

Correlation between the conformational states of F₁-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation

Daichi Okuno, Ryo Fujisawa, Ryota Iino, Yoko Hirono-Hara, Hiromi Imamura & Hiroyuki Noji

Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2008, **105** (52), 20722-20727

奥野大地¹、藤沢亮¹、飯野亮太¹、弘埜-原陽子²、今村博臣^{1,3}、野地博行¹

(¹大阪大・産研、²東京大・生研、³さきがけ・JST)

【研究の背景・目的】F₁-ATPase は ATP 加水分解反応に共役して回転軸であるγサブユニットを回転させる分子モーターである。F₁ は様々な阻害剤のもとで結晶構造が解かれているが、それらの構造にほとんど違いはない。一方、γの回転に関して一分子レベルで研究がなされてきており、化学反応素過程と回転運動との関係が明らかになってきている。γは ATP 結合と ATP 加水分解反応を待ちながらステップ回転をすることが分かっているが、結晶構造の化学状態との相関がはっきりしていない。結晶構造の化学状態を知ることは量子化学計算や分子動力学計算等を用いた回転メカニズム解明へのアプローチにとって重要である。そこで本研究では、結晶構造をもとにしたβ-γクロスリンク mutant を調整し一分子観察によってクロスリンクによる停止位置と自由回転で見られるステップ位置との比較を行い、結晶構造がどのような化学状態をしているのかを調べることを目的とした。

【方法・結果】回転観察はガラスに F₁ を固定し、γサブユニットにプローブとして磁気ビーズを取り付けて行った。β-γクロスリンク用のシステインは結晶構造をもとに変異を導入した(図 1)。クロスリンクの架かるβの化学状態と停止位置の関係を知るため、システインを導入したβにさらに加水分解反応が遅くなる変異(βE190D)を導入し、F₁ はそのβと何も変異を持たない野生型に相当するβを組み合わせたキメラ体を用いた(図 2A)。その回転は ATP 結合が律速段階になるような低濃度 ATP 条件下で 3 点の ATP 結合待ち(0°, 120°, 240°)と 1 点の ATP 加水分解待ち(200°)をする 4 点ステップ回転となる(図 2B)。停止位置は ATP 結合および ATP 加水分解待ちの位置を同定後、クロスリンクにより停止した位置を計測、さらに還元後に再回転したときのそれぞれの反応待ち位置を測定し比較した。その結果、クロスリンクによる停止位置は ATP 結合の位置から +80°加水分解方向の位置であった(図3)。これは今まで解かれている結晶構造が ATP 加水分解後待ち(前後)もしくは ADP 阻害型に相当していることをあらわしている。またクロスリン

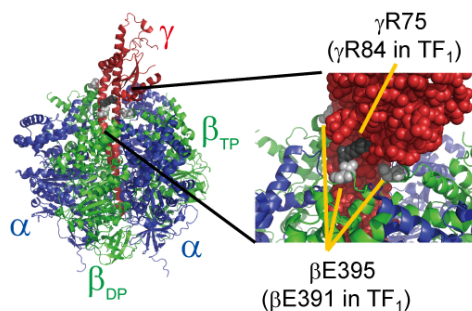


図 1 β-γクロスリンク用に導入したシステインの位置

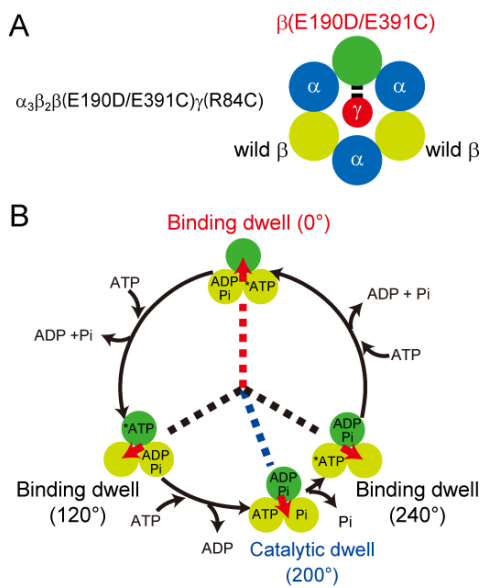


図 2 キメラ体の模式図(A)およびキメラ体の回転の概略図(B)。

クによる停止位置が $\beta(E190D)$ の加水分解待ちの

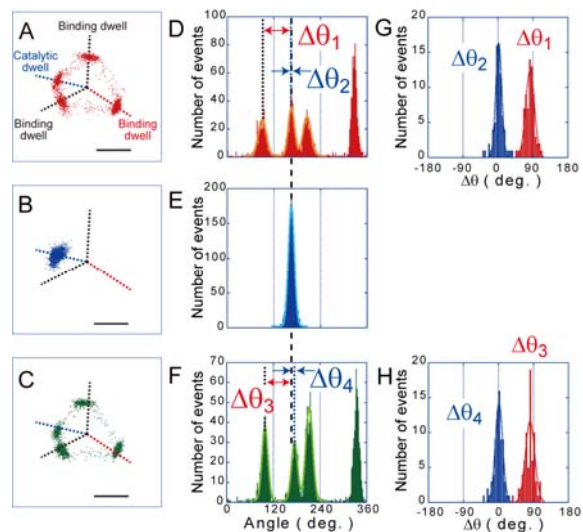


図 3 回転とクロスリンクによる停止の様子。A→B→C の順で回転→クロスリンク→再還元操作。D, E, F は A, B, C の軌跡のヒストグラム。G, H はそれぞれ停止位置からクロスリンク前、再還元後の ATP 結合および $\beta(E190D)$ の加水分解待ち位置との角度の差のヒストグラム。

位置と同じであったことから(図 3)、結晶構造で ADP を結合している β サブユニットが ATP 加水分解反応に触媒活性なサブユニットであることを示している。

【結論・展望】本研究により、解かれている F_1 -ATPase の結晶構造の化学状態は ATP 加水分解反応であることが明らかとなった。これは一分子観察で観察されているもう一つの安定な中間状態である ATP 結合待ちの状態の構造が解かれていないということを意味している。今後は回転メカニズムを調べていく上でこの構造を解かなければならないが、結晶構造の状態実証のためにも相補的に一分子観察をしていく必要がある。また ATP 加水分解反応素過程でリン酸解離のタイミング明らかになっていない。こちらも回転メカニズムを知る上で重要であり調べていく必要がある。