201400

ADP inhibition のかかりにくい変異体 F1-ATPase の酵素学的性質と回転 (2)

○宗行 英朗¹、鈴木 徹也¹、井合 健太郎¹、野地 博行^{2,3}、西坂 崇之⁴、吉田 賢右¹ (¹東工大・資源研、²東大・生産研、³さがしけ 21、⁴通信総合研究所・生体物性 G)

F1-ATPase は ATP を加水分解している最中に ADP を触媒部位に固く結合した不活性化状態におちいる。この不活性化は単なる生成物阻害ではなく、この阻害型の存在が F1-ATPase の種々の解析を困難にしてきた。昨年度、我々は回転実験用の変異体の β サブユニットに更に T165S, G181A, Y341W の変異を導入してこの ADP inhibition を大幅に軽減することに成功した (GT 変異体と呼ぶ)。本年は昨年を引き続き、この GT 変異体の生化学的性質と回転について報告する。GT 変異体は 4 mM ATP 存在下で約 240s⁻¹ の反応速度を示した。反応の初期にラグが見られるため、正確な ATP 濃度依存性の測定は困難であるが、ほぼ単純な Michaelis-Menten 型のパターンを示し、その Km は 30-50 μ M の間と見積もられた。ADP inhibition をほとんど受けなが、 β Y341W の蛍光強度から見積もった触媒部位の ADP に対する親和性は他の変異体とほとんど変わらなかった。また、ADP 共存下での ATPase 活性は比較的素直な競争阻害の形をとり、その Ki は β Y341W の蛍光強度から見積もった 3 番目の ADP の結合の Kd と同じオーダーであった。微小ビーズを結合した GT 変異体の回転速度は変異を導入していないものに比べて若干遅い傾向があり、低濃度 ATP では、ATP の kon が低くなるように見える。また、飽和 ATP 濃度でも短いステップが観察される。昨年に引き続き、ATP, ADP, リン酸の濃度を変化させて、ATP の加水分解の自由エネルギーを制御した条件下での回転観察を行っているが、リン酸 100 mM, ADP が ATP の 100 倍以上の濃度で共存した条件下でも回転が観察されている。現在、単一ステップを明瞭に観察できるように努力している。

E. Muneyuki, T. Suzuki, K. Iai, H. Noji, T. Nishizaka and M. Yoshida : A mutant F1-ATPase resistant to ADP inhibition (2)

201430

F1-ATPase からの ATP の解離

○齋藤 究¹、伊香 祐子²、徳永 万喜洋^{3,4}、二井 將光²、安藤 敏夫¹ (¹金沢大学院・自然科学、²阪大・産業科学研究所、³遺伝研、⁴理研・免疫セ)

F₀F₁-ATP 合成酵素は水素イオン濃度勾配のエネルギーを利用して ATP を合成している。ATP 合成を触媒する F₁-ATPase 部分は ATP を加水分解する際に中心の γ サブユニットを回転させている。この回転運動と ATP の加水分解の関係については、近年、 γ サブユニットに結合させたマーカーの回転を顕微鏡下で観察することにより解析が進んでいる。合成のメカニズムに関して依然不明な点が多いが、分解反応と同様に γ サブユニットの回転が ATP 合成に密接に関係していることが予想されている。

F₁-ATPase からの ATP の解離について解析することは合成反応のメカニズムに近づく手がかりとなる。今回、F₁-ATPase に過剰量の ADP を加えることによる ATP の放出を測定したので報告する。精製した F₁-ATPase にあらかじめ nM オーダーの ATP を結合させておく。そこに数 10 から数 100 μ M の ADP を加えることにより定常的な ATP の放出を計測することができた。ATP の解離速度は ADP 濃度に依存して大きくなった。また、溶液中のリン酸濃度にも依存し、WT の F₁-ATPase ではリン酸濃度が高いほど ATP の解離速度が低くなる結果となった。ATPase の低くなるミュータント β S174F や、 β S174F/ β G149A における ATP 放出速度についても計測を行ったので、これらの結果をふまえ ATP 合成について考察したい。

K. Saito, Y. Iko, M. Tokunaga, M. Futai and T. Ando : ATP release from F1-ATPase

201415

Mg-free ADP が一個結合した F1 の構造と触媒機構との関連

○白木原 康雄¹、鈴木 俊治²、白鳥 綾¹、白木原 千佳子¹、中迫 雅由³、吉田 賢右² (¹国立遺伝学研究所、²東工大生命理学、³慶応・理工)

F1ATPase (F₁; サブユニット組成 $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$) は、呼吸鎖が形成する膜を隔てた水素イオンの濃度差を ATP に変換する ATP 合成酵素の膜から突き出した部分である。私たちは回転触媒機構の詳細を知る目的で、好熱菌 F₁・ $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体を用いて、異なるヌクレオチド結合モードがひきおこす構造変化の詳細を調べている。

今回、Mg-free ADP が 1 個だけ β サブユニットに結合した F₁ の結晶構造と触媒機構との関連について報告する。Mg ヌクレオチドを結合した β サブユニットが 2 個以上ある F₁ の従来の結晶構造との比較により、ヌクレオチド結合の変化に伴う $\alpha 3 \beta 3$ コア部分の構造変化、 γ サブユニットの構造変化を特定することができた。ただし Mg-free の制約の十分な考慮が必要であった。

この構造を F₁ の従来の結晶構造と比べると、従来の結晶構造中で活性サブユニットと思われる closed β DP サブユニット型の構造が見られない。これが通常の multi-site 反応に比べて unisite 反応が非常に遅いことと照合している。

また γ サブユニットを 2 個ヌクレオチドを結合した β サブユニットをもつ F₁ 構造の γ サブユニットと比べると、約 2.5 度ねじれていた。これは 1 分子計測から得られた、産物 ADP・Pi の放出に伴う 3.0 度回転と大きさ、方向ともに合致した。

Mg が存在しないため好熱菌 F₁ は軽く阻害された状態にある。これに対応して ϵ サブユニットが $\alpha 3 \beta 3$ コア部分にそのヘリックス部分を差し込んでいた。

Y. Shirakihara, T. Suzuki, A. Shiratori, C. Shirakihara, M. Nakasoko & M. Yoshida : Structure of F1-ATPase with nucleotide bound to a single catalytic site and its Implications

201445

低 ATP 濃度における F₁-ATPase の回転とヌクレオチド結合数

○榊 直由¹、下 理恵子¹、伊藤 博康²、足立 健吾¹、宗行 英朗³、吉田 賢右³、木下一彦¹ (¹岡崎・統合バイオ、²浜松ホトニクス・筑波研究所、³東工大・資源化学)

F₁-ATPase (以下、F₁ と略す) は、ATP の加水分解によって回転する分子モーターである。F₁ は 3 つの触媒部位をもつが、ATP がその 1 つにだけ結合した状態では回転せず、2 つ以上の ATP が結合した状態を経なければ回転しないと考えられている。しかし、2 つめの ATP 結合が F₁ の回転に寄与していると考ええる bi-site 説と、2 つめだけでなく 3 つめの ATP が結合してはじめて回転すると考える tri-site 説の 2 つの説があり、どちらが正しいかは決着がついていない。

これを解決するために、われわれはまず低 ATP 濃度における F₁ の回転速度の ATP 濃度依存性を測定することにした。Ni-NTA コーティングしたガラス表面に His-tag 付きの F₁ を固定し、F₁ の γ サブユニットにビオチンを介してストレプトアビジンビーズをつけ、低 ATP 濃度 (20 ~ 600 nM ATP) での回転を観察した。トリプトファン消光から見積もったヌクレオチド結合数によれば、この範囲の ATP 濃度は bi-site モードの領域であると考えられる。100 回転以上のほぼ連続的な回転が 20 nM ATP でも観察された。これは bi-site 説を支持するものである。なぜなら、20 nM ATP は F₁ の 3 つめの ATP に対する解離定数よりもはるかに低く、3 つめの ATP が F₁ の連続的な回転に寄与しているとは考えにくいからである。

現在、F₁ へのヌクレオチド結合数の直接測定も試みており、回転観察の結果とあわせることで、2 つの説のうちどちらが正しいかの決着をつけたいと考えている。

N.Sakaki, R.Shimo, H.Itoh, K.Adachi, E.Muneyuki, M.Yoshida and K.Kinosita, Jr : Rotation and site occupancy of F₁-ATPase at low ATP concentrations