

## ATP合成酵素の構造、回転、制御

Structure, rotation and regulation of ATP synthase

吉田 賢右 (Yoshida Masasuke)  
東京工業大学・資源化学研究所・名誉教授



研究の概要：ATP合成酵素（FoF1）は、細胞のエネルギー通貨であるATPを合成する重要な膜酵素であり、回転するモーターである。この酵素全体の作用機構を知るために、原子レベルの構造、回転のメカニズム、および制御機構を解明する。

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：5802

キーワード：ATP合成酵素、回転モーター、FoF1、ATP

### 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、細菌の膜にあまねく存在し、 $H^+$ （プロトン）の流れでATPを合成（嫌気性菌の場合はその逆反応を）している生命に必須の酵素である。ATP合成酵素は、回転モーターである。つまり、 $H^+$ （プロトン）の流れで中心部のシャフトが回転し、この回転によってATP合成の触媒部位の構造が順番を追って変化し、この変化によってATPが合成される。逆にATPを加水分解してシャフトを逆回転し、 $H^+$ をポンプする。この酵素の仕組みを知るためには、その原子構造を知ることが前提となる。しかし、 $F_1$ など部分構造は知られているものの、全体構造は未知である。また、化学的ステップと回転ステップの対応もはっきりしていない。さらに制御については、わずかな手がかりしかない。

### 2. 研究の目的

ATP合成酵素の全体構造を解き、化学ステップと回転ステップの対応をはっきりさせ、制御機構の概要をつかむ。

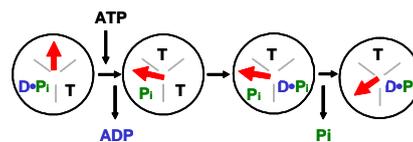
### 3. 研究の方法

ATP合成酵素の全体の結晶化のためには、その回転による構造異性の出現を抑える必

要があると考え、回転子と固定子を遺伝子的に融合したATP合成酵素を作製する。さらに $\epsilon$ サブユニットの構造異性を防ぐためにこれも他のサブユニットに融合する。結晶化に有利だと考えられる好熱菌の酵素を材料とする。回転の分析には、3つの触媒 $\beta$ サブユニットのうち1つだけを性質の変わったものに置き換えたキメラ酵素で、回転を解析する。制御については、制御 $\epsilon$ サブユニットを何が制御しているのか、様々の条件で検討する。

### 4. これまでの成果

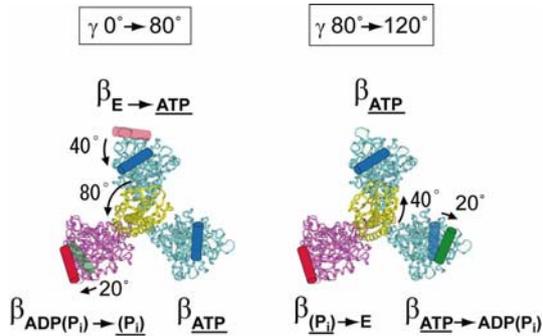
キメラ酵素の回転の1分子解析によって、回転角0度の位置で酵素の触媒 $\beta$ サブユニットに結合したATPは200度の位置で加水分解されることがわかった。また無機リン酸の解離も、おそらく200度で起こり、これが次の40度の回転を引き起こす。120度で示すと下図のようになるが、 $P_i$ がD- $P_i$ 部位から外れる可能性も強い。



TはATP, DはADP,  $P_i$ は無機リン酸。赤い矢印は回転子である $\gamma$ サブユニットの向きを示す。最初に80度、次に40度回転する。

#### [ 4. これまでの成果 (続き) ]

一方、キメラ酵素の1つの触媒 $\beta$ サブユニットに蛍光色素をしっかりと固定し、回転と蛍光色素の偏向面の変化を同時に測定し、回転に伴う下図のような構造変化を検出した。



F1の既知の結晶構造は80度の構造であり、0度においては1つの $\beta$ サブユニットは半分“閉じた”構造をとっていることが示唆された。

好熱菌 $\epsilon$ サブユニットの構造が決まり、推定どおり、C末端ヘリックスはATPを結合したときだけ安定したヘアピン構造であった。1分子観察から、ATPが低濃度になると $\epsilon$ サブユニットのヘアピン構造は不安定となり、ADP阻害による回転停止時間を数倍延長した。

#### 5. 今後の計画

ATP合成酵素の全体の結晶解析は、まだ追及中である。さまざまな工夫をしているが、現在、良好な回折を示す結晶は得られていない。また、 $H^+$ イオンの流れによる回転の直視も達成できていない。今後は、このもっとも困難な部分に研究努力を傾注する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Tsumuraya M, Furuike S, Adachi K, Kinoshita K Jr, **Yoshida M**. Effect of epsilon subunit on the rotation of thermophilic *Bacillus* F1-ATPase. *FEBS Lett.* 583, 1121-1126 (2009).

Yagi H, Kajiwara N, Iwabuchi T, Izumi K, **Yoshida M**, Akutsu H. Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F1-ATPase

beta subunit revealed by NMR. *J Biol Chem.* 284, 2374-2382 (2009)

Masaike T, Koyama-Horibe F, Oiwa K, **Yoshida M**, Nishizaka T. Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F(1)-ATPase correlate with 80 degrees and 40 degrees substep rotations. *Nat Struct Mol Biol.* 15, 1326-1333 (2008)

Ariga T, Muneyuki E, **Yoshida M**, F<sub>1</sub>-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14, 841-846 (2007)

ホームページ

<http://www.res.titech.ac.jp/~seibutu/home.html>