●日本膜学会第 21 年会特別講演

ATP 合成酵素と生体膜

香川 靖雄

女子栄養大学 ☎ 350-0288 埼玉県坂戸市千代田 3-9-21

ATP Synthase and Biomembranes

Yasuo Kagawa

Women's University of Nutrition,
3-9-21 Chiyoda, Sakado, Saitama 350-0288, Japan

ATP synthase is the central enzyme for energy supply of cells. It is composed of a membrane portion (F_o) and a catalytic portion (F_1). F_1 is composed of 5 kinds of subunits ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$), in which each $\alpha_1\beta_1$ protomer has ATP-binding site. The $\alpha_3\beta_3$ oligomer structure is needed for cooperativity of rapid ATP synthesis. Both the protomer and oligomer were reconstituted only in the case of thermophilic F_1 (TF_1). The basic structure of F_o is ab_2c_{12} . X-ray crystallography and nanomechanics of F_1 demonstrated the intramolecular rotation of c - γ axis, which is driven by the electrochemical potential difference of protons ($\Delta\mu H^+$) across the membrane. Recent biological studies using mtDNA-less cell (ρ^0 cell) by membrane fusion, and human genetics are also described. The uncoupling proteins dissipate $\Delta\mu H^+$ to protect mitochondrial membrane.

Key words : ATP 合成酵素 / 分子内回転 / 生体エネルギー / 脱共役蛋白質 / 膜電位

1. はじめに

生体膜には ATP と物質輸送の間のエネルギー変換をする ATPase が多数存在する。その基本構造は細胞質側に ATP を分解する触媒部があり、膜を貫く α ヘリックスの束で囲まれる親水性の孔すなわち輸送体部分を持つ。その蛋白質一次構造には ATP 結合部位である P-ループ (-GXXGXGKT/S-) を始めとする共通配列があるために、遺伝子のファミリーとして分類されている。生体膜 ATPase には F 型、V 型、P 型の 3 種の ATPase 群と ABC 輸送体群の計 4 群

がある。その中で F 型の代表が ATP 合成酵素 (F_oF_1) である。これはミトコンドリア内膜、葉緑体シラコイド膜、細菌形質膜にある。 F_oF_1 は生物のエネルギー源である ATP の大部分を合成している核心的酵素である¹⁻³⁾。

2. 膜の電気化学ポテンシャル差が ATP 合成の駆動力

これらの ATP 合成性の生体膜には電子伝達系があり、その酸化還元エネルギーで膜内外の水素イオンの電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu H^+$) を

Fig. 1 Method of measuring ATP-driven H^+ currents through ATP synthase (F_oF_1) reconstituted in phospholipid bilayers.

A. Indirect measurement of H^+ translocation across the liposome membrane using a pH meter. B. Direct measurement of H^+ current across the planar phospholipid bilayer using an electrode on both sides of the membrane.

作る。 $\Delta\mu H^+$ で駆動される水素イオン (または Na イオン) がこの酵素の触媒部 F_1 の中心軸の γ サブユニットを回転させて高次構造を変化させ ATP を合成する。1997 年のノーベル賞はこの分子内回転の解明に授与され、回転を実測した日本の貢献⁴⁾ も公表された。特にこのような膜酵素の全体像を把握するには、生物物理学的なアプローチが重要である¹⁻⁵⁾。既に蛍光法を用いて分子内回転を推定した論文が出され⁶⁾、回転のトルクも正確に筆者らが予測していた⁷⁾。今までの研究の主流であった遺伝子構造、部位特異的変異による膨大な研究^{8, 9)} が 1997 年に至っても分子内回転を予言出来なかった事は科学的にも興味深い。 F_oF_1 をリボソームに再構成して H^+ 輸送を実証し (Fig. 1A)¹⁰⁾、更に平面膜に $\Delta\mu H^+$ を埋め込んで $\Delta\mu H^+$ と H^+ 電流を実測した (Fig.

Abbreviations

F_oF_1	: ATP synthase.
DELSEED	: -Asp-Glu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp- sequence in the N-terminal region of the β subunit of F_1 .
P-loop	: -Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Thr- sequence of both the α and β subunit of F_1 .
$\Delta\mu H^+$	: electrochemical potential difference of protons across the membrane.

1B)¹¹⁾。最近では $\Delta\mu H^+$ を減弱して、体温維持やミトコンドリア膜保護を行う脱共役蛋白質 1-3 (UCP 1-3) の役割が大きな発展を遂げている。また哺乳類 ATP 合成酵素は原核細胞で確立された基本構造の上に複雑な制御サブユニットがある。また哺乳類 F_oF_1 の γ サブユニットには臓器特異性がある。またミトコンドリア DNA を欠く ρ^0 細胞による細胞工学には形質膜、ミトコンドリア膜などの膜融合の果たした役割が大きい。

3. ATP 合成酵素のサブユニット構造の再構成

ATP 合成酵素 (F_oF_1) は F_1 と F_o とからなる (Fig. 1)。 F_1 は触媒部で $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の 5 種のサブユニットからなり、 F_o は H^+ 透過部で ab_2c_{12} の基本サブユニットがある^{2, 3, 7)}。 F_oF_1 の構成は最小触媒部位を $\alpha\beta$ 界面に持つ $\alpha_1\beta_1$ プロトマーと、共同性を示す $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーが基本である^{3, 7)}。 $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーの中心の孔に γ がある。1つの β の阻害によるオリゴマーの阻害 (single-hit inactivation) は回転の阻害の根拠とされて来たが、回転軸のない $\alpha_3\beta_3$ が阻害される^{3, 7)}。小サブユニットの δ は $\alpha\beta\gamma$ 複合体を F_o に結合する。これらは好熱菌の F_oF_1 (TF_oF_1) のみで単離あるいは実験できる。他の酵素と異なる特徴は、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の γ が回転軸である点で、この回転を阻害すると活性が失われる。重要な機能

Fig. 2 Reconstitution of protomeric ATPase into rotational ATPase and ATP synthase (F_0F_1). F_1 : catalytic portion of ATP synthase. F_0 : proton-driven biomotor in the biomembrane. α : Normal noncatalytic subunit; β : catalytic subunit; $\alpha_1\beta_1$: protomer with ATPase activity. $\alpha_3\beta_3$: oligomer with cooperative ATPase. $\alpha_3\beta_3\gamma$: rotational ATPase; γ : rotational axis; δ : a stator to fix $\alpha_3\beta_3$ to the immobile portion of F_0 (a and b). ε : subunit connected to γ . F_0c : proton driven portion of F_0 ; $F_0c-\gamma\varepsilon$: rotor of the biomotor. The reconstitution is possible only in thermophilic F_1 .

の直接測定は γ の回転も電流測定も TF_0F_1 のみ可能である。この安定な TF_0F_1 の遺伝子も決定されている³⁾。

最も正確で詳細な高次構造は X 線結晶学によるが、旧来の比較的低分子量の蛋白と異なり、この酵素はシンクロトン放射光を用いて始めて解析できたのである^{1, 12)}。 F_1 は結晶解析が行われた最大の蛋白質で、分子量が 371,056、解析対象 3,444 アミノ酸残基もある。白木原、Walker、吉田、それに筆者らが共著で TF_1 オリゴマー結晶等を解析した¹²⁾。安定な好熱菌酵素でなければ基質の無い状態で $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーは得られないからである。その高次構造と全残基の全原子の位置によって ATP 合成反応の重要な段階が決定された¹²⁾。筆者は TF_1 を用い Fig. 1, 2 の再構成や結晶化を進め、 β の DELSEED 配列が高次構造の変化で ATP を遊離させると推定した³⁾。

4. 回転説は好熱菌 F_1 の γ の回転で実証された

F_1 の正の触媒共同性は速やかに大量の ATP を合成する意義がある。ATP は F_1 の上で外部エネルギーなしに結合状態で合成される。これは ATP 関連酵素上の熱力学的平衡現象である¹¹⁾。この結合型 ATP を離す段階のエネルギー論が課題であった。Boyer は F_0F_1 の共同性と反応論の

詳細な研究から、回転説を提出した²⁾。 $\alpha_3\beta_3$ の 3 個の β は、基質に対する親和性の低い O 型、基質と弱く結合する L 型、基質と固く結合する T 型と変化する。ATP が T 型に結合した F_1 に ADP と P_i (無機リン酸) が L 型に結合する。 $\Delta\mu H^+$ のエネルギーで γ が回転して接触する β の高次構造を $T \rightarrow O$, $L \rightarrow T$, $O \rightarrow L$ へと変換させる。T 型に固く結合されていた ATP が O 型から放出される^{2, 3)}。また T 型に移った $ADP+P_i$ は外部エネルギーなしに ATP と平衡状態になる。回転そのものの予測は 1960 年代には、イオンで駆動される糖等の担体ではむしろ常識であったが、膜を横切って大きな蛋白質が回転する事は構造上からも無理があり、現在では担体回転説は否定された。ところが鞭毛モーターが $\Delta\mu H^+$ により回転することが確立された¹³⁾。そこで、Fig. 1B の装置に ATP を加え $\Delta\mu H^+$ に相当する膜電位を逆方向に加えて H^+ 電流が 180 mV で停止する事を見出した¹¹⁾。この値から F_0F_1 の回転のトルクが 42 pN·nm と算出されたのである⁷⁾。そして、遂に筆者がクローン化した好熱菌 $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いて、 γ に結合した蛍光アクチン (長さ 1~3 μm) の回転を直視下で実測することに吉田、木下研究室の共同チームが成功した^{4, 14)} (Fig. 3A)。 $\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ 複合体の β はポリヒスチジンでガラス板に固定してある。回転のトルク N は予想値⁷⁾であった。 γ の回転の方向は F_0 側を上にし

Fig. 3 The stepwise rotation of the γ or $\gamma\epsilon$ subunit in the $\alpha_3\beta_3$ oligomer at sub-micromolar ATP.

A. The system used for observation of the rotation of γ in the $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of TF_1 . B. The record of stepwise rotation at low ATP concentrations (20 nM).

Inset shows the trace of the centroid of the actin image¹⁵⁾. τ_{ATP} : time required for ATP binding. τ_{120} : time required for 120 degree rotation.

た ATP 分解反応で反時計方向で、しかも ATP 濃度を低くすると 120 度毎に停止する (Fig. 3B)¹⁵⁾。

5. β サブユニットの DELSEED 配列の高次構造変化と ATP 放出

X 線結晶学の結果は高次構造の実体を明確に示した。その活性中心である β サブユニットの高次構造は Fig. 4 に示すように筒状のバレル領域、ヌクレオチド結合領域、 α ヘリックス束領域の 3 領域に分かれる。そして、ATP や ADP を結合している構造 A (β_{ATP} , β_{ADP}) と、結合して

いない構造 B (β_E) に分かれる (Fig. 4)。ATP は Fig. 4 の○印中の P で印した P ループ上で外部エネルギーなしに ADP と無機リン酸から合成されて固く結合している。 γ の回転が β の A→B の変形を起こし、ATP を放出する過程は具体的には γ の RC 枝部分と DELSEED 周辺のドメインが軸から離れる歪みを生じ、ATP 結合部へ変形を伝える事である (Fig. 4A から B へ)。特に G 180, H179 の変形が閾値に達すれば β の P ループに結合した ATP が E188 から引き離されて放出されると推定される⁷⁾。この歪みに要する時間は Fig. 3 の τ_{120} に相当する弾力性による。アクチン糸の長さによる抵抗とで 120 度の回転速度 τ_{120} が遅くなることも実測された¹⁵⁾。

今後の課題は F_0 の回転部の構造、 $\alpha_3\beta_3$ を F_0 の a に結合する固定子(恐らく b- δ)、動的なエネルギー変換の実体である。そこで TF_0F_1 より更に安定な超好熱菌の ATP 合成酵素に対応する相同的な V-ATPase 遺伝子をクローン化した¹⁶⁾。超好熱は硫黄依存従属栄養古細菌 *Desulfurococcus* 属 SY 株を用いた。ATP 合成酵素の α と β サブユニットと相同なのは超好熱 B と A サブユニットで分子量が逆転している。A サブユニットに P-ループ構造など ATP 結合酵素の共通構造や DELSEED 様構造は両者に検出できた。F 型と V 型 ATPase は共通する触媒機構、F 型 ATPase の分子回転が確立されたが、P 型 ATPase には構造上回転が考えられない。

6. 人体、哺乳類の ATP 合成酵素

人体や哺乳類の F_0 には a, b, c の 3 種の基本サブユニットの他に d, e, f, g, F6, OSCP, A6L などのサブユニットがある¹⁷⁾。さらに Ca 依存、非依存の 2 種の ATPase Inhibitor が知られている¹⁷⁾。また哺乳類の γ サブユニットの構造には筋肉組織と他組織には C 末端に差がある¹⁸⁾。このような組織分化は多細胞生物固有の性質で、発生途上に選択的スプライシングを起こす機構が詳しく解析されている¹⁸⁾。これらのサブユニットの中には分子内回転の制御を通して ATP 合成

Fig. 4 Model of the partial structure of F_1 modified from X-ray crystallographic data.

A. Nucleotide binding forms (β_{ATP} and β_{ADP}) of the β subunit. B. Nucleotide releasing form (β_E) of the β subunit. N : Amino terminal. C : Carboxy terminal. P : ATP binding portion called P-loop. Coil : α -helix. Arrow plate : β -sheet. There are three domains separated by two dotted lines. G180 : glycine residue #180. H179 : histidine residue #179. DELSEED : -Asp-Glu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp- sequence in the N-terminal region of the β subunit of F_1 .

Fig. 5 Mitochondrial inner membrane and uncoupling proteins (UCP 1-3).

Protons translocated by electron transport system is coupled to ATP synthesis by the rotation of ATP synthase (F_0F_1). Protons accumulated on the cytosol side are released into the matrix side by UCP 1-3 transporting fatty acid (FA). The energy of proton release is converted into heat. To prevent the formation of active oxygen species by high $\Delta\mu H^+$, the non-specific pore is opened.

の制御を行うと推定されるものもある¹⁷⁾。また次項に述べるように膜の他の機能や $\Delta\mu H^+$ との調整を行う蛋白質もいくつか発見されている。

原核生物とは異なり哺乳類の F_0F_1 遺伝子の中で F_0 のサブユニット a と A6L はミトコンドリア

ア DNA (mtDNA) にあり、残りの F_0 と F_1 の全遺伝子は核の染色体内に分散している。また mtDNA には酸化的リン酸化に必要な電子伝達系の主要なサブユニットを合成する合計 13 種のサブユニットの遺伝子が含まれる。mtDNA の遺伝は非メンデル型の母系遺伝である。この遺伝子の解析には、まず mtDNA を除いた ρ^0 細胞を作製する必要がある。すでにヒトについての ρ^0 細胞は得られていたが、数多くの実験に必要なマウスの ρ^0 細胞も作製する事ができた¹⁹⁾。これらの ρ^0 細胞に、ミトコンドリアを含む細胞をサイトカラシンで脱核して得た細胞質体 (cytoplast) をポリエチレングリコールで膜融合させるとサイブリッド (cybrid) が得られる^{19, 20)}。特にこのサイブリッド法でミトコンドリアの電子伝達系と F_0F_1 の膜機能が、保存組織のミトコンドリアでも解析できるようになった²⁰⁾。

7. 新しい脱共役蛋白質の意義

ミトコンドリアの膜研究で大きな進歩は膜を制御する脱共役蛋白質の多様性の発見と、サイクロ

スポリン感受性の孔形成によるアポトーシス機構の解明である。もしも ATP の消費量が少なければ $\Delta\mu\text{H}^+$ が消費されず、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が高まり、それに抗して電子伝達系が H^+ を輸送できなくなる。そこで基質からの電子で還元されたフラビンや CoQ に分子状酸素が非特異的に反応して活性酸素ができて、細胞の DNA や蛋白質を破壊する²¹⁾。この場合、 H^+ を脂肪酸とともに透過させて $\Delta\mu\text{H}^+$ を減らす脱共役蛋白質 (uncoupling protein : UCP) がある (Fig. 5 左)^{21, 22)}。特に過去には UCP は熱発生装置の褐色脂肪組織のミトコンドリア内膜にのみあると考えられていた。しかし、褐色脂肪組織は人体にはほとんどなく、生理的意義は少ないと考えられている。最近、白色脂肪組織等に UCP2, 筋肉に UCP3 が発見されて、従来の UCP は UCP1 として区別されることになった。UCP は、エネルギーを熱として放出するので、肥満の抑制にも大きな意義がある²³⁾。UCP は単にエネルギー効率を下げるだけでなく筋肉などでは、ATP 合成速度を上昇させるのである^{5, 23)}。 $\Delta\mu\text{H}^+$ を減らす方法には、非特異的な膜孔を作る場合、非共役 (電子伝達を H^+ をしない電子受容体に渡す)、低共役 (電子伝達系の H^+ 輸送効率を下げる) 等の方法もある (Fig. 5)。非特異的な内膜の孔はサイクロスポリン感受性であり^{22, 23)}、活性酸素の急増に対する緊急な防御反応、またシトクロム c 放出を介するアポトーシスにも関与していると考えられている。ミトコンドリアの内膜と外膜の間にはシトクロム c の他、各種のカスパーゼ前駆体という蛋白質分解酵素前駆体が内蔵されていてアポトーシスを発動させる。

膜の機能と ATP 合成酵素の解明によって、現在は分子内回転の制御による新しい $\Delta\mu\text{H}^+$ 制御系を ρ^0 株細胞、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスなどを用いた実験で探求している。

文 献

1) Abrahams, J. P. et al., *Nature* **370**, 621-628

- (1994)
- 2) Boyer, P. D., *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749 (1997)
 - 3) Kagawa, Y. and Hamamoto, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 247-256 (1997)
 - 4) Noji, H. et al., *Nature* **386**, 299-302 (1997)
 - 5) Kagawa, Y.: *Advances in Biophysics* **36**, 1-25 (1999)
 - 6) Sabbert, D. and Junge, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2321-2317 (1997)
 - 7) Kagawa, Y. and Hamamoto, T., *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**:421-431 (1996)
 - 8) Futai, M. and Omote, H. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**:409-4414 (1996)
 - 9) Weber, J. and Senior, A. E., *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 223-246 (1997)
 - 10) Kagawa, Y. and Racker, E., *J. Biol. Chem.* **246**, 5477-5487 (1971)
 - 11) Kagawa, Y. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.* **671**, 366-376 (1992)
 - 12) Shirakihara, Y. et al. : *Structure* **5**, 825-836, 1997
 - 13) Berg, H. C. : *Biophys. J.* **68**, 163s-167s (1995)
 - 14) 吉田賢右ほか: 蛋白質・核酸・酵素 **42**, 1396-1402 (1997)
 - 15) Yasuda, R. et al. : *Cell* **93**, 1117-1124 (1998)
 - 16) Shibui, H. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 341-345 (1997)
 - 17) Kagawa, Y. et al. : *Bioscience Report* **17**, 115-146 (1997)
 - 18) Ichida, et al. : *J. Biol. Chem.* **273**, 8492-8501 (1998)
 - 19) Inoue, K. et al. : *J. Biol. Chem.* **272**, 15510-15515 (1997)
 - 20) Ito, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2099-2103 (1999)
 - 21) Skulachev, V. P., *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 100-124 (1998)
 - 22) Papa, S. and Skulachev, V. P., *Molec. Cell. Biochem.* **174**, 305-319 (1997)
 - 23) Cha, H. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 85-90 (1999)
- (受付 1999年5月6日 掲載決定 5月21日)