3P137

好熱菌 F₁-ATPase ε サブユニットの X 線結晶構造解析

○梶原 暢元¹、田中 英明¹、八木 宏昌¹、月原 富武¹、山田 康之²、吉田 賢右³、阿久津 秀雄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 立教大・理、³ 東工大・資源研)

ATP 合成酵素はプロトンの輸送に関わる F₀ 部分と、ATP の合成、加水分解の触媒部位をもつ F₁ 部分からなる回転触媒酵素である。F₁ の構成成分である ε サブユニットでは C 末端の α ヘリックスが折りたたんだ状態と伸びた状態の少なくとも 2 つの構造が報告されている。好熱菌 ε サブユニット (TF₁ ε) は F₁ に結合したまま ATP の加水分解を阻害する阻害型、影響を与えない無害型のコンフォメーションをとることがわかっており、折りたたんだ状態が無害型、伸びた状態が阻害型に対応していると考えられる。F₁ の周囲に ATP が多く存在すると阻害型の ε は無害型に変わることから、ATP が両者の変換に影響を与えていると考えられる。TF₁ ε は ATP がない状態ではきちんとしたフォールドをとらないが、ATP が存在すると安定な構造をとるようになることが分かっている。大腸菌ではこのような現象は報告されていない。そこで、TF₁ ε における ATP の結合部位を特定するため ATP 存在下での ε 単体の X 線結晶構造解析を試みた。その結果、2.0 Å の分解能で構造を決定することができ、N 末に β シートドメイン、C 末に 2 本のヘリックスを持つことが明らかになった。この構造は報告されている大腸菌 ε 単体の無害型と酷似していた。しかし、その表面電荷は大きく異なっている。TF₁ ε は折りたたんだ 2 つのヘリックス間に多くの正電荷があり、そこに ATP のリン酸がトラップされていた。この ATP が 2 つのヘリックスの間を取り持ち、無害型の構造を安定化しているように見える。これに対し、大腸菌 ε の表面電荷には大きな偏りがなく、ATP がなくても無害型をとることができる。したがって、阻害型と無害型の変換を制御する部位は他にあるのか、大腸菌と好熱菌では阻害型と無害型の変換を制御する機構が異なることが考えられる。

N.Kajiwar, H.Tanaka, H.Yagi, T.Tsukihara, Y.Yamada, M.Yoshida and H.Akutsu : X-ray crystal structure analysis of TF₁ epsilon subunit

3P139

V₁-ATPase のステップ回転

○今村 博臣¹、舟本 冴子¹、吉田 賢右^{1,2}、横山 謙¹ (¹ JST・ERATO・ATP システム、² 東工大・資源研)

液胞型 ATPase (V-ATPase) は、ATP の加水分解にともない膜を介してプロトンを輸送することで様々な細胞の機能に重要な役割を果たしている。V-ATPase は ATP を加水分解する V₁ 部分とプロトンを輸送する V₀ 部分から構成されている。F₀F₁-ATPase との類似性から、V₁ 部分は ATP 駆動の回転分子モーターであると考えられてきたが、最近好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来 V-ATPase の V₁ 部分 (V₁-ATPase、推定サブユニット組成 A₃B₃DF) を用いた実験によりそれが証明された (Imamura *et al.* (2003) *PNAS* 100, 2312-15)。V₁-ATPase をガラス表面に固定し回転子である D サブユニットに 340 nm のビーズを結合させ、高濃度 (0.1~4 mM) の ATP 存在下でビーズの回転を顕微鏡で観察すると、ビーズは一方向 (膜側から見て反時計回り) に連続的に回転する。今回、ATP 濃度を非常に低くした条件 (1~4 μM) でビーズの回転を観察した。この条件ではビーズの回転は連続的ではなく、120° ごとにステップしながら回転した。ATP の濃度とビーズの回転速度の関係は Michaelis-Menten の式と合致し、また、ATP 低濃度における回転速度は溶液系での ATPase 分解速度の 1/3 と近い値を示した。以上のことから V₁-ATPase は 1 分子の ATP の結合が引き金となって 120° 回転し、1 回転あたり 3 分子の ATP が消費されると考えられる。

H.Imamura, S.Funamoto, M.Yoshida and K.Yokoyama : Stepwise rotation of V₁-ATPase

3P138

区分標識と残余双極子相互作用を組み合わせた H⁺-ATPase β サブユニットの構造解析

○八木 宏昌¹、辻本 拓哉¹、山崎 俊夫²、吉田 賢右³、阿久津 秀雄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 理研・GSC、³ 東工大・資源研)

H⁺-ATPase は ATP の加水分解を触媒する酵素である。細胞内において本酵素は F₁ と呼ばれ、生体膜中に存在する F₀ 部分と結合して ATP 合成酵素として機能している。F₁ 中の α₃β₃γ の結晶構造では触媒サブユニットである β はヌクレオチド結合型では open、非結合型では closed 構造をとっていた。また ATP の加水分解に伴って F₁ が回転するということも知られている。F₁ 回転のメカニズムはヌクレオチド結合時における β サブユニットの構造変化が γ サブユニットとの相互作用を順次変化させることによるものと考えられる。そこで我々はこの open から closed への構造変化がモノマーのみでも起こりうるのかを溶液 NMR を用いて検証した。モノマー β サブユニットの信号帰属は標識部位が異なる 4 種の区分標識体を作成して行った。その結果 90% 程度の主鎖の帰属を完了し、化学シフト値から TALOS を用いて 2 次構造を推定した。ADP を加えた時に起こる化学シフト値の変化からおおよその構造変化領域を特定した。さらに N 末端および C 末端のみが標識された β サブユニットの残余双極子相互作用 (RDCs) 測定で両者の相対配置決定を試みた。結果、N 末端で 65 個、C 末端で 40 個の RDCs が観測された。構造から求める計算値は α₃β₃ 結晶構造の β サブユニット部分を使って行った。2 次構造をとっている領域のみで実測値と計算値をフィットさせた結果、両者に比較的良好一致がみられた。そこから求めた N 末端と C 末端の相対配置は ADP 存在下では closed、非存在下は open に近い結果であった。以上より β サブユニットはモノマーのみでも複合体中で見られたような open から closed への構造変化を起こすことが分かった。このことから β サブユニットの構造変化は F₁ 部の回転を引き起こす駆動力になりうることを示唆された。

H.yagi, T.Tsujimoto, T.Yamazaki, M.Yoshida and H.Akutsu : Structural analysis of H⁺-ATPase beta subunit by segmental isotope labeling and residual dipolar couplings

3P140

1 分子 FRET 法により明らかにされた F₀F₁-ATP 合成酵素 ε サブユニットの構造状態

○飯野 亮太^{1,2}、鈴木 俊治^{1,2}、吉田 賢右^{1,2} (¹ 科技振・ERATO、² 東工大・資源研)

回転分子モーターである F₀F₁ の ε サブユニットは、本酵素の ATP 加水分解・合成活性を制御する内部因子として知られている。由来する種が異なる F₁ の結晶構造解析では、ε サブユニットの C 末 α ヘリックスは異なる構造をとっている。本研究は、1) 1 分子 FRET 法を利用して ε サブユニットがとりうるあらゆる構造状態を網羅する、2) 各構造間の遷移のダイナミクスを明らかにする、3) それぞれの構造状態と F₀F₁ の ATP 加水分解・合成活性との相関を明らかにする、ことを目的としている。

[方法] 好熱菌由来 F₁ の γ サブユニットの N 末端と ε サブユニットの C 末端にシステイン残基を導入し、Cy3 (ドナー) および Cy5 (アクセプター) を結合させた。蛍光ラベルした F₁ は、δ サブユニットの C 末端に導入したビオチン化配列を介し、ストレプトアビジン-ビオチン-BSA でコートしたカバーガラス上に固定した。FRET の検出は、高速回転モーターを利用した輪帯エパネッセント照明に Dual-View 光学系を組み合わせでビデオレートで行った。

[結果] ADP 存在下では、約 0.9 の高い FRET 効率を示した。一方、加水分解しない ATP アナログである AMPNP 存在下では、FRET 効率は 0.7、0.3、0.1 付近にピークを持つ 3 状態に分布した。これらの結果は、F₁ の触媒サブユニットである 3 つの β への ATP の結合数により、ε サブユニットが異なる構造状態を取ることを示唆している。また、今回のターンオーバーしない条件では、各構造間の遷移が観察されることは非常にまれであった。今後は、ATP 加水分解・合成条件下で観察を行う予定である。

R. Iino, T. Suzuki and M. Yoshida : Conformational states of the epsilon-subunit of F₀F₁ ATP synthase revealed by single-pair FRET