

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23770157

研究課題名(和文) 枯草菌 ATP 合成酵素の活性調節の包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of Bacillus subtilis ATP synthase

研究代表者

山田 康之 (Kato-Yamada, Yasuyuki)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：80386507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 枯草菌 ATP 合成酵素の部分複合体である F1-ATPase (BF1) の生化学的な解析を行い、BF1 は非常に強い IADP 阻害を受けること、F1-ATPase の阻害因子として知られるサブユニットが BF1 では活性化因子として働くことを明らかにした。(2) BF1 の非常に強い IADP 阻害は非触媒部位への ATP 結合が弱い事が原因ではないことを明らかにした。(3) 枯草菌 ATP 合成酵素の大量発現系を構築し、詳細な機能解析を可能とした。(4) 枯草菌に ATP 濃度センサータンパク質である ATeam を組み込んだ株を構築した。(5) 枯草菌 ATP 合成酵素の活性調節が機能する生理的な条件を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) Biochemical analysis of Bacillus subtilis F1-ATPase (BF1) revealed that BF1 is strongly inhibited by MgADP inhibition and the "inhibitory" epsilon subunit acts as an activator in BF1. (2) It was revealed that the strong MgADP inhibition of BF1 is not due to the low ATP binding affinity of noncatalytic sites. (3) Overexpression system of BFoF1 was successfully constructed. (4) Bacillus subtilis strain containing an ATP-sensor protein (ATeam) was constructed. (5) Physiological conditions where the regulation of BFoF1 by the epsilon subunit is prominent were revealed.

研究分野：機能生物科学

キーワード：活性調節 阻害 生体エネルギー変換

1. 研究開始当初の背景

ATP合成酵素の触媒機構が明らかになってくる一方、それがどのように調節されているのかを理解する事もまた重要である。ATP合成酵素の活性調節機構としては、全てのATP合成酵素で見られるADP阻害による調節が知られている。これは触媒部位に強く結合したADPによって、ATP合成の逆反応であるATP加水分解反応が阻害されるというものである。これと相補するものとして、真核細胞ミトコンドリアATP合成酵素では、特有なATPaseインヒビタータンパク質による調節、葉緑体ATP合成酵素では、特有な γ サブユニットのジスルフィド結合の形成・解裂による調節が知られている。一方、細菌のATP合成酵素の活性調節機構についてはこれまで余り研究がなされていなかった。研究代表者は、細菌のATP合成酵素にもADP阻害以外の活性調節機構が存在するものと考え、好熱菌 *Bacillus* PS3 由来のATP合成酵素を材料として、その活性調節機構の存在を示し、詳細を理解することを目指して研究を行ってきた。その結果これまでに、ATPase活性の阻害因子として知られていた ϵ サブユニットがATPase活性調節能を持つこと、活性調節に伴い ϵ サブユニットが大きく構造変化すること、 ϵ サブユニットと、触媒サブユニットである β サブユニット間の静電相互作用が活性調節に重要であること等を明らかにしてきた。これらの研究などにより、細菌のATP合成酵素では、ADP阻害とともに ϵ サブユニットが活性調節を担っていると考えられるようになった。さらに研究代表者は、単離したATP合成酵素の ϵ サブユニットにATPが結合することを、世界ではじめて示した。 ϵ サブユニットへのATP結合は、枯草菌、また弱いながらも大腸菌由来のATP合成酵素の ϵ サブユニットでも見られ、詳細なメカニズムは異なるとしても、ある種の細菌のATP合成酵素に広く保存された性質であると考えられる。さらにそのATP結合と活性調節の関係を明らかにした。

しかしながら、このような *in vitro* での実験で見られるATP合成酵素の活性調節が、実際の細胞内でどのように機能しているのかを明らかにした研究はなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ATP合成酵素の活性調節が細菌にとって、どのようなメリットがあるのかを明らかにする事を目的とした。上記の目的のためには、ATP合成酵素変異株を作成し微生物生理学的な実験を行うことが必須である。このため、ゲノム遺伝子操作系およびATP合成酵素欠損株などが無い好熱菌 *Bacillus* PS3 に代わり、近縁種でありATP合成酵素の活性調節のしくみが似ていると考えられ、かつ遺伝子操作が容易な枯草菌 *Bacillus subtilis* を用い、はじめに生化学的な性質があまり分かっていない枯草菌ATP合

成酵素の生化学的な性質を明らかにし、さらに枯草菌の生菌を用いて生理条件下でのATP合成酵素の活性調節について調べる事とした。*In vitro* での実験で明らかになった条件をふまえ、 ϵ サブユニットによる活性調節、共役状態の変化が、枯草菌にとって有利に働く生育環境を具体的に明らかにする事を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 枯草菌 F_1 -ATPase の解析

枯草菌と好熱菌 *Bacillus* PS3 のATP合成酵素は、その極めて高い相同性からよく似た性質を持つものと考えられたが、枯草菌由来のATP合成酵素を用いた生化学的な解析はほとんど例がなく、特に ϵ サブユニットの働きについては全く調べられていなかったため、これを検証した。作製した大量発現系から調製した枯草菌 F_1 -ATPase(BF_1)の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体および ϵ サブユニットを用い $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体を *in vitro* 再構成により調製し、生化学的解析を行った。具体的には、 BF_1 における、ADP阻害、 ϵ サブユニットによる調節、保存性の高い β DELSEED領域の機能解析、 ϵ サブユニットへのATP結合の活性調節への影響、非触媒部位の機能、好熱菌 F_1 との違いの原因などについて調べた。

(2) 枯草菌ATP合成酵素の生化学的解析

上記の実験と平行して、ATP合成酵素ホロ酵素を用いた解析も行った。まずは枯草菌から調製した反転膜小胞を用いて、ATPase活性、 H^+ 輸送活性、ATP合成活性を調べた。しかしながら、枯草菌細胞膜に含まれるATP合成酵素の量は少なく、詳細な解析は困難であることがわかった。そのため、大腸菌を宿主とした枯草菌ATP合成酵素($BFoF_1$)の大量発現系を作製することとした。得られた $BFoF_1$ を含む大腸菌反転膜を用いて、詳細な解析を行った。また、精製条件についても検討した。

(3) 枯草菌生菌中のATP濃度のリアルタイム測定系の構築

一見して生育に違いが見えない場合でも、細胞のエネルギー充足状態が大きく異なる場合も考えられるため、生きた菌体のエネルギー充足状態(細胞内ATP濃度)を測定するために、京都大学の今村博臣博士らとの共同研究によって開発された、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって細胞内ATP濃度を直接測定出来るATPセンサー(ATeam, Adenosine 5'-Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements)を導入した枯草菌株を作製した。作製した枯草菌株によって、細胞内ATP濃度の観察を行った。

(4) 枯草菌を用いた、*in vivo*でのATP合成酵素活性調節の解析

枯草菌を用いて、*in vivo*でのATP合成酵素の

活性調節についての検討を行った。 ϵ サブユニットによる活性調節能を無くした変異株の性質を野生株と比較した。野生型だけでなく、他の遺伝子の変異株もバックグラウンドとして用いた。

4. 研究成果

(1) 枯草菌 F_1 -ATPase の解析

BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体では、初速度の活性と比較して定常状態では数%程度まで低下することから、非常に強い ADP 阻害を受けていることが示唆された。これにより、 BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の定常状態での ATPase 活性の ATP 濃度依存性は、2 コブの特徴的な形となった。ADP 阻害を解除することで活性化を引き起こすことが知られている界面活性剤 lauryl dimethylamine oxide (LDAD) を添加することで、100 倍程度の非常に強い活性化が見られた。また、あらかじめ ADP とインキュベートした後に活性を測る実験を行ったところ、モル比で 1:2 程度の ADP により、活性が強く阻害された。これらの結果から、 BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体では ADP 阻害が非常に強いと結論した。一方、 BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体を用いた測定から、一般的に F_1 -ATPase の阻害因子として働くことが知られる ϵ サブユニットが、 BF_1 では活性化因子として働くことがわかった。 ϵ サブユニットによる活性化は特に低濃度 ATP で顕著であった。また、初速度には大きな差はなく、定常状態の活性が大きく変化していた。これらの結果から、 ϵ サブユニットは、阻害的な ADP の結合を妨げることで ADP 阻害を軽減し、その結果活性化因子として働いていることが示唆された。これを確かめるために、 BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体を ADP とインキュベートする実験を行ったところ、 BF_1 - $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体と比較して、ADP による阻害が大きく軽減されていた。この他、 ϵ サブユニットの構造を一般的に阻害状態に対応するとされる extended 型に固定したところ、非常に高い活性を示した。これらの結果から、 BF_1 においては、 ϵ サブユニットが ADP 阻害を解除することで、高い活性を示すものと結論づけた。

そこで、触媒部位にトリプトファンを導入し、ATP や ADP の結合を蛍光変化によって測定可能な BF_1 変異体を作製し、 ϵ サブユニットによるヌクレオチド結合の変化を調べた。その結果、 ϵ サブユニットが実際に触媒部位への ADP 結合を阻害していることが明らかとなった。

この非常に強い ADP 阻害の原因を調べるため、一般に ADP 阻害の解除に重要であるとされる非触媒部位への ATP 結合を調べた。非触媒部位への ATP 結合が弱いために、ADP 阻害が強い可能性が考えられたが、測定の結果から非触媒部位への ATP 結合は BF_1 においても十分強く、強い ADP 阻害の原因とは考えられないことが明らかとなった。

この他、触媒部位を持つ β サブユニットに含まれる、非常に保存性の高い DELSEED 領

域が、 BF_1 では DELGEED という特徴的な配列になっている事に着目し、DELSEED 配列を持つ BF_1 を作製し、その性質を野生型と比較することで DELGEED 領域の役割を明らかにすることを試みた。しかしながら、ATPase 活性、 ϵ サブユニットの構造変化の様子など様々な検討を行ったが、野生型との明確な違いを見出すことはできなかった。

この他、 BF_1 の活性調節をより詳細に調べるために、回転 1 分子観察の実験系を構築したので、今後解析を行う。

(2) 枯草菌 ATP 合成酵素の生化学的解析

部分複合体である BF_1 ではなく、ATP 合成酵素のホロ酵素(BF_0F_1)の生化学的解析では、野生型と ϵ サブユニットの C 末端ドメインを欠損した変異体(ϵ^{AC})の比較を行った。野生型では、ATPase 活性と比較して、高い GTPase 活性を示す一方、 H^+ 輸送活性については、ATP を基質とした方が高い事が明らかとなった。基質によって共役の度合いに差があるといえ、その差の原因は、好熱菌 F_0F_1 で見られる、 ϵ サブユニットへの ATP 結合に依存した条件的な脱共役状態と同様に、 ϵ サブユニットへの ATP と GTP の結合の差によるものと考えられた。すなわち BF_0F_1 においても、 ϵ サブユニットにヌクレオチドが結合していない状態では、脱共役が起こることが明らかとなった。また、 ϵ^{AC} 変異体は野生型よりも低い活性を示した事から、 BF_1 と同様に BF_0F_1 においても、 ϵ サブユニットが ADP 阻害を軽減していることがわかった。さらに詳細な解析を試みたが、枯草菌細胞膜に含まれる BF_0F_1 の量は少なく、詳細な解析を行うことは困難であった。そのため、大腸菌を宿主とした BF_0F_1 の大量発現系を作製した。作製した BF_0F_1 を含む大腸菌反転膜小胞を用いた測定では、枯草菌反転膜と比較して、膜タンパク質あたり 5 倍程度の高い活性を示し、枯草菌反転膜では困難であった、低基質濃度での測定が可能となった。この反転膜から BF_0F_1 を可溶化、精製する条件の検討も行った。

(3) 枯草菌生菌中の ATP 濃度のリアルタイム測定系の構築

枯草菌ゲノム DNA に ATeam 遺伝子を導入することに成功した。蛍光共鳴エネルギー移動の顕微鏡による観察にも成功したので、今後、経時的な観察を試みる予定である。さらに、ATP 合成酵素変異株と組み合わせた観察も試みる予定である。また、ATeam に組み込んで利用することが可能な、ATP 結合能の非常に高い好熱菌 ϵ サブユニットの作製に成功したので、今後これをもとにヌクレオチド結合能・特異性を改変した ATeam の作製を試みる予定である。

(4) 枯草菌を用いた、*in vivo* での ATP 合成酵素活性調節の解析

野生株と ϵ^{AC} 株では、生育に顕著な違いは観察されなかった。そこで、様々なバックグラウンドの親株を用いて同様の比較を行ったところ、 ϵ^{WT} と ϵ^{AC} で生育に差の見られる条件を見出したので、引き続き解析を行い、ATP合成酵素の ϵ サブユニットによる調節の生理的な意義の解明を目指す。

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3件、全て査読あり)

1 . High affinity nucleotide-binding mutant of the ϵ subunit of thermophilic F_1 -ATPase
Yasuyuki Kato-Yamada
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2016) 469, 1129-1132
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.121

2 . Severe MgADP inhibition of *Bacillus subtilis* F_1 -ATPase is not due to the absence of nucleotide binding to the noncatalytic nucleotide binding sites
Toru Ishikawa and Yasuyuki Kato-Yamada
PLoS ONE (2014) 9, e107197
doi: 10.1371/journal.pone.0107197

3 . ϵ Subunit of *Bacillus subtilis* F_1 -ATPase relieves MgADP inhibition
Junya Mizumoto, Yuka Kikuchi, Yo-hei Nakanishi, Naoto Mouri, Anrong Cai, Tokushiro Ohta, Takamitsu Haruyama and Yasuyuki Kato-Yamada
PLoS ONE (2013) 8, e73888
doi: 10.1080/09168451.2014.890033

[学会発表](計7件)

1 . 高田 浩志、山田 康之
枯草菌 F_1 -ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
第53回日本生物物理学会年会 2015年9月13日~2015年9月15日金沢大学角間キャンパス(石川県・金沢市)

2 . 高田 浩志、山田 康之
枯草菌 F_1 -ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
日本生体エネルギー研究会 第40回討論会 2014年12月11日~2014年12月13日愛媛大学南加記念ホール(愛媛県・松山市)

3 . Toru Ishikawa, Yasuyuki Kato-Yamada
Role of Noncatalytic Sites of *Bacillus subtilis* F_1 -ATPase
Tokyo ATPase Workshop 2014年6月2日~2014年6月3日 東京大学武田先端知ビル(東京都・文京区)

4 . 石川 透、山田 康之

枯草菌 F_1 -ATPase の非触媒部位と ADP 阻害の関係性

日本生体エネルギー研究会 第38回討論会
2012年12月22日~2012年12月24日岡山大学薬学部(岡山県・岡山市)

5 . 多賀名 智昭、鈴木 祥太、河村 富士夫、山田 康之
枯草菌 F_1 -ATPase 合成酵素の機能解析
日本生体エネルギー研究会 第38回討論会
2012年12月22日~2012年12月24日岡山大学薬学部(岡山県・岡山市)

6 . Junya Mizumoto, Yuka Kikuchi, Yasuyuki Kato-Yamada
epsilon Subunit suppresses ADP-inhibition of *Bacillus subtilis* F_1 -ATPase
17th European Bioenergetics Conference 2012年09月15日~2012年09月17日
Freiburg im Breisgau (Germany)

7 . 水本純弥、菊池有夏、山田康之
ATP合成酵素におけるADP阻害と ϵ サブユニットによる阻害の関係
日本生体エネルギー研究会 第37回討論会
2011年12月21日 京都産業大学神山ホール(京都府・京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 康之 (Kato-Yamada, Yasuyuki)
立教大学・理学部・教授
研究者番号: 80386507