

ATP合成酵素の活性調節におけるεサブユニットの役割

山田 康之

酸化的リン酸化, 光リン酸化反応の最終段階のATP合成という, 細胞のエネルギー代謝において重要な役割を担うATP合成酵素は, ほぼ全ての生物において保存されている。高等な生物においては高度な活性調節を受けているが, 原核生物においても, 細胞のエネルギー状態に応じた活性調節を受けていると考えられている。本稿ではATP合成酵素の, 特にεサブユニットによる調節について, 筆者らの研究により好熱菌 *Bacillus* PS3由来のATP合成酵素を用いて得られた知見を中心に述べる。

1. はじめに

(1) ATP合成酵素

生物が呼吸による基質の酸化や光合成によって得たエネルギーはそれぞれ, 呼吸鎖, 光合成の電子伝達系のプロトンポンプによって, 膜を介した H^+ の濃度差, 電位差からなる H^+ の電気化学的ポテンシャル差($\Delta\tilde{\mu}H^+$)の形に変換される。この電気化学的なエネルギーは, 様々な物質の膜を介した輸送やべん毛運動などに利用されるが, 細胞内でより利用しやすい形であるアデノシン三リン酸(ATP)の化学的なエネルギーへと変換される。生体内のエネルギー通貨ともいわれるATPが, アデノシン二リン酸(ADP)と無機リン酸に加水分解される際のエネルギーが, 生合成やイオン輸送, 運動など, 生体内でエネルギーを必要とする様々な反応に利用される¹⁾。

呼吸や光合成で得られた $\Delta\tilde{\mu}H^+$ をエネルギー源としてATP合成を行っているのが, F_0F_1 -ATP合成酵素である。 F_0F_1 -ATP合成酵素は, $\Delta\tilde{\mu}H^+$ によって駆動される H^+ の移動と共役して, ADPと無機リン酸からATPを合成しており(H^+ の代わりに Na^+ を用いるものもある。), 真核細胞のミトコンドリア内膜, 葉緑体のチラコイド膜, 細菌の形

質膜などに広く普遍的に存在している²⁻⁵⁾。

F_0F_1 -ATP合成酵素は, 分子量50万にもなる巨大な膜酵素である(図1)。 $\Delta\tilde{\mu}H^+$ によって駆動される膜を介した H^+ の移動と, ADPと無機リン酸からのATP合成という二つの反応を共役させるという働きを反映し, F_0F_1 という名の通り構造的にも大きく二つの部分に分けることができる。一つは H^+ の輸送(移動)を担う F_0 部分である(図1(c))。 F_0 部分は膜内在性部分であり, 比較的単純な構造を持つ細菌のATP合成酵素では, 大きい方からa, b, c三種のサブユニットの1:2:10という分子量15万程度の複合体であり, H^+ の通り道を形成している。

もう一つは F_0 に結合している膜表在部分である F_1 部分である(図1(b))。細菌では細胞質側, ミトコンドリアではマトリクス側, 葉緑体ではストロマ側に面している。この部分は分子量の大きい順に, $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ という5種のサブユニットの $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ という分子量38万程度の複合体であり, 三つある β サブユニット上にATP合成の触媒部位を持っている。

F_0 部分と F_1 部分とは, Mg^{2+} を除いて低イオン強度の緩衝液にするなどの簡単な操作で分離することができる。このようにして得られる F_1 部分は, それのみでATP合成の逆反応であるATP加水分解反応を触媒することから F_1 -ATPaseと呼ばれている。なお, F_0F_1 -ATP合成酵素のホロ酵素でもATP加水分解とそれに伴う逆方向への H^+ の輸送を触媒することができ, 細菌のものは嫌気的な環境では解糖で得られたATPを加水分解し, $\Delta\tilde{\mu}H^+$ を維持するため働いていると考えられている。 F_1 -ATPaseは水可溶性であり, 膜タンパク質である F_0F_1 と比べて, 取り扱いが容易

立教大学理学部生命理学科 (〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1)

On the regulatory role of the epsilon subunit in ATP synthase

Yasuyuki Kato-Yamada (Department of Life Science, College of Science, Rikkyo University, 3-34-1, Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan)

本総説は2008年度奨励賞を受賞した。

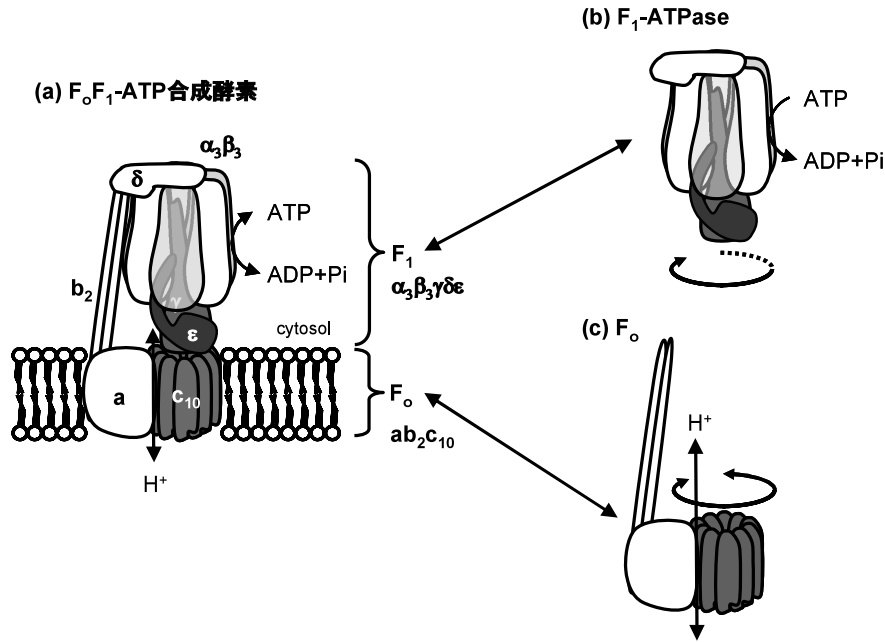


図1 ATP合成酵素

(a) F_0F_1 -ATP合成酵素は、(b) F_1 -ATPase と (c) F_0 部分に容易に分けることができる。触媒反応に伴って、図中の色の濃い部分が色の薄い部分に対して回転する。葉緑体やミトコンドリアのものはもう少し複雑であるが、基本的な構造は共通である。

であることから、そのATP加水分解活性が F_0F_1 によるATP合成反応の逆反応の部分反応としてよく調べられている。(ATP合成反応にはエネルギー源である $\Delta\tilde{\mu}H^+$ が必要であることから、定量的な測定を行うには、用いる膜小胞の均質性など様々な要因を考慮する必要がある。)

1994年にはJohn Walkerのグループがウシ心筋ミトコンドリアの F_1 -ATPaseのX線結晶構造解析に成功した⁶⁾。これにより、 α 、 β サブユニットおよび γ サブユニットの一部の構造が明らかになった。それは α サブユニットと β サブユニットが交互に並んだ $\alpha_3\beta_3$ からなるリング状の構造の中心を、 γ サブユニットのコイルドコイル構造が貫いているというものであった。またこの結晶中で、三つある β サブユニットはATP結合型、ADP結合型、ヌクレオチド非結合型という異なる構造をとっていた。これは触媒反応中に γ サブユニットの($\alpha_3\beta_3$ に対する)回転が起こるといふ、Paul Boyerの回転触媒説²⁾と合致するものであった。1997年には野地、安田らによって γ サブユニットの回転の1分子観察が行われ、 γ サブユニットが触媒反応中に一方方向に回転するという決定的な結果が得られた⁷⁾。 γ サブユニットの回転が明らかになると、 γ サブユニットの回転に伴ってその他のサブユニットは、ともに回転するのかが検討され、その結果 $\gamma\epsilon c_{10}$ からなる複合体(図1の色の濃い部分)が回転子として、ATP合成酵素の他の部分に対して回転していることが明らかになった⁸⁻¹⁰⁾。ちょうど水力発電のタービンと発電機(モーター)のように、ATP

の合成・加水分解によって $\gamma\epsilon$ サブユニットが回転する F_1 モーターと、 H^+ の移動によって c_{10} が回転する F_0 モーターが共通の軸でつながっていることで、これら二つの反応の共役がなされていると考えられている。

F_1 -ATPaseにおける γ サブユニットの回転メカニズムは精力的に研究されており、この回転がATP1個の加水分解で120度進むものであることや、120度のステップは80度と40度のサブステップからなることなどが明らかにされてきた^{11,12)}。さらには触媒反応において、三つの β サブユニットで、基質、生成物の結合・解離、化学反応の起こるタイミングと γ サブユニットの回転の関係がほぼ完全に明らかにされてきている¹³⁻¹⁵⁾。

このような反応を進めるメカニズムの研究がある一方で、反応がどのように制御されているかの研究もすすんできている。

(2) ATP合成酵素の様々な活性調節機構

すべてのATP合成酵素で保存されていると考えられている活性調節の仕組みとして、ADP阻害と呼ばれるものがある¹⁶⁾。これは、ATP加水分解反応中にその反応生成物であるADPが酵素上に強く結合した状態をとり、ATP加水分解反応が停止してしまうというものである。また、ADP阻害の解除に α サブユニットにある非触媒性ATP結合部位へのATPの結合が関与していると考えられている^{17,18)}。ADP阻害には例えば急激に $\Delta\tilde{\mu}H^+$ が無くなった場合に、ATPの浪費を防ぐなどの働きがあるものと考えら

れるが、その生理的な意義は余りよく分かっていない。

ADP 阻害の他にも、植物葉緑体、あるいは真核細胞のミトコンドリアの ATP 合成酵素では、以下に示すようなそれぞれの系に特有の活性調節系の存在が知られている (図 2)。

植物では夜の間は光化学系を動かさないで、ATP 合成を行うことができない。このときに 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仕組みがある。光化学系からの還元力の供給が無くなり、葉緑体内が酸化になると、ATP 合成酵素の γ サブユニット上にある二つのシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成し、その活性が低くなる (図 2(a))¹⁹⁾。同様にミトコンドリアでも、酸素の供給が無く酸化のリン酸化が行えない時に、ATP 合成酵素を止める仕組みが存在する。ミトコンドリアの ATP 合成酵素には、その活性を阻害する ATPase インヒビターというタンパク質があり、pH 依存的に ATP 合成酵素と複合体を形成し、活性調節をしている

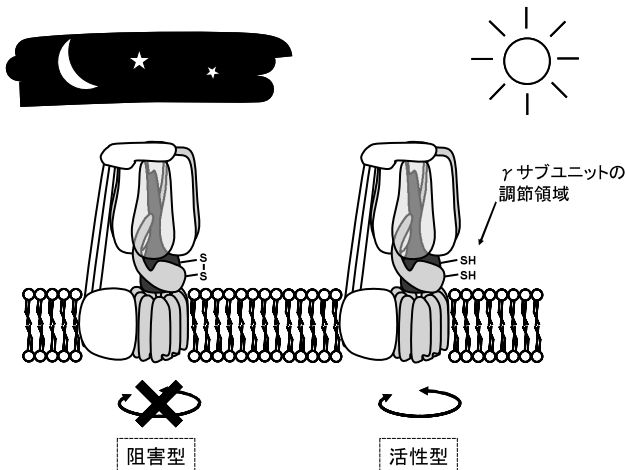
ことが知られている (図 2(b))^{20,21)}。これらの活性調節の仕組みはそれぞれの系に固有のものであるが、細菌の ATP 合成酵素のタンパク質レベルでの活性調節メカニズムが、ADP 阻害の他にも存在するのではないかと私たちは考えた。

2. ϵ サブユニット

(1) 阻害因子としての ϵ サブユニットの働き

ϵ サブユニットは分子量 15,000 程度で β サンドイッチからなる N 末端ドメインと、2本の α ヘリックスのコイルドコイルからなる C 末端ドメインという二つのドメインを持つ (図 7 も参照) F_1 で一番小さなサブユニットで、 F_0 と F_1 の界面に存在する (ミトコンドリアの F_1 では δ サブユニットと呼ばれるものが、本稿で取り上げている細菌や葉緑体の F_1 の ϵ サブユニットに相当する)。 F_0 でのプロトン輸送と F_1 での ATP 合成・加水分解の共役に必要であるが、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ が F_1 と同程度の活性を持つという事実 (F_1 の

(a) 植物葉緑体 ATP 合成酵素の調節



(b) ミトコンドリア ATP 合成酵素の調節

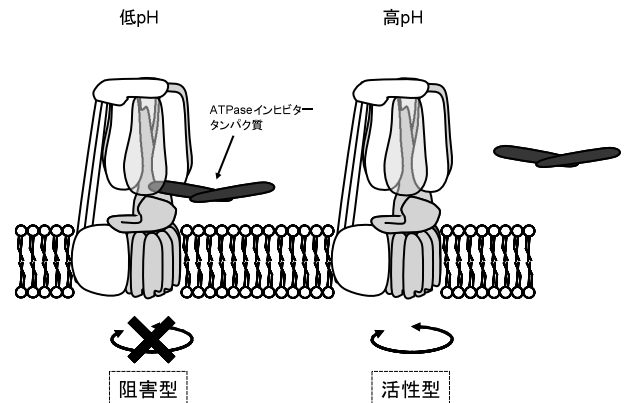


図 2 ATP 合成酵素の活性調節機構の例

- (a) 植物葉緑体 ATP 合成酵素では、 γ サブユニットにある二つのシステイン間のジスルフィド架橋の形成により活性が阻害される。
- (b) ミトコンドリア ATP 合成酵素では、ATPase インヒビタータンパク質が結合することで活性が阻害される。

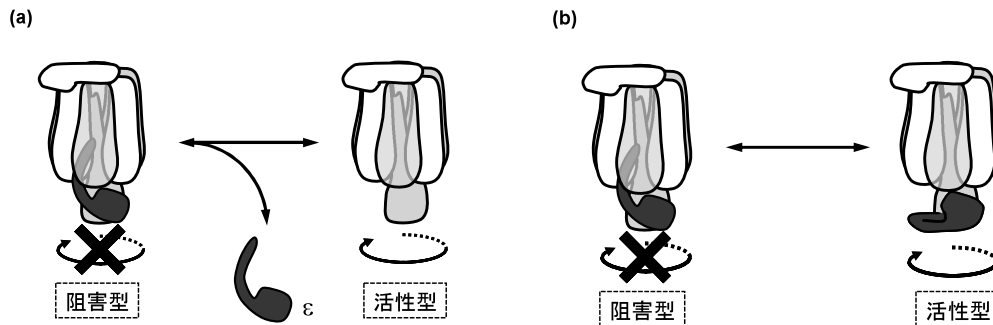


図 3 F_1 -ATPase の ϵ サブユニットによる阻害の様式

- (a) 大腸菌や植物葉緑体の F_1 -ATPase では、 ϵ サブユニットの脱着を伴う活性化が起こる。
- (b) 好熱菌 F_1 -ATPase では、 ϵ サブユニットが結合したままで活性化が起こる。

回転1分子観察は通常 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を用いて行う) などからもわかるように, F_1 の ATPase 活性には必要無い. ϵ サブユニットは大腸菌や葉緑体の (ホロ酵素 F_0F_1 ではなく) F_1 -ATPase では, 複合体に結合することで ATPase 活性を阻害する性質がよく知られている²²⁻²⁴). これは, F_1 -ATPase 複合体に ϵ サブユニットが結合することで阻害がかかり, ϵ サブユニットが複合体から脱離することで活性化が起こるといものである (図 3(a)). この働きは, F_0F_1 が生合成される過程で細胞内に出現する遊離の F_1 -ATPase が ATP を無駄に消費することを防ぐためのものであり, ホロ酵素を形成すると阻害効果は無くなるものと (調節因子というよりは単なる阻害因子として) 考えられていた²³). しかしながら, ϵ サブユニットの有無によって活性が大きく変化すること, ホロ酵素である ATP 合成酵素では ϵ サブユニットの脱着は起こらないと考えられることなどから, ϵ サブユニットが ATP 合成酵素の活性調節を行っている可能性を検討することにした.

(2) 好熱菌 F_1 -ATPase 活性の ϵ サブユニットによる変化

私たちは中等度好熱菌 *Bacillus* PS3 由来の F_1 -ATPase (TF_1) を用いてその ϵ サブユニットの性質を調べた. TF_1 は F_1 -ATPase のなかでも古くからよく研究されているものの一つで, きわめて安定で生化学的な実験に適している²⁵). TF_1 の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体, δ サブユニット, および ϵ サブユニットの三者を, 大腸菌を宿主とした大量発現系から調製し, これらの間で再構成を行い, 得られた複合体の ATPase 活性を測定した²⁶).

ここでは ϵ サブユニットの働きに注目し, 図 4 には $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体と $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体の ATP 20 μ M 及び 200 μ M での ATP 加水分解のタイムコースを示してある. この測定は NADH の酸化と共役した ATP 再生系を用いて行っているので, NADH の酸化に伴う 340nm の吸光度の減少によって, ATP 濃度を一定に保ったままリアルタイムに ATPase 活性を測定できる. 図に示したように ϵ サブユ

ニットの有無で顕著な違いが観察された. $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体は比較的高い一定の活性を示す ($\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で見られる活性の小さな変化は, ADP 阻害によるものである) のに対して, ϵ サブユニットを含む $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体では, はじめの活性の低い状態から徐々に活性化していくという変化を示した.

ATP 20 μ M (図 4(a)) では十分時間をおいても, ϵ サブユニットを含む複合体の活性は ϵ サブユニットを含まない複合体と比べて低いままであったが, さらに ATP 濃度を上げると活性化の速度は速くなっていき, また最終的な活性は ϵ サブユニットを含まない複合体と同程度になった (図 4(b)). このことから, TF_1 の ϵ サブユニットを含む複合体では基質である ATP による ATPase の活性化が起こると考えられた. このような連続的な活性化は大腸菌由来の F_1 -ATPase でも見かけ上同じように観察されるが, モル比で数十倍程度の ϵ サブユニットを加えると活性化が見られなくなることから, 先に述べたように, 阻害的な効果を持つ ϵ サブユニットの複合体からの脱離を反映したものであるとされている²³. つまり大腸菌 F_1 -ATPase の場合には, 「 ϵ サブユニットの結合した活性の低い F_1 -ATPase 複合体」と「 ϵ サブユニットが脱離した活性の高い F_1 -ATPase 複合体」という変化をしていることになる (図 3(a)). 植物葉緑体由来の F_1 -ATPase でも同様の ϵ サブユニットの脱着による活性の変化が報告されている²⁴).

ところが好熱菌 F_1 -ATPase では, 過剰の ϵ サブユニットを加えてもその影響は見られず, 図 4 で見られた活性化の際に ϵ サブユニットは脱離していないと考えられた. そこでそれを直接的に示すために, 活性化した複合体の単離を試みた. ATP と保温することで活性化した好熱菌の F_1 -ATPase をゲルろ過 HPLC により分離し, SDS-PAGE で調べたところ, 活性化した F_1 -ATPase には ϵ サブユニットが含まれていた. この結果は好熱菌 F_1 -ATPase では活性化に伴う ϵ サブユニットの脱離は起こらないことを意味する.

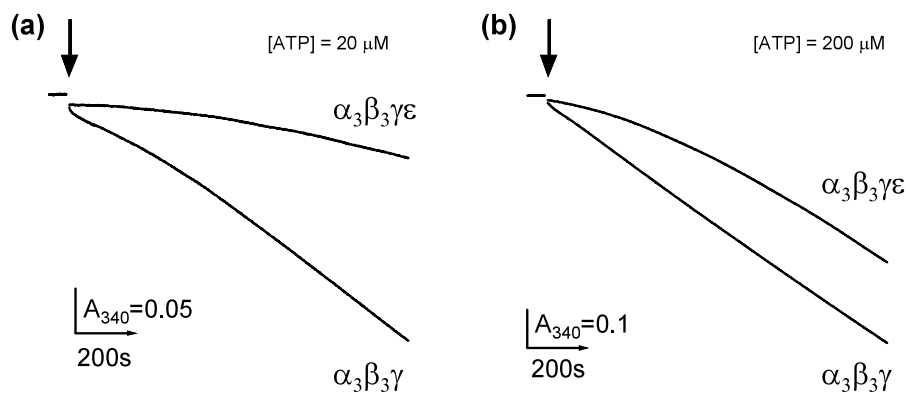


図 4 ATP 再生系を用いた TF_1 の ATPase 活性測定

ATP 濃度によって, ϵ サブユニットによる阻害の程度, 阻害からの回復の速度に違いが見られる.

すなわち好熱菌 F_1 -ATPase では、 ϵ サブユニットが結合したままで「活性の高い状態」と「活性の低い状態」の二つの状態をとりうると言える(図3(b))。同様の変化は、ホロ酵素である F_0F_1 -ATP 合成酵素複合体を用いても観察され²⁷⁾、これらの結果から私たちは好熱菌 ATP 合成酵素において、 ϵ サブユニットは単なる阻害因子ではなく、活性調節の役割を持っているものと考えた。 F_1 -ATPase の状態では ϵ サブユニットの脱離が起こる大腸菌や植物葉緑体の ATP 合成酵素でも、ホロ酵素である F_0F_1 の形になれば ϵ サブユニットと複合体の結合はより強固になり、 ϵ サブユニットの脱離は起こらなくなり、好熱菌の場合と同じように複合体中で活性調節を行っているものと考えられる。

(3) 活性調節に伴う構造変化

私たちは、この活性の変化に伴う ϵ サブユニットの変化をジスルフィド架橋の人為的な導入や、蛍光共鳴エネルギー移動などの手法を用いて検討した^{28,29)}。これらの生化学的な実験と、大腸菌およびウシミトコンドリア由来の F_1 -ATPase の ϵ サブユニットを含む構造解析^{30,31)}の結果などから、図5に示すような ATP 依存的な ϵ サブユニットの構造変化と ATPase 活性状態の変化の関係を提案した³²⁾。

大腸菌、好熱菌の ATP 合成酵素において、 ϵ サブユニットを伸び上がった構造に固定すると ATPase 活性を阻害し、コンパクトな構造に固定すると阻害しないという結果が得られている^{33,34)}。また、 $\Delta\mu H^+$ によって ϵ サブユニットの構造が変化するという報告^{34,35)}もある。

(4) 回転触媒との関係

それでは、 ϵ サブユニットは γ サブユニットの回転 (= 活性) をどのように調節しているのだろうか。これについては、いくつかの種由来の ATP 合成酵素での結果が報告されている。好熱性シアノバクテリアの ATP 合成酵素では、 ϵ サブユニットが結合すると、その回転が完全に停

止する³⁶⁾。この ϵ サブユニットは効きが強いとも言え、このことはシアノバクテリアにおいて、 F_0F_1 が主に ATP 合成酵素として働いていることと関係があるのかもしれない。一方、大腸菌の ATP 合成酵素では、連続した回転の中で数ミリ秒程度の極めて短い停止が観察されている³⁷⁾。好熱菌 *Bacillus* PS3 の F_1 -ATPase についても報告があるが³⁸⁾、私たちのグループでも現在詳細な解析を行っており、大腸菌やシアノバクテリアのいずれとも異なる様式であると考えられる。(ATP 合成酵素のなかでは ϵ サブユニットは比較的一次構造の保存度は低い) 立体構造もよく似ており、ATPase 活性を阻害するというみかけの働きも同様でありながら、その阻害の様式は生物種によって細かく異なっているという点で興味深い。 ϵ サブユニットが ATP 合成酵素の環境への適応を担うために、微調整を行っていると言えるのかもしれない。

(5) ATP 合成における役割

このように ϵ サブユニットは ATP 合成酵素の ATPase 活性を阻害する働きがあるが、それではこの酵素の本来の働きともいえる ATP 合成反応にはどのように関係しているのだろうか？

ϵ サブユニットは活性を調節する働きの他に、 F_0 と F_1 をつなぐ役割も併せ持つことから、これを無くしてしまうと ATP 合成・加水分解と H^+ 輸送が脱共役してしまうため、 F_0F_1 を用いる場合、 F_1 -ATPase の場合のように ϵ サブユニットの有無で直接比較することはできない。このため、主に活性調節にかかわる部分である C 末端の α ヘリックスドメインのみを除いた変異体を用いた例がある^{27,39,40)}。これらの研究によると、ATP 合成活性そのものには ϵ サブユニット (の C 末端ドメイン) は必要ないとのことである。しかしながら、磁気ピンセットを用いた強制的な逆回転による 1 分子の (ATP 合成酵素のホロ酵素ではなく) F_1 -ATPase での ATP 合成の実験では、 ϵ サブユニットが効率的な ATP 合成に必須であるという結果が得られており⁴¹⁾、ATP 合成反応における ϵ サブユニットの役割を明らかにするには、さらなる研究が必要であると考えられる。

3. ϵ サブユニットへの ATP 結合

(1) ϵ サブユニットへの ATP 結合の発見

筆者は精製した好熱菌 *Bacillus* PS3 の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの紫外吸収スペクトルが精製ロットによって大きく異なることなどから、単離した ϵ サブユニットに ATP が結合することを発見した⁴²⁾。 ϵ サブユニットの C 末端ドメインには塩基性のアミノ酸が多数存在することから、静電相互作用による非特異的な ATP 結合の可能性が考えられた。しかしながら、 ϵ サブユニットへのヌクレオチド結合は ATP に対する特異性が極めて高く、ゲルろ過

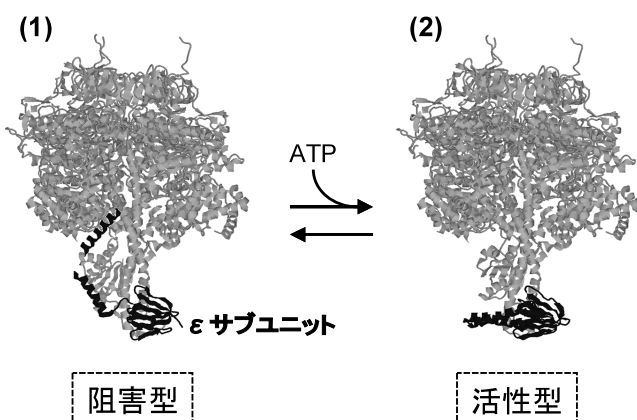


図5 ϵ サブユニットによる活性調節の模式図

(1) ϵ サブユニットが伸び上がった構造を取る阻害型と(2)折りたたまれた構造を取る活性型の二つの状態を行き来する。PyMOL (<http://www.pymol.org>) を用いて PDB ID : 1E79, 1FS0 より作成。

HPLCを用いた解析では、UTPやCTPの他、GTPやADPでさえ結合が見られなかった(図6)。分子量15,000という非常に小さなタンパク質であるεサブユニットに極めて高い特異性を持ってATPが結合するという事実は驚くべきものであった。データベース検索をしても、εサブユニットと類似のタンパク質でヌクレオチド結合能を持つものは見つからなかった。X線結晶構造解析の結果、ATPはεサブユニットに新規の様式で結合していることがわかった(図7(a))⁴³⁾。アデニン環はεサブユニットとワトソン-クリック塩基対様の水素結合をして、結合の特異性を確保しているようであった(図7(b))。この結果から、ATPはコンパクトな活性型の構造のεサブユニットに結合することがわかった。

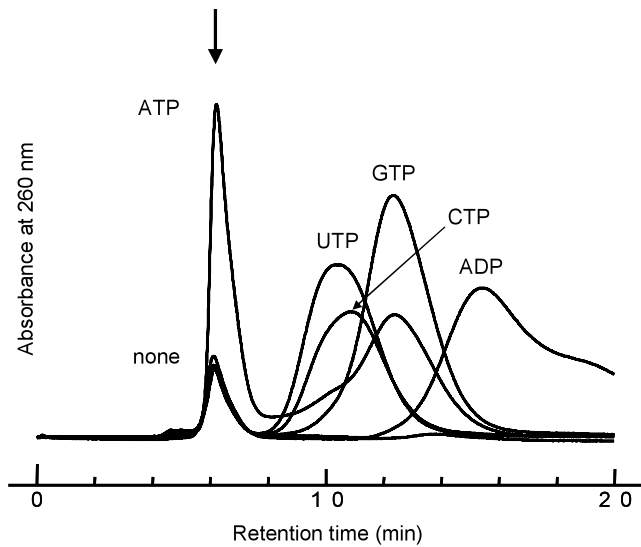


図6 εサブユニットへの特異的なATP結合
ゲルろ過HPLCの結果、ATPを加えたときにのみ矢印で示したεサブユニットのピークが高くなっている(文献42より)。

蛍光標識したεサブユニットを作成し、蛍光変化からヌクレオチド結合を定量したところ、25℃において、ATP結合の K_d が3μM程度であるのに対し、ADPでは、200μM程度、GDPでは3mM程度と、その結合は100~1000倍程度弱いことがわかった²⁹⁾。このようなATPに対する高い特異性から、εサブユニットが、ATP合成酵素を細胞のエネルギー状態に応じて調節するための細胞内ATP濃度センサーとして働いている可能性が考えられた。しかしながら、 K_d が数μMというような非常に強い結合では、細胞のエネルギー状態(ATP濃度)がどのように変化しても、ATPは結合したままであり、細胞内ATP濃度センサーとしての機能は期待できない。細胞によって異なるが、細胞内のATP濃度は一般にmMのオーダーであるとされている¹⁾。この領域でのATP濃度変化を検出するためには、 K_d がmM程度の強さの結合であることが要求される。ここで私たちにとって幸運であったのは、好熱菌の酵素へのATP結合を室温付近で検討していたため、その結合が強くなり、ゲルろ過HPLCによっても検出が可能であったことである。実際、温度を上げていくと、好熱菌F₁-ATPaseのεサブユニットへのATP結合は弱くなっていき、至適生育温度である65℃付近では、 $K_d=600μM$ 程度であると見積もられた²⁹⁾。この程度の結合の強さであれば、細胞内のATP濃度の変動に応じてεサブユニットへのATP結合が変化すると考えられる。同じ*Bacillus*属の常温菌である枯草菌(*Bacillus subtilis*)由来のATP合成酵素のεサブユニットを調製し、ATP結合を見たところ、25℃で $K_d=2mM$ 程度と、細胞内のATP濃度センサーとして機能するのに適当な強さであった⁴⁴⁾。

(2) εサブユニットへのATP結合と活性調節の関係

このように単離したεサブユニットで見られたATP結合であるが、はたしてATP合成酵素複合体中にあるεサ

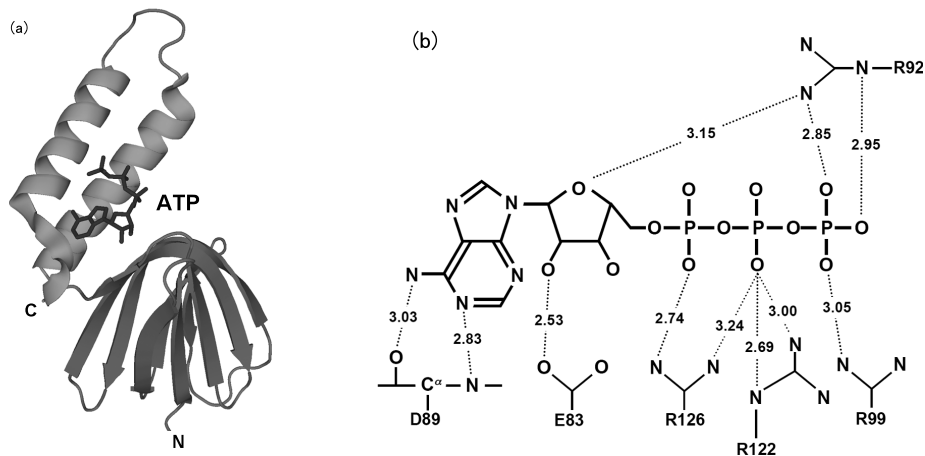


図7 ATPを結合したεサブユニットの構造
(a)N末端とC末端ドメインの境目にATPが結合している(文献43, PDB ID: 2E5Y)。
(b)ATPとεサブユニットの主な相互作用(文献43)。

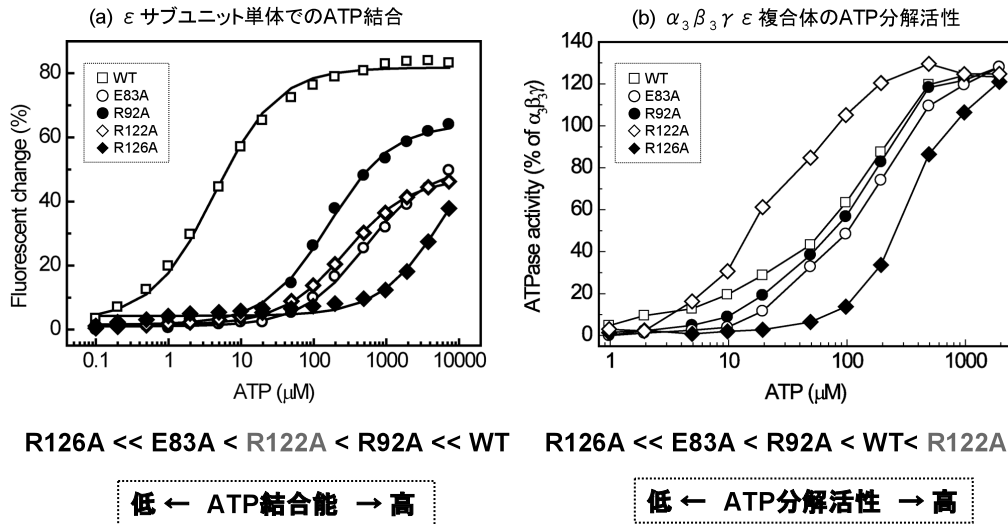


図8 εサブユニットへのATP結合とATPase活性の関係
 R122A変異体以外では、(a)εサブユニットへのATP結合が弱い変異体ほど、(b)ATPase活性を阻害する効果大きい(文献42より)。

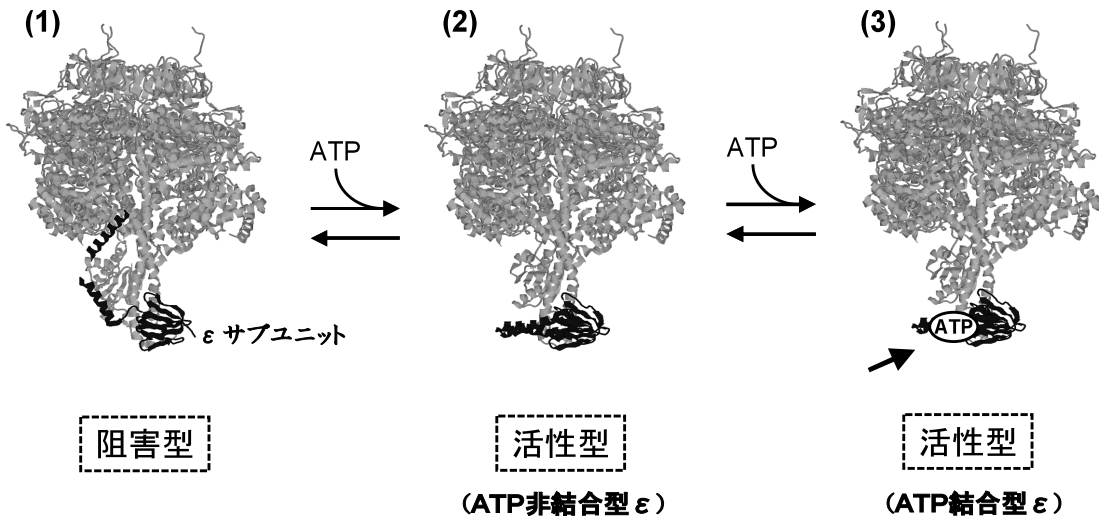


図9 新たに提案したεサブユニットによる活性調節の模式図
 図5に、(3)εサブユニットにATPを結合した活性型複合体という分子種を加えたもの。

ブユニットにもATPは結合し、活性調節と関係しているの
 であろうか。そこで、ATP結合能を持たないような変異体
 εサブユニットを作成し、その活性調節の様子を調べる
 ことにした⁴⁵⁾。

主にC末端ドメインの酸性及び塩基性アミノ酸のうち、
 ATPと直接相互作用しているものなどを、それぞれアラ
 ニンに置換した変異体εサブユニット11種類を作成し、
 ゲルろ過HPLCによりATP結合能を評価した。その結果、
 ATP結合が大きく損なわれた4種類の変異体を選び、そ
 れらを含むF₁-ATPaseを調製し、ATPase活性を測定した。
 その結果、R122A変異体を除くと、ATP結合の弱いもの
 のほど、より強くATPase活性を阻害するという結果が得
 られた(図8)。以前の私たちの結果から、R122はATPase

活性の阻害そのものに重要であると考えられるので³²⁾、
 R122A変異体ではATP結合の変化よりも活性阻害の変化
 の影響が現れたものと考えられる。

これらの結果とその他のいくつかの実験の結果から、
 ATP依存的な活性状態の変化を模式的に表すと、図9の
 ようになる。図5の模式図に「εサブユニットにATPの
 結合した活性型(3)」という分子種が新たに加わったもの
 である。εサブユニットへのATP結合によって、阻害型
 (1)と活性型(2)の平衡が、阻害型(1)と活性型(2)+(3)
 という平衡になり、活性型の割合が増えることになる。つ
 まり、εサブユニットへのATP結合は、ATP濃度が比較的
 高いときに、ATP合成酵素をATPase活性型に保つ働きが
 あると言える。これは、「細胞が十分なATPは持っている

が、 $\Delta\tilde{\mu}H^+$ が不十分であるようなときには、ATPを消費して $\Delta\tilde{\mu}H^+$ を形成するが、細胞内のATPが不十分なときには、 ϵ サブユニットの働きによってATPaseが弱められ、さらなるATP濃度の低下を避ける。」といったかたちで細胞にとって役に立っているものと考えられる。ATP合成酵素は、いわばATPと $\Delta\tilde{\mu}H^+$ の変換装置であるといえるが、自由エネルギーに任せて反応が進むわけではなく、そのバランスをうまく保つために ϵ サブユニットによって速度論的な調節がなされているのであろう。このように ϵ サブユニットにATPが結合しそれが活性調節に関係するということから、 ϵ サブユニットが広義のアロステリック部位として機能していると考えることができる。

(3) ϵ サブユニットへのATP結合の一般性

一次配列の類似性から、少なくとも *Bacillus* 属については、 ϵ サブユニットへのATP結合という性質は保存されているように見える。また、大腸菌のATP合成酵素の ϵ サブユニットについても、 $K_d=22\text{mM}$ と非常に弱いながらATPの結合が観察された⁴³⁾。しかし、細胞内のATP濃度がこれほどまでに高くなることは考えにくいので、大腸菌の場合は、 ϵ サブユニットへのATP結合の生理的な機能は失われてしまったものと考えられる。 ϵ サブユニットへのATP結合がどの程度の生物種で保存されているのか、保存されている生物とそうでない生物の違いは何か?など、今後の研究によって明らかにしていきたいと考えている。

(4) ϵ サブユニットへのATP結合の応用

ϵ サブユニットは、ATPに対する特異性の高さ、その小ささ、及びATP結合に伴う大きな構造変化といった特徴を持っており、これを用いた細胞内ATP濃度センサーの開発が大阪大学の今村らによって進められている⁴⁶⁾。これは、 ϵ サブユニットをCFPとYFPではさんだもので、蛍光共鳴エネルギー移動によって細胞内の任意の部位のATP濃度を直接見ることができる。これまで細胞内ATP濃度の測定は、主に細胞を破砕しATPを抽出することで行われてきた。新しいセンサーを用いると、従来の方法では失われてしまっていた時空間的な情報も含めて、細胞内のATP濃度を見ることができる。これによって、ATP合成酵素の活性調節はもちろん、様々な生命現象とそれに伴うATP濃度の変化を詳細に解析できることが期待される。

この他にも、その小ささとATP結合の特異性の高さから、リガンドとタンパク質結合のモデル系として計算科学などの分野での活用も考えられる。

4. おわりに

以上、筆者らのこれまでの研究の流れに沿って、ATP合成酵素の活性調節における ϵ サブユニットの役割について述べてきた。今後は、これらの活性調節機構が実際に生

細胞中でどのように働くのか、どのような生理的な役割があるのかといった点を明らかにして行きたいと考えている。

謝辞

本研究は筆者が学生として東京工業大学資源化学研究所吉田・久堀研究室に在籍していた時から現在に至るまで引き続き行ってきたものである。吉田賢右教授(現 京都産業大学教授)、久堀徹助教授(現 東京工業大学教授)をはじめ、吉田・久堀研究室の皆さまには大変お世話になり感謝しております。共同研究者の皆さまにもこの場を借りて感謝致します。私が立教大学に移り、研究室の立ち上げからの3年間、一緒に研究室を盛り上げてくれた一期生の加藤茂幸君をはじめ、私のつたない指導を受けながら研究を進めてくれた学生諸君にも感謝致します。

参考文献

- 1) Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman and Co., New York.
- 2) Boyer, P.D. (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717-749.
- 3) Kinosita, K., Jr., Yasuda, R., & Noji, H. (2000) *Essays Biochem.*, **35**, 3-18.
- 4) Yoshida, M., Muneyuki, E., & Hisabori, T. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 669-677.
- 5) Senior, A.E., Nadanaciva, S., & Weber, J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 188-211.
- 6) Abrahams, J.P., Leslie, A., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) *Nature*, **370**, 621-628.
- 7) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature*, **386**, 299-302.
- 8) Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Jr., & Yoshida, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 19375-19377.
- 9) Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999) *Science*, **286**, 1722-1724.
- 10) Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M., & Capaldi, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **98**, 898-902.
- 11) Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., & Yoshida, M. (1998) *Cell*, **93**, 1117-1124.
- 12) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., Jr., & Itoh, H. (2001) *Nature*, **410**, 898-904.
- 13) Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 142-148.
- 14) Ariga, T., Muneyuki, E., & Yoshida, M. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 841-846.
- 15) Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (2007) *Cell*, **130**, 309-321.
- 16) Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., & Vinogradov, A.D. (1982) *Biochem. J.*, **202**, 9-14.
- 17) Jault, J.-M. & Allison, W.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 1558-1566.
- 18) Matsui, T., Muneyuki, E., Honda, M., Allison, W.S., Dou, C., & Yoshida, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 8215-8221.

- 19) Ort, D.R. & Oxborough, K. (1992) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 961-967.
- 20) Pullman, M.E. & Monroy, G.C. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 3762-3769.
- 21) Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., & Walker, J.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **104**, 15671-15676.
- 22) Smith, J.B., Sternweis, P.C., & Heppel, L.A. (1975) *J. Supramol. Struct.*, **3**, 248-255.
- 23) Sternweis, P.C. & Smith, J.B. (1980) *Biochemistry*, **19**, 526-531.
- 24) Nelson, N., Nelson, H., & Racker, E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7657-7662.
- 25) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., & Kagawa, Y. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7910-7916.
- 26) Kato, Y., Matsui, T., Tanaka, N., Muneyuki, E., Hisabori, T., & Yoshida, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 24906-24912.
- 27) Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T., & Yoshida, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33991-33994.
- 28) Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Hisabori, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35746-35750.
- 29) Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40130-40134.
- 30) Rodgers, A.J.W. & Wilce, M.C.J. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1051-1054.
- 31) Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., & Walker, J. E. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1055-1061.
- 32) Hara, K.Y., Kato-Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T., & Yoshida, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23969-23973.
- 33) Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J.W., Aggeler, R., Wilce, M.C.J., Yoshida, M., & Capaldi, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **98**, 6560-6564.
- 34) Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 46840-46846.
- 35) Richter, M.L. & McCarty, R.E. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 15037-15040.
- 36) Konno, H., Murakami-Fuse, T., Fujii, F., Koyama, F., Ueoka-Nakanishi, H., Pack, C.G., Kinjo, M., & Hisabori, T. (2006) *EMBO J.*, **25**, 4596-4604.
- 37) Nakanishi-Matsui, M., Kashiwagi, S., Hosokawa, H., Cipriano, D.J., Dunn, S.D., Wada, Y., & Futai, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **280**, 23797-23801.
- 38) Tsumuraya, M., Furuike, S., Adachi, K., Kinoshita, K., Jr., & Yoshida, M. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 1121-1126.
- 39) Kuki, M., Noumi, T., Maeda, M., Amemura, A., & Futai, M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 17437-17442.
- 40) Masaike, T., Suzuki, T., Tsunoda, S.P., Konno, H., & Yoshida, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 800-807.
- 41) Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., & Noji, H. (2005) *Nature*, **433**, 773-777.
- 42) Kato-Yamada, Y. & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36013-36016.
- 43) Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **104**, 11233-11238.
- 44) Kato-Yamada, Y. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6875-6878.
- 45) Kato, S., Yoshida, M., & Kato-Yamada, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 37618-37623.
- 46) Imamura, H., Huynh Nhat, K.P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **106**, 15651-15656.