

膜エネルギー代謝研究室 Laboratory of Membrane Bioenergetics

教授 横山 謙 Prof. K. Yokoyama, Ph.D.

助教 岸川淳一 Assist. Prof. J.Kishikawa, Ph.D.

1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要であり、生命がエネルギーを使いやすい形に変え、それを使う仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP は、主にミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素により作られる。作られた ATP は、生物が運動することや、生体分子の合成、分解、輸送などに使われる。たとえば、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。V-ATPase のように、ATP を使って基質を運ぶタンパク質は輸送体と呼ばれ、その仕組みは、それぞれの輸送体の構造を明らかにすることでだいぶわかってきたが、不明な点も残っている。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。我々は、1 分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学により、V-ATPase および ATP 合成酵素 FoF1 の構造機能の解明に取り組んできた。一方で、生命がエネルギーを利用する過程は、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を決めることも報告されている。以上の背景のもと、生体エネルギー学の視点から老化・寿命・疾病の問題に取り組んでいる。

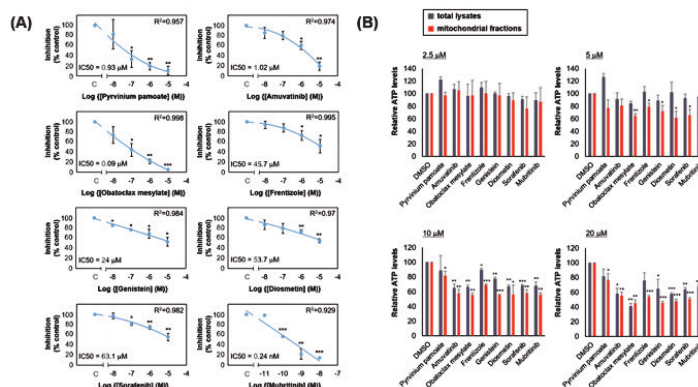
2. 本年度の研究成果

(1) V_o 部分の構造の決定

低温電子顕微鏡 (クライオ EM) による単粒子解析は、タンパク質の構造を決定する有力な方法の一つである。電子直接検出器の登場および解析手法の発展により、タンパク質分子を時には原子分解能で構造決定することが可能になった。今回、我々は、大阪大学にある自動撮影装置を備えた Titan Krios (FEI) により、V-ATPase の V_o 部分の構造を原子分解能で決定することができた。親水性である V_i 部分が脱離し、残された V_o 部分でのプロトンの漏洩がなんらかの機構で妨げられていることが予想されていた。今回の研究成果により、プロトンの漏洩阻害が、親水的な腕部分の大きな構造変化による回転阻害によって起こることが明らかになった。このような機械的な活性調節機構をタンパク質が備えているのは驚きであり、いかに精緻で精巧な仕組みでタンパク質が生命を支えているかを改めて認識できた。この成果は、2020 8月に eLife に発刊された。

(2) 麻酔作用と ATP 濃度変化の関係

ミトコンドリア呼吸鎖複合体は様々な生命活動に必要とされるアデノシン三リン酸 (ATP) を合成する重要な機能を担っているが、一方で薬理的、遺伝学的に呼吸鎖複合体の活性を下げると線虫の寿命が延びるという報告がある。そこで私達は、MASC アッセイという方法を用いて 2500 種類の既存薬の中からミトコンドリアの ATP 合成に対する阻害薬の探索を行い、それらが線虫の寿命に影響を与えるかどうか調べた。その結果、哺乳細胞において 2500 種類の既存薬の中から 8 個の ATP 合成阻害剤を見つけた (図 1A)。さらに、これら 8 個の薬剤が線虫でも ATP 量を減らすことを明らかにした (図 1B) この成果は、2020 の 8月に BBA に発刊された。



3. Research projects and annual reports

Energy is necessary to sustain life. Bioenergetics is an important scientific field, whose aim is how life changes energy into a form that is easy to use and how it is used. ATP, the energy currency of life, is synthesized by ATP synthase, which exists in mitochondria or in bacterial plasma membranes. The produced ATP is used in variety of biological processes, such as muscle contraction, the synthesis and degradation of biomolecules. For example, the vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles which are responsible for various physiological phenomena through its acidification. How molecular machines made up of tiny proteins converts the energy of ATP into transport and motion is a very interesting question and one that needs to be solved in the life sciences. To understand the mechanism of these molecular machines, we need to see its movement and shape. For this purpose, we have used single-molecule rotation observation and structural biology with cryo-electron microscopy. Our final goal is to clarify and describe how living organism transform and use energy to live.

On the other hand, the process by which life utilizes energy is likely related to aging and age-related diseases. Several enzymes involved in energy metabolism are reported to be involved in life-span altering genes, and the amount of energy intake itself determines lifespan. We have started to study the relationship between the intracellular concentration of ATP, the energy currency, and lifespan using molecular imaging techniques. The results revealed a close relationship between aging, anesthetic effects, and metabolic control and ATP levels in the individual. Thus, we are addressing the issues of aging, lifespan and disease from the perspective of bioenergetics.

This year's accomplishments

1) Structure of the Vo domain of V/A-ATPase

Single particle analysis using cryo-EM is one of the most powerful methods for protein structure determination. With the advent of direct electron detectors and the development of analytical techniques, we can easily determine the structure of protein molecules, sometimes with near atomic resolution. In this study, we have determined the structure of the Vo part of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI), which is equipped with an automated imaging system at Osaka University. The hydrophilic V₁ part of V-ATPase has been desorbed, and the leakage of protons from the remaining Vo part of V-ATPase was expected to be somehow prevented. The results of the present study reveal that the inhibition of proton leakage is caused by a large structural change in the hydrophilic arm, which inhibits rotation. These results will be published in the next year. CryoEM structure of V type ATP synthase.

2) Relationship between anesthetic action and ATP concentration change

The mitochondrial respiratory chain complex plays an important role in the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), which is required for various biological activities, but it has been reported that pharmacologically and genetically decreasing the activity of the mitochondrial respiratory chain complex prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Therefore, we used the MASC assay to search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2,500 existing drugs to determine whether they affect the lifespan of *C. elegans*. As a result, we found 8 inhibitors of ATP synthesis among 2500 existing drugs in mammalian cells (Figure 1A). Furthermore, we found that these eight drugs also reduced ATP levels in *C. elegans*.

4. 論文, 著書など

原著論文

なし

英文総説

1. Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken Cryo-EM studies of the rotary H⁺-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. (2019) Biophysics and Physicobiology 140-146

日本語解説記事

なし

5. 学会発表など

1. 古田綾、岸川淳一、中西温子、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V/A-ATPase のヌクレオチドフリー構造の解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
2. 岸川淳一、中西温子、古田綾、加藤貴之、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン Vo の構造解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
3. 三谷奈穂、中野敦樹、岸川淳一、横山謙 “キメラ軸を持つ V1-ATPase の 1 分子解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 ポスター発表
4. 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙 “Single-particle analysis of lipid nanodisc-reconstituted V-ATPase from *Thermus thermophilus*” 第57回日本生物物理学会 宮崎市 9/2019
5. 岸川淳一、加藤 貴之、古田 綾、中西 温子、光岡 薫、横山 謙 V型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン Vo の単粒子解析 Single particle analysis of membrane Vo domain of V type ATP synthase 蛋白質科学会年会 6/2019 神戸ポートアイランド

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究補助金 基盤研究 B

課題名：液胞型 ATPase の全体構造解明を突破口としたプロトン輸送機構の解明 研究代表者：横山 謙
取得年度 H29-31 (3年)

武田科学振興財団 特定研究助成

課題名：オルガネラと細胞間をつなぐ膜輸送を介した細胞恒常性維持機構の解明
共同研究者：横山 謙 取得年度 H30-34 (5年)

2) 学外活動

日本生物物理学会

日本生体エネルギー研究会 常任幹事

日本生化学会

日本分子生物学会

日本タンパク質科学会

3) アウトリーチ活動

なし

4) その他

1. 古田綾（修士2年生）さんが2019年12月開催の日本生体エネルギー研究会討論会で優秀発表賞を受賞
2. 科学研究補助金費審査委員として50件以上の申請書を査読
3. 論文査読2件（Science Advanced, Nature Communications）
4. 岸川淳一研究助教が大阪大学蛋白質研究所に助教として赴任した。