3P161

化学ポテンシャルに駆動される Fo モーターにおける分子動力学シミュレーション

○山崎 久嗣、高野 光則（早大・理工・物理）

ATP 合成酵素 (Fo, F₁) は、ミトコンドリアの内膜に埋め込まれており、外側と内側の H⁺ 濃度差を利用して ATP を合成する。特に、Fo 部分は H⁺ 濃度勾配から得られる電気化学的ポテンシャルを c サブユニット (rotor) の回転という力学的エネルギーに変換する役割を担っており、鞭毛モーターの回転機構との関連性からも大変興味深い。Fo の立体構造は不明な部分もあるが、Elston らは限られた構造情報を基に Half Channel モデルを提唱し、rotor の回転機構の説明に用いた (Nature, 1998)。彼らのモデルは a サブユニット (stator) に内膜の外側と内側に繋がる 2 つの「半チャネル」があり、H⁺ は外側と繋がった半チャネルから入り、近傍の rotor と結合して内膜中を一周し、一周後に内側と繋がった半チャネルから出て行く、という一連の過程が 1 次元 (ラチェット) モデルとして単純化されている。そのため実際の立体構造を考慮したモデルでも同様の機構が働くか否かは分からない。一方、Aksimentiev らは実際の立体構造を考慮した分子動力学シミュレーション (MD) を行ったが (Biophys.J., 2004)、外から力が与えられている (steered MD を使用) ので、どういう機構で化学ポテンシャルが回転力に変換されるかという本質的な問いに対して答えることが出来ない。我々はこの問いに取り組むため、Fo の立体構造を保持した粗視化モデルを用い、分子間及び分子-H⁺ 間には静電力を含む物理化学的相互作用が働くとして、H⁺ は正電荷を持つ粒子として扱い、内膜に相当する仕切り壁を設け、内外に H⁺ の数密度差を設定する事で、立体構造と (電気) 化学ポテンシャルだけで回転が実現するかどうかを MD を用いて示すことを目的とする。

H.Yamasaki and M.Takano : Molecular dynamics simulation of Fo motor driven by chemical potential of proton

3P163

低温環境下で新たに発見された F₁-ATPase の反応中間体

○渡邊 力也^{1,2}、島袋 勝弥⁴、吉田 賢右³、野地 博行²（¹ 東大・生産研、² 阪大・産研、³ 東工大・資源研、⁴ フロリダ州 F₁ 喜木村の ATP 加水分解で 120° ステップする回転モーターである。現在、この 120° ステップは 80° と 40° の 2 つサブステップから構成されることがわかっており、80° サブステップの前には「ATP 結合待ちの反応中間体」、40° サブステップの前には「ATP 加水分解待ちの反応中間体」と「未同定の反応中間体」が存在することが知られている。この未同定の反応中間体は、ATP 加水分解の生成物である ADP と Pi のどちらかの解離に関わるものであると予想されている。本研究では、高熱菌由来の F₁ (TF₁) の回転観察を低温で行い、4 つ目の新たな反応中間体を発見したので、これに関して報告する。4℃ ATP 飽和条件下で直径 0.3 μm のビーズを回転ブロープとした場合、TF₁ は室温 ATP 飽和条件下では観察できない 120° 間隔の停止状態を伴って回転した。V_{max} は室温の場合の 1/5 で 1.14Hz、K_m は 4.68 μM であった。また停止時間のヒストグラムは 1 次の指数関数で近似でき、その時定数は 139ms であった。この新たな反応中間体の停止角度を同定する為、ATP の濃度変化で顕在化する「ATP 結合待ちの停止角度」や、ATP アナログである ATP γ S への基質交換で顕在化する「加水分解待ちの停止角度」と比較する実験を行った。その結果、新たな反応中間体の停止角度が「ATP 結合待ちの停止角度」と一致し、また ATP の濃度変化に応じて先の停止時間の時定数が変化しないことから、ATP 結合以外の反応が律速反応であると確認された。では、この反応中間体の律速反応は何であろうか？現在、様々な条件下で検討している。

R.Watanabe, K.Shimabukuro, M.Yoshida, H.Noji : New Reaction Intermediate of F₁-ATPase found at low temperature

3P162

液胞型 ATPase の膜ポテンシャル駆動による回転観察への取り組み

○飯野 亮太¹、中野 雅裕²、田端 和仁¹、今村 博臣³、玉腰 雅忠⁴、横山 謙³、野地 博行¹（¹ 阪大・産研、² 東工大・資源研、³ JST・ERATO・ATP システム、⁴ 東葉大・生命科学）

液胞型 ATPase (V-ATPase) は ATP の加水分解により回転する分子モーターである (Imamura et al., 2003; Yokoyama et al., 2003)。真核生物の V-ATPase は ATP 加水分解と共役したプロトン輸送により細胞内膜小胞の酸性化等を担う。一方、好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 等の一部の原核生物では、V-ATPase は膜ポテンシャル差を駆動力とした ATP 合成酵素として働く。我々は、膜ポテンシャルによって駆動される ATP 合成時の V-ATPase の回転観察を目標とし、新規な実験系の構築に取り組んでいる。井出らが開発した水平平面膜法をベースとし、ガラス基板上に固定した可溶性 V₁ 部分と平面膜に埋め込んだ疎水性 V_o 部分の顕微鏡下での再構成を試みている。これまで、1) 個別に精製した V₁ 部分と V_o 部分の再構成による V-ATPase の ATP 合成能の完全回復、2) 界面活性剤で可溶化した再構成 V-ATPase の ATP 加水分解駆動の回転発見頻度の大幅な改善、に成功している。本年度ではこの進展について報告する。

R. Iino, M. Nakano, K. Tabata, H. Imamura, M. Tamakoshi, K. Yokoyama, H. Noji : Development of new experimental system toward the visualization of the rotation of V-ATPase driven by the membrane potential

3P164

外力により強制回転させた F₁ 中の ε サブユニットのコンフォメーション

○税田 英一郎¹、飯野 亮太²、山田 (加藤) 康之³、野地 博行²、鈴木 俊治^{1,4}、吉田 賢右^{1,4}（¹ 東工大・資源研、² 阪大・産研、³ 立教大・理・生命、⁴ 科技振・ERATO）

F_oF₁-ATP 合成酵素は、ミトコンドリア、葉緑体、バクテリアなどの生体膜上に存在する回転分子モーターである。膜中の F_o 部分と膜から突き出した F₁ 部分から成り、中央部分のサブユニット (γ ε-c リング) の回転を介して、膜を介した両方向のプロトン輸送と ATP 加水分解/合成を共役させている。F_oF₁-ATP 合成酵素の ε サブユニットは ATP 加水分解/合成活性を制御する内部因子として知られており、結晶構造やクロスリンク実験などから ATP 合成時と ATP 加水分解時とで異なった構造 (少なくとも "down-state" と "up-state" の 2 つの構造) をとることが提案されている。この ε サブユニットの活性調節に関連した構造変化を 1 分子レベルでリアルタイムに検出するのが本研究の目的である。Cy3 (ドナー) と Cy5 (アクセプター) でダブルラベルした ε サブユニットを F₁ モーター (α₃ β₃ γ) に再構成する。磁気ビーズによる γ の回転観察と 1 分子 FRET による ε サブユニットの構造変化検出を同時に行い、ε サブユニット 1 分子の構造変化と制御機能の相関を明らかにする。γ サブユニットの回転方向により ε サブユニットが異なる構造を取るという我々の仮説を検証するために、磁気ピンセットを用いて F₁ モーターに外力による ATP 加水分解/合成の両方向の回転を与えたときの FRET の変化を観察する。現在までにビーズの回転と 1 分子 FRET 変化を同時に検出する光学系の開発を行った。ビーズと 1 分子 FRET シグナルの同時観察は、高速回転モーターを利用した輪帯エパネッセント照明と Dual-View による FRET 検出系に通常のハロゲンランプによるビーズの透過光像観察を組み合わせて行った。ビーズの透過光像が加わることによる FRET シグナルの S/N 低下はほとんど見られなかった。FRET 検出のための色素導入部位の検討も行っている。

E.Saita, R.Iino, Y.Kato-Yamada, H.Noji, T.Suzuki, M.Yoshida : Conformations of epsilon subunit in F₁ forced-rotated by magnetic tweezers