3P141

Rotation and hydrolysis activities of F₁-ATPase with γ subunit truncations

○ Mohammad Delawar Hossain^{1,2,3}、古池 晶¹、牧 泰史¹、足立 健吾¹、Md. Yusuf Ali²、Mominul Huq³、木下一彦¹ (¹ 岡崎統合バイオ、²Shahjalal Univ. of Science and Technology、³Bangladesh Univ. of Engineering and Technology)

An isolated sub complex of F₁-ATPase with minimal composition for activity is $\alpha_3\beta_3\gamma$ in which the γ subunit rotates with respect to $\alpha_3\beta_3$ hexamer during hydrolysis of ATP. In the structure of mitochondrial F₁-ATPase (MF₁) which is superimposable with the structure of $\alpha_3\beta_3$ hexamer of thermophilic bacteria PS3, carboxyl (C) terminus of the γ subunit forms an α -helix which fits into the hydrophobic bearing formed by the loops of $\alpha_3\beta_3$ ring. The last amino acid residues at the C-terminus of the γ subunit were suggested to play an important role during rotation. This has prompted us to study the effect of successive truncation of C-terminal amino acid residues of γ subunit of the $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of F₁-ATPase from thermophilic bacillus PS3 on the rotation and hydrolysis activities. The hydrolysis activity at different MgATP concentrations (2000-0.02 μ M) was measured for both wild type and mutant complexes in the presence of an ATP regenerating system. The measurement reveals that hydrolysis activity decreases to 27-63% for truncation up to the 14th residues and 17-67% up to 17th residues compared to the intact complex. We are now measuring the rotational torque in the same range of ATP concentration and the results will be presented in the meeting.

MD.Hossain, S.Furuike, Y.Maki, K.Adachi, MY.Ali, M.Huq, K.Kinosita, Jr. : Rotation and hydrolysis activities of F₁-ATPase with γ subunit truncations

3P143

1 分子 F₁ で計測した高効率の ATP 合成

Rondelez Yannick¹、○中嶋 貴子²、Tresset Guillaume¹、山田 康之³、藤田 博之⁴、竹内 昌治⁴、野地 博行² (¹ 東大・生産研・LIMMS/CNRS、² 東大・生産研、³ 立教大・生物、⁴ 東大・生産研・CIRMM)

F₀F₁-ATP 合成酵素は、ミトコンドリア、葉緑体、バクテリアなどの生体膜上に存在し、細胞内のエネルギー供与体として広く生物界に分布している。しかしながら、単離された F₁ 部分のみでは ATP 加水分解反応を触媒し、回転するモーターであることが知られている。生体内での本来の働きである ATP 合成時、F₁ モーターは同じくモーターである F₀ 部分によって ATP 加水分解時とは逆方向に回転させられている。そこで本研究では、F₁ モーターを機械的に逆方向に回転させ、ATP 合成反応を検出することを目的とした。F₁ モーターを $\alpha_3\beta_3$ サブユニットに導入した His タグでガラス基盤に固定し、 γ サブユニットに直径 0.4 ミクロン程度の磁気ビーズを結合させることで、磁気ピンセットを用いて F₁ モーターを自在に回転させることができる。さらに我々はマイクロ加工技術を利用して約 6 フェムトリッターのチャンバーを作製し、F₁ モーター 1 分子をその中に閉じ込め、磁気ピンセットによって逆回転させた。機械的逆回転の後、F₁ モーターを磁場から解放すると、F₁ モーターは ATP 加水分解による回転を再開し、その速度は上昇していた。既に求めてある回転速度/ATP 濃度の関係式より、チャンバー内の ATP 濃度を求めることができ、チャンバー体積から合成した ATP 分子の数を求めることに成功した。ATP 合成効率は F₁: $\alpha_3\beta_3\gamma$ よりも F₁: $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ の場合の方が高く、それは 100% に達するほどであった。このことから、これまで触媒の最小単位と考えられていた F₁: $\alpha_3\beta_3\gamma$ は、少なくとも 10Hz で ATP 合成反応する時には ϵ を必要とすることが示唆された。

Y.Rondelez, T.Nakashima, G.Tresset, Y.Yamada, H.Fujita, S.Takeuchi, H.Nc : Highly coupled ATP synthesis by single F₁ molecule

3P142

F₁-ATPase における ATP 結合定数の角度依存性

○榎原 昇一、野地 博行 (東大・生研)

F₁-ATPase は、ATP を加水分解する際に、中心の γ サブユニットがそれぞれの 3 つの α , β サブユニットを軸受けとして回転する分子モーターである。その回転に必要なトルクは触媒部位である 3 つの β サブユニットが順番に ATP を加水分解することにより発生している。そのため回転は ATP 濃度が低い場合、 β サブユニットが ATP 結合を待たねばならないため

120° 間隔のステップを示すようになる。さらにその 120° 間隔のステップは 80° 間隔と 40° 間隔のサブステップに分かれることが観察されている。先に生じる 80° サブステップは ATP 結合によって誘起され、後に起こる 40° サブステップは生成物 (ADP もしくはリン酸) の解離によると考えられている。ATP 結合によって回転が起こるならば、回転とともに β が ATP を強く結合することが予想される。このことを検証するために一分子回転実験によってさまざまな角度における ATP 結合の確率を測定し、そこから ATP 結合定数の角度依存性を調べた。実験は F₁ 分子をガラス基板上に固定させ、磁気ビーズを γ サブユニットに結合させて行った。磁気ビーズを用いることにより、外部磁場で γ サブユニットの向きを制御することが可能となる。すると任意の時間だけ任意の角度に γ サブユニットを向かせ、磁場を切ったときの挙動から ATP が結合したかどうかを知ることができる。具体的にはステップ待ちの角度からある方向に向かわせ、一定時間後に磁場を切ったら次のステップ待ちの角度へ進めば ATP が結合したことを意味し、元のステップ待ちの角度に戻れば ATP が結合しなかったことになる。これまでステップ待ちの角度から逆方向に向かせると ATP が結合しにくくなり、順方向に向かせると結合しやすくなる傾向が見えてきている。発表ではこのような実験の進展を報告する。

S. Sakakihara, H. Noji : Angle dependency of ATP-binding constant of F₁-ATPase

3P144

F₁ モーターに結合した基質の加水分解速度は γ サブユニットの角度に依存する

○渡邊 力也¹、島袋 勝弥²、吉田 賢右²、野地 博行¹ (¹ 東大生産研、² 東工大・資源研)

ATP 駆動回転のモデルでは、F₁ モーターは 1 回の ATP 加水分解で 120° ステップする回転モーターである。ATP 結合に伴った 80° サブステップをした後、この角度で ATP の加水分解と ADP + Pi の解離をする。そして、その反応に伴って 40° のサブステップをするとされている。細胞内では、F₁ モーターはもう 1 つの回転モーターである F₀ と結合し、これによって逆回転し ATP を合成している。それでは γ を逆回転させたとき、どの角度で F₁ モーターは ATP を合成するのであろうか? そこで、ATP の加水分解/合成反応の角度依存性を調べようと考えた。1 分子レベルで計測する為には平均 1 msec で起こる加水分解を遅くする必要がある。そこで、変異型 F₁ モーター $\alpha_3\beta$ (E190D)₃ γ と加水分解に時間のかかる ATP アナログ (ATP γ S) を組み合わせ、回転計測を行うことにした。この組み合わせで計測した場合、野生型 F₁ モーター ($\alpha_3\beta_3\gamma$) に比べ加水分解の速度は非常に遅く、その時定数は 9.0sec である。この生化学的反応と γ の角度との相関関係を調べる為、磁気ピンセットで γ の角度を強制的に変化させた時の挙動を解析した。ATP γ S の加水分解待ちで停止している位置より、 γ を回転方向に動かして短時間ホールドし、そしてリリースすると、直ちに次のステップまで回転した。これは、ホールドしている間に ATP γ S が加水分解されたことを意味する。また、回転方向と逆に動かして長時間ホールドし、そしてリリースすると、元の回転角度に戻り、その後平均 9sec を経てステップした。これは、ホールドしている間に ATP γ S が加水分解されなかったことを意味する。このことから、ATP γ S の加水分解速度は γ の角度に依存することが分かった。現在、これらの厳密な測定を行っている。本発表ではこれらの進展について報告する。

R.Watanabe, K.Shimabukuro, M.Yoshida, H.Noji : F₁ modulates the rate of ATP hydrolysis reaction depending on the angle of gamma subunit.