

ICORP「ATP 合成制御」プロジェクト 追跡評価報告書

総合所見

本プロジェクトでは ATP 合成酵素 (FoF₁-ATPase) の制御機構と生物個体における意義を細菌、植物、ヒト等の多様な生物種について、1 分子操作・計測、遺伝子工学的操作、細胞および個体操作等の多岐に渡る生物学関連技術を駆使して研究を推進した。プロジェクト終了後もこれらの研究は継続され順調に発展し、顕著な成果を上げている。

細菌 ATP 合成酵素研究では、F₁-ATPase 駆動機構の詳細なメカニズムを明らかにした。動物ミトコンドリア ATP 合成酵素研究では、阻害因子 IF1 が細胞内 ATP 恒常性維持に関与していることを IF1 ノックダウン HeLa 細胞作製と機能解析により示した。また、ヒト ATP 合成酵素 F₁-ATPase の大腸菌での発現に成功して 1 分子回転観察を行い、回転機構が細菌の F₁-ATPase とは異なることを明らかにした。これらの成果は学術的な発見として重要であるだけでなく、ATP 合成酵素を原因とするさまざまな遺伝病・疾患の理解に貢献することを期待させるものである。植物葉緑体 ATP 合成酵素の制御機構の研究では、システイン残基導入による S-S 架橋実験に基づき、γ サブユニットの α ヘリックス構造の“ずれ”が制御に関与することを示し、光合成機能向上への道を拓いている。

ATP 合成酵素はあらゆる生物に存在する酵素であり、その動作原理を理解することや、その研究で必要となり開発され磨かれた独自の技術は、将来社会に貢献することが期待される。実際、研究の波及効果の点でも、これら成果をまとめた論文は、医学、薬学、化学、物理学など分野を超えて被引用件数が増えている。ICORP に関わった研究者は研究室を主宰するようになり、ATP 合成酵素を核として研究を発展させている。また ICORP の特色の一つである国際共同研究の面でも、ニュージーランドの Gregory M. Cook 研究室と継続的に日本の研究者が行き来している実績がある。

以上のように、プロジェクト終了後の研究の継続と発展はもちろんのこと、研究成果の科学技術進歩への貢献と応用、そして生命の基本現象への関連づけまでに発展させることができたといった観点からも、その進展は高く評価できる。

1. 研究成果の発展状況や活用状況

(1) プロジェクト終了後の研究の継続、発展

研究継続、発展、活用： 本プロジェクトは ATP 合成酵素 (FoF₁-ATPase) 研究について、細菌グループ、動物グループ、植物グループ、の 3 つから構成されていたが、プロジェクト終了後もそれぞれの研究は下記のように発展し続けている。

細菌の ATP 合成酵素 (FoF₁-ATPase) 研究では、東京大学・野地研究室および早稲田大学・木下研究室と共同で F₁ 駆動機構の詳細なメカニズムを明らかにし、また、大阪大学・阿久津研究室と共同で Fo の構造解析を行っている。実際、細菌 F₁-ATPase の 1 分子操作

と観測では、ステーター部分 ($\alpha\beta$ サブユニット) の構造変化と基質結合/乖離定数の変化の連続性を議論できたこと (早稲田大学木下研究室との共同研究)、ローター (γ サブユニット) との静電的な相互作用は回転に関与しないことが系統の変異導入により解明されローターは単なる回転軸 (棒) として機能していると推定されたことなど、回転機序理解にとって極めて重要な成果が得られている。横山が研究を進めている好熱菌 V-ATPase (VoV₁-ATPase) については、回転子がない状態でもその基本構造が組み立てられること、さらに、回転軸を相同性のない外来タンパク質に変えても V₁ が回転するという興味深い発見をしている。

動物ミトコンドリア ATP 合成酵素の研究では、細菌には見られない ATP 合成酵素のアッセンブル機序や阻害に関する注目すべき成果を上げている。また、阻害因子 IF1 ノックダウン HeLa 細胞作製とその機能解析により、IF1 が細胞内 ATP 恒常性維持に関与していることを示した。さらに、MASC 法と名付けた細胞内ミトコンドリアをインタクトな状態で機能制御する手法を開発し、各種生理機能に関わる因子のノックダウンと薬理学的手法により、ミトコンドリアの ATP 合成機能研究を可能としたことも極めて意義深い。癌に限らず、ミトコンドリアに関わる様々な未知の病態メカニズムの解明や創薬に繋がると期待できる。他方、ヒト ATP 合成酵素 F₁-ATPase の大腸菌での発現にも成功して 1 分子回転観察を行い、回転機構が細菌のそれとは異なることを明らかにしている。

植物 ATP 合成酵素の制御機構研究は久堀が進めている。制御には γ サブユニットの酸化還元が重要であるが、酸化還元によって制御をうけるタンパク質研究の継続により、目的タンパク質のシステイン残基の酸化還元状態を正確に測定する技術の開発に成功して特許を出願した。そのツールは「レドックス応答性タンパク質解析キット」として販売されるに至っている。食料に限らず植物を利用した物質生産が注目されている現在、これらの成果は今後の植物育成に関わる応用開発にとっても重要な情報を提供している。

プロジェクト終了後の予算獲得とそれによる研究継続: 本プロジェクトに直接関連した研究についての大型研究費 (競争的資金) 取得により研究を継続しているプロジェクト参加者として、吉田 (科研費(S))、久堀 (新学術領域)、横山 (科研費(B)) が挙げられる。また 2011 年に開始された久堀 (東京工業大学教授) の CREST では、プロジェクト中より植物の CF₀F₁ による ATP 生産性の向上を主眼に置いた研究を展開し、さらに、その成果を発展・利用するための応用研究を継続している。

報告論文・被引用件数など: プロジェクト期間中に報告された論文は 52 報であり、それらの被引用件数は期間中および終了後も、医学、薬学、化学、物理学など分野を超えて順調に増え続けており累積 1400 件を超えている。また、プロジェクト終了後 5 年弱で 34 報の論文が報告されたが、これらのうち、特に引用の高い論文として Nature 姉妹紙や PNAS 掲載論文などがあり、上位 3 報は 1 年あたり被引用件数が 10 件以上である。基礎研究論文としてのこの高い引用数は評価できる。このように、報告論文数および被引用件数からみても、優れた研究が継続されて行われていること、そしてそれらの成果

が注目されていることがわかる。また招待講演についても、吉田による国内外における多数の講演、鈴木（動物 ATP 合成酵素グループ）による大阪大学医学部での招待講演などがあり、本プロジェクトの研究内容はプロジェクト終了後も国内外で、基礎生物学分野のみならず医学の分野にまで広く注目されていることを示している。なお、プロジェクト期間中および終了後も含めて特許の出願件数は少ないが、終了後に東京工業大学と株式会社同仁化学研究所で共同出願したチオール酸化還元状態を検出する方法特許はすでに実用化（商品化・販売）されている。

(2) 相手国チームとの交流の効果

本プロジェクトでは、細菌の分子生理学とエネルギー代謝および細菌 ATP 合成酵素の先駆的研究者であるニュージーランド・オタゴ大学の G. Cook 教授との共同研究を、ATP 合成酵素 ϵ サブユニットによる ATP 分解阻害の生理学的意味の解明を目的として展開している。そして ϵ サブユニットを変異させた大腸菌を作成しその影響を解析している。Cook 研究室には日本から若手研究者を送り込むことにより両国研究室の強みを融合するなど、相互補完的研究が行われた。プロジェクト期間中に吉田と Cook は、 ϵ サブユニット変異株が塩濃度ストレスに弱いという発見の論文について検討し、さらに、偏性好気性菌である枯草菌についても、日本から派遣された若手研修者が研究を開始している。実際、枯草菌 ϵ サブユニット変異株の生理研究により、C 末端の欠失した ϵ サブユニットを持つ枯草菌変異株ではその孢子発芽能がなくなることを発見した。現在、これら成果の論文を行なっている。

また、プロジェクト期間中の研究成果として、それまで不明であった ϵ サブユニット阻害と ADP 阻害の関係について、 ϵ サブユニット阻害が ADP 阻害を補強延長することを解明した。これは細菌 ATP 合成酵素制御機構の基本的理解に重要な知見であり、病原菌に対する薬剤開発のための基礎データとなっている。残念ながら Cook 教授の日本への招聘やシンポジウム開催などの具体的企画はなかったが、上述のように相手国チームとの研究交流の学術的效果は確実に得られている。

2. 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

(1) 研究成果の科学技術の進歩への貢献

ATP 合成酵素の作動（回転）機構： 世界で初めてヒト ATP 合成酵素 F_1 の 1 分子観察に成功し、その回転機構が好熱菌のそれとは異なることを発見したことが先ず挙げられよう。特に回転機構についてはこれまで、J. Walker（ノーベル化学賞受賞）がウシ F_1 の構造解析から提唱していたモデルと、吉田が好熱菌 F_1 の 1 分子観察から提唱していたモデルには相違点があったが、ヒト F_1 の 1 分子観察の結果、吉田のモデルが正しいことが実証されたことは学術的に極めて重要である。

ATP 合成酵素の制御： 本プロジェクトでは、初めて ATP 合成酵素の制御欠陥が引き起

こす細胞・個体レベルの生理現象解明に取り組んだ。そして細菌（大腸菌、枯草菌）、光合成生物（シアノバクテリア）、動物細胞（HeLa 細胞）、およびマウス個体について、制御欠陥変異体（ ϵ サブユニット阻害欠如、IF1 欠失）を作製し解析した結果、欠陥の生理的な影響は一様ではなく生物種ごとに様々であることを明らかにした。ATP 合成酵素制御の生物学的意義自体は残念ながら明確にはなっていないが、光合成生物 ATP 合成酵素についてはその光による制御、枯草菌ではストレス環境による制御について、生理的意味が示された。また、これら以外の系でも、制御系の相互連携のしくみや個体の環境適応における役割について飛躍的に理解が進みつつある。本プロジェクトが ATP 合成酵素とその制御の生理学的研究の基盤を与えたことは大きな成果であり、生命活動の本質的理解のための基礎科学進展という重要な意味を持つものである。

疾病・健康長寿・老化・植物利用： ヒト ATP 合成酵素 F_1 の回転機構の理解は、ATP 合成酵素を原因とする様々な遺伝病や疾患の理解に貢献すると期待される。また、現在 ATP の生産・消費と疾病および老化の関係が論じられ始め、世界的に ATP 合成酵素と病態や健康・寿命との関連に興味を持たれている。従って、ATP 合成酵素制御の生理作用についての本プロジェクトの成果は今後ますます注目されるであろう。さらに、植物葉緑体 ATP 合成酵素の制御機構の研究においても、これまでの ATP 加水分解についてだけでなく、プロトン駆動力による ATP 合成についての研究が開始されている。その仕組みの理解は光合成機能向上への道を拓くと期待される。

特許： プロジェクト中に 3 件、終了後に 2 件の特許出願がある。特に、MASC (mitochondrial activity of SLO-permeabilized cells) 法による細胞外部からのミトコンドリアのアクセス方法に関してはミトコンドリア内の酸化的リン酸化系と解糖系のバランスが再注目されているだけに、癌ばかりでなく様々なヒト病態の理解、あるいはメタボリックシンドロームの理解において、重要な研究手法となるであろう。その産業化についても今後の発展と貢献が期待される。他方、プロジェクト終了後の植物タンパク質酸化還元状態定量化に関する特許は、薬品メーカーとの共同出願で実用化されており、今後の幅広い利用が期待される。

(2) 研究成果の応用に向けての発展

医療・創薬への応用： 既にジョンソン・エンド・ジョンソン社が結核菌 ATP 合成酵素の阻害剤を薬として上市していることから明らかなように、 F_0F_1 -ATP 合成酵素や V-ATPase は、細菌や癌細胞などに対する創薬研究のターゲットとなっている。吉田が蓄積した ATP 合成酵素に関するデータやミトコンドリア研究のための MASC 法は、癌やヒト病態研究、そして病原菌に対する薬剤開発のための基礎データおよび基盤手法としても貴重である。また、プロジェクト終了後の成果であるヒト F_1 -ATPase1 分子解析法の確立により、今後ヒト F_1 -ATPase の制御機構が解明されれば、ATP 合成酵素の過剰および過少発現に伴う様々な病態を制御する技術の開発につながることが期待される。他方、共同

研究者である野地らは、1分子観測および操作で得られた知見をもとに、1分子デジタルELISA法を開発した。創薬分野においても新しい診断技術としての発展が期待できる。

植物育種への応用： 久堀はCREST研究に採択され、「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」に取り組み、光合成細菌であるシアノバクテリアの大規模培養技術の構築、および光合成による含窒素化合物の工業生産のための基盤技術の開発を目指している。ATP合成酵素の改変による光合成機能向上を意図したものである。将来的には、様々な環境下での有用植物の育種・改良技術への発展、各種光合成細菌を利用した大規模物質産生などの工業分野への展開も期待できる。

以上のように、プロジェクト終了後も、研究は医療・創薬研究開発、植物育種研究など、応用に向けて着実に展開されており、社会に貢献することが期待される。本プロジェクトは、ERATO「吉田ATPシステムプロジェクト」の後継プログラムとして成果を引き継いだが、単なる延長研究としてではなく、まったく新しい切り口で研究を発展させることができ、その結果、このような成果応用も導いている。これらの意義は大きい。

(3) 参加研究者の活動状況

動物研究グループリーダーでありヒトATP合成酵素の研究で成果を挙げた鈴木は、東京大学の主幹研究員として科学研究費基盤研究(C)に2回採択され、研究を継続展開している。ヒトATP合成酵素メカニズム解明に代表される鈴木の結果はヒトそのものについての研究であり、ATP合成酵素およびミトコンドリア機能という観点から、ヒトの生命活動に関わる代謝および老化、疾病の理解、そして医療、創薬分野において、新たな展開を可能とした。藤川研究員は科学研究費若手研究(B)に採択され、ミトコンドリアに局在するエネルギー代謝関連遺伝子の機能について、MASCアッセイ法を用いて解析する研究を行っている。また、島袋研究員は宇部工業高等専門学校の准教授となり、科学研究費新学術領域研究に採択され、ATP依存性アメーバ運動のメカニズム研究を継続している。

V-ATPase(VoV₁-ATPase)の研究で成果を挙げた横山は京都産業大学の教授として、科学研究費基盤研究(B)に2回、挑戦的萌芽研究に1回採択され、V-ATPaseの構造および機能解析そして1分子計測の開発と解析を、これら研究費を利用して継続している。兼任研究員であった久堀は東京工業大学の教授に採用され、科学研究費新学術領域研究やJSTのCRESTなどに採択されて、植物のATP合成制御研究を継続している。

以上のように本プロジェクト参加研究者はそれぞれ順調にキャリアアップし、本プロジェクトで行った研究を継続し発展させている。