

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07014

研究課題名(和文) ヒトFoF1-ATP合成酵素の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of human FoF1-ATP synthase

研究代表者

鈴木 俊治 (Suzuki, Toshiharu)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・主幹研究員

研究者番号：60618809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトF1-ATPase (F1)と高い構造類似性を持つウシF1の大量生産システム、顕微鏡一分子回転観察システム、X線結晶構造解析システムを確立した。そして寿命伸長効果や生活習慣病の改善効果が報告されているレスベラトロールをモデル阻害剤として、ウシF1の機能に与える影響を顕微鏡一分子観察とX線結晶構造解析により明らかにした。分析の結果、レスベラトロールはF1の回転軸と固定子の間に結合し、生成物リン酸の結合の素過程進行を阻害することによりATPの合成反応を阻害している事が示唆された。この結果は、今後の哺乳類の生体エネルギーシステムの人為的機能調節の研究の理論的基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, I established heterologous expression, microscopic single-molecule analysis and X-ray crystallographic systems for bovine F1-ATPase which has high structural similarity to human F1. By using the systems, effects of resveratrol, which has been suggested to have positive effects of extending lifetime and curing adult diseases of eukaryotes, have been analyzed as a model inhibitor for mammalian F1. As a result, resveratrol was suggested to inhibit the ATP-synthesis turnover by preventing the elementary step of product phosphate-binding by binding to the cleft formed between the rotor and stator subunits of bovine F1. This finding would become a theoretical basis to artificially control the energy system of mammalian species in future.

研究分野：構造生物学

キーワード：FoF1-ATP synthase F1-ATPase ATP

1. 研究開始当初の背景

地球上のすべての生物は、その生命活動の維持・進行に高エネルギー物質であるアデノシン 3 リン酸(ATP)を利用している。この生命のエネルギー通貨とも言える ATP の多くは、 F_0F_1 -ATP 合成酵素(以後、 F_0F_1)により合成されており、 F_0F_1 は生命のエネルギーシステムの中心的役割を担っている。近年の F_0F_1 の研究は F_0F_1 分子自体の理解だけではなく、その機能の変化が宿主生物の高次生命機能にどのように及ぼすか、という事に興味を広がりつつある。実際、寿命の伸長効果や生活習慣病の改善効果が見られる β -ケトグルタル酸やレスベラトロール、制癌効果を持つアンジオスタチン、肝細胞への HDL コレステロールの取り込みに影響を及ぼす apolipoprotein A-1 などは、 F_0F_1 もしくはその部分複合体の機能に影響を及ぼしている事が報告されている。これらの分子機構を解明するためには、 F_0F_1 の ATP 結合ドメインである F_1 -ATPase(F_1)部分の機能制御機構を理解する必要がある。しかし、今まで F_0F_1 や F_1 の詳細な研究が行われてきたのはバクテリア由来酵素であり、バクテリア-哺乳類間ではサブユニット構成をはじめアミノ酸配列の類似性は低い事から、機能制御の理解に必要な精密な構造的議論は実際のところ難しいのが現状であった。

2. 研究の目的

近年、研究代表者により組替え体ヒト F_1 の生産・分析システムが確立され、哺乳類 F_1 の詳細な分子機構の解明が可能となった。そこで本研究では、哺乳類 F_1 の機能に影響を及ぼす代謝物や天然物の作用機構を、顕微鏡一分子回転観察や X 線結晶構造解析等により詳細に明らかにし、人工調節因子の創製を試みる。 F_0F_1 は回転分子モーターであり、 F_0 ドメインに負荷された ATP 合成に必要な生体膜を介した H^+ の電気化学的ポテンシャルのエネルギーは、回転子サブユニットの力学的な回転を介して F_1 ドメインに伝えられ ATP が合成される。本研究で用いる F_1 (ドメイン) はそれ自体で逆反応である ATP 加水分解活性を持ち、ATP 加水分解により回転子サブユニットを回転させる事ができる回転分子モーターである。そこで顕微鏡一分子観察による F_1 の回転分析と、X 線結晶構造解析から得られる構造情報から、どのような阻害剤との分子間相互作用が回転モーターである F_1 の機能(回転)制御に有効なのかを詳細に明らかにする事を本研究の目的とする。得られた知見は、将来的な F_0F_1 の人為的制御という医薬的観点からも重要な意義を持つと考えられる。

3. 研究の方法

本研究の開始時点の問題点として、ヒト F_1 は大腸菌内での合成量が低く、安定性も低い事があった。そこでヒト F_1 と構造類似性が高いウシ F_1 (触媒サブユニットのアミノ酸配列の相同性が 99%) の実験システムの確立を行

った。すでに大腸菌内での発現系は、研究代表者により確立されつつあったので、そのシステムを最適化させ完成させた。そして得られた組替え体ウシ F_1 を使って、顕微鏡一分子回転観察システムと各種 X 線結晶構造解析システムを新たに確立した。そして以後の実験は、得られた組替え体ウシ F_1 を用いて行った。阻害剤による F_1 の機能の変化は、主に顕微鏡一分子回転観察によりを分析し、阻害剤の結合様式やその変化などの構造情報は、X 線結晶構造解析により分析した。

4. 研究成果

まずヒト F_1 の研究で確立した顕微鏡システムをと技術を適用することにより、ウシ F_1 の顕微鏡一分子回転観察システムの確立と分析を行った。その結果(26)、ウシ F_1 の ATPase 駆動の回転速度は 655 ± 38 rps とヒト F_1 (705 ± 75 rps) と同様にバクテリア F_1 と比べ高速であり、ATP 高濃度条件下の回転中にはヒト F_1 と同様に概ね 6 点の短い停止が見られた。また ATP 結合速度は $1.8 \pm 0.3 \times 10^7$ /M/s (ヒトは $2.7 \pm 0.3 \times 10^7$ /M/s) など、ウシ F_1 の回転特性は、ヒト F_1 と非常に類似している事を確認した。

X 線結晶構造解析では、精製した組替え体ウシ F_1 を sitting-drop 蒸気平衡法により PEG3350 を沈殿剤として用いて、ATP 類似体の AMPPNP と Mg^{2+} と必要に応じてリン酸アナログであるチオリン酸の共存下、結晶を作成した。作成した結晶からは、放射光施設 SPring8 のビームライン(BL32XU、BL41XU、BL44XU)を使用して回折データを入手し、分子置換法及び構造精密化により最終構造を得た。そして、チオリン酸を含んだ結晶からはチオリン酸が結合した構造が 1 種得られたが、興味深いことに、チオリン酸なしの結晶からは回転子サブユニットの回転角度が異なる 3 種類の結晶構造から得られた。分析の結果、これら 4 種類の結晶構造は、 F_1 から生成物リン酸が解離していく(言い換えるとリン酸が結合していく)素過程のスナップショット(素過程中間体)であることが判明した。つまりこの X 線結晶構造解析システムを用いることにより、リン酸解離(逆反応で考えると結合)の素過程中の構造に、分析対象の阻害剤が結合能を持つかの有無や結合様式がわかることを意味している。

次に、ポリフェノールの一種であるレスベラトロールをモデル阻害剤として使用し、ウシ F_1 の機能(回転)への影響を顕微鏡一分子回転観察により分析した。その結果、レスベラトロール添加により、通常発生しない長い回転の停止と再開を繰り返す事が明らかになった。解析の結果、新たに発生する長い停止は、ATP 結合から約 90 度進んだ角度で発生することが判明した。この角度は、ATP 加水分解反応で考えると、リン酸解離後に別の触媒部位の ATP の加水分解の素過程を待っている角度であるが、ATP 合成反応で考えると ATP

合成反応の素過程後に、別の触媒部位にリン酸が結合する素過程を待っている角度である。

X線結晶構造解析では、ウシ F₁ 結晶作成後にレスベラトロールをソーキングにより結晶中に導入し、同様に構造決定を行った。その結果、レスベラトロールはリン酸結合前の構造(上記の 90 度)には結合できるが、リン酸結合の素過程中間体構造(回転子の角度は約 75 度)には結合できない事が判明した。解析の結果、この現象は、回転子サブユニットが回転角度によりレスベラトロール結合ポケットの形状を変化させ、レスベラトロールとの親和性が立体障害のため低下した為である事が示唆された。

これらの結果を併せて考えると、レスベラトロールは、リン酸の結合を待っている構造に結合しその状態を安定化させることにより、前後の素過程の進行を阻害していることが示唆された。この状態は ATP 合成反応で考えると、基質であるリン酸の結合を待っている状態に対応する。さらに結晶構造解析からリン酸結合の素過程中間体構造にレスベラトロールは結合できないという実験結果は、レスベラトロールが結合したままの状態ではリン酸結合の素過程が進行できないという事を同時に示唆している。これらの結果を考えると、少なくとも ATP 合成方向で考えると、レスベラトロールは基質リン酸の結合の素過程を阻害することにより、FoF₁ の機能を抑制しているというモデルが導かれる。一方、ATP 加水分解反応方向で考えると、レスベラトロールが結合した 90 度の構造は、リン酸解離後に別の触媒部位で ATP が加水分解されるのを待っている分子状態に対応するが、細胞内で FoF₁ の役割は ATP 合成反応であることから、本研究ではその阻害機構は ATP 合成反応で考察することとした。

また本研究では当初の想定とは異なり、組換え体ウシ F₁ の X 線結晶構造解析システムが確立でき、レスベラトロールがウシ F₁ に結合した複数の結晶構造の入手に成功するという予定外の大きな進展があったため、当初予定していた inhibitory factor-1 (IF1) を用いた人工調節因子の創成は時間的に行うことが出来なかった。しかし本研究で実験システムが確立され知見が得られたことから、今後より実現可能な研究課題として実施していく予定である。

本研究で確立されたウシ F₁ の顕微鏡一分子回転観察システムと、様々な分子状態を分析できる X 線結晶構造解析システムは、他の様々な阻害剤・阻害因子に適用可能である。現在までに結合様式が分かっている哺乳類 F₁ の阻害剤・阻害因子は、何れも本研究の構造解析システムにより解析できる回転子の角度領域の構造に結合しており、このリン酸解離前後の角度領域は、様々な阻害剤が結合し F₁ の機能を調節するのに適した角度領域なの

かもしれない。

本研究システムで確立された研究システムと得られた知見は、今後の我々ヒトの寿命伸長や生活習慣病改善などに向けた研究の理論的基盤の一つとなると考えられる。また、哺乳類のエネルギーシステムの制御というのは、裏返すと非哺乳類のエネルギーシステムの制御にもつながる。そして本研究により同時に導かれる非哺乳類のエネルギーシステム制御の手がかりは、我々人類を取り巻いている病原性生物の駆逐などにも有効な手法の一つとなりうると考えられる。

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 8 件)

1. Kang S, Todokoro Y, Bak S, Suzuki T, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu, H (2017) Direct assignment of ¹³C solid-state NMR signals of TF₀F₁ ATP synthase subunit c-ring in lipid membranes and its implication for the ring structure. *J Biomol NMR*, 70(1), 53-65, doi: 10.1007/s10858-017-0158-x, 査読あり.
2. Schenck S, Kunz L, Sahlender D, Pardon D, Savtchuk I, Suzuki T, Neldner Y, Štefanić S, Steyaert J, Volterra A, Dutzler R (2017) Generation and characterization of anti-VGLUT nanobodies acting as inhibitors of transport. *Biochemistry*, 56(30), 3962-3971, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00436, 査読あり.
3. Soga N, Kimura K, Kinoshita, K Jr, Yoshida M and Suzuki T (2017) Perfect chemo-mechanical coupling of F₀F₁-ATP synthase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 114(19), 4960-4965, doi: 10.1073/pnas.1700801114, 査読あり.
4. Mitome N, Sato H, Tomiyama T, Shimabukuro K, Matsunishi T, Hamada K and Suzuki T (2017) Identification of aqueous access residues of the sodium halfchannel in transmembrane helix 5 of the Fo-a subunit of *Propionigenium modestum* ATP synthase, *Biophys Physicobiol*, 14, 41-47, doi: 10.2142/biophysico.14.0_41, 査読あり.
5. Suzuki T, Iida N, Suzuki J, Watanabe Y, Endo T, Hisabori T and Yoshida M (2016) Expression of mammalian mitochondrial F₁-ATPase in *Escherichia coli* depends on two chaperone factors, AF1 and AF2. *FEBS Open Bio*, 6(12), 1267-1272, doi: 10.1002/2211-5463.12143, 査読あり.

6. Eriksen J, Chang R, McGregor M, Silm K, Suzuki T, Edwards RH (2016) Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism. *Neuron*, 90(4), 768-80, doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.026, 査読あり.
 7. Saita E, Suzuki T, Kinoshita K Jr, Yoshida M (2015) Simple mechanism whereby F_1 -ATPase motor rotates with near-perfect chemo-mechanical energy conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(31), 9626-31, doi: 10.1073/pnas.1422885112, 査読あり.
 8. Shirakihara Y, Shiratori A, Tanikawa H, Nakasako M, Yoshida M and Suzuki T (2015) Structure of a thermophilic F_1 -ATPase inhibited by an ϵ -subunit: Deeper insight into the ϵ -inhibition mechanism. *FEBS J*, 282(15), 2895-913, doi: 10.1111/febs.13329, 査読あり.
- [学会発表](計 25件)
1. Toshiharu Suzuki, Kunio Hirata, Eiki Yamashita, Seiki Baba, Naoya Iida, Takashi Kumasaka, Toshiya Endo, Toru Hisabori, Masasuke Yoshida, Hiroyuki Noji, CHEMOMECHANICAL COUPLING OF ROTATION OF MAMMALIAN F_1 -ATPASE BY STATIC AND DYNAMIC X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES, 62th Biophysical Society Annual Meeting, San Francisco, USA, 2018年2月17-21日
 2. 和泉諒之、鈴木俊治、近藤久益子、久堀徹、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の ATP 合成酵素の精製と活性測定、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都産業大学
 3. 飯田直也、粕谷有造、曾我直樹、上田太郎、吉田賢右、木下一彦、鈴木俊治、好熱菌 *Bacillus* PS3 由来 F_0F_1 -ATP 合成酵素の ATP 駆動に寄る H^+ 輸送活性の蛍光顕微鏡観察、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都産業大学
 4. 阿久津秀雄、Su-Jun Kang、戸所泰人、鈴木俊治、吉田賢右、藤原敏通、好熱菌 F 型 ATP 合成酵素 c-リングの固体 NMR による研究、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都産業大学
 5. 曾我直樹、木下一彦、吉田賢右、鈴木俊治、Perfect chemomechanical coupling of F_0F_1 -ATP synthase、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都産業大学
 6. 鈴木俊治、飯田直也、平田邦生、山下栄樹、馬場清喜、熊坂崇、遠藤斗志也、久堀徹、吉田賢右、野地博行、生体分子モーターが力を発生させているところを見る：静的・動的 X 線結晶構造解析に寄る哺乳類 F_1 -ATPase の回転力発生機構の分析、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、2017 年 12 月 19-21 日、京都産業大学
 7. 鈴木俊治、平田邦生、山下栄樹、飯田直也、遠藤斗志也、久堀徹、吉田賢右、野地博行、分子モーターが動いている瞬間をみる：時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F_1 の回転力発生機構の分析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6-9 日、神戸ポートアイランド
 8. 鈴木俊治^{1,2,3}、平田邦生⁴、山下栄樹⁵、飯田直也⁶、遠藤斗志也³、久堀徹²、吉田賢右³、野地博行、生体分子モーターが力を発生させているところを見る：時分割動的構造解析による哺乳類 F_1 -ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析、平成 29 年度日本結晶学会年会、2017 年 11 月 23-24 日、広島市、JMS アステールプラザ
 9. Naoya Iida, Yuzo Kasuya, Naoki Soga, Taro Uyeda, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinoshita, Toshiharu Suzuki、pH-indicator を用いた好熱菌 *Bacillus* PS3 由来 F_0F_1 -ATP 合成酵素の ATP 加水分解と H^+ 輸送の共役機構、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19-21 日
 10. Ryo Watanabe, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki、Ryohei Kobayashi, Hiroyuki Noji、ハイブリッド F_1 -ATPase の 1 分子回転観察、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19-21 日
 11. Mariel Zarco Zavala, Duncan G.G. Mcmillan, Toshiharu Suzuki、Hiroshi Ueno, Rikiya Watanabe, Francisco Mendoza Hoffmann, José J. García Trejo, Hiroyuki Noji, Biophysical Characterization of the Chemomechanical Coupling of F_1 ATPase of *Paracoccus denitrificans*、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19-21 日
 12. 鈴木俊治、平田邦生、山下栄樹、飯田直也、遠藤斗志也、久堀徹、吉田賢右、野地博行、角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による、哺乳類 F_1 -ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19-21 日
 13. Toshiharu Suzuki (2016) Arginine finger mediated rotation of bovine F_1 -ATPase driven by phosphate-release. European Bioenergetics conference 2016, Riva del Garda, Italia, 7 月 6 日
 14. 鈴木俊治、平田邦生、山下栄樹、遠藤斗

- 志也、久堀徹、吉田賢右、野地博行、角度分割・時分割X線結晶構造解析による、哺乳類F₁-ATPaseのリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析、2017年6月22日、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター
15. 鈴木俊治、平田邦生、山下栄樹、遠藤斗志也、久堀徹、吉田賢右、野地博行、角度分割・時分割X線結晶構造解析による、哺乳類F₁-ATPaseのリン酸解離駆動の回転力発生機構の解明、第6回日本生物物理学会関東支部会、2017年3月13-14日、早稲田大学
 16. 鈴木俊治、回転角度分割構造解析による哺乳類F₁-ATPaseの回転力発生と制御のしくみ、第54回日本生物物理学会年会シンポジウム「ミトコンドリアの分子マシンナリーと機能管理：合成、構造、機能、適応、そして淘汰」、2016年11月25-27日、つくば
 17. Mariel Zarco-Zavala, Duncan G G McMillan, Toshiharu Suzuki, Hiroshi Ueno, Francisco Mendoza-Hoffmann, Jose J. Garcia-Trejo, Hiroyuki Noji1, Unveiling the chemomechanical coupling of F₁ ATPase of *Paracoccus denitrificans*, 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば
 18. Naoya Iida, Yuzo Kasuya, Naoki Soga, Toshiharu Suzuki, Taro Uyeda, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinoshita, Determination of the proton pump activity and the H⁺/ATP ratio of thermophilic *Bacillus* PS3 F₀F₁-ATP synthase, 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば
 19. Toshiharu Suzuki (2016) How does F₁-ATPase drive rotation? X-ray crystallography and single-molecule studies of mammalian F₁-ATPases, 第16回日本蛋白質科学会年会シンポジウム(英語)、6月7-9日、福岡国際会議場
 20. 鈴木俊治、哺乳類F₁-ATPaseの回転を介したエネルギー変換の仕組みと、生体内因子・天然物による機能調節の分子メカニズム、BMB2015(平成27年度日本生化学会/分子生物学会合同年会)シンポジウム「呼吸鎖複合体とATP合成の新描像」、2015年12月2日、神戸
 21. 富山泰至、佐藤宏樹、鈴木俊治、松西拓哉、濱田康平、吉田賢右、三留規誉、Na⁺輸送型F₀F₁-ATP合成酵素のαサブユニットのイオンチャンネルの解析。日本生体エネルギー研究会 第41回討論会、2015年12月、東京、東大
 22. 飯田直也、粕谷有造、曾我直樹、田崎 健、鈴木俊治、吉田賢右、木下一彦、好熱菌由来*Bacillus* PS3由来F₀F₁-ATP合成酵素のATP駆動によるH⁺ポンプ活性の定量。日本生体エネルギー研究会 第41回討論

- 会、2015年12月、東京、東大
23. 奥村 元、鈴木俊治、吉田賢右、遠藤斗志也、野地博行、ResveratrolによるウシF₁-ATPaseの回転調節機構の解明、日本生体エネルギー研究会 第41回討論会、2015年12月、東京、東大
 24. 鈴木俊治、奥村 元、吉川祐輔、飯田直也、鈴木純子、木下一彦、渡邊康紀、遠藤斗志也、野地博行、吉田賢右、哺乳類F₁-ATPaseのリン酸解離による回転力発生機構、日本生体エネルギー研究会 第41回討論会、2015年12月、東京、東大
 25. 鈴木俊治、若林千晃、田中一巳、鈴木純子、野地博行、吉田賢右、ヒトのエネルギー生産システムはどのように調節されるのか？生体因子・天然物によるヒト・ウシF₁-ATPaseの阻害の分子メカニズム、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月、徳島

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Toshiharu_Suzuki2

<https://researchmap.jp/7000007501/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊治 (SUZUKI, Toshiharu)

東京大学・大学院工学系研究科

・主幹研究員

研究者番号：60618809

(兼任)東京工業大学・

科学技術創成研究院・特定教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし