

業績紹介： Na⁺ポンプ V-ATPase のイオン結合に伴う構造変化を赤外分光法で解明

古谷祐詞 (分子研・公募研究代表者)
神取秀樹 (名工大院工・班友)

論文題目: "Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-ring of V-ATPase from *Enterococcus hirae* Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy"
著者: Yuji Furutani, Takeshi Murata and Hideki Kandori
雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc. (Communication)*,
Publication Date (Web): February 14, 2011,
(DOI: 10.1021/ja1116414)

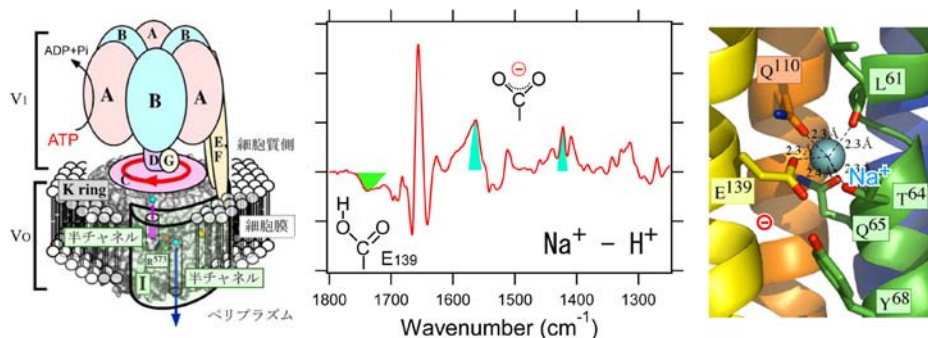
細胞は脂質二重膜からなる細胞膜で内外を区切っているが、分子やイオンなどをやり取りすることで養分を得たり、老廃物を排出したりすることで生命活動を維持している。このような物質のやり取りを行っているのが輸送体と呼ばれる一群の膜タンパク質である。その一種である V-ATPase は、生体内のエネルギー通貨と呼ばれるアデノシン三リン酸 (ATP) の加水分解により、プロトン細胞内の小胞内に輸送することで酸性環境を作り出す。骨代謝に関連する破骨細胞やガン細胞にも存在し、本酵素による酸性環境異常は骨粗鬆症やガン転移の原因の一つであるため、その特異的阻害剤は治療薬として期待されている。

類縁酵素であるバクテリア由来 V-ATPase は Na⁺や Li⁺イオンを輸送する。9 種類のサブユニットから構成される超分子複合体膜タンパク質であり、全体の分子量は 70 万以上にもおよぶ (下図左)。これまでに、K リングの原子レベルでの結晶構造解析がなされ、139 番目のグルタミン酸 (E139) を含むイオン結合部位の構造が明らかにされている (下図右)。このため真核生物由来の V-ATPase のモデルタンパク質として様々な研究が進められている。これまでに Na⁺や Li⁺が結合した K リングの X 線結晶構造が報告されているが (T.

Murata et al, *Science*, 2005, T. Murata et al, *PNAS*, 2008)、イオン脱着に伴う構造変化を実験的に明らかにした例はなかった。

今回、全反射型フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR) により V-ATPase の酵素活性を保った状態において、Na⁺および Li⁺イオンの脱着に伴う構造変化を明らかにした (下図中央)。V-ATPase が Na⁺および Li⁺イオンを結合すると K ring の E139 が脱プロトン化することで、イオン結合部位における電荷バランスを保ち、脂質二重膜を透過するエネルギー障壁を緩和することが分かった。また、E139 と水素結合を形成している 68 番目のチロシン残基 (Y68) がイオンの結合解離に重要な役割を果たしていることも示唆された。さらに、K ring のタンパク質の二次構造には大きな変化は観測されないこともわかった。このことは V-ATPase のイオン輸送において K ring は大きな構造変化をせず、I サブユニットとの間で形成される 2 カ所の半チャンネルにおいてイオンの結合解離を順次行うことで一方向性を獲得しているというこれまでのモデルを支持する。阻害剤の一種である *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) が E139 に結合することで変化が大幅に小さくなることも明らかとなった。このことから今回得られた赤外吸収スペクトルの変化が K ring のイオン結合部位の構造変化に由来することが支持された。

測定前後において、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパク質サブユニットの数と量、V-ATPase の Na⁺イオン依存的な ATPase 活性を確認したところ、ほとんど変化していないことが明らかとなった。ATR-FTIR は V-ATPase のような超分子複合体タンパク質に対しても優しい計測法であり、今後、様々な蛋白質とイオンとの相互作用解析に有用な手法になるものと思われる。



業績紹介：新規光受容体 MR の単離・精製・分光学的性質と分子進化的考察

須藤雄気（名大院理・公募研究代表者）

論文題目："A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties"

著者：Yuki Sudo, Kunio Ihara, K. Shiori Kobayashi, Daisuke Suzuki, Hiroki Irieda, Takashi Kikukawa, Hideki Kandori, and Michio Homma

雑誌巻号：J. Biol. Chem. **286**, 5967-5976 (2011)

太陽光は、生物のエネルギー源もしくは情報源として利用される。ロドプシタンパク質は、その際の光受容体として機能する[1]。ロドプシタンパク質とは、レチナール(ビタミンAのアルデヒド型)を発色団とする7回膜貫通型タンパク質の総称であり、教科書に登場する光駆動H⁺ポンプ・バクテリオロドプシン(BR)や、視覚を司るロドプシン(Rh)などに代表される[2]。微生物から高等生物まで広く存在するロドプシタンパク質群は数千種に及び、その機能は、BRに代表される「ポンプ」と、Rhや微生物の走光性を司るセンサーロドプシン(SR)などの「センサー」に大別される。このような機能分化はどのように起こってきたのだろうか？

これまでの遺伝学的解析によると、ポンプからセンサーが進化してきたと考えられている。実際に、SRの一種であるSRIIIは、ポンプとして働かうし[3]、BRの点変異体が、センサーとして機能しうること[4]、その分光学的性質[5-7]などから、BRとSRIIIの密接な関係が示唆される。ではこのような進化過程で、どのような変化が起こったのだろうか？すなわち、BRとSRIIIには、様々な性質に違いが見られるが、どのような順序で変化が加わったのであろうか？

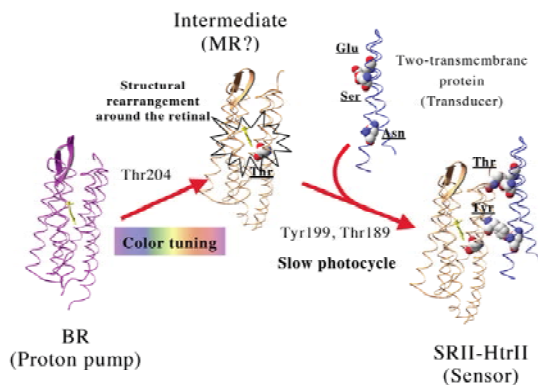


図 1. 新規受容体 MR を経由したロドプシンの分子進化
MR の性質を明らかにすることにより、光駆動イオンポンプ (BR) から、色変化や種々の光反応変化が起こり(MR)、光センサー (SRIII) が生まれたと推察した。

この問いに答えることは、地球上の生物がどうやって効率的に光を利用しているかを明らかにすることに繋がる。

本研究は、この究極的問いに迫ることを目的として行った。つまり、進化の途中にある(であろう)分子を単離し、その性質がポンプ(BR)に近いのか、センサー(SRIII)に近いのかを調べることで、進化の過程での変化を類推することを試みた。ゲノム情報をサーチし、その候補となる分子を *H. walsbyi* と呼ばれる古細菌から単離した。Middle Rhodopsin (MR)と名付けたこの分子のポンプ能、センサー能を解析するとともに、高純度に精製した後、光化学反応と構造変化を解析した。その結果、進化の初期段階で色が大きく変化したこと、その後光反応の遅延と伝達タンパク質との相互作用が起こった事を考察した(図1)。また、思わぬ副産物として、微生物型ロドプシンとしては初めてヒトなどと同様に、11-*cis* 型のレチナールを発色団としうる事がわかった。もしかしたらこれまで進化的な関係が無いと言われてきた Type-1 型(微生物)と Type-2 型(動物)ロドプシンをつなぐミッシングリンクなのかも知れない。

現在、この興味深い性質について、A01 班・藤井/酒井グループ、A01 班・古谷博士、A03 班・水谷/水野グループ、A03 班・井上博士と共同で解析を行っており、面白い結果が出つつある。今後の進展にご期待頂きたい。

引用文献

- [1] Y. Sudo, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, the 3rd edition (CRC press), in press (2011)
- [2] D. Suzuki, H. Irieda, M. Homma, I. Kawagishi, and Y. Sudo, *Sensors* **10**, 4010-4039. (2010)
- [3] Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, M. Sumi and N. Kamo, *Biophys. J.* **80**, 916-922. (2001)
- [4] Y. Sudo, and J. L. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16129-16134. (2006)
- [5] Y. Sudo, Y. Furutani, A. Wada, M. Ito, N. Kamo, and H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16036-16037. (2005)
- [6] Y. Sudo, M. Yamabi, S. Kato, C. Hasegawa, M. Iwamoto, K. Shimono, and N. Kamo, *J. Mol. Biol.* **357**, 1274-1282. (2006)
- [7] Y. Sudo, Y. Furutani, J. L. Spudich, and H. Kandori, *J. Biol. Chem.* **282**, 15550-15558. (2007)

業績紹介：回転分子モーター F₁-ATPase の化学・力学共役スキームを解明

飯野亮太 (阪大産研・公募研究代表者)

論文題目：" Phosphate release in F₁-ATPase catalytic cycle follows ADP release "

著者：Rikiya Watanabe, Ryota Iino and Hiroyuki Noji

雑誌巻号：Nat. Chem. Biol. 6, 814-820 (2010)

F₁-ATPase (F₁) はタンパク質でできた回転分子モーターである。F₁ では化学反応と力学的回転が可逆的に共役している。F₁ は ATP 加水分解で得られるエネルギーを使って反時計回りに自律的に回転するだけでなく、外力で回転子を逆方向の時計回りに強制回転させると、ADP と無機リン酸 (P_i) からエネルギー的に不安定な ATP を高い効率で合成することができる。これは自然界に存在する数多くの分子モーターの中でも稀少な性質である。例えば、ATP を加水分解して動くリニアモーターのキネシンやミオシンを後ろに引っ張っても ATP を合成することはできない。我々は 1 分子操作技術を用いた化学平衡の計測により (図 1)、F₁ の化学・力学共役スキームの中で唯一不明だった P_i 解離のタイミングを明らかにした (図 2)。そしてこの結果をもとに、F₁ が効率よく ATP を合成する仕組みの一端を提案した (図 3)。

F₁ の化学・力学共役スキームを図 2b に示す。本研究の結果から、P_i 解離のタイミングは ADP の解離よりも後であることが明らかとなった。尚、ATP 加水分解を駆動力とする多くの分子モーターでは、P_i は ADP よりも先に解離すると考えられている。我々は、この P_i 解離のタイミングの違いが F₁ 固有の性質に重要ではないかと考えた。上述の通り、F₁ は他の分子モーターと異なり、ATP 加水分解反応と力学的回転運動が可逆的に共役している。また生体内で F₁ は、F_o モーターと呼ばれる別の分子モーターによって無理やり逆方向に回転させられて ATP を合成している。しかしながら生体内の ATP 濃度は ADP 濃度よりも 10 倍以上高いとされ、ATP の効率的な合成には、ATP でなく ADP を基質として選択的に結合する仕組みが必要になる。

そこで我々は以下のモデルを提案した。逆反応の ATP 合成では基質の P_i は ADP よりも先に触媒部位へ結合すると考えられる。また生体内の P_i 濃度は ATP 濃度よりもずっと高いので、P_i は生成物 ATP よりも結合しやすいと予想される。P_i 結合部位と ATP の γ リン

酸の結合部位は一致しており、P_i が先に結合すると ATP の結合は物理的に阻害される (図 3)。一方、P_i は ADP の結合は阻害しない。このように P_i が ATP の結合を選択的に阻害することで、ATP 濃度が高い生体内でも効率的に ATP 合成を行えるのだと考えられる。

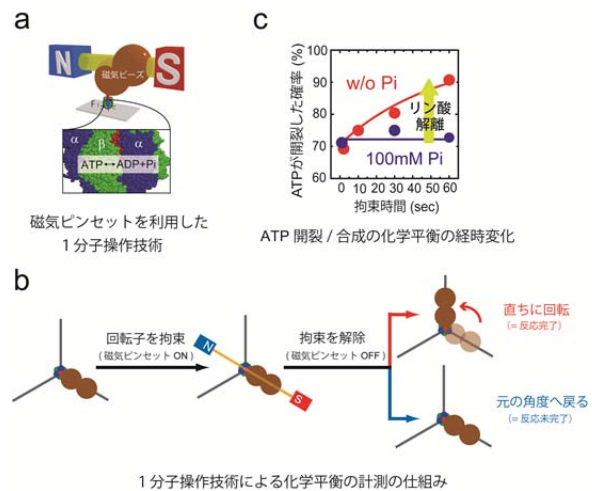


図 1. 1 分子操作による化学平衡の計測。(a) 磁気ピンセットを利用した 1 分子計測・操作系の模式図、(b) 実験操作の模式図。(c) ATP 開裂/合成の化学平衡の計測結果

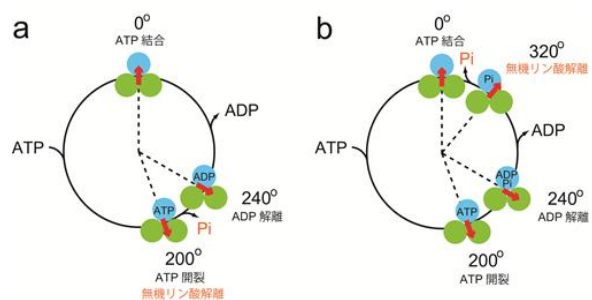


図 2. F₁ の化学・力学共役スキーム。P_i 解離の角度には 2 つの候補があった。(a) ATP の開裂直後に解離。(b) ATP 開裂から 120° 回転した後に解離。本研究で後者であることを解明。

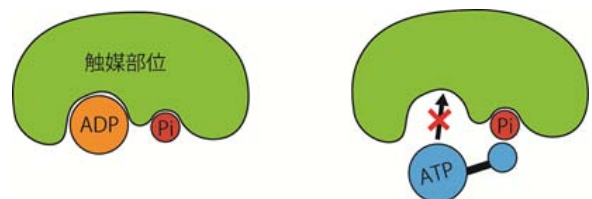


図 3. ATP 合成反応における無機リン酸の役割。触媒部位への P_i の結合が ATP の結合を物理的に阻害し、ADP の選択的な結合を促して効率よく ATP 合成を行う。