1I1600

F₁-ATPase による ATP 合成の試み

○伊藤 博康^{1,2}、野地 博行²、吉田 賢右^{2,3}、木下 一彦^{2,4} (¹ 浜松ホトニクス (株) 筑波研究所、² CREST チーム 13、³ 東工大・資源研、⁴ 慶大・理工・物理)

ATP 合成酵素は、水に可溶性の F₁ サブユニットと膜に埋め込まれた F₀ サブユニットからなり、膜内外のプロトンの濃度勾配を利用して、可逆的に ATP の分解／合成を行う。F₁ サブユニット部分は簡単に膜から取り外すことができ、単体では、ATP 分解酵素として働く。ATP 分解の際に、F₁ の γ サブユニットが周囲の $\alpha_3\beta_3$ をステーターとして回転する回転モーターのローターであったことの確証は、この酵素をガラス基盤上に固定し、 γ サブユニットに大きな目印 (蛍光標識したアクチンフィラメント) をとりつけるという回転アッセイ法の確立が鍵であったと言えるだろう。我々は、この分子機械がどのような仕掛けで働くのか、分子内で何が起きているのかを、光学顕微鏡の下で、1 分子が働いている現場を直接「見て操作する」ことにより解明したいと考えている。大きな目印は、 γ サブユニットを操作するためのハンドルとしても用いることができる。目印を直径 1 μ m の磁気ビーズに変えて、外部から回転磁場を印加すると、ATP 存在下で、 γ サブユニットとともに回転している磁気ビーズの回転を止めたり、強制的に逆回転させることができた。磁場を取り除けば、磁気ビーズは再び ATP による反時計回りの回転を開始する。さて、ADP と Pi の存在下で、逆回転 (時計方向) を続ければ、F₁ ATPase は、ATP を合成することができるのだろうか？この問いに関しては、一昨年の年回で、ATP の検出の効率の問題があることを議論した。ATP の検出の効率の向上を目指した操作・計測システムを改良を行い、徐々に問題を解決しつつある。まだ、試行数も少なく、ATP は、できるともできないともいえない状態であるが、研究の進展について報告したい。

H. Itoh, H. Noji, M. Yoshida, and K. Kinoshita, Jr. : Try to detect the mechanically synthesized ATP of F₁-ATPase

1I1630

結合ヌクレオチド、構成サブユニット、温度が与える F₁-ATPase の活性への影響

○足立 健吾¹、安田 遼平¹、野地 博行¹、吉田 賢右^{2,3}、木下一彦^{2,3} (¹ CREST チーム 13、² 東工大・資源研、³ 慶大・理工・物理)

ATP 合成酵素の一部分である F₁-ATPase (F₁) はそれ自身が回転する分子モーターである。回転子 γ サブユニットは 3 つの β サブユニットと 3 つの α サブユニットに取り囲まれており、 β サブユニットでの ATP 加水分解にともなって回転がおこっている。ATP 再生系を用いた F₁ の溶液中での ATP 加水分解測定において、活性は測定開始直後最も高く、しだいに減少し、最終的に一定になる。この現象は MgADP 阻害と呼ばれる F₁ の性質で、ATP 加水分解によって生じる ADP がある確率で F₁ を不活性な状態にするためである。我々は開始直後の最も高い活性を MgADP 阻害の無い状態での F₁ の活性と考え、顕微鏡下で観察した 1 分子の回転速度と比較した。無負荷に近い条件で測定された 1 分子の回転速度 (昨年報告された安田らのデータ) は、加水分解活性から期待される値より高かった。ADP 阻害以外の原因があるのだろうか。我々は温度の活性に対する影響を検討した。我々の使う高熱菌由来の F₁ ($\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックス) を水温で 24 時間放置したときは、23°C で放置したもののよりも約 60% まで活性が減少した。ゲル濾過 HPLC で調べたところ、低温ではサブコンプレックスの解離が進んでいた。温度はコンプレックスの安定性に重要で、ヘテロな分子が活性に影響を与えることが見かけの低い活性の原因であろうと考えられる。さらに、活性測定開始以前から結合しているヌクレオチドの数、 $\alpha\beta\gamma$ 以外のサブユニットの影響などを検討している。

K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida and K. Kinoshita, Jr. : The effect of bound nucleotide, subunit composition and temperature on the ATPase activity of F₁-ATPase

1I1615

F₁ モーターの回転トルクを直接測定する

○野地 博行¹、伊藤 博康¹、足立 健吾¹、吉田 賢右^{1,2}、木下一彦^{1,3} (¹ CREST、² 東工大資源研、³ 慶大物理)

F₁ モーターは ATP 合成酵素の膜表在性部分であり、ATP を加水分解して分子中央の γ サブユニットを回転させる回転分子モーターである。モーターの機能に必要な最低限のサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3\gamma$ である。三つの α 、 β サブユニットは交互に並んでリング構造をとり、 γ サブユニットを取り囲んでいる。そして、三つの β が順番に ATP を加水分解することで、 γ が一方向に回転する。この回転の様子は、 γ に蛍光標識したアクチン線維を結合させ $\alpha_3\beta_3$ リングをガラスに固定することで、蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。F₁ モーターが出す回転トルクは、 $\alpha_3\beta_3$ リングと γ の間に生じる回転方向のポテンシャルの傾きである。すなわち、各角度での回転トルクがわかれば、このポテンシャルの形状をもとめることができる。これまでの実験では、回転しているアクチン線維の長さと同転速度で決まる粘性抵抗から回転トルクの値をもとめ、その値が角度によらずおおよそ 40pNm で一定であるとしている。しかし、この場合の回転トルクの値は、各角度での瞬間の回転速度で決まるために、正確に求められているとは言い難い。そこで今回は、アクチン線維の代わりに磁気ビーズを γ サブユニットに結合させ、外部から磁場を与えて回転を各角度において静止させた。この時に γ にかかっている外力の大きさを見積もることで、F₁ モーターの回転トルクを測定することを試みている。これによって、 $\alpha_3\beta_3$ リングと γ の間のポテンシャルの形をもとめることができるであろう。またさらに、この測定を ATP のアナログである AMP-PNP や生成物である ADP もしくは Pi 存在下で行なうことで、ATP 加水分解に伴うポテンシャルの変化の解明が期待できる。

H.Noji, H.Itoh, K.Adachi,M.Yoshida and K.Kinoshita : Direct measurement of torque value of F₁ motor

1I1645

F₁-ATPase による ATP の加水分解と回転の同時観察

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

回転分子モーターである F₁-ATPase 1 分子に対する ATP の結合・解離と、その回転の同時観察を行った。F₁ をガラス面に固定し、回転軸である γ -shaft に微小ビーズ (直径 0.2 μ m) 数個の集合体を結合させて、波長 $\geq$ 660 nm の明視野像としてビーズをとらえる。ATP の結合・解離は、蛍光性の ATP 1 分子をレーザー (波長 532 nm) のエバネッセント照明で励起して観察する (～ 50 nM まで可能)。F₁ には 3 つの ATP 加水分解サイトがあり、連続的な回転においては 1 個以上の ATP が絶えず結合していると考えられるので、通常の無標識の ATP を過剰にし (100-400 nM, $k_{\text{cat}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、蛍光性 ATP が～ 1 分に 1 回結合するような条件 (50 nM, $k_{\text{cat}} \sim 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で回転の観察を試みた。蛍光性 ATP が結合すると、F₁ は 120 deg. のステップ状の回転を行った。蛍光強度と回転の解析にはそれぞれビデオフレーム (33 ms) $\pm$ 1 程度の誤差があると仮定し、フレーム $\pm$ 2 の範囲で調べところ、91% のサンプル (N = 68) において ATP の結合とステップのタイミングは同期していた。興味深いことに、蛍光性 ATP が解離する前に 2 番目のステップが観察され (83%, N = 47)、さらに蛍光性 ATP の解離と 3 番目のステップもやはり同期した (79%, N = 33)。2、3 番目のステップは無標識の ATP の結合／加水分解によるものだと考えられる。今回の結果は蛍光性 ATP を含むものだが、これが通常の ATP だけによる回転にも当てはまるとすると、 μ M 以下の ATP 濃度においても、2 個以上のヌクレオチドが回転運動の間に絶えず結合しているようなメカニズムを考える必要があるかも知れない。

T. Nishizaka, K. Adachi, H. Noji, K. Oiwa, R. Yasuda and K. Kinoshita Jr. : Simultaneous observation of stepwise rotation and single ATPase by F₁-ATPase