

令和元年6月4日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05592

研究課題名(和文) 改造して理解するモータータンパク質F1-ATPaseの動作原理

研究課題名(英文) Understanding of the mechanisms of F1-ATPase by redesigning beta-subunit's P-loop

研究代表者

古賀 信康 (KOGA, Nobuyasu)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター) 准教授

研究者番号：50432571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATPをエネルギー源として駆動する回転モータータンパク質F1-ATPaseのサブユニットの構造変化の仕組みを明らかにすることを目的とする。サブユニットと配列・構造が似ているが構造変化能を持たないサブユニットと比較することにより、リン酸結合部位であるP-loop (GxxxxGKT/S)のxxxxに対応する残基の違いが構造変化に重要なのではないかと考え、このP-loopにおいてそれらの残基をのものに変異したときの構造変化能に及ぼす影響を、分子動力学シミュレーション、1分子回転計測実験等を用いて調べた。その結果、サブユニットのP-loopに組み込まれている構造変化の仕組みを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

F1-ATPaseはほぼ全ての生物が有し、生命のエネルギー源であるATPを合成する酵素である。F1の構造変化の仕組みを理解することは、生命の制御・設計という観点において、F1の構造変化、すなわちATP合成を制御する技術を構築する上で重要となる。また、F1-ATPaseの構造変化の仕組みを理解することで、蛋白質の構造変化原理の一般的な理解と、さらには構造変化するタンパク質のデザイン原理の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：F1-ATPase is a rotary molecular motor utilizing ATP as an energy source. In this study, we aimed to reveal the mechanisms of conformational change of the beta-subunit. On the basis of comparison of the beta-subunit with the alpha-subunit that does not change its conformation upon ATP binding, we hypothesized that the sequence difference in the xxxx region of P-loop (GxxxxGKT/S), a phosphate-binding motif, may play an important role for the conformational change. We investigated the impact of the sequence in the xxxx region on the conformational change by mutating the sequence from beta to alpha, performing molecular dynamics simulations, single-molecule experiments, etc. These results illuminate how the beta-subunit encodes its conformational change in the P-loop.

研究分野：タンパク質分子デザイン

キーワード：タンパク質分子デザイン 分子モーター F1-ATPase 構造変化 P-loop 分子動力学シミュレーション 1分子回転計測実験

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然界のタンパク質は長い年月をかけて進化した結果の産物であることから、それらを解析するのみでは、そのタンパク質の構造構築原理、機能発現原理を解明することは難しい。そこで、それらの原理に関して様々な仮説を立てながら、計算機を用いて合理的に、自然界のタンパク質分子を大きく改造、あるいは、完全にゼロからタンパク質分子をデザインした後に、それらが実際にどのように動作するのか実験により調べることにより、その動作原理を解明するアプローチが重要になってくる。

(2) これまでの新規機能性タンパク質分子は、自然界のタンパク質構造を鋳型として、主鎖構造はそのままだに側鎖構造のみを変えることで作られてきた。しかし、鋳型として用いている自然界のタンパク質構造は進化の結果、ある機能を発現することに最適化されてきた構造であるため、高い活性を持つ新規機能性タンパク質を生み出すことは困難であった。その一方で、我々の研究により、タンパク質の構造構築原理が明らかになり、主鎖を含めてゼロから望みの立体構造をデザインすることが可能になってきた。そこで、このデザイン手法を更に発展させ、望みの機能性タンパク質分子をゼロから自在にデザインする技術確立し、将来的には、主鎖構造を含めてゼロからモータータンパク質のような機能性分子をデザインすることを目標に、本研究では、回転モータータンパク質 F1-ATPase を改造することによりその動作原理に迫った。

2. 研究の目的

これまでに我々が開発したタンパク質構造のデザイン手法を用いて、計算機により合理的に ATP をエネルギー源として駆動する回転モータータンパク質 F1-ATPase を改造し、その動作原理を明らかにする。F1-ATPase は、 α および β サブユニットが交互に3つずつ並んだ6量体のリング構造とその中心を貫く回転子である γ サブユニットから成り、3つの β サブユニットが協同しながら順番に ATP を結合・加水分解することにより、自身の構造を大きく変化させ、 γ サブユニットを回転させている。この F1-ATPase の回転運動における最も重要な原動力である β サブユニットの構造変化はどのように β サブユニットの立体構造中に組み込まれているのだろうか？本研究では、特に、 β サブユニットの構造変化の源である、リン酸結合部位 P-loop α B helix hinge-loop に着目して改造を行い、F1-ATPase が ATP を加水分解して構造変化する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

β サブユニットの構造変化は、リン酸結合部位である P-loop(GxxxxGKT/S, x:任意のアミノ酸)に ATP が結合・加水分解・生成物の解離をすることにより、P-loop が構造変化を起こすことに端を発している。なぜ α サブユニットでは ATP を結合しても P-loop は構造変化しないのに対して、 β サブユニットの P-loop は構造変化するのだろうか？我々は、P-loop の xxxx に対応する残基の違いが P-loop の構造変化に重要なのではないかと考え、主に以下3つの方法でこれらの配列の構造変化に及ぼす影響を検証した。

(1) α サブユニットの野生型、 β サブユニットの野生型、 β サブユニットの P-loop の xxxx を1残基ずつ α サブユニットの配列に変えたもの、 β サブユニットの P-loop の xxxx 全てを α サブユニットの配列に変えたもの、について分子動力学シミュレーションを行った。P-loop を構成する残基ごとの二面角分布や相互作用を解析することにより、どの変異がどのような相互作用によって P-loop 構造に影響を及ぼしているのかを残基単位で検証した(古賀グループ・古賀理恵が実施)。

(2) P-loop の xxxx に対応する残基が P-loop の構造変化、ひいては、 β サブユニット全体の構造変化に及ぼす影響を実験的に検出する方法のひとつとして1分子回転計測実験を行った。1分子回転計測実験は3つの α および β と1つの γ サブユニットから成る複合体の γ サブユニットの回転を計測することから、必ずしも β サブユニットの構造変化能を直接反映するわけではない。しかしながら、 β サブユニットの構造変化能を間接的に観測する手段として有効だと考え、1分子回転計測実験を実施した。そこで、 β サブユニットの P-loop の xxxx を1残基ずつ α サブユニットの配列に変えたもの、 β サブユニットの P-loop の xxxx 全てを α サブユニットの配列に変えたものについて1分子回転計測実験を行った(改造 F1 の発現・精製は古賀グループ・古賀理恵が実施、1分子回転計測実験は野地グループ・上野博史が実施)。

(3) β サブユニット単体での構造変化能を実験的に直接観測するため、P-loop の xxxx 全てを α サブユニットの配列に変えたものについて、X線結晶構造解析を行った(古賀グループ・古賀理恵が実施)。

4. 研究成果

(1) F1-ATPase の回転運動における最も重要な原動力である β サブユニットの構造変化はどのように β サブユニットの立体構造中に組み込まれているのだろうか？なぜ α サブユニットは ATP を結合するだけで構造変化しないのか？本研究では、当初、 β サブユニットの構造変化の源である

リン酸結合部位 P-loop αB helix hinge-loop の構造を、αとβサブユニットで比較したときに hinge-loop の形状や長さがαとβで顕著に異なるため、hinge-loop が構造変化に重要なのではないかと考えた。そこで、βサブユニットの hinge-loop をαサブユニットの hinge-loop に改造して 1 分子回転計測実験を行った。しかしながら、回転速度は野生型の半分に落ちただけであり、この結果から、βサブユニットの hinge-loop は ATP 結合・解離に伴って構造変化するが、それは ATP 結合・解離に伴う P-loop の構造変化に伴い付随して起こるものであり、hinge-loop が構造変化の主要な駆動力発生装置ではないことが明らかになった。そこで、ATP 結合・解離に伴って直接的に構造変化する P-loop に着目して、βサブユニットの構造変化の仕組みを探った。

(2) αとβサブユニットの P-loop を比較してみると、図 1 のように、ATP 結合によって、αサブユニットの P-loop 構造は”Closed”のまま変わらないのに対し、βサブユニットの P-loop 構造は”Open”から”Closed”へと変化することがわかる。

また、αとβサブユニットの P-loop(GxxxxGKT/S, x: 任意のアミノ酸)の配列を比較すると、F1-ATPase 全ての種において、xxxx に対応するアミノ酸配列が、βサブユニットでは GAGV で保存されており、αサブユニットでは DRQT で保存されていた。そこで、これらの配列の違いが P-loop の構造変化の有無に重要なのではないかと考え、αとβサブユニットの P-loop の結晶構造を Ramachandran plot を用いて表現し、配列と構造の違いを比較したところ、βサブユニット xxxx の最初の x が Open 構造のときに取る二面角はアミノ酸配列が GLY でしか取り得ない領域にあることがわかった。そのため、βサブユニットの最初の x が GLY であることが P-loop の構造変化に重要なのではないかと推測した。

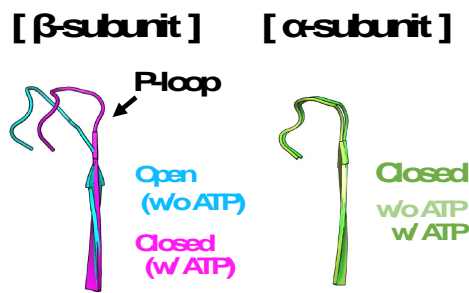


図 1 . P-loop 構造

(3) βサブユニットの最初の x が GLY であることの P-loop の構造変化における役割を調べるため、分子動力学法を用いて、P-loop の xxxx が DRQT であるαサブユニットの野生型、xxxx が GAGV であるβサブユニットの野生型、βサブユニットの P-loop の xxxx を 1 残基ずつαサブユニットの配列に変えたもの、βサブユニットの P-loop の xxxx GAGV 全てをαサブユニットの配列 DRQT に変えたもの、について ATP なしで 200ns のシミュレーションを行った。これらの結果を二面角分布等を用いて解析したところ、最初の x が GLY であるかどうかで最初の x の二面角分布が異なり、その二面角分布の違いが、ATP なしで最初の x が GLY の場合は図 1 左の水色のような P-loop 構造を、最初の x が GLY 以外の場合は図 1 右の薄緑のような P-loop 構造を生み出していることを明らかにした。

(4) βサブユニットの最初の x が GLY であることが P-loop の構造変化、ひいては、βサブユニット全体の構造変化、そして最終的には、γサブユニットの回転に及ぼす影響を 1 分子回転計測実験を用いて調べた。βサブユニットが野生型であるもの、βサブユニットの P-loop の xxxx GAGV 全てをαサブユニットの配列 DRQT に変えたβサブユニットを用いたもの、βサブユニットの P-loop の xxxx を 1 残基ずつαサブユニットの配列に変えたβサブユニットを用いたもの、について ATP を用いて回転速度を計測した。また、これら全てに対して基質として ATP_γS を用いた場合の回転計測実験も行い、回転速度の変化が ATP の加水分解速度の変化に起因するのかわどかを調べた。その結果、表 1 の上段に示したように、βサブユニットの P-loop の xxxx 全てをαサブユニットの配列に変えた変異体の回転速度は野生型の 1/1000 倍にまで落ちていた。また、その変異体の回転速度を ATP_γS を用いて測定した下段の結果は、基質を変えたことによる回転速度への影響が野生型の場合より小さいこと、つまり、回転速度が落ちた原因は ATP の加水分解速度が落ちたからではなく、その他の過程の速度が遅くなったことを示していた。ATP 加水分解に関わらない残基の置換によってこれほどまでに回転速度が遅くなった変異体の例はこれまで我々の知る限りない。次に、xxxx のどの残基が回転速度の減少に効いていたかを調べるために、βサブユニットの P-loop の xxxx を 1 残基ずつαサブユニットの配列に変えて同様の実験をしたところ、表 1 に示すように、X₂ (2 番目の x) の ALA を ARG に変えると回転速度は野生型の 1/23 倍にまで落ちたが、その回転速度の減少は ATP 加水分解速度を遅くしたことに起因していた。X₁ (最初の x) の GLY を ASP に変えると加水分解以外の要因で回転速度が野生型の 1/17 倍にまで落ちることがわかった。この結果は、最初の x が GLY であることが P-loop の構造変化、ひいては、βサブユニットの構造変化に重要であることを示唆している。

	WT	Ploop β to α	X ₁ : G to D	X ₂ : A to R	X ₃ : G to Q	X ₄ : V to T
回転速度の比率(WT:1)	1	1/1000	1/17	1/23	1/3	3/4
// (ATP _γ S/ATP)	1/20	1/2.5	1/1.1	1/90	1/13	1/25

表 1 . βサブユニットP-loop変異体の 1 分子回転計測結果

(5) βサブユニットの最初の x が GLY であることが P-loop の構造変化に重要であるならば、そ

の配列を α サブユニットの配列 ASP に変えたら、ATP を結合しない条件下で α サブユニットのように Closed 構造を取るはずである。そのことを β サブユニット単体で直接観測するために、まずは、P-loop の xxxx 全てを α サブユニットの配列に変えた β サブユニット単体の X 線結晶構造解析を試みた。その結果、これまでに結晶と回折データを得ることに成功した。

F1-ATPase の構造変化メカニズムに関して、アポ・ホロ型の結晶構造を比較することで、結果的に構造変化した部分を特定し構造変化のメカニズムを推測することや、分子動力学シミュレーションを行うことで、どの残基がどのような順番で構造変化するのかが調べられてきた。しかしながら、構造変化を引き起こす鍵となる残基を予測し、実際にそれらの残基を他のアミノ酸に変えたときに F1 がどのように振る舞うのかを、分子動力学シミュレーションと 1 分子観測実験等を用いて観測し、その構造変化への影響について言及した研究は少ない。本研究は、そのような改造して理解するというアプローチにより F1-ATPase の構造変化メカニズムの一端を解明した点が斬新である。今後は、本研究で得られた主鎖構造の大きな変化を伴う構造変化メカニズムに関する知見を、構造変化するタンパク質のデザインに役立たせたい。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

古賀理恵, 上野博史, 政池知子, 野地博行, 古賀信康, “F₁-ATPase の構造変化に との P-loop 配列の違いが及ぼす影響”, 第 56 回日本生物物理学会年会 2018 年

上野博史, 古賀理恵, 政池知子, 古賀信康, 野地博行, “Rotation of the engineered F₁-ATPase with non-catalytic -type P-loops”, 第 56 回日本生物物理学会年会 2018 年

佐藤友保, 上野博史, 林久美子, 古賀理恵, 古賀信康, 野地博行, 政池知子, “ヒンジ領域を非触媒型に置換した触媒サブユニットをもつ F₁-ATPase の回転トルクと反応速度”, 第 56 回日本生物物理学会年会 2018 年

Rie Koga, Hiroshi Ueno, Tomoko Masaie, Hiroyuki Noji and Nobuyasu Koga, “Impact of the sequence difference of P-loop on the conformational changes of F₁-ATPase”, The 79th Okazaki Conference: Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, 2018 年

上野博史, 古賀理恵, 政池知子, 古賀信康, 野地博行, “サブユニットの P-loop が化した改造 F₁-ATPase の回転”, 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年

古賀理恵, 上野博史, 政池知子, 野地博行, 古賀信康, “回転分子モーター F₁-ATPase の構造変化メカニズムの解明に向けて”, 第 17 回日本蛋白質科学会年会 2017 年

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：古賀 理恵

ローマ字氏名：(Koga, Rie)

研究協力者氏名：上野 博史

ローマ字氏名：(Ueno, Hiroshi)

研究協力者氏名：野地 博行

ローマ字氏名：(Noji, Hiroyuki)

研究協力者氏名：政池 知子

ローマ字氏名：(Masaie, Tomoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。