3P165

ATP 合成酵素結晶の高質化

○白木原 康雄¹、白鳥 綾¹、村上 聡²、安達 宏昭³、松村 浩由⁴、高野 和文⁵、井上 豪⁴、森 勇介⁶、佐々木 孝友⁶、鈴木 俊治⁷、吉田 賢右⁷ (¹ 遺伝研、² 阪大産研、³ 株式会社創晶、⁴ 阪大応用化学、⁵ 阪大工生命先端工学、⁶ 阪大電気電子情報工学、⁷ 東工大生命理学)

膜酵素 ATP 合成酵素 (FoF1) は、呼吸鎖がくみ出した水素イオンを膜貫通の Fo 部分 (ab2c8-12) で取り込み、膜外部分 F1 上で ADP と Pi から ATP を合成する。触媒部分 F1 (分子量 38 万、サブユニット構成 $\alpha 3 \beta 3 \gamma \delta \epsilon$) は $\alpha 3 \beta 3$ コアの真ん中を γ が貫いた構築をしている。

私たちは FoF1 の構造解析を目指しその結晶化を行っている。昨年度、decylmaltoside で可溶化、精製した標品がつくる六角形板状結晶が 7A 程度の回折模様を示すことを報告した。今年度はこの結晶の高質化のために行った実験結果を報告する。

(1) 有効なカラムである陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムでの画分の選択の違いによって結晶化が大きく異なる。即ち、初段の Qsepharose で 0.4M で溶出する画分よりも 0.5M で溶出する画分の方が結晶化能が良い、ゲル濾過でも分離したボイド画分を除くと結晶化能が良くなる、ことを見ている。(2) 最良の界面活性剤は decylmaltoside、dodecylmaltoside であるが、dodecylmaltoside で精製、保存したサンプルの寿命は数ヶ月であるのにくらべ decylmaltoside でのサンプル寿命は少なくとも 1 年であった。(3) 更に最近行っているレーザー照射による結晶の高質化の実験では、レーザー照射が結晶化を促進するという予備的結果を得た。

Y. Shirakihara, A. Shiratori, S. Murakami, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, G. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki, and M. Yoshida : Improvement of ATP synthase crystals

3P167

F₁-ATPase の回転運動の温度依存性 (3)

○古池 晶¹、足立 健吾¹、榊 直由²、伊藤 博康^{3,4}、下一昆 理恵子¹、吉田 賢右⁵、木下一彦¹ (¹ 早大・理工、² 東大・生産研、³ 浜松ホトニクス・筑波研究所、⁴ 科技振ソフナノマシン、⁵ 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 は、至適温度 (〜70℃) 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。これまでに、回転速度や回転トルクの温度依存性、活性状態と非活性状態の熱力学的安定性等について報告してきた (前年会 3P146)。しかし、最も知りたい無負荷状態での回転速度は、次の様にバルクでの ATP 加水分解速度から見積もっていた。

ATP 再生系存在下では、反応開始直後の最大活性 A^i (全ての F₁ が活性化状態: 室温で 300/s) と、生成物である MgADP の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 を測定できる。1 回転で 3 個の ATP を加水分解するので、回転速度は $A^i/3$ で求められる。しかし、温度上昇により平衡状態へ至る時間 τ は急激に減少し、40℃以上では見かけ上消失した。そのため、40℃以上の A^i は 4〜35℃までの活性の比 $R = A^e/A^i$ の外挿値と A^e の実測値から見積もった。40, 50, 65℃では約 500, 1200, 6000/s となり、F₁ は生理条件で 2000 回転/秒 (rps) 以上の回転速度を持つことが示唆された。

今回、無負荷状態での回転運動の観察を試みた。ローターである γ サブユニットの先に直径 40 nm の金粒子を付け、その回転をレーザー暗視野照明法で高速度カメラ (最大 32000 frame/s) により観察した (Yasuda *et al.* (2001) *Nature*)。その結果、45℃で 400rps 程度で回転した。これは、40℃以上でも A^i が増加していることを裏付ける結果である。現在さらに高温での測定を試みており、50℃では 1000rps で回転するものも観測された。至適温度での 2000rps の超高速回転が現実味を帯びてきた。年会では、実験結果の詳細と進展を報告する。

S. Furuike, K. Adachi, N. Sakaki, H. Itoh, R. Shimo-Kon, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr. : Temperature Dependence of the Rotation of F₁-ATPase (3)

3P166

Δ NC 変異を導入した F₁-ATPase の ATP 加水分解機構

○下一昆 理恵子¹、宗行 英朗²、榊 直由³、足立 健吾¹、古池 晶¹、酒井 坦⁴、吉田 賢右⁵、木下一彦¹ (¹ 早大・理工、² 中央大・理工、³ 東大・生産研、⁴ 静岡県立大・生活健康科学、⁵ 東工大・資源研)

F₁-ATPase は ATP 加水分解酵素で、3 種類のサブユニット α , β , γ で ATP 加水分解活性が現れる。これまでに ATP 加水分解サイトは β サブユニット上にあり、F₁ 分子あたり 3 つの加水分解サイトをもつことが明らかにされている。我々は、3 つの β サブユニットサイトのうち、いくつにヌクレオチドが結合すれば定常的な ATP 加水分解活性がみられるかを調べた。 β サブユニットへのヌクレオチド結合のプロープとして、ヌクレオチド結合サイト近傍に Trp を導入し (β Y341W 変異)、Trp の消光の大きさからヌクレオチド結合数を見積もった。F₁ はある確率で ATP 加水分解を行わない非活性化状態をとり、ATP 混合と同時に非活性化がどんどん進むことが知られている。これまで結合ヌクレオチド数測定は、非活性化が進んだ状態ではなされてきた。ここでは活性化状態での β サブユニットのヌクレオチド結合数を見積もるために、非活性化を促進する ADP を Trp を含まない ATP 再生系を用いて排除し、 β サブユニットのヌクレオチド結合状態を調べた。また、 α サブユニットに結合した ATP の影響を取り除くため、 α に ATP が結合できない変異体 (Δ NC 変異) を用いた。実験の結果、活性化状態にある F₁ のヌクレオチド結合数は 2 つより少なく、非活性化の進行とともに結合ヌクレオチド数は増加することがわかった。これは、現在広く受け入れられている 3 つのヌクレオチドが結合して初めて活性がみられるというモデルでは説明できず、結合ヌクレオチド数が 2 つ未満でも活性があることを示している。また、結合ヌクレオチド数が平均して 2 つ未満の ATP 濃度のとき、加水分解活性があるだけでなく、 γ サブユニットの回転もみられることが 1 分子回転観察から明らかになった。

R. Shimo-Kon, E. Muneyuki, N. Sakaki, K. Adachi, S. Furuike, H. Sakai, M. Yoshida, K. Kinoshita Jr. : A mechanism for the ATPase activity of F₁-ATPase that lacks non catalytic sites

3P168

モータ蛋白の動作機構の統一理論

○増田 正 (東医歯院・疾患生命・生命システム)

モータ蛋白であるミオシンやキネシンは、レール蛋白であるアクチンや微小管と相互作用しながら、多様な移動形態を示す。すなわち、タイトカップリング/ルースカップリング、逐次的/非逐次的、前進/後退などの現象である。ミオシンとキネシンにおいて、ATP の加水分解を行うコア部分は構造的に類似しており、これらの多様な現象も統一的な原理で説明できるものと考えられるが、まだ、そのような原理は見出されていない。そこで、これらの現象を統一的に説明するための理論を考案した。この理論では、ATP のエネルギーは、モータ蛋白がレール蛋白から解離するために用いられ、パワーストロークには直接は関与しないと仮定した。解離状態のモータ蛋白は静電ポテンシャルエネルギーを持っており、レール蛋白と結合する過程で、このポテンシャルエネルギーが減少する。減少した分のポテンシャルエネルギーは、モータ蛋白の内部変形に伴う弾性エネルギーに変換される。そして、内部変形が元に戻る際に、パワーストロークに伴う仕事に使われる。パワーストローク後はエネルギー的に最も安定な状態であり、外部からのエネルギー供給がなければ、それ以上の変化は生じない。この状態で ATP のエネルギーが供給されると、モータ蛋白の構造変化が引き起こされ、レール蛋白とのアフィニティが低下して解離する。解離後に構造変化は元に戻り、再び静電ポテンシャルエネルギーを持った初期状態になる。このように考えれば、モータ蛋白の多様な動作形態を、モータ蛋白のコア以外の周辺構造によって説明することができる。この理論に基づいて、弾性関節を通して結合した剛体リンクで表したモータ蛋白が、レール蛋白と静電相互作用を行うという簡略化したモデルを作成してシミュレーションを行い、モータ蛋白の多様な動作形態を再現できることを示した。

T. Masuda : A unified theory of the workings of motor proteins