

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570159

研究課題名(和文) 葉緑体型ATP合成酵素の活性調節機構を構造の側面から理解する

研究課題名(英文) Understanding of the regulatory mechanism on the activity of chloroplast-type ATP synthase by X-ray crystallography

研究代表者

紺野 宏記 (KONNO, HIROKI)

金沢大学・バイオAFM先端研究センター・准教授

研究者番号：80419267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体型ATP合成酵素の部分複合体である  $\alpha_3\beta_3$  に存在する挿入配列と 阻害の関係を構造生物学的側面から理解するために、 $\alpha_3\beta_3$  のX線結晶構造解析に取り組んだ。これまで、結晶化に適した変異  $\alpha_3\beta_3$  の作成に成功し、結晶を得ることができたが、高分解能のデータはまだ得られていない。

また、葉緑体型ATP合成酵素の活性制御に重要な挿入配列がどのように遠く離れた触媒部位である サブユニットに影響しているかを生化学的手法により検証し、サブユニット上のN末端およびC末端の  $\alpha$ -ヘリックスのコイルドコイル構造の相対的なズレが、挿入配列による活性制御効果を サブユニットに伝達している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inserted region on the gamma subunit of chloroplast type ATP synthase strongly affect to the inhibitory effect of endogenous epsilon subunit (epsilon inhibition). To understand the relationship between the inserted region and the epsilon subunit, we try to dissolve structure of sub-complex of chloroplast type ATP synthase ( $\alpha_3\beta_3\epsilon$ ). Though we could not yet get crystal in high resolution, we succeeded to make stable sub-complex mutant for crystallization and could get some crystal. We also investigated an affect of the inserted region on the gamma subunit to the ATPase activity on the beta subunit because these two parts exist far from each other. We then identified a conformational change of two central alpha helices in gamma subunit which is interact with catalytic sites on the beta subunit. It is necessary to read regulatory effect of the inserted region.

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：ATP合成酵素 葉緑体

## 1. 研究開始当初の背景

ATP合成酵素( $F_0F_1$ )は、細菌から高等植物に至るほぼすべての生物が利用しているエネルギー変換の鍵酵素であり、分子内の一部分が回転しながら機能するという生物界で知られているもっともユニークなモータータンパク質である。この酵素は生体のエネルギー代謝において非常に重要であり、その活性がさまざまな機構によって調節されている。これまで、ATPの加水分解産物であるADPが酵素上から解離しないことによる不活性化(ADP阻害)や、内在性の阻害サブユニットである $\epsilon$ による調節( $\epsilon$ 阻害)などがよく知られている。また、葉緑体ATP合成酵素の $\gamma$ サブユニットには、他の生物種由来のATP合成酵素が持たない37アミノ酸長の挿入配列が存在しており、光条件下では、挿入配列中に含まれる2つのシステイン間のジスルフィド結合が還元され酵素活性が上昇する(酸化還元調節)。これは、光合成を営む葉緑体では、ATP合成酵素が光条件下でのみ働くため、暗所で逆反応であるATP加水分解活性を抑制するシステムと考えられている。

これまで、挿入配列の一部分を持っているシアノバクテリア由来の酵素をもちいて、この領域を削除するとADP阻害や $\epsilon$ 阻害にきわめて陥りにくくなることが明らかになっている(Konno et al. 2006, *EMBO J.* 25, 4596-4604)。すなわち、挿入配列はADP阻害や $\epsilon$ 阻害に対する感受性を決定する重要な役割を担っている。しかし、 $\gamma$ サブユニットの挿入配列は、ATPの加水分解を触媒する $\beta$ サブユニット上の触媒部位から遠く離れているので、活性制御のための何らかの情報伝達の分子機構が必要である。しかし、酵素分子内をつなぐ活性制御シグナルの実体は、いまだに不明である。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究課題ではシアノバクテリアATP合成酵素の部分複合体( $\alpha_3\beta_3\gamma$ )を用いて、挿入配列を持った複合体分子と、これを欠いた複合体分子を結晶構造レベルで比較し、 $\beta$ - $\gamma$ 間の相互作用がどのように変わることによってADP阻害や $\epsilon$ 阻害に陥りやすくなる

のかを明らかにする。

また、上記の研究計画と並行して、葉緑体型ATP合成酵素の活性制御を生化学的視点から理解することを目指す。葉緑体型ATP合成酵素の活性制御に重要な挿入配列は触媒部位である $\beta$ サブユニットから遠く離れた部位にあり、直接影響を与えるようには見えない。触媒部位サブユニットと直接相互作用するのは、 $\gamma$ サブユニットにあるN末端およびC末端の $\alpha$ ヘリックスのコイルドコイル構造であるので、これらの $\alpha$ ヘリックスが相対的にずれることで、活性に変化が生じることが考えられる。この仮説を検証するため、 $\alpha$ ヘリックスにシステインを導入し、S-S架橋をかける実験を行い、架橋により酵素活性が大きく変化するかどうかを検証する。さらに、制御機構を解明する補助的ツールとして葉緑体型ATP合成酵素特異的に作用するカビ毒・テントキシンを用いたX線結晶構造解析および1分子回転観察も行う。

## 3. 研究の方法

### ① 構造解析のための変異体の作成およびその精製法の確立

これまでATP合成酵素の研究では、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ は精製を容易にするためヒスチジンタグを導入してきたが、付加したタグがタンパク質の結晶化に影響を与える可能性が高い。そこで、精製後にヒスチジンタグを取り除くためのトロンピン切断サイトをタグとタンパク質の間に導入した $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用意する。さらに、トロンピンによるタグの除去が不完全な場合、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 分子が不均一な集団となり、これが結晶化に影響する可能性もあるので、HPLCを用いてタグを利用しない $\alpha_3\beta_3\gamma$ の精製法も早期に確立する。

### ② $\epsilon$ を含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ の構造解析

葉緑体型 $\alpha_3\beta_3\gamma$ では挿入配列により内在性の阻害サブユニットである $\epsilon$ による活性制御( $\epsilon$ 阻害)が非常に強く発現される。挿入配列と $\epsilon$ 阻害の関係を明らかにするために、 $\epsilon$ サブユニットにより阻害された構造をとっている $\alpha_3\beta_3\gamma$ の構造解析を行う。そして、挿入配列を削除した $\alpha_3\beta_3\gamma$   $\epsilon$ のそれと比較することによって、挿入配列があると $\epsilon$ どのような分子機構で阻害が増強されるかを明らかにする。十分なタンパク質試料を調製した後に、結晶化ロボット・結晶化キットを用いて初期スクリーニングを実施し結晶化条件を探る。次に、結晶化条件の精

密化を行う。結晶化に成功したら、X線構造解析を行う。すでに、ミトコンドリアや大腸菌の $\alpha_3\beta_3\gamma$ の構造が報告されているので、分子置換法による位相決定が可能である。続いて、定法に従い、電子密度の計算、分子モデリング、構造の精密化を行い、立体構造を決定する。

### ③ 挿入配列を欠いた $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶構造解析

挿入配列を欠損するとADP阻害にきわめて陥りにくいことから、挿入配列の有無による複合体分子の構造の違いを比較することで、ADP阻害状態を構造面から理解する。挿入配列を欠損した変異 $\alpha_3\beta_3\gamma$ はすでに作成済みである。タンパク質試料を調製した後は、結晶化ロボット・結晶化キットを用い初期スクリーニングを実施し、結晶化条件を探り、構造解析を実施する。また、本研究計画がうまく進行しない時は、これまでも生物種を変えることにより結晶化が成功した例が少なくないことから、他の好熱性シアノバクテリア (*Thermophilic Cyanobacterium*, *Synechococcus* sp. MA19)由来酵素の大量発現系を構築し、X線結晶構造解析を行う。発現系の作成期間としては、申請者が構築した *Thermosynechococcus elongatus* BP-1の発現系の例を基準とすると1~2ヶ月程度である。

### ④ 低濃度 テントキシン条件下における $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶構造解析

1分子回転実験より、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ はATP結合待ちの位置(0度)と、触媒反応を起こす位置(80度)の2カ所の $\gamma$ の角度で安定化することがわかっているが、低濃度(10~50  $\mu$ M)のテントキシンは0度の位置で $\alpha_3\beta_3\gamma$ の回転を阻害する。すなわち、テントキシンを加えた状態で $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶化が成功すれば、未だ解かれていないATP結合待ちの状態での結晶構造が分かる。そこで、モル比1:1の条件でテントキシンを含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶化条件を探り、構造解析を行う。

## 4. 研究成果

### 結晶構造解析に向けた変異複合体の作成および結晶化条件の探索

はじめに、構造解析に必要な変異体の作成およびその精製法の確立を行った。これまでATP合成酵素の研究では、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ は精製を容易にするためヒスチジンタグを導入してきたが、付加したタグがタンパク質の結晶化に影響を与える可能性が高い。そこで、精製後にヒスチジンタグを取り除いた

めのトロンピン切断サイトをタグとタンパク質の間に導入した $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ を用意した。十分なタンパク質試料を調製した後に、結晶化ロボット・結晶化キットを用いて初期スクリーニングを実施し結晶化条件を探ったが、良好な結晶化条件は見つからなかった。トロンピンによるタグの除去が不完全な場合、 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 分子が不均一な集団となり、これが結晶化に影響する可能性が考えられた。そこで、タグを利用しない $\alpha_3\beta_3\gamma$ の精製法を確立した。再度、初期スクリーニングを実施したところ、結晶化タンパク質を得ることができた。しかし、得られた結晶の大きさは十分ではなかった。

また、結晶化する際の長期間のインキュベーションにより $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の $\alpha$ サブユニットが分解されていることが明らかとなった。これは、精製後のサンプルに含まれるごくわずかなプロテアーゼによって限定分解を受けたものと考えられる。そこで、限定分解を受けている箇所を他のアミノ酸に置換した $\alpha$ サブユニットを含む変異 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 変異体を作成した。この変異体の安定性を調べたところ、野生型では6日で $\alpha$ サブユニットの分解が確認されたが、変異 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ では10日経っても $\alpha$ サブユニットが分解されることはなかった(図1)。さらに長期間(19日間)のインキュベーションでも $\alpha$ サブユニットが分解されることはなかった。長期間の結晶化にも十分に耐えられる $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の作成に成功した。この変異 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ を

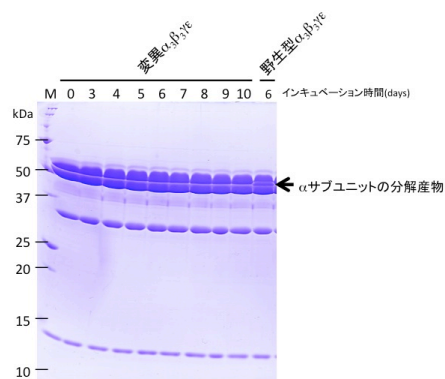


図1. 分解を受けにくい変異 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ の作成

用い結晶化条件の最適化を行ったところ、ある程度の大きさの結晶をえることができた(図2)。得られた結晶を用いて、実験室レベルの回折実験を行ったが、 $\beta$ - $\gamma$ 間の相互作用がどのように変わることによってADP阻害や $\epsilon$ 阻害に陥りやすくなるかを議論できるほどの分解能は得られなかった。分解能を上げるため、結晶を浸す溶液の沈殿剤等の濃度を上げることで結

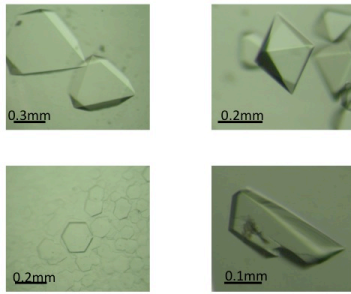


図2. 得られている結晶

晶から水分子を除いたが、分解能の向上は見られなかった。また、放射光施設(Spring8)でも回折実験を行ったが、放射光施設のビームでも分解能の向上は見られていない。

また、結晶構造解析と並行して、葉緑体型 ATP 合成酵素の活性制御を生化学的視点から理解する研究計画も行った。葉緑体型 ATP 合成酵素の活性制御に重要な挿入配列は触媒部位である $\beta$ サブユニットから遠く離れた部位にあり、直接影響を与えるようには見えない。触媒部位サブユニットと直接相互作用するのは、 $\gamma$ サブユニットにある N 末端および C 末端の $\alpha$ ヘリックスのコイルドコイル構造であるので、これらの $\alpha$ ヘリックスが相対的にずれることで、活性に変化が生じることが考えられる。この仮説を検証するため、 $\alpha$ ヘリックスにシステインを導入し、S-S 架橋をかける実験を行い、架橋により酵素活性が大きく変化するかどうかを検証した。その結果、架橋をすることで、酵素活性が大きく上昇する変異体を見いだした。また、阻害サブユニットである $\epsilon$ に対する挙動にも変化が見られた。S-S 架橋をする前は、100%近い阻害率であったが、架橋をすることで、40%近まで阻害率が減少する変異体を得られた。以上のように、 $\gamma$ サブユニット内の N 末端および C 末端の $\alpha$ ヘリックス間の相対的な位置関係が、活性の制御に重要な役割を果たすことを強く示唆する結果が得られた。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Sunamura, E., Kamei, K., Konno, H., Tamaoki, N., Hisabori, T. (2014) Reversible control of F<sub>1</sub>-ATPase rotational motion using a photochromic

ATP analog at the single molecule level”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 358-363. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.117.

2. Kishikawa, J., Ibuki, T., Nakamura, S., Nakanishi, A., Minamino, Y., Miyata, T., Namba, K., Konno, H., Ueno, H., Imada, K., and Yokoyama, K. (2013) Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and flagellar protein export apparatus. *PLoS One.* **8**(5):e64692. doi: 10.1371/journal.pone.0064695.
3. Hisabori, T., Sunamura, E., Kim, Y., Konno, H. (2013) The Chloroplast ATP Synthase Features the Characteristic Redox Regulation Machinery. *Antioxid. Redox. Signal.* **19**, 1846-1854. doi: 10.1089/ars.2012.5044.
4. Nojima, T., Konno, H., Kodera, N., Seio, K., Taguchi, H., Yoshida, M. (2012) Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone. *PLoS One.* **7**, e52534. doi: 10.1371/journal.pone.0052534.
5. Sunamura, E., Konno, H., Imashimizu, M., Mochimaru, M., Hisabori, T. (2012) A conformational change of the  $\gamma$  subunit indirectly regulates the activity of cyanobacterial F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **287**, 38695-38704. doi: 10.1074/jbc.M112.395053.
6. 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. doi: 10.1093/pcp/pcs018.
7. Imashimizu, M., Bernat, G., Sunamura, E., Broekmans, M., Konno, H., Isato, K., Roegner, M., Hisabori, T. (2011) Regulation of F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits is significant for light/dark adaptation. *J. Biol. Chem.* **286**, 26595-26602. doi: 10.1074/jbc.M111.234138.

[学会発表] (計 8 件)

1. 松岡裕太、吉田啓亮、紺野宏記、久堀徹 「葉緑体チオール酵素の in vivo レドックス状態に影響を与える因子の探索」

第 55 回日本植物生理学会年会  
2014.3.18-20, 富山大学五福キャンパス

2. 砂村栄一郎、亀井敬、紺野宏記、玉置信之、久堀徹「光応答性 ATP アナログによる F1-ATPase の活性と回転の制御」日本生体エネルギー研究会・第39回討論会、2013.12.18-20, 静岡県コンベンションアーツセンター
3. Takamitsu Haruyama, Noriyuki Kodera, Hiroki Konno 「Investigation of hPrx2 oligomerization process by high-speed AFM」  
第 51 回日本生物物理学会年会  
2013.10.28-30, 国立京都国際会館
4. Liwen Zhu, Hiroki Konno, Momoko Okuda, Noriyuki Kodera, Toshio Ando, Hideki Taguchi 「Real-time observation of amyloid fibril formation of yeast prion Sup35 by high-speed atomic force microscopy」  
第 51 回日本生物物理学会年会  
2013.10.28-30, 国立京都国際会館
5. 紺野宏記  
「葉緑体 ATP 合成酵素の活性調節機構」  
北陸植物学会 2013 年度北陸地区インターキャンパスセミナー 2013.6.23, 金沢大学サテライト・プラザ
6. 砂村栄一郎、紺野宏記、今清水真理、持丸真理、久堀徹「シアノバクテリアF1-ATPaseにおけるγサブユニットの構造変化と活性制御の関連」日本生体エネルギー研究会・第38回討論会 2012.12.22-24, 岡山大学薬学部
7. 野島達也、紺野宏記、古寺哲幸、清尾康志、田口英樹、吉田賢右「DNA構造によるタンパク質の柔軟な連結」細胞を創る研究会5.0 2012.11.21-22, 東京工業大学すずかけ台キャンパス
8. Sunamura, EI, Konno, H, Imashimizu, M, Mochimaru, M, Hisabori, T  
「Conformational change of the  $\gamma$  subunit regulates the ATP hydrolysis activity of cyanobacterial ATP synthase」17th European Bioenergetics Conference

2012.09.15-20, University of Freiburg,  
Germany

9. 紺野宏記、中根 武、吉田右賢、上岡-中西華代、原 怜、久堀 徹「ホウレンソウ緑葉における葉緑体ATP合成酵素 $\gamma$ サブユニットの酸化還元調節の可視化」第84回日本生化学会大会 2011.09.21-24, 国立京都国際会館

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ  
[http://www.se.kanazawa-u.ac.jp/bioafm\\_center/j/](http://www.se.kanazawa-u.ac.jp/bioafm_center/j/)

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
紺野宏記 (KONNO HIROKI)  
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・  
准教授  
研究者番号：80419267
- (2) 研究分担者  
なし ( )  
研究者番号：
- (3) 連携研究者  
なし ( )  
研究者番号：

