

## ATP合成酵素の構造と制御と生理

Structure, regulation and physiology of ATP synthase

吉田 賢右 (YOSHIDA MASASUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・教授



### 研究の概要

細胞にエネルギーを供給する ATP 合成酵素の制御機構、制御不調の細胞や個体の生理、その基本となる ATP 合成酵素の構造解明を目的とする。現在までに、ヒト ATP 合成酵素の回転触媒の素過程、ミトコンドリア ATP 合成素過程の酵素の阻害因子 IF1 の個体生存と繁殖における代替性、ヒト ATP 合成酵素の量を制御する新しい因子、などを発見した。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生体エネルギー変換・酵素の調節・ATP 合成

### 1. 研究開始当初の背景

すべての生き物のすべての細胞の中において、ATP はエネルギー通貨として使われている。ADP とリン酸から ATP を再び合成するのは ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ ) で、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の膜に存在している。この酵素は、 $H^+$ の流れで回転する  $F_0$  モーターと、ATP 加水分解で回転する  $F_1$  モーターが、共通の回転シャフトで連結し、 $H^+$ の流れと  $ATP \rightleftharpoons ADP + \text{リン酸}$  のエネルギーを交換する。細胞の ATP の消費需要と合成能力とは刻一刻変化している。では、それに応じて ATP 合成酵素はどのように制御されているか。細菌における  $\epsilon$  サブユニットの構造変化による阻害、植物における  $\gamma$  サブユニットの酸化による阻害、動物における因子 IF1 による阻害、など *in vitro* の知見があったが、実際の生理にどう関わるのか、よくわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

ヒトを含む動物ミトコンドリアの ATP 合成酵素を中心に、その制御の分子機構、細胞生理、欠陥個体の病態、を解明する。また、ATP 合成酵素の全体構造の結晶解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) ATP 合成酵素の制御の分子機構

ヒト  $F_1$  の大腸菌発現の成功とその回転の 1 分子観察系を開発した。また、回転を外部磁場で制御ないし強制する実験系で、回転トル

クの制御を観察できる系をつくりあげた。

#### (2) 制御欠陥のある細胞と個体の生理

私たちの開発したハイスループットの培養細胞ミトコンドリア ATP 合成活性測定法を駆使する。これで網羅的なノックダウンをおこない未知の制御因子の探索をおこなう。また、IF1 のノックアウトマウスを作製し、その病態を解明する。

#### (3) ATP 合成酵素の原子構造の解明

ATP 合成酵素は、世界の多数のグループの構造解明の挑戦を、この 20 年間ことごとくしりぞけてきた。回転する「すべる」結合、停止位置の違いによる回転異性の存在、などが問題である。サブユニット融合 ATP 合成酵素、またモノクローン抗体を結合した酵素の結晶化を行う。

### 4. これまでの成果

細菌の  $F_1$  モーターの回転子に磁気ビーズを付着して外部磁場でモーターを強制的に回転させてその時に生じる抵抗の精密な測定から、 $F_1$  は 0 度、40 度、80 度でトルクを発生することがわかった。40 度のトルクは新発見であり、どの触媒過程がこれに対応するのか、興味もたれる。

ヒト  $F_1$  の回転の 1 分子観察から、ヒト  $F_1$  は 0 度、65 度、90 度のサブステップ回転を行うことがわかった。0→65 度は ATP の結合、65→90 度はリン酸の解離、90 度で ATP 加水分解が起きて 120 度まで回転し 1 サイクルとなる。このサイクルは細菌の場合と違ってお

り、ATP 合成酵素が進化の中でステップを変化させる柔軟性をもつ分子であることがわかった。

ATP 合成酵素の量を制御する新しい因子 (Orf47) を発見した。この因子が不足するとミトコンドリアの ATP 合成酵素が顕著に減少する。

細菌の ATP 合成酵素は  $\epsilon$  サブユニットによって阻害されるが、その阻害が無効となる変異枯草菌は孢子の産生に障害がおこることがわかった。大腸菌は塩水の中の生育に  $\epsilon$  サブユニットが必要であった。このように  $\epsilon$  の生理的な作用は細菌ごとにいろいろである。植物葉緑体の ATP 合成酵素の  $\gamma$  サブユニットは、日の出とともに還元されて酵素は活性化、日暮れになると酸化されて不活性化することを野外の生きたホウレン草で見出した。ミトコンドリア ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 を完全に失ったノックアウトマウスを作成した。驚いたことに、調べた限り健康であった。IF1 の阻害作用は今まで *in vitro* の実験で多くの報告があるが、実は個体では essential ではなかった。あらたな視点で制御の研究を見直す必要がある。

ATP 合成酵素の結晶解析は、いろいろ試みているがまだ成功のめどがたっていない。

#### 5. 今後の計画

上記の研究をさらに続ける。特に、ノックアウトマウスについて、IF1 が必須となるストレス条件があるはずである (さもなければ酵母からヒトまで保存されない)。その条件を探る。結晶解析については、さらに努力を続けるとともに、最近簡便な精製法を確立したウシ ATP 合成酵素の結晶化も試みる。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Hara, K. Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Yoshida M., and Kino, K. (2011) "ATP photosynthetic vesicles for light-driven bioprocesses", *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1133-1138.
2. Taniguchi N, Suzuki T, Berney M, Yoshida M., Cook GM. (2011) The regulatory C-terminal domain of subunit  $\epsilon$  of  $F_0F_1$  ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 193: 2046-52.
3. Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. (2011) Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F(o)F(1)-ATP Synthase by epsilon-subunit. *J Biol Chem.* 286: 16807-16813.
4. Ohsakaya S, Fujikawa M, Hisabori T, Yoshida M. (2011) Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem.* 286: 20292-6.

5. Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M., Suzuki T. (2011) Efficient ATP synthesis by thermophilic *Bacillus*  $F_0F_1$ -ATP synthase. *FEBS J.* 278: 2647-54.
6. Kohori A, Chiwata R, Hossain MD, Furuike S, Shiroguchi K, Adachi K, Yoshida M., Kinoshita K Jr. (2011) Torque generation in  $F_1$ -ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophys J.* 101: 188-95.
7. Rak M, McStay GP, Fujikawa M, Yoshida M., Manfredi G, Tzagoloff A. (2011) Turnover of ATP synthase subunits in  $F_1$ -depleted HeLa and yeast cells. *FEBS Lett.* 585: 2582-6.
8. Watanabe R, Okuno D, Sakakihara S, Shimabukuro K, Iino R, Yoshida M., Noji H. (2011) Mechanical modulation of catalytic power on  $F(1)$ -ATPase. *Nat Chem Biol.* 8(1): 86-92.
9. Usukura E, Suzuki T, Furuike S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. (2011) Torque generation and utilization in motor enzyme  $F_0F_1$ -atp synthase: half-torque  $F_1$  with short-sized pushrod helix and reduced atp synthesis by half-torque  $F_0F_1$ . *J Biol Chem.* 287: 1884-91.
10. Kuruma Y, Suzuki T, Ono S, Yoshida M., Ueda T. (2012) Functional analysis of membraneous Fo-a subunit of  $F_1F_0$ -ATP synthase by *in vitro* protein synthesis. *Biochem J.* 442, 631-638.
11. Konno H, Nakane T, Yoshida M., Ueoka-Nakanishi H, Hara S, Hisabori T. (2012) Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* 53: 626-34.
12. Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Todokoro Y, Tanaka K, Okada O, Fujiwara T, Yoshida M., Akutsu H. (2012) Purification, characterization and reconstitution into membranes of the oligomeric c-subunit ring of thermophilic F(o)F(1)-ATP synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 82: 396-401.
13. Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. (2012) Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial  $F_0F_1$ , to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. *J Biol Chem.* 287: 18781-7.
14. Adachi K, Oiwa K, Yoshida M., Nishizaka T, Kinoshita K Jr. (2012) Controlled rotation of the  $F(1)$ -ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nat Commun.* 3:1022.

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~fmotojim/index-j.html>