

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2014

課題番号：23227006

研究課題名(和文) ATP合成酵素の構造と制御と生理

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

研究代表者

吉田 賢右 (Yoshida, Masasuke)

早稲田大学・理工学術院・名誉教授

研究者番号：90049073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 81,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のF1は0度、40度、80度でトルクを発生することがわかった。40度のトルクは新発見である。植物葉緑体のATP合成酵素のガンマサブユニットは、日の出とともに還元されて酵素は活性化、日暮れになると酸化されて不活性化することを野外のホウレン草で見出した。ヒトF1は、0～65度(ATPの結合)、65～90度(リン酸の解離)、90度でATP加水分解が起きることを発見した。ミトコンドリアATP合成酵素の量を制御する因子(Orf47)を発見した。ミトコンドリアATP合成酵素の阻害因子IF1を完全に失ったノックアウトマウスを作成した。驚いたことに、健康であった。

研究成果の概要(英文)：We found the followings. Bacterial F1 generates at rotation angle 0, 40, 80° in one 120 cycle. Torque at 40° has been unnoticed before. Chloroplast ATP synthase of field spinach is activated at morning by reducing S-S bond of its gamma subunit and inactivated at night by oxidation. Human F1 rotates with three steps in a 120 cycle; 0～65° by ATP binding, 65～90° by Pi release, and 90～120° by ATP hydrolysis. A new factor Orf47 is required for assembly of human mitochondrial ATP synthase. Knockout mice that lack mitochondrial IF1, an inhibitor protein for ATP synthase, was produced. Surprisingly, they are healthy.

研究分野：生化学

キーワード：ATP ATPsynthase FoF1 F1 IF1 ATP synthesis Orf47

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生き物のすべての細胞の中において、ATP はエネルギー通貨として使われている。ADP とリン酸から ATP を再び合成するのは ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ ) で、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の膜に存在している。この酵素は、 $H^+$ の流れで回転する  $F_0$  モーターと、ATP 加水分解で回転する  $F_1$  モーターが、共通の回転シャフトで連結し、 $H^+$ の流れと ATP  $\rightarrow$  ADP+リン酸 のエネルギーを交換する。細胞の ATP の消費需要と合成能力とは刻一刻変化している。では、それに応じて ATP 合成酵素はどのように制御されているか。細菌における  $\epsilon$  サブユニットの構造変化による阻害、植物における  $\gamma$  サブユニットの酸化による阻害、動物における因子 IF1 による阻害、など *in vitro* の知見があったが、実際の生理にどう関わるのか、よくわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

ヒトを含む動物ミトコンドリアの ATP 合成酵素を中心に、その制御の分子機構、細胞生理、欠陥個体の病態、を解明する。また、ATP 合成酵素の全体構造の結晶解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ATP 合成酵素の制御の分子機構

ヒト  $F_1$  の大腸菌発現の成功とその回転の 1 分子観察系を開発する。また、回転を外部磁場で制御ないし強制する実験系で、回転トルクの制御を観察する。

### (2) 制御欠陥のある細胞と個体の生理

私たちの開発したハイスループットの培養細胞ミトコンドリア ATP 合成活性測定法を駆使する。これで網羅的なノックダウンをおこない未知の制御因子の探索をおこなう。また、IF1 のノックアウトマウスを作製し、その病態を解明する。

### (3) ATP 合成酵素の原子構造の解明

ATP 合成酵素は、世界の多数のグループの構造解明の挑戦を、この 20 年間ことごとくしりぞけてきた。回転する「すべる」結合、停止位置の違いによる回転異性の存在、などが問題である。サブユニット融合 ATP 合成酵素、またモノクローン抗体を結合した酵素の結晶化を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ATP 合成酵素の制御の分子機構

ヒト  $F_1$  の分子機構を主として 1 分子観察で解明した。回転子である サブユニットは、ATP の結合で 0 度から 65 度回転し、リン酸の解離で 90 度の位置まで 25 度回転し、次に ATP の加水分解が起きて 120 度の位置まで 30 度回転する。 $F_1$  は、ATP 3 分子の加水分解で 1 回転 (360 度) するので、上記の 120 度回転が反応の 1 サイクルとなる。好熱菌  $F_1$  は、ATP の結合で 80 度回転し、ATP の加水分解が起きて次にリン酸の解離で 30 度回転する。この

ようにヒト  $F_1$  の回転触媒のようすは好熱菌  $F_1$  とはだいぶ違うことがわかった。ヒト  $F_0F_1$  を阻害するタンパク質である IF1 は、90 度の位置で回転を止めた。これを強引に外力で時計回り方向 (ATP 合成方向) に回すと、阻害が解除されて サブユニットは再び回転を開始した。この結果は、細胞内で水素イオンの流れによって サブユニットに時計回りの回転トルクがかかると、IF1 が解離して  $F_0F_1$  の阻害が解除され ATP 合成が開始されることを示唆する。IF1 は、ATP 加水分解は阻害するが、ATP 合成は阻害しない、と考えられる。しかし、これは触媒反応として考えればありえないことであり、謎とされてきたが、上記の実験でこれが解決された。

ウシ  $F_1$  の大腸菌発現にも成功した。ウシ  $F_1$  の回転の性質はヒト  $F_1$  と良く似ている。ウシ  $F_1$  の結晶解析に成功した。ウシ  $F_1$  の結晶解析はこの 20 年間、J. Walker たちの独占状態であったが、これによって、1. 変異を導入して結晶解析できる、2. 野生型あるいは変異導入した  $F_1$  の 1 分子観察による回転特性を解析できる、道が開けた。

細菌の  $F_1$  の回転子 サブユニットに磁気ビーズを付着して外部磁場の方向と実際の磁気ビーズの方向の角度のずれの精密な測定から、 $F_1$  は ATP 加水分解によって、0 度、40 度、80 度で反時計回り方向のトルクがジャンプしていることがわかった。40 度の反時計回り方向トルクジャンプは ATP が無いときにも観察された (このとき、時計回り方向のトルクが 0 度 40 度で働くので、外から力を加えない限り サブユニットは 40 度の位置に到達できない)。サブユニットは 40 度の位置に置かれると、そこに安定にとどまることはできず、どうしても反時計回り方向に回ろうとするのである。今までは、ATP の結合でトルクが生じて サブユニットは 0 度から 80 度まで回転する、と考えられた。しかし、ATP の結合によって生じた自由エネルギーは 0 度から 40 度の回転に使われて、40 度から 80 度の回転は自動的に生じると考えたほうが良い。言い換えれば、40 度までの回転によって  $F_1$  分子内部に構造のひずみが生じて、その解消のために サブユニットは 80 度まで回転する。また、 $F_1$  の 40 度ごとのトルクジャンプは、 $F_0$  の 36 度ごとのトルクジャンプとずれが少なく、両モーターのスムーズな接続を可能にしていると考えられる。

### (2) 制御欠陥のある細胞と個体の生理

細菌の ATP 合成酵素は  $\epsilon$  サブユニットによって阻害されるが、その阻害が無効となる変異を導入した枯草菌は孢子の産生に障害がおこることがわかった。一方、同様の変異を導入した大腸菌は塩水の中の生育が低下した。このように  $\epsilon$  サブユニットの生理的な作用は細菌ごとにいるいるであることがわかってきた。

植物葉緑体の ATP 合成酵素の  $\gamma$  サブユニッ

トには2つのシステインを含む余分な挿入配列があり、酸化されてS-S結合ができると活性(回転)が停止することがわかっていました。今回、実際の野外の植物でも、この酸化還元による制御が起きていることを証明した。すなわち、野外のホウレン草で、日の出とともに $\gamma$ サブユニットのシステインは還元されて酵素は活性化する、日暮れになると酸化されて不活性化することを見出した。生きた生物でATP合成酵素の制御を直接観察されたのは初めてだろう。

ヒトATP合成酵素に弱く結合しているMLQという機能未知の小さなタンパク質を欠損させたところ、ATP合成酵素の量が顕著に減少した。MLQは、アッセンブリーに必須の因子であることがわかった。また、ATP合成酵素のマイナーなサブユニットであるdのノックダウン細胞はミトコンドリア内に2種のアッセンブリー中間体を蓄積することがわかった。一つは分子中央の回転シャフトと $F_1$ の結合した $F_1$ -c-ringであり、もう一つは $F_1$ の固定子 $F_0$ の固定子をつなぐ分子の外側のstalkの構成サブユニットを含む(b-e-g)複合体である。ヒトATP合成酵素は、回転子シャフトと固定子stalkが別々に構成されて、それが後に合体してできることが示唆された。

ヒト細胞(HeLa細胞)で、300あまりのミトコンドリア局在機能未知タンパク質のノックダウン株を作製し、そのATP合成活性をスクリーニングしたところ、遺伝子C2Orf47によってコードされるタンパク質が減少するとミトコンドリアのATP合成酵素の量が顕著に減少することを発見した。C2Orf47は、ATP合成酵素の量を制御する新しい因子であり、グルコース飢餓によって発現が亢進する。

ミトコンドリアATP合成酵素の阻害因子IF1を完全に失ったノックアウトマウスを作成した。驚いたことに、運動能力、絶食適応、生殖、など何の障害も見られなかった。IF1の阻害作用は今までin vitroの実験で多くの報告があるが、実は個体ではessentialではなかった。これに代替する因子を探索したが見つかっていない。最近、IF1ノックアウトマウスは、ガンになりにくいことを見出した(正確には、持続増殖生を獲得したMEFを移植したヌードマウスのガンの発達がみられない)。ガン細胞は、血流の不足(酸素供給不足)によって、ATP生産をミトコンドリア依存から解糖系にきりかえる、傾向がある。IF1は、その有効な切り替えに必要とするのだろう。IF1がなくても、日常的な健康には無害で、しかもガンを防ぐ、となれば、IF1を阻害する低分子はガンを抑制するか農政がある。スクリーニングを開始している。

### (3) ATP合成酵素の原子構造の解明

ATP合成酵素の結晶解析は、いろいろ試みているがまだ成功のめどがたっていない。回転異性体が生じるのを防ぐために、好熱菌の

ATP合成酵素の回転子と固定子のサブユニットを遺伝子的に融合したものをいろいろ作製した。しかし、多大な努力にかかわらず良好な結晶は得られなかった。すでにJ. Walkerが長年挑んでいるのであるが、私たちもウシのATP合成酵素の結晶化を試みた。ウシ心臓から精製法を確立し、結晶化条件をさがしたが、よい結晶は取れていない。結局、構造解析については、好熱菌の $F_0$ のc-ringの構造を固体NMRで、好熱菌の $F_1$ の構造を結晶解析で、成功したにとどまった。

## 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22件)

1. Hara, K. Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Yoshida M., and Kino, K. (2011) "ATP photosynthetic vesicles for light-driven bioprocesses", *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1133-1138. 査読有り
2. Taniguchi N, Suzuki T, Berney M, Yoshida M., Cook GM. (2011) The regulatory C-terminal domain of subunit  $\epsilon$  of  $F_0F_1$  ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 193: 2046-52. 査読有り
3. Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. (2011) Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP Synthase by epsilon-subunit. *J Biol Chem.* 286: 16807-16813. 査読有り
4. Ohsakaya S, Fujikawa M, Hisabori T, Yoshida M. (2011) Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem.* 286: 20292-6. 査読有り
5. Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M., Suzuki T. (2011) Efficient ATP synthesis by thermophilic *Bacillus* FoF1-ATP synthase. *FEBS J.* 278: 2647-54. 査読有り
6. Kohori A, Chiwata R, Hossain MD, Furuike S, Shiroguchi K, Adachi K, Yoshida M., Kinoshita K Jr. (2011) Torque generation in F1-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophys J.* 101: 188-95. 査読有り
7. Rak M, McStay GP, Fujikawa M, Yoshida M., Manfredi G, Tzagoloff A. (2011) Turnover of ATP synthase subunits in F1-depleted HeLa and yeast cells. *FEBS Lett.* 585: 2582-6. 査読有り
8. Watanabe R, Okuno D, Sakakihara S, Shimabukuro K, Iino R, Yoshida M., Noji H. (2011) Mechanical modulation of catalytic power on F(1)-ATPase. *Nat Chem Biol.* 8(1): 86-92. 査読有り
9. Usukura E, Suzuki T, Furuike S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. (2011) 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 F0F1. J Biol Chem. 287: 1884-91. 査読有り
10. Kuruma Y, Suzuki T, Ono S, Yoshida M, Ueda T. (2012) Functional analysis of membraneous Fo-a subunit of F1Fo-ATP synthase by in vitro protein synthesis. Biochem J. 442, 631-638. 査読有り
  11. Konno H, Nakane T, Yoshida M, Ueoka-Nakanishi H, Hara S, Hisabori T. (2012) Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. Plant Cell Physiol, 53: 626-34. 査読有り
  12. 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 F(o)F(1)-ATP synthase expressed in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 82: 396-401. 査読有り
  13. Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. (2012) Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. J Biol Chem. 287: 18781-7. 査読有り
  14. Adachi K, Oiwa K, Yoshida M, Nishizaka T, Kinoshita K Jr. (2012) Controlled rotation of the F(1)-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. Nat Commun.;3:1022. 査読有り
  15. Sugawara K, Fujikawa M, Yoshida M. (2013) Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity. FEBS Lett. 587: 3843-7. 査読有り
  16. Fujikawa M, Ohsakaya S, Sugawara K, Yoshida M. (2013) Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). Genes Cells. 19: 153-60. 査読有り
  17. Kioka 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, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. (2014) Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 111: 273-8. 査読有り
  18. Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M. (2013) IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. Biosci. Rep. 33 / art:e00067 / doi 10.1042/BSR20130078. 査読有り
  19. 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, 390-398. 査読有り
  20. Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M (2014) Chemo-mechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. Nature Chem Biol, 10, 930-6. 査読有り
  21. Chiwata R, Kohori A, Kawakami T, Shiroguchi K, Furuie S, Adachi K, Sutoh K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. (2014) None of the rotor residues of F1-ATPase are essential for torque generation. Biophys J. 106: 2166-74. 査読有り
  22. Sirakihara Y, Shiratori A, Tanikawa H, Nakasako M, Yoshida M, Suzuki T (2015) Structure of thermophilic F1-ATPase inhibited by ε-subunit: Deeper insight into ε-inhibition mechanism. FEBS Journal, in press. 査読有り
- 〔学会発表〕(計 約30件)  
Yoshida M. Mammalian ATP synthase; from single molecule to body ドイツ Bochum.Univ. 2014. Jan. 10  
 他
- 〔図書〕(計 1件)  
 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〕  
 ホームページ等  
 なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
 吉田 賢右 (YOSHIDA, masasuke)  
 早稲田大学・理工学術院・招聘研究教授、  
 京都産業大学・シニアリサーチフェロー  
 研究者番号：90049073
  - (2)研究分担者  
 なし
  - (3)連携研究者  
 なし