3P145

極低 ATP 濃度における F₁-ATPase の回転とトルク

○榊 直由^{1,2}、下-昆 理恵子¹、伊藤 博康^{3,4}、足立 健吾¹、宗行 英朗⁵、吉田 賢右^{5,6}、木下 一彦¹ (¹ 岡崎統合バイオ、² 総研大・物理・機能分子、³ 浜松ホトニクス・筑波研究所、⁴ JST・CREST、⁵ 東工大・資源研、⁶ JST・ERATO)

F₁-ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma$) は ATP 駆動の回転分子モーターであり、 α と β が交互に並んでできた円筒構造の中を棒状の γ が回転する。触媒部位は 3 つの β にそれぞれ 1 つずつ存在し、ATP が順番に加水分解されることにより、 γ が一方方向に回転すると考えられている。3 つの触媒部位においてヌクレオチド (ATP または ADP) の占有数がどのように遷移し、それがどのようにに回転と結びついているかはまだよくわかっていない。現在のところ、F₁ が回転するためにはヌクレオチドの占有数が 3 になる状態が必要だとする説が有力である。そこで、ヌクレオチドの占有数が少なくなると考えられる非常に低い ATP 濃度で F₁ は回転するのか、もし回転するならばそれは通常の ATP 濃度のときと違いがあるのかどうかを調べることにした。本研究では、F₁ をガラス表面に固定し、微小なプラスチックの粒子 (以下、ビーズと呼ぶ) を γ に結合させ、その回転を光学顕微鏡で観察した。回転観察には大小 2 種類のビーズを使用し、大きいビーズはトルク測定に、小さいビーズは回転速度測定に用いた。トルクは ATP 濃度 (2 nM-2 mM) によらずほぼ一定であった。また、回転速度は ATP 濃度 (0.2-600 nM) にはほぼ比例した。これまでのところ、F₁ の挙動が“低 ATP モード”にはつきりと移行する様子はみられていない。しかし、0.2-2 nM ATP のような非常に低い ATP 濃度では、頻繁にバックステップするといったような異常なステップがみられる傾向があった。

N. Sakaki, R. Shimo-Kon, H. Itoh, K. Adachi, S. Furuike, E. Muneyuki, M. Yoshida and K. Kinoshita, Jr. : Rotation and torque of F₁-ATPase at extremely low ATP concentrations

3P147

Δ NC 変異を導入した F₁-ATPase のヌクレオチド結合数と ATPase 加水分解活性

○下-昆 理恵子¹、宗行 英朗²、榊 直由¹、足立 健吾¹、古池 昌¹、伊藤 博康^{3,4}、井合 健太郎²、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 浜ホト・筑波研究所、⁴ 科技団・CREST)

F₁-ATPase は ATP の加水分解エネルギーをもとに α 、 β サブユニットそれぞれ 3 個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 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 サブユニット上の合計 3 つの ATP 結合サイトのみである。F₁-ATPase の活性の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 加水分解サイトのうちいくつに ATP が結合して十分な活性が出るかを調べることが必要となる。現在提唱されている 2 つの相反するモデルは、Bi-site モデル—3 つの β サブユニットのうち最大 2 つにヌクレオチドが結合すれば活性が出る (2 つで十分) 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活性が出る (3 つ必要) である。そこで、我々はこれら 2 つのモデルのうちどちらがより妥当か調べることを目的とし、F₁-ATPase に結合しているヌクレオチドの個数と ATPase 活性の関係を調べた。結合ヌクレオチド数は、限外ろ過膜を用いた直接測定法、ヌクレオチド結合により消光する Trp をプローブとして導入した変異体を用いた方法の 2 通りの方法によって決定した。ATP 存在下では、F₁-ATPase は活性を持つ活性化状態と活性を持たない非活性化状態の 2 状態をとれるが、各々の状態でのヌクレオチド結合数を求めることを試みた。また、これらの実験では非触媒部位である α サブユニットに結合しているヌクレオチドの影響を排除するため、 α サブユニット上にヌクレオチドが結合出来ない変異体 (Δ NC) を用いた。その結果、Tri-site モデルのみでは説明できない結果を得たので、それについて報告する。

R. Shimo-Kon, E. Muneyuki, A. N. Sakaki, K. Adachi, S. Furuike, H. Itoh, M. Yoshida, K. Kinoshita Jr. : Site occupancy and ATP hydrolysis activity of F₁-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site

3P146

F₁-ATPase の回転運動の温度依存性 (2)

○古池 昌¹、榊 直由¹、足立 健吾¹、伊藤 博康^{2,3}、昆一下 理恵子¹、吉田 賢右⁴、木下 一彦¹ (¹ 岡崎統合バイオ、² 浜松ホトニクス・筑波研究所、³ 科技振ソフトナノマシン、⁴ 東工大・資源研)

F₁-ATPase (F₁) は、ATP の加水分解により駆動する回転分子モーターである。好熱菌由来の F₁ を用いて、回転速度や回転トルクの温度依存性を調べた。至適温度 (75 ℃) が高いため、失活させることなく幅広い温度範囲でその回転運動を観察できる利点がある。

ローターである γ サブユニットの先に目印となるビーズを付け、その回転を高速度カメラ (500 fps) で観察した。主な結果は、1. 回転速度は温度上昇と共に増加、2. 回転トルクは、23~50 ℃ではほぼ一定、3. 低温 (4 ℃) での ATP 結合速度、ATP 加水分解速度は共に室温の 15 分の 1 程度に減少するというものであった。高温 (55 ℃以上) では、ビーズが外れるために測定不能であったので、バルクでの ATP 加水分解速度から高温での回転速度を見積もることにした。ATP 再生系存在下では、反応開始直後の最大活性 A^i (初期状態活性: 全ての F₁ が活性化状態) と、活性阻害により加水分解速度が一定となる平衡状態活性 A^e (活性化状態と非活性化状態の F₁ が平衡化) を調べることができる。回転観察では、活性化状態の F₁ を観察しているため、その回転速度は A^i に対応する。温度の上昇に伴い A^i は単調に増加したが、40 ℃以上では消失し、 A^e のみが観測された。4 ℃から 35 ℃までの活性の比 $R = A^e/A^i$ (23 ℃で 0.2) を外挿すると、65 ℃では 0.04 であった。ここで、 A^e の実測値 (250/s) から予想される A^i は約 6000/s となり、F₁ は生理条件で 2000/s 以上の速度で回転していることが示唆された。現在、このような高温高速回転を観察できる実験系の作成を試みている。年会では、実験結果の詳細と進展を報告する。

S. Furuike, N. Sakaki, K. Adachi, H. Itoh, R. Kon-Shimo, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr. : Temperature Dependence of the Rotation of F₁-ATPase (2)

3P148

F₁-ATPase 変異体の 1 分子回転観察: ATP-binding dwell の長さが catalytic dwell に与える影響

○鳥袋 勝弥¹、宗行 英朗²、吉田 賢右^{1,2} (¹ 科技機構・ERATO 吉田プロジェクト、² 東工大・資源研・生物資源)

F₁-ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma$) は、回転分子モーターで、ATP の加水分解に伴い、内部の γ が $\alpha_3\beta_3$ リングに対して回転する。F₁-ATPase が ATP を 1 つ消費することに γ は 120° ステップするので、回転の最小単位はこの 120° ステップだと言える。さらに、この 120° ステップは細かく分けて、ATP-binding dwell, 80°-rotation, catalytic dwell, 40°-rotation の 4 つの段階からなると考えられる。ATP 結合待ちの状態 (ATP-binding dwell) の F₁-ATPase に ATP が結合すると、 γ が 80° 回転 (80°-rotation) し、catalytic dwell と呼ばれる‘回転の待ち’状態に到達する。catalytic dwell で ATP の加水分解、加水分解産物の解離が起これ、それに伴い γ が 40° 回転 (40°-rotation) して再び ATP-binding dwell 状態になり、反応の 1 サイクルが終了する。

これまで、catalytic dwell の長さは ATP 濃度に依存せず、一定だと考えられてきた。ところが、F₁-ATPase 変異体 ($\alpha_3\beta$ (E190D) γ) では、ATP 濃度が低くなるにしたがって、catalytic dwell が短くなる傾向が見られた。特に K_m 以下の ATP 濃度では、この現象が顕著に観察された。catalytic dwell の長さ、その直前の ATP-binding dwell の長さの関係を調べたところ、ATP-binding dwell が長いほど catalytic dwell が短くなることが分かった。この結果は、ATP-binding dwell が長いと、catalytic dwell に到達する前に、その ATP-binding dwell で ATP の加水分解が起きてしまうことを示唆している。つまり、F₁-ATPase では、ATP 加水分解反応の素過程の順番が厳密に決まっているわけではなく、ある程度、順番が前後することがあると考えられる。

K. Shimabukuro, E. Muneyuki, M. Yoshida : Single molecule analysis of the rotation in F₁-ATPase mutant: the effect of ATP-binding dwell length on the catalytic dwell