2P177

V-ATPase F サブユニットの構造とその機能

牧尾 尚能^{1,2}、岩田 想²、吉田 賢右^{1,3}、○横山 謙¹ (¹ 科学振興機構 ERATO ATP システム、² Imperial college、³ 東京工業大学資源化学研究所)

V-ATPase/synthase は、真核生物においてはプロトンポンプとして、一部の原核生物ではナトリウムポンプもしくは ATP 合成酵素として働く生体内で最も重要な酵素の一つである。我々は3年前 V-ATPase が F-ATPase/synthase 同じく回転機構で働く分子モーターであることを証明し、かつ中央回転軸にソケット様構造をもつ特徴的なサブユニットが存在することもあわせて明らかにした。今回、中央回転軸を構成するサブユニット F の結晶構造を解くことができたのでこれを報告する。 サブユニット F は典型的な α/β 構造をもつタンパク質であった。類似性を指摘されていた F-ATPase ϵ サブユニットとまったく似ておらず、対照的に大腸菌の鞭毛モーターの調節因子である CheY と明確な構造的相同性を示した。CheY は、'活性中心'にあるアスパラギン酸残基がリン酸化されることにより鞭毛モータータンパク質のひとつである FlmM に結合し、鞭毛モーターの回転の向きを変える。おもしろいことにサブユニット F にも同様の構造モチーフが保存されていた。またホロ酵素中のサブユニット F のヌクレオチド依存的な構造変化が 1 分子 FRET 実験で検出された。以上の結果は、サブユニット F が V-ATPase の活性制御において中心的役割を果たしていることを示している。

H.Makyio, S.Iwata, M.Yoshida, and K.Yokoyama : Structure of central stalk subunit F in V type ATPase/synthase

2P179

ヌクレオチドが結合・解離しやすい F₁-ATPase の γ の角度

○足立 健吾¹、西坂 崇之²、野地 博行³、伊藤 博康⁴、大岩 和弘⁵、吉田 賢右⁶、木下一彦¹ (¹ 早大・理工、² 学習院・理、³ 阪大・産研、⁴ 浜松ホトニクス&CREST、⁵ 関西先端研究センター、⁶ 東工大・資源研)

F₁-ATPase は回転分子モーターである。3つの β サブユニットにおいて ATP を加水分解するとき、中央の回転子 γ サブユニットを反時計回りに回転する。また、すでによく知られているようにこの分子は可逆モーターであり、 γ が時計回りに人為的に逆回転されると、ADP と無機リン酸から ATP を合成する。 γ の向きに依存した ATP と ADP のアフィニティの違いが ATP 加水分解や ATP 合成を制御しているのである。本研究では、ヌクレオチドが結合しやすいまたは解離しやすい γ の角度を、蛍光性ヌクレオチドを用いて直接 1 分子で測定することを目的としている。

γ の回転角度は γ に付けた磁性ビーズを外部磁場によって任意の方向に回転させることで操作し、同時に Cy3-ATP (または Cy3-ADP) の結合・解離を全反射照明を用いた 1 分子蛍光から観察した。100 nM ATP と 100 nM Cy3-ATP 存在下において、分解方向への回転では、Cy3-ATP の結合から解離までの γ の回転角度は以前の結果と同じように $\sim 240^\circ$ であった。一方、合成方向への回転では $\sim 70^\circ$ であった。また、Cy3-ATP の結合・解離しやすい角度は、加水分解方向への回転のときはどちらも ATP 待ちの角度から分解方向に 30° 付近であった。合成方向への回転のときは ATP 待ちの角度から分解方向に 40° 付近で結合しやすく、合成方向に 30° 付近で解離しやすいようであった。今回、ATP が最も結合しやすい角度は ATP 待ちの角度ではなく約 30° 分解方向にあり、ATP の結合頻度は 3 倍程度高くなることが分かった。今後、ビーズの角度精度や測定条件を更に検討し、データの信頼性を調べる予定である。また、ATP だけでなく ADP の結果についても報告したい。

K.Adachi, T.Nishizaka, H.Noji, H.Itoh, K.Oiwa, M.Yoshida, K.Kinosita, Jr. : The affinity of nucleotide for F₁-ATPase depends on the angle of the γ subunit

2P178

回転分子モーター V₁ の回転メカニズムは F₁ とは異なる

○今村 博臣¹、武田 泉穂²、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)

V₁ は液胞型 ATPase (V-ATPase) の水溶性部分で、F₁ と同様の ATP 駆動型回転分子モーターである。どちらの回転モーターも ATP の加水分解に伴って中心軸となるサブユニットが 1 方向に回転する。我々は今回、V₁ の回転メカニズムを調べるために回転軸を形成するサブユニットの 1 つである D サブユニットにプローブとなるビーズをつけ、その回転を解析した。ATP 低濃度において V₁ は 120° ステップしながら回転し、ステップの待ち時間の解析から 1 つの ATP の結合によって 120° 回転する事がわかった。 120° ステップの速度から求めた V₁ のトルクはおおよそ 35 pN nm で、F₁ よりもわずかに低く算出された。次に、非常にゆっくりと加水分解される ATP アナログである ATP γ S を基質に用いたところ、ATP γ S の加水分解待ちと考えられる停止が現れ、 120° ステップしながら回転した。F₁ の場合は ATP の結合の後 80° 回転してから ATP の加水分解が起こるが、V₁ では ATP γ S の加水分解待ちの停止位置は ATP 結合待ちの停止位置と同じであった。この結果は V₁ と F₁ の回転メカニズムが異なることを示している。

H.Imamura, M.Takeda, S.Funamoto, M.Yoshida and K.Yokoyama : Rotation mechanism of V₁ is distinct from that of F₁

2P180

F₁-ATPase の回転運動における γ サブユニットの役割 — C 末側 α ヘリックスの長さとの回転の関係 —

○ Mohammad Delawar Hossain^{1,2,3}、古池 晶¹、牧 泰史⁴、足立 健吾¹、Md. Yusuf Ali²、Mominul Huq³、吉田 賢右⁵、木下一彦¹ (¹ 早大・理工、² Shahjalal Univ., Science and Technology、³ Bangladesh Univ. Engineering and Technology、⁴ 新潟大・理、⁵ 東工大・資源研)

F₁-ATPase (F₁) は、ATP 加水分解により駆動される回転分子モーターである。それぞれ 3 個の α 、 β サブユニットが交互に位置した円筒状構造の中心に、ローターである γ サブユニット (逆平行 α ヘリックスを形成し、長い方が C 末、短い方が N 末、その差は約 6 ビッチ) が深く突き刺さっている。大腸菌由来 F₁ では、 γ C 末のアミノ酸 12 個は回転にあまり重要ではなく、遺伝子操作で削除しても回転速度、回転トルク、ATP 加水分解速度に与える影響は少ないことが示されている [2]。一方、 β サブユニットのキャッチループとの相互作用が予想されるアミノ酸 (γ C 末から 18,19 番目) を変異させた場合、ATP 加水分解速度が野生型に比べて激減するため [3]、 γ C 末には ATP 加水分解に重要なアミノ酸配列領域も存在することがわかる。

私たちは、好熱菌由来 F₁ の γ C 末の長さとその回転運動との関係を知るために、 γ C 末からアミノ酸 14 個と 17 個削除した変異体 (N 末との長さの差はそれぞれ約 2 ビッチと約 1 ビッチ) について調べてきた (前年会 3P141)。ATP 加水分解速度も回転トルクも野生型のそれより数割減少するだけで、大きな影響がないことがわかった。今回は、さらに γ C 末のアミノ酸を削除し、 β サブユニットのキャッチループとの相互作用部分を持たない変異体が、滑らかではないが回転できることを確認した。現在、この変異体の回転トルク、ATP 加水分解速度について詳しく調べている。年会ではその進展を報告する。[1] Menz *et al.*, *Cell*, 106, 331 (2001). [2] Muller *et al.*, *J.Biol.Chem.*, 277, 23308 (2002). [3] Greene *et al.*, *J.Biol.Chem.*, 278, 51594 (2003).

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