

論文の内容の要旨

論文題目 ウシミトコンドリア由来ATP合成酵素の基本特性とその
制御に関する1分子解析

氏 名 小林 稔平

第1章 序論

F₀F₁-ATP合成酵素(F₀F₁)は、ミトコンドリアの内膜などに存在し、その膜間にかかるプロトンの電気化学ポテンシャル(proton motive force; *pmf*)を用いてATPを合成する^[1]。F₀F₁はF₀とF₁の2つの回転分子モーターからなる。膜内のF₀では*pmf*に沿ってプロトンが通り抜ける。このとき、固定子に対して回転子を、膜外から見て時計回り方向に回転させる。一方、膜外のF₁はATPの加水分解の際に生じる自由エネルギー変化を利用して、回転子を反時計回り方向に回転させる。F₀によるプロトン輸送とF₁による触媒反応は共通の回転子 γ を通じて共役している。*pmf*が十分に大きければ、F₀がF₁を逆回転させ、F₁はATP合成反応を触媒する。しかし、*pmf*が減少するとF₁がF₀を逆回転させ、ATPを加水分解する。

高い安定性と取り扱いのしやすさから、F₁に関する研究が精力的に行われてきた。3回対称性を持つF₁は120°回転ごとに1つのATPを加水分解し、1回転で計3つのATPを分解する。F₁はリング状の固定子 $\alpha_3\beta_3$ を回転子 γ が貫く構造を取っており、 β の触媒部位にATPが結合し加水分解が起こる。その際の $\alpha_3\beta_3$ リングの構造変化に伴い γ が回転する。

本研究では哺乳類ウシミトコンドリア由来F₁(*b*MF₁)を対象とした。*b*MF₁はX線結晶構造解析のモデルF₁として長年構造解析が行われ、1残基レベルの相互作用の解明が行われてきた^[2]。一方で、*b*MF₁の回転触媒機構を明らかにするための1分子回転解析は行われておらず、F₁の構造と機能の相関関係は不明なままであった。第2章では、*b*MF₁の1分子回転解析を行い、その回転特性を明らかにした上で豊富に存在する結晶構造との対応付けを行った。

本論文後半ではATP合成酵素の制御について述べる。生体内では、低*pmf*条件下で生じるATPの加水分解はATPの浪費につながるため厳密に制御されている。ミトコンドリア型F₀F₁では、ATPase inhibitory factor 1(IF₁)と呼ばれる制御タンパク質がF₁部位に作用し、ATP加水分解を阻害している^[3]。これまで数々の生化学実験^[4]やX線結晶構造解析^[5]が行われ、IF₁阻害機構が提案されてきた。しかし、これを実証する速度論的解析や1分子計測は行われておらず、IF₁阻害機構については不明な点が多い。本研究では、生化学実験(第3章)と1分子計測(第4章)の両面からIF₁阻害機構についての議論を行った。

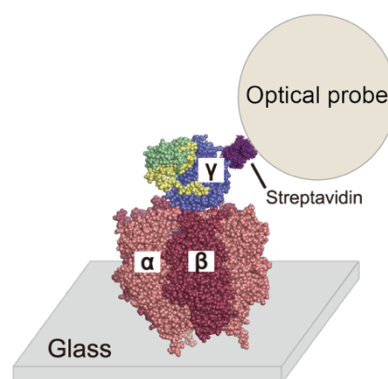


図1 F₁の構造と1分子観察系

F₁は固定子 $\alpha_3\beta_3$ リングと回転子 γ からなる。1分子計測の際には $\alpha_3\beta_3$ リングをガラス面に、 γ にプローブを結合させて回転を可視化した。本研究では40 nm 金コロイド、もしくは~300 nm 磁気ビーズを用いた。

第2章 1分子解析によるウシミトコンドリア由来 F₁の回転機構解明

2.1 背景

F₁ 研究は、1 分子計測と結晶構造解析を両輪として著しい発展を遂げてきた。しかし、両者が研究対象とする F₁ が異なっていた。1 分子計測では好熱性 *Bacillus* 由来 F₁(TF₁)^[6]が、構造解析では *b*MF₁^[2]がそれぞれ用いられてきた。「TF₁の反応スキームは *b*MF₁ と同一」という前提の下、1 分子計測の知見は高分解能の構造が得られている *b*MF₁ の結晶構造をもとに議論されてきた。ところが、近年ヒトミトコンドリア由来 F₁ (human Mitochondrial F₁; *h*MF₁)の 1 分子計測によって、「バクテリア型とミトコンドリア型の回転スキームは同一ではない」ことが示唆され^[7]、前提が大きく揺らいでいる。そのため、同一種の F₁ を用いて 1 分子計測と構造解析を進めることが急務である。本章では結晶構造が豊富に存在する *b*MF₁ の回転運動を 1 分子解析することで、1 分子計測と結晶構造解析を厳密に対応付けさせることを目的とした。

2.2 実験手法

回転観察に用いた *b*MF₁ は、回転子 γ にプローブ結合用のシステインを、固定子である β に精製・ガラス固定用の His-tag をそれぞれ導入したものをを用いた。本研究ではプローブとして金コロイド(ϕ 40 nm)か磁気ビーズ(ϕ ~300 nm)を用いた(図 1)。

2.3 実験結果・考察

ATP 加水分解に伴う反応素過程の角度を決定するため、基質アナログである ATP γ S と、触媒サブユニット β の 1 残基に変異を導入した β E188D 変異体を用いて回転観察を行った。その結果、*b*MF₁ は回転の最小単位である 120°内に *binding dwell*(ATP 結合待ち状態)、*long dwell*(より長い停止)、*short dwell*(より短い停止)の 3 種類の回転停止点を示した(図 2、図 3)。ATP γ S も β E188D 変異体も ATP 開裂反応速度を低下させると考えられることから、*long dwell* は ATP 開裂反応待ち状態(*catalytic dwell*)であると同定した。これに加えて、ATP 開裂反応待ち状態で回転を停止させる基質アナログである AMP-PNP を用いて回転停止位置を調べた結果、この角度位置は *catalytic dwell* の位置と一致した。すなわち、*binding dwell* から見て、*catalytic dwell* は+80°の位置にあることが分かった。これは他の F₁ で明らかになった角度と一致している(TF₁: 80°, *h*MF₁: 90°)。一方で、*short dwell* がどの素過程を表すかは未だ同定できていないが、その角度位置は *catalytic dwell* から見て+50~60°の位置、すなわち、*binding dwell* から見て+10~20°の位置にあることが分かった。他の F₁ との類似性を考えると、*short dwell* はリン酸解離待ち状態であると考えられる。

120°ステップの解析(図 2~図 4)から得られた知見をもとに、*b*MF₁ の回転触媒機構モデルを提案した(図 5)。また、AMP-PNP を用いた実験から結晶構造のほとんどは *catalytic dwell* に対応することも明らかになった。一方で、*catalytic dwell* から見て γ が 50~60°回転した結晶構造はいまだに発見されておらず、*short dwell* の対応付けについては不明のままである。*Short dwell* と対応する反応素過程の同定は今後の課題としたい。

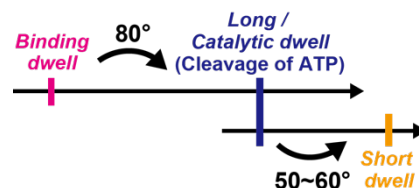


図 2 *b*MF₁ の 3 つの回転停止点

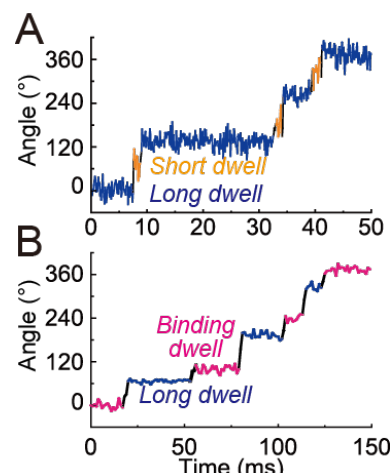


図 3 *b*MF₁ のタイムコース

(A) ATP γ S 1 mM (B) ATP γ S 1 μ M (A)では *long* と *short*、(B)では *binding* と *long* の 2 つの回転停止点が観察された。この傾向は変異体 β E188D でも同様であった。

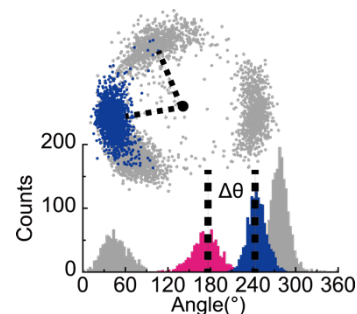


図 4 AMP-PNP による停止

Binding dwell と AMP-PNP による停止位置の角度差は 76°であった。

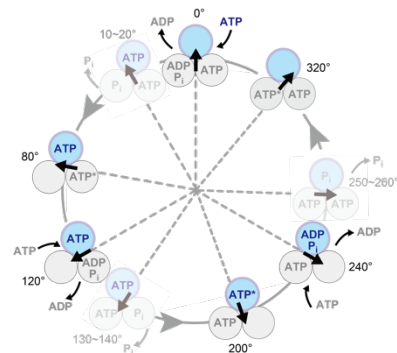


図 5 *b*MF₁ の回転触媒機構

円は β 、矢印は γ の回転方向を表す。 β のヌクレオチドの結合状態を円中に示した。ATP の後の*は加水分解反応が起きる瞬間であることを示す。

第3章 生化学実験による IF₁ の速度論的解析

3.1 背景

ウシミトコンドリア由来 IF₁ と bMF₁ の X 線結晶構造解析から IF₁ の阻害機構が以下のように提案されている^[5]。まず、天然変性部位である IF₁ の N 末端部分が bMF₁ の β と可逆的に結合し、中間体を形成する。この段階では F₁ と IF₁ の相互作用は非常に弱く、F₁ の触媒機能は停止しない。次に IF₁ の N 末端のフォールディングが進み、α-helix 構造をとることで γ の回転を阻害する。同時に、β に結合したヌクレオチド状態が変化して ATP 結合状態から ADP 結合(加水分解完了)状態に変化する。つまり、IF₁ は F₁ にゆるく結合したのち、ATP 加水分解による γ の回転を伴い不可逆的な阻害状態に陥るという 2 段階阻害機構が提唱されている(図 6A)。一般に 2 段階阻害の場合、阻害定数は低濃度で単調増加し、その後飽和に達するという双曲線型の関係を示すことが予想される。しかし、過去の生化学実験では双曲線型の関係は得られておらず、IF₁ の 2 段階阻害機構は実証されていない。本研究では IF₁ の阻害機構を検証するため、幅広い [IF₁]、[ATP] 濃度で実験を行い、2 段階阻害機構の実証を試みた。

3.2 方法

IF₁ は pH 依存的に構造を変化させる C 末端部分を取り除いたものを新たに精製した。F₁ による ATP 加水分解活性を定量化するため、ATP 再生系により NADH の増減を定量できる系を用いた。IF₁ を添加すると bMF₁ の活性は急激に減衰した。この減衰を指数関数でフィッティングして阻害定数 $k_{inhibition}^{app}$ を算出した(図 6B)。

3.3 結果・考察

本実験では $k_{inhibition}^{app}$ と [IF₁] 依存性、および [ATP] 依存性を求めた(図 6C)。すべての条件で、 $k_{inhibition}^{app}$ は低濃度 [IF₁] で比例し、高濃度 [IF₁] で飽和に達するという関係を示した。これは上述の 2 段階阻害機構を支持する結果である。さらに、図 6A の反応速度式より算出された式 $k_{inhibition}^{app} = k_{lock}[IF_1]/(K_M + [IF_1])$ に基づき、これらのプロットをフィッティングして k_{lock} と K_M を算出した。さらに実効 IF₁ 結合定数 $k_{on}^{eff} = k_{lock}/K_M$ を新たに定義して評価することで、図 6A で示される IF₁ の 2 段階阻害機構で示される反応素過程の特性を明らかにした。その結果、第 1 段階の IF₁ 結合(binding)過程は ATP 濃度に依存すること、第 2 段階の異性化(locking)過程は ATP 濃度に依存しないという対照的な性質を持つことが分かった。

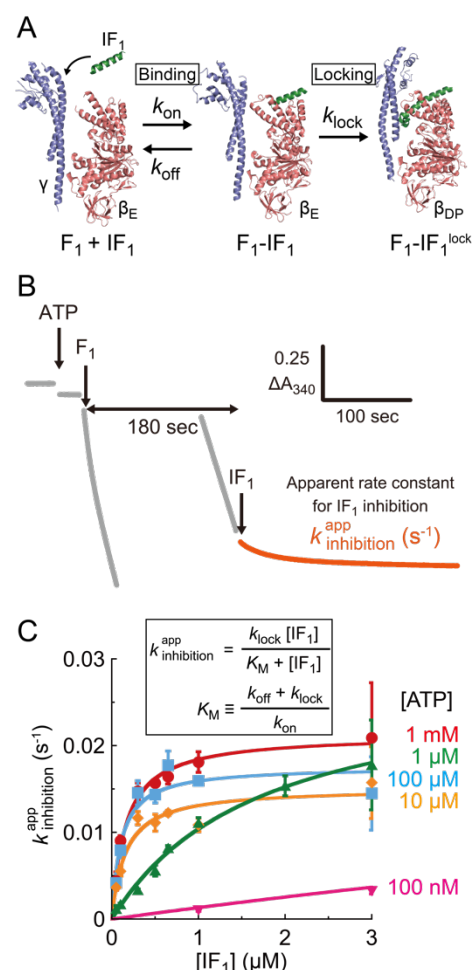


図 6 IF₁ の生化学実験

(A) IF₁ による 2 段階阻害機構

化学反応式は 3 つの速度定数 k_{on} 、 k_{off} 、 k_{lock} を用いて表される。

(B) 生化学実験の実験手順

bMF₁ の活性が一定になるのを待ったため、bMF₁ 添加後 180 秒経ってから IF₁ を添加した。

(C) 生化学実験から得られた [IF₁] と阻害定数 $k_{inhibition}^{app}$ の関係

実線は図中の式で示されたフィッティングを表す。

第4章 1 分子回転解析による IF₁ の制御機構解明

4.1 背景

生体内で IF₁ はその環境変化に応じて F₀F₁ と結合・解離を行い、その機能を制御する。しかし、2 段階阻害機構(図 6A)や前章の実験結果(図 6B)からは、一度 IF₁ 阻害に陥った bMF₁ は触媒活性を失ったままの状態だと示唆される。つまり、既存の実験系では IF₁ 解離条件を探索できず、生体内での IF₁ 制御機構の解明は不

可能であった。本章では外部から力を加え bMF_1 の触媒反応を制御するため、1 分子回転観察系(図 1)に磁気ピンセット^[8]と呼ばれる系を組み合わせた。これは電磁石によって磁場を発生させ、自在に分子を操作できる系である(図 7A)。操作後の bMF_1 の回転/停止をもとに IF_1 の解離条件を探索した。

4.2 方法

IF_1 を含む溶液を導入すると、数分以内に bMF_1 は回転を停止した。その後、10 分以上停止した粒子に対して IF_1 阻害粒子と定義し、磁気ピンセットで IF_1 阻害 bMF_1 の 1 分子操作を行なった。操作後の bMF_1 は回転を再開するか、停止を続けるかの 2 つに分かれた。

4.3 結果・考察

IF_1 阻害に陥った粒子の回転再開条件を探索するため、図 7B 中の 4 条件で回転再開を試みた。その結果、ATP/ADP/リン酸を含む溶液中で、時計回り方向に強制的に 1 回転させた場合のみ高い回転再開割合を示した。これは生体内を模倣した環境で、 bMF_1 に ATP 合成に必要な構造変化が起こると IF_1 が解離することを意味する。次に、 IF_1 阻害で停止している粒子を任意の角度で拘束し、解放直後に回転を再開するかを観察し、 IF_1 阻害解放の角度依存性を調べた。その結果、回転再開割合は拘束角度に大きく依存し変化した(図 7C)。 IF_1 解離角度と bMF_1 の反応素過程との対応づけは今後の課題である。

5. 総括

本研究では、まず 1 分子回転解析を用い bMF_1 の回転特性を解明し、結晶構造との対応づけを行った。その結果、ほとんどの結晶構造は *catalytic dwell* と対応することがわかった。一方、*short dwell* に対応する結晶構造は不明のままであり、これに対応する反応素過程の同定は必須である。次にミトコンドリア型 ATP 合成酵素の制御因子である IF_1 の阻害状態を解析し、従来から提案されていた 2 段階阻害機構を実証した。さらに、磁気ピンセットを用いた 1 分子観察・操作技術の融合により、 IF_1 解離についての新たな知見を与えた。この知見をさらに検証するため、 IF_1 の結合解離を直接観察できる系の構築が望まれる。

Reference

[1] Noji, H., *et al.*, *Biophys Rev.* 9, 103-118. (2017). [2] Abrahams, J. P., *et al.*, *Nature*, 370, 621-628 (1994). [3] Pullman, M. E., & Monroy, G. C., *J Biol Chem*, 238, 3762-3769 (1963). [4] Bason, J. V., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 406, 443-453 (2011). [5] Bason, J. V., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 11305-11310 (2014). [6] Watanabe, R., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 6, 814-820 (2010). [7] Suzuki, T., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 10, 930-936 (2014). [8] Rondelez, Y., *et al.*, *Nature*, 433, 773-777 (2005).

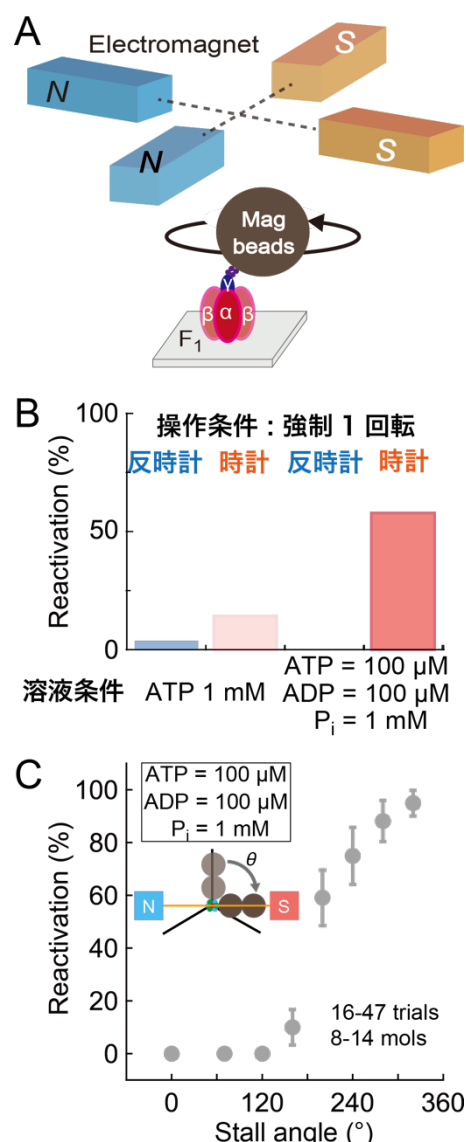


図 8 IF_1 の回転実験概要
(A) 1 分子観察系と磁気ピンセット
(B) 4 種類の溶液・操作条件による回転再開割合
(C) IF_1 解離の拘束角度依存性
模式図中の θ が Stall angle に対応する。