

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	葉緑体ATP合成酵素の活性制御サブユニットの構造機能相関
Title(English)	
著者(和文)	秋山健太郎
Author(English)	Kentaro Akiyama
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12343号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀 徹,若林 憲一,田中 寛,瀧ノ上 正浩,村上 聡,増田 真二,山田 康之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12343号, Conferred date:2023/3/26, 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

(博士課程)
Doctoral Program

論文要約

THESIS OUTLINE

系・コース：	生命理工学	系
Department of, Graduate major in	ライフエンジニアリング	コース
学生氏名：	秋山 健太郎	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	久堀 徹	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：	若林 憲一	
Academic Supervisor(sub)		

ATP 合成酵素 (F_0F_1) は生体内のエネルギー代謝を司る分子である ATP を供給している全生物が有するタンパク質複合体で、軸を回転させながら触媒反応を行うモーターのような形をしたタンパク質である。興味深いことに、光合成生物が持つ葉緑体 ATP 合成酵素 (CF_0CF_1) は回転軸を構成する γ サブユニット ($CF_1\text{-}\gamma$) 上に非光合成生物には見られないアミノ酸配列がある。この特有の配列によって、 CF_0CF_1 は他の F_0F_1 にはない独自の「レドックス制御機構」を備えている。このレドックス制御により、 CF_0CF_1 は光合成条件によって変動する細胞内酸化還元状態に応じて活性を調節しており、結果的に細胞内 ATP の効率的な生産・維持を行っていると考えられている。しかし、レドックス制御を受ける Cys 残基ペアは触媒部位から遠い位置にあり、なぜその Cys 残基ペアの酸化還元状態が酵素活性を変化させることができるのか、その分子機構はこれまで明らかでなかった。本研究では、 CF_0CF_1 のレドックス制御機構を分子レベルで明らかにするために、遺伝子組換えが容易な単細胞緑藻のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を実験材料として、レドックス制御に関わる部位に変異を導入した酵素を作出・精製し、それらの生化学的解析を行った。

レドックス制御を担う CF_0CF_1 に特有の配列は主にレドックス感受性 Cys 残基ペアを有する Redox loop ドメインと、触媒サブユニットと相互作用可能な位置に配置されている β -hairpin ドメインで構成されている。 β -hairpin ドメイン内にはレドックス制御に重要な役割を果たすと報告されている、高度に保存された負電荷アミノ酸 (Asp-Asp-Glu : DDE) に富んだモチーフがある。本研究では、これらの残基・ドメイン・モチーフがレドックス制御機構にそれぞれ関与すると予想し、レドックス制御のスイッチを担う Cys 残基を Ser 残基に置換した変異体 (C198S、C204S、C198S/C204S)、DDE モチーフを構成する負電荷アミノ酸を全て中性アミノ酸 (Asn-Asn-Gln : NNQ) に置換した変異体 (DDE/NNQ)、Redox loop ドメインと β -hairpin ドメインのどちらか一方を削った変異体 (Δ Redox_loop と $\Delta\beta$ -hairpin)、または両方を削った変異体 (Δ Insertion) を作出した。まず、導入したそれぞれの変異が $CF_1\text{-}\gamma$ の細胞内レドックス状態の明暗応答

に及ぼす影響を調べた。その結果、 β -hairpin ドメインがレドックス応答の速度を支配する因子であり、特に β -hairpin ドメイン内の DDE モチーフの電荷が暗条件で誘導される酸化反応の速度を決定することが分かった。続いて、変異型 CF_0CF_1 を精製し、導入した変異と ATP 合成活性のレドックス制御の関係を調べた。その結果、① 既知のレドックス制御感受性 Cys 残基ペア以外に ATP 合成活性に影響するアミノ酸残基が存在する可能性があること、② DDE モチーフ上の負電荷はレドックス制御に必須ではないこと、③ β -hairpin ドメインは ATP 合成を不活性化するストッパーとして機能し、Redox loop ドメインが酸化還元状態に応じて、その不活性化を解除することを見出した。

以上の生化学的解析結果に基づいて、本論文では「 CF_0CF_1 のレドックス制御は、 $CF_1\gamma$ 上にある光合成生物に特有の β -hairpin ドメインと Redox loop ドメインが酸化還元状態に応じて協調的に作用することで成立する」という新たな活性制御モデルを提案する。

F_0F_1 -ATP synthase is a ubiquitous enzyme in cells of all organisms. The enzyme produces ATP by rotating its central shaft using the proton electrochemical potential formed across the bio-membrane. Interestingly, chloroplast ATP synthase (CF_0CF_1) is equipped with a redox regulation mechanism on a specific insertion region of the γ subunit ($CF_1\gamma$), which is the major part of the central shaft. The insertion region consists of the redox loop domain and the β -hairpin domain. The highly conserved Cys residue pair on the redox loop domain plays a switching role for redox regulation, although the pair is far from the catalytic site. Under reducing (photosynthetic) conditions, these Cys residues become a reduced form, and CF_0CF_1 is activated. In contrast, a disulfide bond is formed under oxidizing (dark) conditions, and CF_0CF_1 is inactivated. Thus, the redox-sensitive Cys pair controls CF_0CF_1 activity in response to intracellular redox conditions that fluctuate with changing light intensity. The β -hairpin domain is positioned along the central shaft of the $CF_1\gamma$, and the top of the domain appears to interact with the catalytic β subunit. Many studies have been conducted over the decades to elucidate the catalytic reaction and its regulatory mechanism. However, the underlying molecular mechanism of redox regulation of the ATP synthesis reaction in CF_0CF_1 has not been fully clarified.

In this dissertation, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was employed for the study. Seven $CF_1\gamma$ mutants related to redox regulation were generated; C198S, C204S, C198S/C204S, DDE/NNQ, Δ Redox_loop, $\Delta\beta$ -hairpin, and Δ Insertion mutants. First, I examined the change in the redox states of the $CF_1\gamma$ mutants in vivo caused by the light/dark transition. As a result, I found that the β -hairpin domain is an important determinant for the kinetics of the redox response, and particularly, the charge of the DDE motif determines the oxidation efficiency. Next, I measured the ATP synthesis activity of purified $CF_1\gamma$ mutants. The results provided insights into redox regulation:

- 1) There might be redox-sensitive amino acid residues besides the regulatory Cys pair.
- 2) The negative charge of the DDE motif, which had been predicted to be important for redox regulation, is not essential for the regulation.
- 3) The β -hairpin domain functions as an ATP synthesis inhibitor, and the redox loop domain releases the inactivation depending on the redox state of CF_0CF_1 .

Based on the biochemical analyses described above, I propose a feasible model of redox regulation of the ATP synthesis reaction by the cooperative function of the β -hairpin and the redox loop domains specific to CF_0CF_1 .