

静的・動的X線結晶構造解析による生体分子モーターF₁-ATPaseの 反応素過程構造の決定と力発生の分子機構

¹東大院・工、²東工大・化学生命研、³京産大・総合生命、⁴阪大・蛋白研
⁵高輝度光科学研究センター(JASRI)、⁶理研・SPRING8センター、⁷早大・物理
○鈴木 俊治^{1,2,3}、山下 栄樹⁴、馬場 清喜⁵、平田 邦生⁶、飯田 直也⁷
遠藤 斗志也³、熊坂 崇⁵、久堀 徹²、吉田 賢右³、野地 博行¹

Power-generation mechanism of rotary molecular motor F₁-ATPase by static and dynamic X-ray crystallographic studies

○Toshiharu Suzuki^{1,2,3}, Eiki Yamashita⁴, Seiki Baba⁵, Kunio Hirata⁶, Naoya Iida⁷, Takashi Kumasaka⁶, Toru Hisabori², Toshiya Endo³, Masasuke Yoshida³ and Hiroyuki Noji¹
¹Dept of Applied Chem, Graduate School of Eng, The Univ of Tokyo,
²CLS, Inst of Innovative Res, Tokyo Inst of Tech, ³Dept of Mol Bio, Kyoto-Sangyo Univ,
⁴Inst of Protein Res, Osaka Univ, ⁵Japan Synchrotron Radiation Res Inst (JASRI),
⁶SPRING8-center, Riken, ⁷Dept of Physics, Waseda University

【Abstract】 F₁-ATPase (F₁, hereafter) is a rotary molecular motor driven by ATP-hydrolysis. To reveal its physical-power generation mechanism, we established two analytical systems, static and dynamic X-ray crystallographic systems, by using recombinant bovine F₁. The studies provided various rotation interim snapshots for elementary steps of release of product phosphate and ADP. The former structures identified stepwise rotation of rotor and widening of the phosphate binding pocket during phosphate release at atomic level. Sequence of the structural transition was further confirmed by our dynamic time-divided X-ray crystallographic study. The ADP-releasing intermediate structures unveiled a dynamic conformational rearrangement in the catalytic subunit (especially at p-loop) for ADP release. These results provide one of power-generation mechanisms that elastic energy accumulated inside protein molecule, originally provided by ATP-binding, is released by the trigger of the phosphate release and converted into the physical power to drive rotation.

【序】 生体分子モーターは、ATPの加水分解により力学的エネルギーを発生させるユニークな蛋白質であり、細胞内で筋収縮など重要な役割を担っている。その力発生機構の解明は生体分子モーター研究の最重要研究課題であるが、研究の多くは反応素過程前後の分子状態の比較から力発生過程を推定する事に限られており、肝心の力を発生している瞬間である素過程進行中の分子状態は、今だ良く判っていない。

F₁-ATPase(以後F₁)はF₀F₁-ATP合成酵素の部分複合体であり、ATP加水分解により回転力を発生させる回転分子モーターである。約50kDaの回転子サブユニットが330kDaのリング状の固定子の中で回転する。F₀F₁-ATP合成酵素を用いた研究により、その回転を介したエネルギー変換効率はほぼ100%である事から[1]、F₁もATP加水分解反応と力発生が高度に共役している分子モーターと考えられる。ヒト由来F₁を用いた顕微鏡一分子回転分析から、そのATP結合、ATP加水分解、リン酸解離の素過程でそれぞれ、65°、30°、25°回転子が回転する事がわかっているが[2]、それらの素過程に蛋白質内で何が起きているかはほとんど分かっていない。そこで近年我々は、新しくウシF₁の顕微鏡一分子観察システムとX線結晶構造解析システムを確立した[3]。そして今回、通常の静的な結晶構造解析法と新しく確立した動的結晶構造解析法を駆使し、生成物リン酸及びADPの解離過程の中間体構造の決定を行った。そして生体分子モーターの素過程進行中の構造変化を原子レベルで明らかにすることにより、蛋白質が力学的エネルギーを発生する仕組みを解明する事を試みた。

【方法・結果・考察】

1. 静的結晶構造解析による回転中間体構造の入手

ATP アナログ AMPPNP 存在下、チオリン酸(リン酸アナログ)や ADP の有無の条件で結晶を作成し構造解析を行った(SPring8 BL32XU、BL38B1、BL41XU、BL44XU、PF BL17A)。その結果、回転子の角度が最大 20 度異なる 5 種のリン酸解離中間体構造(チオリン酸結合型 2 種とチオリン酸が非結合型 3 種)と、2 種類の ADP 解離中間体構造を得た。

2. 動的結晶構造解析による回転中間体構造の入手

チオリン酸結合型構造の結晶を、チオリン酸が入っていない溶液で洗浄後、様々な時間インキュベート後、液体窒素で凍結し分子状態を固定した。そして回折データを入手し構造決定を行った結果、驚くべきことにインキュベーション時間が長くなるにつれ、回転子が結晶中で段階的に回転していく様子が観測された。この結果は、このウシ F₁ 結晶システムは、結晶を崩壊させずに約 500 残基もの回転子サブユニットが結晶中で回転できる事を示している。得られた回転中間体構造は、上記の静的構造解析により得られた構造と酷似していた事から、これらの中間体構造はリン酸解離過程を正しく検出していることが示唆された。

3. 明らかになったリン酸解離駆動の回転力発生機構

得られた中間体構造の比較から以下のような回転力発生機構が明らかになった。触媒サブユニット β_{emp} は、隣の α_{emp} サブユニットら伸びているアルギニンフィンガー残基と、チオリン酸を介して相互作用し引きつけられている。チオリン酸が解離するとその相互作用が消失し、両サブユニットが離れることにより間に隙間が発生するが、その空間は回転軸サブユニットが回転方向に変位しながら入り込んで安定化される、その結果回転力が発生する事が明らかになった。興味深いことに、チオリン酸が外れた部位には、複数の水分子による特殊な構造体を段階的に形成そして崩壊させていく事により、触媒部位の構造変化とそれによる回転子の回転を段階的に発生させている事が判明した。F₁ はパワーストロークモーターと考えられ、安定な力発生のためには準安定な回転中間体状態が存在する事が提唱されている事から、この中間状態の存在は非常に興味深い。また、分子が小さく相互作用数も少ないリン酸が回転トルクを発生させる仕組みは謎であったが、今回の結果は、F₁ 分子は ATP 結合により分子内に蓄積された弾性力のエネルギーを、リン酸解離のトリガーにより開放する事により、回転力を発生させる分子機構を示唆している。

4. では、ADP 解離の素過程はどうなっているのか?

以前の顕微鏡一分子観察から得られたヒト F₁ の回転スキームでは、リン酸解離前には生成物 ADP の解離が起きる。ADP とチオリン酸を使った結晶構造解析の結果、ADP 解離中間体構造を 2 種類決定する事に成功した(1.80Å と 1.99Å)。構造の比較から、ADP が触媒サブユニットのヒンジ構造と p-loop 構造の変化を伴い、結合位置をスライドさせながら解離していく分子機構が示唆された。しかし興味深いことに、ADP の解離では回転子は回転しないようである。この結果から新しく分かる事を、顕微鏡一分子解析から得られたヒト F₁ の回転スキームを参照しながら議論したい。

【参考文献】

- [1] N. Soga, K. Kimura, K. Kinoshita Jr., Yoshida M, T. Suzuki, *Proc Natl Acad Sci USA*, **114**, 4960-4965 (2017)
- [2] T. Suzuki, K. Tanaka, C. Wakabayashi, E. Saita, M. Yoshida, *Nature Chem Biol*, **10**, 930-936 (2014)
- [3] T. Suzuki, N. Iida, J. Suzuki, Y. Watanabe, T. Endo, T. Hisabori, M. Yoshida, *FEBS Open Bio*, **6**, 1267 (2016)