

戦略的創造研究推進事業
ERATO
吉田 ATP システムプロジェクト
追跡評価用資料

2012 年 6 月

科学技術振興機構

目次

目次.....	1
報告書要旨.....	2
プロジェクトの展開状況.....	4
第1章 プロジェクトの概要.....	5
1.1 スタート時の背景とプロジェクトの狙い.....	5
1.2 プロジェクトの研究成果.....	7
1.2.1 ATP 合成酵素.....	7
1.2.2 V-ATP アーゼ.....	8
1.2.3 エネルギー変換システム制御（植物の ATP 合成酵素）.....	9
1.2.4 電子伝達系.....	10
第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況.....	11
2.1 各研究テーマの展開、および、現在の状況.....	11
2.1.1 ATP 合成酵素.....	11
2.1.2 V-ATP アーゼの構造と機能.....	12
2.1.3 植物の ATP 合成酵素.....	12
2.2 参加研究者の動静.....	13
第3章 プロジェクト成果の波及と展望.....	14
3.1 科学技術への波及と展望.....	14
3.1.1 1分子可視化技術の展開.....	14
3.1.2 代表的論文と被引用件数の年次推移.....	14
3.1.3 キーワード検索の結果.....	15
3.2 社会経済への波及と展望.....	17
3.2.1 マイクロマシーン.....	17
3.2.2 1分子可視化技術の応用.....	17
3.2.3 ATP の代謝の健康・医療への応用.....	17
3.2.4 シアノバクテリアの窒素固定作用の活用.....	18
参考文献.....	19

報告書要旨

地球上のあらゆる生物は ATP (アデノシン 3 リン酸) の加水分解のエネルギーで、ほとんど全ての活動を行っている。ATP 合成酵素の反応機構については多くの仮説が提唱されたが、1997 年に吉田らは木下らとの共同研究で、ATP 合成酵素が回転するという Boyer の予測を 1 分子法による顕微鏡観察で証明した。この結果を元にして、本プロジェクトでは、エネルギー変換の分子機構と制御の解明を目指して、4 つのグループで検討を行った。

「ATP合成酵素グループ」では、F₁部分の回転軸 γ が 3 つの触媒部位 β の協調的な構造変化によって回転することを明らかにした。ATPの加水分解による解裂は、 γ が 80° 回転した位置で約 1msのうちに起こることが証明された。 γ には ϵ という制御因子が働いており、ATPの濃度によって伸びた構造や折りたたまれた構造に変化し、ATPの合成がコントロールされている。F₀モーターの回転子であるCリング中の c サブユニットの数は生物によって 8~15 と異なるが、1 回転あたり c サブユニットの数だけ H⁺ が輸送され、3 つの ATP が合成されるという機構があることが分かった。

「V-ATPアーゼグループ」では、V₁部分の回転を初めて 1 分子観察で実証した。F₁ で観察される 80°+40° のサブステップが V₁ の回転ではないこと、及び 1 ATP の加水分解で 120° を一気に回すことを明らかにした。V-ATPアーゼを構成しているタンパク質は全く不明であったが、中心回転軸を構成する C(V₀-d) サブユニットと F サブユニットの結晶構造を決定した。F サブユニットは V-ATPアーゼの活性を上昇させ、構造変化を伴う調節因子であることが示唆された。

「エネルギー変換システム制御系グループ」では、植物の ATP 合成酵素の検討を行った。植物の ATP を合成する機構は、基本的には他の生物と同一であるが、調節の仕組みは異なっている。植物における ϵ 阻害はバクテリアの場合よりもはるかに強く、1 分子法による観察の結果、 ϵ による回転の休止が頻回に起こるためであることを証明した。又、回転軸 γ サブユニットを酸化還元し、暗い所では酵素の活性を休止させているチオレドキシンについて、その他の標的タンパク質の網羅的な探索を独自の手法を用いて行った。

「電子伝達系グループ」では、大腸菌の b₀ 型キノール酸化酵素をモデル系としてプロトン輸送とエネルギー変換機構を系統的に解明した。

プロジェクト終了後、プロジェクトの展開を目的として幾つかの公的資金が投じられてきたが、特に 2006 年 12 月に発足した ICORP 「ATP合成制御プロジェクト」で大きな展開が図られている。細菌の ATP 合成酵素では、先ず ADP 阻害が起こり、さらなる阻害が必要なときに ϵ 阻害が生じること、 ϵ 阻害のない大腸菌株は高塩濃度下で死滅することが分かった。ヒトの ATP 合成酵素の研究を開始した。哺乳類の ATP 合成酵素では ϵ ではなく阻害タンパク質 IF1 (Inhibitory Factor 1) という別の因子がある。動物細胞の

ATP合成活性の測定法としてMASC(Mitochondrial activity of SLO-permeabilized cells) 法を開発した。さらに、DAPIT(Diabetes-associated Protein in Insulin sensitive tissue) がヒトATP合成酵素のアッセムブリーに重要であることが分かった。V-ATPアーゼに関しては、古細菌および1部の真正細菌ではF₀F₁の代わりに働いていることが分かった。又、中心回転軸の下部を構成するリング (V₀-c) の構造を決定することができた。植物のATP合成酵素に関しては、活性の明所、暗所における増減をほうれん草を用いて実証した。科研費の特定領域研究ではATP合成酵素の回転モーターの制御に関する検討を行った。学術創成研究では酸化還元の研究を行っている。

本プロジェクトには総括責任者以外に25名の研究者が参加している。その内6名はICORP研究者となり、その他、教授2名を含め、助教、講師以上に昇進された方も10名を数えており、本プロジェクトは人材育成上も大きな役割を果たしたといえる。

プロジェクト成果の波及と展望に関して、科学技術への波及と展望については、ATPアーゼの回転の1分子可視化に、粘性抵抗の小さいビーズ結合法を取り入れ、計測精度に格段の向上を図ったこと、サブユニット間のリアルタイムでの可視化にFRET法を取り入れ、今村らのATP濃度の測定技術の確立に結びついたこと等が挙げられる。V-ATPアーゼについては本プロジェクトがきっかけとなって、回転分子モーターのモデル酵素として研究が盛んに行われるようになった。

社会経済への波及と展望については、1つはマイクロマシーンとしての検討がある。医学的応用として、1分子可視化技術を応用したDNAシーケンサーが米国のベンチャーで製品化されている。抗生物質の効かない病気に対して、ATPの合成を阻害する化合物を薬として開発する試みがあり、細胞内のATP濃度の測定技術を利用して、Johnson & Johnsonでは結核菌を対象にした化合物を合成している。ATPの代謝や、IF1の健康や医療への影響が広く検討されている。シアノバクテリアは遺伝子改変がやりやすく、空気中の窒素を固定して新資源を得ようとする試みが始まっている。

プロジェクトの展開状況

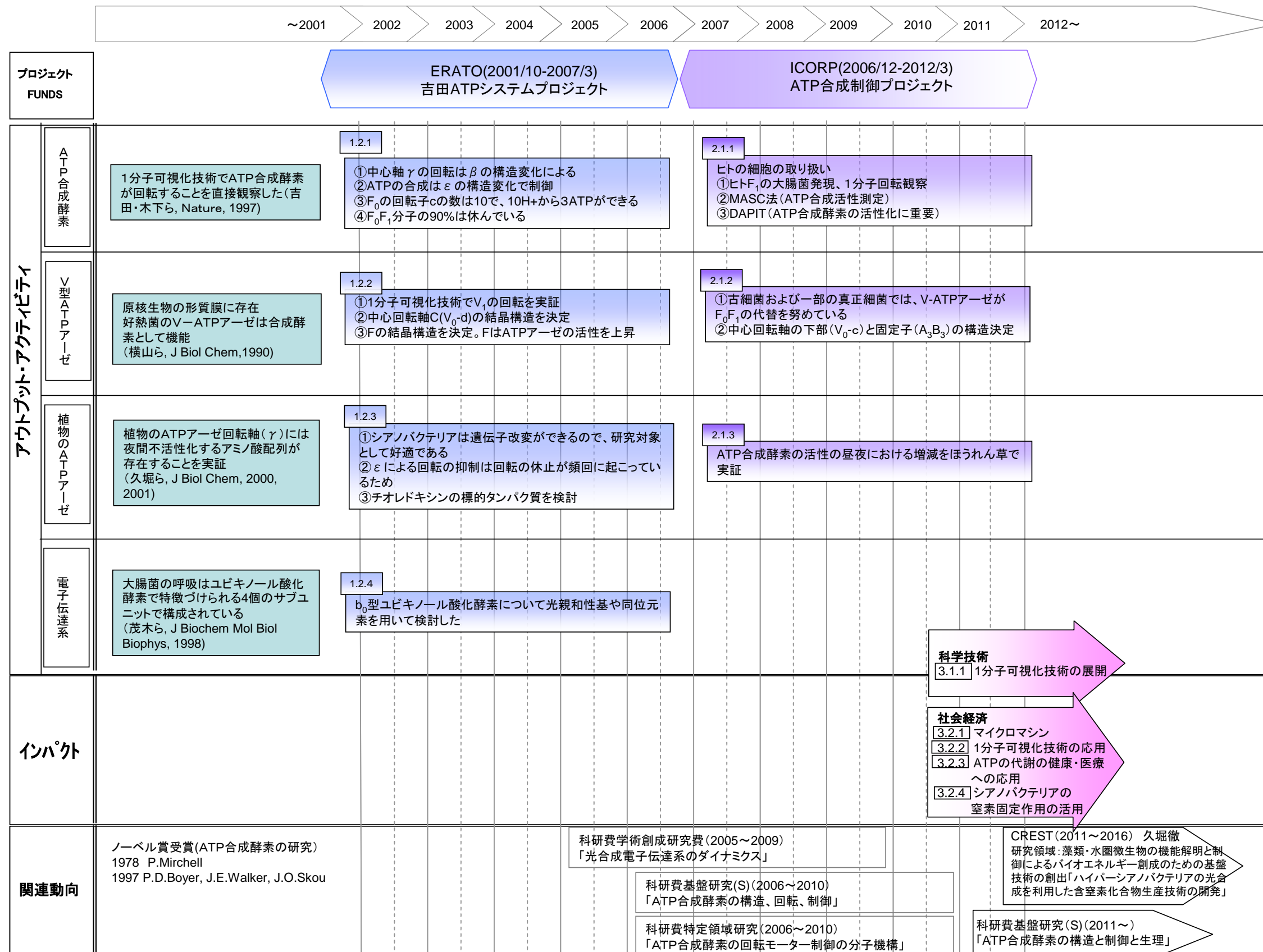


図 プロジェクトの展開状況 (まとめ図)

第1章 プロジェクトの概要

1.1 スタート時の背景とプロジェクトの狙い

地球上のあらゆる生物はATP（アデノシン3リン酸）の加水分解のエネルギーで、ほとんど全ての活動を行っている。このATPを合成する酵素の駆動機構の基本はP.Mitchellの H^+ ポンプの提唱¹（1978、ノーベル賞）、P.Boyerの回転モーターの提唱²（1997、ノーベル賞）、J.Walkerの結晶構造³（1997、ノーベル賞）、吉田と木下の回転直視⁴（Nature,1997）で確定した。本プロジェクトはATPシステムによるエネルギー変換の分子機構と制御の解明を目指して、4つのグループで検討した。「ATP合成酵素グループ」は、生物界のATP合成の主体であるATP合成酵素（ F_0F_1 ）の構造と機能の解明に取り組んだ。「V-ATPアーゼグループ」は、真核生物の液胞等に存在し、 H^+ ポンプ、膜融合やpHセンサーとして働いているV-ATPアーゼの研究を行った。「エネルギー変換システム制御系グループ」では、動物と異なって植物においては光合成に由来する還元力が細胞生理全体の管制的な制御を行っているので、その全体像と具体像を明らかにすることを企画した。「電子伝達系グループ」では、ATP合成の駆動力となる H^+ のポテンシャル勾配を作り出している呼吸鎖（電子伝達系）、特に酸素との反応を行う末端酸化酵素を主要な標的として研究を行った。バクテリアのATP合成酵素の構造を図1に示す。 F_1 では、 γ と ϵ サブユニットからなる回転子が、取り囲んでいる $\alpha_3\beta_3$ リング内で回転する。 F_0 ではcサブユニットが回転している。

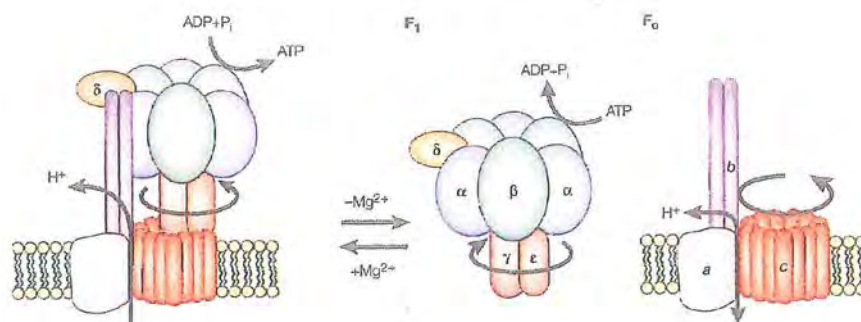


図1 ATP合成酵素の構造⁵

¹ Mitchell P et al., *Nature*, 191, 144-148, 1961 (参考文献 1)

² Boyer PD et al., *Biochem Biophys Acta*, 1140, 215-250, 1993 (参考文献 2)

³ Abraham JR et al., *Nature*, 370, 621-628, 1994 (参考文献 3)

⁴ Noji H et al., *Nature*, 386, 299-302, 1997 (参考文献 4)

⁵ Yoshida M et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 669-677, 2001(参考文献 5)

(1) ATP合成酵素 (F_0F_1) の研究はそれまで主として F_1 の研究が行われてきたが、ERATOでは酵素全体での機能、制御の仕組み、構造的な知見を得ることを目的とした。又、生化学的なアプローチのみならず、1分子観察を駆使して、どこまで解明できるかも狙いの1つだった。

(2) V-ATPアーゼは横山らによって見出され⁶、遺伝子も取られていたが、ERATOではV-ATPアーゼが回転するかどうかの証明と、構造や機能を明らかにすることを目標とした。

(3) 植物におけるATP合成酵素の制御システムの解明を目指して、酵素のサブユニットの機能とチオレドキシンを介した酸化還元制御について検討した。

(4) ATPシステムの作動機構を理解するためには、本来の共役系である電子伝達系の理解も不可欠であり、大腸菌ユビキノール酸化酵素をモデル系として検討を行った。

実験手法として、特に独自性の高いものとして次の4点が挙げられる。

①ATPアーゼの回転の1分子可視化に、粘性抵抗の小さいビーズ結合法を取り入れ、計測精度に格段の向上が図られた。サブユニット間のリアルタイムでの可視化を目指してFRET (fluorescence resonance energy transfer) 法も検討した。

②外部の29の研究機関との共同研究により、顕微鏡下1分子可視化技術、X線結晶構造解析技術、NMRによる構造解析技術等、最先端の実験技術を取り入れた。

③ATPアーゼの回転を完全にコントロールする実験系を確立した。回転軸の γ サブユニットに磁気ビーズを結合し、外部磁場により回転を制御する系で、共同研究者の早稲田大学の木下らのグループにより開発された。

④光照射に伴う植物細胞内での酸化還元制御において中心的な役割を果たすチオレドキシンの標的分子の網羅的探索法を確立した。

⁶ Yokoyama K et al., *J Biol Chem*, 265,21946-21950, 1990 (参考文献 6)

1.2 プロジェクトの研究成果

1.2.1 ATP 合成酵素

ATP (アデノシン三リン酸) の化学式を図 2 に示す。

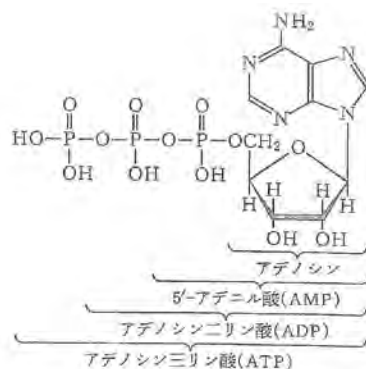


図 2 ATP の化学式

(1) γ の回転を引き起こすのは、 β の open-close の構造変化によるものと思われる。単離した β においても ATP 結合が無い場合は open 構造を形成し、ATP 結合により closed 構造を形成することが判明した。 F_1 においては触媒過程に伴って起こる 3 つの β の協調的な構造変化が γ を回転させる駆動力になっているものと思われる⁷。

(2) ATP 加水分解速度の低い変異酵素の 1 分子観察を行い、酵素に結合している ATP の加水分解による解裂は、 γ が 80° 回転した位置で約 1 ms のうちに起こることを証明した⁸。また、 80° の位置でもう 1 つの反応 (後にリン酸の解離と判明) が起こると、 γ はさらに 40° 回転することを明らかにした。

(3) ϵ は単なる阻害ではなく、制御因子として働いていることが分かった。 ϵ が伸びた構造 (up-state) になると、 F_0F_1 の ATP 加水分解活性は強く抑制されるが、ATP 合成活性は阻害されない。ATP が有る時は ϵ が下に折りたたまれた (down-state) 構造になり、ADP が有る時は up-state 構造を形成する。 H^+ の電気化学ポテンシャルが負荷されると、up-state 構造形成が促進されることが判明した。つまり、ATP 濃度と H^+ によって、 ϵ の C 末ドメインのコンフォメーションが変化し、ATP の合成がコントロールされていることが明らかになった⁹。

⁷ Yagi H et al., *J Am Chem Soc*, 126, 16632-16638, 2004 (参考文献 7)

⁸ Shimabukuro K, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 14731-14736, 2004 (参考文献 8)

⁹ Suzuki T et al., *J Biol Chem*, 278, 46840-46846, 2003 (参考文献 9)

(4) F_0 モーターの回転子であるcリング中のcサブユニットの数の決定を行った。1つのcサブユニットは、輸送される H^+ が結合/解離するカルボキシル基 (Glu56 残基) を1つ持ち、aサブユニットと H^+ の授受の際に発生するトルクによりcリングが回転する。従って、cリング中のcサブユニットの数だけの H^+ が1回転あたり輸送される。遺伝子的にcを何個もタンデムにつないだ融合タンパクを作って機能を調べると、cリング中にcサブユニットが10あることが分かった。 F_1 は1回転で3ATPを合成するので、10の H^+ から3つのATPができていくことになる。cサブユニットの数は生物によって異なることが、その後分かってきた。酵母は10、葉緑体は14、牛は8で、人は牛と同じく8だと思われる¹⁰。

(5) ATPの加水分解時の F_0F_1 全体の回転の1分子観察を行った。1分子では回転速度が多分子分析の10倍であることが分かった。つまり、 F_0F_1 はADP阻害による長時間の回転停止と回転再開を繰り返しており、平均90%の分子が可逆的かつ交代にADP阻害状態に陥っていることが示唆された¹¹。

1.2.2 V-ATPアーゼ

V-ATPアーゼは、真核生物の液胞等に存在し、プロトンポンプ、膜融合やpHセンサーとして働いている、ERATOでは高度好熱性細菌を対象にして、全体での機能、制御の仕組み、構造的な知見を得ることを目的とした。原核生物型V-ATPアーゼの構造モデルを図3に示す。

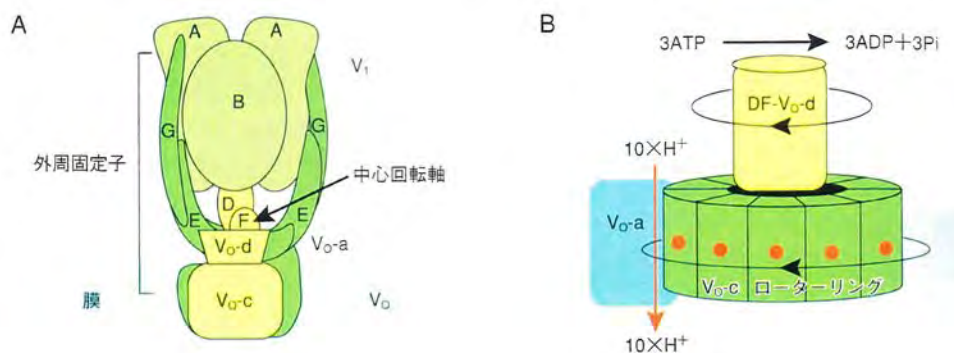


図3 原核生物型V-ATPアーゼの構造モデル¹²

(1) ATP駆動による V_1 部分の回転を初めて1分子観察で実証した。 F_1 の場合は結晶構造が分かっており、どこに回転プローブを付けるかの設計が容易であった。 V_1 は構造が

¹⁰ Mitome N, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 12519-12164, 2004 (参考文献 10)

¹¹ Hirono-Hara Y et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 4288-4293, 2005 (参考文献 11)

¹² 横山 謙, *実験医学*, 24, 2583-2587, 2006 (参考文献 12)

不明であったので、回転プローブを付ける場所を見つけるのに試行錯誤法に頼らざるを得ず、多大の時間が掛かった。また、 F_1 では蛍光アクチンフィラメントを用いたが、本研究ではその後開発された、通常の明視野顕微鏡での観察が可能なビーズ法を用いた。 F_1 で観察される $80^\circ + 40^\circ$ のサブステップが V_1 の回転ではないことを確認し、1 ATPの加水分解で 120° を一気に回ること、更に直視によって、酵素全体の回転も明らかにした¹³。

(2) V-ATPアーゼを構成しているタンパク質の構造は全く不明であったが、そのうちの1つを明らかにした。特に中心回転軸を構成するCサブユニットの結晶構造を決定するのに成功したが、これはV-ATPの構造を決めた最初の報告である。真核生物では既に別のサブユニットにCという名称が付けられていたので、本報告のCサブユニットをその後 V_0-d サブユニットという名称に変更した。このサブユニットは下部がローターリングの穴にはまり込み、3回対称を持つ面がDF複合体からなる V_1 回転軸を受けているのが判明した¹⁴。

(3) 構成タンパク質の1つであるFサブユニットの結晶構造の解明と機能の検討を行った。FサブユニットはDサブユニットに結合して、回転軸を構成していることは既に明らかにしていた¹⁴。FRET法（1分子蛍光共鳴エネルギー移動法）による検討で、静止状態と回転状態で構造が異なり、このサブユニットが構造変化を伴う調節因子であることが示唆された¹⁵。

1.2.3 エネルギー変換システム制御（植物のATP合成酵素）

植物のATP合成酵素は葉緑体のチラコイド膜にほとんど同じ分子構造を持った超分子複合体として存在している。ATPを合成する分子機構は基本的には他の生物と同一と考えられるが、調節の仕組みは異なっている。そこでERATOでは、ATP合成酵素の制御と、還元力を供給しているチオレドキシンを検討した。

(1) 葉緑体植物酵素は遺伝子操作による改変が困難である。一方シアノバクテリアは大腸菌と同様の原核生物で、1996年にDNA配列も解明されており、遺伝子操作も容易に行うことができるので、主としてシアノバクテリアを用いて検討を行った。植物における ϵ 阻害はバクテリアの場合よりもはるかに強く、ATP濃度が非常に高い場合でも阻害効果を持っていることが分かった。又、 ϵ の影響を1分子法で観察し、 ϵ による回転の抑制は回転

¹³ Imamura H et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 100,2312-2315, 2003 (参考文献 13)

¹⁴ Iwata M, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101,59-64,2004 (参考文献 14)

¹⁵ Makiyo H et al., *EMBO J*, 24, 3974-3983, 2005 (参考文献 15)

の休止が頻回に起こるためであることを証明した¹⁶。

(2) ATP合成酵素の回転軸である γ サブユニットを酸化還元して活性を調節しているチオレドキシシンについてその他の標的タンパク質の網羅的な探索を独自の手法を用いて行った。その結果、葉緑体中に存在する4つを含めて、15種の標的タンパク質を同定した¹⁷。その中の1つであるシクロフィリンは免疫抑制剤シクロスポリンのターゲットであるが、酸化還元による活性調節について生化学的な裏付けを得ることができた¹⁸。また、葉緑体内の糖脂質合成酵素もチオレドキシシンの制御下にあることを明らかにした¹⁹。

1.2.4 電子伝達系

当初の目標は電子伝達鎖における電子伝達と H^+ 輸送の作動機構の詳細な解明にあったが、ERATOでは大腸菌のbo型キノール酸化酵素をモデル系としてプロトン輸送とエネルギー変換機構を系統的に解明した。

(1) bo型ユビキノール酸化酵素には2つのキノン酸化還元部位があり、電子はサブユニットIIのキノール酸化部位 Q_L からサブユニットIのキノン結合部位 Q_H とヘムbを経てヘムo-Cu_B複核中心に伝達される。光親和性基としてジアズリン基を付加した阻害剤オーラシンCを合成し、サブユニットIを架橋部位として同定した。 Q_L 部位はサブユニット1-2間に存在することがわかった。更に、ユビキノン2のカルボニル炭素を同位標識した1-または4-¹³C- Q_2 で Q_H 部位を再構成し、セミキノンの電子スピン共鳴スペクトル（微細構造分裂）に及ぼす¹³Cの核スピン($I=1/2$)の影響を調べ、非対称的にキノン環のC₁側がタンパク側と強く水素結合することを明らかにした²⁰。

¹⁶ Konno H et al., *Embo J*, 25, 4596-4604, 2006 (参考文献 16)

¹⁷ Yamazaki D et al., *Plant Cell physiol*, 45,18-27, 2004 (参考文献 17)

¹⁸ Motohashi K et al., *J Biol Chem*, 278, 31848-31852, 2003 (参考文献 18)

¹⁹ Yamaryo Y et al., *FEBS Lett*, 580, 4086-4090, 2006 (参考文献 19)

²⁰ Grimaldi S et al., *Biochemistry*, 42,5632-5639,2003 (参考文献 20)

第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況

ERATO 終了後、電子伝達系以外の研究テーマに関しては、主として ICORP「ATP 合成制御プロジェクト」で、研究が継続された。

2.1 各研究テーマの展開、および、現在の状況

2.1.1 ATP 合成酵素

(1) 細菌の ATP 合成制御

ATP高濃度条件下では ϵ 阻害は起こらず、回転とADP阻害が平衡状態にあるが、ATP濃度が低くなると ϵ 阻害が現れる。つまり、個別的な阻害が独立して起こるのではなく、先ずADP阻害という現象があり、さらなる阻害が必要な場合に、 ϵ 阻害が生じるという関係を明らかにした²¹。又、 ϵ 阻害のない大腸菌株は高塩濃度下で早く死滅することが明らかになった²²。

(2) ヒトの ATP 合成酵素の研究開始

ERATOの時代はヒトを含めて動物細胞のATP合成酵素については、変異を導入した酵素の研究は殆ど皆無であった。バクテリアはシンプルで扱いやすいが、機能もシンプルである。大腸菌でヒトのATP合成酵素のF₁を発現することができるようになり、例えばシステイン残基を入れることもできる。変異を加えると、種々の状況にどう対応できるかが分かるようになってきた。1分子の回転観察もできるようになった。

A. ϵ と IF1 (Inhibitory Factor 1)

哺乳類のATP合成酵素にも ϵ はあるが、別のタンパクがくさびとしてくっついており、 ϵ の構造変化を妨げ働けない状態になっていることを明らかにした²³。その代わりに阻害タンパク質 (IF1) という別の因子がある。IF1 は酵母からヒトに至るまで、真核生物に広く保存されており、N端側のヘリックスがF₁の β/α サブユニットの間に突き刺さるような形で挿入されて活性を阻害する。ヒトIF1 がヒトF₁の回転を2段階で停止させることを見出した²⁴。ヒトIF1 のノックアウトマウスを作製したが、正常に成育するマウスが生ま

²¹ Tsumuraya M et al., *FEBS Lett*,583, 1121-1126, 2009 (参考文献 21)

²² 未発表 (参考文献 22)

²³ 投稿準備中 (参考文献 23)

²⁴ 未発表 (ICORP「ATP 合成制御プロジェクト」研究実施中間報告書 36 ページ) (参考文献 24)

れてきた。生体内にはIF1に代わるバックアップ制御系があることが示唆される。

B. 動物細胞のATP合成活性をハイスループットに測定する方法として、MASC (mitochondrial activity of SLO-permeabilized cells) 法を開発した²⁵。MASC法では培養細胞にストレプトリシンを投与し、数回の洗浄処理のみでミトコンドリアのATP合成活性の測定が可能であり、必要な細胞数も従来の1000分の1程度である。

C. ATP合成酵素に付随する因子であるDAPIT(Diabetes-associated Protein in Insulin sensitive tissue) がヒトATP合成酵素のアッセンブリー(サブユニットが集まって酵素を形成すること)に重要であるということ、遺伝子ノックダウンの実験から明らかにした²⁶。DAPITは糖尿病発症機構に関係していると考えられている。

2.1.2 V-ATPアーゼの構造と機能

(1) V-ATPアーゼの中心回転軸の下部を構成する膜に結合したリング(V₀-c)の構造を決定した。2つの膜貫通型ヘリックスからなる12のサブユニットから構成されている²⁷。

(2) V-ATPアーゼのA₃B₃サブコンプレックスの結晶構造を決定した。F₀F₁-ATPアーゼのα₃β₃とは構造が著しく異なっており、触媒作用を持つAサブユニットは突出したでっぱりを有している。BサブユニットはATPを結合できないように見えるので、疎水性の残基でATPの加水分解が行われていると思われる²⁸。

2.1.3 植物のATP合成酵素

ERATO終了直前又は直後から下記3つのプロジェクトでERATO研究の展開が図られてきた。

- ① ICORP「ATP合成制御プロジェクト」代表 吉田賢右 (2006.12~2012.3)
「植物のATP合成制御」
- ② 科研費 特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」
代表・野地博行 (2006年度~2010年度)

²⁵ Fujikawa M et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 401, 538-543, 2010 (参考文献 25)

²⁶ 未発表 (ICORP「ATP合成制御プロジェクト」研究実施中間報告書101ページ) (参考文献 26)

²⁷ Toei M et al., *Proc Natl Acad Sci*, 104, 20256-20261, 2007 (参考文献 27)

²⁸ Maher MJ et al., *EMBO J*, 28, 3771-3779, 2009 (参考文献 28)

「ATP 合成酵素の回転モーター制御の分子機構」

- ③ 科研費 学術創成研究費「光合成電子伝達系のダイナミクス：未知のネットワークの解明」代表・鹿内利治 (2005 年度～2009 年度)

ICORP では、*in vitro* ではなく、植物の中での制御を明らかにすることを目的として二つの方法を用いた。一つは植物の細胞から葉緑体を壊さずに抽出し、これに光を当てて酸化還元実験を行う方法である。電子伝達システムや、酸化還元システムは葉緑体が壊れると働かないので、無傷葉緑体を用いることが非常に重要である。もう一つの方法はさまざまな光条件にあるホウレンソウの緑葉を液体窒素に投入して完全に凍結し、実験室で液体窒素を用いて細胞を破壊すると同時に、チオール基の修飾試薬でタンパク質の酸化還元状態を固定する。という方法を用いて、実際の植物体内のタンパク質のレドックス状態がどのように変化するのか、どのように制御されるのかについての知見を得ることができる。ATP 合成活性の明所、暗所における増減をほうれん草を用いて実証した。野外栽培ほうれん草で日照に応答して、 γ サブユニットにある 2 つのシステインのSH基の酸化還元が実際に生じることを初めて示した²⁹。

特定領域研究ではATP合成酵素の回転モーターの制御に関する検討を行った。6 報の論文が出されている³⁰。

学術創成研究では葉緑体の中でどのようにチオレドキシシンが働くかということ調べた。その結果、NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) は酸化されると NADP になる。NADPH から還元力をもらってチオレドキシシンを還元する酵素が有る。シアノバクテリアは NADPH から還元力をもらってチオレドキシシンを還元する酵素を持っているという機構を明らかにした。

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

2.2.1 参加研究者の動静

プロジェクトに参加した研究者は総括責任者以外に 25 名で、その内 6 名は ICORP 研究員として、ERATO の研究の継続、発展の研究に従事している。研究職以外に転出した者も 4 名いるが、その他は帰国 1 名、民間会社 1 名、公立研究所 1 名以外、全て大学に適職を得て、10 名が助教、講師以上に就き、内 2 名が教授に昇進している。又、本プロジェクトの研究により、3 名が博士を取得した。本プロジェクトは人材育成上大きな役割を果たしたと言える。

²⁹ 投稿中 (参考文献 29)

³⁰ Meiss E et al., *J Biol Chem*, 283, 24594-24599, 2008 (参考文献 30)

第3章 プロジェクト成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及と展望

3.1.1 1分子可視化技術の展開

生体分子の1分子可視化は1984年に柳田敏雄らによって開発されたが、ERATO開始前の1997年に、吉田グループは木下グループと共同でF₁の回転の可視化に成功した。ERATOでは1分子可視化技術を駆使しており、吉田グループの研究者による下記のような発展が見られる。

(1) 吉田グループでF₁の可視化に成功した野地とERATOの研究者だった飯野は金沢大学の安藤、内橋と共同で、高速原子間力顕微鏡を用いて、F₁の1分子観察を行い、F₁の中心に γ （回転軸）が無くても、3つの触媒サブユニット（ β ）の構造が順次変わることを示した。1方向に回る構造的な基盤は $\alpha_3\beta_3$ -リング自体に有って、 γ はリングの形の変化にしたがって回転しているという示唆を得た³¹。

(2) ERATOの研究者であった今村は、その後「さきがけ」の研究により、FRET法で細胞中のATP濃度を測定する技術を確立した³²。今迄生きている細胞の中で、ATPの濃度をモニターする技術は無かったため注目されている。例えばICORP「ATP合成制御プロジェクト」で、IF1の作用を調べるときに利用された。また、これらの成果を挙げて、今村は京都大学次世代研究者育成センターに准教授として採用された(2010年10月)。

(3) V-ATPアーゼの研究の拡大

V-ATPアーゼは丈夫で沢山とれるので、回転分子モーターのモデル酵素として有望だと見なされるようになり、研究が盛んに行われるようになってきた。(図5参照)
V-ATPアーゼの構造はマスマスペクトル³³や電子顕微鏡で検討されている。

3.1.2 代表的論文と被引用件数の年次推移

代表研究者が選んだ下記主要論文7報の被引用件数の年次推移を図4に示した。

³¹ Uchihashi T et al., *Science*, 333, 755-758, 2011 (参考文献 31)

³² Imamura H et al., *Proc Natl Acad Sci*, 106, 15651-15656, 2009 (参考文献 32)

³³ Min Zhou et al., *Science*, 334, 380-385, 2011 (参考文献 33)

- (1) Shimabukuro K et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100, 14731-14736, 2003
- (2) Suzuki T et al., J Biol Chem, 278, 46840-46846, 2003
- (3) Ueno H et al., Proc Natl Acad Sci USA, 102,1333-1338, 2005
- (4) Imamura H et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100, 2312-2315, 2003
- (5) Iwata M et al., Proc Natl Acad Sci USA, 101, 59-64, 2004
- (6) Yamazaki D et al., Plant Cell Physiol, 45,18-27, 2004
- (7) Konno H et al., EMBO J, 25,4596-4604, 2006

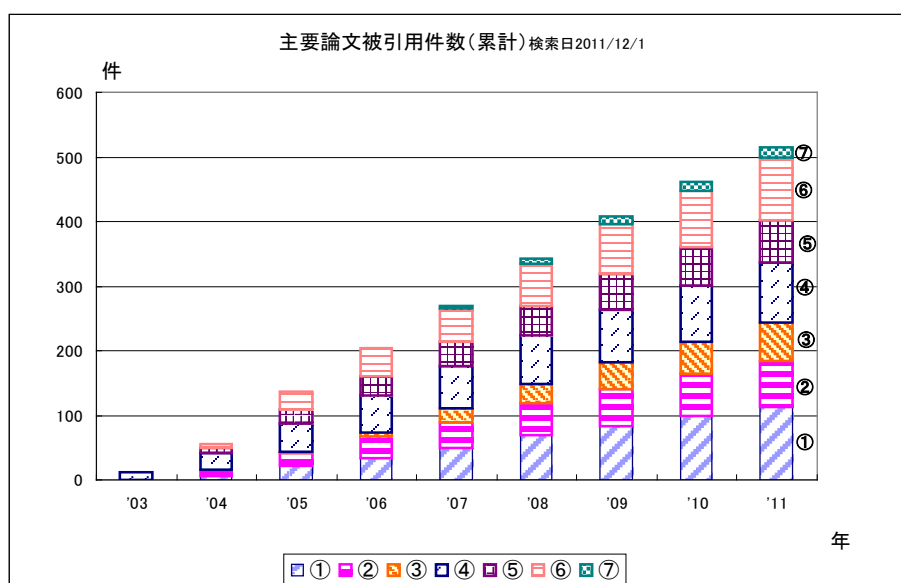


図 4 主要論文の被引用件数年次推移 (累計)
(web of science で検索 2011/12/1)

図 4 に示したように被引用件数は発表後調査時点の 2011 年末まで増加の傾向にある。プロジェクト終了後に、この分野の研究が世界的にも活発に行われていることを物語っている。

3.1.3 キーワード検索の結果

本研究のキーワードとして、ATP synthase or ATPase と V-ATP synthase or V-ATPase を選び、該当論文数を Web of Science で検索した。図 5 に示した ATP synthase or ATPase に関しては、ATP アーゼ回転説が提出された 1990 年代初頭に急増し、以後毎年 3,000 件程度提出されており、世界的にコンスタントにかなりの規模で活発な研究が続けられていることが分かる。図 6 に示した V-ATP synthase or V-ATPase に関しては、横山が最初の論文を提出した 1990 年以降、論文数が着実に増加しており、今後も大きな発展

が期待される。

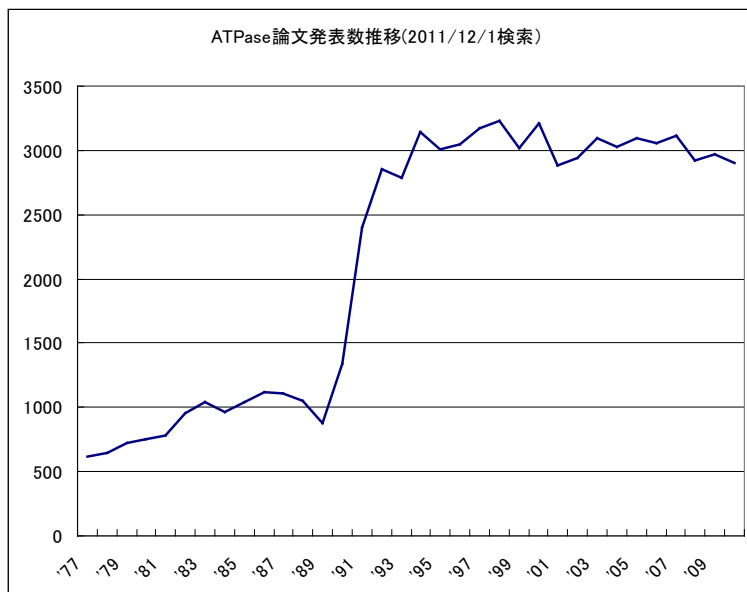


図 5 ATPアーゼのキーワード検索
(web of science で検索 2011/12/1)

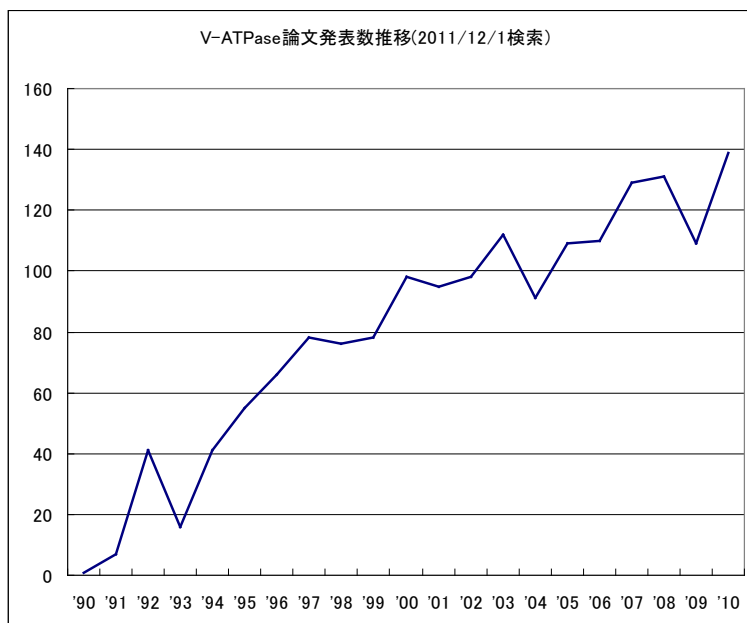


図 6 V-ATPアーゼのキーワード検索
(web of science で検索 2011/12/1)

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 マイクロマシーン

原子間力顕微鏡により、回転軸 γ が無くても ATP アーゼは回転的な構造変化をすることが分かった。野地、飯野等はこれらの知見から、新しい人工モーターの創成を検討している。中心の物体はタンパク質でなくてもよいので、例えばカーボンナノチューブや DNA を入れたハイブリッドモーターができないかということも考えている。材料の選択面でも、部品の性質面でも自由度が大きい。逆に、例えば光で回転する軸を中心に配置すると、光のエネルギーを ATP に直接変換するマイクロマシーンを開発できると期待している。

3.2.2 1分子可視化技術の応用

柳田敏雄教授が先鞭を付けた、1分子可視化技術は「吉田 ATP システムプロジェクト」で、対象分子を観察できるようにする遺伝子改変等、多くの技術ノウハウが蓄積された。これら 1分子技術の応用として次の 2つがある。

(1) DNA シーケンサー

DNA の 4 種の塩基の各々を異なる色の蛍光で標識しておき、鋳型となる DNA に酵素を用いて標識された塩基が付く順番を 1分子技術で検出することにより、迅速で安価な DNA シーケンサーができる。これは 2009 年に米国のベンチャーで製品化されている。1分子を顕微鏡で観察するという基盤技術を開発したのは日本だが、その技術を展開、応用して実用化に結びつけたのは欧米勢である。

(2) 細胞中の ATP 濃度の定量

抗生物質の効かない病原菌の中には長年増殖しないで、身体の中に潜んでいて、突然発症するものがある。抗生物質には細胞増殖を阻害することを作用機序としているものが多いので、増殖しない病原菌には有効でないことが多い。この場合にも ATP は消費されているので、ATP の合成を阻害する化合物を薬として開発しようという試みが始まっている。この場合には細胞中の ATP 濃度の測定が必要である。Johnson & Johnson は結核菌を対象にしたリード化合物を合成し、現在 Ph-II の段階にある。

3.2.3 ATP の代謝の健康・医療への応用

(1) 最近は生活習慣病のように、代謝に異常をきたす病気が増えている。ATP の合成、分解は極めて基本的な代謝であり、ATP の増減がこれらの病気に関係している可能性がある。

(2) ATP と長寿には関係があると言われている。活性が高すぎても低すぎても寿命は短くなる。線虫やマウスではミトコンドリアの活動があまり高くない方が長生きできるという実験結果がある。ミトコンドリアの活動低下は ATP 酵素の代謝回転速度に影響している筈で、今後の検討が期待される。

(3) IF1 を劣化させると、細胞レベルでは種々の影響がでることが沢山報告されているが、本研究の後継プロジェクトで IF1 の遺伝子をノックアウトしたマウスを作って調べてみても、一見したところでは影響が認められない。元々 IF1 は虚血のときに ATP 濃度の低下を防止すると言われ、また生物が極限状態に陥ったときに初めて働く因子とも言われている。そのためストレスを与えると、IF1 劣化の影響が現れてくるかもしれない。ATP は生きることの根源なので、健康や医療への影響を調べることは意味がある。

3.2.4 シアノバクテリアの窒素固定作用の活用

シアノバクテリアは、光活性型 ATP アーゼの研究に極めて有効であるが、アミノ酸などの含窒素化合物の生合成を行わせる素材としても有望であり、共同研究者だった久堀は、このテーマで、平成 23 年度 CREST（研究領域：藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出、研究総括：松永 是、研究者名：久堀 徹、課題名：ハイパーシアノバクテリアの光合成を利用した含窒素化合物生産技術の開発）に採択された。シアノバクテリアは遺伝子組み換えにより、高効率で光による空気中の窒素を固定できる可能性があり、本研究の成果は新資源につながるものとしての期待が極めて高い。

参考文献

No	書誌事項
1	Mitchell P, "Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism", <i>Nature</i> , 191, 144-148, 1961
2	Boyer PD, "The Binding Change Mechanism for ATP Synthase Same Probabilities and Possibilities", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1140, 215-250, 1993
3	Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE, "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria", <i>Nature</i> , 370, 621 – 628, 1994
4	Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K Jr, "Direct observation of the rotation of F1-ATPase", <i>Nature</i> , 386, 299 - 302, 1997
5	Yoshida M, Mineyuki E, Hisabori T, "ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell", <i>Nature Reviews Molecular Cell Biology</i> , 2, 669-677, 2001
6	Yokoyama K, Oshima T, M, Yoshida M, "Thermus thermophilus membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase", <i>J Biol Chem</i> , 265, 21946-21950, 1990
7	Yagi H, Tsujimoto T, Yamazaki T, Yoshida M, Akutsu H, "Conformational change of H ⁺ -ATPase beta monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy", <i>J Am Chem Soc</i> , 126, 16632-16638, 2004
8	Shimabukuro K, Yasuda R, Muneyuki E, Hara KY, Kinosita K, Yoshida M, "Catalysis and rotation of F ₁ motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 degrees substep rotation", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 14731-14736, 2003
9	Suzuki T, Murakami T, Iino R, Suzuki J, Ono S, Shirakihara Y, Yoshida M, "F ₀ F ₁ -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance", <i>J Biol Chem</i> , 278, 46840-46846, 2003
10	Mitome N, Suzuki T, Hayashi S, Yoshida M, "Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: Indication of noninteger 10 : 3 H ⁺ /ATP ratio and permissive elastic coupling", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 101, 12159-12164, 2004
11	Hirono-Hara Y, Ishizuka K, Kinosita K, Yoshida M, Noji H, "Activation of pausing F ₁ motor by external force", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 102, 4288-4293, 2005
12	横山 謙, "見えてきた V-ATPase の構造と活性調節メカニズム", <i>実験医学</i> , 24, 2583-2587, 2006
13	Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K, "Evidence for rotation of V-1-ATPase", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 100, 2312-2315, 2003

14	Iwata M, Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, Yokoyama K, Iwata S, "Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase", <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> ,101,59-64,2004
15	Makyio H, Iino R, Ikeda C, Imamura H, Tamakoshi M, Iwata M, Stock D, Bernal RA, Carpenter EP, Yoshida M, Yokoyama K, Iwata S, "Structure of a central stalk subunit F of prokaryotic V-type ATPase/synthase from <i>Thermus thermophilus</i> ", <i>EMBO J</i> , 24, 3974-3983, 2005
16	Konno H, Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M, Hisabori T, "The regulator of the F-1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F-1-ATPase by the epsilon subunit", <i>EMBO J</i> , 25, 4596-4604, 2006
17	Yamazaki D, Motohashi K, Kasama T, Hara Y, Hisabori T, "Target proteins of the cytosolic thioredoxins in <i>Arabidopsis thaliana</i> ", <i>Plant Cell physiol</i> , 45,18-27, 2004
18	Motohashi K, Koyama F, Nakanishi Y, Ueoka-Nakanishi H, Hisabori T, "Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin - Thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity", <i>J Biol Chem</i> , 278, 31848-31852, 2003
19	Yamaryo Y, Motohashi K, Takamiya K, Hisabori T, Ohta H, "In vitro reconstitution of Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase regulation by thioredoxin", <i>FEBS Lett</i> , 580, 4086-4090, 2006
20	Grimaldi S, Ostermann T, Weiden N, Mogi T, Miyoshi H, Ludwig B, Michel H, Prisner TF, MacMillan F, "Asymmetric binding of the high-affinity Q(H)(center dot-) ubisemiquinone in quinol oxidase (bo(3)) from <i>Escherichia coli</i> studied by multifrequency electron paramagnetic resonance spectroscopy", <i>Biochemistry</i> , 42,5632-5639,2003
21	Tsumuraya M, Furuike S, Adachi K, Kinoshita K Jr, Yoshida M, "Effect of epsilon subunit on the rotation of thermophilic <i>Bacillus</i> F1-ATPase", <i>FEBS Lett</i> ,583, 1121-1126, 2009
22	未発表
23	投稿準備中
24	未発表 (ICORP 「ATP 合成制御プロジェクト」 研究実施中間報告書 36 ページ)
25	Fujikawa M, Yoshida M, "A sensitive simple assay of mitochondrial ATP synthesis of cultured mammalian cells suitable for high-throughput analysis", <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 401, 538-543, 2010
26	未発表 (ICORP 「ATP 合成制御プロジェクト」 研究実施中間報告書 101 ページ)
27	Toei M, Gerle C, Nakano M, Tani K, Gyobu N, Tamakoshi M, Sone N, Yoshida M, Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, Yokoyama K, "Dodecamer rotor ring defines H ⁺ /ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from <i>Thermus thermophilus</i> ", <i>Proc Natl Acad Sci</i> ,104, 20256-20261, 2007

28	Maher MJ, Akimoto S, Iwata M, Nagata K, Hori Y, Yoshida M, Yokoyama S, Iwata S, Yokoyama K, "Crystal structure of A ₃ B ₃ complex of ATPase from <i>Thermus thermophilus</i> ", <i>EMBO J</i> , 28, 3771-3779, 2009
29	投稿中
30	Meiss E, Konno H, Groth G, Hisabori T, "Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by the phytotoxin tentoxin", <i>J Biol Chem</i> , 283, 24594-24599, 2008
31	Uchihashi T, Iino R, Ando T, Noji H, "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F ₁ ATPASE", <i>Science</i> , 333, 755-758, 2011
32	Imamura H, Huynh Nhat KP, Togura H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H, "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators", <i>Proc Natl Acad Sci</i> , 106, 15651-15656, 2009
33	Min Zhou, Nina Morgner, Nelson P Barrera, Argyris Politis, Shoshanna C Isaacson, Dijana Matak-Vinkovic, Takeshi Murata, Ricardo A. Bernal, Daniela Stock, Carol V Robinson, "Mass Spectrometry of Intact V-type ATPases Reveals Bound Lipids and the Effects of Nucleotide Binding", <i>Science</i> , 334, 380-385, 2011