

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07013

研究課題名(和文)ATP合成酵素のATPモーターとプロトンモーターをつなぐ分子内クラッチ

研究課題名(英文)Molecular clutch between ATP and proton motors in ATP synthase

研究代表者

山田 康之 (KATO-YAMADA, Yasuyuki)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：80386507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ATP合成酵素の条件的脱共役状態では、回転軸を構成するサブユニット間の相互作用が変化している可能性が示唆された。(2)サブユニット間架橋による共役の回復を検討したが、これまでのところ見られていない。(3)不活性変異体を用いた解析では、通常用いている標品に3割程度不完全な状態のものが含まれる可能性が示唆された。(4)ATP合成酵素における条件的脱共役状態に関与するサブユニットへのATP結合の強くなった変異体を得られた。また、野生型サブユニットへのATP結合強度の再評価を行った。(5)枯草菌ATP合成酵素の活性調節の生理的意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだ不明な点の多い、ATP合成酵素の条件的脱共役状態について、さまざまな知見を得ることができた。更に研究を続け分子機構の解明へとつなげたい。ATP合成酵素の活性調節機構は原核生物と真核生物では異なるため、抗生物質の作用点として注目されている。条件的脱共役も、サブユニットが構造変化をするバクテリアATP合成酵素のみが持つ性質であると考えられることから、同様に全く新しい抗生物質の作用点として活用することも期待される。

研究成果の概要(英文)：(1)It was shown that inter-subunit interactions within rotor components is altered under uncoupling state. (2)Recovery of the coupling by the inter-subunit cross-linking has not been observed so far. (3)It was shown that one third of the TFoF1 molecules may be incomplete. (4) A mutant epsilon subunit with higher affinity for ATP was obtained. (5) The physiological significance of the regulation of ATP synthase in *Bacillus subtilis* was clarified.

研究分野：機能生物学

キーワード：生体エネルギー変換 共役 活性調節 脱共役

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ATP合成酵素( $F_0F_1$ )の膜表在性部分である  $F_1$ -ATPase( $F_1$ )では、ATP合成・分解反応に伴って、中心部分の  $\gamma$  サブユニットが  $\alpha_3\beta_3$  リングに対して回転する。一方、膜内在性の  $F_0$  部分( $F_0$ )では、膜を介した  $H^+$ の流れによって10個の  $c$  サブユニットからなるリング( $c$ リング)が、 $ab_2$  サブユニットに対して回転する。 $F_1$ (ATPモーター)と  $F_0$ ( $H^+$ モーター)の回転部分( $\gamma$  および  $c$  リング)は水力発電における発電機(電気モーター)と水流タービン(水力モーター)と同じように、共通の回転軸を介して連結されており、 $F_1$  でのATP合成・加水分解という化学反応と、 $F_0$  での  $H^+$ の輸送という物理的な過程が、サブユニットの回転という特異なメカニズムを介して共役している。共役の基本的なしくみが明らかになってくる中で、ATP合成酵素の研究においては、その調節機構の解明が残された大きな問題のひとつとなっていた。

研究代表者はこれまでに、バクテリアのATP合成酵素の活性調節機構の詳細を明らかにすることを目的とし、主に好熱菌 *Bacillus PS3* 由来のATP合成酵素を材料として研究を行ってきた。その結果、ATPase活性の阻害因子として知られていた  $\epsilon$  サブユニットは回転子のサブユニットであり、ATPase活性調節を持つこと、活性調節に伴い  $\epsilon$  サブユニットのC末端ドメインが大きく構造変化すること、 $\epsilon$  サブユニットと触媒サブユニットである  $\beta$  サブユニット間の静電相互作用が、活性調節に重要であること等を明らかにしてきた。また、 $\epsilon$  サブユニットによる調節と、全てのATP合成酵素に共通な活性調節のしくみと考えられているADP阻害の関係を明らかにした。これらの我々の研究や、他の研究グループの研究により、バクテリアのATP合成酵素では  $\epsilon$  サブユニットとADP阻害が活性調節を担っていると考えられるようになった。さらに、単離したATP合成酵素の  $\epsilon$  にATPが結合することを、世界ではじめて示した。また、 $\epsilon$  サブユニットのC末端ドメインは、ATPを結合していない状態では高い、モルテングロビュール様の伸びた構造をとり、ATPを結合するとコンパクトなヘアピン構造をとる事がわかった。これらの結果から、 $\epsilon$  サブユニットが単に活性調節の役割を持つだけでなく、その調節の為に細胞内ATP濃度センサーの役割をも担っている可能性を考え、研究代表者は近年「ATP合成酵素の  $\epsilon$  サブユニットへのATP結合と活性調節の関係を明らかにする」事を目標として研究を進めてきた。

その結果、 $\epsilon$  サブユニットへのATP結合が  $F_1$  をATPase活性型に保つ事を明らかにし、新たなATPase

活性調節のモデルを提案した。すなわち、図1(ATPase欄)にあるように(1)  $\leftrightarrow$  (2)というATPase不活性型と活性型の平衡が、中間型の  $\epsilon$  サブユニット(図中、斜線濃色部)にATPが結合する事によって、(1)  $\leftrightarrow$  (2)  $\leftrightarrow$  (3)という平衡となり、ATP存在下で平衡が活性型に偏り、「細胞内に豊富にATPがある際に、ATPase活性のより高い状態をとる」というモデルである。さらにATP合成酵素のホロ酵素を用いて研究を進めた結果、 $\epsilon$  サブユニットが単に活性をオン・オフするだけでなく、「 $\epsilon$  サブユニットへのATP結合が、

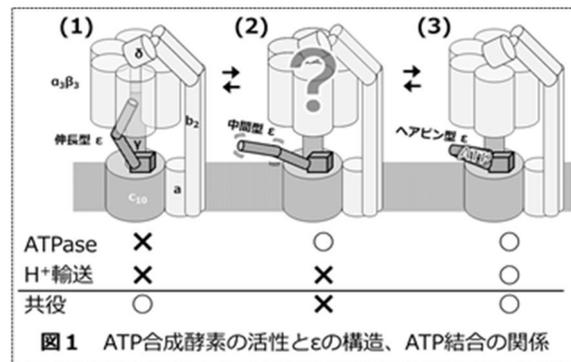


図1 ATP合成酵素の活性と $\epsilon$ の構造、ATP結合の関係

ATPase活性と  $H^+$ 輸送活性の共役状態を変化させる、という、まったく新しい機能が明らかになった。 $\epsilon$  サブユニットが  $\gamma$  サブユニットに沿って伸長し、ATPase活性と  $H^+$ 輸送活性のいずれも持たない共役状態(図1(1))から、触媒サブユニットである  $\beta$  サブユニットへのATP結合に伴い、(2)の中間型へと  $\epsilon$  サブユニットのC末端ドメインが構造変化し、ATPase活性型になる。しかし、 $\epsilon$  への結合が弱いGTPを基質とした場合など、 $\epsilon$  サブユニットにATPが結合していない(2)の状態では、 $H^+$ 輸送活性は殆ど無かった。 $\epsilon$  サブユニットにATPが結合し、C末端ドメインがヘアピン型に折り畳まれた(3)の状態になる事で共役は回復し、 $H^+$ 輸送が見られた。このようにあかも自動車のクラッチのようにATPaseと  $H^+$ 輸送の共役状態が可逆的に変化するという、ATP合成酵素の脱共役状態(条件的脱共役状態、図1(2))の存在が明らかになった。

### 2. 研究の目的

ATP合成酵素の2つの回転分子モーターである、ATPモーターと  $H^+$ モーターをつなぐ分子内クラッチと言える、条件的な脱共役状態に注目し、脱共役のメカニズムを明らかにすること、特に、その際の  $\epsilon$  サブユニットの働きを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)Biacoreを用いた脱共役状態におけるサブユニット間相互作用の解析: 脱共役状態では、サブユニット間の相互作用が変化していると考えられるため、Biacoreによるサブユニット間相互作用の直接測定を試みた。ATP合成酵素の回転軸を構成するサブユニットである、 $\gamma$  サブユニット、 $\epsilon$  サブユニット及び  $c$  サブユニット間の相互作用を測定した。

(2)サブユニット間架橋による脱共役状態の解析: 脱共役状態でサブユニット間相互作用が低下し、サブユニット間でのスリップが起こるのであれば、これをサブユニット間架橋により固定することができれば、共役が回復することを期待できる。そこで、ATP合成酵素の回転軸を構成するサブユニットである、 $\gamma$  サ

ブユニット、 $\epsilon$  サブユニット及び  $c$  サブユニットのサブユニット間架橋による共役の回復の有無を検討した。

(3)不活性変異体を用いた脱共役状態の解析: 脱共役状態を定量的に解析するために、 $H^+$ 輸送活性を持たない  $F_0$  を含む不活性変異体 ATP 合成酵素を作製し、その NTPase 活性から共役の程度を見積もることを試みた。 $F_0$  が回転できない変異体であれば、共役状態では NTPase 活性がゼロになる一方、脱共役状態では NTPase 活性が回復することが期待される。

(4)脱共役を支配するサブユニットへの ATP 結合の解析: ATP 合成酵素の共役状態は、 $\epsilon$  サブユニットへのヌクレオチド結合状態に依存して変化する。 $\epsilon$  サブユニットの ATP 結合について、詳細な解析、結合強度の変化した変異体の作製などを行った。

#### 4. 研究成果

(1)Biacore を用いた脱共役状態におけるサブユニット間相互作用の解析: Biacore を用いて  $\gamma$  サブユニットと  $\epsilon$  サブユニットの結合及び  $\gamma\epsilon$  サブユニットへの  $c$  サブユニットの結合を解析した。 $c$  サブユニットの標品としては、 $c$  サブユニットの細胞質側ループ部分のみを含む合成ペプチドを用いた。この条件では、ATP を加えない場合が脱共役状態、ATP を加えた場合が共役状態に対応すると考えられる。 $\gamma$  サブユニットを固定し、 $\epsilon$  サブユニットの結合を測定した結果では、ATP の有無による差は見られなかった。また、 $\epsilon$  非存在下での  $\gamma$  への  $c$  サブユニットループの結合はほとんどみられなかった。 $\gamma$  サブユニットに  $\epsilon$  サブユニットを結合させた状態で、 $c$  サブユニットループの結合を観察すると、ATP 存在下で、より強い結合が観察された。しかしながら、観察された  $c$  サブユニットループ結合の化学量論比は、 $\epsilon$  サブユニットに対して 1 程度であり、ATP 合成酵素複合体中での値である 10 と比較すると小さなものであった。 $c$  サブユニットについて、合成ペプチドでは 10 量体形成ができないため、このような結果が得られたものと考えられた。そこで、 $c$  サブユニットリングを単離し、同様の測定を行うことを試みた。しかしながら、 $c$  サブユニットリングの純度の高い標品を得ることができず、ATP 合成酵素複合体中での状態での測定を行うことはできなかった。さらに精製条件などを検討し、測定を行いたいと考えている。

(2)サブユニット間架橋による脱共役状態の解析: 回転軸を構成するサブユニットである、 $\gamma$  サブユニット、 $\epsilon$  サブユニット及び  $c$  サブユニットのうち、 $\gamma$ - $\epsilon$ 、 $\epsilon$ - $c$  間の架橋について検討した。その結果、作製した変異体において、架橋の形成は確認できたが、架橋による共役の回復は観察されなかった。この結果から、脱共役状態では  $\gamma$  の回転を伴わない ATP 加水分解が起こっている可能性と架橋部位が不適切であった可能性が考えられた。そこでこれらの可能性を検討するために、 $\beta$ - $\gamma$  間を架橋することで、 $\gamma$  サブユニットが回転できなくなる変異体を作製し、架橋状態での GTP 加水分解活性を検討した。その結果、 $\gamma$  サブユニットが回転しない状態では、GTP 加水分解活性は見られなかった。このため、これらの変異体では、架橋導入位置が不適切であったために共役の回復が見られなかったものと考えた。近年、好熱菌 ATP 合成酵素複合体の全体構造が明らかとなったため、この構造をもとに、新たに  $\gamma$ - $c$  サブユニット間で架橋する変異体を設計、作製しているところである。

(3)不活性変異体を用いた脱共役状態の解析: 不活性変異体として、 $F_0$ - $c$  サブユニットにプロトンが結合しない変異体を作製し、解析を行った。この変異体は、共役条件下では低い NTPase 活性を持ち、脱共役条件下では高い NTPase 活性を持つ、すなわち、低い ATPase 活性と高い GTPase 活性をもつことが期待された。作製した変異体について、共役条件である ATPase 活性を測定したところ、予想に反し高い活性を示した。また、この変異体にさらに  $\epsilon$  サブユニットへの変異を加え、ヌクレオチド条件によらず共役すると考えられる変異体も作製したところ、この二重変異体においても高い ATPase 活性が見られた。これらの結果から、通常使用しているサンプルには、 $\epsilon$  サブユニットへのヌクレオチド結合に依存した条件的脱共役ではない形で脱共役したものが含まれていることが示唆された。さらに詳細な解析を行った結果、通常の条件で得られる反転膜小胞に含まれる  $TF_0F_1$  分子のうち、およそ 3 割程度が ATP を基質に用いた場合でも脱共役しており、不完全な状態にあると見積もられた。最近報告された  $TF_0F_1$  の低温電子顕微鏡による構造解析においても、2nd stalk の欠落した分子が相当程度観察されており、このような分子が精製標品中のみならず、反転膜中にも存在することが考えられる。これらの分子の寄与を差し引いて正常な状態にあると考えられる  $TF_0F_1$  分子について、もっぱら脱共役状態を取ると考えられる GTP を基質とした条件下での共役の程度を見積もったところ、GTP を基質とした場合でも完全に脱共役している訳ではなく、およそ 3 割程度の分子が共役状態にあると見積もることができた。 $\epsilon$  サブユニットへの GTP の弱い結合に対応するものと考えられる。

(4)脱共役を支配するサブユニットへの ATP 結合の解析: 野生型よりも高い ATP 結合能を持つ変異体  $\epsilon$  サブユニットの作製に成功した。脱共役状態の解析への応用のほか、細胞内 ATP 濃度測定用のセンサータンパク質への応用などが期待される。また、野生型  $\epsilon$  サブユニットへの ATP 結合の測定条件を再検討し、非標識状態で測定したところ、これまで考えられていたよりも強い結合力を持つことが明らかとなった。

(5)その他: 枯草菌 ATP 合成酵素の活性調節の生理的意義を明らかにすることができた。脱共役状態の生理的な意義についても同様の実験系で解析することを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiwara Miria, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 ATP-binding affinity of the subunit of thermophilic F1-ATPase under label-free conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100725 ~ 100725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100725">https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100725</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akanuma Genki, Tagana Tomoaki, Sawada Maho, Suzuki Shota, Shimada Tomohiro, Tanaka Kan, Kawamura Fujio, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 C-terminal regulatory domain of the subunit of FoF1 ATP synthase enhances the ATP-dependent H <sup>+</sup> pumping that is involved in the maintenance of cellular membrane potential in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e815 ~ e815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1002/mbo3.815">https://doi.org/10.1002/mbo3.815</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuyuki Kato-Yamada	4. 巻 469
2. 論文標題 High affinity nucleotide-binding mutant of the subunit of thermophilic F1-ATPase	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1129-1132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2015.12.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuyuki Kato-Yamada, Genki Akanuma, Tomoaki Tagana, Maho Sawada, Shota Suzuki, Tomohiro Shimada, Kan Tanaka, Fujio Kawamura
2. 発表標題 Regulatory C-terminal domain of the subunit in FoF1 ATP synthase is important to maintain cellular membrane potential by activating ATP-dependent H <sup>+</sup> pumping in <i>Bacillus subtilis</i>
3. 学会等名 20th European Bioenergetics Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原美理亜、高田浩志、瀬沼美梨、山田康之
2. 発表標題 最強のATP結合タンパク質の作製
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関口敬俊、岡村歩美、高田浩志、赤沼元気、山田康之
2. 発表標題 枯草菌FoF1-ATP合成酵素におけるDELSEED領域の機能解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田浩志、堀内由紀子、山田康之
2. 発表標題 分子内架橋によるATP合成酵素の条件的脱共役状態の解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第42回討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 赤沼元気、澤田真帆、多賀名智昭、島田友裕、田中寛、河村富士夫、山田康之
2. 発表標題 枯草菌FoF1 ATP合成酵素の サブユニットによる活性調節の生理的意義
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第42回討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤原美理亜、高田浩志、瀬沼美梨、山田康之
2. 発表標題 最強のATP結合タンパク質の作製
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第42回討論会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立教大学理学部生命理学科山田研究室ホームページ <a href="https://www2.rikkyo.ac.jp/web/katoyama/">https://www2.rikkyo.ac.jp/web/katoyama/</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考