

## Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit $\epsilon$ of $F_1$ -ATPase from photosynthetic organisms

Yagi, H., Konno, H., Murakami-Fuse, T., Isu, A., Oroguchi, T., Akutsu, H., Ikeguchi, M., Hisabori, T.

*Biochemical Journal* 2009, 425(1):85-94

八木宏昌<sup>1</sup>、紺野宏記<sup>2</sup>、村上-布施朋重<sup>2</sup>、井須敦子<sup>2</sup>、笠口友隆<sup>3</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>、池口満徳<sup>3</sup>、久堀徹<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>阪大・蛋白研、<sup>2</sup>東工大・資源研、<sup>3</sup>横浜市大・院・生体超分子)

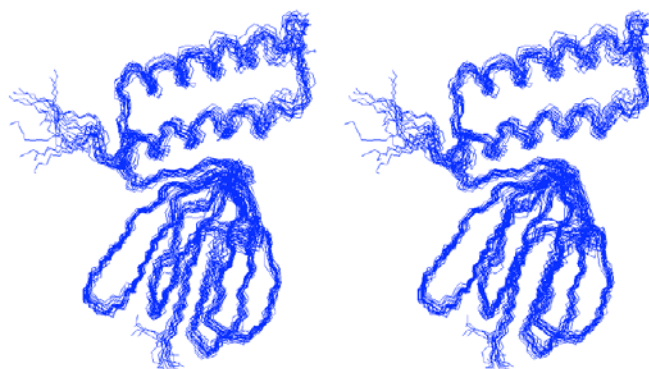
【研究の背景・目的】葉緑体およびバクテリア由来の ATP 合成酵素( $F_0F_1$ )の $\epsilon$ サブユニットは、加水分解活性を強力に阻害する内在性の阻害サブユニットである。細菌由来の $\epsilon$ サブユニットは、単独および複合体中での構造がすでに明らかにされており、N 末端側の $\beta$ サンドイッチ構造ドメインと 2 本の $\alpha$ -ヘリックスがタンデムにつながった C 末端側の $\alpha$ -ヘリックスドメインで構成されている。NMR および X 線結晶構造解析で決定された $\epsilon$ サブユニットの単独の構造では、C 末端側の $\alpha$ -ヘリックスドメインが $\beta$ サンドイッチ構造の上に折り重なるように畳まれていたのに対して、 $\gamma$ サブユニットの部分ドメインとの共結晶によって解析された $\epsilon$ サブユニットの構造では、C 末端側のヘリックスが $\gamma$ サブユニットのコイルドコイル構造に寄り添うように立ち上がっていた。このことから、複合体の中でも $\epsilon$ サブユニットが C 末端側の $\alpha$ -ヘリックス部分を大きく構造変化させていることが予想され、これをサポートするような実験データも数多く得られている。しかし、これまでの研究の多くは、大腸菌および好熱菌の $\epsilon$ サブユニットについて行われたもので、 $\epsilon$ の構造変化にどこまで普遍性があるのかはわかっていなかった。

私たちが長く研究している葉緑体型の ATP 合成酵素は光合成条件で機能を最大限に発揮するように調節されており、バクテリア型の酵素と比べると複雑な調節機構を備えている。しかし、葉緑体型 ATP 合成酵素の結晶構造は、まだ $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットのヘテロダイマー部分について解かれているのみで、その他のサブユニットについては全く情報が無い。そこで、私たちはシアノバクテリアを材料として ATP 合成酵素の $\epsilon$ サブユニットの構造解析を行った。

【結果と展望】まず、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の $\epsilon$ サブユニットの溶液構造を解析した (次頁図)。その構造は、これまで報告されている細菌型の $\epsilon$ サブユニットと同じく、N 末端側 $\beta$ サンドイッチ構造ドメインと C 末端側 $\alpha$ -ヘリックスドメインで構成されており、両ドメインの空間配置も細菌のそれとほぼ同じであった。しかし、C 末端側の二本の $\alpha$ -ヘリックスのうち、1 番目のものが 21 残基あり、これまでに報告されている大腸菌や好熱菌のそれに比べてひと巻き長かった。一方、二本の $\alpha$ -ヘリックスをつなぐループ部分のアミノ酸は 5 残基でバクテリアのものに比べ

て3残基ほど短くなっていた。次に、ホウレンソウ葉緑体の $\epsilon$ サブユニットの構造解析を試みた。しかし、このタンパク質は、溶解度が極めて低く NMR によって解析することができなかった。そこで、N 末端側ドメインを好熱性シアノバクテリア由来、機能的に構造変化が重要と考えられる C 末端側ドメインをホウレンソウ葉緑体由来としたキメラ $\epsilon$ サブユニットを作成し、構造解析を行った。二つのドメインのそれぞれの二次構造は、これまで知られているものと共通であったが、C 末端側ドメインの畳まれ方は、これまで知られているいずれの ATP 合成酵素にも見られない特徴的なものであった。しかし、その配置は複合体中では $\gamma$ サブユニットに阻まれてしまうもので、実際の構造を反映しているとは考えにくい。

得られた構造について、分子動力学計算を行い、ドメイン間の安定性を調べたところ、シアノバクテリアの $\epsilon$ サブユニットではC末端側ドメインと N 末端側ドメインの間にはほとんどコンタクトが見られず、C 末端側ドメインの自由度が高いことがわかった。これに比べ、キメラサ



ブユニットでは、両者の間に複数のコンタクトが認められた。すでに構造解析が行われている大腸菌や好熱菌の $\epsilon$ サブユニットでは両ドメインの安定性がさらに高いことがわかった。このような C 末端側ドメインの安定性の違いは、大腸菌、好熱菌、およびホウレンソウの C 末端側ドメインをシアノバクテリアの N 末端側ドメインに結合して作成したキメラサブユニットによる ATP 合成酵素の阻害の程度から見積もった解離定数にも反映されていた。すなわち、葉緑体型酵素で見られる $\epsilon$ サブユニットの強い阻害作用は、 $\gamma$ サブユニットとの強い相互作用の反映であり、この相互作用には $\epsilon$ サブユニットの N 末端側ドメインおよび C 末端側ドメインの両方が関係していることがわかった。