

たんぱく質ナノモーターの回転メカニズムの全貌解明

—多剤耐性腸球菌の抗菌薬開発に期待—

生物の体内に存在する V 型 ATPase は、回転運動によりイオンを細胞膜の内外に運ぶことで、生命活動を維持する役割をもつ「たんぱく質ナノモーター^{注1)}」です。千葉大学大学院理学研究院（膜タンパク質研究センター）の鈴木花野特任助教、村田武士教授らはアリゾナ州大学の Singharoy らとの国際共同研究で、院内感染の原因となる多剤耐性腸球菌^{注2)}の生育に重要な V 型 ATPase 回転モーター部分の新たな立体構造を解析することに成功しました。この構造に基づいてコンピュータによるシミュレーションで検証した結果、不明であった V 型 ATPase の加水分解直後の構造を含む回転メカニズムを明らかにし、アデノシン三リン酸(ATP)のエネルギーが回転運動に変換されるメカニズムの全貌を解明しました。本研究成果は、本酵素の立体構造に基づいた多剤耐性腸球菌の抗菌薬の開発につながるものと期待されます。

本論文は、2022年6月14日に米国科学雑誌「ACS Central Science」にオンラインで公開されました。

■ 研究の背景と経緯

V 型 ATPase は生体膜中に存在し、ATP のエネルギーを使ってイオンを膜の反対側に運ぶことで、細胞膜内外のイオン濃度を調整するたんぱく質ナノモーターです。回転モーター部分の V_1 と膜たんぱく質の V_0 部分から構成され（図 1A）、 V_1 部分にはヌクレオチド^{注3)}が結合できるサイトが 3ヶ所あり、そこで順々に ATP を ADP とリン酸 (Pi) に加水分解することで運動して中心軸が回転し、これに伴い V_0 部分でイオンを輸送します。

近年薬剤耐性菌の蔓延が国際社会の継続的な脅威となっていますが、上市される新規抗菌薬の数は年々減少しており、薬剤耐性菌に対する治療の選択肢は急速に狭まりつつあります。その結果、薬剤耐性菌による死者数は急増し 2050 年までにその数は年間 1000 万人を超えると推計されています。薬剤耐性菌の 1 つである多剤耐性腸球菌の類縁菌（腸内連鎖球菌）にも V 型 ATPase が存在し、腸内のアルカリ性環境下での生育に重要な役割を担っています。V 型 ATPase の分子メカニズムを知ることにより、多剤耐性腸球菌が引き起こす疾病原因の解明につながり、V 型 ATPase の阻害剤が抗菌薬になり得ると考えています。

本研究グループは近年、腸内連鎖球菌に存在する V 型 ATPase の V_1 部分 (A_3B_3DF 複合体) の詳細なスナップショット構造^{注4)}を X 線結晶構造解析^{注5)}によって複数明らかにし、ATP のエネルギーが回転運動に変換されるメカニズムの大枠を原子レベルで解明しました（図 1B）。しかし ATP が加水分解された直後のスナップショット構造は唯一明らかになっていませんでした。そこで ATP 加水分解直後に相当する状態を作り出し、その立体構造解析と MD シミュレーション^{注6)}による検証を行いました。

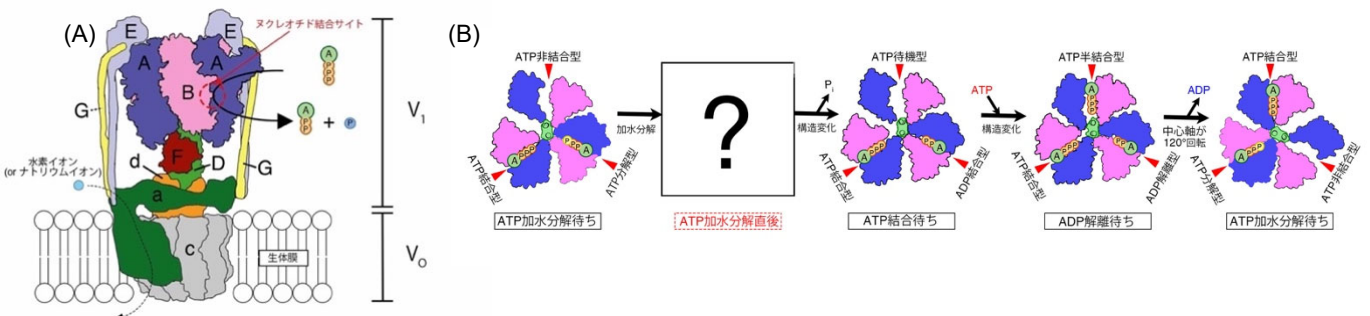


図 1 (A): V 型 ATPase の構造モデル。V 型 ATPase は 9~13 種類のたんぱく質からなる超分子複合体で水溶性たんぱく質部分 (V_1 部分) と膜たんぱく質部分 (V_0 部分) からなる。触媒頭部 (A_3B_3 ; 青色と紫色の 6 量体) で ATP を加水分解し、中心軸 (DFd) とローターリング (c) を回転させ水素イオン (またはナトリウムイオン) を細胞外 (またはオルガネラ^{注7)} 内) へ輸送する。

図 1 (B): これまでに明らかになっている V_1 -ATPase の分子メカニズム。全て上から見た V_1 -ATPase のスナップショット構造。見やすくするために A_3B_3 複合体の C 末端ドメイン、D サブユニットのみを表示している。3 カ所あるヌクレオチド結合サイトを赤い矢印で示した。「ATP 加水分解待ち」構造と「ATP 結合待ち」構造の間のスナップショット構造が明らかになっていない。

■研究成果

加水分解直後のスナップショット構造を得るために V_1 -ATPase に ADP とリン酸の類似体であるフッ化アルミニウム^{注8)} を混ぜて結晶化を行い、新たな V_1 -ATPase の結晶構造を得ることに成功しました (図 2A,B)。既知の V_1 -ATPase 構造と比較すると「ATP 加水分解待ち」構造の「ATP 分解型 (ATP 加水分解を待っているフォーム)」のヌクレオチド結合部位に ADP とフッ化アルミニウムが結合したことで、新しいフォーム「ADP・Pi 結合型」に変化していました。このため得られたスナップショット構造は「リン酸解離待ち」と考えられます。

得られた構造に基づいて MD シミュレーションを行った結果、加水分解で生じたリン酸の排出経路は中心軸側とその反対側からの 2 方向存在し (図 2C)、そしてリン酸が「ADP・Pi 結合型」から排出されることで V_1 -ATPase 全体の構造変化が引き起こされ、新たな ATP が結合できるようになることが確認されました。

これらの結果から、今まで明らかになっていなかった「リン酸解離待ち」構造と、「ATP 加水分解待ち」構造から「ATP 結合待ち」構造までの回転分子メカニズムを新たに提案することができました (図 3)。

■今後の展開

本研究で V_1 -ATPase の唯一未解明であった「リン酸解離待ち」構造が解明されたことにより、V 型 ATPase が ATP のエネルギーを回転運動に変換する分子メカニズムの全貌が明らかになりました。これにより、V 型 ATPase の生体エネルギー変換メカニズムの一般原理の理解が進展するものと期待できます。また、 V_1 -ATPase の回転の詳細な分子メカニズムの解明により、多剤耐性腸球菌などへの抗菌薬の開発につながることを期待されます。

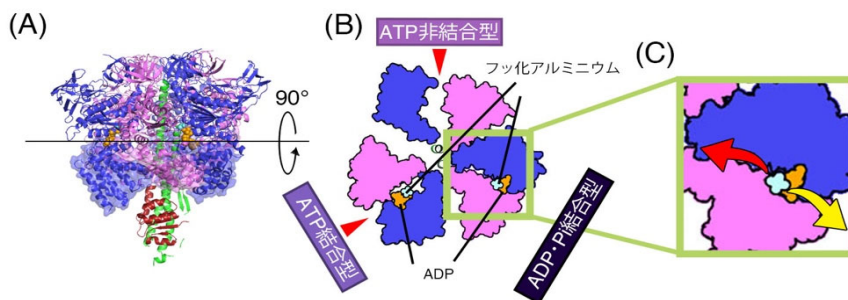


図 2: 本研究で得られた V_1 -ATPase (A_3B_3DF 複合体) の結晶構造。(A) は横から、(B) は上から見た立体構造。ADP をオレンジ色、フッ化アルミニウム (リン酸の類似体) を水色で表す。(C) MD シミュレーションから得られたリン酸の排出される 2 方向を赤^{注9)} と黄色^{注10)} の矢印で表す。

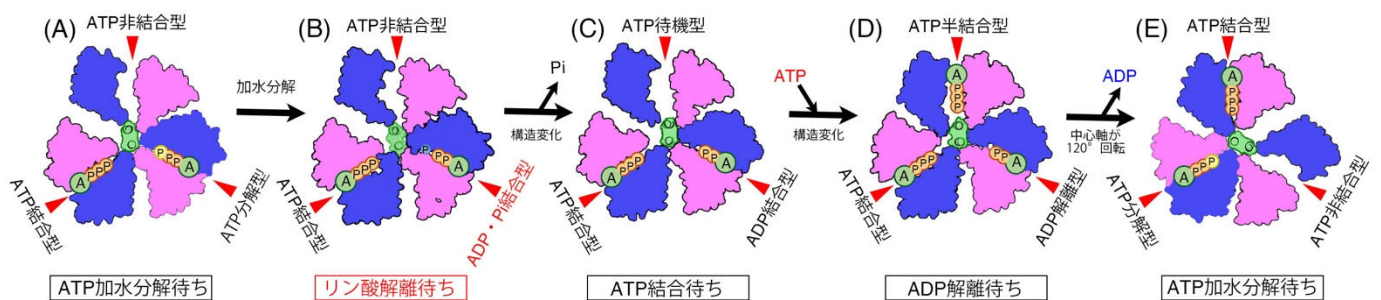


図 3: V_1 -ATPase の分子メカニズムモデル。全て上から見た V_1 -ATPase のスナップショット構造 (A・E:「ATP 加水分解待ち」構造、B:「リン酸解離待ち」構造、C:「ATP 結合待ち」構造、D:「ADP 解離待ち」構造)。V 型 ATPase で ATP のエネルギーが回転運動に変換されるには、まず「ATP 加水分解待ち」構造 (A) の「ATP 分解型」に結合している ATP が ADP とリン酸に加水分解して「ADP・Pi 結合型」に変化する (「リン酸解離待ち」構造: B)。その後「ADP・Pi 結合型」からリン酸が解離して ADP のみが結合した状態になることで「ADP 結合型」に変化し、そして協同的に V_1 -ATPase 構造変化が起こって「ATP 結合待ち」構造 (C) になる。生じた「ATP 待機型」に ATP が結合することにより、さらに構造変化が起こり、「ADP 解離待ち」構造 (D) になり、最終的に ADP が解離することで、中心軸が 120 度回転し、最初の「ATP 加水分解待ち」構造 (E) に戻るといふ分子メカニズムモデルを提案した。

■研究プロジェクトについて

本研究は新学術領域研究（発動分子科学）、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業（AMED）、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）等の支援を受けて行われました。

■用語解説

注1) たんぱく質ナノモーター：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運動に変換するたんぱく質複合体の総称。ナノメートル（ 10^{-9} メートル）程度の大きさである。

注2) 多剤耐性腸球菌：Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE)。世界保健機構（WHO）が挙げた優先して研究開発に取り組むべき 12 種類の薬剤耐性菌の 1 つであり、心内膜炎や敗血症などの日和見感染を引き起こす。

注3)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 などを含む。

注4) スナップショット構造：たんぱく質が機能するときの動的な構造変化の中の 1 つの静止構造のこと。

注5) X線結晶構造解析：解析対象のたんぱく質を結晶化し、X線照射によって得られる回折データからたんぱく質の原子レベルでの立体構造を決定する手法。

注6) MDシミュレーション：分子動力学シミュレーション。生体高分子の各原子・分子について時間に対する原子の位置と速度をコンピューターで計算し、その動きを解析する手法。

注7) オルガネラ：細胞小器官。細胞の内部で特に分化した形態や機能を持つ構造の総称。

注8) フッ化アルミニウム：リン酸の類似体。F₁-ATPase やその他の ATPase では、ATP 加水分解直後の構造を得るためにフッ化アルミニウムを用いて X線結晶構造解析を行い、加水分解直後のスナップショット構造を得ることに成功している。

注9) 赤矢印の排出経路（動画）：

https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/acscentsci.1c01599/suppl_file/oc1c01599_si_001.mov

注10) 黄色矢印の排出経路（動画）：

https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/acscentsci.1c01599/suppl_file/oc1c01599_si_002.mov



■論文掲載情報

論文タイトル：Revealing a hidden intermediate of rotatory catalysis with X-ray crystallography and Molecular simulations

著者情報：#Mrinal Shekhar, #Chitrak Gupta, #Kano Suzuki, Chun Kit Chan, *Takeshi Murata, *Abhishek Singharoy (#共同第一著者, *責任著者)

掲載誌：ACS Central Science

DOI：https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01599

本件に関するお問い合わせ

<研究に関すること>

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

<報道に関すること>

千葉大学企画部渉外企画課広報室

Tel：043-290-2018

E-mail：koho-press@chiba-u.jp