

# H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニット c-リングと脂質膜の相互作用 (阪大蛋白研<sup>1</sup>、アリゾナ大<sup>2</sup>) 小林将俊<sup>1</sup>, 戸所泰人<sup>1</sup>, A. V. Struts<sup>2</sup>, 藤原敏道<sup>1</sup>, M. F. Brown<sup>2</sup>, ○阿久津秀雄<sup>1</sup>

Interaction of H<sup>+</sup>-ATP synthase Subunit *c*-ring with Lipid Membrane  
(IPR, Osaka Univ.<sup>1</sup>, Univ. Arizona<sup>2</sup>) Toshimasa Kobayashi<sup>1</sup>, Yasuto Todokoro<sup>1</sup>,  
A. V. Struts<sup>2</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup>, M. F. Brown<sup>2</sup> and Hideo Akutsu<sup>1</sup>

The F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase utilizes the transmembrane H<sup>+</sup> gradient for the synthesis of ATP. F<sub>o</sub> subunit *c*-ring plays a key role in transporting H<sup>+</sup> through F<sub>o</sub> in the membrane. We investigated the interactions of *E. coli* subunit *c* with dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC-*d*<sub>54</sub>) at lipid/protein ratios of 50:1 and 20:1 by means of <sup>2</sup>H solid-state NMR. In the liquid-crystalline state, the <sup>2</sup>H NMR moment and the order parameter were little affected by the presence of *c*-ring, suggesting a matching of the bilayer thickness to the transmembrane hydrophobic surface of *c*-ring. Moreover, the viscoelasticity was also little influenced by *c*-ring. These findings may be important for the torque generation in the rotary catalytic mechanism of the F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> motor.

## <はじめに>

H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素は生体エネルギー変換系の最後に位置する重要なタンパク質複合体で、約 500 kDa の巨大な膜酵素である。膜に形成されたプロトン濃度勾配を用いて ATP を合成するが、そこでは回転触媒機構が働いている。この酵素は ATP を合成する水溶性の F<sub>1</sub> と膜に埋まった疎水性の F<sub>o</sub> からなる。F<sub>o</sub> においては *c* サブユニットからなるリングがプロトン移動に共役して回転する。F<sub>o</sub> 全体の結晶構造はまだ報告されていない。サブユニット *c* 単体の溶液構造については Girvin およびわれわれのグループが大腸菌、および好熱菌について報告している。われわれは現在、膜に再構成された *c*-リングに注目して固体 NMR による解析に取り組んでいる。

## <実験>

本研究では大腸菌の *c* サブユニット (EF<sub>o</sub>*c*) を大量発現させて、精製して実験に用いた。*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チ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った。界面活性剤中で EF<sub>o</sub>*c* 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。EF<sub>o</sub>*c*/脂質膜の再構成には、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*<sub>54</sub>) を用いた。再構成の際のタンパク質と脂質のモル比は 1:50, 1:20 である。これらの膜の超遠心沈殿物を NMR 測定試料とした。測定にはバリアン CMX 500 Infinity plus 固体 NMR 装置を用いた。

## <結果と考察>

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

Key words: F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase, subunit *c*-ring, <sup>2</sup>H-NMR, hydrophobic matching

こばやし、とどころ、ストラッツ、ふじわら、ブラウン、あくつ

ングと脂質膜の相互作用を調べた(1)。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 Fig. 1a に示す。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、対称的な粉末スペクトルを与える。四極子分裂は C-D 結合の秩序パラメータ  $S_{CD}$  と関係づけられる。

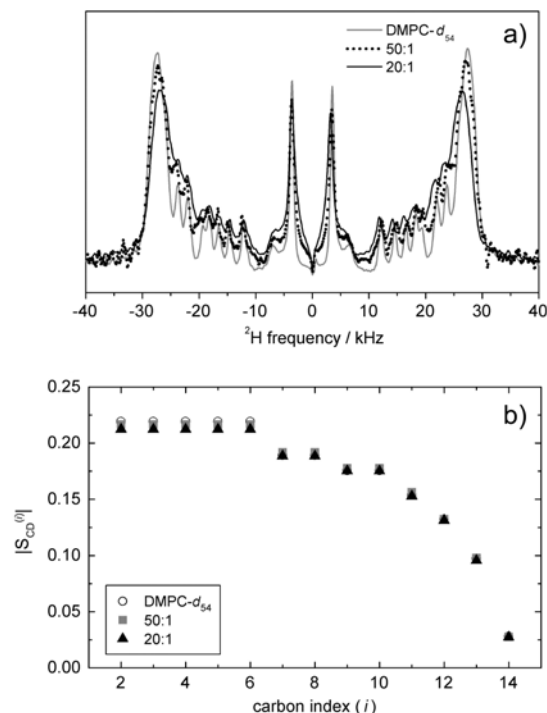


Fig. 1 (a) De-Paked  $^2\text{H}$  NMR spectra of DMPC- $d_{54}$  and DMPC- $d_{54}$ /subunit  $c$  at 30°C. (b) The segmental order parameter of C- $^2\text{H}$  bond in the fatty acid chains at 30 °C.

ミスマッチを起こすものと考えられる。

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。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。Fig. 2a 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性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。

以上の結果は液晶状態にある DMPC 程度の厚さの膜ではサブユニット  $c$ -リングと脂質の関係は非常にマッチングがよく (Fig. 2b)、脂質膜中での  $c$ -リングの回転はスムーズであると考えられる。

(1) Kobayashi, M., et al. (2008) *Biophys. J.* **94**, 4339

結合の秩序パラメータ  $S_{CD}$  と関係づけられる。重水素化ミリスチン酸は 12 個の  $\text{CD}_2$  と一つの  $\text{CD}_3$  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。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三つの試料と比較するとタンパク質の影響はほとんど見られない (Fig. 1b)。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

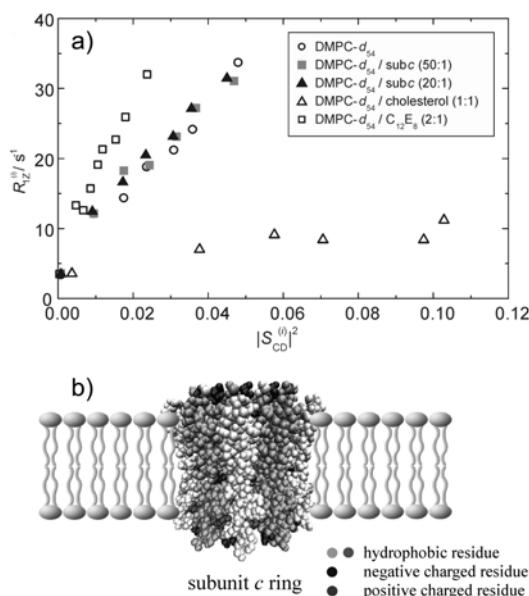


Fig. 2 (a)  $R_{1Z}^{(i)}$  plots as a function of  $|S_{CD}^{(i)}|^2$  for DMPC- $d_{54}$ , DMPC- $d_{54}$ /subunit  $c$  (50:1), and DMPC- $d_{54}$ /subunit  $c$  (20:1) membranes at 30°C. Reference data are also presented. (b) A schematic model of the  $c$ -ring in lipid bilayers in the liquid-crystalline state.