

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074002

研究課題名（和文） ATP 合成酵素の回転モーター制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulation of rotation in the ATP synthase

研究代表者

久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：40181094

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ATP 合成酵素、回転制御、回転阻害、 γ サブユニット、 ϵ サブユニット、レドックス制御、テントキシン

1. 研究計画の概要

生体分子モーターの作動機構を明らかにするために、駆動機構の解明と制御機構の解明は車の両輪である。分子モーターの制御とは、モーター分子の原子レベルでの動きの制御である。これを理解するために、回転軸（ \cdot サブユニット）側からの研究と、外的要因の研究を同時平行して実施する。特に、(1) \cdot サブユニットの構造変化による回転制御を 1 分子レベルで解析し、正確な角度解析により軸受け側の \cdot サブユニットの構造と停止位置の対応付けを行う。また、磁気ピンセット技術を用いて、停止と回転に要する力を実測する。さらに、制御時に起こる構造変化を立体構造レベルで解明し、制御と構造の関連付けを行なう。(2) 内在性阻害因子である \cdot サブユニットの機能を、阻害にかかる力の測定と分子構造の変化の両面から検証する。さらに内在性阻害因子の構造変化と膜ポテンシャルの関連付けを行う。(3) 外来因子による ATP 合成酵素の再活性化の分子機構を調べることで、回転調節の分子機構を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) 植物型 ATP 合成酵素の \cdot サブユニットの酸化還元制御による回転調節機構の詳細を明らかにするために、シアノバクテリア ATP 合成酵素に変異導入し、回転と停止の詳細（特に停止位置の解明）を一分子レベルで明らかにすること、および磁気ピンセットを用いて停止のからの回復について解析した。酸化状態で酵素活性が低く抑えられる条件では、 γ サブユニットが ADP 阻害と同じ位置で高頻度で停止することがわかった。この回転

制御に直接関与する γ サブユニットの領域が、葉緑体型 ATP 合成酵素のみに挿入されている 30 アミノ酸長の配列にあることを明らかにした。さらに、この配列を削除した変異体およびその変異体を持った変異株シアノバクテリアを解析することによって、制御の生理的な意味についても重要な知見を得ることができた（論文準備中）。

(2) 葉緑体型 ATP 合成酵素に特異的に働くテントキシンによる阻害と活性促進についても、一分子レベルで詳細な解析を行い、酵素のどのような変化が活性変化に影響するのかを明らかにした。さらに、この阻害の解析から、テントキシンが ATPase 反応の生成物である ADP の酵素からの遊離段階を特異的に阻害することや複数分子のテントキシンが酵素の結合した時に起こる活性化の原因を特定することに成功した。

(3) 細菌型 ATP 合成酵素を用いた回転 1 分子観察実験では、阻害状態がはっきりと見られなかった。一方、生化学的な解析から、細菌型である好熱菌 ATP 合成酵素では、阻害型から活性型への転換が起こると、構造変化を起こした ϵ サブユニットへ ATP の結合が起こり、これにより阻害型への再転換が起こりにくくなっている事が明らかになった。このことが、植物型と比較して細菌型では ϵ サブユニットの阻害効果が弱い事の一因と考えられる。この知見をふまえて、細菌型 ATP 合成酵素の阻害状態をより詳細に解析するために、ATP 結合能を持たず、阻害効果の強い変異体 ϵ サブユニットを用いた回転 1 分子解析に着手した。

(4) 植物型および細菌型の ϵ サブユニット

の機能の違いを明らかにするため、シアノバクテリア由来の ϵ サブユニットおよびその一部を植物型にしたものについて、NMRによる溶液構造の解析を行った。その結果、 ϵ サブユニットのC末側のヘリックス部分が阻害活性だけでなく、酵素に対する親和性にも重要な役割を果たしていること、2本のヘリックス部分およびこれらを結合しているループ部分には生物間で多様性があることなどを明らかにした(論文投稿中)。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

研究計画は、当初予定した研究項目について順調に進行していると判断している。シアノバクテリアのATP合成酵素を用いた研究においては、形質転換が予想以上に時間を要することなどが、多少の計画の遅れの原因となっている。特に、ATP合成酵素は生体にとって最も重要な酵素のひとつと考えられ、これに変異を導入することは、細胞内のエネルギーバランスに直接影響を与えることが予想される。しかし、これまでの3年間で γ サブユニットによる酸化還元制御、レドックスに関わらない挿入配列の役割、および ϵ サブユニットのC末端ヘリックス構造の生理的な役割について、その重要性を解明することに成功した。論文発表が少ないが、上記の成果については、それぞれについて論文準備中あるいは投稿中であり、本年度中には目標を達成できるものと予想している。

4. 今後の研究の推進方策

本研究では、ATP合成酵素の回転制御に特化して、研究計画を提案した。これまでの一連の研究で制御に関わる分子の詳細は生化学的にはかなり解明することが出来たが、実際に酵素上で何が起こるかを明らかにするためには、立体構造の解析が必須である。特に、我々が昨年明らかにしたテントキシンによる阻害がATP結合待ちの状態での酵素の回転位置を制止することは重要である。これまでATP合成酵素について報告されている全ての結晶構造は、いわゆるADP阻害位置で停止しているものであり、 γ サブユニットと周辺の β サブユニットの相互作用状態は同じであった。テントキシンにより阻害された酵素は、唯一異なる構造を示すことが期待され、残りの2年間でこの構造の解明に全力を挙げて取り組む。

一方、回転制御については、葉緑体型、細菌型それぞれに特徴的な制御機構を明らかにすることが出来たので、今後、磁気ピンセットを用いた力学測定を行い、酵素分子の回転に対してそれぞれの制御機構の寄与を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

①Iizuka S, Kato S, Yoshida M, Kato-Yamada Y.
gammaepsilon Sub-complex of thermophilic ATP synthase has the ability to bind ATP. Biochem Biophys Res Commun. 349, 1368-1371 (2006) 査読有り

②Kato S, Yoshida M, Kato-Yamada Y.
Role of the epsilon subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. J. Biol. Chem. 282, 37618-37623 (2007) 査読有り

③Meiss E, Konno H., Groth G, Hisabori T.
Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by the phytotoxin tentoxin. J. Biol. Chem. 283, 24594-24599 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 3件)

①紺野宏記、村上朋重、久堀徹
Regulation of Cyanobacterial F₁-ATPase rotation. Gordon Research Conference (Molecular & Cellular Bioenergetics) 2007年6月16日~25日 Proctor Academy, U. S. A.

②Meiss E., Konno, H., Hisabori, T.
Single Molecule Analysis of the Tentoxin-Induced Molecular Processes of Inhibition and Stimulation of CF₁. 15th European Bioenergetics Conference 2008年7月20日 Trinity College Dublin, Dublin, Ireland

③Kato-Yamada, Y.
Epsilon subunit, an ATP sensor of ATP synthase. 15th European Bioenergetics Conference 2008年7月20日 Trinity College Dublin, Dublin, Ireland