

液胞型 ATPase (V_0V_1) の構造解析

平成 28 年 4 月 18 日受付

横 山 謙 *1
中 西 温 子 *2
岸 川 淳 一 *1

要 旨

液胞型 ATPase V_0V_1 およびその可溶性部分 V_1 の構造決定を試みた。 V_0V_1 全体および V_1 部分の X 線結晶構造解析用の結晶を作成した。高分解能の反射データを得るために、現在結晶を大きくするなどの条件検討を行っている。平行して凍結電子顕微鏡 (クライオ EM) を用いた V_1 および V_0V_1 の単粒子解析を行った。 V_1 に関しては、良好な単粒子像が得られ、構造解析ソフト relion で解析した結果、 $\sim 9 \text{ \AA}$ 分解能の三次元構造を得た。また、界面活性剤を検討することで、解析に適した V_0V_1 の画像が得られた。十分な枚数の画像を撮影し、いまだ明らかにされていない V_0V_1 の原子分解能構造を決定する。

キーワード：液胞型 ATPase, 構造解析, V-ATPase, V_0V_1 , 電子顕微鏡

はじめに

液胞型 ATPase (V_0V_1) は、細胞内のリソゾームなどの空胞系の膜に存在するプロトン ATPase である。水素イオン (プロトン) を空胞内に送り込むことで内部を酸性化し、タンパク質の修飾や、分解、エンドサイトーシス、などを支えている [1]。 V_0V_1 は、ミトコンドリアや細菌の細胞に存在する ATP 合成酵素 F_0F_1 と進化的に親戚で構造も共通性が高く、両者は同様の回転触媒機構で機能すると考えられる [2]。すなわち、可溶性の V_1 部分で起こる ATP の分解・合成と、膜内在性の V_0 部分でのプロトンの膜横断的な移動が、中心回転軸の回転によりエネルギー共役する (図 1)。

V_0V_1 を真核生物の空胞膜から調製することは容易ではない。そのため、その分子機構の理解や構造解析は遅れていたが、我々は、原核生物から V_0V_1 を初めて単離し [3]、その V_0V_1 を材料として V_0V_1 が回転することを初めて証明した [2]。構造面では、 A_3B_3 サブ複合体 [4]、中心回転軸を形成する V_0-C [5]、 V_1-F サブユニットの結晶構造 [6] を原子分解能で解明し、プロトン透過を担う V_0 部分の L-ring 複合体の構造を電子線結晶学で明らかにした [7]。一方、 V_0 部分を含む V_0V_1 全体の構造、および V_1 部分の原子分解能構造は重要課題として残されている。我々は、ここ数年、 V_0V_1 お

*1 京都産業大学総合生命科学部

*2 京都産業大学リエゾンオフィス

よび V_1 の構造解析に取り組んできた。その結果、 V_0V_1 、 V_1 とも X 線構造解析に必要な結晶の作成には成功した。しかしながら現状の結晶から構造決定に必要な分解能の回折像が得られていない。そのため現在、結晶をより大きくする、違う結晶形にする、等の条件検討を行っている。

凍結電子顕微鏡 (クライオ EM) を用いた単粒子解析による V_0V_1 および V_1 の構造解析も進めている。電子直接検出機の登場により、クライオ EM でタンパク質分子の明瞭な像が撮影できるようになった。この革命的な技術により、多くのタンパク質の構造が Nature Science 等の一流科学雑誌に掲載されるようになった。大阪大学超高压電子顕微鏡センターにあるクライオ EM を用い、そこで撮影された V_0V_1 および V_1 の画像を解析することでそれぞれの構造を明らかにする。現在、 V_1 に関しては $\sim 9 \text{ \AA}$ 分解能の単粒子平均像が得られている。 V_0V_1 についても溶液条件を変えることで明瞭な分子像を撮影できるようになった。この分野の長年の課題であった V_0V_1 全体の構造決定の道筋がついた段階に到達した。

材料と方法

V_0V_1 は好熱菌 *Thermus thermophilus* の細胞膜から界面活性剤で可溶化し精製したものを使用する。精製を容易にするために V_0V_1 の膜内在性サブユニットにヒスチジン残基からなるヒスタグを遺伝子操作で導入した。この V_1 を構成する 4 種類のサブユニット遺伝子をもつ発現ベクターを大腸菌に入れた。この発現系で V_1 を発現させた。 V_0V_1 、 V_1 ともアフィニティーカラム、イオン交換、密度勾配遠心で精製し、純度が 99% 以上の標品を結晶化、もしくは単粒子解析に使用した。デイノコッカスやクロストリジウム属の細菌から得られた V_1 も構造解析実験に供した。結晶化は、市販の結晶化スクリーニングキットを用い、1 検体につき約 1000 条件の結晶化スクリーニングを行った。結晶が得られた条件の再現性をとり、沈殿剤の濃度、pH、温度等を変化させることで結晶の改善を試みた。

単粒子解析は、大阪大学超高压電子顕微鏡センターの光岡薫教授と共同で行っている。連続撮影可能なクライオ EM Titan で一回あたり数万個の単粒子画像を撮影する。クラス平均画像、三次元平均画像の作成は、3.1 GHz の CPU を 40 搭載したワークステーションで relion を動かしこの解析を行った。

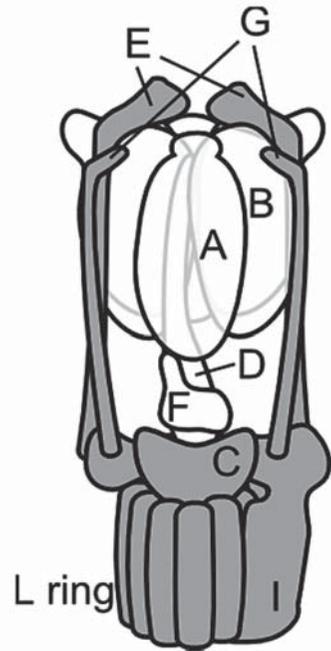


図 1. V_0V_1 の構造。白色で示されている領域が V_1 に相当。

結果と考察

1. V_0V_1 および V_1 の結晶化

T.thermophilus V_1 では、10 条件以上で結晶が出た (図 2)。形をみると大体六角形と同じ空間群の結晶とおもわれる。沈殿剤の濃度、pH を変える、ヌクレオチド等を加えることで結晶性の改善を試みたが、大きな結晶は得られていない。サイズを倍以上にしないと放射光ビームをあてることができないので、引き続き結晶化条件の改善を行う。

V_0V_1 に関しては、全サブユニットを含む結晶の作成に成功し、放射光施設で最大分解能 4.7\AA のデータ・セットを得ている。

原子分解能の結晶構造モデルを組むために様々な改良を加え、 3\AA より高い分解能のデータ・セットを得る必要がある。結晶の改善法として、結晶中の水含量を減らす (デハイドレーション)、結晶核をタンパク質溶液に入れることで結晶を大きくする、もしくは結晶ができる条件を増やす (マクロシーディング、ミクロシーディング)、微重力下で結晶を作成する、等がある。引き続き結晶化条件の改善を試みる。

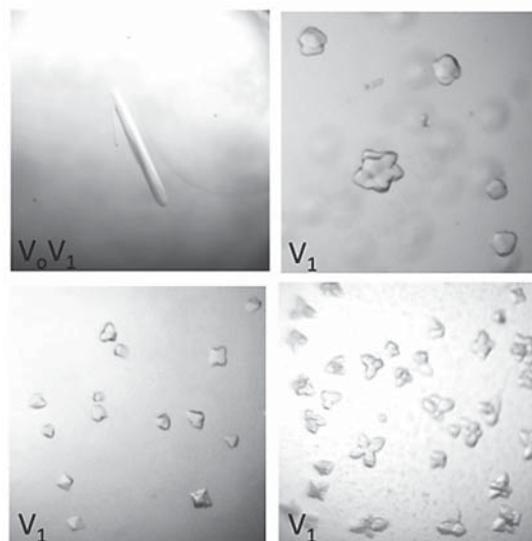


図 2. V_0V_1 と V_1 の結晶写真

2. クライオ EM による V_1 の単粒子解析

大阪大学高圧電顕センターにあるクライオ EM Titan で高純度の V_1 を観察した。以下の画像解析の操作は解析ソフト relion で行った。122 枚の画像から 20539 の V_1 粒子を抽出した。次にこの粒子を 100 クラスの設定でクラス平均像に分けたところ、上向きと横向きと思われる 20 の V_1 クラス平均画像が得られた (図 3)。上向きの平均画像では、ヘリクスなどの 2 次構造が見られ、 6\AA 以下の分解能があると思われる。これらのクラスに含まれる 11639 の粒子から三次元のクラス平均像を作成した。2 種類の三次元クラス平均像のうち、ひとつは 9.3\AA の分解能であった。 V_1 は A, B サブユニットが交互にならんだ A_3B_3 と中心にある回転軸 DF から構成される。今回の構造では AB 単位の疑似 3 回対称性が区別できた。また、分子中心の空洞に回転軸である DF が確認できた。解析する粒子数を増やせば、原子分解能で構造を決めることが可能であろう。

3. クライオ EM による V_0V_1 の単粒子解析

界面活性剤である DDM で可溶化した V_0V_1 を Titan で観察した。溶液に含まれる界面活性剤から生成するミセルは、画像の質をさげるため、 V_0V_1 像は V_1 とくらべコントラストが悪くなっている。

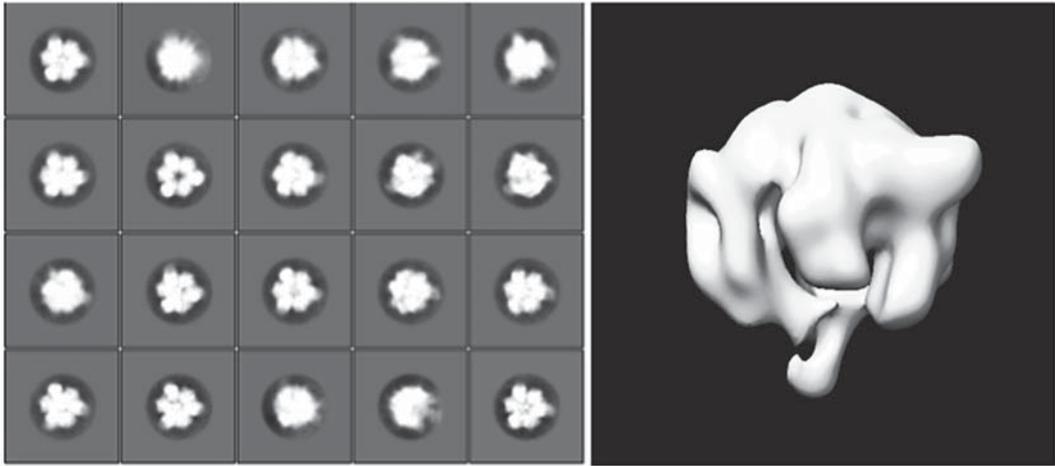


図 3. V_1 の 2-D クラス平均像 (左) と 3-D 平均像 (右)

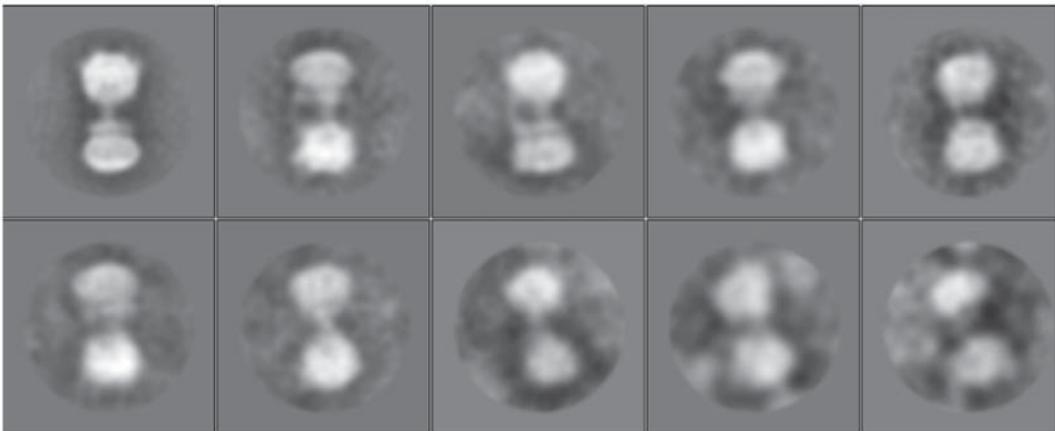


図 4. V_0V_1 のクラス平均像。外周ストークが見える。

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 の分子長とほとんど変わらないためである。 V_1 の時と同様に、 V_0V_1 粒子像を relion で抽出し、20 のクラス平均像を得た。 V_0V_1 の特徴である 2 本の外周ストークが見える像をふくめ、 V_0V_1 と判断できるクラス平均像が 10 得られた (図 4)。このクラスを構成する 1233 の粒子から三次元クラス平均像を計算したが、 $\sim 15 \text{ \AA}$ 分解能程度の平均像が得られた。分解能が上がらなかった原因として、画像自体のコントラストの弱さが考えられる。最近、LMNG という疎水部に対する結合力が高い界面活性剤が開発された。LMNG を使うことで LMNG の濃度を限界ミセル濃度以下まで低くし、ミセルフリーの溶液にすることが可能である。現在、LMNG で可溶化した V_0V_1 のクライオ EM 像の撮影を行っており、コントラストの高い粒子像を得ている。この像を解析することで、原子分解能に近い V_0V_1 の構造が得られることが期

待される。

おわりに

F₁ の結晶構造説明 [8] で 1997 年にノーベル賞を受賞した John Walker は、以来 20 年間、ひたすら ATP 合成酵素 F₀F₁ の全体構造説明に取り組んできたが、いまだ成功していない。そのため F₀F₁ におけるプロトンの透過機構、および回転とプロトン輸送との (両方向の) 共役機構は未説明である。

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説明は、生体エネルギー分野における残された最大の課題となった。本研究で用いられる好熱菌由来の V₀V₁ は、生産性の高さ、酵素自体の安定性から構造・機能解析に適した試料であり、幸いにもホロ酵素の結晶も得られている。また、近年構造生物学の世界に革命をもたらしたクライオ EM と電子直接検出器による単粒子解析は、V₀V₁ のような 600 kDa をこえる超分子複合体の構造解析に対して有効である。界面活性剤を工夫することで、V₀V₁ の明瞭な撮影像が得られるようになった。本研究により、V₀V₁ の高分解能構造が得られれば、V₀ 部分でのプロトン透過に関わる領域の構造が明らかになる。さらに単粒子解析により、様々な中間体構造の解析が可能になれば、反応機構の全容が明らかになるだろう。構造情報に基づいた機能解析実験と組み合わせることで、V₀V₁ のプロトン輸送機構が明らかになれば、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。

参考文献

1. Forgac, M., Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2007). **8** (11): p. 917-29.
2. Imamura, H., et al., Evidence for rotation of V₁-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2003) **100** (5): p. 2312-5.
3. Yokoyama, K., et al., Isolation of prokaryotic V₀V₁-ATPase from a thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*, 1994. **269** (16): p. 12248-53.
4. Maher, M.J., et al., Crystal structure of A3B3 complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J*, (2009) **28** (23): p. 3771-9.
5. Iwata, M., et al., Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004) **101** (1): p. 59-64.
6. Makyio, H., et al., Structure of a central stalk subunit F of prokaryotic V-type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J* (2005) **24** (22): p. 3974-83.
7. Toei, M., et al., Dodecamer rotor ring defines H⁺/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2007) **104** (51): p. 20256-61.
8. Abrahams, J.P., et al., Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, (1994) **370** (6491): p. 621-8.

Structural Studies of the Vacuolar type ATPase

Ken YOKOYAMA
Atsuko NAKANISHI
Jun-ichi KISHIKAWA

Abstract

Vacuolar type ATPases (V_0V_1) are widely distributed in organisms and function as a proton pump responsible for acidification of intracellular compartments such as a lysosome, Golgi apparatus, endosome so on. In this study we have attempted to determine the structure of V_0V_1 and V_1 moiety. We obtained crystal of both the V_0V_1 and V_1 in several conditions. We are now carrying out the optimization of these crystal conditions. In addition, we observed the molecules of V_0V_1 and V_1 by cryo electron microscopy. Single particle analysis of the V_1 revealed 3-D averaged image at ~ 9 Å resolution. Also we obtained 2-D averaged images of V_0V_1 in which two stalks structure was clearly observed. These structural analysis of the V_0V_1 and V_1 would shed light on the molecular mechanism of V-ATPases in near future.

Keywords : V-ATPase, Rotary molecular motor, Structural study, Cryo-electron micrography, V_0V_1