

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15749

研究課題名（和文）哺乳動物FoF1ATP合成酵素全体の高分解能及び動的構造解析

研究課題名（英文）High resolution and dynamic structural analysis of the entire mammalian FoF1ATP synthase

研究代表者

慈幸 千真理（Jiko, Chimari）

京都大学・複合原子力科学研究所・特別研究員（RPD）

研究者番号：70585976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：回転を伴い柔軟性が高いために極めて不安定な哺乳動物ミトコンドリアFoF1ATP合成酵素のモノマー、テトラマー、オリゴマーを形態ごとにサブユニットを解離することなく安定に精製し、単分散性の高いクライオグリッドを作製することに成功した。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析によりI F1結合型テトラマー全体を約7オングストローム分解能の構造を導いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミトコンドリアの内膜に存在し、哺乳動物の生命活動を維持するために必要なATPエネルギーの95%以上を生産し、また近年の研究によってミトコンドリア膜透過性遷移孔（PTP）として機能することが明らかになってきているFoF1ATP合成酵素の高分解能構造解析である。その詳細な構造は、本酵素が関与する疾患の創薬研究の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Monomers, tetramers, and oligomers of mammalian mitochondrial FoF1ATP synthase, which are extremely unstable due to their flexibility with rotation, were stably purified without dissociation of subunits per form, and highly monodisperse cryogrids were successfully prepared. Single-particle structural analysis using cryo-electron microscopy led to a structure of the entire I F1-bound tetramer at approximately 7Å resolution.

研究分野：構造生物学

キーワード：Fo F1ATP合成酵素 ミトコンドリア 単粒子構造解析

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内膜のプロトン輸送を駆動力とする ATP 合成は哺乳動物の生命活動を維持するために重要なエネルギー変換機構であり、29 サブユニットからなる分子量 60 万の膜蛋白質複合体である FoF1ATP 合成酵素が担っている。本酵素は、ATP の 90%以上を生産するだけでなく (Boyer, Annu. Rev. Biochem., 1997)、ミトコンドリア内膜の形成にも重要な役割を果たしている (Davies et al., PNAS, 2012, Jiko et al., eLife, 2015)。また本酵素の機能不全はアポトーシス (細胞死) を招くと示唆されており (Giorgio et al., PNAS, 2013)、さらに神経変性疾患や代謝異常疾患に関与していることから (Kucharczyk et al., BBA, 2009)、本酵素の精緻な立体構造の解明は今後の薬剤分子設計における重要な基盤となると考えられ、広く研究が進められている。このような生物学的、医学的な重要性から、FoF1ATP 合成酵素については、50 年以上にもわたって構造解明の取り組みがなされているものの、原子レベルで全体構造が解明されていないことによって、FoF1ATP 合成酵素の働きについて理解が遅れている。本酵素は、膜に結合するドメインの Fo (エフ・オー) と可溶性ドメイン F1 (エフ・ワン) から構成されており、これまでに、F1 ドメインの構造が X 線回折実験により解析された結果 (Walker, ノーベル賞, 1997)、F1 ドメインが回転することで、ADP と Pi から ATP が合成されるという、回転触媒反応による化学エネルギー変換機構が明らかになった (Noji et al., Nature, 1997)。また、クライオ電子顕微鏡 (Henderson et al., ノーベル賞, 2017) によって、酵母の Fo 二量体が部分的に 3.6Å 分解能で構造解析されたが (Guo et al., Science, 2017)、全体構造でないためにプロトンポンプのメカニズム全容は未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3. 研究の方法 ~ の取り組みによって本酵素について原子レベルの高い分解能で構造を決定すること、及び動的立体構造変化を解明することである (Fig.1)

3. 研究の方法

本研究では、FoF1ATP 合成酵素全体を安定化させる精製方法を確立して三次元結晶を製作し、その全長について X 線により構造解析し、クライオ電子顕微鏡 (クライオ電顕) を用いて、5Å 分解能を目標とする単粒子構造解析を行い、加えて本酵素の回転によって形成される種々のコンフォメーションで本酵素を精製し、クライオ電顕で 10Å 分解能の構造を決定する。

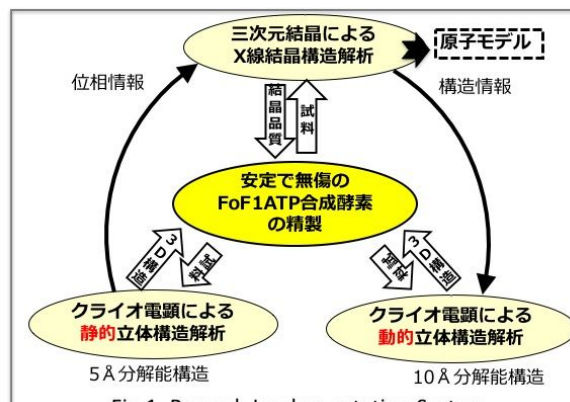


Fig.1: Reserch Implementation System

4. 研究成果

本酵素は、回転を伴い柔軟性が高いために極めて不安定で、精製することが困難であることから、その構造解析を難しくしている。本研究では、まず、本酵素の全長を安定で無傷な状態で精製することに重点をおき研究を行った結果、哺乳動物ミトコンドリア FoF1ATP 合成酵素モノマー、テトラマー、オリゴマーの形態ごとに大量に精製することに成功した (Fig.2)。

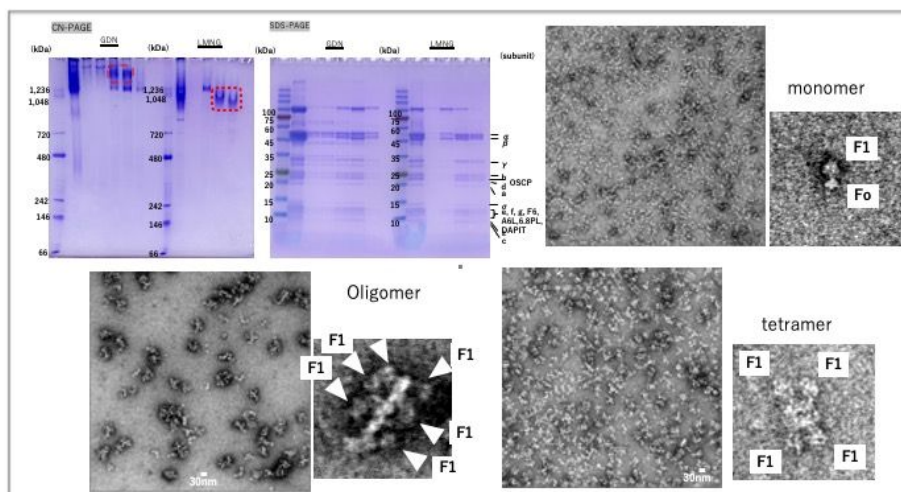
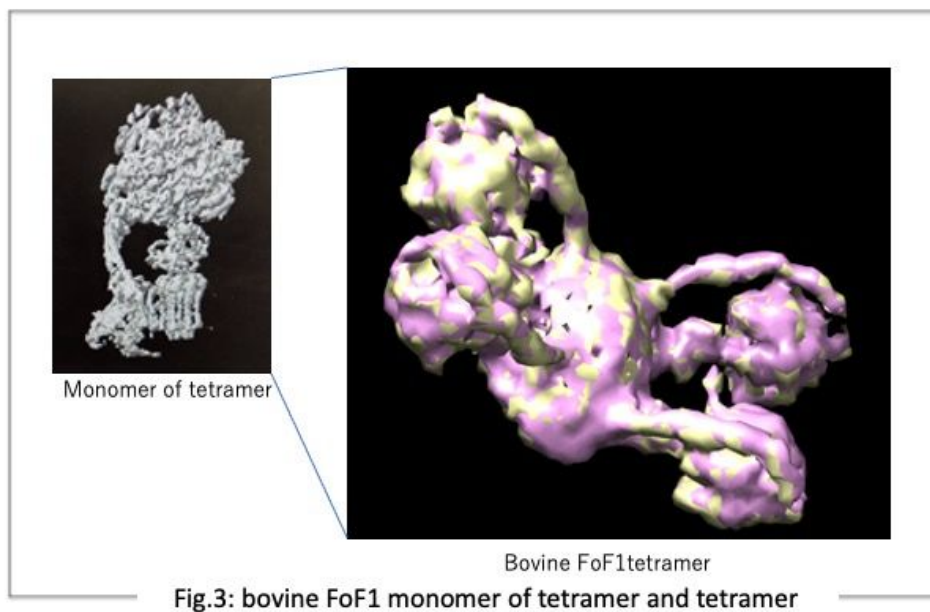


Fig.2: bovine FoF1 monomer, tetramer, and oligomer

その成果は京都大学から精製した哺乳動物ミトコンドリア FoF1ATP 合成酵素オリゴマーとして国際出願を済ませた (国際公開番号 WO2023/0331101A1)。さらに精製の詳細については論文を投稿し、現在レビュー中である。次にその高度に精製した試料を用いて、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析から取り組んだ。生体膜内で本酵素は高次集合体(オリゴマー)を形成するが、**機能する最小単位はテトラマー**であると考えられているため、本酵素テトラマーのクライオグリッド作製を行った。クライオグリッド作製のためには、精製過程で用いたショ糖の除去や、試料を濃縮する必要があった。しかし、透析や濃縮膜を本酵素に使用することが不可能であることがわかったため、Polyethylene glycol を使用して溶液交換と濃縮を同時に可能にする方法を見出した。これにより単分散性の高いクライオグリッドを作製することができ、共同研究により IF1 結合型 FoF1ATP 合成酵素テトラマーの構造を全体で約 7 Å、テトラマー中のモノマーにフォーカスして 3.6 Å の構造を導いた (Fig.2)。



今後、更なるデータを収集し、高分解能構造を導きたいと考えている。

また、Gu 博士らの研究成果 (Gu et al., Science, 2019) により、内在性阻害蛋白質 IF1 は、哺乳動物本酵素テトラマー状態を安定化させ、1つのコンフォメーションに固定されることがわかった。IF1 は、ATP 合成酵素の精製で従来使用されたカラム樹脂を用いた方法では、簡単に除去されてしまう。しかしながら、我々の開発した精製方法では、IF1 が解離しない溶液条件を満たしながら、またカラムを使用していないため、天然の IF1 結合型テトラマーが精製できる。このことから、X線回折実験で用いる三次元結晶化においても、クライオ電顕による単粒子構造解析においても好都合である。今後、結晶中に分子を固定することで、高分解能の構造決定が容易である点がメリットである X線結晶構造解析を行い、クライオ電顕の単粒子構造解析を組み合わせ、酵素全長の高分解能構造解析を行い、IF1 結合テトラマー酵素の正確な原子の位置を決定する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Perez, R., Beninca, C., Fernandez del Rio, L., Baghdasarian, C. Shu S., Zanette, V., Gerle, C., Jiko, C., Khairallah, R., Khan, S., Pacheco, D. R. F., Shabane, B., Erion, K., Masand, R., S. Dugar, S., Ghenoiu, C., Schreiner, G., Stiles, L., Liesa, M., Shirihai, O.S.	4. 巻 e111699
2. 論文標題 Inhibition of ATP-synthase reverse-activity restores energy homeostasis in mitochondrial pathologies.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111699	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 該当する

1. 著者名 Hernandez, A., Asseri, A.H., Purugganan, A.J., Jiko, C., deRam, C., Lill, H., Pabst, M., Mitsuoka, K., Gerle, C., Bald, D., McMillan, D.G.G.	4. 巻 9
2. 論文標題 Rapid and Highly Stable Membrane Reconstitution by LAiR Enables the Study of Physiological Integral Membrane Protein Functions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 494,507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.2c01170	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 該当する

1. 著者名 Urbani A, Giorgio V, Carrer A, Franchin C, Arrigoni G, Jiko C, Abe K, Maeda S, Sginzawa-Itoh K, Bogers JF, McMillan DG, Gerle C, Szabo I, Bernardi P	4. 巻 4341
2. 論文標題 Purified F-ATP synthase forms a Ca ²⁺ -dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12331-1	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 FoF1-ATP合成酵素オリゴマー	発明者 慈幸千真理, 森本幸生, GERLE Christoph	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/032925	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 F o F 1 - A T P 合成酵素オリゴマー	発明者 慈幸千真理、森本幸生、ゲーレ・クリストフ	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-142046	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------