

## Physiological Impact of Intrinsic ADP-Inhibition of Cyanobacterial $F_0F_1$ Conferred by the Inherent Inserted Sequence into the $\gamma$ Subunit.

Sunamura E.-I., Konno H., Imashimizu-Kobayashi M., Sugano Y., Hisabori T.  
Plant Cell Physiol. (Rapid Paper) 2010 Apr 25. [Epub ahead of print]

【研究の背景】ATP合成酵素は、電子伝達系によってエネルギー産生膜内外に形成されるプロトンの電気化学的勾配を利用して、回転しながらATPを合成する。この酵素は、プロトン勾配がない、または不十分なきには、逆反応であるATP加水分解を触媒することが出来る。生体内では、無駄にATPを加水分解しないように、ATP合成酵素は加水分解活性の調節機構をもっていると考えられている。調節機構としてよく知られているのは、ADP阻害である。ADP阻害は、分解産物であるADPが固く触媒部位に結合し、反応を停止させる現象である。

ATP合成酵素は、 $F_0$ と $F_1$ の二つの部分で構成されている。 $F_0$ は膜タンパク質で、プロトンポンプとして働く。 $F_1$ は可溶性タンパク質で、ATPの合成・加水分解を触媒する。また、 $F_1$ のみでは加水分解反応のみを触媒する。

シアノバクテリアの $F_1$ では、回転軸である $\gamma$ サブユニットの中ほどに、大腸菌やミトコンドリアなど、他の種やオルガネラ由来の $\gamma$ サブユニットにはない約25アミノ酸挿入配列が存在する。当研究室の紺野らは、シアノバクテリア $F_1$ の $\gamma$ サブユニットの挿入配列を欠損させると、ATP加水分解活性が大幅に上昇することを報告した(Konno *et al.* 2006)。生化学的な解析によって、変異酵素の活性の上昇は、ADP阻害に陥りにくいためであることが示唆された。 $F_1$ は1分子回転実験によって酵素反応を詳細に調べることができるので、回転挙動を観察することで、活性の上昇に直接関与する反応段階を明らかにすることが出来ると予想される。。そこで、私は1分子回転観察実験を行い、挿入配列を欠損させたシアノバクテリア $F_1$ と野生型 $F_1$ の分子の挙動を比較することで、この挿入配列の果たす役割を調べた。

### 【結果と考察】

1分子回転実験を行うためには、回転観察用のビーズの固定に必要な変異を $F_1$ に導入する必要がある。挿入配列を欠損させた $F_1$ に回転観察用の変異を加えた影響を調べるため、まずATP加水分解活性測定を行った。挿入配列を欠損させた $F_1$ は、野生型と比べてATP加水分解活性が大幅に上昇した。ADP阻害を解除するこ

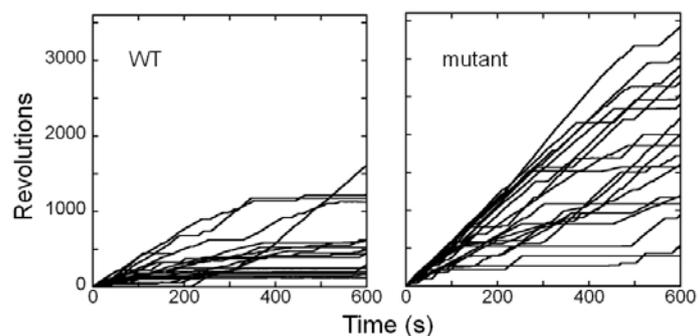


図1 回転実験におけるタイムコース

とが知られている界面活性剤 LDAO や抗生物質であるテントキシンを加えて活性測定を行ったところ、挿入配列を欠損させた  $F_1$  では、活性化が見られず、ADP 阻害に陥りにくいことが示唆された。

続いて1分子回転実験を行ったところ、挿入配列欠損  $F_1$  はよく回転する傾向にあった(図1)。回転時の平均回転速度はそれほどの違いが見られないため、活性の違いは、回転中にあらわれる停止の頻度と長さによるものと考えられる。停止持続時間のヒストグラムと回転持続時間のヒストグラムを作製したところ、挿入配列を欠損させた  $F_1$  は、停止に陥っている時間が短く、回転が持続していることがわかった。長い停止は ADP 阻害であることがわかっているので、挿入配列を欠損させた  $F_1$  は ADP 阻害に陥っている時間が短い、すなわち、ADP 阻害に陥りにくいことになる。挿入配列は、ADP 阻害に陥りやすくすることにより、 $F_1$  の ATP 加水分解活性を低く抑える役割をもっているものと推測される。

シアノバクテリア  $\gamma$  の挿入配列は、夜間などプロトン勾配の形成が十分でないときに、ADP 阻害によって無駄な ATP 加水分解を防ぐものと考えられる。この仮説の当否を明らかにするため、挿入配列を欠損させた ATP 合成酵素をもつシアノバクテリア変異株(以下変異株)を作製した。変異株と野生型では、増殖速度を比較しても顕著な差は見られなかったが、細胞内の ATP 量を定量すると、変異株では暗所における細胞内 ATP 量が大きく減少していた(図2)。挿入配列を欠損した変異体は野生型と同等の ATP 合成活性を有していた。また、発現している ATP 合成酵素の量にも差が見られなかったことから、挿入配列を欠損させた ATP 合成酵素の高い ATP 加水分解活性によって、細胞内 ATP 量が減少したと考えられる。

以上のように、挿入配列は ADP 阻害に陥りやすくすることで ATP 加水分解反応を抑制し、生体内の ATP 量の維持に重要な役割を担っているものと考えられる。

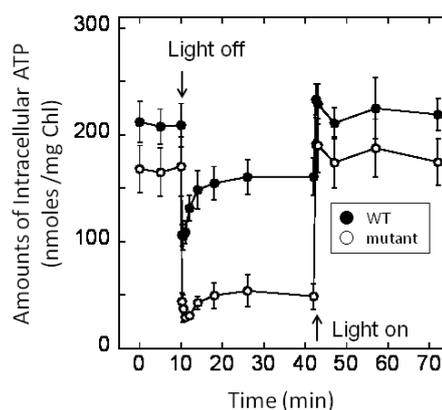


図2 細胞内ATP量の結果