

研 究 報 告 書

「膜超分子モーターの相関構造解析による分子メカニズムの解明」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有)

研究期間: 平成24年10月～平成30年3月

研 究 者: 村田 武士

1. 研究のねらい

V-ATPase は真核生物のほとんどの膜系に存在し、プロトンポンプとして働いて内部の酸性環境を作り出す膜超分子モーターである。V-ATPase は骨粗鬆症やがん転移などの疾病と関係しており、重要な創薬ターゲットとして知られている。また、V-ATPase は膜融合への直接的関与や pH センサーとして働くなど、多機能性を持つことが報告されている。申請者は 1994 年以来、腸球菌 V-ATPase の分子生物学・生化学・構造生物学的研究を展開してきた。そして、①世界で初めて触媒部分(V_1)の高分解能構造を得ることに成功した。また、②V-ATPase 全複合体の結晶(最大分解能 6 Å)を得ることに成功している。さらに、ヒト V-ATPase の各サブユニットや複合体について発現精製条件の検討を行い、③ヒト V-ATPase の創薬ターゲット部分である外周固定子や V_1 部分の精製・再構成に成功した。そこで、本研究では下記の研究を遂行し、V-ATPase の相関構造解析による分子メカニズムの解明を目指す。

① 相関構造解析による V_1 -ATPase 回転メカニズムの解明

腸球菌 V_1 -ATPase の各種中間体や変異体の X 線結晶構造解析や単一分子回転計測、高速 AFM 測定、計算機シミュレーションなどの複数手法をつなげる相関構造解析を行い、 V_1 -ATPase の ATP 加水分解反応に伴う回転分子メカニズムの解明を目指す。

② V-ATPase 全複合体の構造機能解析

抗体や阻害剤を使って腸球菌 V-ATPase 全複合体の結晶化を継続し、世界初の膜超分子モーターの X 線結晶構造の解明を目指す。得られた構造を基に、単一分子回転計測結果等との相関構造解析を行い、本酵素のエネルギー共役機構の解明を目指す。

③ V-ATPase 創薬ターゲット部分の構造機能解析

精製に成功したヒト由来の V_1 複合体や外周固定子の X 線結晶構造解析やピアコアを用いた結合親和性解析を行う。そして、腸球菌 V-ATPase と比較することにより、ヒト V-ATPase が持つ多機能性の理解や、疾病との関係と原因の解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

下記に本研究で得られた成果の概要を研究項目ごとに記載した。

① 相関構造解析による V_1 -ATPase 回転メカニズムの解明

腸球菌 V_1 -ATPase の ATP 分解待ち、ATP 結合待ち、 P_i 解離待ち、ADP 解離待ちの4種のスナップショット構造を世界で初めて明らかにした(論文発表 1,2,5)。さらに、単一分子回転計測、高速 AFM 測定、計算機シミュレーションによる V_1 -ATPase の回転ダイナミクスを明らかにした(論文発表 4)。得られた結果の相関構造解析により、 V_1 -ATPase の詳細な回転分子メカニズムモデルを提案した。

② V-ATPase 全複合体の構造機能解析

V-ATPase 全複合体のクライオ電顕単粒子解析を行い、分解能 11 Å の電顕像を得た。

また、全複合体の単一分子回転測定系を確立し、回転ダイナミクスを明らかにした(論文発表 3)。これらの相関構造解析により、本酵素のエネルギー共役機構の理解が深まった。また、膜リングの結晶構造とATR-FTIR 測定結果との相関構造解析を行い、イオン輸送メカニズムモデルを提案した。

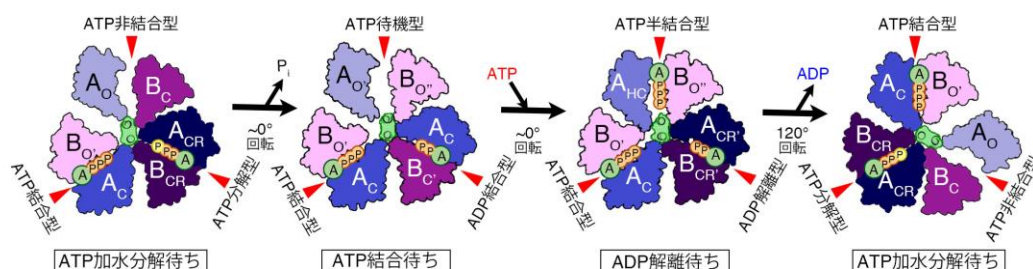
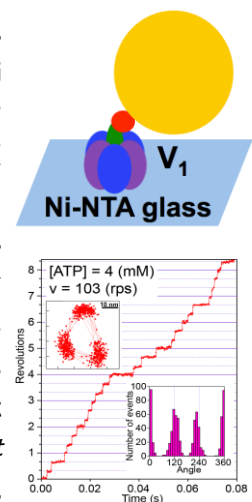
③ V-ATPase 創薬ターゲット部分の構造機能解析

ヒト V-ATPase サブユニットの発現精製法を確立し、ピアコア等を用いて各サブユニット間の結合親和性を明らかにした。そして、創薬標的部位である DF 複合体の結晶構造解析に成功した。ヒト V-ATPase の膜タンパク質部分は熱安定性が低いため、発現精製が困難であった。そこで、統計熱力学的解析による熱安定化変異体予測方法を開発した(特許出願 1,2)。次に、ヒトおよび病原菌の V-ATPase の創薬標的部位の相違点を明らかにし、それらの特異的阻害剤の探索と開発を行った。そして、V-ATPase を分子標的とした悪性がんや溶連菌感染症の治療薬候補となるモノクローナル抗体や化合物を創出することに成功した。

(2) 詳細

① 相関構造解析による V_1 -ATPase 回転メカニズムの解明

腸球菌 V_1 -ATPase の ATP 分解待ち(論文発表 5: Arai *et al.*, *Nature*, 493, 703–707, 2013)、ATP 結合待ち、ADP 解離待ち(論文発表 1: Suzuki *et al.*, *Nat. Commun.*, 7, 13235, 2016)の3種のスナップショット構造を世界で初めて明らかにした。結晶構造に基づき回転軸部分および A_3B_3 複合体の変異体を作製し、回転速度と構造形成能の相関を明らかにした(Jahangir *et al.*, *PLoS ONE*, 8, e74291, 2013; Jahangir *et al.*, *SpringerPlus*, 2, 689, 2013)。さらに岡崎バイオ・飯野教授らと共同で腸球菌 V_1 -ATPase の単一回転計測系を確立し、ATP 駆動の回転ダイナミクスを明らかにした(論文発表 4: Minagawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 288, 32700–32707; 右図)。これらの相関構造解析により、 V_1 -ATPase の回転分子メカニズムの大枠を解明することに成功した(論文発表 1, 2; Iino *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 31, 49–56, 2015; Iino *et al.*, *IUBMB Life*, 66, 624–630, 2014; 下図)。



大挑戦型研究課題の延長期間で達成しようとする目標

提案したメカニズムモデルから P_i 解離待ち構造の存在が示唆された。しかし、 P_i 解離待ち構造は安定性が低いため構造解析が難しい。本研究では、変異体やヌクレオチドアナログを用いて P_i 解離待ち構造を安定化させて X 線結晶構造解析を行う。そして、計算機解析、単一分子回転計測、高速 AFM 測定により、各スナップショット間のすべてのダイナミクスを明らかに

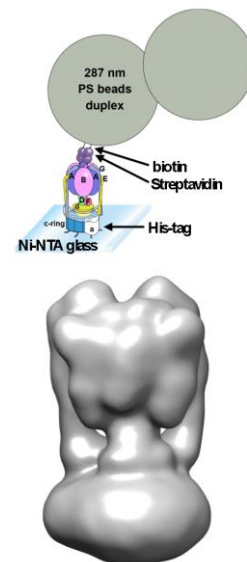
する。これらの解析結果をシームレスにつなげ、世界初の全原子リアルタイム回転ダイナミクスの完全理解を目指す。

達成状況

V_1 -ATPase の ATP 加水分解後の ADP*Pi 結合型構造に類似すると考えられる ADP*Pi アナログ (ADP*AlF₄) 存在下で共結晶化を行い、分解能 3.8 Å で X 線結晶構造を決定した。得られた構造には ADP*AlF₄ が 2 分子結合し、これにより ATP 分解待ちの構造が変化した Pi 解離待ち構造が得られたと考えている。また、金沢大・内橋教授、安藤教授らと共同で腸球菌 A₃B₃ 複合体の高速 AFM 測定系を確立し、ATP 駆動のダイナミクスを明らかにした(論文準備中)。さらに、横浜市立大・池口教授らと共同で V_1 -ATPase の全原子分子動力学シミュレーションと粗視化 MD とを、Fluctuation Matching を用いたマルチスケールな手法を用い、軸の 120° 回転を粗視化 MD で再現した。(Isaka *et al.* *Biophys. J.*, 112, 911-920)。これらの解析結果をシームレスにつなげ、 V_1 -ATPase の全原子リアルタイム回転ダイナミクスモデルを提案するに至った(論文準備中)。

② V -ATPase 全複合体の構造機能解析

新規阻害剤を活用して V -ATPase 全複合体の結晶(最高分解能 5 Å の回折斑点)を得た。次に、東大・上野助教、岡崎バイオ・飯野教授らと共同で腸球菌 V -ATPase 全複合体の大腸菌発現精製システムを構築した。そして、全複合体の単一分子回転測定系を確立し、回転ダイナミクスを明らかにした(論文発表 3:Ueno *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 289, 31212-31223; 右図)。さらに生理研・村田准教授らと共同でゼルニケ位相板を用いた全複合体のクライオ電顕単粒子解析を行い、分解能 20 Å の電顕像を得た(右図)。また、膜リングの結晶構造と ATR-FTIR 測定結果との相関構造解析を行い、イオン輸送メカニズムモデルを提案した(Kandori *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 134-141)。

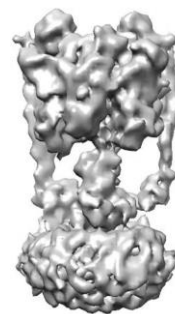


大挑戦型研究課題の延長期間で達成しようとする目標

全複合体構造の分解能低下の原因は回転軸部分の揺らぎであると示唆された。本研究では、PA タグや新規阻害剤、バインダー等を用いて全複合体の揺らぎを固定化する。そして、X 線結晶構造解析やクライオ電顕単粒子解析を高度に組み合わせることにより、高分解能構造を決定し、 V_1 部分と V_0 部分のエネルギー共役機構の解明を目指す。

達成状況

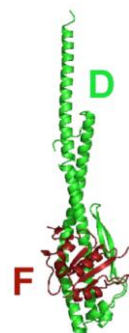
回転軸の揺らぎを抑えることを目的に PA タグを各種サブユニット内に導入した精製試料を調製し、PA タグ抗体との共結晶化やゼルニケ位相板を用いたクライオ電顕単粒子解析を行なったが、分解能は向上しなかった。次に、ボルタタイプのクライオ位相差電子顕微鏡および電子直接検出カメラを用いて、 V -ATPase 全複合体の精製試料を撮影し、Relion プログラムを用いて取得した粒子像の単粒子解析を行うことにより分解能 11 Å の電顕像を得ることができた(右図)。 V_1 部分と V_0 部分は d サブユニットと外周固定子を介して結合していた。d サブユニットは 10 量体からなる膜内リングの側面に静電相互作用により弱く結合していることから、 V_1 部分と V_0 部分のエネ



ルギー共役は完全でないことが示唆された。

③ V-ATPase 創薬ターゲット部分の構造機能解析

理研・白水博士らと共同でヒト V-ATPase の親水性サブユニットの発現精製法を確立し、ビアコア等を用いて各サブユニット間の結合親和性を明らかにした (Rahman *et al.*, *PLoS ONE*, 8, e5504, 2013)。しかし、ヒト V-ATPase の膜タンパク質部分は熱安定性が低いため、発現精製が困難であった。そこで、京大・木下教授らと共同で統計熱力学的解析による熱安定化変異体予測方法を開発した (特許出願 1,2)。また、新規阻害剤 (280 候補化合物) の約 8 割が V-ATPase の回転軸部分に結合し、阻害していることを明らかにした。さらに、創薬標的部位の一部であるヒト由来 DF 複合体の結晶構造解析に成功した (論文準備中; 右図)。



大挑戦型研究課題の延長期間で達成しようとする目標

これまでの研究により、ヒト V-ATPase の回転軸部分が創薬標的となることが示唆された。また、腸球菌 V-ATPase は病原性を持つ溶連菌の V-ATPase と高い相同性を示すため腸球菌 V-ATPase の特異的阻害剤は溶連菌感染症などの治療薬につながる可能性が期待できる。そこで本研究では、ヒトおよび腸球菌の V-ATPase 回転軸部分の相違点を明らかにする。そして、それらの特異的阻害剤の探索と開発を行い、V-ATPase を分子標的とした悪性がんや溶連菌感染症の治療薬の開発につなげる。

達成状況

ヒトおよび腸球菌の V-ATPase 回転軸部分の相違点を明らかにする目的で、腸球菌 V-ATPase の回転軸部分の遺伝子をヒト由来遺伝子に置き換えたキメラ V-ATPase を作製し、その性質を調べた。腸球菌 A₃B₃ 複合体にヒト回転軸 DF 複合体を結合させたキメラ V₁-ATPase の単一分子回転計測を行ったところ、ヒト回転軸 DF 複合体が腸球菌 A₃B₃ 複合体から離脱することなく ATP に依存して回転することを明らかにした (論文準備中)。一方、ヒト膜内リングのキメラ体では ATPase 活性は失われていたが複合体として精製することが可能であった。ヒト膜内リングの細胞外部分に結合するモノクローナル抗体は悪性がんの治療薬につながる可能性が期待できる。そこで、ヒト V-ATPase の細胞外部分をマウスに免疫し、ヒト化 V-ATPase の精製サンプルを用いてヒト V-ATPase に対するモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。そして、ヒト V-ATPase の膜内リングを認識するモノクローナル抗体を創出することに成功した。また、取得した 280 種類の阻害剤の中から病原菌 V-ATPase の回転軸部分に作用し、病原菌の生育を阻害する特異的な阻害剤を発見した。現在、有機合成の専門家 (千葉大学の森山准教授) と共同で阻害剤の合成展開を行い、より抗菌活性の高い化合物への改変を進めている。

3. 今後の展開

さきがけ研究の中で腸球菌 V₁-ATPase の詳細構造を世界で初めて解明し、単一回転計測や高速 AFM、MD シミュレーション結果との相関構造解析により詳細な分子メカニズムを理解することができた。今後は病原菌やヒト由来の V₁-ATPase との類似点と相違点を明らかにし、特異的な阻害剤の開発に貢献する。

全複合体の関しては 11 Å 分解能の電顕像を得ることができ、V₁ 部分と V₀ 部分のエネルギー共役機構を理解することができた。今後もクライオ電顕解析を継続し、より高分解能の立体構造解

明を目指す。

ヒトおよび病原菌の V-ATPase に対するモノクローナル抗体や阻害剤を創出することに成功した。今後は V-ATPase が関連する悪性がんなどの重要な疾病の治療薬や溶連菌感染症などに対する全く新しい抗生物質の創出に向けて研究を継続する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:

本さがけ研究の中で V_1 -ATPase の詳細構造を世界で初めて解明し、単一回転計測や高速 AFM、MD シミュレーション結果との相関構造解析により詳細な分子メカニズムを理解することができた。全複合体の関しても 11 Å 分解能の電顕像を得ることができ、 V_1 部分と V_0 部分のエネルギー共役機構を理解することができた。さらに、ヒトおよび病原菌の V-ATPase に対するモノクローナル抗体や阻害剤を創出することに成功した。以上より、研究目的をほぼ達成できたと考えている。

大挑戦型研究課題の「挑戦性」を踏まえた自己評価:

大挑戦型延長期間での達成目標は①Pi 解離待ち構造の解明、②全複合体の高分解能構造解明、③ヒトおよび病原菌に対する特異的阻害剤の開発であった。①については、Pi 解離待ち構造と示唆される結晶構造解析に成功した。②については、高分解能とは言えないが、20 Å 分解能から 11 Å 分解能に解像度が改善したことにより、 V_1 部分と V_0 部分でのエネルギー共役機構の解釈が可能となった。③についても、ヒトおよび病原菌の V-ATPase に対する特異的モノクローナル抗体や阻害剤を創出することに成功した。以上のことから、大挑戦型研究課題の研究目的をほぼ達成できたと考えている。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況):

本さがけ研究では、8件の共同研究を行い、それらの共同研究成果をすでに国際誌に12報発表している。また、研究補助員や大学院生の配置も適切に行われ、研究実施体制と研究費執行も適切であったと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

本研究により V-ATPase の詳細な構造と機能が解明されることにより、その他の膜超分子モーターの分子メカニズムの理解も飛躍的に発展すると期待され、さらにもっと広く、生体エネルギー変換機構の一般原理の解明と生体高分子相互作用の一般則の確立やその予測法の提案が可能になると考えている。本研究で得られた成果は、生命現象の理解において、エネルギーの流れと情報の流れの原理を明らかにするとともに、病因としても知られる V-ATPase 異常の治療薬開発や溶連菌感染症などに対する抗生物質の開発にも役立ち、その成果を社会に還元できると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

V_1 -ATPase の詳細構造を世界で初めて解明し、単一回転計測や高速 AFM、MD シミュ

レーションの専門家とのコラボレーションによりそれらの結果との相関構造解析により詳細な分子メカニズムをダイナミカルに理解することができた。全複合体に関しても 11 Å 分解能の電顕像を得ることができ、V_i 部分と V_o 部分のエネルギー共役機構を理解することができた。さらに、ヒトおよび病原菌の V-ATPase に対するモノクローナル抗体や阻害剤を創出することに成功した。以上より、研究目的をほぼ達成できたと考える。

また、大挑戦での目標であった①Pi 解離待ち構造の解明、②全複合体の高分解能構造解明、③ヒトおよび病原菌に対する特異的阻害剤の開発においては、①Pi 解離待ち構造と示唆される結晶構造解析に成功した。②20 Å 分解能から 11 Å 分解能に解像度が改善したことにより、V_i 部分と V_o 部分でのエネルギー共役機構の解釈が可能となった。③ヒトおよび病原菌の V-ATPase に対する特異的モノクローナル抗体や阻害剤を創出することに成功した。大挑戦型研究課題の研究目的をほぼ達成できたと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 (* 責任著者)

1. Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Shintaro Maruyama, Kazumi Shimono, Fabiana L. Imai, Eiro Muneyuki, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato and *Takeshi Murata (2016) Crystal structures of the ATP-binding and ADP-release dwells of the V₁ rotary motor; *Nat. Commun.*, 7, 13235
2. *Ryota Iino, Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Kano Suzuki, *Takeshi Murata (2015) Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 31, 49–56
3. Hiroshi Ueno, Yoshihiro Minagawa, Mayu Hara, Suhaila Rahman, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, *Takeshi Murata and *Ryota Iino (2014) Torque generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase; *J. Biol. Chem.*, 289, 31212–31223
4. Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Mayu Hara, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, *Takeshi Murata and *Ryota Iino (2013) Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase; *J. Biol. Chem.* 288, 32700–32707
5. Satoshi Arai, Shinya Saijo, Kano Suzuki, Kenji Mizutani, Yoshimi Kakinuma, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, So Iwata, Ichiro Yamato and *Takeshi Murata (2013) Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V₁-ATPase based on asymmetric crystal structures; *Nature*, 493, 703–707

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件

1.

発明者: 村田 武士、木下 正弘、安田 賢司、高椋 勇樹、水谷 健二

発明の名称: 膜タンパク質の熱安定化変異体予測装置、熱安定化変異体予測方法、および、プログラム

出 願 人：科学技術振興機構
出 願 日：2014/6/25
出 願 番 号：特願 2014-130560 号

2.

発 明 者：村田 武士、木下 正弘、安田 賢司、高椋 勇樹、梶原 佑太、鈴木 七緒、
水谷 健二

発明の名称：膜タンパク質の熱安定化変異体予測装置、熱安定化変異体予測方法、および、プログラム

出 願 人：科学技術振興機構
出 願 日：2015/6/24
出 願 番 号：PCT/JP2015/068277

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. Takeshi Murata Molecular mechanism of V1 rotary motor, *JST CREST-PRESTO joint international symposium, Structural Biological Dynamics: From Molecules to Life with 60 trillion Cells*, Tokyo, Japan, 2015/11/5
2. Takeshi Murata Rotational mechanism of Enterococcus hirae V1-ATPase, *Gordon Research Conference in Molecular and Cellular Bioenergetics*, New Hampshire, USA, 2015/6/22
3. Takeshi Murata Rotation mechanism of V-ATPase based on crystal structures, *Gordon Research Conference in Protons and Membrane Reactions*, Ventura, USA, 2014/2/2

プレスリリース

1. 膜タンパク質の理論的耐熱化法を開発 「熱安定化をもたらすアミノ酸置換を短時間で予測」(2016 年 4 月 22 日)
2. たんぱく質ナノモーターの回転メカニズムの解明に道筋 「がん転移や骨粗しょう症の原因解明に期待」(2016 年 10 月 25 日)