

平成 18 年 11 月
総括責任者 吉田賢右

1.1. 構想

地球のすべての生物のエネルギー獲得と利用の基本は、驚くほど単純な図式で表される。キーワードはATPであり、このシステム全体を「ATPシステム」と呼ぶことができる。細胞は、ATPをADPと無機リン酸 (Pi) に加水分解して、そのときに放出されるエネルギーを使って生命に必要なさまざまな活動をおこなう。生じたADPとPiは、ATPに再び合成される。ATPは不断に必要であり、したがって不断に合成されている。このATP分解と合成のサイクルにおいて、分解のやり方はエネルギーの使い方に応じて非常に多様である。しかし、ATP合成は、嫌氣的解糖などによる基質レベルの合成と、呼吸あるいは無限の太陽光エネルギーの利用による合成と、2通りのやり方しかない。前者は通常の酵素反応であるが、後者はより高次の膜の事象である。すなわち、細胞膜 (細菌)、ミトコンドリア内膜 (動植物・菌類)、葉緑体チラコイド膜 (植物) など、エネルギー変換膜と総称される生体膜でおこなわれ、圧倒的に多くのATPを生産している。その基本的仕組みは、まず、呼吸、あるいは光合成によって、エネルギー変換膜の内外にプロトン (H^+ 、水素イオン) の電気化学的ポテンシャル差が形成されることである。次に、エネルギー変換膜に存在するATP合成酵素の中を、プロトンがポテンシャル勾配に沿って流れて、その時に放出されるエネルギーでATPが合成される。このATP合成の仕組みのストーリーは今から20年前に確立された。しかし、このストーリーの役者たち、つまりエネルギー変換膜の膜タンパク質複合体の機能が構造に基づいた分子の言葉で議論できるようになったのは、ごく最近のことである。現在の主要な問題は、呼吸や光のエネルギーで、どうやってプロトンが運ばれるのか、プロトンの通過がどのようにATP合成を引き起こすのか、そのエネルギー変換の分子機構と制御の解明である。生体膜を反応場とするエネルギー変換の研究は、必然的に、柔らかで閉じた脂質2重膜の袋を相手にすることになる。これは、扱いにくい不均一系である。そのゆえに、今まで、この分野の研究は後回しにされたり、あるいは迂回されることが多かった。このERATO「ATPシステム」では、この課題に正面から挑戦した。4つのグループで、取り組んだ。「ATP合成酵素グループ」は、生物界のATP合成のメジャープレイヤーである F_0F_1 -ATP synthase 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、真核生物においてはプロトンポンプとして働き、古細菌などの原核生物においてはATP合成もおこなっているV-ATPaseの研究をおこなった。「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プロトンのポテンシャル勾配をつく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おこなった。

1.2. 達成

本プロジェクトによる発見を列挙する。

I. ATP合成酵素グループ

- Piの解離によって酵素のβサブユニットの活性中心の構造が変化することを見いだした。(JBC, '02)
- F_oがプロトンを通わせるには、回転が必須である。これは受動的なプロトン通過についても真実である。(JBC, '02)
- εサブユニットは、伸びた構造 (extended) と折れたたまった構造 (folded form) をとる。ADP と $\Delta\mu_{H^+}$ があると前者、ATP があると後者の構造が形成される。(JBC, '03)
- 単離したε サブユニットはATP結合タンパク質であった。結合はATP特異的でADPやGTPは結合しない。(JBC, '03)
- 酵素に結合しているATPのβ-γボンドの切断 (加水分解) は、ATP待ちの角度を0°とすると回転角80°の位置で起こる。(PNAS, '03)
- インテインを利用したNMRによって、単離したβサブユニット(52 kDa)の残基のほとんどをアサインした。βサブユニットがATPの結合によって、開から閉への構造変化を起こすことを見いだした。(JACS, '04, with H. Akutsu)
- F_o-aサブユニットを欠いたATP合成酵素を単離した。これは、ATPを分解できない。F_o-bがモーターのレールとなっているらしい。これに、別に単離したF_o-aサブユニットを加えると、完全な酵素となった。(JBC, '04)
- γサブユニットを強制的に逆回転させて、酵素にATPを合成させた。(Nature, '04, with H. Itoh, and K. Kinoshita)
- 回転とATP結合を同時に観察した。ADPの解離は240-360°の間で起こることが示唆された。(Nat. Struct. Mol. Biol, '04; with T. Nishizaka, K. Kinoshita)
- F_o-cリングは、F_o-cサブユニット10個から成ることがわかった。H⁺/ATP比は3.333..となる。F_oとF₁の回転のステップがくい違う(36°/F_o:120°/F₁)。 (PNAS, '04)
- ATPで駆動されるATP合成酵素の回転を観察した。界面活性剤存在下、特異的阻害剤が有効な初めての観察。回転スピードは350 rpsに達する。 (PNAS, '05)
- “ADP-Mg阻害”に陥ったF₁のγサブユニットを強制的に~+40°回転させると、阻害から生き返る。 (PNAS, '05; with H. Noji)
- ATP合成酵素がATP合成を行う時には、ATP加水分解を行う時と違った構造を経るらしい。εサブユニットがのびている。(BBRC, '06)
- εサブユニットの構造遷移を蛍光共鳴エネルギー移動で追跡した。遷移は触媒よりもずっと遅いプロセスであった。(JBC, '06)
- 酵素の回転がATP待ちの位置で長い間とどまると、先に別のβサブユニットに結合していたATPの分解が起きてしまう。(Biophys. J, '06)
- F_o-cサブユニットのCHCl₃-H₂O中の構造をNMRで決めた。pH2と8.5でGlu65のCOOHの向きは同じだった。Girvinのモデルはあやしい。(JMB '06, with H. Akutsu)
- F_o-cサブユニットのヘリックスが回転できないようにS-S結合で架橋した酵素も十分に活性がある。この点からもGirvinのモデルはあやしい。(unpublished)

- ・リン酸は、ADP-Mg 阻害からの回復を助ける。この効果はH⁺勾配があると著しい。εサブユニットは、このリン酸の効果に拮抗する。(JBC, '06, in press)
- ・20年来不明だった細菌のATP合成酵素オペロンの先頭にあるunc-i遺伝子産物の機能は、F₀-cサブユニットをリングに組み込むシャペロンと判明。(unpublished)
- ・欠陥βサブユニットを1つ含むF₁の回転を分析した。あるβに0°で結合したATPは、200°で分解され、320°-360°でリセット反応 (Pi解離?) する。(unpublished)
- ・γとεサブユニットを遺伝子融合すると、εサブユニットは伸びたままである。それでもATP合成はできる。分解は阻害される。(unpublished)
- ・εサブユニットにATPが結合した構造を結晶解析で明らかにした。(unpublished, with H. Akutsu)
- ・εサブユニットがのびている状態のF₁の結晶構造を解いた。(unpublished, with Y. Shirakihara)

II. 電子伝達系グループ

- ・カルボニル炭素を¹³Cで標識したユビキノン2を用い、*bo*型キノール酸化酵素のQ_H部位に基質は非対称的に結合することを見出した。(Biochemistry, 03, with H. Miyoshi, F. MacMillan)
- ・D₄-Tyr標識*bo*型キノール酸化酵素を利用して反応中心のHis-Tyr共有結合対の形成機構を推定した。(JBC, 04, with T. Kitagawa)
- ・¹³C-Tyr標識*bo*型キノール酸化酵素を用い、Tyr288側鎖のプロトン化状態を推定し、還元によるTyr残基近傍の構造変化を見出した。(JBC, 05, with H. Kandori)
- ・時間分解EPR分光法で*bo*型キノール酸化酵素の酸素還元反応には2つのフェリル中間体が存在することを発見。(Biochemistry, 04, with H. Hori, S. Takahashi)
- ・プロテオミクス研究によってピックアップされたYhcBは*bd*型キノール酸化酵素のサブユニットではなく、機能にも不必要である。(BBA, 06)
- ・ユビキノン2アナログをプローブとした研究に基づいて*bd*型キノール酸化酵素の速度論機構を提案。(JB, 06, with H. Miyoshi, E. Muneyuki)
- ・光親和性標識で*bd*型キノール酸化酵素のサブユニット1のQループのGlu280をユビキノン環のメトキシ基の結合部位として同定。(JBC, 06, with H. Miyoshi)
- ・*bd*型キノール酸化酵素による基質酸化部位のアミノ酸残基としてQループにあるLys252とGlu257を同定した。(Biochemistry, 06, with H. Miyoshi)
- ・*bd*型キノール酸化酵素のサブユニット1のGlu99とGlu107は酵素活性とヘム*b*_{595-d}複核中心の結合に不可欠である。(Biochemistry, 06, with H. Miyoshi)
- ・パルスラジオリシス法を*bo*型キノール酸化酵素に適用し、Cu_B中心やサブユニット1の保存性残基が分子内電子移動に果たす役割を明らかにした。(unpublished, with K. Kobayashi)
- ・大腸菌ヘムO合成酵素発現系を利用し、*bo*型および*bd*型キノール酸化酵素共に基質キノールから電子を受け取るヘム*b*はヘムOでは置換できないことを見出した。(unpublished)
- ・枯草菌ヘムA合成酵素およびヘムO合成酵素の大腸菌発現系を利用し、ヘムを結合するヒスチジン残基を同定した。(unpublished)
- ・パブリカ有色体膜には基質特異性の異なる2種類のNAD(P)H脱水素酵素が存在することを

見出した。(unpublished)

III. V-ATPアーゼグループ

- 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。V-ATPaseは F_0F_1 と同様、回転触媒機構で働く分子モーターであることが確定した。(PNAS, '03)
- ホロV-ATPaseの回転を実証した。ATP加水分解によってLサブユニットのリング(F_0 -cリングに相当)が、 V_1 の A_3B_3 リングに対して回転した。(JBC, '03)
- ホロ酵素を穏和な条件で解離させることにより、A、B、E、G、Iサブユニットは固定子、C、D、F、Lサブユニットは回転子とわかった。(JBC, '03)
- V_0 -d(C)サブユニットの結晶構造を決めた。このサブユニットはソケット状の形で、DF回転軸に対して軸受けのような役割を果たしている。(PNAS, '04)
- A_3B_3D が最小回転単位であることがわかった。FサブユニットはDサブユニットに結合し V_1 のATP分解活性を活性化する。(JBC, '04)
- Fサブユニットの結晶構造を解いた。構造は鞭毛の回転方向制御のCheYと似ていた。FRETによるとC端のヘリックスがATP依存的に動く。(EMBO J, '05)
- V_1 と F_1 は回転の機作が異なる。 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。1 ATPの加水分解で 120° を一気に回る。(PNAS, '05)
- 単離したA、Bサブユニットから A_3B_3 複合体ができる。これにはATPが必要である。 A_3B_3 複合体に、DF複合体が結合して V_1 ができる。(JBC, '06)
- ホロ酵素の2次元結晶の作成に成功した。電子線の反射もみられた。(JSB, '06, with Mitsuoka)
- V_1 と V_0 からV-ATPaseを再構成した。中心シャフト(D,F)がなしで再構成できた。しかし、Fサブユニットなしの再構成体はATPを合成できない。(unpublished)
- A_3B_3 の結晶構造を解いた。AサブユニットのN末領域にバルジ様構造があった。C末端付近にも F_1 - β に見られない付加的な構造があった。(unpublished)

VI. エネルギー変換システム制御系グループ

- 葉緑体 CF_1 のテントキシン阻害感受性に重要なアミノ酸を結晶構造から特定した。同様の変異によって好熱菌 F_1 がテントキシン感受性となった。(JBC, '02 with Groth, Lill, Bald)
- 葉緑体ATP合成酵素が活性化されるのにもなう γ サブユニットの構造変化を検出できた。(BBRC, '03)
- 葉緑体cyclophlinがレドックス制御を受けていることを見だし、さらにそのシステイン残基を同定した。(JBC, '03)
- テントキシン感受性を付与した変異 F_1 の1分子回転観察により、活性制御と停止の関係を明らかにした。(JBC, '04 with Groth, Bald)
- 植物細胞の細胞質にあるチオレドキシンのレドックス標的となるタンパク質群を見いだした。(PCP, '04)
- 植物に特有な γ サブユニットの挿入配列を導入したキメラ酵素で酸性アミノ酸を削除した変異体は、普通とは逆に還元状態で回転が阻害された。(JBC, '04)

- ϵ サブユニットのC末端の α -ヘリックスは F_1 と F_0 の共役に重要である。(BBRC, '04)
- 光合成細菌のタイプ II パーオキシレドキシンは抗酸化ストレスに重要な役割を果たしており、生育に必須である。(JBC, '05)
- 植物細胞質型チオレドキシンの標的として細胞質型リンゴ酸脱水素酵素を確定し、制御機構を明らかにした。(JBC, '06)
- 好熱性シアノバクテリア F_1 複合体の回転を観察し、 ϵ による回転停止位置はADP-Mg阻害の位置であることを見いだした。(EMBO J, '06)
- 葉緑体チラコイドルーメンへ還元力を伝達する系が存在し、この経路には原核生物由来のm型チオレドキシンの働いている。(JBC, '06)
- 葉緑体MGDG合成酵素はチオレドキシンの制御される新奇の酵素である。(FEBS Lett, '06 with Yamaryo, Ohta)
- 葉緑体Mg-キラーゼはチオレドキシンの制御される新奇の酵素である。(unpublished)

1.3. 展望

上記のような成果によって、「ATPシステム」に対する私たちの理解は進んだ。同時に、次の目標も浮かび上がってきた。ATP合成酵素の研究では、素反応の順列が相当はっきりしてきた。最後の素反応は何か、これがわかると反応スキームの概略が完成する。また、回転触媒の機構の中心部分が明らかになってきた。しかし、プロトンによる回転については、1分子観察で回転を直視すること、およびプロトンモーターの構造解析が、重要な課題として残っている。この間、機構解明の進行につれて、ATP合成酵素の制御について、いくつかの形式が認識されるようになってきた。ADP-Mg阻害、 ϵ サブユニットによる阻害、植物におけるレドックス制御など。今後、この制御の分子機構、相互の関係、生理的意味、生物種ごとのバリエーション、が重要な課題となる。このERATOによって、V-ATPaseについての私たちの理解のレベルは、 F_0F_1 型のATP合成酵素のそれに接近してきた。両者はもともと基本的なところは共通しているものの、具体的な点では予想以上に違いがある。同じと決めてかかることは危険である。構造的な研究は格段に進んだ。今後は、V-ATPase全体の構造決定、 V_0 と V_1 を繋ぐストークは何本あるのか、プロトンによる回転の直視、いまだ具体的な手がかりのない制御機構、さらにその先にある生理的な研究、真核生物のV-ATPaseの探求、など課題は多い。植物のATPシステムにおいて、制御解明がすでに主要な課題となっている。このプロジェクトにおいて、レドックス制御を受けているタンパク質群の網羅的な解析と、それに引き続く個々のタンパク質の制御の具体像を明らかにしてきた。また、植物のATP合成酵素に特徴的なレドックス制御を回転の制御として確定した。今後は、この研究をさらに徹底して、レドックス制御の俯瞰的な全体像と詳細な個別制御のようすを明らかにすること、制御の生理的な意味を生きた植物において解析することが課題となるであろう。呼吸鎖の研究は広大な分野をなしている。このプロジェクトでは主として、細菌の末端オキシダーゼであるチトクロム bo 、 bdI について研究努力を集中し、両者の活性中心まわりの知見が多く得られてきた。今後の課題としては、これらの成果を立体構造とダイナミックスの中で位置づけていくことがあげられる。特に立体構造が未知であるチト

クロム*bd*の構造決定は大きな意味を持つ。また、細菌は各々の環境に適応して呼吸鎖の性質を変えている。オキシダーゼも例外ではない。病原性細菌や有用細菌の生理を明らかにする上で、オキシダーゼの性質のバリエーションを明らかにすることは、大きな意義があると思われる。