V型Na⁺-ATPaseの膜内在性ローターリングの構造：結晶構造から見えてきた回転モーターのイオン透過機構

科学技術振興機構ERATO

岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト
東京理科大学基礎工学部生物工学科
愛媛大学農学部生物資源学科

村田武士
山登一郎
柿沼喜己

1. はじめに

タンパク質がはたらくメカニズムを理解するためには、その立体構造情報が不可欠である。しかし、その

対象が膜タンパク質である場合には、大量発現・精製・結晶化のすべてが難しく、構造生物学的研究が遅れている。V型ATPaseとF型ATPaseは生体最小の回転モーターであり、親水性の触媒頭部部分 (V₁, F₁部分) とH⁺輸送を担う膜内在性部分 (V₀, F₀部分) とから構成される分子的に近縁な膜タンパク質 (分子質量600 kDa-800 kDa) である (Fig. 1)。

F型ATPaseは、真核細胞のミトコンドリアおよび葉緑体の内膜やバクテリアの細胞膜に存在し、呼吸鎖や電子伝達系によって形成されたH⁺の電気化学的濃度勾配を使って、ATPを合成するATP合成酵素である。F型ATPaseの研究は、大腸菌で*atp*オペロンが発見され (Fig. 1b)、分子生物学的・生化学的研究が進展してきた。特に水溶性部分 (F₁) の研究はX線結晶構造が解かれたこと¹⁾やF₁1分子の回転が直接観察されたこと²⁾などにより飛躍的に進み、ATPのエネルギーが軸サブユニットの回転という物理的な力に変換されるメカニズムの詳細が明らかになりつつある。これによりF₁部分での回転とF₀部分でのH⁺輸送がどのように結びついているかが注目を集めているが、F₀部分の原子分

Fig. 1 Schematic structure models of *E. hirae* V-type Na⁺-ATPase (c, a; *ntp* operon) and *E. coli* F-type H⁺-ATPase (d, b; *atp* operon). Three major subunits of the V-type ATPase, A, B, and K subunits, resemble β, α and c subunits of the F-type ATPase structurally and functionally, respectively (shown by bold lines). Other minor subunits of the V-type ATPase correspond to those of the F-type ATPase as shown by lines and broken lines. The numerical value represents the number of subunit. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

Structure of the Rotor Ring of the V-type Na⁺-ATPase: A Model for Ion Translocation of a Rotary Motor Revealed from the X-ray Structure

Takeshi MURATA¹, Ichiro YAMATO² and Yoshimi KAKINUMA³

¹ERATO Iwata Human Receptor Crystallography Project, JST

²Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science

³Faculty of Agriculture, Ehime University

解能の立体構造が得られていないため、そのイオン輸送のメカニズムの詳細は現在でも未解明のままである。

V型ATPaseは真核細胞の酸性小胞に存在し、ATPのエネルギーを使ってH⁺を小胞内部に輸送し、内部の酸性化を担っている。この酸性化は、情報伝達物質・毒物・薬剤の濃縮や、分泌タンパク質・ウイルス・ペプチドホルモンなどのプロセッシングや抗原の提示などの生理的にきわめて重要な反応に関与している。また、V型ATPaseは破骨細胞などの特殊な細胞膜にも存在し、骨の分解や再吸収に関与しており、V型ATPaseの機能異常が骨粗鬆症や大理石病の原因となることが示唆されている³⁾。このようにV型ATPaseは医学・生理学的にも大変重要な酵素であるが、研究対象が真核細胞であることから、V型ATPaseに関する分子生物学、生化学、構造生物学的研究はF型ATPaseに比べ遅れていた。

腸内連鎖球菌は高塩・高アルカリ条件下で生育が可能であり、これを担うタンパク質として、Na⁺-ATPaseが発見された⁴⁾。筆者らは生化学的・遺伝学的・分子生物学的解析により、この酵素がNa⁺輸送性の典型的な真核細胞型のV型ATPaseであることを明らかにした⁵⁾。本酵素遺伝子群は9個のORFからなるオペロンを形成している（Fig. 1a）。このオペロンを導入したプラスミドを用いて本酵素の大量精製系およびリポソームへの再構成系を確立し、分子生物学・生化学的研究を展開してきた⁶⁻⁸⁾。そして最近、V型、F型の両ATPaseとして初めて膜タンパク質部分であるローター（K）リングの詳細構造を得ることに成功した⁹⁾。本稿では、得られたローターリングのX線結晶構造と、その構造から予想される本酵素のイオン透過機構について紹介する。

2. ローターリングについて

V型、F型ATPaseのローターリングはプロテオリピッドともよばれる疎水性のcサブユニット（本酵素ではKサブユニット）が集合することにより構成されている。F型ATPaseのcサブユニットは8 kDaの2回膜貫通ヘリックス構造を形成している。V型ATPaseのcサブユニットは16 kDaの4回膜貫通ヘリックスから構成され、F型cサブユニットの遺伝子が重複したものと考えられている。F型ATPaseのローターリングの生化学的、構造学的研究は進んでおり、まずNMRを用いた有機溶媒中でのcサブユニットの構造が報告された。また、ローターリングの大きさ（cサブユニットの数）は種により異なること（酵母由来：10量体、バクテリア由来：10、11、15量体、植物由来：14量体など）が報告されている¹⁰⁾。さらに、われわれがV型のKリングの結晶構造を学会（EBEC2004）で報告してから遅れること半年後に*I. tartaricus* F型Na⁺-ATPaseのcリングの

Fig. 2 Structure of the K ring and localization of lipids and detergents. The K ring is shown in ribbon representations (a, b and c) or electrostatic surface representation (red, negative; blue, positive; grey, neutral) (d). (a and d) Side views. (b) Side view of the monomer. (c) Top view from the cytoplasmic side of the membrane. The Na⁺ ions are shown as light blue spheres. Lipids and detergents are shown in space-filling representation (C and O atoms are green and red, respectively). In (d), the extent of the hydrophobic belt, 39 Å, is indicated by a vertical line. (カラー図は電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

原子分解能でのX線結晶構造が報告されている¹¹⁾。

V型ATPaseのローターリングの生化学的、構造学的研究はF型に比べ遅れていたが、現在では構造的にも機能的にもF型のローターリングよりも複雑であることが明らかになっている。真核細胞のV型ローターリングはc、c', c''サブユニットの3種類のサブユニットから構成されており、膜融合反応の重要なコンポーネントとしても機能していること¹²⁾が報告され注目を集めている。

3. ローターリングのX線結晶構造

腸内連鎖球菌（*E. hirae*）V型Na⁺-ATPaseを精製し、イソプロパノール処理により複合体を解離させて、Kリングを精製した。これを結晶化し、多重重原子置換法を使って、2.1 Å分解能で構造を決定した。得られた構造はKサブユニットが対称10量体のリングを形成していた（Fig. 2a）。F型とV型のリングは同じくらい大きさであるとして一般に信じられていたが、本酵素は酵母ミトコンドリアF型ATPaseのリングに比べ、倍の分子量の巨大リングを保持していることがわかった。

Fig. 3 The Na^+ -binding pocket viewed from outside the K-ring. Oxygen and nitrogen atoms are shown in red and dark-blue, respectively. Dotted lines represent Na^+ -O bonds. Na^+ ion is shown in light-blue. Residues involved in Na^+ binding are shown in stick (a) or space-filling [(b) and (c)] representation. In (b) and (c), residues not involved in binding are shown in solvent accessible surface representation. In (c), in order to open the Na^+ -binding pocket, the torsion angles of the side chain of Glu¹³⁹ have been changed from $(-170, 72)$, which is the determined angle by the X-ray structure analysis, to $(70, 170)$. (カラー図は電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

Kサブユニットは4本の膜貫通ヘリックスで構成されている (Fig. 2b). ヘリックス 1-2 とヘリックス 3-4 はF型cサブユニットの遺伝子重複であると考えられているが、構造的にもよく保存されている (主鎖のRMSD 1.0 Å). X線結晶構造が解かれた *I. tartaricus* F型 Na^+ -ATPaseのcサブユニットと比較すると、アミノ酸配列上でも高い類似性がある (ヘリックス 1-2 との類似性 50.6%; ヘリックス 3-4 との類似性 46.8%) が、結晶構造も互いによく保存されている (ヘリックス 1-2 との主鎖のずれ (RMSD) 2.4 Å; ヘリックス 3-4 との主鎖のずれ (RMSD) 2.3 Å). 特に後述する Na^+ 結合サイトはよく保存されている. このことからF型ATPaseとV型ATPaseのイオン輸送の本質的なメカニズムは酷似していると考えられる.

4. Na^+ 結合サイトの構造

本酵素は Na^+ を輸送するATPaseであり、KサブユニットのE¹³⁹近傍で Na^+ を高親和性で結合すると考えられている⁷⁾. 実際に Na^+ と考えられる電子密度がヘリックス 2-3間のリング側面中央 (E¹³⁹近傍) に存在している (Fig. 2d, 3a). 計10個の Na^+ がそれぞれのKサブユニットの5つの残基から構成される Na^+ 結合ポケット (ヘリックス2のL⁶¹の主鎖、T⁶⁴の側鎖、Q⁶⁵の側鎖、ヘリックス3のQ¹¹⁰の側鎖、ヘリックス4のE¹³⁹の側鎖) に同様に結合している (Fig. 3a). ヘリックス2のL⁶¹は主鎖の酸素原子が Na^+ に配位し、 α ヘリックスが壊れて折れ曲がっている. Fig. 3bのように空間充填図で表す

と、 Na^+ が完全にリング内に閉じ込められていることがわかる.

この Na^+ は機能上、結合サイトから解離し、輸送されるはずである. ところが Na^+ 結合サイト内には上下左右前後どこにも結合 Na^+ が抜け出るような空間は存在していない. では Na^+ はどのように解離するのであろうか. そこで Fig. 3cのようにE¹³⁹の側鎖のねじれ角を常識的にゆらぎうる範囲内で変化させてみたところ、 Na^+ が自由に抜け出るための空間が生じることがわかった. このことより、E¹³⁹の側鎖は Na^+ 結合サイトの蓋のような役割をしていて、これが開閉することにより、 Na^+ の結合・解離が可能になっているというモデルを考えている. では実際にどのようにしてE¹³⁹の蓋は開くのであろうか? 本酵素の Na^+ 輸送はKリングとそれに隣接するIサブユニットの境界面で行われていると考えられる⁷⁾. Iサブユニットには機能上必須であるR⁵⁷³が存在する. F型ATPaseや他のV型ATPaseでもこれに対応するアルギニン残基が存在し、ローターリングのグルタミン酸残基と相互作用することが重要であると報告されている^{3), 13)}. われわれはこのR⁵⁷³とE¹³⁹との静電的相互作用により、E¹³⁹の側鎖が引き延ばされて、蓋が開くと推測している.

5. 脂質と界面活性剤

ローターリング構造の内部には、20分子以上のリン脂質と考えられる電子密度が存在している (Fig. 2c). リング内部中央部分では電子密度が失われているが、これは脂質分子のゆらぎによるものであり、リング内部は脂質分子で満たされていると考えられる. リング側面には脂質分子に帰属できる電子密度が見られないが、これは精製の過程で剥がれてしまったと考えている. リング側面上部には結晶形成に必要であった2分子の界面活性剤と20分子の界面活性剤のアルキル鎖部分と考えられる電子密度が存在している (Fig. 2c, 2d). この界面活性剤の位置とリング側面の疎水性領域から、リング側面の脂質二重層は Fig. 2dで示したK¹³⁰からN⁷⁹, N¹⁵⁵の間に存在すると考えている. つまり、 Na^+ 結合サイトは完全に脂質内部に埋まっていると推測している.

6. イオン透過機構モデル

ローターリングの結晶構造から、イオン透過機構に関して明らかになったことや、推測されることを以下にまとめる. 1) Na^+ 結合サイトはリング側面中央に存在し、 Na^+ を結合している. 2) 結合 Na^+ はリング内部に閉じ込められており、リング内部には Na^+ の通り道は見当たらない. 3) E¹³⁹の側鎖が Na^+ 結合ポケットの蓋の役割を果たしており、側鎖のコンフォメーション

Fig. 4 A model for ion translocation by the V-type ATPase from *E. hirae*. The model is based on the K-ring structure, shown in space-filling representation (a) or cartoon (b). (a) Side view of the whole enzyme. (b) The view is from the cytoplasm and shows K ring-I subunit interface at the level of the Na⁺ binding sites. Glu¹³⁹ is shown in yellow, and other residues involved in Na⁺ binding (Leu⁶¹, Thr⁶⁴, Gln⁶⁵ and Gln¹¹⁰) are in light blue; oxygen and nitrogen atoms are shown in red and blue, respectively. Sodium ions are shown as blue spheres. I subunit (structure unknown) is in green and the essential Arg⁵⁷³ in a half-channel connecting to the periplasm is placed in close proximity to the K ring. Another half-channel links the ion-binding sites to the cytoplasm. Clockwise rotation of the ring (red arrow) driven by ATP hydrolysis in V₁ transfers bound Na⁺ ions to a half-channel connected to the periplasm. (カラー図は電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> 参照)

変化により、蓋の開閉が達成されて、Na⁺の結合・解離がリング側面が可能になると考えられる。4) E¹³⁹の蓋の開閉はIサブユニットのR⁵⁷³との静電的相互作用により達成されていると推測される。5) Na⁺結合サイトは膜内に完全に埋まっていると推測される。3)と5)より、Na⁺解離状態ではE¹³⁹の負電荷が膜内に露出してしまうことになるので、Na⁺結合サイトは膜内では常にNa⁺を結合していると考えられる。本酵素はATPのエネルギーを使って、ローターリングを回転させ、Na⁺を細胞内から細胞外へ排出する役割を担っている。以上を考慮すると、本酵素のイオン輸送はイオン輸送路をもつと考えられるIサブユニットに2つの半チャネルを考えると妥当である。これはF型ATPaseで予想されている“two channel model”に相当する¹³⁾。

本酵素のイオン輸送機構モデルをFig. 4に示す。A₃B₃, E, F, Iサブユニットは固定子であり、回転しない。A₃B₃にATPが結合し、そのコンフォメーションを順次換えることにより、軸部分のD, G, C, Kリングが回転する(赤い矢印で示す)。この回転により、ローターリングE¹³⁹の側鎖とIサブユニットR⁵⁷³の距離が近づき、静電的相互作用によりE¹³⁹の蓋が開く(Fig. 4b; 灰色の矢印で示す)。これにより、Na⁺結合サイトのNa⁺に

対する親和性が低下し、結合Na⁺が1つ目の半チャネル(half channel to periplasm)に放出され、Na⁺が外側へ拡散していく(青い矢印で示す)。さらに、ATPのエネルギーによる回転により、Na⁺解離状態のNa⁺結合サイトがもう1つの半チャネル(half channel to cytoplasm)に近づく。この状態ではE¹³⁹とR⁵⁷³がリングの回転によって遠ざかり、それらの静電相互作用が失われるため、Na⁺に対する高親和性を回復し、半チャネルを通してたどり着いたNa⁺(紫色の矢印で示す)を結合する。この結合に際しては、この状態でNa⁺を結合しないと、ATPのエネルギーを使ってもさらに先に回転できないような疎水性バリアが存在するものと仮定している(Fig. 4b; 黄色の領域で示す)。このようにして、ATPのエネルギーが回転のエネルギーに変換され、それが一方向のイオン輸送を可能にし、イオンの電気化学的濃度勾配のエネルギーに変換されると考えている。

5. おわりに

ローターリングの構造を中心に、V型ATPaseのイオン輸送のメカニズムを考察した。しかし、イオン輸送路を形成すると考えられるIサブユニット(F型ATPase

ではaサブユニット)の分子情報はまだ少ない。その詳細構造を得ることがイオン輸送機構の解明に必須であり、今後のF型、V型ATPaseの研究における最重要課題であるといえる。

文 献

- 1) Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**, 621-628.
- 2) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature* **386**, 299-302.
- 3) Nishi, T. and Forgac, M. (2002) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103.
- 4) Heefner, D. L. and Harold, F. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 2798-2802.
- 5) Kakinuma, Y., Yamato, I. and Murata, T. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 7-14.
- 6) Murata, T., Takase, K., Yamato, I., Igarashi, K. and Kakinuma, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24885-24890.
- 7) Murata, T., Kakinuma, Y. and Yamato, I. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48337-48340.
- 8) Murata, T., Arechaga, I., Fearnley, I. M., Kakinuma, Y., Yamato, I. and Walker, J. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 21162-21167.
- 9) Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A. G. and Walker, J. E. (2005) *Science* **308**, 654-659.
- 10) Pogoryelov, D., Yu, J., Meier, T., Vonck, J., Dimroth, P. and Muller, D. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 1040-1044.
- 11) Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. and Dimroth, P. (2005) *Science* **308**, 659-662.
- 12) Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M. and Mayer, A. (2001) *Nature* **409**, 581-588.
- 13) Junge, W., Lill, H. and Engelbrecht, S. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-425.

V型 Na⁺-ATPase の膜内在性ローターリングの構造：結晶構造から見てきた回転モーターのイオン透過機構

村田武士（むらた たけし）

JST ERATO 岩田プロジェクト・グループリーダー

連絡先：〒210-0855 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1番12号C棟5階

E-mail: t_murata@hrc.jst.go.jp

山登一郎（やまと いちろう）

東京理科大学基礎工学部生物工学科教授

連絡先：〒278-8510 千葉県野田市山崎2641

E-mail: iyamato@rs.noda.tus.ac.jp

柿沼喜己（かきぬま よしみ）

愛媛大学農学部生物資源学科教授

連絡先：〒790-8566 松山市樽味3-5-7

E-mail: ykaki@agr.ehime-u.ac.jp