

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命工学 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	秋山 健太郎		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	久堀 徹	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	若林 憲一	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

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  $\gamma$  サブユニット ( $CF_1-\gamma$ ) 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、それらの生化学および構造生物学的解析を行った。

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  $\beta$ -hairpin ドメインで構成されている。 $\beta$ -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  $\beta$ -hairpin ドメインのどちらか一方を削った変異体 ( $\Delta$ Redox\_loop と  $\Delta\beta$ -hairpin)、または両方を削った変異体 ( $\Delta$ Insertion) を作出した。まず、導入したそれぞれの変異が  $CF_1-\gamma$  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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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、導入した変異とレドックス制御の関係を ATP 合成 / 加水分解活性の測定によって調べた。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 モチーフの負電荷はレドックス制御

に必須ではないこと、③  $\beta$ -hairpin ドメインは ATP 合成 / 加水分解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 ATP 合成方向のみの不活性化を解除することを見出した。さらに、レドックス制御機構を構造レベルで解明するために、酸化型（不活性型） $CF_0CF_1$  と、還元型（活性型）を模倣した酸化型にならない変異（C198S/C204S）を導入した  $CF_0CF_1$  について、低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行った。その結果、Cys 残基ペアの酸化還元状態によって Redox loop ドメインの柔軟性は変化するが、安定な回転停止位置での構造はほぼ同じであることが分かった。これは、レドックス制御による活性調節は安定な回転停止位置では起こらない、言い換えると回転する瞬間にレドックス制御が機能していることを示唆している。

以上の生化学および構造生物学的解析に基づいて、本論文では「 $CF_0CF_1$  のレドックス制御は、 $CF_1$ - $\gamma$  上の  $\beta$ -hairpin ドメインと Redox loop ドメインが酸化還元状態に応じて、軸が回転する瞬間に協調的に触媒サブユニットと相互作用し、ATP 合成方向のみの活性を調節する」というラチェット機構に基づいた新たな活性制御モデルを提案する。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

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	申請学位 (専攻分野) : 博士 (理学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名 : 秋山 健太郎 Student's Name	指導教員 (主) : 久堀 徹 Academic Supervisor(main)
	指導教員 (副) : 若林 憲一 Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

$F_0F_1$ -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  $\gamma$  subunit ( $CF_1\text{-}\gamma$ ), which is the major part of the central shaft. The insertion region consists of the redox loop domain and the  $\beta$ -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  $\beta$ -hairpin domain is positioned along the central shaft of the  $CF_1\text{-}\gamma$ , and the top of the domain appears to interact with the catalytic  $\beta$  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  $CF_1\text{-}\gamma$  mutants related to redox regulation were generated; C198S, C204S, C198S/C204S, DDE/NNQ,  $\Delta$ Redox\_loop,  $\Delta\beta$ -hairpin, and  $\Delta$ Insertion mutants. First, I examined the change in the redox states of the  $CF_1\text{-}\gamma$  mutants in vivo caused by the light/dark transition. As a result, I found that the  $\beta$ -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/hydrolysis activity of purified  $CF_1\text{-}\gamma$  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  $\beta$ -hairpin domain functions as an ATP synthesis/hydrolysis inhibitor, and the redox loop domain releases inactivation of the ATP synthesis only depending on the redox state of  $CF_0CF_1$ .
- Finally, the protein structures of oxidized (inactive)  $CF_0CF_1$  and C198S/C204S mutant mimicking reduced (active)  $CF_0CF_1$  were determined by Cryo-EM single particle analysis. As a result, I found that the flexibility of the redox loop domain depends on the redox state, although the entire structures at the steady rotational stop degree are almost the same. These results suggest that the redox regulation mechanism does not occur at the steady rotational stop degree; in other words, it works at the moment of rotation.

Based on the biochemical and structural analyses described above, I propose a feasible redox regulation model based on a ratchet mechanism in which the  $\beta$ -hairpin domain and the reduced redox loop domain work as a pawl and adjust spring, respectively.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).