

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18107004

研究課題名(和文) ATP合成酵素(FoF1)の構造、回転、制御

研究課題名(英文) Structure, rotation and regulation of ATP synthase (FoF1)

研究代表者

吉田 賢右 (YOSHIDA MASASUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90049073

研究成果の概要(和文)：

ATP合成酵素のATP合成/分解の触媒活性は、 F_1 -ATPase部分にある。 F_1 -ATPaseでは $\alpha_3\beta_3$ がリング状に配置され、その内部に棒状の γ サブユニットが存在する。3つの β サブユニットそれぞれに触媒部位が存在し、そこでATP加水分解が進行すると、 γ サブユニットが回転する。そこで、1つの β サブユニットだけ活性を9%失う変異を導入して回転を観察した結果、以下のことが明らかになった。 γ サブユニットが0度の位置で1つの β サブユニットに結合したATPは、それから200度回転した位置で加水分解され、320度回転した位置で無機リン酸を放出する。3つの β サブユニットが、あたかも輪唱のようにこの過程を120度の位相差でおこなうことで γ サブユニットがスムーズに回転することが分かった。蛍光色素を1つの β サブユニットにふらふらしないように2点で結合してその構造変化を回転と同時に観察した。

研究成果の概要(英文)：

We made F_1 -ATPases containing one or two mutant β subunits that have the altered catalytic kinetics. The analysis of their asymmetric stepwise rotations reveal that, when watching one β subunit in F_1 -ATPase, it binds ATP at 0° , cleaves ATP after $\sim 200^\circ$ rotation, and undergoes the final catalytic event, presumably the product release, after $\sim 320^\circ$ rotation. Three β subunits carry out this cycle at 120° difference like “trolling a tune” and their cyclic inter-domain bending motions would induce the rotation of γ subunit.

Rotation of the central shaft γ subunit in a molecular motor F_1 -ATPase is assumed to correlate with and probably be driven by domain motions of the three catalytic β subunits. Here we observe directly these β motions through an attached fluorophore, concomitantly with 80 degrees and 40 degrees substep rotations of γ in the same single molecules. We show the sequence of conformations that each β subunit undergoes in three-step bending, an approximately 40 degrees counterclockwise turn followed by two approximately 20 degrees clockwise turns, occurring in synchronization with two substep rotations of γ . The results indicate that most previous crystal structures mimic the conformational set of three β subunits in the catalytic dwells. Moreover, a previously undescribed set of β conformations, open, closed and partially closed, is revealed in the ATP-waiting dwells. The present study thus bridges the gap between the chemical and mechanical steps in F_1 -ATPase.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|-------------|
| 2006年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2007年度 | 19,600,000 | 5,880,000 | 25,480,000 |
| 2008年度 | 19,600,000 | 5,880,000 | 25,480,000 |
| 2009年度 | 19,600,000 | 5,880,000 | 25,480,000 |
| 2010年度 | 19,600,000 | 5,880,000 | 25,480,000 |
| 総計 | 85,600,000 | 25,680,000 | 111,280,000 |

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ATP 合成、ATP 合成酵素、 F_0F_1 、モータータンパク質、生体エネルギー

1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素 (F_0F_1) は、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の膜にあまねく存在し、 H^+ (プロトン) の流れで ATP を合成 (嫌気性菌の場合はその逆反応を) している。 F_0F_1 は、 H^+ の流れで駆動する F_0 モーターと、ATP で駆動する F_1 モーターが、共通の回転シャフト ($c_{10}\text{-}\gamma\epsilon$) を持つことによって、 H^+ の流れと ATP/ADP+ P_i のエネルギーを交換する、他に類例のない構造と機能を持つ酵素である。 F_1 モーターについて言えば ATP 加水分解による回転の仕組みはある程度わかってきた。しかし、いくつかの重要な課題が残っていた。すなわち、 F_0F_1 および F_0 モーターの原子構造がいまだ不明であること、 F_0 モーターの理解が模式図の程度にとどまっていること、 F_1 モーターの回転と F_1 の構造変化の関係がやはり模式図の段階にとどまっていること、 F_0F_1 の制御について全くと言っていいほど理解が進んでいないこと、である。

2. 研究の目的

この基盤研究 (S) では、 F_0F_1 および F_0 モーターの原子構造の解明、回転の分子的な理解、 F_0F_1 による ATP の合成と分解の制御の理解、を追究する。

3. 研究の方法

F_0F_1 および F_0 の結晶構造解明の上で、少なくとも3つ、解決すべき問題がある。一つは F_0 モーターの固定子 (a -サブユニット) と回転子 (c -リング) の微妙な結合である。それは、回転できるほどゆるく、しかし、離れていってしまわない程度に強いはずである。界面活性剤は両者の分離をうながし、 a -サブユニットは失われる。二つ目の問題は、 F_0F_1 が回転モーターであること自体に存在する。回転子は少なくとも3箇所安定に止まるので3種の構造異性の F_0F_1 が存在する。三つ目の問題は、 ϵ -サブユニットは F_0F_1 の環境によって2つの大きく異なる構造をとることを私たちは見いだしており、これもまた、構造異性の原因となりうる。そこで、 F_0F_1 を変異安定な好熱菌 F_0F_1 を使って、界面活性剤の種類と条件を徹底的に検討してきた (リゾレシチンを使うと好熱菌 F_0F_1 は本来の構造を保ちながら単分散になる)。さらに、好熱菌 F_0F_1 の大腸菌発現系を利用して結晶化に有利なさまざまな工夫をした標品を調整する。例えば、(c_{10X} - a) F_0F_1 を作製した。 c -リングは10コピーの c -サブユニットからなるリングであ

るが、これを融合して1本のポリペプチド (c_{10X})とした $c_{10X}F_0F_1$ は、ATP 合成活性を持っていた (PNAS 2004)。次に c_{10X} の C 端に a -サブユニットの N 端を融合した (c_{10X} - a) F_0F_1 を作り出した。これは固定子と回転子が結合してしまったので活性はない。しかし、リンカーを切断すると活性がただちに回復するので、本来の構造を持っていると推定できる。この(c_{10X} - a) F_0F_1 では、 a -サブユニットと c -リングは共有結合で結ばれているので両者は解離することはない。さらに、 a -サブユニットと ϵ -サブユニットを融合した (a - ϵ) F_0F_1 も作成している。これも回転できないが、回転子が一つの決まった方向を向いた均一の構造をとることが予想できる。また、この(a - ϵ) F_0F_1 では ϵ -サブユニットの構造異性が抑えられる。

モーターの分子的理解では、 H^+ による回転の機構について、生化学的な研究と1分子観察による研究を行う。 H^+ による F_0F_1 あるいは F_0 の回転を、直視したものは誰もいない。膜の中の蛋白質を、イオンの勾配を与えながら、1分子で観察することは容易ではない。私たちは、巨大人工膜小胞に埋め込まれた好熱菌 F_0F_1 に H^+ ポテンシャルを与え、回転を検出しようとしている。 H^+ による F_0F_1 の回転とは、つまり、ATP 合成をもたらす回転である。また、 F_1 のモーター機構については、三つある触媒 β サブユニット (=モーターのドライブユニットにあたる) のうち、その一つが機能を失ったキメラ F_1 を作成してその回転を詳細に観察すれば、3つのドライブユニットがそのように協力してスムーズな回転を引き起こしているのか、わかるはずである。また、一つの β サブユニットの特定の箇所に蛍光の標識を入れて、回転とともにその偏光面の動きをみると、1分子の構造の変化がリアルタイムでわかることが期待できる。

細胞が飢えれば (呼吸基質が不足し) H^+ ポテンシャルは減少し、 F_0F_1 は逆反応、すなわち貴重な ATP の加水分解を始める。こんなことが起きないように、 F_0F_1 は制御されているはずである。私たちは、 ϵ -サブユニットは球状と棒状の2つの異なる構造をとることができて、それにしたがって F_0F_1 の性質が大きく変わることを発見した。 ϵ -サブユニットは、球状 ϵ - F_0F_1 においては $\alpha_3\beta_3$ に接触していないが、棒状 ϵ - F_0F_1 では C 端のヘリックスが γ -サブユニットによりそって $\alpha_3\beta_3$ の中心部まで挿入される。 $\gamma\epsilon$ は回転子であり、これによって当然、回転のようすは変わるだろう。 ϵ -サ

βサブユニットは、ADP や H⁺ポテンシャルが存在していると（すなわち ATP 合成に好適な条件）では棒状になり、ATP が存在していると球状になる。驚いたことに、棒状ε-F₀F₁は、ATP 合成活性はあるが、ATP 加水分解活性は抑制されている。このε-サブユニットによる制御の機構と生理的な意味を明らかにする。

4. 研究成果

ATP 合成酵素の ATP 合成/分解の触媒活性は、F₁-ATPase 部分にある。F₁-ATPase ではα₃β₃ がリング状に配置され、その内部に棒状のγサブユニットが存在する。3つのβサブユニットそれぞれに触媒部位が存在し、そこで ATP 加水分解が進行すると、γサブユニットが回転する。そこで、活性を 99%失う変異を持つβサブユニットを1つだけ導入したキメラ酵素を作成して、回転を観察した結果、以下のことが明らかになった。γサブユニットが0度の位置で1つのβサブユニットに結合した ATP は、それから 200 度回転した位置で加水分解され、320 度回転した位置で無機リン酸を放出する。3つのβサブユニットが、あたかも輪唱のようにこの過程を 120 度の位相差でおこなうことでγサブユニットがスムーズに回転することが分かった。

3つのβサブユニットが各々どんな構造の動きを見せるのか、それを調べるために、1つのβサブユニットのC末端側のドメインに蛍光色素を結合して、γサブユニットの 80 度と 40 度のサブステップ回転と同時にその蛍光の偏光面の動きを観察した。その結果、回転に伴って各々のβサブユニットは3つの構造を遷移することがわかった。まず、γサブユニットが 0 度から 80 度回転すると、βサブユニットのC末端側のドメインは 40 度向きを変える。次にγサブユニットの 200 度から 240 度の回転でこのドメインは 20 度もどる向きに動く。そして、γサブユニットの 240 度から 320 度の回転にもなると、βサブユニットのC末端側のドメインはさらに 20 度もどる向きに動き、もとの構造にもどる。また、今まで結晶解析から求められた構造は、80 度の位置、すなわち catalytic dwell の構造であることが分かった。

結晶構造解析のサンプルとしては、回転子の向きを完全にそろえた ATP 合成酵素を調製する必要があるため、回転子の c₁₀-リング、固定子の F₀a、回転子のεサブユニットとγサブユニットをすべて1本のポリペプチドとして融合した(c₁₀-α-ε-γ) F₀F₁を作製した。その他にもさまざまな融合 F₀F₁を作製した。また、膜外部分の特異抗体を作製した。結晶化に好適な界面活性剤の種類と条件を徹底的に検討した。このような準備が整い、結晶化条件

の探索にとりかかった。現在、F₀F₁および F₀の擬結晶を生じる条件が見つかった。F₁モーターのドライブユニットである3つのβサブユニットのうち一つを1%の活性のものに置き換えたキメラを作製し、その回転挙動から1つのβが360度のどこで回転に寄与するか、解明した。同様の方法で一つのβに蛍光色素を固定して回転に伴う偏光面の遷移を1分子で観察して、回転に伴うβの構造変化をリアルタイムで検出した。F₀F₁の制御サブユニットεにATPが結合した構造をNMRおよび結晶解析で決定した。

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 20 件)

- ① Masaike T, Koyama-Horibe F, Oiwa K, Yoshida M, Nishizaka T. Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F₁-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15: 1326-33.
- ② Ariga T, Muneyuki E, Yoshida M, F₁-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2007; 14: 841-846
- ③ Yagi H, Kajiwaru N, Tanaka, Tsukihara T, Kato-Yamada Y, Yoshida M, Akutsu H. Structures of the thermophilic F₁-ATPase ε subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁ *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 11233-11238

[学会発表] (計 23 件)

- ① M. Yoshida "Mechanism and regulation of F₀F₁- motor" Plenary lecture at 15th European Bioenergetics Conference 2008, July 20, Dublin (Ireland)
- ② T. Suzuki, C. Wakabayashi, B.A. Feniouk, N. Taniguchi, M. Yoshida "Function of epsilon subunit in Bacillus PS3 F₀F₁- ATP synthase" 15th European Bioenergetics Conference 2008, July 20, Dublin (Ireland)
- ③ B.A. Feniouk, T. Suzuki, M. Yoshida "Regulatory transition of subunit epsilon in ATP synthase from Bacillus PS3 " 15th European Bioenergetics Conference 2008, July 20, Dublin (Ireland)
- ④ 三留規誉, 大坂谷章子, 鈴木俊治, 吉田賢右 "ATP 合成酵素の精製における界面活性剤の検討と変異 ATP 合成酵素の安定性" 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008. 12

[その他]
ホームページ等
<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~fmotojim/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 賢右 (YOSHIDA MASASUKE)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90049073

(2) 研究分担者

久堀 徹 (HISABORI TORU)
東京工業大学・資源化学研究所・教授
研究者番号：40181094

(3) 連携研究者

村上 聡 (MURAKAMI SATOSHI)
東京工業大学・生命理工学部・教授
研究者番号：30300966