

平成22年 5月 31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19770027

研究課題名（和文） ϵ サブユニットによる葉緑体型 ATP 合成酵素の活性調節機構研究課題名（英文） Regulatory mechanism of the activity of chloroplast ATP synthase by the ϵ subunit

研究代表者

紺野 宏記 (KONNO HIROKI)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：80419267

研究成果の概要（和文）：

本研究では葉緑体型 ATP 合成酵素の活性制御に重要な ϵ サブユニットの C 末端側 α -ヘリックス部分および γ サブユニット上の調節領域部分に注目し、これらの重要性を生化学的、生理学的に調べた。その結果、これらの調節機構による ATP 合成酵素の ATP 加水分解活性の抑制が、ATP が合成されない暗所下での細胞内 ATP 量の維持に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Physiological effects of C-terminal α -helices of the ϵ subunit and regulatory region of the γ subunit of chloroplast-type ATP synthase were investigated. We found that those regulatory mechanisms were important for maintenance of intracellular ATP levels in dark.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：葉緑体、ATP 合成酵素、活性調節

1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素 (F_0F_1) は、ATP 合成およびその逆反応である ATP 加水分解に伴い構成サブユニットの一部が回転するモータータンパク質である。この回転は、様々な機構によって調節されおり、ATP の加水分解産物である ADP が酵素上から解離しないことによる不活性化 (ADP

阻害) や内在性の阻害サブユニットである ϵ による調節 (ϵ 阻害) などが知られている。これまで、この分子モーターの回転機構については、主として細菌の細胞膜由来の酵素を使用して研究が進められ、多くの重要な知見が明らかになっている。一方、光合成生物の葉緑体では、ATP 合成酵素が光条件下

でのみ働くため、細菌のそれとは全く異なる複雑な制御システムを備えている。葉緑体 ATP 合成酵素(F_0F_1)は、細菌の ATP 合成酵素で見られる上記の調節の他に、 γ サブユニット上に存在する2つのシステイン残基間のジスルフィド結合の形成・解離(酸化・還元調節)によってその活性が高度に調節されている(バクテリアおよびミトコンドリア由来の γ は2つのシステインを含む酸化還元調節領域をもたない)。さらに、葉緑体およびシアノバクテリア由来(葉緑体型)の酵素は、他の生物や器官由来の酵素と異なり、内在性の阻害サブユニットである ϵ サブユニットによって ATP 加水分解活性が強力に阻害される(ϵ 阻害)。この強い阻害は暗所下での F_0F_1 の ATP 加水分解活性による ATP の浪費を防ぐためと考えられている。細菌型 F_1 の ϵ サブユニットも F_1 および F_0F_1 の ATP 加水分解活性を阻害するが、その阻害は ATP 濃度に依存するなど葉緑体型 ϵ サブユニットとは明らかに異なる。バクテリアで見られる ϵ 阻害の ATP 濃度依存性は、 ϵ サブユニットに ATP が結合することにより ϵ サブユニットの C 末端側の α -ヘリックス部分の構造が変化し、その構造では ATP 加水分解活性を阻害しないことが知られている (Kato-Yamada et al.2000,*JBC*.275,35746-35750)。ところが葉緑体型の ϵ サブユニットは、その ATP 加水分解活性阻害に ATP 濃度依存性が見られない (Konno et al.2006,*EMBO J*.25,4596-4604)。この違いは、葉緑体 γ サブユニットに存在する酸化還元調節領域が影響していることも考えられるが (Hisabori et al.1998,*JBC*.273,15901-15905)、 ϵ サブユニット自体の構造の違いに由来する可能性もある。私は、葉緑体型 ATP 合成酵素の部分複合体である $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いて ϵ 阻害について以下の点を明らかにした。(1)阻害サブユニットである ϵ が ATP 合成酵素の γ サブユニットの回転を完全に阻害する。(2) ϵ サブユニットによって γ が停止する位置は、酵素が ADP 阻害(生成物阻害)に陥って停止する位置と同じである。(3)他種の ϵ には見られない ATP 加水分解活性の強い阻害は γ サブユニット上に存在するレドックス制御スイッチ領域が重要である(シアノバクテリア由来の酵素はレドックス制御スイッチの一部を保持している)(Konno et al.2006,*EMBO J*.25,4596-4604)。しかし

ながら、ATP 合成酵素の部分複合体である $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いた 1 分子観察で明らかになった ϵ 阻害と ADP 阻害が ATP 合成酵素複合体(F_0F_1)において果たしている役割は詳細に検証されていない状況である。

2. 研究の目的

本若手研究(B)では、上述した 1 分子観察で明らかになった ϵ 阻害と ADP 阻害が ATP 合成酵素複合体(F_0F_1)において果たしている役割を生化学的、生理学的に検証することを目指す。また ϵ 阻害に重要とされている C 末端側の α -ヘリックス部分に注目し、この部分を ATP 結合が確認されている好熱性細菌由来に改変したキメラ ϵ およびこの α -ヘリックス部分を欠失した ϵ を作成する。この変異 ϵ サブユニットの ATP 結合能および ATP 加水分解活性に対する阻害能を検証し、葉緑体型 ϵ サブユニットの C 末端部分が、 F_1 および F_0F_1 の活性制御にどのような役割を果たしているかを生化学的に詳細に調べる。さらに、本研究では、上記の研究に加えて、これらの変異 ϵ および ϵ 阻害に重要な調節領域を削除した γ を含むシアノバクテリア F_0F_1 の形質転換体を作成し、その増殖能などを様々な条件下で比較検証する。またシアノバクテリアで実験系が確立している DNA マイクロアレイを用い、ATP 合成酵素の活性調節の欠損が他の遺伝子に及ぼす影響を調べる。これらの実験により ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節機構が光合成機能調節全体に果たしている役割を生理学的に検証する。この ϵ サブユニットによる制御が、ADP 阻害と本質的に同じであるのか否かを明らかにすれば、この分子モーターがどのようにして生体内で調節されているのかを知る重要な手がかりを得ることができる。そして、ATP 合成酵素の活性調節の重要性を生理レベルまで拡張して調べることによって、生命に必須の ATP 合成をより効率的に行うために生物がとっている戦略を知ることが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 変異 ϵ サブユニットを含む ATP 合成酵素の形質転換株の作出および生理学的検証
グルコース栄養培地で生育でき、光合成遺伝子の破壊が可能な *Synechocystis* SP. PCC 6803 を用い、まず ATP 合成酵素の γ あるいは ϵ サブユニットの遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、相同組換え

によって ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの破壊株を作成する。 ϵ 破壊株には制御に重要であると考えられるC末端側ヘリックス部分を欠いた変異 ϵ サブユニットの遺伝子を導入する。このようにして作成した形質転換株の増殖能を様々な光条件下で野生株と比較する。また、シアノバクテリアで実験系が確立している DNA マイクロアレイを用い、ATP 合成酵素の活性調節の欠損が他の遺伝子に及ぼす影響を調べる。

(2) キメラ ϵ によるATP合成酵素の活性制御
好熱菌 F_1 の ϵ サブユニットはATPが結合するとC末端側の α -ヘリックス部分の構造が大きく変化することが知られている。そこで、シアノバクテリア F_1 の ϵ の C 末部分を好熱性細菌 PS3 由来に改変したキメラ ϵ サブユニットを作成し、そのATP結合能を平衡透析法により評価する。ATPが結合するキメラ ϵ サブユニットが得られたらこれを複合体に導入し、シアノバクテリア F_0F_1 のATP加水分解活性に対する阻害能を検証する。上記の実験より葉緑体型 ϵ サブユニットが本来の活性制御を失った場合、 F_1 および F_0F_1 の活性がどのように変わるかを調べることで、葉緑体型 ϵ サブユニットの活性調節の理解につなげる。

(3) 活性調節領域を欠失した変異 γ サブユニットを導入したATP合成酵素を含む形質転換株の作出および生理学的検証 グルコース耐性の *Synechocystis* SP. PCC 6803株を用い、ATP合成酵素の γ サブユニットの遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、相同組換えによってATP合成酵素の γ サブユニットの破壊株を作成する。次に、破壊株にATP加水分解活性の制御に重要な調節領域を欠失した γ サブユニットの遺伝子を導入する。次に、作成した形質転換株の増殖能を様々な光条件下で野生株と比較する。また、シアノバクテリアで実験系が確立しているDNAマイクロアレイを用い、 γ サブユニット上の調節領域によるATP合成酵素の活性調節の欠損が他の遺伝子に及ぼす影響を調べる。

4. 研究成果

(1) ϵ の C 末端側 α -ヘリックスの重要性の生理学的検証 ϵ サブユニットの C 末端ヘリックスを削除した ATP 合成酵素を含む形質転換株からチラコイド膜を調製し、そのATP加水分解活性を野生株と比較した。その結果、 ϵ の C 末端ヘリックスが欠失したATP合成酵素は野生型よりも高いATP加水分解活性を示すことがわかった。現在、形質転換株の増

殖能や暗所下における細胞内ATP量を野生株と比較している。植物やシアノバクテリアは光の当たらない夜間にATP合成の逆反応であるATP加水分解を効率よく阻害しなければならない。本結果は、その阻害機構の解明に重要な知見を与えた。またシアノバクテリア形質転換体を用い F_0F_1 における ϵ の C 末端部分の生理学的重要性も明らかにしつつある。

(2) キメラ ϵ によるATP合成酵素の活性制御
シアノバクテリア F_1 の ϵ の C 末端側の α -ヘリックス部分を好熱性細菌 PS3、大腸菌、葉緑体由来に改変したキメラ ϵ を作成し、本来の活性制御を失った場合、 F_1 および F_0F_1 の活性がどのように変わるか調べた。その結果、キメラ ϵ は F_1 に結合しにくい、いったん結合すると阻害の程度はシアノバクテリア ϵ と変わらないことがわかった(図1)。好熱性細菌 PS3 の ϵ にATPが結合すると非阻害型の構造をとるにもかかわらず、キメラ ϵ はシアノバクテリア F_1 のATP加水分解活性を阻害したことから、シアノバクテリア F_1 にみられる強い ϵ 阻害には ϵ 以外の要因も重要であることがわかった。シアノバクテリアおよび葉緑体(chloroplast-type)の γ サブユニットには他種の γ が持っていない数十アミノ酸長からなる挿入配列が存在し、この挿入配列を削除すると ϵ 阻害が低下する。すなわち、chloroplast-type F_1 にみられる強い ϵ 阻害は ϵ へのATP結合とは関係なしに γ 上の挿入配列によって ϵ が非阻害型の構造をとりにくいことによると示唆できる。

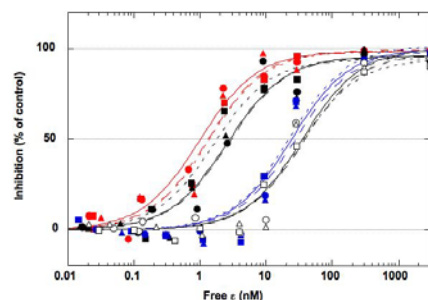


図1. キメラ ϵ のシアノバクテリア $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体に対する結合親和性

C末端側 α -ヘリックス部分が葉緑体(黒)、大腸菌(青)、好熱菌(白)由来のキメラ ϵ サブユニットのシアノバクテリア $\alpha_3\beta_3\gamma$ に対する結合親和性は、 ϵ による $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体のATP加水分解活性阻害の程度より見積もった。赤印はシアノバクテリア ϵ 。

(3) 活性調節領域を欠失した変異 γ サブユニットを導入したATP合成酵素を含む形質転換株の作出および生理学的検証 ATP合成酵素の活性調節に重要な γ サブユニット上の調節領域を削除したシアノバクテリア F_0F_1 をもつ形質転換株を作成し、その増殖能、ATP合成活性およびATP加水分解活性などを様々な条件下で調べ、この酵素の活性調節が光合成機能調節全体に果たしている役割を

生理学的に検証した。はじめに、*Synechocystis* sp. PCC6803株のATP合成酵素 γ サブユニットの調節領域配列を欠失した変異株の細胞内のATP量の変動を調べた。その結果、光照射下でも変異株の細胞内ATP量は野生株の8割ほどであったが、暗所に移したときの減少量ははるかに大きく、ほぼ20%のレベルまで低下した(図2)。調節領域を欠失したATP合成酵素の性質から予想すると、この大幅な減少の原因は、暗所下でATP加水分解活性が阻害されないためと考えられる。この研究によって、ATP合成酵素の加水分解活性の抑制が、細胞の生理においても重要であることを明らかにした。

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)

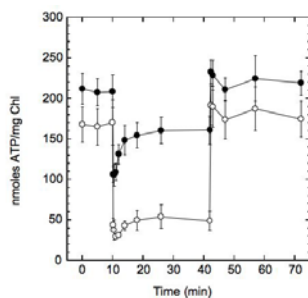


図2. 光環境の変化に伴うATP量変化

(●) *Synechocystis* sp. PCC 6803の野生株
(○) 調節領域を欠失した変異 γ を導入したATP合成酵素を含む形質転換株

は下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Sunamura, E-I., Konno, H., Imashimizu-kobayashi, M., Sugano, Y., Hisabori, T. Physiological impact of intrinsic ADP-Inhibition of Cyanobacterial F_0F_1 conferred by the inherent inserted sequence into the γ subunit. *Plant Cell Physiol.* 2010, Vo51, No6 in press 査読有り

② Yagi, H., Konno, H., Murakami-fuse, T., Isu, A., Oroguchi, T., Akutsu, H., Ikeguchi, M., Hisabori, T. Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit epsilon of F_1 -ATPase from photosynthetic organisms. *Biochem. J.* 2009, Dec 14;425(1):85-94 査読有り

③ Meiss, E., Konno, H., Groth, G., Hisabori, T. Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by phytotoxin tentoxin. *J. Biol. Chem.* 2008, Sep 5;283(36):24594-9. 査読有り

[学会発表] (計8件)

① Hiroki Konno, Atsuko Isu, Tomoe Murakami-Fuse, Toru Hisabori, Inhibition of rotation of the cyanobacterial F_1 -ATPase by the ϵ subunit, International Symposium of Joint Research Net-work on Advanced Materials and Devices, 2010年3月25~26日, 北海道ホテルニドム

② 紺野宏記、井須敦子、村上-布施朋重、久堀徹、葉緑体型 F_1 -ATPase の回転におけるADP阻害と ϵ 阻害、日本生体エネルギー研究会 第35回討論会、2009年12月18~20日、旭川医科大学

③ Hiroki Konno, Atsuko Isu, Tomoe Murakami-Fuse, Inhibition of rotation of the cyanobacterial F_1 -ATPase by the ϵ subunit, International Symposium Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomenbranes, 2009年9月8~10日, 京都大学

④ Hiromasa Yagi, Hiroki Konno, Tomoe Murakami-Fuse, Hideo Akutu, Toru Hisabori, Structure of the C-terminal domain of the epsilon subunit of chloroplast-type F_1 , BMB 2008, 2008年12月9~12日, 神戸ポートアイランド

⑤ 紺野宏記、村上-布施朋重、久堀徹, ADP阻害と ϵ 阻害の関連性: 一分子観察による検証, 日本生体エネルギー研究会 第34回討論会, 2008年11月6~8日, 東京医科歯科大学

⑥ Hiromasa Yagi, Hiroki Konno, Tomoe Murakami-Fuse, Hideo Akutu, Toru Hisabori, Structure of the C-terminal domain of the ϵ subunit of chloroplast-type F_1 , 15th European Bioenergetics Conference, 2008年7月19~24日, Trinity College Dublin.

⑦ 紺野宏記、村上-布施朋重、久堀徹, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の F_1 -ATPase における γ - ϵ サブユニット間の相互作用, 日本生体エネルギー研究会 第33回討論会, 2007年11月15~17日, 山口大学

⑧ Hiroki Konno, Tomoe Murakami-Fuse, Fumihiko Fujii, Fumie Koyama, Hanayo Ueoka-Nakanishi, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, Toru Hisabori, Regulation of Cyanobacterial F_1 -ATPase rotation, Gordon Research Conference (Molecular & Cellular Bioenergetics), 2007年6月16~25日, Proctor Academy

〔図書〕（計1件）

①紺野宏記、久堀徹，北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会共編，光合成研究法，2009, 249-258

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺野 宏記 (KONNO HIROKI)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：80419267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし