

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790048

研究課題名(和文)ポリフェノール類を用いたATP合成酵素の機能解析

研究課題名(英文)Mechanism of inhibition of ATP synthase by phytopolyphenols

研究代表者

關谷 瑞樹 (Sekiya, Mizuki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70509033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ATP合成酵素はF1部分で行われるATPの合成・分解とF0部分のプロトン輸送をサブユニットの回転により共役させる酵素である。本研究課題では、ポリフェノール類によるATP合成酵素に対する阻害作用を検討し、curcumin及びその類縁体が強いF1阻害作用を有すること、piceatannolがサブユニット間相互作用に影響を与え、F1を阻害することを明らかにした。さらに piceatannol と系統的変異導入を組み合わせ、触媒活性と回転の共役にサブユニット間相互作用が重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：ATP synthase generate ATP using energy from a proton motive force across the membrane. Their mechanism includes subunits rotation, which are essential for energy coupling between proton transport and catalysis. We have studied the inhibitory effects and inhibition mechanism of phytopolyphenols. I found curcumin and its analogues inhibited ATP synthase F1 sector. We also found piceatannol and beta-gamma interface mutation affect the rate-limiting transition step, even though they perturb physically separated rotor-stator interactions. These data indicate that both rotor-stator interaction sites contribute to formation of the rate limiting transition state.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ATP合成酵素 ポリフェノール F-ATPase

1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素は ATPase 活性を持つ F_1 部分 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) と膜内で H^+ 輸送路を形成する F_0 部分 (ab_2c_{10}) からなり、ATP の合成・分解に伴ってサブユニット複合体が回転するモーターであることが知られている (図 1)。

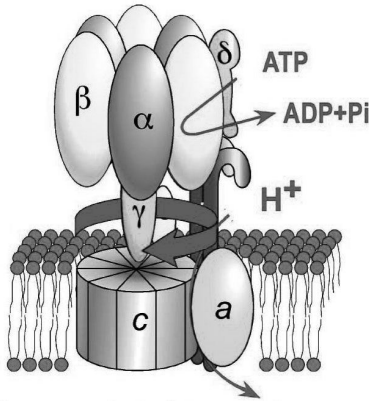


図1 ATP合成酵素のモデル図

ATP の合成・分解という化学反応はサブユニット複合体の回転を介して H^+ 輸送と共役している。化学反応と回転は β - γ サブユニット間の相互作用により共役しており、効率の高い共役のために β - γ 相互作用は回転の各ステップで制御されていると考えられる。しかし詳細な分子機構は明らかでない。

ATP 合成酵素は電子伝達 (呼吸) により形成されるプロトンの濃度勾配を駆動力として ATP 合成の役割を担っている。病原微生物も例外でなく、休眠状態で多剤耐性の結核菌において、菌の生存に本酵素が必須であることが明らかとなっている。ヒトにおいては、虚血性疾患の際に酸化リン酸化が停止すると、ATP 合成酵素が本来と逆反応である ATP の加水分解を行い、虚血部位の壊死を促進することが知られている。

したがって、ATP 合成酵素の詳細な駆動機構を解明することは生物にとって最も基本的な酵素を理解するに止まらず、新規医薬品の開発、あるいはナノメートルサイズの分子マシンの開発にもつながる。

2. 研究の目的

本研究課題では①ATP 合成酵素を強力に阻害するポリフェノール類を見出すこと、②ポリフェノール類のATP 合成酵素阻害機構を解明し、同酵素の駆動機構を理解すること、を目的とした。

①Resveratrol, piceatannol, quercetin などのポリフェノール類化合物は抗菌、抗腫瘍、抗炎症、心筋保護作用などを有しており、ATP 合成酵素は標的分子の1つとして知られている。一方で curcumin 類もポリフェノールの1種であるが、ATP 合成酵素に対する作用は詳細に検討されていなかった。

そこで、天然または合成類縁体の ATP 合成酵素阻害作用を評価し、阻害に重要な構造を検討した。また、大腸菌に対する抗菌作用を評価し、酵素の阻害作用と大腸菌の増殖の相関性を検討した。

②Resveratrol, piceatannol, quercetin は結晶構造解析の結果から F_1 部分の回転子である γ サブユニットと固定子である α, β サブユニットの間にはさまるように結合することが明らかにされている。そこで、上記の化合物が結合した際に回転に与える影響を詳細に解析した。粘性抵抗の小さな粒子をプローブとして用い、 F_1 部分の ATP 分解活性と関連した一分子ごとの回転を観察した。各反応段階や熱力学的パラメータを評価し、ポリフェノール類による β - γ サブユニット間相互作用への影響を検討した。また、 β - γ サブユニット間相互作用に欠損のある変異酵素を用い、ポリフェノール類と組み合わせて回転を評価し、酵素の阻害部位の回転触媒機構における役割を検討した。

ポリフェノール類は多様な薬理作用を持ち、かつ毒性が低いことから、標的タンパク質の阻害様式を明らかにすることは新たな薬剤を開発する上で有用な情報になると考えた。また、既知の阻害剤だけでなく類縁体を合成し、活性評価を行うことで新規医薬品のシーズ化合物の探索にもつながる。さらに、ポリフェノール類を用い、ATP 合成酵素の回転機構をアミノ酸残基レベルで明らかにし、サブユニットの回転を伴う本酵素の生体内における重要性に迫ることができると考えた。

本研究は ATP 合成酵素の作動機構の研究に生化学的手法に加え、薬剤と変異導入、そして一分子観察を駆使している点を特色としている。解析方法も研究代表者が見出した「酵素の停止状態」を解析し、「一分子観察へ熱力学」を導入するという特色あるものとなっている。また、酵素の阻害薬剤と系統の変異体を組み合わせて、一分子観察を行う試みは報告されておらず、ATP 合成酵素の機能について効果的に新たな知見が得られると考えた。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の3つの方向性で研究を実施した

(1) ATP 合成酵素を阻害する新たなポリフェノール類の探索

Curcumin 類縁体は抗菌、抗腫瘍、抗炎症抗酸化作用など多様な生物活性が知られており ATP 合成酵素を標的分子の候補と考えた。そこで curcumin 及びその類縁体について市販の化合物ライブラリーを活用するとともに、東北大学大学院薬学研究科の岩淵好治教授より合成・供給を受けた。化合物群の F_1 ATPase 阻害作用と酸化リン酸化に依存した大腸菌の増殖阻害作用を評

価した。得られた結果から、curcumin の F_1 ATPase 阻害作用や大腸菌の増殖阻害作用に重要な構造部位を検討した。

(2) ポリフェノール類の ATP 合成酵素阻害メカニズムの解析

阻害剤には F_1 部分を阻害することが明らかになった resveratrol, piceatannol, quercetin, curcumin を用いた。結晶構造を見ると resveratrol, piceatannol, quercetin は、回転子(ローター)である γ サブユニットと固定子(ステーター)である α , β サブユニットの間にはさまるように結合している。ATP 合成酵素の回転には β - γ サブユニット間相互作用が極めて重要であることが明らかになっているが、ポリフェノール類はこの相互作用に影響を与えていると推定した。そこで、当研究室で確立した一分子観察法を駆使して、ポリフェノール類による β - γ サブユニット間相互作用への影響を詳細に解析した。粘性抵抗ができる限り小さい金ビーズをプローブとし、精製した大腸菌 ATP 合成酵素(F_1 または F_0F_1)の回転をレーザー顕微鏡で検出した(図2)。

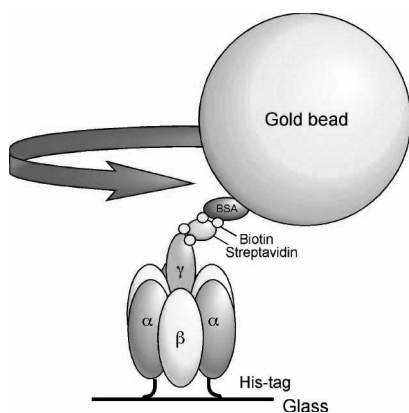


図2 一分子観察のモデル図

化合物を添加した際の ATP 合成酵素の回転を観察した。回転には反応段階に応じた 120° ごとのステップがあり、回転速度には確率的なゆらぎが存在する。また、本酵素は秒単位で停止と連続した回転を繰り返すことも研究代表者らによって明らかにしている。そこで、薬剤による 120° ごとのステップの長さ、速度のゆらぎの大きさ、停止時間の長さ割合などについて評価した。同時に回転速度を熱力学的に解析し、回転の遷移状態における薬剤の影響を見積もり、ポリフェノール類が β - γ サブユニット間相互作用に与えるエネルギーの寄与を検討した。

(3) ポリフェノール類を利用した ATP 合成酵素の触媒機構の解析

β - γ サブユニット間相互作用に重要なアミノ酸残基の変異酵素にポリフェノール類を加え、一分子観察を中心に詳細な解析

を行った。研究代表者らはすでに γ Met23 や β Glu381 が β - γ サブユニット間相互作用に重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。そこで γ Met23 や β Glu381 及び周辺のアミノ酸残基に系統的な変異を導入し、精製した変異酵素にポリフェノール類を加えたときの酵素活性・回転速度を評価した。さらに、ステップや停止、熱力学的解析を行い、得られた結果を高次構造と対応させ、ポリフェノール類の結合部位と γ Met23- β Glu381 の β - γ サブユニット間相互作用における協調性を検討した。

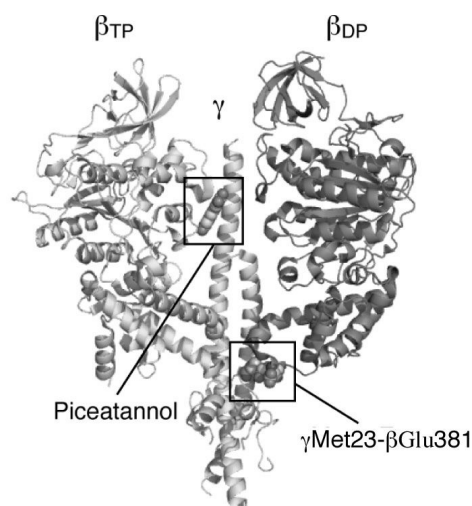


図3 F_1 部位における piceatannol の結合部位と γ Met23- β Glu381 の位置

4. 研究成果

(1) ATP 合成酵素を阻害する新たなポリフェノール類の探索

Curcumin は F_1 ATPase を濃度依存的に抑制した。阻害様式は非競合阻害で、 K_i を $1 \mu\text{M}$ と見積もった。類縁体を用いた構造活性相関の検討により、curcumin の $4'$ -ヒドロキシ基と $1,3$ ジケトン構造が阻害作用に重要であることが示唆された。また、 $3'$ -メトキシ基を一箇所脱離させた DMC は強力に F_1 ATPase を阻害することを明らかにした。一方で $3'$ -メトキシ基を2箇所脱離させた BDMC は阻害作用を示さなかった(図4)。さらに、curcumin は酸化的リン酸化に依存した大腸菌の増殖を抑制した。また、DMC は curcumin より強力な作用を示し、BDMC は作用を示さなかった。したがって、curcumin 及び DMC は ATP 合成酵素を阻害することで大腸菌の増殖を阻害することが示唆された(図5)。成果は現在国際誌に投稿中である。

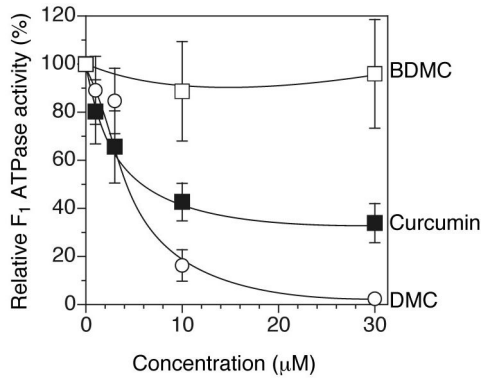
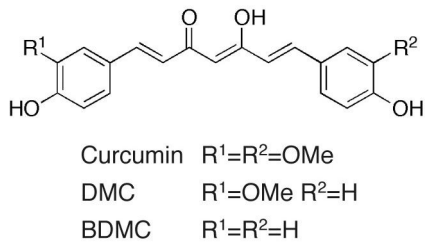


図 4 Curcumin 類の化学構造 (上) と F₁ ATPase 阻害作用 (下)

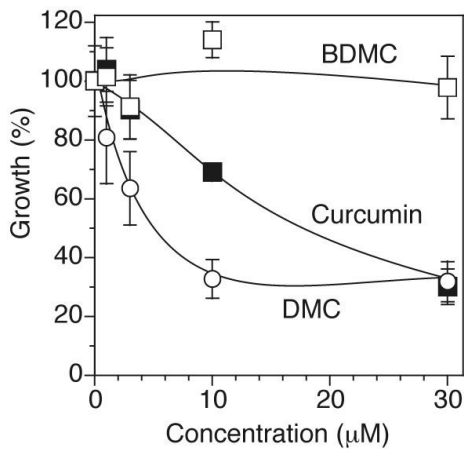


図 5 Curcumin 類の大腸菌に対する増殖抑制作用(コハク酸を炭素源に添加しており増殖は酸化的リン酸化に依存する)

(2) ポリフェノール類の ATP 合成酵素阻害メカニズムの解析

まず piceatannol の ATP 合成酵素阻害メカニズムを検討した。Piceatannol は F₁ の回転速度を最大で約 70% 低下させた (図 6)。回転のステップを詳細に解析すると、120°ごとに catalytic dwell を約 10 倍延長させることが明らかになった (図 7)。Catalytic dwell の延長作用は γC 末端を短縮することによって消失した。したがって piceatannol は γC 末端を標的とすることが確認された。また、熱力学的解析により、piceatannol の添加によって catalytic dwell から 120° 回転に移る際の活性化エネルギー

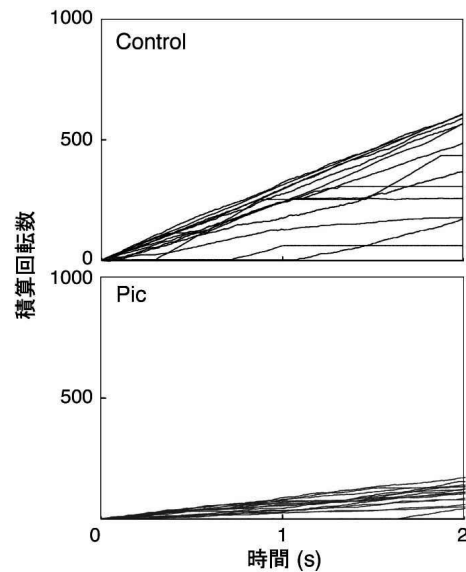


図 6 DMSO のみ (Control) と 200 μM piceatannol (Pic) を添加した F₁ の回転のタイムコース

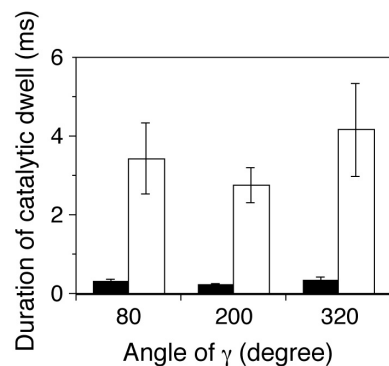
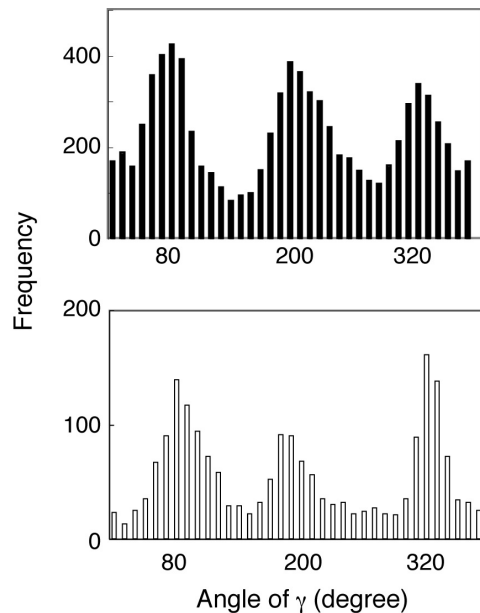


図 7 DMSO のみ (Control) と 200 μM piceatannol (Pic) を添加した F₁ の回転の角度 (上) と catalytic dwell の平均時間 (下)

ー、エンタルピー、エントロピーのいずれもが上昇した。したがって、piceatannol は β と γ が作る空間に結合することにより、catalytic dwell でサブユニット間相互作用を増加させ、回転を阻害することが示唆された。

続いて、curcumin の ATP 合成酵素阻害メカニズムを検討し、piceatannol と比較した。Curcumin も F_1 の回転速度を約 70%低下させ、catalytic dwell を約 10 倍延長させることを明らかにした。一方 γ C 末端を短縮した変異体に対しても同様の作用を示した。したがって、curcumin は他のポリフェノール類とは異なるメカニズムで ATP 合成酵素を阻害したと考えられる。

(2)ポリフェノール類を利用した ATP 合成酵素の触媒機構の解析

続いて、piceatannol をバイオプローブとして、 F_1 の γ C 末端における β - γ 相互作用の重要性を検討した。これまでに結晶構造解析や熱力学的解析などから、 β - γ サブユニット間相互作用に γ C 末端領域と γ Met23 周辺が重要と考えられている。 γ Met23Lys 変異体は β Glu381 と水素結合を形成し、 β - γ の相互作用を増加させる。そこで、異なる位置で β - γ サブユニット間相互作用を増加させる piceatannol と γ Met23Lys 変異体を組み合わせて、回転を観察し、熱力学的解析を行った。その結果、 γ Met23Lys 変異 F_1 に piceatannol を添加すると、catalytic dwell は相乗的に延長した。また、活性化エネルギー、エンタルピー、エントロピーはさらに増加した。したがって、離れた位置にある γ C 末端領域と γ Met23 周辺は同じ反応段階で β - γ サブユニット間相互作用に関わっていることが示唆された。成果は Journal of Biological Chemistry に報告した。

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. M. Sekiya, R. K. Nakamoto, M. Nakanishi-Matsui and M. Futai. Binding of the phytopolyphenol piceatannol disrupts β/γ subunit interactions and the rate limiting step of steady state rotational catalysis in the *Escherichia coli* F_1 -ATPase. (2012) J. Biol. Chem., 287, 22771-22780.
2. M. Futai, M. Nakanishi-Matsui, H. Okamoto, M. Sekiya and R. K. Nakamoto. Rotational

catalysis in proton pumping ATPases: from *E. coli* F-ATPase to mammalian V-ATPase. (2012) Biochim. Biophys. Acta, 1817, 1711-1721.

3. M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, and M. Futai. Rotating proton pumping ATPases: subunit /subunit interactions and thermodynamics. (2013) IUBMB Life, 65, 247-254.

[学会発表](計6件)

1. 關谷瑞樹、Robert K. Nakamoto、中西(松井)真弓、二井將光：一分子観察によるポリフェノール類の ATP 合成酵素阻害機構(生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、京都、2012年11月16日)
2. 千葉瑛子、佐藤桃恵、關谷瑞樹、久坂亮介、山越博幸、高山亜紀、柴田浩行、中西(松井)真弓、岩淵好治、二井將光：クルクミン類縁体による ATP 合成酵素の阻害作用(日本薬学会第 133 年会、横浜、2013年3月28日)
3. 久坂亮介、關谷瑞樹、千葉瑛子、佐藤桃恵、岩本(木原)昌子、中西(松井)真弓、二井將光：クルクミンによる ATP 合成酵素の阻害機構の解析(日本薬学会第 133 年会、横浜、2013年3月28日)
4. 關谷瑞樹、Robert K. Nakamoto、吉田秀成、西山枝里、(松井)真弓、二井將光：ポリフェノール類による ATP 合成酵素阻害メカニズムの解析 (FAOBMB Mini-Symposium、岩手矢巾、2013年4月6日)
5. 關谷瑞樹、久坂亮介、西山枝里、千葉瑛子、佐藤桃恵、岩本(木原)昌子、二井將光、中西(松井)真弓：クルクミンによる ATP 合成酵素阻害メカニズムの解析(第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013年9月12日)
6. 關谷瑞樹、鈴木彩香、二井將光、中西(松井)真弓：ポリエーテル α -ピロンによる ATP 合成酵素阻害メカニズム(日本薬学会第 134 年会、熊本、2014年3月30日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

關谷瑞樹 (Mizuki Sekiya)

研究者番号：70509033

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

()

研究者番号：