

千葉大学大学院融合理工学府

博士論文

回転分子モータータンパク質 V-ATPase の

一方向回転機構の解明

令和3年2月提出

先進理化学専攻

化学コース

生体構造化学研究室

丸山 慎太郎

要旨

第一章 緒言

V-ATPase は ATP の化学エネルギーを利用して、親水性の触媒頭部回転モーター V_1 部分の中心軸 DF 複合体を回転させて膜内在性のイオン輸送ローターリング V_0 部分でイオンの能動輸送を行い、細胞や生体の恒常性維持に重要な役割を果たすタンパク質複合体である。ATP 駆動型の回転分子モーターの一種である V_1 -ATPase は、リング状の触媒ドメインである A_3B_3 複合体とその中心軸である DF 複合体から構成されている。 A_3B_3 複合体は同一の A_1B_1 ユニットが N 末端の β バレルドメインでクラウン構造を形成して会合し、3 組がリング状に集合した複合体であるにも関わらず、ヌクレオチド結合時、非結合時ともにユニークな非対称構造を形成していた。

Enterococcus hirae 由来の V_1 -ATPase についてこれまで構造生物学的な研究や生化学的解析が行われてきており、 V_1 複合体および A_3B_3 複合体について X 線結晶構造解析によっていくつかの結晶構造が明らかとなったが、 V_1 -ATPase が回転分子モーターとして駆動される回転メカニズムや、 A_3B_3 複合体、DF 複合体それぞれが回転触媒機能の中で担う役割は未だに明らかとなっておらず、生体内のエネルギー変換機構は依然として不明のままである。本研究では、第 2 章において、 A_3B_3 複合体が非対称構造を形成するメカニズムおよびその意義について報告し、第 3 章において回転を生み出す協同的構造変化メカニズムについて報告する。本研究は V-ATPase をはじめとする複合体タンパク質

が複雑な四次構造を形成する機構、また、ATP の化学エネルギーが V_1 -ATPase をはじめとする回転分子モーターを利用して回転トルクへと変換されるメカニズムの理解に重要な知見となるものであると考えられる。

第二章 V-ATPase 加水分解触媒ドメインの非対称構造形成メカニズム

X線結晶構造解析によって V_1 -ATPase の触媒ドメインである A_3B_3 複合体がヌクレオチドの有無にかかわらず非対称構造を形成することが明らかとなっていた。ところが、非対称構造が形成されるメカニズムや意義は明らかとなっていなかった。そこで、本研究では、 A_3B_3 複合体の非対称構造形成メカニズムを明らかにするために、 β バレルドメインによる会合を弱めるような変異型 $A_3B_3(A_3B_{(L65Y)3})$ 複合体を作製し、その構造を高速 AFM と X 線結晶構造解析によって明らかにした。 $A_3B_{(L65Y)3}$ はヌクレオチド非結合時、野生型よりも対称性の高い構造を形成していた。さらにヌクレオチドが結合することでクラウン構造が崩壊し、密な螺旋状複合体を形成していた。これらの結果から、野生型 A_3B_3 はクラウン構造の制約によって不安定な A_1B_1 ユニットを含んだ非対称で負荷のかかった構造を形成していることが示唆された。本研究によって回転分子モータータンパク質がどのようにして協働的に構造変化し、その機能を発揮しているのかについての根本原理についての新たな知見がもたらされた。

第三章 V₁-ATPase の回転における親和性変化モデル

V₁-ATPase についてこれまで結晶構造解析や一分子観察実験など様々な方法によって回転メカニズムモデルが提唱されてきた。だが、触媒ドメインである A₃B₃ 複合体の構造変化や、それに連動した DF 複合体の回転運動を生み出す駆動力が何によってもたらされているのかは、これまで明らかとされていなかった。そこで、本研究では、V₁-ATPase のサブユニット間の結合親和性の変化を表面プラズモン共鳴法によって測定した。A サブユニットに ATP が結合することで、A、B サブユニット間の親和性が高まり、ATP の結合は A₁B₁ ユニットの密な構造形成に寄与していることが明らかとなった。さらに、DF 複合体はチップ上にヌクレオチドを用いて再構成された密な構造をとる A₁B₁ ユニットと高い親和性で結合しており、DF 軸は A₃B₃ 複合体の中で 1 組の A₁B₁ ユニットに主に結合していることが示唆された。本研究によって、V₁-ATPase の回転メカニズムについて、熱揺らぎの中でそれぞれのサブユニット間の親和性が変化することで駆動されているという親和性変化モデルを構築することができた。回転分子モータータンパク質 V₁-ATPase は ATP の化学エネルギーを用いて、親和性を変化させ、熱揺らぎの中で運動の方向性を制御しながら、回転していることが示唆された。

第四章 V₁-ATPase の回転触媒機構の分子メカニズム

V₁-ATPase の ATP 加水分解メカニズムとしてこれまで、A₃B₃ 複合体における ATP 加水分解に伴う協同的な構造変化に伴い、DF 複合体が一方向に回転するという回転触媒機構が提唱されている。しかし、どのような分子メカニズムで回転触媒としての機能を発揮しているのかは明らかになっていなかった。そこで、本研究ではシステイン架橋による安定化変異体 (A_(S23C)B_(N64C) 複合体) を作製し、X 線結晶構造解析と高速 AFM 観察を組み合わせることによって、回転触媒機構の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。X 線結晶構造解析によって A_(S23C)B_(N64C) 複合体のそれぞれの ATP 加水分解ステップに相当する 3 種類の結晶構造が明らかとなった。さらに、高速 AFM 観察によって A_(S23C)B_(N64C) 複合体はヌクレオチドが 3 分子結合した状態と 2 分子結合した状態の 2 状態を遷移し、その構造変化が一方向性をもって協同的に回転伝搬している様子を捉えることができた。そして、結晶構造をスナップショットとして高速 AFM によって得られた回転ダイナミクスの動画に対応させることで、触媒ドメインである A₃B₃ 複合体の回転ダイナミクスについて分子レベルで詳細なメカニズムモデルを構築した。さらに、得られた A₃B₃ 複合体の回転メカニズムを軸が結合した V₁-ATPase の回転メカニズムと比較することで、V₁-ATPase を構成している A₃B₃ 複合体および DF 複合体それぞれの役割が回転触媒機構の中で担う役割が明らかとなった。

第五章 結語

本研究によって、*Enterococcus hirae* 由来の V_1 -ATPase の触媒ドメインである A_3B_3 複合体の非対称構造形成メカニズムが明らかとなり、さらに、 A_3B_3 複合体の回転触媒機構に伴う反応段階ごとの詳細な構造変化が分子レベルで明らかになった。今回得られた知見によって、 V_1 -ATPase をはじめとする複雑な四次構造を形成するタンパク質はそれぞれの構成サブユニット間での絶妙なバランスの中で、協同的に動作し機能を発揮していることが示唆された。このような複合体タンパク質の詳細な構造生物学的研究は、 V_1 -ATPase の性状の理解にとどまらず、タンパク質が複合体を形成して複雑な四次構造を形成するメカニズムの理解や、生体内におけるエネルギー変換メカニズムの解明に向けた大きな一歩であると考えられる。

目次

要旨

目次

第一章 緒言

第二章 V-ATPase 加水分解触媒ドメインの非対称構造形成メカニズム

第二章第一節 実験

第二章第二節 結果と考察

第二章第三節 結論

第三章 V_1 -ATPase の親和性変化モデル

第二章第一節 実験

第二章第二節 結果と考察

第二章第三節 結論

第四章 V_1 -ATPase の回転触媒機構の分子メカニズム

第二章第一節 実験

第二章第二節 結果と考察

第二章第三節 結論

第五章 結語

謝辞

参考文献

略称

第一章 緒言

F-, A-, V-ATPaseは回転分子モータータンパク質であり、協同的に機能するリング状の触媒ドメインを有し、ATP加水分解のエネルギーを利用してイオン輸送を行う (Fig. 1-1)^{1,2}。F-ATPaseは、ミトコンドリアや葉緑体においてATP合成を担う³。古細菌では、A-ATPaseがF-ATPaseのようにはたらく、その構造やサブユニット構成はV-ATPaseに類似する⁴。V-ATPaseは、真核生物の様々なオルガネラ膜や原核生物の細胞膜などに存在し、ATP加水分解反応と共役したカチオンポンプとして機能する^{1,5}。これらのATPaseは親水性の球状触媒ドメイン (F₁、A₁、V₁) とイオン輸送を担う疎水性の膜内在性ドメイン (F_o、A_o、V_o) から構成されている^{4,6}。これらのATPaseの回転触媒機構について、三次元構造や、一分子観察実験など様々な研究がなされてきたが、協同的構造変化メカニズムやエネルギー変換機構の解明には至っていない⁶⁻¹⁴。

V-ATPaseは細菌にも存在し、これまで *Enterococcus hirae* (*E. hirae*)由来のV-ATPaseについて発現精製系が確立され、研究が進められてきた^{5,15-20}。この酵素は生理的にNa⁺ポンプとして機能しており、真核生物由来のV-ATPaseと相同なアミノ酸配列を持った9つのサブユニットから構成されている²¹。V₁部分はA、B、D、Fが3:3:1:1のストイキオメトリで構成されており、A₁B₁ユニットがリング状に3組集合したA₃B₃複合体とその中心軸となるDF複合体から形成されている。A、BサブユニットはいずれもN末端側βバレルドメイン、中央部のα/βドメイン、C末端側ヘリカルドメインから構成されており、N末

端側βバレルドメインでの相互作用によってクラウン構造を形成し、 A_3B_3 複合体のリング構造を保持している(Fig. 1-2a-c)。 V_1 複合体は一分子観察によって、ATP 1分子の加水分解に対応してDF軸が 120° 回転することが確認されている回転分子モータータンパク質である^{22,23}。近年の報告により、この 120° 回転には F_1 -ATPase同様 40° 、 80° のサブステップが存在することが明らかとなっている²⁴。 V_1 -ATPaseでは各 A_1B_1 ユニットでATPを順次加水分解し、その際の構造変化によってDF軸および V_0 ローターリングへ回転運動が伝搬され、そのエネルギーを利用して濃度勾配に逆らって Na^+ を輸送すると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未だに明らかとされていない(Fig. 1-2d-f)⁵。

V -ATPaseにおいて一方向回転に重要な役割を果たしていると考えられる A_3B_3 複合体について、これまでにいくつかの結晶構造は明らかとなっている(Fig. 1-2)¹⁹。一般に、同一ペアのサブユニット(A_1B_1 ユニット)3組から組み上がる複合体は3回対称軸を有すると期待される。しかし、 A_3B_3 複合体は A_1B_1 ユニットが3組集合した六量体であるにもかかわらず、3回対称軸を持たない非対称構造を形成していることが明らかとなった(Fig. 1-2d)¹⁹。ヌクレオチド非結合時、 A_3B_3 複合体のそれぞれの A_1B_1 ユニットは、“empty”(ATP結合不可)、“bindable”(ATP結合可能)、“bound”(ATP結合時と同様)フォームを形成していた(以後 eA_3B_3 と表記)(Fig. 1-2d)¹⁹。また、AMP-PNP(ATPの非加水分解性アナログ)と共結晶化した構造では、“empty”、“bound”、“bound”フォームを形成し、3箇所存在するヌクレオチド結合部位のうち“bound”フォームの2箇所にはAMP-PNPが結合で

きないことが明らかとなった（以後 bA_3B_3 と表記）(Fig. 1-2e)¹⁹。こうした非対称構造を形成することが明らかとなったことで、 A_3B_3 複合体はヌクレオチドの結合解離に応じて協同的に非対称構造から別の非対称構造へ一方向的に変化し、ATP加水分解の順序を制御していることが示唆された。さらに、中心軸となるDF複合体の結合によっても A_3B_3 複合体の構造は非対称に変化し、 A_1B_1 ユニットはそれぞれ“empty”、“bound”、“tight”という構造を形成していた。軸と結合した A_1B_1 ユニットがとる密な“tight”フォームは回転触媒機構の中でATP加水分解を触媒すると考えられている。しかし、 A_3B_3 複合体の非対称構造が形成されるメカニズムや意義、そして、回転触媒中に非対称な構造変化が生じ、それが一方向的に伝播していくメカニズムについては、明らかになっていなかった。

第二章では、 A_3B_3 複合体の非対称構造形成メカニズムおよび、協同的構造変化メカニズムを明らかにするために、非対称構造が生じる要因となっていると考えられるクラウン構造における相互作用を弱めて各サブユニットの会合を弱めた $A_3B_{(L65Y)3}$ を作製した。本研究では、ヌクレオチド非存在下での結晶化スクリーニングを行い分解能 3.4Å でヌクレオチド非結合型 $A_3B_{(L65Y)3}$ の結晶構造を決定した。また、過剰量(6 mM)の AMP-PNP 存在下での $A_3B_{(L65Y)3}$ について、分解能 2.1 Å で AMP-PNP 結合型 $A_3B_{(L65Y)3}$ の構造を決定した。さらに野生型 A_3B_3 と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ の溶液中での構造を明らかにするため、野生型 A_3B_3 と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ それぞれについて HS-AFM 観察を行った。また変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ の生化学的性質を調べるために ATPase 活性測定を測定し野生型と比較した。

第二章ではこれらの実験結果に基づいて、V-ATPase が非対称な複合体を形成するメカニズム、ひいては、V-ATPase をはじめとするタンパク質が複雑な四次構造を形成する根本原理について議論する²⁵。

第三章では、 A_3B_3 複合体の構造を変化させ、 V_1 -ATPase の軸の回転を生み出している要因を明らかにするために、東京理科大学山登研究室、白石研究室との共同研究により、SPR 解析によってサブユニット間の親和性の変化を測定した。はじめに、ヌクレオチド存在下での A、B サブユニット間の結合親和性を測定した。次に、 A_1B_1 ユニットとヌクレオチドの見かけの親和性を測定した。これらの結果から、A、B サブユニット間の結合親和性は結合しているヌクレオチドの種類によって変化するということが示唆された。さらに、DF 複合体と密な“tight”フォームを形成している A_1B_1 ユニットの親和性は非常に高く、今回得られた知見から V_1 -ATPase の回転メカニズムについて親和性変化モデルを提唱する²⁶。

第四章では、 A_3B_3 複合体の非対称構造が回転触媒機構中にどのように構造変化していくのかを観察するために、システイン変異によって複合体を安定化した変異型 A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)}B_{(N64C)}$ 複合体) を作製し、金沢大学安藤研究室との共同研究により、 A_3B_3 複合体について高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いた回転観察実験を行った⁹。これによって観察された構造変化の HS-AFM 像に $A_{(S23C)}B_{(N64C)}$ 複合体についての結晶構造を詳細なスナップショットとして対応させることによって、回転触媒機構の詳細な構造変化

の遷移についての知見を得た。これらの構造生物学的知見と ATPase 活性測定等による生化学的な知見から、V-ATPase の回転触媒機構の分子メカニズムについて議論する。さらに、これまでの中心軸 DF が結合した V_1 -ATPase に関する研究と中心軸 DF が結合していない A_3B_3 複合体それぞれの ATP 加水分解触媒機構を比較することで、タンパク質超分子複合体のそれぞれの構成ユニット、 V_1 複合体、 A_3B_3 複合体、そして DF 複合体の役割について議論する。

本研究によって *E. hirae* 由来 V_1 -ATPase について、ATP の化学エネルギーの変換を担う触媒ドメイン A_3B_3 複合体の非対称構造形成メカニズムが明らかとなり、さらに、触媒ドメインによる回転触媒機構についてこれまでよりも詳細な分子メカニズムが明らかとなった。本研究によって得られた知見は、 V_1 -ATPase をはじめとする種々の分子モータータンパク質の協同的な動作機構の理解の手助けとなると考えられる。

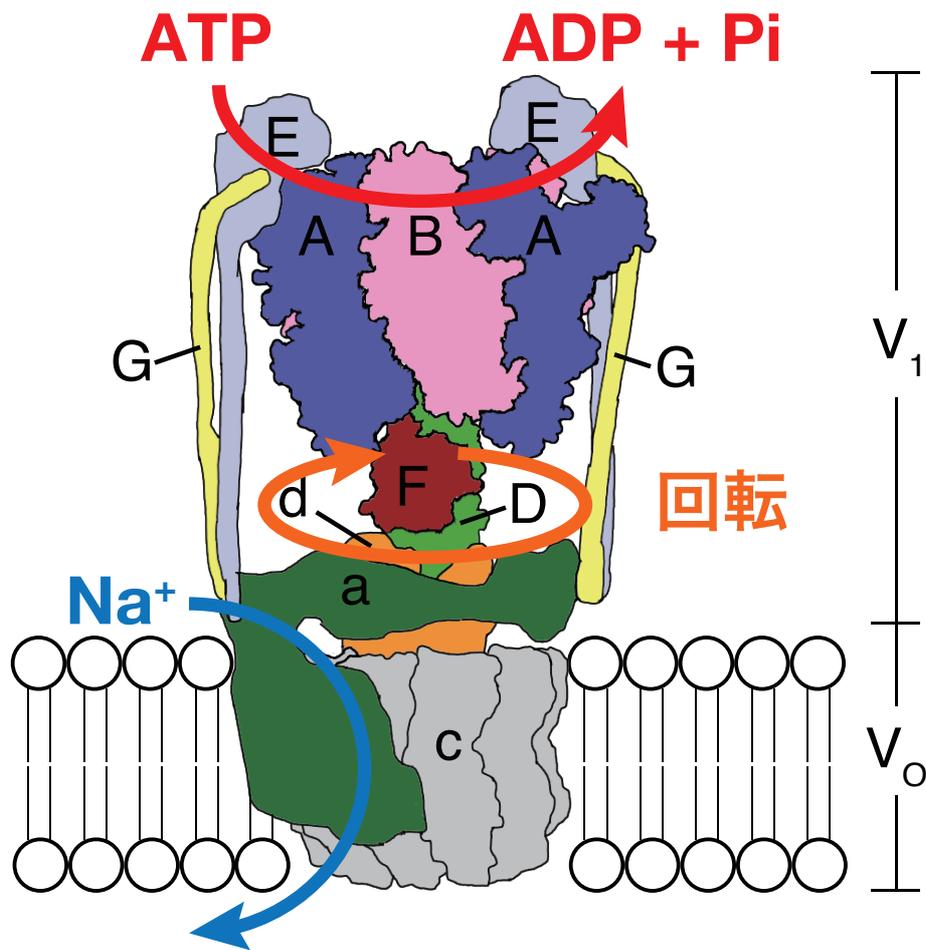


Fig.1-1 *Enterococcus hirae* 由来 V-ATPase の構造模式図

腸球菌 V-ATPase の構造を模式図で表した。腸球菌由来の V-ATPase は触媒ドメインである A₃B₃ 複合体で生じる ATP 加水分解反応に伴う構造変化で、DF 軸および V₀ ドメインを回転させ、その運動エネルギーによって、膜内在性ドメインである V₀ 複合体で濃度勾配に逆らって Na⁺ を輸送する膜間電気ポテンシャルを生み出す。

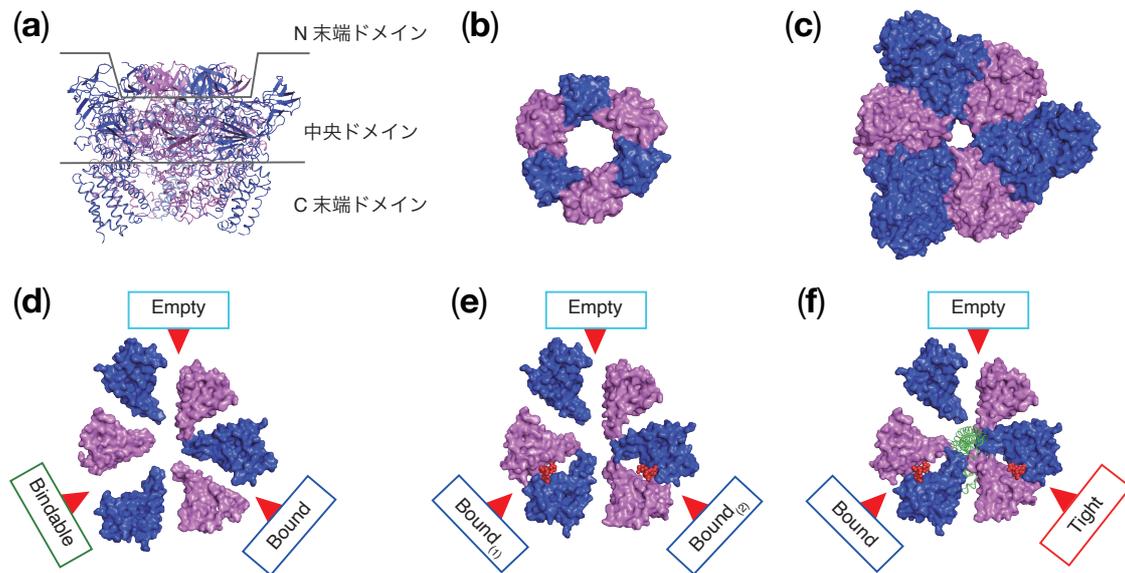


Fig. 1-2 A_3B_3 複合体および V_1 (A_3B_3DF) 複合体の結晶構造

(a) ヌクレオチド結合型 A_3B_3 複合体結晶構造の側面図。N 末端ドメイン(A サブユニット残基番号 1-71、B サブユニット残基番号 1-77)、中央ドメイン(A サブユニット残基番号 72-449、B サブユニット残基番号: 78-362)、C 末端ドメイン(A サブユニット: 残基番号 450-593、B サブユニット: 残基番号 363-458)の 3 領域で線引きした。A サブユニットを青、B サブユニットを紫で表した。(b-f) N 末端側 β バレルドメイン (クラウン構造) の上面図(b)、中央ドメイン(c)、ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の C 末端ドメイン(d)、AMP-PNP 結合型 A_3B_3 複合体の C 末端ドメイン(e)、AMP-PNP 結合型 V_1 複合体の C 末端ドメイン(f)を N 末端側から見てサーフェス表示。ヌクレオチド結合部位を赤い三角形で指し示した。結合した AMP-PNP 分子を赤の球体表示、DF 軸を緑で示した。

第二章 V-ATPase 加水分解触媒ドメインの非対称構造形成メカニズム

第二章第一節 実験

2.1.1 変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の発現・精製

A_3B_3 複合体の結晶構造に基づいて N 末端側 β バレルドメインの疎水性相互作用を弱めるような 1 残基変異を導入した変異体を作成した^{18,19,27,28}。PyMOL で eA_3B_3 の構造から変異導入の候補となる残基を選択し、いくつか変異遺伝子を作製してその代表として $A_3B_{(L65Y)_3}$ を用いた。

発現は理化学研究所生命機能科学研究センターとの共同研究によって大腸菌無細胞合成系を用い、 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体および $D_{(T60C/L67C)}F$ 複合体を発現させた^{6,12}。発現させた A_3B_3 複合体を含む溶液を、A バッファー(20 mM Tris-HCl、1 M NaCl、20 mM Imidazole; pH 8.5)で平衡化させた His Trap HP カラム (GE Healthcare) にあてがひ、His-tag の付いた A_3B_3 複合体を吸着させ、B バッファー (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、500 mM Imidazole; pH 8.0) で溶出させた。タグを取り除いたサンプルを得るために TEV プロテアーゼを加えて 4 °C で一晩反応させた。その後反応液を C バッファー(20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、20 mM Imidazole、2 mM dithiothreitol; pH 8.5)で一晩透析した。透析後の溶液を A バッファーで平衡化させた His Trap HP カラムにアプライし、B バッファーで溶出し、フロースルーを回収した。D バッファー(20 mM Tris-HCl、20 mM NaCl、2 mM dithiothreitol; pH 8.5)にバッファー交換し、D バッファーで平衡化した HiTrap Q HP カラ

ムで 20-1000 mM NaCl のグラディエント溶出を行った。

A_3B_3 および $A_3B_{(L65Y)_3}$ は E バッファー (20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol; pH 7.5) で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムを用いて精製した。得られた精製標品は Amicon Ultra-15 10000MWCO フィルターで濃縮した。

$D_{(T60C/L67C)}F$ は F バッファー (20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol; pH 8.0) で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 75 pg カラムを用いて精製した。得られた精製標品は Amicon Ultra-15 3000MWCO フィルターで濃縮した。

2.1.2 電子顕微鏡観察と画像処理

精製した A_3B_3 複合体および $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体をグロー放電カーボンコーティングされた銅グリッド上に分注した。それぞれのグリッドを 2.0% (w/v) の酢酸ウラニルでネガティブ染色した。顕微鏡画像は 200 kV で FEI Tecnai G2 F20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) を使用して電子直接検出機 (FEI Falcon II) を用いて収集した。粒子画像を EMAN2 パッケージの e2boxer.py を用いて 2D クラス平均化し、RELION ソフトウェアで加工した^{30,31}。

2.1.3 ATPase 活性測定

A_3B_3 複合体および $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体 (10 mg/mL) を G バッファー (100 mM MES, 5 mM $MgSO_4$, 100 mM NaCl, 10% glycerol; pH 6.0) 中で DF 複合体 (5 mg/mL) と氷上でインキュ

べートし、 A_3B_3DF 複合体として再構成させた¹⁸。 A_3B_3 および、再構成された A_3B_3DF 複合体の ATPase 活性は ATP 再生系を用いて測定した^{19,20}。反応溶液は 1 mM ATP/MgSO₄、2.5 mM phosphoenolpyruvate、50 μg/mL pyruvate kinase、50 μg/mL lactate dehydrogenase、0.2 mM β-NADH (dipotassium salt)、そして 2 μg または 20 μg の A_3B_3 もしくは $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体を含む。ATP 加水分解反応を ATP/MgSO₄ の添加で開始し、340 nm での吸光度の減少を計測した。

2.1.4 HS-AFM 観察

HS-AFM 観察を行うために、金沢大学安藤研究室と共同研究を行い、 A_3B_3 複合体を ATPES とグルタルアルデヒドで処理して固定化した。マイカ基板を使用直前に切り出し、ATPES を超純水で 10 万倍希釈した後に 3 分間マイカ基板上でインキュベートした。さらに、0.025%のグルタルアルデヒドを 3 分間インキュベートし、マイカ基板を作成した。その後マイカ基板を観察溶液(20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 2mM DTT and 10 % glycerol)で数回洗浄した。その後 A_3B_3 、もしくは $A_3B_{(L65Y)3}$ を 5 分間インキュベートし、観察溶液で数回洗浄した後、3-5 frame/sec、測定範囲を 50 nm × 50 nm (150 px × 150 px)または 50 nm × 40 nm (150 px × 120 px)で HS-AFM 観察を行った^{32,33}。

2.1.5 結晶化

296 K でのシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて全ての結晶化を行った。得られた結晶は glycerol 濃度を 20-22.5%まで高めたクライオ溶液にソーキング後、クライオロープ(Hampton Research)ですくい取り、液体窒素で瞬間冷却した^{19,20}。

ヌクレオチド非結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 溶液(10 mg/mL in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol)と結晶化溶液(0.1 M NaCl, 0.1 M ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris propane, pH 6.5, and 28% (w/v) PEG 3350)を 0.3 μ L ずつ等量混合し、結晶を成長させた。

2.1.6 X 線回折実験と結晶構造解析

全ての X 線回折像は極低温で単結晶から収集した^{19,20}。

$A_3B_{(L65Y)_3}$ ヌクレオチド非結合型：X 線回折実験は Photon Factory (茨城県) の BL-17A ($\lambda=0.98$ Å)で行った^{34,35}。得られた回折像は XDS で 3.4 Å までスケーリングした^{36,37}。構造は MOLREP を用いて eA_3B_3 (PDB ID: 3VR2)をサーチモデルとして分子置換した³⁸。Coot で分子構築を行い³⁹、REFMAC5⁴⁰ や PHENIX⁴¹ を用いて構造精密化を行った。精密化後の構造の評価には RAMPAGE を用いた⁴²。全ての r.m.s.d.は C_α 原子で計算した。構造の作成には PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 & Version 2.4, Schrodinger, LLC.)を用いた。コンタクトサーフェスの計算には PDBePISA を用いた⁴³。

$A_3B_{(L65Y)_3}$ AMP-PNP 結合型：前任者により、Photon Factory (茨城県) の BL-1A ($\lambda=1.1$ Å)で、回折像が得られていた。得られた回折像を基に 2.1 Å までスケーリングした^{36,38}。

本研究では、MOLREP を用いて bV1(PDB ID: 3VR6)をサーチモデルとして分子置換した。Coot で分子構築を行い³⁹、REFMAC5⁴⁰や PHENIX⁴¹を用いて構造精密化を行った。精密化後の構造の評価には RAMPAGE を用いた⁴²。全ての r.m.s.d.は C_α原子で計算した。構造の作成には PyMOL および Chimera を用いた⁴⁴。コンタクトサーフェスの計算には PDBePISA を用いた⁴³。

2.1.7 その他の方法

タンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories)を用い、BSA をスタンダードとして決定した。SDS-PAGE は Laemmli らの方法⁴⁵に従い、ゲルは CBB で染色した。

第二章第二節 結果と考察

2.2.1 A_3B_3 複合体および $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の発現精製と ATPase 活性測定

E. hirae A_3B_3 複合体のクラウン構造を弱めるために、三次元構造に基づいて各 A_1B_1 ユニットが疎水性相互作用している部位に変異を導入した。B サブユニットの 65 番目のロイシンをより親水性が高く嵩高いチロシンへと置換した。L65Y 変異 B サブユニットはクラウン構造での疎水性相互作用が弱まっているために、複合体としての会合能が低下していると予想された。我々は変異型 B サブユニットと野生型 A サブユニットを大腸菌無細胞合成系にて発現させ、野生型と同様に精製を行った(Fig.2-1a-c)。変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体はクラウン構造が弱まっているにも関わらず野生型 A_3B_3 複合体と同様に精製された。さらに、溶液中における複合体の構成サブユニットのストイキオメトリーを調べるために、理化学研究所生命機能科学研究センターとの共同研究により、Tecnai F20 を用いてネガティブ染色電子顕微鏡観察を行った。それによって A、B サブユニットは野生型変異型ともに 3:3 のストイキオメトリーで複合体を形成していることが確認された(Fig.2-2)。

精製された A_3B_3 複合体および $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の ATPase 活性を測定した(Fig. 2-1d)。結果、変異体の反応初速度は野生型の 40%ほどに低下していた。その後、変異体の反応速度は急速に低下していった。次に DF 複合体とインキュベートして A_3B_3DF として再構成すると、野生型では比活性が 2.8 倍に上昇し、 V_1 複合体として再構成されているこ

とが示唆された。 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体も同様に DF 複合体のインキュベーションによる活性の上昇がみられ、DF 複合体との結合能は失われていないことが示された。しかし、野生型ほど活性は上昇せず、また時間経過で活性を喪失していくことが明らかとなった。これらの結果から、 $A_3B_{(L65Y)_3}$ は DF 軸との結合能を保持しているが、不安定化していることが示唆された。

2.2.2 HS-AFMを用いた野生型 A_3B_3 と変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ の構造比較

HS-AFMはタンパク質や核酸、細胞、オルガネラ等の構造や動きを可視化する装置であり、本研究では金沢大学の安藤研究室との共同研究により、野生型 A_3B_3 と変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ の溶液中におけるヌクレオチド非存在下での構造をHS-AFMによって観察した(Fig.2-3a)^{46,47}。 A_3B_3 、 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体をグルタルアルデヒドで固定化した後にAPTESで処理したマイカ基板上に流すことで、電荷相互作用によりN末端領域が基板にトラップされ、 A_3B_3 複合体および $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体のC末端側を観察することができた(Fig. 2-3b, c)。X線結晶構造解析によりAサブユニットはBサブユニットよりも大きさが大きい (Aサブユニットの方がBサブユニットよりも約140残基長い) ため、野生型、変異体ともにAサブユニットに相当する3点の明るい輝点が観察された(Fig.2-3d-g)。A、Bサブユニットの高さの差は野生型 A_3B_3 複合体では0.1-0.5 nm、変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体では0.55 nmであった。HS-AFM観察におけるノイズを低減するためにそれぞれの分子についてHS-

AFM画像の平均化処理を行った。Fig. 2-3e, gにコントラストを強くした像を示した。コントラストを強くすることで、野生型 A_3B_3 複合体の1つのAサブユニットが低く（暗く）観察された。野生型 A_3B_3 複合体では最も高いAサブユニットと最も低いものではその高さに 0.3 ± 0.1 nmの差があった。これは野生型 A_3B_3 複合体が水溶液中でも結晶中と同様に非対称構造を形成していることを強く示唆するものと考えた¹⁹。これに対して変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体では3つのAサブユニットの高さに明確な差がなく、水溶液中で対称性が向上していることが示唆された。BサブユニットのL65Yの変異によってA、Bサブユニット間の相互作用を弱まり、 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体はより対称性の高い構造を形成するようになったと考えられた。

2.2.3 ヌクレオチド非結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の X 線結晶構造解析

変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ の詳細な立体構造を決定するために結晶化を行い(以後 $eA_3B_{(L65Y)_3}$ と表記)、X 線結晶構造解析によって分解能 3.4 Å で結晶構造解析を行った (Table 2-1; PDB ID: 5ZEA)。 $eA_3B_{(L65Y)_3}$ は結晶格子中でヌクレオチド非結合時の野生型 A_3B_3 複合体 (以後 eA_3B_3 と表記)に類似したヘテロ六量体としての全体構造を形成していた(Fig.2-4a-c)。単位胞に 2 分子の六量体が含まれており、それぞれ $eA_3B_{(L65Y)_3}$ -1 (chain A-F)、 $eA_3B_{(L65Y)_3}$ -2 (chain G-L)と分別する。これら 2 分子の構造はよく似ていた(r. m. s. d. = 1.30)ため、以後全ての図、議論には $eA_3B_{(L65Y)_3}$ -1 のデータを用いた。

変異を導入した B サブユニットの 65 番目の残基にはチロシン残基に相当する電子密度がみられ、野生型 A_3B_3 複合体の変異導入前のロイシン残基と重ね合わせると変異箇所
の残基の角度が変化し、この部分の疎水性相互作用が失われていることが示唆された
(Fig. 2-5)。この変異により留め金としての負荷が緩み、各サブユニットの会合が弱まっ
て C 末端側がより開いた構造を示していると考えられた。(Fig. 2-4c)。 $eA_3B_{(L65Y)3}$ の 3 つ
の A、B サブユニットの構造はそれぞれよく似た構造を形成していた(Fig. 2-4d-f)。野生
型 A_3B_3 複合体はヌクレオチド非結合時それぞれの A_1B_1 ペアがそれぞれ“empty”、
“bindable”、“bound”フォームを形成し、非対称構造を形成していたのに対し、 $eA_3B_{(L65Y)3}$
は HS-AFM で観察されたようにそれぞれの $A_1B_{(L65Y)1}$ ペアが開いた対称構造を形成して
いた(Fig. 2-3d-g)。RMSD 値(Table 2-2)、接触表面積(Table 2-3)、そしてヌクレオチド結合
部位の構造を比較(Fig. 2-6)したところ、 $eA_3B_{(L65Y)3}$ の 3 つの $A_1B_{(L65Y)1}$ ユニットは全て、
 eA_3B_3 における“bindable”フォームによく類似していた。 A_1B_1 ユニットのヌクレオチド
結合部位は、A サブユニットの保存された P ループ(リン酸結合ループ:GXXXXGKT(S))、
アーム部分 (261-275 残基: 構造変化を起こす α ヘリックス)、また B サブユニットの
Arg350 (ATPase における Arg-finger) からなり、 $eA_3B_{(L65Y)3}$ の 3 組の $A_1B_{(L65Y)1}$ ペアは、
 $eA_3B_{(L65Y)3}$ の“bindable”フォームをとる A_1B_1 ペアと同程度まで開いて、A サブユニット
のアーム部分の Arg262 が B サブユニットの Arg350 と離れていた。全体として、
 $eA_3B_{(L65Y)3}$ はより開いて、完全対称ではないが対称性の高い構造を形成していた(Fig. 2-

4f, Fig. 2-6)。

これまでの研究や本研究での結果より、 β バレルドメインにおけるクラウン構造の留め金としての強さが弱まり、負荷が小さくなった場合の A_1B_1 ユニットはヌクレオチド非結合時、“bindable”フォームを基底構造として形成する傾向にあると示唆された。変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体で留め金が弱まっているために、 A_1B_1 ユニット間の接触表面積は約 2700 \AA^2 で野生型とほとんど差がないが、 A_1B_1 ユニット内での接触表面積が野生型 A_3B_3 複合体の 4837.0 \AA^2 から変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の 4547.3 \AA^2 に減少し、複合体への拘束が緩み、C 末端側がより開いて 3 組全ての A_1B_1 ユニットが“bindable”フォームを形成することができたと考えられる(Table 2-4)。

2.2.4 AMP-PNP 結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の結晶構造

次に $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体に AMP-PNP が結合した際の詳細な構造を得るため、過剰量(6 mM)の AMP-PNP 存在下で $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の結晶化を試み(以後 $bA_3B_{(L65Y)_3}$ と表記)、分解能 2.1 \AA で分子置換法によって結晶構造を決定した(Table 2-1, Fig. 2-7; PDB ID 5ZE9)。

得られた結晶構造は見た目には 2 分子の AMP-PNP が結合した野生型 A_3B_3 複合体 (bA_3B_3 と表記)と同じく六量体を形成していたが、クラウン構造に変異を導入した 3 箇所のうち 1 箇所においてクラウンが切断され、3 つの A_1B_1 ペア単位が螺旋状に連なった螺旋状六量体であった(Fig. 2-7a-d)。電子密度マップで示すように(Fig. 2-8)、3 組全て

の $A_1B_{(L65Y)_1}$ ユニットのヌクレオチド結合部位には AMP-PNP とマグネシウムイオン (Mg^{2+}) が結合していた。2 組の $A_1B_{(L65Y)_1}$ ユニットに結合している AMP-PNP のリン酸の電子密度が他の 1 組のそれよりも弱いのは、AMP-PNP が部分的に加水分解を受けているからであると考えられた。AMP-PNP は弱酸性条件では AMP-PN とリン酸イオンへと分解を受ける性質があり、結晶化条件の pH6.0 の溶液中で AMP-PNP と加水分解を受けて AMP-PN となった分子が結晶中で共に存在していたためであると考えられた。

結合したヌクレオチドは A サブユニットの P ループの 238 番リジン、アーム部分の 262 番アルギニン、B サブユニットの 350 番アルギニンと相互作用する¹⁹⁾。3 組中 2 組の $A_1B_{(L65Y)_1}$ ユニットでは、350 番アルギニンの $C\alpha$ 原子が結合しているヌクレオチドに bA_3B_3 の“bound”フォームよりも約 1.2 Å 接近しており、より強く相互作用していた (Fig.2-8)。この差は接触表面積の差 (Table2-3) や RMSD 値の差 (Table2-5) にも現れていた。

このような A、B サブユニットが密に相互作用した構造は、これまで V_1 複合体において DF 軸と相互作用していた A_1B_1 ユニットの“tight”フォームでのみみられていた構造に相当する。RMSD 値やヌクレオチド結合部位の構造を“tight”フォームと比較すると、 $bA_3B_{(L65Y)_3}$ の 2 組の $A_1B_{(L65Y)_1}$ ユニットは“tight”フォームとよく似ていた (Table2-5, Fig. 2-9)。これらの結果から、AMP-PNP は A_1B_1 ユニットを閉じさせる接着剤のようにはたらく、AMP-PNP が結合した A_1B_1 ユニットは安定な基底構造として“tight”フォームを形成することが示唆された。密に閉じて“tight”フォームを形成しようとする作用は非常に強

く、変異導入によって弱まった留め金は 3 箇所全てのヌクレオチド結合部位に AMP-PNP が結合して構造が収縮しようとする際の負荷に耐え切ることができない。その結果、留め金は負荷を逃そうと割れて、クラウン構造が崩壊した螺旋状構造を形成したのだと考えられた(Fig. 2-7a)。bA₃B_{(L65Y)3} の“bound”フォームは、クラウン構造の切れ目で形成されており、切れ目の反対に位置する A₁B_{(L65Y)1} ユニットとの相互作用と負荷によって生じた構造であり、“tight”フォームよりも不安定な構造であると考えられる。

2.2.5 A₃B₃ 複合体の非対称構造形成メカニズム

一般に同一ユニットが複数集合して形成される複合体は、対称軸を有した対称構造を示すと考えられる。ところが、ヌクレオチド非存在下の A₃B₃ 複合体はβバレルドメインでクラウンが形成された非対称な六量体構造を形成していた。本研究では、HS-AFM によってヌクレオチド非結合時野生型 A₃B₃ 複合体が非対称な六量体を形成し、変異型 A₃B_{(L65Y)3} 複合体はより対称性の高い構造を形成していることが明らかとなった。そして、X 線結晶構造解析によって、対称性の高い A₃B_{(L65Y)3} 複合体はヌクレオチド非存在下では全ての A₁B₁ ユニットが“bindable”フォームを形成していることが明らかとなった。これらの結果から、ヌクレオチド非結合状態の A₃B₃ 複合体における A₁B₁ ユニットは“bindable”フォームを基底構造として形成する傾向にあることが示唆された。さらに、AMP-PNP が結合した A₃B_{(L65Y)3} 複合体はクラウン構造が崩壊して密に閉じた螺旋状六量体を形成することが明らかとなった。このことから、AMP-PNP が結合した A₃B₃ 複合体における A₁B₁ ユニットは“tight”フォームを安定な基底構造として形成することが示唆された。

これまで得られた結果に基づいて、なぜ、どのように V-ATPase の A₃B₃ 複合体がヌクレオチド非存在下で非対称構造を形成していたのか、その理由を解明することはタンパク質が協同的に動作するメカニズムを知る上で重要である。A₃B_{(L65Y)3} 複合体の変異が導入されたクラウン構造は留め金としての作用が弱まっており、中央ドメインにおける

A、B(L65Y)サブユニットの接触が軽減され、それによって生じていた負荷が低減される。それによって全ての $A_1B_{(L65Y)_1}$ ユニットが基底構造である“bindable”フォームを形成する(Fig.2-10a)。野生型 A_3B_3 複合体の留め金による拘束は強く、リング状複合体のリング径や構造が厳しく制限されている。そのため、 A_3B_3 複合体は強い負荷がかかった中央ドメインで密に閉じてA、Bサブユニットが接触した構造を形成する(Fig. 2-10b)。もし、それぞれの A_1B_1 ユニットやA、Bサブユニットがその構造を柔軟に、そして任意に変化させることができるのであれば、六量体は強い負荷がかかった中でも対称構造を形成すると考えられる。ところが、 A_1B_1 ユニットは eA_3B_3 や bA_3B_3 で見られるように、離散的にしか構造を変化させることができない。そのため、 A_1B_1 ユニットが A_3B_3 複合体として集合する際に、それぞれが閉じたり開いたりして全体として非対称構造を形成する。この時、野生型 A_3B_3 複合体は留め金による拘束によって、それぞれの A_1B_1 ユニットが開いた基底構造である“bindable”フォームと閉じた不安定構造である“empty”フォームや“bound”フォームを形成した準安定状態が生み出されるのであると考えられる (Fig. 2-10b)。

AMP-PNP 結合時、 A_1B_1 ユニットは“tight”フォームを形成する傾向にある。変異導入によって弱まった留め金では、3組の A_1B_1 ユニットが“tight”フォームを形成しようとする際の収縮の負荷に耐えきれずに、クラウン構造の一部が崩壊して $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体は螺旋状六量体を形成する(Fig. 2-10c)。野生型 A_3B_3 複合体は留め金がリング径やリング

構造を維持するには十分に強いため、中央ドメインによる接触によって負荷がかかって
もリング状六量体の構造を維持することができる。その代わりに、1組の A_1B_1 ユニッ
トは結合していたヌクレオチドを解離して“empty”フォームを形成する。ヌクレオチド
を解離した A_1B_1 ユニットは、留め金によってリング径が厳しく制約されているために、
より開いた“bindable”フォームを形成することはできず、少しだけ閉じた“empty”フォー
ムを形成する。ヌクレオチドが結合した2組の A_1B_1 ユニットもリング径の制約を受け
て密に閉じた“tight”フォームではなく、少しだけ開いた“bound”フォームを等価に形成
する。この時、ヌクレオチドを解離した A_1B_1 ユニットが“bindable”フォームや“bound”
フォームではなく、“empty”フォームを形成することには機能面でメリットが存在する。
“empty”フォームはヌクレオチドに対する親和性が低く、ATP や AMP-PNP が結合する
ことができないが、もし、“bindable”フォームや“bound”フォームが形成された場合、そ
こにヌクレオチドが結合してしまうために、3分子めの ATP が結合してしまうこととな
り、六量体の構造が収縮して崩壊してしまう。野生型の留め金は強く、リングに制約を
かけるため、“bindable”フォームではなく“empty”フォームを形成させることで、クラウ
ン構造が崩壊してしまうことが防がれている。このように、留め金は複合体全体の構造
やその振る舞いを制約しており、その様はまるで西遊記に登場する孫悟空の頭の輪、緊
箍児のようである。(物語の中で、孫悟空が悪事をはたらこうとすると頭の輪が締め、
正しい行動をとらせようとする。) V_1 -ATPase のように協同的に動作するタンパク質が

複雑な四次構造を形成する必要があるのは、このように、複合体に負荷を内包した準安定状態を生み出すためであるという可能性が考えられる。

第二章第三節 結論

A_3B_3 複合体に軸が結合した V_1 -ATPase では、それぞれの A_1B_1 ユニットは、ヌクレオチドの結合にかかわらず“empty”、“bound”、“tight”の構造をとる。“empty”フォームと“bound”フォームは上述の通り、負荷によって生み出された不安定構造であると考えられる。 V_1 -ATPase は、負荷によって生じる準安定状態の間を遷移しながら構造変化することで協同的な機能を発揮することができるということが示唆された²⁵。また、バクテリア由来 V_1/A_1 -ATPase や F_1 -ATPase だけでなく、真核生物由来 V_1 -ATPase や F_1 -ATPase も同様に非対称構造を形成することから、その他の ATP 加水分解酵素も同様のメカニズムで協同的な機能を発揮していると推察される。回転分子モータータンパク質はいくつかの非対称な準安定状態を遷移しながら、決して最安定構造に落ち着くことができずに構造変化し続けることで、ATP 加水分解の機能を発揮し続けられるのだと考えられる。本研究によって、複合体内部に負荷を内包するメカニズムは複雑な四次構造を形成するタンパク質が、協同的に機能を発揮することができることの根本原理なのであるということが示唆された。

Table 2-1 A3B)L65Y3 複合体のデータ収集・精密化の統計値

	eA ₃ B _(L65Y) ₃	bA ₃ B _(L65Y) ₃
Data collection		
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions		
Unit cell a, b, c (Å)	180.84, 107.77, 193.37	105.37, 151.37, 235.49
Unit cell α, β, γ (°)	90, 99.39, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50-3.38 (3.58-3.38)	60-2.10 (2.23-2.10)
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	0.102 (0.610)	0.124 (0.837)
Mean <i>I</i> / σ(<i>I</i>)	12.23 (2.01)	11.32 (2.11)
Completeness (%)	99.1 (95.9)	99.5 (97.5)
Redundancy	3.9 (2.6)	6.6 (6.2)
Refinement		
Resolution (Å)	48.20-3.38	54.87-2.10
No. reflections	1017960	218240
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.2151/0.2575	0.1659/0.1955
No. atoms		
Protein	47887	24467
Ligand/ion	0	342
Water	100	1299
<i>B</i> -factors		
Protein	108.80	38.63
Ligand/ion	-	54.25
Water	53.43	40.55
R.m.s. d.		
Bond lengths (Å)	0.002	0.006
Bond angles (°)	0.435	0.774
Ramachandran favoured (%)	98.0	98.7
Ramachandran allowed (%)	1.9	1.3
Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0
PDB ID	5ZEA	5ZE9

Table 2-2 eA₃B_(L65Y)₃ のそれぞれの A₁B₁ ユニットを A₃B₃ 複合体および V₁ 複合体と重ね合わせた際の RMSD 値

構造	フォーム	eA ₃ B _(L65Y) ₃		
		Bindable ₍₁₎	Bindable ₍₂₎	Bindable ₍₃₎
eA ₃ B ₃	Empty	1.30	1.65	2.29
	Bindable	1.02	0.88	1.21
	Bound	3.58	3.26	2.87
bA ₃ B ₃	Empty	1.33	1.60	2.16
	Bound ₍₁₎	3.84	3.59	3.35
	Bound ₍₂₎	4.01	3.76	3.52
bV ₁	Empty	1.56	1.83	2.39
	Bound	4.12	3.85	3.54
	Tight	4.79	4.61	4.48
eA ₃ B _(L65Y) ₃	Bindable ₍₁₎	0	0.75	1.46
	Bindable ₍₂₎	0.75	0	1.14
	Bindable ₍₃₎	1.46	1.14	0

計算は全て C α 炭素原子に対して行った。

Table 2-3 各 A₁B₁ フォーム中の A、B サブユニット間の接触表面積(Å²)

構造	フォーム	接触表面積(Å ²)
eA ₃ B ₃	Empty	2243.2
	Bindable	1812.7
	Bound	2293.7
bA ₃ B ₃	Empty	2379.9
	Bound ₍₁₎	2448.2
	Bound ₍₂₎	2560.6
bV ₁	Empty	2291.0
	Bound	2488.0
	Tight	3130.7
eA ₃ B _(L65Y) ₃	Bindable ₍₁₎	1998.6
	Bindable ₍₂₎	1959.1
	Bindable ₍₃₎	1982.4
bA ₃ B _(L65Y) ₃	Tight ₍₁₎	3026.5
	Bound	2265.0
	Tight ₍₂₎	2923.4

Table 2-4 A₃B₃ 複合体中央ドメインにおける接触表面積(Å²)

構造	接触表面積(Å ²)	
	A ₁ B ₁ ユニット内	A ₁ B ₁ ユニット間
eA ₃ B ₃	4837.0	2662.4
bA ₃ B ₃	5561.0	2809.0
eA ₃ B(L65Y) ₃	4547.3	2772.1
bA ₃ B(L65Y) ₃	5717.0	2596.1

中央ドメインでのA、Bサブユニット間の接触表面積の和を示した

Table 2-5 bA₃B_(L65Y)₃ のそれぞれの A₁B₁ ユニットを A₃B₃ 複合体および V₁ 複合体と重ね合わせた際の RMSD 値

構造	フォーム	bA ₃ B _(L65Y) ₃		
		Tight ₍₁₎	Bound	Tight ₍₂₎
eA ₃ B ₃	Empty	4.70	4.17	4.76
	Bindable	4.79	3.98	4.84
	Bound	2.35	1.53	2.39
bA ₃ B ₃	Empty	4.52	3.98	4.55
	Bound ₍₁₎	1.75	0.94	1.81
	Bound ₍₂₎	1.63	0.92	1.69
bV ₁	Empty	4.54	4.01	4.59
	Bound	1.69	1.00	1.74
	Tight	0.91	1.63	0.59
eA ₃ B _(L65Y) ₃	Bindable ₍₁₎	4.75	3.99	4.80
	Bindable ₍₂₎	4.54	3.76	4.60
	Bindable ₍₃₎	4.39	3.52	4.44
bA ₃ B _(L65Y) ₃	Tight ₍₁₎	0.00	1.54	0.79
	Bound	1.54	0.00	1.55
	Tight ₍₂₎	0.79	1.55	0.00

計算は全て C α 炭素原子に対して行った。

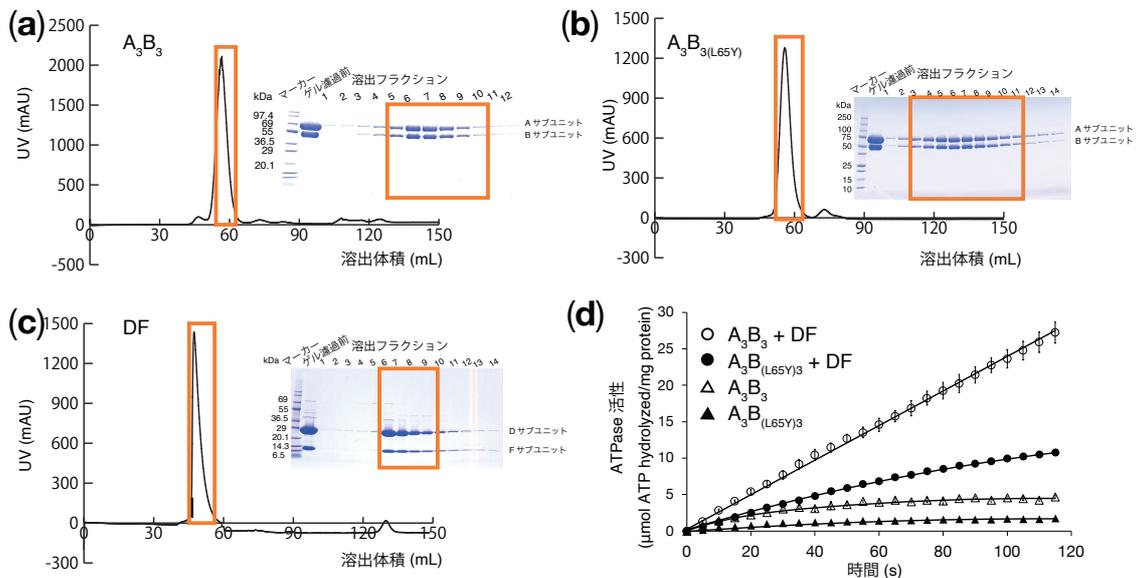


Fig. 2-1 A_3B_3 複合体、 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体、DF 複体の精製と ATPase 活性測定

(a-c) HiLoad 16/60 Superdex 200 pg(a, b)または HiLoad 16/60 Superdex 75 pg (c)カラムを用いたゲル濾過プロファイル (A_3B_3 (a)、 $A_3B_{(L65Y)3}$ (b)、DF (c))。精製フラクションの SDS-PAGE 結果を右に示した。ゲル濾過フラクションの四角で囲った部分が SDS-PAGE の四角で囲った部分に対応している。(d) 精製標品の ATPase 活性を ATP 再生系によって測定した。23°C で 340 nm での吸光度から NADH の酸化率を算出し、ATP 加水分解量を求めた。野生型の A_3B_3 複合体は活性が低いですが DF 複体の添加によって V_1 複合体として再構成され、活性が上昇している。変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体は非常に活性が低いですが、野生型と同様 DF 複体の添加によって活性が上昇する。標準誤差をグラフ中にバーで表示した。

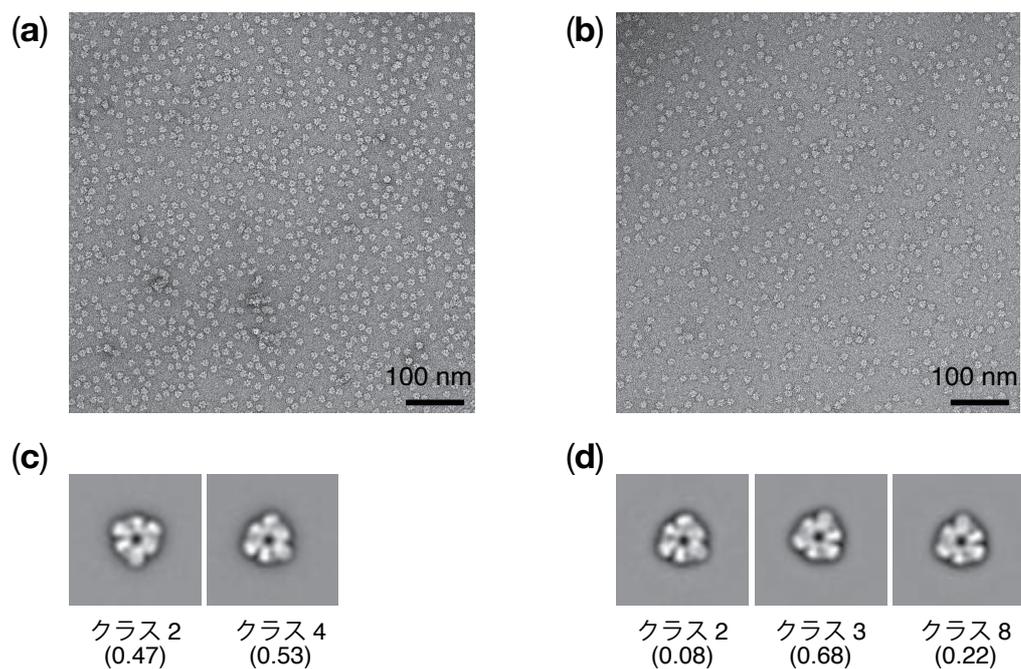


Fig. 2-2 野生型および変異型 A_3B_3 複合体のネガティブ染色電子顕微鏡画像

野生型 A_3B_3 複合体(a)と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体(b)のネガティブ染色電子顕微鏡画像を示した。スケールバーは 100 nm に対応している。手動で粒子を選び、野生型について 12 画像から 5097 粒子、変異型については 60 画像から 15933 粒子を選び出した。野生型 A_3B_3 複合体(c)と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体(d)の 2D クラス分けを行い、2 つもしくは 3 つのクラスに分けられた。

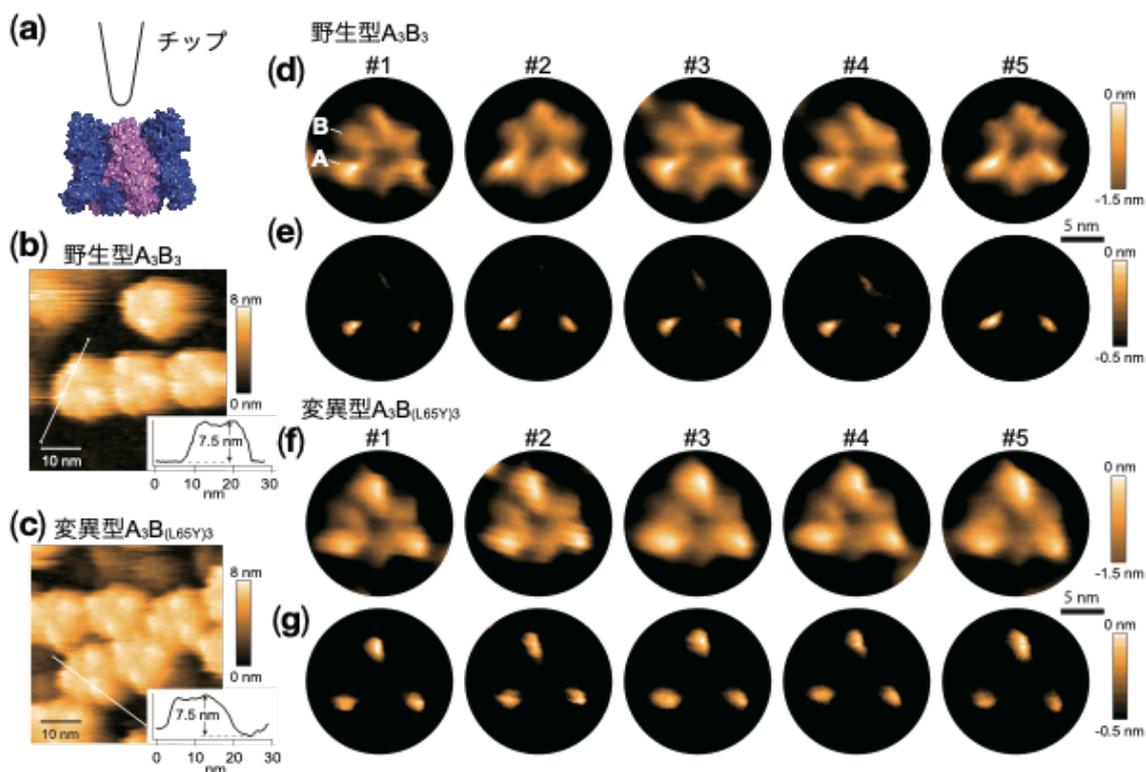


Fig. 2-3 野生型および変異型 A_3B_3 複合体の高速 AFM 画像

(a) 高速 AFM を用いた A_3B_3 複合体の観察の模式図を N 末端ドメインを下に向けた側面図で表した。カンチレバー先端にチップが付けられている。(b, c)野生型 A_3B_3 複合体(b)と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体(c)の高速 AFM 画像で $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ の範囲を表示している。白線部分の高さ情報を示したプロファイルを挿入図として示した。(d, e)野生型 A_3B_3 複合体の平均化画像を高さのカラーテーブルのコントラストを変更した図とともに 5 分子掲載している。(d)の#1 に A サブユニット (高いサブユニット) と B サブユニット (低いサブユニット) を示した。(f, g)同様に変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体の平均化画像を掲載した。

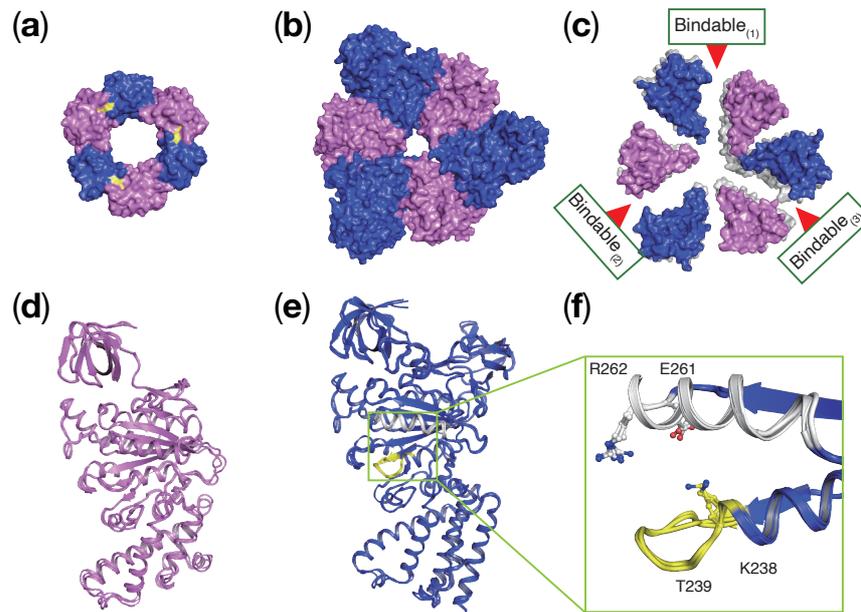


Fig. 2-4 ヌクレオチド非結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の結晶構造

(a) ヌクレオチド非結合型変異 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の N 末端 β バレルドメイン (クラウン構造) の上面図。変異導入箇所を黄色で示した。(b) ヌクレオチド非結合型変異 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の中央ドメインの上面図。(c) ヌクレオチド非結合型変異 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の C 末端ドメインをヌクレオチド非結合型野生型 A_3B_3 複合体“bindable”フォーム (chain B & E) の N 末端ベータバレルドメインで重ね合わせた上面図。(d, e) ヌクレオチド非結合型変異 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の A サブユニット (青色) と B サブユニット (紫色) をそれぞれ $C\alpha$ 原子で重ね合わせた構造。P ループを黄色、アーム領域を白色で表示している。緑色の枠はヌクレオチド結合部位を示している。(f) e の緑色の枠部分に対応するヌクレオチド結合部位をズームインした図。

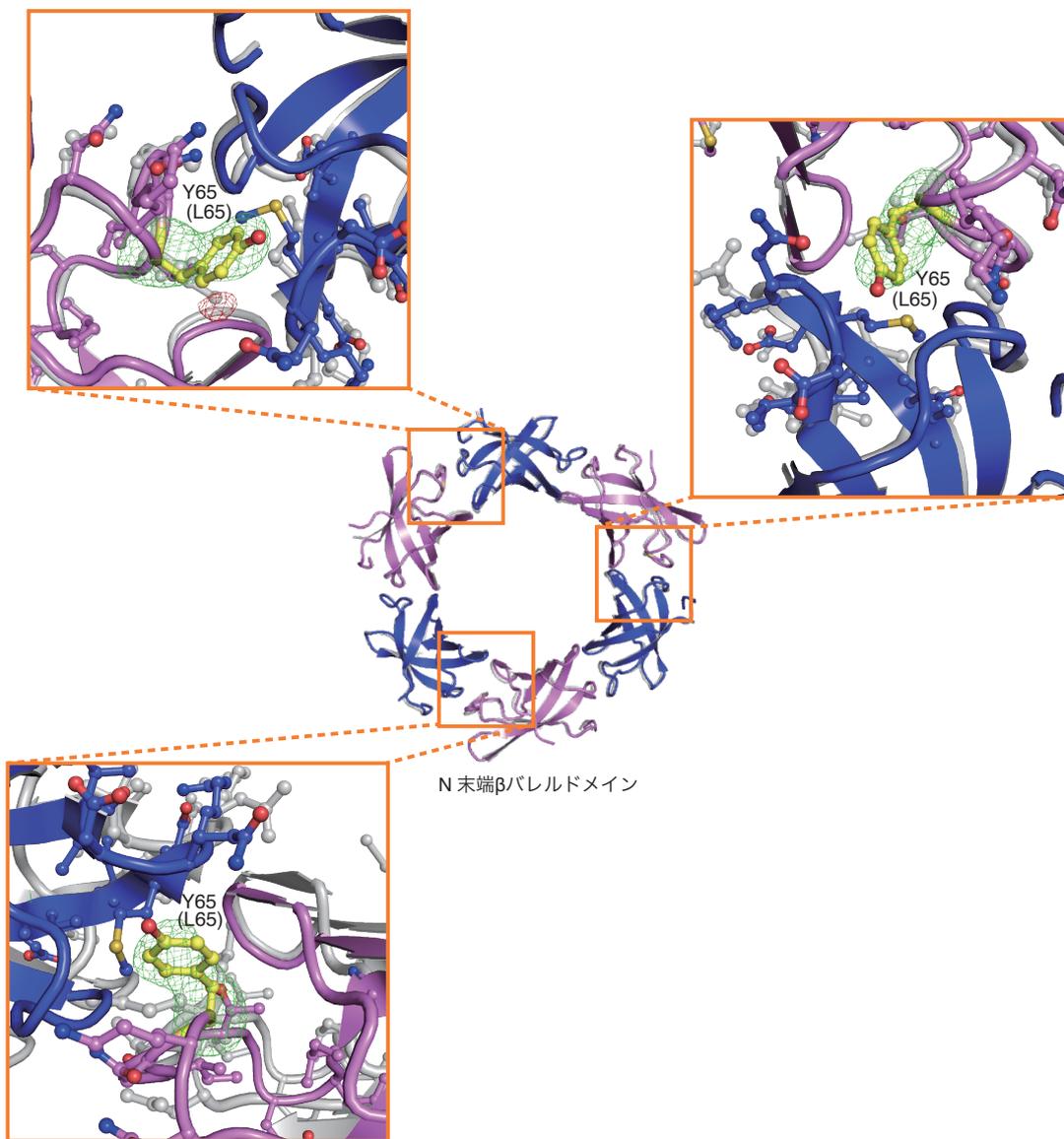


Fig. 2-5 野生型 A_3B_3 複合体と変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体のクラウン構造の比較

野生型 A_3B_3 複合体と変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体を“bindable”フォームで重ね合わせた β バレルドメイン（クラウン構造）の上面図。変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体を青と紫でカラー表示、野生型 A_3B_3 複合体を白黒表示している。中央図のオレンジ色の枠は変異箇所を示している。周囲のオレンジ色の枠で囲われた図は黄色で示した変異残基(L65Y)付近をズームインして表示している。L65Y 残基の $|F_0 - F_C|$ オミットマップを 4.0 シグマで赤色（ネガティブ）と緑色（ポジティブ）で表示している。

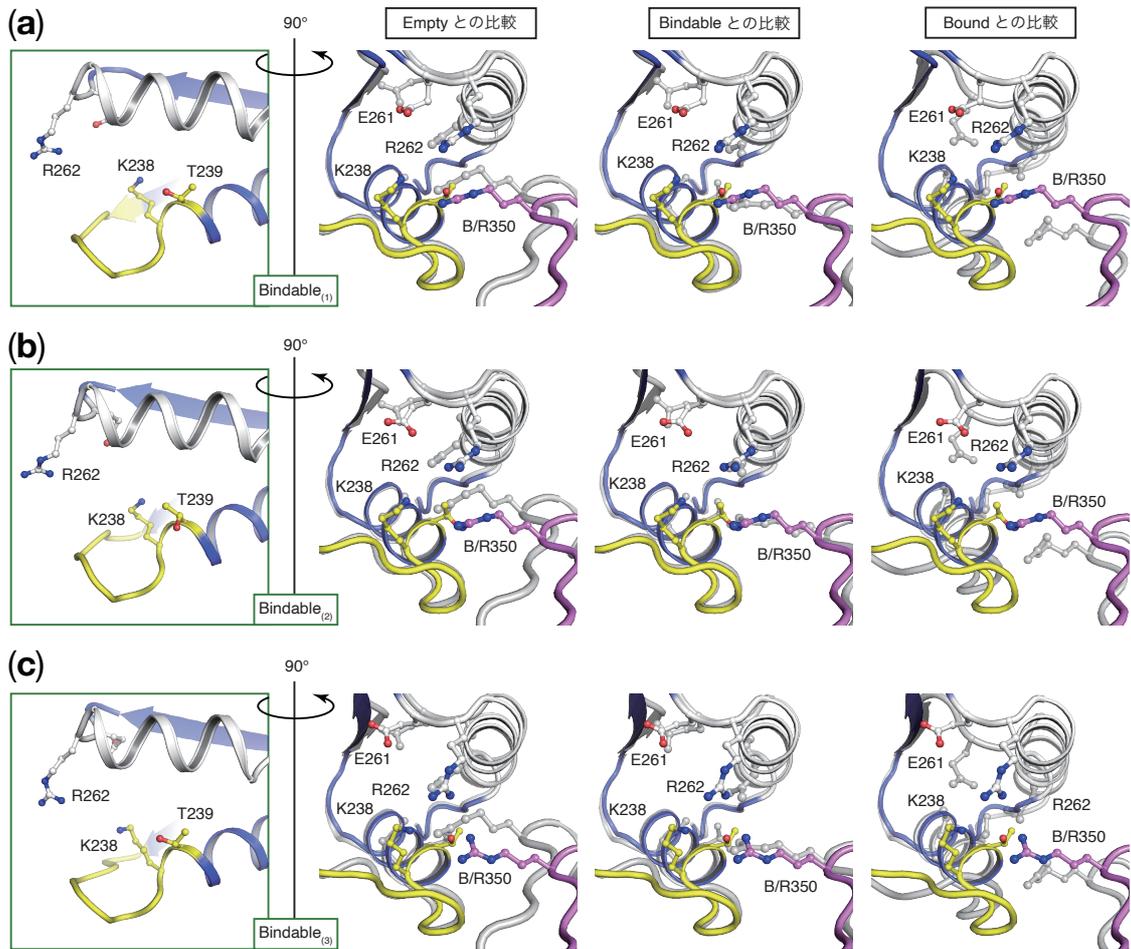


Fig. 2-6 eA₃B_(L65Y)₃ 複合体の“bindable”フォームのヌクレオチド結合部位の拡大図

ヌクレオチド結合部位を周辺の保存された残基とともに表示している。P ループとアーム領域をそれぞれ黄色と白色のリボン表示で表してしている。右側の 3 枚の図は一番左の図を 90°回転させて、A-B サブユニットのインターフェースが見やすいように表示している。変異型 A₃B_(L65Y)₃ 複合体の“bindable”フォームを白黒で表示した野生型 A₃B₃ 複合体のそれぞれ“empty” (a)、“bindable” (b)、“bound” (c)の A サブユニット（残基番号 67-593）で重ね合わせている。

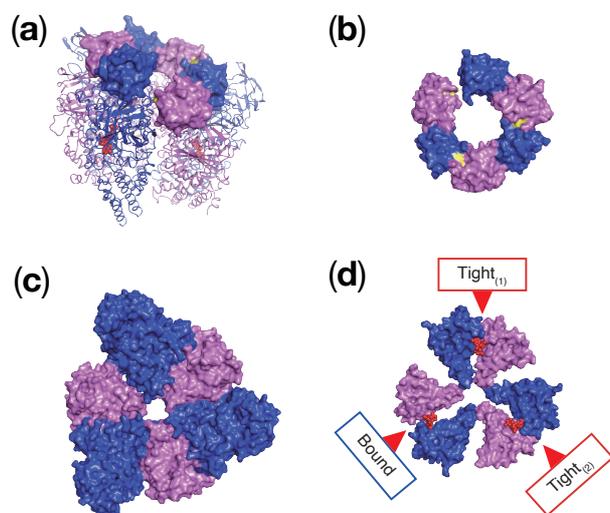


Fig. 2-7 AMP-PNP 結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の結晶構造

(a) AMP-PNP 結合型変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体($bA_3B_{(L65Y)_3}$)の上側面図。N 末端ドメインをサーフェス表示し、それ以外の中央ドメイン、C 末端ドメインをリボン表示した。(b, c) N 末端ドメイン(b)と中央ドメイン(c)の上面図。(d) $bA_3B_{(L65Y)_3}$ の C 末端ドメイン。

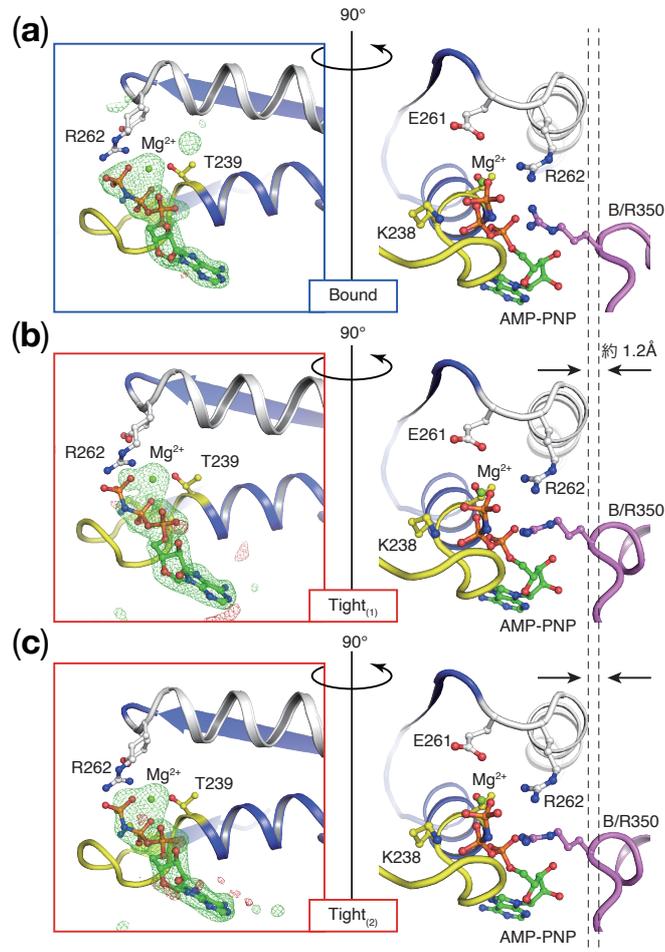


Fig. 2-8 AMP-PNP 結合型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体のヌクレオチド結合部位周辺構造の比較

ヌクレオチド結合部位をズームインして表した図。Pループとアーム領域をそれぞれ黄色と白色で表示している。b $A_3B_{(L65Y)_3}$ の“bound” (a)、“tight₍₁₎” (b)、“tight₍₂₎” (c)に対応している。右側の図は左の図を90°回転させて、A-Bサブユニットのインターフェースが見やすいように表示している。結合ポケットのAMP-PNPとMg²⁺を取り除いて計算した $|F_o| - |F_c|$ マップを4.0シグマで赤色（ネガティブ）と緑色（ポジティブ）で表示している。

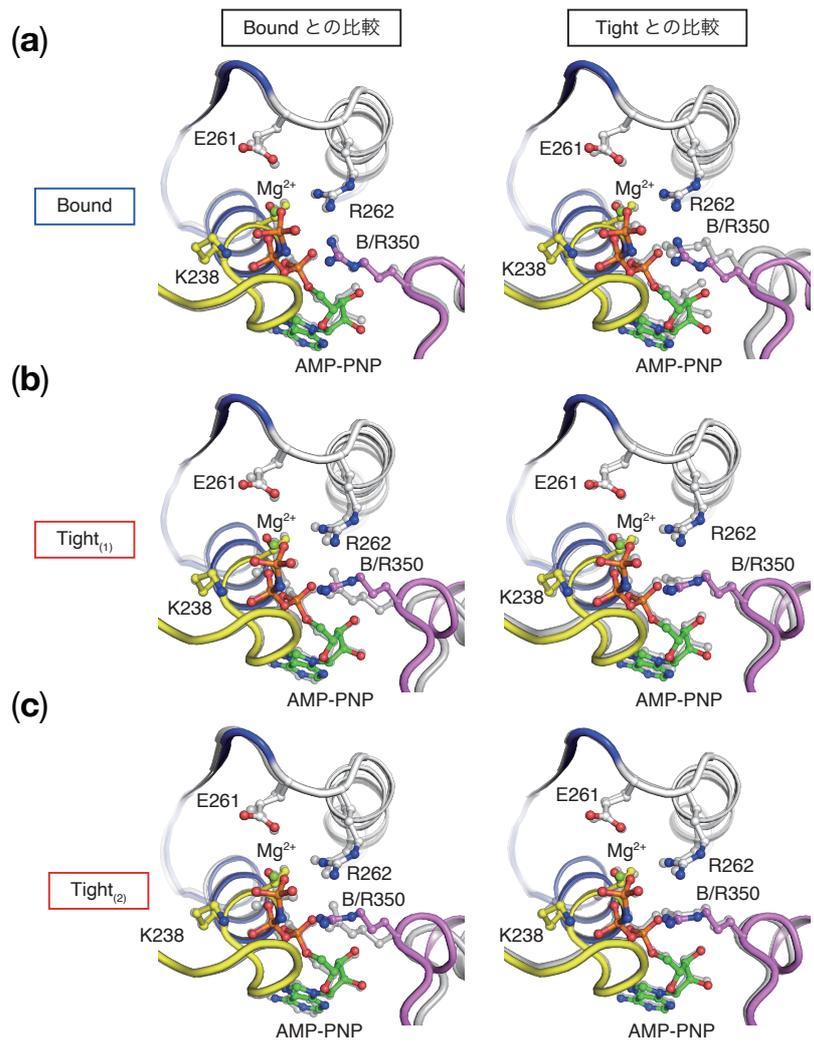


Fig. 2-9 変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の野生型 A_3B_3 複合体とのヌクレオチド結合部位周辺構造の比較

AMP-PNP 結合型変異型 $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体($bA_3B_{(L65Y)_3}$)の“bound” (a)、“tight₍₁₎” (b)、“tight₍₂₎” (c)フォームの結合部位。AMP-PNP 結合型 A_3B_3 複合体の“bound”フォーム、もしくは AMP-PNP 結合型変異型 V_1 複合体の“tight”フォームの A サブユニット (残基番号 67-593) で重ね合わせ。

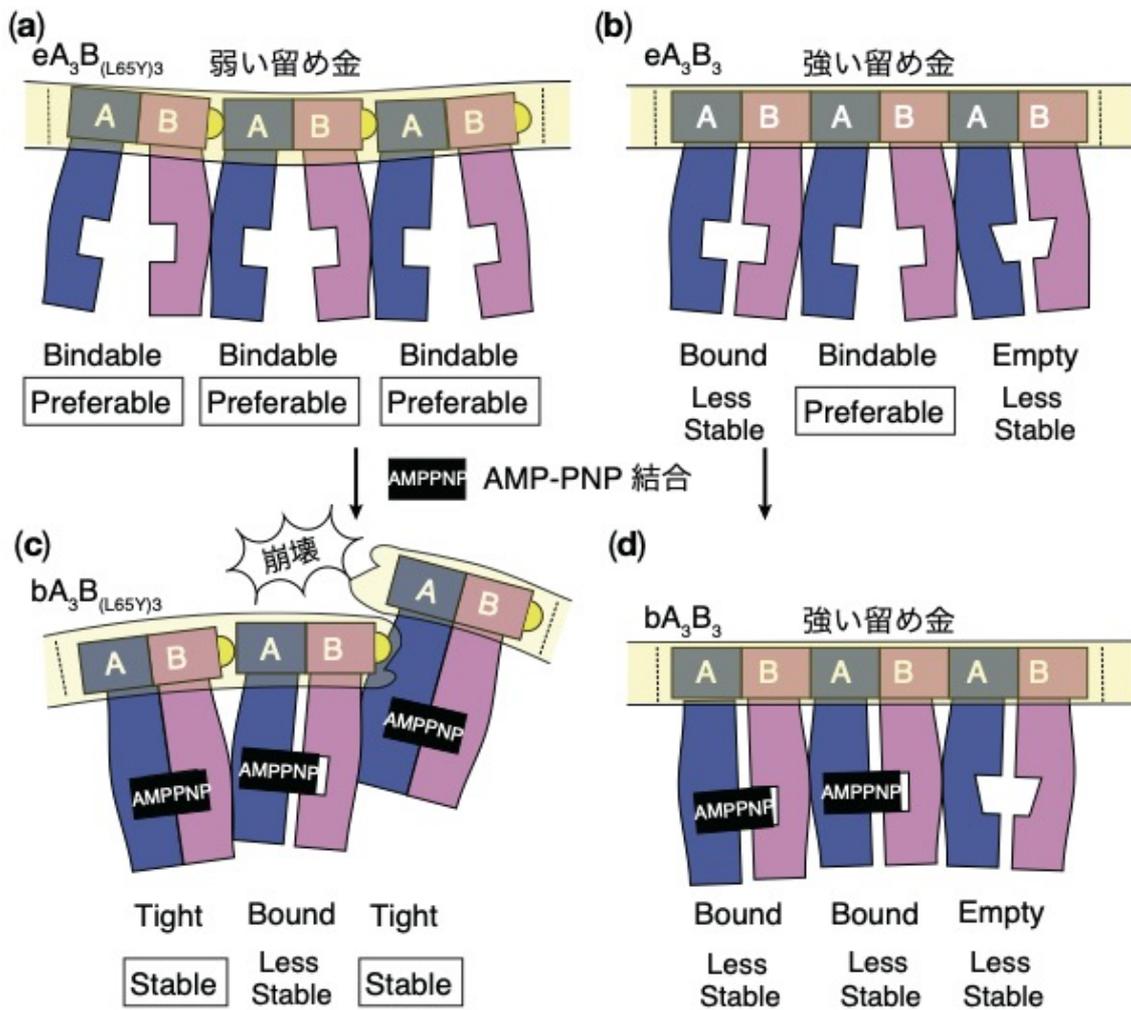


Fig. 2-10 野生型 A_3B_3 複合体と変異型 $A_3B_{(L65Y)3}$ 複合体の構造モデル

A_3B_3 複合体を切り開いて内側から見た展開図。A サブユニットを青色、B サブユニットを紫色で表示している。クラウン構造を黄色で示している。点線部は切断面を表す。変異型 (a, c) と野生型 (b, d) A_3B_3 複合体のヌクレオチドの結合に応じた協同的構造変化 (a から c と b から d) 構造変化をモデル化した。クラウン構造部分の黄色い半円は L65Y 変異を示す。変異導入によって弱まったクラウンはカーブしており (a)、崩落してクラウンが崩壊する (c)。AMP-PNP は黒色の四角で表した。ヌクレオチド結合部位は白い空白となっている。“empty” フォームはヌクレオチド親和性が非常に低い。そのため、ヌクレオチド結合部位を台形で表示した。それぞれの A_1B_1 ユニットの構造はモデル図の下部に、preferable form (stable form) であるのか、less stable form であるのかとともに記した。

第三章 V₁-ATPase の親和性変化モデル

第三章第一節 実験

3.1.1 A₃B₃ 複合体および DF 複合体の発現精製

SPR 解析を行うために、B サブユニットの N 末端側に GST タグを融合した。A サブユニットを融合した B サブユニットとともに大腸菌合成系で発現させた。B サブユニットはグルタチオンアフィニティー精製キットと A バッファー(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 50 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT)用い、A サブユニット、DF 複合体はそれぞれ B バッファー(20 mM MES-Tris, pH 6.5, 10% glycerol, 50 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT)と C バッファー(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT)を用いて以前報告された方法に従って精製した¹⁸。

3.1.2. SPR を用いた結合親和性測定

A₁B₁ ユニットへの DF 軸やヌクレオチドの結合を調べるために、Biacore T100(GE Healthcare Bio-sciences, AB, Sweden)を用いて SPR 解析を行った。抗 GST 抗体を用いた GST キャプチャーキットによって 50 µg/mL の GST タグ付き B サブユニットをリガンドとして CM5 チップにトラップした。様々な濃度(5-5500 µg/mL)の A サブユニットを過剰量のヌクレオチド(1 mM ATP もしくは 0.6 mM ADP)とともにアナライトとして B バッファー中で 30 µL/min で流し、時間 0 s から A、B サブユニット間の結合親和性を

測定した。300 s 後、A サブユニットを含まず、ヌクレオチドを含んだ B バッファーを流した。A サブユニットの濃度に依存したレスポンスをプロットし、A、B サブユニット間の結合親和性を算出した。フローセルにはタンパク質を含まないものをネガティブコントロールとして用いた。得られたセンサグラムは Biacore T100 evaluation software を用いて速度定数より、 k_{on}/k_{off} を求めた。平衡解離定数(K_D)はラングミュラー結合モデル (1:1 結合モデル) を用いて求めた。測定系の再生には 10 mM グリシン塩酸塩 pH2.0 で 2 分間洗浄した後、10 mM NaOH で 30 秒間洗浄を行った。

A₁B₁ ユニットのヌクレオチドに対する親和性を求めるために、100 µg/mL の GST タグ付き B サブユニットと 500 µg/mL の A サブユニットを 0.02 mM ATP を含んだ D バッファー (20 mM MES-Tris pH6.5, 150 nM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT) を 30 µL/min で流し、チップ上に A₁B₁ ユニットの再構成した。その後、220 s の時点で A サブユニットも ATP も含まない D バッファーを流し、300 s の時点で様々な濃度の ADP や AMP-PNP を含んだ D バッファーを流し、A、B サブユニットの解離速度の逓減を解析した。220 s でのレスポンスから 0 s でのレスポンスを引いたものを相対レスポンスファクター (RRF) とした。解離速度定数はヌクレオチド非存在下から減算して、ヌクレオチド濃度に依存した単一指数関数フィッティングで算出した。A₁B₁ ユニットのヌクレオチドに対する見かけの親和性はラマチャンドラプロットを用いて、Prism8 software を用いて求めた。600 s でヌクレオチドを再び取り除いた。

A₁B₁ ユニットの DF 複合体に対する親和性を算出するために、上述の方法で 2 mM の ATP を含んだ B バッファーを用いてチップ上に A₁B₁ ユニットを再構成し、10 μL/min で 0.02 mM の AMP-PNP を含んだ B バッファーで ATP を AMP-PNP に置換した。その後、0 s で 0.37-30 μg/mL (11-860 nM) の DF 複合体を 0.02 mM AMP-PNP とともに 300 秒間流し、ヌクレオチド存在下での DF 複合体の A₁B₁ ユニットに対する親和性を求めた。センサグラムは 256-295 レスポンスユニット (RU) である結合した A サブユニットの量で正規化した。K_D はラングミュラー結合モデル (1:1 結合モデル) を用いて求めた。

3.1.3 その他の方法

タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, CA) を用いて、ウシ血清アルブミンを基準として求めた^{18,27}。GST キャプチャーキットおよびグルタチオン親和性精製キットは GE Healthcare, AB, Sweden から購入した。精製段階を確認するために行った SDS-PAGE は、試料を CBB で染色し、レムリーらの方法に従った⁴⁵。3 4 2 3 5 6 7 8 6 制限酵素は Nippon Gene Japan, New England BioLabs Japan K.K. もしくは Wako Pure Chemical Industries Ltd. で購入した。

第三章第二節 結果と考察

3.2.1. 様々なヌクレオチド条件での A、B サブユニットの結合親和性測定

東京理科大学の山登研究室、白石研究室との共同研究によって、A、B サブユニット間のヌクレオチド存在下での結合親和性を、Biacore チップに固定した GST タグの付いた B サブユニットを用いて求めた(Fig. 3-1a)。GST タグの付いた B サブユニットを抗 GST 抗体を用いて CM5 チップに固定化し、過剰量の ATP もしくは ADP とともに A サブユニットをアナライトとして流した。

溶液中で A、B サブユニットはヌクレオチド存在下では A_1B_1 ユニットとして再構成されるが、ヌクレオチド非存在下では再構成されない¹⁸。ATP 存在下での A、B サブユニットの会合速度定数 k_{on} は 4.2×10^3 で、解離速度定数 k_{off} は 8.6×10^{-4} と算出された(Fig. 3-1b)。これに対して、ADP 存在下での A、B サブユニットの会合速度定数 k_{on} は 1.2×10^2 で、解離速度定数 k_{off} は 4.0×10^{-4} であった(Fig. 3-1c)。A、B サブユニット間の親和性（解離定数 K_D ）は ATP 存在下で 86 nM、ADP 存在下で 3.4 μ M と見積もられた(Fig. 3-1b, c)。ATP は A、B サブユニットの間で ADP よりもおおよそ 40 倍強い接着剤のようにはたらいっていると考えられた。ATP のように γ リン酸を有するヌクレオチドが A、B サブユニットの会合を誘起すると考えられる。解離速度定数は ATP 存在下でも ADP 存在下でも近い値をとっており、これは A_1B_1 ユニットが ATP の結合によって ATP 加水分解の触媒遷移構造である tight フォームを形成することに起因すると考えられる^{19,25}。

基質である ATP が、A サブユニット単体に結合しても加水分解を受けないが、A₁B₁ ユニットに結合すると tight フォームが形成され、加水分解を受けて反応生成物である ADP が生じる¹⁸。本結果から、A₁B₁ ユニットの安定性は結合しているヌクレオチドの種類に依存していることが示唆された。

3.2.2. A₁B₁ ユニットに対するヌクレオチドの結合親和性測定

チップ上に再構成された A₁B₁ ユニットは、ヌクレオチドを取り除き A サブユニットを含む溶液を流すと、A サブユニットは ATP 結合時には $k_{\text{off}} = 1.1 \times 10^{-2}$ (/s)、ADP 結合時には $k_{\text{off}} = 1.2 \times 10^{-2}$ で単一指数関数的に速やかに解離した(Fig. 3-2a)。この結果は、ADP は、ATP が加水分解を受けて生成した ADP も含めて、A₁B₁ ユニットから解離し、A₁B₁ ユニットがヌクレオチドを失ったことで不安定下して速やかに A サブユニットが解離していることを示唆している。ATP は A₁B₁ ユニットを再構成させ(Fig. 3-1b)、加水分解後は ADP として速やかに解離する(Fig. 3-2a)ことから、次の実験操作では ATP を用いて A₁B₁ ユニットをチップ上に再構成することとした。

次に、チップ上に再構成した A₁B₁ ユニットに対するヌクレオチドの結合親和性を調べるために、Fig. 3-2b における A サブユニットの解離フェーズ中に ADP を添加することで、ヌクレオチド濃度に依存した解離速度の遞減効果を測定した。ADP を使用した際の解離速度の減衰曲線は単一指数関数で表され、そこから解離速度を算出した。解離

速度はヌクレオチド濃度に依存していた(Fig. 3-2c)。そこから、 A_1B_1 ユニットと ADP の見かけの親和性は 9.7 nM と算出された。この値は、ITC 測定で得られた V_1 複合体の“tight”フォームや“bound”フォームといった高親和性構造に相当していた²⁰。さらに、ADP を取り除くと A サブユニットは再び 1.0×10^{-2} (/s) で解離し始めた。

同様に ATP の非加水分解性のアナログである AMP-PNP を用いて、結合親和性を測定した。AMP-PNP の場合は、単一指数関数的な通減効果は見られず、AMP-PNP の解離が遅すぎるために平衡状態に達していないことが示唆された。このような制限はあるが、ADP と同様に解析を行った。測定後期(500-590s)において減衰曲線は直線的になったため、その時間での曲線から解離速度を算出し、見かけの親和性を求めた。 A_1B_1 ユニットと AMP-PNP の見かけの親和性は ADP 同様 4.7 nM と高く(Fig. 3-2e)、この値は V_1 複合体の“tight”フォームや“bound”フォームといった高親和性構造(9.4 nM と 40 nM)に対応していた²⁰。再び AMP-PNP を取り除いた際の解離速度は 5.3×10^{-4} (/s) と AMP-PNP 存在時と同程度に遅く、これはおそらく AMP-PNP が加水分解を受けず A_1B_1 ユニット中で強く残り続けていたためと考えられる。これらの結果は、2 章で議論した A_1B_1 ユニットにヌクレオチドが結合した際の基底構造が“tight”フォームであるという留め金を緩めた $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の研究から得られた知見に一致していた。従って、本研究ではチップ上に再構成された A_1B_1 ユニットは“tight”フォームを形成していると結論づけた。

3.2.3. A₁B₁ ユニットに対する DF 複合体の結合親和性

チップ上で“tight”フォームを形成して再構成された A₁B₁ ユニットに対する DF 複合体の結合親和性を測定した(Fig. 3-3a)。再構成された A₁B₁ ユニットからの A サブユニットの解離速度は、Fig. 3-2d で示したように非常に遅いため、3.2.2.と同様に ATP を用いて A₁B₁ ユニートを再構成した後に、様々な濃度の DF 複合体を AMP-PNP とともに流した(Fig. 3-3b)。DF 複合体と“tight”フォームを形成している A₁B₁ ユニートの結合親和性は、SPR 定常状態のレスポンスと DF 濃度のプロットから、 $K_D = 55 \text{ nM}$ と求められた(Fig. 3-3c)。先行研究によって DF 複合体と A₃B₃ 複合体の結合親和性は $K_D = 1.8 \text{ nM}$ と求められていた²⁷。DF 複合体と A₃B₃ 複合体 (3 組の A₁B₁ ユニートが会合した複合体)の結合親和性が 1.8 nM であることを鑑みれば、DF 複合体はヌクレオチドと結合して“tight”フォームを形成しているたった 1 組の A₁B₁ ユニートと非常に強く相互作用しており、A₃B₃ 複合体中で DF 複合体は“tight”フォームを形成している A₁B₁ ユニートに対して主に結合していると考えられた。DF 複合体と“tight”フォームを形成している A₁B₁ ユニートの結合親和性が高いという結果は、“tight”フォームがヌクレオチドが非存在下において V₁ 複合体では形成されるが、A₃B₃ 複合体では形成されないという以前の結果と一致している¹⁹。DF 複合体はまるでヌクレオチドが存在しなくても A₁B₁ ユニートを“tight”フォームとする留め具のようにはたっている。さらに、A₃B₃ 複合体は A、B サブユニットから再構成する際にヌクレオチド存在下で濃縮した後にヌクレオチドを取

り除く必要があるのに対し、 V_1 複合体の再構成はヌクレオチド存在下で濃縮するだけで可能である¹⁸。これらの結果から再構成された A_1B_1DF 複合体が V_1 (A_3B_3DF) 複合体の会合の核となると考えられる。

Fig. 3-3b のセンサグラムは 2 相性を示しており、この要因としていくつかの可能性が考えられるが、主な原因として以下のようなものが考えられる。本実験ではバックグラウンドコントロールとして DF を加えないセンサグラムを用いた。AMP-PNP の存在下での A サブユニットの解離は非常に遅く (Fig. 3-2d)、また、DF 複合体が留め具のように機能している状態では DF 複合体と強固に結合した A_1B_1 ユニットの方がより安定であった。そのため、DF 複合体と結合している A サブユニットの解離は、結合していないバックグラウンドコントロールよりもはるかに遅く、A サブユニットの解離が少ないためであると考えられるが、これらの解離の割合について算出することはできなかった。

3.2.4. V_1 -ATPase の回転における親和性変化モデル

E. hirae V_1 -ATPase について結晶構造解析や生化学的解析、生物物理学的知見に基づいた回転メカニズムモデルがこれまでに提唱されてきた^{48,49}。ここでは、これまでの回転メカニズムモデルに、今回明らかとなったサブユニット間の親和性が変化するという知見を組み合わせ、より詳細な分子メカニズムモデルを提唱する。Fig. 3-4a は“ATP 加水分解待ち”構造で基質である ATP の加水分解待ちの状態であり、Fig. 3-4b は“ATP

結合待ち”で次の基質である ATP の結合待ちの状態であり、Fig. 3-4c は“ADP 解離待ち”構造で生成物である ADP の解離待ちの状態であり、Fig. 3-4d は“遷移状態”であり軸の回転待ちの状態である。この“遷移状態”の結晶構造は得られていないが、DF 軸のない A_3B_3 複合体のヌクレオチド結合型の結晶構造 (A_1B_1 ユニットはそれぞれ“empty”、“bound”、“tight”フォームを形成) が相当すると考えた。

まず、“ATP 加水分解待ち”から“ATP 結合待ち”にかけて、ATP 分子は V_1 -ATPase の 3 箇所 のヌクレオチド結合部位のうち 2 箇所に結合し、“tight”フォームで加水分解を受ける¹⁹。ATP 加水分解後、“tight”フォームからリン酸イオンが脱離し、“ADP-bound”フォームが形成される。この構造変化は隣の“empty”フォームを形成している A_1B_1 ユニットの協同的な構造変化を引き起こし、“bindable-like”フォームが形成される。さらに、この時の構造は軸の正方向への回転が妨げられるようになっている²⁰。

“ATP 結合待ち”から“ADP 解離待ち”にかけての構造変化は、“bindable-like”フォームへの ATP の結合によって駆動される。本研究で示唆されたように ATP は A、B サブユニット間で強い接着剤のようにはたらくので、ATP が結合すると“bindable-like”フォームはさらに閉じて“half-closed”フォームを形成する。この構造変化では、さらに隣の A_1B_1 ユニットの構造が“ADP-bound”フォームから“tight-like”フォームへと変化する。“ADP-bound”フォームを形成している A_1B_1 ユニットは、結合しているヌクレオチドが ADP であるため、A、B サブユニットが解離して開きやすくなっているが、DF 軸が留め具のよ

うに A_1B_1 ユニットを安定化させている。この構造変化は、一分子観察実験における 40° の回転サブステップに相当する²⁴。構造変化前の“ATP 結合待ち”の構造よりも“ADP 解離待ち”の構造の方が、DF 軸の周りの構造が密となっており、DF 軸の反対方向への回転が阻害されているように考えられるので、モデル図では“half-closed”フォームの A_1B_1 ユニット軸と接触しているように表した。

“ADP 解離待ち”から“遷移状態”にかけて、ATP は強い接着剤のようにはたらくので、“half-closed”フォームはさらに閉じて“bound”フォームを形成しようとする。この時、この閉じようとする動きと連動するように、留め金の制約の中で“tight-like”フォームに結合していた ADP が ATP の自由エネルギーを利用して解離する²⁵。ADP 分子の V_1 複合体中のそれぞれの A_1B_1 ユニットに対する結合親和性は、 ${}_2\text{ADP}V_1$ の 2 箇所²⁶の結合部位についてはそれぞれ 6.7 nM と 13 nM であり、 ${}_3\text{ADP}V_1$ の 3 箇所²⁷めの結合部位については 3.4 μM と低い²⁰。ADP の接着剤としての強さは ATP のおよそ 40 分の 1 であるため、この協同的な構造変化と親和性の変化に伴って、ADP と結合している“tight-like”フォームを形成している A_1B_1 ユニットが開かされて、小分子である ADP は速やかに解離する。ADP が解離するとヌクレオチドが結合していない時の A、B サブユニットの親和性は低い²⁸ために A_1B_1 ユニットは開いて“empty”フォームを形成する。そのため“tight-like”フォームを形成している A_1B_1 ユニットに主に結合していた DF 軸が離れ、遷移状態となる。

“遷移状態”から“ATP加水分解待ち”にかけて、DF軸はブラウン運動の中でATPと結合しているA₁B₁ユニットと高い親和性で引き合い、結果として反時計回り方向の回転運動となる⁴⁸⁻⁵⁰。このステップは一分子観察実験で観察された80°のサブステップに対応する²⁴。DF軸が“bound”フォームに到達すると、“tight”フォームへと構造が変化し、この構造変化による安定化によって自由エネルギーランドスケープは深く落ち込み、軸の回転トルクが生み出されている。この回転機構はサーマルラチェット機構の一種であり、有機化合物の分子モーターの回転機構に類似している。

第三章第三節 結論

本研究では、これまでに得られていた構造生物学的知見に本研究で明らかとなった生化学的性質を加えることで、 V_1 -ATPase の回転メカニズムについて親和性変化モデルを提案することができた²⁶。A サブユニットへのヌクレオチドの結合によって A、B サブユニット間の親和性が変化する。それと連動するように、 A_1B_1 ユニットと DF 軸の親和性が変化する。形に取り込まれた ATP のエネルギーは親和性の変化と運動方向の選択に利用され、こうした動きの駆動力は熱揺らぎのエネルギーに由来している。親和性変化モデルは回転分子モーター V_1 -ATPase の回転機構の根本原理となる可能性が考えられる。

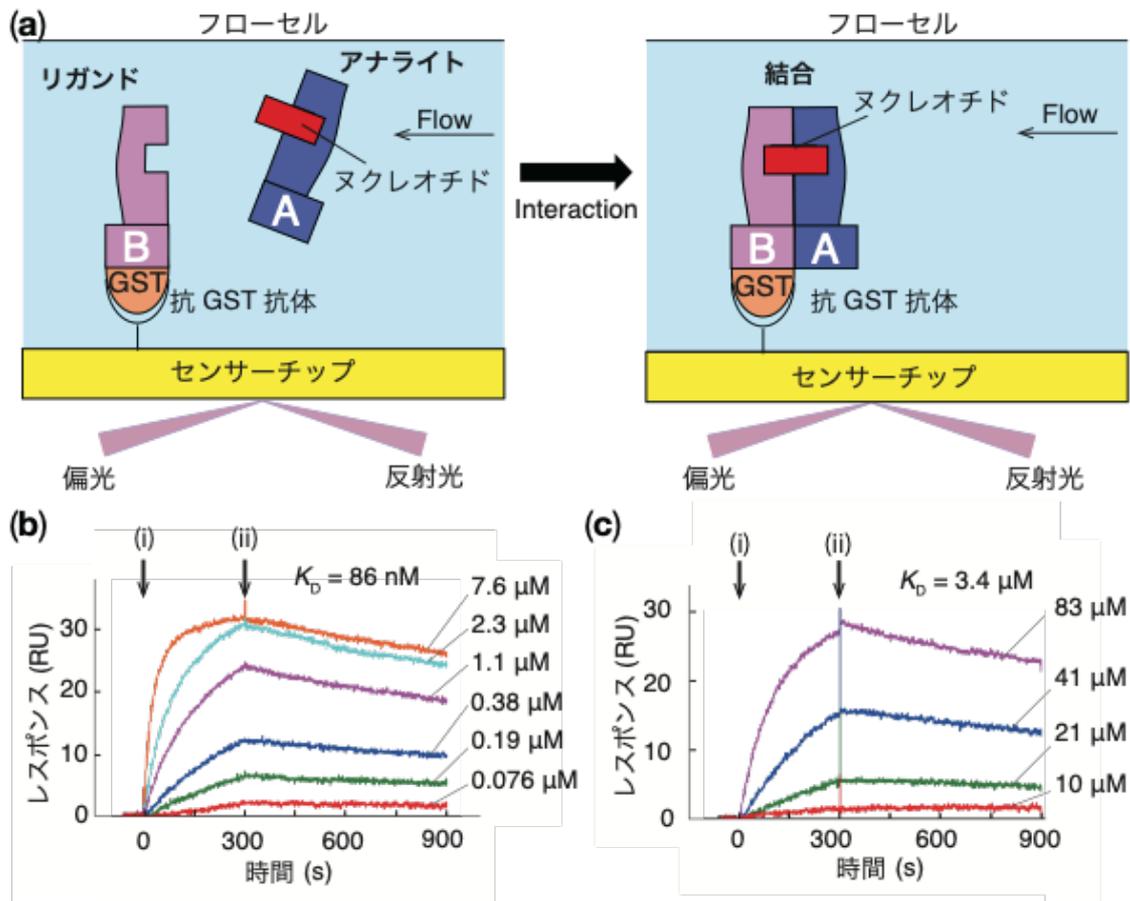


Fig. 3-1 ヌクレオチド存在下での A、B サブユニット間の結合親和性測定

(a) SPR 測定の模式図。CM5 チップ上のリガンドとして GST タグ（橙色）の付いた B サブユニットを紫で表し、過剰量のヌクレオチド（赤色）とともに穴ライトとして流した A サブユニットを青色で表した。(b, c) ATP (b) もしくは ADP (c) の濃度に依存したセンサグラムを示した。A サブユニット（アナライト）の濃度を右側に示した。(i) でヌクレオチドとともに A サブユニットを流し、(ii) で A サブユニットを含まないヌクレオチド溶液を流した。

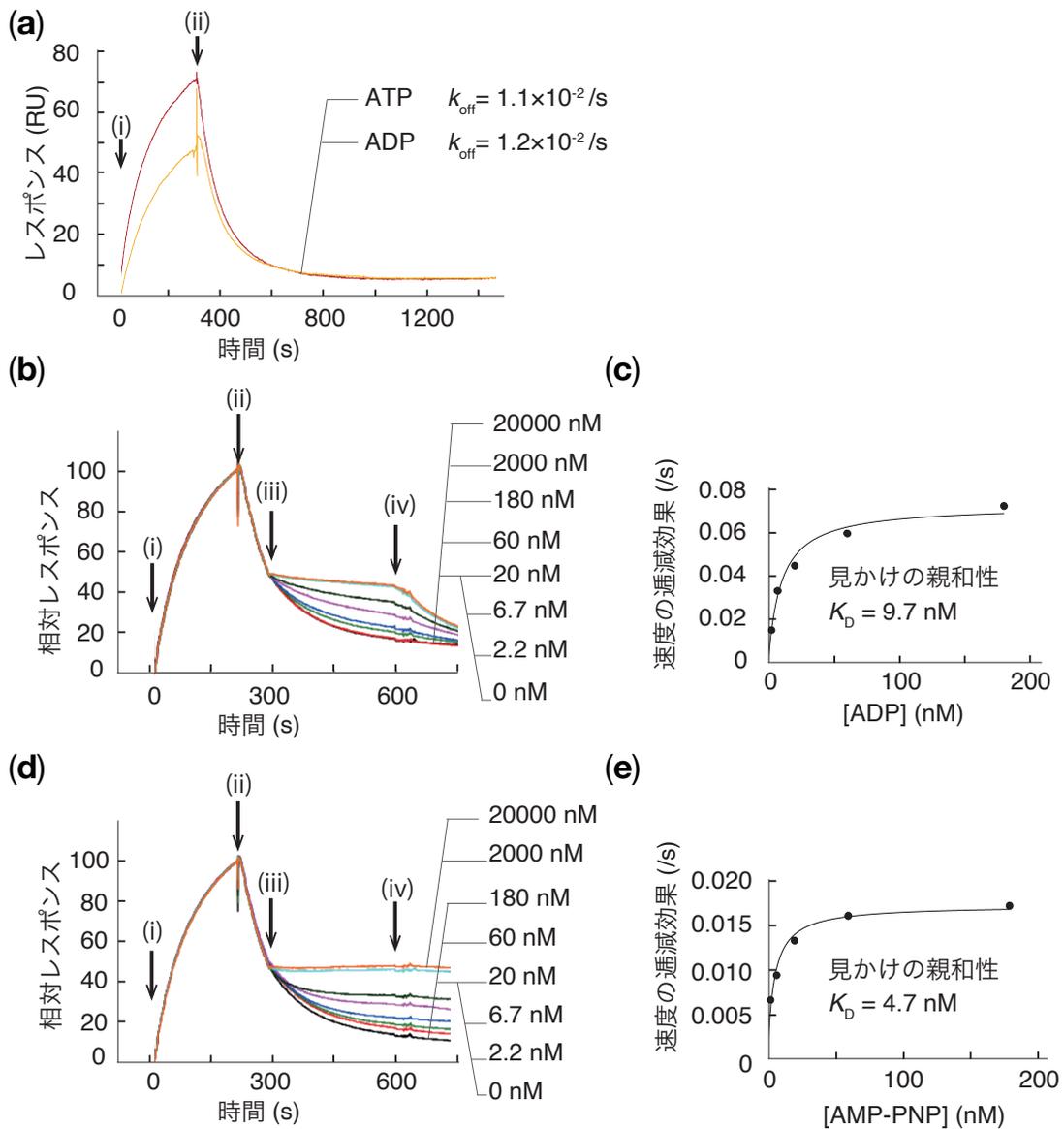


Fig. 3-2 A₁B₁ ユニットのヌクレオチド結合親和性測定

(a) ヌクレオチド非存在下での A₁B₁ ユニットの A サブユニットの解離。(i)で 0.5 mg/mL の A サブユニットを 0.03 mM ATP とともに D バッファー中でアナライトとして 0 s で流し (赤色)、5.5 mg/mL の A サブユニットを 0.6 mM ADP とともに流した (橙色)。(ii)でチップ上に再構成された A₁B₁ ユニットの D バッファーを流した。(b, c) ADP による A サブユニットの解離速度の逓減効果。(b) 右側に ADP 濃度を記載した。(c) 解離速度の逓減効果を表した。(d, e) AMP-PNP による A サブユニットの解離速度の逓減効果。(i)で A サブユニットを ATP とともに流し、(ii)で A サブユニットも ATP も含まないバッファーを流した。(iii)で様々な濃度の ADP (b)もしくは AMP-PNP (d)を流し、(iv)で再び A サブユニットもヌクレオチドも含まないバッファーを流した。

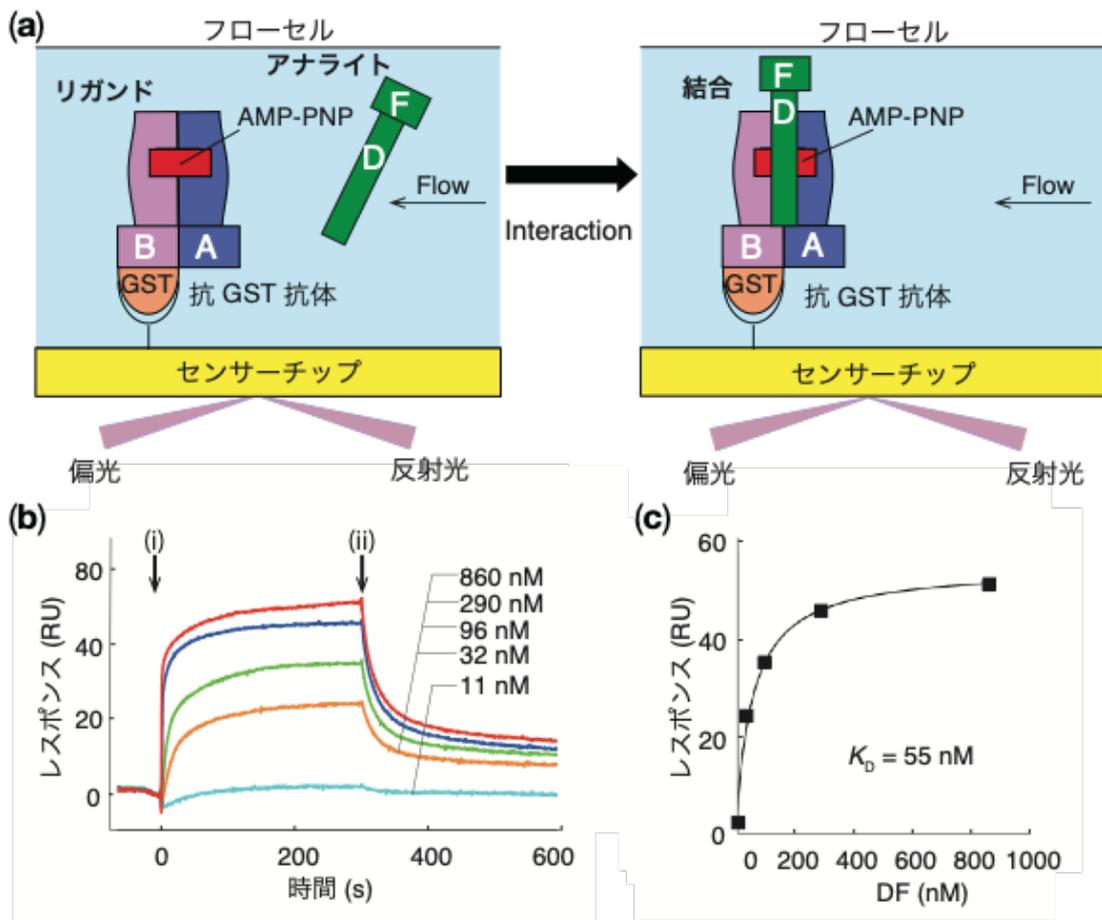


Fig. 3-3 A₁B₁ ユニットに対する DF 複合体の結合親和性測定

(a) DF 複合体の結合親和性測定の模式図を Figure 3-1a 同様に表した。DF 複合体を緑色で表した。(b) DF 複合体の濃度を右側に示した。(i)で DF 複合体を含むバッファーを AMP-PNP とともに流した。(ii)で DF 複合体を含まないバッファーを流した。(c) DF 複合体結合の定常状態で、様々な濃度の DF 複合体を加えてから 280 秒後のレスポンスをプロットした。

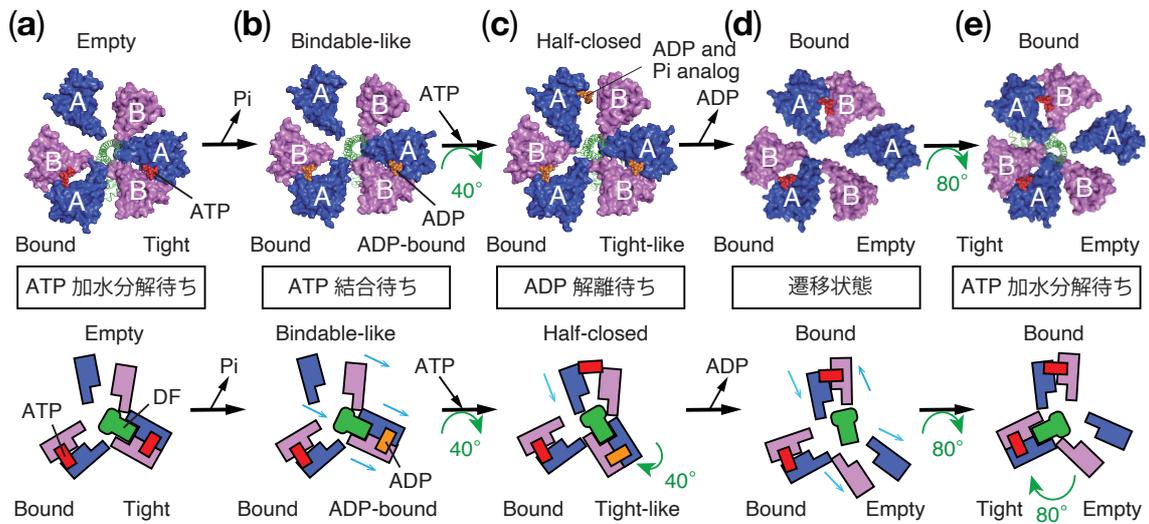


Fig. 3-4 V₁-ATPase 回転モデルの模式図

上図は V₁ および A₃B₃ 複合体の結晶構造の C 末端ドメインを N 末端側から見た上面図であり、左から 2_{ATP}V_1 (ATP 加水分解待ち) (a)、 2_{ADP}V_1 (ATP 結合待ち) (b)、 3_{ADP}V_1 (ADP 解離待ち) (c)、 $2_{\text{ATP}}\text{A}_3\text{B}_3$ (回転の遷移状態) (d)、 120° 回転した 2_{ATP}V_1 (ATP 加水分解待ち) (e)を示した。結合した AMP-PNP 分子を赤色、ADP 分子を橙色、リン酸イオンアナログ(SO_4^{2-})を茶色で球体表示した。下図は上図の構造モデルに基づいた ATP 加水分解と DF 軸の 120° 回転モデルを模式化し表したものである。A サブユニットを青色、B サブユニットを緑色、DF 複合体を緑色、ATP 分子を赤色、ADP 分子を橙色でそれぞれ示した。各サブユニットの構造変化の動きを水色の矢印で示し、回転の動きを緑色の巻き矢印で示した。

第四章 V₁-ATPase の回転触媒機構の分子メカニズム

第四章第一節 実験

4.1.1 A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体の発現・精製

A₃B₃ 複合体の結晶構造に基づいて N 末端側 β バレルドメインで A₁B₁ ペア間にシステイン架橋を生じさせるよう変異体をデザインした^{18,19,27,28}。PyMOL を用いて eA₃B₃ の構造から変異導入の候補となる残基を選択し、A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} を作製した。

X 線結晶構造解析用、および HS-AFM 観察用サンプルの発現は理化学研究所生命機能科学研究センターとの共同研究にて、大腸菌無細胞合成系として確立された方法に従い、A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体を発現させた^{6,12}。また、それ以外の活性測定などの機能解析用サンプルの発現は大腸菌(BL21(DE3))を用いて大腸菌合成系によって発現させた^{22,51}。

4.1.2 ATPase 活性測定

基本的な操作は 2.1.2. に従った。A₃B₃ および A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体(10 mg/mL)を G バッファー(100 mM MES, 5 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 10% glycerol; pH 6.0) 中で DF 複合体(5 mg/mL)と氷上でインキュベートし、A₃B₃DF 複合体として再構成させた¹⁸。A₃B₃ および、再構成された A₃B₃DF 複合体の ATPase 活性を ATP 再生系を用いて測定した^{19,20}。反応溶液は 400 μ M ATP/MgSO₄、2.5 mM phosphoenolpyruvate、50 μ g/mL pyruvate kinase、

50 $\mu\text{g/mL}$ lactate dehydrogenase、0.2 mM $\beta\text{-NADH}$ (dipotassium salt)、そして 1 μg の A_3B_3 もしくは $\text{A}_{(\text{S23C})_3}\text{B}_{(\text{N64C})_3}$ 複合体を含む。ATP 加水分解反応は ATP/MgSO₄ の添加によって開始され、340 nm での吸光度の減少を捉えた。

4.1.3 結晶化条件

296 K でのシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて全ての結晶化を行った。得られた結晶は glycerol 濃度を 20%ないし 22.5%まで高めたクライオ溶液にソーキング後、クライオループ(Hampton Research)ですくい取り、液体窒素で瞬間冷却した^{19,20}。

$\text{A}_{(\text{S23C})_3}\text{B}_{(\text{N64C})_3}$ 溶液(11 mg/mL in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol) と結晶化溶液(0.1 M NaCl, 0.1 M MES-Tris pH 8.0, and 25% (w/v) PEG 3350)を 0.3 μL ずつ等量混合し、ヌクレオチド非結合型 $\text{A}_{(\text{S23C})_3}\text{B}_{(\text{N64C})_3}$ の結晶を成長させた。

$\text{A}_{(\text{S23C})_3}\text{B}_{(\text{N64C})_3}$ 溶液(11 mg/mL in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol) と結晶化溶液(0.1 M NaCl, 0.1 M NH₄OAc, 0.1 M Tris pH 7.5, and 27% (w/v) PEG 3350)を 0.3 μL ずつ等量混合し、AMP-PNP 結合型 $\text{A}_{(\text{S23C})_3}\text{B}_{(\text{N64C})_3}$ の結晶を成長させた。

4.1.4 X 線回折実験と結晶構造解析

全ての X 線回折像は極低温で単結晶から収集した^{19,20}。

ヌクレオチド非結合型 $\text{A}_3\text{B}_{(\text{L65Y})_3}$ の X 線回折実験は PF の BL-17A ($\lambda=0.98$ Å)で行った

^{34,35}。得られた回折像を XDS で 2.7 Å までスケーリングした ^{36,37}。構造は MOLREP を用いて eA₃B₃ (PDB ID: 3VR2) をサーチモデルとして分子置換した ³⁸。

AMP-PNP 結合型 A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} の X 線回折実験は PF の BL-1A (λ=1.1 Å) で行った ^{34,35}。得られた回折像を XDS で 3.4 Å までスケーリングした ^{36,37}。構造は MOLREP を用いて bA₃B₃ (PDB ID: 3VR3) をサーチモデルとして分子置換した ³⁸。

ADP 結合型 A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} の X 線回折実験は前任者により、PF の BL-17A (λ=1.1 Å) で行われた ^{34,35}。得られた回折像を XDS で 2.7 Å までスケーリングした ^{36,37}。構造は MOLREP を用いて _{3ADP}V₁ (PDB ID: 5KNC) をサーチモデルとして分子置換した ³⁸。

Coot で分子構築を行い ³⁹、REFMAC5⁴⁰ や PHENIX⁴¹ を用いて構造精密化した。精密化後の構造の評価には RAMPAGE を用いた ⁴²。全ての r.m.s.d. は C_α 原子で計算した。構造の作成には PyMOL を用いた。接触表面積の計算には PDBePISA を用いた ⁴³。

4.1.5 HS-AFM 観察

HS-AFM 観察を行うために、A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体を N 末端側の His タグを用いて固定した。マイカ基板を使用直前に切り出し、ATPES を超純水で 10 万倍希釈した後に 3 分間マイカ上でインキュベートした。さらに、0.025% のグルタルアルデヒドを 3 分間インキュベートししマイカ基板を作成した。その後マイカ基板を観察溶液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 2mM DTT and 10 % glycerol) で数回洗浄した。その後 A₃B₃、もしくは

は $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ を 5 分間インキュベートし、観察溶液で数回洗浄した後、10-12 frame/sec、測定範囲を 50 nm × 50 nm (150 px × 150 px) もしくは 50 nm × 40 nm (150 px × 120 px) で観察を行った³²。

4.1.6 その他の方法

その他の方法に関しては 2.1.7.と同様に行った。

第四章第二節 結果と考察

4.2.1 A_3B_3 複合体および $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の発現精製と ATPase 活性測定

V_1 -ATPase の触媒ドメインである A_3B_3 複合体はヌクレオチド存在下で A_1B_1 二量体へと解離してしまうため、高速 AFM によって加水分解反応に伴う構造変化を長時間観察することが困難である。そこで N 末端側で A_1B_1 二量体が非極性相互作用によって会合しているドメインに変異を導入することによって、 A_3B_3 複合体を安定化した。本稿第二章で述べた通り、これまでに A_1B_1 二量体の会合を弱めた変異体を以前作製しているため、同様の領域の A サブユニットの 23 番目のセリン、および B サブユニットの 64 番目のアスパラギンに変異を導入し、 A_1B_1 二量体をシステイン架橋することによって A_3B_3 複合体を安定化した。²⁵ この変異箇所は共に N 末端側 β バレルドメインに位置しており、互いがジスルフィド結合を形成するのに十分近い距離に位置している¹⁹。こうして作製した $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体を *E. coli* タンパク質発現系または *E. coli* タンパク質無細胞発現系で発現、精製することにより、精製標品を得た(Fig. 4-1a, b)。

得られた精製標品の A_3B_3 複合体、 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の ATP 加水分解活性を測定することによって野生型と変異型の機能の比較を行った。野生型 A_3B_3 複合体は速やかに失活するのに対して $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体は失活が非常に緩やかであった(Fig. 4-1c)。 A_3B_3 複合体および $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体に DF 複合体をインキュベートすることによって V_1 (A_3B_3 DF もしくは $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ DF) として再構成したものは共に持続的な活性を

示した(Fig. 4-1c)。また、変異型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の活性初速度は野生型 A_3B_3 複合体の 33 倍であったが、 V_1 として再構成した $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}DF$ の活性は A_3B_3DF の 1.1 倍と大きな差は見られなかった(Table 4-1)。これらの結果から、変異型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体が安定化しており、さらに DF 複合体との結合能を保持していることが示唆された。

4.2.2. ヌクレオチド非結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の結晶構造

ヌクレオチド非結合状態での $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の結晶化を行い、分子置換法により分解能 2.7 Å で結晶構造を決定した (Table 4-2)。全体構造は野生型のヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体と同様に N 末端側 β バレルドメインで会合した 6 量体として集合していた(Fig. 4-2a-c)。システイン架橋に相当する電子密度が観測され、変異を導入した 2 残基のシステインによる安定化を結晶構造からも確認することができた(Fig. 4-4)。

それぞれの A_1B_1 ユニットの構造は野生型 A_3B_3 複合体と近い構造であったが、1 組の A_1B_1 ユニットの構造が“bound”フォームから“half-closed”フォームへと変化していた (Table 4-4, Fig. 4-4)。これは N 末端側 β バレルドメインにおける会合部分に変異を導入したことにより、第 2 章で議論したようなストレス均衡が変化して一部の構造が変化したものだと考えられた²⁵。全体として、 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体は野生型同様非対称構造を示していた(Fig. 4-2b, c)。

4.2.3 AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の結晶構造

$A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体に AMP-PNP が結合した状態の構造を明らかにするために、過剰量(6 mM)の AMP-PNP 存在下で結晶化を行い、分子置換法によって結晶構造を 3.4 Å で決定した(Table 4-2, Fig. 4-2d-f)。1つの単位胞中に2分子の六量体が観測されたが、それら2分子の構造は類似していた(r.m.s.d. = 0.896 Å²)。得られた AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の構造は野生型と同様に“empty”、“bound”、“bound”フォームを形成し、2組の“bound”フォームのヌクレオチド結合部位に AMP-PNP 由来の電子密度が観測され、“empty”フォームのヌクレオチド結合部位にはヌクレオチドに相当する電子密度は観測されなかった(Table 4-5, Fig. 4-5)。野生型の A_3B_3 の AMP-PNP 結合構造と同様の構造を形成していることから、本構造も ATP 結合状態の $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の構造に相当すると考えられる。結晶中では“tight”フォームの形成はみられなかったが、ATP や AMP-PNP は A-B サブユニット間で強い接着剤としてはたらきタイトな A_1B_1 のコンフォメーションを形成させようとするため、溶液中などの揺らぎの中では“bound”フォームが“tight”フォームへと変化し、ATP 加水分解が触媒されると考えられた^{19,25}。

4.2.4 ADP 結合型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の結晶構造

過剰量(6 mM)の ADP 存在下で結晶化させた $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の X 線回折測定を

行い、ADP 結合型の $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の結晶構造を 2.7 Å で決定した(Table 3-3, Fig. 4-2g-i)。3 箇所のヌクレオチド結合部位のうち 2 箇所にしかヌクレオチドが結合しなかった AMP-PNP 結合型構造とは異なり、ADP 結合型構造では、3 箇所全ての結合部位にヌクレオチド由来の電子密度が観測された(Fig. 4-6)。 A_1B_1 ユニットの構造はそれぞれ “half-closed”、“bound”、“ADP-bound”であった(Table 4-6, Fig. 4-2g, i, Fig. 4-6)。今回得られた ADP 結合型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体は ADP 解離待ちの V_1 の(${}_{3ADP}V_1$ 、PDB ID: 5KNC) 構造に似ていた²⁰。

3 箇所のヌクレオチド結合部位のうち “half-closed” フォームを形成していた 1 箇所の A_1B_1 には ADP だけではなく、 SO_4^{2-} に相当する電子密度が観測され、 SO_4^{2-} がリン酸イオンのアナログとして結合していると考えられた(Fig. 4-6)。“half-closed” を形成した A_1B_1 ユニットの結合した ADP 分子とリン酸イオンアナログは ATP 分子を模倣するように結合していたことから、この ${}_{3ADP}A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体は ${}_{3ADP}V_1$ 同様、ADP 解離待ちのステップに相当すると考えられた。上述のように、ヌクレオチドの結合によって $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体が $V_1(A_3B_3DF)$ 複合体と同様の構造変化を示すことから、回転触媒中の構造変化は軸の結合解離にかかわらず、触媒ドメインによってもたらされていることが示唆された。

4.2.5 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の高速 AFM 観察

$A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体をヒスチジンタグを介してマイカ基板に接着し、HS-AFM 観察を行った。はじめに、結晶構造と HS-AFM 像を対応させるために、ヌクレオチド非存在下、過剰量(6 mM)AMP-PNP 存在下、過剰量(6 mM)ADP 存在下での $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の HS-AFM 像をそれぞれ観察した。先述した結晶構造よりヌクレオチド非存在下での高速 AFM 像は、結晶構造におけるヌクレオチド非結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体に対応し、過剰量(6 mM)AMP-PNP 存在下、過剰量(6 mM)ADP 存在下での構造はそれぞれ AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体、ADP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の結晶構造に対応すると考えられる。 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の 3 つの A サブユニットの最も明るい輝点をそれぞれ結び三角形を描き、その面積を算出することで、それぞれの構造を解析した(Fig. 4-7a)。 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体では三角形の面積が平均して約 26 nm²、AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体 (ヌクレオチドが 2 分子結合した状態) では約 19 nm²、ADP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体(ヌクレオチドが 3 分子結合した状態) では約 16 nm² とヌクレオチドの結合数が増加するにつれて $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体がより小さな構造を形成することが示唆された。

次に ATP γ S 加水分解の回転触媒に伴う $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の構造変化を観察するために、HS-AFM を用いて 2 μ M の ATP γ S 存在下で $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の観察を行った。 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の 3 つの A サブユニットの最も明るい輝点を結んで描いた三角形の重心から最も離れた頂点がどのように移り変わっていくのかをプロットすることで、

回転ステップの解析を行った。三角形の重心から最も離れた頂点は概ね反時計回りに遷移しており、途中それぞれの頂点が重心からほとんど同一の距離をとるような構造もみられた(Fig. 4-7b)。ATP γ S 加水分解に伴う、3つのAサブユニットをプロットした三角形の面積の変化を解析すると、三角形の面積はおよそ21 nm²と17 nm²の2成分で推移していることが示唆された(Fig. 4-7c)。このことから、A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}複合体は回転触媒中にヌクレオチドが2分子結合した状態と3分子結合した状態で構造変化を繰り返していることが示唆された。このことから、回転触媒中に加水分解後生成物であるADPが脱離する前に次のATP分子が結合するステップが先に生じていると考えられる。

4.2.6 V₁-ATPase 触媒ドメイン (A₃B₃複合体) の一方向回転触媒メカニズム

これまでV₁(A₃B₃DF)複合体の回転メカニズムに関して一分子観察実験やX線結晶構造解析から様々な議論がなされてきた。V₁複合体はAMP-PNPの結合の有無にかかわらず“empty”、“bound”、“tight”の非対称構造を形成する¹⁹。“tight”に結合したATPは加水分解を受けてADPとリン酸イオンが生成される。生成されたリン酸イオンは速やかに解離し、“tight”フォームは“ADP-bound”フォームへと変化する²⁰。この構造変化に連動してさらに隣のA₁B₁ユニットが“empty”から“bindable-like”へと変化する。ATPが結合することが可能となる。この“bindable-like”へ次のATP分子が結合すると、“half-closed”フォームへの構造変化が生じ、隣のA₁B₁ユニットが連動して“ADP-bound”から“tight-like”

へと構造変化する。この“tight-like”に結合している ADP 分子が解離すると、軸は次の“bound”フォームを形成している A_1B_1 ユニットへ向かって移動し、回転する。軸と結合した A_1B_1 ユニットは、軸との結合によって“tight”フォームを形成する。こうして生じた構造は元の“empty”、“bound”、“tight”が反時計回りに 120° 回転したものとなっており、このようにそれぞれの A_1B_1 ユニットが協同的に構造変化することで、軸の回転運動が生じているのだと考えられていた^{19,20}。

$A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体でも V_1 複合体と同様に ATP 加水分解後、リン酸イオンが解離し、ADP と結合している A_1B_1 ユニットは“ADP-bound”フォームを形成し、それに伴って隣接する“empty”は“bindable-like”へと構造変化すると考えられる(Fig. 4-1)。加水分解直前の結晶構造は A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体) と V_1 複合体で異なり、 V_1 複合体ではヌクレオチドが結合している A_1B_1 ユニットの構造はそれぞれ“bound”と“tight”で異なるのに対して、 A_3B_3 複合体および $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体ではどちらの A_1B_1 ユニットも等価に“bound”を形成していた。この構造変化では A サブユニットはほとんど動いておらず、 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の高速 AFM 観察では検知されていないが、 V_1 複合体において本加水分解触媒ステップに相当する結晶構造から、おそらく V_1 でも A_3B_3 複合体でも同様に回転ステップが進行すると考えられる²⁴。このステップは一分子観察実験で観察された DF 軸の 40° 回転のサブステップに相当すると考えられている²⁴。次に“bindable-like”へ次の ATP 分子が結合することによって“half-closed”への構造変化が誘起される。この構

造は $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の高速 AFM 観察で見られていた、ヌクレオチドが 3 分子結合した状態の構造であると考えられ、 $3ADPA_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の結晶構造に対応する。また、このステップに相当する結晶構造は A_3B_3 複合体と V_1 複合体で類似していた(Fig. 4-2, 4-6)。ATP が結合していることにより、A、B サブユニット間の結合親和性が高い状態となり、“half-closed”を形成している A_1B_1 ユニットはさらに閉じた構造を形成しようとする²⁶。ADP と結合して“tight-like”を形成している A_1B_1 ユニットは、ATP が結合している時よりも親和性が約 40 倍低下しているために、“half-closed”の構造変化と連動するように協同的に構造変化し、“tight-like”は ADP を解離して開いて“empty”となり、“half-closed”はさらに閉じて“bound”となる²⁶。 V_1 複合体においては、それまで軸が結合していた A_1B_1 ユニットが、軸との親和性の低い“empty”へと構造変化したことで、軸が解離し、ATP が結合して“bound”を形成している隣の A_1B_1 ユニットと強く相互作用してそちらに向かって揺らぎの中で一分子観察実験で観察された 80° 回転のサブステップに相当する動きが生じる^{24,26}。 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体については DF 軸が存在しないために、軸が動作する本ステップは観察されていないが、DF 軸がなくとも A_3B_3 複合体および $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体は V_1 複合体とほとんど同様に構造変化しており、加水分解触媒ドメインである A_3B_3 複合体の構造は、DF 軸がなくとも協同的な構造変化し、軸はそうした協同的な構造変化に伴って回転の方向性が制御されているということが示唆された

^{9,26}。

このように A_3B_3 複合体の協同的構造変化モデルは、軸が結合した V_1 複合体とほとんど同様の構造変化を示していた。協同的な構造変化は軸の結合の有無にかかわらず、ヌクレオチドの結合解離に応答して生じており、 F_1 -ATPase におけるデモクラティックモデルと同様に、 V_1 -ATPase も協同的に構造変化していることが示唆された⁹。これまでに V_1 -ATPase の回転メカニズムについて X 線結晶構造解析と一分子観察実験から様々な議論がなされてきたが、今回の A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体) の X 線結晶構造解析と HS-AFM から明らかとなった知見から回転メカニズムにおいて DF 軸の果たす役割を考察したい。HS-AFM で観察された $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の ATP(ATP γ S)加水分解に伴う回転の一方向性は、一分子観察実験で観察された V_1 複合体のものよりも低下していた。これは A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体) と V_1 複合体の構造の違いによるものであると考えられる。先述の通り、ATP 加水分解のステップにおける結晶構造は、 V_1 複合体では A_1B_1 ユニットの構造は“empty”、“bound”、“tight”それぞれ異なる構造を形成するが、 A_3B_3 複合体および $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体では“empty”、“bound”、“bound”と“bound”を等価に形成していた。 V_1 複合体では加水分解が生じる A_1B_1 ユニットの軸と強く結合している“tight”フォームに限定されている。これに対して、 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体では ATP の結合によって A、B サブユニット間の親和性が高まっているため、“bound”フォームが揺らぎの中で加水分解遷移構造である“tight”フォームへと変化し、ATP の加水分解が生じる。さらに、 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体はシステイン架橋によって留め金が強ま

っており、2 箇所の“bound”フォームで同時に加水分解が生じる可能性があり、ADP の脱離箇所 2 箇所存在することによって、時計回り、もしくは反時計回りの 2 種類の構造変化が生じる可能性があり、これが逆回転ステップ生じさせる一因となっていると考えられる。DF 軸の結合によって“empty”、“bound”、“tight”と全ての A_1B_1 ユニットが異なる構造を形成することができ、ATP 加水分解が生じる活性部位が 1 箇所に制限されていると考えられる。ATP 加水分解活性を比較すると $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の非活性の初速度は $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}DF$ 複合体よりも 1.1 倍高く、軸の結合によって活性が低下している。これは $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体では 3 箇所のうち 2 箇所の活性部位で同時に ATP 加水分解反応が生じ得るのに対して、 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}DF$ では 3 箇所のうち 1 箇所の活性部位でしか加水分解反応が生じ得ないからであると考えられる。本研究によって、触媒ドメインである A_3B_3 複合体は基質であるヌクレオチドの結合解離に応答して協同的にその構造が変化する入力装置のようにはたらき、中心軸である DF 複合体は運動を制御し回転の方向性を高める制御装置のようにはたらいているということが示唆された。

第四章第三節 結論

本研究では、軸のない触媒ドメイン (A_3B_3 複合体) の ATP 加水分解に伴う回転ダイナミクスを HS-AFM によって観察し、X 線結晶構造解析によってその各ステップの詳細構造を明らかにすることで、詳細な分子構造の変化を捉えることに成功した。HS-AFM 像からは $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体はヌクレオチドが2分子結合した ATP 加水分解中に ATP 加水分解待ち、もしくは ATP 結合待ちの構造と3分子結合した ADP 解離待ちの2状態を遷移していることが示された。このことから、 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体は軸がなくとも V_1 とほとんど同様のメカニズムで回転し、ヌクレオチドが二分子結合した ATP 結合待ち状態を経て、ヌクレオチドが3分子結合した ADP 解離待ち構造を形成、つまり次の ATP が結合して初めて ADP が脱離するという ADP 後抜けモデルにて回転ステップが進行することが示唆された⁴⁹。さらに A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体) と V_1 複合体の構造、構造変化メカニズムを比較することによって、触媒ドメインである A_3B_3 複合体が基質や生成物の結合解離に協動的な構造変化をもって応答し、中心軸である DF 複合体はその構造変化を制御し、回転方向を制御している。 V_1 -ATPase をはじめ回転分子モータータンパク質は、それぞれの構成サブユニットのバランスの中で、回転モーターとしての機能が生み出されているということが示唆された。

Table 4-1 A₃B₃ 複合体および A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体の ATP 添加後 60 秒間の比活性

	ATP 添加後 60 秒間の比活性 ($\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
A _{(S23C)3} B _{(N64C)3} + DF	18 ± 0.21
A _{(S23C)3} B _{(N64C)3}	23 ± 0.31
A ₃ B ₃ + DF	15 ± 0.19
A ₃ B ₃	0.68 ± 0.083

Table 4-2 A_(S23C)3B_(N64C)3 複合体のデータ収集・精密化の統計値

	eA _(S23C) 3B _(N64C) 3	2AMPNPNA _(S23C) 3B _(N64C) 3
Data collection		
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Cell dimensions		
Unit cell a, b, c (Å)	122.080, 121.830, 129.110	117.570, 123.380, 230.280
Unit cell α , β , γ (°)	90.00, 90.22, 90.00	90.00, 90.07, 90.00
Resolution (Å)	50-2.70 (2.87-2.71)	50-3.38 (3.59-3.38)
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	0.077 (0.711)	0.185 (0.679)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	15.06 (2.03)	7.84 (2.04)
Completeness (%)	99.8 (99.3)	99.7 (98.8)
Redundancy	4.0 (4.1)	4.2 (4.3)
Refinement		
Resolution (Å)	44.30-2.71	49.37-3.38
No. reflections	102917	91940
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.2342/0.2661	0.207/0.2845
No. atoms		
Protein	23490	46400
Ligand/ion	84	80
Water	286	16
<i>B</i> -factors		
Protein	83.77	79.95
Ligand/ion	110.49	39.43
Water	61.61	17.39
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.002	0.003
Bond angles (°)	0.576	0.607
Ramachandran favored (%)	98.0	98.7
Ramachandran allowed (%)	2.0	1.3
Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0
PDB ID	7DQC	7DQD

Table 4-3 ADP 結合型 A_{(S23C)3}B_{(N64C)3} 複合体のデータ収集・精密化の統計値

	3ADPA _{(S23C)3} B _{(N64C)3}
Data collection	
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
Unit cell a, b, c (Å)	120.030, 121.090, 231.470
Unit cell α , β , γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	50-2.70 (2.86-2.69)
R_{sym} or R_{merge}	0.155 (0.640)
Mean $I / \sigma(I)$	8.71 (2.09)
Completeness (%)	98.7 (98.1)
Redundancy	3.4 (3.4)
Refinement	
Resolution (Å)	47.63-2.69
No. reflections	92582
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.2241/0.2519
No. atoms	
Protein	23808
Ligand/ion	89
Water	191
<i>B</i> -factors	
Protein	39.00
Ligand/ion	33.09
Water	25.37
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.646
Ramachandran favored (%)	98.2
Ramachandran allowed (%)	1.8
Ramachandran outliers (%)	0.0
PDB ID	7DQE

Table 4-4 $eA_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ のそれぞれの A_1B_1 ユニットを eA_3B_3 と重ね合わせた際の RMSD 値

構造	フォーム	eA_3B_3		
	A_1B_1 ユニット	Empty	Bindable	Bound
$eA_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$	Empty	0.79	1.42	3.45
	Bindable	1.76	0.60	3.32
	Half-closed	2.57	1.64	2.36

計算は全て $C\alpha$ 炭素原子に対して行った。

Table 4-5 $2\text{AMP-PNP}A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ のそれぞれの A_1B_1 ユニットを bA_3B_3 と重ね合わせた際の RMSD 値

構造	フォーム	bA_3B_3		
	A_1B_1 ユニット	Empty	Bound ₍₁₎	Bound ₍₂₎
$bA_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$	Empty	1.06	3.90	4.05
	Bound ₍₁₎	3.86	0.91	0.96
	Bound ₍₂₎	4.23	1.39	1.25

計算は全て $C\alpha$ 炭素原子に対して行った。

Table 4-6 eA_{(S23C)3}B_{(N64C)3} のそれぞれの A₁B₁ ユニットを _{3ADP}V₁ と重ね合わせた際の RMSD 値

構造	フォーム	_{3ADP} V ₁		
	A ₁ B ₁ ユニット	Half-closed	Bound	Tight-like
_{3ADP} A _{(S23C)3} B _{(N64C)3}	Half-closed	2.07	3.36	3.63
	Bound	2.73	1.30	1.53
	Tight-like	3.08	1.81	0.80

計算は全て C α 炭素原子に対して行った。

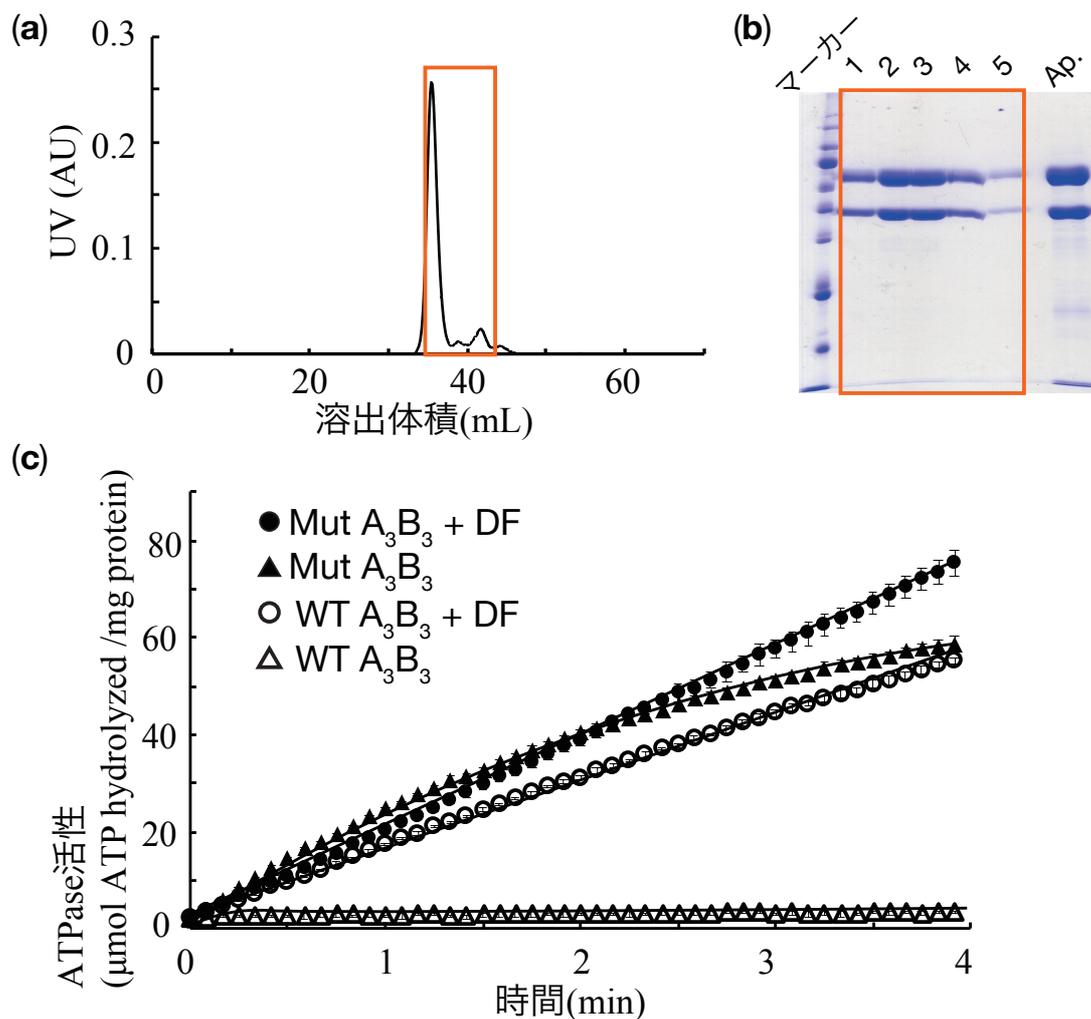


Fig. 4-1 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の生成と野生型および変異型 A_3B_3 複合体の ATPase 活性

(a) HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムを用いた $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体のゲル濾過プロファイル。(b) 精製フラクションの SDS-PAGE。四角で囲った部分がそれぞれのフラクションに対応する。(c) ATP 再生系を用いた精製サンプルの ATPase 活性測定。23°C で 340 nm での吸光度から NADH の酸化率を算出し、ATP 加水分解量を求めた。標準誤差をバーで表示した。

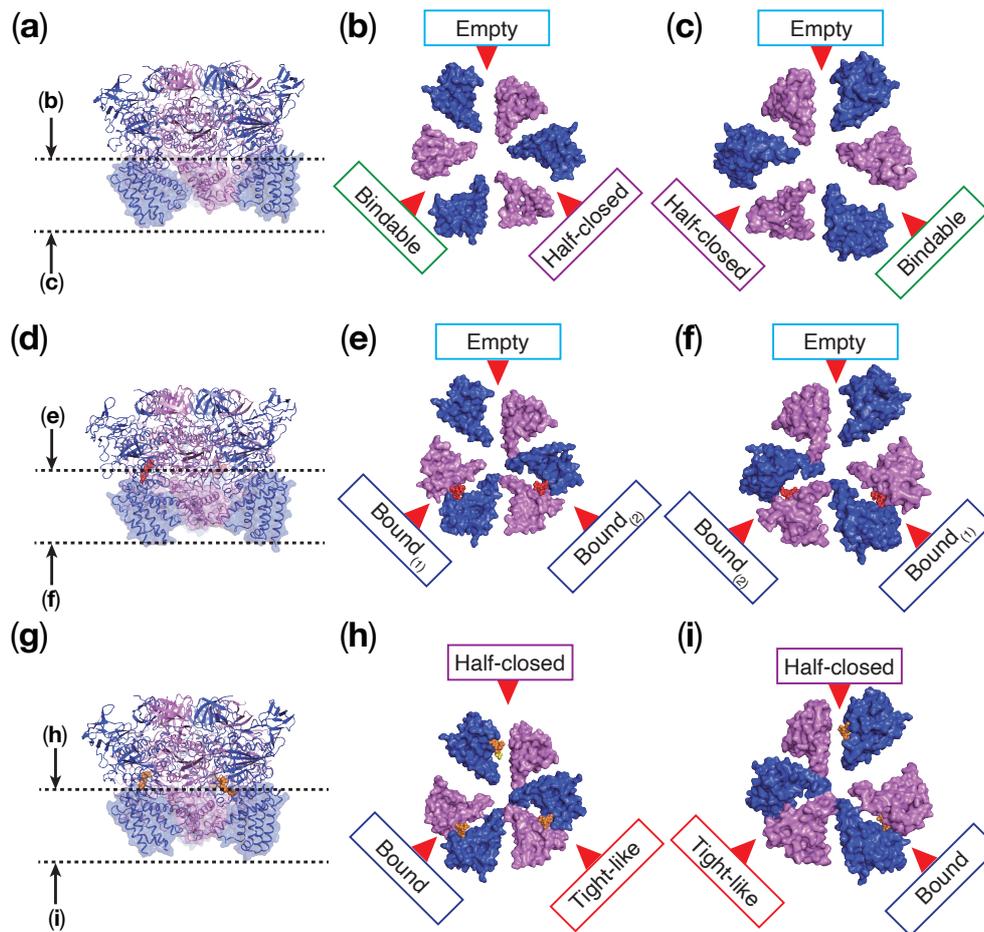


Fig. 4-2 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の結晶構造

変異型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体結晶構造の上面図。A サブユニットを青色、B サブユニットを紫色で表示した。結合している AMP-PNP、ADP、リン酸アナログ(SO_4^{2-})を球体表示した。ヌクレオチド非結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体(a-c)、AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体(d-f)、ADP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体(g-i)の結晶構造。(a, d, g) $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の側面図をリボン表示し、C 末端ドメイン(A: 450-593, B: 363-458)を透過したサーフェス表示した。A サブユニットを青色、B サブユニットを紫色で表示した。(b, e, h) N 末端側から見た $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の上面図。(c, f, i) C 末端側から見た $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の上面図。AMP-PNP、ADP、 SO_4^{2-} をそれぞれ赤色、オレンジ色、黄色の球体表示で表している。

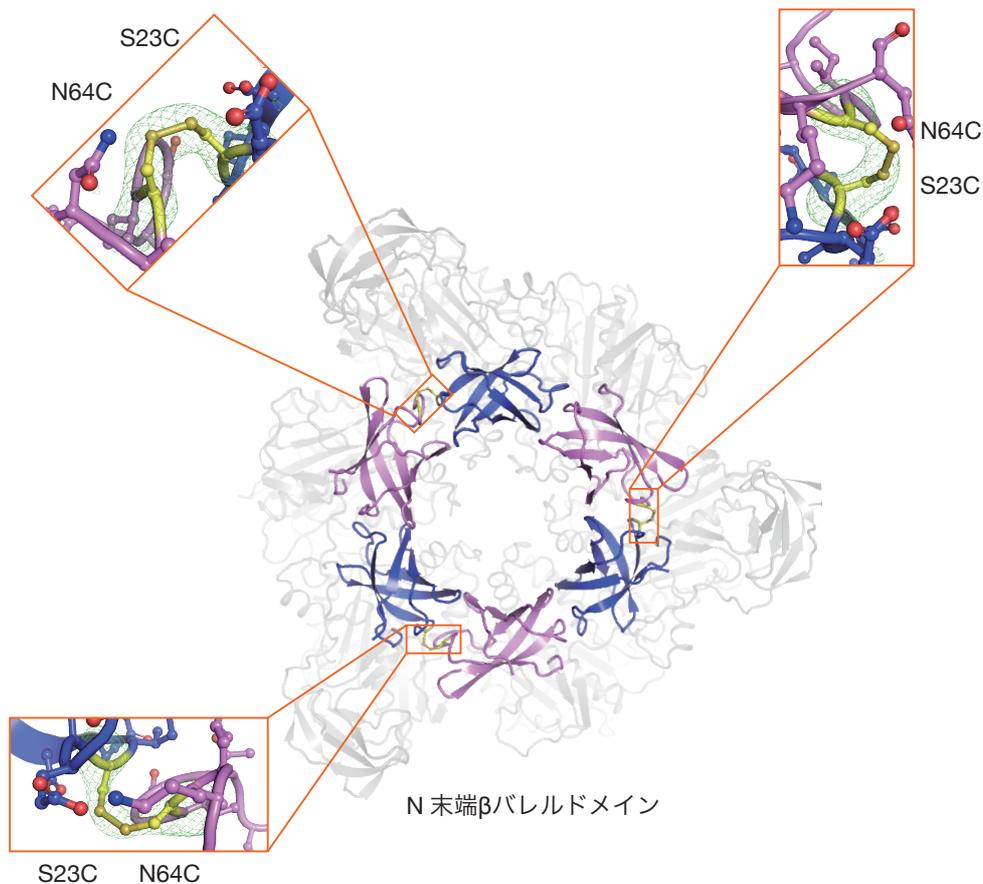


Fig. 4-3 A_(S23C)3B_(N64C)3 複合体クラウン構造部分のシステイン架橋

野生型 A₃B₃ 複合体と変異型 A_(S23C)3B_(N64C)3 複合体の β バレルドメイン (クラウン構造) の上面図。変異型 A_(S23C)3B_(N64C)3 複合体を青と紫でカラー表示した。中央図のオレンジ色の枠は変異箇所を示している。周囲のオレンジ色の枠で囲われた図は黄色で示した変異残基(A-S23C、B-N64C)付近をズームインして表示している。A-S23C、B-N64C 残基の $|F_o| - |F_c|$ オミットマップを 4.0 シグマで赤色 (ネガティブ) と緑色 (ポジティブ) で表示している。

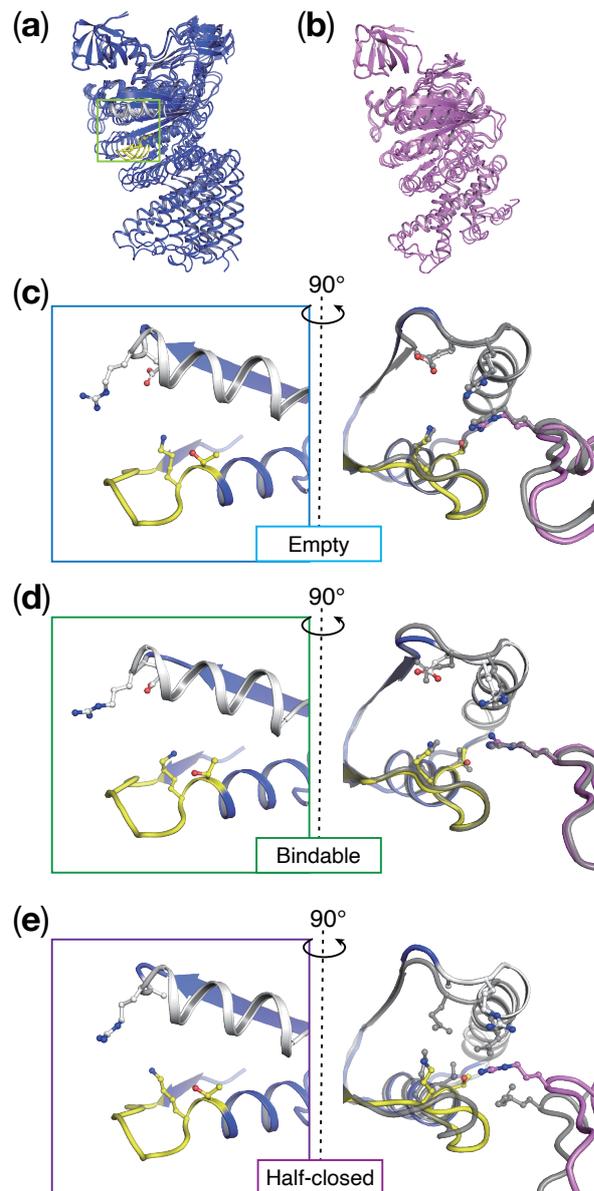


Fig. 4-4 ヌクレオチド非結合型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体のヌクレオチド結合部位の拡大図

(a) ヌクレオチド非結合型変異 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の A サブユニット (青色) (a) と B サブユニット (紫色) (b) をそれぞれ $C\alpha$ 原子で重ね合わせた構造。P ループを黄色、アーム領域を白色で表示している。緑色の枠はヌクレオチド結合部位を示している。(c-e) a の緑色の枠部分に対応するヌクレオチド結合部位をズームインした図。右側には左の図を 90° 回転させて、A-B サブユニットのインターフェースが見やすいように表示し、ヌクレオチド非結合型 A_3B_3 複合体の “empty”、“bindable”、“bound” の A サブユニット (残基番号 67-593、白黒で表示) と重ね合わせた図を掲載している。

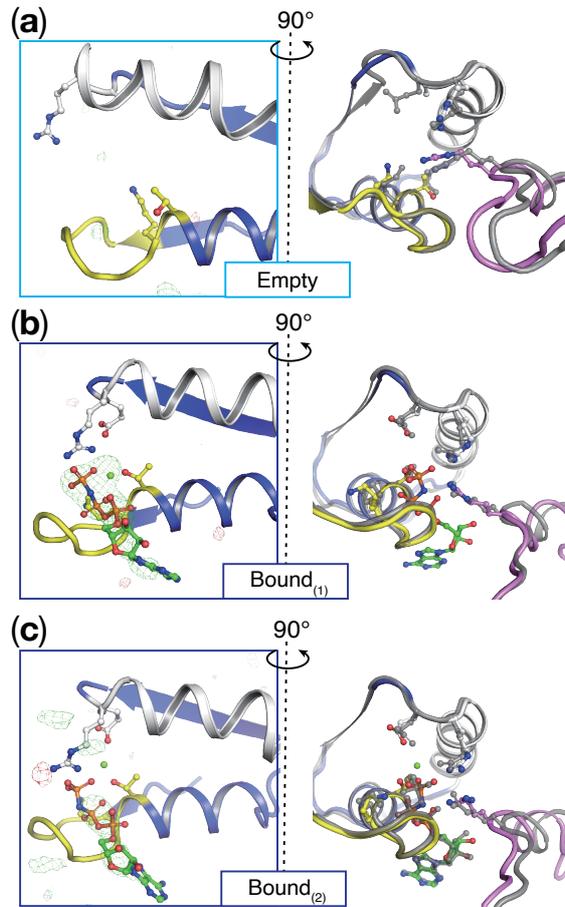


Fig. 4-5 AMP-PNP 結合型 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体のヌクレオチド結合部位の拡大図

AMP-PNP 型変異 $A_{(S23C)3}B_{(N64C)3}$ 複合体の A サブユニット (青色) (a) と B サブユニット (紫色) (b) をそれぞれ $C\alpha$ 原子で重ね合わせた構造。P ループを黄色、アーム領域を白色で表示している。緑色の棒はヌクレオチド結合部位を示している。(c-e) a の緑色の棒部分に対応するヌクレオチド結合部位をズームインした図。右側には左の図を 90° 回転させて、A-B サブユニットのインターフェースが見やすいように表示し、AMP-PNP 結合型 A_3B_3 複合体の“empty”、“bound₍₁₎”、“bound₍₂₎” の A サブユニット (残基番号 67-593、白黒で表示) と重ね合わせた図を掲載している。

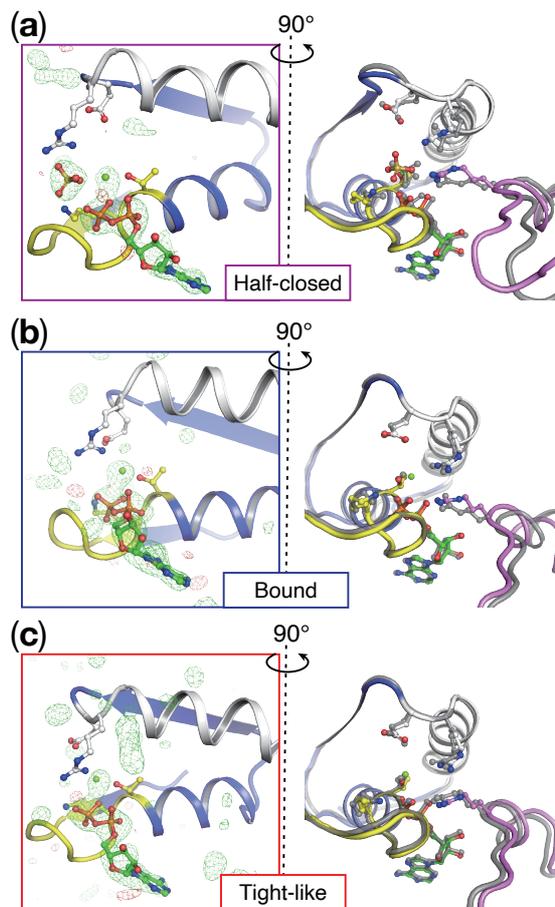


Fig. 4-6 ADP 結合型 $A_{(S23C)}_3B_{(N64C)}_3$ 複合体のヌクレオチド結合部位の拡大図

ADP 結合型 $A_{(S23C)}_3B_{(N64C)}_3$ 複合体の A サブユニット (青色) (a) と B サブユニット (紫色) (b) をそれぞれ Ca 原子で重ね合わせた構造。P ループを黄色、アーム領域を白色で表示している。緑色の棒はヌクレオチド結合部位を示している。(c-e) a の緑色の棒部分に対応するヌクレオチド結合部位をズームインした図。右側には左の図を 90° 回転させて、A-B サブユニットのインターフェースが見やすいように表示し、ADP 結合型 V_1 複合体の“half-closed”、“bound”、“tight-like”の A サブユニット (残基番号 67-593、白黒で表示) と重ね合わせた図を掲載している。結合ポケットの ADP と Mg^{2+} を取り除いて計算した $|F_o| - |F_c|$ マップを 4.0 シグマで、赤色 (ネガティブ) と緑色 (ポジティブ) で表示している。

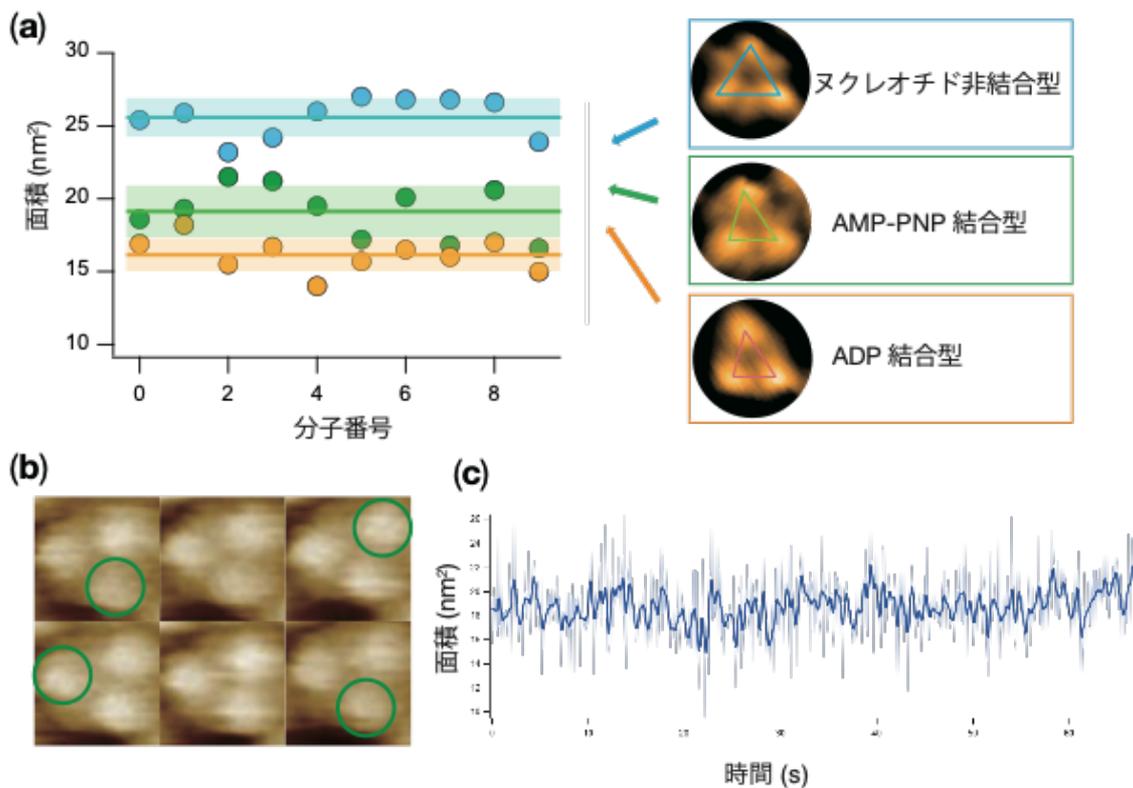


Fig. 4-7 ATP- γ S 加水分解に伴う $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の協同的構造変化

(a) ヌクレオチド非存在下、過剰量 AMP-PNP 存在下、過剰量 ADP 存在下 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体のそれぞれの A サブユニットの最も明るい輝点を結んで描かれる三角形の面積の大きさ。ヌクレオチド非存在下の面積の平均を青色の破線で左図に表し、過剰量 AMP-PNP 存在下、過剰量 ADP 存在下を同様にそれぞれ緑色、赤色で示した。(b) ATP γ S の加水分解に伴う変異型 $A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体の協同的構造変化を捉えた高速 AFM 像。結晶構造の“empty”フォームに対応する A サブユニットを緑色の丸で囲った。(c) A サブユニットで最も明るい輝点を結んだ三角形の面積の時間変化。生データを明るい青色で、スムージング処理したデータを深い青色で表した。

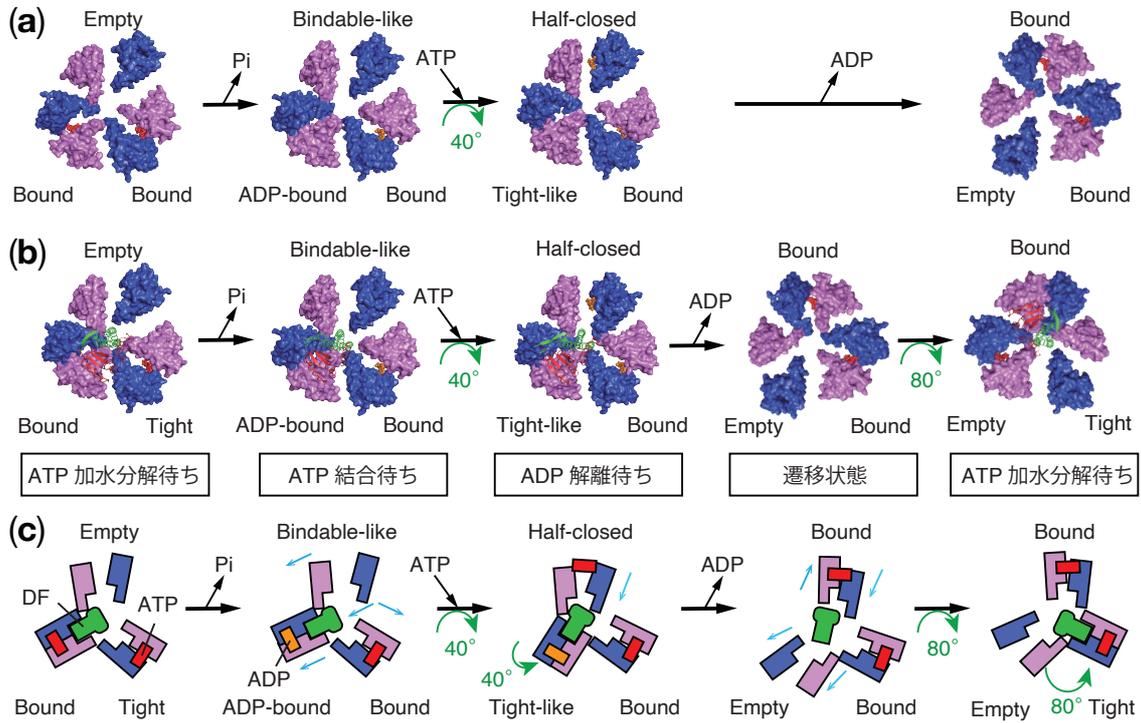


Fig. 4-8 A_3B_3 複合体および V_1 複合体の協同的構造変化の回転伝搬分子メカニズム

高速 AFM 像と結晶構造に基づいた A_3B_3 複合体の協同的構造変化モデル。(a) A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体) の結晶構造を C 末端ドメインを N 末端側から見た上面図。協同的構造変化メカニズムモデルに基づいて並べた。(b) V_1 複合体の結晶構造を(a)同様に示し、回転メカニズムモデルに基づいて並べた。(c) V_1 複合体の一方方向回転メカニズムモデルを Figure3-4 同様に結晶構造に基づいて模式図で示した。

第四章 結語

本研究では、*E. hirae* 由来 V_1 -ATPase について、主に構造生物学的知見や生化学的解析に基づいて、生化学的解析の知見等を組み合わせることで、一方向回転メカニズムの解明を目指した。

第 2 章では、触媒ドメインである A_3B_3 複合体の非対称構造メカニズムについて主に報告した。非対称な野生型 A_3B_3 複合体と対称性の高い $A_3B_{(L65Y)_3}$ 複合体の構造、機能を比較することで、非対称構造が V_1 -ATPase が酵素として ATP 加水分解に連続的に触媒として機能するために重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

第 3 章では SPR 法を用いて測定した V_1 -ATPase のそれぞれのサブユニット間の親和性の変化について報告した。基質である ATP は A、B サブユニット間で強い接着剤のようにはたらき、ATP の結合によって A_1B_1 ユニットを密に閉じさせるような構造変化が生じることが示唆された。さらに、 A_3B_3 複合体の中でも、密に閉じた 1 組の A_1B_1 ユニットと DF 軸が主に結合していることが示唆され、 V_1 -ATPase の回転は熱揺らぎによって駆動され、ATP のエネルギーは親和性の変化と運動の方向性の選択に用いられていることが示唆された。

第 4 章では X 線結晶構造解析と HS-AFM 観察を組み合わせることで明らかとなった、ATP 加水分解反応に伴う V_1 -ATPase 触媒ドメインの詳細な構造変化を報告した。ATP 加水分解反応に伴って ADP 後抜けモデルに従い触媒ドメインである A_3B_3 複合体の構造

が協同的に変化することで、回転が生み出されることが示唆された。さらに、 A_3B_3 複合体 ($A_{(S23C)_3}B_{(N64C)_3}$ 複合体) と V_1 複合体のメカニズムを比較することで、 A_3B_3 複合体、DF 複合体それぞれが果たす役割も明らかとなった。

本研究によって V_1 -ATPase について構造が明らかとなった後も不明のままであった非対称構造形成のメカニズムや一方向回転のメカニズムを理解する上での重要な知見を持たせることができた。本研究は V_1 -ATPase の性状の理解にとどまらず、タンパク質の四次構造形成メカニズムの理解や、生体内エネルギー変換メカニズムの解明に向けた一歩としても重要であると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご助言を賜り、丁寧にご指導くださった千葉大学大学院理学研究院の村田武士教授に心より感謝いたします。また、ご親切に議論に取り組んでくださり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京理科大学基礎工学部の山登一郎教授に感謝いたします。さらに、理化学研究所生命機能科学研究センタータンパク質機能・構造研究チームの白水美香子部門長、石塚（桂）芳子技師、染谷友美技師、沖縄科学技術大学院大学(OIST)の松波秀行研究員、金沢大学バイオ AFM 先端研究センター高速 AFM 研究開発部門の安藤敏夫部門長、イメージング研究部門の古寺哲幸部門長、名古屋大学理学研究科の内橋貴之教授、Weil Cornell Medicine Anesthesiology の今村元紀博士、横浜市立大学生命医科学研究科の水谷健二助教、東京理科大学基礎工学部の白石充典准教授、新井聡史博士、斎藤靖子様、そして千葉大学生体構造化学研究室の小笠原諭特任准教授、安田賢司特任助教、鈴木七緒博士、今井（薬師寺）・ファビアナ・リカ博士、鈴木花野博士に感謝いたします。

本研究の放射光実験は茨城県つくば市の PF で行いました(proposals 2014G-171, 2014R-51, 2016G048, and 2016R-19)。PF では BL-1A 及び BL-17A の方々にご協力いただき、感謝申し上げます。分子描画及び分子解析ソフトとして Pymol、UCSF Chimera パッケージ (Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-

GM103311))を使用しました。また、生化学的解析のために、Biacore T100 evaluation、Anabel、Prism 8 のソフトを使用しました。

本研究は日本学術振興会（特別研究員 DC2(R2 年度)）、科研費（特別研究員奨励費: 20J11683）、公益財団法人双葉電子記念財団（平成 31 年度博士後期課程奨学金）、千葉大学 SEEDS 基金（千葉大学国際交流事業(2019 年度)）、の支援を受けたものです。

最後に、共に実験に携わり、支えてくださった生体構造化学研究室の皆様、そして、あらゆる面で私を支えてくださった友人達と家族に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Forgac, M. Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917–929 (2007).
2. Mulkidjanian, A. Y., Makarova, K. S., Galperin, M. Y. & Koonin, E. V. Inventing the dynamo machine: The evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 892–899 (2007).
3. Walker, J. E. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1–16 (2013).
4. Grüber, G., Manimekalai, M. S. S., Mayer, F. & Müller, V. ATP synthases from archaea: The beauty of a molecular motor. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 940–952 (2014).
5. Taguchi, J. & Kitao, A. Operating principles of rotary molecular motors: Differences between F1 and V1 motors. *Biophys. Physicobiol.* **13**, 117–126 (2016).
6. Zhao, J., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* **521**, 241–245 (2015).
7. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* **386**, 299–302 (1997).
8. Suzuki, T., Tanaka, K., Wakabayashi, C., Saita, E. I. & Yoshida, M. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F₁-ATPase motor. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 930–936

- (2014).
9. Uchihashi, T., Iino, R., Ando, T. & Noji, H. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase. *Science* (80-.). **333**, 755–758 (2011).
 10. Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621–628 (1994).
 11. Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J. E., Leslie, A. G. W. & Mueller, D. M. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F₁ATPase. *EMBO J.* (2006) doi:10.1038/sj.emboj.7601410.
 12. Cingolani, G. & Duncan, T. M. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2011) doi:10.1038/nsmb.2058.
 13. Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 13231–13236 (2015).
 14. Oot, R. A., Kane, P. M., Berry, E. A. & Wilkens, S. Crystal structure of yeast V₁-ATPase in the autoinhibited state. *EMBO J.* **35**, 1694–1706 (2016).
 15. Kakinuma, Y., Yamato, I. & Murata, T. Structure and function of vacuolar Na⁺-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 7–14 (1999).

16. Imamura, H. *et al.* Rotation scheme of V₁-motor is different from that of F₁-motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17929–17933 (2005).
17. Murata, T., Yamato, I. & Kakinuma, Y. Structure and mechanism of Na⁺-translocating ATPase from *Enterococcus hirae*. *J. Bioenerg. Biomemb.* **37**, 411–413 (2005).
18. Arai, S. *et al.* Reconstitution in vitro of the catalytic portion (NtpA₃-B₃-D-G complex) of *Enterococcus hirae* V-type Na⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 698–702 (2009).
19. Arai, S. *et al.* Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature* **493**, 703–707 (2013).
20. Suzuki, K. *et al.* Crystal structures of the ATP-binding and ADP-release dwells of the V₁ rotary motor. *Nat. Commun.* **7**, 13235 (2016).
21. Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Structure of the rotor of the V-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science (80-.)*. **308**, 654–659 (2005).
22. Minagawa, Y. *et al.* Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **288**, 32700–32707 (2013).
23. Iino, R., Ueno, H., Minagawa, Y., Suzuki, K. & Murata, T. Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses. *Curr.*

- Opin. Struct. Biol.* **31**, 49–56 (2015).
24. Iida, T. *et al.* Single-molecule analysis reveals rotational substeps and chemo-mechanical coupling scheme of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **294**, 17017–17030 (2019).
 25. Maruyama, S. *et al.* Metastable asymmetrical structure of a shaftless V₁ motor. *Sci. Adv.* **5**, eaau8149 (2019).
 26. Arai, S., Maruyama, S., Shiroishi, M., Yamato, I. & Murata, T. An affinity change model to elucidate the rotation mechanism of V₁-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 1413–1418 (2020).
 27. Alam, M. J. *et al.* Loose Binding of the DF Axis with the A₃B₃ Complex Stimulates the Initial Activity of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
 28. Saijo, S. *et al.* Crystal structure of the central axis DF complex of the prokaryotic V-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19955–19960 (2011).
 29. Kigawa, T. *et al.* Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 63–68 (2004).
 30. Tang, G. *et al.* EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 38–46 (2007).
 31. Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM

- structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530 (2012).
32. Kodera, N., Sakashita, M. & Ando, T. Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 10.1063/1.2336113 (2006).
33. Uchihashi, T., Kodera, N. & Ando, T. Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Protoc.* **7**, 1193–1206 (2012).
34. Hiraki, M., Yamada, Y., Chavas, L. M. G., Wakatsuki, S. & Matsugaki, N. Improvement of an automated protein crystal exchange system PAM for high-throughput data collection. *J. Synchrotron Radiat.* **20**, 890–893 (2013).
35. Hiraki, M. *et al.* High-throughput operation of sample-exchange robots with double tongs at the Photon Factory beamlines. *J. Synchrotron Radiat.* **15**, 300–303 (2008).
36. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr D* **66**, 125–132 (2010).
37. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144 (2010).
38. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
39. Emsley, P. *et al.* Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.*

- Sect. D Biol. Crystallogr.* **D60**, 2126–2132 (2004).
40. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biological Crystallogr.* **D53**, 240–255 (1997).
 41. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **D66**, 213–221 (2010).
 42. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 437–450 (2003).
 43. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
 44. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
 45. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, (1970).
 46. Ando, T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophys. Rev.* **10**, 285–292 (2018).
 47. Ando, T., Uchihashi, T. & Scheuring, S. Filming biomolecular processes by high-speed

- atomic force microscopy. *Chem. Rev.* **114**, 3120–3188 (2014).
48. Yamato, I., Murata, T. & Khrennikov, A. Energy flow in biological system: Bioenergy transduction of V₁-ATPase molecular rotary motor from *E. hirae*. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **130**, 33–38 (2017).
 49. Singharoy, A. *et al.* Rotational mechanism model of the bacterial V1 motor based on structural and computational analyses. *Front. Physiol.* **10**, 1–12 (2019).
 50. Yamato, I. & Murata, T. Rotation Mechanism Revealed From the Three Dimensional Structure and Single Molecule Observation of V₁-ATPase From *E. Hirae*. **VI**, 177–184 (2020).
 51. Ueno, H. *et al.* Torque generation of enterococcus hirae V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **289**, 31212–31223 (2014).

略称

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

AMP-PNP: 5'-Adenylylimido-diphosphate

ATP: Adenosine 5'-triphosphate

ATP γ S: Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate

ATPES: 3-aminopropyl-triethoxysilane

BCA: Bicinchoninic acid

Bis-Tris: Bis (2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane

BSA: Bovine Serum Albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CCP4: Collaborative Computational Project No. 4

DTT: Dithiothreitol

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethanesulfonic acid

HS-AFM: High-Speed Atomic Force Microscopy

Imidazole: 1,3-Diaza-2,4-cyclopentadiene

GST: Glutathione S-transferase

LDH: Lactate Dehydrogenase

MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid

PEG: Polyethylene glycol

Phenix: Python-based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography

Pi: Inorganic Phosphate

PK: Pyruvate Kinase

RMSD: root mean square deviation

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SPR: Surface Plasmon Resonance

TEV: Tobacco Etch Virus

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane

XDS: X-ray Detector Software