

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19210

研究課題名（和文）蛍光分子の焼き付けと蛍光回復を利用したATP合成反応における酵素の回転の測定

研究課題名（英文）Measurement of enzyme rotation in the ATP synthesis reaction using fluorescent molecule burning and fluorescence recovery

研究代表者

久堀 徹（HISABORI, TORU）

東京工業大学・国際先駆研究機構・特任教授

研究者番号：40181094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、蛍光分子の退色と蛍光回復を利用してATP合成反応時のATP合成酵素の回転を実証することを目指した。緑藻クラミドモナスのATP合成酵素を完全複合体として単離生成し、人工膜小胞に酵素触媒部位を外側に配向して埋め込む方法を確立した。安定に酵素活性を維持できる蛍光標識としてCy3分子をサブユニットに導入したが、検出感度などの制約により、現行装置では回転の実証が不可能であることが判明した。リポソームに組み込んだATP合成酵素の活性測定法を確立し、ATP合成時の酸化還元制御の機能部位を明らかにした。また、酵素複合体の安定に重要なサブユニット上のアミノ酸を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のATP合成反応は、生命の基幹エネルギー物質であるATPを生産する普遍的な反応である。生体膜に存在してこの反応を担うATP合成酵素の反応機構、および、特に光合成生物のATP合成酵素が特異的に持つ制御機構を解明することは、生体エネルギー分野長年の夢であり、極めて重要な研究と位置付けられる。ATPが生体内のあらゆる生命現象に対してエネルギーを供給しているその重要性を考えると、ATPの生産機構を総合的に解明することは、生物の生産性の向上などに直結する知見となるものであり、エネルギー獲得や食糧増産など人類社会に貢献する研究である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to demonstrate the rotation of ATP synthase during ATP synthesis using fluorescent molecules that undergo photobleaching and fluorescence recovery. The following key findings were obtained. (1) ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas* was isolated as a complete complex, and a method was established to embed the enzyme catalytic site outwardly oriented in artificial liposomes. (2) Cy3 molecules were introduced into the subunit as stable fluorescent labels. However, due to limitations in detection sensitivity, the current setup was unable to demonstrate enzyme rotation. (3) Molecular mechanism of the redox regulation of ATP synthesis reaction was revealed using ATP synthase incorporated into liposomes. Key amino acids on the subunit, crucial for enzyme complex stability, were identified.

研究分野：植物生化学

キーワード：ATP合成酵素 完全複合体 回転 蛍光標識 酸化還元制御 ATP合成活性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1994年にATP合成酵素のF₁部分の結晶構造解析により、 $\alpha_3\beta_3$ 六量体の中心部分を γ サブユニットが回転軸のように貫く構造が明らかにされた。そして、1995年にドイツのJungeらは、葉緑体ATP合成酵素の可溶性部分であるCF₁を用いて、蛍光標識による γ サブユニットの回転観察を報告している。CF₁では、 $\alpha_3\beta_3$ 六量体の回転軸に位置する γ サブユニットのC末端にCysがあり、これが六量体の穴から飛び出す位置に配置している。Jungeらは、このCysに蛍光標識を行い、蛍光の偏光解消実験によりタンパク質分子全体の動きに比べて γ サブユニットに標識した蛍光分子の回転の動きが早いことを捉え、 γ サブユニットは少なくとも200度は回転する、と結論した(Sabbert D. et al. Nature 1996)。しかし、回転の決定的な証拠は、1997年に東工大の吉田賢右教授、慶応大の木下一彦教授らによる共同研究で、 γ サブユニットに蛍光標識したアクチン線維を結合させ、アクチン線維の動きを直接蛍光顕微鏡により観察するという、いわゆる1分子回転観察実験により提供された(Noji H. et al. Nature 1997)。以来、酵素反応の詳細が生化学的に調べられ、また、1分子回転観察実験により生物物理学の研究対象として回転の力学特性も詳細に明らかにされている。この回転に関しては、ATP加水分解反応のサブステップ(基質の結合、化学反応、生成物の解離)に対応した回転角度の分析も行われている。近年、クライオ電子顕微鏡観察技術の長足の進歩により、複雑な構造をしている膜内在性部分(F₀部分)と可溶性部分(F₁部分)からなる酵素複合体の全体構造が様々な生物種由来のATP合成酵素について明らかにされている。しかし、この酵素が膜ポテンシャルを利用して実際にATPを合成するときに、加水分解反応とは逆の時計回りに回転するかどうかについては、決定的な証拠は得られていない。この時計回りの回転については、すでに間接的な証拠は複数得られているが、酵素1分子回転観察実験で示されているようなATP加水分解時のような観察はいまだに行われていないし、合成反応の速度論や合成制御と回転の対応付けも十分には出来ていない状況である。

2. 研究の目的

ATP合成酵素の回転の研究は、これまで1分子回転観察実験によって強力に進められたために、Jungeらの蛍光標識実験は、ほとんど顧みられることがなかった。しかし、ATP合成時の酵素の挙動については、膜に埋め込まれた酵素を調べるという制約があるため、1分子回転観察実験では対応できず、不明のままであった。そこで、本研究では、リポソームに再構成した酵素を蛍光標識し、偏光照射による蛍光の退色と酵素反応に伴うその回復を利用して回転を測定する新たな実験系を構築する。そのために、葉緑体型ATP合成酵素を完全複合体として光合成膜から単離精製する方法を確立し、リポソームに再構成して活性測定が可能な系を実現する。そして、ATP合成反応時に γ サブユニットが回転することを実証し、その速度論的解析と制御の解析を行う。

3. 研究の方法

- (1) ATP合成酵素を再構成したリポソームの調製：単細胞緑藻クラミドモナスのATP合成酵素を完全複合体として単離精製し、人工膜小胞(リポソーム小胞)に一方向に整列させて埋め込む。この再構成リポソームを用いて、ATP合成反応の解析を行う。
- (2) ATP合成酵素 サブユニットの蛍光標識：回転子である サブユニットの適当な位置にCysを導入し、蛍光性マレイミドで特異的標識を行う。
- (3) リポソームの作成とATP合成酵素の蛍光標識分子の観察：蛍光標識したATP合成酵素をリポソームに再構成し、ATP加水分解活性、ATP合成活性を維持していることの確認、および、蛍光標識分子の確認を行う。
- (4) レーザー照射による蛍光標識分子の退色：蛍光標識したATP合成酵素をリポソーム再構成した後、可視波長可変レーザーを一定時間照射し、退色が起こる条件を設定する。
- (5) リポソームにおけるATP合成酵素駆動と退色の回復の確認：退色した蛍光分子の蛍光の回復を利用したプロトン駆動のATP合成酵素の回転現象を観察する。

4. 研究成果

本研究は、研究方法に示した(1)から(5)までの研究を順を追って進めた。しかし、既存のレーザー装置では回転現象を観察できる時間領域での退色を行うことができず、蛍光の回復により膜結合酵素におけるサブユニットの回転を実証するという当初目的を達成することができなかった。一方で、本研究により葉緑体型ATP合成酵素完全複合体の調製が可能な実験条件を確立できたことで、この酵素の活性制御については分子レベルで大きな成果を上げることができた。

ATP合成酵素完全複合体の精製とリポソーム

クラミドモナス葉緑体 ATP 合成酵素の サブユニット N 末端に His-tag を付加した酵素を、クラミドモナス葉緑体内に発現させた。そして、このクラミドモナス細胞標品から葉緑体膜タンパク質を可溶化後に Ni-NTA カラムにより一段階で ATP 合成酵素を高純度に調製する実験系を確立した。この ATP 合成酵素を再構成したりポソームに KCl-バリノマイシンを用いて膜ポテンシャルを印加し、ATP 合成活性をルシフェリン ルシフェラーゼ法で確認した (図 1)。

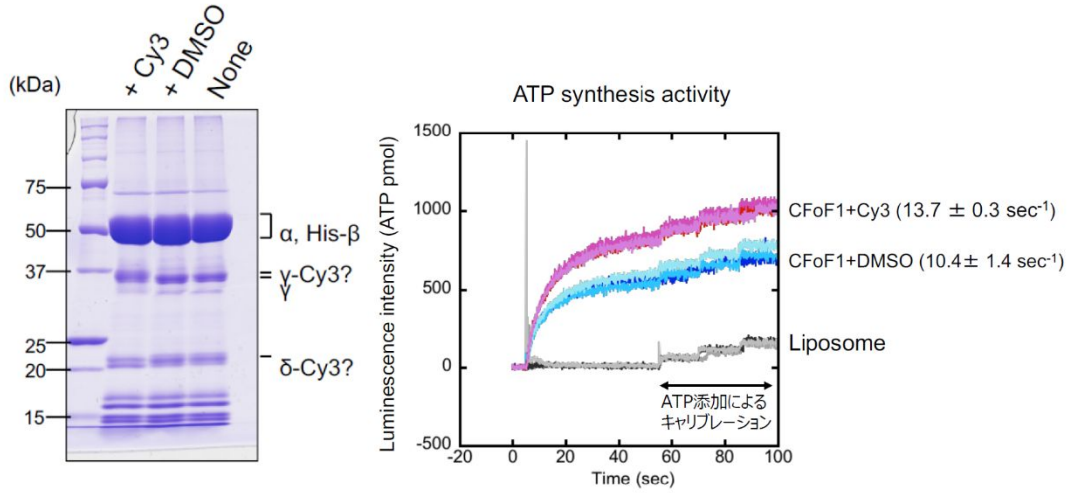


図1 クラミドモナス葉緑体ATP合成酵素の精製標品とATP合成活性

ATP合成酵素複合体の Cy3 標識

サブユニットの蛍光標識対象とする Cys を構造情報から検討し、レドックス制御部位の 2 つの Cys のうち ²⁰⁴Cys を Ser に置換して ¹⁹⁸Cys を用いることとした (図 2)。サブユニットの外表面にも図に示す通り Cys が存在する。標識過程では両者を識別できないが、サブユニット上の Cys に蛍光化合物である Cy3 を導入することに成功した。また、標識後の酵素は、ATP 合成活性を維持していた (図 1 参照)。

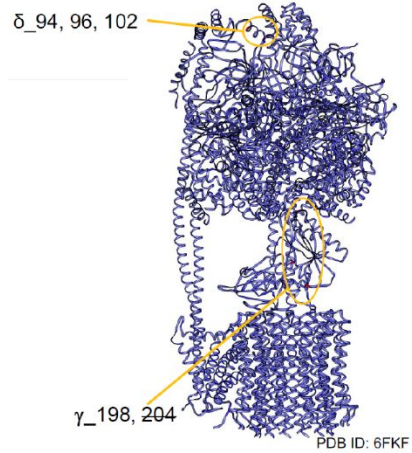


図2 ATP合成酵素のCy3標識部位

退色実験 (顕微鏡観察不可)

Cy3 標識した ATP 合成酵素を含む再構成プロテオリポソームに 632nm (20 Hz) のレーザー光を照射し、Cy3 蛍光の退色を調べたところ、照射時間、および、照射レーザー強度に応じた退色が観察された (図 3A)。一方、十分に退色させる強度と時間で処理した場合、リポソームの ATP 合成活性は最大 20%まで減少した。蛍光顕微鏡でプロテオリポソームを観察したところ、レーザー照射による蛍光輝点の現象は観察できた (図 3B、画面の右半分のみレーザーを照射)。しかし、十分な退色には分オーダーの時間がかかること、個々の輝点の輝度変化を観察するためには使用機器の感度が不足していることなど、今後個々のリポソームにおいて酵素の駆動 (蛍光標識分子の回転) による蛍光回復を観察するには解決すべき問題点が数多く存在することが判明した。

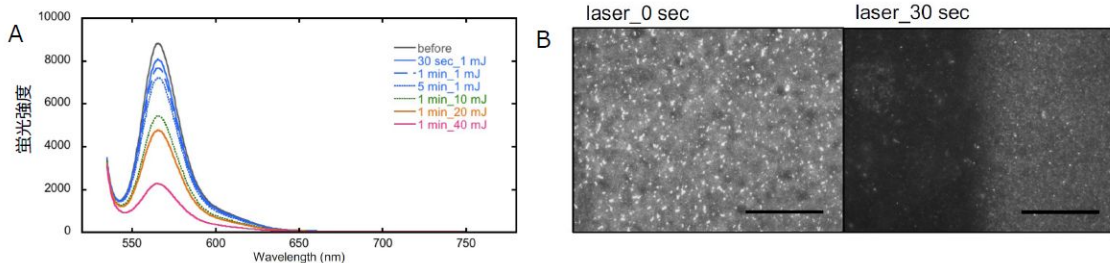


図3 レーザー光照射によるCy3の退色

ATP合成酵素完全複合体のATP合成と酸化還元制御

クラミドモナス葉緑体 ATP合成酵素への変異導入と完全複合体の精製技術を確立できたことで、葉緑体 ATP合成酵素サブユニット上の酸化還元制御スイッチについて、分子レベルの解析を行った。まず、レドックス制御に重要と思われるサブユニットのヘアピン構造と2つのCysを保持しているレドックスループ構造について、各種の変異体を作成した(ヘアピン、レドックスループ、ヘアピン&レドックスループなど)。これらを複合体として発現するクラミドモナス細胞から精製酵素複合体を調製し、プロテオリポソームによるATP合成活性の酸化還元制御の解析、および、Cysペアの酸化還元状態の解析を行った。合わせて、完全複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。これにより、ATP合成酵素の酸化還元制御においてヘアピン構造とレドックスループ構造が強調して働くことで、ATP合成活性を厳密に制御していることを明らかにした(図4、Akiyama K. et al. PNAS 2023)。さらに、プロテオリポソームではATP加水分解活性が極めて厳密に制御されていること、および、構造解析情報をもとに、このような酸化還元制御が酵素の制御領域の柔軟性の変化によることを明らかにした(論文投稿準備中)。また、シアノバクテリアチラコイド膜に存在するATP合成酵素において、機能未知だったサブユニット外表面のアミノ酸変異がATP合成酵素複合体の安定性に影響することを見出し論文発表した(Machida A. et al. PCP 2023)。



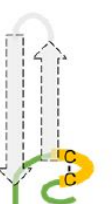

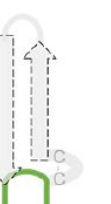
					
	野生型	DDE/NNQ	Δβ-hairpin	ΔRedox loop	ΔInsertion
酸化型	×	×	○	×	○
還元型	◎	◎	◎		○

図4 γサブユニットのレドックス制御領域の変異導入とATP合成酵素活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiyama Kentaro, Ozawa Shin-Ichiro, Takahashi Yuichiro, Yoshida Keisuke, Suzuki Toshiharu, Kondo Kumiko, Wakabayashi Ken-ichi, Hisabori Toru	4. 巻 120
2. 論文標題 Two specific domains of the subunit of chloroplast FoF1 provide redox regulation of the ATP synthesis through conformational changes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2218187120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2218187120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Machida Akito, Kondo Kumiko, Wakabayashi Ken-ichi, Tanaka Kan, Hisabori Toru	4. 巻 64
2. 論文標題 Molecular Bulkiness of a Single Amino Acid in the F1 -Subunit Determines the Robustness of Cyanobacterial ATP Synthase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1590 ~ 1600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久堀徹
2. 発表標題 葉緑体ATP合成酵素の活性制御の分子機構 - 40年でどこまで理解できたか -
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久堀徹
2. 発表標題 光合成エネルギー変換系酵素の機能制御の解明
3. 学会等名 日本植物生理学会2024年度年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石内 俊一 (ISHIUCHI SHUN-ICI) (40338257)	東京工業大学・理学院・教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------