3P149

F₁-ATPase の回転と ATP 結合・解離のメカニズム

○足立 健吾¹、西坂 崇之²、島袋 勝弥³、野地 博行⁴、伊藤 博康⁵、大岩 和弘⁶、吉田 賢右^{3,7}、木下一彦¹ (¹岡崎統合バイオ、²学習院・理、³ERATO[®] ATP System[®]、⁴東大・生産研、⁵浜松ホトニクス&CREST、⁶関西先端研究センター、⁷東工大・資源研)

F₁-ATPase は中央の γ サブユニットを 3 つの α サブユニット、3 つの β サブユニットが交互に取り囲んだ構造をしている。各 β サブユニットでの ATP の結合・加水分解・解離に伴って γ サブユニットが 80° と 40° のサブステップから成る 120° の回転をする。この 3 つの部位の協同的なヌクレオチドサイクルと回転との関係を調べるために、 γ に付けたビーズの明視野像で F₁ の回転を観察しながら、対物式全反射蛍光顕微鏡をもちいた蛍光性 ATP アナログ (Cy3-ATP) の 1 分子蛍光観察で ATP の結合・解離を同時に測定した。

Cy3-ATP の結合速度 ($2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) は通常の ATP より 10 倍ほど低い、Cy3-ATP のみで F₁ を回転させることができた。50,100,150nM の低濃度 Cy3-ATP において、ビデオレート内での観察では、ATP 待ちの角度で 2 個の Cy3-ATP が結合していた。また、 γ に付けるビーズとして磁性ビーズを用い外部磁場で加水分解方向に γ を回転させると、ATP 待ちの角度近くを除いてほとんどの角度で 2 個の Cy3-ATP が結合し続けることが分かった。さらに、ATP と Cy3-ATP 混在で γ を回転させ 1 個の Cy3-ATP が結合してから解離するまでの角度を測定したところ 240° であった。加水分解の遅い ATP- γ -S や加水分解ステップが遅くなる変異体 F₁ を使ったビデオレートサブステップの実験によって、Cy3-ATP (ADP) の解離は 80° サブステップのときに起こることが分かった。これらの結果から、F₁ はそのほとんどのサイクルにおいて 2 個の結合ヌクレオチド状態であり、ATP 待ちの角度で 3 つ目の ATP が結合し、続いて起こる 80° サブステップのときのみ 3 個になることが予想される。現在、Pi の解離がどこで起こっているのかを調べている。

K.Adachi, T.Nishizaka, K.Shimabukuro, H.Noji, H.Itoh, K.Oiwa, M.Yoshida, K.Kinoshita, Jr. : Mechanism of rotation and ATP binding/release in F₁-ATPase

3P151

1 分子を見ながら力学計測する

○西川 宗¹、西川 正俊²、Martin Zulliger³、岩根 敦子³、柳田 敏雄^{1,3} (¹CREST・ソフトナノマシン、²阪大院・基礎工、³阪大院・生命機能)

レーザートラップを用いた 1 分子力学計測法はミオシンなど分子モーターの機能計測に使用される。高い時間分解能と空間分解能によりステップサイズやキネティクスの情報を得る強力なツールであるが、1 分子イメージングのように 1 個であることを随時確認しないので、1 分子の証明はオフラインの統計的手法に委ねられる。この方法では、力学計測を始める前に 1000 ポイント近くのデータ収集を必要とするばかりか、最終的には相互作用確率が低いことが 1 分子の根拠となる。つまり相互作用するポイントをあまねく探し回り、苦労の末に結果を得ることが現状である。

分子モーター 1 分子を見ながら力学計測できれば話はずいぶん楽になる。本研究では、蛍光ラベルした分子モーターを見ながらダブルトラップ法で力学計測する系の構築を目指す。まず、フォトファブリケーションにより表面にサブミクロン幅の矩形の隆起をもつスライドガラスを作成した。GFP を融合したミオシンを結合しエバネッセン照明を行うと、隆起部にミオシンの輝点を確認することができた。隆起幅が十分に小さいので、力学計測の際にも複数分子が同時に相互作用する可能性は極めて少なく、アクチンフィラメントとガラスエッジの接触もなく作業することができた。

近年、多種多様な分子モーターが力学計測の対象となっており、溶液条件により複雑に会合状態を変える (1 分子ではなくなる) ものも少なくない。また、力学計測と化学反応の同時計測など煩雑な操作を伴う 1 分子計測の必要性も増している。分子モーター 1 分子を確認しながら簡単に力学計測できることで、これらの問題を解決できると考えられる。

S.Nishikawa, M.Nishikawa, M.Zulliger, A.H.Iwane, T.Yanagida : The method of force measurement, after checking single molecules.

3P150

ヌクレオチド非結合型 F₁-ATPase のポテンシャル測定

○原 陽子、黒田 綾、野地 博行 (東大・生産研)

F₁-ATPase (以下 F₁) は、3 つの β サブユニット上の ATP 加水分解に伴って、真ん中の γ サブユニットが回転するモーター蛋白質である。 β サブユニット上のヌクレオチドの結合・解離によって、 γ サブユニットと α β リングの間のポテンシャルの形状が変化し、 γ サブユニットが方向に回転する。このポテンシャルの移り変わりは、 β サブユニットの構造が、何も結合していない状態 (カラ型) → ATP 結合型 → ADP 結合型と順次変化することによって引き起こされると考えられる。そのため、それぞれのポテンシャルの形状を測定すれば、F₁ がどのように回転するかを明らかにすることができる。ATP 結合型と ADP 結合型のポテンシャルは、すでに実測されており、どちらも特定の角度において安定点をもつ非対称的な谷型ポテンシャルであることが分かっている (昨年度ポスター B289)。本研究ではカラ型のポテンシャルを測定するために以下の実験を行った。

1 分子観察は、 α β リングをガラス基板上に固定し、 γ サブユニットに磁気ビーズを結合させて行った。まず、低濃度 ATP 存在下で ATP 結合による 120 度ごとのステップを観察した。F₁ は ATP と非常に親和性が強く、nM オーダーの ATP を結合する。そのため、溶液中のごくわずかな ATP が問題となる。そこで、溶液中にタグのついていない F₁ を大量に流し込むことにより ATP を完全に取り除いた。F₁ に結合した ATP は 100 秒後には、溶液中に解離するので、溶液交換後しばらく待てば、ATP が結合していない状態になるはずである。その結果、この条件下での γ サブユニットは、ATP 結合のステップとは別の角度に安定して存在することがわかった。また、初めの角度から他の角度にランダムに遷移する様子も観察された。現在、 γ サブユニットの存在位置からポテンシャルの測定を行っている。

Y Hirono-Hara, A Kuroda, H Noji : Direct measurement of potential of nucleotide free F₁-ATPase

3P152

蛍光性 CdSe ナノ粒子を用いたモータータンパク質の無負荷・高精度の運動解析法の開発

○佐藤 崇¹、渡辺 朋信²、樋口 秀男^{2,3} (¹東北大・材料システム、²東北大・先進医工、³東北大・学際センター)

現在、単一分子モーター蛋白質の運動解析には、光トラップしたビーズのナノ計測法、ビデオ 1 分子イメージング法が用いられている。しかしながら、光ピンセットによる負荷は、モーター蛋白質の運動に影響を与える。また、ビデオ装置を用いた 1 分子イメージング法は、空間分解能が低く (50nm/33ms)、位置精度を上げる為には、画像を積算し時間分解能を下げざるを得ない (1.5nm/500ms など)。上記の分解能では、極低濃度 ATP でしかモーター蛋白質の運動ステップサイズ等を測定できない。そこで我々は、無負荷条件下で、かつ、nm,ms の分解能でモーター蛋白質の運動を観察できる手法を構築した。蛍光標識として CdSe ナノ粒子 (サイズ: 5~20nm) を用いて、その蛍光像を高感度冷却型 CCD カメラで撮影した。モーター蛋白質の 1 分子イメージングに CdSe ナノ粒子を用いることは、蛍光分子や蛍光ビーズを用いるより有利な点が多い。CdSe ナノ粒子は有機蛍光分子に比べ蛍光強度、蛍光寿命ともに約 20 倍であるため、明るく長時間の蛍光観察が可能である。解析法には、蛍光像の蛍光強度分布を Gauss 関数に近似することで CdSe 粒子の位置を計測する方法をとった。本手法による、スライドガラスに CdSe 粒子を固定した際の位置精度は 3nm/50ms であり、ステージを 4nm 毎に微小振動させたところ、CdSe 粒子がステップ状に運動している様子を計測することができた。実際に、モーター蛋白質キネシンにビオチン/アビジン系を介して CdSe 粒子を結合させ、微小管上の運動を計測してみたところ、キネシンの 1 ステップである 8nm の位置変化を計測することに成功した。この手法を用いてミオシン V がステップを発生する際のネック部の動きを観察し、ミオシン V の運動メカニズムの解明を進めている。

T.Sato, T.Watanabe and H.Higuchi : Imaging of the movements of single motor proteins labeled with CdSe nano-particle at no-load and high-resolution.