

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2003～2008

課題番号：15083203

研究課題名（和文） H⁺-ATP 合成酵素等の機能制御におけるソフトな分子間相互作用研究課題名（英文） Intermolecular soft interactions regulating H⁺-ATP synthase function

研究代表者

阿久津 秀雄（AKUTSU HIDEO）

大阪大学・蛋白質研究所・招聘教授

研究者番号：60029965

研究成果の概要：

われわれが生きていくために必須のエネルギーを生み出す H⁺-ATP 合成酵素は地球上最小の分子モーターであることが知られている。この酵素の回転触媒反応のメカニズムを核磁気共鳴法により立体構造を基に明らかにした。この酵素は多数のタンパク質単位（サブユニット）が集まってできている。回転の原因となる個々の単位の構造変化は ATP とのソフトな相互作用に始まり、サブユニット間のソフトな相互作用によって駆動されていることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2003 年度	8,000,000	0	8,000,000
2004 年度	168,000,000	0	168,000,000
2005 年度	15,500,000	0	15,500,000
2006 年度	15,500,000	0	15,500,000
2007 年度	24,000,000	0	24,000,000
2008 年度	16,000,000	0	16,000,000
総計	247,000,000	0	247,000,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：基礎生物科学・生物物理学

キーワード：H⁺-ATP 合成酵素、*β* サブユニット、溶液 NMR、区分標識法、*c* サブユニット、固体高分解能 NMR、構造解析、ソフトな相互作用

1. 研究開始当初の背景

F₀F₁ H⁺-ATP 合成酵素は呼吸に基づく生体エネルギー生産系の最後に位置する重要なエネルギー変換タンパク質である。Walker らによる水相ドメイン F₁ ATPase の結晶構造解析、吉田・木下らの F₁ 回転の実証により、本タンパク質は回転と同期して ATP の合成を触媒する全く新しい形の酵素であることが明らかになった。即ち、この酵素ではプロ

トン移動が回転に共役し、それがさらに ATP 合成に共役している。ここでは、プロトンと F₀, F₀ と F₁, F₁ とヌクレオチドの間のソフトな相互作用が重要な役割を果たしている。Walker らの X 結晶構造だけではこの回転機構を原子のレベルで理解することはできなかった。核磁気共鳴（NMR）法はそのギャップを埋めて、回転のメカニズムを明らかにする重要な方法である。しかし、本酵素はバ

クテリアの F_1 で、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ のサブユニット構成で約 380 kDa、 ab_2c_{10-14} からなる膜内在性ドメイン F_0 を加えると 500 kDa を越す巨大なタンパク質複合体である。NMR の分子量の壁は 30-50 kDa であると言われている。この分子量の壁をどのようにして乗り越えて、プロトン移動共役回転触媒機構を明らかにするかが、本研究の最大の課題であった。

2. 研究の目的

そこで、われわれは新しい NMR 手法を開発することにより、この酵素のプロトン移動と共役した回転触媒機構を原子の分解能で明らかにすることを目指した。即ち、本研究では、分子生物学的手法と我々自身が新規に開発している溶液、固体 NMR の手法を駆使して以下の課題に取り組む。

(1) 水溶性ドメイン F_1 ATPase の回転触媒反応を担う $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を対象とし、触媒サブユニットである β (約 52 kDa) に注目して、溶液 NMR による解析を行う。

(2) 膜内在性で H^+ チャネル、および回転子と考えられているサブユニット c に注目し、固体および溶液高分解能 NMR を用いて解析を行う。

(3) これらの研究を進めるための固体 NMR 解析法の開発を進める。

3. 研究の方法

(1) インタイン区分安定同位体標識法を用いて β サブユニットを部分的に標識し、巨大タンパク質の高分解能構造解析法を開発する。第一段階では単体で、第二段階では $\alpha_3\beta_3$ 複合体で、第三段階では $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で解析することにより β サブユニットの構造変化と回転触媒機構の関係を明らかにする。

(2) 疎水的なサブユニット c 構造を有機溶媒中で溶液 NMR により解析する。次に膜に取り込まれた状態で固体高分解能 NMR を用いて解析を行う。

(3) タンパク質構造の固体 NMR による解析法を開発する。この際、試料として GPCR (受容体) のモデルともいわれるマストパラン X を用いる。

4. 研究成果

(1) H^+ -ATP 合成酵素 F_1 の溶液 NMR による研究

本研究では好熱菌の H^+ -ATP 合成酵素 F_1 (TF_1) β サブユニットを中心に、溶液 NMR を用いてソフトな分子間相互作用が F_1 の回転を駆動することを明らかにした。

① 区分同位体標識による β サブユニット

の NMR 解析

ミトコンドリア F_1 (MF_1) の結晶構造では三つの β サブユニットの構造が異なっており (核酸フリー β_E , ADP 結合 β_{DP} , ATP アナログ結合 β_{TP})、それらの間の構造変化が回転と関係することが示唆された。これらの構造変化は β サブユニット固有の性質を反映しているのであろうか。もし、そうであれば β の構造変化は回転の駆動力となりうる。そこで、 β サブユニット単量体にヌクレオチドが結合することで結晶で見られるような構造変化が起きるかどうかを NMR で調べた。しかし、 β は分子量が 5.2 万であるため、NMR の分子量の壁を越える。そこで、シグナルの数を減少させて分解能を上げる区分安定同位体標識法を用いた。区分標識法では 473 残基のアミノ酸のうち、1-124、1-271、272-473、391-473 部分のみをそれぞれ 2H , ^{13}C , ^{15}N で標識した。高分子用に開発された二次元 1H , ^{15}N TROSY スペクトルを測定すると、それぞれ高分解能のスペクトルを得ることができた。これを用いて 9 割程度のシグナルを帰属した。

次に、ADP 結合による構造変化を調べるために残余双極子相互作用 (residual dipolar coupling (RDC)) を用いた。RDC の測定は N 末端では 1-124 残基、C 末端では 391-473 残基が選択標識された β サブユニットを使用した。各ドメインの相対配向角を ADP 存在下と非存在下で求めた。その結果、 β サブユニットは単量体でもヌクレオチドがなければ開構造をとることが分かった。次に溶液中での ADP 非存在下と存在下での相対配置を比較すると溶液中の単量体でも F_1 結晶と同じような開から閉構造への変化が起こることが明らかになった。

ヌクレオチド結合による開/閉構造変換は β サブユニット固有のものであり、構造変化にはエネルギーを必要とせず、 F_1 回転の重要な駆動力になる。

② β サブユニットの開/閉構造変換の駆動メカニズム

ヌクレオチドによる構造変化はどのような機構で引き起こされるのであろうか。ミトコンドリア F_1 の結晶構造の触媒部位における水素結合ネットワークを開構造と閉構造で比較すると特徴的な相違がある。P ループ主鎖とリン酸基間の水素結合形成は最も基本的な相違であるが、これがグローバルな変化を引き起こすのは困難である。一方、Lys164 の側鎖アミノ基は開構造では Asp252 の側鎖カルボキシル基と水素結合しているが、閉構造ではリン酸基および Gly158 のカルボニルと水素結合している。閉構造で Asp252 は

Thr165 と水素結合する。これらの水素結合はいずれも P ループ領域の構造変化と結びついており、ヌクレオチド結合による開構造から閉構造への変化に直接関与している可能性がある。そこで、これらのアミノ酸をアラニン置換すると、核酸は結合するがグローバルな構造変化は全く起こさなくなる。さらにこれらの変異 β を含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体も全く活性を示さなかった。構造変化と活性に必須な Lys164, Thr165, Asp252 は上述のように水素結合変化で相互に深く関わっている。Asp252 がキーとなり、開構造と、閉構造では水素結合のスイッチングが起こっている。ここで、Lys と Thr で側鎖の長さが異なるため、大きな構造変化となる。このスイッチングを引き起こすのはヌクレオチド結合によるリジン側鎖 (Lys164) とリン酸基の水素結合形成である。この状態は中間状態と考えられ、結晶構造における半閉構造に対応する。この構造変化メカニズムはヌクレオチド結合に始まるダイナミックなソフト相互作用といえる。

さらに、ADP 結合と ATP 結合では最終段の構造に違いがあり、後者の γ -リン酸は Tyr307 などにより構成されるポケットと相互作用している。これらより、単量体の ATP 結合構造が F_1 における触媒反応活性化構造に近いことが示唆された。

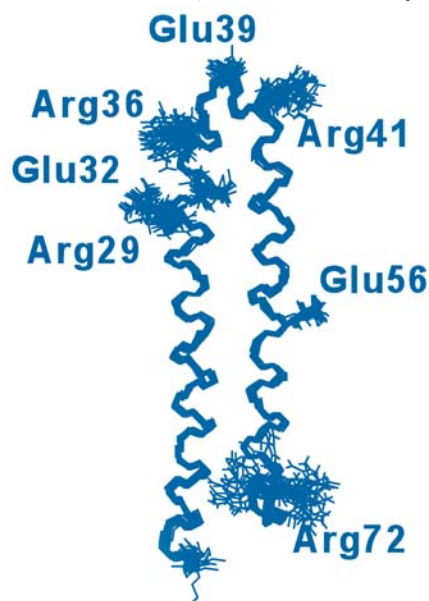
③TF₁ 複合体 (δ を除く) の NMR 解析

F_1 の中ではこのような構造変化が α サブユニット、 γ サブユニットの存在下で起こる。したがって、単量体で見出された結果が F_1 の中でも実現しているのかということが常に問題になる。そこでわれわれは TF₁ そのものの溶液 NMR による解析を目指して、 $\alpha_3\beta_3$ ヘキサマーを用いて方法論の開発を進めた。その方法を用いることにより 360 kDa 以上の TF₁ 複合体 (δ を除く) 中の β の NMR スペクトルを得ることに成功した。その結果、開構造の化学シフトを単量体と複合体でほとんど変化がなかったが、閉構造については変化が見られた。これは N 末端、C 末端ドメインの相対配向角が MF₁ 結晶中と単量体で異なることとよく対応しており、閉構造には 2 種類あることが強く示唆された。

(2) H⁺-ATP 合成酵素 F₀ サブユニット c の NMR による解析

好熱菌サブユニット c の構造を有機溶媒中で溶液 NMR により決定した (下図)。これに基づき当時提案されていたエネルギー変換モデルが適当でないことを示し、新しいモデルを提案した。平行して大腸菌サブユニット c の固体状態での固体 NMR 解析を行った。

¹³C,¹⁵N 均一標識大腸菌サブユニット c を大量に調製し、固体状態で構造解析を行ったところ溶液構造とよく似た構造をとっていることが明らかになった。さらに、これを脂質膜に再構成して固体高分解能 NMR による解析を行った。帰属された化学シフトから判断すると提案されているヘアピン構造に近い。さらに二つの原子核だけを選択的に ¹³C 標識したサブユニット c を化学合成し、距離測定を行った。その結果は現在提案されているリング構造モデルとは矛盾するものであった。



好熱菌サブユニット c の溶液構造

また、大腸菌サブユニット c 試料を重水素化脂質膜に再構成したことを利用して、膜中におけるサブユニット c と脂質の相互作用の解析を重水素固体 NMR により行った。その結果、液晶状態では膜の脂質分子は c リング表面を脂質分子であるかのように認識しており、摩擦によるエネルギーの損失が非常に少ないことが示唆された。

(3) 固体 NMR 解析法の開発

上記 (2) の研究を進めるために固体 NMR による構造解析法を開発した。¹³C,¹⁵N 均一標識タンパク質の NMR シグナル帰属のために、残基内スピン系の 2 次元相関、残基間スピン系の 2 次元相関、さらに 3 次元相関を測定するためのパルス系列を開発し、配列特異的連鎖帰属を可能にした。また、リン脂質膜のリン、重水素と膜結合タンパク質のプロトン間の磁化移動を測定してタンパク質が膜にどのように結合しているかを決定する方法を開発した。これらは膜結合マストパラン X に適用して、その高分解能構造を決定することに成功した。構造決定には核間距離の情

報が重要であるが、固体ではプロトン間の距離を利用できないのが欠点であった。そこで、プロトン間の距離を測定するための方法も開発し、SAIL (立体整列安定同異体標識) アミノ酸に適用してその有効性を確かめた。

5. 主な発表論文等

(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 44 件)

1. H. Yagi, N. Kajiwara, T. Iwabuchi, K. Izumi, M. Yoshida, and H. Akutsu; Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F₁-ATPase *b* subunit revealed by NMR. *J. Biol. Chem.*, (査読有), **284**, 2307-2319, 2009
2. M. Kobayashi, H. Yagi, T. Yamazaki, M. Yoshida and H. Akutsu; Dynamic inter-subunit interactions in thermophilic F₁-ATPase subcomplexes studied by cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer NMR. *J. Biomol. NMR*, (査読有), **40**, 165-174, 2008
3. M. Kobayashi, A. V. Struts T. Fujiwara, M. F. Brown, and H. Akutsu; Fluid Mechanical Matching of H⁺-ATPsynthase Subunit *c* Ring with Lipid Membranes Revealed by ²H Solid-State NMR. *Biophys. J.*, (査読有), **94**, 4339-4347, 2008
4. H. Takahashi, H. Akutsu, and T. Fujiwara; A magic-angle-spinning NMR method for ¹H-¹H distance measurement using coherent polarization transfer in ¹³C-labeled organic solids. *J. Chem. Phys.*, (査読有), **129**, 154504, 1-12, 2008
5. H. Akutsu and Y. Takayama; Functional roles of heme architecture and its environment in tetraheme cytochrome *c*. *Accounts Chem. Res.*, (査読有), **40**, 171-178, 2007
6. A. Egawa, T. Fujiwara, T. Mizoguchi, Y. Kakitani, Y. Koyama, and H. Akutsu; Structure of the light-harvesting bacteriochlorophyll *c* assembly in chlorosomes from *Chlorobium limicola* determined by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (査読有), **104**, 790-795, 2007
7. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara; Spectral fitting for signal assignment and structural analysis of uniformly ¹³C-labeled solid proteins by simulated annealing based on chemical shifts and spin dynamics. *J. Biomol. NMR*, (査読有), **38**, 325-339, 2007
8. H. Yagi, N. Kajiwara, H. Tanaka, T. Tsukihara, Y. Kato-Yamada, M. Yoshida and H. Akutsu; Structures of the thermophilic F₁-ATPase *e* subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (査読有), **104**, 11233-11238, 2007
9. N. Komi, K. Okawa, Y. Tateishi, M. Shirakawa, T. Fujiwara and H. Akutsu; Structural analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides bound to phospholipid membranes by magic angle spinning solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, (査読有), **1768**, 3001-3011, 2007
10. Y. Kakitani, H. Nagae, T. Mizoguchi, A. Egawa, K. Akiba, T. Fujiwara, H. Akutsu and Y. Koyama; Assembly of a mixture of isomeric BCl *c* from *Chlorobium limicola* as determined by intermolecular ¹³C-¹³C dipolar correlations: Coexistence of dimer-based and pseudo-monomer-based stackings. *Biochemistry*, (査読有), **45**, 7574-7584, 2006
11. S.-M. Kim, T. Yamamoto, Y. Todokoro, Y. Takayama, T. Fujiwara, J.-S. Park, and H. Akutsu; Phospholipid-dependent regulation of cytochrome *c*₃-mediated electron transport across membranes. *Biophys. J.*, (査読有), **90**, 506-513, 2006
12. T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida, H. Akutsu; A new solution structure of ATP synthase subunit *c* from thermophilic *Bacillus PS3*, suggesting a local conformational change for H⁺-translocation. *J. Mol. Biol.*, (査読有), **358**, 132-144, 2006
13. Y. Todokoro, I. Yumen, K. Fukushima, S.-W. Kang, J.-S. Park, T. Kohno, K. Wakamatsu, H. Akutsu and T. Fujiwara; Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. *Biophys. J.*, (査読有), **91**, 1368-1379, 2006
14. E. Harada, Y. Todokoro, H. Akutsu and T. Fujiwara; Detection of peptide-phospholipid interaction sites in bilayer membranes by ¹³C NMR spectroscopy: Observation of ²H/³¹P-selective ¹H-depolarization under magic-angle spinning. *J. Amer. Chem. Soc.*, (査読有), **128**, 10654-10655, 2006
15. M. Kobayashi, Y. Matsuki, I. Yumen, T. Fujiwara, and H. Akutsu; Signal assignment and secondary structure analysis of a uniformly [¹³C, ¹⁵N]-labeled membrane protein, H⁺-ATP synthase subunit *c*, by magic-angle spinning solid-state NMR. *J. Biomol. NMR*, (査読有), **36**, 279-293, 2006
16. K. Iwata, T. Fujiwara, Y. Matsuki, H. Akutsu, S. Takahashi, H. Naiki, and Y. Goto; 3D Structure of amyloid protofilaments of β2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (査読有), **103**, 18119-18124, 2006
17. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara; Precision ¹H-¹H distance measurement via ¹³C NMR signals: Utilization of the ¹H-¹H double-quantum dipolar interactions recoupled under MAS conditions. *Magn. Reson. Chem.*,

(査読有), **42**, 291-300, 2004

18. T. Fujiwara, Y. Todokoro, H. Yanagishita, M. Tawarayama, T. Kohno, K. Wakamatsu and H. Akutsu; Signal assignments and chemical-shift structural analysis of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled peptide, Mastoparan-X, by multidimensional solid-state NMR under magic-angle spinning. *J. Biomol. NMR*, (査読有), **28**, 311-352, 2004
19. H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu; A conformational change of H^+ -ATPase β monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, (査読有), **126**, 16632-16638, 2004
20. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara; Band-selective recoupling of homonuclear double-quantum dipolar interaction with a generalized composite 0 degrees pulse: application to ^{13}C aliphatic region-selective magnetization transfer in solids. *J. Magn. Reson.*, (査読有), **162**, 54-66, 2003

[学会発表] (国際学会 計 83 件)

1. H. Yagi, N. Kajiwara, K. Izumi, M. Yoshida, and H. Akutsu; ATP-Binding Induces a New Conformation in H^+ -ATPase β Subunit Related to the Catalytically Activated State; "KEYSTONE SYMPOSIA" on Molecular and Cellular Biology, Santa Fe, New Mexico, February 15-20, 2009
2. H. Akutsu; Soft interactions regulating proton-ATP synthase; Yokohama NMR International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR; Yokohama, Japan, October 20-21, 2008
3. Y. Todokoro, Ken. Tanaka, M. Kobayashi, T. Suzuki, M. Yoshida, T. Fujiwara, H. Akutsu; Solid-state NMR Measurement of H^+ -ATP Synthase Subunit c-Ring Reconstituted into Lipid Bilayers; 23rd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems; San Diego, USA, August 24-29, 2008
4. H. Akutsu; Molecular Mechanism of the Energy Transduction by H^+ -ATP Synthase; Second International Conference on "Theoretical and Applied Biophysics", Ulaanbaatar and Nukht, Mongolia, June 19, 2008
5. M. Kobayashi, H. Yagi, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu; Conformational analysis of β subunit in 350 kDa F_1 -ATPase subcomplex with solution NMR; The 2nd Asia-Pacific NMR Symposium, Hsinchu, Taiwan, October 12-14, 2007

[図書] (計 6 件)

1. Y. Todokoro, M. Kobayashi, T. Fujiwara and H. Akutsu; Structural analysis of membrane systems by solid-state NMR. "Chemistry, Physics, and Biology in Macromolecular Science" ed. T. Sato, (査読有), 173-182, Osaka University Press, Osaka, 2008
2. T. Fujiwara and H. Akutsu; Secondary Structure Analysis of Proteins from Angle Dependent Interactions *Modern Magnetic Resonance*, Ed. G. Webb, Vol. 1, (査読有), 731-736, Springer Netherlands, 2007
3. 阿久津秀雄、藤原敏道; 固体高分解能 NMR; 「生命科学のための機器分析ハンドブック」西村善文編; 羊土社, (査読有), 157-162, 2007
4. 八木宏昌、阿久津秀雄; H^+ -ATP 合成酵素 F_1 の回転駆動力; 「生命秩序を担う生体超分子」阿久津秀雄、月原富武、嶋田一夫編; 蛋白質核酸酵素増刊 50 巻 10 号, (査読有), 1160-1166, 2005
5. 阿久津秀雄; 核磁気共鳴法 (NMR) によるリポソーム系の研究; 「リポソーム応用の新展開」秋吉、辻井監修; NTS, (査読有), 90-99, 2005
6. 阿久津秀雄; 第 2 章 「化学シフト」 11-25、第 5 章 「核スピン緩和」 45-61; 「NMR 分光法—原理から応用まで—」(日本分光学会測定法シリーズ 41) 阿久津秀雄・嶋田一夫・鈴木栄一郎・西村善文編; 学会出版センター, (査読有), 2003

[その他]

ホームページ

URL: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/biophys/priority/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿久津 秀雄 (AKUTSU HIDEO)

大阪大学・蛋白質研究所・招聘教授

研究者番号: 60029965

(2) 研究分担者 2003-2007

八木 宏昌 (YAGI HIROMASA)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 70332749

(3) 研究分担者 2007-2008

藤原 敏道 (FUJIWARA TOSHIMICHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 20242381