

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シアノバクテリアATP合成酵素 サブユニットの活性調節機構
Title(English)	
著者(和文)	稲辺宏輔
Author(English)	Kosuke Inabe
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11550号, 授与年月日:2020年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀 徹,若林 憲一,上田 宏,西山 伸宏,村上 聡,山田 康之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11550号, Conferred date:2020/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

2019 年度 博士論文

シアノバクテリア ATP 合成酵素
 ϵ サブユニットの活性調節機構

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系
ライフエンジニアリングコース 久堀・若林研究室
稲辺 宏輔

指導教員 久堀 徹 教授
副指導教員 若林 憲一 准教授

略語一覽

ACMA : 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine
ADP : adenosine 5'-diphosphate
AMS : 4-acetamido-4-maleimidyl-stilbene-2,2-disulfonate
ATP : adenosine 5'-triphosphate
Amp : Ampicillin
Amp : Ampicillin
BSA : bovine serum albumin
CBB : coomassie brilliant Blue
CTD : C-terminal domain
DEAE : diethylaminoethyl
DTT : dithiothreitol
ECS : Electrochromic shift
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
FCCP : p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
G6PDH : Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HEPES : 2-[4-(2-hydroxymethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid
HK : Hexokinase
IMV : Inverted membrane vesicles
IPTG : isopropyl 1-thio- β -D-galactoside
KPi : potassium inorganic phosphate
Km : Kanamycin
LDAO : N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide
LDH : Lactate dehydrogenase
LMNG : Lauryl maltose neopentyl glycol
NADH : nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NDH : NADH-ubiquinone oxidoreductase
NTD : N-terminal domain
Ni²⁺-NTA : nickel-nitrilotriacetic acid
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PCR : Polymerase chain reaction
PEP : phospho enol pyruvate
PK : Pyruvate kinase
Pi : inorganic phosphate
SDS : sodium dodecyl sulfate
TCA : trichloroacetic acid
TES : N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid
Trx : thioredoxin

目次	
第 1 章	1
1-1 光合成反応	2
1-2 シアノバクテリア	4
1-3 ATP 合成酵素の活性調節機構	7
1-4 ϵ 阻害の多様性	12
1-5 本博士論文研究の目的	15
第 2 章	16
2-1 要旨	17
2-2 結果	18
2-2-1 ϵ サブユニットの C 末端側ドメイン変異体	18
2-2-2 ϵ サブユニットの CTD 変異体存在下での ATP 加水分解活性測定	20
2-2-3 ϵ サブユニットの CTD 変異体と ADP 阻害・ γ サブユニットの挿入配列による阻害の関係性	23
2-2-4 CD スペクトル測定による ϵ サブユニット変異体の二次構造予測	25
2-2-5 ϵ_N の $\alpha_3\beta_3\gamma$ との複合体形成能の確認	26
2-3 考察	30
ϵ サブユニット CTD 変異体の ATP 加水分解活性の阻害機構	30
2-4 方法	32
2-4-1 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 部分複合体の発現・精製	32
2-4-2 ϵ サブユニットの変異体の作製と発現・精製	34
2-4-3 ϵ_{NC_SS} または ϵ_{CC_SS} の酸化還元条件の確認	36
2-4-4 ATP 再生系を用いた ATP 加水分解活性測定	37
2-4-5 ATP 再生系を用いない ATP 加水分解活性測定 (P_i の定量)	38
2-4-6 CD スペクトル測定	39
2-4-7 複合体再構成実験	39
第 3 章	40
3-1 要旨	41
3-2 結果	42
3-2-1 ϵ サブユニットの CTD 変異体存在下での $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の回転観察	42
3-2-2 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ により停止した γ サブユニットの回転角の決定	43
3-2-3 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ により停止した γ サブユニットの強制回転実験	46
3-3 考察	49
3-3-1 <i>T. elongatus</i> の ϵ サブユニットは独自の活性調節機構をもつのか	49
3-3-2 <i>T. elongatus</i> 由来の ϵ サブユニットの活性調節モデル	49
3-3-3 <i>T. elongatus</i> 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの CTD は構造変化するか	50
3-4 方法	52
3-4-1 一分子回転観察実験用の $\alpha_3\beta_3\gamma$ ($\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot) の用意	52
3-4-2 Ni-NTA コーティングスライドガラスの作製	53

3-4-3	磁気ビーズの調製	53
3-4-4	磁力の向き制御と磁気ビーズの操作方法	54
3-4-5	$\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の回転観察	54
3-4-6	ε サブユニットの添加実験	56
第4章	58
4-1	本章の概要	59
第5章	60
5-1	要旨	61
第6章	62
6-1	総括	63
参考文献	64
論文目録	70
謝辞	71

第 1 章

序論

1-1 光合成反応

地球上の様々な生物のエネルギーは、基本的に太陽光の光エネルギーに由来する。このとき、太陽の光エネルギーを様々な生物が利用可能な化学エネルギーへと変換する役割を担っている一次生産者は植物である。私たちヒトのような動物はこの植物を直接あるいは間接の食料とすることでエネルギーを得ている。

植物の光合成は、植物の細胞内に存在する細胞小器官の一つである葉緑体に存在するタンパク質が、光を受容することで始まる。この光受容タンパク質は光化学系と呼ばれ、葉緑体中に存在する特殊な胞膜であるチラコイド膜に存在する。光化学系によって始まる一連の反応は以下のような反応で進む [Nelson, N. et al (2004)]。光化学系は、光化学系 I と光化学系 II の二つがあり、光化学系 II が光を受容することで、水を分解して電子を引き抜き、チラコイド膜と呼ばれる特殊な膜構造で覆われた内胞膜内（ルーメン）で水素イオン（プロトン）を生成する [Blankenship, R. E. and Hartman, H. (1998)]。電子は、チラコイド膜内に存在するプラストキノンへ渡され、プラストキノンは還元型のプラストキノールになる。プラストキノールは、シトクロム *b₆f* 複合体へと電子を渡し、プラストシアニンへと電子が渡される [Kurisu, G. et al (2003)]。さらに、この過程でプロトンは葉緑体内胞膜外（ストロマ）からルーメンへ輸送される。プラストシアニンは、光化学系 I へと電子を渡し、光化学系 I からフェレドキシン、フェレドキシン-NADP⁺オキシドレダクターゼへと電子がリレーされ、最終的に NADP⁺へと電子が渡され NADPH が生成される [Itoh, S. et al (2001)] [Lea-Smith, D. J. et al (2016)]。このような一連の電子のリレーの際にルーメンにプロトンが蓄積することで、チラコイド膜内外でのプロトンの濃度勾配が生じる。プロトンは、チラコイド膜内外のプロトンの濃度勾配とそれにしたがって形成された電気化学的勾配に従い、ATP 合成酵素のルーメン側の親水性のチャンネルを入口として、膜内在性の回転子に結合する。プロトンが回転子中を 1 回転し、ストロマ側の親水性のチャンネルを出口としてプロトンが放出される。このルーメンからストロマへのプロトンの逆方向への輸送の過程で ATP が生産される [Kramer, D. M. et al (1999)] [Hahn, A. et al (2018)]。生成された NADPH と ATP は、カルビン・ベンソンサイクルで大気中の二酸化炭素から糖を合成するエネルギーとして消費される (図 1-1)。私たち動物は、植物内に蓄積された糖を摂取することでエネルギー源を得る。

このような光合成反応は、植物の葉緑体だけでなく真核藻類やラン藻（シアノバクテリア）にも同様に保存されている。そのため、シアノバクテリア

と葉緑体の光合成の機構には共通点が多く、植物葉緑体同様にシアノバクテリアの光合成反応の研究は進化や光合成反応のメカニズムを明らかにすることにおいて重要である。また、シアノバクテリアは、形質転換方法が一部の種において確立されており、光合成反応を理解する上で重要な変異株を使った生理学的解析を行うことができる。さらに、シアノバクテリアの光合成生物としての特徴を生かして、有用物質を光合成反応で作らせる研究が進んでおり、生物学意義だけでなく応用面での重要性も大きい。このような背景から本研究では、光合成のエネルギー変換機構について研究するために、シアノバクテリアに着目した。

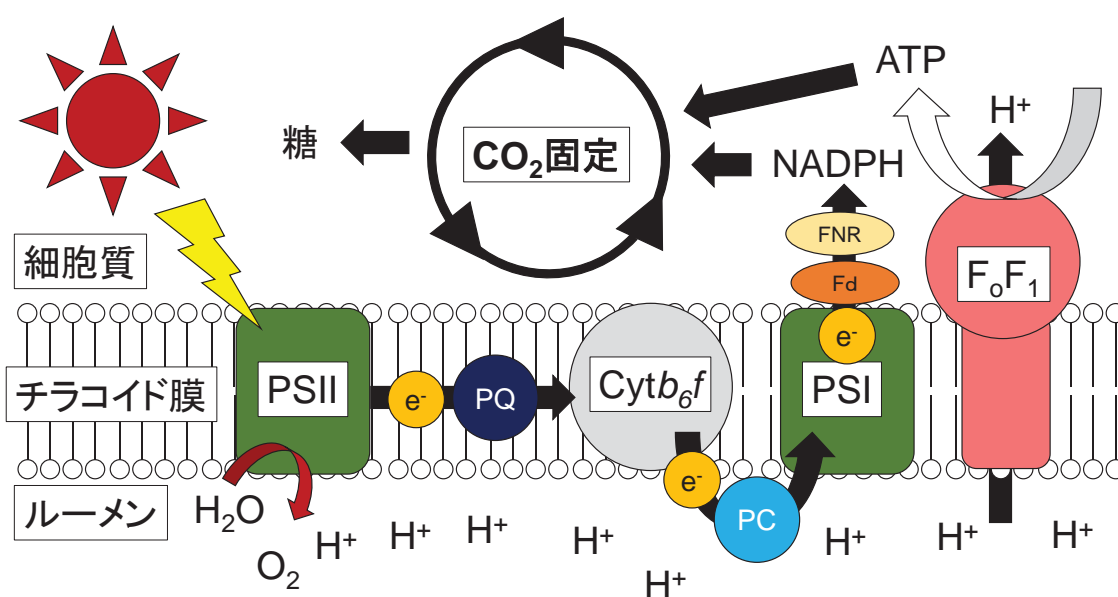


図 1-1 光合成反応のまとめ

光合成反応は、PSII が光を受け PQ へと電子を渡し、Cytb₆f、PC、PSI、Fd、FNR を経て NADPH へと電子を渡す。F₀F₁ は光合成反応が起きたときに形成されたチラコイド膜内外の水素イオン濃度勾配を利用して、ATP を合成する。NADPH と ATP は二酸化炭素を固定する際のエネルギー源となる。PSII：光化学系 2、PQ：プラストキノン、Cytb₆f：シトクロム b₆f、PC：プラストシアニン、Fd：フェレドキシン、FNR：フェレドキシン-NADP⁺オキシドレダクターゼ、F₀F₁：ATP 合成酵素、e⁻：電子

1-2 シアノバクテリア

シアノバクテリアは、グラム陰性細菌の一種であり、光合成を行う微生物である。系統上は、植物や藻類がもつ葉緑体の祖先であると言われている [Stoebe, B. et al (1999)] (図 1-2)。

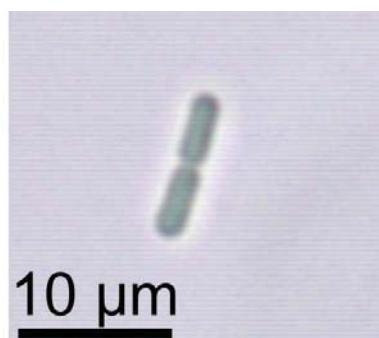


図 1-2 シアノバクテリアである *T. elongatus* BP-1 の明視野顕微鏡像

上記の「1-1 光合成反応」において述べたように、シアノバクテリアは植物葉緑体と並んで光合成研究のモデル生物として扱われ、光合成の仕組みは類似点が多いが、相違点もいくつか存在する。例えば、光化学系と複合体を形成し、光捕集を行うタンパク質が異なる。緑色植物の葉緑体の光捕集タンパク質は LHC と呼ばれ、シアノバクテリアの光捕集タンパク質はフィコビリソームと呼ばれ、光捕集のメカニズムも異なる [Green, B. R. (2019)]。こういった光化学系関連タンパク質の違いもあるが、シアノバクテリアは光合成反応を行うチラコイド膜上で呼吸反応も行う。この呼吸反応は、光化学系関連タンパク質と同じチラコイド膜上にある呼吸鎖複合体で行われる [Lea-Smith, D. J. et al (2016)]。呼吸反応は、NDH 複合体などの呼吸鎖複合体がルーメンへとプロトンを運ぶことで、チラコイド膜内外にプロトンの濃度差を形成する [Laughlin, T. G. et al (2019)]。ATP 合成酵素は、光合成反応と呼吸反応の際に生じたチラコイド膜内外のプロトンの濃度勾配により生じた電気化学的勾配を利用することで、ATP を合成する。さらに、ATP 合成酵素は膜内外のプロトンの濃度勾配のみならず、膜電位にも応じて活性が変化する [Junesch, U. et al (1987)] [Soga, N. et al (2017)]。チラコイド膜上には、チラコイド膜の各種イオンの濃度勾配に応じて働くイオンのトランスポーターが数多く存在しているため、チラコイド膜内外の膜電位も大きく変化している。例えば、カリウムイオンを透過する SynK と呼ばれるカリウムイオンチャネルを欠損したシアノバクテリア変異株は、プロトン濃度勾配形成能が悪くなり、電子伝達活性も低下する [Checchetto, V. et al (2012)]。このようなシアノバクテリ

アのチラコイド膜上に存在するイオンのトランスポーターは、葉緑体のチラコイド膜上にも存在し、トランスポーターの欠損変異株は、表現型に異常が出る [Kunz, H. H. et al (2014)]。

つまり、シアノバクテリアの ATP 合成酵素は、光合成反応と呼吸反応、イオンのトランスポーターによって形成されたチラコイド膜のプロトンの濃度勾配や膜電位を利用することで ATP を合成している。ここで、シアノバクテリアのチラコイド膜で起こりうる環境変化についてまとめた (図 1-3)。

- ① 光合成反応は、光が照射しているときに起き呼吸反応も同様に駆動していると考えられる [Mullineaux, Conrad W. (2014)]。
- ② 光が当たらなくなると、光合成反応は停止する。しかし、呼吸は細胞内の呼吸基質である糖が枯渇しないかぎり続く。
- ③ 光が当たらない環境がつづく、呼吸の基質も枯渇し始める。一般に、24 時間程度で呼吸鎖の基質は枯渇する [Viola S. et al (2019)]。
- ④ 光が再び照射されると光合成が駆動し始めるが、始めは糖がないため、呼吸鎖が駆動しない。
- ⑤ しかし、光が照射されてしばらくすると、カルビン・ベンソンサイクルが周り、糖の合成が進み呼吸鎖が駆動する。

通常は、明→暗→明→暗→・・・というサイクルが起きることで、①→⑤の順番に反応が起こると考えられる。

すなわち、シアノバクテリアは光環境や呼吸鎖の基質が増減しており、チラコイド膜のプロトンの濃度勾配や膜電位が大きく変化していると考えられる。そして、光環境や呼吸鎖基質以外にもチラコイド膜内外のプロトンの濃度勾配に影響を与えるタンパク質は複数種存在する。ただし、チラコイド膜のプロトン濃度勾配や膜電位が環境変化に応じて変化することは、細胞に悪影響を与えるためではなく、むしろ環境変化に柔軟に対応するための緩衝材である。

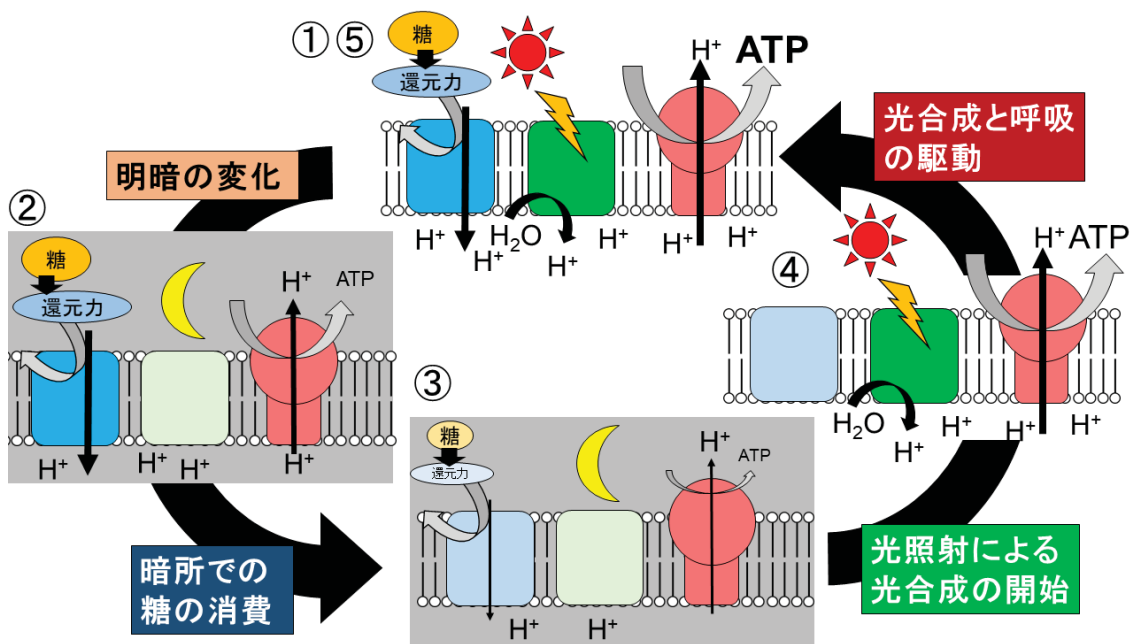


図 1-3 シアノバクテリアのチラコイド膜を介したプロトン濃度勾配の変化

シアノバクテリアのチラコイド膜の環境は大きく変化する。①日の光が照射されている環境では、光合成反応と呼吸反応が駆動し、チラコイド膜のプロトン濃度勾配が形成されて ATP が合成される。②光がとまると、呼吸反応だけが進み、③光が当たらない環境がつづくと呼呼吸反応も止まり始める。そして、④再び光が当たると、光合成反応が再び駆動し、⑤光合成が進むと糖が合成されて呼吸反応も始まる。

1-3 ATP 合成酵素の活性調節機構

葉緑体またはシアノバクテリア由来の ATP 合成酵素は、9 種のサブユニットからなる超分子複合体である [Junge, W. et al (2015)] (図 1-4)。ATP 合成酵素は、チラコイド膜以外では、バクテリアの細胞膜やミトコンドリア内膜のクリステに存在する。プロテオバクテリア由来の ATP 合成酵素のサブユニットは 8 種、ミトコンドリアの ATP 合成酵素は、18 種である [Rühle, T. et al (2015)]。また、回転する生体分子モーターとしても知られている [Yoshida, M. et al (2001)]。

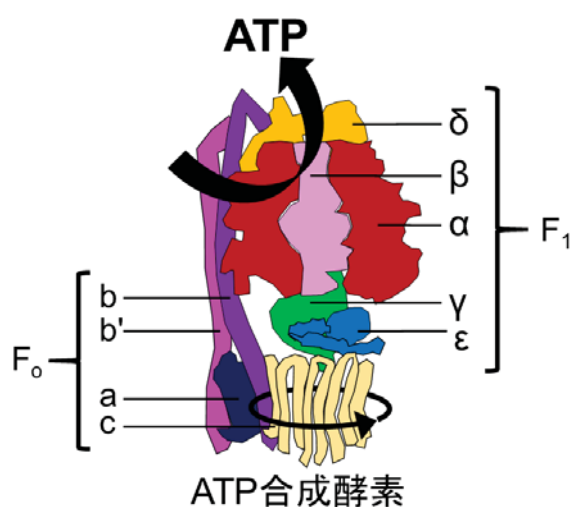


図 1-4 予想されているシアノバクテリア ATP 合成酵素の表面図の模式図
シアノバクテリアがもつ ATP 合成酵素は基本的なサブユニット構成は葉緑体やほかのバクテリアと同じであるが、ミトコンドリア ATP 合成酵素は、さらに多くのサブユニットをもつ。F₁ 部分が親水性サブユニット群であり、F₀ 部分は膜貫通サブユニット群である。

上記の「1-2 シアノバクテリア」のように、シアノバクテリアのチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配は常に変動している。そして、ATP 合成酵素は、変動するプロトン濃度勾配と膜電位に対応するために、いくつかの活性調節機構をもつ。

1) ADP 阻害

ADP 阻害は、ATP の加水分解産物（あるいは ATP 合成の基質）が触媒部位に結合することで起こる活性調節機構である [Vasilyeva, E. A. et al (1982)]。この活性調節機構は、植物の葉緑体 ATP 合成酵素のみならず、細胞小器官であるミトコンドリアや非光合成細菌などにも保存された ATP 合成酵素共通の活性調節機構である [Dunham, K. R. et al (1981)] [Jault, J. M. et al (1996)]。膜電位が喪失した際に起こる活性調節機構であると考えられており、膜電位が発生した際には、ADP 阻害は解除されると報告されている [Strotmann, H., et al (1977)]。また、界面活性剤である LDAO により、ADP 阻害は解除されることも報告されている [Jault, J. M. et al (1996)]。

2) γ による活性調節

γ による活性調節は、葉緑体 ATP 合成酵素やシアノバクテリア ATP 合成酵素のみに保存されている γ サブユニット中の特殊な配列（挿入配列）によって引き起こされる活性調節機構である [Hisabori, T. et al (2013)] (図 1-5)。回転モーターのシャフトに相当する、 γ サブユニットの二本の α ヘリックス (γ シャフト) に寄り添いながら直立したヘアピン構造が、 β サブユニット特有に保存された DELSEED 領域と γ サブユニットの相互作用の立体的な障害となることで、 β サブユニットの構造変化を阻害し、活性を調節すると考えられている [Murakami, S. et al (2018)]。植物葉緑体では、この挿入配列による触媒反応の活性調節はさらに 2 つのシステイン残基により行われている (図 1-6)。挿入配列上の 2 つのシステイン残基が、ジスルフィド結合を形成・解離することで挿入配列の立体構造を変化させることで調節すると考えられている [Kim, Y. et al (2011)]。この γ サブユニットのジスルフィド結合の形成・解離は、葉緑体内に存在するチオレドキシシンと呼ばれる酸化還元応答タンパク質によって、調節される [Schwarz, O. et al (1997)]。そして、このチオレドキシシンによるジスルフィド結合の形成・解離は、植物が生育している光環境に依存して行われる [Konno, H. et al (2012)] [Yoshida, K. et al (2014)]。

A : 報告された $\gamma \cdot \varepsilon$ の部分複合体の構造 [Murakami, S. et al (2018)] オレンジの領域が挿入配列である

B : γ サブユニットの挿入配列による活性調節モデル

これまで報告された X 線結晶構造解析並びにクライオ電顕による構造解析によると、 γ サブユニット中の挿入配列が、触媒部位である β サブユニットの DELSEED 領域に衝突することで活性調節を行うと考えられる。

3) ϵ 阻害

本論文で着目した ϵ 阻害について解説する。 ϵ 阻害は、*Escherichia coli* や *Geobacillus stearothermophilus* 由来の ATP 合成酵素においてよく研究され、その機構についてのモデルが提唱された [Laget, P. P. et al (1979)] [Kato, Y. et al (1997)]。 ϵ 阻害は、 ϵ サブユニットの C 末端側の 2 本の α ヘリックスが、大きく構造変化し、 β サブユニット特有に保存された DELSEED 配列と相互作用するというモデルが考えられている活性調節機構である (図 1-7)。このモデルは、 ϵ サブユニットの C 末端側の 2 本の α ヘリックス上に保存された正電荷アミノ酸をアラニンに置換した変異体が、活性調節を行えないという報告に基づいて考えられたモデルである [Hara, K. Y. et al (2001)]。また、この構造変化は、ATP 濃度変化や膜電位変化によって引き起こされることが報告されている [Yagi, H. et al (2007)] [Suzuki, T. et al (2003)] [Sobti, M. et al (2019)]。

この ϵ 阻害による活性調節機構は、*E. coli* や *G. stearothermophilus* 由来の ATP 合成酵素の研究結果に基づいて考えられた活性調節モデルである。つまり、この活性調節モデルが他の生物由来の ATP 合成酵素の ϵ 阻害に適応できる保証はない。

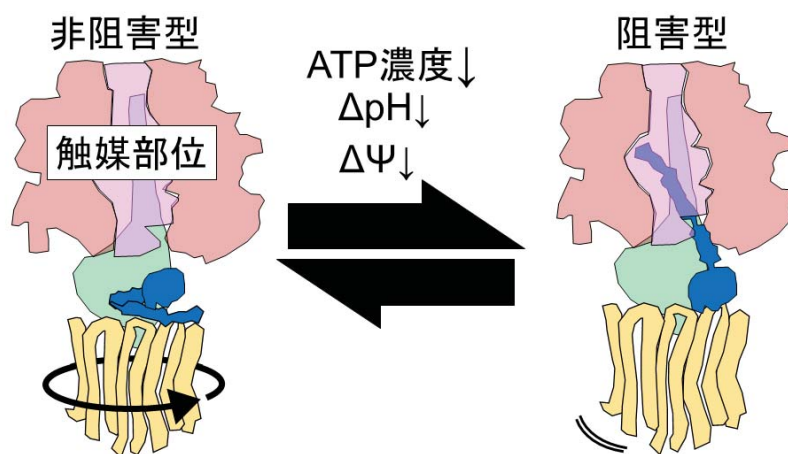


図 1-7 非光合成細菌で提案された ϵ サブユニットによる活性調節機構の立体構造の模式図

ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは、ATP 濃度や膜電位の変化といった ATP 合成酵素の環境変化を感知することで、構造変化する。C 末端側ドメインが $\alpha_3\beta_3$ のリング構造に入りこむことで、 β サブユニットの DELSEED 領域と相互作用し活性調節する。

1-4 ϵ 阻害の多様性

ここで、表 1-1 にこれまで報告された様々な生物の ϵ サブユニットの C 末端側ドメイン欠損変異体 ($\epsilon\Delta$ CTD) が示す酵素活性の変化や、報告されている ϵ サブユニットの立体構造についてまとめた。そして、表 1 の内容を改めて以下で解説する。

- *G. stearothermophilus* や *E. coli* の $\epsilon\Delta$ CTD 変異体は、ATP 合成活性や ATP 加水分解活性が上昇する [Masaïke, T. et al (2006)] [Iino, R. et al (2009)]。複合体中で ϵ サブユニットの構造も、触媒部位に向かって大きく伸びた構造が報告されている [Shirakihara, Y. et al (2015)] [Cingolani, G et al (2011)] [Guo, H. et al (2019)]。 ϵ サブユニットの CTD は ATP 濃度や膜電位依存的に構造変化を起こすことが報告されている [Schulenberg, B et al (1999)] [Suzuki, T. et al (2003)]。さらに、昨年、*E. coli* の ϵ サブユニットの CTD が ATP 濃度依存的に構造変化することが、タンパク質の立体構造レベルで明らかになった [Sobti, M. et al (2019)]。
- *Bacillus subtilis* の $\epsilon\Delta$ CTD 変異体は、ATP 合成活性や ATP 加水分解活性が低下する。 ϵ サブユニットの立体構造はわかっていない。 ϵ サブユニットが、ATP 依存的に構造変化することが報告されている [Kato-Yamada Y. (2005)] [Akanuma G. et al (2019)]。
- 好アルカリ性菌である *Caldalkalibacillus thermarum* は、 $\epsilon\Delta$ CTD 変異体は、ATP 合成活性への影響は報告されていないが、ATP 加水分解活性が上昇することが報告されている [Keis, S. et al (2006)]。一方で、報告された ϵ サブユニットの立体構造情報は、折りたたまれた構造であった [Ferguson, S. A. et al (2016)]。 ϵ サブユニットの ATP 結合部位を欠損しても、 ϵ サブユニットは折りたたまれた構造であった。
- ホウレンソウの葉緑体 ATP 合成酵素は、野生型と $\epsilon\Delta$ CTD 変異体が ATP 合成活性は変わらず、ATP 加水分解活性は上昇する [Nowak, K. F. et al (2002)]。報告された ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの立体構造情報は、折りたたまれた構造であった [Hahn, A. et al (2018)]。膜電位に応じて、 ϵ サブユニットが構造変化することが報告されている [Johnson, E. A. et al (2002)]。
- 本研究で着目したシアノバクテリアの $\epsilon\Delta$ CTD 変異体は、シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以降、*Synechocystis* と呼ぶ) の $\epsilon\Delta$ CTD 変異株について報告がある。*Synechocystis* の $\epsilon\Delta$ CTD 変異株は、ATP 合成活性が低下し、ATP 加水分解活性は上昇する [Imashimizu, M. et al (2011)]。一方で、 ϵ サブユニットの立体構造情報は、別種である好熱性シ

シアノバクテリアの *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 で報告があり、 ϵ サブユニットは、折りたたまれた構造であり、ATP を結合しない [Yagi, H. et al (2010)] [Murakami, S. et al (2018)]。

以上の通り、生物種によって ϵ サブユニットの CTD の酵素活性に対する影響は多様化している。つまり、これまでに *E. coli* などと考えられてきた ϵ サブユニットによる活性調節機構は、他の生物種にあてはまらないという例がすでに知られている。よって、本博士論文研究で着目したシアノバクテリアも、 ϵ サブユニットの CTD が独自の活性調節機構を持つ可能性が高いと推測できる。しかし、シアノバクテリアの ϵ サブユニットの CTD による活性調節機構について詳細に調べた報告はない。

表 1-1 生物種ごとの ϵ サブユニットの構造と酵素活性に対する影響

ATP合成酵素の由来	ϵ Δ CTD変異体		報告された複合体中の構造	構造変化
	ATP合成活性	ATP加水分解活性		
<i>G. stearothermophilus</i>	▲	▲	Extended	○
<i>E. coli</i>	▲	▲	Extended/Retracted	○
<i>B. subtilis</i>	▽	▽	?	○
<i>C. thermarum</i>	?	▲	Retracted	?
Spinach chloroplast	N.S.	▲	Retracted	○
<i>S. 6803</i>	▽	▲	?	?
<i>T. elongatus</i> BP-1	?	?	Retracted	?

▲, 上昇; ▽, 低下; N.S., 差がない

G. stearothermophilus, *Geobacillus stearothermophilus*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *C. thermarum*, *Caldalkalibacillus thermarum*; *S. oleracea*, *Spinacia oleracea*; *S. 6803*, *Synechocystis* sp. PCC6803; *T. elongatus* BP-1, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

1-5 本博士論文研究の目的

表 1-1 のように、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節機構は生物種によって異なる。これはその生物が生育する環境への対応や光合成や呼吸といった代謝反応などの目的に応じて、 ϵ サブユニットによる活性調節機構が進化したと考えられる。特に、シアノバクテリアは光合成だけでなく呼吸反応にも ATP 合成酵素が働く必要がある。そのため、シアノバクテリアの ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節機構は、他の生物種とは異なり、二つの代謝反応に適応した活性調節機構である可能性が高い。しかし、シアノバクテリアの ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節機構は明らかになっていない。よって、本博士論文研究は、シアノバクテリア ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節がどのように働くのか明らかにし、シアノバクテリア ATP 合成酵素の活性調節機構が、どういった点で環境変化や代謝反応などの目的に応じて有利に働くか考察する。

第 2 章では、 ϵ サブユニットの変異体を設計し、大腸菌における組換えタンパク質として発現・精製して生化学的性質を調べた。第 3 章では、 ϵ サブユニットの変異体による活性調節機構を明らかにするために、一分子回転観察実験を行った。第 4 章では、ATP 合成酵素全複合体を用いて、その生化学的特性を調べた。第 5 章では、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の ϵ サブユニットの変異株を作製し、その生理学的特徴を調べた。第 6 章においてこれまで得られた結果をもとに、シアノバクテリアの ATP 合成酵素の活性調節機構がどういった点で有利であるか考察した。

第2章

T. elongatus BP-1 由来の ATP 合成酵素の
 ϵ サブユニット C 末端側ドメイン変異体の
生化学的特性

2-1 要旨

第2章では、シアノバクテリアの一種である好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (以下、*T. elongatus*) 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの大腸菌で発現した組換えタンパク質を利用することにより、 ϵ サブユニットの C 末端側ドメインの活性調節における重要性を明らかにすることを目標に研究を開始した。

ϵ サブユニットの C 末端側ドメイン変異体を作製し、大腸菌の組換えタンパク質として発現・精製した ϵ サブユニット変異体を用いて生化学的解析を行った。その結果、 ϵ サブユニットの C 末端側ドメインが構造変化せずとも、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 部分複合体と複合体を形成して ATP 加水分解活性を阻害することがわかった。

2-2 結果

2-2-1 ϵ サブユニットのC末端側ドメイン変異体

ϵ サブユニットによる活性調節機構を明らかにするために、 ϵ サブユニットの変異体を設計した (図 2-1)。一つ目は、活性調節において重要と考えられてきたC末端側のドメイン (以下、CTD) をすべて欠損した ϵ_N 変異体 (以下、 ϵ_N) である。二つ目は、CTD を構造変化できないようにした ϵ_{CC_SS} 変異体 (以下、 ϵ_{CC_SS}) である。三つ目は、同じく CTD を構造変化できないが、 ϵ_{CC_SS} 変異体とは異なった設計をした、 ϵ_{NC_SS} 変異体 (以下、 ϵ_{NC_SS}) である (図 2-1A)。 ϵ_{CC_SS} と ϵ_{NC_SS} は、CTD あるいは N 末端側ドメイン (以下、NTD) に 2 個の Cys 残基を導入した変異体である。酸化剤を添加し、Cys 残基間でジスルフィド結合を形成させて、 ϵ_{CC_SS} と ϵ_{NC_SS} の CTD が構造変化を起こせないようにした (図 2-1)。

様々な濃度の酸化剤である Aldrithiol-2 または還元剤である DTT を添加し変異導入した Cys 残基間のジスルフィド結合の形成と解離を起こした。タンパク質の酸化還元状態は、SDS-PAGE のバンド移動度の差を確認することで確認した (図 2-2)。その結果、 ϵ_{CC_SS} のジスルフィド結合の形成または解離は、300 μ M の Aldrithiol-2 と 300 μ M の DTT を添加する条件が最適であると判断した。また、 ϵ_{NC_SS} のジスルフィド結合の形成または解離は、300 μ M の Aldrithiol-2 と 1 mM の DTT を添加する条件が最適であると判断した。

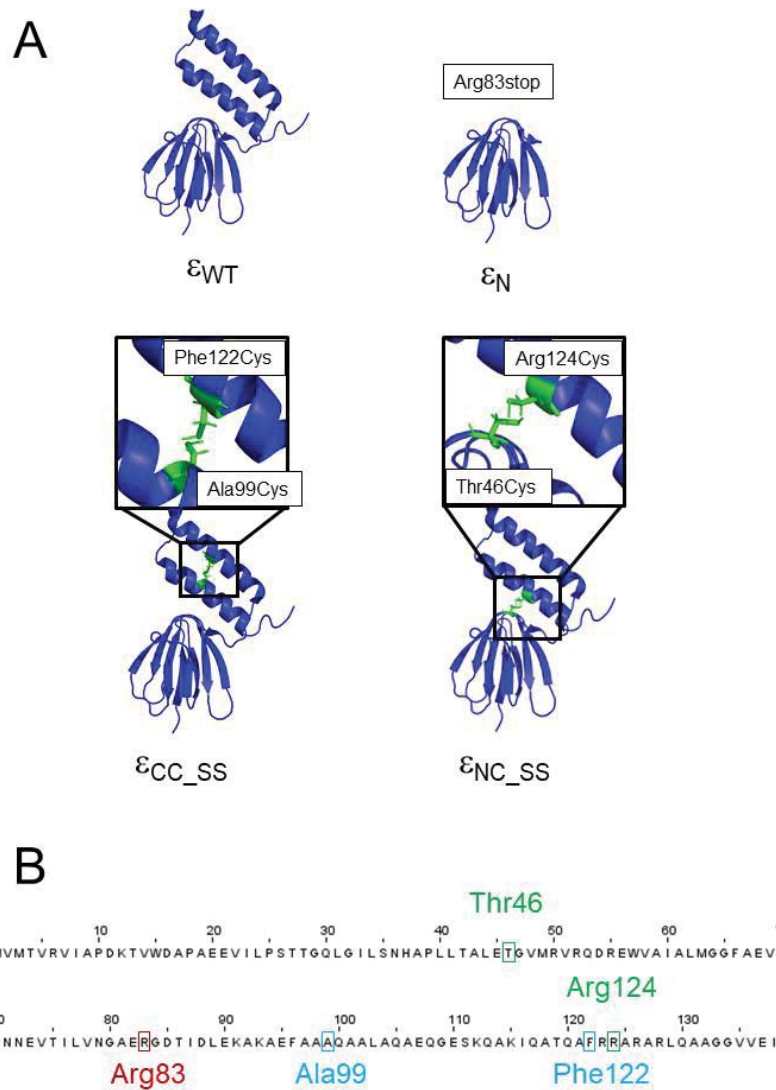


図 2-1 本博士論文研究で使用した ϵ サブユニットとその変異体
A : 野生型 ϵ サブユニットと予想される ϵ サブユニット変異体の構造
B : ϵ サブユニットのアミノ酸配列と変異アミノ酸の位置

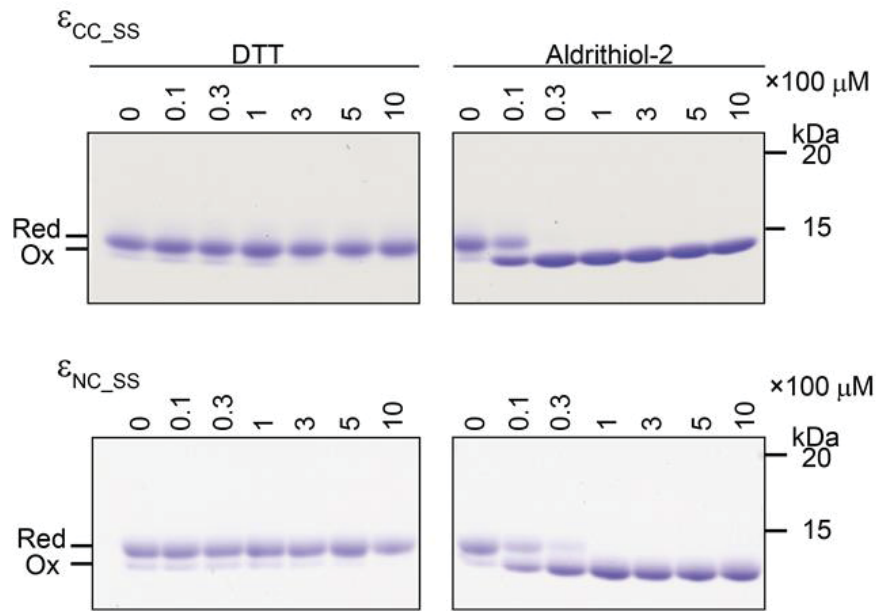


図 2-2 ϵ_{CC_SS} と ϵ_{NC_SS} の酸化・還元条件の検討
 ϵ_{CC_SS} と ϵ_{NC_SS} の酸化・還元状態の確認は、Cys 残基を AMS 修飾し SDS-PAGE 後の移動度の差から判断した。

2-2-2 ϵ サブユニットの CTD 変異体存在下での ATP 加水分解活性測定

ϵ_{WT} やその変異体が、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ による ATP 加水分解活性を阻害できるかどうか調べるために、様々な濃度の ϵ_{WT} やその変異体存在下で、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ による ATP 加水分解活性を測定した (図 2-3)。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性は、 ϵ がいない条件で $8.4 \pm 1.0 \mu\text{mol} / \text{sec} \cdot \text{mg}$ であった。 ϵ_{WT} は、先行研究同様に、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ による ATP 加水分解活性を阻害した [Konno, H. et al (2006)]。一方で、CTD をすべて欠損した変異体である ϵ_N は、ATP 加水分解を阻害できないと考えられたが、予想に反して ATP 加水分解を阻害した。また、 ϵ_{CC_SS} または ϵ_{NC_SS} も同様に ATP 加水分解を阻害した。

ATP 加水分解活性の値から、近似式をもとに解離定数を算出した (表 2-1)。 ϵ_{WT} の解離定数は、 $0.7 \pm 0.3 \text{ nM}$ であり、先行研究と同程度の値であった。 ϵ_N の解離定数は $21 \pm 6.3 \text{ nM}$ であった。つまり、 ϵ_N と γ の親和性が低下していることが示唆された。同様に、 ϵ_{CC_SS} 並びに ϵ_{NC_SS} の解離定数を算出した。酸化処理を施した ϵ_{CC_SS} 並びに ϵ_{NC_SS} (それぞれ、以下 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ 、 $\epsilon_{NC_SS_Ox}$) はそれぞれ、 $2.3 \pm 2.2 \text{ nM}$ 、 $2.5 \pm 0.1 \text{ nM}$ であった。また、無処理並びに還元処理を施した ϵ_{CC_SS} または ϵ_{NC_SS} (それぞれ、以下 $\epsilon_{CC_SS_Non}$ 、 $\epsilon_{CC_SS_Red}$

また、 $\epsilon_{NC_SS_Non}$ 、 $\epsilon_{NC_SS_Red}$) もすべて同程度の値であった。 ϵ_{CC_SS} 並びに ϵ_{NC_SS} の解離定数は、先行研究で報告された ϵ_{WT} の解離定数と同程度の値であり、 ϵ_{CC_SS} 並びに ϵ_{NC_SS} は、 γ の親和性が ϵ_{WT} と同程度であるということがわかった [Konno, H. et al (2006)]。よって、酸化還元処理による影響は親和性に影響がないことが示唆された。

ここで、 ϵ_N が活性を阻害した酵素が、Assay Buffer 1 中に含まれる LDH または PK でないことを証明するために、LDH または PK を含まない Assay Buffer 2 中で、ATP 加水分解活性を測定した (図 2-4)。ATP 加水分解活性は、一定時間中の ATP 加水分解後の P_i を定量することで算出した。 ϵ_N 存在下で ATP 加水分解活性が低下したことから、 ϵ_N は LDH や PK がなくとも、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性を阻害したことがわかった。

また、 ϵ サブユニット変異体存在下で γ サブユニットの挿入配列欠損変異体の ATP 加水分解活性を測定した (図 2-5) (図 2-6)。その結果、 ϵ サブユニットとその変異体はすべて γ サブユニットの挿入配列欠損変異体の ATP 加水分解活性を阻害できなくなった。

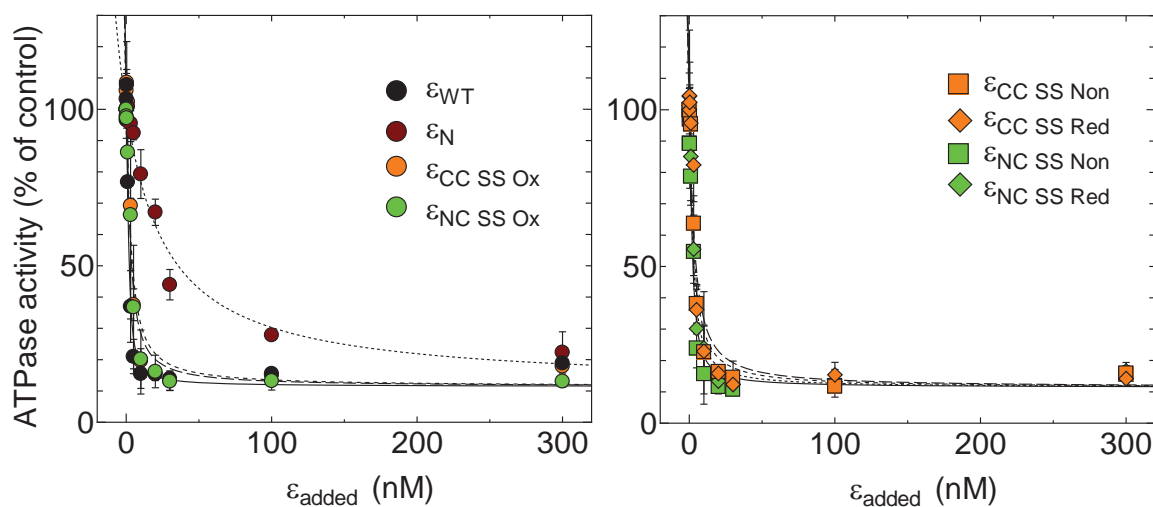


図 2-3 様々な濃度の ϵ サブユニットまたはその変異体存在下での $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性測定
 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の濃度は 2 nM である。

表 2-1 ATP 加水分解活性値をもとに算出した解離定数 (K_D)

Type of ϵ	ϵ_{WT}	ϵ_N	ϵ_{CC_SS}			ϵ_{NC_SS}		
			Non	Red	Ox	Non	Red	Ox
K_D (nM)	0.7 ± 0.3	21 ± 6.3	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.7	2.5 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.7	2.3 ± 2.2

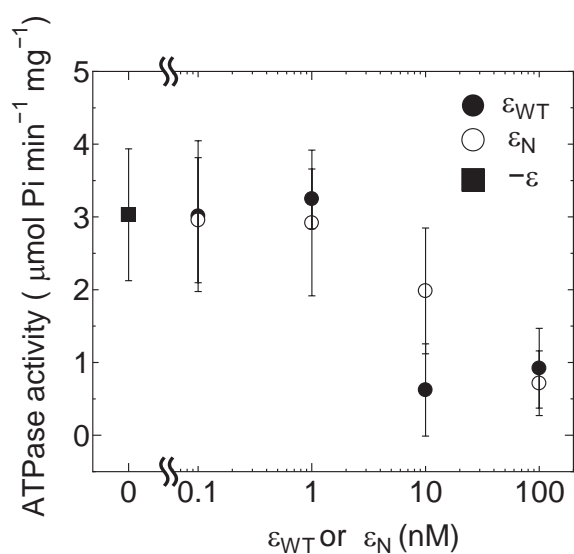
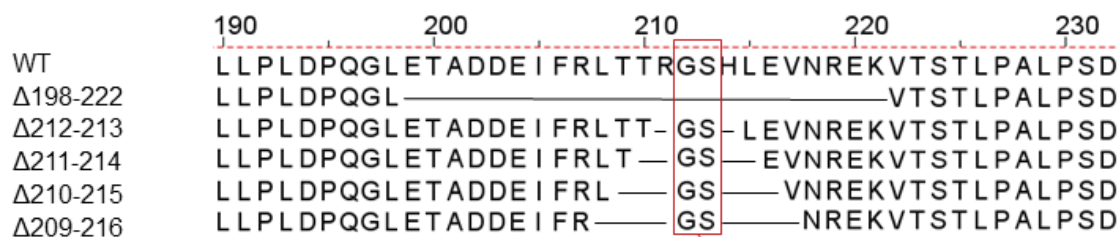


図 2-4 LDH・PK がない Assay Buffer 中での $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性測定
ATP 加水分解活性の測定は ATP 加水分解後の Pi を定量することで算出した。



挿入配列のヘアピン構造のクリンチに相当する2残基

図 2-5 種々の γ サブユニット中の挿入配列の変異体
立体構造から明らかになった挿入配列中の構造で、ヘアピン構造のクリンチに相当する 2 残基を残して、挿入配列を徐々に短くしていった。

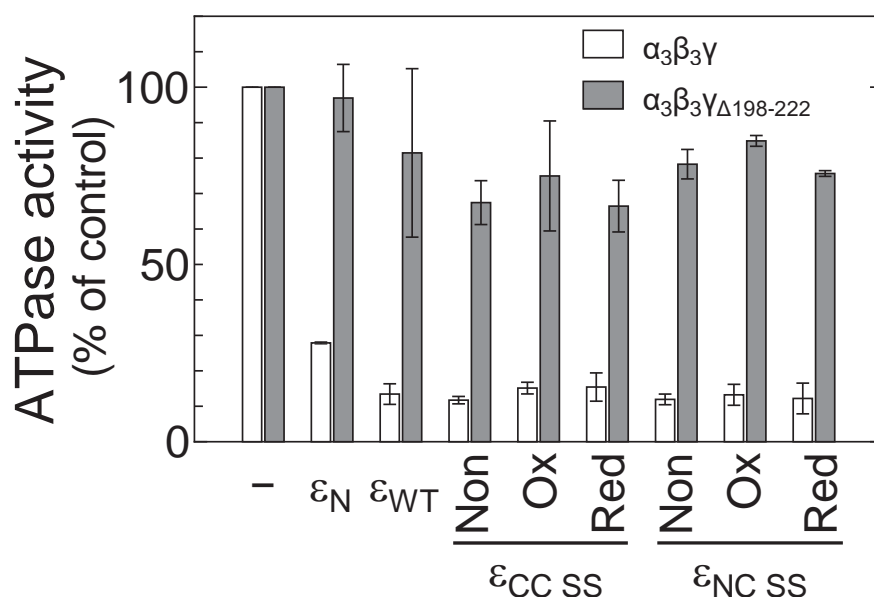


図 2-6 ϵ 変異体存在下の γ の挿入配列欠損変異体の ATP 加水分解活性測定
 用いた ϵ サブユニットはすべて 100 nM
 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の濃度は 10 nM、 $\gamma_{\Delta198-222}$ は 2 nM

2-2-3 ϵ サブユニットの CTD 変異体と ADP 阻害・ γ サブユニットの挿入配列による阻害の関係性

ϵ サブユニット変異体による ATP 加水分解の阻害機構を明らかにするために、 γ サブユニット中の挿入配列変異体と ϵ サブユニット変異体の関係性を調べた。村上らによると、 γ サブユニット中の挿入配列が短くなるにつれて、 ϵ_{WT} による ATP 加水分解の阻害が起こらなくなる [Murakami, S. et al (2018)]。そこで、 γ サブユニット中の挿入配列を同様に徐々に短くして、ATP 加水分解活性を調べた (図 2-5) (図 2-7)。村上らと同じ条件で実験するために、野生型の $\alpha_3\beta_3\gamma$ (以下、 $\alpha_3\beta_3\gamma^{WT}$) と挿入配列を徐々に短くしていった $\alpha_3\beta_3\gamma^{WT}$ 変異体を用いた。そのため、回転実験で用いることができるような $\alpha_3\beta_3\gamma$ とは異なり活性が低い。 ϵ_N は挿入配列の変異体の ATP 加水分解活性を阻害できなかった。また、 ϵ_{WT} と $\epsilon_{CC\ SS}$ は $\gamma_{\Delta212-213}$ 、 $\gamma_{\Delta211-214}$ の ATP 加水分解活性は阻害したが、 $\gamma_{\Delta210-215}$ 、 $\gamma_{\Delta209-216}$ と挿入配列が短くなるにつれて、ATP 加水分解活性を阻害できなくなった。

ADP 阻害を解除すると言われている界面活性剤である LDAO を Assay Buffer 1 に添加して活性測定を行った (図 2-8)。その結果、 ϵ_N は ATP 加水分解活性を阻害できなかったが、 $\epsilon_{CC\ SS}$ は ATP 加水分解活性を阻害した。

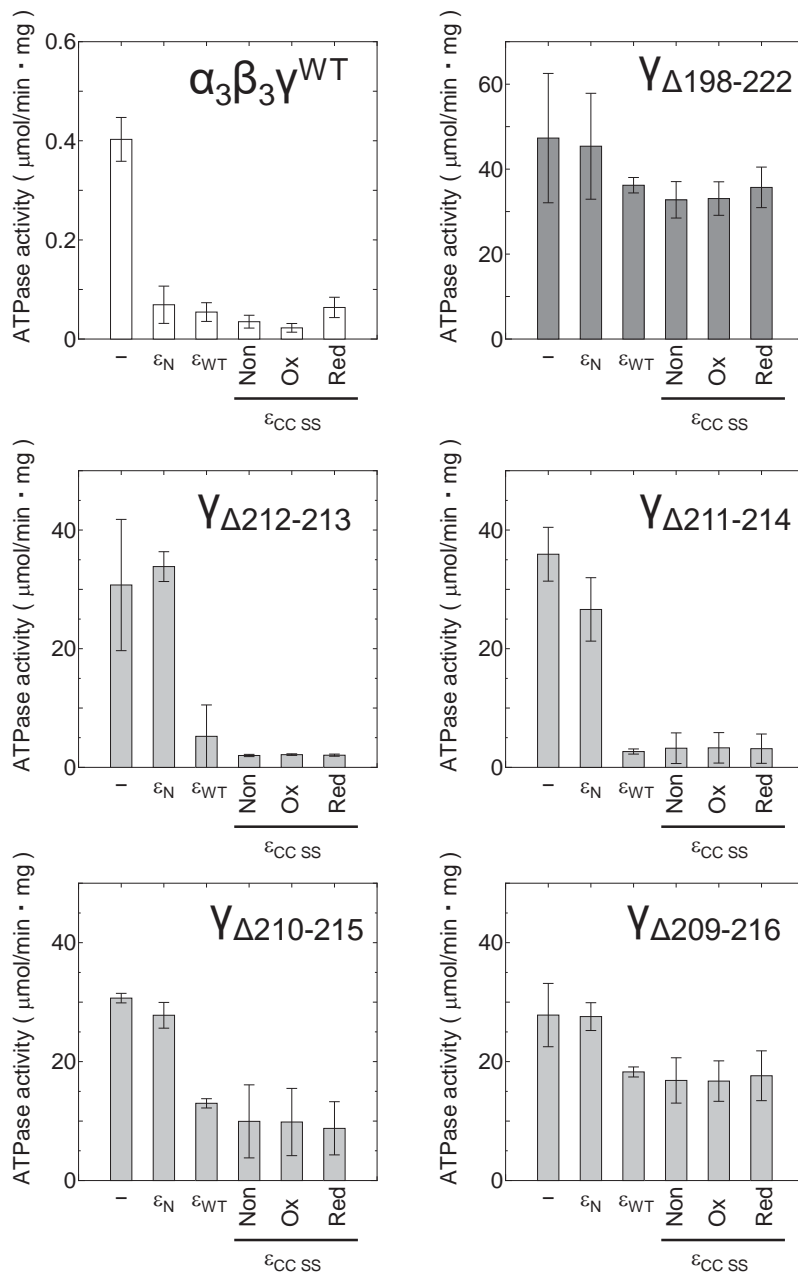


図 2-7 ε_{WT}、ε_Nまたはε_{CC SS}存在下でのα₃β₃γ^{WT}またはγサブユニットの挿入配列変異体のATP加水分解活性
α₃β₃γ^{WT}は他の実験で用いたものとは異なり、回転実験用のアミノ酸の置換をしていない。
用いたεサブユニットはすべて100 nM、α₃β₃γ^{WT}の濃度は10 nM、γ^{Δ198-222}は2 nM、その他のγサブユニットの変異体は4 nMである。

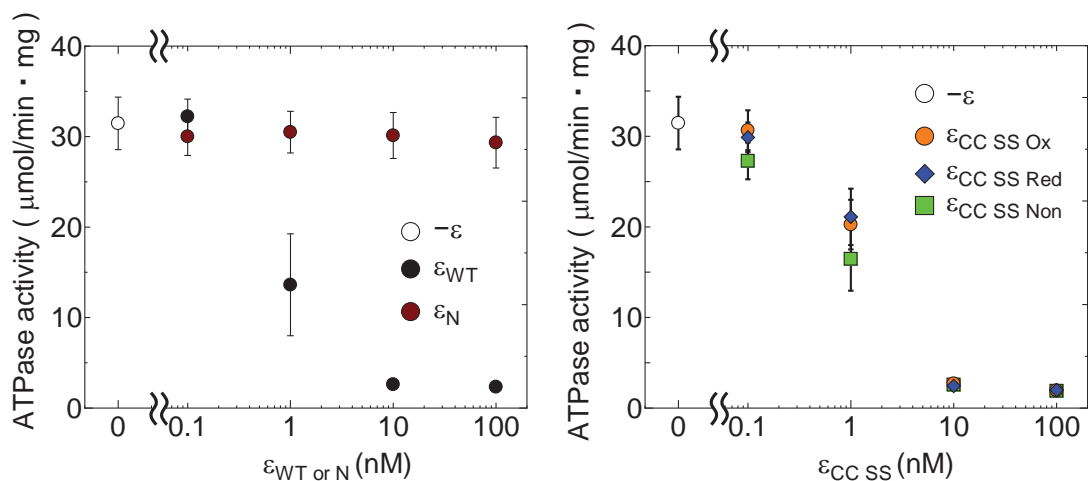


図 2-8 0.1% LDAO を含んだ Assay Buffer 中の ATP 加水分解活性測定
 使用した $\alpha_3\beta_3\gamma$ の濃度は 2 nM である。

2-2-4 CD スペクトル測定による ϵ サブユニット変異体の二次構造予測

ϵ_N と γ サブユニットの親和性が低下していることを示唆する結果から、 ϵ_N の構造が維持されていない可能性が考えられた (表 2-1)。そこで、 ϵ_N の構造を確認するために、CD スペクトルを測定することで二次構造を確認した (図 2-9A)。 ϵ_N の CD スペクトルを測定した結果、 β シート構造を示唆する 220 nm の波長に単一の負のピークが確認された。よって、 ϵ_N の構造は、設計通り β シートから成る構造を維持していると考えられる [Kelly S. et al (2005)]。一方で、酸化還元処理によって、 ϵ_{CC_SS} の構造が維持されているかどうか、CD スペクトルを測定することで確認した。 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ 、 $\epsilon_{CC_SS_Non}$ 、 $\epsilon_{CC_SS_Red}$ の CD スペクトルを測定したところ、すべて ϵ_{WT} と同じスペクトルを示した (図 2-9B)。すなわち、酸化還元処理によって ϵ_{CC_SS} は二次構造が変化していないと考えられる。

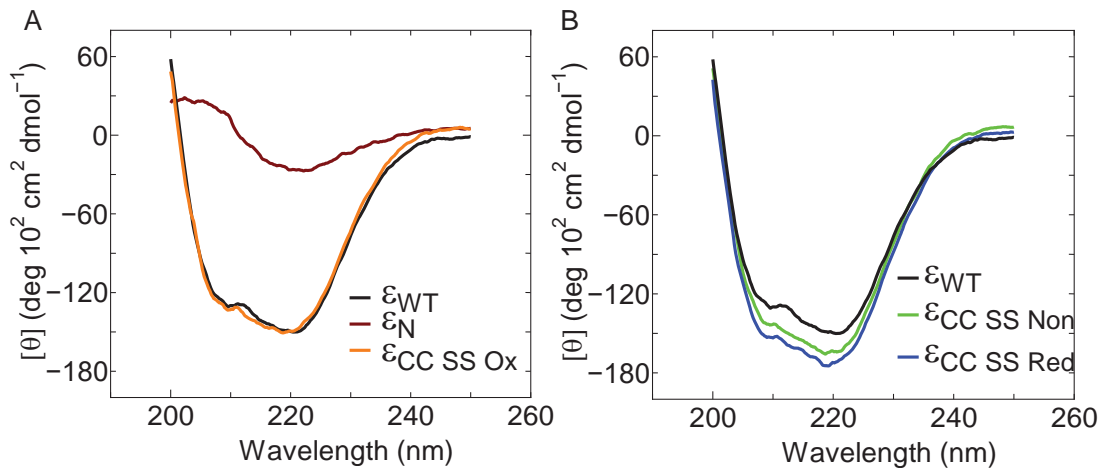


図 2-9 ϵ サブユニットまたはその変異体の CD スペクトル測定
タンパク質濃度は 0.1 mg/mL で測定を行った。

A : ϵ_{WT} と ϵ_N が示した CD スペクトル

B : ϵ_{CC_SS} の酸化・還元処理の前後で示した CD スペクトル

2-2-5 ϵ_N の $\alpha_3\beta_3\gamma$ との複合体形成能の確認

ϵ_N と γ が本当に複合体を形成できるかどうかを調べることにした。 ϵ_N と $\alpha_3\beta_3\gamma$ を混和し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供することで、同じ画分に $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N が溶出するかどうか確認した。同じ画分に $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N が溶出すれば、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N は複合体を形成している。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} または ϵ_N を混和し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} または ϵ_N を混和したサンプルは、同じ溶出時間のところにピークが確認された (図 2-10A・B)。これは、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 単体が示すピークと同じ時間であった。各ピークを回収し、SDS-PAGE に供したのちにウェスタンブロッティングを行い、 β サブユニットと ϵ サブユニットの存在を確認した (図 2-11)。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 単体は、 β サブユニットのみバンドが確認できた。一方で、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} または ϵ_N を混和したサンプルは、 β サブユニットと ϵ_{WT} または ϵ_N のバンドが現れた。溶出した ϵ_{WT} と図 2-10C で溶出した ϵ_{WT} のピークが少しずれている理由は、 ϵ_{WT} の分子質量が 14.7 kDa で、カラムの分子質量の分画限界 (10 kDa~) に近く、分画がうまくいかなかったためと考えられる。

さらに、LDAO 存在下での $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} または ϵ_N を混和したサンプルも同様に、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} を供した場合、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} を混和したサンプルのピークにそれぞれのサブユニットに相当するバンドのみが見られたが、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N は複数のバンドが確認された (図 2-

12)。また、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N をカラムに供したときに得られたピークは、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} をカラムに供したときに得られたピークより早い時間に現れた。そして、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N のピークが現れた時間は、凝集したタンパク質が溶出する時間であった。つまり、LDAO を添加したことによって $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N は複合体を形成できず、凝集してしまったために早い時間にピークが現れたと考えられる。

以上のことから、LDAO 非存在下では、同じ画分に $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N が溶出したため、 ϵ_N は $\alpha_3\beta_3\gamma$ と複合体を形成できることがわかった。一方で、LDAO 存在下では ϵ_N が $\alpha_3\beta_3\gamma$ と複合体を形成できるかどうかわからなかった。

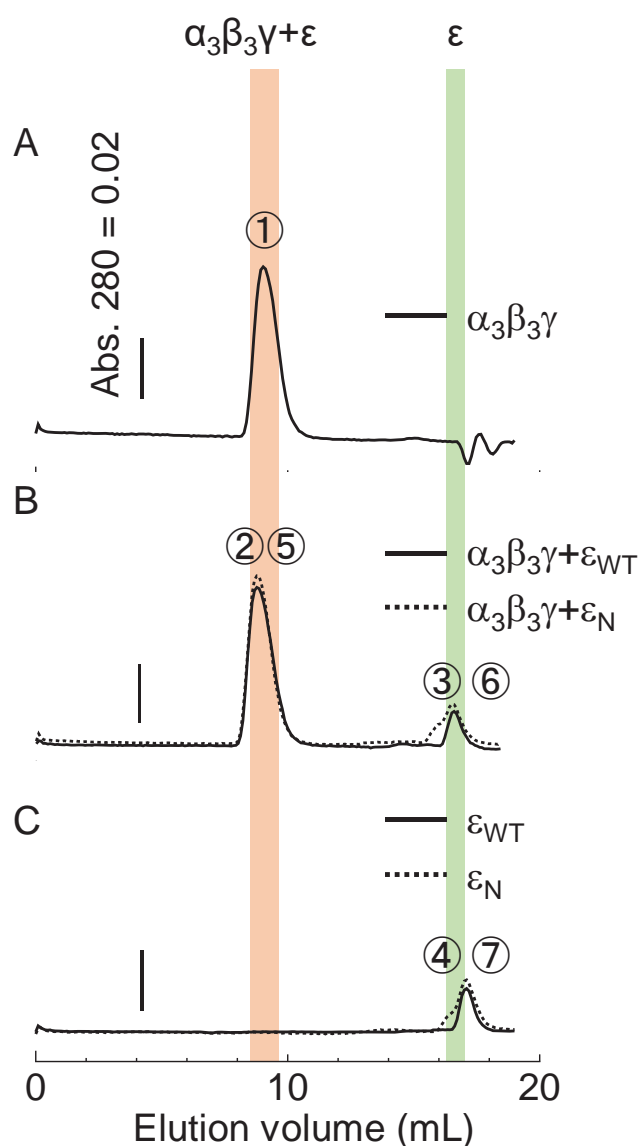


図 2-10 $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N の複合体形成確認実験

$\alpha_3\beta_3\gamma$ と ε_{WT} または ε_N を $1\ \mu\text{M}$ と $5\ \mu\text{M}$ の濃度で混合し、カラムに供した

A : $\alpha_3\beta_3\gamma$ 、B : $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ε_{WT} または ε_N 、C : ε_{WT} または ε_N をカラムに供して得られたクロマトグラム

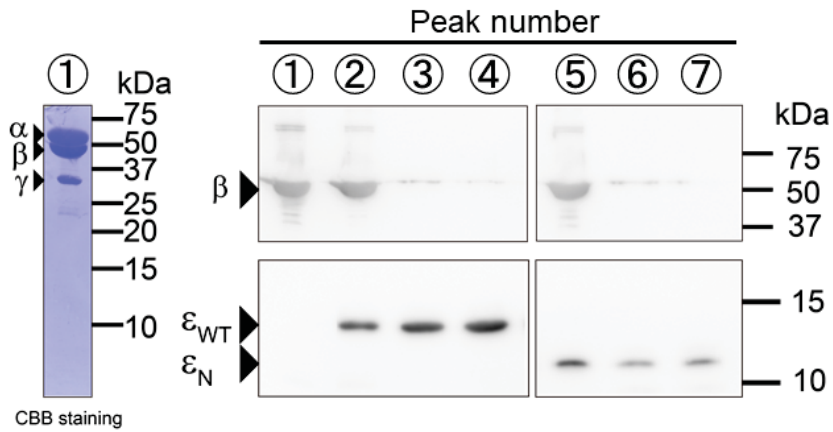


図 2-11 図 2-10 で得られたピークで溶出したタンパク質のウェスタンブロッティングによる確認
各レーン番号が図 2-9 の各ピーク番号に相当する

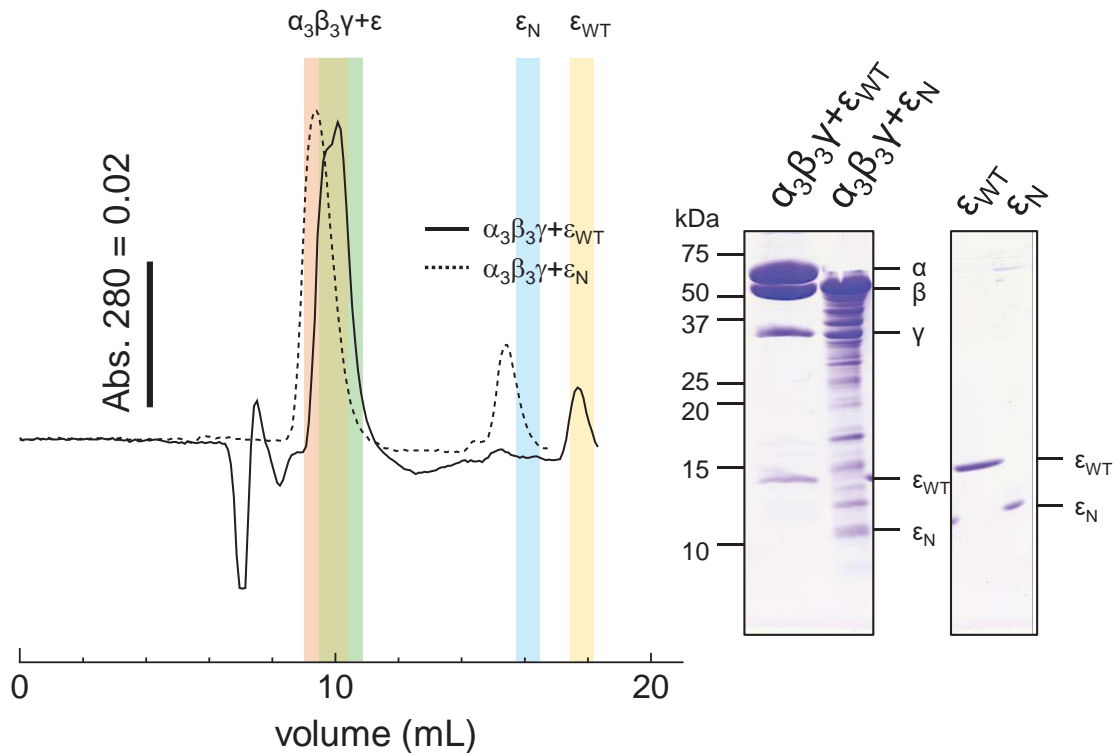


図 2-12 LDAO 存在下での $\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_N の複合体形成確認実験
Buffer C に 0.1% LDAO を添加して、各色の範囲で溶出したタンパク質を回収し、SDS-PAGE した。

2-3 考察

ϵ サブユニット CTD 変異体の ATP 加水分解活性の阻害機構

これまで、バクテリアや葉緑体由来の ATP 合成酵素がもつ ϵ サブユニットは、CTD によって ATP 加水分解活性を阻害すると考えられてきた。しかし、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは、CTD を必要とせず、ATP 加水分解活性を阻害した。よって、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは、これまで報告された CTD による活性調節を行うバクテリアや葉緑体由来の ATP 合成酵素とは異なり、独自の活性調節機構をもつことが示唆された。

ϵ_N は、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性を阻害した一方で、 γ サブユニットの挿入配列変異体の ATP 加水分解活性や LDAO により ADP 阻害が解除された ATP 加水分解活性を阻害できなかった。しかし、 ϵ_{cc_ss} は一部の γ サブユニットの挿入配列変異体を除き、ATP 加水分解活性を阻害した。

γ サブユニットの挿入配列は、少しでも短くなると LDAO による ATP 加水分解活性の活性化率が顕著に低くなる [Murakami, S. et al (2018)]。これは、 γ サブユニット中の挿入配列は ADP 阻害を引き起こすため、挿入配列が短くなると ATP 加水分解活性を阻害できなくなるためと考えられている

[Sunamura, E. et al (2010)]。よって、 ϵ_N は ADP 阻害を起こし、 ϵ_{cc_ss} が別の活性調節機構をもつ可能性が出てきた。

紺野らによると、CTD を欠損した ϵ (ϵ_N とは異なる切断箇所) と複合体を形成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ はヌクレオチドを欠くと複合体が維持できないことを報告している [Konno, H. et al (2011)]。この報告では、紺野らは CTD を欠損した ϵ と $\alpha_3\beta_3\gamma$ の複合体はヌクレオチドとの親和性が低いことによって複合体が維持できないと考察している。よって、 ϵ_N が LDAO 添加によって ATP 加水分解活性を阻害できなくなった理由は、 ϵ_N と複合体を形成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ はヌクレオチドとの親和性が低いため、LDAO 添加によって ADP が複合体から遊離しやすく、ATP 加水分解活性が顕著に上昇したと考えられる。つまり、紺野らの報告は ϵ_N が ADP 阻害を起こしたことを支持すると考えられる。

LDAO は $\alpha_3\beta_3\gamma$ から ADP をはずすため、紺野らの報告にあるようなヌクレオチドを欠いた複合体を再現できる。そこで、図 2-12 で LDAO 存在下で ϵ_N が $\alpha_3\beta_3\gamma$ と複合体が形成できるかどうか検証した。しかし、SDS-PAGE 後に α サブユニットに相当するようなバンドが一部消失し、目的のタンパク質か夾雑物か判断できないようなバンドが多数確認された。また、 β サブユニットに相当するバンドの移動度も変化した。この結果から、紺野らの報告である

ように、LDAO 存在下ではヌクレオチドが外れてしまうために ϵ_N と $\alpha_3\beta_3\gamma$ は複合体を維持できない可能性が考えられる。よって、本実験では LDAO 存在下で ϵ_N が $\alpha_3\beta_3\gamma$ と複合体を形成できることを証明できなかった。この結果から ϵ_N による活性調節機構は決定できなかった。

ϵ_N は γ サブユニットの挿入配列の変異体の ATP 加水分解活性を阻害できなかった。また、 ϵ_{CC_SS} や ϵ_{WT} も γ サブユニットの挿入配列を完全に欠損した変異体 ($\gamma\Delta198-222$) や $\gamma\Delta212-213$ 、 $\gamma\Delta211-214$ よりも挿入配列が短くなった変異体 ($\gamma\Delta210-215$ 、 $\gamma\Delta209-216$) の ATP 加水分解活性を阻害できなかった。先行研究によると、 ϵ_{WT} は γ サブユニットの挿入配列の有無によらず γ サブユニットと結合し、その親和性も大きく変わらない [Konno, H et al (2006)]。よって、 ϵ_{WT} と同程度の親和性をもつと考えられる ϵ_{CC_SS} は挿入配列の有無によらず γ サブユニットと結合できると推測できる。しかし、 ϵ_N は挿入配列の有無によらず γ サブユニットと結合できることを確認していない。これらを踏まえて、挿入配列を欠損した変異体を使った活性測定の結果は、 ϵ_{CC_SS} や ϵ_{WT} は ADP 阻害を起こすことを示唆しているが、 ϵ_{WT} による阻害と ADP 阻害は異なる活性調節機構であると報告されている [Konno, H et al (2011)]。よって、 ϵ_{CC_SS} による活性調節機構を明らかにするためには、 γ サブユニット中の挿入配列の欠損変異体を使わずに ADP 阻害と ϵ_{WT} による阻害を区別する必要がある。

以上の結果から、本章で行った γ サブユニット中の挿入配列の変異体や LDAO を添加した実験では、 ϵ サブユニットの変異体による活性調節機構が ADP 阻害なのか、 ϵ_{WT} と同じ活性調節機構なのか決定できなかった。

2-4 方法

2-4-1 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 部分複合体の発現・精製

本博士論文研究では、モデル生物としてシアノバクテリアの一種である好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を選択した。その理由として、

- (1) 活性調節に重要な γ サブユニットと ϵ サブユニットの部分複合体の X 線結晶構造解析が完了しているため、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節モデルを構造生物学視点から考察できること
- (2) 所属研究室では、活性調節機構を理解する上で重要な変異体解析が、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素で進んでいること
- (3) *T. elongatus* は形質転換が可能であり、活性調節機構を生理学的に評価できること

が挙げられる。この *T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素を利用することで、シアノバクテリアがもつ ϵ サブユニットによる活性調節機構について研究した。

本章では、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の部分複合体であり、ATP 加水分解活性をもつ最小単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いた。この $\alpha_3\beta_3\gamma$ は、 α サブユニットと β サブユニットのそれぞれの N 末端側ドメインに 10 個の His 残基を付加している。また、一分子回転観察実験を行うため、すべての Cys 残基を Ala 残基に置換している。[Konno, H. et al (2011)]。さらに、 γ サブユニットの 112 番目の Gly 残基と 125 番目の Ala 残基を Cys 残基に置換することで、一分子回転観察実験用のポリスチレンビーズがストレプトアビジンを介して結合できる (図 2-13)。

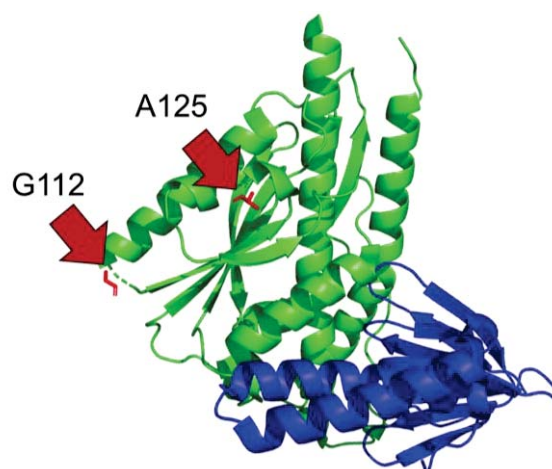


図 2-13 γ サブユニット (緑) の 112 番目の Gly 残基と 125 番目の Ala 残基の立体構造上の位置

それぞれの残基の位置を赤矢印で示した。

さらに、回転実験を行う上で ATP 加水分解活性が高いほうがビーズを回転する $\alpha_3\beta_3\gamma$ の発見頻度が高いため、 γ サブユニット中に K221S 変異を導入してある [Konno, H. et al (2006)] [Sunamura, E. et al (2010)]。この K221S 変異によって、 γ サブユニットと ε サブユニットの親和性は変化していない

[Konno, H. et al (2006)]。また、様々な γ サブユニット中の挿入配列の欠損変異体 ($\gamma\Delta 212-213$ 、 $\gamma\Delta 211-214$ 、 $\gamma\Delta 210-215$ 、 $\gamma\Delta 209-216$ 、 $\gamma\Delta 198-222$) は、 β サブユニットのそれぞれの N 末端側ドメインに 10 個の His 残基を付加したのみで、回転実験用の Cys 残基への置換などはしていない $\alpha_3\beta_3\gamma$ ($\alpha_3\beta_3\gamma^{\text{WT}}$) を使用した。この $\alpha_3\beta_3\gamma$ の γ サブユニット中の挿入配列の変異体の発現ベクターは、近藤久益子博士が作製したものを使用した。ただし、精製プロトコルは、すべて同じ順序で行った。

$\alpha_3\beta_3\gamma$ の大腸菌における発現ベクターを用いて、大腸菌 BL21(DE3) $\Delta 702$ 株を形質転換し、LB+Amp (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) プレートにおいて一晩 37°C で培養した [Nichols, N. N. et al (1997)]。この BL21(DE3) $\Delta 702$ 株は、大腸菌由来の ATP 合成酵素を発現できない大腸菌株である。コロニーを 5 mL の 2 \times YT+Amp (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 培地に植え継ぎ、6 時間前培養したのち、500 mL の 0.2 mM の IPTG を添加した 2 \times YT+Amp (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 培地で 18~20 時間、37°C で培養した。遠心分離 (6600 \times g、10 min、4°C) したのちに菌体を回収し、-80°C で保存した。

集菌した菌体を Buffer A で懸濁したのちにフレンチプレスにより破碎した (~1200 kg/cm²)。破碎液を遠心分離し (23500 \times g、15 min、4°C)、大腸菌由来のタンパク質を変性させるために、破碎後の上清画分を 50°C で 20 min 保温した。保温した溶液を再び遠心分離し (23500 \times g、15 min、20°C)、回収した上清画分を Buffer A で平衡化した Ni²⁺-NTA (QIAGEN) カラムに吸着させることでアフィニティークロマトグラフィー精製を行った。カラムを等量の Buffer A で洗浄し、等量の Buffer B を数回添加して、タンパク質を溶出させた。この溶出画分を 100 kDa cut-off の Amicon Ultra-15 (Millipore) で濃縮したのちに、Buffer C で平衡化した Superdex 200 Increase (GE Healthcare) カラムに供することで、ゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。280 nm の波長の光でタンパク質濃度の経時変化をモニターし、ピークを分取した。100 kDa cut-off の Amicon Ultra-4 (Millipore) で濃縮したのち、終濃度 10%(v/v) のグリセロールを添加して、-80°C で保存した。タンパク質濃度は、濃度既知である BSA (Thermofisher Scientific) を用いて検量線を引き、決定した。

表 2-2 Buffer の組成

Buffer A	Buffer B
20 mM KPi (pH8.0)	20 mM KPi (pH8.0)
100 mM KCl	100 mM KCl
50 mM Imidazole-HCl (pH8.0)	250 mM Imidazole-HCl (pH8.0)
0.1 mM MgCl ₂	0.1 mM MgCl ₂
0.1 mM ATP	0.1 mM ATP

Buffer C
50 mM HEPES-KOH (pH 8.0)
100 mM KCl
0.1 mM MgCl ₂
0.1 mM ATP

2-4-2 ε サブユニットの変異体の作製と発現・精製

ε_N の発現プラスミドは、ε_{WT} 発現用ベクターの DNA 塩基配列情報をもとに設計したプライマー（表 1-2）を用いて、PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit（TAKARA）を使い作製した。ε_{CC_{SS}} と ε_{NC_{SS}} 発現ベクターは、砂村栄一郎博士が作製したものを使用した。ε_{CC_{SS}} は、ε サブユニットの 99 番目の Ala 残基と 122 番目の Phe 残基を Cys 残基に置換した変異体である。また、ε_{NC_{SS}} は、46 番目の Thr 残基と 124 番目の Arg 残基を Cys 残基に置換した変異体である。

表 2-3 ε サブユニットの変異体作製のプライマー

Type of primer	Sequence
ε _N	5'-CGAGCGCTAGAAGCTTGCGGCCGCA-3'
	5'-GCTTCTAGCGCTCGGCACCGTTGAC-3'
εAla99Cys	5'-GCGGAGTTTGCCGCCTGTCAGGCTGCCCTCGCTC-3'
	5'-GGCGGCAAACCTCCGCCTTGGCTT -3'
εPhe122Cys	5'-CGTCGCGCCCGTGCTCGCTTG-3'
	5'-AGCACGGGCGCGACGACAGGCTTGGGTGGCTTGAA -3'
εThr46Cys	5'-TTAACTGCCTTGAATGTGGTGTGATGCGGGTGCG-3'
	5'-TTCCAAGGCAGTTAAGAGGGGGGCA-3'
εArg124Cys	5'-GCGCCCGTGCTCGCTTGCAGG-3'
	5'-CAAGCGAGCACGGGCGCAACGAAAGGCTTGGGTG-3'

ϵ_{WT} または作製した ϵ サブユニットの変異体発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) Δ 702 株を形質転換し、LB+Amp (50 μ g/mL Amp) プレートにおいて一晩 37°C で培養した。生育したコロニーを採取し、5 mL の 2 \times YT+Amp (50 μ g/mL Amp) 培地に植え継ぎ、5~6 時間 37°C で前培養した。前培養液を 1 L の 2 \times YT+Amp (50 μ g/mL Amp) 培地に植え継ぎ O.D. $_{600}$ = 0.6~0.8 になるまで 37°C で培養し、終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、3 時間 37°C で培養した。培養液を遠心分離 (6000 \times g, 10 min, 4°C) したのちに菌体を回収し、-80°C で保存した。

菌体を Buffer D で懸濁したのち、フレンチプレスにより破砕した (~1200 kg/cm²)。破砕液を遠心分離し (23500 \times g, 20 min, 4°C)、上清画分を回収したのち、Buffer D で平衡化した DEAE Sephacel (GE Healthcare) が充填されたカラムに添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。Buffer D と Buffer E で直線濃度勾配溶出を行い、各画分で溶出したタンパク質を SDS-PAGE により確認し、 ϵ サブユニットに相当する画分を夾雑タンパク質が少なくなるように回収した。終濃度が 20% (w/v) になるように硫酸アンモニウムを添加し、Buffer F で平衡化した Phenyl-Toyopearl-650M (TOSOH) カラムに供し、疎水性クロマトグラフィー精製を行った。Buffer F と Buffer G で直線濃度勾配溶出を行い、各画分で溶出したタンパク質を SDS-PAGE により確認し、 ϵ サブユニットに相当する画分を夾雑タンパク質が少なくなるように回収した。回収したタンパク質を 10 kDa cut-off または 3 kDa cut-off の Amicon Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮したのち、Buffer H で平衡化した Superdex 75 (GE Healthcare) カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。分取したピークを 10 kDa cut-off または 3 kDa cut-off の Amicon Ultra-4 (Millipore) を用いて濃縮したのち、終濃度 10%(v/v) のグリセロールを添加して、-80°C で保存した。タンパク質濃度は、濃度既知である BSA (ThermoFisher Scientific) を用いて検量線を引き、決定した。

表 2-4 Buffer の組成

Buffer D	Buffer E
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA	1 mM EDTA
20 mM NaCl	300 mM NaCl
Buffer F	Buffer G
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA	1 mM EDTA
20%(w/v) Ammonium Sulfate	

Buffer H
50 mM HEPES-KOH (pH 8.0)
100 mM KCl

2-4-3 ϵ_{NC_SS} または ϵ_{CC_SS} の酸化還元条件の確認

各濃度の Aldrithiol-2 (酸化剤) または DTT (還元剤) を添加した ϵ_{NC_SS} または ϵ_{CC_SS} を室温で 1 時間静置したのち、終濃度 5% (w/v) TCA を添加し、酸化還元状態を固定した。遠心分離 (20100×g、10 min、4°C) したのち、上清を捨て、冷アセトンを追加することでアセトン洗浄を行った。サンプルに対して AMS 標識を行い、非還元 SDS-PAGE で ϵ_{NC_SS} または ϵ_{CC_SS} の酸化還元状態を確認した。

酸化還元状態の確認は、SDS-PAGE を行った際に、チオール基の修飾試薬である AMS を用いた移動度の違いから、ジスルフィド結合の有無を判断した (図 2-14)。

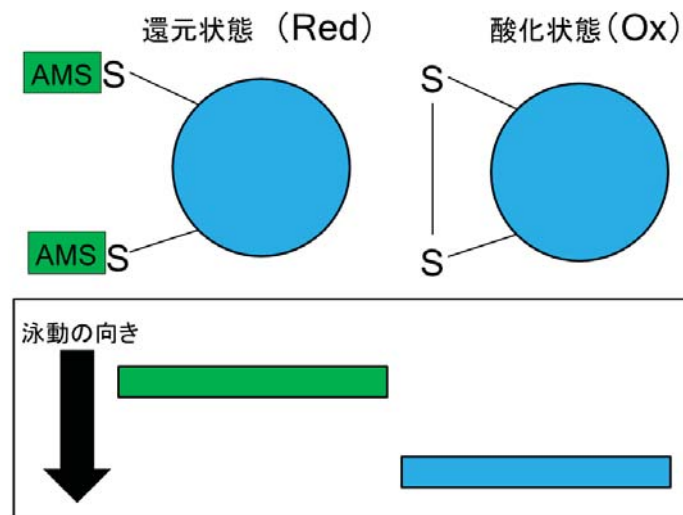


図 2-14 AMS 標識によるチオール基のレドックス状態の確認

チオール基の修飾試薬である AMS は、分子量が 536.4 である。そのため、AMS が修飾されたタンパク質は、分子量が大きいほうへシフトする。そして、分子量の大きさからジスルフィド結合の有無を確認する。

2-4-4 ATP 再生系を用いた ATP 加水分解活性測定

ATP 加水分解活性測定法の原理について説明する。ATP 加水分解活性は、ATP 再生系に伴う NADH の吸光度の減少をモニターすることで、その傾きの値から算出した。

ATP 再生系とは、ATP 加水分解によって生成された ADP が PK によって PEP と ADP から ATP に再生産される多段階反応を指す。この ATP 再生系のうち、ATP 再生系で生成したピルビン酸と NADH を LDH が消費し、乳酸を生成する。NADH は 340 nm の波長の光を吸収するため、NADH の消費を吸光度でモニターできる (図 2-15)。NADH の消費速度の傾きから ATP 加水分解活性を算出した。

つづいて、実験の流れを説明する。1.2 mL の Assay Buffer 1 を 25°C で 2 分間保温し、分光光度計 (Jasco V-550) で 340 nm の波長で吸光度測定を開始した。測定開始から、30 秒後に $\alpha_3\beta_3\gamma$ を添加し、測定開始から 250 秒後に、 ϵ サブユニットまたはその変異体を添加した。 ϵ サブユニット添加後の吸光度減少の直線の傾きから ATP 加水分解活性を算出した。LDAO を用いる場合は、溶液に 0.1% (w/v) LDAO となるように Assay Buffer 1 に添加した。測定開始から、30 秒後に $\alpha_3\beta_3\gamma$ を添加し、測定開始から 100 秒後に、 ϵ サブユニットまたはその変異体を添加した。

近似式を用いた解離定数は、以下の式 1 で ATP 加水分解活性を近似することで算出した。

$$y = 100 - (100 - A_{min}) \cdot \left(K_{Dapp} + [\epsilon] + [F_1] - \sqrt{\frac{(K_{Dapp} + [\epsilon] + [F_1])^2 - 4[\epsilon][F_1]}{2[F_1]}} \right) \quad (\text{式 1})$$

式中のそれぞれの項目は、 y が、

$$y = 100 \times \frac{\epsilon \text{ サブユニットを各濃度で添加した時の活性の値}}{\epsilon \text{ サブユニットを添加していないときの活性の値}} \quad (\text{式 2})$$

として定義される値で、そのほかの項目は、

A_{min} : ϵ サブユニットを各濃度で添加したときに得られた最も小さい値を式 2 に代入した値

K_{Dapp} : 見かけの解離定数

$[\epsilon]$: ϵ サブユニット濃度

$[F_1]$: $\alpha_3\beta_3\gamma$ 濃度 (2 nM)

として定義した。

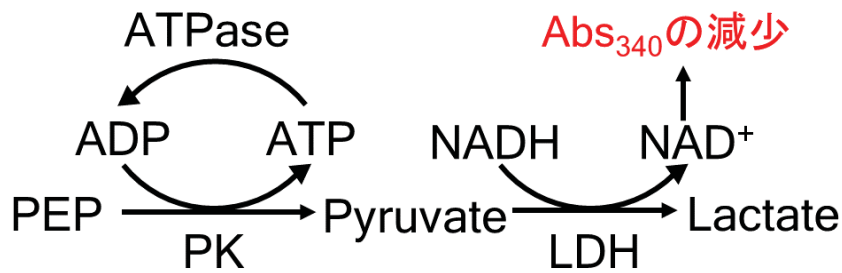


図 2-15 ATP 再生系とそれに伴う NADH の吸光度変化

ATPase に相当する $\alpha_3\beta_3\gamma$ が ATP を加水分解し、ADP が生産されると PK が PEP を消費することで ATP を再生産する。このとき生産されたピルビン酸が LDH によって NADH を消費することで乳酸に変換され、NADH が消費されたことで 340 nm の波長での吸光度が減少する。

表 2-5 Assay Buffer 1 の組成

Assay Buffer 1
50 mM HEPES-KOH (pH8.0)
100 mM KCl
2 mM PEP
50 μ g/mL PK
50 μ g/mL LDH
2 mM MgCl ₂
2 mM ATP

2-4-5 ATP 再生系を用いない ATP 加水分解活性測定 (P_i の定量)

様々な濃度の ϵ_{WT} または ϵ_N を含んだ Assay Buffer 2 に終濃度 2 nM の $\alpha_3\beta_3\gamma$ を添加して、10 分間 25°C で保温した。10 分後、終濃度 4% (w/v) TCA になるように Assay Buffer 2 に添加して、反応を終了させた。次に、Mo. Solution を添加し、10 分間 25°C で保温した。そして、Sn. Solution を添加し、10 分間 25°C で保温したのち、Abs₆₃₀ を測定した。

表 2-6 Assay Buffer 2 と各溶液の組成

Assay Buffer 2	
50 mM HEPES-KOH (pH8.0)	
100 mM KCl	
1 mM MgCl ₂	
1 mM ATP	
Mo. Solution	Sn. Solution
3.5%(v/v) H ₂ SO ₄	2.8%(v/v) H ₂ SO ₄
1% (w/v) Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₄	0.2%(w/v) Hydrazine Sulfate
	1%(w/v) SnCl ₂

2-4-6 CD スペクトル測定

20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中にタンパク質濃度が 0.1 mg/mL になるように希釈した。測定は、円二色性分散計 (Jasco J-820) を用いて行った。

2-4-7 複合体再構成実験

$\alpha_3\beta_3\gamma$ と ϵ_{WT} または ϵ_N を 1 μ M と 5 μ M の濃度で混合した後に、室温で 10 分間保温した。その後、混合した溶液に LDAO を添加あるいは未添加の Buffer C で平衡化した Superdex 200 Increase カラム (GE Healthcare) に供した。流速 0.5 ml/min で溶液を流し、280 nm の波長の光の吸光度のピークをそれぞれ分取した。ピークに相当するタンパク質を特定するために、抗 β サブユニット抗体と抗 ϵ サブユニット抗体を用いてウェスタンブロッティング解析を行った。LDAO 存在下では、SDS-PAGE をした。

第3章

一分子回転観察実験による *T. elongatus* の
 ϵ サブユニット C 末端側ドメイン変異体の
ATP 加水分解活性阻害機構の解明

3-1 要旨

第2章で見出した *T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが、CTD を用いずに ATP 加水分解活性を阻害する分子機構を明らかにするために、第3章では、一分子回転観察実験を行った。その結果、 ϵ サブユニットが CTD を用いずに ATP 加水分解を阻害した機構は、 ϵ サブユニットの野生型と同一の阻害機構であることがわかった。つまり、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは、これまで他の生物種において報告されてきたような CTD を使った阻害機構とは異なった機構によって ATP 加水分解活性を阻害していることがわかった。

3-2 結果

3-2-1 ϵ サブユニットの CTD 変異体存在下での $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の回転観察

ϵ サブユニットの CTD 変異体が、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の ATP 加水分解活性を阻害した機構を詳細に調べるために、 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ を用いて一分子回転観察実験を行った。一分子回転観察実験は、 γ サブユニットにビーズを取り付け、ATP 加水分解に伴った γ サブユニットの回転を直接観察する手法である。

回転実験を行うために調製した $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の回転観察を始めてから、300 秒後に ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ を添加した。コントロールとして ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ を含まない Assay Buffer 3 を改めて添加したところ、 γ サブユニットの回転が持続する様子が観察された (図 3-1 左)。一方で、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ を添加したところ、回転が停止した (図 3-1 中央、右)。ただし、一部の分子はその後も少しだけ回転が持続した。 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ は、回転観察後にもジスルフィド結合が形成されていることを確認した (図 3-2)。また、 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ の代わりに $\epsilon_{CC_SS_Red}$ を添加し、その後の挙動を観察したところ、回転が停止した (図 3-3 左)。

ϵ_N も同様に 300 秒後に添加したが、 γ サブユニットの回転の停止が確認できなかった (図 3-3 右) ϵ_N の添加前後で回転速度を最小二乗法により計算した。その結果、 ϵ_N の添加後に回転速度の低下は見られなかった (表 3-1)。この結果は、 γ サブユニットとビーズの結合が、 ϵ_N と γ サブユニットの結合に影響を与えたために回転を阻害できなくなったと考えられる。

ϵ_{NC_SS} は ϵ_{CC_SS} と解離定数が同程度であり、同一の性質の分子と考えられたため、一分子回転観察実験に用いなかった。よって、 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ をのみを γ サブユニットの回転の挙動の観察に用いた。

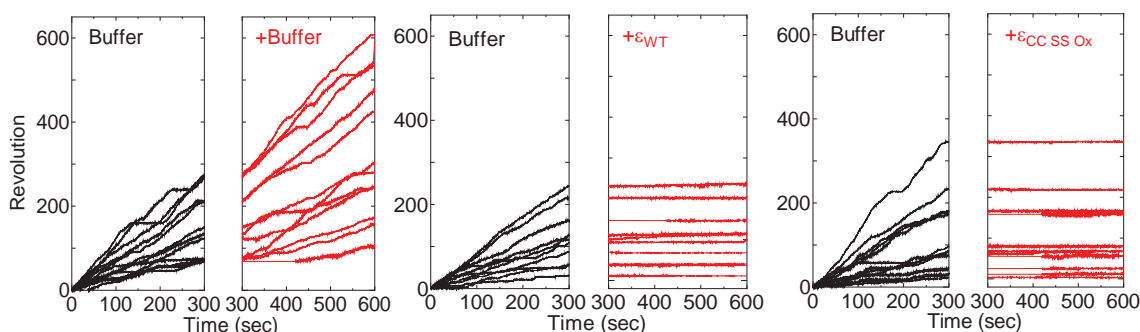


図 3-1 一分子回転観察実験における ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ 添加前後の γ サブユニットの回転挙動の変化

ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ は回転観察を始めてから 300 秒後に添加した。

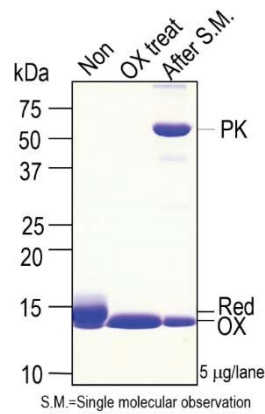


図 3-2 回転実験後の $\epsilon_{CC_SS_OX}$ のジスルフィド結合の確認
 ジスルフィド結合の確認は AMS ラベリング法で行った。

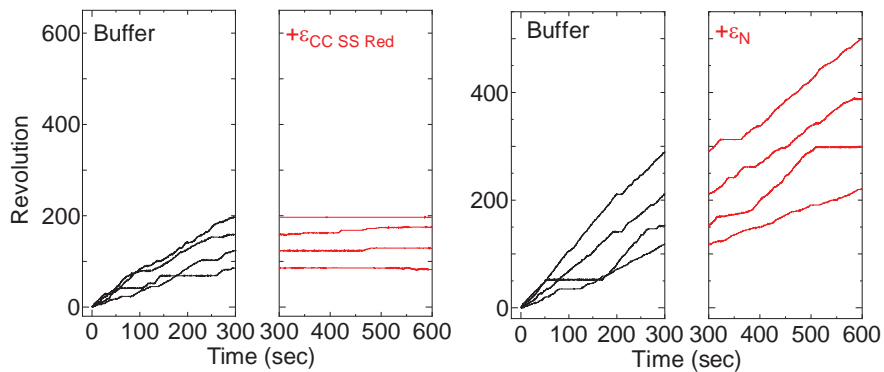


図 3-3 $\epsilon_{CC_SS_Red}$ または ϵ_N を添加した前後の γ サブユニットの回転数の変化
 添加した ϵ サブユニット変異体の種類以外は図 3-1 と同じ条件である。

表 3-1 ϵ_N 添加前後の回転速度の推移

ϵ_N 前		ϵ_N 後	
傾き(rev/sec)	R^2	傾き(rev/sec)	R^2
0.4457	0.864	0.5985	0.9379
0.986	0.9957	0.7348	0.9857
0.3847	0.9833	0.3446	0.9954
0.7125	0.9986	0.6205	0.9955

3-2-2 $\epsilon_{CC_SS_OX}$ により停止した γ サブユニットの回転角の決定

$\epsilon_{CC_SS_OX}$ により回転が停止した角度を決定した。250 nM の ATP を含む Assay Buffer 3 中のある停止角度を 0° と定義して、 γ サブユニットが存在する角度を解析した。 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_OX}$ を含まない Assay Buffer 3 中では、

0°、120°、240°、360°・・・と回転が持続した（図 3-4 左）。一方で、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ を添加したところ、回転が停止し、その角度はおよそ 80°であり、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ による停止角度に有意差は見られなかった（図 3-4 中央・右）（図 3-5）。よって、 γ サブユニットの回転は、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ により同じ角度で停止したことがわかった。この結果から、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ は同じ阻害機構を有する可能性が示唆された。

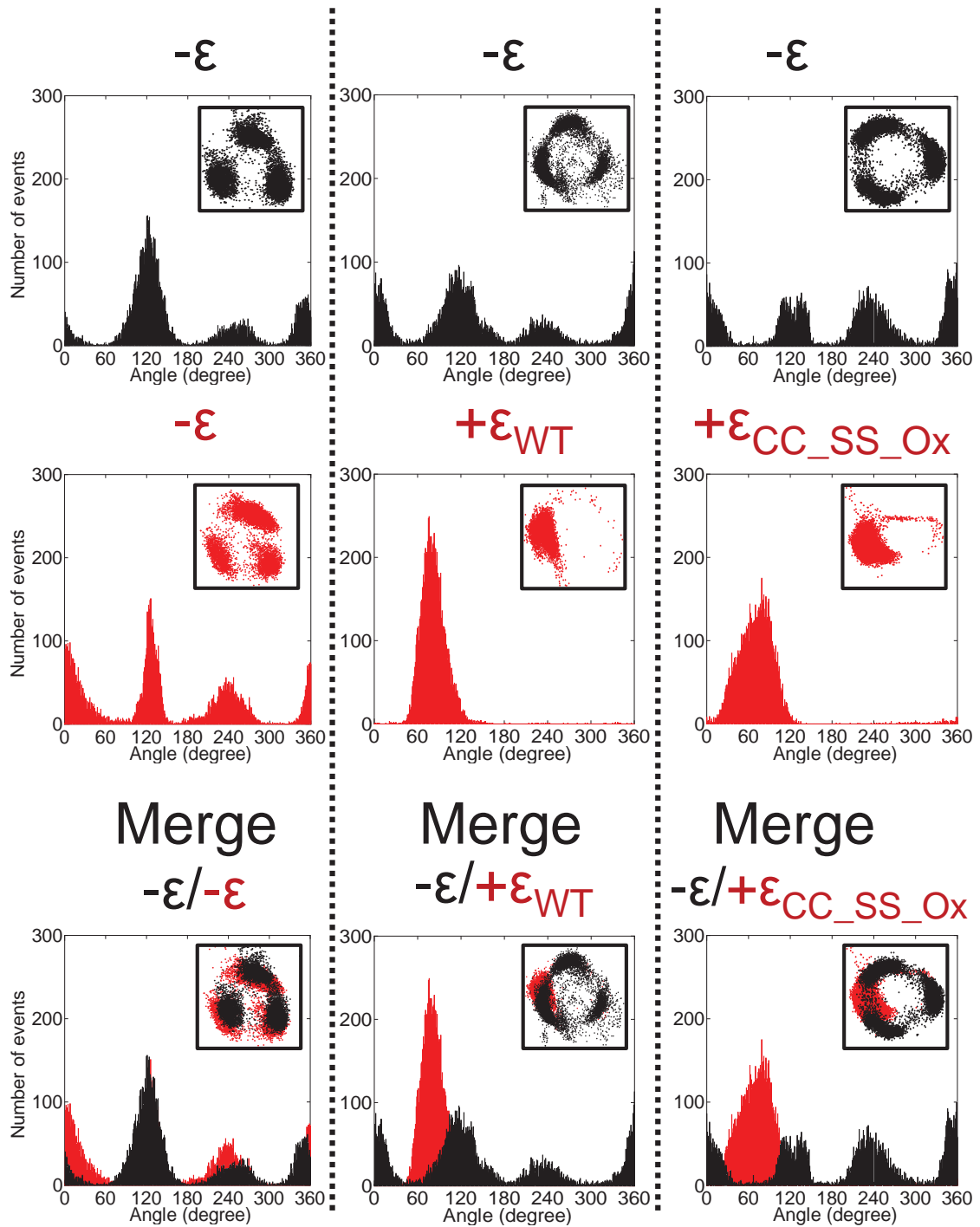


図 3-4 γ サブユニットが確認された角度のヒストグラムとビーズの重心の位置を表した投影図（図中の小窓）
 黒字が ϵ サブユニット添加前で赤字が ϵ サブユニット添加後の回転角度を表している。

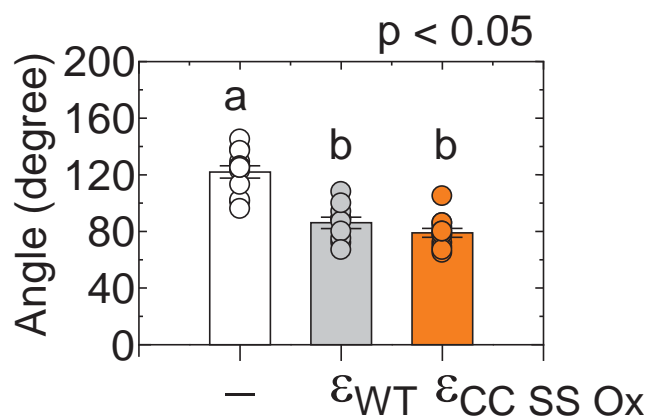


図 3-5 ϵ サブユニットまたはその変異体添加後のビーズの停止位置のまとめ
 有意差検定は、TukeyKramer 法で有意水準 $p < 0.05$ で行った。

3-2-3 $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ により停止した γ サブユニットの強制回転実験

$\epsilon_{CC_SS_Ox}$ が γ サブユニットの回転を停止させた阻害機構を決定するために、 γ サブユニットに磁気ビーズを取り付け、回転が停止した $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の γ サブユニットを磁気ピンセットによって強制回転を行った。ADP 阻害に陥った $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の γ サブユニットを 80° 強制的に反時計回りに回転させた (図 3-6)。その結果、 γ サブユニットは 70% の確率で回転を回復した (図 3-7A・B) (表 3-2)。この確率は、先行研究で報告された確率とほとんど同程度であった [Hirono-Hara, Y. et al (2005)] [Konno, H. et al (2011)]。一方で、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ によって停止した γ サブユニットを反時計回りに 80° 強制的に回転させたところ、回転を回復することはなかった (図 3-7C・D) (表 3-2)。先行研究も ϵ_{WT} により停止した γ サブユニットの回転が回復することはなかった。よって、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_Ox}$ により停止した阻害機構は、ADP 阻害ではなく、互いに同一の阻害機構によって停止したと考えられる。

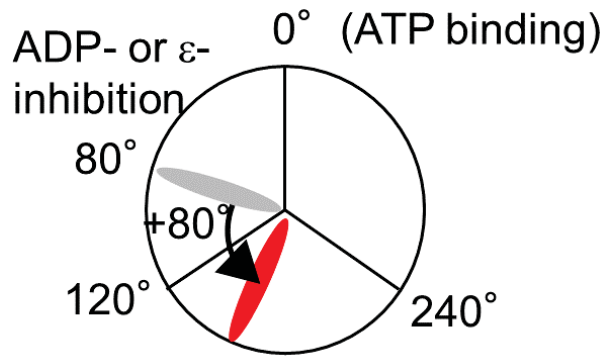


図 3-6 磁気ピンセットによる強制回転実験の概念図
 γ サブユニットの回転が停止した角度（灰色の楕円）から強制的に反時計回りに 80° 回転させた（赤色の楕円）。

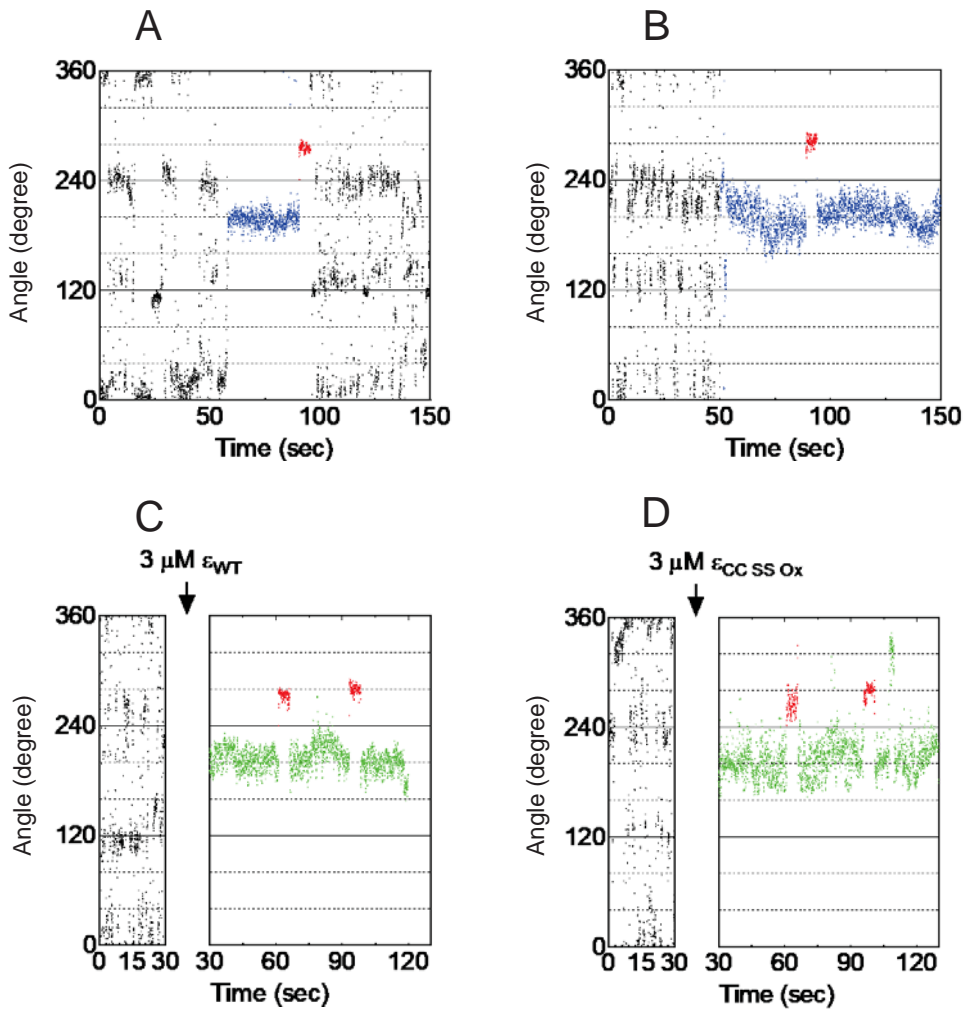


図 3-7 強制回転実験時の γ サブユニットの角度の経時変化

黒い点が、操作を行っていないときの γ サブユニットの位置、赤い点が強制的に反時計回りに 80° 回転させた γ サブユニットの位置、緑の点が ε サブユニットまたはその変異体によって停止した γ サブユニットの位置を示す。

- A、B : ADP 阻害に陥った $\alpha_3\beta_3\gamma$ の γ サブユニットを強制的に反時計回りに 80° 回転させた後の挙動を解析した。
- C : ε_{WT} により停止した γ サブユニットを強制的に反時計回りに 80° 回転させた後の挙動を解析した。
- D : $\varepsilon_{CC_SS_Ox}$ により停止した γ サブユニットを強制的に反時計回りに 80° 回転させた後の挙動を解析した。

表 3-2 磁気ピンセットによる強制回転実験の結果

Stall angle	Activated	Not activated	Frequency of activation (%)
80° (ADP-inhibition)	7	3	70 (n = 10)
80° (ε_{WT} -inhibition)	0	8	0 (n = 8)
80° ($\varepsilon_{CC_SS_Ox}$ -inhibition)	0	8	0 (n = 8)

3-3 考察

3-3-1 *T. elongatus* の ϵ サブユニットは独自の活性調節機構をもつのか

第3章の結果から、 ϵ_{WT} と $\epsilon_{CC_SS_ox}$ は同じ阻害機構によって $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の ATP 加水分解活性を阻害するということがわかった。この結果は、*T. elongatus* 由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは、CTD の構造とは無関係に ATP 加水分解活性を阻害することを示唆している。すなわち、 ϵ サブユニットの NTD が γ サブユニットと相互作用することによって、ATP 加水分解活性が阻害されたと考えられる。

これまでにバクテリアや葉緑体由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが、ATP 加水分解活性を CTD の構造とは無関係に阻害できるという報告はない。しかし、これまでの葉緑体由来の ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの報告には疑問がある [Nowak, K. et al (2002)]。Nowak らによると、葉緑体由来の ϵ サブユニットの CTD 欠損変異体は、葉緑体由来の $\alpha_3\beta_3\gamma$ による ATP 加水分解活性を阻害できない。しかし、Nowak らの報告の中では、 ϵ サブユニットの変異体濃度が低く、 ϵ サブユニットの変異体が $\alpha_3\beta_3\gamma$ と複合体を形成していない可能性がある。本研究では、*T. elongatus* の CTD 欠損変異体である ϵ_N は $\alpha_3\beta_3\gamma$ との親和性が低下していた (表 2-1)。すなわち、葉緑体由来の ϵ サブユニットの CTD 欠損変異体も、自身のタンパク質濃度が Assay Buffer 中で高濃度であれば複合体を形成でき、 ϵ サブユニットの NTD が γ サブユニットと相互作用することで、ATP 加水分解活性を阻害できる可能性があると考えられる。それゆえ、葉緑体 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットも、高濃度の ϵ サブユニットの CTD 欠損変異体を用いて ATP 加水分解活性を阻害できるかどうかを検証する必要がある。

3-3-2 *T. elongatus* 由来の ϵ サブユニットの活性調節モデル

T. elongatus 由来の ϵ サブユニットが、ATP 加水分解活性を阻害した分子機構について考察する。第2章において、*T. elongatus* 由来の ϵ サブユニットが、ATP 加水分解活性を大きく阻害するためには、 γ サブユニットの挿入配列を必要とすることが確認された (図 2-6) (図 2-7)。 γ サブユニットによる活性調節機構については、これまでほとんどわかっていなかった。しかし、昨年明らかになった構造情報から γ サブユニットの挿入配列が形成するヘアピン構造が β サブユニットの DELSEED 配列の領域に衝突することで活性を調節するモデルが提案されている [Murakami, S. et al (2018)] [Hahn, A. et al

(2018)]。これを支持する結果として、村上らによると、 γ サブユニットの挿入配列が短くなると、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ のATP加水分解活性が上昇することが報告されている [Murakami, S. et al (2018)]。そして、先端がDELSEED領域から3アミノ酸残基分以上短くなると ($\gamma\Delta 210-215$ 、 $\gamma\Delta 209-216$ 、 $\gamma\Delta 198-222$ 変異体)、 ε サブユニット存在下でのATP加水分解活性が阻害されにくくなる

[Murakami, S. et al (2018)] (図 2-7)。一方で、ATP加水分解活性の阻害機構について、 γ サブユニットと ε サブユニットの相互作用の点から報告がある。砂村らによると、 γ シャフト内をジスルフィド結合で固定すると、 ε サブユニットによる $\alpha_3\beta_3\gamma$ のATP加水分解活性の阻害が大きく起こらなくなる

[Sunamura, E. et al (2012)]。また、秋山らによると、 γ シャフトと挿入配列を固定すると、 ε サブユニットによる $\alpha_3\beta_3\gamma$ のATP加水分解活性の阻害が大きく起こらなくなる [Akiyama, K. et al (2019)]。

第2章では、 ε サブユニットはCTDがうまく働かなくとも、ATP加水分解を阻害したことを見出した。しかし、第2章では、その阻害機構がわからなかった。そこで、第3章で ε サブユニットがCTDがうまく働かなくともATP加水分解を阻害した機構について詳細に調べた。その結果、 ε サブユニットは、ATP加水分解活性をCTDを使わずに阻害できることがわかった。つまり、 ε サブユニットはNTDを使い、ATP加水分解活性を阻害できる。よって、 ε サブユニット存在下のATP加水分解活性阻害モデルとして以下のようなことが考えられる。

- ① γ サブユニット中の挿入配列が ε サブユニットの存在によって、 β サブユニットのDELSEED領域に衝突し、触媒反応を阻害する説
 - ② ε サブユニットと γ サブユニットの挿入配列の位置関係が、 γ シャフトの位置を固定することで、ATP加水分解活性を阻害している説
- 今後、これらの説について検証していく必要がある。

3-3-3 *T. elongatus* 由来のATP合成酵素の ε サブユニットのCTDは構造変化するのか

T. elongatus 由来のATP合成酵素の ε サブユニットは、複合体を形成していない ε サブユニット単体では折りたたまれた構造をしており、 γ サブユニットと ε サブユニットの部分複合体の構造中でも折りたたまれた構造であった [Yagi, H. et al (2010)] [Murakami, S. et al (2018)]。

また、葉緑体由来のATP合成酵素の ε サブユニットのCTDと*T. elongatus*のNTDによるキメラ ε サブユニットは、単体で折りたたまれた構造をしており、全複合体の構造も同様に、 ε サブユニットは折りたたまれた構造であつ

た [Hahn, A. et al (2018)]。一方で、 ϵ サブユニットのCTDが活性調節を行うとされる *E. coli* や *G. stearothermophilus* の ϵ サブユニットのCTDは、複合体を形成していない ϵ サブユニット単体では折りたたまれた構造をしており、X線結晶構造解析により報告された複合体中で、伸びた構造をしていた [Yagi, H. et al (2007)] [Uhlen, U. et al (1997)] [Cingolani, G. et al (2011)] [Shirakihara, Y. et al (2015)]。これらの構造情報は、葉緑体やシアノバクテリアの ϵ サブユニットは本来構造変化しない可能性を示唆する。ところが、複合体中で折りたたまれた構造をしているにもかかわらず、 ϵ サブユニットがCTDでATP加水分解を阻害する報告もあり、必ずしも構造情報が ϵ サブユニットのCTDによる活性調節の有無を示唆するとは限らない [Ferguson S. A. et al (2016)] [Keis S. et al (2006)]。また、葉緑体由来の ϵ サブユニットが構造変化する報告もあり、*T. elongatus* 由来の ϵ サブユニットも、同様に構造変化をする可能性がある [Johnson, E. A. et al (2002)]。しかし、ATP合成酵素中の ϵ サブユニットは、常に複合体を形成している。第2章や第3章で用いた材料は、部分複合体であり、*T. elongatus* 由来の ϵ サブユニットは、全複合体中において構造変化する可能性もある。そのため、ATP合成酵素全複合体を用いて再検討する必要がある。さらに、これまではATP加水分解活性に重点を置いて解析したが、 ϵ サブユニットは、ATP合成活性を阻害するという報告もある [Masaïke, T. et al (2006)] [Iino, R. et al (2009)]。よって、*T. elongatus* 由来の ϵ サブユニットのCTDがATP合成活性を阻害する可能性も考えられる。そこで、第4章・第5章では、*T. elongatus* 由来のATP合成酵素の全複合体を用いて ϵ サブユニットの活性調節機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

3-4 方法

一分子回転観察実験は、分子の回転を光学顕微鏡下で観察することで、その挙動から触媒過程を決定する方法である。しかし、一般に生体分子は顕微鏡で観察できるほど十分な大きさでない。そのため、分子の回転を光学顕微鏡下で直接観察することはできない。そこで、光学顕微鏡下で分子の動きを観察するために、 γ サブユニットにプローブとしてポリスチレンビーズを取り付けることで、顕微鏡下での観察を可能にした。ポリスチレンビーズを取り付けるために、以下のような流れで実験を行った。

3-4-1 一分子回転観察実験用の $\alpha_3\beta_3\gamma$ ($\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot) の用意

$\alpha_3\beta_3\gamma$ の発現・精製の方法は、Ni アフィニティークロマトグラフィー精製まで第2章と同じ手法に従った(第2章 2-4 方法 2-4-1)。Ni アフィニティークロマトグラフィー精製後、溶出画分を 100 kDa cut-off の Amicon Ultra-15 (Millipore) で濃縮したのちに、Buffer I で平衡化した Superdex 200 Increase (GE Healthcare) カラムに供することで、ゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。280 nm の波長の光でタンパク質濃度の経時変化をモニターし、ピークを分取した。100 kDa cut-off の Amicon Ultra-4 (Millipore) で濃縮したのち、濃度既知である BSA (Thermofisher Scientific) を用いて検量線を引き、タンパク質濃度を決定した。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot と Biotin-PEAC₅-maleimide (Dojindo) が 1 : 10 のモル比になるように混合し、20°C で 3 時間以上振とう器中で混和した。その後、未結合のビオチンを除くため、Buffer H で平衡化した NAP-5 (GE Healthcare) に溶液を添加し、Buffer H でタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を 100 kDa cut-off の Amicon Ultra-4 (Millipore) を用いて濃縮したのち、終濃度 10%(v/v) のグリセロールを添加して、-80°C で保存した。濃度既知である BSA (Thermofisher Scientific) を用いて検量線を引き、タンパク質濃度を決定した。

表 3-3 Buffer の組成

Buffer I
20 mM KPi (pH 7.0)
100 mM KCl
0.1 mM MgCl ₂
0.1 mM ATP

3-4-2 Ni-NTA コーティングスライドガラスの作製

磁気ピンセットと磁気ビーズによる分子の強制回転実験は、分子がガラスに強く結合している必要がある。そこで、Ni-NTA でコーティングされたスライドガラスを用いることで、 α サブユニットと β サブユニットの N 末端に融合された His タグを介して強く結合できる。そのために、Ni-NTA でコーティングされたスライドガラスを調製した。

100%エタノールに浸ったスライドガラスを超音波洗浄し、その後超純水 (Millipore) で洗浄した。スライドガラスを 20%セルオチル液につけ、16 時間以上静置した。スライドガラスを超純水で洗浄し、120°Cで 1 時間乾燥させ、水を完全に蒸発させた。乾燥後、約 120 mL のトルエンと 240 μ L の 3-mercaptopropyl trimethoxysilane を混合した溶液を攪拌しつつ、スライドガラスを 3 時間以上浸した。100%エタノールで洗浄し、Buffer J を攪拌しつつ、スライドガラスを 3 時間以上浸した。超純水で洗浄し、スライドガラスを Buffer K につけて 16 時間以上静置した。超純水で洗浄し、100 mM NiSO₄ につけて、使用まで 4°Cで保存した。

表 3-4 Buffer の組成

Buffer J	Buffer K
20 mM KPi (pH7.0)	200 mM KPi (pH 7.0)
50 mM DTT	2 mg/mL Maleimido-C3-NTA

3-4-3 磁気ビーズの調製

磁気ビーズは Sera-Mag Magnetic Streptavidin-Coated Particles (GE Healthcare) を使用した。磁気ビーズは、アジ化ナトリウムを含む溶液中で保存されている。アジ化ナトリウムは、ADP 阻害を起こす化合物として知られているため、以下のような操作で調製することで、アジ化ナトリウムを除去した。

磁気ビーズが入った溶液を 30 μ L とり、1 mL の Buffer L と十分に混和した。遠心分離 (20400 \times g, 3 min, 4°C) し、上清を捨て、再び 1 mL の Buffer L で沈殿を懸濁した。1 mL の Buffer L と十分に混和し、遠心分離

(20400 \times g, 3 min, 4°C) をしてから上清を捨てるまでの操作を 3 回繰り返し、最後に 100 μ L の Buffer L で沈殿を懸濁した。

また、磁気ビーズはビーズ同士がつきやすく、一つのビーズが一つの分子に結合するために、使用の前に一つ一つを分離する必要がある。そこで、以

下のような操作を行い、ビーズを分離させた。アジ化ナトリウムを除去したビーズをボルテックスで十分に懸濁し、超音波処理を 15 秒ほど行った。上清をすて、Buffer L で再度懸濁した。ビーズは、10 倍に希釈して使用した。

表 3-5 Buffer の組成

Buffer L
50 mM HEPES-KOH (pH8.0)
50 mM KCl

3-4-4 磁力の向きの制御と磁気ビーズの操作方法

電磁石を正方形の 4 辺に配置した磁気ピンセットを用いて、顕微鏡のステージ上に磁場を発生させ、磁力の向きをパソコン上で制御した。磁場の制御は、分子運動解析ソフトウェア（デジモ）を用いた。

3-4-5 $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の回転観察

はじめに、大きさの違う二つのカバーガラス（(24×36) と (18×18)）とグリースを塗った紙（パラフィルムの剥離紙）でフローチャンバーを作製した（図 3-8）。磁気ピンセットによる強制回転実験は、Ni-NTA でコーティングされたスライドガラスを使用した。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot を 200 nM になるように、Buffer M で希釈し、フローチャンバーに 15 μ L 流した。室温で 2 分間静置し、50 μ L の Buffer M 流し結合していない $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot を洗い流した。ポリスチレンビーズまたは磁気ビーズを 15 μ L 流し、室温で 15 分間静置した。ポリスチレンビーズは、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズを用いた。このポリスチレンビーズは金流星博士が調製した。50 μ L の Buffer H で洗い流し、50 μ L の Assay Buffer 2 を流し、顕微鏡下で観察を開始した（図 3-9）。顕微鏡は IX71（Olympus）を使用し、100 倍の倍率の位相差油浸レンズと位相差コンデンサーを用いて観察した。回転する様子をフレームレート 30 fps で動画撮影し、TRAnCE Viewer（金流星博士作）で解析した。

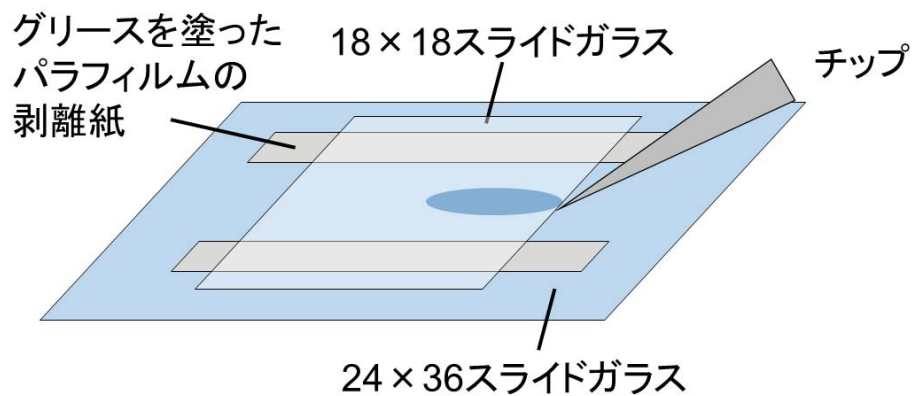


図 3-8 フローチャンバーの概略図

二枚のスライドガラスとパラフィルムの剥離紙を重ねて、剥離紙の厚さ分の隙間があるフローチャンバーを作製した。この隙間に各種 Buffer を流し込み、Buffer 中で γ サブユニットの回転を観察した。

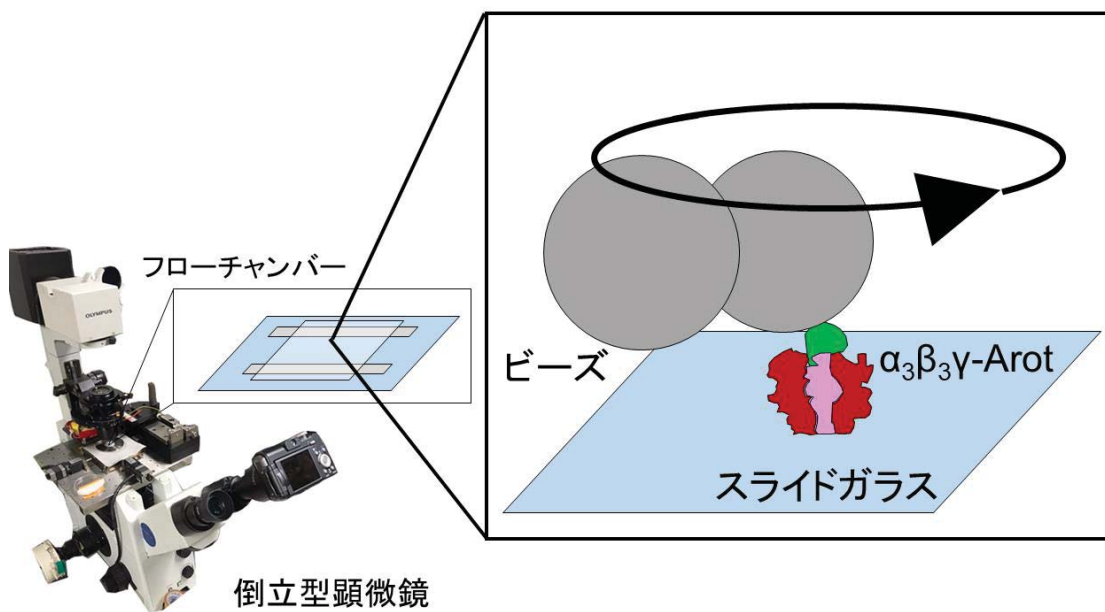


図 3-9 一分子回転観察実験の概略図

$\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot をフローチャンバーに流し込み、その後ビーズを流すことで γ サブユニットにビーズを結合させ、ビーズの回転を観察した。

表 3-6 Buffer の組成

BufferM	Assay Buffer 3
20 mM KPi (pH8.0)	50 mM HEPES-KOH (pH8.0)
100 mM KCl	100 mM KCl
0.5%(w/v) BSA	2 mM PEP
	100 μ g/mL PK
	500 μ M MgCl ₂
	250 nM ATP

3-4-6 ϵ サブユニットの添加実験

ϵ_{WT} 、 ϵ_N または $\epsilon_{CC_SS_ox}$ による $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arotの回転への影響を評価するため、以下のような実験を行った。250 nM ATPを含むAssay Buffer 3で回転観察を始めて、300秒後に3 μ Mの ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_ox}$ を含むAssay Buffer 3を添加して300秒間観察した。はじめの250 nM ATPを含むAssay Buffer 3で見られる γ サブユニットの回転の3ステップの一つを0°と定義し、 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_ox}$ を添加した後に γ サブユニットが停止した位置を計算した(図3-10)。

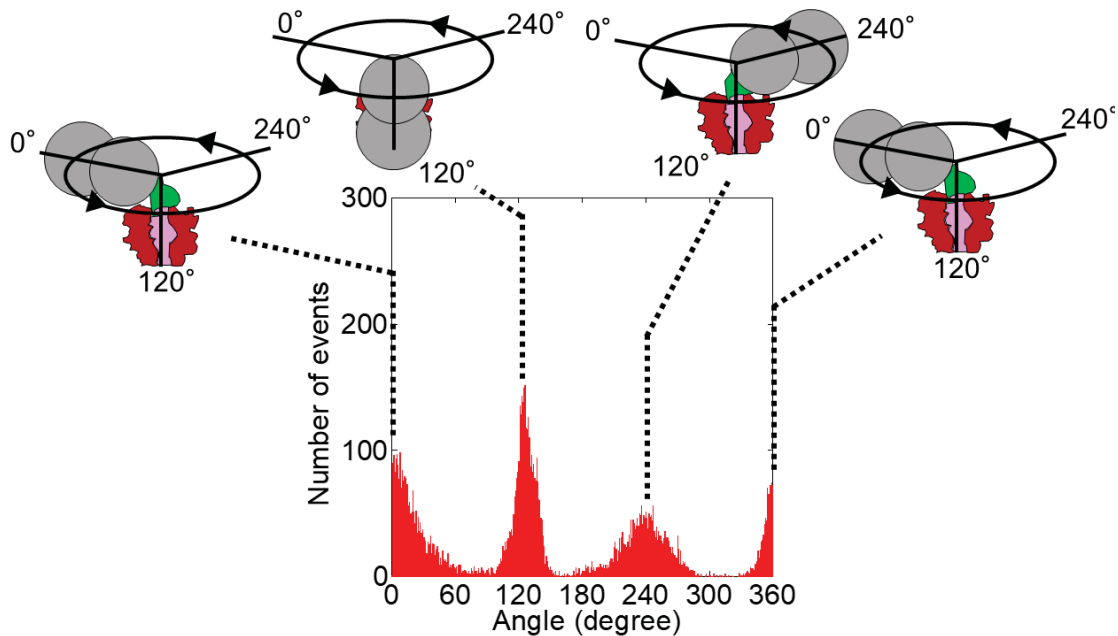


図 3-10 ビーズの位置と角度の定義

低濃度の ATP 条件下では、ATP の結合が律速となるため、ATP の触媒部位の数だけステップが観察される。それゆえ、3つの120°のス

テップがある。そして、そのうちの一つの角度を 0° と定義することで、その後の停止する角度を決定することができる。

磁気ピンセットを用いた強制回転実験は、以下のように行った。 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_OX}$ を添加してしない条件では、停止した $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の γ サブユニットを強制的に反時計回りに 80° 回転させ 5 秒間その角度で維持し、その後の挙動を観察した。 ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_OX}$ を添加する条件では、回転観察をはじめて 30 秒後に ϵ_{WT} または $\epsilon_{CC_SS_OX}$ を添加し、停止した $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Arot の γ サブユニットを強制的に反時計回りに 80° 回転させ 5 秒間その角度で維持し、その後の挙動を観察した。

第4章

大腸菌反転膜小胞を用いた ϵ サブユニット
C 末端側ドメイン変異体の生化学的特性
の解析

4-1 本章の概要

本章は、生化学的解析や大腸菌における相補性実験を通して、シアノバクテリア ATP 合成酵素全複合体の ϵ サブユニット変異体や γ サブユニット変異体を解析した。その結果、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットや γ サブユニットによる活性調節機構の全貌が明らかになった。

第5章

T. elongatus BP-1 ϵ_N 変異株の生理学的解析

5-1 要旨

本章では、*T. elongatus* の ϵ サブユニット変異株を作製し、野生株と比較する生理学的解析を行った。また、先行研究で明らかになっている *Synechocystis* の ϵ サブユニット変異株の表現型と比較した。その結果、シアノバクテリア ATP 合成酵素の活性調節機構が、より詳細に明らかになった。

第6章

総括と展望

6-1 総括

本章では、シアノバクテリアが環境応答に応じて生育するうえで、どういった点において、これまでに明らかになったシアノバクテリア ATP 合成酵素の ϵ サブユニットの活性調節機構並びに γ サブユニットの活性調節機構が有利なのかを考察している。また、そういった考察から、今後の研究課題を挙げている。

参考文献

- Akanuma, G. et al (2019) C-terminal regulatory domain of the ϵ subunit of F_0F_1 ATP synthase enhances the ATP-dependent H^+ pumping that is involved in the maintenance of cellular membrane potential in *Bacillus subtilis* *Microbiologyopen*. e815
- Akiyama, K. et al (2019) The β -hairpin region of the cyanobacterial F_1 -ATPase γ -subunit plays a regulatory role in the enzyme activity *Biochem. J.* **476** 1771-1780
- Blankenship, R., E. and Hartman, H. (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends in biochemical sciences* **23** 94-97
- Broser M. et al (2010) Crystal structure of monomeric photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3.6-Å resolution *J. Biol. Chem.* **285** 26255-26262
- Cabezón, E. et al (2000) Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitor protein, IF_1 *J. Biol. Chem.* **275** 28353-28355
- Campbell, D. and Oquist, G. (1996) Predicting Light Acclimation in Cyanobacteria from Nonphotochemical Quenching of Photosystem II Fluorescence, Which Reflects State Transitions in These Organisms. *Plant Physiol.* **111** 1357-1366
- Checchetto, V. et al (2012) Thylakoid potassium channel is required for efficient photosynthesis in cyanobacteria *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109** 11043-11048
- Cingolani, G. and Duncan, T. M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F_1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** 701-707
- Cipriano, D. J. and Dunn, S. D. (2006) The role of the ϵ subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase: The C-terminal domain is required for efficient energy coupling *J. Biol. Chem.* **281** 501-507
- Depaoli, M. R. et al (2018) Real-Time Imaging of Mitochondrial ATP Dynamics Reveals the Metabolic Setting of Single Cells *Cell Rep.* **25** 501-512.e3
- Dunham, K. R. and Selman, B. R. (1981) Regulation of spinach chloroplast coupling factor 1 ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **256** 212-218
- Evron, Y. and McCarty, R. E. (2000) Simultaneous measurement of ΔpH and electron transport in chloroplast thylakoids by 9-aminoacridine fluorescence *Plant Physiol.* **124** 407-414
- Ferguson, S. A. et al (2016) Regulation of the thermoalkaliphilic F_1 -ATPase from *Caldalkalibacillus thermarum* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113** 10860-10865

- Fristedt, R. et al (2015) The Thylakoid Membrane Protein CGL160 Supports CF₁CF₀ ATP Synthase Accumulation in *Arabidopsis thaliana* *PLoS One* 10(4): e0121658
- Green B. R. (2019) What Happened to the Phycobilisome? *Biomolecules* **9** 748
- Guo, H. et al (2019) Structure of a bacterial ATP synthase *eLife* **8** e43128
- Hahn, A. et al (2018) Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase *Science* **360** eaat4318
- Hara, K. Y. et al (2001) The Role of the DELSEED Motif of F₁-ATPase: Propagation of the inhibitory effect of the ϵ subunit *J. Biol. Chem.* **276** 23969-23973
- Hebbelmann, I. et al (2012) Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase *J. Exp. Bot.* **63** 1445–1459
- Strotmann, H. and Bickel-Sandkoetter, S. (1977) Energy-dependent exchange of adenine nucleotides on chloroplast coupling factor (CF₁) *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **32** 803-809
- Hirono-Hara, Y. et al (2005) Activation of pausing F₁ motor by external force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** 4288–4293
- Hisabori, T. et al (2013) The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxid. Redox Signal.* **19** 1846-1854
- Iino, R. et al (2005) Real-time monitoring of conformational dynamics of the ϵ Subunit in F₁-ATPase *J. Biol. Chem.* **48** 40130-40134
- Iino, R. et al (2009) Mechanism of inhibition by C-terminal α -helices of the ϵ subunit of *Escherichia coli* F₀F₁-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **284** 17457–17464
- Imashimizu, M. et al (2011) Regulation of F₀F₁-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by γ and ϵ subunits is significant for light/dark adaptation *J. Biol. Chem.* **286** 26595–26602
- Itoh S., Iwaki M., Ikegami I. (2001) Modification of photosystem I reaction center by the extraction and exchange of chlorophylls and quinones *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1507** 115-138
- Iwai, M. et al (2004) Improved Genetic Transformation of the Thermophilic Cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 *Plant Cell Phys.* **45** 171-175
- Jault, J. M. et al (1996) The $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of the F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 with the β T165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover *J. Biol. Chem.* **271** 28818-28824

- Johnson, E. A. and McCarty, R. E. (2002) The carboxyl terminus of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry* **41** 2446–2451
- Johnson, E. A. and McCarty, R. E. (2002) The carboxyl terminus of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry* **41** 2446–2451
- Junesch, U. and Gräber, P. (1987) Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **893** 275-288
- Junge, W. and Nelson, N. (2015) ATP synthase *Annu. Rev. Biochem.* **84** 631–57
- Kato, Y. et al (1997) Thermophilic F₁-ATPase Is Activated without Dissociation of an Endogenous Inhibitor, ε Subunit *J. Biol. Chem.* **272** 24906-24912
- Kato-Yamada, Y. (2005) Isolated ε subunit of Bacillus subtilis F₁-ATPase binds ATP *FEBS lett.* **30** 6875-6878
- Keis, S. et al (2006) Inhibition of ATP hydrolysis by thermoalkaliphilic F₁FO-ATP synthase is controlled by the C terminus of the ε subunit *J. Bacteriol.* **188** 3796–3804
- Kelly, S. et al (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751** 119–139
- Kim, Y. et al (2011) Redox regulation of rotation of the cyanobacterial F₁-ATPase containing thiol regulation switch *J. Biol. Chem.* **286** 9071-9078
- Komatsu-takaki, M. et al (1996) Energizing effects of illumination on the reactivities of lysine residues of the γ subunit of chloroplast ATP synthase *Eur. J. Biochem.* **236** 470-475
- Konno, H. et al (2006) The regulator of the F₁ motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F₁-ATPase by the ε subunit *EMBO J.* **25** 4596–4604
- Konno, H. et al (2011) Characterization of the relationship between ADP- and ε-induced inhibition in cyanobacterial F₁-ATPase *J. Biol. Chem.* **286** 13423–13429
- Konno, H. et al (2012) Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes *Plant Cell Phys.* **53** 626-634
- Kramer D. M. et al (1999) How acidic is the lumen? *Photosyn. Res.* **60** 151-163

- Kunz, H.-H. et al (2014) Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in Arabidopsis *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111** 7480-7485
- Kurusu, G. et al (2003) Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302** 1009-1014
- Laget, P. P. and Smith, J. B. (1979) Inhibitory properties of endogenous subunit ϵ in the Escherichia coli F₁ ATPase *Arch. Biochem. Biophys.* **197** 83-89
- Laughlin, T. G. et al (2019) Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis *Nature* **566** 411-414
- Lea-Smith, D. J. et al (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1857** 247-255
- Masaïke, T. et al (2006) Probing conformations of the ϵ subunit of F_oF₁-ATP synthase in catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342** 800–807
- Mukherjee, S., and Warshel, A. (2017) The F_oF₁ ATP synthase: from atomistic three-dimensional structure to the rotary-chemical function. *Photosynth. Res.* **134**, 1–15
- Mullineaux, C. W. (2014) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes *Biochim. Biophys. Acta* **1837** 503-511
- Murakami, S. et al (2018) Structure of the γ - ϵ complex of cyanobacterial F₁-ATPase reveals a suppression mechanism of the γ subunit on ATP hydrolysis in phototrophs *Biochem. J.* **85** 2253-2266
- Murray, H. D. et al (2003) Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant *Mol. Cell.* **12** 125-134
- Nelson, N. and Ben-Shem, A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5** 971-982
- Nichols, N. N. and Harwood, C. S. (1997) PcaK , a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*, PcaK , a High-Affinity Permease for the Aromatic Compounds 4-Hydroxybenzoate and Protocatechuate from *Pseudomonas putida* *J. Bacteriol.* **179** 5056-5061
- Nowak, K. F. et al (2002) The C-terminal domain of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase is not required for ATP synthesis. *Biochemistry* **41**, 15130–15134

- Schulenberg, B. and Capaldi, R. A. (1999) The ϵ Subunit of the F_1F_0 Complex of *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* **274** 28351–28355
- Schwarz, O. et al (1997) Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H^+ -ATPase *J. Biol. Chem.* **272** 16924-16927
- Shirakihara, Y. et al (2015) Structure of a thermophilic F_1 -ATPase inhibited by an ϵ -subunit: deeper insight into the ϵ -inhibition mechanism. *FEBS J.* **282** 2895–2913
- Sobti, M. et al (2019) Cryo-EM reveals distinct conformations of *E. coli* ATP synthase on exposure to ATP *eLife* **8** e43864
- Soga, N. et al (2017) Perfect chemomechanical coupling of F_0F_1 -ATP synthase *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114** 4960-4965
- Stanier, R. Y. et al (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev.* **35** 171-205
- Stoebe B., and Kowallik K. V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics *Trends Genet.* **15** 344-347
- Sugiyama, K. and Hisabori, T. (2003) Conformational change of the chloroplast ATP synthase on the enzyme activation process detected by the trypsin sensitivity of the γ subunit *Biochem Biophys Res Commun.* **301** 311-316
- Sunamura, E. et al (2010) Physiological impact of intrinsic ADP inhibition of cyanobacterial F_0F_1 conferred by the inherent sequence inserted into the γ subunit *Plant Cell Phys.* **51** 855-865
- Sunamura, E. et al (2012) A conformational change of the γ subunit indirectly regulates the activity of cyanobacterial F_1 -ATPase *J. Biol. Chem.* **287** 38695-38704
- Suzuki, T. et al (2003) F_0F_1 -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J. Biol. Chem.* **278**, 46840–46846
- Suzuki, T. et al (2007) The product of *uncI* gene in F_1F_0 -ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104** 20776-20871
- Takano, S. et al (2015) The initiation of nocturnal dormancy in *Synechococcus* as an active process *BMC Biol.* **13**:36
- Taniguchi, N. et al (2011) The regulatory C-terminal domain of subunit ϵ of F_0F_1 ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* **193** 2046-2052

- Uhlin, U. et al (1997) Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli* *Structure* **5** 1219-1230
- VASILYEVA, E. A. et al (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics. *Biochem. J.* **202** 9-14
- Viola, S. et al (2019) Probing the electric field across thylakoid membranes in cyanobacteria *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116** 21900–21906
- Voon, C. P. et al (2018) ATP compartmentation in plastids and cytosol of *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescent protein sensing *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115** E10778-E10787
- Yagi, H. et al (2007) Structures of the thermophilic F₁-ATPase ϵ subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁ *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104** 11233-11238
- Yagi, H. et al (2010) Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit F_oF₁-ATPase from photosynthetic organisms *Biochem. J.* **425** 85–94
- Yaginuma, H. et al (2014) Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging *Sci. Rep.* **4** 6522
- Yoshida, M. et al (2001) ATP synthase - A marvellous rotary engine of the cell *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** 669–677
- Yoshida, K. et al (2014) Distinct redox behaviors of chloroplast thiol enzymes and their relationships with photosynthetic electron transport in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Phys.* **55** 1415-1425

論文目録

第 2・3 章

Inabe, K., Kondo, K., Yoshida, K., Wakabayashi, K., Hisabori, T. (2019) The N-terminal region of the ϵ subunit from cyanobacterial ATP synthase alone can inhibit ATPase activity, *Journal of Biological Chemistry*, 294(26), 10094–10103

第 4・5 章

Inabe, K., Kondo, K., Yoshida, K., Wakabayashi, K., Suzuki, T., Hisabori, T. In preparation

謝辞

本研究を行うにあたり、熱心に指導してくださり、かつ有意義なディスカッションや的確な指摘をしてくださった久堀徹教授には深く感謝を申し上げます。久堀教授とは学部4年のATPase Work Shopからお世話になり、5年間根気強くご指導いただきました。本当にありがとうございました。

いつもセミナーでの重要な指摘をしてくださり、修士課程から一貫して研究者としての姿勢など、多岐に渡る多くのことを教えてくださった若林憲一准教授に感謝を申し上げます。様々な相談にも乗っていただき、同じモータータンパク質に興味を持つものとして、その深いバックグラウンドから重要な示唆をたくさんいただきました。ありがとうございました。

多くの研究のアドバイスをしていただいた鈴木俊治特任教授に感謝申し上げます。鈴木特任教授には、同じATP合成酵素の分野の研究者として多くの実験上のアドバイスをしていただきました。実験の技術から私が知らなかったような先行研究まで多くのことを教えていただき、感謝に堪えません。本当にありがとうございました。

研究生生活の上で、快適な研究生生活を送る環境を与えてくださった野亦次郎助教、吉田啓亮助教に感謝を申し上げます。野亦助教とは研究に関するディスカッションをさせていただき、自身の分野にこだわらず様々な分野について教えていただき、大変感謝しております。吉田助教とは、特に、いくつかの実験で解析をしていただき、研究者としての姿勢を学ばせていただいたこと、かつ私生活における相談から、食事をご一緒させていただいたことまで、非常に感謝しております。また、光合成分野における深い知識をもとに様々なアドバイスをいただきました。

研究員である近藤久益子博士に深く感謝申し上げます。近藤博士には実験の技術を数多く教えていただきました。また、私生活や進路のことなど様々な相談をさせていただき非常に感謝しております。

同じく研究員である見原翔子博士、同期である横地佑一君とは夜に様々なディスカッションをして非常に刺激をうけ、楽しかったです。

最後に、久堀・若林研究室のスタッフの方々、先輩・後輩、そしてなにより進学を快諾してくださった両親に深く感謝申し上げます。

2020年3月
稲辺 宏輔