

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651048

研究課題名（和文） 生物分子モーターの回転を自在に操る新しい実験システムの開発

研究課題名（英文） Development of the new method to control the molecular motor enzyme

研究代表者

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

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がサブユニットの2本のヘリックスの相対的な位置のズレに起因すると予想し、サブユニットの中心軸を構成するヘリックスの相対位置を任意に動かすことで活性がどのように変化するかを評価すること、サブユニット下部のチオールスイッチ部分の配列を光駆動スイッチタンパク質に置き換え、光のオンオフあるいは波長の切り替えによって酵素活性および回転の調節を行うことを目指して研究を行った。さらに、ATP合成酵素の加水分解活性の測定に一般に用いられるカップリングアッセイ法の感度を大幅に向上し、1分子レベルで溶液状態の酵素の活性を測定することを目標として、極微量の溶液小胞中に封じ込めた酵素の動態を蛍光を用いて簡便にモニターできる実験系の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

Based on our hypothesis that the activity of ATP synthase can be regulated by the relative slippage of two alpha-helices of the gamma subunit, we intended to restrict the movement of two alpha-helices and studied the change in the enzyme activity. Then we tried to introduce a novel artificial switch into the gamma subunit to control the enzyme activity using a certain domain of light-responsible protein. In addition, the highly sensitive monitoring system to measure the enzyme activity at single molecule level at the aqueous phase was developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子マニピュレーション、光スイッチ

1. 研究開始当初の背景

ATP合成酵素は、生体エネルギー変換の鍵酵素であり、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の細胞質膜でATP合成を担っている。この酵素は、触媒反応中に酵素分子の軸部分のサ

ブユニットを高速回転させる分子モーターで、1997年に光学顕微鏡による1分子観察の手法により、実際にATP加水分解時に連続的に一方向に回転することが確認された (Noji, H. et al. Nature (1997) 386:299)。

葉緑体の ATP 合成酵素は、光合成の電子伝達系と共役し、光合成環境下で効率的に ATP 合成を行っている。しかし、暗所では、無駄な逆反応を抑制するために、光合成電子伝達反応で生じる還元力を用いて直接その活性が厳密に制御されている。この制御は、回転軸のサブユニットにある二つのシステインの酸化還元によって行われている。高等植物の ATP 合成酵素では、ミトコンドリア内膜や細菌の ATP 合成酵素には存在しない二つのシステインを含む約 40 アミノ酸の配列がチオールスイッチ部分を形成している。この配列は非光合成生物・器官由来の ATP 合成酵素には全く見られない特殊な配列で、光合成生物の ATP 合成酵素の制御のために進化の過程で生じたものと言える。

これまでバクテリアやミトコンドリアを材料として ATP 合成酵素の結晶構造解析が進められ、すでに分子の全体構造も明らかにされているが、葉緑体型 ATP 合成酵素では触媒部位が存在する。複合体の構造が部分的に報告されているのみで、回転軸についての情報がない。このため、チオールスイッチ部分の酸化還元によってどのような構造変化が誘導され、回転が調節されるのかはいまだに不明である。一方で、生化学および 1 分子レベルの研究から、システインの酸化に伴う酵素活性の変化や、スイッチの酸化がどのような機構で触媒部位における活性抑制を引き起こすのかについては、徐々に明らかになりつつある。これまでの研究によれば、酸化還元調節の基本は、複合体を貫く二本のヘリックス構造の相対的な配置のズレによるものであろうと推測される。そこで、ズレを他のタンパク質によって誘導すれば分子モーターの回転制御が可能になるのではないか、という発想が本提案の基盤であった。

2. 研究の目的

本研究では、分子モーターの回転制御を人為的かつ可逆的に可能にする新しい実験システムの開発を目指した。タンパク質分子モーターは、駆動システムとしてはまだ応用にはほど遠いが、光や他の化合物による回転制御が可能になれば、応用の可能性が大きく広がる事が期待できる。逆に、化合物の存在を回転という物理現象で可視化できる新しいセンサーシステムとしての応用も可能であろう。さらに、基礎研究として、回転制御の分子機構の解明に役立つ実験系となる。併せて、酵素分子を液量の限られた小空間に閉じこめることで、蛍光を利用して高感度に酵素活性を測定できる新たな実験系の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) サブユニットの中心軸を構成する 2 本のヘリックス構造の相対的なズレの人為的な誘導と活性変化

ATP 合成酵素の制御機構としてこれまで知られている葉緑体型 ATP 合成酵素のサブユニットのジスルフィド結合による酸化還元制御、内在性阻害サブユニットであるサブユニットによる阻害は、いずれも制御の作用点がサブユニットの下部にあり、3/3 部分にある触媒部位とは遠く離れている。これらの制御機構が触媒部位での ADP 阻害に影響して制御を行っているとすれば、両者を物理的につなぐ分子機構が存在するはずである。その候補として、2 本のヘリックス構造がまず考えられる。そこで、この 2 本のヘリックスの相対する位置にシステインを導入し、この酸化によるジスルフィドの形成によって、ヘリックス同士の相対的な位置を任意の方向に動かし、酵素活性がどのように変化するかを調べた。これによって、どのような構造変化が酵素活性に影響するかを明らかにできるもの予測した。

(2) 分子モーター制御領域への光応答タンパク質の導入

光合成生物の光受容タンパク質であるフォトロボリンの LOV ドメイン、光合成細菌の BLUF ドメイン、シアノバクテリアの GAF ドメインなど、光に応答して構造変化するタンパク質の光応答ドメイン部分を分子モーターの軸サブユニットであるシステイン配列の中間の調節領域に導入する。分子モデルの研究により、このドメインはサブユニット本体から突出した独立した構造と予想されており、酵素複合体中では他のサブユニットとの相互作用も一切起こらないと考えられる。実際、この調節領域ドメインだけをバクテリアの酵素の相当部分に挿入すると、酵素の制御が可能になった(Bald, D. et al. J. Biol. Chem. (2000) 275:12757)。従って、この部分に外来タンパク質ドメインを導入しても、酵素本体は影響を受けずに複合体形成が出来る可能性は高いと予想した。そこで、外来スイッチ蛋白質をサブユニットの相当部分に導入する方法について、研究を行った。

(3) 新たな高感度活性測定系の開発

さらに、ATP 合成酵素の活性制御を 1 分子レベルで研究するために、酵素活性の高感度分析を可能にする方法の開発を行った。この目的を達成するために、酵素分子を小胞に閉じこめて反応生成物を簡便に高感度・定量的に測定する新技術を開発することを目指した。

4. 研究成果

(1) サブユニットの中心軸を構成する2本のヘリックス構造の相対的なズレの人為的な誘導と活性変化

一連の研究には、当研究室で発現系を構築した好熱性シアノバクテリアのATP合成酵素のコアコンプレックス^{3, 3}複合体を用いた。この複合体のサブユニットは、高等植物が持っている40残基のレドックス制御領域のうち、ふたつのシステインを含む9残基を欠いているが、ここにホウレンソウ由来の制御スイッチを導入することで、酸化還元による活性制御が出来ることは確認済みである。しかし、制御スイッチで起こる酸化還元によるジスルフィド結合の形成・解離が、酵素活性をどのように制御するのかが、これまで全く明らかになっていなかった。

そこで、既に報告されているミトコンドリアF₁の結晶構造を参考に、この2本のヘリックスの相対する位置に複数個の組み合わせでCysを導入した。導入したCysは、ヘリックス一巻き分は上下に移動しても、互いにジスルフィド結合を形成可能であることを、電気泳動によって確認した。ジスルフィド結合の形成によって、N末側ヘリックスをC末側に対して動かない、あるいは、N末側ヘリックスが上に上がるようにした場合には、このようなヘリックスの動きの制限によって著しい活性の上昇が見られた。一方、逆にN末側を下に下げようとしてジスルフィド結合を形成させた場合には、活性の変化が見られないか、低下することがわかった。さらに、上記の活性上昇の原因を明らかにするために、酵素の特異的な阻害様式であるADP阻害からの解除に有効な界面活性剤LDAOの効果調べたところ、ジスルフィド結合の形成によって活性が上昇している複合体では、それ以上の活性化が見られなかった。このように、ヘリックス構造を任意に動かすことで酵素活性を調節できること、酵素活性の調節がADP阻害の程度を変化させることによって起こることを明らかにした(論文投稿中)。

(2) 分子モーター制御領域への光応答タンパク質の導入

光合成細菌のBLUFドメインを導入した場合には、³の発現が見られず、複合体形成もできなかった。そこで、シアノバクテリアのGAFドメインを用いてサブユニットとの融合タンパク質の作成条件を検討した。色素団を保持したGAFの発現はATP合成酵素発現系に用いる大腸菌で可能となったため、³の制御スイッチ領域に導入する系の確立を進めたが、研究期間中に複合体を形成し活性を調節するには至らなかった。

これらの問題を解決するために、新たな遺伝子改変を行った。これまでの研究で

BLUFドメインやGAFドメイン等、構造を持った蛋白質をアミノ酸配列の中に入れて発現することが難しいことがわかったが、一方でこれらのドメインを別の蛋白質のN末端あるいはC末端に適当なリンカーを介して融合した蛋白質の発現については、これまでも報告がある。そこで、サブユニットの制御領域の前後でサブユニットの配列を切断し、この状態で複合体を形成することが可能かどうかを調べた。その結果、葉緑体型ATP合成酵素に特徴的な30アミノ酸の配列の前側、後ろ側のいずれに切れ目を入れても、ふたつのサブユニットの断片は発現し、3×3リングと複合体を形成すること、および、形成した複合体が切れ目を持たない複合体とほぼ同等の活性を有することがわかった。今後は、この切れ目の前後にBLUFドメインやGAFドメインを接続し、これらの光応答性蛋白質ドメインを保持したATP合成酵素複合体を作成することが可能かどうかを明らかにする。また、³に切れ目を導入することが出来たので、切れ目部分の末端のアミノ酸をCysに置換し、新たにマレイミド修飾を用いて光応答性の機能性の分子を導入することを計画している。

(3) 新たな高感度活性測定系の開発

ATP合成酵素は酵素反応中に回転する極めてユニークな性質を持っており、このために回転観察という方法で酵素の制御を評価することが可能である。一方で、この方法では、酵素分子をガラス基盤に固定する必要があることや、回転を観察するための巨大な標識を接続する必要があることなど、酵素の制御を分子レベルで研究する上では障害も多い。

そこで、酵素活性そのものを1分子レベルで観察可能な高感度分析を可能にすることを目指して、酵素分子を小胞に閉じこめて反応生成物を簡便に高感度・定量的に測定する新技術の開発をおこなった。実験では、まず、少量の溶液小胞中(オイル中の水玉)に封じ込めた酵素の動態を簡便にモニターできる実験系の開発を行った。これをカップリングアッセイにシステムを応用する試みとして、モデル酵素にグルコース6リン酸脱水素酵素を用いた。この酵素の反応生成物であるNADPHは340nm付近に吸収を有するが、その分子吸光係数は、6600程度であり、また、蛍光もそれほど強くない。そこで、NADPHの高感度検出を行うために、酵素反応の生成物であるNADPHをさらに別の蛍光物質に変換するジアホラーゼを用いたカップリングアッセイ系を導入した。その結果、系全体の感度を1000倍以上向上させることに成功した。この共役系とグルコース6リン酸脱水素酵素を油中の小胞に封じ込め、個々の小胞の蛍光の増大を定量的に観察した結果、小胞あたり数十

個の酵素分子による反応を観察できるレベルまで、実験系を高感度化させることに成功した。

今後、小胞作成技術を向上し、定量的な解析の精度を上げること、および、蛍光の退色を抑制する技術の開発や高感度カメラの導入によって、小胞に封じ込めた1分子酵素の振る舞いを蛍光測定できる技術を確立したい。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

葉緑体 ATP 合成酵素の活性制御には、サブユニットの α -ヘリックスのズレが関与する
砂村栄一郎、紺野宏記、久堀徹
第53回日本植物生理学会年会 2012年3月
18日 京都産業大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

増田真二 (MASUDA SHINJI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号：30373369

池内昌彦 (IKEUCHI MASAHIKO)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：20159601

竹内昌治 (TAKEUCHI SHOJI)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号：90343110