3P161

β (E190D)F₁-ATPase 変異体の回転解析

○島袋 勝弥¹、宗行 英朗¹、安田 涼平³、原 清敬¹、木下一彦^{2,3}、吉田 賢右^{1,3} (¹東工大・資源研・生物資源、²総合バイオ・分子研、³CREST Team13)

F₁-ATPase($\alpha_3\beta_3\gamma$)はF₀F₁-ATP合成酵素の一部で、 $\alpha_3\beta_3$ リングの中心を γ が貫いた構造をしており、単独ではATPを加水分解する。F₁-ATPaseは回転分子モーターで、ATPの加水分解に伴い γ が回転する。これまで、F₁-ATPaseがATPを1つ消費するごとに、 γ が120°ステップして回転するとされてきた。しかし、最近、この120°ステップは90°ステップと30°ステップからなることが発見された。さらに、90°ステップのdwell timeはATP濃度に依存し、30°ステップはATP濃度に依存しないことから、前者はATP結合を、後者はATP結合以降に起こる何かの現象を反映していると考えられる。

そこで、30°ステップの詳細を調べるために、以下の変異体を作成し、解析をおこなった。

β の触媒部位にある190番目のGluをAspに変えた変異体を作成した。このGluをAspに変えることで、ATPから γ リン酸の引き抜きの過程が遅くなると予想される。この変異体のATPaseを測定したところ、V_{max}は野性型の1/100で3.4s⁻¹、K_mは2.5 μ Mと求まった。1分子回転観察をおこなったところ、video rate(30frame/s)でも、飽和ATP(>mM)存在下で120°ごとに3点でステップしながら回転しているのが確認できた。さらに、低濃度ATP(< μ M)では120°ステップではなく、90°と30°交互に計6点でステップしながら回転していた。発表では、さらに解析を進め、これらの結果から得られた知見を報告する。

K.Shimabukuro, E.Muneyuki, R.Yasuda, K.Y.Hara, K.Kinosita and M.Yoshida : Rotation analysis of beta(E190D)F₁-ATPase mutant.

3P163

F₁-ATPaseに結合した蛍光性ATPの角度の検出

○西坂 崇之¹、野地 博行²、木村 成輝¹、木下一彦^{3,4}、大岩 和弘¹ (¹通信総合研究所 生体物性G、²さががけ21、³岡崎・統合バイオ、⁴CREST チーム13)

回転分子モーターであるF₁-ATPaseのエネルギー変換機構を、顕微鏡下において1分子のレベルで調べている。昨年の年会では、蛍光性ATPの結合/解離とF₁の回転の同時観察について報告した。しかし実験では、複数の基質の連続的な結合と1回のイベントを分離する目的で、無標識の基質を混在させたため、結果の解釈が難しく課題が残った。そこで複数個のATPが結合している状況でも個々のATPが区別できるように、蛍光色素1分子の方向を検出する新しい全反射型顕微鏡を開発した。この光学系を用いれば、蛍光性ATPの方向のみならず、直接標識した色素により蛋白自身の微小な構造変化も精度良く検出できると期待される。【方法】レーザーを1方向から照射する全反射型照明において、発生するエバネッセント場の偏光の方向は、光源であるレーザーの偏光と入射の方向に依存する。そこでこの2つを同時に変化させるように、レーザーを対物レンズの開口数1.42の領域に円弧を描きながら照射し、同時に光源の偏光方向を弧の方向に一致させた。この光学系ではエバネッセント場の偏光がxy平面内で回転し、z方向の成分を持たない。偏光を時間的に回転させれば、色素の振動面とエバネッセント場の偏光方向が一致した時に輝点は最も明るくなるので、色素1分子の向きを容易に決定することができる。しかも全反射型であるため、溶液中にフリーの色素がある状態(〜100nM)でも観察が可能である。

F₁に蛍光性ATPが1分子しか結合しない濃度(uni-site条件)で観察したところ、ATPの向きを約10°の精度で決定することができた。今後はATPが複数個結合するような条件を見いだして解析を進め、回転中に3つのサイトの幾つにヌクレオチドが結合しているのかを決定したい。

T. Nishizaka, H. Noji, S. Kimura, K. Kinosita Jr. and K. Oiwa : Imaging of orientation of fluorescent ATP binding F₁-ATPase

3P162

F₁-ATPaseの回転軸 γ サブユニットの向きに依存したATPのアフィニティ

○足立 健吾¹、西坂 崇之²、野地 博行³、伊藤 博康^{1,4}、塩 育¹、大岩 和弘²、吉田 賢右^{1,5}、木下一彦^{1,6} (¹CRESTチーム13、²通総研・関西支所、³PRESTO、⁴浜松ホトニクス・筑波研究所、⁵東工大・資源研、⁶岡崎国立共同研究機構)

F₁-ATPaseは、3つの α サブユニット、3つの β サブユニットがそれぞれ交互に回転軸 γ サブユニットを取り囲んだ構造をしている。そして、3つの β サブユニットが協同的にATPの結合・加水分解・解離をすることで γ サブユニットを一方方向に回転させている。すなわち、 γ サブユニットの向きと β サブユニットのヌクレオチド結合状態とは密接に関連しており、 γ サブユニットの向きが3つの β サブユニットの協同性を制御していると考えられる。 γ サブユニットの向く角度が β サブユニットへのATPのアフィニティを変えているのである。この角度依存性を直接1分子レベルで調べることは、この分子の回転する仕掛けを理解する上で重要である。

F₁-ATPaseの回転の様子は、ガラス基盤に固定したF₁の γ サブユニットに取り付けた蛍光性アクチンフィラメントや微小ビーズ、蛍光色素1分子を使って光学顕微鏡下で直接観察されているが、取り付けるプローブとして磁性ビーズを用いれば、外部磁場によって γ サブユニットの向きを自由にマニピュレートすることができる。また、 γ サブユニットの回転にともなったATPの結合・解離の様子は、蛍光性(Cy3)ATPを使ってエバネッセント場蛍光顕微鏡下で測定されている。このような技術を使えば、外部磁場によって γ サブユニットに結合された磁性ビーズをある角度に向け、その角度での蛍光性ATPの結合する頻度や、結合した蛍光性ATPを何度回せば解離するかをエバネッセント場蛍光顕微鏡で観察することができるのである。現在、このように γ サブユニットの角度に依存した蛍光性ATPのアフィニティ測定を試みているところである。

K. Adachi, T. Nishizaka, H. Noji, H. Itoh, M. Shio, K. Oiwa, M. Yoshida and K. Kinosita, Jr. : The measurement of the gamma angle-dependent affinity of F₁-ATPase for ATP.

3P164

磁気ピンセットを用いたF₁モーターの回転ポテンシャルの測定

○野地 博行¹、伊藤 博康^{2,3}、塩 育³、足立 健吾³、宗行 英朗⁴、吉田 賢右^{3,4}、木下一彦^{3,5} (¹PRESTO、JST、²浜松フォトニクス筑波研究所、³CREST生命活動のプログラムチーム13、⁴東工大資源化学研究所、⁵岡崎国立共同研究機構バイオサイエンスセンター)

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モーターである。 γ を取り囲んでいる3つの β サブユニットが、順番にATPを加水分解しその構造を変化させることで、回転トルクを発生している。この回転トルクは、 $\alpha_3\beta_3$ リングと γ サブユニットの間に生じる回転方向のポテンシャルの傾きである。F₁モーターは、ATP加水分解に伴ってこの回転ポテンシャルの形状を「ATP結合型→ADP・Pi型→ADP型→カラ型」と変化させていると考えられる。それぞれの回転ポテンシャルの形を知ることは、このモーターがどのように力を発生するのかを理解するために不可欠である。そこで本実験では、F₁がヌクレオチド状態の変化に伴って回転ポテンシャルがどのようにに変化させるのかを明らかにするために、ATPアナログであるAMP-PNP存在下やADP存在下などで回転ポテンシャルの計測を行なった。F₁分子をガラス基板に固定し、 γ サブユニットに磁気ビーズを結合させた。回転の様子は、磁気ビーズの明視野像で観察することができる。そこに、AMP-PNPやADPを添加して回転を途中で停止させる。そして、外から磁場をかけて磁気ビーズを両方向に動かしてみる。その際、回転ポテンシャルの傾き(回転トルク)が大きいほど、外部磁場の角度と磁気ビーズの向いている角度のズレ角が大きくなる。このズレ角を色々な角度について調べることで、AMP-PNPやADPを結合した状態の回転ポテンシャルの形状を知ることができる。また、ATP存在下で連続的に回転しているF₁に外部から磁場をかけることで回転を静止させて、各角度におけるトルクも測定している。これによって、各回転ポテンシャルが連結したポテンシャルの形を知ることができ、H. Noji, H. Itoh, M. Shio, K. Adachi, E. Muneyuki, M. Yoshida, K. Kinosita, Jr. : Direct measurement of rotary potentials of F₁ motor using magnetic tweezers