

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19770103

研究課題名 (和文) ATP合成酵素のプロトンモーターの結晶構造解析

研究課題名 (英文) Crystallization and structural analysis of proton motor of ATP synthase

研究代表者

三留 規誉 (MITOME NORIYO)

東京工業大学・資源化学研究所・特任助教

研究者番号：9043198

研究代表者の専門分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ATP合成酵素、構造解析、分子モーター、プロトンポンプ

### 1. 研究計画の概要

F<sub>0</sub>モーターはいかにして、プロトンの電気化学的エネルギーを回転という力学的エネルギーに変換しているのでしょうか？その仕組みの分子的理解にとってF<sub>0</sub>モーターの構造の解明は不可欠である。しかし、この結晶構造解析は、この12年あらゆる挑戦をしりぞけてきた。その困難の理由は、F<sub>0</sub>モーターの固定子(F<sub>0</sub>aサブユニット)と回転子(F<sub>0</sub>cリング)の微妙な結合である。それは、回転を許すほどゆるく、離れてしまわない程度に強いはずである。しかし、膜蛋白質の精製に用いる界面活性剤は、F<sub>0</sub>aサブユニットとF<sub>0</sub>cリングの微妙な結合を弱めて両者の解離を促す。本研究では、F<sub>0</sub>aサブユニットとF<sub>0</sub>cリングが解離しないF<sub>0</sub>モーターを結晶化に用い、構造解析を行う。そして、プロトン流れで回転する機構を明らかにする。

### 2. 研究の進捗状況

F<sub>0</sub>の構造を安定化するために、好熱菌*Bacillus PS3*のATP合成酵素を用いて、回転子のc<sub>10</sub>-リングと固定子のaサブユニットを1本のポリペプチドとして架橋した(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>を作製した。これは、F<sub>0</sub>cリングの10コピーのcサブユニットおよびF<sub>0</sub>aサブユニットを一本のポリペプチドとして融合した(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>である。これは固定子と回転子が固定されてしまったので、活性はない。しかし、リンカー部分を切断すると活性がただち

に回復することから、これは、本来の構造をもっていると推定できる。この融合変異により、F<sub>0</sub>の構造が安定化したので、Ni-NATカラムでF<sub>0</sub>を精製することが可能となり、高い純度でF<sub>0</sub>精製することができるようになった。精製に用いる界面活性剤を検討し、ドデシルマルトシドなどのマルトシド系の界面活性剤とsucrose monodecanoateで単分散した(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>を得ることができるとわかった。こうして得られた精製した(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>と(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>がどれくらいの期間、安定であるかを分析したところ、(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>において、bサブユニットが、4日以内に切断された。一方、(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>では、少なくとも2週間は全てのサブユニットが安定に構造を保っていたので、F<sub>1</sub>と結合していないbサブユニットは、不安定であることが予想された。そこで現在は、(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>を中心に結晶化を行っている。

また、ab<sub>2</sub>部分複合体を抗原にして、F<sub>0</sub>に結合するモノクローナル抗体を作製した。抗体のスクリーニングを工夫して、ab<sub>2</sub>の細胞質側に結合する抗体とab<sub>2</sub>のペリプラズム側に結合する抗体を得た。これらのFabフラグメントは、ab<sub>2</sub>およびF<sub>0</sub>に1:1で結合することがわかった。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

これまでに安定な(c<sub>10</sub>-a)F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>を得ることに成功した。この複合体は、F<sub>0</sub>の結晶構

造解析の最大の問題である  $F_0a$ サブユニットの解離を防ぐ。界面活性剤の種類と濃度を検討することにより、単分散した  $F_0F_1$ を得る条件がわかった。安定性のチェックにより、結晶化に必要な期間は複合体は安定であることがわかった。また、 $F_0$ に結合する Fabフラグメントを調整した。結晶化に有望な複合体と抗体フラグメントを得て、結晶化に必要な環境は整った。

#### 4. 今後の研究の推進方策

$F_0a$ -サブユニットと  $F_0c$ -リングが解離しない  $(c_{10}-a)F_0F_1$ の結晶化を行う。抗体を結合させることにより、 $F_0F_1$ は水溶性領域を拡大し、結晶の形成が促進される。そこで  $F_0$ に結合するモノクローナル抗体から Fabフラグメントを調製して、 $(c_{10}-a)F_0F_1$ に結合し、結晶化を行う。よい結晶が得られたら、Spring-8 (放射光施設) で、構造データを収集する。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

① Noriyo Mitome, Sakurako Ono, Hiroki Sato, Nobuhito Sone, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida. The essential Arg of  $F_0a$  subunit in  $F_0F_1$  - ATP synthase ensures c-ring rotation by preventing a futile proton shortcut. International Symposium Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes. September 8-10, 2009, Kyoto University.

② 三留規蒼、大坂谷章子、鈴木俊治、吉田賢右、ATP合成酵素の精製における界面活性剤の検討と融合変異ATP合成酵素の安定性、第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

③ 佐藤宏樹、三留規蒼、鈴木俊治、吉田賢右、化学修飾による  $Na^+$ 輸送型  $F_0F_1$ -ATP合成酵素の  $Na^+$ チャンネルを形成するアミノ酸残基の同定、第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

④ 三留規蒼、大坂谷章子、鈴木俊治、吉田賢右、ATP合成酵素および  $ab_2$ 複合体の精製における界面活性剤の検討、日本生体エネルギー研究会 第34回討論会、2008年11月8

日、東京医科歯科大学

⑤ 三留規蒼、小野桜子、佐藤宏樹、鈴木俊治、曾根のぶひと、吉田賢右、融合変異を用いた  $F_0F_1$ -ATP合成酵素の  $aR169$  の役割の解析、日本生体エネルギー研究会第33回討論会、2007年11月17日、山口大学