

文部科学省マテリアル先端リサーチインフラ 令和 6 年度秀でた利用成果

クライオ電子顕微鏡による回転型 ATPase の機能構造解析 (利用課題名：クライオ電子顕微鏡を用いた ATP 動態を担う蛋白質の構造解析)

^a 京都産業大学, ^b 大阪大学, ^c 京都工芸繊維大学 横山 謙^a, 中野 敦樹^a, 岸川 淳一^{ac}, 中西 温子^{ab}
大阪大学超高压電子顕微鏡センター 光岡 薫



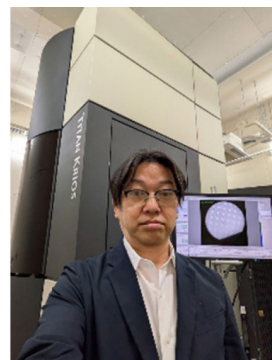
1. はじめに

2012 年に電子直接検出器が登場し、クライオ電子顕微鏡（クライオ電顕）によるタンパク質構造の分解能が飛躍的に向上した。この「分解能革命」により、結晶化が困難で構造決定が難しかった多くの膜タンパク質の構造が次々と発表されている。私たちが研究対象としている回転型 ATP 合成酵素も結晶化が困難で、その全体構造解明は長らく未解決の課題だった。

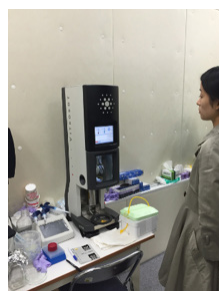
2014 年、大阪大学超高压電子顕微鏡センターにハイエンドなクライオ電子顕微鏡「Titan Krios」が導入され、クライオ電顕の専門家である光岡 薫教授が赴任された。光岡教授とは以前から電子顕微鏡による構造解析に関する共同研究を進めていたこともあり、私はすぐに ARIM の前身であるナノテクノロジープラットフォームの枠組みで Titan Krios の使用を申請し、回転型 ATP 合成酵素の一種である V/A-ATPase の全体構造解明を開始した。

クライオ電顕画像の取得や解析に関して十分なノウハウがない中、手探りで V/A-ATPase の構造解析を進め、2016 年の中頃には低分解能ながら V/A-ATPase の全体構造を決定することができた。ATP 合成酵素の全体構造決定という点では、ドイツやアメリカのグループに遅れをとったものの、我が国で初めて決定された複雑な膜タンパク質複合体の構造であり、その研究成果を 2018 年に刊行した [6]。

それ以降も、クライオ電顕による ATP 合成酵素の構造解析により回転型 ATP 合成酵素の仕組みの解明につながる多くの研究成果を挙げることができた。現在では、生体膜上で機能している ATP 合成酵素や呼吸鎖複合体といった膜タンパク質の機能構造解析を ARIM の支援のもと進めている。



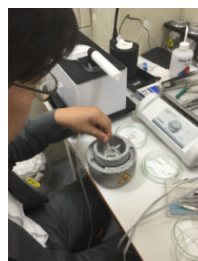
左から 京都産業大学 横山 謙, 大阪大学 光岡 薫



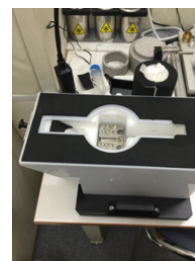
Vitrobot の前で作業
(中西さん)



グリッドに試料溶液をのせる。
液体エタンで急速凍結。



フォルダにセット
(光岡先生)



ケースに入れて



Titan Krios に
セットし撮影

クライオグリッドの作製風景



2. ATP 合成酵素 FoF1 と V/A-ATPase

ATP 合成酵素は、生体膜間の電気化学ポテンシャル

(プロトン駆動力) を利用して ATP 合成反応を行うエネルギー変換装置である。ミトコンドリアやクロロプラスト、一部の細菌の細胞膜には F_0F_1 型の ATP 合成酵素が存在する [1]。一方、好熱菌 *Thermus thermophilus* の細胞

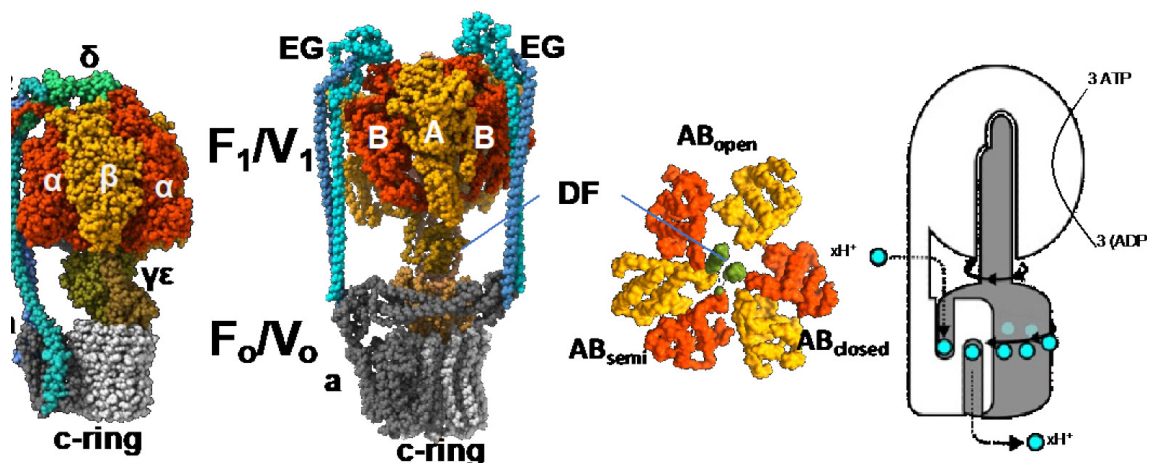


図1 FoF₁ (A), V/A-ATPase (B) の構造, (C) V_i 部分のスライス構造, 3つのABの境界にATPの結合部位がある. 中心に回転軸であるDFが位置している. (D)回転触媒機構の模式図. 中心回転軸が外周固定子部分に対して回転することで, V_i 部分で3分子のATPが加水分解すると中心回転軸が1回転し, V_o 部分でプロトンが輸送される.

膜から得られるATP合成酵素は、構成サブユニット組成や一次構造が真核生物の液胞などの酸性小胞の膜に存在するプロトンポンプであるV-ATPaseに似ていることからV-ATPaseと呼ばれ、同様の酵素は腸球菌の細胞膜からも発見されている。また、古細菌 (Archea) にも同様のV型ATP合成酵素が見つかったことから、V/A-ATPaseと呼ばれることもある [2][3][4][5]。

これらのATP合成酵素は、ATPの合成・分解を担う6量体を含む外周固定子と、膜内在性の回転リングを含む中心回転軸から構成される。プロトン駆動力により回転リングが回転すると、6量体でADPがリン酸化されATPが合成される (図1)。反対にV_i 部分でATPが分解されると中心回転軸が回転し、プロトンが輸送される。

ATP合成酵素の構造解明は、生体エネルギー分野において長らく残された課題の一つであった。しかし、回転することで機能するATP合成酵素は、複数の回転状態からなる混合物として存在し、結晶構造解析による全体的な構造の決定は困難だった。また、複数のサブユニットから構成される複雑な構造からなる超分子複合体であることも、その構造解析を困難にした一因である。

3. V/A-ATPaseの試料調製

我々は、*T. thermophilus* 由来のV/A-ATPaseの構造・機能に関する研究を長年にわたり継続してきた [2]。好熱性細菌由来のタンパク質は安定性が高く扱いやすいため、構造解析に適しており、比較的簡単に構造解析に必要な試料を得ることが可能である。通常、ニッケルカラム (Ni-NTA) を使用したアフィニティー精製により膜画分50gから約5mgのV/A-ATPaseが得られる。

当初は、限界ミセル濃度未満のLMNG (界面活性剤の一種) を含むV/A-ATPase溶液からクライオグリッドを作

成した。この方法で良好なクライオ画像を得ることができたが、V/A-ATPaseの凝集が見られ、クライオ電顕画像1枚あたりのV/A-ATPase単粒子画像の数が少なくなる傾向があった。そこで、V/A-ATPaseをナノディスクと呼ばれる脂質膜に再構成し、界面活性剤を除去した状態でクライオグリッドを作成した。その結果、再現性の高い良好なクライオ電顕画像を得ることができ、クライオ電顕画像あたりの単粒子画像数の歩留まりが大幅に上がった。そのため大量のV/A-ATPaseの単粒子画像を抽出し、画像解析に供することができた。

4. クライオ電子顕微鏡により解明されたV/A-ATPaseの回転機構

クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析は、タンパク質粒子の画像を撮影し、それを元に3次元構造を再構成する方法である。この過程で、異なる構造を分離し、それぞれの構造を詳細に解析できるので、回転型ATPaseのように複数の構造が混在する場合に有効である。

我々は、V/A-ATPaseのATP加水分解中間体の構造を捉えるために、内在性ヌクレオチドを除去したV/A-ATPaseを異なるATP濃度条件で反応させた。この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構造解析を行った。

V/A-ATPaseのATP駆動性モータードメインであるV_iの原子分解能構造を得るために、各条件下でV_i部分を強調した構造精密化を行った。触媒部位へのヌクレオチド (ATP/ADP) 結合状態に関わらず、V_iドメインは、開いた構造 (AB_{open})、やや閉じた構造 (AB_{semi})、閉じた構造 (AB_{closed}) から構成されていた (図2)。

飽和ATP濃度条件では、AB_{open}にはATP、AB_{semi}にはATP、AB_{closed}にはADPとPiが結合していた。ATP結合

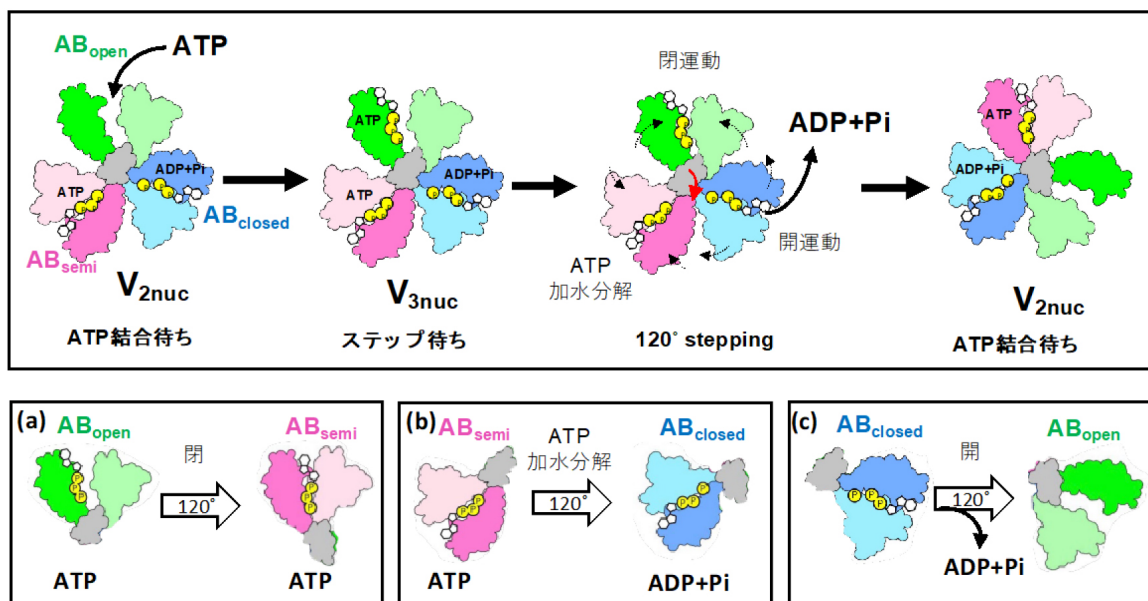


図2 (上) V₁部分でのATP駆動による回転機構 (a) ~ (c) 120°ステップに伴って3つのABで起こる反応

が律速段階になる条件では、ADPがAB_{closed}に、ATPがAB_{semi}に結合していたが、AB_{open}は空だった。これは、次のATP分子がAB_{open}に結合することを示している。

最後に、加水分解が遅くなるATPアナログであるATPγSを含む反応液中のV₁部分の構造を解析した。この条件では、ATP加水分解を待つ構造が得られる。得られたV₁ドメインの構造には、すべての触媒部位にATPγSとADPが観察された。AB_{closed}にはADP、AB_{semi}にはATPγSが結合しており、これはAB_{closed}が加水分解後の構造で、AB_{semi}が加水分解を待っている構造であることを示している。

この結果から、次に示すATP加水分解と回転運動の化学力学共役機構に関する重要な洞察が得られた。V_{3nuc}からV_{2nuc}への構造変化では、図2に示されるように、3つのAB二量体は以下の構造変化を同時に起こす：(a) AB_{open}からAB_{semi}への変化、(b) AB_{semi}からAB_{closed}への変化、(c) AB_{closed}からAB_{open}への変化。これらの変化と同時にDF回転子が120°ステップする。(a)では、結合したATPによりAB二量体がより閉じた構造になる。また、AB_{semi}(ATP)とAB_{closed}(ADP+Pi)を比較すると、結合しているATPとADPの違いにより化学ポテンシャル差が生じる。そのことにより、AB_{semi}からAB_{closed}への構造変化が自発的に起こり、同時に120°ステップも駆動される。AB_{closed}に結合したADPおよびPiが放出され、AB_{open}に変換する過程(c)は、触媒部位とADP+Piとの相互作用を切断する過程であり、120°ステップによりAB_{closed}が開くことにより引き起こされる。

つまり、3つの触媒部位で起こる化学反応が、軸タンパク質の120°ステップと共役することで同時に起こる。AB_{open}に結合したATPに加えて、AB_{semi}に結合したATPの加水分解過程も、120°ステップの駆動力になる[6]。

5. V/A-ATPaseの時間分解能構造解析

クライオ電子顕微鏡を使った構造解析では、反応時間を変えることで酵素の構造変化を捉えることができる。V/A-ATPaseの速い構造変化を捉えるために、硫酸イオンを反応液に加え、初期状態から定常状態への変化を遅くした。

低濃度のATPと硫酸イオンを含む反応液でV/A-ATPaseを60秒間反応させ、クライオグリッドを作成して構造解析を行った。この条件では、AB_{semi}とAB_{closed}に硫酸イオンが結合し、AB_{open}が空の構造(V_{2SO4})と、AB_{semi}にATP、AB_{closed}に硫酸イオン、AB_{open}が空の構造(V_{semi1ATP})が得られた(図3)。

次に、V/A-ATPaseを飽和濃度のATPで5秒および30秒反応させ、構造解析を行った。5秒の反応液からは、AB_{open}の触媒部位にATPが結合し、AB_{closed}およびAB_{semi}の両方に硫酸塩が結合した構造(V_{1ATP})と、AB_{open}とAB_{semi}の触媒部位にそれぞれATPが結合し、AB_{closed}に硫酸イオンが結合した構造(V_{2ATP})が得られた。飽和ATP濃度条件で30秒反応させた反応液からは、V_{1ATP}と、AB_{open}とAB_{semi}にATPが結合し、AB_{closed}にADP+Piが結合した構造(V_{3ATP})が得られた。

以上の結果から考えられるV_{2SO4}からV_{3nuc}への移行過程を図3に示した。まず、V_{2SO4}にATPが結合するとV_{1ATP}ができる。AB_{open}に結合したATPによりV_{1ATP}が120°ステップし、AB_{closed}の硫酸イオンが放出され、V_{semi1ATP}になる。V_{semi1ATP}にATPが結合するとV_{2ATP}になる。これが120°ステップすると、AB_{closed}からADPとPiが放出され、V_{2nuc}に変化する。V_{2nuc}にATPが結合するとV_{3nuc}になる。ここまでくると、最初にV₁部分に結合して

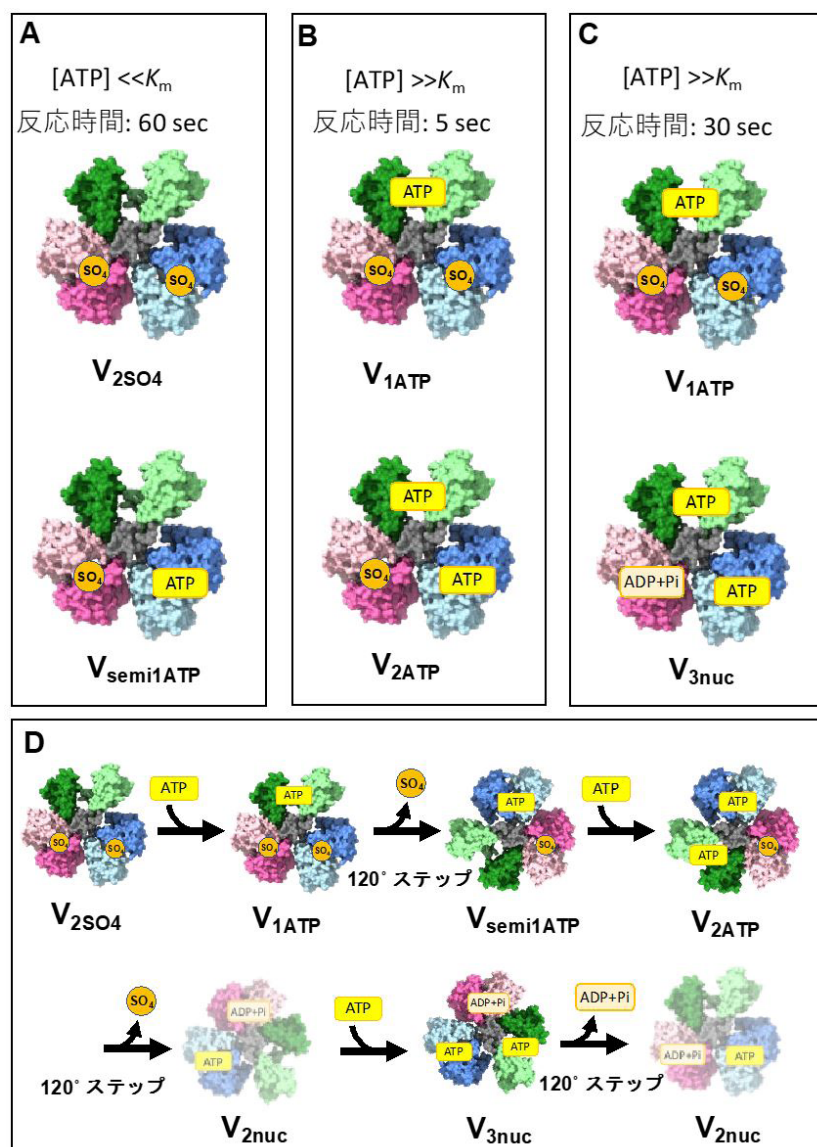


図3 V/A-ATPase の時間分解能構造解析。A～C 異なる反応条件と時間で得られた V_1 部分の構造。D 初期状態から定常状態への構造変化。この実験では、 V_{2nuc} は構造として単離されず半透明で表示した。

いた硫酸イオンはすべて放出され、 V_{2nuc} と V_{3nuc} が交互に現れる定常状態になる。

この結果から、硫酸イオンが V/A-ATPase の初期反応を遅くする一方、定常状態での活性に影響を与えないことが説明された。また、 AB_{open} に ATP が結合しているだけの状態よりも、 AB_{open} と AB_{semi} の両方に ATP が結合している方が、より速く 120° ステップが起きることが示唆された。このことは、 AB_{semi} に結合した ATP も 120° ステップの駆動力の一つになることを示唆する [7]。

6. おわりに

クライオ電子顕微鏡による構造解析は、ATP 合成酵素に代表される膜タンパク質の機能を解明する上で強力な手法である。通常、クライオ電子顕微鏡のマシナタイム

に制限があるためクライオ電顕での撮影自体いつでもできるわけではない。我々の場合、ARIM の枠組みにより比較的豊富なマシナタイムをいただくことができ、研究が大いに進捗した。いままでは、可溶化状態の ATP 合成酵素の機能構造解析を行ってきたが、ATP 合成酵素は本来生体膜に包埋されている状態ではたらいっている。現在我々は、ATP 合成酵素本来の機能を見るために、ミトコンドリア内膜に存在する ATP 合成酵素を直接構造解析している。これに関しても ARIM の枠組みのマシナタイムを活用させていただいている。大阪大学超高压電顕センターの Titan Krios は第 2 世代で最新型ではないが、メンテナンスが十分で状態が良く、高分解能のタンパク質の構造解析が可能である。今度とも Titan の共同利用により、ATP 合成酵素のみならず他の重要な膜タンパク質の機能構造を進める予定である。クライオ電顕による機能構造解析により、膜タンパク質の中間体構造を数多く決定す

ることで、膜タンパク質の高機能改変やドラッグデザインなどの産業応用も期待される。

7. 謝辞

V/A-ATPase の構造生化学解析は、主に岸川 淳一博士(京都工繊大准教授)、中西 温子博士(大阪大学 RPD) により行われた。また、クライオ電顕の撮影には光岡 薫博士(大阪大学 超高压電子顕微鏡センター 教授)にご助力いただいた。

参考文献

- [1] Boyer, P.D. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1140, 215-50 (1993).
- [2] Yokoyama, K. & Imamura, H. Rotation, structure, and classification of prokaryotic V-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 37, 405-10 (2005).
- [3] Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in

physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 917-29 (2007).

- [4] Kuhlbrandt, W. Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu Rev Biochem* 88, 515-549 (2019).
- [5] Boyer, P.D., Cross, R.L. & Momsen, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2837-9 (1973).
- [6] Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Tamakoshi, M., Mitsuoka, K. & Yokoyama, K. Cryo EM structure of intact rotary H(+)-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat Commun* 9, 89 (2018).
- [7] Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K. & Yokoyama, K. Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding. *J Biol Chem* 299, 102884 (2023).

(京都産業大学生命科学研究科教授 横山 謙)



【お問い合わせ】

大阪大学 ARIM 微細構造解析部門

☎ 06-6879-7941

E-mail arim@uhvem.osaka-u.ac.jp

ホームページ

<https://nanoplatform.osaka-u.ac.jp/>