

ICORP ATP 合成制御プロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】 吉田 賢右 （京都産業大学 総合生命学部／教授）
Gregory M. Cook (University of Otago, Department of Microbiology and Immunology／Professor)

【評価委員】（五十音順）

金澤 浩 （大阪大学 大学院理学研究科／教授）
吉川 雅英 （東京大学 大学院医学系研究科／教授）
鈴木 裕 （旭川医科大学／教授）
原田 慶恵 （京都大学 物質—細胞統合システム拠点／教授）

評価の概要

地球のあらゆる生物は、ATP（アデノシン3リン酸）分子に内包される高いエネルギーを利用することによって、ほぼ全ての生命活動を成り立たせている。ATPは、ミトコンドリア膜や細菌細胞膜上に存在するATP合成酵素において、同じ膜上にある電子伝達系により膜内外に形成されたプロトン駆動力をエネルギー源に合成される。また、この酵素の逆反応として、プロトン駆動力が十分でない状態ではATPを加水分解してプロトン勾配を膜内外に形成することができる。この酵素は複数タンパク質からなる複合体であるが、吉田研究総括らは、酵素の作動機構において複合体内のサブユニットが回転するという、極めて特徴ある事象が関与することを、巧妙な1分子観察により、世界に先駆けて明らかにしている（M. Yoshida et.al., Nature rev. mol. cell bio. 2001）。すなわち、膜内外の電気化学的プロトン勾配の力とATPの化学結合エネルギーとを相互に変換する因子として認識されていたATP合成酵素の変換機構に、構成因子の回転という力学的エネルギーが新たに関与することが、研究総括らによって明らかにされた。ATP合成酵素がこのような複雑かつ特徴的エネルギー変換装置であることを証明したことは、今なお世界のいかなる研究グループの追従を許さぬオリジナリティの高いものとなっている。

本ICORP ATP合成制御プロジェクトは、上記成果ならびに研究総括がリーダーを務めたERATOプロジェクト*からさらに進展し、ATP合成酵素の触媒機構に加えてATPの合成と分解という逆反応間の制御がどのような分子内機構で制御されているか、またその制御の生理的意味について明らかにしようとするものである。研究構想全体の基盤に、研究総括らのオリジナルかつ先導的な研究成果があることは、本プロジェクトの特筆すべき点である。

細胞内ATP量の制御の破綻は、おそらく細胞と個体にエネルギー欠乏による異常を引き起こすと考えられる。従って生物にはそれを防ぐ制御機構、すなわちエンジンとしてのATP合成酵素を調節するブレーキやアクセルがあるはずだが、その調節のしくみには不明な点が多く残されていた。本プロジェクトでは、植物のATP合成酵素において、ATP合成活性が明所・暗所で増減することをほうれん草を用いて実証するとともに、その中核となる分子機構として、F₁部分のγサブユニットの酸化還元状態が日照により変化すること、また、変異体の解析からεサブユニットが重要な役割を果たすことを明らかにしている。このようにATP合成酵素の生理学的役割を生物固体レベルで実験的に示した例はなく、本

プロジェクトの制御機構の生理学的意義を解明しようとする構想実現に大きな貢献となっている。こうした成果の他に本プロジェクトでは、新しい研究手法や解析系を開発して研究構想の実現を目指している。例えば、ほ乳類細胞内の ATP 量をリアルタイムで実測したり、ミトコンドリア内の ATP 量を人為的に制御する方法の開発などを行っている。また、野地博行（東京大学）らのグループとの連携で、ATP 合成酵素の一分子内の回転を外部の力で人為的に制御する手法を確立した点でも新展開がある。従って今後さらに、ATP 合成酵素の制御を必要とする新たな生理学的局面を見出すとともに、その制御機構自体の解明も進むことが期待される。それによって、より高い評価に通じる研究の展開が今後期待できる。

本 ICORP プロジェクトでは、細菌、植物、ヒト（動物）といった多様な生物種について、1 分子観察、遺伝子工学的操作、細胞及び個体操作という多岐に渡る手法を駆使して研究を推進している。研究総括は、多様な専門を持つ研究者を統括し、その育成や各グループ間の連携に配慮し、適切な判断でプロジェクトを運営している。また、細菌生理学的研究を可能にするため、すぐれた知見と手法を蓄積している人材としてニュージーランド・オタゴ大学 G.Cook 教授を見出し、若手研究者を派遣するなど緊密な連携で国際共同研究を進めている。

以上を総合して、本 ICORP ATP 合成制御プロジェクトは、ICORP 事業に相応しい研究体制を整え、オリジナルかつ高水準の成果を挙げていることから、戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」に資する成果が得られると期待される。

※ 吉田 ATP システムプロジェクト（2001 年 10 月～2007 年 3 月）

1. 研究プロジェクトの設定及び運営について

1-1. プロジェクトの全体構想

ATP（アデノシン3リン酸）は、ADP（アデノシン2リン酸）と無機リン酸（Pi）のリン酸無水物結合によって合成される、分子量 500 ほどの小さな化合物である。このリン酸無水物結合を加水分解すると、エステル結合の加水分解など通常の分解反応の 1.5～2 倍ほどの高いエネルギーが放出される。地球のあらゆる生物は、この ATP の加水分解のエネルギーを利用して生命活動を行っている。この ATP 合成はミトコンドリア膜や細菌細胞膜上に存在する ATP 合成酵素によってなされるが、その酵素の構造・機能の特徴ある点については、吉田研究総括らの巧妙な 1 分子観察によって明らかにされた（M. Yoshida et.al., Nature rev. mol. cell bio. 2001）。すなわち、膜内外の電気化学的プロトン勾配の力と ATP の化学結合エネルギーとを変換する因子として認識されていた ATP 合成酵素の変換機構内に、構成因子の回転という力学的エネルギーが新たに関与することが、研究総括らによって明らかにされた。それまでの研究背景には、P.Mitchell(1978, ノーベル賞) の H⁺ の電気化学的勾配を駆動力とする ATP 合成機構の提唱、P.Boyer(1997, ノーベル賞) の触媒機構の動力学的解析にもとづく回転モーター機構の予言、J.Walker(1997, ノーベル賞) の触媒部位の結晶構造決定があったが、回転機構が触媒機構に実在することを明らかにし、ATP 合成酵素の触媒機構の真の姿を明らかにした点で、研究総括らの業績は今なお世界のいかなる研究グループの追隨を許さぬ独自性を有している。

本 ICORP プロジェクトは、上記ならびに研究総括がリーダーを務めた ERATO プロジェクト*の研究成果をもとに、さらに、ATP 合成酵素の制御機構とその制御の生理的意味について明らかにすることを全体構想として掲げている。生物の ATP 合成能力と消費需要は刻一刻と変化している。ATP 合成に必要なプロトン濃度勾配と ADP、無機リン酸が適量存在する場合は問題がないが、プロトン濃度勾配が低い場合、ATP 合成酵素は ATP の加水分解反応によってプロトンを汲み出す可能性がある。そのような反応はエネルギー源としての ATP の無駄使いであり、生物にとって致命的である。従って生物にはそれを防ぐ制御機構、すなわちエンジンとしての ATP 合成酵素を調節するブレーキやアクセルがあるはずだが、その調節のしくみについては、不明な点が多く残されている。

本プロジェクトは、生化学、遺伝子工学、及び研究総括らが得意とする 1 分子解析など、様々な手法を融合的に駆使するとともに、これらの解析を異なる生物種（細菌、植物、ヒト（動物））に展開することによって、各生物種共通または特有の制御システムを明らかにしようとするものである。この成果は、将来的な医療・医薬利用、植物の有効的利用などの基盤となることが期待できる。

※ 吉田 ATP システムプロジェクト（2001 年 10 月～2007 年 3 月）

1-2. プロジェクトの運営

本プロジェクトは、細菌における ATP 合成酵素の制御グループ、植物における ATP 合成酵素の制御グループ、動物における ATP 合成酵素の制御グループの 3 グループから構成されている。研究対象タンパク質分子は共通であるが、扱う生き物が全く異なるという

非常にユニークな構成である。このような異分野の研究者が吉田研究総括の強力な牽引力の下、ATP 合成酵素という共通のタンパク質分子を対象に一丸となって研究を行っている。

プロジェクトの運営に関しては、資金の配分、人員の確保、若手研究者の処遇などで研究総括の適切な配慮が評価できる。基礎研究の成果が歴史に残るかどうかは学術論文として出版されることで評価しなくてはならないが、すでに学術論文発表が複数なされており、まもなく発表できると思われるデータもあることから、着実に研究が進んでいると考えられる。若手研究者は自らのアイデアで研究を進めており、優れた成果を順当に上げる中で、それらを担当した若手研究者も育成されている。研究総括の方針により、研究機器への投資よりも「人への積極的な投資」を行っていることが実を結んでいる。こうして育成された研究者は、次世代の研究進展を担うであろう。

1-3. 相手国機関との交流実施状況

国際研究交流相手として、細菌の分子生理学とエネルギー代謝及び細菌での 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 G.Cook 教授と共同研究が行われている。本共同研究では、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる ATP 加水分解阻害の生理学的意味を探る目的で、 ϵ を変異させた大腸菌の解析が行われている。これまでのところ、高塩濃度環境下では高い ATP 加水分解が認められ、大腸菌の増殖阻害が起きることが見出されているが、現時点でその機構は不明であり、意義の解明には到っていない。本プロジェクトでは G.Cook 研究室に日本から若手研究者を送り込むことで両国の研究室の強みを融合するなど、ICORP 事業のしくみを有効に活用し、相互補完的研究体制が構築されていると評価できる。一方、研究成果は上がりつつある段階であり、国際連携は目に見える形で緒についたところと言える。今後の研究進展に期待したい。

【研究プロジェクトの設定及び運営】 a（的確かつ効果的であった）

【研究活動の状況】 a（良好な研究展開を示した）

2. 研究内容、研究成果

ATP 合成酵素の制御機構は、現時点で以下の4つの方式が知られている。本プロジェクトでは、これらの分子メカニズムと相互関係（制御方式の統合のしくみ）、及び細胞や個体に対する生理学的な意義を明らかにすることを課題としている。

- ・ ϵ サブユニットによる阻害
- ・ ADP による阻害
- ・ ATP 加水分解反応阻害因子 IF1 による阻害
- ・ γ サブユニットによる阻害

本章では、プロジェクトを構成する3つの研究グループの現在までの研究進捗状況を個別に評価する。

2-1. 細菌のATP合成制御グループ

細菌の実験系では遺伝子工学的手法や1分子回転観察手法が確立されており、本グループはその強みを生かして研究を進めている。細菌におけるATP合成酵素の制御には、ADPによる阻害と ϵ サブユニットによる阻害があると考えられている。ADP阻害は、1つの触媒部位にADPが強く結合して残ってしまうことによって生じることがわかっている。また、 ϵ サブユニットによる阻害は、X線結晶構造解析から、 ϵ サブユニットのC末端にある2本の α ヘリックスがヘアピン型または伸長型の2つの構造をとり、伸長型がATP合成酵素の回転を阻害することによって生じることが吉田研究総括らによって明らかになっていた。

本グループではさらに、ADP阻害と ϵ 阻害が協調的に効果を発揮しているのではないかという仮説のもとに、様々なATP濃度条件下でATP加水分解活性測定と回転運動観察がなされた。その結果、ATP高濃度条件下では、 ϵ 阻害は起きず、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 阻害が現れることを明らかにし、 ϵ 自体がATPを結合する能力をもち、細胞内ATP濃度を検出して低濃度条件下ではATP加水分解が進行しないようにしているとの仮説を提唱している。さらに興味深いのは、ATP合成酵素は、 ϵ による阻害時にADPによる阻害時と同じ角度（80度の回転位置）になっていることを見出し、2つのATP分解の機構に相関性があることを提案したことである。さらに吉田研究総括らが得意とする顕微鏡一分子観察技術を使って、分子に磁気ビーズを結合させ、外部磁場を回転させることで分子を強制的に決まった角度だけ回転させ、阻害を解除することで各阻害方式のダイナミクスを明らかにした。これらの結果から、ATP合成酵素のADP阻害と ϵ 阻害の関係について、個別的な阻害が独立して起こるのではなく、まず、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ことは、複数種類の阻害機構の必要性を考える上で重要である。また、FRET技術を用いた ϵ サブユニットの構造変化の解明、 ϵ のC末端ヘリックスの欠失とNTP加水分解活性及び、NTP合成反応活性への影響を明らかにするなど、興味深い成果を挙げている。さらに、 ϵ の遺伝子のC末端を欠失させた、 ϵ 阻害がない大腸菌株を作製しその菌について解析した結果、高低塩濃度環境では増殖速度が半減することが明らかになった。また、 ϵ 阻害がない枯草菌では、孢子発芽欠陥により孢子生存率が低下することが見出され、 ϵ 制御は孢子の状態に耐えるために必要であることが示唆された。このように菌種依存的なストレス環境下での ϵ 阻害の生理的重要性を明らかにした。

さらに、回転子 γ -サブユニットに結合させた磁気粒子を外部磁場により強制回転させる手法によりトルクを見積もり、ATP加水分解時に3つの状態を遷移してF1がトルクを発生すること、それらの回転角度を解明するとともに、ATPの合成（逆回転）は加水分解（順回転）の3遷移状態の逆をたどること、従って合成と分解は同じ反応経路にあることを示唆し、ATP分解と合成のメカニズムとその制御について新たな観点から理解を深めた。これらの主要な発見は、オリジナリティの高い成果である。

2-2. 植物のATP合成制御グループ

植物の葉緑体では光合成によってプロトン輸送が行われ、葉緑体チラコイド膜の内外に

形成されたプロトンの電気化学的勾配を駆動力として ATP 合成酵素が ATP を産生している。従って、光合成が行えない夜間は ATP 合成を行うことができないため、ATP 合成酵素が逆反応によって ATP を加水分解してしまうのを防ぐしくみがあると考えられる。植物における ATP 合成酵素 (CFoCF1) の制御には、ADP による阻害、 ϵ サブユニットによる阻害、及び γ サブユニットによる阻害の 3 つの方式が知られている。

本グループは、他の研究室との共同研究で、 ϵ の構造を決定しそれが、細菌の ϵ と同じ構造をしていることを明らかにするとともに、 ϵ サブユニット阻害の生理的意義をシアノバクテリアを用いて解析し、 ϵ サブユニットの変異株は暗所に長時間放置された場合生存能力が低下することを示した。また植物では、昼の間、光合成によって ATP を合成している酵素が、夜暗くなってから ATP を無駄に消費してしまわないようにするために γ サブユニットにおける S-S 阻害が存在することが 1983 年から予想されていた。すなわち、 γ サブユニットにある二つのシステインの SH 基が酸化（ジスルフィド結合が形成）されると ATP 合成酵素の活性が低下するという機構だが、本グループはこの 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、さらに、野外栽培ほうれん草で日照に応答して γ サブユニット SH 基の酸化還元が実際に生じることを初めて示した。このように生きた植物細胞で γ サブユニットの酸化、還元が確認されたのは初めての例である。さらに、 γ サブユニットの酸化とそれによる ATP 分解活性阻害は、電子伝達系の阻害及びプロトン駆動力の消失により引き起こされることを発見し、その制御機構の解明が今後の課題として重要であることを示した。本グループは、グループリーダーの東京工業大学 久堀徹教授の強力な牽引の下、細菌グループとも連携しつつ ATP 分解抑制機構の生物学的意義を明確に示しており、特筆すべき成果を上げていると言える。

2-3. 動物の ATP 合成制御グループ

動物細胞における ATP 合成酵素の研究は、サブユニットの種類が多いことや細胞の取り扱いが難しいことなどから、細菌、植物に比べて解析が進んでいない。本プロジェクトではまず、新しくヒトの ATP 合成酵素の解析系を立ち上げたことを高く評価したい。また、動物細胞においてミトコンドリアの 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 法 (mitochondrial activity of SLO-permeabilized cells) を開発したことも意義深い。従来、動物細胞のミトコンドリアの ATP 合成活性を測定するには、多段階の細胞処理が必要であり、多量の細胞を要したが、MASC 法では、マイクロプレート上の培養細胞にストレプトマイシンを投与し、数回の洗浄処理のみで ATP 合成活性が測定可能であり、必要な細胞数も従来の 1000 分の 1 程度である。この手法により、ATP 合成酵素の制御に関連する遺伝子をスクリーニングする事も可能になった。医療・医薬研究開発の基盤ともなるであろう。今後は、この手法を使って効率よく ATP 合成活性の測定を行い、新しい知見が得られることが期待できる。

本グループのもう一つの成果は、ATP 合成酵素に付随する因子である DAPIT 及び MLQ が FoF1ATP 合成酵素の形成・維持に関与していること、すなわち酵素活性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ことである。DAPIT は、糖尿病を誘発させたラットにおいてインスリン応答性組織での発現が減少する因子として同定されており、糖尿病発症機構との関係にも関心が寄せられる。しかし、これらの生物学的な意義を明らかにするには、今後のさらなる研究が必要である。細胞レベルに留まらず、

生物個体レベルで ATP 合成制御の役割を解明していくと、分子から個体までカバーする理想的な生物学的ストーリーが描けるのではないだろうか。

本グループはまた、ヒト F_1 の回転と IF_1 による回転阻害の特性を明らかにすることに成功している。このことにより、ヒト遺伝病の原因となると言われている F_1 変異の詳細解析、また、ATP 合成活性に影響を及ぼす低分子化合物（ホルモン類似体等）のスクリーニングや作用機序解明が可能となった。このような実験系を構築できたことは、今後の臨床研究において重要な成果である。一方、動物細胞の ATP 合成酵素はミトコンドリアという細胞内コンパートメントに収まっており、またミトコンドリアが進化上細菌に由来していることを踏まえると、ミトコンドリアにはある程度の独自性があると考えられる。従って、細胞内部環境に対するミトコンドリア自体の環境応答の解析といった地道な研究展開も必要ではないだろうか。以上、動物グループは白紙の状態から始めた挑戦的なテーマに取り組んでおり、様々な苦労があったことが想像できるが、その成果が挙がりつつあり、科学的側面及び医療・医薬的側面ともに、今後の展開が期待される。

【研究成果（科学技術的側面）】 a（成果として良好である）

【研究成果（産業社会的側面）】 a（成果として良好である）

3. 総合評価

本 ICORP プロジェクトでは、これまで解明されていなかった、ATP 合成酵素の制御機構と生物個体における意義を明らかにするため、細菌、植物、ヒト（動物）といった多様な生物種について、1 分子観察、遺伝子工学的操作、細胞及び個体操作という多岐に渡る手法を動員して研究を推進している。特筆すべきは、本プロジェクトが、ATP 合成酵素の分子複合体研究における吉田研究総括の全くオリジナルな発見に基づいている点である。このことは、世界のいかなる研究グループの追従を許さぬ研究成果となって現れている。また、本プロジェクトの研究者はこれまでまったく異なる生き物を研究対象として取り扱ってきた研究者の集まりであるが、研究総括は、研究者の育成や各グループ間の連携に配慮し、適切な判断でプロジェクトを運営している。また、細菌生理学的研究を可能にするため、すぐれた知見と手法を蓄積している人材としてニュージーランド・オタゴ大学 G.Cook 教授を見出し、若手研究者を派遣するなど緊密な連携で国際共同研究が進められている。

一方、ATP 合成酵素の制御の生物学的意義が明確になっていないことは課題である。細胞内 ATP 量の制御の破綻は、おそらく細胞と個体にエネルギー欠乏による異常を引き起こすだろう。しかし、制御を必要とする生理学的局面、例えば ATP が枯渇する局面などは具体的に見出されていない。これまでの成果の中では、植物の ATP 合成酵素の光による制御、及び枯草菌でのストレス環境による制御においてその生理学的意味が示されており、本プロジェクトの構想に沿った結果が得られていると言え、高く評価できる。今回、プロジェクトからは順調な研究進展、及び新しい研究テーマに取り組むための研究手法や解析系を開発したことが報告された。この基盤をもとに、植物や菌以外の系においても、各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むことが期待できる。さらに、生体のエネルギー代謝に関わる因子やその制御機構の解明により、将来的に、医療・医薬分野での応用展開が強く期待される。

以上を総合して、本 ICORP ATP 合成制御プロジェクトは、優秀な研究水準にあると認められ、戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」に資する成果が得られたと認められる。

〔総合評価〕 A（戦略目標の達成に資する成果が得られた）

以上