B437

F1-ATPaseの構造変化に関する研究

○佐藤 美和、池口 満徳、木寺 紹紀（横浜市大・院総合理）

基質結合に伴う蛋白質の応答を線型のレベルで扱うことを考える。線型近似によって、摂動に伴う分布関数の応答は次式で与えられる： $\langle \Delta r_i \rangle_1 = \beta \sum_j \langle \Delta r_i \Delta r_j \rangle_0 f_j$ 。ここで、 $\langle \Delta r_i \rangle_1$ は基質結合に伴う原子 i の移動量、 $\langle \Delta r_i \Delta r_j \rangle_0$ は非摂動状態でのゆらぎの分散共分散行列、 f_j は原子 j にかかる外力である。この描像では、応答の挙動は非結合状態のゆらぎによって決まる。分散共分散行列は、弾性 network model や分子動力学法から計算でき、相当程度複雑なダイナミクスを反映させることができる。ここでは、ATP 合成酵素の水溶性ドメインである F1-ATPase($\alpha\beta_3\gamma$) の二つの結晶構造 1bmf, 1h8e の差が、上式の線形応答で再現可能かどうかの検証を行った。分散共分散行列は 1bmf に対する弾性 network model の計算から求め、外力は β_E の基質結合部位に最も近い C_α 原子にかけた。その結果を下図に示す。

M.Sato, M. Ikeguchi and A. Kidera : Structural change of F1-ATPase

B439

マクロな量である ATP の加水分解自由エネルギーと F₁-ATPase 一分子のステップ回転の関係○宗行 英朗¹、渡部 隆宏¹、野地 博行²、西坂 崇之³、吉田 賢右¹（¹東工大・資源研、²東大・生産研、³学習院・理・物理）

一分子の F₁-ATPase が ATP を加水分解して回転を起こす際、その個々のステップ動作とマクロに定義される ATP の加水分解の自由エネルギーの関係がどのようにになっているかは、非常に興味のある問題である。これを調べるには F₁-ATPase の回転を ATP, ADP, Pi の共存下で観察する必要があるが、このような実験は F₁-ATPase が ADP による特異的な阻害を強く受けるために従来不可能であった。昨年及び一昨年の本年会で我々は、回転実験用の変異体の β サブユニットに更に T165S, G181A, Y341W の変異を導入してこの ADP inhibition を大幅に軽減することに成功し (GT 変異体と呼ぶ)、その生化学的性質と ATP の加水分解の自由エネルギーが低くなった条件下での回転をビデオレートで観察して報告した。その結果、個々のステップ回転の速度は溶液中の ATP の加水分解の自由エネルギーの影響をほとんど受けず、ATP 結合の待ち時間が自由エネルギーの低下にともない長くなって、時間平均した速度が低下するように見えた。今回は更に、ADP やリン酸単独の効果や、時間分解能を高めた観察結果について報告し、エネルギー論と酵素反応速度論の両方の観点から結果について考えてみたい。

E. Muneyuki, T. Watanabe, H. Noji, T. Nishizaka, M. Yoshida : Relationship between the free energy of ATP hydrolysis and step rotation of F₁-ATPase

B438

Δ NC 変異体を用いた F1-ATPase のヌクレオチド結合数と回転速度の測定

○昆一下 理恵子¹、宗行 英朗²、井合 健太郎²、梶 直由¹、足立 健吾¹、伊藤 博康³、古池 晶¹、牧 泰史¹、吉田 賢右²、木下一彦¹（¹岡崎・統合バイオ、²東工大・資源研、³浜松ホトニクス・筑波研究所）

F1-ATPase は 3 つの α サブユニット、3 つの β サブユニットが交互にみかんの房状に並んだ円筒の真ん中に、棒状の γ サブユニットが突き刺さった構造をもち、ATP の加水分解エネルギーをもとに α 、 β からなる円筒に対して γ サブユニットが回転する分子モーターである。ATP の結合サイトは α 、 β サブユニット上にあるが、ATP を加水分解できるのは β サブユニット上の ATP 結合サイトのみである。F1-ATPase の回転メカニズムを明らかにするうえで、 β サブユニット上の 3 つの ATP 加水分解サイトにいくつの ATP が結合して回転が起こるかを調べる必要があるとなる。現在信じられている 2 つの相反する説は、1, Bi-site モデル—3 つの β サブユニットのうち最大 2 つのヌクレオチドが結合するだけでも回転が起こる (2 つで十分) 2, Tri-site モデル—3 つの β サブユニットすべてに何らかのヌクレオチドが結合してはじめて回転が起こる (3 つ必要) そこで、以下の 2 つの方法を用いて、平衡状態における F1-ATPase の結合ヌクレオチド数を測定した。1, ゲルろ過法 2, ATP 結合サイトに導入された Trp の蛍光消光測定 上述のとおり F1-ATPase には ATP の加水分解に寄与しない α サブユニット上の ATP 結合サイトがあり、この影響を避けるため、 α サブユニットに ATP を結合することが出来ない Δ NC 変異体を用いた。年会では F1-ATPase 1 分子の回転観察の結果とともに Bi-site モデル、Tri-site モデルのいずれのモデルがより妥当であるかを報告する。

R. Kon-Shimo, E. Muneyuki, K. Iai, N. Sakaki, K. Adachi, H. Itoh, S. Furuie, Y. Maki, M. Yoshida and K. Kinoshita, Jr. : Measurement of site occupancy and rotation speed of F1-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site

B440

F₁-ATPase の回転軸をねじる

○井合 健太郎、宗行 英朗、吉田 賢右（東工大・資源研）

【目的】

F₀F₁-ATP 合成酵素は、電気化学的ポテンシャル差にしたがった H⁺ の移動と共役して ADP と無機リン酸から ATP を合成する。F₁ 部位は、そのみで加水分解活性をもつことから、F₁-ATPase と呼ばれている。F₁-ATPase は、ATP 加水分解活性を持つ β サブユニットと、活性を持たない α サブユニットが交互に並んだ 6 量体リングの中心を γ サブユニットが貫く形をしている。3 つの β サブユニットが協調して ATP を加水分解することで γ サブユニットが一方向に回転する事が知られているが、その回転メカニズムの詳細はよく分かっていない。そこで本研究は回転機構の解明をその目的とする。

【方針】

回転軸である γ サブユニットは主に触媒部位を持つ (要は γ サブユニットを回転させている) β サブユニットと、hth 領域とスイッチ領域の 2 カ所で接触している。 γ サブユニットの回転軸の部分は α ヘリックスのコイルドコイル構造をとっている。そこでもし γ サブユニットのこの 2 つの領域の間の α ヘリックスの部分で 1 アミノ酸残基の挿入あるいは欠失を行うと、スイッチ領域側ではぴったり相互作用するが hth 領域側では角度がずれる (あるいはその逆) というようなことが起こりうるのではないかと。つまり $\beta\gamma$ サブユニット間の上下で相互作用が同期しなくなることで、一方向回転に何らかの影響が出るのではないかと考えた。 γ サブユニットにこれらの変異を導入した F₁-ATPase の特性と予想される構造から $\beta\gamma$ サブユニット間相互作用、及び回転メカニズムを考察していく。

K Iai, E Muneyuki, M Yoshida : Analysis of rotation mechanism of F₁-ATPase using twisted γ mutant