

クライオ電子顕微鏡による液胞型 ATPase (V_0V_1) の構造解析

平成 29 年 4 月 12 日受付

岸 川 淳 一*
中 西 温 子*
横 山 謙*

要 旨

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により液胞型 ATPase (V_0V_1) の全体構造の解明を試みた。 V_0V_1 を含む試料溶液を観察用グリッド上に添加し、急速凍結することで、電子線が透過できるクライオグリッドを作成した。界面活性剤の濃度を減らすことで良好なグリッドが作成でき、そこから数千枚の電子顕微鏡画像を得ることができた。構造解析ソフトにより、単粒子画像をピックアップし、平均化することで三次元再構成による立体構造の再構成が可能になった。解析を進めることで、 V_0V_1 の立体構造を決定し、その分子機構を明らかにする道筋が分かった。

キーワード：液胞型 ATPase, 構造解析, クライオ電子顕微鏡, 単粒子解析, 回転分子モーター

はじめに

液胞型 ATPase (V_0V_1) は、リソゾームやゴルジ体、エンドソームなどのオルガネラの膜に存在するプロトンポンプである。ATP の加水分解エネルギーを利用して、水素イオン（プロトン）をオルガネラ内に輸送することで、内部を酸性化する。この酸性化により、オルガネラ内でのタンパク質の修飾や、分解、エンドサイトーシス、などが起こる [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 と進化的に同一のファミリーに属し、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 [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。

真核生物の V_0V_1 が存在する空胞膜の調製が容易ではないため、高純度の V_0V_1 を調製することが難しい。そのため、その分子機構の理解や構造解析は遅れていた。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 が回転することを最初に証明した [2]。構造面では、触媒中心を構成する 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た。また、プロトン透過を担う V_0 部分の L-ring 複合体の構造 [7]

* 京都産業大学総合生命科学部

を電子線結晶学で明らかにした (図 1)。一方、 V_0 部分を含む V_0V_1 全体の構造の原子分解能構造は重要課題として残されている。

低温電子顕微鏡 (クライオ EM) による単粒子解析は、タンパク質の構造を決定する有力な方法の 1 つである。しかし、それから得られる構造情報の分解能は、X 線結晶構造解析で得られる構造情報と比べるとやや劣るケースがほとんどであった。しかし、最近開発された電子直接検出器の登場により、タンパク質分子の明瞭な像がクライオ EM で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。

我々は、長年にわたり、結晶作成による V_0V_1 の構造解析に取り組んできたが、構造解析に適した結晶が得られず、その構造決定に至らなかった。そこで、結晶構造解析のかわりに、クライオ EM で撮影された V_0V_1 の単粒子画像を解析することでその構造を明らかにすることを試みた。現在、界面活性剤を含む溶液条件を検討することで V_0V_1 の明瞭な分子像を撮影できるようになった。画像解析ソフトにより、 V_0V_1 の立体構造を再構成することに成功した。

材料と方法

好熱菌 *Thermus thermophilus* の細胞膜に存在する 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。界面活性剤である n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM) により、 V_0V_1 を膜から可溶化する。可溶化された V_0V_1 を DDM 存在下でアフィニティーカラムにより精製した。さらに、イオン交換、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製し、高純度標品を得た。界面活性剤は、 V_0V_1 のような膜タンパク質の疎水性部を覆い、可溶化させるが、遊離のミセルやモノマーは、タンパク質溶液の混在物としてクライオ EM 画像の S/N を低下させる。クライオグリッドの氷の厚さも画像の S/N に影響を与えるが、界面活性剤は水の表面張力を微妙に変え、そのため氷厚の調整が困難であった。LMNG (lauryl maltose -neopentyl glycol) は、膜タンパク質の疎水性

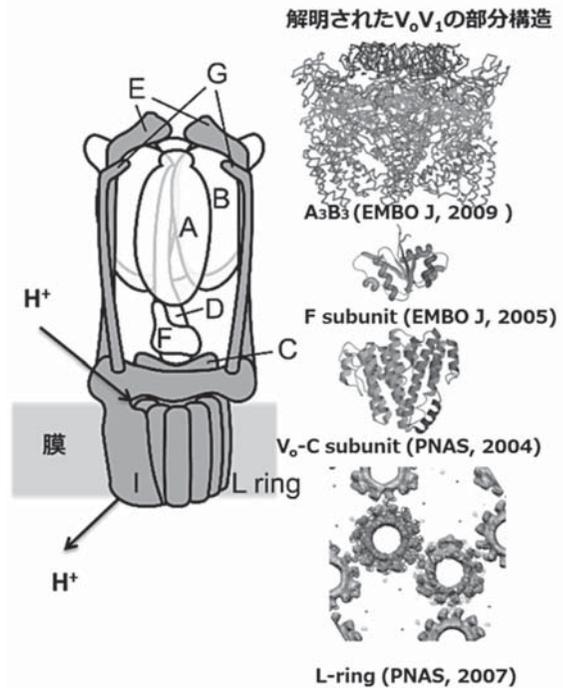


図 1. 左: V_0V_1 の模式図。 V_1 (白, A_3B_3DF), V_0 (灰色, $IE_2G_2CL_{12}$)。 $DFCL_{12}$ が中心回転軸として、 $A_3B_3E_2G_2I$ に対して回転する。 右: 解明された V_0V_1 の部分構造

部分に強く吸着することで、臨界ミセル濃度以下でも膜タンパク質を可溶化できる (図2)。界面活性剤のミセルをほとんど含まない条件で、かつ分子長程度の氷厚の領域を含むクライオグリッドを作成し、クライオ EM 画像を撮影した。この時、分子同士が重ならず、且つ画像あたりの単粒子の数が十分あるように試料の濃度を調節した。電子を直接検出できる CMOS カメラ (Falcon II) を搭載した自動データ収集を容易に行えるクライオ EM (Titan Krios) により、クライオ EM 画像を数千枚撮影する。撮影されたクライオ EM 画像を CTF 補正、ドリフト補正した上で、画像解析する。

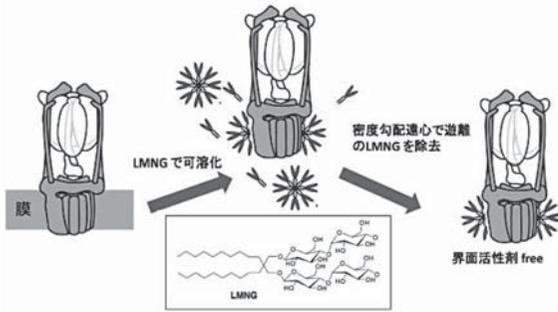


図2. LMNG による可溶化。LMNG は疎水部に対する結合力が強く、臨界ミセル濃度以下でも膜タンパク質を可溶化する。

自動データ収集を容易に行えるクライオ EM (Titan Krios) により、クライオ EM 画像を数千枚撮影する。撮影されたクライオ EM 画像を CTF 補正、ドリフト補正した上で、画像解析する。

クライオ EM を用いた単粒子解析 (single particle analysis: SPA) による立体構造決定のフローチャートを図3に示す。ドリフト補正されたクライオ EM 画像から、画像解析プログラム

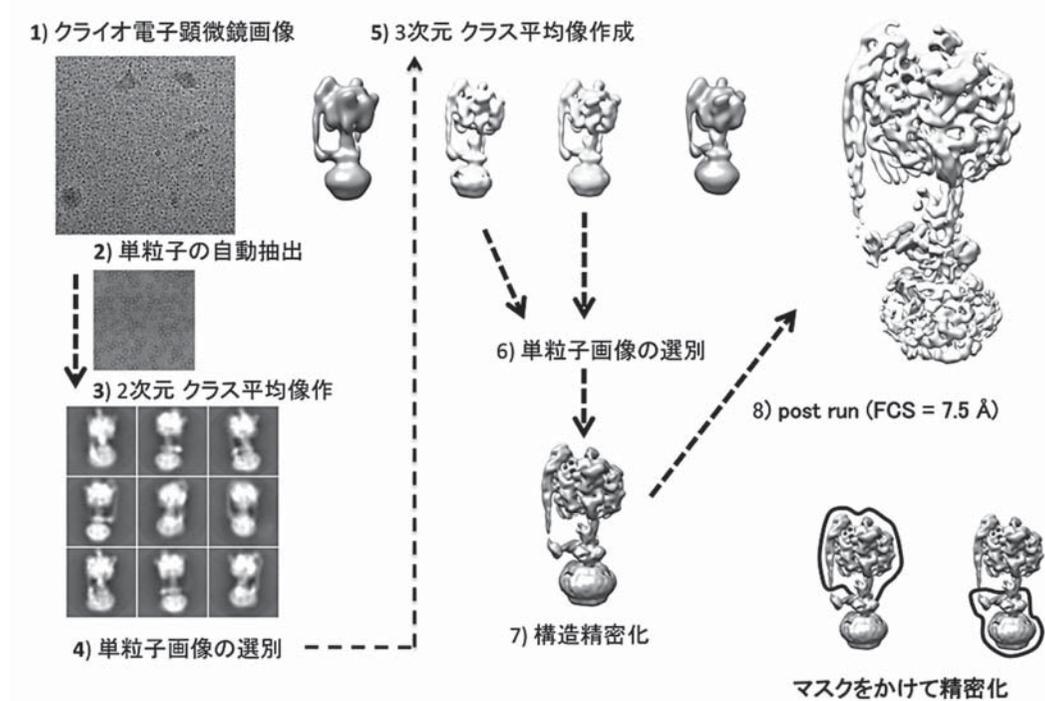


図3. クライオ EM を用いた SPA による立体構造決定のフローチャート。約 900 枚のクライオ EM 画像から約 1.2×10^5 の単粒子画像を抽出し、2次元および3次元クラス分けで選別された単粒子画像から精密化を行う。

RELION により、単粒子画像を自動抽出した。1,000 枚程度のクライオ EM 画像から、 $1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個程度の単粒子画像を抽出できる。抽出した単粒子画像を分類し、似ている画像から 2 次元再構成のクラスを作成した。S/N の良いクラスをつくる単粒子画像を選別し、選別された単粒子画像の向きを推定し、トモグラフィーで用いられる逆投影法により複数の立体構造を得た。最も分解能の高い 3 次元クラスをつくる単粒子画像を使って 構造精密化を行った。

結果と考察

1. クライオ EM による V_0V_1 の撮影

大阪大学超高压電顕センターにあるクライオ EM Titan krios で高純度の V_0V_1 を観察した。前回、界面活性剤である DDM で可溶化した V_0V_1 を用いた結果を報告した。溶液に含まれる DDM から生成するミセルにより画像の質がさがり、コントラストが悪い画像になった。これを改善するため、界面活性剤として LMNG を使った。 V_0V_1 を可溶化する時の 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。今回、LMNG の濃度を 0.003% まで低下させた溶液に含まれる V_0V_1 をクライオ EM で撮影したところ、コントラストの良い画像を得ることができた。この画像を使って解析を進めた。

2. 画像解析ソフト RELION による単粒子解析

RELION は、得られた大量の単粒子画像の向きを期待値最大化 (EM) 法により推定・分類し、2 次元および 3 次元画像を再構成する。 V_0V_1 粒子像を RELION で抽出し、150 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複数得られた (図 3)。このクラスを構成する数万の単粒子画像粒から 3 次元クラス平均像を計算した結果、 $\sim 10 \text{ \AA}$ 分解能程度のクラス平均像が得られた。最も粒子数が多いクラスからなる 3 次元再構成画像を精密化することで、フーリエシエル相関で $\sim 7.5 \text{ \AA}$ 分解能の立体構造を得ることができた。

今後の展開

側鎖レベルの議論を可能にするには、 3 \AA 台の分解能をもつ構造情報が必要である。また、プロトンの透過機構を議論するには、水分子の同定を可能にするさらに分解能の高い構造が必要となる。そのために、以下の点を工夫する。

3 次元クラス分けの時に、微妙に異なる構造が 1 つのクラスとして分類されると、そのクラスの単粒子画像から得られる立体構造の分解能が落ちる。 V_0V_1 の場合、 5×10^4 個の単粒子で 3 次元クラス分けしてもほぼ 1 つのクラスに分類される。解析する単粒子画像の数を 1×10^6 以上に増やし、得られる構造の S/N を挙げることで、複数のクラスに分類する。高い分解能のクラス毎に精密化を行い、より高い分解能の立体構造を得る。異なる構造を複数決定できれば、構造のスナップショットを得ることになり、どの構造変化が回転運動を生み出すのかも議論できる。

また、分子中に動きやすい領域があると、その部分の分解能が落ち、全体の分解能も低くなる。V₀V₁の場合でも、V₁の中心軸部分の分解能が高いのに対し、V₀リングを構成するヘリクス部分の分解能が低い。この原因として、V₀リング部分が他の部分に対して動きやすいことが考えられる。英国MRCの長井らは、スプライソソームの単粒子解析において、ドメイン毎にマスクをかけることで、他のドメインの分解能を上げている [8]。V₀V₁に対しても細かくマスクをかけ解析することで、分解能が上がりにくいV₀リングなどの分解能を改善する (図3)。

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。

参考文献

1. Forgacs, 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. Nguyen, T., et al., Cryo-EM structure of the yeast U4/U6.U5 tri-snRNP at 3.7 Å resolution. *Nature*, (2016) **530**: p. 298-305.

Structural analysis of Vacuolar type ATPase (V_0V_1) using cryo electron microscope

Jun-ichi KISHIKAWA

Atsuko NAKANISHI

Ken YOKOYAMA

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 by single particle analysis using cryo electron microscope. For imaging of V_0V_1 , LMNG was used for solubilization detergent to reduce detergent concentration. Over a couple of thousands imaged of cryo-grid containing V_0V_1 were obtained by cryo-EM Titan krios (FEI). Single particle images of V_0V_1 were picked up by RELION, single particle analysis software, then 2-D averaged class images were reconstructed from the collected images. Finally, we obtained 3-D averaged class images from nearly 100k particles at resolution of 7.5 Å estimated by Fourier shell correlation.

Keywords : V-ATPase, Rotary molecular motor, Structural study, Cryo-electron micrography, Single particle analysis