生体内エネルギー変換機構の解明に向けた回転モータータンパク質改変体の創生

○大友章裕[1,2]、原島崇徳[1]、飯野亮太[1,2]（[1]分子研、[2]総研大）

【研究の背景・目的】ATP 駆動イオンポンプである V-ATPase は真核生物の液胞や細菌に発現し、ATP の化学エネルギーを膜間のイオンの電気化学ポテンシャルに変換するナノサイズの生体エネルギー変換装置である。V-ATPase は 2 つの回転モータータンパク質の複合体であり、ATP 加水分解反応を担う水溶性の V_1 モーターとイオン輸送を担う膜内在性の V_o モーターとが力学的回転によって共役することで機能する。V-ATPase には H^+輸送型と Na^+輸送型が存在し、また種によってイオン/ATP 共役比が異なることが知られている。しかしながら、イオン選択の機構や多岐にわたるイオン/ATP 共役比の機能的意義は解明されていない。そこで、Na^+輸送型である *Enterococcus hirae* 由来 V-ATPase（EhV_oV_1）の回転子 c-ring を改変することで、H^+輸送型に機能転換した改変体と野生型の 2 倍のイオン/ATP 共役比を持つ改変体を作製し、その機能解析・回転特性の解明を目指した。

【方法】V_o モーターの回転子 c-ring に存在するイオン結合部位のアミノ酸配列を比較することで、H^+輸送型と Na^+輸送型に特徴的な配列が保存されていることが明らかとなった。この特徴に基づき、H^+輸送型に保存されている非極性残基を導入した cQ65I 変異体および c-subunit の界面に Na^+結合部位を模倣した cG63E-V34Q-Y141T 変異体を作製し（図 1）、これらのイオン輸送測定および 1 分子回転計測を行った。

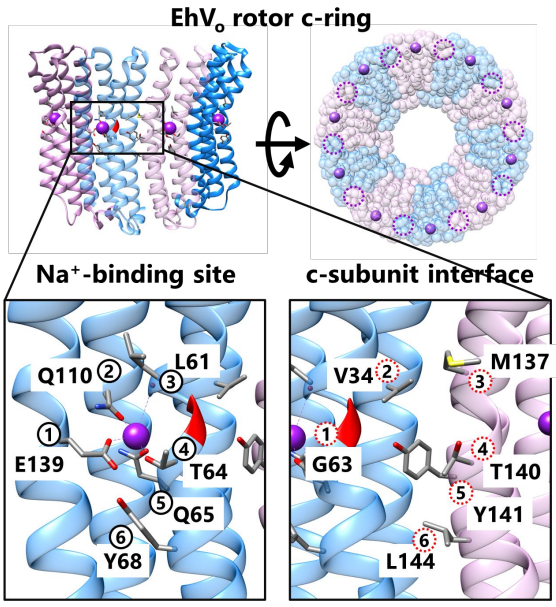

Figure 1. Structure of EhV_o rotor c-ring (PDB ID: 2BL2).

【結果 1】リポソームに再構成した野生型および cQ65I 変異体の H^+輸送活性を、pH 感受性蛍光色素 ACMA を用いて測定した。野生型では H^+輸送を示す蛍光強度減少が観測されず、cQ65I 変異体のみ H^+輸送活性を示した。また界面活性剤で可溶化した cQ65I 変異体の 1 分子回転計測を行ったところ、回転速度は Na^+濃度に対してほとんど変化せず、ATP 駆動の回転は Na^+と共役していないことが明らかとなった。これらの結果は、cQ65I 変異体が H^+を選択的に輸送していることを支持する。

【結果 2】野生型の EhV_oV_1 は、c-ring の 10 個の Na^+結合部位を反映した 36°のステップサイズを示すことが分かっている[1]。対して今回作製した cG63E-V34Q-Y141T 変

異体は、1 分子回転計測で 18°のステップサイズを示した。この結果は、c-ring に 20 個の Na^+が結合していることを示唆する。現在、cG63E-V34Q-Y141T 変異体の 1 分子回転特性の詳細を解析中である。

【結論・展望】様々な V-ATPase の配列比較に基づき c-ring のイオン結合部位に変異導入することで、Na^+輸送型から H^+輸送型へと機能転換した改変体を得ることができた。この結果は、V-ATPase ではチャネルとして働く a-subunit ではなく c-ring の配列がイオン選択性に主に寄与していることを示唆する。今後は野生型と cQ65I 変異体の 1 分子回転特性を比較し、異なるイオンを輸送する際のタンパク質ダイナミクスの解明を目指す。

cG63E-V34Q-Y141T 変異体の 1 分子回転計測から、c-ring に 20 個の Na^+が結合していることが示唆された。この変異体ではイオン/ATP 共役比が野生型の 2 倍になっていると考えられるため、機能解析をすることでその生理的・機能的意義の解明が期待できる。今後は cG63E-V34Q-Y141T 変異体に対して ATP 加水分解・合成能の評価や Na^+輸送活性の測定を行うとともに、1 分子回転特性の詳細を明らかにしていく。

【参考文献】

1. Otomo A., Iida T., Okuni Y., Ueno H., Murata T., Iino R. (2022) Direct observation of stepping rotation of V-ATPase reveals rigid component in coupling between V_o and V_1 motors. *PNAS*, **117**, e2210204119.

otomoa@ims.ac.jp

Engineering ion-binding site of *Enterococcus hirae* V-ATPase

○**Akihiro Otomo[1, 2], Takanori Harashima[1], Ryota Iino[1, 2] ([1] Institute for Molecular Science, [2]SOKENDAI)**

V-ATPase (V_oV_1), expressed in eukaryotic vacuoles and bacteria, is a membrane protein that selectively pumps H^+ or Na^+ using ATP hydrolysis energy. The c-ring of the V_o motor responsible for ion transport contains an ion-binding site composed of multiple amino acid residues. We compared amino acid sequences of the ion-binding sites among various V-ATPases and found that the H^+- and Na^+-transporting ATPases have characteristic amino acid residues. Based on these findings, we introduced mutations to the ion-binding site of Na^+-transporting *Enterococcus hirae* V-ATPase to impart non-natural ion transport properties. The cQ65I mutant showed a reduced Na^+-binding affinity and a significantly increased H^+-transport activity. Moreover, a triple mutant, cG63E-V34Q-Y141T, apparently showed 18° steps, suggesting that this mutant transports 20 Na^+ per single turn, twice as many as the wild-type which has c_{10}-ring. Here, we report the biochemical and single-molecule analyses of these mutants.