

Mechanism of Inhibition by C-Terminal α -Helices of the ϵ Subunit of *Escherichia Coli*

F_0F_1 -ATP Synthase

Ryota Iino, Rie Hasegawa, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji

J. Biol. Chem. 284 (2009):17457-17464.

【研究の背景・目的】

F_0F_1 -ATP 合成酵素の ϵ サブユニットは本酵素による ATP 加水分解活性を阻害する内部因子である。 ϵ による阻害効果には C 末端の 2 つのヘリックスが必要であることが明らかになっており、速度論的な解析により、阻害のメカニズムの詳細も提案されている。

一方、本酵素の本来の機能である ATP 合成に対する ϵ の効果の詳細は調べられていなかった。本研究では、ATP 合成活性の速度論的な解析により、 ϵ サブユニットが ATP 加水分解だけでなく ATP 合成反応も阻害することを明らかにし、そのメカニズムを提案した。

【方法・結果】

大腸菌由来の F_0F_1 の ϵ サブユニットの C 末端の 2 つの α ヘリックスを欠失した変異体 ($F_0F_1^{\epsilon\Delta C}$) の発現系を構築した。野生型 F_0F_1 ($F_0F_1^{\text{WT}}$) および $F_0F_1^{\epsilon\Delta C}$ を大腸菌に発現させ精製後、リボソームに再構成し、リボソーム内外の pH 差 (ΔpH) または K^+ -Valinomycin による拡散電位差 ($\Delta\psi$) を駆動力とする ATP 合成活性を計測し比較した。また、可溶化した F_0F_1 の ATP 加水分解活性も測定した。

基質である ADP または無機リン酸の濃度を変化させ ATP 合成活性を測定した結果、 $F_0F_1^{\epsilon\Delta C}$ ではすべての基質濃度で活性が $F_0F_1^{\text{WT}}$ よりも数倍増加することが明らかとなった。 $F_0F_1^{\epsilon\Delta C}$ と $F_0F_1^{\text{WT}}$ の違いは、ATP 加水分解活性においても同様であった。

さらに、さまざまな組み合わせの ΔpH および $\Delta\psi$ で ATP 合成を測定した結果、ATP 合成活性の ΔpH および $\Delta\psi$ に対する依存性は $F_0F_1^{\epsilon\Delta C}$ と $F_0F_1^{\text{WT}}$ でほぼ同様であった。

【結論・展望】

本研究の結果から、 ϵ は F_0F_1 の ATP 合成および加水分解の両方を阻害することが明らかとなった。すべての基質濃度域で阻害がみられたことから、 ϵ は ATP 合成および加水分解反応の素過程 (基質の結合、共有結合の形成・切断、生成物の解離) の複数の過程に影響を与えることが明らかとなった。1 分子の F_1 には 3 つの β サブユニット (触媒部位) が存在し、結晶構造ではそれぞれの β は異なる状態 (異なる反応素過程) にある。そして、それぞれの β は γ サブユニットの回転に伴い、順番を守って反応を進めると考えられている。

しかしながら、 ϵ の C 末端の α ヘリックスは、 F_1 の結晶構造において ATP を結合した β サブユニットとのみ相互作用している。よって、 ϵ は複数の β サブユニットと同時に相互作用することにより、複数の素過程に影響を与えるというモデルは成立しない。そこで我々は、 ϵ は γ の回転を抑制することにより複数の反応素過程に影響を与えるという新規なモデルを提案した。

このモデルから、 ϵ の存在下で 1 分子回転観察を行うと、ATP 結合待ちの停止だけでなく ATP 加水分解待ち (生成物の解離待ち) による停止も長くなることが予想される。この予想を 1 分子計測により今後検証する。

また我々は以前、磁気ピンセットで強制的回転させた際の F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックス) の ATP 合成反応の効率 ϵ を再構成すると大幅に改善されることを報告した (Rondelez et al., *Nature* 2005)。 ϵ サブユニットの C 末端の α ヘリックスを欠失した変異体を用いれば、 F_1 の強制的回転と反応のカップリングにおける本部位の役割も明らかになると期待している。