

機関番号：55501

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)

独立行政法人国立高等専門学校機構宇部工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：90431981

研究成果の概要 (和文) : ATP合成酵素 (F_0F_1) は、 H^+ の流れで F_0 モーターの c リングを F_0a サブユニット (F_0a) に対して回転させ、 F_1 でATPを合成する酵素である。 H^+ の流れがどのようにして c リングを回転させるのかを理解するには、 c -リングと F_0a の構造的相互作用と機能の関係を明らかにすることが必要である。本研究では、 F_0a と c -リングを融合して回転を制御した F_0 モーターを作製し、生化学的分析により F_0a のアルギニン残基の役割を明らかにした。また、 c -リングと F_0a を融合した変異により、 F_0 を高い純度で精製することができるようになった。そして、得られた複合体の構造的安定性について検討し、結晶化を行った。

研究成果の概要 (英文) :

In F_0F_1 -ATP synthase that couples H^+ transport with ATP synthesis/hydrolysis, an F_0c subunit decamer ring (c -ring) rotates relative to F_0a as protons pass through F_0 . To understand the torque generation mechanism, structural and functional information is required. In this study, I generated $c_{10-a}F_0F_1$ in which c_{10} and F_0a were genetically fused. The biochemical analysis revealed that the conserved arginine residue in F_0a ensures proton-coupled c -ring rotation by preventing a futile proton shortcut. I also successfully purified $c_{10-a}F_0$ and analyzed stability of complexes for crystallization of F_0 .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,300,000	708,000	4,080,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素 (F_0F_1) は、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の膜に存在し、 H^+ (プロトン)の流れで ATP を合成している。この酵素は、 H^+ の流れのエネルギーで回転する F_0 モーターと、ATP の加水分解のエネルギーで回転する F_1 モーターが、共通のシャフト ($\gamma \epsilon$ -c リング) を共有している。 F_0 モーターは H^+ の流れにより、c リングを ab_2 に対して回転させる。すると F_1 の中で $\gamma \epsilon$ が $\alpha_3 \beta_3$ に対して回転し、 β サブユニットで ATP が合成される。逆反応では、 F_1 モーターは ATP の加水分解により $\gamma \epsilon$ を回転させる。すると c リングが回転し、c リングと F_0a サブユニットを通して H^+ が輸送される。

F_1 モーターについては、1994 年の J. Walker らによる F_1 の結晶構造解析の論文が契機となり、研究が格段に進んだ。 F_1 の原子構造をもとにデザインした実験により回転が証明され、3つの β サブユニットの協調的な構造変化によって β サブユニットの回転が駆動されるというシナリオが確立しつつある。しかし、 F_0 モーターについては、依然としてモーターの基本原理がわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、 F_0a -サブユニットと F_0c -リングを融合し、回転を制御した F_0 モーターを作製し、生化学的分析と結晶化に用いる。そして、プロトン流れで回転する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

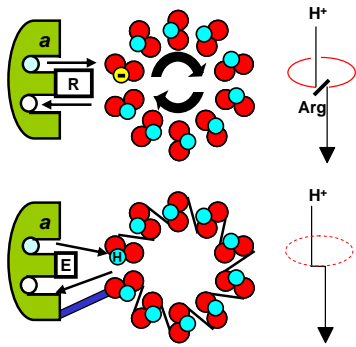
好熱菌 *Bacillus PS3* の ATP 合成酵素を用いて、 F_0c -リングの 10 コピーの c-サブユニットを融合して 1 本のポリペプチドとした $c_{10}F_0F_1$ を作成した (Mitome et. al. **PNAS2004**)。次に、 F_0 の回転を制御するために、10 個の F_0c と F_0a

サブユニットを一本のポリペプチドとして融合した回転のできない $c_{10}-a$ 融合 ATP 合成酵素を作製した。この $c_{10}-a$ 融合 ATP 合成酵素を利用して、生化学的解析を行った。そして、 $c_{10}-a$ 融合 ATP 合成酵素および $c_{10}-aF_0$ の精製条件を検討し、結晶化を行った。

4. 研究成果

ATP 合成酵素の F_0 モーターは、膜を介した H^+ の輸送に伴い回転するモーターである。このモーターは H^+ が F_0a サブユニットと F_0c サブユニットを通る際、 c_{10} リングが ab_2 サブユニットに対して回転する。 F_0a にはすべての生物種の ATP 合成酵素で保存されたアルギニン残基 (*aArg169*) が F_0a と F_0c の境界にあり、 c_{10} リングの回転制御に重要だと考えられている。実際、*aArg169* を Glu, Ala, Val, Ile, Lys, Phe, Trp に置換した変異酵素は、ATP 合成活性、ATP 駆動の H^+ 輸送活性は完全になくなり、 c_{10} リングが回転しないことが示唆された。しかし、これらの *aArg169* 置換変異酵素のうち、R169E, R169A および R169V 変異酵素は H^+ を透過することがわかった。この H^+ の透過は cE56Q 変異により完全に防がれた。 c_{10} リングの回転を制御するために 10 個の F_0c と F_0a サブユニットを一本のポリペプチドとして融合した回転のできない $c_{10}-a$ 融合 ATP 合成酵素を作製した。この $c_{10}-a$ 融合 ATP 合成酵素は c_{10} と F_0a を結ぶリンカーを切断すると活性を持つことから、本来の構造を模倣している。この ($c_{10}-a$) F_0F_1 は H^+ を透過しないが、*aArg169* を Glu, Ala, Gly に置換した ($c_{10}-a$) F_0F_1 は H^+ を透過することが明らかとなった。このことから、*aArg169* は c_{10} リングの回転を介さない短絡的な H^+ の透過を防ぎ、 H^+ の流れを c_{10} リングの回転に連動させる役割があることが明らかとなった (図 1) (Biochemical J. **2010** Mitome et. al.)。

図1: F_0a の Arg は H^+ のショートカットを防ぐ



ATP 合成酵素の F_0 の回転機構を明らかにするためには、結晶構造解析は不可欠である。その難しさの要因の一つは、 F_0 モーターの固定子 (F_0a サブユニット) と回転子 (F_0c -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、しかし、離れてしまわない程度に強いはずである。結晶化のためには、まず、分子を単分散に溶液に溶かすことが必要である。膜蛋白質の場合、これは、界面活性剤存在下でのみ可能である。しかし、界面活性剤は、 F_0a サブユニットと F_0c -リングの微妙な結合を弱めて両者の乖離を促す。この困難を乗り越えるために、まず、安定な好熱菌 *Bacillus PS3* の F_0F_1 を使って、前述の F_0a と c -リングが解離しない $(c_{10-a})F_0F_1$ を作製した。次に、界面活性剤の種類と条件を徹底的に検討した。19 種類の界面活性剤を用いて、膜面分から ATP 合成酵素およびそのサブ複合体 ab_2 の可溶性および精製をおこなった。SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、ATP 加水分解活性測定から、各界面活性剤で得られる複合体の収率、安定性、単分散性、活性を検討した。その結果、ウンデシルマルトシドなどのマルトシド系の界面活性剤で、安定で単分散した ATP 合成酵素および ab_2 を得ることができることを見出した。

回転子の c_{10} -リングと固定子の F_0a サブユニットを融合した変異により、 F_0 の構造が安定化したので、 c_{10-a} の C 末端に導入した His-tag を利用して Ni-NAT カラムで $(c_{10-a})F_0$ を精製することが可能となり、高い純度で F_0

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 $(c_{10-a})F_0$ を得ることができることがわかった。こうして得られた精製した $(c_{10-a})F_0$ と $(c_{10-a})F_0F_1$ がどれくらいの期間、安定であるかを分析したところ、 $(c_{10-a})F_0$ において、 b サブユニットが、4 日以内に切断された。一方、 $(c_{10-a})F_0F_1$ 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_1 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。

また、 ab_2 部分複合体を抗原にして、 F_0 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_2 の細胞質側に結合する抗体と ab_2 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_2 および F_0 に 1:1 で結合することがわかった。

○まとめと展望

F_0 の回転子と固定子を融合できたことから、回転を止めた F_0 の解析が可能となり、 F_0a のアルギニンが H^+ のショートカットを防ぐ役割があることが明らかとなった。この融合変異により、 F_0a の位置を基準に c_{10} リング上の特定の F_0c に変異を導入することができるようになった。この融合変異は、 F_0a と F_0c の相互作用の解析への応用が期待される。好熱菌の ATP 合成酵素はその構造の安定性により、サブユニットを融合して構造を制御した ATP 合成酵素を作製することを可能とした。これは、ATP 合成酵素の結晶構造解析の最大の問題である回転子の向きによる構造多形を一つにするため、構造解析の難易度を下げることが期待できる。

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3件)

① 三留規 蒼、Biochemical study of ATP synthase using fusion protein technique、日韓技術士会議 第40回会議資料、査読無、p78-81、2010

② 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、Essential arginine residue of the F_0 -a subunit in F_0F_1 -ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without c -ring rotation in the F_0 proton channel、*Biochemical Journal*、査読有、430、p171-177、2010、

③ 佐藤宏樹、三留規 蒼、鈴木俊治、吉田賢右、Aqueous access channels in subunit a of sodium transporting F_0F_1 -ATP synthase、*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* :1797、査読無、suppl. 1、p37、2010、査読無

[学会発表] (計12件)

1) 三留規 蒼、Biochemical study of ATP synthase using fusion protein technique、日韓技術士会議、2010年10月17日、下関 海峡メッセ 招待講演

2) Sato, H., Mitome, N., Suzuki, T., Yoshida, M., Aqueous access channels in subunit a of sodium transporting F_0F_1 -ATP synthase, 16th European Bioenergetics Conference, Warsaw, July 17-22, 2010.

3) 三留規 蒼、回転する分子モーターの構造制御技術と機能解析、日本技術士会生物工学会、2009年10月10日、日本技術士会 文京区神谷町 講演発表

4) Noriyo Mitome, Sakurako Ono, Hiroki Sato, Nobuhito Sone, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, The essential Arg of F_0 a subunit in F_0F_1 - ATP synthase

ensures c -ring rotation by preventing a futile proton shortcut, International Symposium Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins Working in Biomembranes, September 8-10, 2009, Kyoto University.

5) 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^+ チャネルを形成するアミノ酸残基の同定、*Biochemistry and Molecular Biology*、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

6) 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、*Biochemistry and Molecular Biology*、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

7) 三留規 蒼、回転ナノモーターの構造制御技術の開発、新世代研究所2007年度採択研究成果報告会、2008年12月5日、SII幕張ホール

8) 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^+ チャネルを形成するアミノ酸残基の同定 第34回日本生体エネルギー研究会2008年11月6-8日、東京医科歯科大学

9) 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、第34回日本生体エネルギー研究会、2008年11月6-8日、東京医科歯科大学

10) 三留規 蒼、ATP合成酵素の構造解析に向けた界面活性剤の検討、膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス、第3回班会議、2008年6月28日、名古屋大学野依記念

学術交流館

- 11) 三留規誉、小野桜子、佐藤宏樹、鈴木俊治、曾根のぶひと、吉田賢右、日本生体エネルギー研究会、2007年11月15-17日、山口大学吉田キャンパス
- 12) 三留規誉、ATP合成酵素の全体構造解析を突破口とした分子機構の解明、膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス第2回班会議、2007年9月4日、新富良野プリンスホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三留 規誉 (MITOME NORIYO)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：90431981