The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mechanical Modulation of Inhibitory Pausing State and ATP binding of V_1-ATPase
Author(s)	Naciye, Esma Tirtom
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27565
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【48】

氏　　名	Naciye Esma Tirtom（ナジエ エスマ ティルトム）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学 位 記 番 号	第　２５７１６　号
学位授与年月日	平成 24 年 12 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	Mechanical Modulation of Inhibitory Pausing State and ATP binding of V_1-ATPase （１分子操作法による V_1-ATPase の反応の角度依存性に関する研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　紀ノ岡　正博 （副査） 教　授　大竹　久夫　　教　授　原島　　俊　　教　授　福崎　英一郎 教　授　渡邉　　肇　　教　授　福井　希一　　教　授　村中　俊哉 教　授　金谷　茂則　　教　授　藤山　和仁　　教　授　仁平　卓也 教　授　永井　健治 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻教授　野地　博行

論 文 内 容 の 要 旨

Chapter 1　Introduction

V_1-ATPase is a rotary molecular motor, which hydrolyzes ATP while its shaft, composed of D and F subunits, rotates in counterclockwise direction. However, physiological role of V_1-ATPase is to synthesize ATP, where the shaft rotates in clockwise direction. So, rotation direction of the shaft changes with the chemical reaction being held. This phenomenon is called as mechanochemical coupling. This coupling is also observed in F_1-ATPase, which is evolutionarily-related homolog of V_1-ATPase. In both proteins, chemical reactions are regulated by rotation of the shaft: If the shaft rotates in clockwise direction, equilibrium between ATP hydrolysis and synthesis shifts towards synthesis, and if rotates in counterclockwise direction, then vice versa.
Studying the angular modulation of chemical reactions will reveal insights about the coupling mechanisms of both V_1- and F_1-ATPases. However, F_1-ATPase has been studied extensively and its mechanochemical coupling mechanism was almost deduced. At this point, focusing on V_1-ATPase will help us to understand how similar or different these proteins are as rotary ATPases. So, this study started with analysis of angular modulation of ATP binding affinity in V_1-ATPase.

Chapter 2　Two Pauses of V_1-ATPase and Mechanical Modulation of long pause state

The biochemical ATPase assay of V_1 suggested that all active V_1 molecules, after a while, completely lose their activities. To prevent the interference from this inactive state to the modulation experiment, characterization of this pausing state was necessary. Therefore, before continuing with angular modulation of ATP binding affinity, first, these pauses were studied. During the rotation assay of single V_1 molecules, the existence of this irreversible final pause was confirmed and called as 'long pause' hereafter. In addition, a new pause was discovered, which frequently interrupted V_1's rotation. This pause was reversible and second-scale therefore was called as 'short pause'. Short pause was not predicted from biochemical assay, so it is a new finding of this study.
Later, the angular positions and kinetic constants of these pauses were characterized. Angular positions of pauses were determined to be same as that of ATP binding and hydrolysis, which makes the rotation scheme of V_1-ATPase more complicated than that of F_1-ATPase. Finally, the long pause state of V_1-ATPase was mechanically modulated to see whether V_1 will resume rotation or not with external energy input. With magnetic field, the magnetic bead which was attached to shaft of V_1-ATPase was modulated. The bead was rotated to a certain angle, and stalled there for a specific period of time, and then released. Upon this type of stall-and-release experiment, two general behaviors were observed: V_1 either went back to original angle and continued to stay in long pause state, which was called as 'Failure in Reactivation' or resumed rotation, which was called as 'Reactivation'. The probability of 'Reactivation' was calculated and, its stall angle dependency was determined. Reactivation was observed starting from +70°, reaching its maximum value at +110°. Including ADP in the chamber buffer suppressed the reactivation probability drastically, implying that long pause state is the ADP-inhibited state of V_1. This part of my study showed that chemical reactions of V_1 can be efficiently modulated by rotation of the shaft.

Chapter 3　Mechanical Modulation of ATP-binding Affinity of V_1-ATPase

After characterization of pauses of V_1-ATpase, I continued with the main objective, which is to study the angular modulation of ATP binding of V_1-ATPase. Stall-and-release experiments were performed at non-saturating [ATP] where we observed clear ATP binding dwells. Upon release from the magnetic field, two behaviors were observed: One is going back to original binding angle, called as 'off' event, and the other is stepping to next binding angle, called as 'on' event. 'off' event implies that at the time of release from the magnetic field, V_1 was not bound ATP therefore could not generate torque needed for stepping to the next angle. After many trials, the probability of 'on' event (P_{on}) among whole number of trials was calculated. P_{on} increased depending on stall angle and stall time. From the stall time vs P_{on} graph, rate constants of ATP binding and release were determined, both of which exponentially increased with stall angle. Torque generated by ATP binding was estimated from the slope of koff as 4 pN.nm, which is almost $1/6^{th}$ of the whole torque. ATP binding generated larger torque in F_1-ATPase, almost 11 pNnm, which implies that ATP binding, is not the primary torque generating step in V_1-ATPase. ATP binding affinity was successfully modulated, and torque by ATP binding was calculated in this chapter.

Chapter 4　General Conclusion and Future Work

This study showed, for the first time, the mechanical modulation of chemical reactions in V_1-ATPase. The chemical reactions that were analyzed were long pause state and ATP binding of V_1-ATPase.
Meanwhile a sec-scale, reversible 'short pause' was discovered during V_1 rotation. Even though its angular position and kinetic constant were determined, these findings did not give a clue about the physiological role of short pause. So, further research is necessary for this pause as discussed in 'Future Work' section.
Modulation experiment suggested that long pause represents the ADP-inhibited state of V_1, which is an inhibitory state caused by not releasing the hydrolysis product, ADP.
Finally, I think that this study will pave way for new ideas in both science and applied technology.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生物モーターには、アクチン、ミオシン系やダイニン、チューブリン系のようなリニア分子モーターと、F 型-ATP 合成酵素や細菌のべん毛のような回転分子モーターがある。本論文の研究対象である V-ATPase は、F 型-ATP 合成酵素と

構造的相同性を持つ回転分子モーターであり、ATP の加水分解で得られる化学エネルギーを回転運動という形で力学エネルギーに直接的に変換することができる興味深い性質を持つ。その構造的相同性から、V-ATPase は F 型-ATP 合成酵素と同様の作動機構で、エネルギー変換を行っていると考えられていたが、昨今の 1 分子計測によって、その作動機構は大きく異なることが明らかになりつつある。本論文では、1 分子操作計測によって、その作動機構の詳細な違いの解明に切り込んでいる。

第一章では、V1-ATPase に関する一般的な知見を紹介している。

具体的には、1) V1-ATPase の生体内での機能および生理学的な重要性。2) V1-ATPase の立体構造。3) 回転分子モーターとしての V1-ATPase の回転機構に関するものである。

第二章では、新たに発見された 2 種類の不活性化メカニズム (回転運動の停止状態) を紹介している。

新たに発見された V-ATPase の 2 種類の不活性化状態は、F 型 ATP 合成酵素の ADP 阻害状態と同等のものであると考えられるが、不活性化状態に陥るもしくは不活性化状態から活性化するメカニズムは F 型 ATP 合成酵素と大きく異なることが示されている。

第三章では、ATP の結合過程で出力される回転トルクの大きさを 1 分子操作法によって定量的に計測している。

ATP の加水分解は、ATP の結合、分解、生成物である ADP および無機リン酸の解離の 4 つの反応素過程から構成され、F 型-ATP 合成酵素では、それぞれの反応素過程で出力される回転トルクの大きさが計測されている。その計測では、ATP の結合過程で出力される回転トルクが全回転トルクの半分以上を占めており、つまりは F 型 ATP 合成酵素の回転運動は主に ATP の結合によって駆動されていることが明らかにされていた。一方、本論文の計測では、V1-ATPase は、ATP の結合過程で 4pNnm の回転トルクしか出力しないことが示され、この値は、F 型-ATP 合成酵素と比較すると非常に小さいことがわかった。すなわち、V1-ATPase では ATP の結合以外の反応素過程が主となり回転運動が駆動されているのである。これは、近年明らかにされた V1-ATPase の立体構造を基にした結晶学的な予想とも整合性がとれる結果である。

第四章では、F 型 ATP 合成酵素との比較から V1-ATPase の回転機構について議論している。

Boyer の回転触媒説では、基質の結合および生成物の解離によって大きな回転トルクが発生し、回転運動が駆動されると考えられていた。この説は F 型 ATP 合成酵素では実証されたが、V1-ATPase はこの説の限りではないことが判明した。つまりは、本論文によって、V1-ATPase は F 型 ATP 合成酵素とは全く異なる作動原理に基づいて回転していることが証明されたのである。今後、他の反応素過程の出力する回転トルクの大きさも計測することができれば、両者の違いだけでなく類似している点も明確になるであろう。それらの知見がそろった暁には、ATP の加水分解を駆動力とする分子モーターの普遍的な作動原理を導き出すことが可能になると考えられる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。