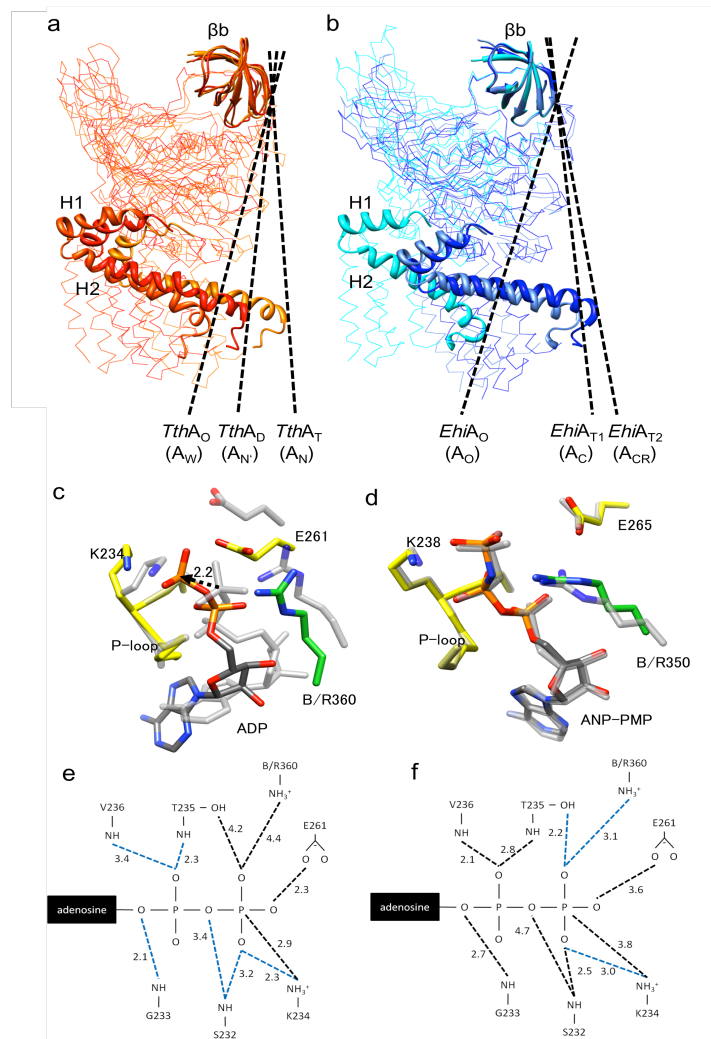


図 2-13 *T.thV₁* と *E.hiV₁* の複合体中の各 A サブユニットの構造比較。*T.thA* は Nagamatsu Y らの構造 (PDB ID; 3W3A, ref. [27])、*E. hiA* は Arai S らの構造 (PDB ID; 3VR6, ref. [28]) を参照した。*T.thV₁* と *E.hiV₁* の各 A サブユニットの構造を N 末端の β バレルを基準に重ね合わせた図を a と b に示した。c に *T.thA_D* (色付き) と *T.thA_T* (灰色) の P-loop 領域を重ね合わせた図を示す。A サブユニットの残基を黄色、B サブユニットの残基を緑色で示した。*T.thA_D* と *T.thA_T* の構造を重ね合わせたとき、触媒部位の ADP の β 位の Pi の位置が変化している (点線矢印)。*E.hiA_{T1}* (色付き) と *E.hiA_{T2}* (灰色) の P-loop 領域を重ね合わせたとき、このような構造変化は起こらない (d)。e と f に *T.thA_D* と *T.thA_T* のヌクレオチド結合部位の模式図を示す。黒色点線は各原子間の距離 (Å) を示し、青色点線は水素結合可能な距離を示す。

表 2-3 *T.thV₁* の各 A サブユニット間の rmsd 値 (Å) から構造の類似性を比較した。A サブユニットの N 末端の β バレルを基準に計算した。

	<i>T.thA_O</i>	<i>T.thA_T</i>	<i>T.thA_D</i>
<i>T.thA_O</i>	-	11.4	6.42
<i>T.thA_T</i>	-	-	5.71

表 2-4 *E.hiV₁* の各 A サブユニット間の rmsd 値 (Å) から構造の類似性を比較した。A サブユニットの N 末端の β バレルを基準に計算した。

	<i>E.hiA_O</i>	<i>E.hiA_{T1}</i>	<i>E.hiA_{T2}</i>
<i>E.hiA_O</i>	-	13.1	15.7
<i>E.hiA_{T1}</i>	-	-	2.87

表 2-5 *T.thV₁* と *E.hiV₁* の各 A サブユニット間の rmsd 値 (Å) から構造の類似性を比較した。A サブユニットの N 末端の β バレルを基準に計算した。

		<i>T. thermophilus</i>		
		<i>T.thA_O</i>	<i>T.thA_T</i>	<i>T.thA_D</i>
<i>E.hirae</i>	<i>E.hiA_O</i>	2.93	13.5	8.45
	<i>E.hiA_{T1}</i>	14.5	4.59	8.55
	<i>E.hiA_{T2}</i>	16.9	6.42	10.7

T.thV₁ の *T.thA_D* と *T.thA_T* の構造を比較したとき、NB ドメインに対する CT ドメインの位置が大きく異なっていた。図 2-14 の a と b は、*T.thV₁* の NB ドメインと CT ドメインの界面の拡大図である。左に A サブユニットの全体図を示し、拡大図の位置を四角で示した。*T.thA_D* の構造では、NB ドメインと CT ドメインの界面にいくつかの水素結合 (Val²¹⁴-Arg⁴⁵⁷、Leu²¹⁵-Thr⁴³²、Asn⁴²⁵-Gln⁴⁵⁹) が想定された。このような水素結合は *T.thA_T* の構造では生じない。*V₁* の結晶構造では、この水素結合の領域を含む CT ドメインの 2 本のヘリッ

クスが NB ドメインの界面に存在していた。変異体 $V_{1-A010.1}$ では、この 2 本のヘリックスが *E.hi* のものに置換されている。 V_{1-A010} が ADP 阻害に陥る一方、 $V_{1-A010.1}$ は ADP 阻害に陥らなかった。これは NB ドメインと CT ドメインとの水素結合による相互作用が ADP 阻害感受性に寄与していることを強く示唆する。より高分解能の *T.thV₁* の構造情報を明らかにし、Pi の結合様式及び触媒部位の構造を検討することで、*T.thV₁* と *E.hiV₁* における ADP 阻害感受性の違いの分子基盤が明らかになるだろう。

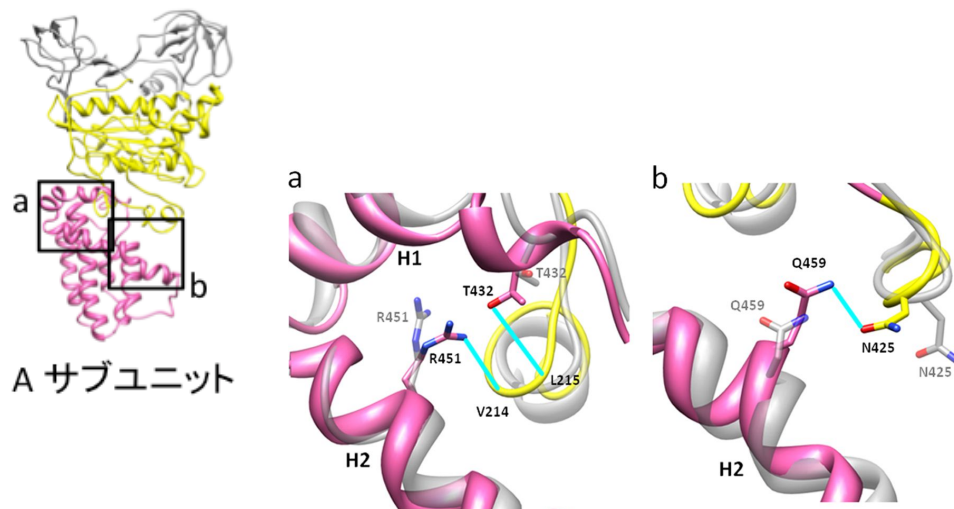


図 2-14 *T.thV₁* の A サブユニットの NB ドメイン (黄色) と CT ドメイン (ピンク色) の相互作用。a と b は NB と CT ドメインの界面で水素結合が起こりうる位置の拡大図を示している。左に A サブユニットの全体図を示し、拡大図の位置を四角で示した。NB ドメイン近傍に位置する CT ドメインの 2 本のヘリックスをそれぞれ H1 と H2 と示した。*T.thA_D* (色付き) と *T.thA_T* (灰色) を NB ドメインの 190-428 番目のアミノ酸残基を基準に重ね合わせたとき、*T.thA_D* では水素結合が生じる (青線)。

2-5 方法

2-5-1 ドメインスワップ変異体 V_1 発現系の構築

A サブユニットを NT (N-terminal) ドメイン、NB (Nucleotide-binding) ドメイン、CT (C-terminal) ドメインの 3 つのドメインに分け、ドメインスワップにより様々な変異体を作成した。*T.thV₁* は Nagamatsu Y らの構造 (PDB ID; 3W3A, ref. [27])、*E.hiV₁* は Arai S らの構造 (PDB ID; 3VR6, ref. [28]) を参照した。A サブユニットのアミノ酸配列と発現系の構造を示す (図 2-14, 15)。*T.thV₁* の NB ドメインをドメインスワップしたものを V_{1-A010} 、CT ドメインをドメインスワップしたものを V_{1-A001} 、NB ドメインと CT ドメインをドメインスワップしたものを V_{1-A011} と記載した。また NB ドメインとその近傍に位置する CT ドメイン 2 本を含めた領域をドメインスワップしたものを $V_{1-A010.1}$ と記載した。

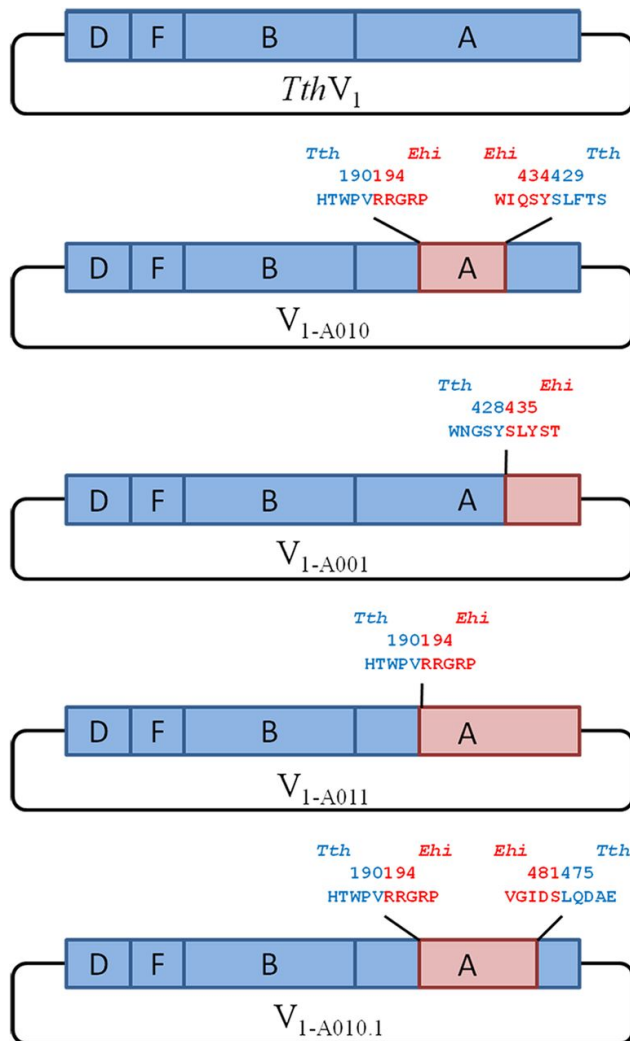


図 2-14 構築したプラスミドの模式図。

全ての発現系は *T.thV₁* 発現系プラスミドをもとに構築した [29]。*T.th* 遺伝子は青色、*E.hi* 遺伝子は赤色で示した。つなぎ目のアミノ酸とその番号を示す。


```

TthA      MIQGV IQKIAGPAVIAKGLGARMYDICKVGEGLVGEIIRLDGDTAFVQVYEDTSGLKV 60
EhiA      MQIGKIIKVSGLVMAENMSEASIQDMCLVGLGVIGEIIEMRQDVASIQVYEETSGIGF 60
          * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
TthA      GEPVVSTGLPLAVELGPGMLNGIYDGIQRPLERIREKTG-IYITRGVVVHALDREKKWAW 119
EhiA      GEPVIRSTGEALSVELGPGIISQMFQDGIQRPLDTFMEVTSQSNFLGRGVQLPALDHEKQWVF 120
          **** * * * . * : * * * * * : . . : * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
TthA      TPMVKPGDEVRGGMVLGTVPEFSFT-HKILVPPDVRGRVKEVKPAGEYTVVEEPPVVLEDG 178
EhiA      EATIEEGTEVSAGDIIGYVDETKIIGHKIMVPNGIKGTQKIE-SGSFTIDDPICVIETE 179
          . : : * * * . * : : * * * * . : * * * * * * * . : * * * * * : : * * * * * : * * * * * :
TthA      T---ELKMYHTWFPVRRAREVQRKLDENTPFLTGMRIIDVLFVPMAGGTAALHSPFGSGKT 235
EhiA      QGLKELTMMQKWPVRRGREPIKQKLNPDVPMITGQRVITDFFPVTKGGAAAVHSPFGAGKT 239
          * * . * . : * * * * * . * * : : * * * * * : * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
TthA      VTQQSLAKWSNADV VVYVGCGERGNEMTDVLFVEFPELTDPKTGGPLMHRTVLIANTSMP 295
EhiA      VVQHQAIAKWSDDVLDLVVYVGCGERGNEMTDVVNEFPELIDPNTGESLMERTVLIANTSMP 299
          * . * . : * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TthA      VAAREASIVGVTIAEYFRDQGF SVALMADSTSRWAEALREISSRLEEMPAEEGYPYLA 355
EhiA      VAAREASITGITIAEYFRDMGYIVAIMADSTSRWAEALREMSGRLEEMPGDEGYPAYLG 359
          * * * * * * * . * : * * * * * * * * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TthA      ARLAIFYERAGKVITLGGE--EGAVTIVGAVSPGGDMSEPVTSQTLRIVGAFWRLDASL 413
EhiA      SRLAEYYERSGRVIALGSDQREGSITSAVSPSGGDISEPVTONTLRVVVKVFWGLDSSL 419
          : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TthA      AFRRHFPAINWNGSYSLFTSALDPWYRENAEDYPELRDAISELLOREAGLQEIIVQLVGF 473
EhiA      AQKRHFPSINWIQSYSLYSTEVGRYMDQILQQDWSMDVTEGMRILQEEELNEIVRLVGI 479
          * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ↓
TthA      DALQDAERLVIIEVGRRIREDFLQQNAFHEVDAYCSMRKAYGIMKMILAFYKEAEEAIKRG 533
EhiA      DSLSDNDRLTLEVAKSIREDYLQQNAFDDVDTFTSREKQFNMLKVIILTFGKEARKALSLG 539
          * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TthA      VSIDEILQ--LPVVERIGRARYVSEEEFF--AYFEEAMKEIQGAFKALA----- 578
EhiA      AWFNEIMEGTVAVRERISRSKYIPEEELAKISSINEEIKETIQLIVSEGMTDD 593
          . : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

図 2-15 *T.thV₁* と *E.hiV₁* の A サブユニットのアミノ酸配列比較。*T.thV₁* の A サブユニットの配列は NCBI Gene ID Q72J72.1、*E.hiV₁* の A サブユニットの配列は NCBI Gene ID Q08636.1 を参照した。配列の下に記した記号は、*；同じ残基、；：；相同性の高い残基、.；：；相同性の低い残基を示す。NT ドメインは緑、NB ドメインは赤、CT ドメインは青色で示した。矢印は V_{1-A010.1} の交換部分を示す。ヌクレオチド結合に関与する P-loop motif A, B は四角で示した。

2-5-2 ドメインスワップ変異体 V_1 の精製

目的の変異を導入した V_1 プラスミド (図 2-14) を BL21-CodonPlus-RP (Stratagene) に形質転換、培養した。菌体を超音波処理により破碎後、破碎液をチューブに移し、65 °C で 30 分、恒温槽で熱処理を行い、4 °C で 7000 rpm、30 分の遠心で不溶性画分を取り除いた。上清を Ni-NTA カラム (Ni-Sepharose fast flow, GE healthcare) に供し、得られたフラクションのうち V_1 が存在するフラクションを Bradford 色素結合法で判断した。ピークフラクションを全て混合し、buffer 置換することにより脱塩した。その後純度を高めるため、液体クロマトグラフィー (ÅKTA prime, GE Healthcare) を用いて陰イオン交換カラム (UNOQ) に供した。得られたフラクションのうち V_1 が存在するフラクションを SDS-PAGE で確認した。 V_1 が存在するフラクションを全て混合し、Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex HR200, GE Healthcare) に供した。0.25 ml ずつ分画したフラクションのうち V_1 が存在するフラクションを SDS-PAGE で確認した。 V_1 が存在するフラクションは全て混合し、Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して濃縮後、4 °C で保存した。

2-5-3 ATPase 活性測定系

ATPase 活性測定には pyruvate kinase を用いた ATP 再生系と lactate dehydrogenase による NADH の酸化反応を利用した。NADH は 340 nm に吸光を持つのに対し、 NAD^+ は 340 nm に吸光を持たないため、340 nm における吸光度変化を測定することで NADH の酸化反応速度を見積もることが出来る。NADH の酸化反応と ATP の加水分解反応は 1 : 1 で共役するため、NADH の酸化反応速度を測定することで、間接的に ATP の加水分解反応速度を見積もることが出来る。右に再生系反応の模式図を示す。

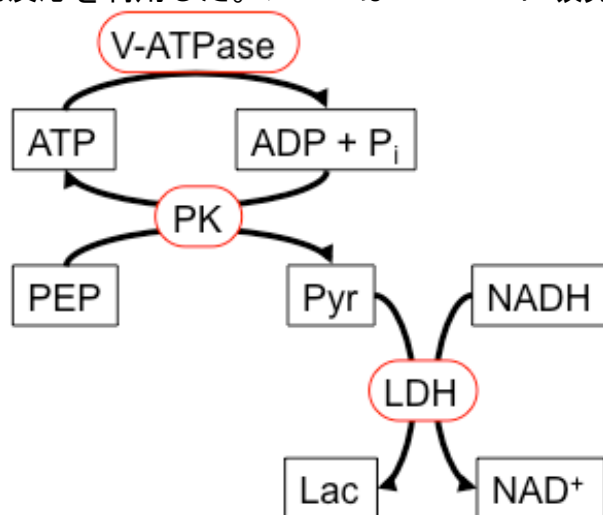


図 2-16 ATP 再生系反応の模式図。

また、以下に ATPase 活性測定反応液の組成を示す。

ATPase 活性測定反応液

50 mM Tris-HCl pH8.0 / adjusted with HCl

100 mM KCl

2 mM MgCl₂

2 mM phosphoenolpyruvic acid

0.1 mg/ml Pyruvate Kinase

0.1 mg/ml Lactic Dehydrogenase

活性は 25 °C で測定した。2 ml の ATPase 活性測定反応液と攪拌子を 1 cm x 1 cm の石英セルに入れ、分光光度計 (EHC-716, JASCO) にセットした後、任意量の NADH を加え OD を 0.8-1.2 に調整した。任意濃度の ATP-Mg を加え、ベースラインが安定した後、測定を開始した。30 秒後に酵素を加え、10 分測定した。V₀、V₁ の活性測定には ATP 加水分解活性測定 mixture に 0.03% DDM (n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside) を加えたものを使用した。

NADH の酸化反応に対応する吸光度変化を NADH の吸光係数 ε で割り、ATP 加水分解反応に対応するモル濃度変化に変換した。

以下に計算式を示す。

$$ATPase\ activity\ (s^{-1}) = \frac{\Delta A_{340}\ s^{-1}\ cm^{-1} \times 200\ \mu l}{x\ M \times y\ \mu l \times 6220\ cm^{-1}\ M^{-1}}$$

$\Delta A_{340}\ s^{-1}\ cm^{-1}$ は 1 秒当たりの吸光度の減少量、 $6220\ cm^{-1}\ M^{-1}$ は NADH のモル吸光係数 ε を示す。 $\Delta A_{340}\ s^{-1}\ cm^{-1}$ は測定中のある 10 秒間の傾きが最も大きい値を使用した。

また、V₁ に結合したヌクレオチドは EDTA 処理と熱処理により除去することが出来る [26]。タンパク質溶液を 100 mM NaPi pH8.0, 10 mM EDTA を含む buffer で置換し、65 °C、で 10 分間熱処理し、その後氷上で 30 分間放置した。熱処理と氷上放置を 5 回繰り返した後、PD-10 カラム (GE Healthcare) にロードした。溶出タンパク質は直ちに活性測定へ供した。

2-5-4 ATP 合成活性測定

V₀、V₁ の ATP 合成活性測定は桐栄らの方法を参照した [24]。リポソームを擬

似的な生体膜と捉え、 V_oV_i を再構成した。そこに PMF (Proton Motive Force) 与えることにより、 V_oV_i の ATP 合成活性を測定した。PMF は膜を隔てた H^+ 濃度差 ΔpH と膜電位差 $\Delta \psi$ から構成されており、Nernst 式から $PMF = -2.3RT/F \Delta pH + \Delta \psi$ と定義されている。本研究では、 ΔpH と $\Delta \psi$ をそれぞれ acid-base transition と K^+ 拡散ポテンシャルにより与えた。 V_oV_i により合成された ATP は luciferin/luciferase による蛍光反応により検出した。本研究では luciferin/luciferase による蛍光反応検出にルミノメーター (Luminescencer - PSN, ATTO) を使用した。

V_oV_i 再構成リポソームは freeze/thaw method により作成した。リン脂質 2 重層は Phosphatidylcholine (Type-s, Sigma) により作成した。まず、Phosphatidylcholine を L buffer に懸濁し、終濃度 40 mg/ml にした後、バスソニケーターで再度よく懸濁した。終濃度 32 mg/ml Phosphatidylcholine、0.05 mg/ml V_oV_i となるようサンプルを調整し、液体窒素の中で瞬間凍結させた。凍結融解、室温融解、2 度繰り返したものを V_oV_i 再構成リポソームとし、作成直後に使用した。

30 μ l の再構成リポソームに 15 μ l の酸性化 buffer (300mM MES pH 4.7) を加え 25 $^{\circ}C$ で 5 分放置したものを酸性化リポソームとした。リポソーム溶液と、それと異なる pH の反応溶液を混合したとき、瞬間的にリポソーム内外に ΔpH を与えることが出来る。イオンや化学物質のリポソームを介した移動は無視できる程度に小さいため、混合直後のリポソーム内の溶液環境は混合前の環境が維持される。本研究では、リポソーム内の pH を pH_{in} 、反応溶液の pH を pH_{out} としたとき、 $\Delta pH = pH_{in} - pH_{out}$ と定義し、 $\Delta pH = 3.8$ の条件で実験を行った。

K^+ 拡散ポテンシャルは、バリノマイシンと呼ばれる K^+ のイオノフォアを使って与える。予めリポソームの内外に K^+ 濃度差を与え、バリノマイシンを加えることにより K^+ イオンを移動させる。 K^+ イオンの移動により生じた電子差を $\Delta \psi$ とした。膜電位は Nernst 式 $\Delta \psi = -2.3RT/F \ln ([K^+]_{out} / [K^+]_{in})$ から計算できる。本実験では $\Delta \psi = 290$ mV の条件で実験を行った。

luciferin/luciferase による蛍光反応により、合成された ATP を検出した。測定にはルミノメーター (Luminescencer-PSN, ATTO) を使用した。以下使用した反応液の組成を示す。

L buffer

100 mM Tricine pH8.5 / pH8.5, adjusted with NaOH
2.5 mM MgSO₄
10 mM NaH₂PO₄

ATP 合成活性測定反応液

100 mM Tricine pH8.5 / pH8.5, adjusted with NaOH
2.5 mM MgSO₄
10 mM NaH₂PO₄
2.2 mg luciferin/luciferase (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS h N
Roche, L buffer で 18 mg/ml に調整直後使用)
x mM ADP-Mg
100 mM KCl
36 nM Valinomycin

ADP-Mg 濃度は任意で調整した。反応系を全て混合し体積を0.5 mlとし、30 °C に温度設定したルミノメーターにセットした。100 秒間ルミノメーター内で静置し、100 秒間 luciferin/luciferase の蛍光強度が安定していることを確認した後、調整直後の酸性化リポソームを加えた。その後 500 秒間の蛍光強度の変化を測定した。

2-5-5 1分子観察実験

V₁ の1分子観察は中野らの方法を参照した [26]。V₁ は縦幅 130 Å、横幅 120 Å と非常に小さいため、軸の回転運動を観察するためには目印となるプローブが必要である。プローブはストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズ (nominal diameter, ~200 nm, Thermo Fisher Scientific) を使用した。

ビオチンとアビジンの結合定数は非常に高いため、一旦アビジンと結合したビオチンは生理的条件化では外れない。回転軸をビーズで修飾するため、D サブユニットにシステインを PCR により導入した (E48C、Q55C)。イオン交換後のサンプルに終濃度 10 mM DTT を加え、システインを還元し、余分な DTT をゲルろ過クロマトグラフィーにより除去した。その後直ちにビオチンマレイミド (dojindo) をモル比で 10 倍量加え、システインの SH 基をビオチン化した。余分なビオチンマレイミドはゲルろ過クロマトグラフィーにより除去した。精製サンプルは直ちに 1 分子観察に供した。

タンパク質をヒスチジンタグで固定するため、Ni-NTA で修飾したガラス (24x36 mm²) を用意した。2 つの 50 μm のスペーサーをガラス表面に固定し、上から非修飾ガラス (24x24 mm²) で覆うことにより、フローセルを作成した。まず、非特異的なタンパク質の吸着を防ぐため 1 mg/ml の BSA (bovine serum albumin, Sigma) を含む TK buffer でフローセルを充填した。次にビオチン化済みの V₁ (終濃度 1-10 nM、M buffer に懸濁) をフローセルにロードし、5 分放置した。1 mg/ml BSA を含む TK buffer 20 μl をフローセルへ 3 回ロードすることで非吸着分子を除去した後、1 mg/ml BSA と 0.1 % のストレプトアビジンコート磁気ビーズを含む TK buffer でフローセルを充填し、10 分放置した。非吸着ビーズを TK buffer で除去した後、任意濃度の ATP-Mg と ATP 再生系 (1 mM phosphoenolpyruvate, 50 μM pyruvate kinase) を含む TK buffer でフローセルを充填し、回転を観察した。ビーズの回転は倒立顕微鏡 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。カメラは CMOS (Neo, Andor, Tokyo, Japan) を使用し 1000 frames s⁻¹ で撮影した。活性は 22 °C で測定した。解析は ImageJ を使用した。ビーズの回転画像から各フレームにおけるビーズの重心座標を求めビーズの軌跡を算出した。時間に対するビーズの軌跡から回転のタイムコースを求めた。以下に M buffer、TK buffer の組成を示す。

M buffer

20 mM MOPS pH7.5

150 mM NaCl

TK buffer

50 mM Tris-HCl pH8.0

100 mM KCl

2mM MgCl₂

無負荷条件で回転観察する際は、磁気ビーズの代わりにアビジンコート (Pierce) された金コロイド粒子 (nominal diameter, ~40 nm, BBInternational, Cardiff, UK) を使用した。磁気ビーズの方法同様、タンパク質をヒスチジンタグで固定するため、Ni-NTA で修飾したガラスを用意し、フローセルを作成した。次にビオチン化済みの V₁ (終濃度 1-10 nM、HK buffer に懸濁) をフローセルにロードし、3 分放置した。HK buffer 20 μl をフローセルへ 3 回ロードすることで非吸着分子を除去し除去後、非特異的なビーズの吸着を防ぐために 10 mg/ml BSA

を含む HK buffer をロードした。30 秒後 HK buffer 20 μl をフローセルへ 5 回ロードした後、金コロイドビーズ ($10^{10}\sim 10^{11}$ 個/ml) をロードし 5 分放置した。HK buffer 20 μl をフローセルへ 5 回ロードすることで非吸着ビーズを除去した後、任意濃度の ATP-Mg と ATP 再生系 (2.5 mM phosphoenol pyruvate, 0.5 mg/ml pyruvate kinase) を含む HK buffer でフローセルを充填し、回転を観察した。以下に HK buffer の組成を示す。

HK buffer

50 mM HEPES-KOH pH8.0

100 mM KCl

ビーズの回転は倒立顕微鏡 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。高速カメラは CMOS (FASTCAM-DJV, Photron) を使用し、ごく短い dwell を観察するため、フレームレートを $4000\sim 8000$ frames s^{-1} でデータを取得した。活性は 22°C で測定した。

2-5-6 その他

タンパク質の濃度決定は紫外吸光法で求めた。アミノ酸分析の結果、 $1\ \mu\text{M}$ V_1 は波長 280 nm において 0.36 の吸収を持つことが分かっていることから [26]、 V_1 のモル濃度を求めた。 V_0 及び V_0V_1 の濃度は、BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE) を使用して求めた。 V_0 サブユニットの組成が完全に分かっていないため、これらは推定の分子量を使用した。 V_0V_1 は 660 kDa、 V_0 は 270 kDa とし、モル濃度を求めた。

複合体形成を確認するため、泳動 buffer に AES (alkyl ether sulfate) を界面活性剤として添加した。AES は複合体の解離を起こしにくいため、可溶化状態の膜タンパク質を複合体の状態でも電気泳動することができる [21]。泳動 buffer に AES を終濃度 0.1 % 加え、35 mA で 55 分、室温で電気泳動を行った。

3 章 中心回転軸におけるトルク伝達機構について

3-1 概要

Thermus thermophilus (*T.th*) の V_0V_1 は ATP を合成・分解する V_1 と、プロトンを輸送する V_0 からなり、両者は複合体中で中心回転軸を介してエネルギー共役している。中心回転軸 DF を欠いた V_1 (A_3B_3) が V_0 と再構成することから、この中心回転軸構造の結合力が弱いことが示唆されていた [21]。本研究では、トルク伝達を媒介する V_1 -DF と V_0 -C 間の結合力が弱いことを再構成実験及び FRET 実験により示した。また、C サブユニットとの界面にある D サブユニットの短いヘリックスの変異実験から、このヘリックスと C サブユニットの凹みとの適合が V_0 と V_1 のエネルギー共役に重要であることを示した。以上の結果より、 V_0V_1 のトルク伝達のモデルを提案した。DF が回転し、C サブユニットへトルクを伝達する様子は、ドライバーでネジを締めるときの押しながら回す様子に似ている。回転分子モーター V_0V_1 は、このような巧妙な仕組みによってトルクを伝達していると考えられる。

3-2 背景

V_0V_1 と F_0F_1 は、中心回転軸複合体の回転により V_1/F_1 での ATP の分解もしくは合成と、 V_0/F_0 での膜横断的なプロトンの移動をエネルギー共役させている (図 3-1, a, [6, 10, 11])。互いの全体構造も良く似ているが、エネルギー共役の鍵となる中心回転軸の構造に大きな違いがある [18-20]。 F_0F_1 では F_1 部分の回転子である $\gamma\epsilon$ が直接 F_0 のローターリングに結合する一方、 V_0V_1 では腕型をした C サブユニットと V_0 のローターリング (L_{12}) からなる C- L_{12} 複合体が、 V_1 部分の回転子である DF に対して軸受けの様に配置する (図 3-1, b, ref. [18-20])。

最近の研究で、 A_3B_3 が EG を介して V_0 と再構成することが示された [21]。これは EG と A_3B_3 との結合力が強く、DF と軸受け構造である C サブユニット間の結合力が弱いことを示唆する。また、真核生物の V_0V_1 は可逆的脱着による調節機構を持つことが知られており (図 3-1, c, [30, 31])、中心回転軸の弱い結合力は、この調節的な V_0 - V_1 間の脱着と関係している可能性がある。一方で、 V_0 -C と V_1 -DF 間の結合力が弱いことは、中心回転軸の回転による V_0 - V_1 間のエネルギー共役に都合が悪いように思われる。中心回転軸を構成するサブユニット間に、とれやすいが回転力を伝える仕組みの存在が予想される。

本研究では再構成実験及び FRET による DF-C 間の結合力の測定、及びトルク伝達の構造的基盤の同定を試みた。クライオ EM による単粒子解析の V_0V_1 の構造は C サブユニットの凹みに DF の一部が嵌り込んでいることを示唆している (図 3-1, b, 赤色四角, [32])。腸球菌 *Enterococcus hirae* (*E.hi*) の DF の結晶構造から、この DF の一部が D サブユニットのごく短いヘリックス (Short Helix; 以下 SH と記す) であることが予想される [33]。 V_0V_1 の中心回転軸における DF-C 間の結合力、およびトルク伝達における SH の役割を解析することにより、回転分子モーター V_0V_1 の中心回転軸を介したトルク伝達の仕組みを考察した。

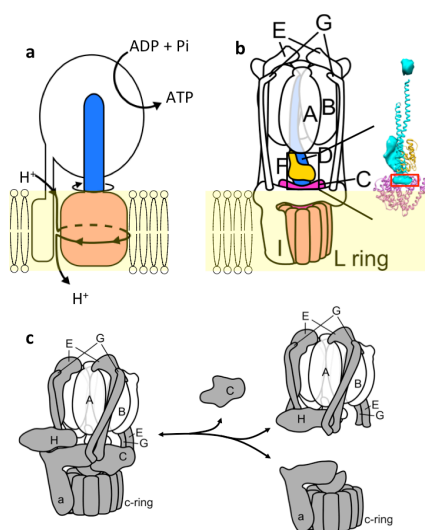


図 3-1 回転分子モーターの模式図 (a)。中心回転軸を青色、ローターリングを赤色で示す。好熱菌 *Thermus thermophilus* (*T.th*) V_0V_1 のモデル図 (b)。中心回転軸の構造を左に、SH を赤色四角で示す。真核生物 V_0V_1 の可逆的脱着による調節機構の模式図を c に示した。

図 3-1 回転分子モーターの模式図 (a)。中心回転軸を青色、ローターリングを赤色で示す。好熱菌 *Thermus thermophilus* (*T.th*) V_0V_1 のモデル図 (b)。中心回転軸の構造を左に、SH を赤色四角で示す。真核生物 V_0V_1 の可逆的脱着による調節機構の模式図を c に示した。

3-3 結果

3-3-1 V_1 、 V_1 -DF 及び V_0 、 V_0 - CL_{12} の調製

本研究では DF-C 間の結合力を調べるため、 V_1 と DF を大腸菌発現系により精製した。 V_1 の発現及び精製系の詳細は 2-5 方法の章に記載した。DF の発現系は今村らの発現系を使用した [34]。 V_1 及び DF 発現プラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus-RP 株 (Stratagene) で発現させ、Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した。また、 V_0 と CL_{12} を *T.th* の形質膜から精製した。詳細は 3-5 の方法の章に示した。精製したタンパク質の電気泳動図を図 3-2 に示す。各複合体は各々のサブユニットを含んでいるので、正常な複合体として精製されていることがわかる (図 3-2)

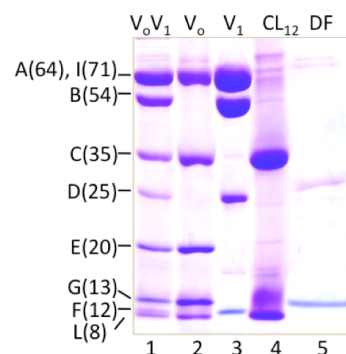


図 3-2 精製したタンパク質の 15% SDS-PAGE。タンパク質は CBB で染色した。泳動したサンプル名をレーン上に示した。

3-3-2 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験

DF-C 間の結合力を介してサブコンプレックスが複合体を形成するかを調べるため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験を行った。*T.th* V_0V_1 は、*in vitro* で V_0 と V_1 が再構成し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで複合体を精製できる [21]。同様に、DF と CL_{12} との複合体を精製できるかを調べた。 V_1 と V_0 を混合し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供したところ V_0V_1 に対応する複合体のピークを示した (図 3-3, lane 1)。一方、DF と CL_{12} を混合し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供したところ、混合したサブユニットに対応するピークのみ示し、複合体に対応するピークが見られなかった (図 3-3, lane 6)。また、 V_1 と CL_{12} 、DF と V_0 を各々混合し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した場合も同様に、複合体に対応するピークが見られなかった (図 3-3, lane 7, 8)。これらの結果は、DF-C 間の結合力が複合体形成に十分でないことを示唆する。

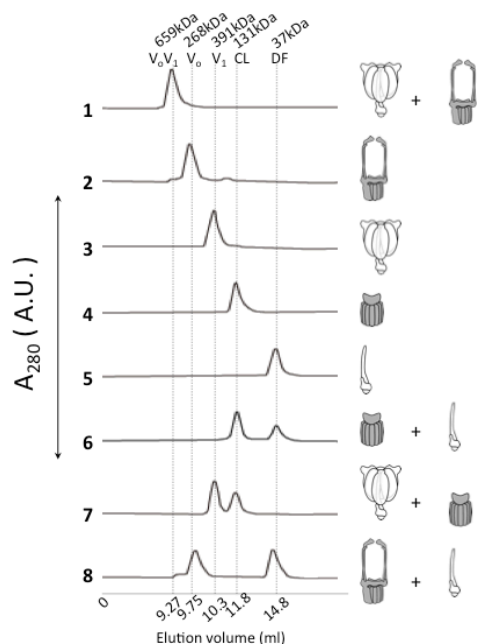


図 3-3 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験のクロマトグラム。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供したサンプルの模式図を右に、各再構成実験のクロマトグラムを左に示した。また各ピークに対応する分子量を上、各溶出体積を下に示した。

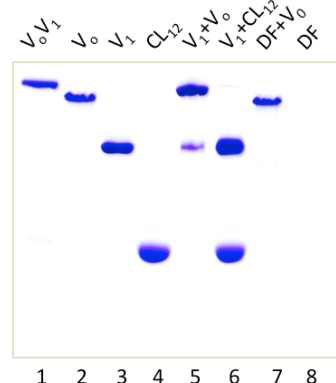
3-3-3 Native-PAGE による再構成実験

T.th V₀V₁ は、*in vitro* で V₀ と V₁ が再構成し、AES (alkyl ether sulfate) という界面活性剤を用いた Native-PAGE で複合体のバンドを確認できる [21]。Native-PAGE の詳細は、2-5 方法の章に示した。

DF-C 間の結合力によりサブコンプレックスが複合体を形成するかを調べるため、Native-PAGE による再構成実験を行った。再構成の方法は、前述のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験と同様の方法で行った。1mg/ml の V₁ 成分と 1 mg/ml の V₀ 成分を体積比 1:1 の割合で混合し、Native-PAGE で再構成体のバンドを確認できるかを検定した。図 3-4 に Native-PAGE ゲルの写真を示す。

V₁ と V₀ を混合し、Native-PAGE に供したところ、V₀V₁ に対応する複合体のバンドが検出された (図 3-4, lane 5)。一方、V₁ と CL₁₂ を混合し、Native-PAGE に供したところ、複合体に対応するバンドは検出されなかった (図 3-4, lane 6)。また、DF と V₀ を混合し、Native-PAGE に供した場合も同様に、複合体に対応するバンドは検出されなかった (図 3-4, lane 7)。これらの結果は、DF-C 間の結合力は複合体形成に十分でないことを示す。

図 3-4 Native-PAGE による再構成実験。タンパク質は CBB で染色した。泳動したサンプル名をレーン上に示した。



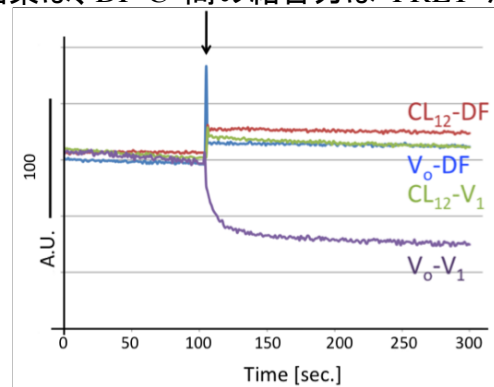
3-3-4 FRET 実験

DF-C 間の会合を直接検出するため、FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を利用した [34]。FRET とは、励起状態のドナー分子から、近傍のアクセプター分子にエネルギーが移動する現象を指す。ドナー分子とアクセプター分子との距離が近付くと、FRET によるエネルギー移動を蛍光の増減として検出することが出来る。この性質を利用して、DF-C 間で FRET が起こるかを調べた。

本実験では、 V_1 の F サブユニット (F/S54C) をドナー、 V_0 の C サブユニット (C/T105C) をアクセプターとし、それぞれ Cy 色素標識マレイミドである Cy3 と Cy5 でラベル化した。ラベル化の詳細は 2-5 方法の章に示した。ラベル化した V_1 成分と V_0 成分を用いて FRET による再構成実験を行った。FRET 実験の詳細は 3-5 方法の章に示した。

532 nm で Cy3 を励起し、Cy3 の蛍光波長である 570 nm の蛍光強度の減少を V_1 成分と V_0 成分の再構成のシグナルとした。 V_1 に対する V_0 の FRET を観察したところ、Cy3 の蛍光強度が減少した (図 3-5, 紫)。これは、 V_1 と V_0 が再構成していることを示す。次に DF に対する CL_{12} の FRET を観察したところ、Cy3 の蛍光強度の減少は見られなかった (図 3-5, 赤)。また、DF に対する V_0 、 V_1 に対する CL_{12} の FRET を観察したところ、Cy3 の蛍光強度の減少は見られなかった (図 3-5, 青緑)。これらの結果は、DF-C 間の結合力は FRET が起こらないほど弱いことが示す。

図 3-5 FRET 実験のタイムコース。横軸を時間、縦軸を Cy3 の 570 nm の蛍光強度とした。



3-3-5 中心回転軸変異体 V_1 と V_0 の再構成実験

再構成実験により、DF-C 間の結合力が弱いことが直接的に示された。DF-C 間の弱い結合力が DF のアミノ酸配列の違いにより変化し、 V_0 と V_1 の再構成に影響するかを調べるため、*T.th* V_1 の中心回転軸を *E.hi* および *H.s* の DF に置換した変異体 V_1 を構築した ($V_{1-E.h-DF}$, $V_{1-H.s-DF}$)。また、DF と C との結合に関与すると思われる D サブユニットの末端にある SH (図 3-1, 6) の役割を調べるために、SH を *E.hi* のものと置換した変異体 V_1 ($V_{1-SH-E.h}$) と SH 欠損変異体

V_1 ($V_{1-\Delta SH}$) を作成した。発現系構築の詳細は 3-5 方法の章に記載した。



図 3-6 *T.th* (*Tt-D*)、*E.hi* (*Eh-D*)、*H.s* (*Hs-D*) の D サブユニットのアミノ酸配列アラインメント。図中の記号は、*；同じ残基、:；相同性の高い残基、.；相同性の低い残基、H；ヘリックス、C；ループを示す。赤色の四角は D サブユニットのごく短いヘリックスを示す。

精製した各変異体 V_1 の電気泳動図を図 3-7 に示す。各変異体 V_1 とも A, B, D, F サブユニットを含んでいることから、正常な複合体として精製されていることがわかる (図 3-7)。

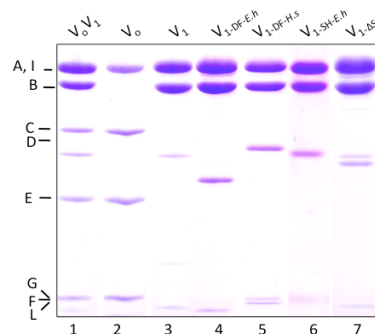


図 3-7 精製したタンパク質の 15% SDS-PAGE。泳動したサンプル名をレーン上に示した。タンパク質は CBB で染色した。

変異を含んだ軸が回転軸として機能しているかを調べるため、ATP 加水分解活性を enzyme coupling assay で測定した。詳細は 2-5 方法の章に示した。連続的な ATP 加水分解活性を測定するため、 V_1 部分には TSSA 変異 (A-S232A/A-T235S) を導入した [26]。ATP 加水分解活性を測定したところ、中心回転軸変異体 V_1 は WT と同等の ATP 加水分解活性を示した。それぞれの

中心回転軸変異体 V_1 について、Michaelis-Menten プロットから計算した K_m 、 V_{max} の値を表 3-1 に示す。この結果は外来軸が回転軸として正常に機能していることを示す。 $H.s$ 由来の DF を持つ V_1 の活性が高いが、その原因は不明である。今後明らかにすべき課題の一つである。

表 3-1 Michaelis-Menten プロットから計算した中心回転軸変異体 V_1 の K_m 、 V_{max} の値。

	V_1	$V_{1-E.h-DF}$	$V_{1-H.s-DF}$	$V_{1-SH-E.h}$	$V_{1\Delta SH}$
K_m [mM]	0.23 ± 0.05	0.76 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.24 ± 0.06
V_{max} [s^{-1}]	30.6 ± 1.8	38.0 ± 0.8	132 ± 3.0	27.5 ± 1.5	21.8 ± 1.4

中心回転軸変異体 V_1 ($V_{1-E.h-DF}$ 、 $V_{1-H.s-DF}$ 、 $V_{1-SH-E.h}$ 、 $V_{1\Delta SH}$) が V_o と再構成するかをゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより検定した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのクロマトグラムと、各ピークフラクションの SDS-PAGE の結果の図を示す (図 3-8)。各ピークフラクションは複合体のピークを示し、SDS-PAGE で複合体のサブユニットのバンドが確認された (図 3-8, 右)。これらの結果は、

中心回転軸変異体 V_1 が V_o と再構成することを示す。つまり、DF の種類、SH の置換、欠失が V_1 と V_o の再構成に影響を与えないことが明らかになった。

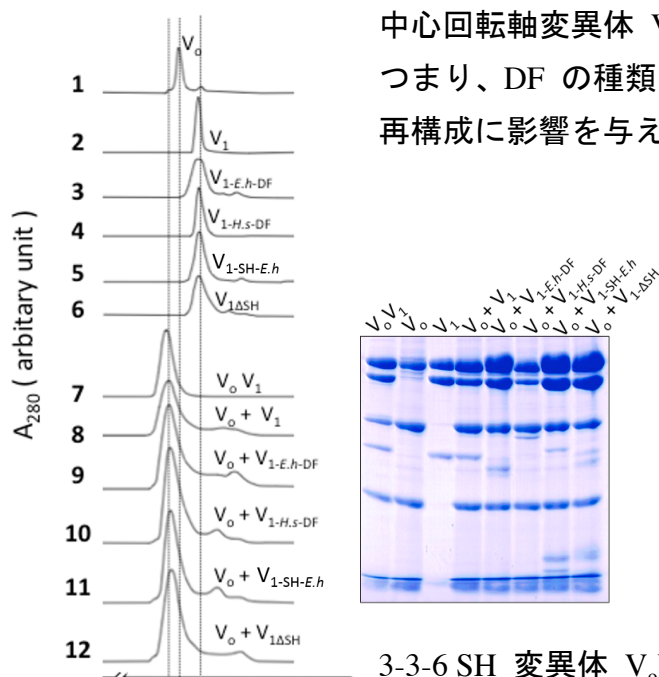


図 3-8 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる再構成実験のクロマトグラム (左)。クロマトグラムの右に供したサンプル名を示した。各ピークフラクションの 15% SDS-PAGE (右)。泳動したサンプル名をレーン上に表示した。

3-3-6 SH 変異体 V_oV_1 の ATP 合成実験

再構成により作成した変異体 V_oV_1 を凍結融解法によりリポソームに再構成し、ATP 合成活性を測定した。測定は 2-5 方法の章に記載した方法で行った。

測定開始より 100 秒後、調製直後の酸性化リポソームを加え (図 3-9, 黒色矢印で示す)、その後 500 秒間の蛍光強度の変化を測定した。再構成により作成した V_0V_1 の ATP 合成活性を測定したところ、ATP 合成を示す蛍光強度の上昇が確認された。一方、中心回転軸変異体 V_0V_1 は、いずれも蛍光強度の上昇は確認されなかった (図 3-9)。これは、外来軸をもつ V_1 、もしくは SH を置換、欠失した V_1 と V_0 との再構成体が ATP を合成しないことを示す。これらの結果は、DF サブユニット、特に SH の変異により、 V_1 と V_0 間の共役がなくなることを示唆する。

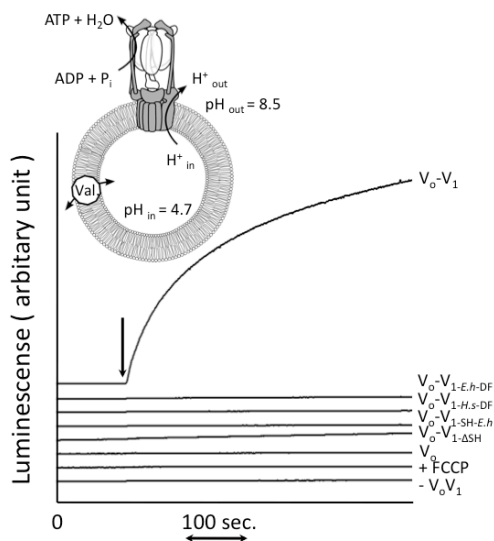


図 3-9 中心回転軸変異体 V_0V_1 の ATP 合成活性測定タイムコース。横軸は時間、縦軸は luciferin/luciferase の蛍光強度を示す。挿入図は実験系の模式図を示す。

3-3-7 SH 変異体 V_0V_1 のプロトンポンプ、チャネル活性測定

D サブユニットの SH が V_0 と V_1 間のエネルギー共役にどのように影響するかを調べるために、SH を *E.hi* 由来のものに置換した V_0V_1 -SH-*E.hi*、および SH を欠損した V_0V_1 - Δ SH のプロトンポンプ活性を測定した [35]。凍結融解法によりリポソームに再構成した V_0V_1 を測定に使用した (詳細は 3-5 方法の章を参照)。実験系の模式図を図 3-10 に示す。

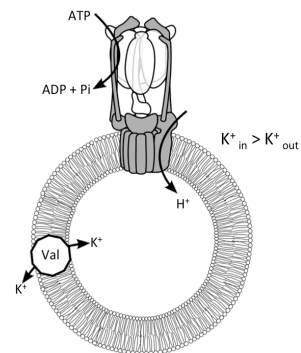


図 3-10 プロトンポンプ活性測定実験系の模式図

V_0V_1 による H^+ 輸送を pH センサー ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, Sigma) の蛍光 (480 nm) により検出した。また、連続的な ATP 加水分解活性を測定するため、 V_1 部分に TSSA 変異

(A-S232A/A-T235S) を導入して実験を行った [26]。バリノマイシンを加えた後 (図 3-11, 左, 黒色矢印)、ATP を加え (図 3-11, 左, 赤色矢印) プロトンポンプ活性を測定した。ATP の添加に伴い、 V_oV_1 はプロトンポンプ活性を示し、 V_o は活性を示さなかった。一方、SH 変異体 V_oV_1 はプロトンポンプ活性を示さなかった。

次にプロトンチャネル活性を測定した。バリノマイシンを加えた後 (図 3-11, 右, 黒矢印)、プロトンチャネル活性を測定した。バリノマイシンの添加に伴い、 V_o はプロトンチャネル活性を示し、 V_oV_1 は活性を示さなかった。一方、SH 変異体 V_oV_1 はプロトンチャネル活性を示した。

これらの結果は、SH 変異体 V_oV_1 が脱共役していることを示す。またこれは、SH と C サブユニットの適切な組み合わせが V_o と V_1 の共役に必須であることが示唆する。

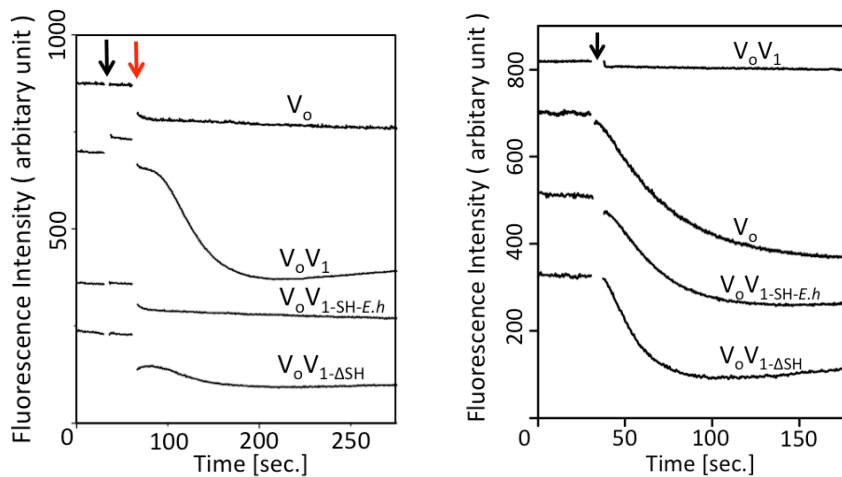


図 3-11 SH 変異体 V_oV_1 のプロトンポンプ活性 (左) とチャネル活性 (右) 測定のタイムコース。横軸は時間、縦軸は ACMA の蛍光強度を示す。各々のタイムコースの上に測定したサンプル名を示した。

3-4 考察

V_0V_1 は、その全体構造がミトコンドリアや細菌の細胞膜に存在する ATP 合成酵素 F_0F_1 と良く似ているが、その中心回転軸の構造に大きな違いがある [18-20]。先行研究で中心回転軸を欠いた $V_1 (A_3B_3)$ が V_0 と再構成することが示されていたことから、 V_0V_1 に特徴的な中心回転軸構造の結合力が弱いことが示唆されていた [21]。本研究では、再構成実験と FRET 実験とにより DF-C 間の結合力が弱いことを直接的に示した。真核生物の V_0V_1 は可逆的脱着による調節機構を持つことが知られていることから [30, 31]、この中心回転軸の弱い結合力は そのような V_0V_1 特異的な調節機構に関与している可能性がある。一方、 V_0 と V_1 の中心回転軸を介したエネルギー共役には、その弱い結合力は都合が悪いように思われる。弱い結合力でトルク伝達を行う仕組みを同定するために、中心回転軸変異体 $V_1 (V_{1-Eh-DF}, V_{1-Hs-DF})$ を作成した。また、その構造から C サブユニットの凹みに嵌り込む D サブユニットの短いヘリックス (SH) の存在が示唆されたことから、SH 変異体 $V_1 (V_{1-SH-Eh}, V_{1-\Delta SH})$ を作成した。これら中心回転軸変異体 V_1 の再構成能および ATP 合成、プロトン輸送活性を調べたところ、これらは全て V_0 と再構成したが、脱共役していた。他の変異体 V_1 に加え $V_{1-\Delta SH}$ が再構成し、脱共役したことは、SH は再構成に寄与しないが、 V_0 - V_1 間のエネルギー共役に重要であることを示す。C サブユニットの凹みに適切な SH が嵌ることが、 V_1 と V_0 間のエネルギー共役に重要であることが示唆された。

DF-C 間の結合力が弱いこと、またトルク伝達には D の末端にあるヘリックスと C サブユニットの凹みとの適合が重要であることが本研究で判明した。この結果をふまえ、取れやすいが回転力を伝えることができる V_0V_1 の中心回転軸でのトルク伝達のモデルを提唱する。DF が回転し C サブユニットへトルクを伝達する様子は、ドライバーでネジを締めるときの押しながら回す様子に似ている (図 3-12)。回転分子モーター V_0V_1 は、このような巧妙な仕組みによってトルクを伝達していると考えられる。

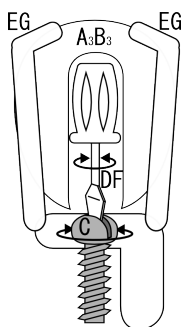


図 3-12 V_0V_1 のトルク伝達のモデル図。モデルに対応する V_0V_1 のサブユニット名を図中に示した。

3-5 方法

3-5-1 *T. thermophilus* の V_0V_1 、 V_0 及び CL_{12} の精製

T. thermophilus V_0V_1 の L サブユニットの C 末端に 3 つのヒスチジン残基を導入した菌体は、東京薬科大学 玉腰雅忠准教授から頂いた [36]。膜タンパク質を精製するため、まず *T. thermophilus* の形質膜を調製した。菌体 1 g 当たり 3 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加え、菌体を懸濁した。50 ml 懸濁液を氷上で 4 分、超音波処理により菌体を破碎した。35000 rpm で 60 分、4 °Cでの超遠心により、沈殿を形質膜として分離した。次に可溶性タンパク質を除去するため、形質膜を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で再懸濁し、35000 rpm で 60 分、4 °Cで超遠心を行った。この操作を 3 回繰り返した後、形質膜 1 g 当たり 3 ml の可溶化 buffer (界面活性剤として 10 % Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether, Wako を含む)を加え、静かに懸濁した。50 ml 懸濁液を氷上で 4 分、超音波処理を行った後、35000 rpm で 60 分、4 °Cで超遠心後、上清を可溶化画分とした。可溶化画分を回収して、Ni-NTA カラム (Ni-Sepharose fast flow, GE healthcare) に供し、界面活性剤を 0.03 % DDM (*n*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside, Enzo Life Sciences)へ置換した。得られたフラクションのうち V_0V_1 が存在するフラクションは Bradford 色素結合法で判断した。ピークフラクションは全て混合し、15 時間、4 °Cで透析することで脱塩した。その後純度を高めるため、液体クロマトグラフィー (ÄKTAprime, GE Healthcare) を用いて陰イオン交換カラム (ResourceQ 6 mL, GE healthcare) に供した。得られたフラクションのうち V_0 及び V_0V_1 が存在するフラクションは SDS-PAGE で判断した。 V_0 、 V_0V_1 が存在するフラクションは各々全て混合し、Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して濃縮後ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex HR200, GE Healthcare) に供した。フラクションを 0.25 ml ずつ分画し、SDS-PAGE で確認した。 V_0 、 CL_{12} 、及び V_0V_1 が存在するフラクションは各々全て混合し、Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して濃縮後、4 °Cで保存した。

3-5-2 FRET 実験

DF-C 間の会合を直接検出するため、FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を利用した [34]。FRET とは、励起状態のドナー分子から、近傍のアクセプター分子にエネルギーが無放射遷移する現象を指す。 V_1 の F サブユニットと V_0 の C サブユニットに PCR でシステインを導入し、(F/S54C、C/T105C)、

それぞれ Cy 色素標識マレイミドである Cy3 と Cy5 でラベル化した。ラベル化方法は 2-5 方法の章に記載した。ラベル化は SDS-PAGE で確認した。

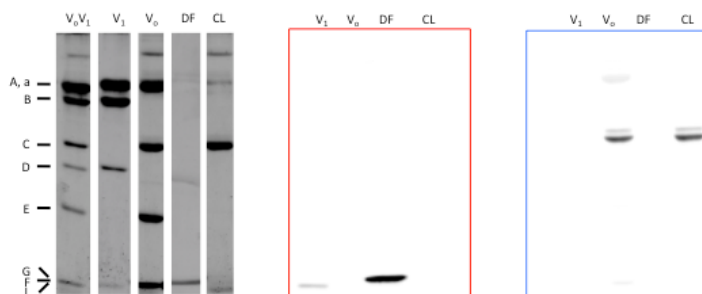


図 3-13 ラベル化確認のための SDS-PAGE。CBB 染色 (左)、Cy3 に対応する蛍光 (中央)、Cy5 に対応する蛍光(右)を示す。

ラベル化した V_1 成分と V_0 成分を用いて FRET 実験を行った。本実験では、 V_1 成分をドナー、 V_0 成分をアクセプターとした。1.2 ml の MD buffer に 2 nM のラベル化した V_1 成分を混合し、励起波長 532 nm で Cy3 を励起した。100 秒後、10 μ M (終濃度 10 nM) の V_0 成分を加え、Cy3 の蛍光波長 570 nm の蛍光をフルオロメーター (FP-6200, JASCO) で検出した。570 nm の蛍光強度の減少を V_1 成分と V_0 成分の再構成の指標とした。

以下使用した反応液の組成を示す。

MD buffer

20 mM MOPS pH7.5

150 mM NaCl

0.03% DDM

3-5-3 中心回転軸変異体 V_1

V_1 の中心回転軸を *E.hi* の V_1 ($E.hiV_1$) の DF と置換した変異体 V_1 ($V_{1-E.h-DF}$) と、*H.s* の V_1 ($H.sV_1$) の DF と置換した変異体 V_1 ($V_{1-H.s-DF}$) を作成した。また、C サブユニットとの界面に存在する D サブユニットのごく短いヘリックス (Short Helix; SH) を *E.hi* のものと置換した変異体 V_1 ($V_{1-SH-E.h}$) と SH 欠損変異体 V_1 ($V_{1-\Delta SH}$) を作成した。以下発現系の構造を示す (図 3-14)。D サブユニットのアミノ酸配列は図 3-6 に示した。

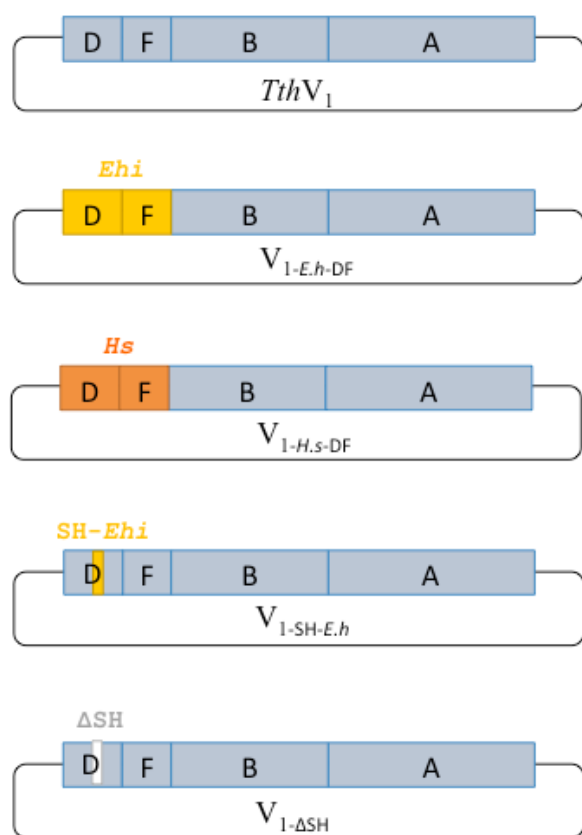


図 3-14 構築したプラスミドの模式図。全ての発現系は *T.thV₁* 発現系プラスミドをもとに構築した [29]。*T.th* 遺伝子は灰色、*E.hi* 遺伝子は黄色、*H.s* 遺伝子はオレンジ色、 $V_{1-\Delta SH}$ の欠損部分は白色で示した。

3-3-4 プロトンポンプ、チャネル活性測定

V_0V_1 のプロトンポンプ、チャネル活性測定は、曾我らの方法を参照した [35]。リポソームを擬似的な生体膜と捉え、 V_0V_1 を再構成し、そこに K^+ 拡散ポテンシャルにより $\Delta\psi$ を与えた。予めリポソームの内外に K^+ 濃度差を与え、 K^+ のイオノフォアであるバリノマイシンを加えることにより K^+ イオンを移動させる。 K^+ イオンの移動により生じた電位差を $\Delta\psi$ とした。 V_0V_1 による H^+ の移動は、pH センサー ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, Sigma) の蛍光により検出した。

V_0V_1 再構成リポソームの作成は曾我らの方法を参照した [35]。リン脂質 2 重層は Phosphatidylcholine (Type-II, Sigma) により作成した。まず、Phosphatidylcholine を R buffer に懸濁し、終濃度 40 mg/ml にした後、バスソニケーターで穏やかに再懸濁した。脂質溶液 250 μ l と 16 % OG (n-Octyl- β -D-glucosid) 250 μ l を混合し、リポソーム溶液が透明になるまで混合した。そこへ 75 μ g の V_0V_1 と KCl を加えた。プロトンポンプ活性測定のリポソームは終濃度 150 mM、チャネル活性測定のリポソームは終濃度 500 mM に KCl の濃度を調整した。次に界面活性剤を除去するため、予め buffer (40 mM Tricine/ pH8.0, adjusted with NaOH, 40 mM MES, 5 mM $MgCl_2$) で平衡化した Biobeads (Bio-beads SM-2, Bio-Rad) を 200 μ l を加えた。室温で 30 分間震盪した後、Biobeads (Bio-beads SM-2, Bio-Rad) を 300 μ l 追加し、2 時間室温で震盪した。Biobeads を回収しないよう、静かに上清を回収し、 V_0V_1 再構成リポソームとした。 V_0V_1 再構成リポソームは作成直後に使用した。

pH センサー ACMA の蛍光により、 V_0V_1 によるリポソーム内の酸性化を検出した。ACMA の蛍光検出には蛍光分光光度計 (FP-6200, JASCO) を使用した。以下 buffer、各々の反応液の組成を示す。

R buffer

40 mM Tricine / pH8.0, adjusted with NaOH
40 mM MES
5 mM $MgCl_2$

プロトンポンプ活性測定の反応系

40 mM Tricine / pH8.0, adjusted with NaOH
40 mM MES
5 mM $MgCl_2$
25 ng/ml ACMA
110 mM NaCl
40 mM KCl

プロトンチャネル活性測定の反応系

40 mM Tricine / pH8.0, adjusted with NaOH
40 mM MES

5 mM MgCl₂
25 ng/ml ACMA
500 mM NaCl

上記の反応系と V_oV₁ 再構成リポソーム 20 μl を体積 1.2 ml に調整し、1 cm × 1 cm のセルの中で混合した。ACMA の蛍光が安定していることを確認後、20 ng のバリノマイシンを加えることでプロトンチャネル活性を測定した。またバリノマイシンを加えた後、ATP を加えることでプロトンポンプ活性を測定した。膜電位は Nernst 式 $\Delta\psi = -2.3RT/F \ln ([K^+]_{out} / [K^+]_{in})$ から計算した。プロトンポンプ活性は $\Delta\psi = -33$ mV、プロトンチャネル活性は $\Delta\psi = -156$ mV の条件で測定した。

4 章 V_0V_1 の構造解析

4-1 概要

V_0V_1 の分子機構を解明するには、その構造情報が必要である。本研究では V_0V_1 及び V_1 の全体構造を明らかにするため、X 線結晶構造解析及び単粒子解析による構造解明を目指した。 V_0V_1 及び V_1 の結晶化を行い、結晶を得ることができたが、構造決定に必要な分解能の回折像を得られなかった。LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol, ref. [37]) は膜蛋白質に対する結合力が強く、臨界ミセル濃度 (CMC) 以下でも膜タンパク質の可溶化状態を保つことができる界面活性剤である。これにより V_0V_1 を可溶化したところ、従来よりも鮮明なクライオ電子顕微鏡像を得ることができた。この画像から得られた V_0V_1 の単粒子を解析することで、8.0 Å 分解能のモデルを得た。画像撮影および解析条件が決まったので、今後解析を進め、 V_0V_1 の原子分解能の構造を得る。

4-2 背景

V_0V_1 はその重要性にも関わらず、その調製が容易でないため、その機能や構造の理解は遅れていた。好熱菌 *Thermus thermophilus* (*T.th*) の V_0V_1 は真核生物の V_0V_1 のホモログであり、同じ基本構造からなる [32, 38]。精製しやすく、且つ安定であることから、*T.th* V_0V_1 は構造解析に適した材料である [3]。

V_0V_1 の全体構造に先行して、その部分構造の一部は既に決定されている。 A_3B_3 サブコンプレックス、中心回転軸を形成する V_0 -C サブユニット、 V_1 -F サブユニットの結晶構造が原子分解能で解明されており、またプロトン透過を担う V_0 の L-ring 複合体構造も電子線結晶構造解析により解明されている [18, 19, 23, 24]。一方、 V_0 部分を含む V_0V_1 全体の構造解明は重要課題として残されている [32]。近年低温電子顕微鏡 (クライオ EM) による単粒子解析において、電子直接検出カメラ (Direct Electron Detector, DED) の登場により、量子検出効率 (Detective Quantum Efficiency, DQE) が顕著に向上した [39]。この技術革新より、タンパク質の明瞭な像を観察出来るようになった。本研究では、 V_0V_1 及び V_1 の全体構造を明らかにするため、結晶作成による X 線結晶構造解析及びクライオ EM を用いた単粒子解析による構造解明を目指した。

4-3 結果

4-3-1 V_1 の結晶化実験

X 線結晶構造解析用の結晶を得るには、均一なタンパク質試料が必要である。 V_1 の A サブユニットにヒスチジntagを導入した発現系では、精製サンプルに A_3B_3 サブコンプレックスが混在する。 A_3B_3 と V_1 の分子量はほぼ同じであり、両者をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分離することはできない。似ているが、少し違うものが混在すると、結晶性を悪化させる可能性がある。そこで、 V_1 の D サブユニットにヒスチジンをパッチのように導入した発現系を構築した (図 4-1)。遊離の D サブユニットは、 V_1 からゲルろ過カラムクロマトグラフィーや密度勾配遠心により除くことができる。

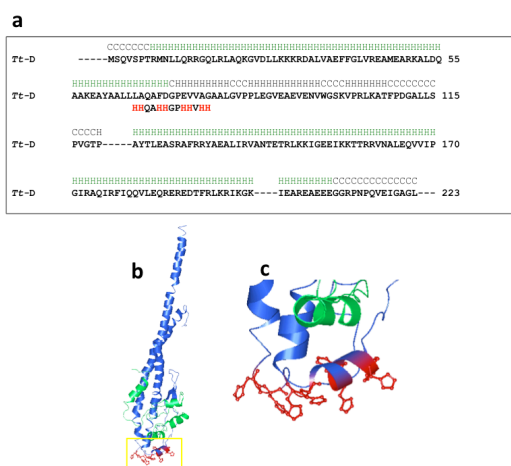


図 4-1 V_1 の D サブユニットのアミノ酸配列 (a) と DF の構造 (b, PDB ID; 3W3A)。a で C はループ、H はヘリックスを構成するアミノ酸残基を示す。b で黄色の四角で示した位置にヒスチジンをパッチのように所々に導入した。c にヒスチジンを導入した位置の拡大図を示す。

構築した V_1 の発現プラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus-RP 株 (Stratagene) で発現させ、Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、密度勾配遠心により精製した。精製純度は SDS-PAGE により確認した (図 4-2, 詳細は 4-5 方法の章を参照)。

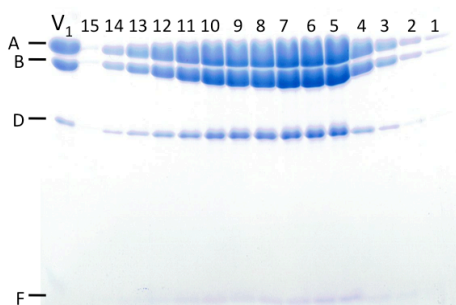


図 4-2 精製した V_1 の 15% SDS-PAGE。タンパク質は CBB で染色した。右から密度勾配遠心後のフラクション 1-15、マーカーの V_1 を示す。

タンパク濃度は BCA assay により決定した。10 mg/ml に調製した V_1 と結晶化溶液を 1:1 で混合し、20 °C で結晶化スクリーンを行ったところ、3 つの条件で結晶を得た。以下結晶化溶液組成と結晶写真を示す (図 4-3 V_1 - a-c)。放射光施設 (Diamond Light Source, UK, Spring-8, 理研播磨) で結晶に放射光を当てたが、回折点の分解能は最大で 6 Å 程度であった。結晶化やクライオ条件の最適化を試みているものの、構造決定に必要な分解能の回折像は未だ得られていない (図 4-3, 右)。

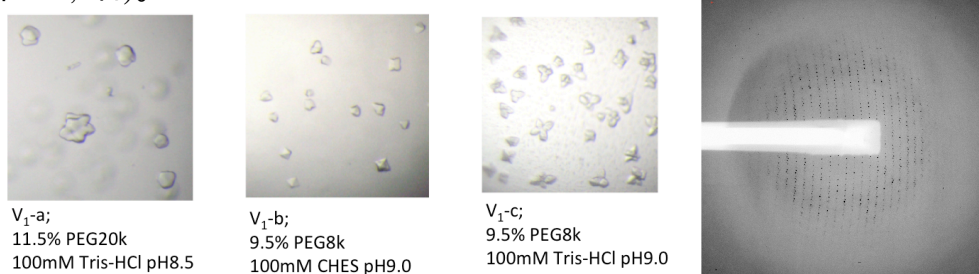
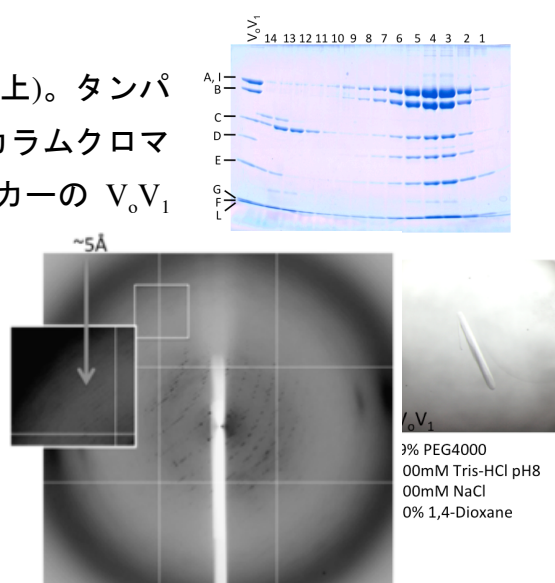


図 4-3 V_1 の結晶写真 (V_1 - a-c)。各々の結晶化条件を写真の下に示した。 V_1 の結晶から得られた回折像を右に示した。放射光施設でのデータ収集は共同研究者の岩田茂美氏が行った。写真は岩田氏のご好意によるものである。

4-3-2 V_0V_1 の結晶化実験

V_0V_1 は *T. th* の形質膜から精製した (3-5 方法の章を参照)。精製純度は SDS-PAGE により確認した。図 4-4 上に SDS-PAGE ゲルの写真を示す。 V_0V_1 タンパク濃度を 10 mg/ml に調製し、結晶化実験に供した。結晶化条件と結晶の写真を図 4-4 右下に示した。放射光施設で結晶に放射光を当てたが、構造決定に必要な分解能の回折像は得られていない (図 4-4, 左下)。

図 4-4 精製した V_0V_1 の 15 % SDS-PAGE (上)。タンパク質は CBB で染色した。右からゲルろ過カラムクロマトグラフィー後のフラクション 1-14, マーカーの V_0V_1 を示す。 V_0V_1 の結晶写真 (右下)。結晶化条件を写真の下に示した。 V_0V_1 の結晶から得られた回折像を左下に示した。放射光施設でのデータ収集は共同研究者の岩田茂美氏が行った。写真は岩田氏のご好意によるものである。



4-3-3 単粒子解析のための V_0V_1 の調製

V_0V_1 は *T. thermophilus* の形質膜から精製した（詳細は 3-5 方法の章を参照）。本実験では、DDM (*n*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside, Enzo Life Sciences) で可溶化した V_0V_1 (DDM- V_0V_1) と、LMNG で可溶化した V_0V_1 (LMNG- V_0V_1) を調製した（図 4-5, 詳細は 4-5 方法の章を参照）。LMNG は膜タンパク質に対して強く結合し、一度可溶化すると限界ミセル濃度以下にしても膜タンパク質の可溶化状態が維持されることが報告されている [37]。これにより、可溶化された V_0V_1 溶液中のミセルを除き、鮮明な電顕画像を得ることができる。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる精製後、LMNG- V_0V_1 が解離していないことを Native-PAGE により確認した。

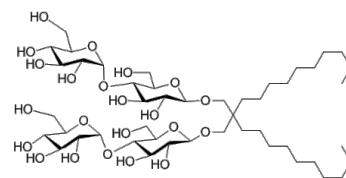


図 4-5 LMNG の化学式。

4-3-4 DDM- V_0V_1 および LMNG- V_0V_1 の画像

電子顕微鏡は電子直接検出カメラ CMOS (Falcon II) を搭載した Titan Kris (FEI, Eindhoven, Netherlands) を使用した。加速電圧 300 kV で画像を撮影し、EPU software (FEI, Eindhoven, Netherlands) により画像データを収集した。撮影条件の詳細は 4-5 方法の章に記載した。DDM- V_0V_1 および LMNG- V_0V_1 の画像を図 4-6 に示す。これらを比較すると、LMNG で可溶化した試料で単粒子がより鮮明なことがわかる。これは、LMNG 溶液中のミセルがほとんどないことによると考えられる。以後、LMNG- V_0V_1 を単粒子解析に用いた。

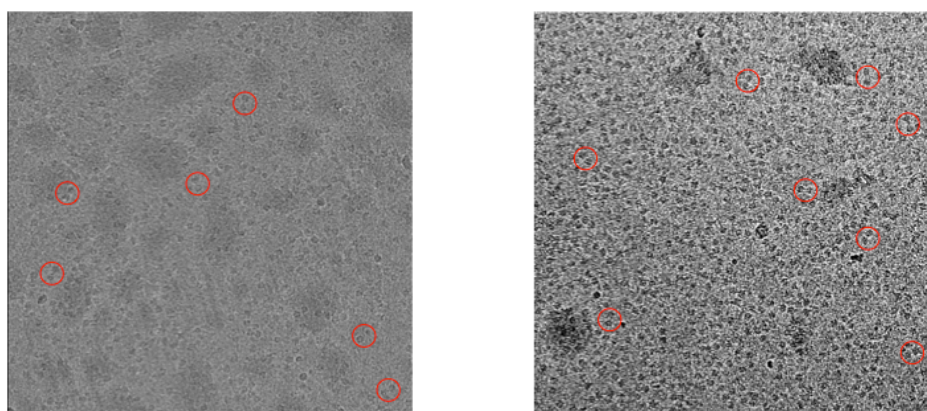


図 4-6 DDM- V_0V_1 および LMNG- V_0V_1 の電子顕微鏡画像。典型的な V_0V_1 単粒子を赤い円で示した。

4-3-5 LMNG- V_0V_1 の単粒子解析

LMNG- V_0V_1 の電子顕微鏡画像データを RELION により解析した [40]。ほとんどの V_0V_1 は横向きになっているが、これは氷の厚さが V_0V_1 の分子長とほぼ変わらないためである。得られた画像データから単粒子を手動抽出し、自動抽出のための 2D クラス平均像を作成した。この平均像をもとに全ての画像データから単粒子を自動抽出し、150 クラスに分類したところ、 V_0V_1 の基本的な形とともに細部の形が確認された。代表的な 2D クラス平均像を図 4-7 左に示す。自動抽出された 119343 個の単粒子のうち、 V_0V_1 であることが明らかな 49199 個の単粒子を 4 クラスに分類し、3D クラス平均像を作成した (図 4-7, 右)。どの平均像においても、I サブユニットや EG ペリフェラルストークの明瞭な電子密度が確認された。

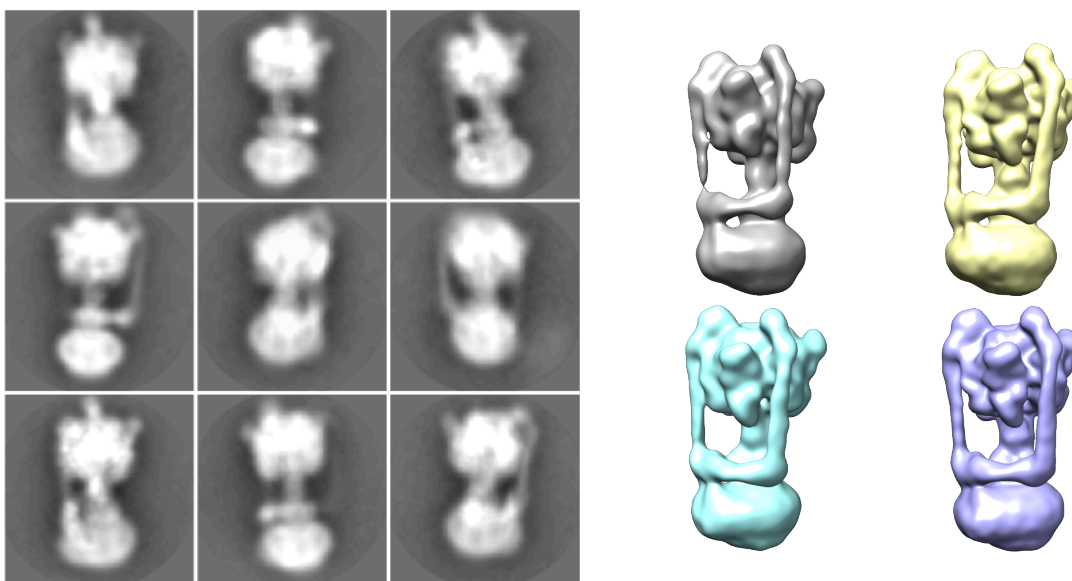


図 4-7 LMNG- V_0V_1 の代表的な 2D クラス (左) および 3D (右) 平均像。

全ての 3D 平均像に大きな構造の違いが見られなかったことから、これら全てのクラスに含まれる単粒子から 3D 再構成を行い、精密化を行ったところ、8.0 Å 分解能のモデルを得た (図 4-8, a, b)。分解能を示す Fourier shell correlation (FSC) カーブと、モデルに含まれる単粒子の角度分布図を示す (図 4-8, b, c)。モデルの局所分解能 (図 4-8, a, 上) から、 V_1 の部分分解能は、 V_0 の部分分解能より高いことがわかる。 V_1 の部分の電子密度に V_1 (PDB ID; 3W3A)、EG (PDB

ID; 3V6I)、C (PDB ID; 1R5Z) の結晶構造を当てはめた図を示す (図 4-8, a, 下)。

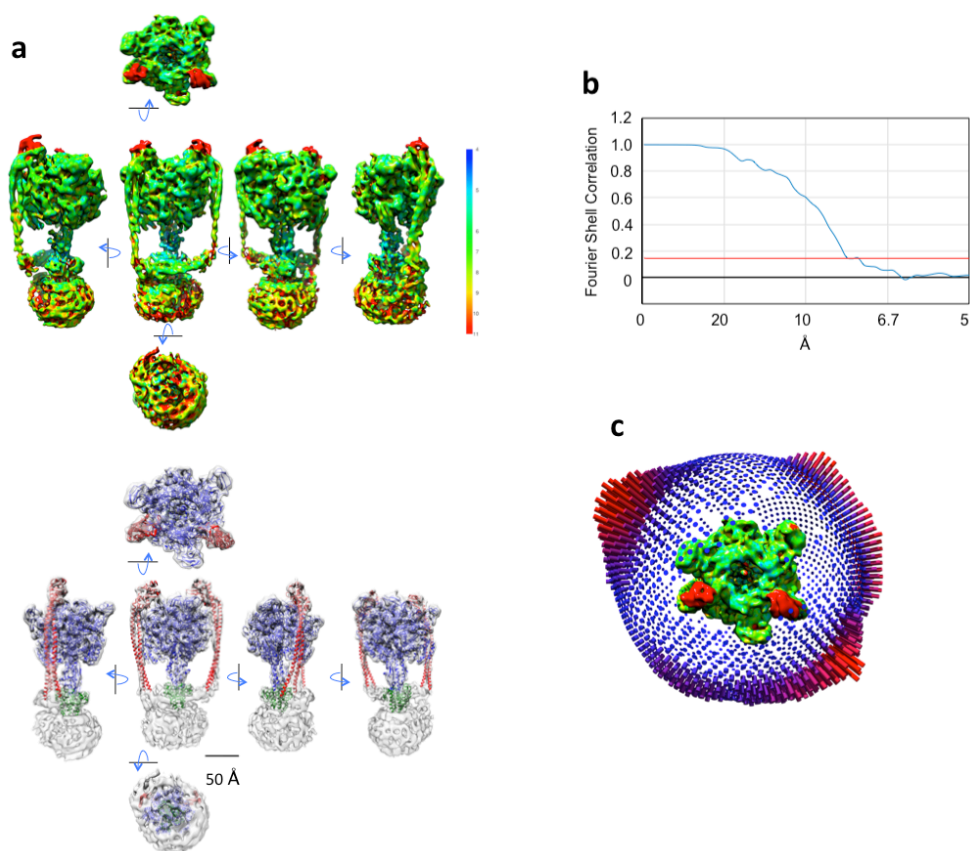


図 4-8 LMNG-V₀V₁ のモデルの局所分解能 (a, 上) と V₁ 部分の電子密度に V₁ V₁ (PDB ID; 3W3A)、EG (PDB ID; 3V6I)、C (PDB ID; 1R5Z) の結晶構造を当てはめた図 (a 下) を示す。分解能を示す Fourier shell correlation (FSC) カーブ (b) と、モデルに含まれる単粒子の角度分布図 (c) を示した。角度分布図のカラムは、モデルのオイラー角を示し、角度毎の単粒子数の分布を示す (c)。

4-4 考察

V_0V_1 及び V_1 の結晶を作成し、結晶に放射光を当てたが、構造決定に必要な分解能の回折像を得ることはできなかった。一方、 V_0V_1 の単粒子解析により、8.0 Å 分解能のモデルを得た (図 4-8)。

クライオ EM で膜タンパク質を観察する時、界面活性剤のミセルはタンパク質と区別が付きにくく、遊離の界面活性剤は画像のコントラストを下げる [41]。そのため、膜タンパク質をクライオ EM で観察するためには CMC の低い界面活性剤を使う必要がある。LMNG の膜タンパク質への高い結合能を利用し、LMNG 0.003 % の濃度条件で V_0V_1 サンプルを調製した。そのため、界面活性剤の影響がほぼない条件で、コントラストの高い V_0V_1 の画像を撮影することができたと考えられる。

今回、49199 個の単粒子画像から 8.0 Å 分解能の V_0V_1 の構造を決定した (図 4-8)。これは、2016 年に Rubinstein らのグループによって発表された *T. th* の V_0V_1 の構造と比して遜色ない構造である。Rubinstein らは、約 16 万個の単粒子から 6.4 Å 分解能の構造を得ている [32]。本研究では V_0V_1 を LMNG で可溶化することにより、効率的に鮮明な V_0V_1 の画像を得た。単粒子の数を増やすことにより、画像の S/N 比が上がり、原子分解能の V_0V_1 の構造を得られると考えている。

4-5 方法

4-5-1 V_1 の結晶化実験

以下の方法で調製し結晶化を行った。 V_1 の発現及び精製は既存の系を一部変更して精製を行った。以下変更した点を記載した。

V_1 はイオン交換カラムによる精製後 (2-5 方法の章を参照)、密度勾配遠心により精製した。密度勾配遠心による精製は、担体に分子を吸着させないため、複合体を均一に精製できる [37]。

ローターは HITACH スイングローター P40ST、遠心管 は 1.5*9.6 (直径*高さ cm) の HITACHI CENTRIFUGE WARE 40 (実容積 10.9 ml) を使用した。高濃度 Sucrose buffer (20mM MOPS pH7.5, 100mM NaCl, 40 % Sucrose) を遠心管の半分まで満たし、続いて低濃度 Sucrose buffer (20mM MOPS pH7.5, 100mM NaCl, 10 % Sucrose) をチューブの高さまで重層した。ふたをして BioComp Gradient Master (BioComp Instruments, Inc.) を使用してリニアな Sucrose の密度勾配を作成した。作成後、300 μ l まで濃縮したサンプルを遠心管の上部へアプライし、35000 rpm で 15 時間、4 °C で超遠心を行った。フラクションの分画は送液ポンプ (PERISTA PUMP, ATTO) を用いて行った。分子量と沈降速度の違いから、サブユニット組成が均一な V_1 を 800 μ l ずつ分画した。精製純度は SDS-PAGE で確認した。精製サンプルは Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して 1 ml に濃縮後、10 ml の M buffer で希釈、再濃縮することにより溶液中の Sucrose を除いた。以下に M buffer、TK buffer の組成を示す。

M buffer

20 mM MOPS pH7.5

150 mM NaCl

タンパク質濃度は BCA assay により決定した。サンプルは Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して 10 mg/ml に濃縮後、直ぐに結晶化に供した。結晶化スクリーニングは以下のスクリーニングキットを用いた。温度は 20 °C、蒸気拡散法により結晶化実験を行った。

Crystal Screen I/II (Hampton Research)

Index I /II (Hampton Research)

WizardI/II (Rigaku)
JBScreen 1-10 (Jena Bioscience)
JSCG CoreI-III (Molecular Dimensions)
MemGold (Molecular Dimensions)
MemGold2 (Molecular Dimensions)
MemMeso (Molecular Dimensions)
Memstart+Memsys. (Molecular Dimensions)

スクリーニングは結晶化ロボット (mosquito LCP, TTP LabTech) 使用して行った。0.1 μ l の結晶化 buffer と 0.1 μ l のサンプルを 98 ウェルのビオラモタンパク質結晶化プレート (アズワン) で混合し、マイクロプレートシールでシーリングした。観察は 20 °C で行った。

4-5-2 V_0V_1 の結晶化実験

V_0V_1 の精製方法は 3-5 方法の章に記載した。タンパク質濃度は BCA assay により決定した。Amicon Ultra Centrifugal Filters (100K) を使用して 10 mg/ml に濃縮後、直ぐに結晶化に供した。温度は 4 °C、蒸気拡散法により結晶化実験を行った。

4-5-3 LMNG- V_0V_1 の調製

単粒子解析のため LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol, ref. [37]) で可溶化した V_0V_1 を調製した。LMNG は 2 つの親水性頭部と 2 つの疎水性尾部を持つ非イオン性界面活性剤である (図 4-5)。CMC が非常に低いことから、界面活性剤がほぼない条件で膜タンパク質を観察することが出来る [37]。精製は既存の系 (3-5 方法の章を参照) を一部変更して精製を行った。

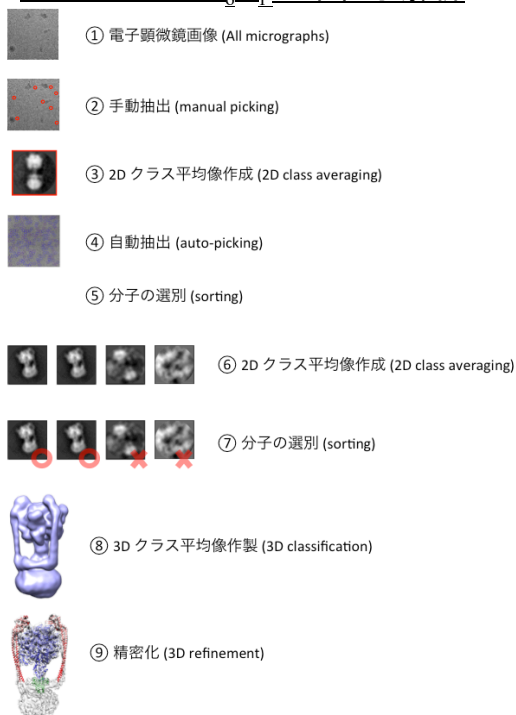
V_0V_1 はイオン交換カラム (6ml RESOURCEQ, Amersham) による精製後、担体容積の小さいイオン交換カラム (1ml RESOURCEQ, Amersham) を用いて V_0V_1 の界面活性剤を DDM から LMNG へ置換した。DDM で可溶化した V_0V_1 をイオン交換カラムへアプライした後、カラム洗浄時に 0.03% DDM を含む buffer から 0.03% LMNG を含む buffer へ置換した。120 分間、流速 0.5 ml/ml で置換することにより V_0V_1 の界面活性剤を LMNG へ置換した。溶出フラクションは SDS-PAGE により確認した。 V_0V_1 が存在するフラクションは全て濃縮し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Superdex HR200, GE Healthcare) により精製し

た。Native-PAGE により複合体形成を確認した。

4-5-4 クライオ EM による単粒子画像撮影

単粒子画像撮影は大阪大学超高压電顕センターで行った。クライオ EM で分子を観察するためには、まず氷包埋法により分子を基盤 (グリッド) 上に固定する必要がある。グリッドの作成は温度 4 °C、湿度 100 % の条件で行った。温度及び湿度調節のため、試料作成には Vitrobot (Vitrobot, FEI) を使用した。グリッドはカーボン支持膜付きグリッド Quantifoil R2/2 を使用した。予め親水化処理をしたグリッドを Vitrobot にセットした後、濃度 0.04 mg/ml の V_0V_1 サンプルを 3 μ l グリッドヘアプライした。余分な溶液を両面からろ紙で吸い取り、グリッドを直ちに液体エタンで瞬間凍結させ、直ちに観察に使用した。撮影は電子直接検出カメラ Falcon II を備えた Titan Kris (FEI, Eindhoven, Netherlands) を使用し、EPU software (FEI, Eindhoven, Netherlands) により画像データを収集した。

4-5-7 LMNG- V_0V_1 の単粒子解析

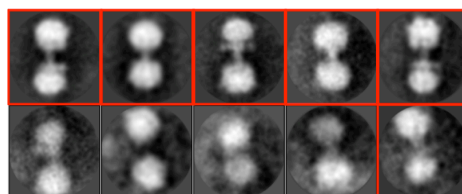


単粒子解析は解析ソフト RELION で行った [40]。手順の概略を図 4-9 に示す。

まず、自動抽出のための参照画像を作成するため、画像データから 983 個の単粒子を手動で抽出し、10 個のクラスに分類し、2D クラス平均像を作成した (図 4-10)。10 クラスの平均像のうち、平均像に含まれる単粒子数やコントラストを指標に V_0V_1 であることが明らかな 6 クラスを選んだ (図 4-10, 赤色の四角で示した)。

図 4-9 単粒子解析のフローチャート。

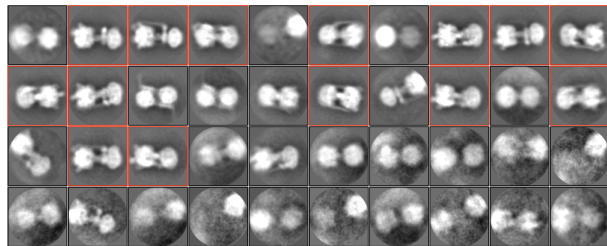
図 4-10 手動抽出した LMNG- V_0V_1 単粒子の 2D クラス平均像。 V_0V_1 であることが明



らかなクラスを赤色の四角で示す。

計 6 クラスの平均像を参照し、全ての画像データから参照に似た単粒子を RELION で自動抽出した。自動抽出された 119343 個の単粒子には、タンパク質でないノイズも混ざっているため、それらを選別するために 150 クラスに分類し 2D クラス平均像を作成した (図 4-7, 左、図 4-11)。平均像に含まれる単粒子数やコントラストを指標に V_0V_1 であることが明らかな 14 クラスを選んだ (図 4-11, 赤色の四角で示した)。

図 4-11 自動抽出した LMNG- V_0V_1 単粒子の 2D クラス平均像。代表的なクラス平均像を示す。 V_0V_1 であることが明らかなクラスを赤色の四角で示した。



これらのクラスに属する 49199 個の単粒子を使って 3D クラス平均像を作成した (図 4-7 右)。全ての 3D 平均像に大きな構造の違いが見られなかったことから、これら全てのクラスに含まれる単粒子を使って 3D 再構成を行った。参照像は Rubinstein らの構造 (EMD ID; EMD-5335) を使用した。モデルに対し精密化を行ったところ、8.0 Å 分解能のモデルを得た (図 4-8, a, b)。作成したモデルは全て解析ソフト UCSF Chimera で作成した [42]。

5 章 結語

大隅良典らのグループによって、酵母液胞膜の V 型 ATPase (V_0V_1) が発見されてからほぼ 30 年が経過した [43]。初期の頃は新規なプロトン輸送性 ATPase であると考えられていたが、研究の進展に伴い F 型 ATPase (F_0F_1) と良く似た分子であることがわかってきた。しかしながら、さらなる研究の進展により、 V_0V_1 と F_0F_1 の構造・機能に関する違いも明らかになった。酸性小胞の膜にある V_0V_1 は、小胞内の pH を調節している。従って V_0V_1 の活性は厳密に制御されているはずであり、両者の違いは V_0V_1 の持つ巧妙な調節機構に起因していると考えられる。一方、類縁の酵素が一部の原核生物の形質膜にも存在し、ATP 合成やイオンポンプとして機能する。これらの原核生物型の V_0V_1 は、真核生物の V_0V_1 に比べ単純なサブユニット組成からなり、比較的容易に大量で安定な酵素を得ることができる。そのため機能や構造の解析に適している。

本論文では好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の V_0V_1 を材料として V_0V_1 の調節機構および構造に関する 3 つの研究成果を述べた。2 章では、 V_0V_1 の活性を調節する機構の一つである ADP 阻害に関する研究成果を紹介した。ドメインスワップ実験により、ADP 阻害に対する感受性が、ヌクレオチド結合部位の性質の違いだけに依存しないこと、ヌクレオチド結合ドメインと C 末ドメインとの相互作用の様式が ADP 阻害に対する感受性に重要であること、 P_i に対する親和性が高くなると ADP 阻害感受性が低下することが示された。ADP 阻害の生理的役割について議論がわかれているが、その感受性に P_i の親和性が関わっていることを初めて実験的に示した。

3 章では V_1 部分と V_0 部分のトルク伝達の仕組みを議論した。 V_0V_1 に特徴的な中心回転軸構造の結合力が弱いことを示し、弱い結合力でトルク伝達を行う仕組みについて議論した。その結果、C サブユニットの凹みに嵌り込む D サブユニットの短いヘリックスが V_1 と V_0 間のエネルギー共役に重要であることが示唆された。

4 章では X 線結晶構造解析及びクライオ EM を用いた単粒子解析による構造解明に関する研究を紹介した。構造解析に適した結晶を作成することはできなかったが、LMNG で可溶化した V_0V_1 をクライオ EM で単粒子解析することにより、平均で 8.0 Å 分解能の V_0V_1 の全体構造を決定した。今後更に構造解析を進め、原子分解能に近い構造を決定し、 V_1 の P_i の結合様式と触媒部位の

構造、中心回転軸の構造、及び V_0 でのプロトン透過機構を明らかにしたいと考えている。また、より複雑な真核生物由来の V_0V_1 の構造を単粒子解析により決定するのが次のステップとなる。真核生物の V_0V_1 は、癌の浸潤や骨粗しょう症に関わっているという報告もある。原子分解能レベルで真核生物の V_0V_1 の全体構造が明らかになれば、 V_0V_1 を標的としたリード化合物の合成にも繋がる。

Peter Mitchell が 1961 年に化学浸透圧説を提唱してから半世紀以上経つ。回転触媒機構によるプロトン透過機構の解明は、生体エネルギー分野に残された最大の課題となった。本研究では、クライオ EM を用いた単粒子解析による V_0V_1 の構造決定の道筋をつけることができた。高分解能の V_0V_1 の構造により、 V_0 部分のプロトン透過に関わる領域の構造が明らかになる。構造情報に基づいた機能解析実験と組み合わせることにより、回転触媒機構によるプロトン透過機構が明らかになり、生体エネルギー分野にとって大きな節目となる成果になるだろう。

参考文献

1. Forgac M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(11), 917-929
2. Nishi T, Forgac M (2002) The vacuolar H⁺-ATPases- nature's versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(2), 94-103
3. Yokoyama K, Imamura H (2005) Rotation, structure, and classification of prokaryotic V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**(6), 405-410
4. Yokoyama K, Oshima T, Yoshida M (1990) *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**(35), 21946-21950
5. Yokoyama K, Akabane Y, Ishii N, Yoshida M (1994) Isolation of prokaryotic V_oV₁-ATPase from a thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **269**(16), 12248-12253
6. Imamura H, et al. (2003) Evidence for rotation of V₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(5), 2312-2315
7. Yokoyama K et al. (2003) Rotation of the proteolipid ring in the V₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**(27), 24255-24258
8. Gogarten JP et al. (1989) D Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**(17), 6661-6665
9. Tsutsumi S et al. (1991) Molecular cloning of genes encoding major two subunits of a eubacterial V-type ATPase from *Thermus thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* **1098**(1), 13-20
10. Noji H et al. (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**(6622), 299-302
11. Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T (2001) ATP synthase –a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Biol.* **2**(9), 669-677
12. Kakinuma Y, Igarashi K. (1994) Purification and characterization of the catalytic moiety of vacuolar-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *J Biochem.* **116**(6) 1302-1308
13. Kakinuma Y, Yamato I, T Murata. (1999) Structure and function of vacuolar Na⁺-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(1) 7-14
14. Yokoyama K et al. (2000) V-Type H⁺-ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* **275**(18) 13955-13961

15. Yokoyama K et al. (1998) V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesis ATP. *J. Biol. Chem.* **273**(32), 20504-20510
16. Kobayashi, H. (1985) A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**(1), 72-7
17. Feniouk B, Suzuki T, and Yoshida M (2007) Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit epsilon in bacterial ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **282**(1), 764-772
18. Iwata M et al. (2004) Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(1), 59-64.
19. Makyio, H et al. (2005) Structure of a central stalk subunit F of prokaryotic V-type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **24**(22) 3974-3983.
20. Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**(5445), 1700-1705
21. Kishikawa J, Yokoyama K (2012) Reconstitution of vacuolar-type rotary H⁺-ATPases/synthase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **287**(29), 24597-24603
22. Kakinuma Y, Igarashi K. (1995) Electrogenic Na⁺ transport by *Enterococcus hirae* Na⁽⁺⁾-ATPase. *FEBS Lett.* **359**(2-3) 255-158
23. Maher, M.J., et al., Crystal structure of A₃B₃ complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* (2009) **28**(23) 3771-3779
24. Toei M. et al. (2007) Dodecamer rotor ring defines H⁺/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(51) 20256-20261
25. Zhou JM, Xue ZX, Du ZY, Melese T, Boyer PD. (1988) Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase. *Biochemistry.* **27**(14), 5129-5135
26. Nakano M et al. (2008) ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **283**(30), 20789-20896
27. Nagamatsu Y, Takeda K, Kuranaga T, Numoto N, Miki K (2013) Origin of Asymmetry at the Intersubunit Interfaces of V₁-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **425**(15), 2699-2708
28. Arai S et al. (2013) Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature.* **493**(7434), 703-707

29. Imamura H, Ikeda C, Yoshida M, Yokoyama K. (2004) The F subunit of *Thermus thermophilus* V₁-ATPase promotes ATPase activity but is not necessary for rotation. *J. Biol. Chem.* **279**(17), 18085-18090
30. Kane P. (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbio. Bio. Rev.* **70**(1), 177-191
31. Parra J, Kane P. (1996) Wild-type and mutant vacuolar membranes support pH-dependent reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **271**(32) 19592-19598
32. Schep DG, Zhao J, Rubinstein JL (2016) Models for the a subunits of the *Thermus thermophilus* V/A-ATPase and *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase enzymes by cryo-EM and evolutionary covariance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**(12), 3245-3250
33. Saijo S, et al. (2011) Crystal structure of the central axis DF complex of the prokaryotic V-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(50), 19955-19960
34. Imamura H, Funamoto S, Yoshida M, 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. Bio. Chem.* **281**(50), 38582-38591
35. Soga N, Kinoshita Jr. K, Yoshida M, Suzuki T. (2012) Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J. Biol. Chem.* **287**(12), 9633-9639
36. Tamakoshi, M et al. (1997) A new *Thermus*-*Escherichia* coil shuttle integration vector system. *J. Bacteriol.* **179**(15), 4811-4814
37. Hauer, F et al. (2015) GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure*, (2015) **23**(9), 1769-1775
38. Zhao J, Benlekbir S, Rubinstein JL. (2015) Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature.* **521**(7751), 241-245
39. Li X et al. (2013) Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle Cryo-EM. *Nat. Methods.* **10**(6), 584-590
40. Scheres SH. (2012) RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM determination. *J. Struct. Biol.* **180**(3), 519-530
41. Rubinstein JL. (2007) Structural analysis of membrane protein complexes by single particle electron microscopy. *Methods.* **41**(4), 409-416
42. Goddard TD et al. (2007) Visualizing density maps with UCSF Chimera. *J. Struct. Biol.* **157**(1): 281-287

43. Ohkuma S. (1985) Cellular responses and the H⁺ pump in the vacuolar system. *Gan To Kagaku Ryoho*. **12**(3): 653-659

謝辞

本研究を行うにあたり終止ご指導下さいました京都産業大学総合生命科学部生命システム学科 横山謙教授、岸川淳一研究助教に心より感謝致します。

本研究の進行にあたり事務処理をして下さった京都産業大学横山研究室 横山朋子秘書に深く感謝致します。好熱菌試料を快く提供して下さい下さった東京薬科大学 玉腰雅忠准教授、本研究成果に対し指導・助言を下さり、貴重な実験結果を示して頂いた大阪大学超高压電子顕微鏡センター 光岡薫教授、大阪医科大学物理学研究室 古池晶助教、京都大学大学院医学研究科 島村達郎特定講師、宇宙航空研究開発機構 (JAXA) 岩田茂美博士に心より感謝の意を記します。また試料調製に適した界面活性剤を快く提供して下さい下さった兵庫県立大学理学部大学院物質理学研究科 Christoph Gerle 特任准教授に心より感謝致します。そして本研究に貢献して頂いた京都産業大学横山研究室の諸氏に感謝致します。どうもありがとうございました。

最後に応援して下さい下さった親族の皆様、特に両親に心より感謝致します。

2016年5月 中西 温子