

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.

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たいわかってきたが、不明な点も残っている。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/A-ATPase のクライオ電顕を用いた構造解析

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。前年度、我々は、大阪大学にある自動撮影装置を備えた Titan Krios により、V/A-ATPase (V-ATPase, VoV1) の Vo 部分の構造を原子分解能で決定し、Vo 部分で見られる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を明らかにした。この成果は、2020 年 8 月に eLife に発刊された。

さらに、いまだ議論が別れている V1 部分での ATP 駆動による回転力発生機構を解明するために、反応条件を変えて凍結グリッドを作成し、ATP 結合待ち、ATP 加水分解待ち、ADP およびリン酸解離待ち、等の構造を決定し、触媒サイクルと構造変化の対応付けをすることで、ATP 加水分解反応と中心回転軸の回転、すなわち化学・力学エネルギー変換機構を明らかにすることを目的に構造解析を進めている。本年度では、ATP 飽和条件での原子分解能構造を決定し、3 つある触媒部位がすべて ATP と思われるヌクレオチドで占められていることを明らかにした。この結果は、3 つある触媒部位に結合しているヌクレオチド数が 2 ないし 3 で推移して機能していること (tri-site 仮説) を支持する結果である。

(2) 呼吸鎖複合体を阻害する化合物の探索

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) 合成に必要な駆動力を供給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。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、8 種類の ATP 合成阻害剤を見つけた。さらに、これらのいくつかは呼吸鎖複合体 I を阻害することを明らかにした。この成果は、2020 年の 8 月に BBA に発刊された。本年度は、阻害剤が精製された呼吸鎖複合体を阻害することを明らかにした。これらの阻害剤は、抗がん剤として使用されているものもあり、呼吸鎖複合体 I が抗がん剤の標的分子である可能性が示唆された。呼吸鎖複合体 I を標的としたドラッグデザインに資する構造情報を得るために、阻害剤が結合した複合体の構造解析をクライオ電顕を用いて進めている。

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) Structural analysis of V/A-ATPase using CryoEM

Single particle analysis by cryo-electron microscopy (cryo-EM) is one of the most powerful methods to determine the structure of proteins. With the advent of direct electron detectors and the development of analysis methods, it has become possible to determine the structure of protein molecules at atomic resolution. Last year, we determined the structure of the Vo domain of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI) equipped with an automated imaging system at Osaka University, and indicated that the inhibition of proton leakage observed in the Vo portion is owing to the rotational inhibition by a large conformational change in the hydrophilic arm of a subunit. This result was published in eLife in August 2020.

In addition, to elucidate the mechanism of ATP-driven rotation of V1, which is still controversial, we prepared a frozen grid with different reaction conditions. Last year's project, we determined the atomic resolution structure under ATP-saturated conditions and found that all three catalytic sites was occupied by nucleotides that appear to be ATP. This result supports the tri-site hypothesis, which states that the number of nucleotides bound to the three catalytic sites remains between two and three.

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 pharmacological and genetic studies have shown that reducing the activity of the respiratory chain complex extends the lifespan of *C. elegans*. We conducted a search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2500 existing drugs using a method called MASC assay, and found 8 ATP synthesis inhibitors. Furthermore, they found that some of them inhibit respiratory chain complex I. These results were published in BBA in August 2020.

In this year, we found that the inhibitors inhibit the purified respiratory chain complexes. Some of these inhibitors have been used as anticancer drugs, suggesting that respiratory chain complex I may be a target molecule for anticancer drugs. In order to obtain structural information for drug design targeting respiratory chain complex I, we are now analyzing the structure of the complex bound with inhibitors.

4. 論文, 著書など

原著論文

1. Mechanical inhibition of isolated V_o from V/A -ATPase for proton conductance. Kishikawa J, Nakanishi A, Furuta A, Tamakoshi M, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. (2020) *Elife* e5686
2. Identification of chemical compounds as an inhibitor of mitochondrial ATP synthesis, leading to an increased stress resistance and an extended lifespan in *C. elegans*. Ikeda T, Kishikawa J, Hayashida Y, Fujikawa M, Yokoyama K. (2020) *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2020 Nov 1;1861(11):148281.

英文総説

なし

日本語解説記事

なし

5. 学会発表など

1. 佐伯詩織、中西温子、横山謙 “結核菌 FoF_1 の発現・精製系の構築” 第 46 回日本生体エネルギー研究会 討論会 金沢市 12/2020 ポスター発表
2. 中野敦樹、佐伯詩織、中西温子、岸川淳一、横山謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の ATP 加水分解待ち構造の解析” 第 46 回日本生体エネルギー研究会 討論会 金沢市 12/2020 口頭発表

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究 B

課題名: クライオ電子顕微鏡による V 型 ATPase の回転機構の解明 研究代表者: 横山 謙

取得年度 R2-R4 (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-R4 (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

日本蛋白質科学会

3) アウトリーチ活動

なし

4) その他

1. 科学研究補助金費審査委員として 30 件以上の申請書を査読