

V-ATPase の回転触媒機構

氏名 横山 謙

所属 (科学技術振興機構、 東工大)

Rotary mechanism of V-ATPase

Ken Yokoyama

Japan Science and Technology agency, Tokyo Institute of technology

<Synopsis>

Vacuolar-type H^+ -ATPases (V-ATPases) are found in a wide range of organisms. V-ATPase has been believed to utilize a rotary catalytic mechanism similar to F_0F_1 to perform their specific function. We succeeded in visualizing subunit rotation coupled to ATP hydrolysis of the V_1 portion using a single molecule detection technique for the first time. Also recent our work has succeeded in resolving each step in the ATP hydrolysis reaction of the V_1 domain. V_1 generated torque of ~ 35 pN nm, which is slightly lower than the ~ 46 pN nm measured for F_1 . Noticeably, the angles for both ATP cleavage and binding were apparently the same in V_1 . This is in sharp contrast with F_1 , which cleaves ATP at 80° posterior to the binding of ATP. Thus, the mechanochemical cycle of V_1 has marked differences to that of F_1 .

V-ATPase は、真核生物の酸性小胞の膜や一部の特殊な細胞の細胞膜に存在するプロトンポンプである。また好熱菌 *Thermus thermophilus* 等の原核生物の形質膜にも類縁酵素が存在し、ATP 合成酵素やナトリウムポンプとして働いている。十数種類の異なるサブユニットから構成される膜超分子複合体であり、膜表在性で ATPase 活性を持つ V_1 部分と膜内在性サブユニットを含み、プロトンチャネル活性を示す V_0 部分から構成される。ミトコンドリアの内膜やクロロプラスとのチラコイド膜に存在する ATP 合成酵素 F_0F_1 と進化的に類縁の酵素であり、同様の回転触媒機構で働く回転分子モーターであると考えられてきた。我々は、1 分子イメージングの手法により *T.thermophilus* 由来 V-ATPase の V_1 部分の ATP 駆動性回転の可視化に成功した¹。次に膜内在性のローターリングの ATP 駆動性回転の証明にも成功し²、V-ATPase が回転触媒機構で働く回転分子モーターであることを確定した。回転速度は、ATP 濃度に依存し、低い ATP 濃度では 120° ごとに停止しながら回転した。停止時間の解析から ATP 1 分子の結合により 1 回の 120° ステップが起こることが判明した。角速度から求め

たトルクは約 35pNnm であり、ATP 1 分子の加水分解における自由エネルギー変化 ~40 pNnm に近い値であった。ATP の結合が起こる角度と加水分解が起こる角度はほぼ同じであり、80° サブステップ後の停止位置で ATP の加水分解反応が起こる F₁ とは異なる³。次に直径 ~40 nm の金コロイド粒子をプローブとして ATP 駆動性の回転を観察した。この条件では、粘性抵抗による負荷がほぼ無視でき、酵素本来の回転が観察できる。基質飽和条件にもかかわらず 120° おきに停止するステップ回転が観察された。停止時間のヒストグラフを作成したところ、1 次の指数関数ではフィッティングされず、2 もしくは 3 次の指数関数でフィッティングされた。この停止位置で ATP の加水分解、生成物である ADP もしくは Pi の脱離が起こっていると考えられる。ATP 濃度を下げていっても 120° ごとの停止しか観察されず、1 回転で 3 点の停止しか観察されなかった。このことは、ATP の結合、加水分解、生成物の脱離という素過程がすべて同じ停止位置で起こるという以前の報告³を支持する。以上の結果から、V-ATPase が、高い効率で化学-力学エネルギー変換を行うステッピングモーターであり、F₁ とは異なるメカノケミカルサイクルで働くことが明らかになった。併せて低負荷回転プローブによる回転観察で明らかになった V_o。由来のサブステップについても述べたい。

(参考文献)

- (1) Evidence for rotation of V₁-ATPase. (2003) Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100(5)**, 2312-2315.
- (2) Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. (2003) Yokoyama K, Nakano M, Imamura H, Yoshida M, Tamakoshi M. *J Biol Chem*. **278**, 24255-24258.
- (3) Rotation scheme of V₁-motor is different from that of F₁-motor. (2005) Imamura, H., Takeda, M., Funamoto, S., Yoshida, M., and Yokoyama, K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102** 17929-17933