

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

H⁺-ATP 合成酵素のエネルギー変換機構と そこにおけるソフトな相互作用

阿久津 秀雄, 八木 宏昌, 藤原 敏道

多くの生物種に普遍的に存在する H⁺-ATP 合成酵素のエネルギー変換機構を F₁ では β サブユニットの役割, また, F₀ では c サブユニットの役割に注目しつつ述べた. ヌクレオチド結合に伴う β サブユニットの開構造から閉構造への変化は β に固有のものであり, ヌクレオチドの結合が水素結合のスイッチングを引き起こすことにより駆動される. これは回転の駆動力の一つともなるものであるが, 可逆過程としての柔軟性も保持している. サブユニット c-リングでは必須酸性アミノ酸のプロトン脱着に伴う側鎖反転がプロトン移動と回転を結びつける. c-リングと膜脂質はお互いを異種と識別しないようなマッチングの好い関係にあることが明らかになった. これらを基礎に, 回転を駆動するサブユニット間のソフトな相互作用について考察した.

1. はじめに

生物に最も広く存在しているエネルギー変換系の一つが H⁺-ATP 合成酵素である. この酵素は生体膜 (原核生物では形質膜, 真核生物ではチラコイド膜やミトコンドリアの内膜) に存在し, 電子伝達系等により形成された膜を横切ったプロトン濃度勾配を利用して ATP を合成する. H⁺-ATP 合成酵素は図 1 に示すように触媒部位を持つ膜表面性の F₁ ドメイン (α₃β₃γ₁δ₁ε₁) と, プロトンチャンネルを形成する膜内在性の F₀ ドメイン (a₁b₂c₁₀₋₁₄) から構成される. この酵素がユニークなのは触媒反応がサブユニットの回転と共役している点である. これは Boyer らによって提案され, 吉田・木下らによって証明された¹⁾. F₁ は F₀ から外れて水に可溶性な ATP 分解酵素となるため, 回転と触媒反応の関係が最もよく研究されている. α₃β₃ リングは固定

され, その中央を貫く γ サブユニットが回転する. この回転は F₁ の疑似 3 回対称性を反映して, 120° を 1 ステップとしており, その中にはさらに (80° + 40°) の二つのサブステップからなっているといわれている²⁾.

回転のメカニズムについては結晶構造と 1 分子解析が重要な情報を与える. Walker らが報告したミトコンドリア

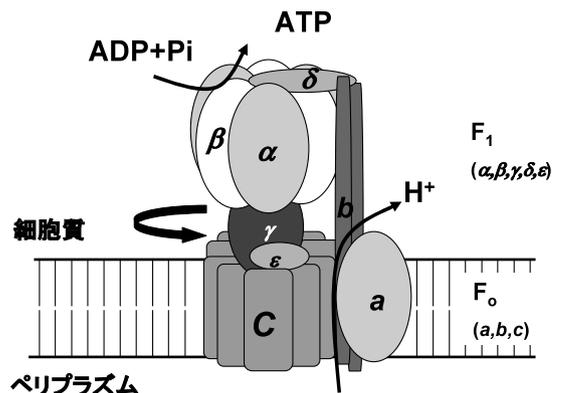


図 1 ATP 合成酵素の模式図

バクテリアでは膜表面性の F₁ 部分は α₃β₃γ₁δ₁ε₁ のサブユニットで構成されており, ATP の合成, 分解に共役して γ が回転する. 膜内在性の F₀ 部分は a₁b₂c₁₀₋₁₄ のサブユニットで構成されており, プロトン移動と共役して c-リングが回転する.

大阪大学蛋白質研究所 (〒565-0874 吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的研究施設)

Energy conversion mechanism in H⁺-ATP synthase and the role of soft interactions

Hideo Akutsu, Hiromasa Yagi and Toshimichi Fujiwara (Institute for Protein Research, Osaka University, OLABB, 6-2-3 Furuedai, Suita 565-0874, Japan)

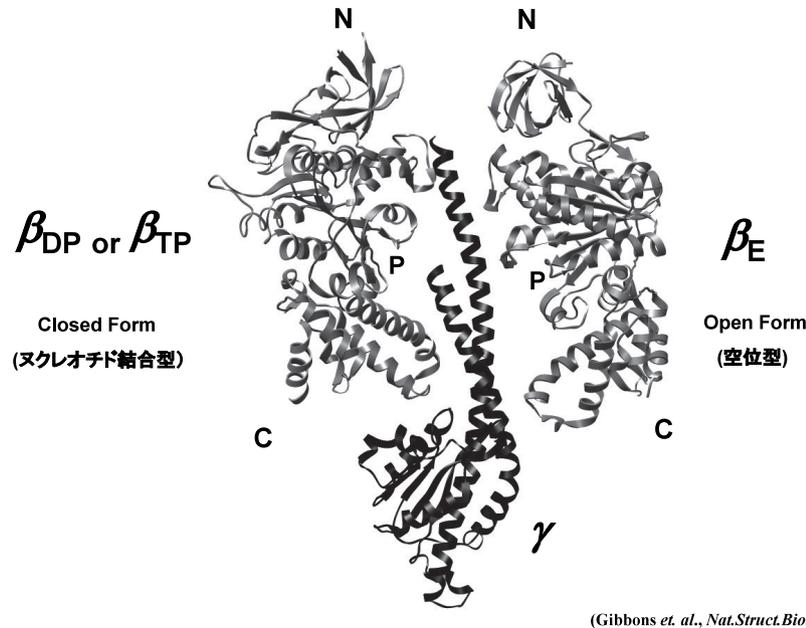


図2 ミトコンドリア (M) F_1 ATPase の結晶構造
 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の構造から γ を中心に β を 2 分子示した. AMPPNP 結合 β サブユニット (β_{TP}) と, ADP 結合 β サブユニット (β_{DP}) は閉構造を, 非結合 β サブユニット (β_E) は開構造をとっている. N, C, P はそれぞれ N 末端, C 末端, P ループを示す.

(M) F_1 の X 線結晶構造³⁾を見ると F_1 中の三つの α サブユニットはほとんど同じ構造をとっているのに対して三つの β サブユニットはヌクレオチドの結合に依存して構造が異なっている (図 2). ヌクレオチドが結合している β_{TP} (ATP アナログが結合) と β_{DP} (ADP が結合) は触媒部位が閉じた構造 (closed form) をとっているが, 何も結合していない β_E は開いた構造 (open form) をとっている. この β サブユニットの構造変化が回転に密接に関係していると考えられている. 本稿ではリガンドと β サブユニット, サブユニット間の相互作用という観点からこの回転を考えてみたい.

一方, F_0 では c サブユニットからなるリングが回転する. F_0 全体の結晶構造はまだ報告されていない. c -リングについてはナトリウムをポンプするバクテリア *Ilyobacter tartaricus* のもの⁴⁾と類縁の V 型 Na^+ -ATPase (*Enterococcus hirae* 由来) の K-リング⁵⁾の結晶構造が報告されている. プロトン移動と c -リング回転の共役についてはいくつかのモデルが提案されているが, F_1 に比べるとかなり研究が遅れている. 本稿の後半ではわれわれの見解も含めて, プロトン移動と回転の共役のメカニズムとこれを支える膜環境について考えてみたい.

これらの回転運動は特異なサブユニット間の相互作用によって支えられている. 最後にこのようなサブユニット間相互作用の特徴について考えてみたい. なお, 本稿では好熱菌 (thermophilic *Bacillus* PS-3) 由来の ATP 合成酵素を中心的に取り扱うので, 特に断らない限りアミノ酸配列の

番号は PS-3 由来のものを用いる.

2. H^+ -ATP 合成酵素 F_1 の回転における β サブユニットの役割

2.1. 区分同位体標識による β サブユニットの NMR 解析

MF_1 の結晶構造では三つの β サブユニットの構造が異なっており, それが回転のメカニズムと関係すると示唆された (図 2). これらの構造は β サブユニット固有の性質を反映しているのであろうか. あるいはまわりからの強制として実現しているものであろうか. 前者であれば, β の構造変化は回転の駆動力となりうる. そこで, β サブユニット単量体にヌクレオチドが結合することで結晶の中で見られるような構造変化が起きるかどうかを NMR で調べた⁶⁾. しかし, β サブユニットは分子量が 5 万を越えるため, NMR にとっては厄介な相手である. まずは構造変化の特徴に注目した. β サブユニットは β シートバレルからなる N 末端ドメイン, 真ん中のヌクレオチド結合ドメイン, α ヘリックスを多く含む C 末端ドメインからなる (図 2). MF_1 の結晶構造を見ると β_{TP} と β_E の違いはヌクレオチド結合ドメインの P ループ (ヌクレオチドの結合モチーフ) およびその周辺に集中している. これとの比較として, 溶液中での β サブユニット単量体における構造変化パターンを得るために全てのアミノ酸からの化学シフト情報を得ることを目指した. そのためには特別な工夫が必要である. このように大きなタンパク質では二次元 NMR スペクトルを測定しても線幅が広く, シグナルの重なりが多い

ために、個々のアミノ酸残基の情報を得ることができない。そこで、シグナルの数を減少させて分解能を上げる区分安定同位体標識法を用いた。区分標識法では473残基のアミノ酸のうち、1-124, 1-271, 272-473, 391-473部分のみをそれぞれ ^2H , ^{13}C , ^{15}N で標識した。高分子用に開発された二次元 ^1H , ^{15}N TROSY スペクトルを測定すると、**図3**に示すようにそれぞれ高分解能のスペクトルを得ることができた⁶⁾。これを用いて9割程度のシグナルの帰属が可能となった。

次にこれらのスペクトルをヌクレオチドの存在下と非存在下で比較した。すると、化学シフトの変化はヌクレオチド結合ドメインの一定部分に集中しており、N末端およびC末端ドメインにはほとんど見られないことが分かった。この領域は F_1 の結晶構造において β_{TP} , β_{DP} と β_{E} の間に見られる構造変化領域と一致する。このことは溶液中の β サブユニット単体でも、ヌクレオチド結合が開構造から閉

構造への変化を起こすことを示唆するものであった。しかし、これを直接証明するためにはドメイン間の相対配向角を決定する必要がある。

2.2. 残余双極子相互作用によるドメイン間の相対配向角の決定

ドメイン間の配向角を決定するためには残余双極子相互作用 (residual dipolar coupling (RDC)) を用いた⁶⁾。RDCの測定はN末端では1-124残基、C末端では391-473残基が選択標識された β サブユニットを使用した。各ドメインの相対配向角をMgADP存在下と非存在下で求めた。**図4A**にその結果を示す⁶⁾。比較のために**図4B**に MF_1 結晶構造の β_{E} と β_{DP} について計算した配向角を示す。N末端ドメインを完全に重ねて、フリーの β 単量体と β_{E} のC末端ドメインを399-409のヘリックス軸で比較するとおよそ 5° の違いしかなかった。誤差範囲を考慮にすれば両者

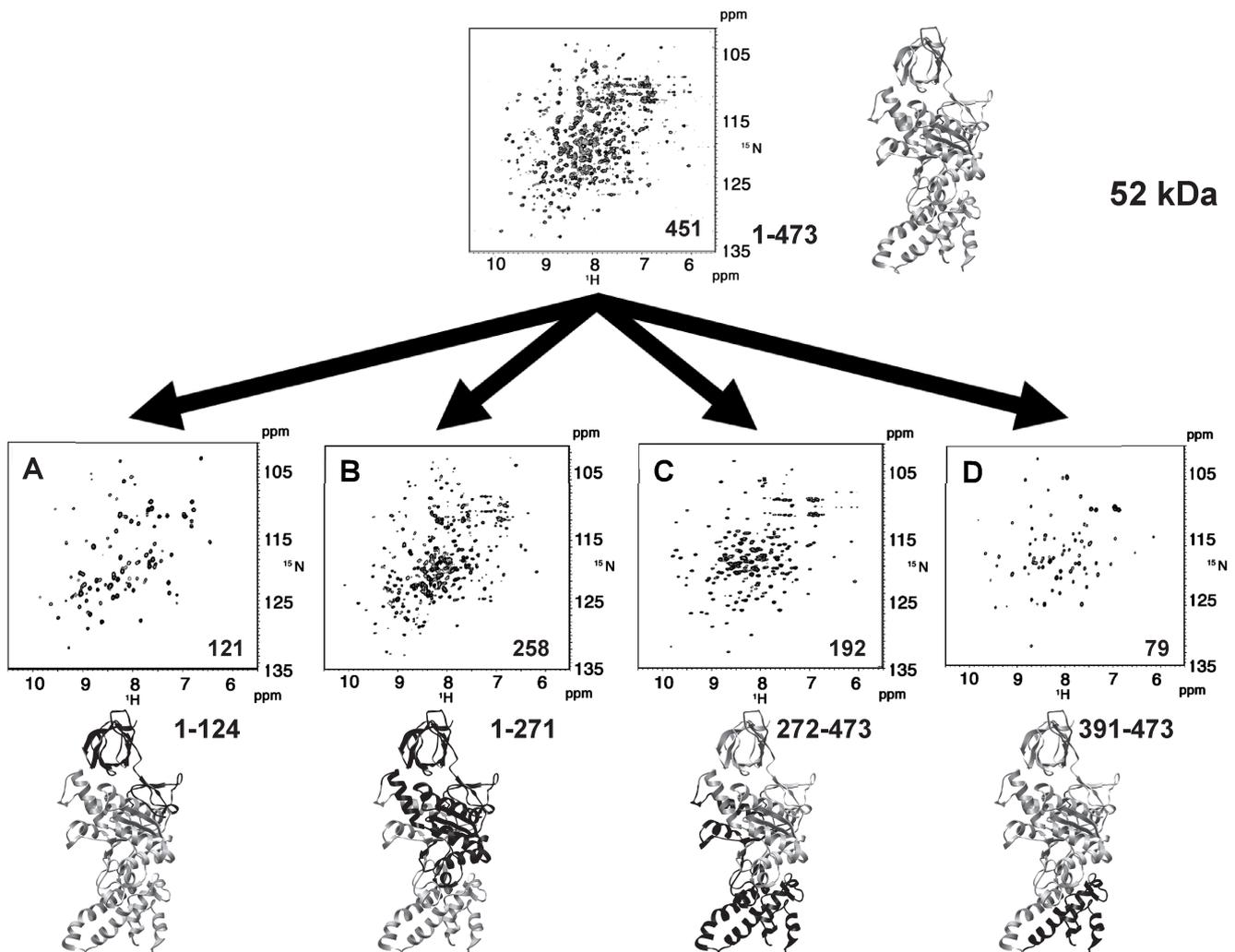


図3 区分安定同位体標識による ^1H , ^{15}N 相関 NMR スペクトルの高分解能化

上は均一に ^{15}N 標識した β サブユニットの ^1H , ^{15}N TROSY スペクトル。473残基から451個のシグナルが期待される。下は区分安定同位体標識試料のスペクトル。標識部位を残基番号(図では黒)で示した。

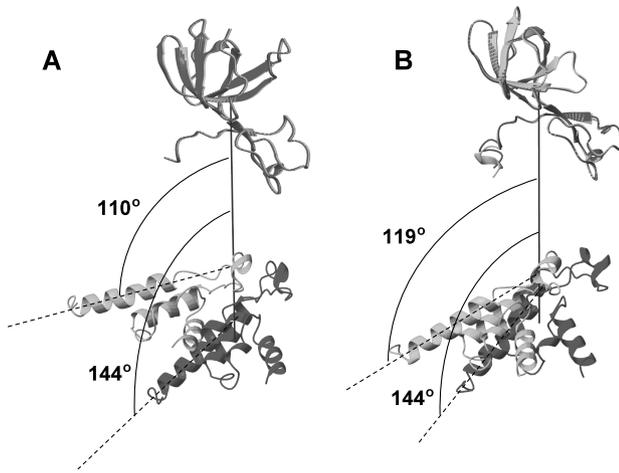


図4 β サブユニットN末端ドメインとC末端ドメインの相対配向

A, NMRで決定された β 単量体の相対配向角⁶⁾. ヌクレオチド結合がない場合(黒)とADPが結合した場合(灰色)の配向角. N末端どうしを重ね合わせた. N末端とC末端の重心を結んだ直線との角度で表している. B, MF₁結晶構造³⁾の β_E と β_{DP} でAと同一残基にあたる部位の重ね合わせを示した. 角度の定義はAと同じ.

は β_E と同じ構造をとっていると言ってもよい. つまり β サブユニットは単量体でもヌクレオチドがなければ開構造をとることを示している. 次に溶液中でのADP非存在下と存在下での相対配置を比較すると399-409ヘリックス軸と両ドメインの重心を結ぶ線の角度はそれぞれ144°と110°であった. 一方, 複合体結晶中での β_E と β_{DP} を同じヘリックス軸で比較すると, それぞれ144°と119°であった. この結果から溶液中の単量体でも結晶中と同じような開構造から閉構造への変化が起こっていると結論できる.

したがって, ヌクレオチド結合による開/閉構造変換は β サブユニット固有のものであり, 構造変化にはエネルギーを必要としないことが分かる. この β 固有の性質はF₁回転の重要な駆動力になる.

2.3. β サブユニットの開閉構造変換の駆動メカニズム

ヌクレオチドによる構造変化はどのような機構で引き起こされるのであろうか. ミトコンドリアF₁(MF₁)の結晶構造の触媒部位における水素結合ネットワークを開構造と閉構造で比較すると特徴的な相違がある. Pループ主鎖とリン酸基の水素結合は最も基本的な違いであるが, これはグローバルな変化を引き起こすのは困難である. これ以外には以下のようなものが上げられる. 既述のようにアミノ酸配列番号は好熱菌PS-3のものを用いている.

- Lys164の側鎖アミノ基は開構造ではAsp252の側鎖カルボキシル基と水素結合しているが, 閉構造ではリン酸基およびGly158のカルボニルと水素結合している.
- Thr165の側鎖水酸基は開構造ではGlu201の側鎖カル

ボキシル基と水素結合しているが, 閉構造ではAsp252の側鎖カルボキシル基と水素結合している.

c) Ala160の主鎖カルボニルとAsp311, Arg333の側鎖は開構造では水素結合を作っていないが, 閉構造ではArg333を仲介として水素結合で結ばれている.

これらの水素結合はいずれもPループ領域の構造変化と結びついており, ヌクレオチド結合による開構造から閉構造への変化に直接関与している可能性がある. そこで, これらのアミノ酸を主にアラニン置換し, どの水素結合が重要であるかを調べた.

図5AにK164Aの変異を導入した β サブユニットのチロシンシグナルの一次元スペクトルを示す. ATPアナログであるMgAMPPNPで滴定するとTyr341のシグナルは変化するが, 他のシグナルは全く変化しない. 前者はアデニン環の環電流によるものであるのでヌクレオチドは結合する(解離定数は $1 \times 10^4 \mu\text{M}$, 図5B)が, 開/閉構造変換は起こらないことを示す. 同じ変異を持つ区分標識試料を用いて詳しく調べると図5Bのようにアデニンポケット部分だけに化学シフトの変化が見られた. β サブユニットだけではATP分解活性を持たないが, $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体になるとほぼ完全な活性を持つ. そこで, 変異 β を含む複合体を再構成して活性を測定するとほとんど観測されなかった. したがって, Lys164は β サブユニットが構造変化を起こすために必須であるとともに, 回転触媒反応のためにも必須であることが分かる. Thr165, Asp252, Asp311, Arg333についてもアラニン置換の実験を行った. T165A, D252Aではヌクレオチドの解離定数は野生型とほとんど変わらないが, 構造変化と活性はK164Aと同じくほとんど失われていた. 一方, D311A, R333Aはヌクレオチド結合にも, 構造変化にもほとんど影響を与えていない. したがって, この二つの残基に関わる水素結合ネットワークは本質的な役割を果たしていないと結論できる.

構造変化にとって必須な残基であるLys164, Thr165, Asp252は実は上記a), b)の水素結合変化で相互に深く関わっている. Asp252がキーとなり, 開構造ではLys164と, 閉構造ではThr165と水素結合を形成する. すなわち, 水素結合のスイッチングが起こっている. このスイッチングを引き起こしているのはヌクレオチド結合によるリジン側鎖(Lys164)とリン酸基の水素結合形成である.

このようにヌクレオチド結合によるサブユニット β の構造変化はリン酸基のPループへの結合を引き金として, まずLys164の側鎖がAsp252からリン酸基に移動し, PループのGly158と水素結合をする. 次にThr165側鎖がAsp252と水素結合をつくる. リジンに比べるとスレオニンの側鎖は3C-C結合分短くなるので, C末端ドメインはヌクレオチド結合ドメインに引き寄せられることになり, 閉構造を形成することになる.

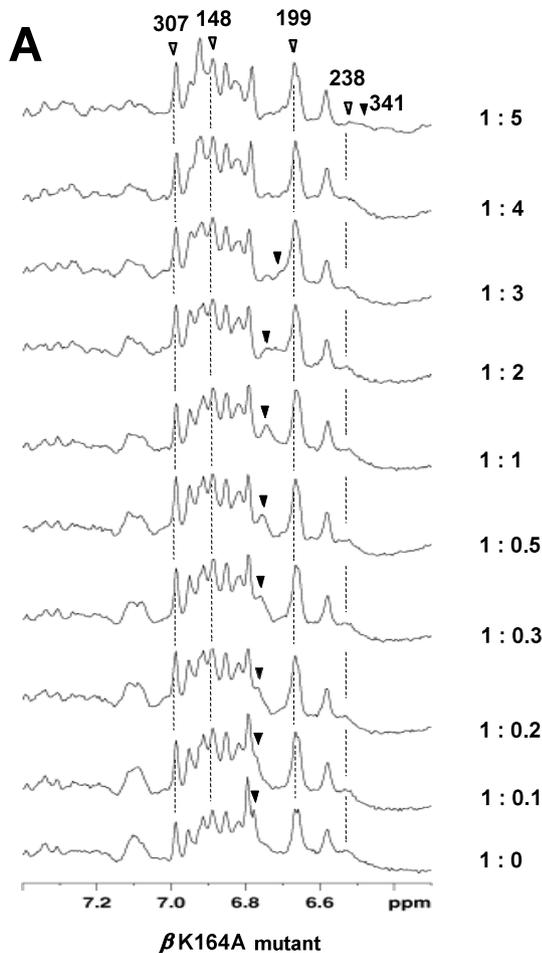
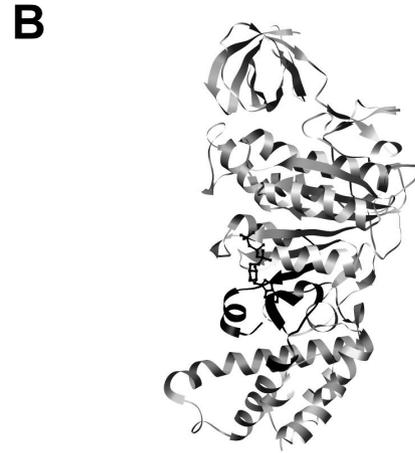


図5 スクレオチド結合の変異体 β (K164A) への影響

A, β サブユニット単体の ^1H NMR スペクトルと Mg-ADP による滴定. 選択的標識によりチロシンの芳香環シグナルだけが見えている. 帰属された残基番号が上に示されている. Tyr341 のみがシフトしているが, これはアデニン環とのスタッキングによる. このシフトから求めた K_d が右の表に与えられている. B, 区分安定同位体標識法で Mg-ADP 結合により化学シフトの変化が見いだされた残基を β 結晶構造にマップした (黒で示す). アデニン結合ポケットのみが変化.



変異 β サブユニット単量体と Mg-ADP の K_d

β サブユニット	K_d
	μM
野生型	$14 \pm 1^*$
K164A	1×10^4

A^* : Odaka *et al.* J.Biochem 115 789-796(1994)

F_1 の中ではこのような構造変化が α サブユニット, γ サブユニットの存在下で起こる. 今までの MF_1 の結晶構造, TF_1 の 1 分子解析²⁾ から三つの β はそれぞれ異なった構造あるいは状態をとっていることが知られている. これらの状態が協調的に変化することによって γ サブユニットの回転が実現する. 回転が続くためには協調的な状態の変化が継続する必要がある. したがって, ここでの相互作用は結晶中での安定な複合体形成の相互作用とは本質的に異なる. 回転における相互作用は安定を目指すのではなく, 次の変化を準備する準安定的なものを目指す. このような相互作用をわれわれはソフトな相互作用と呼ぶ.

ソフトな相互作用を可能にしている要素の一つはスクレオチド結合を引き金とする水素結合のスイッチングである. これは可逆的で, スクレオチドの親和性は決して強くはない (解離定数 $15 \mu\text{M}$ 程度⁷⁾). したがって, 溶液中の β 単量体はスクレオチド存在下で開構造と閉構造の間を可逆

的に行き来している. これが β と γ サブユニットの間の相互作用を柔軟なものにする.

3. H^+ -ATP 合成酵素 F_1 におけるプロトン移動とサブユニット c -リングの回転

3.1. $F_1 c$ の溶液構造と c -リング回転モデル

次に, エネルギー変換のもう一つの重要な構成要素 F_1 におけるプロトン移動とサブユニット c -リング回転の共役について考える. ATP 合成においては電子伝達系で形成されたプロトン濃度勾配を利用して c -リングを回転させ, これに共役した F_1 の γ サブユニットを回転させることにより前章の逆反応として ATP が合成される.

好熱菌 ATP 合成酵素は酵素活性のある状態で c -リングを構成している単量体の数が 10 であることが証明されている⁸⁾. 大腸菌の F_1 (EF_1) も同じと考えられているが, *I. tartaricus* の Na^+ -ATP 合成酵素はその結晶構造⁴⁾ から 11 で

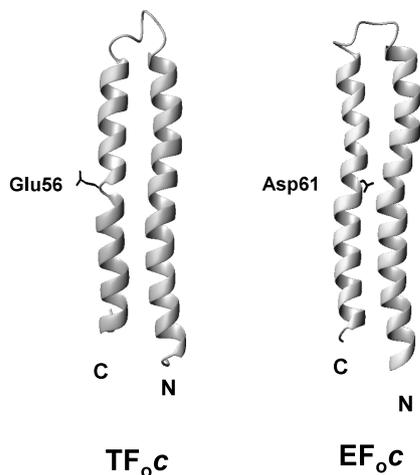


図6 好熱菌および大腸菌の *c* サブユニットの溶液構造
左, 好熱菌 (PS-3)¹⁰⁾; 右, 大腸菌⁹⁾. プロトン輸送に関係する必須酸性アミノ酸の側鎖を示した. N, C はそれぞれ N 末端, C 末端の位置である.

あることが分かっている. このように *c*-リングを構成する単量体の数は生物種によって異なっている. EF₀ の *c* サブユニット (EF_{0c}) の溶液構造は NMR で Girvin らによって決定された⁹⁾. EF_{0c} は図6に示すように2本のヘリックスからなるヘアピン構造をとっている. これが脂質膜を横断していると考えられている. そのC末端側のヘリックスの中央近くにプロトン輸送に必須なアスパラギン酸残基がある. これがプロトン化されている時と解離しているときでC末端付近のヘリックスの構造が変化することを彼らは見いだした. それを基に Girvin らは *c*-リングの回転モデルを提案した⁹⁾. それによると, F₀ のプロトンチャンネル (膜の外側と内側に開いている2本のチャンネルが *a* サブユニットあるいはその付近にあると考えられている) からプロトンを受け取ったり, 出したりする際に *c* サブユニットのC末端に近いヘリックス部分 (これは *a* サブユニットに面している) が構造変化を引き起こし, それによって *c*-リングは回転する. このモデルを検討するために, われわれは PS-3 *c* サブユニット (TF_{0c}) の有機溶媒 (クロロホルム: メタノール = 3:1) 中の構造を調べた¹⁰⁾.

TF_{0c} は EF_{0c} と同様に, ヘリックス-ループ-ヘリックスのヘアピン構造をとっていた (図6). しかし, 好熱菌と大腸菌では, プロトン輸送に必須な残基 (好熱菌では Glu56, 大腸菌では Asp61) の側鎖の向きが大きく異なっていた. われわれは Glu56 の側鎖の p*K*_a を 7.3 と決定することに成功し, この実験で用いた有機溶媒中で確かにカルボキシル基側鎖のプロトン脱着が起こっていることを確認した. そして, pH2 から pH8.5 の範囲で ¹H, ¹⁵N 相関 HSQC スペクトルの化学シフトの変化を比較したが, 構造変化に伴う変化は観測されなかった. 次に, 原子間距離など構造に関する直接的情報を与える ¹H 間の核オーバーハウザー

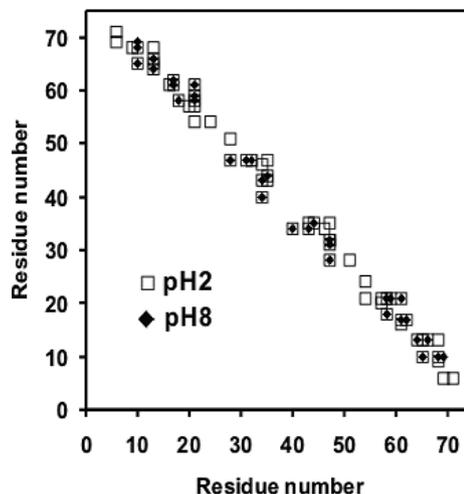


図7 pH2 と pH8 でのヘリックス間 NOE の比較
縦軸と横軸にアミノ酸残基番号が示されている. NOE が観測された (距離が 5 Å 以内の) 残基間にシンボルが示されている.

効果 (NOE) を調べた. 図7に示すように, pH2 と pH8 において二次元 NOESY スペクトルで観測されたヘリックス間距離はほとんど変わらなかった. さらに, グローバルな構造変化を起こしやすい部分は遅い (マイクロ秒からミリ秒) 運動性を示すことも知られているので, 秩序パラメータ, S^2 , ¹H-¹⁵N 異種核間 NOE, ¹⁵N 横緩和速度, R_2 のようなダイナミクスの解析を行った¹⁰⁾. 両末端とループ部分はピコ秒からナノ秒の時間スケールで, 運動性に富むことが明らかになったが, マイクロ秒からミリ秒の時間スケールで起こるドメインの回転を示唆するような結果は得られなかった. したがって, TF_{0c} は Glu56 の側鎖のプロトンの脱着に依存した構造変化を起こしていないと結論できる. 生物種によって *c*-リングの回転機構が異なるとは考えにくいので, ヘリックスの構造変化に基づく回転モデルには疑問符が付いた.

この結果に基づき, われわれは *c*-リングの新しいプロトン移動・回転機構として側鎖反転モデル (side-chain flipping model) を提案した. このモデルでは図8に示すようにプロトン運ぶグルタミン酸の側鎖がプロトン結合時には *c*-リングの内側を向き, 解離時には反転して外側を向いてプロトンをチャンネルに放出する. この脱プロトン化では *a* サブユニットに保存されている Arg169 の正電荷が重要な役割を果たしていると考えられている. カルボキシル基の脱プロトン化により負電荷を持つようになった *c*-リングは膜電位あるいはブラウン運動¹¹⁾ により駆動されて外側からプロトンを運んでくるチャンネルまで動く. そこでプロトンを受け取って -COOH になると, 側鎖は再び反転してリング内を向き, 脂質膜に入っていく. この反転によってカルボキシル基は極性を持つリングの内側で安定化され, リング表面はより疎水的になる. これにより膜の疎水

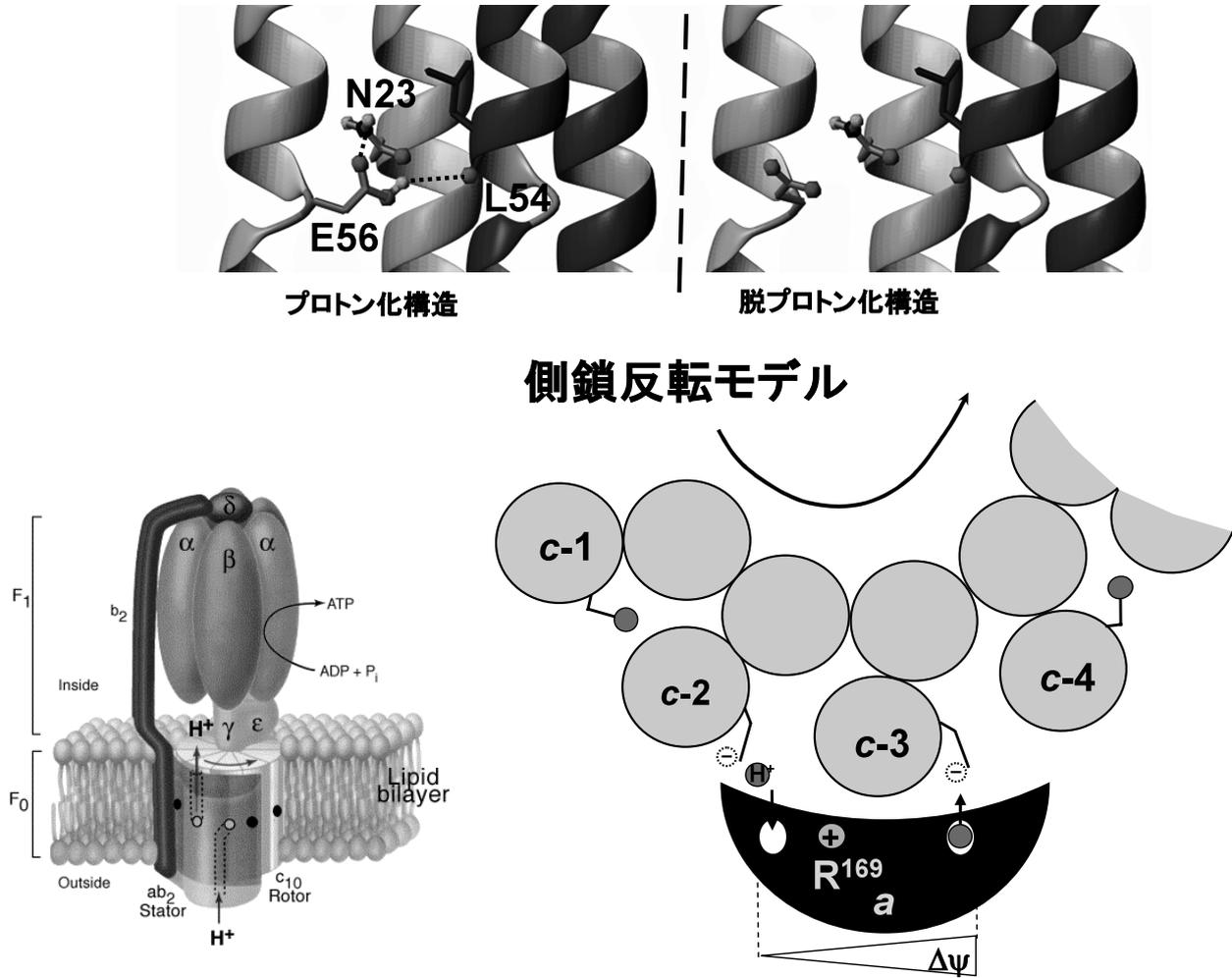


図8 プロトン移動とc-リング回転共役についての側鎖反転モデル

上, Glu56がプロトン化されたとき(左)と脱プロトン化されたとき(右)の構造モデル。下, 共役モデル。○はcサブユニットのヘリックスを表す。内側がN末端側, 外側(図でc-1等と書き込まれている)がC末端側ヘリックス。線で示したのはGlu56側鎖。下の黒い半月部分はaサブユニット。仮想的プロトンチャンネルが白丸で、保存されているArg169がRで示されている。下左は酵素全体の中でのc-リングとプロトンチャンネルの位置を示す。これはFillingameらによるモデル図である。

性部分に入りやすくなる。このモデルでは側鎖の反転という最小のエネルギーでプロトン移動とc-リング回転の共役を実現することができる。

3.2. c-リングと脂質膜の相互作用

プロトン移動とリング回転の共役がどのような機構で行われるにしてもc-リングは脂質膜の中を回らなければならない。したがって、両者の間にどのようなエネルギー損失が出るかは重要な問題である。そこでわれわれは固体重水素NMRを用いてc-リングと脂質膜の相互作用を調べた¹²⁾。

この研究には大腸菌のcサブユニット(EF₀c)を用いた。大量発現で精製されたcサブユニットが脂質膜に再構成されたときにリング構造を取るかどうかをまず確認する必

要がある。そこで、膜に再構成する直前の界面活性剤オクタヒルグルコシドミセル中の沈降速度を調べたところ均一な沈降係数を示すバンドが主成分であり、一定の数のオリゴマー構造を取ることが分かった。界面活性剤中でEF₀cはリング構造を取ることが既に電子顕微鏡で確かめられているので、このオリゴマー構造はリング構造を取っていると考えて研究を進めた。

本実験ではEF₀c/脂質膜の再構成にあたり、脂肪酸部分が重水素化されたL-ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC-*d*₅₄)を用いた。DMPC膜の厚さは液晶状態では生体膜のそれに近いといわれている。再構成の際のタンパク質と脂質の比は重要なファクターであるのでモル比で1:50, 1:20の再構成膜をつくった。これらの膜の超遠心沈殿物をNMR測定試料とした。これは十分に水和され

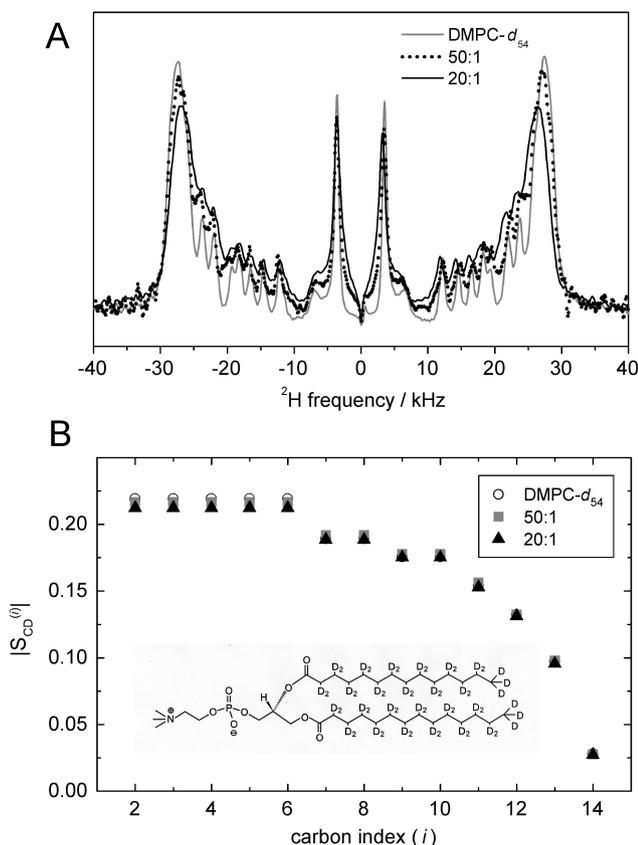


図9 EF_c サブユニット再構成膜の固体重水素 NMR スペクトルと秩序パラメータ

A, 脂質膜, *c*-リング再構成膜 (脂質/タンパク質のモル比=50 および 20) の固体重水素 NMR スペクトル. オリジナルの粉末スペクトルを dePake という方法で処理して分解能を上げてある. 脂質は重水素化ジパルミトイルホスファチジルコリン (DMPC-*d*₅₄) を用いている. 測定温度は 30°C で脂質は液晶状態. B, スペクトルの四極子分裂より求めた脂肪酸各炭素部位における秩序パラメータ. 脂質の化学構造を示してある.

た試料である. 固体 NMR はこのような不定形な非結晶あるいは非配向試料を測定対象とすることができる. このような試料をそのまま測定すると超伝導磁石が作り出す静磁場に対してさまざまな方向に向いた分子が存在するので, そのスペクトルは粉末スペクトルと呼ばれる. ここでの「粉末」はさらさらの粉を意味するのではなく, 分子の配向が無秩序であることを意味する. また, 固体 NMR スペクトルの「固体」もガチガチの固い物質を意味するのではなく, 溶液に比べて回転運動等が制限された分子を意味する. したがって, 特定方向の運動が制限されている液晶や脂質膜などもここでいう「固体」に含まれる.

さまざまな膜試料の液晶状態 (30°C) での固体重水素 NMR 粉末スペクトルを図 9A に示す. これは分解能をよくするための処理がされている. 重水素核はスピン量子数が 1 であるので四極子相互作用によって, 図のような対称的な粉末スペクトルを与える. 対称的なピークの間を四極

子分裂と呼ぶ. この分裂幅は C-D 結合の秩序パラメータ S_{CD} と関係づけられる. 秩序パラメータとは C-D 結合の揺らぎの程度を示すものであり, 揺らぎが全くないときには 1, 完全に無秩序に揺らいでいる場合は零となる. 重水素化ミリスチン酸は 12 個の CD₂ と一つの CD₃ を持つ. DMPC には 2 本のミリスチン酸が含まれている. これら由来のシグナルが全て重なって見えるために複雑になっている. 中央付近の鋭いシグナルはメチル由来のものである. 温度が 15°C 以下のゲル状態ではスペクトル全体がブロードになる. これはゲル状態になると脂質分子の運動が抑えられて線幅が広がるからである.

液晶状態ではメチレン基のシグナルは全て帰属されている. 四極子分裂から求めた脂肪酸の各炭素位置での秩序パラメータを図 9B に示した. 三つの試料を比較するとタンパク質の影響はほとんど見られない. ゲル状態では各メチレン基由来のシグナルは線幅が広がるため分離して観測されない. しかし, タンパク質の存在下では純粋な脂質膜に比較して明らかにスペクトル幅が狭くなっていた. これは *c*-リングの存在が液晶状態では脂質の揺らぎに大きな影響を与えていないが, ゲル状態ではその秩序構造を乱していることを示す. ゲル状態では脂質膜の厚さが大きくなるためにタンパク質の疎水性領域の厚さとの間でミスマッチを起し, 脂質構造の秩序が乱されるものと考えられる.

動的性質への影響を見るために各炭素部位での縦緩和速度の測定も行った. その結果を図 10A に示す. これには若干の違いが見られるがやはりタンパク質の影響は小さい. 縦緩和速度を秩序パラメータの二乗に対してプロットするとその傾きは膜の粘弾性 (一定の数の脂質分子集団の性質) によって変化する. 図 10B にそのプロットを示す. DMPC 膜にコレステロールを加えて固くした場合と非イオン性界面活性剤を加えて柔らかくした場合を合わせて示してある. この場合は傾きが大きく変わる. これらと比較すると, *c*-リングの存在は膜の弾力的な柔らかさにもほとんど影響を与えないと結論できる.

以上のことは液晶状態にある DMPC 程度の厚さの膜ではサブユニット *c*-リングと脂質の間との関係は非常にマッチングがよく (図 10C), その相互作用はソフトであるといえる. すなわち, 脂質は脂質どうしが相互作用するように *c*-リングの界面と相互作用している. したがって, 図 8 に示したような脂質膜中での *c*-リングの回転はスムーズで両者との摩擦抵抗は小さいと考えられる.

4. H⁺-ATP 合成酵素のエネルギー変換におけるソフトな相互作用

H⁺-ATP 合成酵素のエネルギー変換の特徴はその効率のよさであり, それを支えているのは回転触媒反応である.

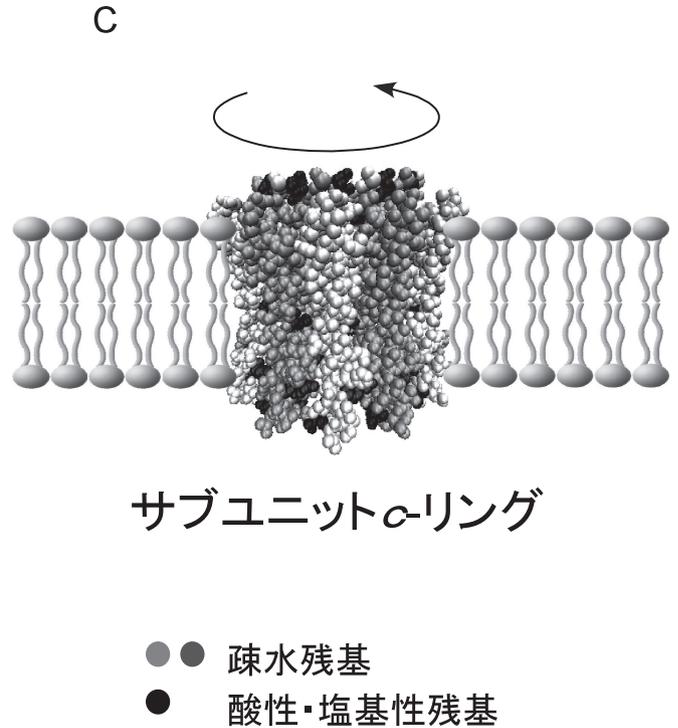
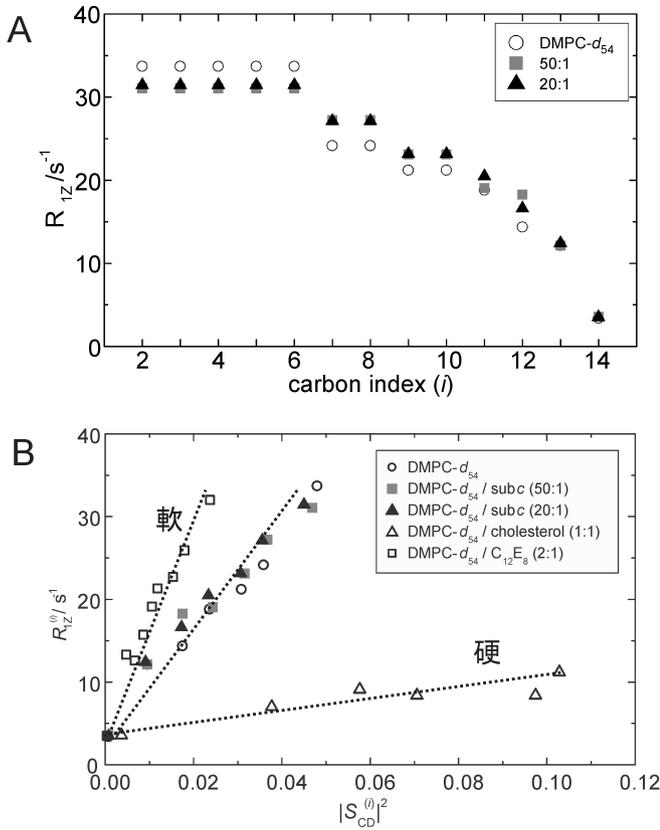


図10 EF_c-リングと脂質膜の疎水性および粘弾性マッチング

A, 脂肪酸各部位における重水素の縦緩和速度. B, 再構成膜の緩和速度と秩序パラメータのプロット. 傾きが小さい程膜は固い. コレステロールと非イオン界面活性剤 (C₁₂E₈) を加えた場合の効果も示してある. C, c -リングと脂質膜のマッチングのイメージ図.

それは大きく二つの要素に分かれている。プロトン濃度勾配が創り出す膜電気化学ポテンシャルの c サブユニットリング回転への変換 (F_0) と、これに共役した γ サブユニット回転の ATP 合成反応への変換 (F_1) である。これは可逆的な反応であり、ATP の濃度が高ければ ATP を分解してプロトンをくみ出す。基質で見ればプロトンの c -リングへの脱着が c -リングを回転させ、ヌクレオチドの β サブユニットへの結合と遊離 (基質と生成物の違いはあるが) が γ サブユニットを回転させる。どちらが駆動力になるかはエネルギー状態によって決まる。すなわち、プロトン濃度勾配が支配的か、ATP の高濃度が支配的かによる。さらに、 β サブユニットでも c サブユニットでも基質の親和性が中庸の値をとることが生理条件下での可逆性を保証している。

このような分子モーターを駆動する鍵は基質濃度をどのように回転に変換するかであろう。本稿で明らかにしたように、 F_1 では ATP 結合による β の開/閉構造間の変換が β と γ 間のより安定な相互作用構造を求めて γ の回転を引き起こす。 β の構造変化は α の協力を得て ATP 加水分解のための活性化構造を実現し、両者の共同作業により ADP + Pi になる。これも γ 回転と共役していると考えられ

る。同時に隣の β への ATP 結合も起こっており、これに伴う構造変化との協同作用でもある。周りの ADP 濃度が低ければ ADP は遊離していくことになるので今度は閉/開構造の変換が引き起こされ、三たび γ の回転につながる。勿論、これも第3の β への ATP 結合に伴う構造変化からの協同効果を含む。このように、ATP と ADP の濃度情報は β への結合あるいはそれからの遊離をとおして γ サブユニットの回転へと変換される。 γ を一方向に動かすのは α の参加による基質の加水分解反応である。そして、三つの β サブユニット間には常に協同効果が働いている。このような仕組みが β/γ の安定構造を固定化させず、さらに次の変化へとつながっていく原因になっている。われわれはこのような相互作用をソフトなサブユニット間相互作用と定義する。このような相互作用を保証する要素の一つは β と γ の接触面がファンデルワールス相互作用を基本とする非特異的なもので結ばれていることであろう。これは γ の回転をスムーズにする。

F_0 ではプロトンの脱着に伴う c サブユニット必須酸性アミノ酸付近の構造変化が回転と共役する。この場合も、プロトンの濃度情報が c -リングの回転へと変換される。すなわち、プロトン濃度勾配が駆動力として働く。現時点

では *a* サブユニットの構造についての情報がないので決定的なことは言えないが、*c*-リングのカルボキシル基とプロトンチャンネルの相互作用が回転の鍵となっている。これもまた、*c* サブユニットと *a* サブユニットが安定構造に固定化されないという意味でソフトなサブユニット間相互作用とすることができる。これを保証するものとして *c*-リングと脂質膜との間の疎水的相互作用をベースとしたマッチングが重要な役割を果たしていることを忘れてはならない。

以上、まとめると H^+ -ATP 合成酵素の回転におけるソフトなサブユニット間相互作用は二つの側面を持つ。第1に、これは複数の相互作用と加水分解あるいはプロトンの脱着のような化学過程が巧妙に組み合わせられることによって実現しており、システムとしての相互作用となっている。第2に、回転の効率性を高めるためには回転子との間の疎水性相互作用を基礎としたソフトな相互作用が重要な寄与をしている。

文 献

- 1) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (1997) *Nature*, **346**, 299–302.
- 2) Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., & Kinoshita, K. Jr. (2007) *Cell*, **130**, 309–321.
- 3) Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994) *Nature*, **370**, 654–659.
- 4) Meyer, T., Polzer, P., Diedrichs, K., Welte, W., & Dimroth, P. (2005) *Science*, **308**, 659–662.
- 5) Murata, T., Yamamoto, I., Kakinuma, Y., Leslie A.G., & Walker, J.E. (2005) *Science*, **308**, 654–659.
- 6) Yagi, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, T., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632–16638.
- 7) Odaka, M., Kaibara, C., Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Ogasawara, K., Yutani, K., & Yoshida, M. (1994) *J. Biochem.*, **115**, 789–796.
- 8) Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S., & Yoshida, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12159–12164.
- 9) Rastogi, V.K. & Girvin, M.E. (1999) *Nature*, **402**, 263–268.
- 10) Nakano, T., Ikegami, T., Suzuki, T., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2006) *J. Mol. Biol.*, **358**, 132–144.
- 11) Junge, W. & Nelson, N. (2005) *Science*, **308**, 642–644.
- 12) Kobayashi, M., Struts, A.V., Fujiwara, T., Brown, M.F., & Akutsu, H. (2008) *Biophys. J.*, **94**, 4339–4347.