

Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F₁-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations

Tomoko Masaike, Fumie Koyama-Horibe, Kazuhiro Oiwa, Masasuke Yoshida & Takayuki Nishizaka

Nature Structural and Molecular Biology, December 2008, Volume 15 No 12, pp1326-1333

doi:10.1038/nsmb.1510

政池知子¹、小山史恵¹、大岩和弘²、吉田賢右³、西坂崇之¹

(¹学習院大・物理、²情報通信研究機構、³東工大・資源研)

【研究の背景・目的】酵素上で起こる反応を理解するだけでなく、その素過程に関与する構造変化を理解することが酵素機能のメカニズム解明の鍵となる。回転分子モーターF₁-ATPaseについては、中心軸のγサブユニットに関してこれまでに1分子レベルで詳細な研究がされており、回転サブステップに至るまで化学反応との関係が明らかになってきた。触媒サブユニットβに関しては、ヌクレオチド非結合型とATP類似分子結合型の結晶構造を比較するとC末端ドメインにコンフォメーションの大きな違いが見られたため、触媒部位におけるATP加水分解に伴ってβが構造変化を起こすことでγの回転が駆動されると予想されてきた。そこで本研究では、γサブユニットのサブステップ回転とβサブユニットの局所的な構造変化を同時に1分子レベルで観察して関連付け、この酵素の作動原理を解明することを目的とした。

【方法・結果】γの回転はポリスチレンビーズの回転、βの構造変化は結合した蛍光分子の向きの変化として検出した(図1)。蛍光分子の向きの検出には、1分子の蛍光分子の振動モーメントの向きを0-180°の角度で決定できる偏光変調全反射型顕微鏡(参考文献)を用いた。まずβのC末端ヘリックスに2つcysteineを導入し、それを架橋するように2箇所固定蛍光分子BSRを標識した。これにより、BSRの振動モーメントの向きとC末端ヘリックスの向きが一致するので両者を関連付けることができる。この顕微鏡では励起光の偏光の向きを一定速度で回転させるため、BSRの蛍光強度がsin波で振動し、βのC末端ドメインの向きの変化に連動したBSRの向きの変化を蛍光強度のsin波の位相のずれ角度として検出することができるのである。3つのうち1つのβに、化学反応の素過程を回転サブステップから同定するための変異を導入したハイブリッドの分子を観察した。その結果、触媒サイトにおけるATPの結合、加水分解、ADPの解離というヌクレオチド結合状態の変化に伴ってβは+40°、-20°、-20°という3ステップの構造変化を起こし、それぞれの構造変化がγの回転サブステップを駆動することがわかった(図2)。また、1つのβの構造変化を1/3回転だけ位相をずらした3つのβの構造変化の組み合わせとして考えると、γの80°、40°のサブステップはそれぞれ別のβによって駆動されることが明らかになった。このように、βの構造変化、ATP加水分解反応の素過程、γの回転サブステップの3つの対応を一意的に決定することができた。更に、驚くべきことに、γが停止しているときの3つのβの構造の組み合わせから、ATP結合待ち状態の3つの触媒サブユニットの構造は今まで解かれたどの結晶構造にもみられない新しい組み合わせであることが初め

て明らかになった。また、対照的に、今までに解かれたほとんどの $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶構造は、ATP結合待ちではなく加水分解待ちの化学状態の構造を示している事が明らかになった。

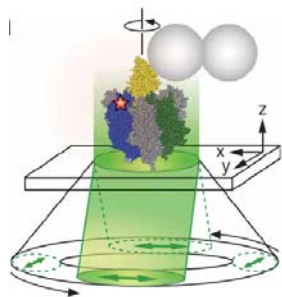


図 1 F_1 -ATPase の触媒サブユニット β の構造変化と中心軸 γ の回転の同時観察系

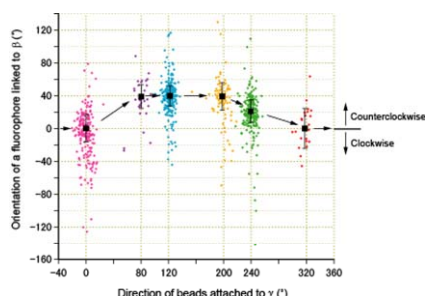


図 2 β の構造変化と γ の回転サブステップの関係

【結論・展望】本研究により、 F_1 -ATPase の 3 つの触媒サブユニット β は中心軸 γ の回転を駆動するために協同的に構造変化を起こすことが明らかになった。今後は、構造検出の時間分解能を向上し、滞在時間が短いADP解離前、リン酸解離前の β の構造も明らかにしたい。また、中心軸 γ に結合するプローブを磁気ビーズに変更し、磁場により γ の回転を制御することで、中間体や遷移状態の β の構造も明らかにする予定である。また、将来的には F_0F_1 ホロ酵素がATPを合成する過程の β の構造変化を観察し、加水分解時の構造変化経路との違いを明らかにしていきたい。基質の化学反応を利用して特有の機能を実現するのは、多くのタンパク質が採用している共通の機構である。本研究で示した構造変化と機能の相関についての知見と手法が、ゆくゆくは酵素全般の基本的な作動原理解明に役立つと確信する。

【参考文献】

Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr. (2004) Chemomechanical coupling in F_1 -ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 142-148.