2PD037

F1-ATPaseによる蛍光性ATPの結合と加水分解

○西坂崇之¹、足立健吾²、野地博行¹、大岩和弘³、安田涼平¹、木下一彦^{1,4}、¹CREST「生命活動のプログラム」チーム13、²金沢大・理・物理、³通信総合研究所・関西支所、⁴慶大・理・物理

回転分子モーターであるF1-ATPaseのエネルギー変換機構について調べる目的で、蛍光性ATP1分子とその偏光の向きを可視化できる顕微鏡を作製した。溶液中にある色素からの背景光を下げるため、対物レンズを通した全反射照明を用い、エバネッセント波でガラス面近傍を励起した。ガラス面上にあるF1にATPが結合すると、1分子に対応すると思われる輝点が高感度カメラにより観察できた。エバネッセント波の偏光の方向は、全反射させる光線の入射方向に依存する。観察された輝点の輝度はエバネッセント波の偏光方向によって変わったため、輝度の正確な定量化が困難となった。そこで中央部分をマスクした円盤を用いて輪帯状の光線を作り、それを対物レンズの縁の部分に集光させた。試料面において、光線は全反射の臨界面以上ですべての方向から均一に照射されるため、無偏光のエバネッセント場を持つ全反射照明が実現できた。この照明により、輝点の明るさは狭い幅の1個のピークを持つ分布になることが確認できた。ところでF1には活性を持つATP結合サイトが3つあり、このサイトに順番にATPが結合していくことが回転のメカニズムに重要であると考えられている。蛍光分光計を用いた実験により、今回観察に用いたミュータントにおいては、1つ目のサイトに対する蛍光性ヌクレオチドの親和性は $K_d=6.5\text{ nM}$ と見積もられた。これより低い濃度(25nM)で蛍光性ATPを顕微鏡下で観察したところ、強い励起光($\geq 25\mu\text{W}/10\mu\text{m}^2$)では強度に反比例して輝点の寿命が短くなったので、ここでの輝点の消滅は退色の効果を見ていると思われる。これより弱い励起光($< 20\mu\text{W}/10\mu\text{m}^2$)では輝点の寿命が70秒となり、これが加水分解された蛍光性ADPの $1/k_{\text{cat}}$ に相当すると考えられる。ATP濃度が高い時(25nM)には、強い励起光($30\sim 70\mu\text{W}/10\mu\text{m}^2$)においても5分間以上光り続ける輝点が観察された。また輝点の偏光方向が時間と共に変化するサンプルも観察された。異なる蛍光性ATPが、同じF1分子の違うサイトに次々に結合・解離を繰り返した場合、輝点の見かけの寿命は増加し、かつ偏光の方向も変化する。今回の結果が、こういったATPの連続的な結合を表しているという可能性を現在検討している。

T. Nishizaka, K. Adachi, H. Noji, K. Oiwa, R. Yasuda and K. Kinoshita Jr.: Binding and hydrolysis of fluorescently labeled nucleotide by F1-ATPase.

2PD039

蛍光色素1分子を用いたF₁-ATPaseの無負荷回転運動の観察

○足立健吾^{1,2}、安田涼平²、野地博行²、吉田賢右^{2,4}、木下一彦^{2,3}
¹金沢大理、²CREST team13、³慶大理工、⁴東工大資源研

F₁-ATPase は、回転子γサブユニットを3つのβサブユニットと3つのαサブユニットが交互に取り囲んだ構造をした、直径 10nm の大きさの回転分子モーターである。ATP の加水分解は各βサブユニットでおこり、その加水分解エネルギーを用いてγサブユニットが回転している。過去の実験ではγサブユニットにアクチンフィラメントを付けF₁の回転を可視化していた[H. Noji *et al.*, 1997 Nature; R. Yasuda *et al.*, 1998 Cell]。しかし、アクチンフィラメントの動きがγサブユニットの動きを直接反映しているかは分らなかった。そこで蛍光色素1分子のような回転の負荷にならない小さなプローブをγサブユニットに付け、双極子モーメントの向きからγサブユニットの回転を1分子で検出することを試みてきた。

無負荷での回転運動を測定するために、3つのβサブユニットに付けた His-tag を Ni NTA カバーガラス表面に固定して、γサブユニットに付けた蛍光色素1分子(Cy3)の双極子モーメントの向きを次の2通りの方法で可視化した。1つ目は、励起光の偏光の向きを時間的に回転させ、1分子の蛍光強度変化の位相から色素の向きを測定する方法。2つ目は、無偏光励起した色素1分子からの蛍光を偏光ビームスプリッターで縦横成分の偏光に分けることで色素の向きを調べる方法である。γサブユニットに付けたアクチンフィラメントの回転がステップ状になるATP(20 nM)条件[R. Yasuda *et al.*, 1998 Cell]で、1つ目の実験をおこなったところ、γの回転はアクチンフィラメントと同様に 120° ステップであることが分かった。このことからアクチンフィラメントの回転で見られたステップはF₁の回転を反映したものであることが分かった。ATP 濃度を変えたとき(20~200 nM)の回転速度については、アクチンフィラメントを付けたときの回転速度や溶液中でのATP分解活性などとあわせて現在検討中である。

K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinoshita Jr.: Imaging of F₁-ATPase rotation under no load through single fluorophore polarization

2PD038

微小ビーズを用いたF1の高速回転の検出

○安田涼平¹、足立健吾^{1,2}、野地博行¹、吉田賢右^{1,2}、木下一彦^{1,4}
¹CREST team13、²金沢大理、³東工大資源研、⁴慶大理工

F1はATP合成酵素の一部であり、単独ではATPを加水分解する。私達は、F1が1回のATP加水分解で1/3回転する分子モーターであることを示した(H. Noji *et al.*, Nature 1997; R. Yasuda *et al.*, Cell 1998)。F1の回転を可視化した方法は、F1の回転子にアクチンフィラメントを付け、アクチンフィラメントの回転を蛍光顕微鏡で観察するというものであった。これにより、低濃度ATP(μM以下)で1回のATP加水分解に伴う1/3回転のステップ状の回転を観察することができた。しかし、この方法はアクチンフィラメントに大きな粘性抵抗がかかるため、高濃度ATPでは、ステップ状の回転は観察されず、回転速度も~5回転/秒で飽和した。

そこで今回は、より小さなプローブを使ってF1-ATPaseの回転を観察することにした。直径0.1 μmのビーズが数個凝集したものを回転子に取り付け、その回転を暗視野顕微鏡で観察した。このビーズの粘性係数は、アクチンフィラメントの系にくらべて数十分の1程度である。ATP濃度が高い時(μM以上)、通常のCCDカメラの時間分解能(1/30秒)では、ビーズの速い回転を捉えることができなかった。1/8000秒の時間分解能を持つ高速CCDカメラを用いた。これにより、ビーズが数十nmの半径で回転する様子が観察され、回転速度は、2mM ATP存在下で40-80回転/秒に達した。これにより、ビーズが数十nmの半径で回転する様子が観察され、2mM ATP存在下での回転速度は、40-80回転/秒に達した。ビーズの回転速度は、ATP濃度μM-mMの範囲で、F1の溶液中でのATP加水分解速度を3で割った値に近かった。このことから、高濃度のATPにおいても、F1が1回のATP加水分解で1/3回転することが確認された。

現在、高濃度ATPにおいてもステップが存在するのか、サブステップが存在するのかなどを検討している。

R. Yasuda, K. Adachi, H. Noji, M. Yoshida and K. Kinoshita, Jr.: Fast rotation of F1 detected through the motion of micro-beads attached to the rotor.

2PD040

粘性物質添加による細菌べん毛の推進効率向上

○工藤成史¹、新井陽二¹、布施浩隆¹、曲山幸生²
 (桐蔭横浜大工¹、食総研²)

バクテリアは、らせん形のべん毛を回転させて、水の中を泳いでいる。バクテリアの遊泳速度(v)とべん毛回転数(f)の比(v/f)は、べん毛1回転あたり菌がどれだけ進むかを表すパラメータであり、べん毛の推進効率を意味している。

流体力学のストークス近似に基づく従来の理論によれば、 v/f は粘度に依存しないはずである。実際、塩類のみを含む水の中にビブリオ菌(べん毛を1本しか持たないもの)を懸濁し、温度変化により粘度を変えて v/f を求める実験を行ったところ、得られた値は温度(すなわち粘度)に依存しなかった(Magariyama *et al.*, 1995)。

今回私たちは、線状高分子であるメチルセルロースを加えて、ビブリオ菌懸濁液の粘度を上げた状態で、レーザー暗視野顕微鏡を用いて v/f を測定した。その結果、メチルセルロースを添加すると、 v/f の値が大きくなるという、水だけの場合とは異なる現象を見出した。この結果は、高分子を添加したときの微小世界の運動が、従来の理論だけでは説明できないことを示している。また、高分子を含む環境に生息するバクテリアが少なくないことを考えると、べん毛の推進効率が高分子添加により高くなることの、生物学的意味にも興味を持たれる。

S. Kudo, Y. Arai, H. Fuse, Y. Magariyama: Increase in efficiency of bacterial propulsion by the addition of viscous agents