论文

ATP 合酶旋转催化的一种新机制

刘佳峰^①, 付新苗^{①②*}, 昌增益^{①②*}^① 北京大学生命科学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京 100871;^② 北京大学蛋白质科学中心, 北京 100871

* 联系人, E-mail: fuxinmiao@pku.edu.cn; changzy@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-10-08; 接受日期: 2015-11-26; 网络版发表日期: 2016-02-02

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB917300)和国家自然科学基金(批准号: 31470766, 31270804, 31570778)资助

摘要 ATP 合酶利用跨膜离子(主要是质子)梯度提供的能量, 催化由 ADP 和 Pi(磷酸)合成 ATP 的反应. 已有证据表明, 这种催化反应通过 ATP 合酶内部亚基之间的相对旋转而实现. 然而, 现有的基于整合在细胞膜内的 c 环及附着于其上的中心杆(由 ϵ 和 γ 亚基组成)转动的 ATP 合酶旋转模型存在多方面的理论缺陷, 也与某些实验数据不符. 本文提出了一种新的 ATP 合酶旋转催化模型, 其中发生旋转的是 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体. 具体而言, 质子的跨膜转运引起 c 环的周期性构象改变, 从而使得附着在 c 环上的中心杆产生往复运动, 这种往复运动驱动 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的连续转动. 这种工作模式与按压式伸缩圆珠笔中推杆的往复运动驱动凸轮产生连续转动的工作机理十分相似. 新模型不仅避免了现有模型的理论缺陷, 而且更好地解释了已有实验数据.

关键词 ATP 合酶, 旋转催化机制, 旋转模型

ATP 合酶(也被称为 F_1F_0 -ATP 酶)是生物体内一种最主要的能量转换装置, 它利用细胞膜两侧由离子(通常是质子)浓度差以及电势差所储存的化学能, 来合成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)^[1,2]. ATP 合酶是一种蛋白质复合体, 由 F_0 及 F_1 两部分组成, 这种构造非常保守地存在于从细菌到人的所有生物体中^[3]. F_0 部分整合在细胞膜内, 其在细菌中的典型亚基组成为 ab_2c_{8-15} , 多个 c 亚基在细胞膜内形成一种环状结构. ATP 合酶的质子通道通常被认为存在于 a 亚基和 c 亚基的作用面内. F_1 部分是附着在 F_0 上的可溶蛋白质, 在细菌中的典型亚基组成为 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, 其中的 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体含有催化 ATP 合成的活

性中心^[4,5].

已有证据表明, ATP 合酶为一种分子马达, 其催化反应依赖中心杆(由 ϵ 和 γ 亚基组成)与 $\alpha_3\beta_3$ 活性中心之间的相对旋转^[6]. 依据现有的旋转模型, 当质子通过通道发生跨膜转运时, 将驱动 c 环在细胞膜内的连续转动^[7-9], 进而驱使附着在 c 环上的 $\gamma\epsilon$ 中心杆转动, 后者的转动引起 $\alpha_3\beta_3$ 中的活性中心发生周期性构象改变, 从而催化 ATP 的合成^[10].

上述旋转催化模型是基于科学家长时间的探索和思考而逐渐形成的. 最初, 美国学者 Paul Boyer 研究组^[11]于 20 世纪 80 年代初提出, “ β 亚基和中心杆之间可能存在相对转动”, 以此解释 3 个 β 亚基与单个 γ

引用格式: 刘佳峰, 付新苗, 昌增益. ATP 合酶旋转催化的一种新机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 269–273, doi: 10.1360/05SCLS-2015-0312

英文版见: Liu J F, Fu X M, Chang Z Y. A reciprocating motion-driven rotation mechanism for the ATP synthase. Sci China Life Sci, 2016, 59: 44–48, doi: 10.1007/s11427-015-4995-0

亚基发生不对称相互作用,但它们三者的催化活性却相同的独特现象.之后,Vik 和 Antonio^[7]提出 c 亚基寡聚体相对 a 亚基转动的模型,以解释质子顺其梯度转运而驱动 ATP 合成的过程.之后, γ 亚基与 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的相对转动得到了化学交联^[8]、荧光各向异性检测^[12]和荧光显微镜观察等数据的支持^[13].

1 结果

1.1 传统 ATP 合酶旋转催化模型的缺陷

虽然现有 ATP 合酶的旋转催化模型已被广泛接受,但仍然存在多方面的理论缺陷^[14].例如, $\gamma\epsilon$ 中心杆与 c 环的转动之间难以同步.实验结果表明, $\gamma\epsilon$ 中心杆相对于 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的转动是以每步 120° 进行的^[15],而 c 环转动时每步的角度被认为决定于其亚基数目(即如果有 n 个亚基每圈就需转动 n 步)^[16].但是在某些物种的 ATP 合酶中, c 环的亚基数(如 8, 10, 11, 13, 14)并非 3 的整数倍^[5,17-19].在这种情况下,为了实现同步,则 $\gamma\epsilon$ 中心杆的每步转动将需对应 c 环的非整数步转动(如果 c 亚基数为 8,则对应 $8/3 \approx 2.7$ 步).由于 c 环转动一圈时的步数被认为与所转运的质子数相等,所以,非整数步的 c 环转动则需对应非整数的质子转运.传统模型难以解释这样的同步如何实现.

另外,考虑到由 a 和 b 亚基构成的侧杆锚定于细胞膜中,依据传统模型,转动的 $\gamma\epsilon$ 中心杆相对于该 ab 侧杆应该至少有 3 种可能的朝向,分别对应与 3 个 β 催化亚基相互作用时的位置.然而,在解析的牛心线粒体 ATP 合酶的晶体结构中,中心杆相对于侧杆而言却只有一种朝向(图 1A)^[20].在冷冻电子显微镜解析的古细菌^[22]和绿藻线粒体^[23]ATP 合酶结构中,也只观察到中心杆相对于侧杆的一种朝向(图 1B).经过比较分析发现,在所有这些来自不同物种的 ATP 合酶结构中,中心杆相对于侧杆的这种朝向皆相同(图 1).

1.2 尚缺乏 ATP 合酶中 c 环/中心杆转动的直接证据

虽然 c 环/ $\gamma\epsilon$ 中心杆相对于 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的转动已经通过体外实验所观察到^[8,12,13],然而迄今并无实验结果表明 c 环/ $\gamma\epsilon$ 中心杆相对于锚定在膜中的 ab 侧杆发生了连续转动.Börsch 等人^[24]利用单分子荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术,发现 b 亚基和 γ 亚基之间存在 3 种不同的

图 1 ATP 合酶的 γ 中心杆相对于锚定在膜中的 b 侧杆只存在一种朝向

A: 牛心线粒体 ATP 合酶 F_1 部分及侧杆复合物的 X 射线衍射晶体结构^[20,21](PDB 号: 2WSS 和 2CLY); B: 栖热菌属嗜热菌(*Thermus thermophilus*)ATP 合酶的 F_1 部分及侧杆的冷冻电子显微镜结构^[22](PDB 号: 3J0J). 图中, 中心杆显示为红色; 侧杆为紫色; $\alpha\beta$ 亚基为灰色(为方便观察,其中朝向读者的一组 $\alpha\beta$ 亚基未显示). δ 亚基为绿色(A)

FRET 效率,他们将此解释为支持 γ 亚基(中心杆)相对 b 亚基(侧杆)转动的证据. Martin 等人^[25]将纳米棒附着在 ATP 合酶的 c 环上,观察到纳米棒反射光强度的周期性变化,他们将此解释为支持 c 环转动的证据.本研究认为,这些实验结果仅表明 c 环/ $\gamma\epsilon$ 中心杆发生了周期性的构象变化,而连续转动只是周期性构象变化的一种特例,因此 c 环/ $\gamma\epsilon$ 中心杆的这种周期性构象变化并非意味着它们在发生连续转动.最近,在一种酵母 V 型 ATP 酶(V-ATPase, 其结构和作用机制被认为与 ATP 合酶类似)的冷冻电子显微镜结构中,研究者依照传统模型预先假定该 ATP 酶存在 3 种构象,于是将原始实验数据先入为主地分为 3 组,重构出了中心杆相对于侧杆不同朝向的 3 种结构.但本研究组认为这样的数据处理方式存在一定主观性,所以结果并非完全客观可靠^[26].

1.3 一种往复运动驱动的 ATP 合酶旋转催化模型

为更好地解释已有实验数据,并避开传统模型的理论缺陷,在此提出一种 ATP 合酶旋转的新模型.如图 2A 所示,在此模型中,发生转动的是 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体,而不是传统模型中所认为的 c 环/ $\gamma\epsilon$ 中心杆.具体而言,质子沿通道的跨膜转运(即质子的结合与释放)将造成 c 环的周期性构象变化,驱使附着在 c 环上的 $\gamma\epsilon$ 中心杆发生周期性的往复运动,后者进而驱动 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的连续转动.这种由往复运动转化为圆周转

动的模型, 是受到可伸缩圆珠笔的工作模式启发而提出的. 在可伸缩圆珠笔中, 笔帽(推杆)的线性往复运动被转化为凸轮的连续转动, 这种运动方式转化的关键在于推杆与凸轮之间存在一种倾斜作用表面.

依据本研究模型, 为使 c 环的构象变化直接传递到中心杆上, 应该由构成质子通道的那部分 c 亚基与 γ 中心杆发生直接相互作用. 这个推论被 ATP 合酶的晶体结构所证实, 即与 γ 亚基有直接接触的几个 c 亚基恰好位于与 a 亚基相互作用的(即质子转运通道所在的)位置(图 3A).

更为重要的是, γ 中心杆(作为推杆)的往复运动转化成 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体(作为凸轮)的转动, 需依赖于两者之间存在一个倾斜作用面. 对已经报道的 ATP 合酶晶体结构的分析表明, 在 γ 亚基和 β 亚基之间确实存在这样一个倾斜作用面(图 3B). 尽管这样一个作用面之前并未引起人们的关注, 但它却由 γ 亚基中最保守的一段氨基酸序列(Asp/Asn-Arg/Lys-Gly-Leu-Cys-Gly)参与组成(图 3C), 这也暗示此作用面具有重要的生物学功能.

此外, 本模型中, $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的顶部需有一个盖子, 以阻止 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体在被 γ 中心杆推动时产生轴向位移(图 2A). 对 ATP 合酶的结构分析显示, δ 亚基即可理想地发挥此盖子的作用. 同时, 此 δ 亚基亦可作为铰链, 将转动的 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体固着在 ab 侧杆的 b 亚基上.

综合对已有结构数据的分析, 得以制作出一个能充分反映这种由往复运动驱动 ATP 合酶旋转工作机制的动画(如补充材料中的视频所示, 图 2B 显示的是该动画的静止状态), 这也从一个侧面表明了本研究所提出模型的合理性.

2 讨论

本文提出了一种由往复运动驱动 ATP 合酶旋转催化的新机制, 其中, c 环及中心杆发生往复运动, $\alpha_3\beta_3$ 六聚体发生转动. 此模型不仅更好地解释了已有实验数据, 而且避免了传统模型多方面的理论缺陷. 在此模型中, c 环及中心杆并不发生连续转动, 因此, 传统模型中两者难以同步的问题不复存在. 另外, $\alpha_3\beta_3$ 六聚体每旋转一周(对应于 3 个 ATP 分子的产生)所转运的质子数也无需与 c 环寡聚体的亚基数目相等^[17]. 而在此模型中, 这样的在不同物种中亚基数目不等的 c 环寡聚体是作为一个结构整体发挥功能的, 以在参与质子跨膜转运而发生周期性结构改变时维持自身结构的稳定性. 同时, 在解析的 ATP 合酶结构中, 中心杆相对于侧杆只存在一种朝向的事实, 尽管与传统模型相矛盾, 但与本研究提出的转动模型却高度吻合.

传统模型所隐含的另一重要问题是, c 环需在膜内发生高速转动(约 100 r/s), 这势必对膜结构的稳定性造成严重干扰. 而在本研究模型中, c 环并不转动, 只发生周期性的构象变化, 这种对细胞膜干扰的问题也就不复存在.

从实验角度考虑, 区分本研究模型与传统模型的关键在于, 确定 c 环和 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体究竟何者相对于 ab 侧杆(即以细胞膜作为参考系)转动. 事实上, 在体外实验中, 当 c 环被固定后, 无论是由 ATP 水解^[27,28] 还是由跨膜质子梯度所驱动的^[29] $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的转动都已经被观察到. 依据传统模型, 这些结果被迫解释

图 2 ATP 合酶中由往复运动转化为旋转运动的工作原理示意图(A), 及该机制模拟动画的静止状态(B)

A: 在“工作态”时, 质子(H^+)的结合使 c 环(c -ring)发生构象变化, 导致 γ 中心杆向上运动, 通过一个斜面推动 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体. 由于 δ 亚基的阻挡作用, $\alpha_3\beta_3$ 六聚体被迫转动. 质子被释放后, c 环和中心杆向下运动返回其初始状态, ATP 合酶回到新的“基态”, 新一轮的质子转运及旋转催化准备就绪; B: 模拟动画基于梭藻线粒体 ATP 合酶的冷冻电子显微镜结构^[22], 及牛线粒体 ATP 合酶的 X 射线衍射晶体结构^[17]而生成

图3 中心杆的 γ 亚基与c环以一种非对称的形式相互作用(A)与 $\alpha\beta$ 二聚体通过一个倾斜表面相互作用(B), 此作用面由一段最保守的 γ 亚基氨基酸序列组成(C)

A: 线粒体 ATP 合酶的 c 环与 γ 亚基相互作用的表面(红色标记部分)^[17](PDB 号: 2XND). 图中 c 环, a 亚基及 b 亚基皆以灰色显示. 其中, b 亚基的位置根据 PDB 数据库中的 2WSS 晶体结构推断得出^[20], 而 a 亚基的位置根据 ATP 合酶的冷冻电子显微镜结构推断得出^[22]; B: 线粒体 ATP 合酶中 γ 亚基与 $\alpha\beta$ 二聚体的相互作用倾斜表面^[20](PDB 号: 2WSS). 其中, $\alpha\beta$ 亚基以灰色显示, γ 亚基以红色显示(其中与 $\alpha\beta$ 二聚体的相互作用倾斜表面以绿色显示); C: 不同物种的 ATP 合酶 γ 亚基氨基酸序列比对结果. 构成 γ 亚基与 $\alpha\beta$ 二聚体的相互作用倾斜表面的氨基酸残基由绿色框圈出, 其中包含 γ 亚基中最保守的 Asp/Asn-Arg/Lys-Gly-Leu-Cys-Gly 序列

为 ATP 合酶的 F_1 部分和其整合在膜中的 ab 侧杆一起围绕被固定的 c 环发生转动. 而依据本研究模型, 这些条件下所观察到的仅是 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的转动, 无需其他部分也一起转动. 在活细胞中, 要观察 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体或 c 环究竟何者相对于细胞膜参考系转动, 目前技术

上尚难以实现, 有待发展新的技术或设计新的实验. 在体外, 一种可能的方案是, 在上述固定 c 环的实验体系中^[29], 将探针标记在 b 亚基(侧杆)上, 观察其是否转动(依照传统模型, 转动可以发生, 而依照本研究模型, 则转动不会发生).

致谢 感谢北京大学刘洋、余家钰、肖皓天、王睿、王妍和金凤参与讨论并提出建议. 蛋白质结构作图使用了美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Chimera 软件.

参考文献

- 1 von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P. Essentials for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. Annu Rev Biochem, 2009, 78:

649–672

- 2 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, 191: 144–148
- 3 von Ballmoos C, Cook G M, Dimroth P. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 43–64
- 4 Abrahams J P, Leslie A G W, Lutter R, et al. Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 1994, 370: 621–628
- 5 Stock D, Leslie A G W, Walker J E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 1999, 286: 1700–1705
- 6 Junge W, Nelson N. ATP Synthase. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 631–657
- 7 Vik S B, Antonio B J. A mechanism of proton translocation by F_1F_0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *J Biol Chem*, 1994, 269: 30364–30369
- 8 Duncan T M, Bulygin V V, Zhou Y, et al. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10964–10968
- 9 Junge W, Sabber D, Engelbrecht S. ATP-synthesis. Rotatory catalysis by F-ATPase: real-time recording of intersubunit rotation. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys Chemie*, 1996, 100: 2014–2019
- 10 Boyer P D. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 717–749
- 11 Gresser M J, Myers J A, Boyer P D. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *J Biol Chem*, 1982, 257: 12030–12038
- 12 Sabbert D, Engelbrecht S, Junge W. Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature*, 1996, 381: 623–625
- 13 Noji H, Yasuda R, Yoshida M, et al. Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase. *Nature*, 1997, 386: 299–302
- 14 Walker J E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochim Soc Trans*, 2013, 41: 1–16
- 15 Yasuda R, Noji H, Yoshida M, et al. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F_1 -ATPase. *Nature*, 2001, 410: 898–904
- 16 Düser M G, Zarrabi N, Cipriano D J, et al. 36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in F_0F_1 -ATP synthase. *EMBO J*, 2009, 28: 2689–2696
- 17 Watt I N, Montgomery M G, Runswick M J, et al. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 16823–16827
- 18 Meier T, Polzer P, Diederichs K, et al. Structure of the rotor ring of F-Type Na^+ -ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, 2005, 308: 659–662
- 19 Vollmar M, Schlieper D, Winn M, et al. Structure of the c_{14} rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem*, 2009, 284: 18228–18235
- 20 Rees D M, Leslie A G W, Walker J E. The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21597–21601
- 21 Dickson V K, Silvester J A, Fearnley I M, et al. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J*, 2006, 25: 2911–2918
- 22 Lau W C Y, Rubinstein J L. Subnanometre-resolution structure of the intact *Thermus thermophilus* H^+ -driven ATP synthase. *Nature*, 2011, 481: 214–218
- 23 Allegretti M, Klusch N, Mills D J, et al. Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature*, 2015, 521: 237–240
- 24 Börsch M, Diez M, Zimmermann B, et al. Stepwise rotation of the γ -subunit of EF_0F_1 -ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *FEBS Lett*, 2002, 527: 147–152
- 25 Martin J, Hudson J, Hornung T, et al. F_0 -driven rotation in the ATP synthase direction against the force of F_1 ATPase in the F_0F_1 ATP synthase. *J Biol Chem*, 2015, 290: 10717–10728
- 26 Zhao J, Benlekbir S, Rubinstein J L. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*, 2015, 521: 241–245
- 27 Tanabe M, Nishio K, Iko Y, et al. Rotation of a complex of the γ subunit and c ring of *Escherichia coli* ATP synthase: the rotor and stator are interchangeable. *J Biol Chem*, 2001, 276: 15269–15274
- 28 Nishio K, Iwamoto-Kihara A, Yamamoto A, et al. Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes: a or beta subunit rotation relative to the c subunit ring. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13448–13452
- 29 Watanabe R, Tabata K V, Iino R, et al. Biased Brownian stepping rotation of F_0F_1 -ATP synthase driven by proton motive force. *Nat Commun*, 2013, 4: 1631