

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24570149
 研究課題名(和文) Inhibitory factor 1によるヒトATP合成酵素の制御機構の解明

 研究課題名(英文) Analyses of inhibitory effects of Inhibitory factor-1 on human ATP-synthase.

 研究代表者
 鈴木 俊治 (Suzuki, Toshiharu)

 東京大学・工学(系)研究科(研究院)・主幹研究員

 研究者番号：60618809

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡一分子観察によりヒトF1の回転スキームを決定し、それはバクテリアF1のものとは異なる事を明らかにした。この成果により、今まで解釈不能であった多数のウシF1のX線結晶構造の機能的解釈を行うことが可能となった。IF1による回転の阻害を分析した結果、IF1は回転を加水分解の素過程を待つ角度である90度で停止させたが、外部磁場によりヒトF1をATP合成方向に強制回転させることにより、阻害が解除される事が明らかになった。これらの結果は、IF1はATP加水分解の素過程を阻害し、ATP合成反応は阻害しないという結晶構造解析や生化学的解析結果と一致し、将来的なATP合成酵素の制御の手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：Firstly, I analyzed rotary catalysis mechanism of human F1-ATPase by single molecule analyses. The rotation scheme revealed was that ATP-binding, Pi-releasing and ATP-hydrolysis steps of the ATP-hydrolysis turnover occur at 0, 65 and 90 deg, which was different from bacterial one and enables us to explain the functional state of crystal structures of bovine F1 so far reported. Then, inhibitory factor-1 (IF1) was shown to prevent the rotation at 90 deg, and the inhibited state was removed only by forced rotation of F1 with magnetic tweezer at the direction of ATP-synthesis: F1 was broken when forced rotation at ATP-hydrolysis direction. These results support and explain earlier findings from crystal structures and biochemical analysis that IF1 blocks only ATP-hydrolysis reaction by preventing an elementary step of ATP-hydrolysis by preventing rotation. These results would provide important clues to understand the regulatory mechanism of IF1 for future applied purposes.

研究分野：機能生物学

キーワード：ATPase F1-ATPase single molecule analysis ATP

1. 研究開始当初の背景

F₀F₁-ATP 合成酵素(以後 F₀F₁ と省略)は生物の生体膜に広く存在し、膜に形成された H⁺ の電気化学的ポテンシャルから、細胞内で必要な ATP の大部分を合成する。F₀F₁ は ATP 加水分解/合成を行う F₁ ドメインと、イオン輸送を行う F₀ ドメインからなる。これら 2 つのドメインは回転分子モーターであり、両ドメインの機能は一部のサブユニット(

・c リング)の回転により共役(連動)するという興味深い構造を持つ。

近年の遺伝子解析技術の進歩は、F₀F₁ に原因を持つ遺伝子病を明らかにしてきた。これらの遺伝子病は F₀F₁ 自体もしくはその複合体形成に必要な分子シャペロンに変異部位を持ち、ミトコンドリアにおける ATP 合成酵素の量を ~ 30% 程度に低下させる(無くなるわけではない)。その結果、細胞レベルでは細胞質への ATP 供給量の低下や ROS の産生などの障害を発生させ、個体レベルでは新生児低血圧症、乳酸アシドーシス、知能発達遅延、肥大性心筋、異形症、小頭症などの臨床的症状を引き起こし、約半分の患者が数ヶ月から数年で死亡する。これらの結果は、~ 30% 程度の ATP 産生能の低下でさえヒト個体レベルでの健全な生命活動に大きな影響を与えることを示している。

F₀F₁ の機能に影響を及ぼすタンパク質性因子で最も詳しく分析されているは、Inhibitory factor-1 (以後 IF1 と省略)である。IF1 は真核生物特有の F₀F₁ の阻害因子として知られているが、近年、細胞のがん化の際に発現量が変化し、ワールブルク効果を持ち、アポトーシス以降にも関係する事が報告されている。

2. 研究の目的

近年申請者により組み換え体のヒト F₁-ATPase(F₀F₁-ATP 合成酵素の水溶性ドメイン、以後 F₁)の発現系が確立され、それまで困難であったヒト F₁ の分子機構を詳細に分

析することが可能となった。本研究ではこのシステムを利用し、阻害因子 Inhibitory factor-1 によるヒト F₁ の機能(回転)の阻害機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。得られる知見は、細胞内のエネルギー通貨である ATP の産生源である ATP 合成酵素の機能調節という意味から、将来的な ATP 合成酵素の人為的調節という医薬的観点からも重要な意義を持つ。

3. 研究の方法

本研究では、現在までに確立している様々な顕微鏡一分子観察技術を駆使し、IF1 によるヒト F₁ の阻害機構を分析する。微小(直径 40nm)の金コロイド粒子を用い、低粘性条件下での回転の高時間分解能解析などを行い、IF1 が F₁ の酵素反応のどの素過程を阻害するかを明らかにする。また、外力により F₁ を ATP 合成方向に回転させ阻害の変化を分析する事により、その阻害スキームを逆反応からのアプローチにより検証する。これらの分析から、IF1 による阻害のスキームを明らかにするとともに、回転モーターの回転を制御する分子機構の解明を行う。また、ヒト F₁ は申請者が昨年度確立した大腸菌を宿主とした大量発現系を用いて入手した組み換え体ヒト F₁ を用いる。

4. 研究成果

ヒト F₁ 酵素の研究はほとんど行われていなかった為、本研究の第一段階として、ヒト F₁ の回転触媒機構を明らかにする必要があった。そこでまず、高感度中央遮蔽型暗視野顕微鏡の開発などを行い、様々な手法でヒト F₁ の回転の分析を行った。その結果ヒト F₁ が ATP により回転するスキームは、ATP 結合を 0 度とすると、生成物リン酸の解離が 65 度、ATP 加水分解が 90 度であり、それまでに解明してきたバクテリア F₁ のものとは異なっていることが明らかになった(下図)。

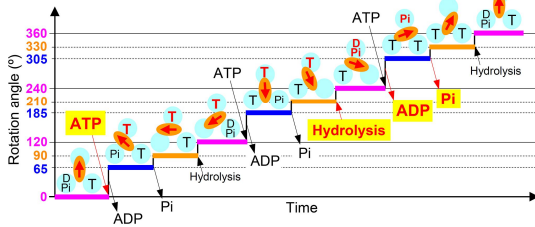


図. 明らかになったヒト F1 の回転スキーム

この成果により、今まで解釈不能であった多数のウシ F1 の X 線結晶構造の機能的位置づけを行うことが可能となり、今後、立体構造に基づいてヒトを含む哺乳類 F1 の詳細な研究を行うことが可能となった。この成果は、今後の F1 研究を考えるうえで本研究の大きな成果の一つといえるだろう。

次に IF1 による阻害効果を分析したところ、IF1 は加水分解の素過程を待つ 90 度でヒト F1 の回転を停止させることを明らかにした。そして興味深いことに、外部磁場により、IF1 により停止したヒト F1 を ATP 合成方向に強制回転させたところ、高い効率で阻害を解除できる事が明らかになった。同様に加水分解方向には強制回転させたところ、回転できないか、F1 の構造が壊れることが判明した。前者の結果は、IF1 は ATP 加水分解の素過程を阻害する事により ATP 加水分解を阻害するという X 線結晶構造解析から提唱されているモデルを支持した。後者の結果は、IF1 が ATP 加水分解の実を阻害し ATP 合成反応は阻害しないという生化学的分析の結果と一致した。今回、阻害の発生/解除と IF1 の解離/結合の関係は明らかにできなかったが、IF1 によるヒト F1 の阻害状態には、速やかに発生する IF1 の結合親和性が弱いタイプの阻害と、阻害状態までに時間を要するが強い親和性のタイプの阻害があることが見出されている。この結果は、IF1 の結合・阻害様式が複数存在することを示唆しているが、それは今後の研究により明らかになると考えている。

また、本研究では、回転モーターの調節に関する手がかりが得られたと考えている。今回の研究から、回転モーターの調節する場合、回転軸付近の構造変化を起こす部分にヘリックスなどの棒状構造のものを挿入し、酵素反応の素過程の進行に必要な構造変化を防止する事により、効果的に素過程の進行を阻害できる事が示唆された。IF1 では、ヘリックスが回転軸と触媒サブユニットの間の領域に挿入される事により、ATP 加水分解に必要な 90-120° の回転を立体構造的に阻害され、ATP 加水分解の turnover が停止するようである。類似の阻害因子は、バクテリア F1 におけるサブユニットにもみられる。しかしバクテリアでは研究データが断片的であり、サブユニットの阻害機構を詳細に議論することは困難であるが、類似の分子機構が働いていることが想像される。

本研究で得られたヒト F1 モーターの制御機構は、将来的な FoF1-ATP 合成酵素の人為的制御の手がかりになると考えられる。

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 10 件)10 件すべて査読有

1. Preobraschenski J, Zender J-F, Suzuki T, Jahn R (2014) Vesicular Glutamate Transporters Use Flexible Anion and Cation Binding Sites for Efficient Accumulation of Neurotransmitter. *Neuron*, 84(6), 1287-301.
2. Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M (2014) Chemo-mechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nature Chem Biol*, 10,930-936.
3. Kang S, Todokoro Y, Yumen I, Shen B, Iwasaki I, Suzuki T, Miyagi A, Morikawa K, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H (2014) Active-Site Structure of Thermophilic Foc-Subunit Ring in Membranes Elucidated

- by Solid-State NMR. *Biophys J*, 106(2), 390-398.
4. Kiota H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Toshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S (2014) Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(1), 273-8.
 5. Masato Morino¹, Toshiharu Suzuki, Masahiro Ito, Terry Ann Krulwich (2014) Purification and functional reconstitution of a seven-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter, *J Bacteriol*, 196(1), 28-35.
 6. Bak S, Kang S, Suzuki T, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H (2013) Improved purification of thermophilic FoF1-ATP synthase c-subunit rings and solid-state NMR characterization of them in different lipid membranes. *J Korean Magnetic Resonance Society*. 17(2), 67-75.
 7. Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Todokoro Y, Tanaka K, Okada O, Fujiwara T, Yoshida M, Akutsu H (2012) Purification, Characterization and Reconstitution into Membranes of the Oligomeric c-Subunit Ring of Thermophilic FoF1-ATP Synthase Expressed in *E. coli*. *Protein express purification*, 82(2), 396-401.
 8. Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M, Suzuki T. (2012) Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J Biol Chem*, 287(12), 9633-9.
 9. Kuruma Y*, Suzuki T* (*equally-contributed to this paper), Ono S, Yoshida M, Ueda T (2012) Functional analysis of membraneous Fo-a subunit of F1F0-ATP synthase by *in vitro* protein synthesis. *Biochem J*, 442(3), 631-8.
 10. Usukura E, Suzuki T, Furuie S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M (2012) Torque Generation and Utilization in Motor Enzyme F0F1-ATP Synthase: half-torque F1 with short-sized pushrod helix and reduced ATP synthesis by half-torque FoF1. *J Biol Chem*, 287, 1884-91.
- 〔学会発表〕(計 22 件)
1. 富山泰至、佐藤宏樹、鈴木俊治、吉田賢右、三留規誉、ナトリウム輸送性ATP合成酵素のATP合成活性とチャンネル解析、第17回化学工学会、2015年3月、徳島大
 2. 若林十雲、佐藤宏樹、鈴木俊治、吉田賢右、松西拓哉、濱田康平、三留規誉、ATP合成酵素のFoの変異によるH⁺輸送活性とイオン輸送機構の解析、第17回化学工学会、2015年3月、徳島大
 3. Su-Jin Kang, Yasuto Todokoro, Ikuko Yumen, Bo Shen, Iku Iwasaki, Toshiharu Suzuki, Atsushi Miyagi, Masasuke Yoshida, Toshimichi Fujiwara, Hideo Akutsu, The Active-Site Structure of Thermophilic FoF1-ATP Synthase c-Subunit Rings in Membranes、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月、京都
 4. Ken Tasaki, Yuzo Kasuya, Naoki Soga, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinoshita Jr、Quantitative assay of ATP-driven proton-pump activity of FoF1、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月、京都
 5. 戸所泰人、姜秀珍、湯面郁子、岩崎郁、鈴木俊治、吉田賢右、藤原敏道、阿久津

- 秀雄、脂質二重膜再構成H⁺-ATP合成酵素 subunit c-ringの固体高分解能NMR法による構造決定。第52回 NMR討論会、2013年11月、石川県立音楽堂
6. Toshiharu Suzuki, Kazumi Tanaka, Chiaki Wakabayashi, Shou Furuike, Eiichiro Saita, Kazuhiko Kinoshita, Masasuke Yoshida、Single molecule analyses of human F1-ATPase revealed distinct rotation scheme of mitochondrial F1 motor.、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月、京都
 7. 鈴木俊治、田中一巳、若林千晃、古池 晶、税田英一郎、木下一彦、吉田賢右、ヒト F1-ATPaseの一分子解析が明らかにした、バクテリアとは異なったミトコンドリア F1の回転スキーム、日本生体エネルギー研究会第39開討論会、2013年12月、静岡
 8. Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Furuike S, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Single-molecule analyses of the rotation and regulation of human F1-ATPase. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月、名古屋
 9. Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Furuike S, Saita E, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Single molecule analysis of the rotation and regulation of human F1-ATPase. 第85回日本生化学会大会、2012年12月、福岡
 10. Feniouk BA, Wakabayashi C, Suzuki T, Yoshida M. A point mutation, beta Gln259Leu, relieves MgADP inhibition in *Bacillus* PS3 ATP synthase. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 11. Kasuya Y, Soga N, Suzuki T, Yoshida M, Kinoshita K Jr. ATP-driven H⁺ pump activity of thermophilic *Bacillus* PS3 FoF1-ATP synthase: reconstituted in a liposomal membrane measured by fluorescence ensemble and single liposome assays. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 12. Soga N, Kimura K, Kasuya Y, Suzuki T, Yoshida M, Kinoshita K Jr. H⁺/ATP ratio of FoF1-ATP synthase from the thermophilic *Bacillus* PS3. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 13. Taniguchi N, Suzuki T, Berney M, Yoshida M, Cook GM. Physiological importance of the epsilon subunit of bacterial FoF1-ATP synthase. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 14. Morino M, Suzuki T, Ito M. Characterization and purification of the multi subunit type Na⁺/H⁺ antiporter from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF1. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 15. Suzuki T, Fujikawa M, Nakamura J, Yoshida M. IF1 (mitochondrial FoF1 inhibitor protein); from single molecule to knock-out mouse. ヨーロッパ生体エネルギー学会、2012年、9月、ドイツ
 16. Soga N, Kasuya Y, Suzuki T, Yoshida M, Kinoshita K Jr. H⁺/ATP ratio of FoF1-ATP synthase from the thermophilic *Bacillus* PS3. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月、名古屋
 17. Kasuya Y, Soga N, Suzuki T, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Quantification of ATP-driven H⁺-transport by thermophilic *Bacillus* PS3 FoF1-ATP synthase reconstituted in a liposomal membrane. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月、名古屋

18. 車ゆうてつ、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、無細胞タンパク合成系による膜タンパク質複合体の構築。第7回 無細胞生命科学研究会、2012年11月、愛媛大学。
19. 車ゆうてつ、松林英明、鈴木俊治、上田卓也、無細胞系で創る膜タンパク質複合体。「細胞を創る」研究会5.0、2012年11月、東京工業大学
20. Mitome N, Sato H, Suzuki T, Yoshida M. Analysis of amino acid residues of sodium channel of ATP synthase from *Propionigenium modestum*. 第85回日本生化学会大会、2012年12月、福岡
21. 三留規誉、佐藤宏樹、鈴木俊治、吉田賢右、ナトリウムイオン輸送型ATP合成酵素のaサブユニットの第4膜貫通ヘリックスのイオン輸送に関わるアミノ酸残基の解析、日本生体エネルギー研究会第38回討論会、2012年12月、岡山大学
22. 車ゆうてつ、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、無細胞タンパク合成系による膜タンパク質複合体の構築。第35回 日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡国際会議場。

〔図書〕(計 1件)

1. 鈴木俊治、吉田賢右 (2014) 「FoF1-ATP合成酵素の回転触媒の構造生物学。」、実験医学増刊「構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか」, 2014年6月, vol.32, 1587-92.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 俊治 (Toshiharu Suzuki)
東京大学大学院工学系研究科
応用化学専攻・主幹研究員

研究者番号：24570149

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし