

## H<sup>+</sup> 輸送性 ATP 合成酵素研究の薬学的新展開

前田 正知

### H<sup>+</sup>-transporting ATP Synthases: Insights into How Their Electrochemically Driven Motor Might Serve as a Drug Target

Masatomo MAEDA

Department of Molecular Biology, School of Pharmacy, Iwate Medical University,  
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Shiwa, Iwate 028-3694, Japan

(Received September 1, 2009)

ATP synthases, widely distributed in bacteria, eukaryotic mitochondria and chloroplasts, are highly conserved multi-subunit complexes. Although the conserved acidic residue in the transmembrane helix of the *c* subunit functions in proton transport, the surrounding residues differ among species. Such divergence could lead to different regulatory modes since pH-dependent proton transport has been demonstrated in *Escherichia coli* with a *c* subunit carrying an additional acidic residue in the helix. There is further divergence in the number of *c* subunits that form the ring structure in F<sub>0</sub>. Recently, it was also suggested that certain chemicals recognize the *a* and *c* subunits of pathogenic bacterial F<sub>0</sub>. Since there may be structural divergence even in well-conserved ATP synthases, the *c* subunit-ring as well as the *a* subunit in F<sub>0</sub> could be targets for drugs for specific bacterial species.

**Key words**—ATP synthase; F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>; proton transport; *c* subunit; *a* subunit; antibacterial drug

#### 1. はじめに

ATP 合成酵素 (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) は酸化的リン酸化や光リン酸化を触媒する酵素で、細菌から真核細胞まで広く分布している。<sup>1)</sup> ATP 合成酵素は細菌では細胞膜に、真核細胞ではミトコンドリア内膜や葉緑体チラコイド膜に存在している。細菌の酵素は、膜表在性の F<sub>1</sub> (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ δ ε) と膜内在性の F<sub>0</sub> (ab<sub>2</sub>c<sub>10~15</sub>) とからなる。F<sub>1</sub> には触媒部位が 3 ヲ所あり、F<sub>0</sub> はプロトン輸送路として機能している。F<sub>0</sub> を介するプロトン輸送は、触媒部位における ATP 合成及び ATP 分解に共役している。回転子 (γ, ε, c) と固定子 (α, β, δ, a, b) を構成して各サブユニットが機能する反応機構は、ATP 合成酵素の回転機構として現在よく知られている。<sup>2)</sup> 動物のミトコンドリアの F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> はもっと複雑なサブユニット組成をしており、F<sub>0</sub> と F<sub>1</sub> にはそれぞれ 10 種 (a, b, c, d, e, f, g, F<sub>6</sub>, A<sub>6</sub>L, OSCP) 及び 6 種 (α, β, γ, δ, ε, IF) のサブ

ユニットが存在する。<sup>3)</sup> Figure 1 に大腸菌 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の構造を模式的に示した。

F<sub>0</sub> の *c* サブユニットには 2 回の膜貫通ヘリックスがあり、ヘリックス同士をつなぐ中央部分は細胞質側を向いている。<sup>4)</sup> γ と ε サブユニットを結合した *c* サブユニットのリングが回転子として、他のサブユニットでできている固定子に対して回転することが示されている。<sup>5)</sup> *c* サブユニットリングの回転が、細胞膜の一方の側から他方の側へのプロトン輸送に必須と推定されているが、プロトン輸送の分子機構は ATP 合成・分解の触媒機構に比べると詳細は明らかではない。<sup>6)</sup> プロトン輸送に関与する残基として *c* サブユニットの Asp-61 と *a* サブユニットの Arg-210 が同定されている。<sup>7)</sup>

本論では、種々のバクテリアの *c* サブユニットに注目し、*c* サブユニットのリング及び *a* サブユニットを標的とする特異的な阻害薬開発の可能性を考察する。

#### 2. 種々細菌の *c* サブユニットの一次構造比較

現在、多くの細菌の ATP 合成酵素のサブユニット遺伝子の配列が決定され、それら配列情報が登録されている。<sup>8)</sup> Figure 2 に代表的な細菌の *c* サブユ

岩手医科大学薬学部分子生物薬学講座 (〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1)

e-mail: mmaeda@iwate-med.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S27 で発表したものを中心に記述したものである。



された酸性残基は、プロトン輸送に必須の残基である。大腸菌などでは Asp 残基であるが、ほかの多くの種では Glu 残基となっている。

Figure 2 から明らかなように、大腸菌 (Eco) やネズミチフス菌 (Stm), 赤痢菌 (Sfl) の *c* サブユニットには、TM1 及び TM2 の両膜貫通領域に Asp 残基以外の極性残基は存在せず、最も疎水的である。これに対して、他の細菌種の *c* サブユニットでは、膜貫通領域の TM1 や TM2 に親水性残基が散在する。例えばマイコプラズマ (Mpn) では、Glu 残基のほかに Ser 残基が 6 個も TM2 に存在する。このように親水的な TM2 がどのような機構で膜内に挿入されるのかは、検討すべき課題である。

さらに興味深いのは、保存された酸性残基以外にも TM1 や TM2 に酸性残基が存在することである。TM1 に酸性残基が余分に存在するのは、7 種のバクテリア (Lla, Spr, Smu, Mtu, Fnu, Tma 及び Mac) である。 *Chlorobium tepidum* (Cte) と *Thermotoga maritima* (Tma) には、2 個目の酸性残基が TM2 に存在する。これらの細菌の TM2 に存在する 2 個の酸性残基は、膜内に埋め込まれたヘリックス中で近傍に位置する可能性がある (Fig. 3)。TM1 や TM2 に存在する余分の酸性残基がプロトン輸送やプロトンによる制御に関与しているのかどうかを明らかにすることは、ATP 合成酵素の作動機構と調節を理解する上にも重要と考えられる。

### 3. $F_0$ を構成する *c* サブユニットのリング構造の多様性

*c* サブユニットは、複数個がリング状に並んで  $F_0$  を構成している。*c* サブユニットの一次構造の多様

性に加え (Fig. 2), リングを構成する *c* サブユニットモノマーの数にも多様性がある (Table 1)。ホウレン草の葉緑体では、1 つのリングに 14 個の *c* サブユニットが存在する。<sup>10)</sup> 一方、酵母のミトコンドリアでは 10 個,<sup>11)</sup> *Ilyobacter tartaricus*<sup>12-14)</sup> や *Propionigenium modestum*<sup>14)</sup> では 11 個、*Spirulina platensis* では 15 個<sup>15)</sup> の *c* サブユニットがリングあたり存在する。大腸菌 ATP 合成酵素の場合には、構造解析が済んでいないので分子生物学的検討結果だが、*c* サブユニットのリングは 10 個のサブユニットモノマーできていると推定されている。<sup>16)</sup> *I. tartaricus* や *P. modestum* のサブユニット数が  $Na^+$  を輸送することと関係しているのかどうかは、明らかでない。

$F_0F_1$  は ATP の加水分解エネルギーを利用して、膜内外にプロトンの濃度勾配を形成する。このため F 型プロトンポンプとも称される。構造的に類似する V 型プロトンポンプの場合も、同様のサブユニットがリング状に配置している。 *Enterococcus hirae* では、2 回のヘアピン構造をとる *c* サブユニットモノマーが 10 個集合してリングを形成している。<sup>17)</sup> しかし、カルボキシ末端側のヘアピンの膜貫通領域にのみプロトン輸送する保存された酸性残基が存在する。古細菌 *Methanopyrus kandleri* では、大腸菌の *c* サブユニットに対応する配列が 13 個連結している。<sup>18)</sup> すなわち、13 個のヘアピンが連結した 1 本のポリペプチド鎖がリングを形成しているらしく、そのヘアピン 1 つ 1 つに保存された酸性残基が存在している。このような *c* サブユニットリングの多様性は、ATP 合成酵素が共通の回転機構で作

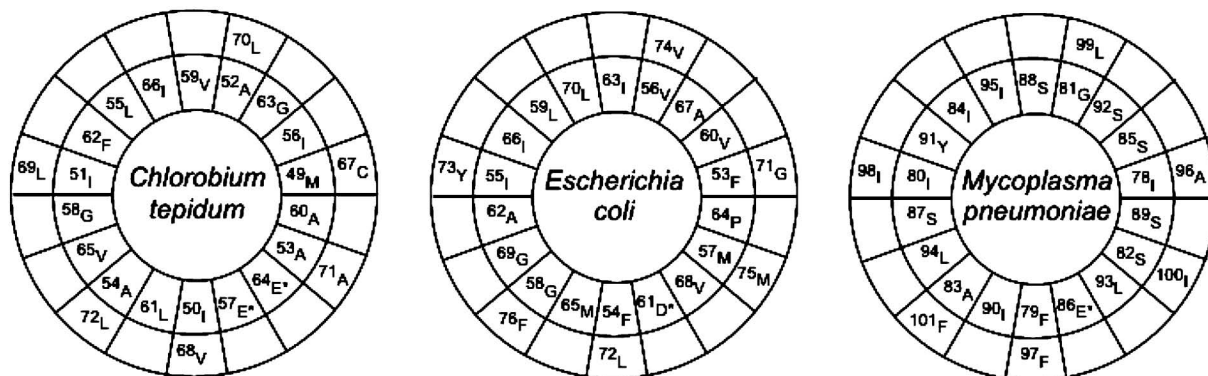


Fig. 3. Helical Wheels of the TM2 Transmembrane Helices of *c* Subunits

Transmembrane helices (TM2) of *c* subunits from *C. tepidum*, *E. coli* and *M. pneumoniae* (from left to right) are modeled by Edmundson wheel analysis.<sup>9)</sup>

Table 1. Number of *c* Subunit in the Ring

Species	Type	Transport Substrate	Number of <i>c</i> subunit	Number of hairpin in <i>c</i> subunit
<i>Escherichia coli</i>	F	H <sup>+</sup>	10?	1
Spinach chloroplast	F	H <sup>+</sup>	14	1
<i>Spirulina platensis</i>	F	H <sup>+</sup>	15	1
Yeast mitochondrion	F	H <sup>+</sup>	10	1
<i>Ilyobacter tartaricus</i>	F	Na <sup>+</sup>	11	1
<i>Propionigenium modestum</i>	F	Na <sup>+</sup>	11	1
<i>Enterococcus hirae</i>	V	Na <sup>+</sup>	10	2(1)
<i>Methanopyrus kandleri</i>	V	?	1	13(13)

The number in the parenthesis indicates that of the acidic residue in a *c* subunit.

Table 2. Proton Uptake by Inverted Membrane Vesicles Derived from *Escherichia coli* Cells Expressing the *c* Subunit with Substituted Acidic Residue(s)

	Substituted Residue			Growth on Succinate	ATP-driven H <sup>+</sup> -transport	References
	A24	I28	D61			
Wild	A	I	D	+	+	(22, 23)
Mutant	D		D	+	+↑	(22)
	D		N	+	+	(22)
	D		G	+	+	(21, 22)
	D		S	(+)	+	(22)
	D		C, A, P, V, L, Y, F, R	—	n.d.	(22)
	N		D	+	+	(22)
		D	D	(+)	+↑	(23)
		E	D	+	+↑	(23)
		D	G	—	—	(23)
		E	G	—	+↑	(23)
		G	—	—	(23)	

Results are cited from the references and summarized in the table.<sup>24)</sup> Inverted membrane vesicles were prepared from *E. coli* cells expressing a mutant *c* subunit with other wild-type F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> subunits. Such vesicles were used for the H<sup>+</sup>-uptake experiments. Vertical arrows indicate that ATP-driven H<sup>+</sup>-uptake that was increased at pH 7.0 compared with that at pH 8 (or pH 7.8), although the other mutants (+ without an arrow) showed similar uptake under the two pH conditions. The positive growth on succinate as a sole carbon source suggested that the mutant F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> has the ability of *in vivo* ATP synthesis.

動していても、進化の過程で多様な調節様式を獲得してきていることを示唆している。

#### 4. 膜貫通領域に存在する酸性残基の位置と数の効果

*c* サブユニットリングの回転に加え、<sup>19)</sup> *c* サブユニットモノマーと *a* サブユニットそれぞれの膜貫通ヘリックスが互いの軸を中心にして回転することが、<sup>7,20)</sup> プロトン輸送と回転子の回転につながると推定されている。しかし、実際の分子機構の解明には多くの検討が必要である。明らかなのは、*c* サブユニットの Asp-61 と *a* サブユニットの Arg-210 (大腸菌の残基番号) がプロトン輸送に決定的な役

割を担っていることである。

先に述べたように、7種の細菌 (Lla, Spr, Smu, Mtu, Fnu, Tma 及び Mac) では、*c* サブユニットの TM2 に加えて TM1 にも酸性残基が存在している (Fig. 2)。大腸菌を用いて、*c* サブユニットの2つの膜貫通領域 (TM1 及び TM2) にそれぞれ酸性残基が存在する F<sub>0</sub> では、プロトンがどのように輸送されるのかという点に注目した検討がなされている。TM1 の酸性残基に相当する Ile-28 のみならず、Ala-24 を酸性残基に置換して、ATP の加水分解に共役したプロトン輸送が測定された (Table 2)。<sup>21-23)</sup> TM1 に酸性残基を導入すると (Asp-24/Asp-61,

Asp-28/Asp-61, Glu-28/Asp-61), 反転膜小胞を用いて測定したプロトン輸送は pH 依存的になる。すなわち膜小胞の懸濁液の pH がアルカリ性よりも中性のほうが、プロトン輸送活性が高くなった。さらに、TM2 の酸性残基 Asp-61 を TM1 に移すこともできる。Ala-24 を Asp-24 とし、61 番目の Asp 残基を Asn, Gly 又は Ser にした場合も ATP 合成酵素は機能した。しかしこの時のプロトン輸送は pH 依存的とはならなかった。

### 5. c サブユニットや a サブユニットを標的とする医薬品の開発

最近、ジアリルキノリンやメフロキン (Fig. 4) に耐性を示す結核菌<sup>25,28</sup>や肺炎双球菌<sup>27</sup>の遺伝子変異が明らかにされている。興味深いことに、耐性を与える変異はこれら細菌の ATP 合成酵素の c サブユニットや a サブユニットの遺伝子に起きていた (Fig. 5)。しかも、変異した残基はプロトンを輸送する c サブユニットの Asp-61 や a サブユニットの Arg-210 の近傍に位置していた。大腸菌では、c サブユニットの Ala-24 や I-28 が置換すると架橋剤 DCCD (dicyclohexylcarbodiimide) に対して抵抗性を獲得する。<sup>29,31</sup> これらの事実、化学薬品の結合部位が c サブユニットの 2 つの膜貫通領域

(TM1 と TM2) や、a サブユニットのカルボキシ末端の 2 つの膜貫通領域に存在する可能性を示唆している。

F<sub>0</sub> の c サブユニットや a サブユニットのアミノ酸残基が耐性菌で特異的に置換しているという事実は、ATP 合成酵素、特にそれらのサブユニットが抗菌薬の標的になり得るということを示している。1 つの薬剤では耐性菌を生じても、標的が異なる複数の薬剤を用いることで耐性が生じるのを克服することが可能である。<sup>25</sup> 結核菌 ATP 合成酵素の c サ

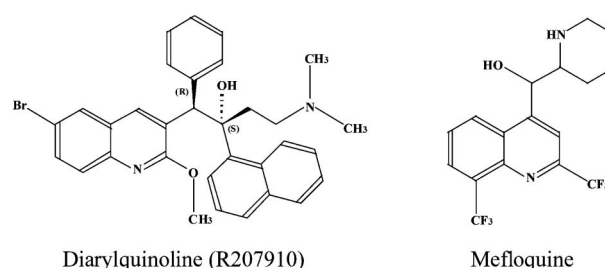


Fig. 4. Structures of Inhibitors Targeting the a and c Subunits in F<sub>0</sub>  
The structures of inhibitors for ATP synthase are shown. Diarylquinoline [R207910, (1R, 2S)-1-(6-bromo-2-methoxy-quinolin-3-yl)-4-dimethylamino-2-(naphthalen-1-yl)-1-phenylbutan-2-ol] targets the c subunit of *Mycobacterium* species,<sup>25,26</sup> and mefloquine does the a and c subunits of *Streptococcus pneumoniae*.<sup>27</sup>

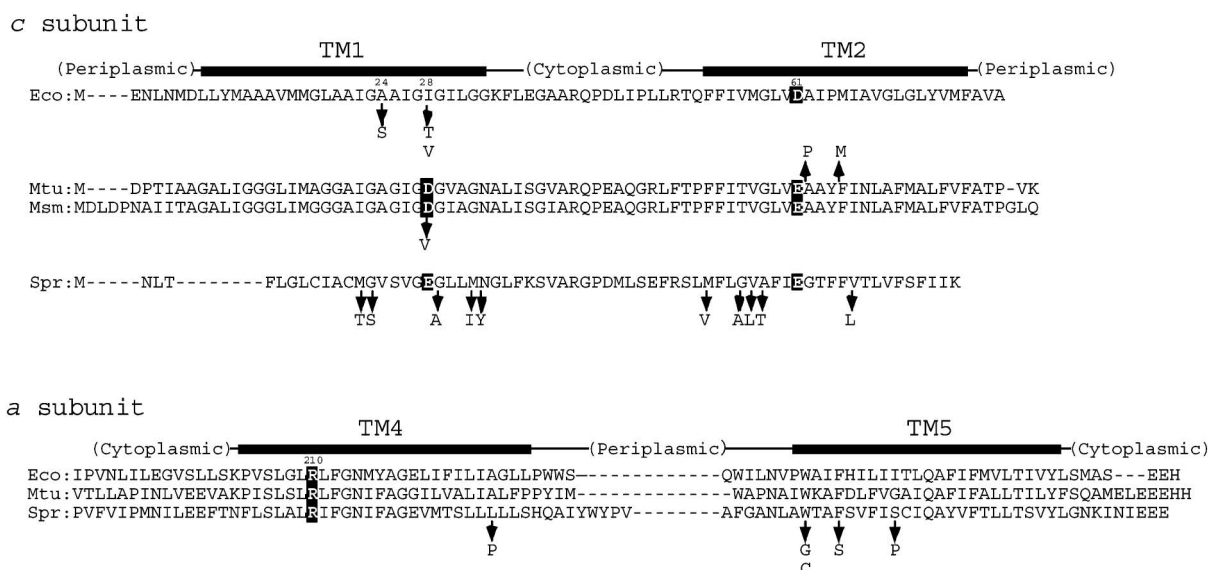


Fig. 5. Mutations in the F<sub>0</sub> Subunits of Pathogenic Bacterial ATP Synthases Confer Diarylquinoline (R207910) and Mefloquine Resistance

Arrows indicate the mutations conferring diarylquinoline and mefloquine resistance for the c subunit of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu) and *Mycobacterium smegmatis* (Msm),<sup>25,28</sup> and *Streptococcus pneumoniae* (Spr)<sup>27</sup> ATP synthase, respectively. The mutations identified in the a subunit of *Streptococcus pneumoniae*<sup>27</sup> ATP synthase are also shown. The sequences corresponding to transmembrane helices (TM) are overlined on the *Escherichia coli* (Eco) sequences with the helix numbers.<sup>29,30</sup> The substitutions in the *E. coli* c subunit conferring DCCD (dicyclohexylcarbodiimide) resistance<sup>29,31</sup> are included. White bold letters indicate the acidic and basic residues in the transmembrane helices.<sup>24</sup>

ブユニットに対するジアリルキノリンの効果は立体特異的であるので、<sup>25,26)</sup> 結合部位の解析は医薬品開発のみならず複雑な ATP 合成酵素の構造と機能の解明にも役立つはずである。<sup>32)</sup>

## 6. おわりに

本論文では、種々の細菌由来の ATP 合成酵素の *c* サブユニットの一次構造を比較した。 *c* サブユニットの 2 番目の膜貫通領域 TM2 に存在する酸性残基は完全に保存されているが、それを除くと膜貫通領域 TM1 と TM2 の残基は種間で大幅に異なっている。このことは、全体的に  $\alpha$  や  $\beta$  サブユニットの保存性が高いのと対照的である。<sup>33)</sup> 高次構造の解析から、 *c* サブユニットのリングを構成する *c* サブユニットモノマーの数にも多様性があることが明らかになっている。

大腸菌では、 TM1 に酸性残基を導入するとプロトン輸送が pH 依存的になる。この知見は、 *c* サブユニットの膜貫通領域の多様性が新たな調節様式を生み出すという可能性を示唆している。また、保存された酸性残基を TM2 から TM1 に移し替えることもできる。注意深く TM1 と TM2 に酸性残基を導入することで、回転子を構成する *c* サブユニットと固定子を構成する *a* サブユニットの間の相互作用が明らかになり、プロトン輸送のより詳細な分子機構が解明されると期待される。

これらの事実や、  $F_0$  の *c* サブユニットや *a* サブユニットを標的とする化合物が存在することから、ATP 合成酵素の構造や反応機構が高度に保存されているものの、細菌種に特異的な抗菌薬を発見することは十分可能と考えられる。<sup>24)</sup> 実際、ジアリルキノリンはネズミ結核菌に対して顕著な治療効果がある。<sup>25)</sup> 阻害剤を利用した  $F_0$  部分の詳細な分子構造と作動機構の解明は、抗菌薬を見つけ出す一助となるはずである。

**謝辞** 本総説を執筆する機会を与えて下さいました酒井秀紀先生（富山大院薬）、森井孫俊先生（鈴鹿医療科学大薬）に深く感謝いたします。

## REFERENCES

1) Futai M., Wada G., Wada Y., "Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology," eds. by Futai M., Wada

Y., Kaplan J. H., Wiley-VCH, Weinheim, 2004, pp. 237-260.

2) Boyer P. D., *Nature (London)*, **402**, 247-248 (1999).

3) Hong S., Pedersen P. L., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 95-120 (2003).

4) Fillingame R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**, 240-243 (1992).

5) Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M., Omote H., Iwamoto-Kihara A., Ueda I., Yanagida T., Wada Y., Futai M., *Science*, **286**, 1722-1724 (1999).

6) Boyer P. D., *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717-749 (1997).

7) Fillingame R. H., Angevine C. M., Dimitriev O. Y., *Biochim. Biochem. Acta*, **1555**, 29-36 (2002).

8) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): [http://www.genome.jp/kegg/catalog/org\\_list.html](http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html)

9) Schiffer M., Edmundson A. B., *Biophys. J.*, **7**, 121-135 (1967).

10) Seelert H., Poetsch A., Dencher N. A., Engel A., Stahberg H., Müller D. J., *Nature (London)*, **405**, 418-419 (2000).

11) Stock D., Leslie A. G. W., Walker J. E., *Science*, **286**, 1700-1705 (1999).

12) Stahlberg H., Müller D. J., Suda K., Fotiadis D., Engel A., Meier T., Matthey U., Dimroth P., *EMBO Rep.*, **2**, 229-233 (2001).

13) Meier T., Polzer P., Diederichs K., Welte W., Dimroth P., *Science*, **308**, 659-662 (2005).

14) Meier T., Yu J., Raschle T., Henzen F., Dimroth P., *FEBS J.*, **272**, 5474-5483 (2005).

15) Pogoryelov D., Yu J., Meier T., Vonck J., Dimroth P., Müller D. J., *EMBO Rep.*, **6**, 1040-1044 (2005).

16) Jiang W., Hermolin J., Fillingame R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4966-4971 (2001).

17) Murata T., Yamato I., Kakinuma Y., Leslie A. G. W., Walker J. E., *Science*, **308**, 654-659 (2005).

18) Lolkema J. S., Boekema E. J., *FEBS Lett.*, **543**, 47-50 (2003).

19) Junge W., Nelson N., *Science*, **308**, 642-644 (2005).

20) Dmitriev O. Y., Abildgaard F., Markley J. L., Fillingame R. H., *Biochemistry*, **41**, 5537-

- 5547 (2002).
- 21) Miller J. H., Oldenburg M., Fillingame R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4900–4904 (1990).
- 22) Zhang Y., Fillingame R. H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 5473–5479 (1994).
- 23) Jones P. C., *J. Bacteriol.*, **183**, 1524–1530 (2001).
- 24) Maeda M., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 117–121 (2008).
- 25) Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Gühlmann H. W. H., Neefs J.-M., Winkler H., Gestel J. V., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., deChaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V., *Science*, **307**, 223–227 (2005).
- 26) Koul A., Dendouga N., Vergauwen K., Molenberghs B., Vranckx L., Willebrords R., Ristic Z., Lill H., Dorange I., Guillemont J., Bald D., Andries K., *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 323–324 (2007).
- 27) Martín-Galiano A. J., Gorgojo B., Kunin C. M., delaCampa A. G., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1680–1687 (2002).
- 28) Petrella S., Cambau E., Chauffour A., Andries K., Jarlier V., Sougakoff W., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2853–2856 (2006).
- 29) Fillingame R. H., Oldenburg M., Fraga D., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20934–20939 (1991).
- 30) Angevine C. M., Herold K. A. G., Vincent O. D., Fillingame R. H., *J. Biol. Chem.*, **282**, 9001–9007 (2007).
- 31) Hoppe J., Schairer H. U., Sebald W., *Eur. J. Biochem.*, **112**, 17–24 (1980).
- 32) Bowman B. J., McCall M. E., Baertsch R., Bowman E. J., *J. Biol. Chem.*, **282**, 9001–9007 (2006).
- 33) Futai M., Noumi T., Maeda M., *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 111–136 (1989).