

Single-molecule study on the temperature-sensitive reaction of F_1 -ATPase with a hybrid F_1 carrying a single β (E190D)

Sawako Enoki, Rikiya Watanabe, Ryota Iino, and Hiroyuki Noji

J. Biol. Chem, 2009, 284(34), 23169-76

F_1 -ATPaseは、 $\alpha_3\beta_3$ シリンダーに対して γ サブユニットが回転する回転分子モーターである。1つのATPが加水分解するごとに γ サブユニットは 120° 回転し、さらにその 120° は、ATP結合とADP解離によって引き起こされる 80° サブステップと、リン酸解離とATP加水分解によって引き起こされる 40° サブステップに分けられる。最近の我々の研究により、 9°C 以下の低温で、ATPの結合が律速にならないATP過剰条件においても、 80° サブステップの前に停止があることが観察され、非常に温度依存性が高い反応(Temperature-Sensitive (TS)反応)であることが示された(文献1)。しかし、TS反応がATP加水分解反応のどの反応に対応するのかは明らかになっていなかった。

今回我々は、加水分解の遅い変異体である F_1 (β E190D)においても、 80° ステップの前にTS反応が起こることを発見した。 F_1 (β E190D)のTS反応は、野生型と同じくらい反応速度が温度に強く依存するが、野生型より150倍遅く、 18°C 以下の低温でvideo rate (33 ms)で観測できる(図1)。

TS反応がATP加水分解のどの反応に対応するかを調べるため、1つの β サブユニットをE190Dに変異させたハイブリッド F_1 , $\alpha_3\beta_2(\beta$ E190D) γ の回転を観測した。有賀らにより、このハイブリッド F_1 を用いて、加水分解の角度がATP結合から 200° で起こることが示されている(文献2)。 F_1 (β E190D)のTS反応、加水分解ともに野生型より遅いことを利用し、TS反応の起こる角度を特定した。観測の結果、TS反応は、加水分解より、 200° 前で起こることが示された。つまり、TS反応は、 $240^\circ - 320^\circ$ で起こるADP解離(文献3, 4)ではなく、ATP結合と同じ角度で起こっている。我々は以前、過剰のADPがTS反応の速度を遅くすることから、TS反応はADPの解離ではないかと推測したが(文献1)、さらに過剰のATPも加えると、ADPにより遅くなったTS反応は、再び速くなることから、ADPによってTS反応が遅くなるのは、ADPによるATPの結合阻害としても説明ができる。また、有賀らによって示された 320° のポーズの存在は、本実験では観測されず、時定数の一致などを考えると、TS反応との間違いではないかと思われる。

以上により、TS反応がATPの結合の角度で起こること、強い温度依存性を持つことから、TS反応は、ATP結合前後の強い相互作用を含む β サブユニットの構造変化であると考えられる(図3)。

References

1) Watanabe, R., Iino, R., Shimabukuro, K., Yoshida, M., and Noji, H. (2008) *EMBO Rep* 9, 84-90

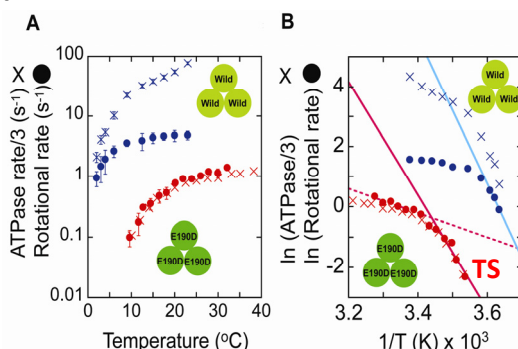


図1: 野生型 F_1 と F_1 (β E190D)の回転速度と加水分解速度(bulk)の温度依存性(A)とそのArrhenius plot (B)

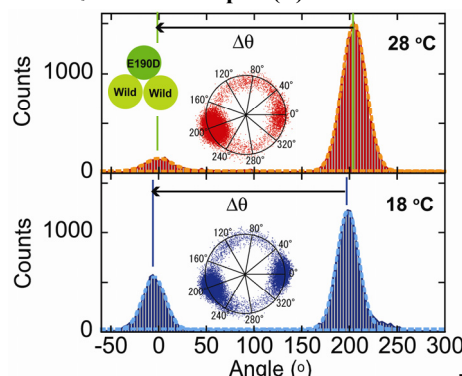


図2: ハイブリッド F_1 , $\alpha_3\beta_2(\beta$ E190D) γ の加水分解からのTS反応の角度

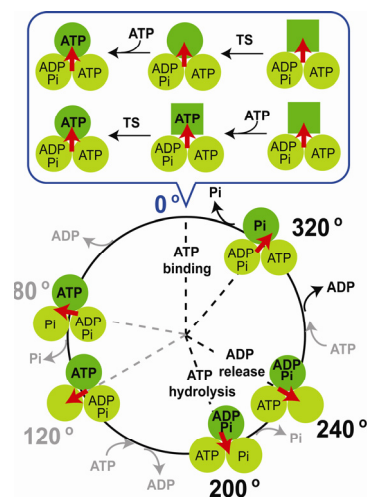


図3: TS反応を含めた F_1 -ATPaseのATP加水分解反応と γ の回転との関係を示すモデル

- 2) Ariga, T., Muneyuki, E., and Yoshida, M. (2007) *Nat Struct Mol Biol* 14, 841-846
- 3) Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr. (2007) *Cell* 130, 309-321
- 4) Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr. (2004) *Nat Struct Mol Biol* 11, 142-148