

機関番号：12608

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074002

研究課題名（和文） ATP合成酵素の回転モーター制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulation of molecular motor ATP synthase

研究代表者 久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・資源科学研究所・教授

研究者番号：40181094

## 研究成果の概要（和文）：

生体分子モーターの作動機構を明らかにするために、駆動機構の解明と制御機構の解明は車の両輪である。分子モーターの制御とは、モーター分子の原子レベルでの動きの制御である。本研究では、これを理解するために、回転軸（ $\gamma$ サブユニット）側からの研究と、外的要因の研究を同時平行して実施した。(1)  $\gamma$ サブユニットの構造変化による回転制御を1分子レベルで解析し、正確な角度解析により軸受け側の $\beta$ サブユニットの構造と停止位置の対応付けを行った。また、磁気ピンセット技術を用いて、停止と回転に要する力を実測した。さらに、制御時に起こる構造変化を立体構造レベルで解明し、制御と構造の関連付けを行なった。(2) 内在性阻害因子である $\epsilon$ サブユニットの機能を、阻害にかかる力の測定と分子構造の変化の両面から検証した。さらに内在性阻害因子の構造変化と膜ポテンシャルの関連付けを目指した。(3) 細胞内におけるATP合成量と分子レベルでのATP合成酵素の活性変化の対応付けを行うことにより、回転調節の生理的な重要性について考察した。

## 研究成果の概要（英文）：

In order to understand the regulation mechanism of the molecular motor enzyme,  $F_1$ -ATPase, we studied the regulation of rotation of the  $\gamma$  subunit itself and external regulation mechanism as well. Consequently, we obtained the following results:

1. Based on the single molecule analysis of rotation of the  $\gamma$  subunit caused by the conformational change of this subunit, we revealed the relationship between the pause position and the form of the  $\beta$  subunit. 2. The inhibitory function of the intrinsic inhibitory subunit  $\epsilon$  was studied both biochemical method and biophysical method. 3. Based on the study of the intracellular ATP level and the ATP synthase activity, physiological significance of the regulation of ATP synthase was discussed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	23,300,000	0	23,300,000
2007年度	23,700,000	0	23,700,000
2008年度	21,000,000	0	21,000,000
2009年度	26,950,000	0	26,950,000
2010年度	21,000,000	0	21,000,000
総計	115,950,000	0	115,950,000

研究分野：生物学・複合新領域

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：ATP合成酵素、調節機構、サブユニット、構造変化、レドックス制御

## 1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素は、触媒反応に伴って分子中央の $\gamma$ サブユニットが回転し、三箇所の触媒部位が協調的な反応を行っていることが明らかにされていた。研究開始当時の 2006 年頃は、触媒反応に伴う分子の構造変化と回転の関係、あるいは回転を引き起こす物理的な要因、そして酵素本来の反応である $\gamma$ サブユニットの回転による ATP 合成の詳細が調べられていた時期である。一方、この酵素は、生体内において内在性阻害因子、基質阻害、膜内外に形成される電気化学ポテンシャル差、さらに葉緑体由来の酵素では酸化還元調節機構など様々な分子機構で精密に制御されていることがわかってきた。また、ATP 合成酵素の特異的な阻害剤も複数知られており、高等植物由来の ATP 合成酵素に特異的に作用する環状テトラペプチド・テントキシンは、低濃度で活性を強く阻害し、高濃度では逆に酵素活性を数倍に高めるといった興味深い特性を持っていることも明らかにされていた。当時までの研究では、このような酵素活性の調節が回転と停止の頻度の調節であることが明らかになってきていたが、その分子機構は全くわかっていなかった。例えば、テントキシンが高濃度に作用して酵素活性が数倍に高まったときに、分子レベルで何が起きているのかは不明のままであった。

このような背景の下で、この酵素の調節の分子機構を解明することは、この酵素の分子機構を理解するうえで、回転機構の解明と対をなす重要な研究であると考え、本研究を企画した。そして、本研究では、新技術を駆使して回転分子モーター調節の分子機構の徹底的な解明を目指した。

## 2. 研究の目的

生体分子モーターの作動機構を明らかにするために、駆動機構の解明と制御機構の解明は車の両輪である。本領域研究は、次世代の測定技術を分子モーター研究に多角的に利用し、さらに分子動力学計算によってモーターの動きを原子座標レベルで理解することを目指して企画された。上記の制御は、モーター分子の原子レベルでの動きの制御であり、これまで生化学的な知見でしか知られていなかった活性の変化を立体構造変化のレベルで理解するために、精密な分子の変化の測定と計算技術が必須であった。そこで、これらの専門家が結集した本領域研究で「制御」の分子機構の研究を実施することで、世界に先駆けて「制御」を原子座標レベルで記述する道を切り拓くことを目指した。我々は、研究開始当時、好熱菌 ATP 合成酵素に葉緑体酵素が持つ酸化還元制御機構を導入し、酵素活性の酸化還元制御と回転の対応付けを解明し、活性の抑制が回転と停止頻度の平衡

状態のずれであることを明らかにしていた。また、内在性阻害因子である $\epsilon$ サブユニットによる活性の阻害が、このサブユニットの構造変化と密接に関係していることも明らかにしていた。さらに、結晶構造解析から、葉緑体 ATP 合成酵素に特異的に作用する阻害と活性化の二機能を併せ持つテントキシンの結合様式を予測し、好熱菌酵素に変異を導入してその感受性を付与することや、同複合体を用いてテントキシンが回転に与える影響の詳細を解析し、阻害と活性化が、回転途中で観察される停止の発生頻度で説明できることを明らかにしていた。そして、2006 年当時、回転制御の研究をさらに進展させるため、好熱性シアノバクテリアの ATP 合成酵素複合体の発現系の構築を行い、より安定な実験系を確立したところであった。これらの研究成果をさらに発展させ、構造と理論的な側面から回転制御を研究することで、分子モーターの制御機構を原子座標のレベルで記述することを本研究の究極の目的として本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

本研究では、好熱性シアノバクテリア由来の ATP 合成酵素複合体と好熱菌由来の ATP 合成酵素複合体を主たる研究材料として、1 分子生化学による回転制御の分子機構の解明を行った。また、形質転換が容易なシアノバクテリアを用いて、ATP 合成酵素の制御と細胞レベルの ATP 量の変化についても調べた。

### (1) 分子モーターの酸化還元制御機構

$\gamma$ サブユニット上の酸化還元によって行われる回転制御を 1 分子観察し、正確な角度解析を行うことですでに結晶構造から明らかにされている軸受け側の $\beta$ サブユニットの構造と停止位置の対応付けを行う。さらに、 $\gamma$ サブユニットによる制御が細胞レベルでどのような役割を担っているのかを明らかにする。

### (2) 分子モーターの内在性阻害因子による制御

内在性阻害因子である $\epsilon$ サブユニットの機能を、阻害にかかる力の測定と分子構造の変化の両面から検証する。力の測定は、磁気ピンセット技術を利用する。膜結合状態では、 $\epsilon$ サブユニットがエネルギー産生膜を介したプロトンの電気化学的ポテンシャル差のセンサーとしての役割を担っていることが予想されているので、その分子機構を生化学と構造の両面から解明する。さらに、 $\epsilon$ サブユニットによる制御が細胞レベルでどのような役割を担っているのかを明らかにする。

### (3) 分子モーターの阻害と活性促進で起こる

## 分子の変化

二機能性のテトラペプチドであるテントキシンによる ATP 合成酵素の阻害と再活性化の分子機構を詳細に調べ、活性と結合テントキシン数の関係を明らかにして、阻害と活性化の現象を生化学的に分離する。さらに、阻害と再活性化の 1 分子の回転を解析し、回転の分子機構を解明する。

## 4. 研究成果

(1)細菌型 ATP 合成酵素の生化学的な解析から、細菌型である好熱菌 ATP 合成酵素では、阻害型から活性型への転換が起こると、構造変化を起こした サブユニットへ ATP の結合が起こり、これにより阻害型への再転換が起こりにくくなっている事が明らかになった。このことが、植物型と比較して細菌型ではサブユニットの阻害効果が弱い事の一因と考えられる。

(2)好熱菌  $F_1$  の サブユニットの NMR 構造解析および X 線構造解析により、このサブユニットの C 末端ヘリックス構造の構造変化が ATP 依存で起こり、この部分が酵素の ATP センサーとして働く可能性を明らかにした。

(3)葉緑体型 ATP 合成酵素の特異的阻害剤であるテントキシンによる回転阻害の解析によって ADP 遊離段階が阻害されること、高濃度テントキシンによる活性化が ADP 阻害からの解除であることを明らかにした。

(4)葉緑体型 ATP 合成酵素のモデル酵素である好熱性シアノバクテリア由来の酵素を用いて、阻害サブユニット の NMR 溶液構造を明らかにした。合わせて、ハイブリッド蛋白質の構造解析によって、葉緑体 ATP 合成酵素 サブユニットの C 末端ヘリックス構造を明らかにした。

(5)シアノバクテリア ATP 合成酵素が持っている サブユニットの挿入配列が ADP 阻害の誘導に重要な役割を果たしていることを、変異体酵素の 1 分子解析により明らかにした。シアノバクテリアの形質転換株の解析により、この ADP 阻害が細胞内 ATP レベルの維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。

(6)植物型 ATP 合成酵素の  $\gamma$  サブユニットの酸化還元制御による回転調節機構の詳細を明らかにするために、シアノバクテリア ATP 合成酵素に変異導入し、回転と停止の詳細(特に停止位置の解明)を一分子レベルで詳細に調べた。その結果、酸化状態ではいわゆる「ADP 阻害」と言われている 80 度の停止位置での停止頻度が増加し、停止時間も長くなる

ことを明らかにした。

(7)シアノバクテリア ATP 合成酵素を用いて、1 分子解析により 阻害と ADP 阻害の関連を調べた。その結果、 阻害が物理的により強固な阻害であり、ADP 阻害とは異なる性質を持つことを明らかにした。

(8)好熱菌 サブユニットの構造変化と膜ポテンシャル維持機構を調べた結果、 の C 末端ヘリックスが膜ポテンシャルの維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。

(9)シアノバクテリア ATP 合成酵素の サブユニットおよび サブユニットの変異が細胞レベルで光合成機能、細胞内 ATP 量、細胞の生存率に及ぼす影響を詳細に調べ、これらの調節機能が実際に暗所での細胞の維持に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は下線)

[雑誌論文](計 14 件)

(1) Imashimizu M, Bernat G, Sunamura EI, Broekmans M, Konno H, Isato K, Rögner M, Hisabori T.

Regulation of  $F_0F_1$ -ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits is significant for light/dark adaptation.

*J Biol Chem.* **286**(30):26595-26602, 2011 (査読有り)

(2) Kadoya F, Kato S, Watanabe K, Kato-Yamada Y.

ATP binding to the  $\epsilon$  subunit of thermophilic ATP synthase is crucial for efficient coupling of ATPase and  $H^+$  pump activities.

*Biochem. J.* **437**(1):135-140, 2011 (査読有り)

(3) Konno H, Isu A, Kim Y, Murakami-Fuse T, Sugano Y, Hisabori T.

Characterization of the relationship between ADP-inhibition and  $\epsilon$ -inhibition in cyanobacterial  $F_1$ -ATPase.

*J. Biol Chem.* **286**(15):13423-13429, 2011 (査読有り)

(4) Kim Y, Konno H, Sugano Y, Hisabori T.

Redox regulation of rotation of the cyanobacterial  $F_1$ -ATPase containing thiol regulation switch

*J. Biol. Chem.* **286**(11):9071-9078, 2011 (査読有り)

(5) Sunamura E, Konno H,

Imashimizu-Kobayashi M, Sugano Y, Hisabori T. Physiological impact of intrinsic ADP inhibition of cyanobacterial  $F_0F_1$  conferred by the inherent sequence inserted into the  $\gamma$  subunit. *Plant Cell Physiol.* **51**(6):855-865, 2010 (査読有り)

(6) 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.* **425**, 85-94, 2010 (査読有り)

(7) Feniouk BA, Kato-Yamada Y, Yoshida M, Suzuki T. Conformational transitions of subunit  $\epsilon$  in ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3. *Biophys. J.* **98**, 434-442, 2010 (査読有り)

(8) Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically- encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15651-15656, 2009 (査読有り)

(9) Kato-Yamada Y. On the regulatory role of the  $\epsilon$  subunit in ATP synthase. *Seikabgaku* **81**, 943-952, 2009 (査読有り)

(10) Yasuno T, Muneyuki E, Yoshida M, Kato-Yamada Y. Modulation of nucleotide binding to the catalytic sites of thermophilic  $F_1$ -ATPase by the  $\epsilon$  subunit: Implication for the role of the  $\epsilon$  subunit in ATP synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 230-234, 2009 (査読有り)

(11) Meiss E, Konno H, Groth G, Hisabori T. Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by the phytotoxin tentoxin. *J. Biol. Chem.* **283**, 24594-24599, 2008 (査読有り)

(12) Yagi H, Kajiwara N, Tanaka H, Tsukihara T, Kato-Yamada Y, Yoshida M, Akutsu H. Structures of the thermophilic  $F_1$ -ATPase  $\epsilon$  subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in  $F_1$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11233-11238, 2007 (査読有り)

(13) Kato S, Yoshida M, Kato-Yamada Y. Role of the  $\epsilon$  subunit of thermophilic  $F_1$ -ATPase as a sensor for ATP. *J. Biol. Chem.* **282**, 37618-37623, 2007 (査読有り)

(14) Iizuka S, Kato S, Yoshida M, Kato-Yamada Y.  $\gamma\epsilon$  sub-complex of thermophilic ATP synthase has the ability to bind ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 1368-1371, 2006 (査読有り)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.res.titech.ac.jp/~juncan/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

山田 康之 (YAMADA YASUYUKI)  
立教大学・理学部・准教授  
研究者番号：80386507

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  
(平成 18～19 年度)

八木 宏昌 (YAGI HIROMASA)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号：70332749  
(平成 18～19 年度)

### (3) 連携研究者

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  
(平成 20～22 年度)