

クライオ電子顕微鏡による回転型 ATPase の構造生化学

横山 謙

1. はじめに

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析では、さまざまな反応溶液条件下で標的酵素の構造を決定できる。そのため、多分子系の生化学では解析が難しい酵素の構造変化と触媒過程の対応づけが可能である（構造生化学解析）。特に、動くことで機能するタンパク質の化学・力学共役機構を捉えるのに威力を発揮する。本稿では、回転することで機能する ATPase（回転型 ATPase）のクライオ電子顕微鏡による構造生化学解析について、筆者らのグループの V/A-ATPase の研究を例に紹介する。

2. 2種類の回転型 ATPase の基本構造と機能

ATP 合成酵素は、F 型と V 型の 2 種類の ATPase に大別できる¹⁻³⁾。F 型 ATP 合成酵素は、 F_0F_1 と呼ばれ、ミトコンドリアの内膜やクロロプラストのチラコイド膜、一部の細菌の細胞膜に存在し、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、ADP をリン酸化し ATP を合成する。V 型の ATP 合成酵素は、一部の細菌や古細菌の細胞膜に存在し、単に V-ATPase と呼ばれることもあるが、古細菌（Archaea）に存在することから、V/A-ATPase もしくは A-ATPase と呼ばれることもある⁴⁾。原核生物の V/A-ATPase は、真核生物の酸性オルガネラに存在するプロトンポンプである V-ATPase にそっくりで、真核生物の V-ATPase の先祖型 ATPase と考えられる²⁾。

F 型と V 型の ATPase は、基本構造を共有しており、親水的で ATP の合成もしくは加水分解を行う F_1/V_1 部分と、プロトンの透過を担う膜内在性の F_0/V_0 部分から構成される（図 1）。 F_1/V_1 部分は、ATP の加水分解により中心回転軸

を回転させる回転分子モーターであり、 F_0/V_0 部分は、プロトン駆動力で回転する回転分子モーターである。 F_1/V_1 と F_0/V_0 は、中心回転軸と外周固定子を共有しており、そのため、二つのモーター部分は、回転運動により ATP の合成/加水分解と、プロトン移動を共役させている（図 1D）。

3. 回転型 ATPase の化学力学変換機構

単離された F_1/V_1 ドメインは、ATP 加水分解活性を示し、それぞれ、 F_1 -ATPase および V_1 -ATPase と呼ばれる。 F_1/V_1 -ATPase が 3 分子の ATP を加水分解すると、回転子が 360° 回転するので、一つの ATP 分子の加水分解あたり、回転軸が 120° 回転することになる。

約 60 年前に Paul Boyer は、 F_0F_1 が回転することで、ATP を合成するとした Binding Change Mechanism 説を唱えた⁵⁾。この説では、ATP 合成酵素の F_1 ドメイン内の三つの触媒部位が、中心にある γ サブユニットの回転に伴い、ATP/ADP に対する親和性が異なる Loose, Tight, Open の形態を順次とっている（図 1E）。三つの触媒部位の協同的な構造変化により、ADP + Pi の結合、ADP のリン酸化、合成された ATP の放出が順番に起こる（回転触媒機構）。Boyer によって予測された F_1 ドメインの非対称な六量体構造は、1994 年にウシ心筋ミトコンドリア F_1 -ATPase の結晶構造によって確認された⁶⁾。続いて、1 分子回転観察実験によって F_1 -ATPase の回転触媒機構が直接証明された⁷⁾。この実験では、回転子の γ サブユニットに観察用プローブを取りつけ、固定子である $\alpha_3\beta_3$ を、ヒスチジンタグを介してガラス表面に固定した。ATP によるプローブの一方回転が光学顕微鏡で観察され、 F_1 -ATPase が ATP によって回転することが証明された。同様に、我々も 5 年後に V_1 -ATPase の回転を実証した⁸⁾。以来、 F_1 -ATPase に関する多くの 1 分子回転観察実験が行われ、一つの ATP 分子の結合が 120° ステップを引き起こし、それが 80° と 40° のサブステップに分割され、ATP 加水分解が 80° の位置で起こることが示されるなど⁹⁾、 F_1 -ATPase の回転機構に関する理解が深まった。しかし、ATP の加水分解エネルギーが回転力に変換される機構（化学・力学共役機構）については、まだ議論が分かれている。

京都産業大学 生命科学部 (〒603-8555 京都市北区上賀茂本山 生命科学部 16 号館)

Structural biochemical analysis of rotary ATPases by Cryo electron microscopy

Ken Yokoyama (Kyoto Sangyo University, Faculty of Biosciences, Kamigamo Mitoyama, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950521

© 2023 公益社団法人日本生化学会

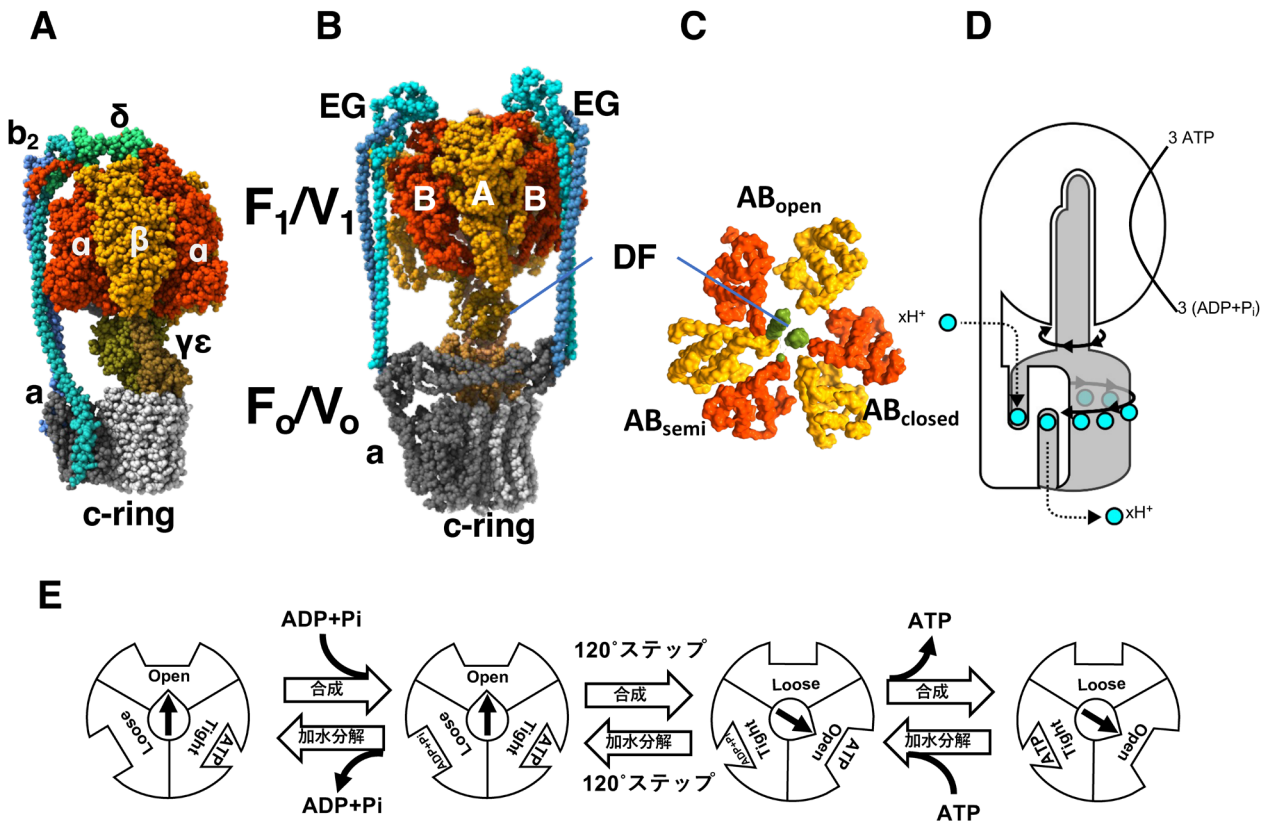


図1 F_0F_1 (細菌型) およびV/A-ATPaseの基本構造

(A) F_0F_1 の構造. F_1 部分は $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ から、 F_0 部分は、 $a_1b_2c_{10}$ から構成される. (B) V/A-ATPaseの構造. V_1 部分は、 $A_3B_3D_1F_1$ から、 V_0 部分は $a_1E_2G_2d_1c_{12}$ から構成される. (C) V_1 部分のスライス構造. A_3B_3 の中心を回転軸であるDFが貫いている. (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_1 部分でのATPの加水分解/合成と、 V_0 部分でのプロトン移動が共役する. (E) BoyerのBinding Change Mechanismモデル.

4. 好熱菌のV/A-ATPase

好熱菌 *Thermus thermophilus* のV/A-ATPaseは、真正細菌で初めて発見されたV型のATPaseであり、ATP合成酵素として機能する¹⁰⁾. この酵素は非常に安定性が高く、大量調製が可能であるため、構造・機能解析に適しており、最もよく研究されたATP合成酵素の一つである. V_1 ドメインは、三つの触媒部位を含む A_3B_3 六量体の中心に棒状のDF複合体が貫いており、単離された V_1 ドメインは、ATPを加水分解して回転子であるDFを回転させる(図1).

V_1 -ATPaseの1分子回転観察実験は、 F_1 -ATPaseとほぼ同じ方法で行われた. その結果、 V_1 -ATPaseでは、 F_1 で観察された120°ステップの間にある80°の停止は観察されなかった¹¹⁾. このことは、 V_1 -ATPaseは、120°ごとの停止位置で、ATPの結合とATPの分解が同時に起こることを示す. この結果は、クライオ電子顕微鏡による構造解析により確認された.

5. クライオ電子顕微鏡によるV/A-ATPaseの構造解析

クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析は、一つ一つのタンパク質粒子の画像を撮影し、その画像を元に3次元構造を再構成する方法である. その過程で、異なる構造を3次元クラス分けにより分離し、それぞれのクラスに対して構造精密化を進めることができる. このため、構造多型が予想されるタンパク質試料の構造機能解析に有効である. たとえば、回転型ATPaseのように回転状態に対応した複数の構造が混在する場合にも適用できる. 酵母V-ATPaseの場合、単粒子解析により中心回転軸の異なる方向を持つ三つのクラスが分離された¹²⁾. また、我々も、単粒子解析を用いてV/A-ATPase試料中に存在する異なる構造をいくつかのクラスに分類し、それぞれのクラスの構造の分解能を向上させることができた¹³⁾.

次に、V/A-ATPaseのATP加水分解中間体の構造を捉えるために、内性ヌクレオチドを除去したV/A-ATPaseをナノディスクに再構築し、低濃度ATPでATP結合を待つ反応条件、飽和ATP濃度での触媒反応を待つ反応条件、ATPの加水分解を待つ条件で反応させた酵素溶液からクラ

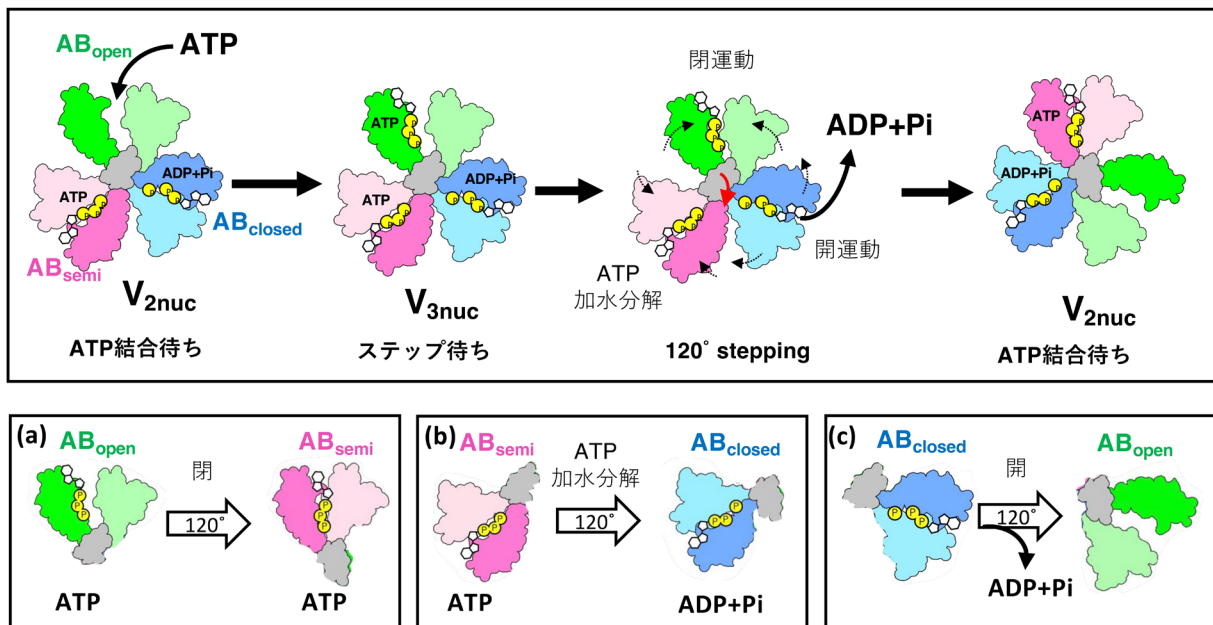


図2 V/A-ATPaseのATPによる回転機構

AB_{open} にATPが結合すると、 120° ステップ待ち構造である V_{3nuc} になる(上)。三つのABで(a)~(c)の反応が同時進行し、DFが 120° ステップする。DFと三つのABとの結合面が決まっているので、ABが構造変化するとDFの位置が変化し、 120° ステップする。

イオグリッドを作製し、クライオ電子顕微鏡で構造解析した¹⁴⁾。

V_1 ドメインの原子分解能構造を得るために、各条件下で V_1 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)結合状態にかかわらず、 V_1 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1, 図2)。

飽和ATP濃度条件($[ATP] \gg K_m$)で得られた V_1 ドメインの構造では、 AB_{open} にはATP、 AB_{semi} にはATP、 AB_{closed} にはADPとPiが結合していた(V_{3nuc} 構造)。

ATP結合が律速段階になる条件($[ATP] < K_m$)では、ADPが AB_{closed} に、ATPが AB_{semi} に結合していたが、 AB_{open} は空であった(V_{2nuc} 構造)。このことは、次のATP分子が AB_{open} に結合することを示す。

最後に、加水分解が遅くなるATPアナログであるATP γ S (4mM)を含む反応液中中の V_1 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(V_{prehyd})が得られるはずである。得られた V_1 ドメインの構造には、すべての触媒部位にATP γ SとADPが観察された。 AB_{closed} にはADP、 AB_{semi} には、ATP γ Sが結合しており、このことは、 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す。つまり、 AB_{semi} に結合したATP γ Sの加水分解には、DFの 120° ステップを伴う AB_{semi} から AB_{closed} への構造変化が必要であり、 V_{prehyd} が、 AB_{semi}

上のATP γ Sの加水分解を待っている構造になる。

6. ATPによって駆動されるV/A-ATPaseの回転機構

以前の F_1 -ATPaseと V_1 -ATPaseの1分子回転実験では、 120° ステップ(F_1 の 80° ステップ)がATP結合と同時に起こることが示され、ステップ開始の待ち時間のヒストグラム解析もそれを支持していた。 AB_{open} にATPがすでに結合している V_{3nuc} 構造の存在は、 V_1 ドメインへのATP結合と 120° ステップが同時に起こるのではなく、結合したATPによって 120° ステップが開始されることを示す。

回転中のV/A-ATPaseの構造生化学解析は、ATP加水分解と回転運動との化学力学共役機構に関する重要な洞察を提供する。 V_{3nuc} から V_{2nuc} への構造変化では、図2に示されるように、三つの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の違いによりダウンヒルの化学ポテンシャル差が生じている。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

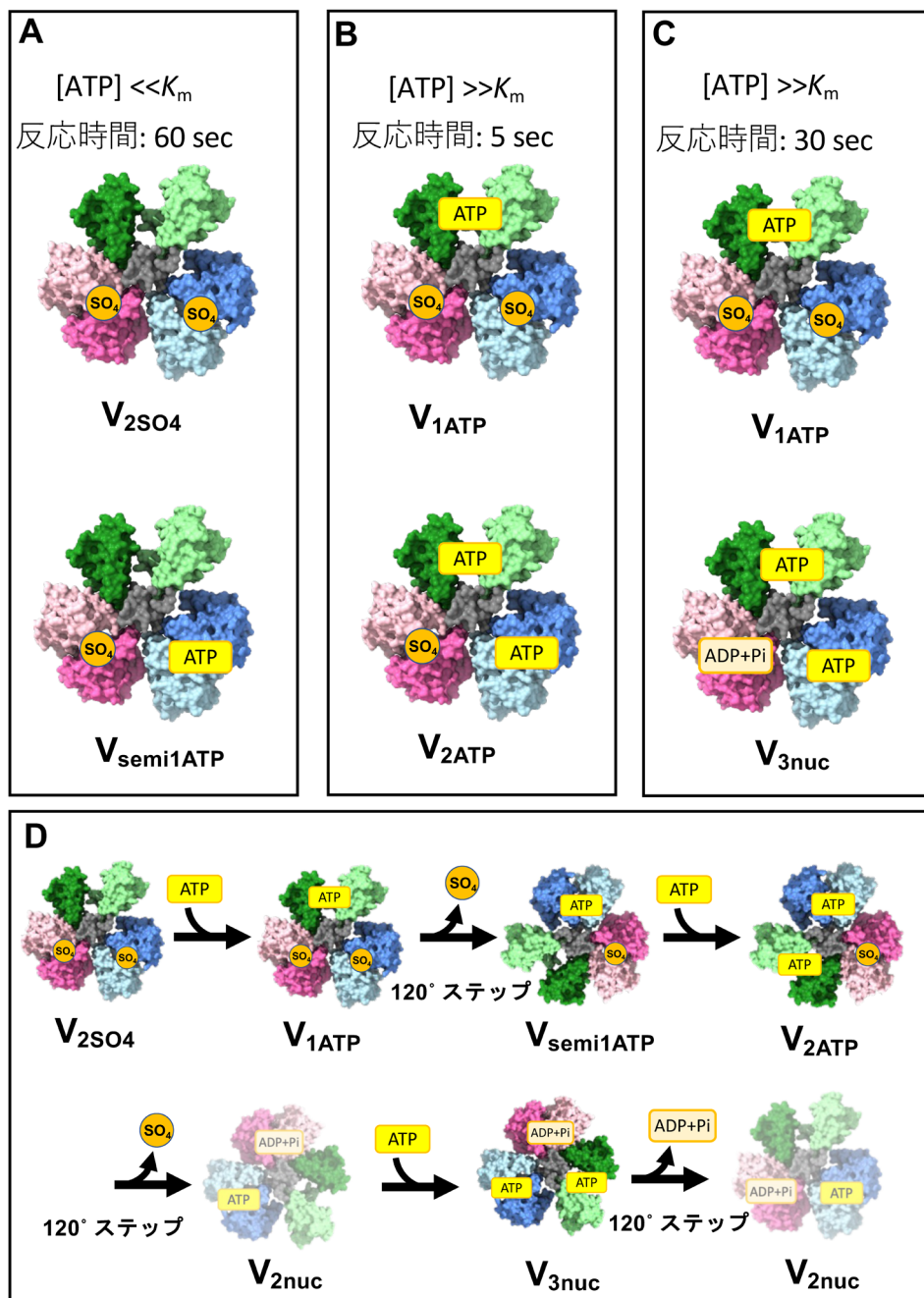


図3 V/A-ATPaseの時間分解能構造解析 (A~C)異なる反応条件と時間で得られた V_1 部分の構造. (D)初期状態から定常状態への構造変化. この実験では, V_{2nuc} は構造として単離されず半透明で表示した.

+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、三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。

7. V/A-ATPaseの時間分解能構造解析

クライオ電子顕微鏡による構造解析では、反応時間を変えることで、酵素の反応の進行に伴う構造変化を捉えることも可能である。しかし、酵素の速い構造変化を捉えるには工夫がいる。我々は、V/A-ATPase初期反応を遅くする硫酸イオンを反応液に加えることで、初期状態から定常状態への変化を遅くした¹⁵⁾。まず、低濃度のATP

と硫酸イオンを含むV/A-ATPaseの反応液を60秒間反応させ、クライオグリッドを作製し構造解析した。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3A)。 $V_{semi1ATP}$ は、 V_{2SO4} の AB_{open} にATPが結合し、 120° ステップした後の構造である(図3A下)。次に、V/A-ATPaseを飽和濃度のATPで5秒および30秒反応させ、構造解析した(図3B, C)。5秒の反応溶液からは、 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。 V_{1ATP} は、 V_{2SO4} にATPが結合した直後の構造であり、 V_{2ATP} は、 $V_{semi1ATP}$ の AB_{open} にATPが結合した直後の構造と考えられる。飽和ATP濃度条件でV/A-ATPaseを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} におそらくADP+Piが結合した構造(V_{3ATP})が得られた。この構造は、以前の研究で、飽和ATP条件下で得られた V_{3nuc} に相当する。

V_{2SO4} から V_{3nuc} への移行過程を、図3D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 V_1 部分に結合して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うまく説明された。

V/A-ATPaseを30秒間ATP飽和条件で反応させた溶液にも、 V_{1ATP} が存在した(図3C)。 AB_{open} に結合したATPによる 120° ステップが速い過程であれば、30秒の反応時間で V_{1ATP} は消失しているはずである。また、同じ反応液から V_{2ATP} が確認されなかったことから、 V_{2ATP} が 120° ステップして V_{2nuc} に変化する過程がより速いことが示唆される。すなわち、 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わかる。つまり、 AB_{semi} に結合したATPも 120° ステップの駆動力の一つになる。これは、先述したモデルと一致しており、結合したATPによって AB_{open} が閉じることと、 AB_{semi} でのATPの加水分解過程の両方が協同して 120° ステップを引き起こし、同時に AB_{closed} を開いてADPとPiが放出される。

8. おわりに

クライオ電子顕微鏡による構造生化学解析は、酵素の機能を解明する上で強力な手法である。現在、クライオ電子顕微鏡のマシントimeに制限があるが、今後クライオ電子顕微鏡の台数が増え、気軽に誰でも使えるようになれば、より多くの酵素の機能が構造生化学により解明されるであろう。結晶構造解析では捉えにくい中間体構造を数多く決定することができ、酵素の高機能改変やドッキングデザインなどの産業応用も期待される。

謝辞

V/A-ATPaseの構造生化学解析は、主に岸川淳一博士(現大阪大学蛋白質研究所 助教)、中西温子博士(現大阪大学 学振PD)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(現大阪大学高圧電顕センター 教授)にご助力いただいた。

文 献

- 1) Boyer, P.D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 215–250.
- 2) Yokoyama, K. & Imamura, H. (2005) Rotation, structure, and classification of prokaryotic V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 405–410.
- 3) Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 917–929.
- 4) Kuhlbrandt, W. (2019) Structure and mechanisms of F-Type ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 515–549.
- 5) Boyer, P.D., Cross, R.L., & Momsen, W. (1973) A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2837–2839.
- 6) Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621–628.
- 7) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K. Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, **386**, 299–302.
- 8) Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M., & Yokoyama, K. (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2312–2315.
- 9) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr., & Itoh, H. (2001) Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature*, **410**, 898–904.
- 10) Yokoyama, K., Oshima, T., & Yoshida, M. (1990) Thermophilus thermophilus membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21946–21950.
- 11) Furuike, S., Nakano, M., Adachi, K., Noji, H., Kinosita, K. Jr., & Yokoyama, K. (2011) Resolving stepping rotation in Thermophilus thermophilus H(+)-ATPase/synthase with an essentially drag-free probe. *Nat. Commun.*, **2**, 233.

- 12) Zhao, J., Benlekkir, S., & Rubinstein, J.L. (2015) Electron cryo-microscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*, **521**, 241–245.
- 13) Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Tamakoshi, M., Mitsuoka, K., & Yokoyama, K. (2018) Cryo EM structure of intact rotary H(+)-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat. Commun.*, **9**, 89.
- 14) Kishikawa, J., Nakanishi, A., Nakano, A., Saeki, S., Furuta, A., Kato, T., Mitsuoka, K., & Yokoyama, K. (2022) Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases. *Nat. Commun.*, **13**, 1213.
- 15) Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K., & Yokoyama, K. (2023) 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.

著者寸描

●横山 謙 (よこやま けん)



京都産業大学生命科学部 教授. 博士 (理学).

■略歴 名古屋市に生まれる. 1985年静岡大学理学部卒業. 91年東京工業大学大学院総合理工学研究科博士後期過程修了. 理学博士. 同年トヨタ自動車入社. 技術部. 95年金沢大学薬学部助手. 2002年科学技術振興財団 プロジェクトGL. 10年京都産業大学総合生命科学部教授.

17年より現職.

■研究テーマと抱負 生体エネルギー変換の仕組みを原子レベルで解明する. さらにミトコンドリアで起こっている生体エネルギー変換と, 細胞レベルの現象とのつながりを明らかにしたい.

■ウェブサイト <http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yokoken/index-j.htm>

■趣味 山歩き, スキー, 海遊び.