2P173

モーター蛋白質 F₁-ATPase の運動様式変換機構:分子動力学シミュレーション

○古賀 信康¹、岡崎 圭一²、竹内 晋司²、高田 彰二² (¹神戸大・自然科学、²神戸大・理)

F₁-ATPase は ATP 加水分解の化学エネルギーを回転の力学エネルギーに変換する分子モーターである。この蛋白質は、 $\alpha\beta$ 各々 3 つのサブユニットがリング状の 6 量体を形成し、リングの中心を γ サブユニットが貫いている。ATP 加水分解により β サブユニットが屈曲運動を行い、 γ サブユニットを回転させると考えられている。本研究の目的は、いかにして複数のサブユニットが協働し、どのように屈曲運動が回転運動に変換されるのかを明らかにすることである。分子モーターように、構造変化して“動く”こと、が蛋白質の機能である場合、分子の動き“そのもの”を直接観測することが機能理解に重要である。そこで、折れたたみ研究に用いられてきた郷モデルを応用し、回転の分子動力学シミュレーションを行った。その結果これまでに、世界で初めてサブステップを含む回転シミュレーションに成功し、回転に重要な相互作用及び部位を明らかにした。これらの結果は、回転触媒機構として常に 2 個ヌクレオチドが結合しているモデルが妥当であることを示唆している。今回は、1 方向回転を生み出すためにサブユニット同士がいかにして協働するのか、アロステリック効果に着目して行った研究について報告する。また視点をえ、F₁-ATPase と同様にリング状の 6 量体を形成する蛋白質 (プロテアーゼ HslU、Holiday 分岐点で働く RuvB 等) について研究を行った。これらの蛋白質は、リングを形成するサブユニットが ATP 加水分解と伴に構造変化し、基質をリングの中央孔に 1 方向に通過させる機能を持つ。すなわち、F₁-ATPase が屈曲から回転への運動変換を行うのに対し、これらの蛋白質は、屈曲から“押し出し”への運動変換を行っている。これらの蛋白質と F₁-ATPase の類似点、相違点について議論したい。

N.Koga, K.Okazaki, S.Takeuchi, and S.Takada : Molecular mechanisms of the rotary motor F₁-ATPase:molecular dynamics simulation

2P175

F₁ モーターの ATP 加水分解反応を機械的に加速する

○中嶋 貴子¹、RONDELEZ Yannick²、Tresset Guillaume²、山田 康之³、榊原 昇一¹、藤田 博之²、竹内 昌治²、野地 博行¹ (¹阪大・産研、²東大・生研、³立教大・理)

F₁ モーターは単独では ATP を加水分解し、そのエネルギーを利用して分子中央にある γ サブユニットを反時計回りに回転する。生体内では、ATP 合成酵素を構成するもう一つの回転モーターである F₀ が F₁ モーターを逆回転させることで、ATP が合成されている。以前我々は、F₁ モーター 1 分子を逆方向に強制回転させ、ATP 合成反応を検出することに成功し、その反応効率が極めて高いことを報告した (04 年、第 42 回本年会)。本研究では、昨年とは逆の実験を行った。すなわち、F₁ モーターを順方向に強制回転させた場合、ATP 加水分解反応が促進されるかを検証した。ガラス基盤に固定した F₁ モーターの回転子 γ サブユニットに直径 0.4 ミクロン程度の磁気ビーズを結合させることで、磁気ピンセットを用いて γ サブユニットを自在に回転させることができる。さらにマイクロ加工技術を利用して約 6 フェムトリッターのチャンパーを作製し、F₁ モーター 1 分子と 500nMATP をその中に閉じ込めることで、チャンパー内部の ATP 濃度変化を F₁ モーターの回転速度の変化として検出することができる。回転観察中に磁気ピンセットで 5 回/秒の速さで 40 秒間、二度強制的に回転させた。観察開始直後、一度目、二度目の強制回転後の回転を比較すると、順に回転速度が遅くなっていることが分かった。これは人為的に ATP を加水分解できたことを示唆している。ただし、回転速度の減少度合いは予想されるより小さく、一回転で 3 個の ATP を分解するという本来の効率を再現できていないことがわかった。5 回/秒で回した場合、一度目は 60% 程度、二度目は 10% の回転が ATP 加水分解と共役していた。また、強制回転の速度を変えた場合、ATP 加水分解の効率も変化するが示された。

T.Nakashima, Y.Rondelez, G.Tresset, Y.Yamada, S.Sakakihara, H.Fujita, S.Takeuchi and H.Noji : Forced rotation of F₁-ATPase in forward direction enhances ATP hydrolysis.

2P174

1 分子操作とマイクロ加工技術を利用して F₁ モーターの回転子 γ をねじる

○原 陽子¹、竹内 昌治¹、野地 博行² (¹東大・生産研、²阪大・産研)

ATP 合成酵素は F₀ と F₁ の 2 つの回転モーターがそれぞれの回転子の部分で連結しており、F₀ が H⁺ の輸送、F₁ が ATP の合成・水解を触媒している。F₁ は 1 回転で 3 つの ATP を合成するが、F₀ は種によって様々で 10 もしくは 14 個の H⁺ を輸送する。しかしどの種においても H⁺ の輸送数は 3 の倍数ではなく、H⁺ と ATP の数が整数比ではない。ATP 合成酵素の回転子にはフレキシブルな部分があり、分子内にエネルギーをねじれとして蓄えることにより、このミスマッチを解消していると予想される。F₁ の回転子 γ は 2 本のコイルドコイルがより合わさった棒状の構造をとり、固定子 $\alpha_3\beta_3$ リングの中央に入り込んでいる。また、F₀ とのつなぎ目の部分は β シートと α ヘリックスからなる。本研究では、 γ の $\alpha_3\beta_3$ リングから突き出た部分が実際にねじれるかを調べることを目的とした。まず、回転子と固定子の接触面にシステインを導入した変異体 F₁ (γ 75C/ β 395C) を作成した。この変異体の γ - β 間のクロスリンク効率は 95% と非常に高く、2 min 以内で完了した。この変異体を用いて、以下のような手順でねじれを検出する。1) まず、2 mM ATP 存在下で回転サンプルの選別を行う。2) その後、酸化剤をチャンパー内に流し込み、3) γ に結合させた磁気ビーズを磁気ピンセットでねじる。これまでのところ、いくつかのサンプルで、酸化剤 DTNB を加えると回転が停止し、2) の後に、還元剤 DTT を流しこむと回転を再開することを確認した。野生型 F₁ では 2) による停止は観察されないことから、 γ - β 間のクロスリンクにより回転が停止したといえる。また、マイクロ加工により PDMS の流路を作成し、ここに溶液をポンプで導入することにより、溶液交換時のステージのずれを防ぎ、酸化剤によるガラス表面への影響を最小限に抑えた溶液交換システムを作成した。

Y.Hirono-Hara, S Takeuchi, H.Noji : Analysis of elastic coupling of ATP synthase with single-molecule manipulation and microfabrication techniques

2P176

F₁-ATPase の回転に対する回転電場を用いた外力の導入

○中山 (渡部) 隆宏¹、宗行 英朗²、杉山 滋³、工藤 成史⁴、吉田 賢右¹ (¹東工大・資源研、²中央大・理工、³食品総合研究所、⁴桐蔭横浜大・工)

F₁-ATPase (F₁ モーター) は ATP から ADP、リン酸への加水分解反応を触媒し、一連の反応で回転する。回転のための構造の最小単位は $\alpha_3\beta_3\gamma$ の 7 つのサブユニットで構成され、 γ サブユニットが $\alpha_3\beta_3$ リングに対して回転するという世界で最も小さい回転分子モーターである。

F₁ モーターのエネルギー論的議論を深めるためには F₁ モーターの回転に対して定常的な外力を導入しておくことが必要である。そこで先ず本研究では、新たな実験系 - F₁ モーターの回転に対して外から定常的な回転力を導入する系の構築を目的とした。

外力の導入には誘電泳動を適用した。誘電泳動とは電場を印加した際の分極した物質と電場との間の相互作用を駆動力として物質が移動する現象である。特に、電場の方向を回転させると、物質に回転力 (トルク) を印加することができる。この原理を用いた研究はべん毛モーターについて適用されている (S. Sugiyama et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1656 (2004) 32-36)。従来からの方法で、 β サブユニットに導入した His tag で F₁ モーターを Ni²⁺-NTA コーティングしたガラスに固定する。そして、 γ サブユニットをポリスチレンビーズで標識することで F₁ モーターの回転をビーズの回転として観察することができる。そこで今回は F₁ モーターのまわりに電極を一定半径の円周上に並べて回転電場を導入することでポリスチレンビーズを分極させて電場の回転方向に力を与え、F₁ モーターに力を加えることを試みた。

T. Watanabe-Nakayama, E. Muneyuki, S. Sugiyama, S. Kudo, and M. Yoshida : Application of external force with traveling wave electric field to F₁ motor