



回転分子モータータンパク質の駆動メカニズムに迫る
～タンパク質は、不安定さを内包した複合体を形成する～

千葉大学大学院理学研究院（分子キラリティー研究センター兼任）の村田武士教授らの研究グループは、回転分子モータータンパク質^{注1)}である V 型 ATPase の触媒部位 A₃B₃ 複合体の機能・構造解析から、回転分子モーターが不安定な構成ユニットからなる準安定構造を形成すること、そのお陰で高い触媒機能を発揮できることを初めて明らかにしました。本研究によって回転分子モーターの根本的な駆動メカニズムの理解が進展するばかりでなく、その他の多くの四次構造^{注2)}を形成するタンパク質複合体の分子メカニズム研究にパラダイムシフトをもたらす成果であると期待できます。

本研究は J S T 戦略的創造研究推進事業（さきがけ）、科学研究費（新学術領域研究：発動分子科学）等の支援を受けて行われました。本研究成果は、2019 年 1 月 30 日（東部標準時）に米国科学誌「Science Advances」のオンライン速報版で公開されました。

■ 研究の背景と経緯

V 型 ATPase (図 1) は、ATP^{注3)} のエネルギーを使って回転モーター部分の回転軸を秒間 100 回転もの速度で一方向に回転させてイオンの能動輸送を行うタンパク質複合体です。細胞内外のイオン環境を整えて、細胞や生体の恒常性維持に重要な役割を果たしています。しかし、どのようにして回転モーター部分が高速で一方向に回転し続けられるのかは明らかになっていませんでした。

本研究グループは腸球菌 V 型 ATPase の触媒頭部ドメイン^{注4)} (A₃B₃ 複合体) の詳細構造を X 線結晶構造解析^{注5)} によって明らかにしました (Arai S. et al, 2013, *Nature*, **493**, 703-707、(図 2a, b))。触媒頭部の留め金 (図 2a, b の四角で囲んだ部分) でリング構造を作り、3 つの

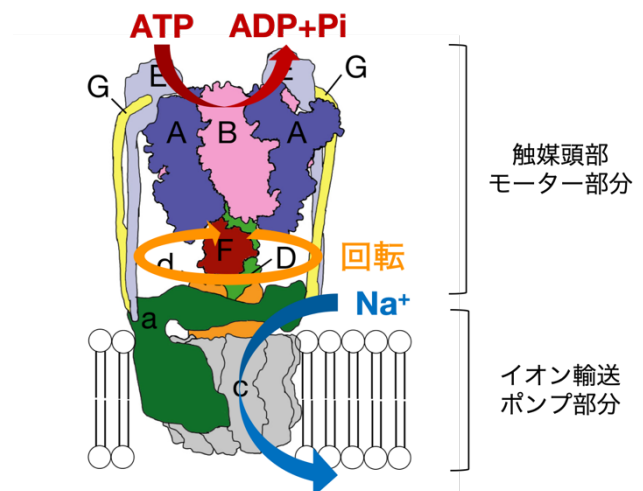


図 1 V 型 ATPase の構造モデル

V 型 ATPase は 9 ~ 13 種類の構成ユニットからなる超分子複合体で、触媒頭部モーター部分と膜結合イオンくみ出し装置部分からなる。触媒頭部 (A₃B₃; 青色と紫色の 6 量体) で ATP を加水分解し、回転軸 (DFd) とローターリング (c) を回転させ、イオンを細胞外 (またはオルガネラ内) へ輸送する。

同じモーターユニット(A_1B_1)の集合体であるにも関わらず、非対称構造を形成していました(図 2c)。また、開いた構造を持つユニットや少し閉じた構造ユニットの存在が確認されました。さらに、ATP に似た構造をもつ AMP-PNP^{注6)} 存在下で、 A_3B_3 複合体の X 線結晶構造解析を行なったところ、一つのユニットにはヌクレオチド^{注7)} が入ることができずに別の非対称構造に変化していました(図 2d)。 A_3B_3 複合体のこうした非対称構造はヌクレオチドの結合順をコントロールし、さらにはその一方向回転を軽々と継続させている大本の仕組みだと考えられました。本研究では、留め金を弱くした変異型 A_3B_3 複合体を作製し、その構造・機能を調べ、非対称構造形成の意義を明らかにしました。

■ 研究の内容

留め金を弱くした変異体では、高速AFM^{注8)} 観察でも対称構造を示していました。一方、野生型 A_3B_3 複合体は非対称構造を形成していました。さらに本研究グループは、X線結晶構造解析でヌクレオチド非結合型(分解能3.2 Å)・AMP-PNP結合型(2.1 Å)の詳細な分子構造を決定しました(図3a, b)。ヌクレオチド非結合型は、野生型と異なり、すべてのユニットが開いた構造の対称構造を示しました(図3c)。AMP-PNP結合型構造では、3箇所全てにAMP-PNPが結合して複合体が崩壊し、リング状に集合できなくなっていました(図3b)。その中のユニットの二つとも、軸と結合した際にだけ初めて生まれる密に閉じた構造を示しました(図3d)。残りは少し閉じた構造ユニットでした。このことは、野生型ではリング状複合体をしっかりと形成維持することで密に閉じた構造の形成が妨げられていることを意味しています。

本研究から、モーターユニット(A_1B_1)が安定に存在する構造は、ヌクレオチド非結合時には開いた構造であり、AMP-PNP結合時には密に閉じた構造であることが示唆されました。しかも、留め金が、まるで孫悟空の頭のキンコジのように、しっかりとモーターリングのサイズと形を決めていると考えられます。開いた構造ユニットが三つ集合しようとする野生型

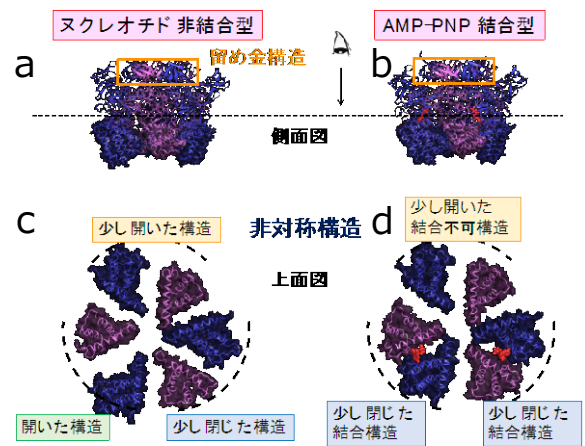


図2 野生型 A_3B_3 複合体の非対称構造

(上段) A_3B_3 複合体の側面図。(a) ヌクレオチド非結合型、(b) AMP-PNP 結合型の C 末端部分は分子表面を半透明に塗りつぶして表示している。

(下段) A_3B_3 複合体の C 末端部分についての上面図 ((a) ヌクレオチド非結合型、(b) AMP-PNP 結合型)。

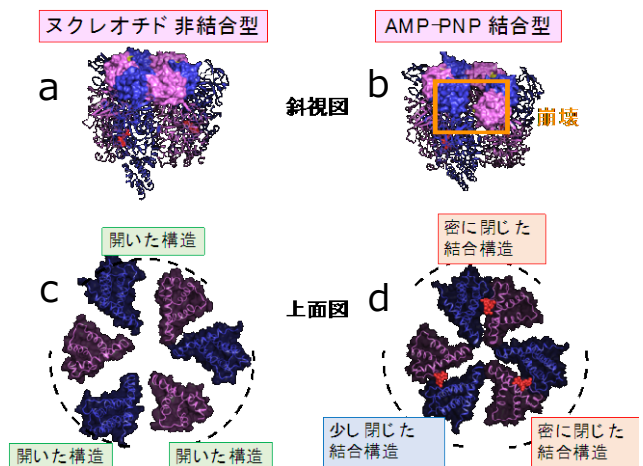


図3 変異型 A_3B_3 複合体の対称構造と複合体の崩壊

(上段) 変異型 A_3B_3 複合体の斜視図 ((a) ヌクレオチド非結合型、(b) AMP-PNP 結合型)。複合体の切れ目を見やすいように N 末端部分は分子表面を塗りつぶしている。

(下段) A_3B_3 複合体の C 末端側上面図 ((a) ヌクレオチド非結合型、(b) AMP-PNP 結合型)。

A₃B₃では、リングサイズが小さすぎて、ユニット間のパッキングがきつく、すべてが開いた構造を取れずに、少し閉じた構造や少し開いた不安定な構造も含む非対称になってしまうようです。これは全体としては、最安定ではなく、準安定な構造と考えられます(図4a,b)。

ヌクレオチド結合により、三つの閉じた構造を入れるには、今度はリングサイズが大きくしかもしっかりしているので、一つのユニットからヌクレオチドを離してしまい、残り二つはヌクレオチドを結合したまま少しだけ閉じた不安定な構造ユニットになり、非対称となるようです。そして留め金の弱い変異体では、その締め付けが弱いため、ユニット間のパッキングに負けて開いた構造を取りやすくなり、対称になると考えられます。変異体にヌクレオチドが結合すると、閉じた三つの構造の縮こまり方に留め金が耐えきれず、切断されてしまうと思われる。つまり、野生型触媒ドメインのA₃B₃複合体では非対称構造を形成することで最安定構造に落ち着いてしまうことが妨げられ、準安定構造間を遷移するお陰で、活性化エネルギーの障壁を素早く乗り越えて軽々と一方向に高速回転することができるのだと提言されました。このように、本研究は回転分子モータータンパク質の駆動原理に迫る成果と考えられます。

さらに、今回の結果は、複数の構成タンパク質が集合する複合体の四次構造形成の意義にも深い示唆を提供します。四次構造の中では、構成タンパク質間の押し合いへし合いがあります。そのためストレスがかかり歪みが生まれ、大抵の四次構造をもつタンパク質複合体は最安定ではあり得ず、準安定な構造を作るのではないのでしょうか。その準安定構造が、実は構成タンパク質間の協同性をもたらし、四次構造をもつタンパク質複合体が示す素晴らしい生物活性を産むのだろうと考えられます。つまり、本研究で得られた概念は、その他多くのタンパク質が複雑な複合体を形成することの根本原理に迫り、タンパク質複合体の構造と機能の研究にパラダイムシフトをもたらす成果であると考えられます。

■ 今後の展開

本研究により、V型ATPaseの回転モーター触媒ドメインについて、非対称構造形成の意義を理解することができました。また本研究は、生体内ではなぜ複雑な四次構造を持ったタンパク質複合体を作り出しているのかというような生体分子の神秘を解き明かすことに繋がる研究成果であると期待されます。将来的には、ナノサイズかつ高効率なモーターとしての産業利用や、ガン転移や骨粗鬆症などV型ATPaseの機能異常に関わる疾患の治療薬の開発への応用も期待されています。

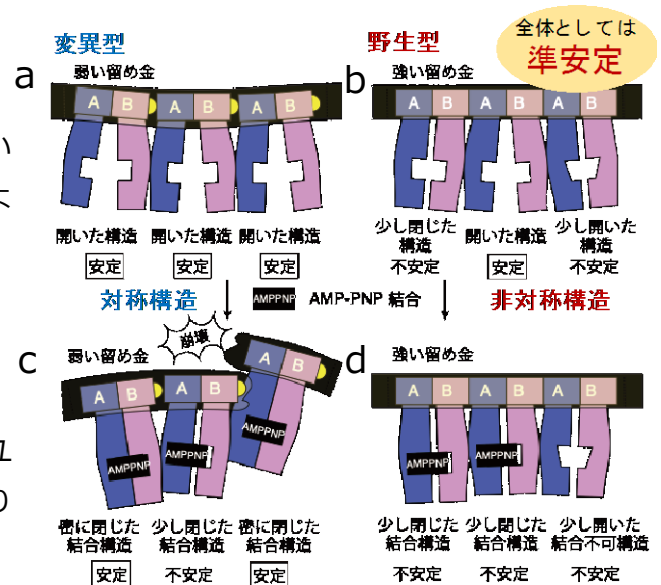


図4 V型ATPase触媒頭部部分の分子メカニズムモデル

A₃B₃複合体を内側面から見て仮想的に展開図とした準安定状態のモデル図。(a)ヌクレオチド非結合型変異型A₃B₃複合体、(b)ヌクレオチド非結合型野生型A₃B₃複合体、(c)AMP-PNP結合型変異型A₃B₃複合体、(d)AMP-PNP結合型野生型A₃B₃複合体

■ 用語解説

注1) 回転分子モータータンパク質

生物の細胞内で ATP の加水分解によって得られたエネルギーを、機械的な回転運動に変換する、サイズがナノメートル (10^{-9} メートル) 程度のタンパク質複合体の総称。

注2) 四次構造

アミノ酸が共有結合（ペプチド結合）で一つながりにつながったタンパク質が、複数個集合して大きなタンパク質（複合体）になる。その集合状態の構造を四次構造と呼ぶ。

注3) ATP

アデノシン三リン酸の略称。普段は高いエネルギーを貯蔵しており、必要な時に取り出して使うことができることから、生体のエネルギー通貨と呼ばれている。

注4) 触媒ドメイン

タンパク質分子全体のうち、触媒作用に関与する部分。

注5) X線結晶構造解析

解析対象のタンパク質を結晶化し、X線照射によって得られる回折データから、タンパク質の立体構造を原子レベルで決定する手法。

注6) AMP-PNP

ATPの非分解性の類似体。 β -と γ -リン酸間が窒素原子に置き換わっているため、加水分解反応が阻害される。

注7) ヌクレオチド

塩基、糖、リン酸から構成される物質で核酸の構成単位。ATP、ADP、AMP-PNPなどを含む。

注8) 高速 AFM

高速原子間力顕微鏡の略称。基盤に固定した試料表面を微小な針でなぞり、原子間力を検知することで、試料表面の構造を測定する手法。秒間10枚程度の画像データが収集できる。

■ 論文掲載情報

掲載誌 : 「*Science Advances*」 **5**, eaau8149 (2019)

<論文タイトル> Metastable asymmetrical structure of shaftless V_1 motor

<著者情報> Shintaro Maruyama, Kano Suzuki, Motonori Imamura, Hikaru Sasaki, Hideyuki Matsunami, Kenji Mizutani, Yasuko Saito, Fabiana L. Imai, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Ichiro Yamato & Takeshi Murata

本件に関するお問い合わせ先

千葉大学大学院理学研究院教授 村田武士

Tel : 043-290-2794 Fax : 043-290-2794

E-mail : t.murata@faculty.chiba-u.jp