

2003年度 博士学位論文

ハイブリッド $F_1$ -ATPaseを用いた  
協同的な回転機構の1分子解析

東京工業大学大学院 総合理工学研究科

物質電子化学専攻

有賀 隆行

指導教官：吉田賢右 教授

# 概要

F<sub>1</sub>-ATPase は ATP の加水分解をエネルギー源として回転するタンパク質分子モーターである。その最小単位は  $\alpha_3\beta_3\gamma$  の 7 つのサブユニットから成り、 $\alpha_3\beta_3$  から成る 6 量体のリングが固定子となり、 $\gamma$  サブユニットが中心軸となって回転する。このことは、当研究室の野地らによって、 $\gamma$  サブユニットにアクチン線維を結合しその回転を顕微鏡下で直接観察することで確かめられた。一方で、 $\beta$  サブユニット上の触媒部位で行われている ATP の加水分解による回転の仕組みとしては、3 つの  $\beta$  サブユニットが順番に交替で ATP を加水分解することによりその構造を互いに協調して変化させ、 $\gamma$  サブユニットを回転させるという Boyer の仮説が支持されている。そしてその予想どおり、ATP 濃度が非常に低いときには、3 回対称に配置された触媒部位への ATP の結合に伴って 120 度毎のステップ状の回転を行う様子が観察された。しかし、3 つの  $\beta$  サブユニットの協調した働きについては、未だに実験的に確認されていなかった。本当にそのような協同性は存在するのだろうか？

この協調した働きを理解するには、1 分子中の 1 つ 1 つの  $\beta$  サブユニットを見分けることが必須である。そこで私は 1 つの  $\beta$  サブユニットのみに変異を導入する新たな手法を開発し、非対称な触媒サブユニットを持つハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転観察を行うことを可能とした。

そして、ATP 結合の親和性や加水分解速度を変化させた触媒部位を一部のサブユニットに導入したハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転特性を調べることにより、個々の  $\beta$  サブユニット上で起こる触媒反応が回転駆動にどのような役割をしているかの同定を試みた。その結果、F<sub>1</sub>-ATPase の回転機構において、3 つの触媒部位が順番に役割を交代することによって回転するという協同的な回転機構の存在を初めて証明した。

## 略語

**FEFE 変異体**  $\beta$ F414E/F420E 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase

**0FEFE**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ <sub>1</sub> $\beta$ (His-tag/I386C)<sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**1FEFE**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (F414E/F420E)<sub>1</sub> $\beta$ (His-tag/I386C)<sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**2FEFE**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (I386C/F414E/F420E)<sub>1</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**3FEFE**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag/F414E/F420E)<sub>3</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**0xE190D**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>1</sub> $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**1xE190D**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag/E190D)<sub>1</sub> $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**2xE190D**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>1</sub> $\beta$ (E190D)<sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**3xE190D**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag/E190D)<sub>1</sub> $\beta$ (E190D)<sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**1xR191K**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag/R191K)<sub>1</sub> $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**1xR256H**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag/R256H)<sub>1</sub> $\beta$ <sub>2</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**1x $\alpha$ R364K**  $\alpha$ (C193S/R354K/His-tag)<sub>1</sub> $\alpha$  (C193S)<sub>2</sub> $\beta$ <sub>3</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**HC5**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>3</sub> $\gamma$ (S109C)<sub>1</sub>

**HC95**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>3</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**C95**  $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ <sub>3</sub> $\gamma$ (S109C/I212C)<sub>1</sub>

**NADH** 還元型 nicotinamide adenine dinucleotide

**LDAO** lauryldimethylamine oxide

**Ni-NTA** nichel nitrilotriacetic acid

**DTT** dichiothreitol

<b>HPLC</b>	high pressure liquid chromatography
<b>BDM</b>	2,3-butanedione 2-monoxime
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide
<b>MOPS</b>	3-[N-morpholino]propanesulfonic acid
<b>EDTA</b>	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid



# 目次

<b>第 I 部 序</b>	<b>1</b>
<b>第 1 章 背景 : F<sub>1</sub>-ATPase のしくみ</b>	<b>3</b>
1.1 ATP 合成酵素 . . . . .	3
1.2 Boyer の交代結合説と回転仮説 . . . . .	3
1.3 Walker の結晶構造 . . . . .	4
1.4 回転の直接観察 . . . . .	5
1.5 ステッピングモーター . . . . .	6
1.6 サブステップの発見 . . . . .	6
1.7 今後の課題 . . . . .	7
<b>第 2 章 本研究の目的</b>	<b>8</b>
<b>第 II 部 ATP 低親和性変異体を用いたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の作製と特性</b>	<b>10</b>
<b>第 3 章 ATP 低親和性変異体 : FEFE</b>	<b>12</b>
3.1 目的 . . . . .	12
3.2 変異導入部位 . . . . .	12
3.3 FEFE 変異体の ATP 加水分解活性測定 . . . . .	13
3.4 初期不活性状態の解析 . . . . .	14
3.4.1 活性化速度の ATP 濃度依存性 . . . . .	14
3.4.2 結合ヌクレオチド定量 . . . . .	14
3.4.3 ユニサイト結合速度定数測定 . . . . .	15

3.5	FEFE 変異体を用いた回転ステップの観察 . . . . .	17
3.6	回転トルク測定 . . . . .	18
3.7	3章のまとめ . . . . .	19
<b>第4章</b>	<b>ハイブリッド変異体作製法の開発</b>	<b>20</b>
4.1	背景 . . . . .	20
4.2	概要 . . . . .	20
4.3	変性および再構成 . . . . .	21
4.4	コンタミネーションとリスクランブル . . . . .	22
<b>第5章</b>	<b>低親和性ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転観察</b>	<b>24</b>
5.1	1FEFE . . . . .	24
5.1.1	活性測定 . . . . .	24
5.1.2	野生型ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase(0FEFE) の性質 . . . . .	25
5.1.3	1FEFE ステップ観察 . . . . .	25
5.2	2FEFE . . . . .	26
5.2.1	活性測定 . . . . .	26
5.2.2	回転観察 . . . . .	27
5.3	各分子での $k_{on}$ の値のばらつき . . . . .	27
5.4	他の分子種の混合 . . . . .	28
<b>第6章</b>	<b>考察—ATP の結合と回転機構</b>	<b>30</b>
6.1	ATP の結合と交代結合説 . . . . .	30
6.2	回転方向とバックステップ . . . . .	31
6.3	変異導入領域の役割 . . . . .	31
6.4	バイサイトモデル・トライサイトモデル . . . . .	32
<b>第7章</b>	<b>第II部のまとめ</b>	<b>34</b>
 <b>第III部 ATP加水分解変異体を用いたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回</b>		

---

<b>回転観察</b>	<b>35</b>
<b>第 8 章 ATP 加水分解変異体：<math>\beta</math>E190D</b>	<b>37</b>
8.1 目的	37
8.2 変異導入部位	38
8.3 ATP 加水分解活性	38
8.4 回転観察	38
8.5 E190D 変異体の特性	39
<b>第 9 章 簡略化したハイブリッド <math>F_1</math>-ATPase 作製法の開発と条件検討</b>	<b>40</b>
9.1 背景と目的	40
9.2 概要	41
9.2.1 方針	41
9.2.2 分子種の同定	42
9.3 $\beta$ E190D ハイブリッドの作製と条件検討	42
9.3.1 電気泳動	43
9.3.2 活性測定	43
9.3.3 回転観察	44
9.3.4 0xE190D、3xE190D の特性	44
<b>第 10 章 <math>\beta</math>E190D を導入したハイブリッド <math>F_1</math>-ATPase の回転観察</b>	<b>46</b>
10.1 高濃度 ATP 存在下での 1xE190D の回転観察	46
10.2 高濃度 ATP 存在下での 2xE190D の回転観察	47
10.3 ATP 濃度依存的な 1xE190D の回転観察	48
10.3.1 溶液交換による ATP 濃度交換	48
10.3.2 溶液交換を行わない低濃度 ATP 存在下での回転観察	49
<b>第 11 章 考察 — 協同的な回転機構モデル</b>	<b>51</b>
11.1 3つの $\beta$ サブユニットの働く協同的な回転機構	51
11.2 それぞれの ATP 加水分解素反応の役割	52

---

11.3	バイあるいはトライサイトモデルと ATP 超低濃度での回転機構 . . . . .	53
<b>第 12 章</b>	<b>第 III 部のまとめ</b>	<b>55</b>
<b>第 IV 部</b>	<b>様々な条件および変異体を用いたさらなる回転機構の解析</b>	<b>56</b>
<b>第 13 章</b>	<b>はじめに</b>	<b>58</b>
<b>第 14 章</b>	<b>様々な条件下での 1xE190D の回転</b>	<b>59</b>
14.1	溶液交換実験 . . . . .	59
14.2	再生系なしでの回転観察 . . . . .	61
14.3	ATPase 阻害試薬 : BDM . . . . .	61
14.3.1	背景 . . . . .	61
14.3.2	溶液系での活性への影響 . . . . .	62
14.3.3	1xE190D の回転への影響 . . . . .	63
14.3.4	考察 . . . . .	63
<b>第 15 章</b>	<b>様々な触媒部位変異体の特性</b>	<b>65</b>
15.1	$\beta$ R191K 変異体 . . . . .	65
15.1.1	目的 . . . . .	65
15.1.2	$\beta$ R191K 変異体の活性測定 . . . . .	65
15.1.3	$\beta$ R191K 変異体の回転観察 . . . . .	66
15.1.4	1xR191K ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の回転観察 . . . . .	66
15.1.5	結論と考察 . . . . .	66
15.2	$\beta$ R256H 変異体 . . . . .	67
15.2.1	背景 . . . . .	67
15.2.2	$\beta$ R256H 変異体 F <sub>1</sub> -ATPase の活性測定 . . . . .	67
15.2.3	$\beta$ R256H 変異体 F <sub>1</sub> -ATPase の回転観察 . . . . .	67
15.2.4	1xR256H ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の回転観察 . . . . .	68
15.2.5	結論と考察 . . . . .	68

---

15.3 $\beta$ E201V 変異体 . . . . .	68
15.3.1 背景 . . . . .	68
15.3.2 活性測定 . . . . .	69
15.3.3 回転観察 . . . . .	69
15.3.4 結論 . . . . .	69
15.4 $\alpha$ R364K 変異体 . . . . .	70
15.4.1 目的 . . . . .	70
15.4.2 $\alpha$ R364K 変異体の活性測定 . . . . .	70
15.4.3 $\alpha$ R364K 変異体の回転観察 . . . . .	71
15.4.4 1x $\alpha$ R364K ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の回転観察 . . . . .	71
15.4.5 結論と考察 . . . . .	72
<b>第 16 章 第 IV 部のまとめ</b>	<b>73</b>
<b>第 V 部 総括</b>	<b>74</b>
<b>第 17 章 結論と展望</b>	<b>76</b>
<b>付録 A 試料の調製</b>	<b>78</b>
A.1 F <sub>1</sub> -ATPase への変異導入 . . . . .	78
A.1.1 $\beta$ サブユニットへの変異導入 . . . . .	78
A.1.2 $\alpha$ サブユニットへの変異導入 . . . . .	79
A.2 F <sub>1</sub> -ATPase の精製 . . . . .	80
A.3 回転観察サンプルの調整 . . . . .	81
A.4 アクチンフィラメント . . . . .	82
A.5 his-tag の無い F <sub>1</sub> -ATPase の調整 . . . . .	83
A.5.1 変異体作製 . . . . .	83
A.5.2 精製 . . . . .	83
A.6 単離 $\beta$ サブユニットの調製 . . . . .	84
A.6.1 変異体作製 . . . . .	84

---

A.6.2 精製 . . . . .	85
A.7 $\beta$ ダイマーを用いたハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPaseの作製(第4章) . . . . .	86
A.7.1 $\beta$ サブユニットのダイマー化 . . . . .	86
A.7.2 F <sub>1</sub> -ATPaseのビオチン化 . . . . .	86
A.7.3 ハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPase再構成 . . . . .	87
A.8 簡略化したハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPase再構成(第9章) . . . . .	88
A.9 回転観察用ガラス基板の調製 . . . . .	89
A.9.1 Ni-NTA処理 . . . . .	89
A.9.2 疎水シラン処理 . . . . .	89
A.10 回転観察用ストレプトアビジンビーズの調製 . . . . .	90
<b>付録B 実験方法</b> . . . . .	<b>91</b>
B.1 ATP加水分解活性測定 . . . . .	91
B.2 結合ヌクレオチド測定 . . . . .	92
B.3 限外ろ過を用いたユニサイトヌクレオチド結合定数測定 . . . . .	92
B.4 回転観察 . . . . .	93
B.4.1 アクチンを用いた回転観察 . . . . .	93
B.4.2 ビーズを用いた回転観察 . . . . .	94
B.4.3 高速カメラを用いた回転観察 . . . . .	95
B.5 解析 . . . . .	96
B.5.1 回転解析(第II部) . . . . .	96
B.5.2 回転解析(第III部、第IV部) . . . . .	97
B.5.3 トルク測定 . . . . .	97
<b>付録C 理論</b> . . . . .	<b>98</b>
C.1 Mg-ADP inhibited form . . . . .	98
C.2 ハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPaseの反応速度論解析 . . . . .	99
C.2.1 FEFEハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPaseの場合 . . . . .	99
C.2.2 $\beta$ E190DハイブリッドF <sub>1</sub> -ATPaseの場合 . . . . .	101

---

C.3 超低濃度 ATP での回転と結合部位占有率の理論解析 . . . . .	103
C.3.1 目的 . . . . .	103
C.3.2 理論 . . . . .	103
C.3.3 実例 : [ATP] = 5 nM . . . . .	105
C.4 回転ステップの間隔 (待ち時間) の時間分布解析 . . . . .	107
C.4.1 律速段階が 1 つだけの場合 . . . . .	107
C.4.2 律速段階が 2 つある場合 . . . . .	109
<b>参考文献</b>	<b>110</b>
<b>発表 (論文・学会)</b>	<b>118</b>
<b>謝辞</b>	<b>120</b>
<b>図目次</b>	<b>121</b>
<b>図目次</b>	<b>121</b>





# 第I部

## 序



# 第1章 背景：F<sub>1</sub>-ATPaseのしくみ

## 1.1 ATP合成酵素

生体内でエネルギー通貨として使われる ATP は、主に生体膜の内外の水素イオンの濃度差を利用して、ADP と Pi から合成される [1]。この合成反応を触媒するのが、ATP 合成酵素である。ATP 合成酵素は分子量約 50 万にもおよぶ巨大膜蛋白質複合体であり、膜中に存在する F<sub>o</sub> 部分 (a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>c<sub>10-14</sub>) と膜の外に存在する F<sub>1</sub> 部分 (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>1</sub>δ<sub>1</sub>ε<sub>1</sub>) からなる (図 1)。水素イオンが F<sub>o</sub> 部分を通過する際のエネルギーを利用して、F<sub>1</sub> 部分が ATP を合成する。この反応は可逆的であり、F<sub>1</sub> 部分での ATP の加水分解により、F<sub>o</sub> 部分で水素イオンを駆動するポンプとして働くこともできる。

F<sub>1</sub> 部分はそのみで強い ATP 加水分解活性を持つため、F<sub>1</sub>-ATPase とも呼ばれる。F<sub>1</sub>-ATPase は α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>1</sub>δ<sub>1</sub>ε<sub>1</sub> というサブユニット構成をもつ。3つの α サブユニットと 3つの β サブユニットは交互に並んでリング状の構造をとり、棒状の γ サブユニットを囲んだ形をしている。ATP の加水分解は β サブユニットで行われる。α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>1</sub> のみで ATP 加水分解活性を持ち、ATP 加水分解の安定な最小ユニットであると考えられている。以下本論文では、特に断りの無い限り F<sub>1</sub>-ATPase と述べる場合この最小ユニットを指す。

## 1.2 Boyer の交代結合説と回転仮説

今から 20 年以上も昔に、Boyer は、F<sub>1</sub>-ATPase の酸素交換反応などの実験から、3ヶ所の β サブユニット上の触媒部位が順番に役割を交代することにより ATP を合成/加水分解するという交代結合説 (Binding Change Mechanism) を提唱し、F<sub>o</sub> 部分と F<sub>1</sub> 部分のエネルギー交換を結びつけるのが γ サブユニットの回転であるという回転触媒説を提唱した [2, 3]。

酸素交換反応とは、ATP が加水分解および合成される際に一分子の水分子が取り込まれ/

放出する反応 ( $ATP + HOH \rightleftharpoons ADP + P_i$ ) を利用して、水分子の酸素原子を  $^{18}O$  でラベルすることによって、ATP 合成/加水分解の際の分子外部からおよび内部での酸素原子の流れを追う実験である [4, 5]。プロトン駆動でのエネルギー化を阻害するアンカップラー存在下や、ATP 再生系での ADP を失くすなど様々な条件下で酸素交換反応の実験を行った結果、それらの結果は単純な触媒モデル (図 2a) では説明をすることが出来ないことが明らかになり、それらの結果をすべて説明するモデルとして二つの触媒部位が同一の働きを交代ですることにより ATP を合成/分解するという交代結合説 (図 2b) を 1976 年に初めて提唱した [6, 7]。

さらにその後の 1982 年には、 $F_1$ -ATPase が 3 つの触媒部位を持つ  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$  というストイキオメトリーをしていること [8-10] および、 $F_1$ -ATPase を用いた詳細な各速度定数の算出結果などから、その交代結合説を 3 モードに拡張して 3 つの触媒部位が交代で働くモデルを提唱し、さらにその 3 つの異なる状態を持つ触媒部位を調節する役割として、1 つずつ存在するサブユニットである  $\gamma, \delta$  または  $\epsilon$  の回転が共役しているという回転触媒説 (図 2c) を初めて提唱した [11]。

この仮説による ATP を加水分解する過程を図 3 に示した。3ヶ所の触媒部位すなわち  $\beta$  サブユニットは ADP と  $P_i$  を弱く結合した L 状態、ADP+ $P_i$  もしくは ATP を結合した T 状態、ATP を弱く結合した O 状態の 3 つの違う構造を取っている。そして、 $\gamma$  サブユニットの回転に伴って、この 3 つの状態を順番にたどって行くこととされた。また、逆反応の際にはこの逆の順番で反応が起こる。すなわち  $F_1$ -ATPase は、3 つの  $\beta$  サブユニットが順番に交替で ATP を加水分解することによりその構造を変化させ、協同的に働くことにより  $\gamma$  サブユニットを逆向きに回転させる、回転モーターとして働くことが予想された。

### 1.3 Walker の結晶構造

1994 年に Walker らによって牛心筋ミトコンドリアの  $F_1$ -ATPase の X 線結晶構造が明らかになった [12]。図 4 に示すとおり、その結晶構造中では触媒部位を持つ 3 つの  $\beta$  サブユニットと、それと似た構造を持つ 3 つの  $\alpha$  サブユニットが交互にならんで 6 量体のリング構造を作り、その中心を貫く形で  $\gamma$  サブユニットが存在していた。

驚くべきことに、3つの $\beta$ サブユニットはそれぞれ違ったヌクレオチド結合状態をもっていた。1つにはATPのアナログであるAMP-PNP<sup>1</sup>が結合しており( $\beta_{TP}$ )、1つにはADPが結合しており( $\beta_{DP}$ )、残りの1つにはなにも結合していなかった( $\beta_E$ )。

さらに、ヌクレオチドの結合した $\beta$ サブユニットの構造(CLOSE構造)と結合していない $\beta$ サブユニットの構造(OPEN構造)が大きく異なっていた。また $\gamma$ サブユニットのリングを貫く部分は、2本の $\alpha$ ヘリックスがねじれた剛直なコイルドコイル構造を取っており、その凹凸と $\beta$ サブユニットの構造変化が共役して、あたかもその構造により $\gamma$ サブユニットの向きが支配されているかのように見えた。

このような非対称な構造は、 $\gamma$ サブユニットの回転と供役して3つの $\beta$ サブユニットが交互に働くというBoyerの仮説をほぼ裏付けるものであった。

## 1.4 回転の直接観察

WalkerらがF<sub>1</sub>-ATPaseの結晶構造を発表した後、 $\gamma$ サブユニットの回転の証明が課題となった。 $\gamma$ サブユニットが $\alpha_3\beta_3$ のリングの中で回転していることを示唆する結果としては、分子内架橋[13]や偏光解消法[14]などを用いた研究が報告されていた。しかし、これらの研究は、 $\gamma$ サブユニットが大きく動いていることは明らかにしたが、回転に関しては他の解釈も可能な間接的なものであった。実際にF<sub>1</sub>-ATPaseが一方向に回転しているかどうかを証明するためには、多分子の平均の動きではなく分子一個の働きを観察する必要があった。そして、その回転は1997年野地らによって顕微鏡で直接観察することで証明された[15]。

その証明は、回転モーターの軸受けにあたる $\alpha_3\beta_3$ リングをカバーガラスに固定し、軸にあたる $\gamma$ サブユニットに目印として長さ数 $\mu\text{m}$ の蛍光染色したアクチンフィラメントを結合し、その回転を蛍光顕微鏡を用いて観察することで行われた(図5)。まず、F<sub>1</sub>-ATPaseをしっかりとガラス面に固定するために、 $\beta$ サブユニットのアミノ末端に遺伝子操作によりヒスチジンが10個連なったタグ(His-tag)を導入した。 $\gamma$ サブユニットにはCys残基を導入し、そこにビオチンを結合させ、4つのビオチン結合部位を持つタンパク質であるストレプトアビジンを介してビオチン化したアクチンフィラメントを結合させた。

<sup>1</sup>adenosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -imino) triphosphate

この系に ATP を加えると、アクチンフィラメントが反時計回りに一方向に連続的に回転しているのが確認され、F<sub>1</sub>-ATPase が ATP の加水分解に伴って  $\gamma$  サブユニットを回転させる回転モーターであることが証明された。

このときのアクチンにかかる粘性抵抗とその回転速度からトルクが求められ、 $[ATP] = 2 \text{ mM}$  の時に約  $40 \text{ pN}\cdot\text{nm}$  であった [16]。この値は、生体内での ATP 加水分解の自由エネルギー変化とほぼ等しく、F<sub>1</sub>-ATPase がエネルギー効率の非常に高い分子モーターであることがわかった。

### 1.5 ステッピングモーター

高濃度 ATP 存在下での回転観察では、アクチンフィラメントにかかる負荷によりその回転が律速となり、多分子系での ATP 加水分解活性から換算される回転速度と比べると、かなり遅い連続的な回転をしていた。しかし、安田らによって  $2 \mu\text{M}$  以下の低濃度 ATP での回転観察を行った結果では、 $120^\circ$  毎にステップする回転が観察された [16]。そしてそのステップ回転の回転速度は ATP 加水分解活性と対応していた。

このことは、低濃度 ATP では F<sub>1</sub>-ATPase への ATP の結合がアクチンフィラメントの回転の律速段階になっていることを示している。低濃度 ATP での回転数は、多分子系で測定した ATP 加水分解活性の  $1/3$  倍とほぼ一致していた。さらに、ステップの待ち時間のヒストグラムを取ったところ 1 つの ATP 結合が律速となった場合の式によく一致していた。この結果は、1 ステップの回転が 1 つの ATP の加水分解によって引き起こされていることを示している。すなわち 1.1.2 節で述べた Boyer の交代結合説と回転仮説から予想されるとおり、1 つの ATP の加水分解で、 $\gamma$  サブユニットが  $120^\circ$  回転することが証明された。

### 1.6 サブステップの発見

2001 年安田らは、より小さい回転プローブと高時間分解能のカメラを用いて観察するというさらなる回転観察系の改良により、これまで 1 つの ATP 加水分解につき  $120^\circ$  回転するとおもわれていた 1 つのステップが  $90^\circ$  と  $30^\circ$  のサブステップに分かれることを発見した

[17]。

ここで明らかになった機構の模式図を図6に示した。90°サブステップの前でのステップの待ち時間はATPの濃度に依存して変化していた。すなわち、この待ち時間は従来観察されていたATP結合のステップに相当し、ある触媒部位にATPが結合することにより90°回転するステップと考えられる。一方、30°サブステップの前に存在している待ち時間はATP濃度に依存せず、このステップは最大の加水分解速度 ( $V_{max}$ ) を与えるATP濃度でも観察された。この待ち時間のヒストグラム解析の結果、この待ち時間は各々1 msの2つの時定数を持つ反応から成っていることが明らかになった。すなわち、ATP結合による90°のステップ回転の後、ある1 msの反応が起こり、引き続いて2つ目の1 msの反応が起きた後で残りの30°のステップ回転しているという回転機構が示された。

## 1.7 今後の課題

ここで、ATP結合以外の二つの反応が、どのような加水分解の素反応に対応しているのか？という疑問が生じた。近年、加水分解変異体およびATPアナログを用いて反応速度を遅くさせた条件でのF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察により、30°サブステップの前に起こる二つの1 msの反応うちの1つは、分子内でのATPの分解反応 ( $ATP \rightarrow ADP \cdot Pi$ ) に対応していることが示唆されている [18]。しかし、もう1つの反応がどのようなイベントに相当するののかについては明らかになっていない。また、それぞれの反応の起こる順番、さらには、これらの反応のそれぞれがどの触媒部位 ( $\beta$ サブユニット) でどのような組み合わせで起きることによって回転しているのか、など、F<sub>1</sub>-ATPaseの回転機構を完全に明らかにするためには、多くの疑問点が残っている。

これらの問題点を明らかにすることが、今後のF<sub>1</sub>-ATPase研究の課題となる。

## 第2章 本研究の目的

前章で述べたように、 $F_1$ -ATPaseが回転する酵素であることが証明された。逆にいえば、明らかになったのは $\gamma$ サブユニットの回転だけである。

先に述べた $F_1$ -ATPaseの回転機構モデルであるBoyerの仮説が前提としているのは、3つの $\beta$ サブユニット間の協動的な働きである。すなわち、3つの $\beta$ サブユニットが「順番に」「交替で」ATPを加水分解しているのかどうか、このことを直接証明する具体的な報告は未だになされていない。

これまでには、Walkerの結晶構造からは、3つの $\beta$ サブユニットがそれぞれ違ったヌクレオチド結合型を持っている構造が明らかになった[12]。また、1つの $\beta$ サブユニットのみを不活性型に変換すると $F_1$ -ATPaseのATP加水分解活性がほぼ完全に失くると報告されている[19]。これらの結果から、回転にはすべての $\beta$ サブユニットの働きが必須であり、また、それぞれのサブユニットが違った役割をしていることが示唆されていた。しかし、これらの現象は全て回転を止めた姿を見ているにすぎない。 $F_1$ -ATPaseの回転機構を明らかにするためには、実際に回転中の $F_1$ -ATPaseの中で、 $\beta$ サブユニットが協動的に働く姿を確認することが必須となる。

では、その協動的な働きとは一体なんだろうか？

そこで私は、その仕組みを理解するためには、個々の $\beta$ サブユニットの役割をそれぞれ独立に観察することが必要であると考えた。これまでの変異体を用いた研究では3つの $\beta$ サブユニット全てに変異が導入されてしまい、1つの $\beta$ サブユニットの役割を知ることはできなかった。そこで本研究では、1つの $\beta$ サブユニットでの加水分解反応がどのように回転に影響しているかを知るために、好熱菌 (*Thermophilic Bacillus* PS3)  $F_1$ -ATPaseを用いて、3つの $\beta$ サブユニットのうち1つのみに変異を導入する手法を開発した。

ここで導入する変異として、まずは、回転への影響がもっとも観察しやすいように、ATPに対する親和性を弱める変異を選択し(第II部)、さらにはATPの加水分解反応を遅くす



---

る変異体を利用した (第 III 部, 第 IV 部)。

これらの変異を1つの $\beta$ サブユニットのみに導入したハイブリッド $F_1$ -ATPaseを作製し、その1分子回転観察を通じて1つの $\beta$ サブユニットにおける ATP の加水分解反応が回転にどのような影響を及ぼしているかを直接観察した。

これらの非対称な変異体 $F_1$ -ATPaseの回転観察により、回転中の個々の $\beta$ サブユニットの働きを明らかにし、 $F_1$ -ATPaseの協同的な回転機構を明らかにすることが本研究の目的である。

## 第II部

# ATP 低親和性変異体を用いた ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの作製と特性



## 第3章 ATP低親和性変異体：FEFE

### 3.1 目的

F<sub>1</sub>-ATPaseの一部の触媒部位へ変異を導入することによる、回転への影響を観察する。本章では、ATP結合の親和性を低下させた変異体を利用しようと考えた。そのような変異体は回転の120°ステップへと影響が現れるために、従来どおりの簡単な回転観察系を用いて容易に変異の影響を観察することができると思われる。そのためには、従来の野生型のF<sub>1</sub>-ATPaseを用いた回転観察ではステップが見られない高濃度ATP存在下において、回転ステップが観察できるような低親和性の変異体が必要となる。まずはATPに対する親和性の低い変異体F<sub>1</sub>-ATPaseを作製し、その特性を調べた。

### 3.2 変異導入部位

F<sub>1</sub>-ATPaseはWalkerらによるX線結晶構造解析により触媒部位の構造が明らかになっている[12]。その結晶構造を参考にして、本研究で導入する変異としてATP触媒部位にある3つの芳香環に注目した。図7に示すとおり、これらの残基(Y331,F414,F420)の芳香環はATPのアデニン環をとりかこむように配置され、ATPの結合を安定化する働きをしていると考えられる。以前の研究から、この部位に変異を導入することによりATPに対する親和性が低くなることが明らかになっている[20–22]。特に、Weberらによると*E.Coli*のF<sub>1</sub>-ATPaseではY331(好熱菌ではY341に相当する)残基をGlu残基に変異させた場合に最も親和性が低くなっていた[20]。そこで、残りの2つのPhe残基をGlu残基に変異させたβF414E/F420Eを部位特異的突然変異誘発により作製し、変異体F<sub>1</sub>-ATPase(以下FEFE変異体と呼ぶ)を発現・精製した。

### 3.3 FEFE 変異体の ATP 加水分解活性測定

得られた FEFE 変異体について ATP 加水分解活性の測定を行った。

活性のタイムコースを図 8 に示す。この図は NADH の吸光度の時間変化を示し、傾きの大きさが活性に対応している。野生型 F<sub>1</sub>-ATPase(HC5) では初期の活性の高い状態 (initial burst) と、一部の分子が Mg-ADP inhibited form (以下 inhibited form) に陥るためにそれより活性の低い平衡状態 (steady state) を持つ活性特性が見られる (図 8a) (詳細は C.1 節を参照)。しかし、FEFE 変異体では活性測定の始めに不活性状態があり、initial burst らしきものは測定できなかった (図 8b)。

野生型では、lauryldimethylamine oxide(以下 LDAO) を加えると、F<sub>1</sub>-ATPase が inhibited form への移行を阻害されて、steady state の活性 (steady 活性) が initial burst の活性 (initial 活性) とほぼ等しくなることが知られている [57]。しかし、この変異体については逆に LDAO を加えると活性が低下していた。LDAO が F<sub>1</sub>-ATPase に作用するメカニズムについては、ほとんど明らかになっていないので、この変異体特異的に LDAO が阻害剤として働いている可能性も考えられる。いずれにせよ、この変異体について initial burst の活性を測定することはできないので、steady 活性を FEFE 変異体の溶液系での活性と定義した。

その steady 活性の ATP 濃度依存性を図 9 に示した。ミカエリスメンテン式 (活性を V、基質 (ATP) 濃度を [S] とする)

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3.1)$$

でフィッティングを行うと、K<sub>m</sub> は約 1.55 mM となっていた。野生型では約 15 μM に K<sub>m</sub> が存在するので ATP に対する親和性は約 100 倍低くなっているといえる。

当初の目的である回転ステップとの比較のために、回転数に換算した ATP 加水分解活性を図 10 に示した。F<sub>1</sub>-ATPase は 3 ステップで 1 回転するので、活性の 3 turnover が 1 回転に相当する。野生型での回転観察からは、4 回転/s 程度でアクチンフィラメントの回転が律速となるが、それ以下ではステップ状の回転が観察できることが知られている [16]。その閾値は 2 μM 程度で、これ以上の ATP 濃度では回転速度は飽和し、ステップ状の回転は観察できない<sup>1</sup>。それに対して、FEFE 変異体では 100 μM で 4 回転/s となっている。FEFE

<sup>1</sup> 負荷の小さな回転プローブを用いて、ビデオレート (30 フレーム/秒) 以上の高時間分解能で観察した場合はこの限りではない [17]。

変異体の活性は、initial 活性ではなく steady 活性であることから、inhibited form に陥っている分子との混合物の活性である可能性がある。そのため、1 分子の活性はそれより高い可能性があるが、それを踏まえても 20  $\mu\text{M}$  以下ならば同様の条件でステップ状の回転を観察できると予想される。

### 3.4 初期不活性状態の解析

#### 3.4.1 活性化速度の ATP 濃度依存性

図 8 に示した FEFE 変異体活性のタイムコースでは、初期不活性状態からの活性化は、一次の指数関数式 (時間変化する活性を  $V(t)$ 、 $A_1, A_2$  は定数とする)

$$V(t) = A_1 \exp(kt) + A_2 \quad (3.2)$$

でフィットすることができた。その時定数  $k$  を活性化速度定数と定義し、その活性化速度定数 ( $k$ ) と ATP 濃度の関係を図 11 に示した。この図から活性化の速度定数は ATP 濃度に比例して増加していることが分かる。その比例係数を  $k_{on}$  とすると、(3.2) 式は以下のように書き換えることが出来る。

$$V(t) = A_1 \exp(k_{on}[\text{ATP}]t) + A_2 \quad (3.3)$$

この式を反応速度論的に解釈すると、活性化反応の経路として



というスキームが予想される。このときの  $k_{on}$  は図 11 での直線フィットの比例係数から 28  $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$  と求められた。

#### 3.4.2 結合ヌクレオチド定量

活性測定の初期の不活性状態は inhibited form に対応している可能性も考えられる。inhibited form とは  $\text{F}_1\text{-ATPase}$  に  $\text{Mg-ADP}$  が強く結合した状態であること (C.1 節) から、活性測定前の  $\text{F}_1\text{-ATPase}$  にどれだけの  $\text{ADP}$  が結合しているかを測定することにより、活性

測定 of 初期状態から inhibited form に陥っているかどうかを予想できる。そこで、FEFE 変異体にどれだけのヌクレオチドがついているかを測定した結果を Table.1 に示した。

Table.1 結合ヌクレオチド定量

サンプル	結合ヌクレオチド
野生型	0.42 個/ $F_1$ -ATPase
FEFE 変異体	0.016 個/ $F_1$ -ATPase

以上の結果から、野生型と比較しても FEFE 変異体には初期状態ではほとんどヌクレオチドがついていないことがわかった。この結果から、初期状態では inhibited form にはほとんど陥っていないと結論できる。

そこで、初期の不活性状態は inhibited form に依るものではなく、別の原因があると予想される。

### 3.4.3 ユニサイト結合速度定数測定

FEFE 変異体の活性測定では initial の活性が見えず、ATP 濃度に依存した lag が存在していたことから、そこで式 3.4 のスキームが考えられた。

第 1 章で述べた Boyer の仮説では、回転を引き起こす高い ATPase 活性を持つには、 $F_1$ -ATPase 1 つあたりに 2 つ以上のヌクレオチドが付くことが必要と考えられている。前節の結果より、結合しているヌクレオチドがほとんど無いことから、この不活性型は 3 つの触媒部位に 1 つも ATP が結合していない状態であると予想することが出来る。そこで、1 つ目の ATP が  $F_1$ -ATPase へ結合する速度 (ユニサイト  $k_{on}$ ) を調べた。

以前に行った蛍光色素の付いたヌクレオチドアナログである TNP-ATP<sup>2</sup> を用いた結合実験では 1 つ目の結合が遅くなっているかのような結果を得ていた [23]。しかし、このヌクレオチドアナログの蛍光色素はちょうど FEFE の変異導入部位と相互作用する位置に導入されており、蛍光色素と変異体の相互作用の影響を無視することが出来ず、正確に 1 つ目の結合を測っていない可能性がある。そこで今度は通常の ATP で確認しようと限外ろ過を用いた結合ヌクレオチド定量法を用いてユニサイト  $k_{on}$  の定量を行った。

<sup>2</sup>2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate

限外ろ過器 (ultrafree) に  $F_1$ -ATPase と ATP を混合した溶液を乗せ、濃縮遠心すると蛋白 ( $F_1$ -ATPase) を除いた外液のみが落ちて来る。その落ちてきた外液の ATP の濃度を定量することにより  $F_1$ -ATPase に結合していない ATP の量がわかり、落ちて来なかった分が  $F_1$ -ATPase に結合したヌクレオチドであるといえる。このときの結合ヌクレオチド量を、混合からの時間変化として測定した。 $F_1$ -ATPase(野生型 or FEFE)  $1 \mu\text{M}$  に対して ATP 濃度は  $0.5 \mu\text{M}$  または  $1.0 \mu\text{M}$  ( $F_1 : \text{ATP} = 2 : 1$  or  $1 : 1$ ) という ATP が過小の条件にすることにより、1つ目の ATP の結合速度 (ユニサイト  $k_{on}$ ) を測定することが可能となる。

その結果、落ちてきた外液をヌクレオチド定量したところ全て ADP のピークであった。そこで結合しなかった ADP 濃度の時間変化を図 12 に示した。どのサンプルでも同様に速やかにヌクレオチド濃度が下がっている。この結果は、ほとんどの ATP が速やかに  $F_1$ -ATPase(野生型&FEFE) に結合していることを示している。

ちなみに ATP を混ぜて長時間 (約 2 時間) 経過した後の上清のヌクレオチド量は Table2 のようになっていた。

Table2: 上清の結合ヌクレオチド量

サンプル	[ADP]
野生型 (with $0.5\mu\text{M}$ ATP)	$1.02 \mu\text{M}$
FEFE(with $0.5\mu\text{M}$ ATP)	$0.90 \mu\text{M}$
FEFE(with $1.0\mu\text{M}$ ATP)	$1.66 \mu\text{M}$

$F_1$ -ATPase が濃縮されている分だけヌクレオチド濃度が濃くなっている。このことも  $F_1$ -ATPase にヌクレオチドが結合していることを示している。

活性の lag から求めた  $k_{on}$  は  $28 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  であることから、FEFE 変異体への ATP の結合には、 $1 \mu\text{M}$  では  $1/(28 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 1 \mu\text{M}) \simeq 36000 \text{ sec}$  ほどかかる計算となる。つまり、1つ目の ATP 結合が遅いという予想が正しければ、この測定時間内 ( $\sim 2$  時間 =  $7200 \text{ sec}$ ) ではほとんど結合しない条件であるにもかかわらず野生型と同様に速やかに結合していた。

実際には濃縮遠心のたびに上清は濃縮されるため溶液の容量が変化し、かつ、一部の ATP は落ちていくのでこの結果から正確な結合ヌクレオチド量を推定するには補正が必要である。しかし、その補正はするまでも無く、1つ目のヌクレオチドは FEFE 変異体  $F_1$ -ATPase に野生型同様速やかに結合することがわかった。



すなわち、当初の予想に反して FEF E 変異体にも 1 つ目のヌクレオチドは速やかに結合しているという結果であった。

### 3.5 FEF E 変異体を用いた回転ステップの観察

FEF E 変異体の回転観察をビーズの系 (図 13) を用いて行った。回転のプロブとしてアクチンフィラメントの代わりにストレプトアビジンでコートしたビーズを用いることで、ビオチン化された  $F_1$ -ATPase をそのまま回転アッセイに用いることができ、また、直径  $0.35\mu\text{m}$  の小さいビーズを用いることにより負荷を比較的小さく押えて、ステップの観察が容易となる。

ある一分子の回転について、その回転観察を行った結果を図 14a に示した。高濃度 ATP ( $200\mu\text{M}$ ) で一様に回転している FEF E 変異体には、低濃度 ATP ( $5\mu\text{M}$ ) を流し込み、溶液交換を行ったところ 1 回転に 3 ステップする回転が観察された。そこで再度 ATP 高濃度 ( $10\text{mM}$ ) にしたところ、ステップは観察されなくなった。それに対して、野生型 (HC95) では ATP 濃度  $5\mu\text{M}$  存在下でも停止すること無くスムーズに回転していた (図 14a 赤線)。

FEF E 変異体での回転の停止は、 $120^\circ$  毎のグリッド線に沿っていることから、 $120^\circ$  毎にステップする回転を示している。図 14b は  $[\text{ATP}] = 5\mu\text{M}$  での FEF E 変異体のステップ回転中の重心の角度分布を示し、停止位置が  $120^\circ$  毎に 3 点に分布していることがこの図から読みとれる。

図 14a での  $[\text{ATP}] = 200\mu\text{M}$  の回転では、 $[\text{ATP}] = 5\mu\text{M}$  でのステップの停止位置と全く同じ位置に、約 1 s 以下の停止が存在していることが見てとれる。溶液交換を行うことによるステップの長さが増えているというこの結果は、1 分子でのステップの停止時間に ATP 濃度依存性があることを示している。この確認を 1 分子ごとに行うことにより、この停止がビーズのガラス面への吸着などのアーティファクトではなく、野生型の低濃度での回転でも見られた、ATP 結合に対応するステップ回転 [16] であることを示している。

ちなみに、 $10\text{mM}$  ATP から  $5\mu\text{M}$  への溶液交換では、 $200\mu\text{M}$  から溶液交換した場合よりもステップ間隔が短くなっていた (data not shown)。これは、高濃度からの溶液交換では、完全に溶液の濃度を下げることが出来ない事を示している。よって、以下の定量的な

回転ステップの解析には、ATP 濃度を 200  $\mu\text{M}$  から溶液交換により 5  $\mu\text{M}$  へ濃度を下げたデータを元に行った。

測定した 23 分子の  $[\text{ATP}]=5 \mu\text{M}$  での回転についてステップの待ち時間を計測し、ヒストグラムをとると図 14c のようになった。このヒストグラムは、一次の指数関数式

$$n = A \exp(-k_{on}[\text{ATP}]t) \quad (3.5)$$

にととても良く一致した (式の導出は付録 C.4.1 節参照)。この式でフィッティングを行った曲線を図に実線で示した。その結果、 $k_{on}$  は  $1.82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、この値は野生型の値 ( $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [17]) の約 1/100 であった。すなわち、触媒部位への FEFE 変異の導入により ATP が 100 倍結合しにくくなっていることが 1 分子回転観察からも明らかになった。

この結果は第 3.3 節でのべた活性測定での親和性の変化 ( $K_m$  が約 100 倍) とよく一致していた。

### 3.6 回転トルク測定

$[\text{ATP}]=5 \text{ mM}$  でのアクチンを用いての回転観察により、FEFE 変異体のトルクを計測した。 $F_1\text{-ATPase}$  のトルクは回転するアクチンフィラメントの回転速度とアクチンフィラメントにかかる水の粘性抵抗から求めることができる (付録 B.5.3 節参照)。

アクチンフィラメントの長さに対してその時の  $F_1\text{-ATPase}$  の回転速度をプロットしたが、図 15 である。回転速度はアクチンの長さが長いほど遅くなっている。実線はトルクが 40 pN·nm であるとしたときの理論曲線である。図を見るといくつかのデータはこの理論曲線付近に存在しているが、多くのプロットはそれより低めなトルクとして現れている。

プロットしたトルクは、ブラウン運動による一瞬の動きを除くために、スムーズに 5 回転したときの傾きの最大値をトルクと定義している。しかし、FEFE 変異体の場合には、 $[\text{ATP}]=5 \text{ mM}$  では活性も飽和していない上に多分子系で測定した活性も 15 回転/s と低い。そのため、5 回転中にトルク測定に影響が現れるほどのステップによる停止が観察されてしまう可能性も考えられる。負荷の無い  $F_1\text{-ATPase}$  の回転が 15 回転/秒であることは、平均して 1 ステップ毎に 1/45 秒、5 回転中には 1/3 秒間の停止が存在することを意味する。この影響はとくに短いアクチンについて現れやすく、1  $\mu\text{m}$  以下のアクチンフィラメント

についてはアクチンの回転も 10 回転/s であるので、ステップによる短い停止が影響していると思われる。逆に、長いアクチンフィラメントでの 1 分子での回転観察では、回転するアクチンフィラメントのガラス面との相互作用などのアーティファクトが増える傾向にある。しかし、これらの影響はすべて回転が遅くなる方向へ作用している。そこで、測定で得られる最大のトルクが 1 分子の真のトルクに対応していると考えられる。

結果として、FEFE 変異体は野生型の F<sub>1</sub>-ATPase と同程度のトルクを持っていると結論できた。

### 3.7 3章のまとめ

- ATP に対する親和性が 1/100 倍に弱まった FEFE 変異体が得られた。
- FEFE 変異体では ATP 結合に由来したなんらかの阻害状態を持つため、initial 活性が測定不能であったが、1 つめの ATP に対する結合速度はそれほど遅くはないなかった。
- FEFE 変異体は野生型ではステップが観察できない ATP 濃度 (5 μM) において、ステップ状の回転が観察できた。そこから、回転中の ATP 結合の速度定数が、 $k_{on} = 1.82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められた。
- FEFE 変異体は、野生型と同程度の回転トルク (約 40 pN·nm) を持っていた。

# 第4章 ハイブリッド変異体作製法の開発

## 4.1 背景

第3章で得た変異を1つの $\beta$ サブユニットのみに導入するために、新たな手法(図16)を開発した。

これまで、ハイブリッド $F_1$ -ATPaseを作製する試みとしては、天野らによるグルタミン酸タグ(Glu-tag)を利用した方法がある[19]。この方法では、変異 $\beta$ サブユニットのみに、Glu-tagを取り付けて、それをNaClグラジエントのイオン交換カラムにより、Glu-tagが1本付いた $F_1$ -ATPase、2本付いた $F_1$ -ATPase、3本付いた $F_1$ -ATPaseのフラクションを別々に回収することで分離していた。しかし、このイオン交換カラムを用いた分離法では、ピークとピークの間があまり離れないために、必然的にさまざまな分子種のハイブリッド $F_1$ -ATPaseのコンタミネーションが存在する。これは、多分子系を用いた統計解析では問題ない程度ではあるが、1分子系においては、観察された1分子に含まれる $\beta$ サブユニットの数が問題となるため、微量のコンタミネーションでも問題が発生してしまう。そこで新たに、より精製度の高いハイブリッド $F_1$ -ATPase作製法を開発することにした。

今回用いている $F_1$ -ATPaseには、回転観察のためにHis-tagが取り付けられている。His-tagは、Nickel Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)と強く結合し、イミダゾールを用いることで容易に解離させることができるという性質を持つ。その性質により一度の精製操作でかなりの精製度での分取が可能となるので、それを今回の精製に利用することにした。

## 4.2 概要

ハイブリッド作製法の概要は図16に示した。ハイブリッドを分取するために、2つの $\beta$ サブユニットにHis-tagをつけ、残りの1つの $\beta$ サブユニットにはFEFE変異を導入する。

そこでまず、2つの $\beta$ サブユニットを特異的にダイマー化させる。角田らにより、 $\beta$ サブユニットの386番目の残基であるIleをCysに変異させると、2つの $\beta$ サブユニットが分子内でクロスリンクすることが知られている[24]。この $\beta$ I386C変異を導入した $F_1$ -ATPaseは、最大活性が野生型の70%程に低下するが、 $K_m$ の値に関しては野生型と変化が無いので、今回のFEFE変異を用いたハイブリッド $F_1$ -ATPaseの回転ステップには、影響が生じないと考えられる。

ハイブリッド $F_1$ -ATPase作製の全体的な流れは以下のようになる。まず $\beta$ (His-tag/I386C)サブユニットを単離精製し、 $CuCl_2$ で酸化することによりCys残基をクロスリンクさせ、ゲルろ過により2量体として単離した( $\beta$ ダイマー)。その $\beta$ ダイマーと、His-tagのない変異体 $F_1$ -ATPaseを混合・変性し、再構成させると、サブコンプレックスのリスクランブルが起こり、一部の $\beta$ ダイマーが変異体 $F_1$ -ATPaseに取り込まれる。

こうして再構成させた産物には、 $\beta$ サブユニットの取り込まれた $F_1$ -ATPase(すなわちハイブリッド $F_1$ -ATPase)と元の $F_1$ -ATPase、および $\beta$ ダイマーが混在する。そこで、Ni-NTAカラムを用いてHis-tag精製する。すると、His-tagを持つものだけ、つまり、 $\beta$ ダイマーの取り込まれたハイブリッド $F_1$ -ATPaseと、 $\beta$ ダイマーが得られることになる。ここから $F_1$ -ATPaseのみをゲルろ過により分取することで、こうして1つの $\beta$ サブユニットだけに変異を導入したハイブリッド $F_1$ -ATPaseを得ることが出来る。

### 4.3 変性および再構成

野生型の好熱菌 $F_1$ -ATPaseでは、8M Ureaを用いて完全変性させて完全に活性のなくなった $F_1$ -ATPaseでも透析によりUreaを抜くだけで容易に再構成し、活性が回復することが知られている[19]。

しかし、8M Ureaを用いて変性させたのちに透析して再構成させると、His-tagやFEFEの変異が入った $F_1$ -ATPaseではアグリゲーションを形成しまい、再構成率が非常に悪いことがわかった。また、そのような条件で $\beta$ ダイマーと混合させるとまったくハイブリッド $F_1$ -ATPaseを得ることは出来なかった。

そこで、条件を検討した結果、2M Ureaで変性させた場合にはアグリゲーションを引き

起こすこと無くサブコンプレックスを解離させ、再構成が可能であることがわかった。最終的な再構成プロトコールでは透析でなく希釈濃縮を用いた (A.7節)。実際に第3章で得た FEFE 変異体に対して His-tag 付き野生型  $\beta$  ダイマーを導入して、ハイブリッド  $F_1$ -ATPase を作製した結果を図 17 に示した。ゲルろ過 (図 17a) によって得られた最終的な産物の非還元 SDS 電気泳動 (図 17b) では、非還元条件 (DTT-) では  $\alpha$  サブユニットの約 1/3 の  $\beta$  モノマーと、 $\beta$  ダイマーのバンドが見てとれた。一方、還元条件 (DTT+) にすると、 $\alpha$  サブユニットとほぼ等量の  $\beta$  サブユニットのバンドが見られた。この結果は得られたハイブリッド  $F_1$ -ATPase が、ほぼ  $\alpha_3\beta(\text{his-tag/I386C})_2\beta(\text{FEFE})_1$  のストイキオメトリーであることを示唆している。こうして得られたハイブリッド  $F_1$ -ATPase の特性については第5章で述べる。

### 4.4 コンタミネーションとリスクランブル

こうして新たに開発したハイブリッド作製法を用いても、他の分子種の混合を 100% 完全に無くすことは不可能である。特に、混合率に影響して来るのが、 $\beta$  ダイマーの精製である。精製には、HPLC によるゲルろ過を 2 回行うことでダイマーとモノマーを分離している。ゲルろ過のチャートではほぼ完全にダイマーのみを単離することができているにも関わらず、非還元条件での SDS 電気泳動を行うと、極微量にモノマーの  $\beta$  サブユニットが含まれていた (data not shown)。モノマーの His-tag 付き  $\beta$  サブユニットが含まれていると、変異体  $\beta$  サブユニットと  $\beta$  ダイマーからなる 1 変異体だけでなく、 $\beta$  ダイマーとコンタミネーションした  $\beta$  モノマーからなる野生型 (0 変異体) および変異体  $\beta$  2 つとコンタミネーションした  $\beta$  モノマーからなる 2 変異体が再構成時に作られ、Ni-NTA カラムで分取されてしまうことになる。この混合を減らすためには、再構成率をあげることが重要となる。なぜなら、モノマーの  $\beta$  サブユニットはより複雑な構造を持つダイマーの  $\beta$  サブユニットよりも  $F_1$ -ATPase に取り込まれやすいと考えられる。そこで、 $\beta$  ダイマーがより多く取り込まれる条件ほど相対的に混在する微量のモノマーの影響が少なくなるはずである。

また、ハイブリッド  $F_1$ -ATPase は時間とともに解離・再会合 (リスクランブル) を繰り返すことが知られている [19]。そのため、ハイブリッド作製時にどれだけコンタミネーションを押えても、実験する段階には各種の組合せのハイブリッド体の混合物となってしまうこ

とは避けることができない。この解離は低温にするほど促進される傾向にあるので、えられたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase は常に室温で保存し、なるべく精製直後に活性測定を行い、精製後 2~3 日の間のみ回転観察に使用した。

# 第5章 低親和性ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase の回転観察

## 5.1 1FEFE

今回開発したハイブリッド作製法(第4章)を用いて、1つの $\beta$ サブユニットのみをFEFE変異体に変えたハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase(以下1FEFEと呼ぶ)を作製した。再構成率は実験毎にばらつきがあるものの、0.7mgずつのF<sub>1</sub>-ATPaseと $\beta$ FEFEダイマーから、最大0.15mgの1FEFEが得られた(図17)。

### 5.1.1 活性測定

得られた1FEFEのATPase活性測定を行った。その結果を図18に示す。第3章で述べた3つの $\beta$ サブユニットにFEFE変異を導入したF<sub>1</sub>-ATPase(以下3FEFEと呼ぶ)の場合と異なり、1FEFEは測定最初の活性が高く(initial burst)、定常状態では活性が低下して(steady state)いた(図18a)。

このinitial burstの存在は3FEFEでは見られなかったものであり、野生型の $\beta$ サブユニットの存在を反映していると考えられる。

その活性のATP濃度依存性を示したものが図18bである。ミカエリスメンテン式(2.1式)でフィットしたところ、initial活性の $K_m$ は約0.45 mMであり、3FEFEの $K_m$ である約1.55 mMの約1/3であった。この結果は親和性の低い $\beta$ サブユニットの数が3つから1つになることにより、3 turnover中の律速段階の数が1/3になることを反映している。

このようなハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの速度論理論解析については、付録(C.2.1節)にて、より詳細に解析を行った。



### 5.1.2 野生型ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase(0FEFE) の性質

1FEFE の活性の V<sub>max</sub> は精製ごとにばらつきがあったが、平均約 20 turnover/s であり、野生型の約 8% と非常に低かった。この大きさは、3 つとも FEFE 変異を導入した 3FEFE の活性 (62 turnover/s) とくらべても低い。また initial 活性にくらべて steady 活性が野生型では 1/4 程度であるのに対して、1FEFE では 1/9 程しかなく、非常に低いという特性も持っていた。

そこで、再構成体作製によるアーティファクトの影響を調べるための対照実験として、第 4 章で開発したハイブリッド作製法を用いて、野生型  $\beta$  サブユニットのみで再構成した F<sub>1</sub>-ATPase(0FEFE) の ATP 加水分解活性を測定した。通常の野生型での最大 initial 活性は 250 turnover/s 以上であるのに対し、0FEFE では 71 turnover/s と低くなることがわかった。また、steady 活性は 7.8 turnover/s であり、initial 活性の約 1/9 と非常に低くなることもわかった。この結果、最大活性が低くなることと、initial に比べて steady の活性が小さくなる原因は、FEFE 変異が 1 つだけ導入された影響ではなく、I386C 変異の影響等、再構成体作製によるアーティファクトであると考えられる。

### 5.1.3 1FEFE ステップ観察

ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase である 1FEFE の回転観察を 3FEFE 同様 (第 3 章) にビーズの系 (図 13) を用いて行った。

その結果が図 19a である。高濃度 ATP (200  $\mu$ M) で一様に回転している 1FEFE に、低濃度 ATP (5  $\mu$ M) を流し込み、溶液交換を行ったところ 1 回転に 1 回のステップ状の回転が観察された。そこで再度高濃度 (10 mM) にしたところ、ステップは観察されなくなった。角度分布のヒストグラム (図 19b) からは、1 回転中のある 1 点でのみステップしていることがわかる。

ここでも、3FEFE 同様に [ATP]=200  $\mu$ M では、5  $\mu$ M でのステップの停止位置と全く同じ位置に、1 s 以下の停止が存在していることがみてとれる。つまり、このステップ回転は、ATP の結合を反映したものであり、ビーズのガラス面への吸着などのアーティファクトでは無いことを示している。

すべての [ATP]=5 μM での 1FEFE の回転ステップについて、1 回転に 1 回ステップの時間間隔のヒストグラムを取ってみると (図 19c)、

$$n = A \cdot \exp(-k_{on} \cdot [ATP] \cdot t) \quad (5.1)$$

によるフィッティング曲線 (付録 C.4.1 節) に良く一致し、 $k_{on} = 3.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。この値は野生型の値に比べて ~1/100 倍であり、第 3 章で求めた 3FEFE での  $k_{on}$  とほぼ同程度の値となっていた。この結果は、1 つの β サブユニット (FEFE) への 1 つの ATP の結合が律速となっている事を示している。また、この回転観察からは、1 回転中の 1 点での待ち時間以外の回転への影響は観察されなかった。

以上より、1 つの β サブユニットに対する ATP の結合が 1 つのステップの律速になっているということが、直接観察できた。すなわち、回転中の β サブユニットの働きの一つを特定することができた。

## 5.2 2FEFE

1FEFE と同様に、今度は FEFE 変異を導入した β ダイマーを野生型 F<sub>1</sub>-ATPase(C95) に導入することにより、2 つの β サブユニットに FEFE 変異を導入したハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase (2FEFE) を作製した。

しかし、1FEFE と同様のプロトコールで作製したにもかかわらず、非常に再構成率が悪いものであった。1FEFE が最大 2 割程度の再構成率だったのに対して、2FEFE では再構成率は最大でも 5% 程度でしかなかった。この結果は、βFEFE ダイマーが、His-tag と FEFE 変異の影響により変性に対して弱くなっていると考えられる。

### 5.2.1 活性測定

活性測定の結果を図 20 に示した。1FEFE 同様に initial burst とそれより低い steady state の活性があった (図 20a)。

また、活性の ATP 濃度依存性 (図 20b) から 2FEFE の  $K_m$  は約 0.90 mM と求められた。この値は、1FEFE の約 2 倍であり、3FEFE に比べると約 2/3 となっており、FEFE 変異の

数を反映した  $K_m$  の上昇を確認することが出来た (付録 C.2.1 節参照)。

initial 活性の最大値 (Vmax) は 82 turnover/sec と 1FEFE に比べて高めになっていた。また、0.1% LDAO を加えたときの活性は initial 活性に対して低くなっている。これは、第 3 章で述べた LDAO は FEFE に対して阻害的に働くという FEFE 変異の影響が、FEFE 変異体  $\beta$  サブユニットが 2 つになったために大きく出ていると考えられる。

## 5.2.2 回転観察

作製したハイブリッド  $F_1$ -ATPase(2FEFE) の回転観察を行ったところ、 $[ATP]=5 \mu M$  で 1 回転中に 2 点でステップする回転が観察された (図 21a,b)。また、ATP 依存的なステップであることも確認できた。

また、観察した 8 個の分子について回転ステップの停止時間の解析を行ったところ、ヒストグラムは 1 次の指数関数式 (C.4.1 節) でフィッティングでき (図 21c)、そこから  $k_{on} = 1.60 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$  と求められ、1FEFE 及び 3FEFE の  $k_{on}$  と同様の値であった。

この結果は、2 つ存在している FEFE 変異の  $\beta$  サブユニットに ATP が結合するときだけ、ATP の結合が遅くなり回転ステップが長く現れることを示している。つまり、1 つの  $\beta$  サブユニットへの ATP の結合が回転ステップの引金になるという 1FEFE での結果を強く裏付けるものであった。

## 5.3 各分子での $k_{on}$ の値のばらつき

1FEFE の  $k_{on}$  の値は 3FEFE の約 2 倍となっていた。しかし、この違いについてはあまり重要に捉える必要はないと考えた。なぜならば、観察された分子毎の  $k_{on}$  の値はそれぞれの 1 分子について個々に算出すると非常に変化に富むものであった。 $k_{on}$  を各 1 分子毎に算出して統計的に処理した結果、1FEFE では  $(3.4 \pm 2.2) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$  (23 分子) であり、3FEFE は  $(1.2 \pm 0.6) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$  (8 分子) であった。また、2FEFE では  $(1.8 \pm 0.8) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$  (8 分子) という、どれも大きな標準偏差を持つ値となっていた。これらの値の広い分布が生じる理由は不明だが、分子の個性や、制御不能な実験条件による違いを反映していると思われる。

## 5.4 他の分子種の混合

以上のような1FEFEでは1回転に1ステップ、また、2FEFEでは1回転に2ステップするような回転は、すべて溶液交換により濃度依存性を確認している。このような特性は野生型での回転観察では全く見ることが出来ない。また、ハイブリッド作製法に基づいて再構成した野生型ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseである0FEFEについても回転観察を行った結果、観察されたすべての分子(27分子)は[ATP]=5 μMの条件で、ステップせずに連続的に回転運動していた(data not shown)。すなわち、これまでのハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase(1FEFE,2FEFE)の回転観察の結果は、FEFE変異の導入の結果となる特性であることは間違いない。

しかし、観察された全てのデータがそのような回転を示すわけではなかった。1FEFEでは、観察した全39サンプル中34分子が、溶液交換により[ATP]=5 μMにした際に1回転に1ステップする回転であった。しかし、それ以外の5サンプルは、ATP濃度を下げてもステップしない連続的な回転が持続する野生型のようなものであった。また、2FEFEに関しては、全19サンプル中11分子が1回転に2ステップする回転であり、1回転に3ステップするものや、1FEFE様のものもあった。

この原因について考察する。他の分子種の混合を完全になくすことはできないことは、4.4節にて述べた。電気泳動や活性測定からは、あきらかな混合の影響はあらわれていないにもかかわらず、1FEFEの回転観察においてはいくつかの野生型らしき連続的な回転が観察されていた。第4章での考察からは、同様に2つのβサブユニットがFEFE変異体となる2FEFEも存在しているはずであるが、そのような回転は発見されなかった。

ここで考えなければならないのは回転の発見頻度である。Cys変異を導入したハイブリッドコンプレックスは、野生型または第3章で用いた変異体(3FEFE)に比べて著しく回転発見頻度が低かった。その発見頻度は野生型や3FEFEでは1プレートに数十個の回転を発見できるにも関わらず、1FEFEの場合には1プレートにつき数個の割合でしかなかった。この結果はinhibited formが影響していると思われる。inhibited formは回転が停止している状態であることがわかっている[25]。つまり、inhibited formに陥っている分子は回転を発見することはできないことになる。

野生型では活性のsteady/initialは1/4程度である。このとき、観察中の75%の分子はinhibited formにより停止していることになる。それに対して、1FEFEではsteady/initial

は 1/10 程度まで落ちており、90%の分子が停止してしまっていることになる。よって、それだけでも数倍は野生型の方が発見頻度が高いことになる。つまり、回転発見頻度は、実際に含まれる他の分子種をその割合以上に反映してしまうことになる。

にもかかわらず、1FEFEに於いては約87%と、ほとんどの分子が1回転に1ステップしていた。また2FEFEに関しては約59%が1回転に2ステップしていたが、この低い確率は、再構成率の低さを反映しているものと思われる。以上の結果より、いくらかの他の分子種も観察されてはいるが、より多くあらわれている回転ステップの振舞いが、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の性質を表していることは間違いないだろう。

## 第6章 考察—ATPの結合と回転機構

### 6.1 ATPの結合と交代結合説

この第II部では、 $F_1$ -ATPaseに1つ、2つ、3つとATP結合の遅い変異 $\beta$ サブユニットを導入していくことで、1つ、2つ、また3つの $120^\circ$ 回転の引き金が遅くなっていることを明らかにした。ある1つの $\beta$ サブユニットで長時間ATPを待っている間は、他の2つの $\beta$ サブユニットでは次の触媒反応をせずに待っているといえる。つまり、 $F_1$ -ATPaseは順番に起こるはずの一連の触媒反応の順番をよく守っていることを示している。また、1つ、2つ、3つとATPの結合が遅くなる影響が観察されたことから、3つ全ての触媒部位( $\beta$ サブユニット)へと、順番にATPが結合することにより回転が起っていることを示している。すなわち「順番に交代で」ATPが結合していることを示している。

第1章で述べたように、Boyerは20年も昔に交代結合説を提唱していた。しかしその根拠は、複雑な酸素交換反応の実験結果が単純な触媒モデル(図2a)では説明が付かないが、複数サイトを持つ触媒モデル(図2b)なら説明できるという消極的なものであり、その結合の順番を保証するものではなかった[7]。また以前、1つの $\beta$ サブユニットを不活性にすることにより、3つの $\beta$ サブユニット全てが機能することが必須であることは示されていた[19]。しかしこの結果も、ATPの結合が、「順番に交代で」起っていることについてはなにも言及していない。すなわち本研究での結果は、ATPが「順番に交代で」結合するという交代結合説をはじめて直接的に証明した結果であるといえるだろう。

ただし、Boyerの交代結合説は、ATPの結合が順番に起っているというだけでなく、触媒反応が協同的に行われていること(cooperative catalysis)も示唆している。しかし、ここまでの研究ではそこまでの証明には至っていない。その証明は次の第III部以降で延べることになる。

## 6.2 回転方向とバックステップ

安田らによると、野生型での回転ステップの1分子観察では約20回に1度の割合で、バックステップが観測されていた[16]。このバックステップの原因として、彼らはアクチンフィラメントへのブラウン運動の寄与と、まちがった $\beta$ サブユニットへのATPの結合により逆向きにATPを加水分解して回転するという二つの可能性を考察しているが、どちらと断定するには至っていない。

しかし、今回の結果からはそれほどのバックステップは観察されなかった。本実験で用いたハイブリッド変異体では、 $\beta$ サブユニットの一部が100倍ATPの結合しにくいものになっている。つまり、次に付くべきATP結合部位がFEFE変異体であったときに、間違った方向の $\beta$ サブユニットはそれより100倍もATPを結合しやすいはずである。野生型での1/20もの確率で起こるバックステップが、逆向きの $\beta$ サブユニットへの結合が原因でそれほどの頻度でおこっているならば、FEFE変異体では逆向きのほうが5倍も付きやすいという計算になる。にもかかわらず、ほとんどが反時計回りに正確にステップを続けているということは、FEFE変異の導入された100倍低い部位へと正確に結合していることを示している。つまり、逆向きの結合部位に対して、正しい方向の $\beta$ サブユニットへの親和性は100倍以上のさらに高いものであるといえる。本研究の結果より、以前の安田らの観察した逆向きのステップは間違った $\beta$ サブユニットへの結合を反映したものではないといえるだろう。

## 6.3 変異導入領域の役割

$\beta$ サブユニットでATPが加水分解されると、構造変化が起こり、それにより押された $\gamma$ サブユニットが回転運動をされると考えられている。Osterらは、ATPの加水分解が $\beta$ サブユニットの構造変化を引き起こすときの高い効率のエネルギー変換を説明するモデルとして、Binding Zipperモデルを提唱している[26, 27]。このモデルでは、まず触媒部位の疎水的な部分にATPのアデニン環が結合し(docking)、その後、ATPの3リン酸が触媒部位の内部と順に水素結合を形成する(Binding Zipper)ことで高効率で力学的エネルギーを発生しているとしている。そのときの $\beta$ サブユニットの構造変化、すなわち1ステップの力学的エ

エネルギーは、dockingした後の水素結合により引き起こされるため ATP 濃度によらず一定であり、外部 ATP 濃度は疎水部位での docking の起こる頻度に影響しているとしている。

さて、第3章で用いた FEFE 変異体は、この疎水部位への変異体である。ATP に対する親和性は 100 倍弱まり、ステップの長さは 100 倍になったのに対して、変異体のステップの力学的エネルギーであるトルクは野生型とほぼ同一であった。また、野生型  $F_1$ -ATPase へ GTP や ITP などの ATP より親和性の低い基質の結合による回転においても、そのトルクは ATP のそれとほぼ同一の値であった [28]。これらの結果は、ATP 濃度は疎水部位への docking のみに関わり、トルクは ATP の親和性に依存しないという Oster らのモデルによく符合していた。つまり、この FEFE 変異は ATP の docking の機会を減少させるが、ひとたび ATP が結合すると Zipping の過程に状態が推移し、野生型同様のトルクを発生することが出来るようになると思われる。

## 6.4 バイサイトモデル・トライサイトモデル

これまでに、 $F_1$ -ATPase に 2 個のヌクレオチドが結合すると回転するというバイサイトモデル [29–31] と、3 つのヌクレオチドが結合するというトライサイトモデル [32–36] が提唱されている。

FEFE 変異体は、1 つも ATP のついてない状態からの活性からの回復は、一次の指数関数式 (3.3 式) でフィットでき、それから求められる ATP 結合の速度定数 ( $k_{on}$ ) は  $28 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と非常に遅いものであった (3.4.1 節)。このことは、ある 1 つの ATP が結合することにより、活性の高い状態 (=回転しうる状態) へと変化することを示している。にもかかわらず、ユニサイトへの結合速度は野生型同様に早いものであった (3.4.3 節)。これらの結果より、 $28 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  というかなり遅い  $k_{on}$  は、2 つ目の ATP の結合速度を反映していると考えることが出来る。そして、回転に際しての ATP の結合速度は、約  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と約 1/100 倍に遅くなったものであり、2 つめの結合速度とも違ったものであった。

以上のような、3 つの  $k_{on}$  すなわち 3 つの ATP の結合速度の変化が観測されたという結果は、回転に 3 つの ATP が結合することが必要であることを示唆している。この結果は、ハイブリッド  $F_1$ -ATPase で逆向きステップがほとんど観察されないという今回の結果 (6.2



節) や、トリプトファン変異体の蛍光の消光を利用した  $F_1$ -ATPase への ATP の結合を検出する研究による、高い ATP 濃度では1つの  $F_1$ -ATPase に対して3つの ATP がついているという結果 [36,37] とも符合する。すなわち、トライサイトでの回転メカニズムを強く示唆していると言えるだろう。

## 第7章 第II部のまとめ

- $\beta$ サブユニットの触媒部位への ATP の親和性を 1/100 に低下させる FEFE 変異体が得られた。
- 変異  $\beta$ サブユニットを1つだけ導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase を作製し、回転観察に応用する系が確立できた。
- この系を用いて、FEFE 変異を導入したハイブリッドの回転観察を行ったところ、野生型ではステップが観察できない ATP 濃度において、1回転に1ステップあるいは1回転に2ステップする非対称な回転が観察できた。
- それらステップより求めた  $k_{on}$  は 3FEFE での  $k_{on}$  と一致していることから、そのステップは1つの  $\beta$ FEFE サブユニットへの ATP の結合を反映していることがわかった。
- 以上の結果から、3つの  $\beta$ サブユニットへと ATP の結合が順番に交代で起こっているという、ATP 結合に関する交代結合説を直接的に証明できた。

## 第III部

# ATP加水分解変異体を用いた ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察



## 第8章 ATP加水分解変異体： $\beta$ E190D

### 8.1 目的

第II部では、ATPの結合の親和性を低下させた変異体 $\beta$ FEFEを導入したハイブリッド $F_1$ -ATPaseを用いて回転観察を行うことにより、1つの $\beta$ サブユニットへのATP結合の回転駆動での役割を同定した。しかし、 $F_1$ -ATPaseの回転には、ATPの結合だけでなく分子内部でのATP加水分解反応( $ATP \rightarrow ADP \cdot Pi$ )や、反応産物の解離などのいくつかの素反応が関わっていると予想され、実際にATPの結合以外の二つの素反応が回転の律速となっていることも明らかになった(図6)[17]。また、それらの素反応は、複雑に絡み合うことにより、回転を駆動しているという協同的な回転機構が予想されていた(図3)。

すなわち、 $F_1$ -ATPaseの回転機構を理解するには、各触媒部位へのATPの結合だけでなく、その他の触媒機構の素反応(ATPの加水分解や反応産物の解離)が、回転駆動でどのような役割を果たしているかを同定することが必須となる。そこで私は、ATPの加水分解反応を遅くした変異体を利用して、ハイブリッド $F_1$ -ATPaseとして一部に導入することにより、 $F_1$ -ATPaseの協同的な回転機構を明らかにすることを試みた。

そこでこの第III部では、導入する変異体として $\beta$ E190D変異体を利用する。この変異体はATPの加水分解反応がとても遅くなっていることが既に知られており[38]、また、回転観察に於いても、既に島袋らによって詳細にキャラクタライズが行われている[18]。まず、既に知られているこの $\beta$ E190D変異体の特色をこの章で述べ、後の章に於いては、ハイブリッド $F_1$ -ATPaseとして変異を導入し、その回転観察の結果を報告する。

## 8.2 変異導入部位

触媒部位での ATP の分解反応を特異的に遅くする変異体として、 $\beta$ サブユニットの 190 番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸に変えた変異体、 $\beta$ E190D 変異体を利用する。 $\beta$ サブユニットの Glu190 残基は  $F_1$ -ATPase の加水分解反応に必須な残基であることが既に知られており [39] 実際にその Glu 残基を Gln に変異させた変異体  $F_1$ -ATPase( $\beta$ E190Q) は、完全に ATP 加水分解活性が失われることが知られている [19, 40]。また、牛心筋ミトコンドリアの  $F_1$ -ATPase において X 線結晶構造が得られており [12]、その構造によると、Glu188(好熱菌  $F_1$ -ATPase では 190 に相当) のカルボキシル基が、水分子を介して、結合 ATP の  $\gamma$  リン酸基に求核攻撃しているように見てとれた (図 22)。すなわちこの  $\beta$ E190 残基は ATP の加水分解反応に深く関わっており、その変異体である  $\beta$ E190D 変異体は、加水分解反応を遅くする変異体であることが期待される。

## 8.3 ATP 加水分解活性

以下に述べる  $\beta$ E190D 変異体  $F_1$ -ATPase の詳細なキャラクタライズは島袋らによって行われた [18]。その加水分解活性測定では、initial burst は観測できないことから、あまり inhibited form には陥らないことがわかった。そしてその steady state 活性は、単純なミカエリスメンテン式にフィットでき、 $V_{max} = 2.4 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 1.4 \text{ }\mu\text{M}$  であった。この  $V_{max}$  の値は野生型  $F_1$ -ATPase(約  $250 \text{ s}^{-1}$ ) に比べてほぼ 1/100 倍に小さくなっており、 $K_m$  の値は野生型 ( $19\mu\text{M}$  ; LDAO 存在下) の約 1/10 となっていた。

## 8.4 回転観察

その回転観察を行ったところ、高濃度 ATP 存在下 (2 mM) において、野生型では見られないような  $120^\circ$  おきに 3 点でステップする回転が観察された (図 23a)。また、低濃度 ATP 存在下 ( $\leq 2 \text{ }\mu\text{M}$ ) において回転観察を行った結果では、その  $120^\circ$  ステップは約  $80^\circ$  と約  $40^\circ$  の 2 つのサブステップに分かれることが解った (図 23b)。 $80^\circ$  サブステップ回転の前の待ち時間は ATP 濃度に依存したことから、この待ち時間は ATP の結合の待ち時間であり、一

方で、40° サブステップ回転の前の待ち時間は ATP 濃度に依存しない待ち時間であった。

それらの待ち時間の時間分布のヒストグラムを取り解析を行った。その結果、80° サブステップの前の待ち時間は、1 次の指数関数式 (付録 C.4.1 節; 式 C.55) に従ってフィッティングでき、ATP の結合定数は、 $k_{on} = 3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められた。この  $\beta$ E190D 変異体の  $k_{on}$  の値は、野生型の約 1/10 であり、変異の影響により ATP の結合の親和性が 10 倍弱まったことを示している。また、一方で、40° サブステップの前の待ち時間のヒストグラムをプロットしたところ、山形のピークが現われ、二つ時定数を持つ指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.63 式) によりフィットすることができて、その時定数はそれぞれ約 320 ms と 20 ms であった (図 23c)。

## 8.5 E190D 変異体の特性

以上の結果より明らかになった  $\beta$ E190D 変異体  $F_1$ -ATPase の回転機構の模式図を図 24 に示した。図 6 に示した野生型  $F_1$ -ATPase で見られた 90° と 30° のサブステップ [17] は、この変異体では 80° と 40° のサブステップに対応していると考えられる。そして、それぞれの反応の待ち時間は、 $\beta$ E190D 変異の導入により遅くなり、ATP の結合は 10 倍遅く、また、各 1 ms であった 2 つの加水分解の中間反応はそれぞれ約 320 ms と約 20 ms と非常に遅くなっていることがわかった。

## 第9章 簡略化したハイブリッド

# F<sub>1</sub>-ATPase 作製法の開発と条件 検討

### 9.1 背景と目的

第II部では、 $\beta$ I386C 変異体のダイマーを用いたハイブリッド作製法を開発し、回転観察に適用することで ATP の結合の影響を観察することができた。しかし、これまでに用いていたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の作製手法では、加水分解変異体のハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を作製し回転観察を行うにあたって、以下のような問題点があることがわかった。

#### 1. 活性 ( $V_{max}$ ) が落ちてしまう。

5.1.2 節に於いて  $\beta$ I386C ダイマーのみを導入した野生型のハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase (0FEFE) を作製し活性測定を行ったところ、その  $K_m$  には影響があらわれなかったが、その  $V_{max}$  は野生型の  $250 \text{ s}^{-1}$  に対して、0FEFE では  $71 \text{ s}^{-1}$  と 1/3 以下に低下していた。この結果は、 $\beta$ I386C 変異の導入によるハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の再構成が加水分解速度に影響していることを示している。これではハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転観察において影響が現れてしまい、実際の特異的な変異導入の影響の観察が難しくなることを意味している。

#### 2. Inhibited form に陥りやすい。

同じく 0FEFE の活性測定の結果では、initial 活性に対する steady 活性の比が野生型に比べて低くなっていることがわかった。この結果はハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転観察中で、回転が止まってしまう時間が長くなることを意味しており、実際に回転観察を行うにあたって、非常に困難が生じることを意味している。



### 3. 他の分子種が混合している。

本来は、1分子観察にあたって他の分子種の混合を極力避けるために新たなハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 作製法を開発したにもかかわらず、5.3 節に述べたように、結局他の分子種が混合してしまうことがわかった。

特に1については、加水分解変異体を用いたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の特性を調べる上でクリティカルな問題である。すなわち、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase には、目的の導入変異(ここでは  $\beta$ E190D) 以外の変異を導入することは極力避けなければならない。また、3のように結局のところ他の分子種の混合が問題となるならば、他の分子種の存在が絶対無いことを目的に再構成法をデザインすることはあきらめる必要がある。そこでむしろ、その混合する他の分子種の比を制御できるハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 作製法を開発することにより、その問題に対応することを試みた。

## 9.2 概要

### 9.2.1 方針

新たに開発した、簡略化したハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 作製法の概略図を図 25 に示した。変異を導入した His-tag の付いた  $\beta$  サブユニットを野生型の F<sub>1</sub>-ATPase (His-tag 無し; C95) と混合する。これを低濃度 Urea で処理して再構成を行うことにより F<sub>1</sub>-ATPase に変異  $\beta$  サブユニットを導入することが出来る。そして、変異  $\beta$  サブユニットのみに取り付けられた His-tag を利用して Ni-NTA カラムを用いた精製を行うことにより、変異  $\beta$  サブユニットの導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase のみを得られる。

当然この手法により作ったハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase には、変異  $\beta$  サブユニットが1つ導入されたものだけでなく、2つ、あるいは3つ導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase が混在してしまうことになる。しかし、最初に混合するモノマーの  $\beta$  サブユニットの混合比を少なくすれば少なくするほど、得られるハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase は、より多くの分子種が変異  $\beta$  サブユニットの1つだけ導入されたものとなると考えられる。

## 9.2.2 分子種の同定

この手法を用いることで、理論上では、極限まで混合する変異  $\beta$  モノマーを少なくすることにより、ほぼ完全に1つのみ変異の導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase のみを得ることが出来ると考えられる。しかし、混合する  $\beta$  モノマーを減らせば減らすほど得られるハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の収量が減ってしまうため、ちょうど良い作製条件を検索する必要が生じる。そしてその条件では、100%完全に同一種のハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase が得られるわけではなく、当然、ある程度は他の分子種も混合していることになる。そのため、このハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を1分子観察に適用した場合には、観察しているある1分子が、目的としている1つ導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase なのか、あるいは、混合してしまった他の分子種なのかを同定する必要が生じてしまう。

しかし、今回用いるハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 作製法では、最初に導入する変異  $\beta$  サブユニットの混合比を変化させることによって、最終的にできあがったハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase への混合している他の分子種の比を変化させることが可能となる。つまり、最初に混合する変異  $\beta$  サブユニットの比を減らした場合に、ある特性を持つ分子の観察された数の比が増えた場合には、それが目的とする1つ導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の特性であると結論することが可能となる。ただしこの手法は、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase へ導入された変異  $\beta$  サブユニットの数によって、観察結果が明らかに異なることが必要条件となる。

## 9.3 $\beta$ E190D ハイブリッドの作製と条件検討

実際に His-tag の無い野生型 F<sub>1</sub>-ATPase(C95) に様々な分量の  $\beta_{his}$ E190D モノマーを混合することによりハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase (1xE190D) を作製した。また、野生型  $\beta_{his}$  サブユニットを  $\beta$ E190D 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase(C95 $\beta$ E190D) と混合することで 2xE190D を作製し、コントロールとして野生型  $\beta_{his}$  と野生型 F<sub>1</sub>-ATPase(C95) の混合により 0xE190D、 $\beta$ E190D 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase(C95 $\beta$ E190D) と  $\beta_{his}$ E190D の混合により 3xE190D を作製した。これらの、様々な比(モル比)での F<sub>1</sub>-ATPase と  $\beta_{his}$  モノマーの混合により得られたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の特性を Table 3 に示した。リスクランブルによる影響を回避するために、ハイブリッドを精製した当日中に活性測定を行い、その翌日および翌々日に回転観察を行った。

Table 3 再構成時の混合比に応じた回転発見頻度と活性と電気泳動図

$F_1 : \beta_{his}$	1xE190D (C95: $\beta_{E190D}$ )				2xE190D (C95 $_{E190D}$ : $\beta$ )			3xE190D	0xE190D
	1:20	1:3	3:2	3:1	1:3	3:2	10:1	5:1	5:1
no step (個 (%))	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.3)	12(46)	7(24)	3(12)	0(0)	34(100)
1 step (個 (%))	2(8)	8(38)	25(78)	26(87)	11(42)	13(45)	3(12)	0(0)	0(0)
2 step (個 (%))	7(29)	9(43)	7(22)	2(6.7)	3(12)	9(31)	19(73)	0(0)	0(0)
3 step (個 (%))	15(63)	4(19)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(4)	32(100)	0(0)
$V_{max}$ (/s)	3.0	6.8	5.8	11	43	16	7.6	3.8	71
$K_m$ ( $\mu$ M)	3.9	6.8	13	21	229*	95*	51*	ND**	303*

### 9.3.1 電気泳動

電気泳動の結果は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの部分のみ示した。導入する $\beta_{his}$ モノマーにはHis-tagが付いているので、分子量が大きめ(53.3 kDa)になり、 $\alpha$ サブユニット(54.6 kDa)とHis-tagの無い $\beta$ サブユニット(51.9 kDa)の間にバンドが現われる。その結果、混合する $\beta_{his}$ モノマーの量比が少なければ少ないほど、中央のバンドが薄くなり、 $\alpha_3\beta_{his}\beta_2$ のストイキオメトリーに近づいてるように見える。ただし、1xE190Dの結果と2xE190Dの結果を比べると、 $\beta$ E190D変異体は、野生型の $F_1$ -ATPaseに取り込まれ難く、逆に野生型の $\beta$ サブユニットは、 $\beta$ E190D変異体よりも再構成しやすいことがわかった。

### 9.3.2 活性測定

ATP加水分解の活性測定では、条件によってinitial burstがあったり、lagがあったりと様々な特性を示していたので、全てsteady stateの活性での値を示した。全ての活性は、様々な分子種が混合されたものの活性を測定しているため、数値の定量的な解析にはあまり意味が無い。しかし、混ぜる $\beta$ モノマーの比が減るほど、1xE190Dでは $V_{max}$ の値が大きく、2xE190Dでは $V_{max}$ の値が小さくなり、1xE190Dは0xE190Dの約3倍、2xE190Dは0xE190Dの約2倍というハイブリッド $F_1$ -ATPaseの予想される $V_{max}$ の値(予想値の解析法は付録C.2.2節にて述べている)に近づいている。

\*2xE190Dと0xE190Dでは、 $K_m$ の値が大きめに出ていた。この結果は、2xE190Dでは

0xE190D の混合の影響が大きく出て、また、収量が少ないために測定点を多く取ることができないため、シングルのミカエリスメンテン式ではあまりフィッティングが合わず、 $\alpha$  サブユニットへの ATP の結合による inhibited form への影響 [54] を反映した  $K_m$  が測定されていると考えられる。\*3xE190D ではさらに収量が少なかったため、低濃度 ATP での活性測定が出来なかった (ND: not detectable)。

### 9.3.3 回転観察

高濃度 ATP 濃度条件 (10 mM) において回転観察を行った結果、0xE190D では野生型 F<sub>1</sub>-ATPase と同様に、全て連続的な回転 (no step) をしており、3xE190D では、 $\beta$ E190D 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase (第8章) と同様に、全てが1回転に3ステップするもの (3 step) であった。一方で、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase (1xE190D, 2xE190D) の回転観察では、様々なステップ数 (0~3 step) の回転が観察された。その回転特性の特定には、まず一方向に回転しているものを全て取りこみ (1~3分/sample)、負荷が大きすぎて回転速度が遅すぎるものは除いた上で、1回転中に回転速度の律速となるような長いステップが幾つあるかによって、それぞれ、ステップなし (no-step), 1つ (1step), 2つ (2step), 3つ (3step) と定義し、その回転の発見個数を数えあげた。その結果、混合する  $\beta_{his}$  モノマーの比を少なくすればするほど、1xE190D では1 step、2xE190D では2 step するものが増えていた。9.2.2節にて述べたように、この混合比を減らすことにより増えている特性こそが、それぞれのハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の特性を示していると決定することができる。その、より詳細な回転特性の解析は次章以降にて述べる。

### 9.3.4 0xE190D、3xE190D の特性

コントロールとしてハイブリッド作製法を適用して作製した 0xE190D と 3xE190D について、回転解析を行った。

0xE190D については、今回の直径 0.2  $\mu$ m の2個ビーズを用いた回転観察の結果では、すべての分子が連続的に回転しており、なんらかの回転への影響を観察することは出来なかった。

また、3x $\beta$ E190D は全て 1 回転に 3 ステップしており、その回転ステップの解析を行い待ち時間のヒストグラムをプロットしたところ、図 23c と同様の山型のピークが現われ (data not shown)、2 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.63 式) でフィッティングすることにより二つの時定数が、 $350 \pm 6.4$  ms と、 $14.7 \pm 0.8$  ms と求まった。これらの値は、ハイブリッド  $F_1$ -ATPase 作製法を適用していない  $\beta$ E190D 変異体  $F_1$ -ATPase の値 ( $321 \pm 22$  ms,  $19.9 \pm 0.1$  ms) [18] とほぼ同じであった。

これらの結果は、今回用いたハイブリッド  $F_1$ -ATPase の作製手法において、 $\beta$ E190D を用いた変異体を導入することによる回転解析では、アーティファクトによる悪影響が現われていないことを意味している。すなわち、今回新たに開発したハイブリッド作製法を用いて、 $\beta$ E190D を導入した変異の解析が可能であることが示された。

# 第10章 $\beta$ E190Dを導入したハイブリッド $F_1$ -ATPaseの回転観察

## 10.1 高濃度 ATP 存在下での 1xE190D の回転観察

高濃度 ATP 存在下 ( $[ATP]=10$  mM) において、1xE190D の回転を観察した。第9章では、導入する  $\beta$ (E190D) モノマーの混合比を減らすにしたがって、より多くの分子が1回転に1ステップする回転を示しており、これが 1xE190D の回転であると結論した。しかし、回転プローブとして直径  $0.2 \mu\text{m}$  と小さめの2個ビーズを用いることにより負荷の影響を減らし、1秒間に1000フレームという高速カメラを用いて回転を観察したところ、長い停止 (long dwell) の約  $120^\circ$  後に、短い停止 (Short dwell) を持つ偏った2ステップをする回転をしていることが明らかになった (図 26a)。

観察された10分子について、これらの停止の待ち時間を、それぞれについて計測し、そのヒストグラムをプロットしたものを図 26b に示した。それぞれのヒストグラムは1次の指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.64 式) でフィッティングを行うことができ、長い方の待ち時間 (L) の時定数は、 $287 \pm 8.1$  ms、短い方の待ち時間 (S) の時定数は、 $22.8 \pm 0.34$  ms と求められた。

この二つの時定数は、 $\beta$ E190D 変異体で見られた二つの時定数 (約 300 ms と約 20 ms) に近い値となっている。1xE190D の二つ待ち時間の時定数が、 $\beta$ E190D 変異体の二つの時定数のそれぞれと対応していると考えられる。すなわち、ATP 結合の影響が観察されないような高濃度 ATP 存在下において観察されているこの待ち時間は、 $40^\circ$  サブステップの前の待ち時間に相当し、1つだけ導入した変異  $\beta$  サブユニットでの二つの素反応の影響が、2個所の  $120^\circ$  回転での  $40^\circ$  サブステップで現れていることを示唆している。もしも、1つの変異  $\beta$  サブユニットにおいて、同時に二つの反応が起きることにより回転を引きおこすと考えるならば、1つだけ  $\beta$ E190D を導入した 1xE190D では、二つの長い時定数 (約 300 ms と

約 20 ms) を持つ 1 つのステップが観察されると予想される。

しかし、この結果からは、2 個所別々の 120° 回転においてひとつづつの長い時定数が観察されていた。1 つの待ち時間では二つの反応 (野生型では 1 ms と 1 ms、 $\beta$ E190D では 300 ms と 20 ms) が起きた後に、40° サブステップが引きおこされると考えられている。1xE190D の回転においては、1 回の 40° サブステップにおいて、2 つの反応が別々の  $\beta$  サブユニットで起こっていると考えると、実際には、長い時定数の待ち時間は  $\beta$ E190D 由来の 300 ms と野生型  $\beta$  由来の 1 ms、また、短い時定数の待ち時間は野生型  $\beta$  由来の 1 ms と  $\beta$ E190D 由来の 20 ms が観測されると期待される。しかし、今回の実験条件では、回転観察プローブとして直径 0.2  $\mu$ m の 2 個ビーズを用いるという比較的小さいながらも多少負荷のかかる条件であるため、1 ステップを行うのに数 ms かかる条件であり、 $\sim$ 1 ms の待ち時間を正確に計測することは困難であった。そのため、解析結果には 1 ms オーダーの定量的な数値が現れないだけで、実際には 1 ms の時定数が存在していると考えられる。それにより、2 つの時定数を持つ指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.63 式) に於いて、片方の時定数が非常に小さい場合に、1 つの時定数を持つ指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.64 式) と見分けがつかなくなることを反映していると考えられる。

また、短い停止は、長い停止の約 120° 後で起っていると述べたが、それが正確に 120° 後で起っていると特定することは非常に難しい。3 点で均等にステップする回転ならば、その 3 点の重心を取ることでより回転中心を求めることが出来る。しかし、今回の 1xE190D のような 1 回転中に長いステップと短いステップを持つ偏った回転ステップでは回転中心を正確に求めることが難しくなっている。今回は、回転プローブとして、少々負荷のかかる 0.2  $\mu$ m の 2 個ビーズを用い、画像の取り込みを 1000 フレーム/sec と早く行うことにより、負荷の影響により回転の軌跡を丸くし、その円軌道から中心位置を求めている。しかしその結果、時間分解能が下ってしまうというジレンマが生じている。

## 10.2 高濃度 ATP 存在下での 2xE190D の回転観察

高濃度 ATP 存在下において、2xE190D の回転観察を行った。その結果、1 回転中に 120° おきに、2 つの長い停止と、1 つの短い停止を持つ偏ったステップ回転が観察された (図 26a)。

観察された 7 分子について、それぞれの停止の待ち時間を計測して、ヒストグラムとして示した (図 26b-d)。その結果、短い待ち時間 (Short dwell) と、その  $120^\circ$  後に起きる長い待ち時間 (Long1 dwell) は、1 次の指数関数式 (付録 C.4 節; C.64 式) でフィッティングでき、時定数はそれぞれ、 $12.7 \pm 0.3$  ms (Short) および  $397 \pm 12.1$  ms (Long1) であった。また、もうひとつの長い停止 (Long2 dwell) の待ち時間は 2 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.63 式) でフィッティングでき、その 2 つの時定数は、 $400 \pm 18.2$  ms と  $10.1 \pm 1.9$  ms と求められた。

これらの結果は、Short dwell は野生型  $\beta$  の 1 ms と  $\beta$ E190D の 20 ms、Long1 dwell は  $\beta$ E190D の 300 ms と野生型  $\beta$  の 1 ms、Long2 dwell は  $\beta$ E190D の 300 ms と  $\beta$ E190D の 20 ms の反応による停止にそれぞれ対応していると考えられる (図 30b)。すなわち、1 つの  $40^\circ$  サブステップが 2 つ別々の  $\beta$  サブユニットによる反応によって起きているという、 $1x$ E190D から得られた結論と一致していることが示された。

## 10.3 ATP 濃度依存的な $1x$ E190D の回転観察

### 10.3.1 溶液交換による ATP 濃度交換

前節までで観察したステップは、ATP の結合速度が飽和する条件であることから、ATP 結合の  $80^\circ$  ステップではなく、 $40^\circ$  のサブステップに対応するものであった。今度は  $80^\circ$  の結合ステップとの対応をつけるために、ここでは低濃度 ATP 存在下での  $1x$ E190D の回転観察を行った。まずは、ATP 濃度依存的な回転ステップを観察するために、溶液交換により ATP 濃度を変えながら、回転観察を行った。 $\beta$ E190D の  $k_{on}$  は約  $3 \times 10^6$   $M^{-1}s^{-1}$  と野生型の約  $1/10$  であることが解っている [18]。そのため、 $[ATP] \approx 2 \mu M$  の条件ならば、第 II 部での FEFE 変異体を用いたハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転観察と同様に、野生型由来の ATP 結合ステップは観察されないが、 $\beta$ E190D 由来の結合ステップが 1 回転中に 1ヶ所観察されると期待される。

実際に同一分子を観察しながら、溶液交換により ATP を変えて回転観察を行った結果の角度分布のヒストグラムを図 28 に示した。その結果、ATP 濃度を下げるにしたがって、短い停止 (Short dwell) 位置の約  $40^\circ$  後ろに第 3 の停止が現れているのが観察された。ATP 濃



度依存的に現れるこの停止が、1つだけ導入された  $\beta$ E190D への ATP の結合ステップであると思われる。ちなみに、 $[\text{ATP}] = 0.2 \mu\text{M}$  では、野生型  $\beta$  サブユニットへの ATP 結合由来の停止が、 $\beta$ E190D 由来の結合の停止と  $120^\circ$  おきに微妙に観察されている。

しかし、ここで観察された ATP 結合の停止の待ち時間は溶液交換により流した ATP 濃度から期待される値よりも短いものであった。 $\beta$ E190D 変異体の  $k_{on}$  は約  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であることから、 $[\text{ATP}] = 2 \mu\text{M}$  での待ち時間の時定数は約 167 ms であり、Long dwell の約半分、 $[\text{ATP}] = 0.2 \mu\text{M}$  ではさらにその 10 倍の長さの ATP 結合の待ち時間が現れるはずであるが、実際にはかなり短いものであった。このことは、 $\mu\text{M}$  以下の ATP 濃度では溶液交換により ATP 濃度を下げることが難しいことを反映していると思われる。そこで次節にて、正しい濃度での ATP 結合による停止を確認するために溶液交換を用いずに、低濃度 ATP 条件での回転観察を行った。

### 10.3.2 溶液交換を行わない低濃度 ATP 存在下での回転観察

$[\text{ATP}] = 2 \mu\text{M}$  と  $[\text{ATP}] = 200 \text{ nM}$  で、1xE190D の回転観察を行った。溶液交換を使わないことで、正確な ATP 結合の  $k_{on}$  を求めることが出来る。実際に回転観察を行った結果を図 29 に示した。

$[\text{ATP}] = 2 \mu\text{M}$  での回転観察では、約  $160^\circ$  間隔の二つの停止のピークが観察された (図 29a,b)。前者の停止の待ち時間についてヒストグラムを取ると 1 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.64 式) でフィッティングができ、その時定数は  $415 \pm 13.1 \text{ ms}$  であった。これが Long dwell に相当すると考えられる。その  $160^\circ$  後ろの停止も 1 次の指数関数式 (付録 C.4.1 節; C.55 式) でフィッティングでき、その時定数は、 $167 \pm 5.1 \text{ ms}$  であった (図 29c)。この停止は Long dwell の約  $160^\circ$  後ろにあることから、 $\beta$ E190D への ATP 結合のステップに相当すると思われる、その時定数から  $k_{on} = 2.99 \pm 9.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められた。この値は  $\beta$ E190D 変異体の  $k_{on}$  の値とほぼ一致した。

$[\text{ATP}] = 200 \text{ nM}$  での回転観察では、1 回転中に特に長い停止を 1 つと、それより短いいくつかの停止をもつ回転が観察された (図 29d,e)。そのもっとも長い停止位置での待ち時間の時定数は  $3.71 \pm 0.33 \text{ s}$  であった (図 29)。この停止が  $\beta$ E190D への ATP 結合のステップに相当すると思われる、そこから、 $k_{on} = 1.35 \pm 0.12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められた。この値も  $\beta$ E190D

変異体の  $k_{on}$  の値と同程度の値であった。また、この条件では、 $\beta$ E190D への ATP 結合による長い停止の  $120^\circ$ 、 $240^\circ$  後に、Long dwell と同程度の長さを持つ野生型  $\beta$  サブユニットへの ATP の結合による停止も観察された。

これらの結果より、Long dwell の約  $160^\circ$  後 (Short dwell の約  $40^\circ$  後) で、 $\beta$ E190D 由来の結合ステップが起こることが示された。

# 第11章 考察 — 協同的な回転機構モデル

## 11.1 3つの $\beta$ サブユニットの働く協同的な回転機構

まず ATP 高濃度条件においてハイブリッド  $F_1$ -ATPase(1x $E190D$ ,2x $E190D$ ) の回転観察を行った。その結果、1つの $\beta$ サブユニットでの $40^\circ$ サブステップ前に起こる2つの反応が、2箇所別々の $120^\circ$ 回転で起こることを示した。

また、ATP 低濃度条件においてのハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転観察の結果、ATP 濃度依存的に長さの変化する停止が、Short dwell の約 $40^\circ$ 後ろ (Long dwell の約 $160^\circ$ 後) に存在し、その待ち時間の長さから求めた ATP 結合の時定数  $k_{on}$  が  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  のオーダーであり、 $\beta E190D$  のそれと一致することを示した。この結果から、1x $E190D$  に1つだけ導入された $\beta E190D$  サブユニット由来の ATP 結合のステップは、 $\beta E190D$  による短い停止の約 $40^\circ$ 後に存在することが明らかになった。

これらの結果を、 $\beta E190D$  サブユニットへと ATP が結合してからの1回転で考えてみる。そこで、 $K_m$  付近での1x $E190D$  の回転の様子を模式図として図 30a に示した。すると、まず $\beta E190D$  に ATP が結合して $80^\circ$ 回転し、次の $120^\circ$ 回転中の $40^\circ$ サブステップの手前で $\beta E190D$  変異由来の長い反応の停止が現れ、さらに次の $120^\circ$ 回転中で、 $\beta E190D$  変異由来の短い反応の停止が現れる結果となっている。すなわち、1つの $\beta E190D$  変異体サブユニットの影響が、3つ別々の $120^\circ$ 回転で起こっていると結論できる。また、 $V_{max}$  条件での2x $E190D$  の回転の様子の模式図を図 30b に示した。これにより、2つの導入された $\beta E190D$  サブユニットの影響が、3ヶ所の $40^\circ$ サブステップで現れることがわかる。

この結果を、1つの ATP 加水分解に相当する1つの $120^\circ$ 回転に注目してみる。すると、1つの $\beta$ サブユニットによる3つの素反応(結合、Long、Short)が、それぞれの $120^\circ$ 回転で起きていることから、1つの $120^\circ$ 回転の駆動には、3つそれぞれの $\beta$ サブユニットでの別々の働きが関わっていることが明らかになった。

この結果を元に回転モデルを構築したものを図 31a に示した。まず、ある  $\beta$  サブユニットに ATP が結合する。それにより、 $\gamma$  サブユニットは約  $80^\circ$  回転する。次に、別のサブユニットにおいて、例えば分子内での ATP の分解 ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ ) などに対応する 1 つ目の反応が起こり、引き続いて、さらに別の  $\beta$  サブユニットにおいて、2 つ目の素反応 (例えば反応産物の解離など) が起こり、 $\gamma$  サブユニットが残りの  $40^\circ$  回転をする。こうして、1 つの ATP を加水分解する間に、3 つの  $\beta$  サブユニットが、全て別々の働きをすることによって  $120^\circ$  回転するという協同的な回転モデルが示唆された。これはすなわち、Boyer の交代結合説より予想されていたモデルを、はじめて完全に証明したと言えるだろう。

## 11.2 それぞれの ATP 加水分解素反応の役割

本研究では、 $F_1$ -ATPase の 3 つの  $\beta$  サブユニットが全て違った役割を担い、協同的に加水分解を行うことにより回転駆動することを明らかにした。しかし、本研究においては、3 つの役割のうち ATP の結合を除いた 2 つ、すなわち、 $\beta E190D$  変異体において約 300 ms と約 20 ms の時定数を持つ反応に相当する二つの加水分解素反応が、具体的にはそれぞれどのような反応素過程に対応しているかについてはまったく明らかにしていない。さらに、その二つの反応のおこる順番についても、特定することは出来ていない。

しかし、これまでの他の研究において、様々な結果が提出されている。まず、この  $\beta E190D$  変異体  $F_1$ -ATPase については島袋らによって詳細なキャラクタライズがされており、ATP の分解がしにくくなるという ATP アナログである  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  を用いての回転観察の結果、二つの時定数の反応のうち約 300 ms に対応する反応 (L) が、ATP の分解 ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ ) に対応していると明らかにした [18]。

また西坂らは、蛍光性 ATP アナログを用いて ATP の結合とステップを同時に直接観察する手法により、一旦結合した ATP は、2 ステップ ( $240^\circ$  回転) の間結合しており、その後解離することを明らかにした [41]。この結果は、加水分解の終わった ADP の解離の反応が、2 つの素過程のうちの後半の反応 (短い停止) あるいは、その後で起きていることを示唆している。さらにこの結果は、回転の際にはヌクレオチドが 3 つ付いていることも示唆しており、3 つの  $\beta$  全てが働くという本研究の結果とあわせて、トライサイトモデルを証明す

る結果ともなっている。

これらの結果から、ATP の結合→ATP の分解→ADP の解離といった反応の流れが3つ別々の $\beta$ で起きていると予想することができる。しかし、ATP の加水分解反応の素過程としては、まだリン酸 (Pi) の解離が残っており、この反応がどこで起きるか、また、回転に関与しているかといったことを明らかにする必要がある。またそれ以外の反応の存在を否定することはできない。これらを明らかにすることが今後の F<sub>1</sub>-ATPase の回転機構の研究の課題となるだろう。

### 11.3 バイあるいはトライサイトモデルと ATP 超低濃度での回転機構

これまでの F<sub>1</sub>-ATPase の協同的な ATP 加水分解機構のモデルでは2つのヌクレオチドが結合しているというバイサイトモデルと [29–31] と、3つのヌクレオチドが結合するというトライサイトモデル [32–36] で議論が続いていると述べた。しかし、バイサイトモードでの回転機構を仮定すると、そのモデルは図 31b のように予想される。このモデルでは1つの $\beta$ サブユニットの影響が2つ同時に起きることになっており、実際の 1xE190D の回転では、1回転中に、2つの時定数を持つ1つの停止が観察されると期待される。すなわち、このモデルは結果と矛盾しており、バイサイトモデルでは、結果を説明することが出来ないことが明らかになった。つまり、本研究によって、我々の観測している F<sub>1</sub>-ATPase の回転が3つの $\beta$ サブユニットの働きすなわちトライサイトモードで回転していることは明らかに証明されたといえるだろう。

しかし、ATP 濃度が  $\approx$ nM オーダーに於いても回転が観察され [42]、そのような低濃度 ATP では、2個ヌクレオチドが結合する濃度よりもかなり低いことから、このような極 ATP 低濃度域ではバイサイトでも回転しているのではないかと考える向き [31] もある。今回、[ATP] = 200 nM での回転観察を行うことにより、その ATP 濃度まで同様の回転機構であることは確認した。すなわち、[ATP] = 200 nM まではトライサイトモードで回転を行っていると言えるだろう。しかし、 $\beta$ E190D 変異体を用いた場合には、ATP 結合が遅いためにそれ以下の ATP 濃度での回転観察は困難であった。

そこで、それ以下ではどのように回転しているのか、既知のパラメーターを基にして理論計算により見積りを行い、その詳細な理論解析を付録 C.3 節にて述べた。その結果、ATP 濃度が 2 つ目の ATP の解離定数である  $K_{d2}$  より小さくなると、すなわち、約 5 nM 付近においてバイサイトとトライサイトの閾値が現れていた。ただし、その閾値は既知のパラメータの測定精度から、ある程度の誤差があることが予想できる。すなわち、 $[ATP] \approx \text{nM}$  オーダーで観察されている回転をトライサイトモードで説明することは十分可能であると言える。

当然、その閾値以下の ATP 濃度条件ならば、ほとんどの分子はバイサイトモードであり、その条件下において  $\gamma$  サブユニットが回転する可能性を否定することは出来ない。ただしこの現象は、ごく一瞬の過渡的な、あるいは、超低 ATP 濃度でのみ起こりうる非常に特殊な状態であると言えるだろう。

## 第12章 第III部のまとめ

- 加水分解反応の2つの素過程を遅くする変異である  $\beta$ E190D を導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase (1xE190D, 2xE190D) を作製した。
- 1xE190D は1回転中に長い停止と短い停止が観察され、それぞれの時定数は、3xE190D の2つの加水分解素反応の時定数と対応していた。
- 2xE190D は1回転中に1つの短い停止と2つの長い停止を持ち、うち1つは2つの時定数から成っていた。
- 変異  $\beta$ E190D サブユニットへの ATP の結合ステップは、短い停止の約  $40^\circ$  後ろで起きていた。
- 以上の結果より、3つの  $\beta$  サブユニットでの ATP 加水分解反応の素過程が順番に交代で働くことにより1つの ATP 加水分解に対応する  $120^\circ$  ステップ回転をするという3つの触媒部位全てが協力して働く、**トライサイトモードでの協同的な回転機構の存在をはじめて証明した。**

## 第IV部

様々な条件および変異体を用いた  
さらなる回転機構の解析





## 第13章 はじめに

第III部では、 $F_1$ -ATPaseが3つの $\beta$ サブユニットが協同して、順番に交代で機能することによりステップ回転を引き起こすという協同的な回転機構の存在を証明した。しかし、それぞれの反応ステップが実際にどんな加水分解素反応に対応しているのかについては、まだ謎が残されている。そこで今後は、これらの素反応の具体的な役割を明らかにする事が $F_1$ -ATPaseの回転機構研究の主たる目的となる。

この第IV部では、この問題を明らかにするべく、2つの側面から研究を行った結果を報告する。1つには、第III部で用いたハイブリッド $F_1$ -ATPase(1xE190D)の回転観察を、さらに様々な溶液条件で行うことにより、それぞれの律速段階がどのような反応によるものかについて考察しようと試みた(第14章)。一方で、こんどは導入する変異体を変化させ、様々な触媒部位変異体を利用して第III部同様の回転機構解析を行うことにより、触媒部位においてATPと相互作用を行う様々な残基の働きが、どのような回転機構での素反応に影響を及ぼすかを同定しようと試みた(第15章)。

これらの研究結果から、各素反応の役割について、様々な新たな可能性が示唆された。しかしまた、実験を行ってはみたもののいまのところ解釈のつかない結果も得られている。このように、この第IV部で行った研究結果は、現時点ではまだ非常に予備的なものである。すなわち、 $F_1$ -ATPaseの回転におけるそれぞれの素反応がどのような役割に対応しているかについての明確な答は未だ得ることが出来ていない。

この第IV部に記す予備的な研究成果が、今後の $F_1$ -ATPaseの回転機構の研究についての礎になれば幸いである。

# 第14章 様々な条件下での1xE190Dの 回転

## 14.1 溶液交換実験

1分子の1xE190Dについて様々な溶液条件へと溶液交換を行い、それぞれの条件が回転ステップや停止時間にどのような影響を及ぼすのか、その観察を行った。その一連の回転観察の結果を、様々な溶液条件下での回転の角度分布として図32に示した。各条件においての回転速度と、また、その回転ステップの長い停止 (Long dwell) と短い停止 (Short dwell) についてそれぞれ時間分布のヒストグラム解析をとり、待ち時間の時定数を算出した結果も示した。ただし、この分子は負荷の影響が小さいわりにふらつきが大きかったので、 $40^\circ$ 以下のステップのずれを見極めることは困難であり、待ち時間を数える時に、 $40^\circ$ 以下のずれは区別せずに両方をまとめて1つの待ち時間として計測した。そして待ち時間の時間分布については、1次と2次の指数関数式(付録C.4.2節;C.63式及びC.64式)の両方でフィッティングを行い、より合う方の値だけを示した。溶液交換による各回転観察結果の溶液条件と、その結果を以下に述べる。

**(A) 再生系なし** ATP再生系を入れない条件で、回転観察を行った ( $[ATP]=10\text{ mM}$ )。長い停止のピークの $120^\circ$ 後に、短い停止のピークが見える。しかしそのピークの後側がなだらかに延びていた。その短い停止の待ち時間が $12\text{ ms}$ と $22\text{ ms}$ の二つの時定数を持つことから、短い停止の後側になんらかの停止の存在が予想される。

**(B) 2 mM ADP** (A)の溶液に、 $2\text{ mM ADP}$ を加えて溶液交換を行った。短い停止の後側の停止が明らかに延びている。その時定数は $11\text{ ms}$ と $76\text{ ms}$ であった。

**(C) 10 mM ADP** 更にADPを増やし、ATPと等量のADP濃度条件にした。短い停止については(B)とあまりかわらないが、長い停止の後側にも停止が現れていた。ADP

の影響が  $\beta_{E190D}$  サブユニットでは既に飽和しており、野生型  $\beta$  サブユニットにも影響しはじめているのかもしれない。

**(D) 100 mM リン酸** 10 mM ATP に加えて、100 mM のリン酸を加えた溶液を流した。長い停止の時定数が 407 ms と長めになっている。ただし、回転観察の結果からは、約 300 ms の時定数の停止はそのままであり、加えてたまに長い停止が増えているようであった。相対的に短い停止のピークが小さく見えている。

**(E) 500 mM リン酸** リン酸濃度を 500 mM へとさらに増やしたところ、さらに長い停止での長めの停止の長さが長くなっていた。時定数は (D) よりも短くなっているが、(D) よりもより長めの長い停止が多いため、相対的に時定数への影響が減っていると考えられる。

**(F) 再生系有り** 再生系を加えた 10 mM ATP の溶液を二度流した。1 回目では回転速度が徐々に早くなっていった (not shown) ので、再度溶液交換をした。綺麗に 120° 毎に山が 3 つ見え、 $\beta_{wild}$  のはずの位置で step が見えてしまっている。この結果は、溶液交換をしすぎたせいでガラス板の疎水面との相互作用により  $\beta$  サブユニットが微妙に変性してしまった事を示しているのかもしれない。このような妙に長い時定数を持つサンプルは、たまに観察されることがある。

**(G) ATP 低濃度** ATP 無しの溶液を 3 回流した。元が  $[ATP]=10$  mM なので、なかなか ATP 濃度が減らず、値を正確に求めても意味がないので結合の待ち時間については時定数を求めていないが、大体  $K_m$  付近である  $[ATP]=2$   $\mu$ M あたりの形に近い。活性すなわち回転数もちょうど半分になっている。

高濃度のリン酸には、長い停止 (Long dwell) の位置でのさらに長い停止を増やす効果があるようである。このさらに長い停止は、inhibited form と同じ位置 [25] であることから、 $\alpha$  サブユニットへの ATP の結合阻害などにより、inhibited form 状態が現れてきたとも考えられる。しかし、高濃度のリン酸を加えているために、塩強度の変化などの他のパラメータによる影響の結果である可能性も考えられる。

また、再生系なし (A) あるいは ADP を加えた回転観察 (B,C) の結果から、短い待ち時間 (Short dwell) あるいはその 40° 後になんらかの外液の ADP 濃度に依存したイベントが

起きていると予想された。

## 14.2 再生系なしでの回転観察

再生系を加えない条件において、より詳細に 1xE190D の回転観察を行い、ある 1 分子についてのその結果を図 33 に示した。

この分子は、特にステップが綺麗に観察されていたので、なんとか  $240^\circ$  に存在する短い停止 (Short) とその約  $40^\circ$  後の ?step を見分けて待ち時間の解析を行うことが出来た (図 33A)。その結果、それぞれが 1 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節; C.64 式) でフィッティングでき (図 33B-D)、それぞれ、Short の時定数が 22ms と ? の時定数が 18ms となった (ちなみに Long は 285ms)。前者が短い停止 (Short dwell) に相当するとすれば、**再生系無しで現れる停止状態はそれとは別のなにかに相当すると思われる。**

このステップは、(1) $280^\circ$  (Short dwell の  $40^\circ$  後に相当) の結合ステップでの ATP 結合に対する ADP による競争阻害かもしれないし、(2) 少し進んだ  $260^\circ$  (Short dwell の  $20^\circ$  後) 付近での第 3 のステップかもしれないし、(3) $240^\circ$  (Short dwell) と  $280^\circ$  (結合 dwell) の間をいつたり来たりしてるものかもしれない。回転ステップをこまかく観察すると、(1)~(3) のどれもが観察されていたが、長い停止 120 度後の短い停止の後で、その  $40^\circ$  度後ろまでをいつたりきたりしているもの (3) が目立つ気がした。

ともあれ、現在用いている回転観察系の時間・空間 (角度) 分解能では、ADP の存在の影響によるこの停止状態が (1)~(3) のどれに相当するかを判別するのは難しい。よって、この停止の意味を明らかにするには、さらなる高時間かつ高空間 (角度) 分解能を持つ測定系が必要となるだろう。

## 14.3 ATPase 阻害試薬 : BDM

### 14.3.1 背景

BDM は 2,3-Butanedione 2-monoxime の略で、商品名では Diacetyl monoxime などと呼ばれる 100 Da 程度の小さい化合物である。筋肉組織には古くから阻害効果があることが

知られており、そこではミオシン II の ATPase に特異的に作用していて、ATP の  $\gamma$  位のリン酸に求核攻撃することで ADP・Pi 状態を安定化し、結果として Pi リリースを遅くしていると言われている [43]。また、上村らは、ミオシン V に対しての BDM の影響を 1 分子で見えており、ミオシン V のサブステップが BDM の影響により延びる事が観察された [44]。そこで、この試薬が F<sub>1</sub>-ATPase ではどのように効くのか、試してみた。

### 14.3.2 溶液系での活性への影響

まず野生型 F<sub>1</sub>-ATPase でさまざまな BDM 濃度において [ATP]=2 mM での活性測定を行った結果を図 34a に示した。initial 活性が活性化したりしている。活性化してるとはいえ、実際の回転観察から得られる活性 (金粒子による負荷があっても 400 s<sup>-1</sup> 弱、時定数から換算すると 500 s<sup>-1</sup> 弱 [17]) よりはだいぶ低いので、inhibited form への影響 (付録 C.1 節参照) も見ている可能性が考えられる。ただし、BDM は、ADP・Pi 状態を安定化するために、ATP から ADP・Pi への反応は促進するという説<sup>1</sup>もありその影響で少々活性化する可能性もある。その場合には、以下で述べる他の変異体と野生型とでは、違う反応が律速段階になっていると考えることができる。

以上のように、野生型 F<sub>1</sub>-ATPase を用いた活性測定では、inhibited form の影響などもあり、何を見ているのかわからなくなってしまっている。そこで、ほとんど inhibited form に落ちないことが知られているいくつかの変異体 (GT 変異体<sup>2</sup>、 $\beta$ E190D 変異体、FEFE 変異体)F<sub>1</sub>-ATPase の活性を調べた。[ATP]=2 mM の時の活性を BDM 濃度を変化させながら測定し、[BDM]=0 mM の時を 1 とした相対活性を図 34b に示した。

結果、これらの変異体では、BDM が活性を可逆的に阻害するのが確認できた。ちなみに、[BDM]=0 mM での絶対活性は、 $\beta$ E190D 変異体が 2.8 s<sup>-1</sup>、FEFE 変異体が 69 s<sup>-1</sup>、GT 変異体が 37 s<sup>-1</sup> <sup>3</sup>であった。BDM は DMSO に溶かした 8 M の溶液として加えているので、DMSO だけを入れたときの相対活性もコントロールとして (-BDM) に示した。DMSO の影響でも微妙ながら不活性化していた。[BDM]=200 mM までしか測れてないのは、BDM は

<sup>1</sup>Higuchi's personal communications

<sup>2</sup>この変異体は影響を最小限にすることを目的として宗行らによって作製された変異体であり、文献 [41] でも用いられている。

<sup>3</sup>GT 変異体の活性が低いのは、これだけ回転観察用にストックしてあったサンプルを用いたためである。

340 nm に吸収を持つので分光器での NADH の吸収測定系ではあまり大量に入れられないためである。

結論として、どの変異体も半分の活性になるのに大体 [BDM]=100 mM ぐらいで、同じ特性を示した。ミオシン II では 20 mM[43]、ミオシン V では約 80 mM[44] なので F<sub>1</sub>-ATPase には少々効きが弱いが、やはり ATPase 全般に効く試薬であると予想される。

### 14.3.3 1xE190D の回転への影響

BDM がどの素反応へと効いてくるのか調べるために、1xE190D の回転への影響を観察した。その結果を図 35 に示した。

図 35A では BDM 濃度を 0 mM から 100 mM へ、また、図 35B では BDM 濃度を 100 mM から 0 mM へ溶液交換を行いながら回転観察を行った結果を示している。その結果、[BDM] 濃度に応じて長い停止 (Long dwell) の時定数が、それぞれ 499 ms → 1.4 s、420 ms → 350 ms へと変化していた。本来なら、[BDM]=0 mM のとき、および、100 mM のときの回転の各時定数は A と B の測定で同じになると予想されるが、差が生じている。これは、それぞれの数値が各々 1 分子での値であり、実際の測定では分子毎の時定数に大きな偏差 (5.1.3 節脚注参照) が見られることを反映していると思われる。また、そのために、短い停止 (Short dwell) に関してはさらに分子毎の時定数の分布が激しいため、2 倍や 3 倍の変化では違いを同定するのが困難であったが、溶液系での活性の低下に影響するような停止の伸びは観察されなかった。

結論として、溶液系での活性測定で E190D 変異体の活性が BDM 濃度が 100 mM で 2 倍に伸びているということから予想できるように、BDM の影響により律速段階である長い停止 (Long dwell) が伸びる結果となっていた。

### 14.3.4 考察

BDM の ATPase への作用機構については、ミオシン V では ADP のリリースに影響しているとの説 [45] もあり、議論が続いている。今回の 1xE190D を用いた回転観察では、長い停止を延ばす結果となっていた。この長い停止は分子内での ATP の分解 (ATP → ADP·Pi)

に対応しているとの結果 [18] と対応させると、BDM は  $F_1$ -ATPase に関してはこの ATP 分解の素反応に対して効く試薬であるということが言えるだろう。



# 第15章 様々な触媒部位変異体の特性

## 15.1 $\beta$ R191K 変異体

### 15.1.1 目的

$\beta$ サブユニットのR191残基は、図36に示すとおり、牛心筋ミトコンドリアのF<sub>1</sub>-ATPaseのX線結晶構造[12]から、触媒部位において $\beta$ サブユニットに結合したATPの $\gamma$ リン酸と相互作用していることがわかった。また、大腸菌においてこの残基に相当する $\beta$ R182残基の変異体F<sub>1</sub>-ATPase ( $\beta$ R181Q,  $\beta$ R181K)について、Nadanacivaらによって溶液系でのキャラクタライズが行われており、そこでもATPの $\gamma$ リン酸と相互作用しているとの結果が示唆された[46]。彼等はまた、このアルギニン残基をリジンに変えた大腸菌の $\beta$ R181K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseは、野生型の大腸菌F<sub>1</sub>-ATPaseの約0.5%の活性であることも明らかにした。

このような低い活性を持つ変異体ならば、回転観察においてその影響を観察することが可能となる。そこで、その変異体のハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseを作製して回転観察を行うことにより、 $\gamma$ リン酸基へと相互作用する残基の、協同的な回転機構での役割がわかるかもしれないと期待して、好熱菌のF<sub>1</sub>-ATPaseに同様の変異( $\beta$ R191K変異)を導入したものを作製し、回転観察を試みた。

### 15.1.2 $\beta$ R191K 変異体の活性測定

$\beta$ R191K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの活性測定を行った。その活性のタイムコースには、初期にかすかなラグがあるが、最初の活性の高い状態(initial活性)から徐々に活性が下がり、LDAOで活性化をした。 $\beta$ E190Dと違い、inhibited formに良く落ちていると考えられる。initial活性は、 $V_{max} = 1.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 9.5 \text{ }\mu\text{M}$ 、であった。steady活性は $V_{max} = 0.82 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m$

= 14.2  $\mu\text{M}$ 、LDAO 活性では  $V_{max} = 2.0 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 4.6 \mu\text{M}$  であった。

### 15.1.3 $\beta\text{R191K}$ 変異体の回転観察

ATP 高濃度 (10 mM) で  $\beta\text{R191K}$  変異体  $\text{F}_1\text{-ATPase}$  の回転観察を行った。その結果、1 回転に 3 ステップする回転が観察できた (図 37A)。このステップの待ち時間のヒストグラムを取ると、2 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節;C.63 式) でフィッティングができ、2 つの時定数はそれぞれ、542 ms と 19.6 ms と求められた (図 37A inset)。また溶液交換で ATP 濃度を下げて回転観察を行うことにより、この停止が  $40^\circ$  サブステップの前の待ち時間に相当することもたしかめた (data not shown)。

### 15.1.4 1xR191K ハイブリッド $\text{F}_1\text{-ATPase}$ の回転観察

$\beta\text{R191K}$  サブユニットを 1 つだけ導入したハイブリッド  $\text{F}_1\text{-ATPase}$  である 1XR191K の回転観察を行った。その結果、 $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$  の条件で、1 回転中に長い停止と短い停止を持つ回転が観察された (図 37B)。それぞれの待ち時間は、1 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節;C.64 式) でフィッティングでき、それぞれの時定数は 793 ms(Long) と 17.3 ms(Short) であった (図 37B inset)。また、ATP 結合のステップも、1xE190D 同様に、長い待ち時間の約  $160^\circ$  後にあった (data not shown)。

### 15.1.5 結論と考察

1xR191K は、1xE190D と比べて長い停止の時定数が長めではあったが、特性としてはほとんど変わらないものであった。この結果は、 $\beta\text{R191}$  残基が、回転機構での役割としては  $\beta\text{E190}$  残基とほぼ同様に、主に ATP の分解 ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ ) に関わっていると考えられる。

一方で、この変異体  $\beta\text{R191K}$  では、 $\beta\text{E190D}$  と違って、数分に及ぶ inhibited form の影響による停止がよく観察された。また、1xR191K においても、変異の影響による長い停止と短い停止に加えて inhibited form の影響によるさらに長い停止が観察されたことから、こ

これらの長い停止や短い停止が、変異の影響によりとても短くなった inhibited from の影響ではなく、回転機構での本質的な反応速度の低下による停止であることが明らかになった。

## 15.2 $\beta$ R256H 変異体

### 15.2.1 背景

$\beta$ サブユニットの256番目の Arg 残基も、牛心筋ミトコンドリア  $F_1$ -ATPase の X 線結晶構造 [12] から、 $\beta$ E190 残基と同様に、 $\beta$ サブユニットの触媒部位上で、ATP の加水分解に利用される水分子と相互作用していることが予想された (図 36)。また Allison らによると、この残基を His に変えた  $\beta$ R256H 変異体  $F_1$ -ATPase は、加水分解活性が  $17 \text{ s}^{-1}$  と低下すると報告された<sup>1</sup>。

そこでこの  $\beta$ R256H 変異体についても回転観察を通じて、キャラクタライズを行った。

### 15.2.2 $\beta$ R256H 変異体 $F_1$ -ATPase の活性測定

$\beta$ R256H 変異体の活性測定を行った。そのタイムコースには、FEFE 変異体 (第3章) と同様な ATP 濃度に依存した初期不活性状態によるラグを持ち、LDAO によって不活性化をした。steady 活性は、 $V_{max}=14.7 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m=38.0 \mu\text{M}$  であった。

### 15.2.3 $\beta$ R256H 変異体 $F_1$ -ATPase の回転観察

$\beta$ R256H 変異体  $F_1$ -ATPase の回転観察を行った。ATP 高濃度 (10 mM) では4回転/秒ほどで3ステップする早い回転が観察され、その待ち時間の解析から2つの時定数が70 ms と4.2 ms と求められた (図 38A)。また、 $[\text{ATP}]=20 \mu\text{M}$  で回転観察を行ったところ、ATP 高濃度 (10 mM) と同様に早い回転 (4回転/秒) が観察された。この結果は、活性測定から求めた  $K_m=38 \mu\text{M}$  から予想される結果 (サブステップより2倍長い ATP の結合待ちのステップが観察される) と一致せず、なんらかの不活性状態が予想される。また、それ以下で

---

<sup>1</sup>allison's personal communications

の ATP 濃度では回転発見頻度が著しく低下し、回転を見つけることができなかった。

#### 15.2.4 1xR256H ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の回転観察

1xR256H も作製し、回転観察を行った。その結果、1 回転に 1 ステップする回転が観察された (図 38B)。その時定数は 42 ms ほどであったが、短い時定数に相当する停止については、停止の待ち時間が短かすぎて計測不能であった。

#### 15.2.5 結論と考察

1xR256H については、ATP の結合の停止との関係についても観察されておらず、このハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase がどのような特性を持つかを知るには、さらに高分解能な回転観察系が必要であると思われる。

ただし  $\beta$ R256H 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase は、活性に ATP 濃度依存的なラグを持ち、低 ATP 濃度で低い回転発見確率となることから、FEFE 変異同様に 2 つ目の ATP の結合が遅くなる変異体であると予想される。この 2 つ目の ATP の結合定数と回転発見頻度の関係については、付録 C.3 節にて詳細に議論している。

### 15.3 $\beta$ E201V 変異体

#### 15.3.1 背景

$\beta$ E201 残基の側鎖は、X 線結晶構造 [12] で得られているヌクレオチドの結合していない  $\beta$  サブユニットの構造 (OPEN 構造) において T165 (CLOSE 構造で Mg<sup>2+</sup> に配位する) 残基と水素結合を形成する。すなわち、OPEN 構造の安定化に寄与していると予想されている [33]。その水素結合を形成できなくした E201V 変異体は活性も 2 s<sup>-1</sup> と低い [33] ので、CLOSE 構造から OPEN 構造への変化での影響 (即ち Short dwell の後におこるイベント) が回転でも見れるのではないかと期待される。

そこで  $\beta$ E201V 変異体 F<sub>1</sub>-ATPase を作製し、簡単なキャラクタライズを行った。

### 15.3.2 活性測定

$\beta$ E201V 変異体  $F_1$ -ATPase のタイムコースは、初期活性に一瞬だけ initial burst のようなもの見えるが、ほとんど直線となっており、LDAO で活性化をした (図 39A)。かなり inhibited form に陥っていると思われる。Steady 活性は  $V_{max}=1 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 582 \mu\text{M}$  であり、+LDAO での活性は  $V_{max}=4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 276 \mu\text{M}$  であった。

Ren らによると [33]、 $V_{max}=2 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{noncat}= 200 \mu\text{M}$ ,  $K_{m3}=4 \mu\text{M}$  であり、活性測定条件の違い (こちらは  $25^\circ\text{C}$ , pH7 なのに対して、Ren らは  $30^\circ\text{C}$ , pH8) を考えるとほぼ同じであり、今回測定した  $K_m$  は Ren らによると  $\alpha$  サブユニットの非触媒部位 (noncat) への ATP 結合による inhibited form への影響を見ていると思われる。

### 15.3.3 回転観察

ATP 高濃度 (10 mM) で、 $\phi=0.2 \mu\text{m}$  のビーズを用いて回転観察を行った。その結果、回転を 10 分子ほど観察したが、すべての回転は連続的には数秒~十数秒しかもたず、その短い回転中では非常に早い回転速度 (10~18 回転/s) であった (図 39B)。この回転速度は  $0.2 \mu\text{m}$  のビーズが 2 コ横に並んだものの回転としては野生型の  $F_1$ -ATPase とほぼ同じであり、その間ではステップもほとんど観察できなかった。

### 15.3.4 結論

結局、この  $\beta$ E201V 変異体は、回転ステップの速度は早い (停止は短い) が、とても inhibited form に陥りやすく、その回復も早いという特色を持つ変異体であった。もちろん暗視野顕微鏡を用いた無負荷の回転観察系 [17] で観察を行えば微妙な違いは観察できる可能性はある。しかし、あっても数倍程度の差では、ハイブリッドにして回転観察を行っても、その違いを特定することは難しいと思われる。

## 15.4 $\alpha$ R364K 変異体

### 15.4.1 目的

$F_1$ -ATPase の ATP 加水分解の触媒部位では、 $\beta$  サブユニットの残基のみならず、 $\alpha$  サブユニットの残基も関わっていることが牛心筋ミトコンドリアの  $F_1$ -ATPase の X 線結晶構造 [12] から明らかになっている (図 36)。

$\alpha$  サブユニットの 364 番目の残基であるアルギニンは、触媒部位において触媒部位に結合した ATP の  $\gamma$  リン酸と相互作用している。また、大腸菌においてこの残基に相当する  $\alpha$ R376 残基の変異体  $F_1$ -ATPase ( $\alpha$ R376C,  $\alpha$ R376Q,  $\alpha$ R376K) について、Nadanaciva らによって溶液系でのキャラクタライズが行われており、この残基が加水分解に必須の働きをする、いわゆる「アルギニンフィンガー」と呼ばれる働きをしているものと示唆されている [47]。彼等はまた、このアルギニン残基をリジンに変えた大腸菌の  $\alpha$ R376K 変異体  $F_1$ -ATPase は、野生型の大腸菌  $F_1$ -ATPase の約 0.1% と低い活性を持つことも明らかにした。また、Le らによっても同様に大腸菌由来の変異体  $\alpha$ R376K のキャラクタライズが行なわれた [48]。その結果も同様に野生型の 0.05% と低い活性を持つことが検出されたが、彼らはそれを、回転を伴わない、協同的な触媒反応の促進が行われないものと結論づけていた。

しかし、このような低い活性でも、もしそれが回転によるものならば、回転観察においてその影響を観察することが可能となると期待される。そこで、その変異体のハイブリッド  $F_1$ -ATPase を作製して回転観察を行うことにより、 $\gamma$  リン酸基へと相互作用する残基の、協同的な回転機構での役割がわかるかもしれないと期待して、好熱菌の  $F_1$ -ATPase に同様の変異 ( $\alpha$ R364K 変異) を導入したものを作製し、回転観察を試みた。

### 15.4.2 $\alpha$ R364K 変異体の活性測定

$\alpha$ R364K 変異体  $F_1$ -ATPase の活性測定を行った。その活性のタイムコースには、最初の活性の高い状態 (initial 活性) から急激に活性が下がり、LDAO で少々再活性化をした。 $\beta$ E190D と違い、非常に inhibited form に落ちやすい変異体であると考えられる。initial 活性は、 $V_{max} = 0.85 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 11.5 \text{ }\mu\text{M}$ 、であった。steady 活性は  $V_{max} = 0.047 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 4.0 \text{ }\mu\text{M}$ 、LDAO 活性では  $V_{max} = 0.18 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 9.42 \text{ }\mu\text{M}$  であった。

これらの結果は、inhibited form には陥っていないという Le らによる考察 [48] とは異なっている。しかしその違いは、Le らが、活性初期の initial 活性を詳細に見ていないことが原因と考えられる。

### 15.4.3 $\alpha$ R364K 変異体の回転観察

ATP 高濃度 (10 mM) で  $\alpha$ R364K 変異体  $F_1$ -ATPase の回転観察を行った。その結果、1 回転に 3 ステップする回転が観察できた (図 40A)。しかし、前節で調べたように、この変異体は steady 活性が initial 活性の 1/20 しかないという非常に ADP-inhibited form に落ちやすい変異体であるため、回転発見頻度が非常に低かった。そこで、回転発見頻度を上げるために、この変異体に限って  $\phi=0.35 \mu\text{m}$  のビーズを用い、KOH ガラス基板で回転観察を行ったにもかかわらず、わずか数例の回転分子しか観察ができなかった上に、どの分子もすぐに回転が停止してしまい、多くのステップ数を得ることが出来なかった。そのため、このステップの待ち時間のヒストグラムの解析するに足るデータ数を集めることが出来なかった。

### 15.4.4 $1x\alpha$ R364K ハイブリッド $F_1$ -ATPase の回転観察

$\alpha$ R364K サブユニットを 1 つだけ導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase である  $1x\alpha$ R364K を作製した。その活性は、initial 活性と +LDAO での活性が約  $20 \text{ s}^{-1}$ 、steady 活性が  $8 \text{ s}^{-1}$  と予想される値 ( $0.85 \text{ s}^{-1}$  の 3 倍) よりも比較的高くなっていた。この結果から、再構成時での野生型  $F_1$ -ATPase のコンタミネーションが予想される。しかし、その活性の特性から、 $\alpha$ R364K 変異体  $F_1$ -ATPase に比べて、1 つだけ導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase に再構成したところ、inhibited form にそれほど落ちにくくなっていることが解った。

そこで、その  $1x\alpha$ R364K ハイブリッドの回転観察を行った。その結果、 $[\text{ATP}]=10 \text{ mM}$  の条件で、1 回転中に長い停止と短い停止を持つ回転が観察された (図 40B)。10 分子ほどの回転分子が観察されたが、すべてがそのような 1 回転中に 1 つの長い停止を持つものであり、活性測定から予想されたコンタミネーションの野生形状の回転は観察されなかった。

観察された 6 分子について、ステップの待ち時間を計測したところ、それぞれの待ち時

間は、1 次の指数関数式 (付録 C.4.2 節;C.64 式) でフィッティングでき、それぞれの時定数が 591 ms(Long) と 26.7 ms(Short) と求められた (図 40B inset)。また、溶液交換による低 ATP 濃度での回転観察の結果、ATP 結合のステップも、1xE190D 同様に、長い待ち時間の約 160° 後にあった (data not shown)。

#### 15.4.5 結論と考察

1x $\alpha$ R364K は、1xR191K 同様に、1xE190D と比べて長い停止の時定数が長めではあったが、特性としてはほとんど変わらないものであった。この結果は、 $\alpha$ R364 残基もまた、回転機構での役割としては  $\beta$ E190 残基とほぼ同様に、主に ATP の分解 (ATP  $\rightarrow$  ADP $\cdot$ Pi) に関わっていると考えられる。

$\alpha$ R364 残基はアルギニンフィンガーとして、リン酸のリリースと深く関わっていると考えられていた。しかし、 $\alpha$ R364 残基の変異体も、E191 残基同様に E190 残基の変異体とあまり変わらない特性を示すことは、一連の触媒部位での ATP のリン酸基周辺の残基群は、すべて ATP 加水分解において同様の働きをしているのではないかと考えられる。

このようにこれまでと同様の結果がでたことで、二つの触媒素反応 (Long と Short) の役割についての新たな知見を得ることは出来なかった。しかし、以上の結果から、F<sub>1</sub>-ATPase の回転機構において、 $\alpha$  サブユニットの残基もまた、協同的な仕組みに寄与していることを初めて明らかにした。



## 第16章 第IV部のまとめ

- 1xE190D を用いた様々な溶液条件での実験により、ADP 依存的な第4の反応ステップの存在が示唆された。
- BDM は  $F_1$ -ATPase の加水分解活性を、分子内部での ATP の分解を遅くする作用によって可逆的に阻害する試薬であった
- $\beta$ R191K 変異体は  $\beta$ E190D 変異体同様に長い停止 (long dwell) と短い停止 (short dwell) を持ち、長い停止は  $\beta$ E190D よりもさらに遅い変異体であった。
- $\beta$ R256H 変異体は FEFE 変異体同様に、2つ目の ATP の結合の時定数の遅い変異体であることが示唆された。
- $\beta$ E201V 変異体は非常に inhibited form に陥りやすい変異体であった。
- $\alpha$ R364K 変異体は、 $\beta$ E190D および  $\beta$ R191K 同様に、長い停止と短かい停止を持っていた。その結果、 $\alpha$  サブユニットもまた、 $F_1$ -ATPase の協同的な回転機構に寄与していることが明らかになった。

# 第V部

## 総括



## 第17章 結論と展望

本研究によって  $F_1$ -ATPase の回転機構について以下の事を証明した。

- ATP 低親和性変異体を導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転観察より、 $F_1$ -ATPase が順番に交代で ATP を結合することによって回転することを証明した。
- ATP 加水分解変異体を導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転観察より、 $F_1$ -ATPase が、3つの触媒部位が全て違った役割を担うことによって回転する、協動的な回転機構を持つことを証明した。

$F_1$ -ATPase は3つの触媒部位を持ち、協調して ATP を加水分解することによって回転していた。このような複雑な機能の解明には、3つの触媒部位を独立に観察する必要があり、従来の変異体を用いた実験手法では不可能であった。そこで私は1つのサブユニットへ特異的に変異を導入するハイブリッド変異体の作製法を開発することにより、この問題を解決した。

また、顕微鏡下で1分子の挙動をリアルタイムに観察することは、反応の素過程を直接観察することを意味している。従来の生化学的研究成果により得られていた変異体を利用し、今回開発したハイブリッドの手法に応用することにより、1分子で起こっている反応の素過程をさらに個々のサブユニットにまで分解して理解することを可能とした。その結果、本研究においては  $F_1$ -ATPase の協調した働きを始めて明らかにすることができた。

このような生体分子の活動における協調した働き、すなわち、分子同士でのクロストークといった仕組みは、シグナル伝達系や解糖系での制御機構など、さまざまな分野で提唱され、理解が進んでいる。本研究は、そのような分子間コミュニケーションを分子内部にまで適用し、実時間で高分解能な直接計測できる実験系をはじめ構築した点において大きな意味がある。

---

近年では、このような分子内部での協調した働きについて、ミオシン [49] やキネシン [50] など、他の分子モーターでも研究が進められている。このような研究によって、化学反応により力学的な運動を生み出すエネルギー変換機構が理解できるだけにとどまらず、協調した働きを利用する分子機械全般の、普遍的な仕組みの理解につながると期待している。

# 付録A 試料の調製

## A.1 F<sub>1</sub>-ATPase への変異導入

### A.1.1 βサブユニットへの変異導入

FEFE 変異体 (第3章) については、Kunkel 法 [51] を用いて F<sub>1</sub>-ATPase(HC95) へ変異を導入した。回転アッセイ用変異体 F<sub>1</sub>-ATPase である HC95 には β のアミノ末端にガラス面固定用の His-tag がついており、α にある唯一のシステインがセリンに変えられ、γ に2つのシステインが導入されている (α(C193S)<sub>3</sub>β(His-tag)<sub>3</sub>γ(S109C/I212C))。

本論文では、この回転観察用変異体である HC95 を主に野生型 F<sub>1</sub>-ATPase として扱っている。ただし一部では、γ へのシステイン変異の1つ減った HC5(α(C193S)<sub>3</sub>β(His-tag)<sub>3</sub>γ(S109C)) あるいは、His-tag の無い C95 (α(C193S)<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ(S109C/I212C)) を野生型としている。

1. 回転アッセイ用変異 (α-C193S, γ-S107C/I210C, β(His-tag)) が導入された 好熱菌 *Thermophilic Bacillus* PS3 F<sub>1</sub>-ATPase の α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ サブユニットのプラスミド pKKαγβHC95 は 野地博行氏に頂いた。
2. F414E/F420E 変異用に 5'-GTA CGA GCC CGG TTG ACC GGT TTC CTG CTC CGC CAC GTG TTC GTT TTG CGA CAA GAA GAA C-3' の配列の合成オリゴヌクレオチドを用意した。
3. βサブユニット DNA を含むプラスミド pUCβ を *E. Coli* CJ236 株を用いて調整することで、ウラシルを含む一本鎖 DNA を作製した。
4. 上記オリゴヌクレオチドと一本鎖 DNA を用いて、Kunkel 法により変異を導入した β サブユニット DNA を作製した [51]。
5. *E. Coli* JM109 株 を用いて変異 pUCβ プラスミドを調整した。

6. 調整されたプラスミドの MluI-PstI フラグメントを、pKK $\alpha\gamma\beta$ HC95 の  $\Delta$ MluI-PstI フラグメントとライゲーションすることで、発現プラスミド pKK $\alpha\gamma\beta$ HC95  $\beta$ F414E/F420E を得た。
7. DNA シークエンスにより配列を確認した。

$\beta$ E190D 変異体 (第 III 部) については、既に F<sub>1</sub>-ATPase 変異導入したプラスミド pKK $\alpha\gamma\beta$ HC95 $\beta$ E190D を島袋氏より頂き、pUC $\beta$  および、pKK $\alpha\gamma\beta$ C95 へとライゲーションすることにより変異導入を行った。

第 16 章で用いた  $\beta$ R191K、 $\beta$ R256H、 $\beta$ E201V についても FEFE 同様に kunkel 法により変異導入を行った。このとき、 $\beta$ R191K 変異用に 5'-GTC GTT TTC CTT CCC GGG TTT TTT CGC CGA CGC CAG C-3'、 $\beta$ R256H 変異用に 5'-ACC GGC CTG CGT GAA ATG GAA AAT ATT ATC GAT AAA GAG-3'、 $\beta$ E201V 変異用に 5'-GCC GGA ATC TTT CAT CAC GTG GTA CAA GTC GTT-3' の合成オリゴヌクレオチドを用意した。

### A.1.2 $\alpha$ サブユニットへの変異導入

1.  $\alpha$  サブユニットの N 末端に His-tag(6His) の付いた変異体 F<sub>1</sub>-ATPase のプラスミド pKKHC95- $\alpha_{his}$  は、東大野地研究室の中嶋貴子氏より頂いた。
2. この変異体 F<sub>1</sub>-ATPase から制限酵素処理により 2.3kb の EcoRI-HindIII 断片を得、pUC118 ベクターに導入することにより pUC $\alpha_{his}$  を得た。
3. SOE(splicing-by-overlap-extension) 法を用いて、pUC $\alpha_{his}$  に  $\alpha$ R364K 変異を導入した。変異導入の合成オリゴヌクレオチドとしては、alpha-R364K-F;5'-GGG TTG TCC GTT TCG AAG GTC GGT GGG GCA GCG-3'、alpha-R364K-R;5'-CGC TGC CCC ACC GAC CTT CGA AAC GGA CAA CCC-3' を用いた。
4. 得られた pUC $\alpha$ R364K の DNA シークエンスを行い配列を確認した。
5. pUC $\alpha_{his}$ R364K より EcoRI-BglIII 断片を切り出し、pKKHC95- $\alpha_{his}$  の  $\Delta$ EcoRI-BglIII 断片に導入することにより、pKKHC95- $\alpha_{his}$ R364K を得た。

## A.2 F<sub>1</sub>-ATPase の精製

好熱菌のタンパク質が熱に強いことを利用して、熱処理をすることで大腸菌由来のタンパク質を除き、さらにβにヒスチジンのタグ (His-tag) がついている事を利用して、Nickel Nitrilotriacetic acid(Ni-NTA) カラムを用いて精製できる。

1. 大腸菌の野生型 F<sub>1</sub>-ATPase を欠損させた *E. coli* JM103Δ (uncB-uncD) 株 に、発現プラスミドを形質転換した。
2. Terrific Broth 培地 (Tryptone 12 g/l, Yeast Extract 24 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.54 g/l, Glycerol 4 ml/l) 2 l に植菌し、37°C で 24 時間培養した。
3. 培養液 2 l を遠心 (6k rpm, 20 分) 後、沈澱を残りの培養液で懸濁し、さらに遠心 (6k r.p.m, 20 分) して沈澱を回収した。
4. 沈澱を 0.2 mg/ml になるように洗いバッファ (50 mM imidazole, 100 mM NaCl, pH8) に溶かした。
5. フレンチプレスを用いて菌体を破碎した。完全に破碎するまで 3 回繰り返した。
6. 不必要なタンパク質を変性させるために、熱処理 (60°C 30 分) を行った。
7. 超遠心 (40k r.p.m, 40 分, 4°C) により変性タンパク質や脂質を沈澱させた。
8. 上清を Ni-NTA Superflow (QIAGEN) カラム (30 ml vol.) へ通し、素通り画分約 130 ml を回収した。
9. 洗いバッファ 150 ml を流し、洗い画分として回収した。
10. 溶出バッファ (200 mM imidazole, 100 mM NaCl, pH8) を 120 ml 流し、溶出画分として回収した。
11. 溶出画分に 70%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈澱として 4°C で保存した。



## A.3 回転観察サンプルの調整

回転アッセイ用変異体 F<sub>1</sub>-ATPase である HC95 には  $\beta$  のアミノ末端にガラス面固定用の His-tag がついており、 $\alpha$  にある唯一のシステインがセリンに変えられ、 $\gamma$  に 2 つのシステインが導入されている ( $\alpha$ (C193S)<sub>3</sub> $\beta$ (His-tag)<sub>3</sub> $\gamma$ (S109C/I212C))。

ビーズを用いた回転観察には、ストレプトアビジンコートしたビーズを  $\gamma$  サブユニットに結合させるために、 $\gamma$  サブユニットの 2 つのシステイン残基にビオチンマレイミドを共有結合させた。

トルク測定用に用いた F<sub>1</sub>-ATPase には、回転観察用のビオチン化されたアクチンフィラメントを  $\gamma$  サブユニットに結合させるために、ビオチン化された  $\gamma$  サブユニットに、さらに、ストレプトアビジンを結合させた。

1. F<sub>1</sub>-ATPase の硫酸沈澱を遠心 (15k r.p.m, 15 分) し、上済みと分離したのち、システイン残基を還元するために、5mM の DTT を含む A-buffer (10 mM MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid)-KOH[pH7.0], 50 mM KCl) に溶解した。そのまま 1 晩静置した。
2. ゴミを落とすために、遠心 (15k r.p.m, 20 分) し、上済みをも A-buffer で平衡化した HPLC でゲルろ過 (Superdex200HR, amersham pharmacia biotech) で精製して、DTT を取り除いた。
3. 4 $\mu$ M の F<sub>1</sub>-ATPase に対して、モル 20 倍量のビオチンマレイミド (Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide, DOJINDO) を加え、室温で 2 時間静置した。ビオチンマレイミドは水にとけにくいため、あらかじめ DMSO に 10 mM となるように溶かした後用いた。
4. 吸光度から濃度を定量した。吸光係数  $\epsilon_{280nm} = 0.154 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^1$  を用いた。
5. 脱塩カラム PD-10(amersham pharmacia biotech) を用いて過剰のビオチンマレイミドを取り除いた。(ビーズ回転用サンプル)
6. ストレプトアビジン (STREPTAVIDIN, SIGMA) をビオチンに対してモル 10 倍量入れて、30 分静置した。
7. 再度ゲルろ過 HPLC(Superdex200HR) で精製して、未反応のストレプトアビジンを取り除いた。(トルク測定用サンプル)

## A.4 アクチンフィラメント

回転のトルク測定に用いるために、アクチンフィラメントのシステインにビオチンマレイミドを共有結合させたのち、蛍光染色した。アクチンの濃度はモノマー、フィラメント共に、 $A_{290nm}^{1\%} = 6.3$  を用いて測定した。以下に手順を示す。溶液として G-buffer (0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM ATP, 2 mM MOPS-KOH[pH7.5]) を用意した。

1. ウサギの骨格筋より Spudich&Watt の方法でアクチンモノマー (G-actin; in G-buffer) を精製した。
2. G-actin に KCl を 100 mM、 $\text{MgCl}_2$  を 1 mM、MOPS(pH7.0) を 10 mM となるように加え、室温で 2 時間静置して重合させ、アクチンフィラメント (F-actin) にした。
3. ビオチンマレイミドを数十 mM となるように Dimethylformamide(DMF) にとかしストックとし、50  $\mu\text{M}$  の F-actin にビオチンマレイミド 500  $\mu\text{M}$  となるようにそのストックから加えた。
4. 室温で 4 時間静置したのち、 $\beta$ -mercaptoethanol を 0.1% となるように加え、反応を停止した。
5. 未反応のビオチンマレイミドを除くため、超遠心 (100k r.p.m、30 分) で F-actin を沈澱させ、G-buffer で沈澱をとかした。もう一度 KCl を 100 mM、MOPS を 10 mM 加え室温で 1.5 時間重合させた後、超遠心により F-actin を沈澱させ、G-buffer で沈澱をとかした。
6. KCl を 100 mM、MOPS を 10 mM 加え、室温で 1.5 時間重合させた。10  $\mu\text{M}$  の F-actin に Cy3-[N'-hydroxysuccinimide](蛍光色素) を 100  $\mu\text{M}$  となるようにとかした。
7. 室温に一晩静置した。
8. 手順 5 と同様にして、未反応の色素を取り除いた。
9. 100 mM KCl、2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20  $\mu\text{M}$  phalloidin(Sigma) を加えアクチンモノマーを重合させた。phalloidin はアクチンのモノマーに 1:1 で結合し、アクチンフィラメントを安定化する。

10. ATP、phalloidin を除くために超遠心 (100k r.p.m、15分) で F-actin を沈澱にし、沈澱を F<sub>1</sub>-buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS [pH7]) にとかした。
11. 手順 10 をもう一度行った。

## A.5 his-tag の無い F<sub>1</sub>-ATPase の調整

### A.5.1 変異体作製

1. pKK $\alpha\gamma\beta$ CWless (F<sub>1</sub>-ATPase の完全な野生型から  $\alpha$  に含まれる Trp と Cys を取り除く変異を入れたもの) から制限酵素処理により NheI-PmaCI フラグメントを得た。これには  $\gamma$  サブユニットの C 末から His-Tag を含まない  $\beta$  サブユニットの N 末側が含まれる。
2. 上記の NheI-PmaCI フラグメントと、pKKHC95 の  $\Delta$ NheI-PmaCI フラグメントとライゲーションすることで、His-tag を含まない発現プラスミド pKK $\alpha\gamma\beta$ C95 を得た。
3. A.1 節にて作製した FEFE 変異を含む MluI-PstI フラグメントと、上記 pKK $\alpha\gamma\beta$ C95 の  $\Delta$ MluI-PstI フラグメントとライゲーションすることで、His-tag を含まない変異体発現プラスミド pKK $\alpha\gamma\beta$ C95-FEFE を得た。
4. 同様に、 $\beta$ E190D 変異体 (第 III 部) についてもライゲーションにより変異導入を行い、pKK $\alpha\gamma\beta$ C95- $\beta$ E190D を得た。

### A.5.2 精製

his-tag の無い F<sub>1</sub>-ATPase の精製には、Ni-NTA カラムを用いることが出来ない。よって Ni-NTA カラムのかわりに疎水カラム (Butyl Toyopearl) を用いる。

1. 大腸菌の野生型 F<sub>1</sub>-ATPase を欠損させた *E.coli* JM103 $\Delta$ (uncB-uncD) 株 に、発現プラスミドを形質転換した。
2. Terrific Broth 培地 (Tryptone 12 g/l, Yeast Extract 24 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.54 g/l, Glycerol 4 ml/l) 2 l に植菌し、37°C で 24 時間培養した。

3. 培養液 2 l を遠心 (6k r.p.m, 20 分) 後、沈澱を残りの培養液で懸濁し、さらに遠心 (6k r.p.m, 20 分) して沈澱を回収した。
4. 沈澱を 0.2 mg/ml になる用に 10%バッファ (50 mM Tris-Cl, 1 mM ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EDTA) 0.5 mM DTT, 10%硫酸アンモニウム, pH8) に溶かした。以後硫酸アンモニウムの濃度に応じて～%バッファと呼ぶ。
5. フレンチプレスを用いて菌体を破碎した。完全に破碎するまで 3 回繰り返した。
6. 不必要なタンパク質を変性させるために、熱処理 (60°C 30 分) を行った。
7. 超遠心 (40k r.p.m, 40 分, 4°C) により変性タンパク質や脂質を沈澱させた。
8. 上清を 10%バッファで平衡化した Butyl Toyopearl カラム (30 ml vol.) へ通し、素通り画分約 130 ml を回収した。
9. 5%バッファ 150 ml を流し、洗い画分として回収した。
10. 3%バッファ 120 ml を流し、溶出画分として回収した。
11. 1%バッファ 100 ml を流し、1%画分として回収した。
12. 0%バッファ 100 ml を流し、0%画分として回収した。
13. 溶出画分に 70%飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈澱として 4°C で保存した。

## A.6 単離 $\beta$ サブユニットの調製

### A.6.1 変異体作製

His-tag の付いた単離  $\beta$  サブユニットの発現には、政池知子氏に頂いたプラスミド pUC $\beta$ -I386C/His-tag(第 II 部) あるいは、pUC $\beta$ His-tag(第 III 部、第 IV 部) を用いた。2FEFE 作製に用いる pUC $\beta$ -I386C/His-tag/FEFE については、A.1 節と同様に Kunkel 法を用いた変異導入により作製した。

1xE190D ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 作製に用いる pUC $\beta$ E190D/His-tag については、pkkHC95- $\beta$ E190D 変異体を制限酵素処理することにより MluI-PstI フラグメントを作製し、pUC $\beta$ His-

tag の  $\Delta$ MluI-PstI フラグメントとライゲーションすることにより変異を導入した。

### A.6.2 精製

単離  $\beta$  サブユニットは、 $F_1$ -ATPase コンプレックスと違い熱に対して弱いので熱処理の過程は省かなければならないが、His-tag を利用して Ni-NTA カラムによる精製を行うことで十分精製が可能である。単離  $\alpha$  サブユニットも同様にして精製を行った。

1. 大腸菌の野生型  $F_1$ -ATPase を欠損させた *E. coli* JM103 $\Delta$  (uncB-uncD) 株 に、発現プラスミドを形質転換した。
2. Terrific Broth 培地 (Tryptone 12 g/l, Yeast Extract 24 g/l,  $KH_2PO_4$  2.31 g/l,  $K_2HPO_4$  12.54 g/l, Glycerol 4 ml/l) 2 l に植菌し、37°C で 20 時間培養した。
3. 培養液 2 l を遠心 (6k r.p.m, 20 分) 後、沈澱を残りの培養液で懸濁し、さらに遠心 (6k r.p.m, 20 分) して沈澱を回収した。
4. 沈澱を 0.2 mg/ml になる用に洗いバッファ (50 mM imidazole, 100 mM NaCl, pH8) に溶かした。
5. フレンチプレスを用いて菌体を破碎した。完全に破碎するまで 3 回繰り返した。
6. 超遠心 (40k r.p.m, 40 分, 4°C) により変性タンパク質や脂質を沈澱させた。
7. 上清を Ni-NTA Superflow (QIAGEN) カラム (30 ml vol.) へ通し、素通り画分約 130 ml を回収した。
8. 洗いバッファ 150 ml を流し、洗い画分として回収した。
9. 溶出バッファ (200 mM imidazole, 100 mM NaCl, pH8) を 120 ml 流し、溶出画分として回収した。
10. 溶出画分に 70% 飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈澱として 4°C で保存した。

## A.7 $\beta$ ダイマーを用いたハイブリッド $F_1$ -ATPaseの作製(第4章)

### A.7.1 $\beta$ サブユニットのダイマー化

I386C 変異の導入された  $\beta$  サブユニットは、 $CuCl_2$  を用いて酸化させることでダイマーを形成させることができる [24]。こうして形成されたダイマーをゲルろ過 HPLC を用いて分離精製した。

1. 硫酸沈澱として保存されている  $\beta$  サブユニットを遠心 (15k r.p.m, 10 分) により沈澱させ、TN バッファ (50 mM Tris-Cl[pH8], 100 mM NaCl) に溶かした。
2. TN バッファで平衡化した脱塩カラム PD-10 を用いて残りの硫酸及び EDTA 等を除いた。
3. 1 ml に対して 1 mM  $CuCl_2$  を 100  $\mu$ l 加えて室温で 2 時間静置した。
4. ゲルろ過 HPLC カラム (Superdex200HR) により、 $\beta$  ダイマー画分を分取した。
5. 再度ゲルろ過 HPLC を行った。
6. 吸光度から濃度を定量した。吸光係数  $\epsilon_{280nm} = 0.154 \mu M^{-1} cm^1$  を用いた。

### A.7.2 $F_1$ -ATPase のビオチン化

再構成に用いる  $F_1$ -ATPase は、 $\beta$  ダイマーのジスルフィド結合との交換反応を防ぐために、 $\gamma$  サブユニットに含まれるシステインをあらかじめビオチン化した。

1.  $F_1$ -ATPase の硫酸沈澱を遠心 (15k r.p.m, 15 分) し、沈澱を 10 mM の DTT を含む TN バッファ (50 mM Tris-Cl[pH8], 100 mM NaCl) に溶解して、室温で 2 時間静置した。
2. ゴミを落とすために、遠心 (15k r.p.m, 20 分) し、上清みを TN バッファで平衡化した HPLC (ゲルろ過カラム, Superdex200HR) で精製した。
3.  $F_1$ -ATPase に対して、DMSO に溶かしたモル 20 倍量のビオチンマレイミド (Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide, DOJINDO) を加え、室温で 2 時間静置した。

4. 脱塩カラム PD-10 を用いて過剰のビオチンマレイミドを取り除いた。
5. 吸光度から濃度を定量した。吸光係数  $\varepsilon_{280nm} = 0.154 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^1$  を用いた。

### A.7.3 ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase再構成

$\beta$ ダイマーとF<sub>1</sub>-ATPaseを混合し、2M尿素(Urea)でサブコンプレックスに解離させた後、再構成させる。その後、 $\beta$ ダイマーのみに含まれるHis-tagを利用して精製することで、ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseのみを得ることができる。

1. このビオチン化したF<sub>1</sub>-ATPaseと前節の手法により得たHis-tag付き $\beta$ ダイマーを各0.7 mgずつ混合し、ウルトラフリー(10k cut, amicon)を用いて濃縮遠心(6k r.p.m, 約10分)により容量を1 mlまで濃縮した。
2. 120 mg尿素を加えて(終濃度2 M)、4°Cで1時間静置した。
3. (50 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ATP) 溶液 30 mlに加えることで尿素を66 mMまで希釈した。
4. ウルトラフリー(10k cut)を用いて濃縮遠心(6k r.p.m, 約60分)により約1 mlまで濃縮した。
5. 洗いバッファ(50 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl)で平衡化したNi-NTAカラム(1.5 ml vol.)に流した。
6. 洗いバッファ(50 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl)6 mlでカラムを洗った。
7. 溶出バッファ(200 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl)6 mlで溶出した。
8. 溶出液をリン酸バッファ(0.1 M Kpi [pH7], 2 mM EDTA)で平衡化したゲルろ過HPLCカラム(Superdex200HR)によりハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseを精製分取し、 $\beta$ ダイマー画分をとりのぞいた。

## A.8 簡略化したハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase 再構成 (第 9 章)

His-tag の付いた  $\beta$  モノマーとビオチン化した F<sub>1</sub>-ATPase を混合し、2M 尿素 (Urea) でサブコンプレックスに解離させた後、再構成させる。その後、 $\beta$  モノマーのみに含まれる His-tag を利用して精製することで、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を得ることができる。この方法では、1つのみ導入されたハイブリッドだけでなく様々な分子種が得られてしまう。しかし、最初に混合する  $\beta$  モノマーの量を少なくすればするほど、ほとんどの分子種は1つのみ変異導入されたハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase となる。

また、His-tag 付き  $\beta$  モノマーの代わりに His-tag 付きの  $\alpha$  モノマーを使うことによって、1つの  $\alpha$  サブユニットのみに変異を導入したハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase も同様に作製することが出来る (第 15.4 節)。

1. ビオチン化した F<sub>1</sub>-ATPase を 2 mg と、His-tag 付き  $\beta$  モノマー 0.1 mg (モル比 3:1 の場合。条件によって変える。本文参照) を 1 ml (40 mM Tris-Cl[pH8], 500 mM KCl) の溶液で混合した。
2. 120 mg 尿素 を加えて (終濃度 2 M)、4°C で 1 時間静置した。
3. 希釈溶液 (35 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) 50 ml に加えることで尿素を希釈した。
4. VIVA-spin(10k cut) を用いて濃縮遠心 (6k r.p.m, 約 60 分) により約 1 ml まで濃縮した。
5. 洗いバッファ (35 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl) で平衡化した Ni-NTA カラム (1 ml vol.) に流した。
6. 洗いバッファ (35 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl) 6 ml でカラムを洗った。
7. 溶出バッファ (200 mM イミダゾール [pH8], 100 mM NaCl) 6 ml で溶出した。
8. 溶出液をリン酸バッファ (0.1 M Kpi[pH7], 2 mM EDTA) で平衡化したゲルろ過 HPLC カラム (Superdex200HR) によりハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を精製分取し、余分な  $\beta$  モノマー画分をとりのぞいた。



## A.9 回転観察用ガラス基板の調製

### A.9.1 Ni-NTA 処理

第II部での回転観察では、F<sub>1</sub>-ATPaseでは3本、ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseでは2本ついたHis-tagを利用してガラス基板に固定するために、ガラス基板にNi-NTA(Ni-nitrilotriacetic acid) コートをを行った。

1. 20 M KOH でガラス板を一晩以上漬け置くことで、ごみと表面コートを洗い流した。
2. milliQ 水で10回洗った。
3. SH シラン溶液 (2% SH-Silane(信越シリコーン), 1% CH<sub>3</sub>COOH, 50% EtOH) に漬け、ホットプレート上で沸騰させないように注意しながら1時間インキュベートした。
4. milliQ 水で軽く洗い、120°C で1時間熱処理乾燥させた。
5. 10 mM DTT に漬け室温で1時間インキュベートした。
6. milliQ 水で5回洗った。
7. 2.5 mg/ml maleimide-C<sub>3</sub>-NTA (DOJINDO) に漬け1時間インキュベートした。
8. milliQ 水で3回洗った。
9. 30 mM NiSO<sub>4</sub> に漬け、そのまま保存した。
10. 利用直前に milliQ 水で洗い、エアダスタを用いて乾燥させた。

### A.9.2 疎水シラン処理

第III部および第IV部で用いたハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseにはHis-tagが1本しか付いていないため、His-tagを用いてのガラス基板への固定ではF<sub>1</sub>-ATPaseは不安定となる。そのためシラン処理により疎水処理したガラス基板を用いることで、非特異的吸着を利用してF<sub>1</sub>-ATPaseをガラス基板に固定した。

1. 20 M KOH にガラス板を一晩以上漬け置くことで、ごみと表面コートを洗い流した。
2. milliQ 水で10回洗った。

3. 1% Dimethyldichlorosilane のクロロホルム溶液に 1 時間漬けた。
4. 軽く milliQ 水で洗ったのち、120°C で 1 時間熱処理乾燥させた。
5. 100%メタノールに漬けて保存した。

## A.10 回転観察用ストレプトアビジンビーズの調製

直径 0.35  $\mu\text{m}$ (第 II 部) および 0.2  $\mu\text{m}$ (第 III 部, 第 IV 部) のビーズは、カルボキシ基の付いたポリスチレンビーズをアミノ基のついたビオチンを反応させることでビオチン化し、さらにアビジンでラベルを行うことにより作製した。

1. 直径 0.35  $\mu\text{m}$  もしくは 0.2  $\mu\text{m}$  の 2.6% carboxylate beads(polysciences Inc.) を 600  $\mu\text{l}$  を遠心 (16k r.p.m. 5 分) し、上清を捨てた。
2. ppt に MES バッファ (25 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid [pH 6]) を 900  $\mu\text{l}$  加え再度遠心 (16k r.p.m. 5 分) し、上清を捨てた。
3. ppt に MES バッファを 850  $\mu\text{l}$ , DMSO に溶かした 10 mg/ml biotin-x-cadaverine (Molecular Probes Inc.) を 50  $\mu\text{l}$ , 50 mg/ml EDC を 50  $\mu\text{l}$ , 50 mg/ml Sulfo-NHS を 50  $\mu\text{l}$  加えた。
4. 室温で 2 時間、ローテーターを用いて攪拌しながら暗所でインキュベートした。
5. 遠心 (16k r.p.m, 10 分) して上清を捨てた。
6. ppt に MOPS バッファ (50 mM MOPS[pH 7]) を 900  $\mu\text{l}$  加え遠心 (16k r.p.m,10 分) した。この作業 (\*MOPS wash) を 4 回繰り返した。
7. ppt に MOPS バッファ 900  $\mu\text{l}$  と 10 mg/ml アビジン (Neutra Avidin, Molecular Probes Inc.) を 100  $\mu\text{l}$  加えた。
8. 保存料として終濃度 0.5 mM となるように EDTA を加えて、4°C で保存した。
9. 利用直前に、過剰のアビジンを除くため、再度手順 6(\*MOPS wash  $\times$  4) を行った。

# 付録B 実験方法

## B.1 ATP加水分解活性測定

F<sub>1</sub>-ATPase の ATP 加水分解活性測定には、ATP 再生系を用いて NADH の吸光度の変化から求めた。図 41 にその反応系のスキームを示した。

1. 硫酸沈澱として保存してある F<sub>1</sub>-ATPase を遠心 (15k r.p.m, 10 分) し、沈澱をバッファ (0.1 M Kpi[pH7], 2 mM EDTA または 20 mM MOPS-KCl[pH7], 100 mM KCl) に溶かした。
2. 10 mM DTT を加えて一晩静置した。
3. HPLC を用いて、バッファで平衡化した Superdex200HR カラムにより、0.5 ml/min でゲルろ過して 22 分のピークを回収した。
4. 吸光度から濃度を定量した。吸光係数  $\epsilon_{280nm} = 0.154 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^1$  を用いた。
5. 活性測定 Assay Mixture (10 mM MOPS, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NADH, 2 mM phospho enol pyruvate, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pyruvate kinase, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lactate dehydrogenase, さらに各濃度の Mg-ATP) を用意した。ハイブリッド変異体の場合にはさらに 10 mM DTT を加えた。
6. Assay Mixture を 25°C で 3 分間 プレインキュベートした。
7. 分光測定器に 1.2 ml Assay Mixture を入れたキュベットをスターラーで攪拌しながら、340 nm の吸光度を 25°C で時間変化測定した。(このときの吸光度が約 1.2 Abs で安定するように NADH の量を調整した)
8. 測定開始 1 分後に F<sub>1</sub>-ATPase を 20  $\mu\text{l}$  または 40  $\mu\text{l}$  投入した。
9. 場合によって 30% LDAO を 4  $\mu\text{l}$  (終濃度 0.1%) 投入した。

10. NADHの吸光度の変化の傾きから活性を算出した。測定直後(5秒後以内)の値を initial 活性とし、平衡状態に達した値を steady 活性とした。

## B.2 結合ヌクレオチド測定

精製された  $F_1$ -ATPase に、どれだけのヌクレオチドが結合しているかをしらべるために、逆相 HPLC を用いた。

1. 検量線用に 1,2,3,4,5  $\mu$ M の ADP 溶液を各 500  $\mu$ l ずつ用意した。
2. サンプルとして 5.24  $\mu$  M FEF E 変異体、対照の野生型として 2.6  $\mu$ M HC5 を用意した。
3. 各々に、24% PCA 84  $\mu$ l と 5M  $K_2CO_3$  8  $\mu$ l を加えて氷上に静置した。
4. 遠心 (15k r.p.m, 10 分, 4°C) した。
5. 上清 150  $\mu$ l を HPLC 用サンプルチューブに入れた。
6. 0.1 M NaPi pH5.8 で平衡化した逆相カラムに各 ADP 溶液及びサンプルを流して、溶出液の 260 nm の吸光度を測定した。
7. 各 ADP 溶液のピーク面積から、ヌクレオチド定量検量線を描き、サンプルの ADP 位置のピーク面積から、サンプルに含まれるヌクレオチドの量を定量した。

## B.3 限外ろ過を用いたユニサイトヌクレオチド結合定数測定

限外ろ過 (ultrafree) に  $F_1$ -ATPase と ATP を混ぜて乗せ、濃縮遠心をするとう蛋白を除いた外液が落ちて来る。外液の ATP 濃度を定量することにより、 $F_1$ -ATPase に結合していない ATP の量がわかり、落ちてこなかった分が  $F_1$ -ATPase に結合したヌクレオチドであると言える。

$F_1$ -ATPase 1 $\mu$ M に対して、ATP 濃度を 0.5 あるいは 1.0  $\mu$ M の  $F_1$ -ATPase より ATP の少ない条件 (2:1 or 1:1) にすることにより、 $F_1$ -ATPase に対する 1 つ目の ATP の結合速度

(ユニサイト  $k_{on}$ ) を測定した。サンプルの  $F_1$ -ATPase としては、FEFE 変異体及び対照の野生型として C95 を精製して用いた。

1.  $F_1$ -ATPase をリン酸バッファ (0.1M Kpi[pH7], 2 mM EDTA) でゲル濾過 HPLC (Superdex200HR) 精製することにより、結合ヌクレオチドをとりのぞいた。
2. PD-10 ゲル濾過カラムを用いて、MOPS バッファ (20 mM MOPS[pH7], 50 mM KCl 2 mM  $MgCl_2$ ) にバッファ交換した。
3. 0.5  $\mu$ M あるいは 1.0  $\mu$ M の Mg-ATP を加えた MOPS バッファを限外ろ過 (ultrafree, 5k cut) に乗せ、 $F_1$ -ATPase を加えてすばやく攪拌した。
4. 直ちに濃縮遠心 (4k r.p.m, 40 sec) を行い、約 150  $\mu$ l の落ちてきた外液を回収した。
5. 5 分後、15 分後、30 分後と手順 4 を行い、同様に落ちてきた外液を回収した。
6. ATP の自然加水分解を防ぐため、落ちてきた外液に 4 mM EDTA を加えた。
7. 残った上清に 10  $\mu$ l の 24% perchloric acid を加え氷上で 10 分置いた後に 10  $\mu$ l の 5 M  $K_2CO_3$  を加えた。
8. 手順 7 で酸変性させた蛋白質を遠心 (12k r.p.m, 10 分) で落とし、その上清に 4 mM EDTA を加えた。
9. 逆相 HPLC を用いて結合ヌクレオチド定量 (B.2 節) を行った。

## B.4 回転観察

### B.4.1 アクチンを用いた回転観察

BufferC (10 mM MOPS (pH7.0), 50 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ ) および、BufferC に 10 mg/ml の BSA を加えたものを BufferD として用意した。蛍光色素が酸素により漂白されるのを防ぐため、これらをバイアル瓶に入れ約 1 時間ほど脱気した。

フローチャンバーとして、2 枚のカバーガラス (下に 24 mm $\times$ 36 mm、上に 18 mm $\times$ 18 mm) を合わせ、スペーサーとしてパラフィルムの裏紙にグリスを塗ったものを用いた (図 42)。このチャンバーは約 10  $\mu$ l の容量を持ち、これを 1 vol. とした。

1. bufferD で 10 nM に薄めたストレプトアビジン化した F<sub>1</sub>-ATPase を 1 vol. 流し、2 分待った。
2. 2 vol. の bufferD で、チャンバーを洗い流した。
3. bufferD で 30 nM に薄めたアクチンを 1.5 vol. 流し、15 分待った。
4. 2 vol. の bufferD で、チャンバーを 1 回洗い流した。
5. bufferD に、0.5% βメルカプトエタノール、6 mg/ml グルコース、2 mM Mg-ATP、0.2 mg/ml グルコースオキシダーゼ、30 Unit カタラーゼを加えた物を bufferE とし、これを 1.5 vol. 流した。
6. マニキュアを用いて、チャンバーをシールした。
7. 蛍光顕微鏡 (IX70, OLYMPUS) を用いて回転を観察し (図 43a)、この画像を ICCD (ICCD-350F, Videoscope) カメラを用いてビデオ (DSR-20, SONY) に録画した。
8. 録画した画像を CREST Image (NIH Image を元 CREST Team13 の安田涼平氏が改良したもの) を用いて解析した。

#### B.4.2 ビーズを用いた回転観察

第 II 部では、ビーズを用いて回転観察を行った。アクチンを用いて蛍光色素の観察場合とくらべて色素の退色を押える必要が無いので、実験操作が簡略化される。さらに、あらかじめストレプトアビジンコートしたビーズを用いることで、ビオチンラベルされた F<sub>1</sub>-ATPase をストレプトアビジンラベルする必要がなく、そのまま回転観察に用いることが出来る。

BufferE (10 mM MOPS (pH7.0), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mg/ml BSA) を用意した。フローチャンバーとして、下に、KOH で洗浄処理した、あるいは、Ni-NTA コートした 24 mm×36 mm のカバーガラス、上に 18 mm×18 mm のカバーガラスを合わせ、スペーサーとしてパラフィルムの裏紙にグリスを塗ったものを用いた (図 42)。このチャンバーは約 10 μl の容量を持ち、これを 1 vol. とした。

1. bufferE で 10 nM に薄めたビオチン化した F<sub>1</sub>-ATPase を 1 vol. 流し、2 分待った。
2. 2 vol. の bufferE で、チャンバーを洗い流した。

3. bufferE で2倍に薄めたストレプトアビジンビーズ (直径  $0.35 \mu\text{m}$ ) 1.5 vol. 流し、10分待った。
4. 2 vol. の bufferE で、チャンバーを1回洗い流した。
5.  $200 \mu\text{M}$  ATP buffer(buffer Eに指定した濃度の Mg-ATP と ATP 再生系として  $0.1 \text{ mg/ml}$  creatine kinase,  $1 \text{ mM}$  creatine phosphate を加えたもの) を 2 vol. 流した。
6. 位相差顕微鏡 (IX-70,OLYMPUS) を用いて回転を観察 (図 43b) した。
7.  $5 \mu\text{M}$  ATP buffer を 2vol. チャンバーに流して (溶液交換)、回転ステップを観察した。
8.  $10 \text{ mM}$  ATP buffer に溶液交換し、回転を観察した。
9. 観察した画像は CCD カメラ (CCD-300-RC, Dage-MTI) を用いてデジタルビデオテープ (DSR-20,SONY) に 30 フレーム/秒で録画した。
10. 録画した画像は CREST Image を用いて解析した。

### B.4.3 高速カメラを用いた回転観察

第 III 部及び第 IV 部での回転観察では、非常に短い時定数 ( $\sim 10 \text{ ms}$ ) のステップを観察する必要があるため、より負荷の小さい直径  $0.2 \mu\text{m}$  のビーズを用いると共に、観察手段として高速カメラ (Hi-Dcam2, Nac Image Technology) を用いた。

フローチャンバーとして、下に疎水シランコートした  $24 \text{ mm} \times 36 \text{ mm}$  のカバーガラス、上に  $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$  のカバーガラスを合わせ、スペーサーとしてパラフィルムの裏紙にグリスを塗ったものを用いた (図 42)。このチャンバーは約  $5 \mu\text{l}$  の容量を持ち、これを 1 vol. とした。

1. bufferE で約  $2 \text{ nM}$  に薄めたビオチン化した  $F_1$ -ATPase を 1 vol. 流し、2分待った。
2. 4 vol. の bufferE で、チャンバーを洗い流し、2分待った。
3. bufferE で2倍に薄めた直径  $0.2 \mu\text{m}$  のストレプトアビジンビーズを 2 vol. 流し、5分待った。
4. 4 vol. の bufferE で、チャンバーを1回洗い流した。

5. 10 mM (あるいは任意の濃度の) ATP buffer (buffer E に指定した濃度の Mg-ATP および、ATP 再生系として 5 mM phosphoenolpyruvate, 0.12 mg/ml pyruvate kinase を加えたもの) を 4 vol. 流した。
6. 位相差顕微鏡 (IX-71, OLYMPUS) を用いて回転を観察 (図 43b) し、この画像を高速カメラを用いて測定し、測定した画像はパーソナルコンピュータを介してハードディスクドライブに AVI 形式の動画ファイルとして、秒間 1000 フレーム/秒で画像を取りこんだ。
7. 画像の解析には ImageJ の Plugin(木下研足立氏製作) を用いた。

## B.5 解析

### B.5.1 回転解析 (第 II 部)

第 II 部の回転画像の解析には、Macintosh の画像解析ソフトである NIH Image を元に、元 CREST Team13 の安田涼平氏によって開発された CREST Image を用いた。

CREST Image での解析は以下のようなになる。アクチン線維の蛍光像、またはビーズの位相差像のビデオ画像を 1 秒間に 30 frame ずつ取り込み、各フレームにおける像の重心の座標  $(x, y)$  を求め、回転の軌跡を算出した。この  $(x, y)$  の軌跡から、回転の中心座標  $(Cx, Cy)$  を目算で求め、 $(x, y)$  の角度  $\theta$  を以下の式より求めた。

$$\theta = \arctan(|Cx - x|/|Cy - y|) \quad (\text{B.1})$$

但し、

$$\theta = 180 - \theta \quad (Cx \geq x, Cy < y)$$

$$\theta = 180 + \theta \quad (Cx \leq x, Cy \leq y)$$

$$\theta = 360 + \theta \quad (Cx < x, Cy \geq y)$$

さらに積算回転数も求めた。上記の角度  $\theta$  は  $360^\circ$  を越えると 0 に戻るが、このときに  $180^\circ$  以上変化する場合に  $360^\circ$  加え、 $-180^\circ$  以上変化する場合には  $360^\circ$  引くという操作を行った。この角度を 360 で割ることにより回転数として算出した。この計算方法では 1frame の間に



180°以上回転する場合に逆回転したものとしてしまう。よって、このような速い回転について回転の解析することはできない。

以上のように F<sub>1</sub>-ATPase 回転の画像データから CREST Image を用いることで、回転の軌跡を得ることができた。さらなる統計的な解析には、WINDOWS 上のグラフソフト ORIGIN を用いた。

### B.5.2 回転解析 (第 III 部、第 IV 部)

高速カメラでの回転解析には、CRESTImage を NIH-Image の Java 言語版である ImageJ に移植した plugin(木下研足立氏製作)を用いた。ビーズの位相差像を秒間 1000 frame ずつ取りこみ、前節同様に各フレームでの重心位置と角度を算出した。さらなる統計的な解析には、WINDOWS 上のグラフソフト Igor を用いて、自作のマクロプログラムを作製して解析を行った。

### B.5.3 トルク測定

アクチン線維の回転からは、アクチンを円柱形の剛体棒とみなすことにより、そこにかかる粘性抵抗と回転速度から回転トルク T を求めることが出来る。

$$T = \frac{4\pi\omega\eta L^3}{3\ln(L/2r) - 0.447} \quad (\text{B.2})$$

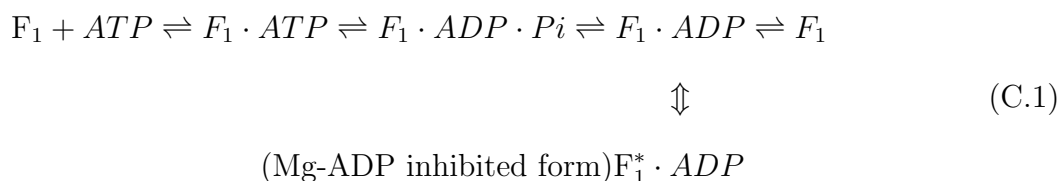
このとき、T:回転トルク (pN·nm)、L:アクチン線維の長さ (nm)、 $\eta$ :水の粘性抵抗  $1 \times 10^{-3}$  (Pa/s)、r:アクチン線維の半径 5(nm)、 $\omega$ :角速度 (rad/sec) である。

# 付録C 理論

## C.1 Mg-ADP inhibited form

F<sub>1</sub>-ATPase は ATP を加水分解する間に、ある確率で不活性化した状態になる。このときの F<sub>1</sub>-ATPase の状態を Mg-ADP inhibited form (以下 inhibited form) と呼ぶ。この現象は、ミトコンドリア [52]、葉緑体 [53]、好熱菌 [54, 55]、大腸菌由来の F<sub>1</sub>-ATPase [56] において報告されていて、βサブユニットが ATP を加水分解している間に ADP を解離しない状態に陥るために起こるといわれている [52–54]。また、F<sub>1</sub>-ATPase にあらかじめ等量の Mg-ADP を混ぜておくことで、一時的に全ての分子の活性を失わせることができ [55]、また、lauryldimethylamine oxide (LDAO) はその状態を解除することが知られている [57]。

F<sub>1</sub>-ATPase の加水分解サイクルのスキームを以下に示す。



この inhibited form のために、多分子での F<sub>1</sub>-ATPase の加水分解活性は測定時間とともに変化する。F<sub>1</sub>-ATPase を ATP 溶液に投入すると、はじめは大きな活性を持ち (initial burst)、数秒で活性の下がった状態に陥り、最終的に活性の安定した平衡状態 (steady state) に落ち着く。steady state の活性は initial burst 活性の 1/4 程度であり、このときは、inhibited form に落ちた不活性化状態の分子と活性状態にある分子の混合した状態であると思われる。

また、1分子観察の結果からは、inhibited form は回転の停止した状態であることが報告されている [25]。その停止の長さは野生型で概ね数十秒に及ぶ。回転の解析は基本的に回転中の分子のみに対して行う。よって、活性と回転速度を比較する際には initial の活性を 1分子観察での回転速度と対応させる必要がある。しかし、回転が ATP の結合で律速となる

低濃度 ATP 存在下での回転速度から算出した 1 分子の ATP 加水分解活性は、多分子系で測定した initial の ATP 加水分解速度をほぼ上回っている [16]。このことは、initial 活性といえども全ての分子が活性状態にあるわけではなく、不活性型の分子がすくなく存在していることを意味している。 $\alpha$  サブユニットへ ATP が結合することによって、inhibited form から回復し [58, 59]、その親和性は数百  $\mu\text{M}$  であると報告されている [54]。そのため、ATP 濃度に依存して inhibited form への陥りやすさが変化し、その影響が活性の濃度依存性に現れている可能性も考えられる。

## C.2 ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の反応速度論解析

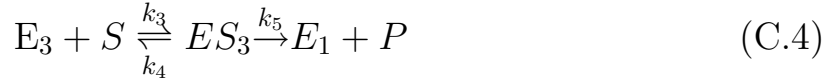
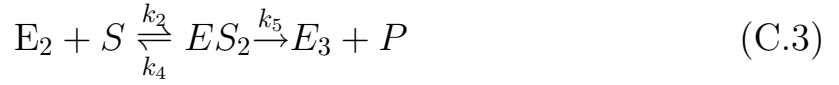
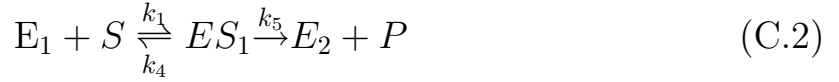
### C.2.1 FEFE ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の場合

FEFE ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase すなわち、1 つ (または 2 つ) の  $\beta$  サブユニットの  $k_{on}$  を変化させた F<sub>1</sub>-ATPase の活性の ATP 濃度依存性はどのような振る舞いをするのか? この疑問に答えるために、ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の活性が ATP 濃度に対してどのような依存性を持つのか、反応スキームを立てその速度論解析を行うことにより解を求めた。

#### 理論

一般解を求めるために、三つの  $\beta$  サブユニットそれぞれが独立の  $k_{on}$  を持つと考えて、それぞれ  $k_1, k_2, k_3$  とした。簡単にするために  $k_{off}$  と  $k_{cat}$  は 3 つとも同じであるとした。このとき、3 つの  $\beta$  サブユニットで ATP を待っているときの酵素 (F<sub>1</sub>) の反応中間状態をそれぞれ区別して、 $E_1, E_2, E_3$  とし、同様に基質 S(ATP) を結合した時の状態を  $ES_1, ES_2, ES_3$  とした。ただし、すべての分子がアクティブである、すなわち回転中であることを想定し、その反応は 1 次であるとした。この条件では 3 つの  $\beta$  が同一であるならば 1 次のミカエリスメンテン式で表すことができる。 $E_x$  にいくつヌクレオチドが付いているか、すなわち反応がバイサイトであるか、トライサイトであるかは、ここでは問題にはならない。

この時のスキームは以下の式 (C.2)~(C.4) で表すことができる。



定常状態を仮定するので、中間産物の量は一定であるため、

$$\frac{d[ES_1]}{dt} = \frac{d[ES_2]}{dt} = \frac{d[ES_3]}{dt} = \frac{d[E_1]}{dt} = \frac{d[E_2]}{dt} = \frac{d[E_3]}{dt} = 0 \quad (C.5)$$

が成り立つ。故に式 (1)~(3) より

$$\frac{d[ES_1]}{dt} = k_1[E_1][S] - (k_4 + k_5)[ES_1] = 0 \quad (C.6)$$

$$\frac{d[ES_2]}{dt} = k_2[E_2][S] - (k_4 + k_5)[ES_2] = 0 \quad (C.7)$$

$$\frac{d[ES_3]}{dt} = k_3[E_3][S] - (k_4 + k_5)[ES_3] = 0 \quad (C.8)$$

$$\frac{d[E_1]}{dt} = k_5[ES_3] + k_4[ES_1] - k_1[E_1][S] = 0 \quad (C.9)$$

$$\frac{d[E_2]}{dt} = k_5[ES_1] + k_4[ES_2] - k_2[E_2][S] = 0 \quad (C.10)$$

$$\frac{d[E_3]}{dt} = k_5[ES_2] + k_4[ES_3] - k_3[E_3][S] = 0 \quad (C.11)$$

さらに、全酵素量  $E_t$  は一定であるので、

$$[E_1] + [E_2] + [E_3] + [ES_1] + [ES_2] + [ES_3] = [E_t] \quad (C.12)$$

このとき、活性  $V$  は産物  $P$  の出来る速さで表せるので、

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_5([ES_1] + [ES_2] + [ES_3]) \quad (C.13)$$

これで、 $V$  について、式 (C.6)~(C.13) の連立方程式を解く<sup>1</sup>と、

$$V = k_5 \frac{3k_1k_2k_3[S][E_t]}{k_1k_2k_4 + k_1k_3k_4 + k_2k_3k_4 + k_1k_2k_5 + k_1k_3k_5 + k_2k_3k_5 + 3k_1k_2k_3[S]} \quad (C.14)$$

<sup>1</sup>方程式を解く際には Mathematica を用いた

となる。この時、

$$K_m^1 = \frac{k_4 + k_5}{k_1}, K_m^2 = \frac{k_4 + k_5}{k_2}, K_m^3 = \frac{k_4 + k_5}{k_3} \quad (\text{C.15})$$

とにおいて、整理すると、 $k_5[Et] = V_{max}$  より

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{(K_m^1 + K_m^2 + K_m^3)/3 + S} \quad (\text{C.16})$$

すなわち、FEFE ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の活性は 1 次のみカエリスメンテン式で表せて、その  $K_m$  は 3 つそれぞれの  $\beta$  での  $K_m$  の単純な平均として現れることがわかった。

### 実例：FEFE 変異体ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の場合

ここで、 $\beta_{FEFE}$  の  $K_m$  を  $K_m^F$ 、 $\beta_{wild}$  の  $K_m$  を  $K_m^W$  とすると

$$K_m^{3FEFE} = K_m^F, K_m^{0FEFE} = K_m^W \quad (\text{C.17})$$

さらに  $K_m^F \gg K_m^W (\simeq K_m^F/100)$  より

$$K_m^{1FEFE} = \frac{K_m^F + K_m^W + K_m^W}{3} \simeq \frac{1}{3}K_m^F \quad (\text{C.18})$$

$$K_m^{2FEFE} = \frac{K_m^F + K_m^F + K_m^W}{3} \simeq \frac{2}{3}K_m^F \quad (\text{C.19})$$

と予想され、3FEFE の  $K_m$  に対して、それぞれのハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の  $K_m$  は、1FEFE の  $K_m$  が約 1/3、2FEFE の  $K_m$  が約 2/3 となっている実験結果と適合することがわかった。

### C.2.2 $\beta$ E190D ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の場合

より一般的なハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase、すなわち  $k_{on}$  だけでなく、 $V_{max}$  も変化する場合には、以下のように、より複雑なスキームが必要となる。



$$E_3 + S \xrightleftharpoons[k_6]{k_3} ES_3 \xrightarrow{k_9} E_1 + P \quad (C.22)$$

これらの式 (C.20)~(C.22) より式を立て、前節同様に  $V = d[P]/dt$  について解くと

$$V = \frac{3[S][Et]}{\left(\frac{k_4+k_7}{k_1k_7} + \frac{[S]}{k_7}\right) + \left(\frac{k_5+k_8}{k_2k_8} + \frac{[S]}{k_8}\right) + \left(\frac{k_6+k_9}{k_3k_9} + \frac{[S]}{k_9}\right)} \quad (C.23)$$

となる。この時、

$$V_{max}^1 = k_7[Et], V_{max}^2 = k_8[Et], V_{max}^3 = k_9[Et], \quad (C.24)$$

$$K_m^1 = \frac{k_4 + k_7}{k_1}, K_m^2 = \frac{k_5 + k_8}{k_2}, K_m^3 = \frac{k_6 + k_9}{k_3} \quad (C.25)$$

とおいて整理すると、

$$V = \frac{3}{\frac{K_m^1+S}{V_{max}^1 \cdot S} + \frac{K_m^2+S}{V_{max}^2 \cdot S} + \frac{K_m^3+S}{V_{max}^3 \cdot S}} \quad (C.26)$$

さらに、

$$V_1 = \frac{V_{max}^1 \cdot S}{K_m^1 + S}, V_2 = \frac{V_{max}^2 \cdot S}{K_m^2 + S}, V_3 = \frac{V_{max}^3 \cdot S}{K_m^3 + S} \quad (C.27)$$

と定義して整理すると、

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} + \frac{1}{V_3}\right)/3 \quad (C.28)$$

と簡潔に表すことが出来る。

### 実例： $\beta$ E190D 変異体ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase の場合

1xE190D ハイブリッドの最大活性  $V_{max}$  について考える。 $V_{max}^{E190D}$  は  $V_{max}^{wild}$  の約 1/100 であることから、

$$\frac{1}{V_{max}^{1xE190D}} = \left(\frac{1}{V_{max}^{E190D}} + 2 \times \frac{1}{V_{max}^{Wild}}\right)/3 \quad (C.29)$$

$$V_{max}^{1xE190D} \simeq 3 \times V_{max}^{E190D} \quad (C.30)$$

と予想することができる。同様に、

$$V_{max}^{2xE190D} \simeq 2 \times V_{max}^{E190D} \quad (C.31)$$

となることも予想できる。

## C.3 超低濃度 ATP での回転と結合部位占有率の理論解析

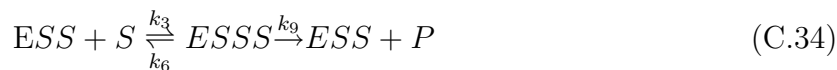
### C.3.1 目的

nM オーダーという超低濃度 ATP 存在下でもトライサイトモードで回転するのか? という問題について考える。ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を用いた回転観察ではそのような超低濃度 ATP 条件では観察が困難である。そこで、理論的に解析を行うことにより、ATP 濃度に応じた結合部位の占有率 (site-occupancy) を予測した上で、そこでの F<sub>1</sub>-ATPase のふるまいの予想を試みる。

ここで注意すべきなのは、ある ATP 濃度において全ての F<sub>1</sub>-ATPase が ATP の n 個付いた状態であるなんてことは絶対にありえず、常に、どの ATP 濃度においても (回転観察系では常に [ATP] ≫ [F<sub>1</sub>] なので)、0 個または 1 個、2 個、3 個の ATP が付いた F<sub>1</sub>-ATPase の混ざりものとなっている。そこでまずそれぞれの状態 (E, ES, ESS, ESSS) の population (分配比) をスキームから算出し、ATP 結合部位付近に導入したトリプトファン残基の蛍光測定などから求めた解離定数 [37] などの既知のパラメーターと照らして考えてみる。

### C.3.2 理論

一般的には、F<sub>1</sub>-ATPase (E) に順次 3 つの ATP (S) が付いて加水分解するときのスキームは次のように表現できる。



ただし、今回の議論で知りたいことは site-occupancy すなわち **何個ヌクレオチドが付いたものがどれだけいるか?** だけである。そこで、簡単のために産物 P のリリースは無視することにする。すると、ユニ、バイ、トライサイト条件での加水分解 ( $k_7, k_8, k_9$ ) と  $k_{off}(k_4, k_5, k_6)$  をひとまとめに考えることが出来る。そして、それぞれの population (配分比) に影響するのは、主に早い方の時定数のみであると考え。必然的に、結合しているヌクレオチド (S) が、ATP であるか ADP であるかを考えないことになるので、inhibited from もとりあえず無い

条件での4つの分子種 (E,ES,ESS,ESSS) の配分比を考えることになる。n 番目の  $k_{cat} + k_{off}$  を  $k_{-n}$  とみなして単純化したスキームが以下のように得られる。



ここで4つの微分方程式を立てて解くこともできる<sup>2</sup>が、配分比だけなら King-Altman の図式解法で簡単に解くことができ、 $[E]_0 = [E] + [ES] + [ESS] + [ESSS]$  と定義すると、

$$[E]/[E]_0 = k_{-1}k_{-2}k_{-3}/\Sigma \quad (C.38)$$

$$[ES]/[E]_0 = k_1[S]k_{-2}k_{-3}/\Sigma \quad (C.39)$$

$$[ESS]/[E]_0 = k_1[S]k_2[S]k_{-3}/\Sigma \quad (C.40)$$

$$[ESSS]/[E]_0 = k_1[S]k_2[S]k_3[S]/\Sigma \quad (C.41)$$

$$\Sigma = k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_1k_{-2}k_{-3}[S] + k_1k_2k_{-3}[S]^2 + k_1k_2k_3[S]^3 \quad (C.42)$$

と求められる。それぞれの結合数が一つだけ違う物同士の比としてまとめると、単純に表わすことができ、

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_1[S]}{k_{-1}} \quad (C.43)$$

$$\frac{[ESS]}{[ES]} = \frac{k_2[S]}{k_{-2}} \quad (C.44)$$

$$\frac{[ESSS]}{[ESS]} = \frac{k_3[S]}{k_{-3}} \quad (C.45)$$

となる。それぞれの分子種の分配比はそれぞれの状態への遷移速度  $k_n$  と  $k_{-n}$  および基質濃度 [S] に依存する。

<sup>2</sup>実際に解いて両方で結果が一致するのは確認した。



### C.3.3 実例 : [ATP] = 5 nM

ここで、低濃度 ATP 条件 ([ATP] = 5 nM) を考える。

#### ヌクレオチドフリー状態 [E]

$k_1$  はユニサイトでの結合速度であり、野生型 F<sub>1</sub>-ATPase では  $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められている [60]。  $k_{-1}$  はユニサイトでのヌクレオチドの解離速度に相当するが、正確には求められていない。しかし、約 14 秒の時定数で ADP-inhibition に陥り、その後なかなか離れることがないということは確かめられている [60] ので、  $k_{-1} \ll 1/14 \text{ s}^{-1}$  であると予想できる。すなわち、[S] = 5 nM の条件では式 (C.43) より

$$[ES]/[E] \gg (1.4 \times 10^7) \cdot (5 \times 10^{-9}) / (1/14) \simeq 1 \quad (\text{C.46})$$

となり、この条件 ([ATP]=5 nM) 下では [E] 即ちヌクレオチドフリー状態は ([ES] にくらべて) ほとんど無いと言える。

ちなみに、トリプトファン変異の蛍光測定 [37] から得た  $K_{m1} = k_{-1}/k_1 \approx \text{nM}$  より、  $k_{-1} \approx 10^{-2}$  と見積もることもできる。

#### 3 個ついた状態 [ESSS]

トライサイトでの  $k_{on}$  は回転観察で結合の待ち時間の解析により求められる [17]。即ち  $k_3 = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  である。トライサイトモデルでは、3 つ目の ATP が結合するとただちに (別の  $\beta$  サブユニットで) 加水分解が起こり、(さらに別の  $\beta$  サブユニットより) ADP と Pi がリリースされる。つまり、[ESSS] から [ESS] に戻る速度定数  $k_{-3}$  には加水分解速度  $k_{cat} = 300 \text{ s}^{-1}$  が効いてくる。このときの [ESSS] は

$$[ESSS]/[ESS] = (3 \times 10^7) \cdot (5 \times 10^{-9}) / 300 = 5 \times 10^{-4} \quad (\text{C.47})$$

と [ESSS] もまた、[ATP]=5 nM の条件で ([ESS] とくらべれば) 殆ど存在していないと言える。ちなみに、site-occupancy でのトライサイトの  $K_{m3}$  (半分の分子種が ESSS となる [S])

とは、この比がほぼ 1 : 1 になる基質濃度である。そのときの  $K_{m3}$  は

$$[ESSS]/[ESS] = (2 \times 10^7) \cdot K_{m3}/300 = 1 \quad (\text{C.48})$$

$$K_{m3} = 15 \times 10^6 = 15 \mu\text{M} \quad (\text{C.49})$$

となり、回転観察から求めた回転活性の  $K_m$  値 [17] や、トリプトファンの蛍光測定から求めた値 ( $13 \mu\text{M}$ ) [37] とよく一致する。

### バイサイトとトライサイトの遷移状態

結局、 $[\text{ATP}] = 5 \text{ nM}$  条件でのバイサイトとトライサイトの状態の分配比は、バイサイトでの ATP の待ち状態である  $[\text{ES}]$  とトライサイトでの待ち状態である  $[\text{ESS}]$  の比、つまり式 (C.44) だけで議論することができる。トライサイト状態にある分子数は、基質濃度と 2 つ目の  $k_{on}$  に比例し、2 つ目の  $k_{off}$  に反比例している。

そして、 $[\text{ESS}]$  へ遷移する速度は  $k_2$  に依存し、 $[\text{ES}]$  に戻る速度は  $k_{-2}$  に依存している。すなわち回転しつづける寿命は  $1/k_{-2} \text{ s}$  で表現できる。しかし、 $k_2$  および  $k_{-2}$  は実験的には求められていない。そこで、これらの値が幾つになるかが問題となる。

もし、 $k_2$  が小さければ、 $k_{-2}$  が小さく (= 回転寿命が長く) ても ATP 低濃度で回転発見頻度が下がる (=  $[\text{ESS}]$  が小さくなる) ことがわかる。しかし、 $k_2$  が  $k_3$  より小さくなった場合、ヌクレオチドフリー状態  $[\text{E}]$  から活性状態  $[\text{ESS}]$  への移行の間に、この遷移速度  $k_2[\text{S}]$  が律速段階となり、活性のタイムコースに  $[\text{ATP}]$  依存的な初期の不活性状態 (lag) が生じると期待される<sup>3</sup>。しかし、野生型  $\text{F}_1\text{-ATPase}$  においては、そのような lag は見えていないので、 $k_2$  は回転条件での  $k_{on}$  に相当する  $k_3 = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と同程度か、それ以上である必要があるだろう。

トリプトファンの蛍光測定から求めた 2 つ目の結合の解離定数 ( $K_{d2}$ ) は  $1.6 \times 10^{-8} \text{ M}$  であった [37]。  $K_{d2}$  は  $k_{-2}/k_2$  に相当するので、(C.44) 式より

$$\frac{[\text{ESS}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_2[\text{S}]}{k_{-2}} = \frac{[\text{S}]}{K_{d2}} \quad (\text{C.50})$$

と表せる。 $[\text{ATP}] = 5 \text{ nM}$  では  $[\text{ESS}]/[\text{ES}] = 5 \times 10^{-9}/(1.6 \times 10^{-8}) \simeq 1/3$  となる。

<sup>3</sup>これが、FEFE 変異体及び  $\beta\text{R256H}$  変異体での活性測定で得られた lag に相当するかもしれない。

この比は、ある瞬間での [ESS] と [ES] の比が 1 : 3 になっていることを示しているが、これには 2 つの意味が考えられる。

(1)  $k_2$  が大きい場合 ( $\geq 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) には  $k_{-2}$  は小さくなり、 $k_{-2} \leq 0.32\text{s}^{-1}$  となる。つまり、素早く [ES] に落ちこむが素早く [ESS] に戻ってくるので、回転は 3 倍長い step として観察されると期待される。

(2)  $k_2$  が小さい場合には、たまに [ES] に落ちるが、なかなか戻ってこないので、回転観察では、1/4 の分子が回転していて残りは停止しているように観察されると期待される。つまり回転発見頻度に影響する。しかし、ATP 濃度が 1 桁以上高い場合 ( $\geq 50\text{nM}$ ) には、回転発見頻度には影響を及ぼさないことになっている。

結局のところ、ATP 濃度が  $K_{d2}$  より小さくなる [ATP]=5 nM 付近で、[ES] と [ESS] の差が見えてくる。つまり、 $K_{d2}$  の値次第で、[ES] の影響の表れる閾値はずれてくる。トリプトファンの蛍光測定から求めた値 [37] では [ATP]=5 nM 付近に閾値がくる計算となっているが、[ATP]=2 nM でも同様の回転が観察されること [42] から、実際の  $K_{d2}$  の値はもっと低いのもかもしれないし、((1) を想定すると  $k_{-2}$  の値はもっと小さいとなる) (2) もありうる。

どちらにせよ低濃度 [ATP] での連続的な回転をトライサイトのみで説明することは、 $K_{d2}(k_2 \text{ と } k_{-2})$  の値次第で、可能となる。その閾値以下でなにが起っているのかを正確に予想するには  $k_2$  および  $k_{-2}$  の正確な値を知る必要があるだろう。

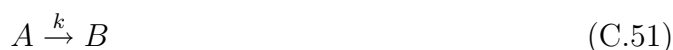
しかし、実際の観察においては野生型の  $F_1\text{-ATPase}$  においても、ATP 低濃度では回転発見頻度がかなり落ちることが知られている。さらに、ATP のプレインキュベーションにより回転発見頻度が上がるという結果 [42] と矛盾しているとも見える。

その原因は、ここまで無視してきた inhibited form に起因するのだろう。

## C.4 回転ステップの間隔(待ち時間)の時間分布解析

### C.4.1 律速段階が 1 つだけの場合

分子の状態が  $A$  から  $B$  に変わるときに、ステップが起こるとする。そのときのスキームは



と表される。ただし、状態  $B$  となった分子はすぐに状態  $A$  となり、繰り返しステップを行うものとする。ステップの時間間隔、即ちステップの待ち時間の分布は、状態  $A$  から状態  $B$  へと遷移する確率と比例することになる。

ここで、 $a$ 、 $b$  をある分子が状態  $A$ 、 $B$  にある確率とする。それらの時間微分は速度定数  $k$  に依存して変化するので、

$$\frac{da}{dt} = -ka \quad (\text{C.52})$$

$$\frac{db}{dt} = ka \quad (\text{C.53})$$

の2式が得られる。これを初期条件  $a(0) = 1$ 、 $b(0) = 0$  に対して解くと  $db/dt$  は時間  $t$  の関数として表され、

$$\frac{db}{dt} = k \cdot \exp(-kt) \quad (\text{C.54})$$

となる。

よって、実際にステップ間の待ち時間を計測し、各々の時間でのイベント数を  $n$  として時間分布をプロットしたヒストグラムは、

$$n = C \cdot \exp(-kt) \quad (\text{C.55})$$

の1次の指数関数式でフィッティングが可能となる。但し  $C$  は任意の定数である。

ATP の結合により引き金となるステップを考える。このときのスキームは、



となり、 $k$  の値は ATP 濃度に比例して、

$$k = k_{on}[\text{ATP}] \quad (\text{C.57})$$

と表される。ここで  $k_{on}$  は、ATP の結合速度定数 (単位は  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) となる。

### C.4.2 律速段階が2つある場合

1つのステップを引き起こすのに律速段階が2つある場合には、反応は次のように表される。



状態  $B$  から状態  $C$  への遷移でステップが起こり、状態  $C$  となった分子はすぐに状態  $A$  へと戻り、繰り返してステップする。状態  $A$  から状態  $C$  へと遷移するときの存在確率の時間変化が、ステップ間の時間間隔即ち待ち時間の分布と一致する。

$a$ 、 $b$ 、 $c$  を状態  $A$ 、 $B$ 、 $C$  にある確率とすると、それぞれの時間微分は

$$\frac{da}{dt} = -k_1 a \quad (\text{C.59})$$

$$\frac{db}{dt} = k_1 a - k_2 b \quad (\text{C.60})$$

$$\frac{dc}{dt} = k_2 b \quad (\text{C.61})$$

と得られる。これらの式を、初期条件  $a(0) = 1$ 、 $b(0) = 0$ 、 $c(0) = 0$  で解くと、

$$\frac{dc}{dt} = \frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2} \cdot \{\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)\} \quad (\text{C.62})$$

となる。これが待ち時間の時間分布となる。

実際に2つの律速段階を持つステップの待ち時間を計測し、時間間隔毎にプロットしたヒストグラムを取ると、そのイベント数  $n$  は

$$n = C \cdot \{\exp(-t/\tau_2) - \exp(-t/\tau_1)\} \quad (\text{C.63})$$

という2次の指数関数式でフィッティングが可能となる。但し  $C$  は任意の定数であり、 $\tau_1$ 、 $\tau_2$  はそれぞれ速度定数  $k_1$ 、 $k_2$  の逆数に対応する時定数 (単位は s) となる。この式は、時間 0 で 0 であり、山型のピークを持ち再び減少する関数となる。片方の時定数  $\tau_1$  が非常に小さいときには、 $\exp(-t/\tau_1)$  が非常に小さくなり、結果として前節の律速段階が1つの場合

$$n = C \cdot \{\exp(-t/\tau)\} \quad (\text{C.64})$$

と見分けが付かなくなる。このとき  $\tau$  は  $1/k$  に対応する時定数 (s) となる。

## 参考文献

- [1] Mithell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148 (1961)
- [2] Boyer, P. D. and Kohlbrenner W. E. The Present Status of the Binding-Change Mechanism and Its Relation to ATP Formation by Chloroplasts. *Energy Coupling in Photosynthesis, Elsevier North Holland, New York* 407-426 (1981)
- [3] Boyer, P. D. The binding change mechanism for ATP synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215-250 (1994)
- [4] Rosing, J., Kayalar, C. and Boyer, P. D. Evidence for Energy-dependent Change in Phosphate Binding for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Based on Measurements of Medium and Intermediate Phosphate-Water Exchanges. *J. Biol. Chem.* **25**, 2478-2485 (1977)
- [5] Boyer, P. D. and Stempel, K. Rapid Nucleotide Labeling and  $^{18}\text{O}$  Exchange Probes of Intermediate States in Electron-Transport-Coupled Phosphorylation. *Methods Enzymol.* **55**, 245-261 (1979)
- [6] Kayalar, C., Rosing, J. and Boyer, P. D. *Fed. Proc.* **35**, 1961 (1976)
- [7] Kayalar, C., Rosing, J. and Boyer, P. D. An Alternating Site Sequence for Oxidative Phosphorylation Suggested by Measurement of Substate Binding Patterns and Exchange Reaction Inhibitions. *J. Biol. Chem.* **25**, 2486-2491 (1977)

- 
- [8] Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. Evidence for three  $\alpha$  subunits in one molecule of  $F_1$ -ATPase from thermophilic bacterium PS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 117-122 (1978)
- [9] Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. and Ui, N. Subunit structure of adenosine triphosphatase. Comparison of the structure in thermophilic bacterium PS3 with those in mitochondria, chloroplasts, and *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 9525-9533 (1979)
- [10] Cross, R. L. The Mechanism and Regulation of ATP Synthesis by  $F_1$ -ATPases. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 681-714 (1981)
- [11] Gresser, M. J., Myers, J. A. and Boyer, P. D. Catalytic Site Cooperativity of Beef Heart Mitochondrial  $F_1$  Adenosine Triphosphatase. Correlations of Initial Velocity, Bound Intermediate, and Oxygen Exchange Measurements with an Alternating Three-site Model. *J. Biol. Chem.* **25**, 12030-12038 (1982)
- [12] Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. and Walker, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628 (1994)
- [13] Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L. and Cross, R. L. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia Coli*  $F_1$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10964-10968 (1995)
- [14] Sabbert, D., Engelbrecht, S. and Junge, W. Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* **381**, 623-625 (1996)
- [15] Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinosita, K. Jr. Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase. *Nature* **386**, 299-302 (1997)
- [16] Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr. and Yoshida, M.  $F_1$ -ATPase Is a Highly Efficient Molecular Motor that Rotates with Discrete 120° Steps. *Cell* **93**, 1117-1124 (1998)

- [17] Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr. and Itoh, H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **410**, 898-904 (2001)
- [18] Shimabukuro, K., Yasuda, R., Muneyuki, E., Hara, K. Y., Kinosita, K. Jr. and Yoshida, M. Catalysis and rotation of F<sub>1</sub> motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40° substep rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14731-14736 (2003)
- [19] Amano, T., Hisabori, T., Muneyuki, E. and Yoshida, M. Catalytic Activities of  $\alpha_3\beta_3\gamma$  Complexes of F<sub>1</sub>-ATPase with 1, 2, or 3 Incompetent Catalytic Sites. *J. Biol. Chem.* **271**, 18128-18133 (1996)
- [20] Weber, J., Lee, R., Grell, E., Wise, J. G. and Senior E. On the Location and Function of Tyrosine  $\beta$ 331 in the Catalytic Site of *Escherichia Coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem* **267**, 1712-1718 (1992)
- [21] Odaka, M., Kaibara, C., Amano, T., Matui, T., Muneyuki, E., Ogasahara, K., Yutani, K. and Yoshida, M. Tyr-341 of the  $\beta$  Subunit Is Major  $K_m$ -Determining Residue of TF<sub>1</sub>-ATPase: Parallel Effect of Its Mutations on  $K_{d(ATP)}$  of the  $\beta$  Subunit and on  $K_{m(ATP)}$  of the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  Complex. *J. Biochem.* **115**, 789-796 (1994)
- [22] Kaibara, C., Matsui, T., Hisabori, T. and Yoshida, M. Structural Asymmetry of F<sub>1</sub>-ATPase Caused by the  $\gamma$  Subunit Generates a High Affinity Nucleotide Binding Site. *J. Biol. Chem.* **271**, 2433-2438 (1996)
- [23] 有賀隆行『ハイブリッド F<sub>1</sub>-ATPase を用いた回転ステップの 1 分子解析』修士論文 (2000)
- [24] Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M. and Noji, H. Cross-linking of Two  $\beta$  Subunits in the Closed Conformation in F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 5701-5706 (1999)



- 
- [25] Hirono-Hara, Y., Noji, H., Nishiura, M., Muneyuki, E., Hara, K. Y., Yasuda, R., Kinoshita, K. Jr. and Yoshida, M. Pause and rotation of F<sub>1</sub>-ATPase during catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13649-13654 (2001)
- [26] Oster, G. and Wang, H. Why is the mechanical Efficiency of F<sub>1</sub>-ATPase so high? *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 459-469 (2000)
- [27] Oster, G. and Wang, H. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 482-510 (2000)
- [28] Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Itoh, H., Yoshida, M. and Kinoshita, K. Jr. Purine but not pyrimidine nucleotides support rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25480-25486 (2001)
- [29] Milgrom, Y. M., Murataliev, M. B. and Boyer, P. D. Bi-site activation occurs with the native and nucleotide-depleted mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochem. J.* **330**, 1037-1043 (1998)
- [30] Boyer, P. D. Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 252-262 (2000)
- [31] Kinoshita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H. and Adachi, K. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 473-489 (2000)
- [32] Weber, J. and Senior, A. E. Bi-site catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase: does it exist? *J. Biol. Chem.* **276**, 35422-35428 (2001)
- [33] Ren, H. and Allison, W. S. Substitution of  $\beta$ Glu<sub>201</sub> in the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* increases the affinity of catalytic sites for nucleotides. *J. Biol. Chem.* **275**, 10057-10063 (2000)

- [34] Menz, R. I., Walker, J. E. and Leslie, A. G. Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell* **106**, 331-341 (2001)
- [35] Yoshida, M., Muneyuki, E. and Hisabori, T. ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669-677 (2001)
- [36] Weber, J., Lee, R. S., Grell, E., Wise, J. G. and Senior, A. E. On the Location and Function of Tyrosine  $\beta$ 331 in the Catalytic Site of *Escherichia Coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 1712-1718 (1992)
- [37] Ono, S., Hara, K. Y., Hirao, J., Matsui, T., Noji, H., Yoshida, M. and Muneyuki, E. Origin of apparent negative cooperativity of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1607**, 35-44 (2003)
- [38] Amano, T., Tozawa, K., Yoshida, M. and Murakami, H. Spatial precision of a catalytic carboxylate of F<sub>1</sub>-ATPase beta subunit probed by introducing different carboxylate-containing side chains. *FEBS Lett.* **348**, 93-98 (1994)
- [39] Yoshida, M., Posper, J. W., Allison, W. S. and Esch, F. S. Identification of an essential glutamic acid residue in the  $\beta$  subunit of the adenosine triphosphatase from the thermophilic bacterium PS3 *J. Biol. Chem.* **256**, 148-153 (1981)
- [40] Ohtsubo, M., Yoshida, M., Ohta, S., Kagawa, Y., Yohda, M. and Date, T. In vitro mutated  $\beta$  subunits from the F<sub>1</sub>-ATPase of the thermophilic bacterium, PS3, containing glutamine in place of glutamic acid in positions 190 or 201 assemble with the  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits to produce inactive complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 705-710 (1987)
- [41] Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M. and Kinoshita, K. Jr. *Nature Struct. Mol. Biol.* In press (2003)

- 
- [42] Sakaki, N., Kon-Shimo, R., Itoh, H., Adachi, K., Furuike, E., Muneyuki, E., Yoshida, M. and Kinosita, K. Jr. Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase at extremely low ATP concentrations. 日本生物物理学会 第 41 回年会 (2003)
- [43] Higuchi, H. and Takemori, S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J Biochem (Tokyo)* **105**, 638-643 (1989)
- [44] Uemura, S., Higuchi, H. and Ishiwata, S. Substep triggered by ATP binding and Pi release in myosin V motor. 日本生物物理学会 第 41 回年会 (2003)
- [45] Ishiwata, S. Microscopic Studies on Dynamic Properties of Protein Motors and Cytoskeleton. *the 19th International Symposium in Conjunction with award of the International Prize for Biology* (2003)
- [46] Nadanaciva, S., Weber, J. and Senior, A.E. The role of  $\beta$ -Arg-182, an essential catalytic site residue in *Escherichia Coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **38**, 7670-7677 (1999)
- [47] Nadanaciva, S., Weber, J., Wilke-Mounts, S. and Senior, A.E. Importance of F<sub>1</sub>-ATPase Residue  $\alpha$ -Arg-376 for Catalytic Transition State Stabilization. *Biochemistry* **38**, 15493-15499 (1999)
- [48] Le, N.P., Omote, H., Wada, Y., Al-Shawi, M.K., Nakamoto, R.K. and Futai, M. *Escherichia coli* ATP Synthase  $\alpha$  Subunit Arg-376: The Catalytic Site Arginine Does Not Participate in the Hydrolysis/Synthesis Reaction but Is Required for Promotion to the Steady State. *Biochemistry* **39**, 2778-2783 (2000)
- [49] Kad, N.M., Rovner, A.S., Fagnant, P.M., Joel, P.B., Kennedy, G.G., Patlak, J.B., Warshaw, D.M. and Trybus, K.M. A mutant heterodimeric myosin with one inactive head generates maximal displacement. *J. Cell Biol.* **162**, 481-488 (2003)
- [50] Kaseda, K., Higuchi, H. and Hirose, K. Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1079-1082 (2003)

- [51] Kunkel, T. A., Bebenek, K. and McClary, J. Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Methods Enzymol* **204**, 125-39 (1991)
- [52] Milgrom, Y. M. and Boyer, P. D. The ADP that binds tightly to nucleotide-depleted mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase and inhibits catalysis is bound at a catalytic site. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 43-48 (1990)
- [53] Guerrero, K. J., Xue, Z. and Boyer, P. D. Active/Inactive state transitions of the chloroplast F<sub>1</sub> ATPase are induced by a slow binding and release of Mg<sup>2+</sup>. Relationship to catalysis and control of F<sub>1</sub> ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 16280-16287 (1990)
- [54] Jault, J. M., Matsui, T., Jault, F. M., Kaibara, C., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kagawa, Y. and Allison, W. S. The  $\alpha_3\beta_3\gamma$  complex of the F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 containing the  $\alpha$ D261N substitution fails to dissociate inhibitory MgADP from a catalytic site when ATP binds to noncatalytic sites. *Biochemistry* **34**, 16412-16418 (1995)
- [55] Matsui, T., Muneyuki, E., Honda, M., Allison, W. S., Dou, C. and Yoshida, M. Catalytic Activity of the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  Complex of F<sub>1</sub>-ATPase without Noncatalytic Nucleotide Binding Site. *J. Biol. Chem.* **272**, 8215-8221 (1997)
- [56] Kato, Y., Sasayama, T., Muneyuki, E. and Yoshida, M. Analysis of time-dependent change of *Escherichia Coli* F<sub>1</sub>-ATPase activity and its relationship with apparent negative cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 275-281 (1995)
- [57] Paik, S. R., Jault, J. M. and Allison, W. S. Inhibition and inactivation of the F<sub>1</sub> adenosinetriphosphatase from *Bacillus* PS3 by dequalinium and activation of the enzyme by lauryl demethylamin oxide. *Biochemistry* **33**, 126-133 (1994)
- [58] Milgrom, Y. M., Ehler, L. L. and Boyer, P. D. The characteristic and effect on catalysis of nucleotide binding to noncatalytic of chloroplast F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 11551-11558 (1991)

- 
- [59] Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Noji, H., Hara, K., Yoshida, M. and Hisabori, T.  $\alpha_3\beta_3\gamma$  complex of F<sub>1</sub>-ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 can maintain steady-state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites. *Biochem. J.* **343**, 135-138 (1999)
- [60] Masaike, T., Muneyuki, E., Noji, H., Kinoshita, K. Jr. and Yoshida, M. F<sub>1</sub>-ATPase changes its conformations upon phosphate release. *J. Biol. Chem.* **277**, 21643-21649 (2002)

# 発表(論文・学会)

## 論文

Takayuki Ariga, Tomoko Masaïke, Hiroyuki Noji, Masasuke Yoshida

“Stepping rotation of  $F_1$ -ATPase with one, two, or three altered catalytic sites that bind ATP only slowly.”

*Journal of Biological Chemistry*, July 2002, Vol. **277**, No. 28, 24870-24874

## 国際学会

- Takayuki Ariga, Katsuya Shimabukuro, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida.

“Rotation of  $F_1$ -ATPase(2): analysis of kinetic cooperativity and step rotation using hybrid enzymes.”

Biophysical Society 48<sup>th</sup> Annual Meeting, Baltimore, Maryland, 2004 February.

- Takayuki Ariga, Katsuya Shimabukuro, Masasuke Yoshida.

“Rotation of  $F_1$ -ATPase: analysis of kinetic cooperativity and step rotation using hybrid enzymes.”

Biophysical Society 47<sup>th</sup> Annual Meeting, San Antonio, Texas, 2003 March.

## 国内学会

- 有賀隆行、島袋勝弥、宗行英朗、吉田賢右

「ハイブリッド  $F_1$ -ATPase を用いた協同的な回転メカニズムの1分子解析」

第 41 回 生物物理学会年会 新潟 平成 15 年 9 月

- 有賀隆行、政池知子、野地博行、吉田賢右

「 $F_1$ -ATPase は ATP 結合の順番をよく守る回転分子モーターである」

第 25 回 日本分子生物学会年会 横浜 平成 13 年 12 月

- 有賀隆行、政池知子、野地博行、木下一彦、吉田賢右

「ハイブリッド  $F_1$ -ATPase を用いた回転ステップの 1 分子解析」

第 38 回 生物物理学会年会 仙台 平成 12 年 9 月

- 有賀隆行、政池知子、野地博行、木下一彦、吉田賢右

「ハイブリッド  $F_1$ -ATPase を用いた回転ステップの 1 分子解析」

生体エネルギー研究会第 26 回討論会 高知 平成 12 年 9 月

# 謝辞

本研究を行うにあたり、生化学、分子生物学に無知だった私を0から指導していただいた政池知子氏に心から感謝いたします。また、テーマや研究の指針を提供してくださった野地博行博士に感謝いたします。F<sub>1</sub>-ATPaseの反応速度論について指導していただいた宗行英朗博士に感謝いたします。

また回転観察についての指導などしていただいた木下一彦教授、安田涼平博士、西坂崇之博士、足立健吾博士を始めとする旧CREST Team13の皆様にも感謝いたします。

最後に、指導していただいた吉田賢右教授、共に研究生活を送った吉田・久堀研究室の皆様どうもありがとうございました。



# 目次

図 1 ATP 合成酵素の構造 .....	123
図 2 Boyer の提唱した交代結合説と回転仮説 .....	124
図 3 交代結合説による回転機構の模式図 .....	125
図 4 牛心筋ミトコンドリア F <sub>1</sub> -ATPase の結晶構造 .....	126
図 5 F <sub>1</sub> -ATPase 観察系 .....	127
図 6 F <sub>1</sub> -ATPase のサブステップ .....	128
図 7 触媒部位への ATP の結合 .....	129
図 8 野生型と FEFE 変異体の ATP 加水分解活性のタイムコース .....	130
図 9 FEFE 変異体の加水分解活性の ATP 濃度依存性 .....	131
図 10 野生型と FEFE 変異体の活性と回転速度 .....	132
図 11 活性化速度定数の ATP 濃度依存性 .....	133
図 12 ユニサイトへのヌクレオチド結合測定 .....	134
図 13 ビーズを用いた F <sub>1</sub> -ATPase 回転の観察系 .....	135
図 14 FEFE 変異体の回転ステップ観察 .....	136
図 15 FEFE 変異体の回転トルク .....	137
図 16 ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase 作製法の概要 .....	138
図 17 ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase 作製のゲルろ過と SDS 電気泳動 .....	139
図 18 1FEFE ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の ATP 加水分解活性測定 .....	140
図 19 1FEFE ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の回転ステップ観察 .....	141
図 20 2FEFE ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の ATP 加水分解活性測定 .....	142
図 21 2FEFE ハイブリッド F <sub>1</sub> -ATPase の回転ステップ観察 .....	143
図 22 触媒部位上の $\beta$ Glu190 残基 .....	144
図 23 $\beta$ E190D 変異体の回転観察 .....	145

図 24 $\beta$ E190D 変異体 $F_1$ -ATPase のサブステップ	146
図 25 簡略化したハイブリッド $F_1$ -ATPase 作製法の概要	147
図 26 1xE190D ハイブリッド $F_1$ -ATPase の回転観察	148
図 27 2xE190D ハイブリッド $F_1$ -ATPase の回転観察	149
図 28 溶液交換による低濃度 ATP での 1xE190D の回転観察	150
図 29 低濃度 ATP での 1xE190D の回転観察	151
図 30 ハイブリッド $F_1$ -ATPase の回転の模式図	152
図 31 協同的な回転機構のモデル	153
図 32 溶液交換による様々な条件での 1xE190D の回転観察	154
図 33 再生系なしの条件での 1xE190D の回転観察	155
図 34 $F_1$ -ATPase の BDM 濃度依存的な活性測定	156
図 35 1xE190D の BDM 濃度依存的な回転観察	157
図 36 $F_1$ -ATPase の触媒部位残基	158
図 37 $\beta$ R191K 変異体の回転観察	159
図 38 $\beta$ R256H 変異体の回転観察	160
図 39 $\beta$ E201V 変異体の特性	161
図 40 $\alpha$ R364K 変異体の回転観察	162
図 41 再生系を用いた ATP 活性測定のスキーム	163
図 42 フローセル	164
図 43 光学系	165

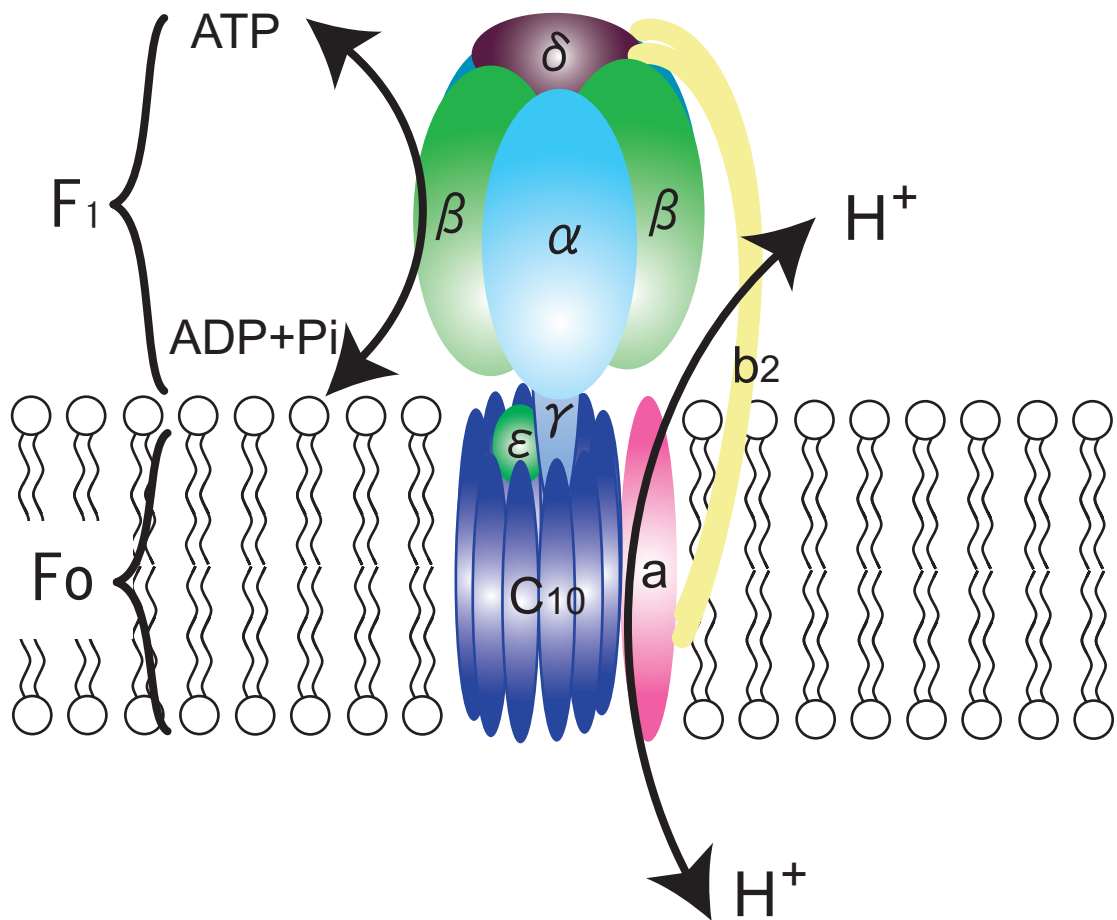


図1 ATP合成酵素の構造(模式図)

膜内に存在するF<sub>0</sub>部分(ab<sub>2</sub>c<sub>10</sub>)と膜の外に突き出ているF<sub>1</sub>部分(α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδε)からなる。水素イオンがF<sub>0</sub>部分を通り抜けるとF<sub>1</sub>部分でATPが合成される。逆にF<sub>1</sub>部分でATPが加水分解されるとF<sub>0</sub>部分で水素イオンが輸送される。

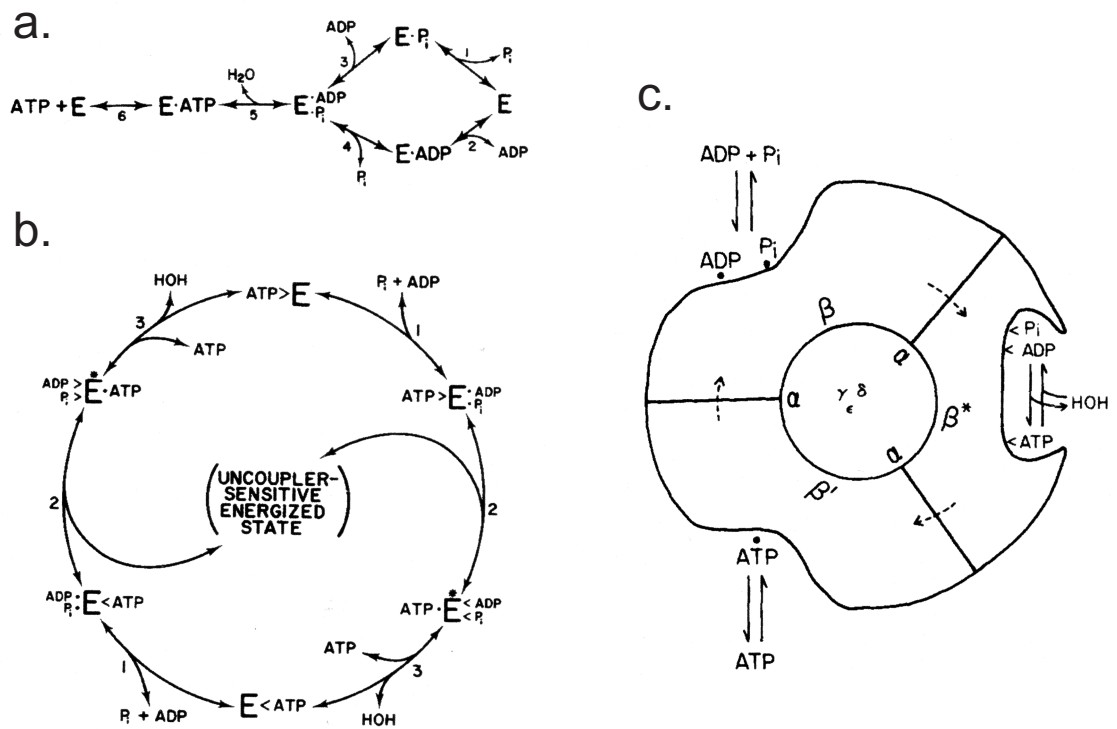


図2 Boyerの提唱した交代結合説と回転仮説

- a. 単純な触媒モデル。このモデルでは酸素交換反応の結果が説明つかない。
- b. 2モードでの交代結合モデル。図の><は固く基質が結合している状態を示し、中点は弱い結合を示す。エネルギー状態の変化により、基質の結合状態が変化する。
- c. 3モードでの交代結合説。3つの触媒部位の存在を反映して、3つのβサブユニットでの交代した働きと、それによるγサブユニットの回転を提唱している。(文献[7]と[11]より引用)

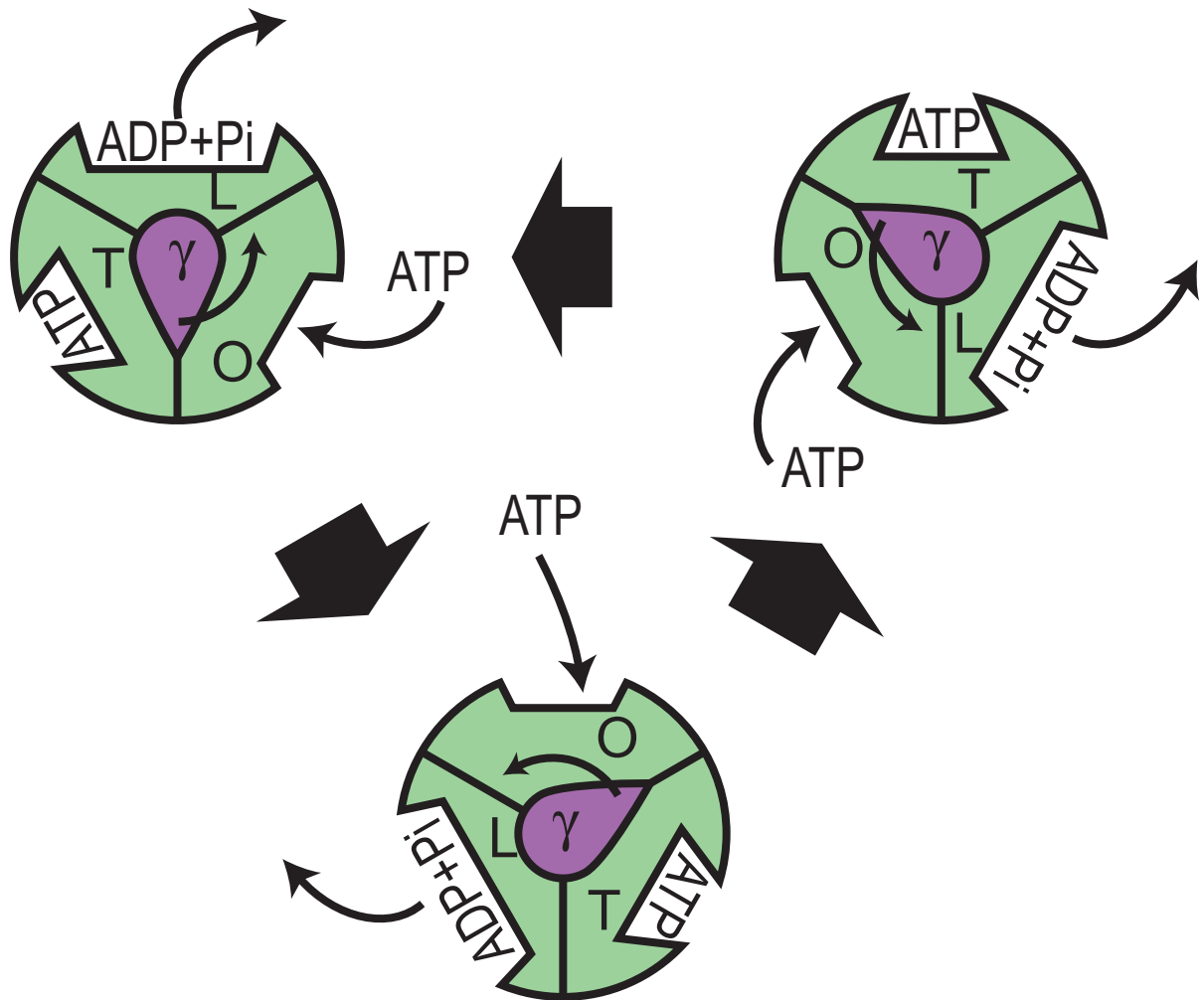


図3 交代結合説による回転機構の模式図

ATP加水分解反応では、ATP合成酵素の3ヶ所の触媒部位が、1つずつ位相をずらして順番に交代でO→T→L→Oと構造を変える。この構造変化により中心の軸(γサブユニット)が回転する。逆反応であるATP合成反応ではγサブユニットの回転に伴って逆向きに反応が進む。

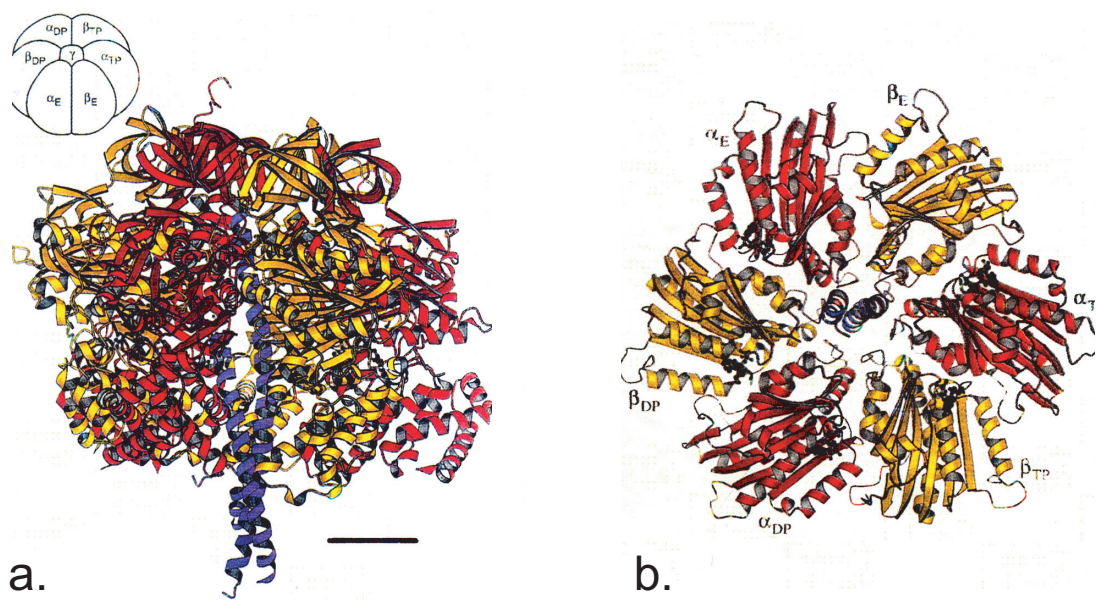


図4 牛心筋ミトコンドリアF<sub>1</sub>-ATPaseの結晶構造

a.横から見た図、b.上から見た図。バーは20 Å。

αサブユニットとβサブユニットが交互に並んでリング状の構造を作りその中心にγサブユニットが存在していた。3つのβサブユニットはそれぞれ違ったヌクレオチド結合状態(β<sub>TP</sub>, β<sub>DP</sub>, β<sub>E</sub>)をもっていた。(文献[12]より引用)

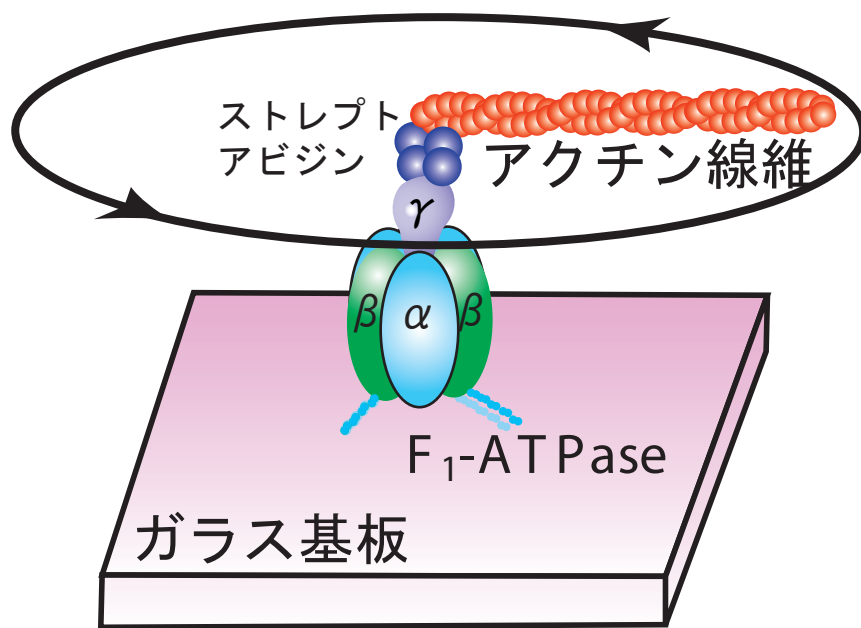


図5 F<sub>1</sub>-ATPase回転の観察系(模式図)

F<sub>1</sub>-ATPaseのγサブユニットにストレプトアビジンを介してアクチンフィラメントを結合させ、その回転を蛍光顕微鏡下で観察する。F<sub>1</sub>-ATPaseは、βサブユニットにつけられたHis-Tagによりガラス基板上に固定する。

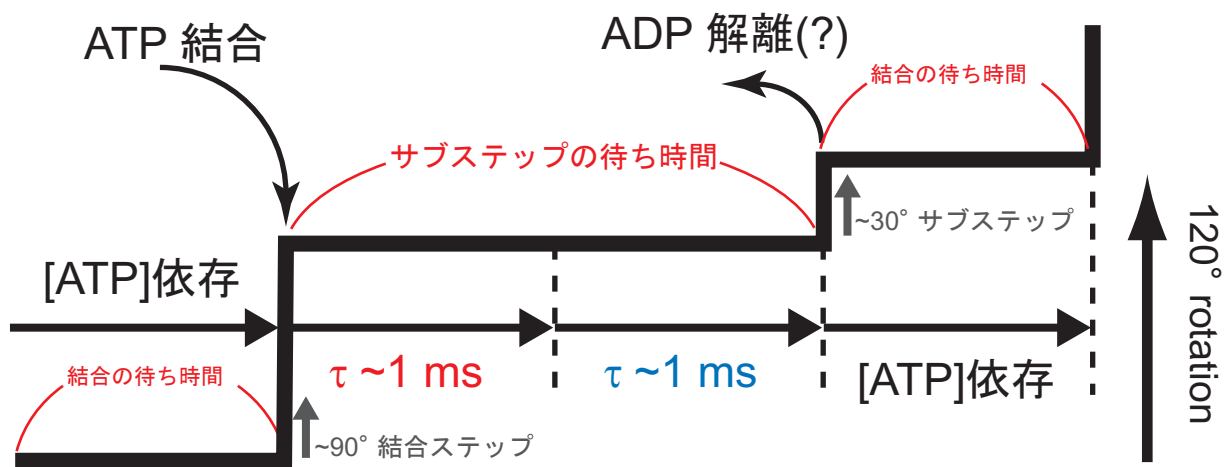


図6 F<sub>1</sub>-ATPaseのサブステップ (模式図)

1つのATP加水分解に対応する1つの120°ステップは、約90°のATP結合ステップ ( $k_{on} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )と2つの1 msの時定数を持つ待ち時間を持つ約30°のサブステップから構成されている。



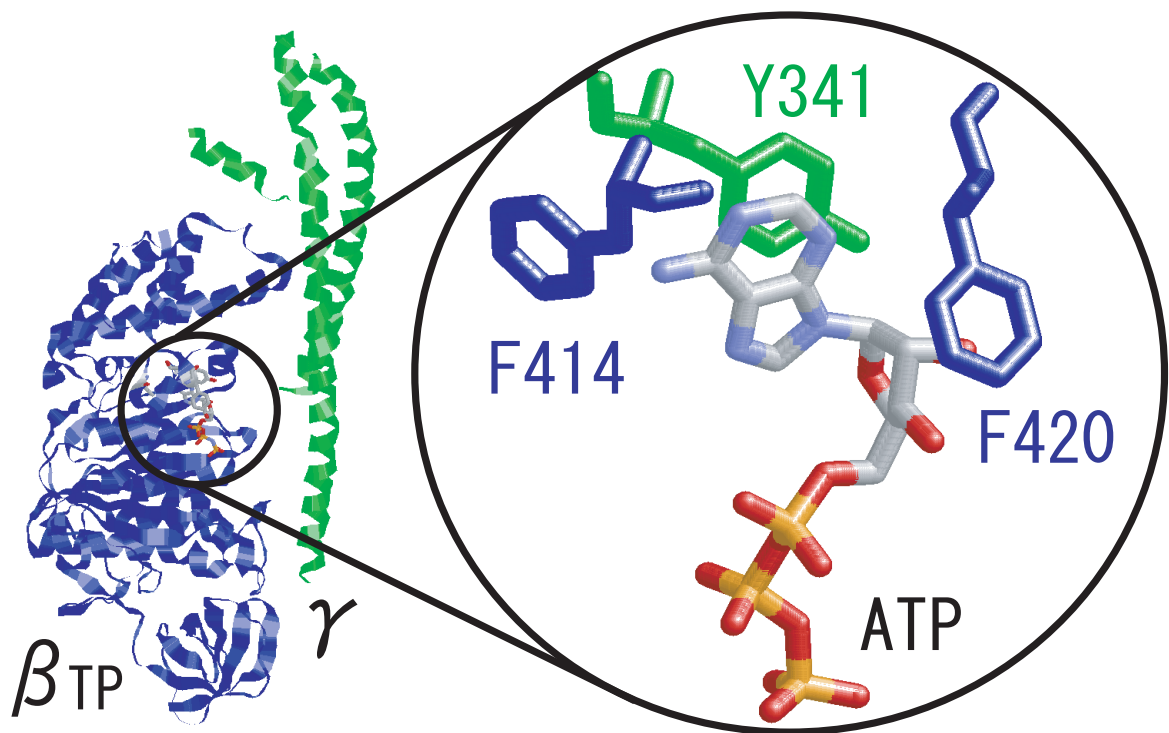


図7 触媒部位へのATPの結合

Walkerらによる結晶構造[12]より、左図はATP結合型の $\beta$ サブユニット( $\beta_{TP}$ )と $\gamma$ サブユニットを示した。右図はそのATP結合部位付近を拡大したもの。 $\beta$ サブユニット上の触媒部位へ結合したATPのアデニン環周辺には3つの芳香環をもった残基が配置されていて、ATPの結合を安定化する役割をしていると考えられる。

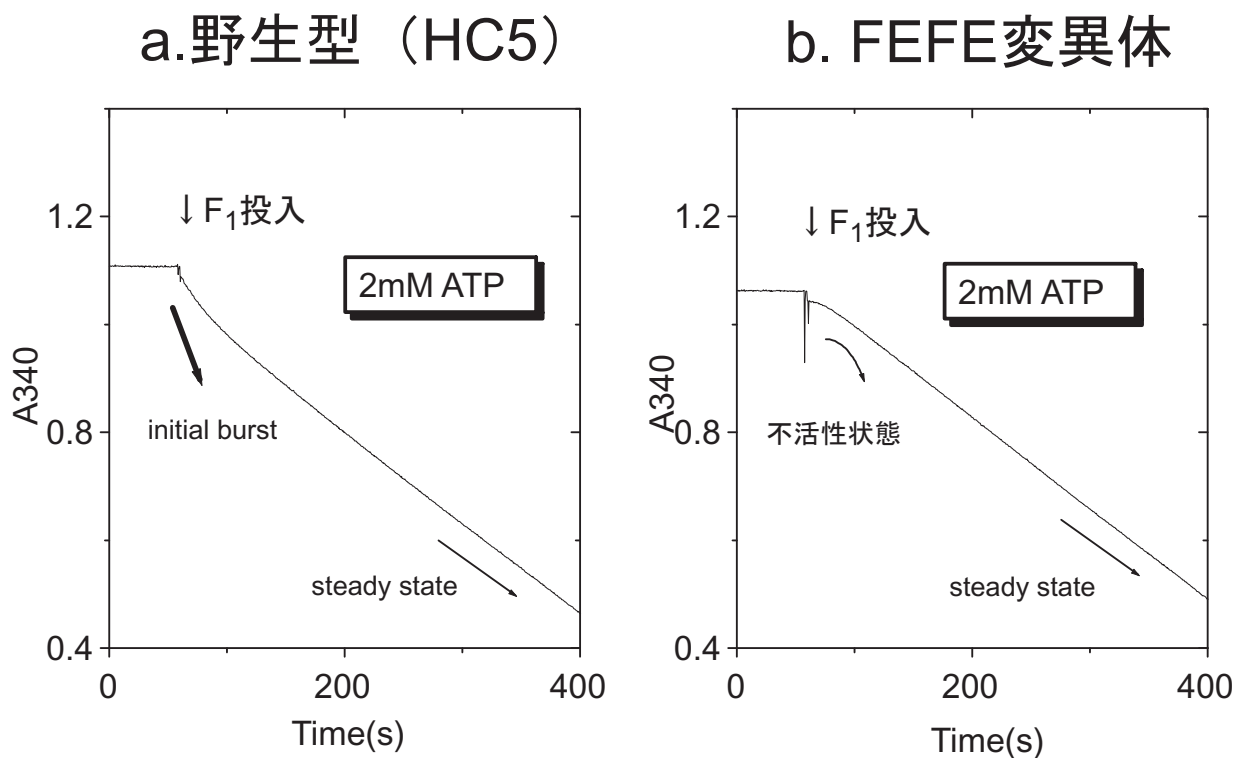


図8 野生型とFEFE変異体のATP加水分解活性のタイムコース  
 野生型F<sub>1</sub>-ATPase(a.)とFEFE変異体(b.)のATP加水分解活性をATP再生系により測定した。野生型では、活性測定初期に活性の高い状態(initial burst)があるのに対し、FEFE変異体では始めに活性の低い状態(lag)が存在していた。

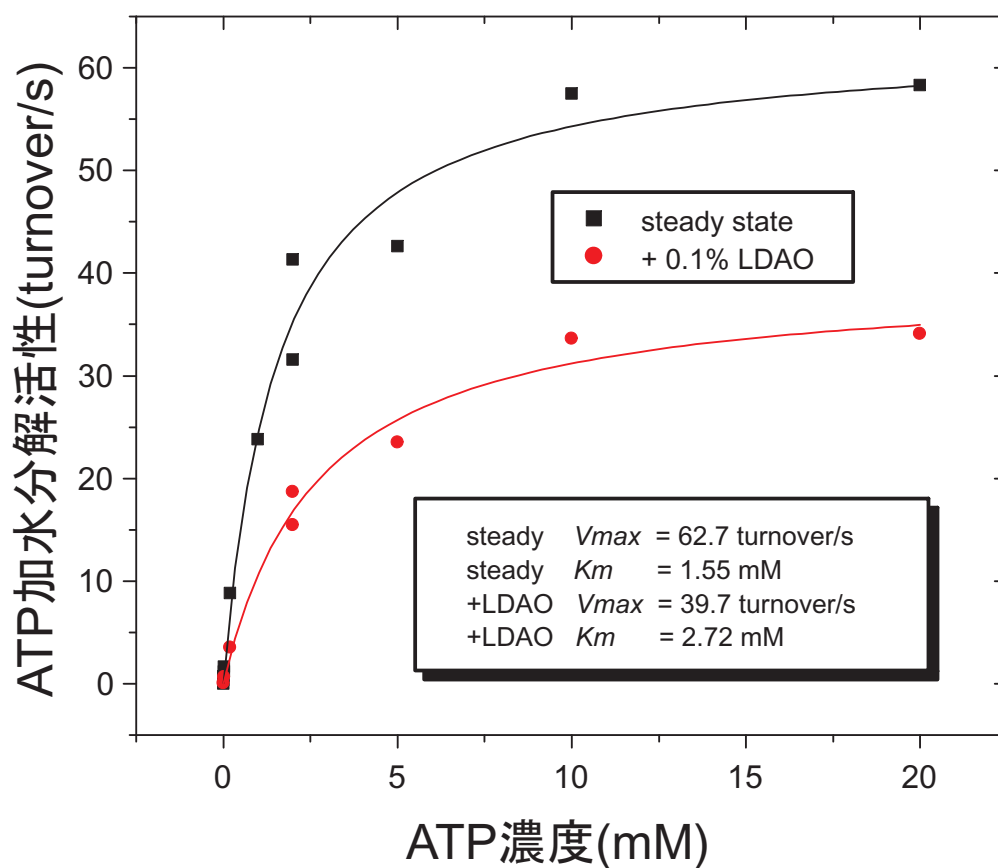


図9 FEFE変異体の加水分解活性のATP濃度依存性  
 FEFE変異体のsteady state活性および、0.1% LDAO存在下での加水分解活性をATP濃度に対してプロットした。実線はミカエリスメンテン式 $V=V_{max} \cdot S/(K_m + S)$ によるフィッティング曲線。steady活性の $K_m$ は約1.5 mMであり、野生型の約100倍となっていた。

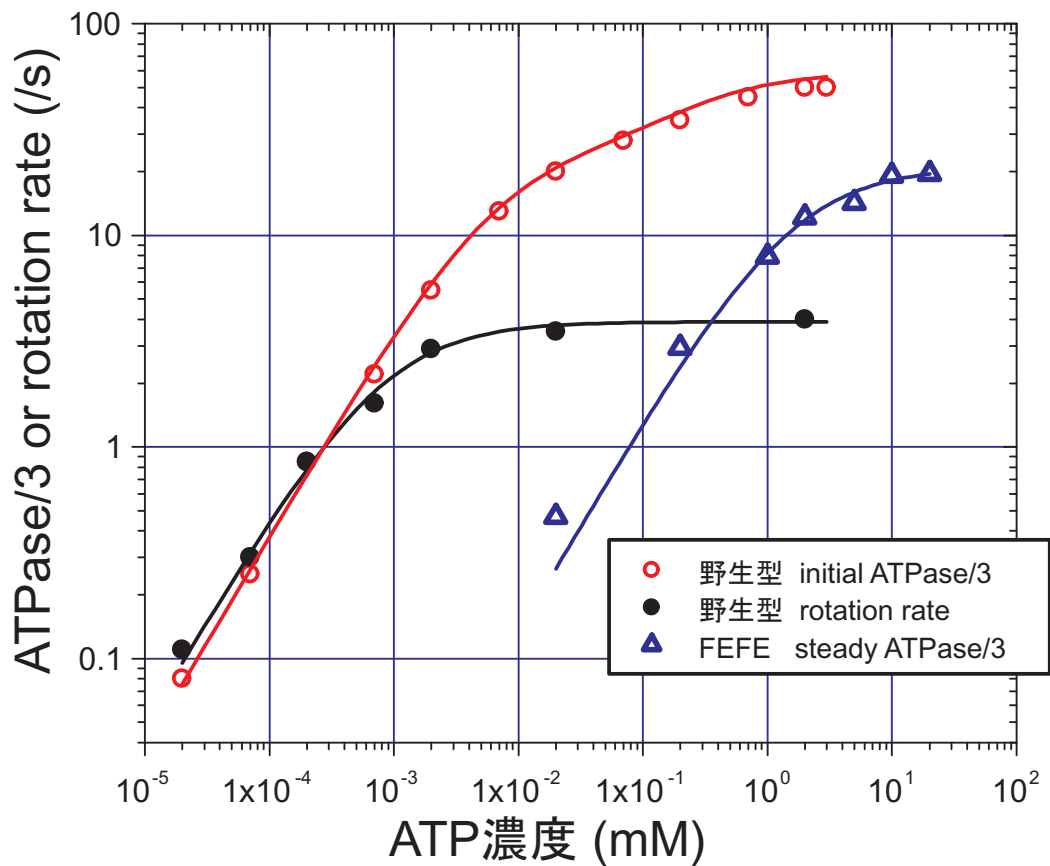


図10 野生型とFEFE変異体の活性と回転速度

野生型の活性と回転観察による回転速度(アクチン長 : 0.8-1.2  $\mu\text{m}$ ) およびFEFE変異体の活性を回転速度に換算してプロットした。野生型のデータは文献[16]からの引用である。実線はミカエリスメンテン式によるフィッティング曲線である。回転観察ではアクチンフィラメントにかかる負荷により5回転/sほどで頭打ちとなっている。野生型では回転速度が1回転/s以下になるとステップ状の回転が観察できるようになり、活性と対応した。FEFE変異体は100  $\mu\text{M}$ 以下で、1回転/s以下になるのでそれ以下のATP濃度ならばステップ状の回転が観察できると予想される。

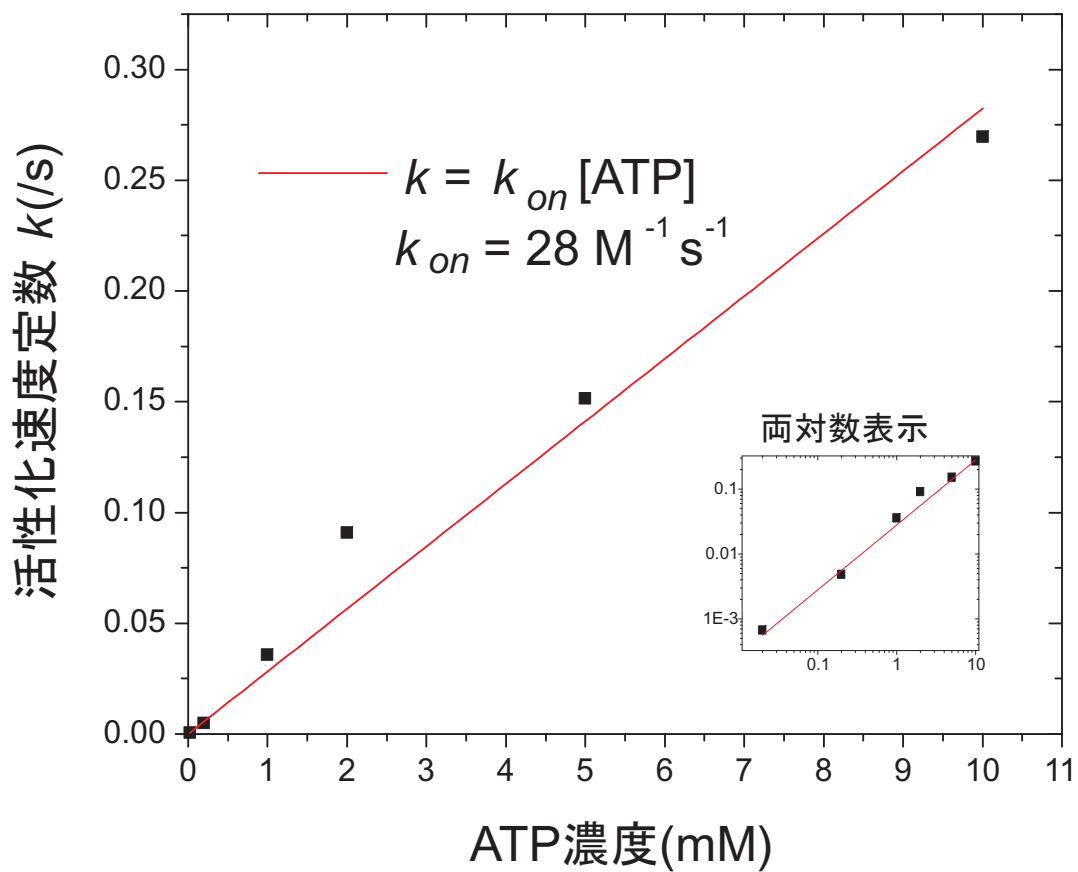


図11 活性化速度定数のATP濃度依存性  
 FEFE変異体の活性化速度を、ATP濃度に対してプロットした。  
 実線は直線  $k = k_{on}[\text{ATP}]$  でのフィッティングを示す。  
 その傾きから、 $k_{on} = 28 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と求まった。

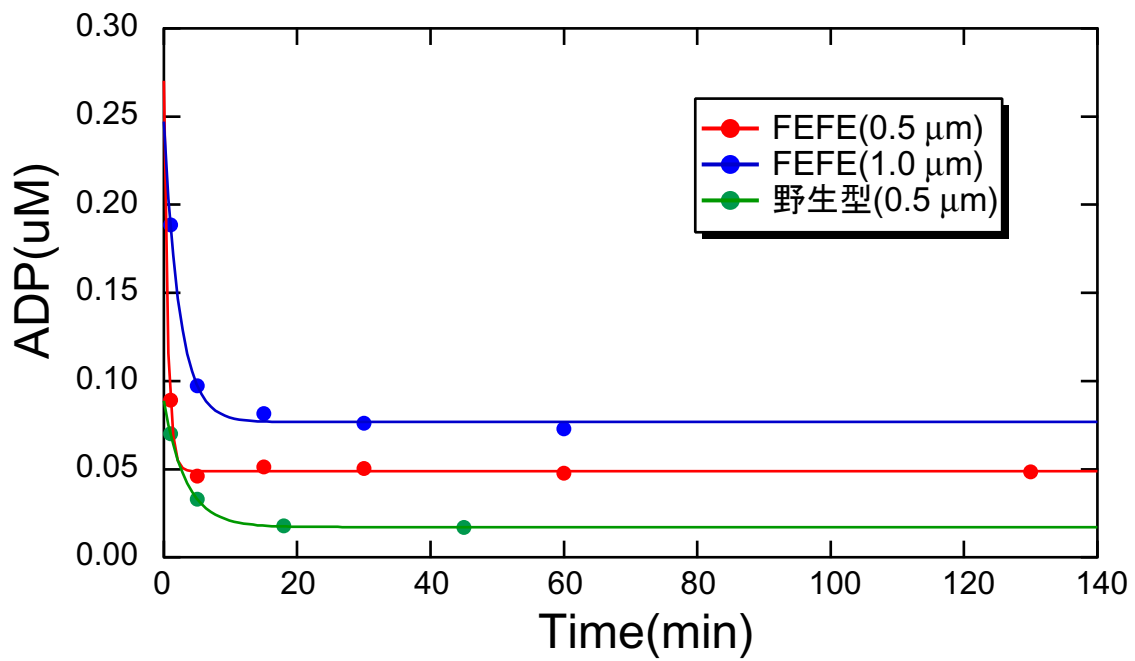


図12 ユニサイトへのヌクレオチド結合測定

各F<sub>1</sub>-ATPase(FEFE, 野生型)に対する、結合しなかったヌクレオチドの濃度を時間ごとにプロットした。濃度の低下は、その分だけヌクレオチドがサンプルへ結合したことを示している。FEFE変異体も野生型同様にヌクレオチドが速やかに結合していた。

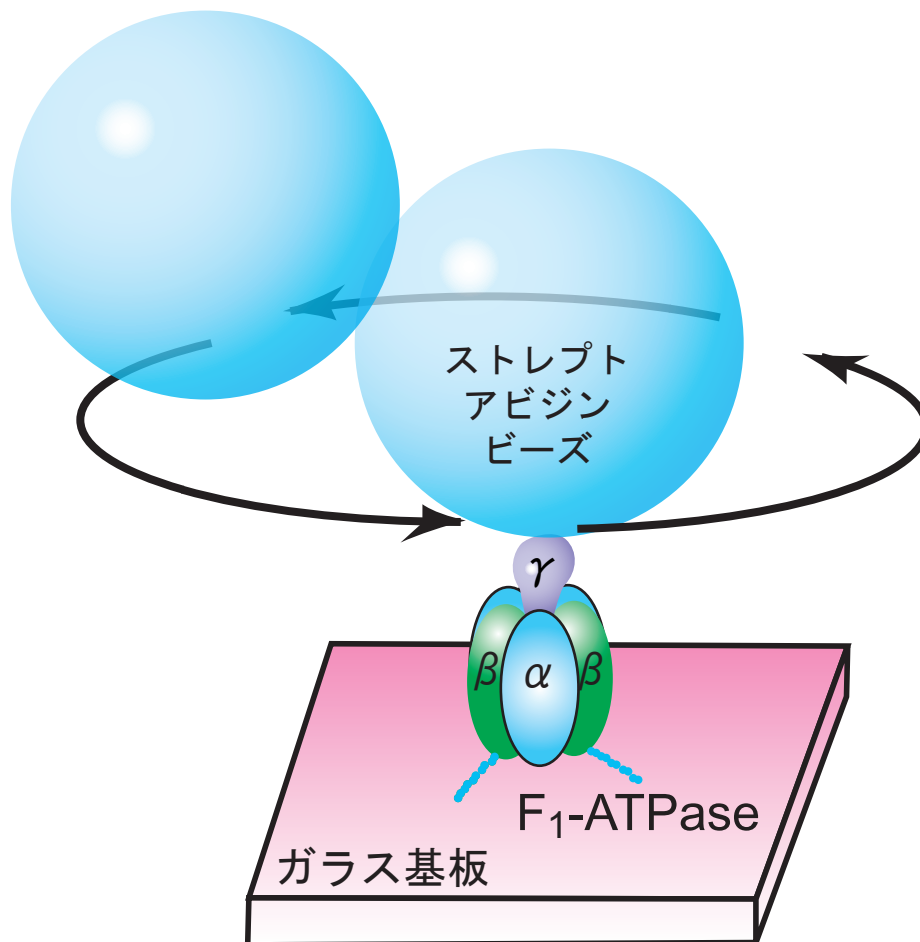


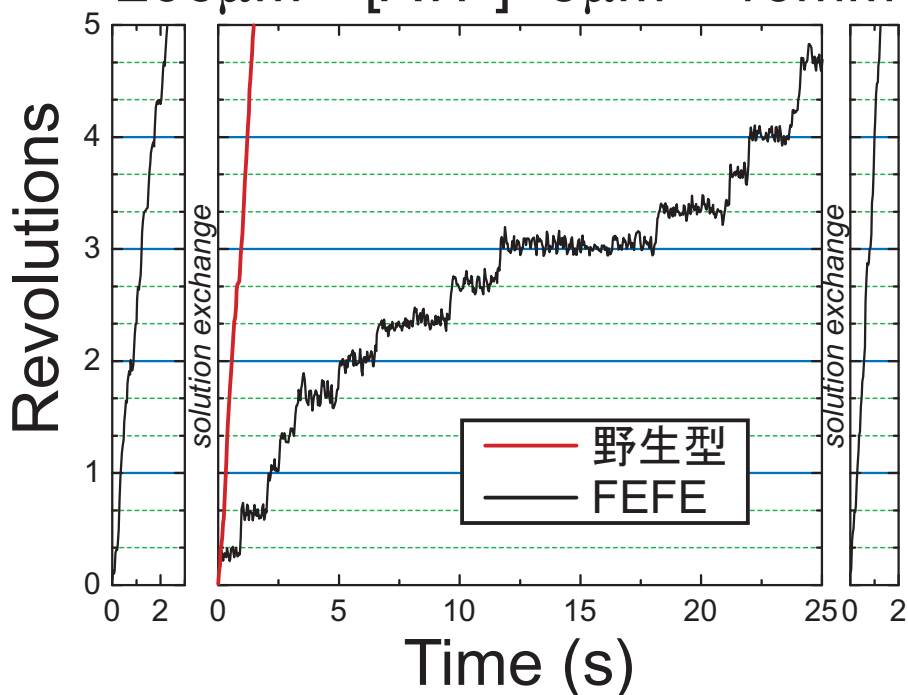
図13 ビーズを用いたF<sub>1</sub>-ATPase回転の観察系(模式図)

F<sub>1</sub>-ATPaseの $\gamma$ サブユニットに従来用いていたアクチンフィラメントの代わりに、ビーズを結合させ、その回転を位相差顕微鏡を用いて観察する。ビーズ1つでは回転の識別が難しいので、2個以上のアグリゲーションを形成したものの回転を観察する。

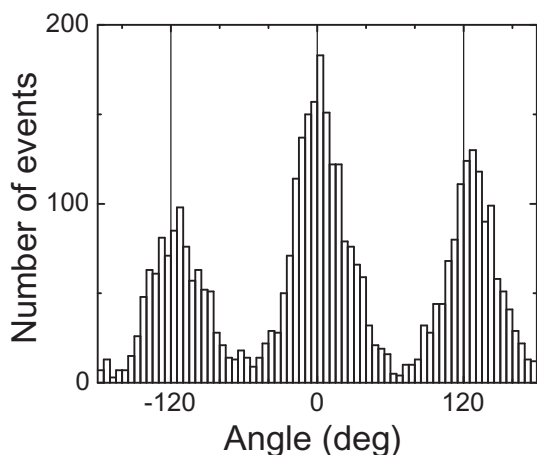
F<sub>1</sub>-ATPaseは、 $\beta$ サブユニットにつけられたHis-Tagによりガラス基板上に固定する。

a. 野生型およびFEFE変異体の回転

200 $\mu$ M  $\rightarrow$  [ATP]=5 $\mu$ M  $\rightarrow$  10mM



b. ステップの角度分布



c. 待ち時間のヒストグラム

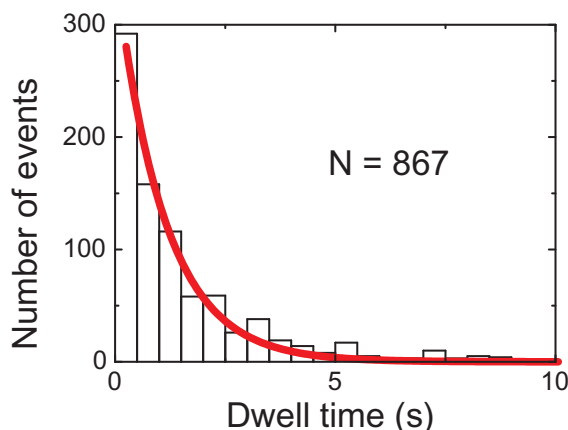


図14 FEFE変異体の回転ステップ観察

- 回転角度の時間経過。ATP濃度5 $\mu$ Mでは、野生型はスムーズに回転しているのに対し、FEFE変異体は120 $^{\circ}$ ごとにステップ状の回転が観察された。
- FEFE変異体の回転ステップの角度分布。図14aの5 $\mu$ Mの回転(140秒間)について角度のヒストグラムを取った。停止位置は120 $^{\circ}$ ごとに3点に分布していた。
- ステップの待ち時間のヒストグラム。[ATP]=5 $\mu$ Mでの23分子の回転ステップについてステップの待ち時間を測定した。実線は  $n=A\exp(-k_{on}[ATP]t)$  によるフィッティング曲線。但しAは定数である。この曲線より  $k_{on}=1.82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求めた。



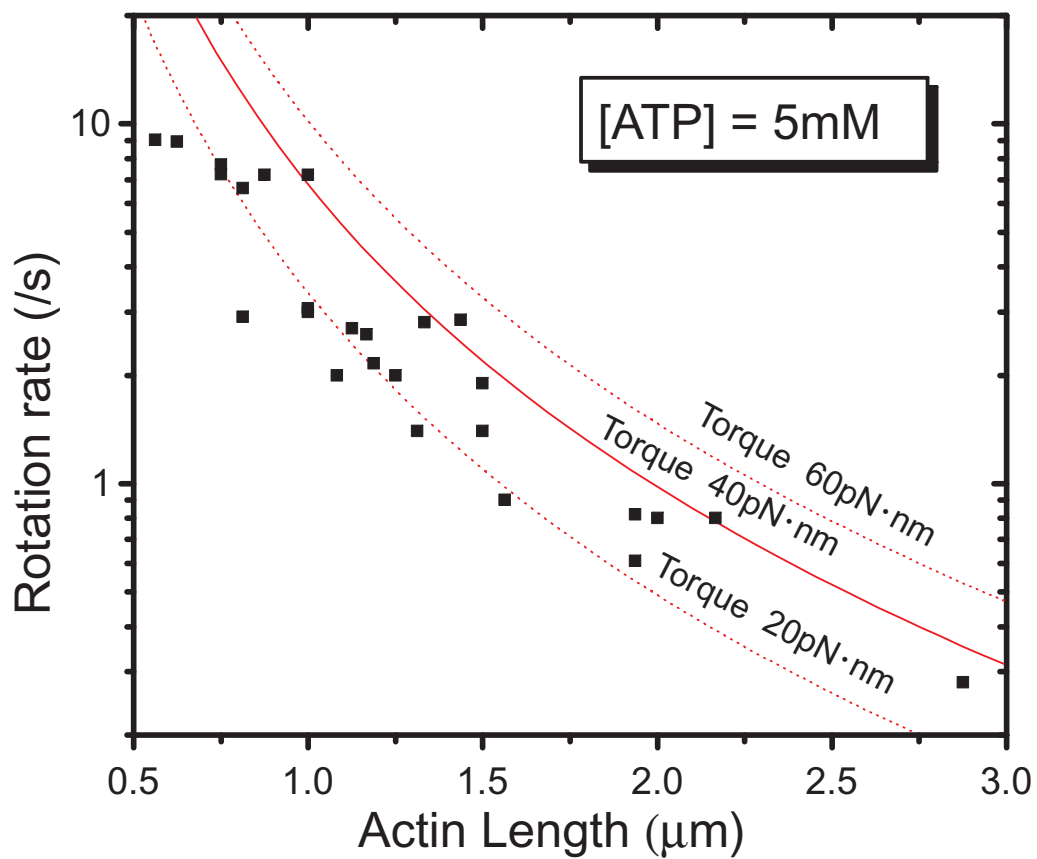


図15 FEFE変異体の回転トルク

アクチンフィラメントの長さや回転速度の関係をプロットした。実線と点線は一定トルク(20、40、60 pN·nm)での理論曲線。(付録B.5.3節参照)。FEFE変異体のトルクは最大40 pN·nmに達していた。

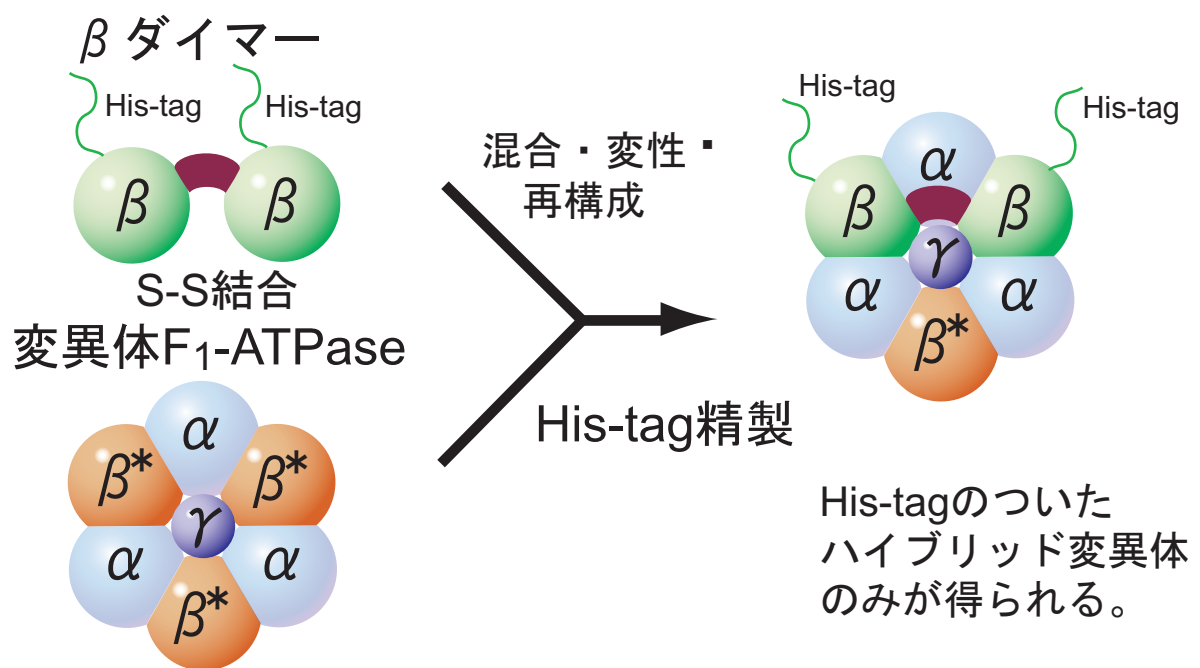


図16 ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase作成法の概要

Cys変異を利用したクロスリンクによりダイマー化したβサブユニットを変異体F<sub>1</sub>-ATPaseと混合・変性させ、再構成させる。それによりβサブユニット1つのみに変異の導入されたハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseを作成する。このとき、目的のハイブリッド変異体のみHis-tagが導入されていることを利用して、Ni-NTAカラムにより分離精製する。

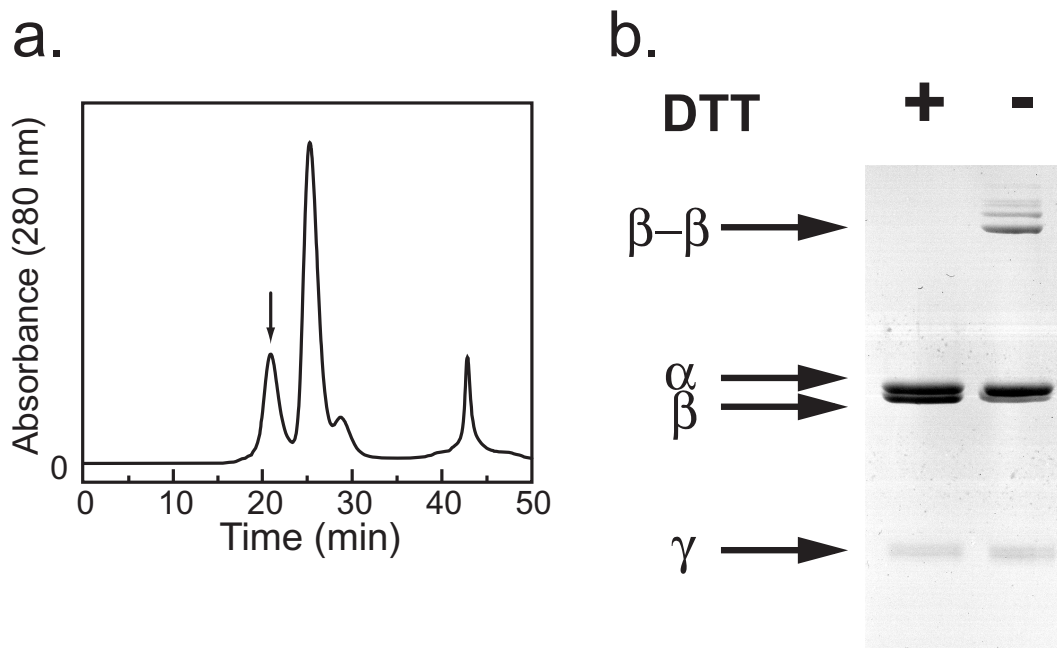


図17 ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase作製のゲルろ過とSDS電気泳動

a. 最終ゲルろ過の溶出。Ni-NTAで回収したHis-tagのついたサンプルをHPLCを用いてゲルろ過した溶出液を280 nmの吸光で検出した。矢印のピークがハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseに対応している。

b. 1FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの非還元SDS電気泳動。非還元条件(DTT-)ではβダイマーとβモノマーのバンドが両方存在しており、βモノマーのバンドはαに比べて1/3程度であった。10 mM DTTで1時間処理することにより還元したハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase (DTT+)には、αとβがおおよそ当量ずつ含まれていた。このβのバンドには還元されたβ<sub>His-tag</sub>2つ分のバンドとHis-tagのない変異体β1つのバンドが重なっていると思われる。

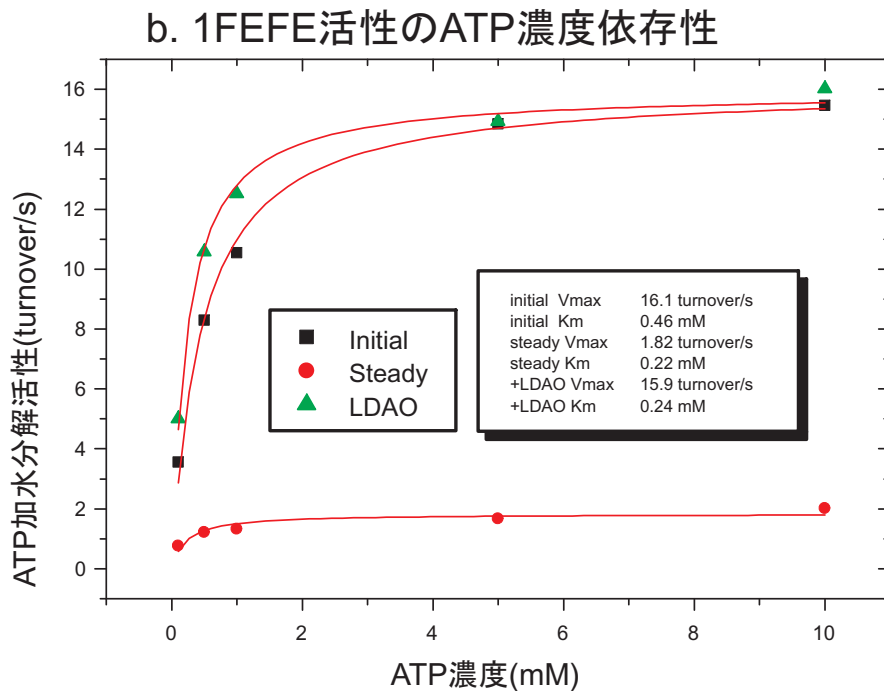
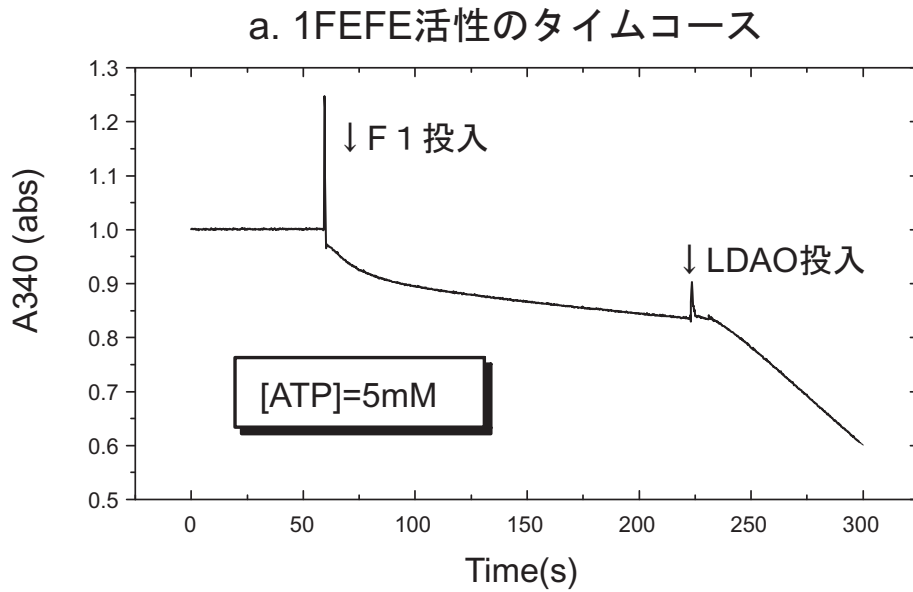
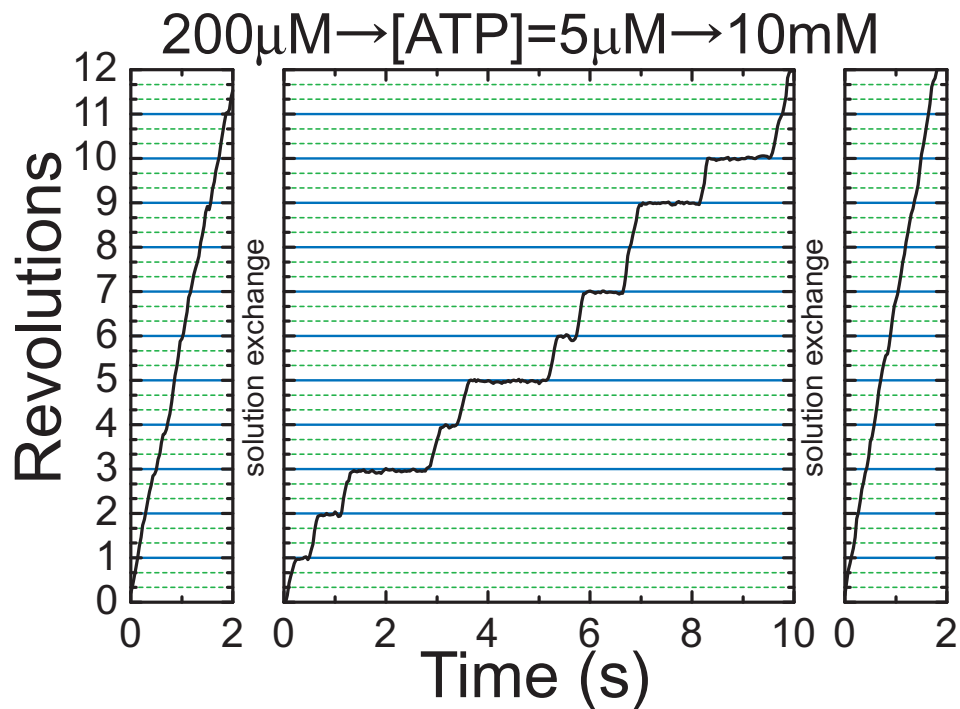


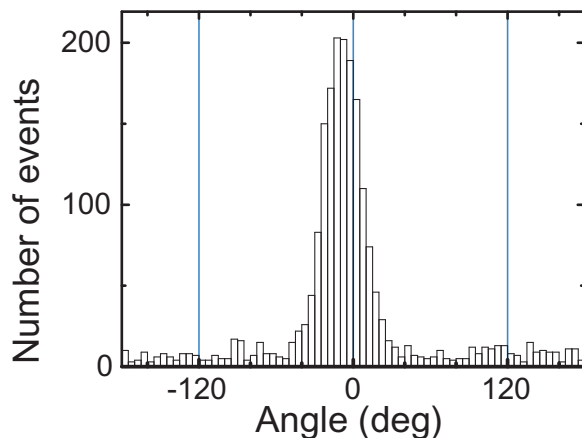
図18 1FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseのATP加水分解活性測定

- a. 1FEFE活性のタイムコース。活性初期の高い活性(initial burst)が存在し、続いて活性の低いsteady stateに陥った。0.1% LDAOを投入すると活性が回復した。
- b. 1FEFE活性のATP濃度依存性。1FEFEのATP加水分解活性をATP濃度に対してプロットした。実線はミカエリスメンテン式でのフィッティング曲線である。initial活性の $K_m$ は約0.5 mMであり、3FEFE変異体と同様に野生型に比べて大きくなっていた。

a. 1FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察



b. ステップの角度分布



c. 待ち時間のヒストグラム

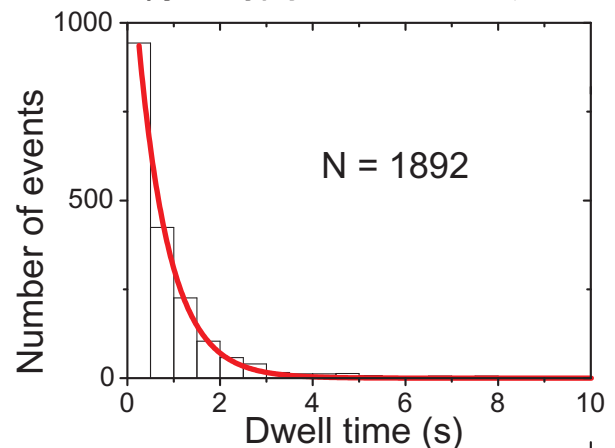
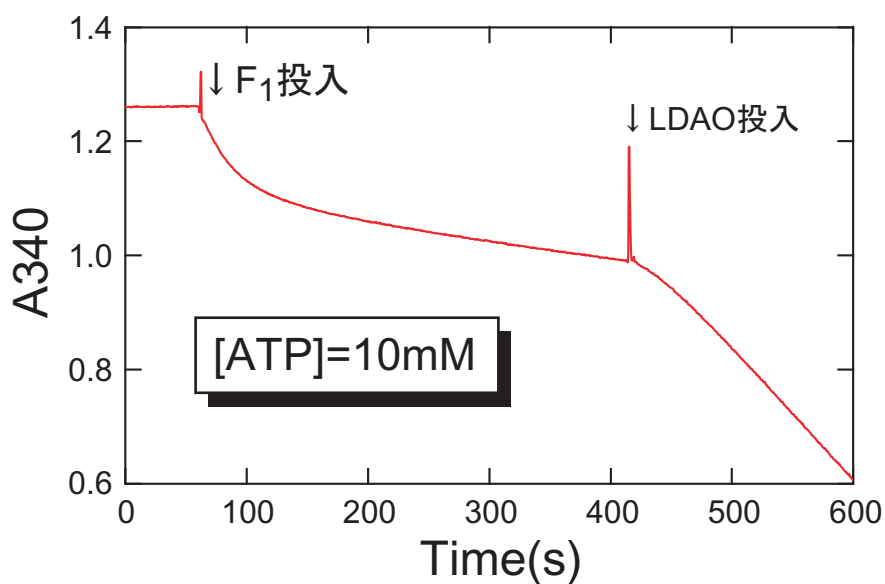


図19 1FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転ステップ観察

- a. ビーズの回転角度の時間変化。ATP濃度200  $\mu$ Mではスムーズに回転していたが、溶液交換によりATP濃度を5  $\mu$ Mにしたところ1回転に1度停止するステップ状の回転が観察された。再度溶液交換により10 mMにしたところ、またスムーズに回転した。
- b. ステップの角度分布。a.の5  $\mu$ Mの回転ステップの角度分布をプロットした。停止位置は1回転中の1点のみに存在していた。
- c. ステップの待ち時間のヒストグラム。観察された23個の分子について[ATP]=5  $\mu$ Mでステップの待ち時間を計測した。実線は $n=A\exp(-k_{on}[ATP]t)$ によるフィッティング曲線。但しAは定数である。この曲線よりステップする1点での $k_{on} = 3.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と求められた。

### a. 2FEFE活性のタイムコース



### b. 2FEFE活性のATP濃度依存性

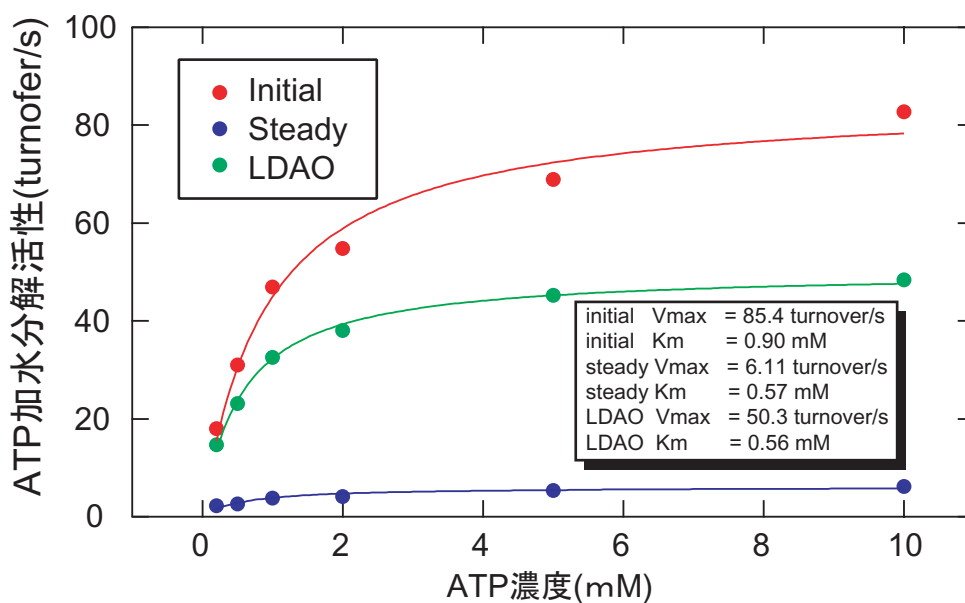


図20 2FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseのATP加水分解活性測定

#### a. 2FEFE活性のタイムコース

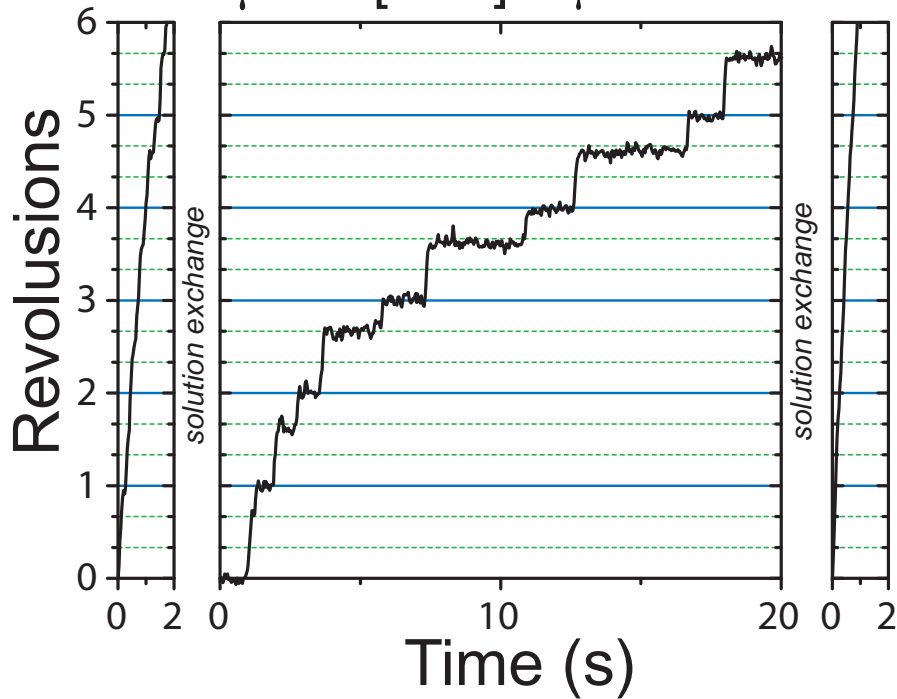
活性初期に高い活性(initial burst)が存在し、続いて活性の低い steady stateに陥った。0.1%LDAOを投入すると活性が回復した。

#### b. 2FEFE活性のATP濃度依存性

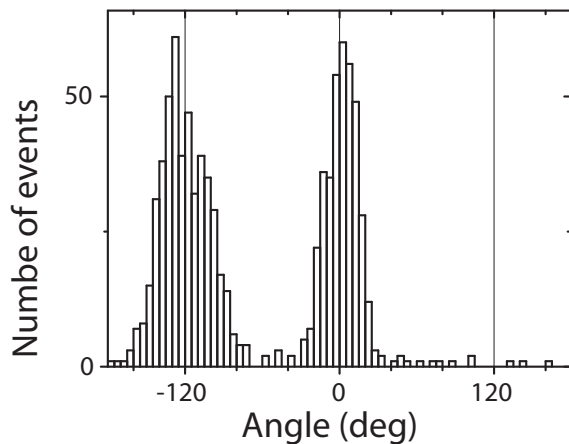
2FEFEのATP加水分解活性をATP濃度に対してプロットした。実線はミカエリスメンテン式でのフィッティング曲線である。

initial活性のK<sub>m</sub>は約0.9 mMであり、1FEFEの約2倍となっていた。

a. 2FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察  
200μM→[ATP]=5μM→10mM



b. ステップの角度分布



c. 待ち時間のヒストグラム

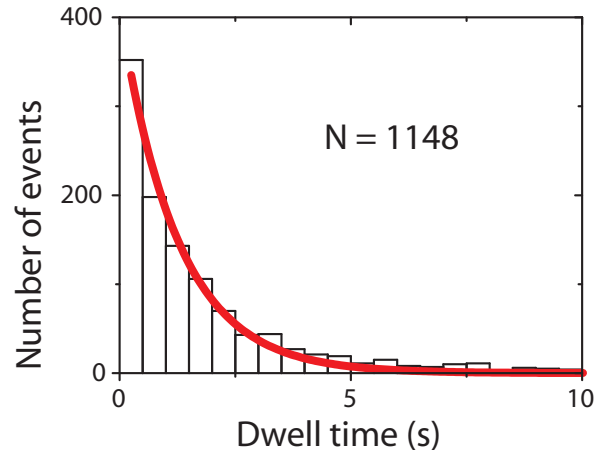


図21 2FEFEハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転ステップ観察

- a. ビーズの回転角度の時間変化。ATP濃度200 μMではスムーズに回転していたが、溶液交換によりATP濃度を5 μMにしたところ1回転に1度停止するステップ状の回転が観察された。再度溶液交換により10 mMにしたところ、またスムーズに回転した。
- b. ステップの角度分布。a.の5 μMでの回転ステップの角度分布をプロットした。停止位置は1回転中の2点のみに存在していた。
- c. ステップの待ち時間のヒストグラム。観察された8個の分子について[ATP]=5 μMでのステップの待ち時間を計測した。実線は  $n=A\exp(-k_{on}[ATP]t)$  によるフィッティング曲線。但しAは定数である。この曲線よりステップする2点での  $k_{on} = 1.60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求められた。

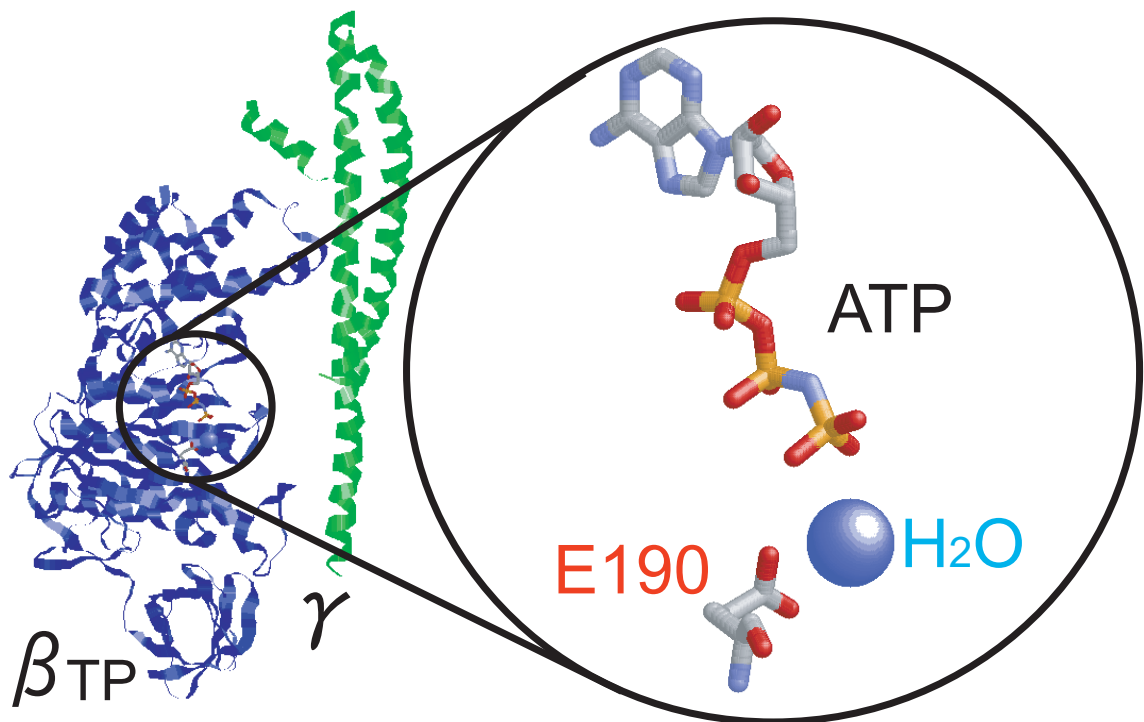


図22 触媒部位上のβGlu190残基

Walkerらによる結晶構造[12]より、左図はATP結合型のβサブユニット(β<sub>TP</sub>)とγサブユニットを示した。右図はそのATP結合部位付近を拡大したもの。触媒部位へ結合したATPのγリン酸基を求核攻撃する水分子と、E190残基のグルタミン酸残基が相互作用している。E190残基は加水分解反応に深く関わっていると考えられる。



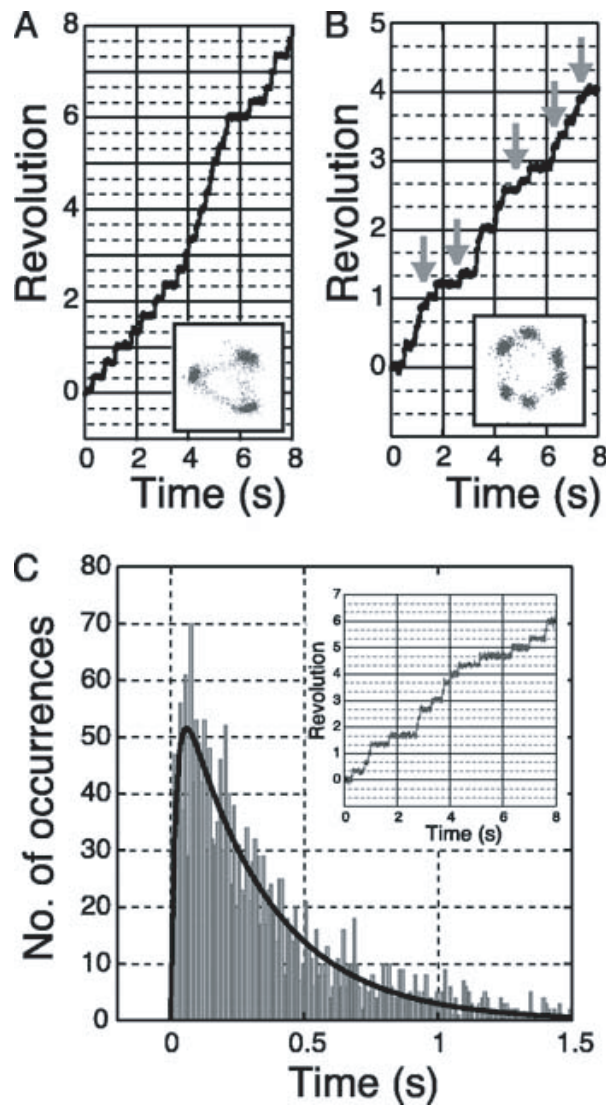


図23  $\beta$ E190D変異体の回転観察(文献[18]より引用)

(A,B)  $\beta$ E190D変異体の回転のタイムコース。[ATP]=2 mM(A)と [ATP]=2  $\mu$ M(B)の回転角度の時間分布を示している。insetはビーズの輝度重心の分布を示している。矢印は40°サブステップの位置を指示している。

(C) [ATP]=2 mMでの待ち時間のヒストグラム。実線は $A \times (\exp(-k_1 \times t) - \exp(-k_2 \times t))$ でのフィッティング曲線。ただしAは定数であり、 $k_1=50.3 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2=3.12 \text{ s}^{-1}$ であった。

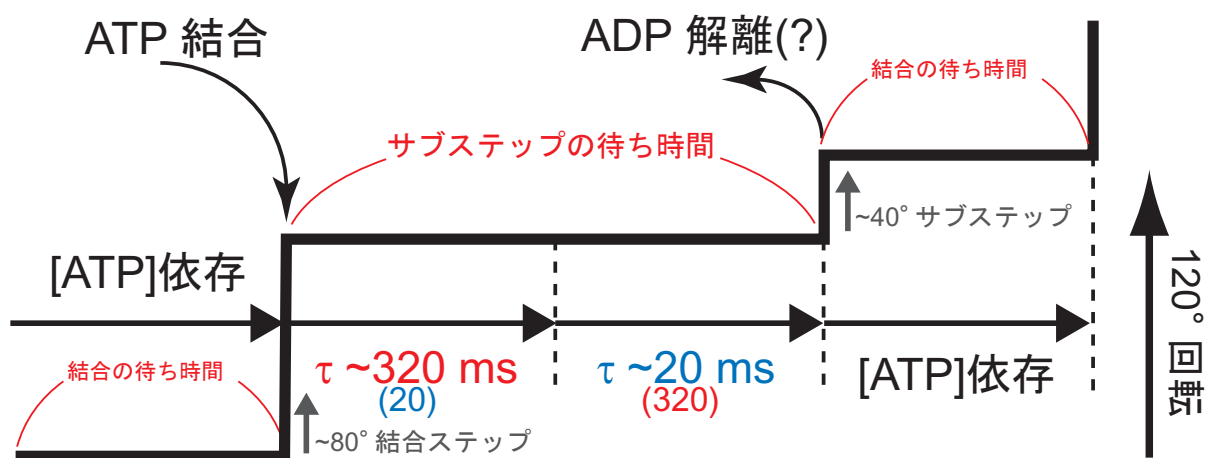
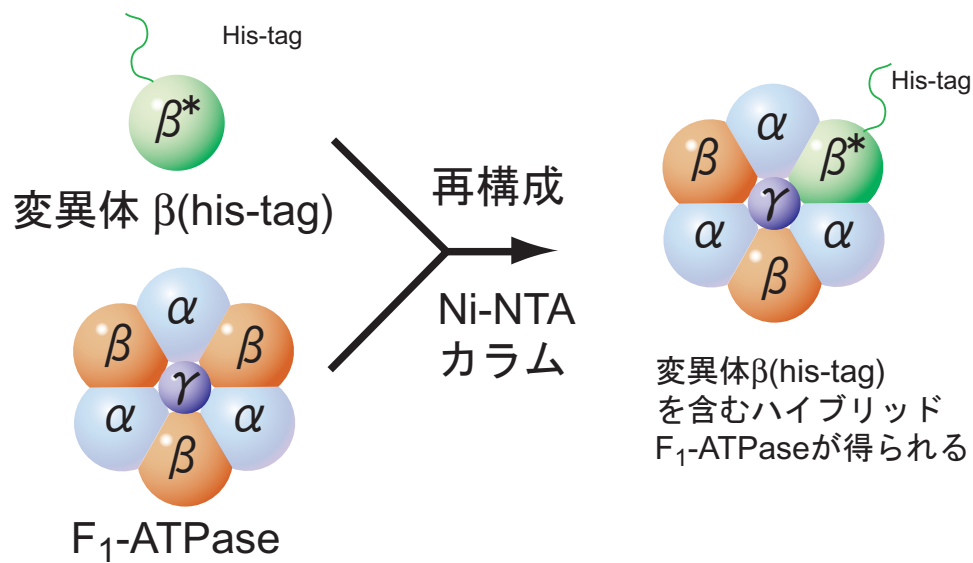


図24  $\beta E190D$ 変異体 $F_1$ -ATPaseのサブステップ (模式図)

1つのATP加水分解に対応する1つの $120^\circ$ ステップは、約 $80^\circ$ のATP結合ステップ ( $k_{on} = 3 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )と約 $320\text{ ms}$ と約 $20\text{ ms}$ の二つの時定数を持つ待ち時間を持つ約 $40^\circ$ のサブステップから構成されている。

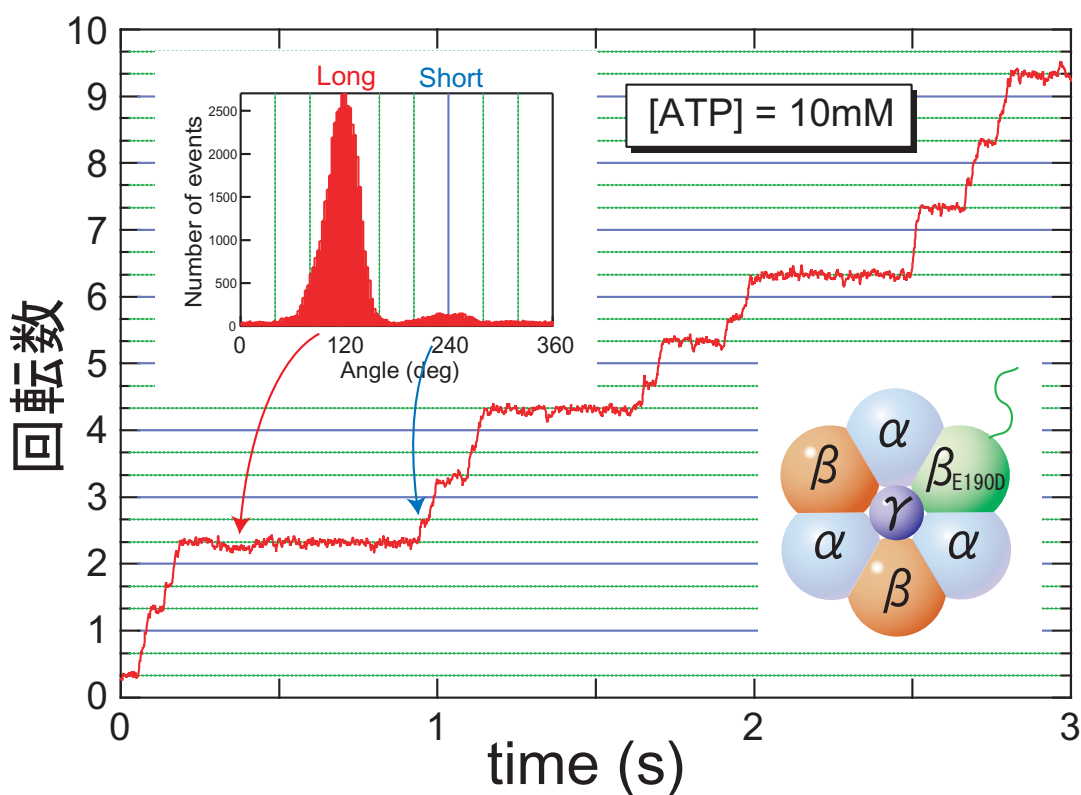


### 図25 簡略化したハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPase作製法の概要

変異 $\beta$ サブユニットを野生型のF<sub>1</sub>-ATPaseと混合・変性させ、再構成させる。それにより $\beta$ サブユニット1つのみに変異の導入されたハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseを作成する。

このとき、目的のハイブリッド変異体のみにHis-tagが導入されていることを利用して、Ni-NTAカラムにより分離精製する。混ぜる変異 $\beta$ サブユニットの混合比を減らせば減らすほど得られるハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseは、1つのみ導入されたものが主となる。

## a. 1xE190Dの回転観察



## b. 停止時間の時間分布

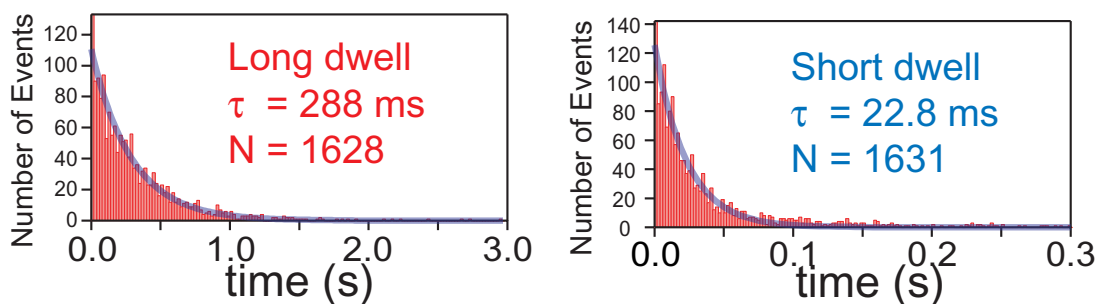
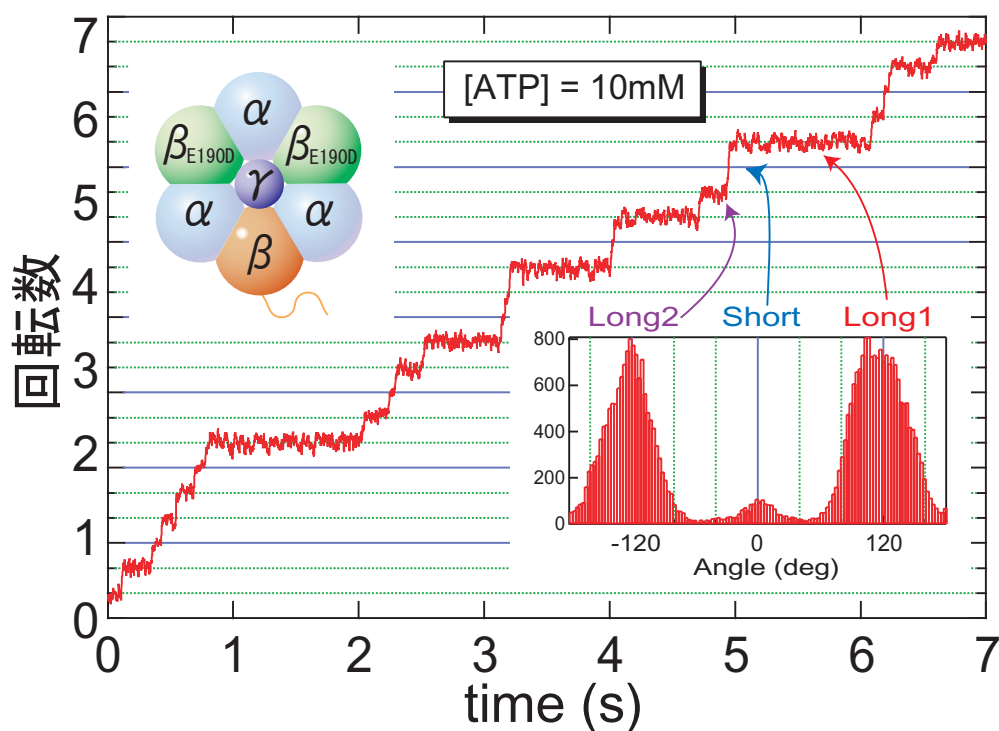


図26 1xE190DハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

- [ATP]=10 mM での回転観察の結果、ある1分子について回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)とを示した。1回転中に長い停止(long dwell)と、その120°後に短い停止(Short dwell)が存在していた。
- 長い停止 (Long dwell)と短い停止(Short dwell)の待ち時間を10分子について計測した結果のヒストグラム。実線はヒストグラムの1次の指数関数式  $n=A \cdot \exp(-t/\tau)$  でのフィッティング。ただしAは定数である。これよりそれぞれの時定数がLong = 288 msとShort = 22.8 msと求められた。

## a. 2xE190Dの回転観察



## b. 停止時間の時間分布

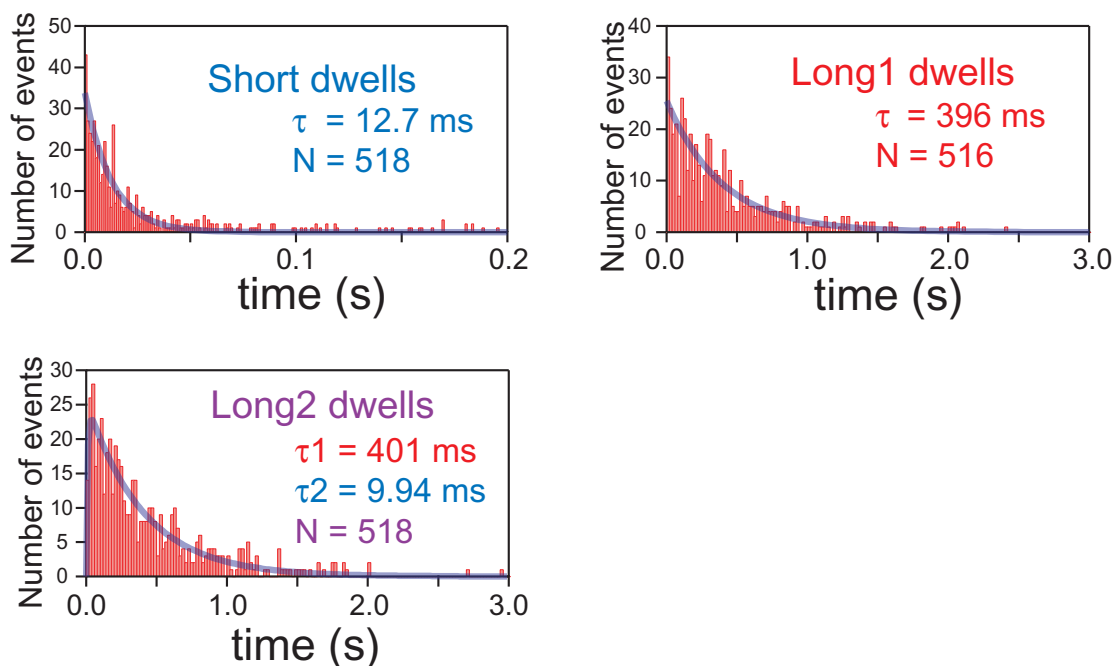


図27 2xE190DハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

- [ATP]=10 mM での回転観察の結果、ある1分子について回転数の時間変化とinsetに角度分布(右下)とを示した。1回転中に120°おきに、短い停止(Short dwell)と2つの長い停止 (Long1 dwellとLong2 dwell)が存在していた。
- それぞれの待ち時間をすべての分子で計測した結果のヒストグラム。実線はヒストグラムの1次または2次の指数関数式でのフィッティング曲線。これよりそれぞれの時定数がShort = 12.7 ms、Long1 = 396 ms、Long2 = 401 ms & 9.94 msと求められた。

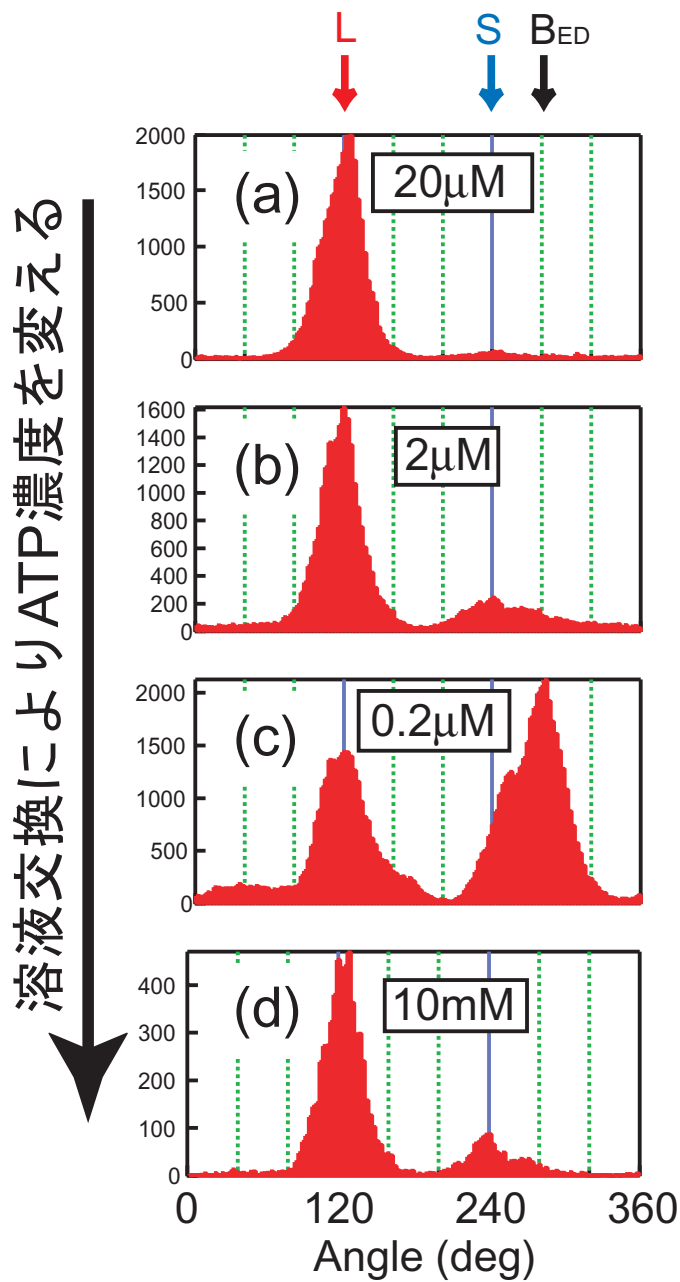


図28 溶液交換による低濃度ATPでの1xE190Dの回転観察  
 1xE190Dの回転を(a)[ATP]=20  $\mu$ Mから、(b)[ATP]=2  $\mu$ M、(c)  
 [ATP]=0.2  $\mu$ M、(d)[ATP]=10 mMへと溶液交換しながら回転観  
 察を行った結果の角度分布をそれぞれプロットした。ATP濃  
 度を下げるにしたがって、短い停止の約40° 後ろである280°  
 の位置で新たな停止が現れていた。各条件での回転速度は、  
 それぞれ(a)1.8回転/s、(b)1.7回転/s、(c)0.5回転/s、(d)1.2回  
 転/sであった。

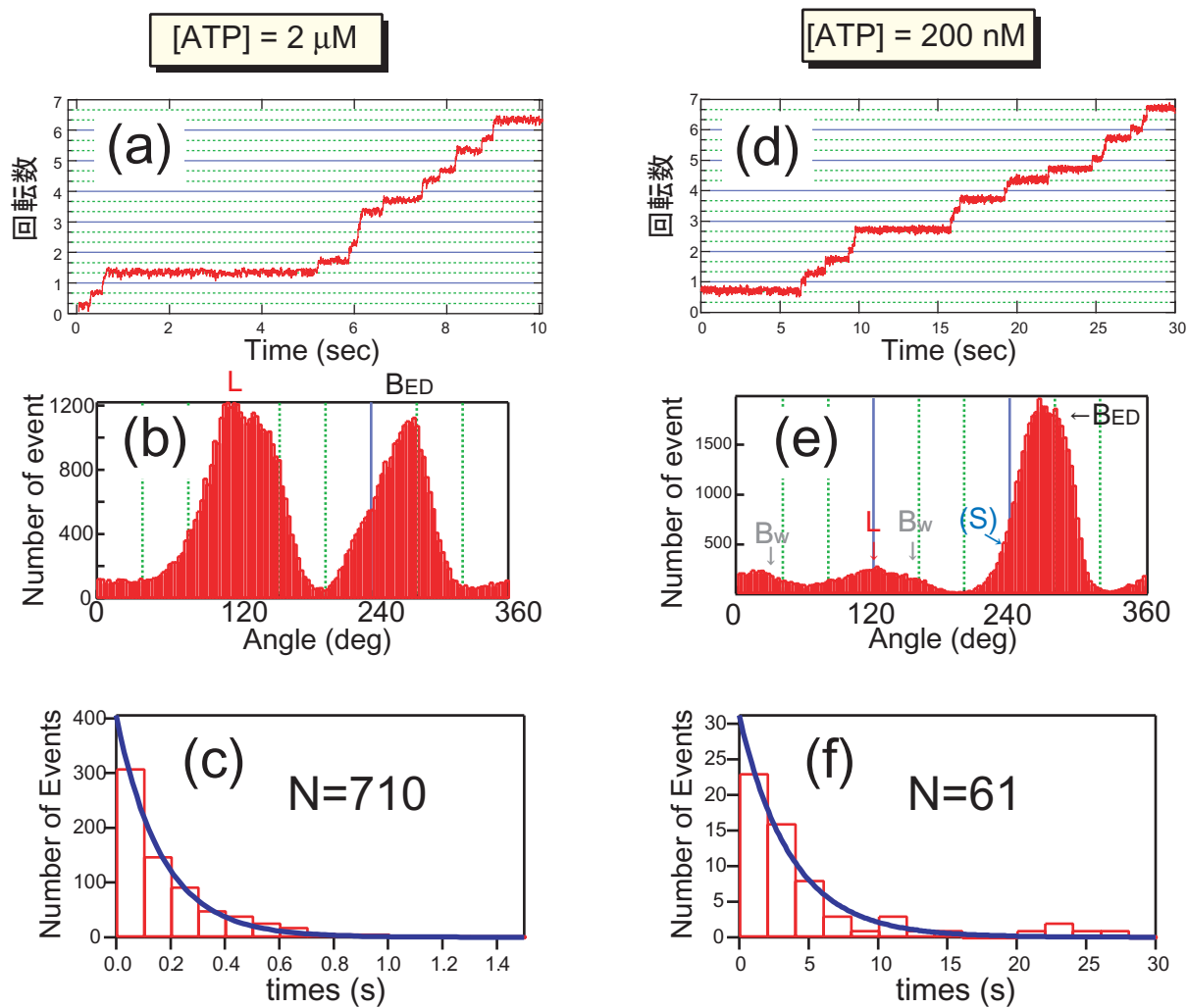
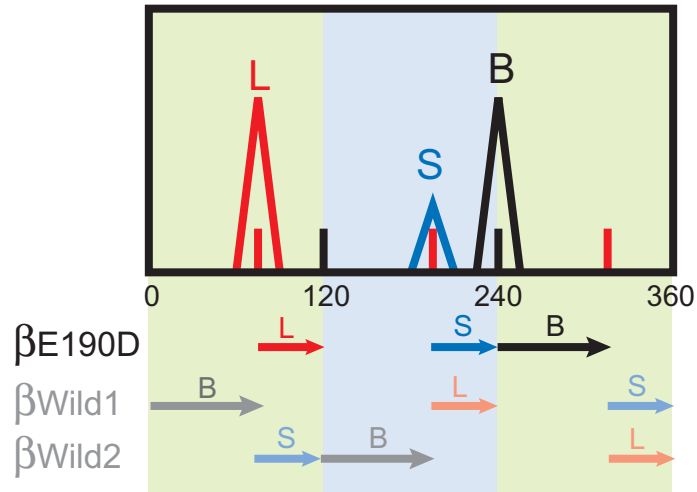


図29 低濃度ATPでの1xE190Dの回転観察

1xE190Dの回転を[ATP]=2 μM (a-c)と[ATP]= 200 nM (d-f) で回転観察を行った結果の時間変化(a,d)と角度分布(b,e)をそれぞれプロットした。(c,f)280° の位置の結合の待ち時間に対する時間分布のヒストグラム。実線は $n = A \exp\{-t/(k_{on}[ATP])\}$ によるフィッティング曲線。これからβE190DへのATPの結合定数 $k_{on} = 2.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (c),  $1.35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (d)と求められた。

### a. 1xE190D (Km付近)



### b. 2xE190D (Vmax付近)

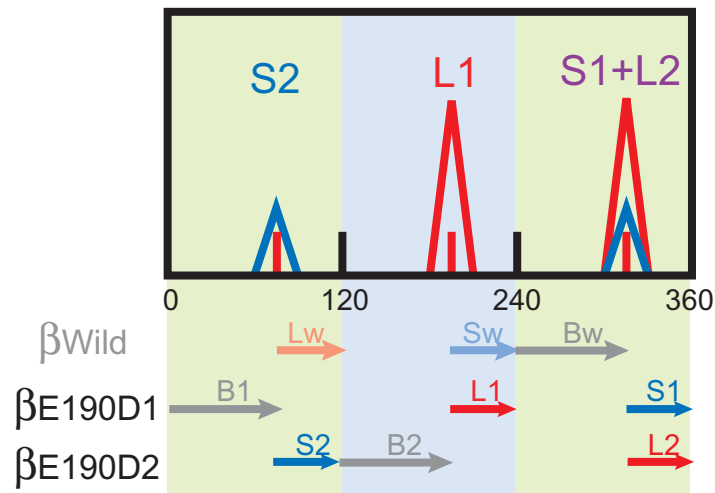


図30 ハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転の模式図

a. 1xE190DのK<sub>m</sub>付近での回転の角度分布を模式図で示した。

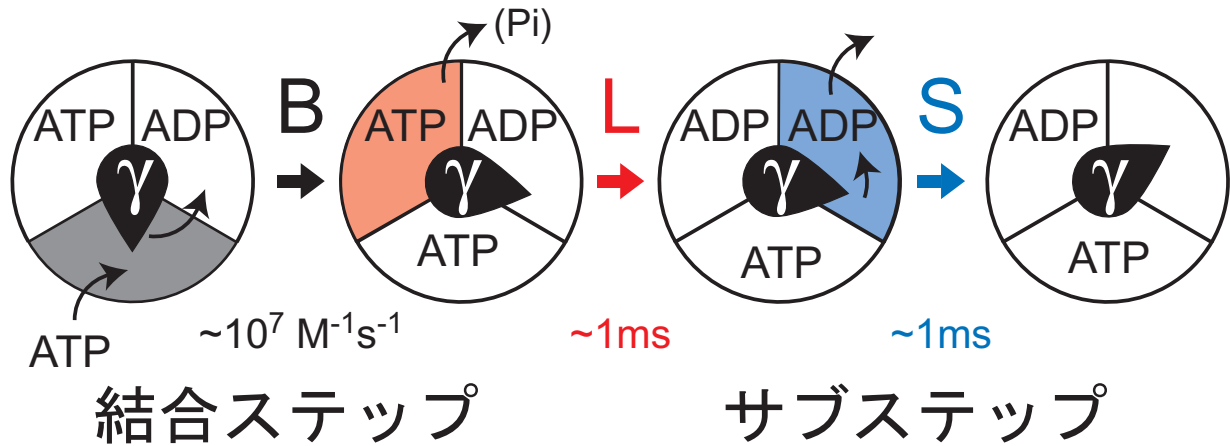
3ヶ所の停止位置の存在は、1つのβE190Dサブユニットの影響が、3つ別々の120°回転で違った影響として現れていることを示唆している。

b. 2xE190DのV<sub>max</sub>条件での回転の角度分布を模式図で示した。

1つのβE190Dの影響による2ヶ所の停止が、120°ずらして2つ重なった形として現れている。



a. 3つのβサブユニットが協同的に働くモデル(トライサイト)



b. 2つのβサブユニットが協同的に働くモデル(バイサイト)

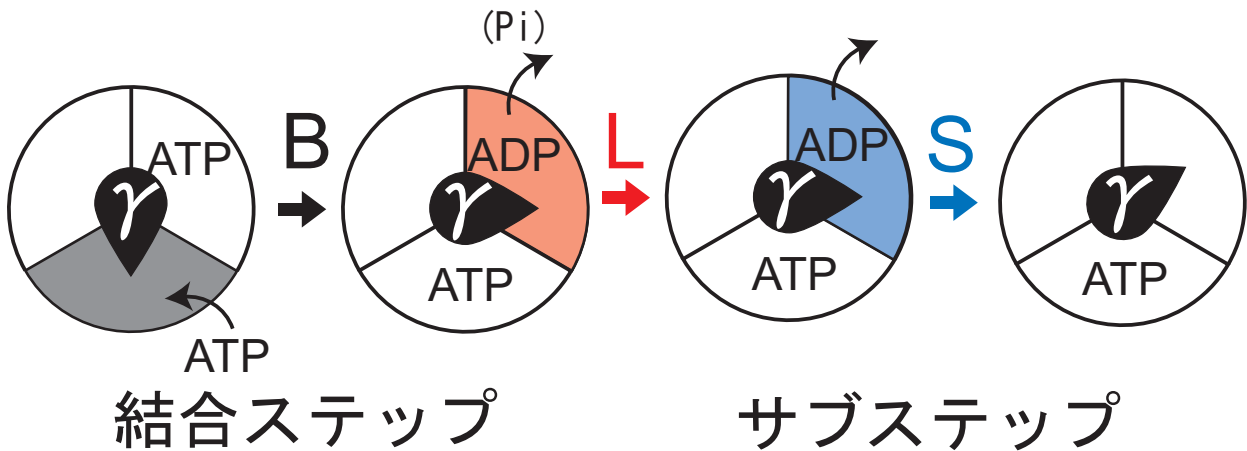


図31 協同的な回転機構のモデル

- a. 本研究により示唆された、3つのβサブユニットが3種の違った働きをすることによって1つの120°回転を引き起こす、トライサイトモードでの協同的な回転機構のモデル。
- b. 2つのβサブユニットが3種の違った働きをすることによって1つの120°回転を引き起こす、バイサイトモードでの協同的な回転機構のモデル。このモデルは本研究により否定された。

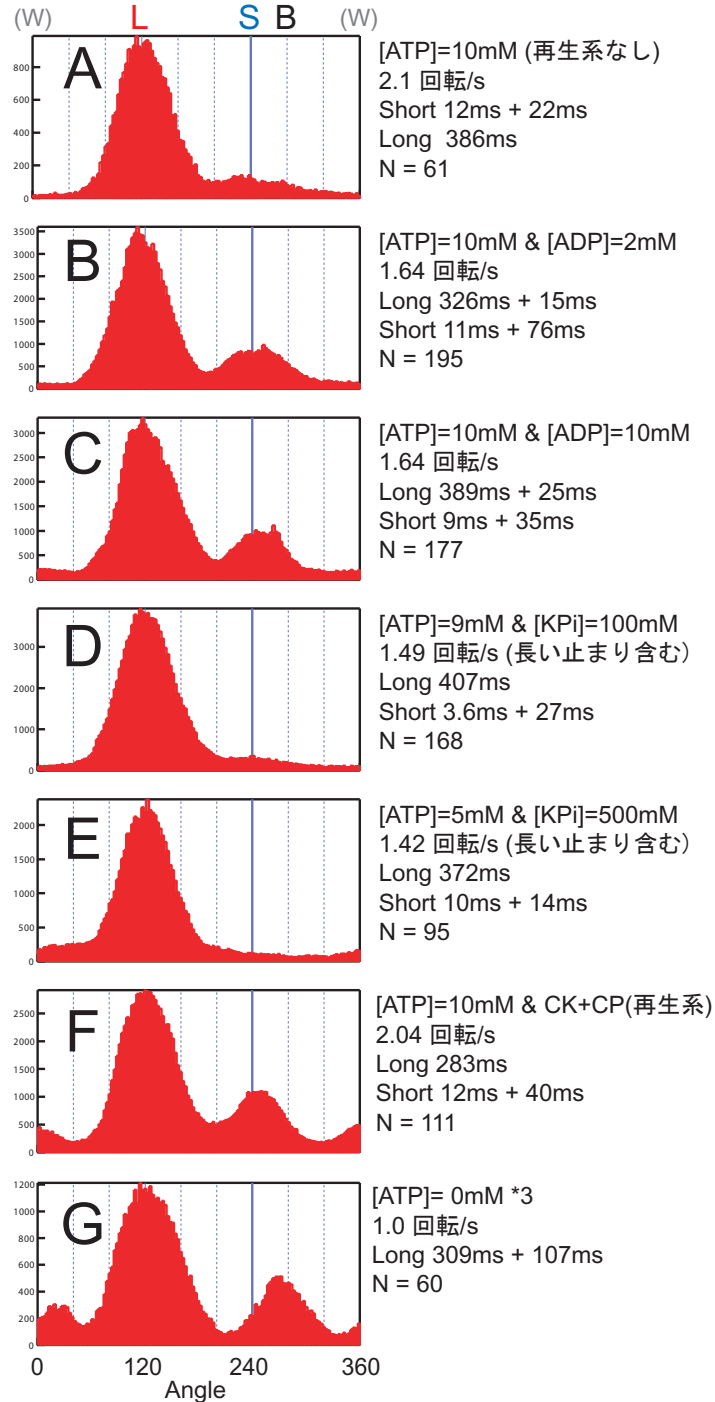


図32 溶液交換による様々な条件での1xE190Dの回転

ある1xE190Dの1分子について、様々な条件での溶液交換を繰り返して、それぞれの条件での回転の角度分布を示した。各条件は図の右側に示し、そのときの回転速度も示した。また、長い停止(Long)と短い停止(short)について1次と2次の指数関数式でフィッティングを行い、より合う方についての時定数を求めた結果も示した。

### A. 再生系なしの条件での1xE190Dの回転と角度分布

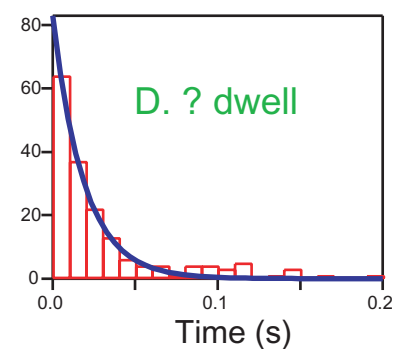
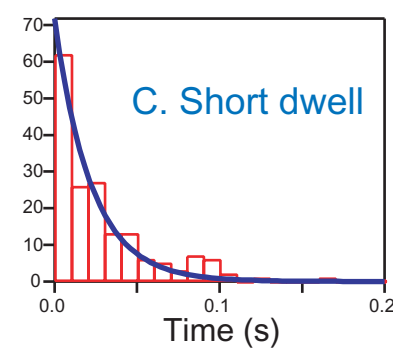
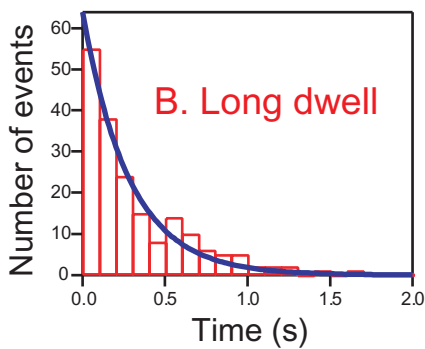
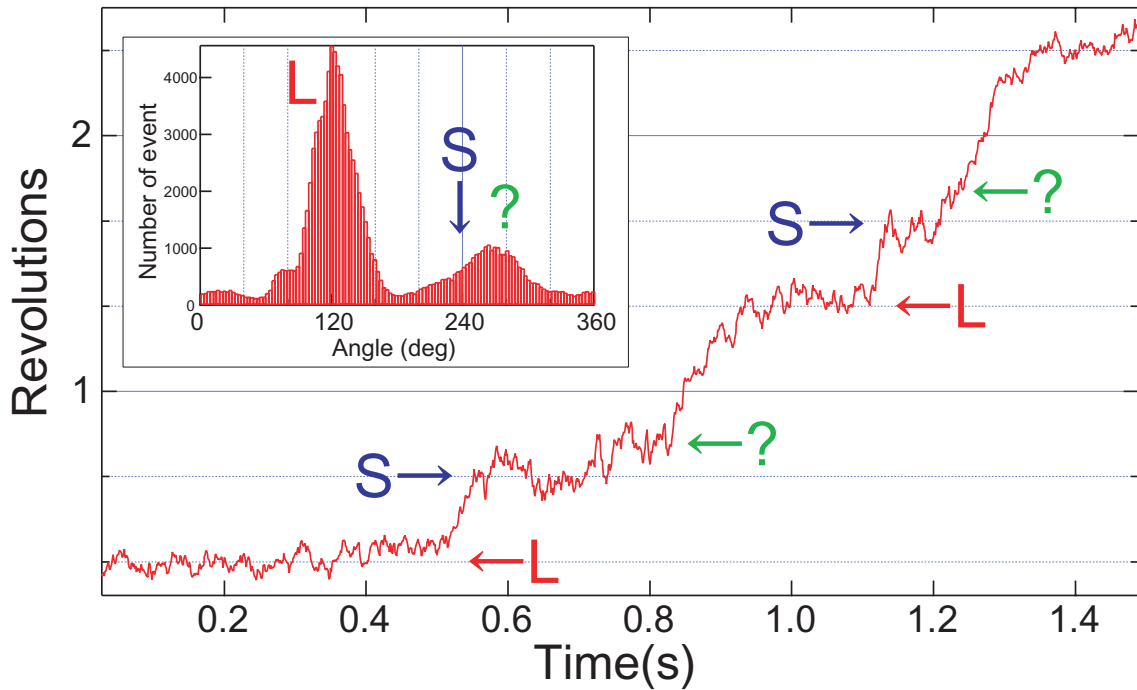
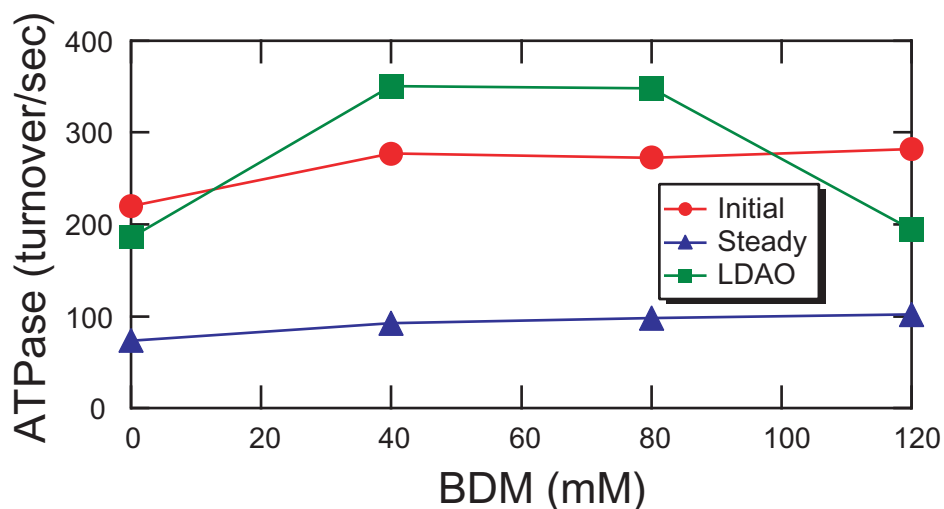


図33 再生系なしの条件での1xE190Dの回転観察

A. ある1xE190Dの1分子について、[ATP]= 10 mM かつ再生系を入れない条件での回転を観察し、その時間分布と角度分布を示した。長い停止(L)と短い停止(S)のほかに、もうひとつの停止(?)が観察された。

B-D. それぞれの待ち時間のヒストグラムを示した。実線は $n=A \cdot \exp(-x/\tau)$  によるフィッティング曲線を示す。その結果、それぞれの時定数は、285 ms (Long)、22 ms (Short)、18 ms (?)と求められた。

a. 野生型F<sub>1</sub>-ATPaseへのBDMの阻害効果



b. 各種変異体F<sub>1</sub>-ATPaseへのBDMの阻害効果

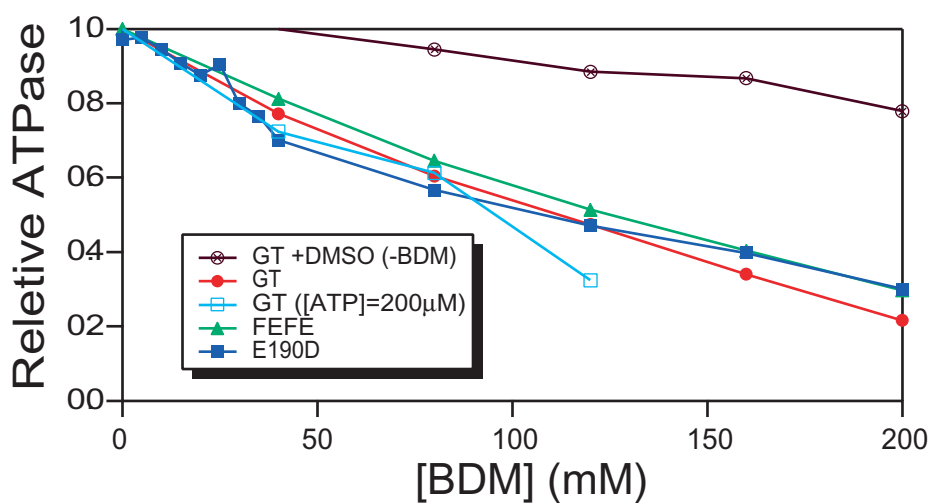
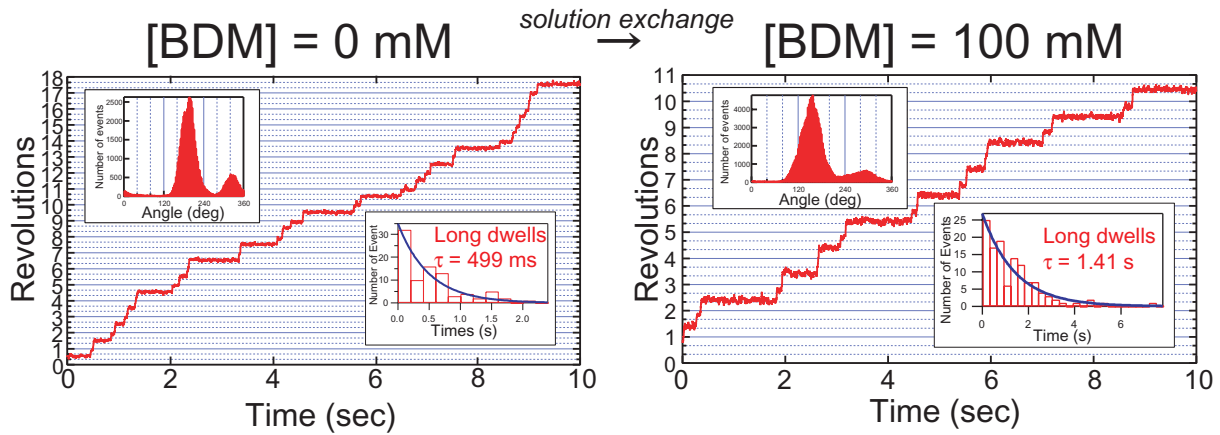


図34 F<sub>1</sub>-ATPaseのBDM濃度依存的な活性測定

- 野生型F<sub>1</sub>-ATPaseのATP加水分解活性測定を各BDM濃度で行った([ATP] = 2 mM)。
- Inhibited form に陥り難い各種変異体F<sub>1</sub>-ATPase(GT変異体、βE190D、FEFE変異体)を用いて各BDM濃度のATP加水分解活性を測定し、[BDM]=0を1とした相対活性としてをプロットした。対照としてBDM無し(+DMSO)の活性も示した。

A. 1xE190D回転のBDM濃度依存性 ([BDM] 0 mM → 100 mM)



B. 1xE190D回転のBDM濃度依存性 ([BDM] 100 mM → 0 mM)

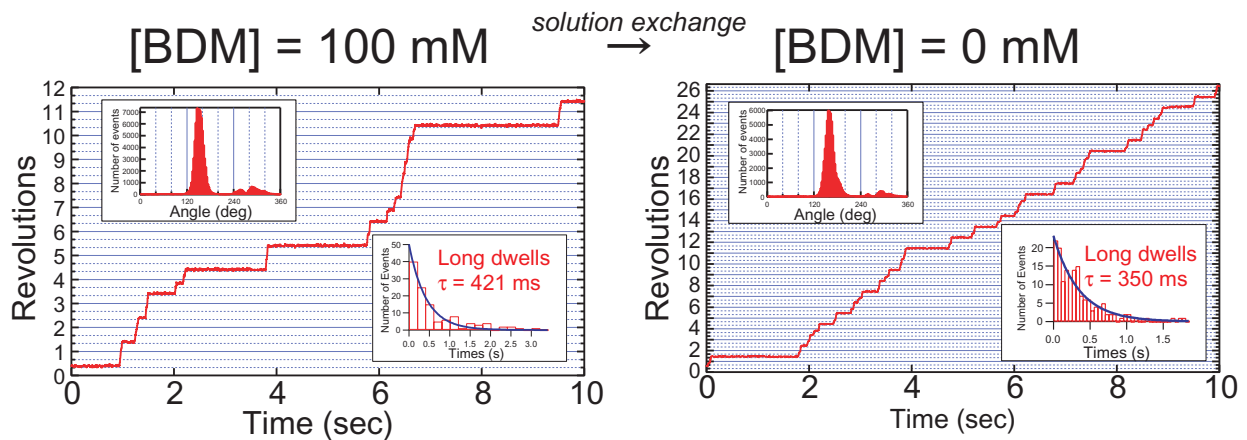


図35 1xE190DのBDM濃度依存的な回転観察

1xE190Dの回転([ATP]=10 mM)を、溶液交換によりBDMの濃度を変化((A)[BDM]=0 mM→100 mM、(B)[BDM]=100 mM→0 mM)させながら観察した。回転数の時間変化とinsetに角度分布(右上)と、長い停止 (Long dwell)の時間分布のヒストグラム(左下)を示した。

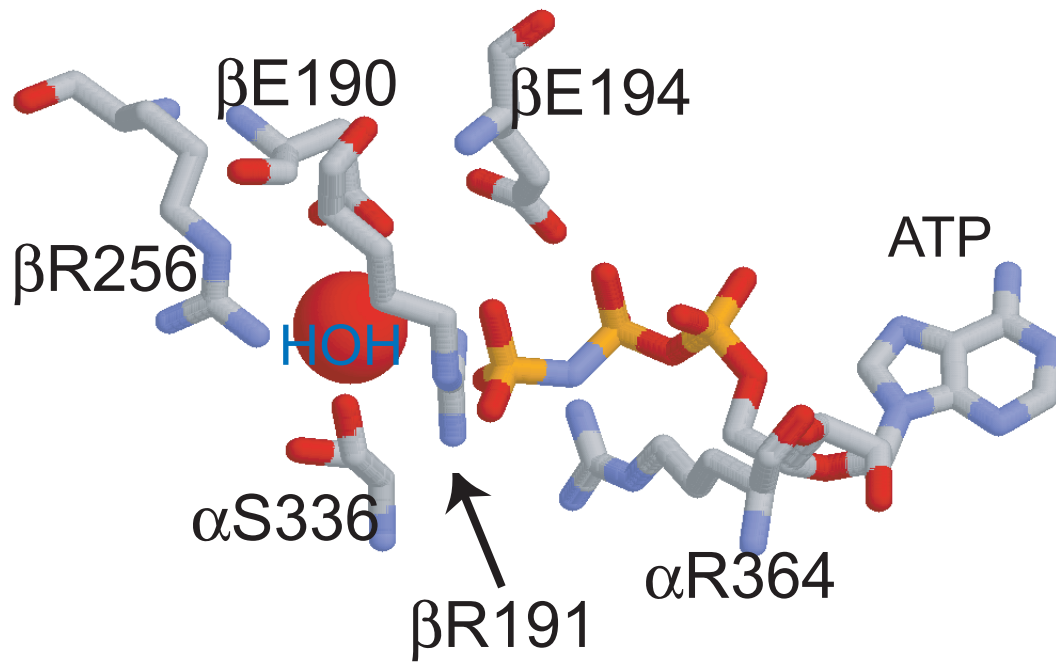
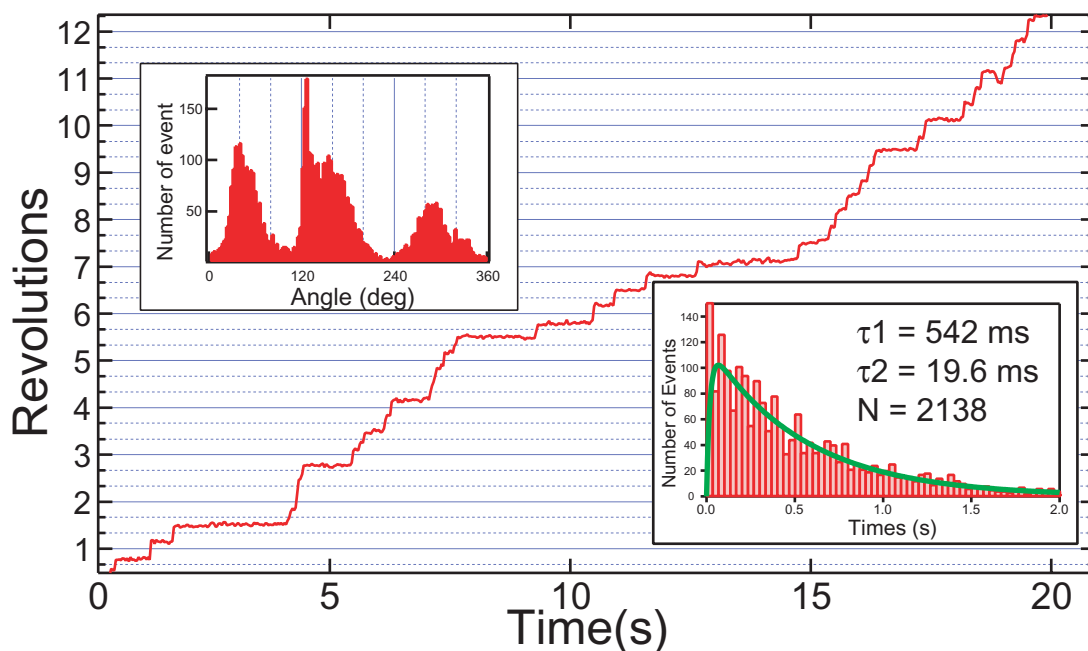


図36 F<sub>1</sub>-ATPaseの触媒部位残基

牛ミトコンドリア心筋のX結晶構造(文献[12])から明らかになった、ATPを結合した触媒部位付近の残基。ただし残基番号は好熱菌F<sub>1</sub>-ATPaseで対応する残基のものに置き換えて表示している。

## A. $\beta$ R191K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察



## B. 1xR191KハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

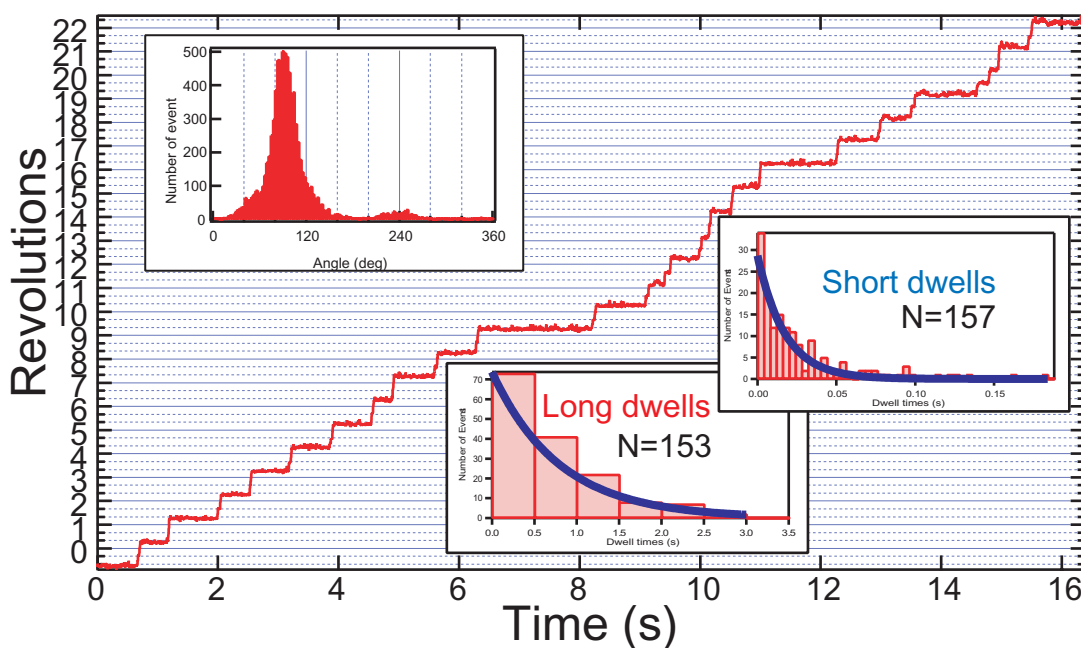
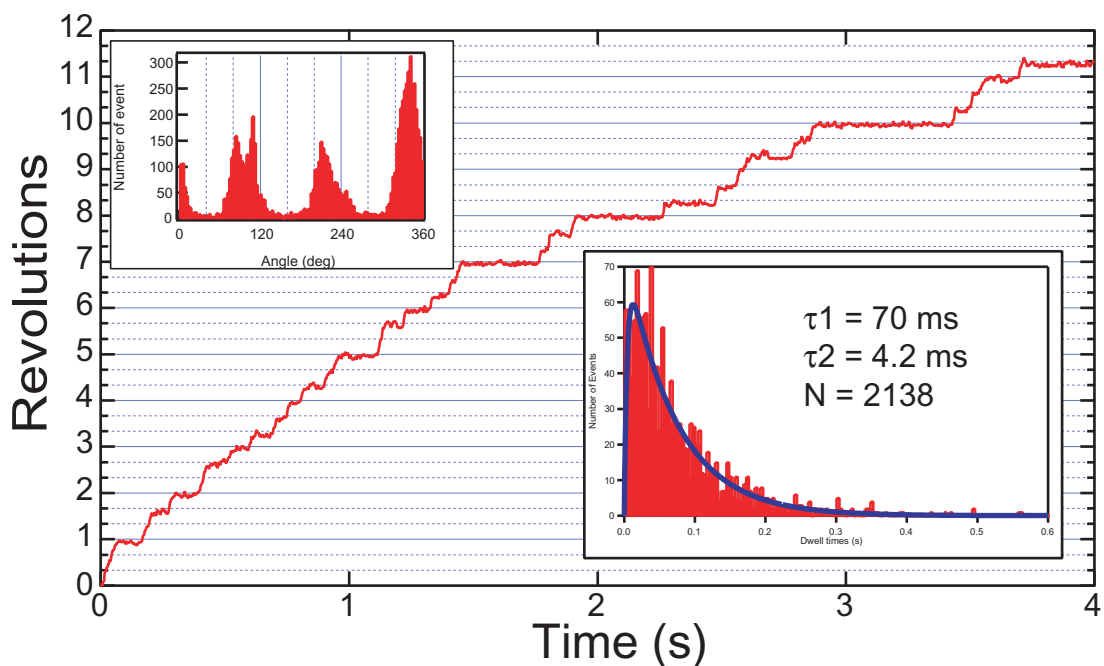


図37  $\beta$ R191K変異体の回転観察

- A.  $\beta$ R191K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)と待ち時間のヒストグラム(右下)を示した。ヒストグラムのフィッティングより二つの時定数が542 msと19.6 msと求められた。[ATP]=10 mM。
- B. 1xR191KハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)と長い停止(Long dwell)と短い停止(Short dwell)の待ち時間のヒストグラム(右下)を示した。ヒストグラムのフィッティングにより、それぞれの時定数がLong=793 msとShort=17.3 msと求められた。[ATP]=10 mM。

## A. $\beta$ R256H変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察



## B. 1xR256HハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

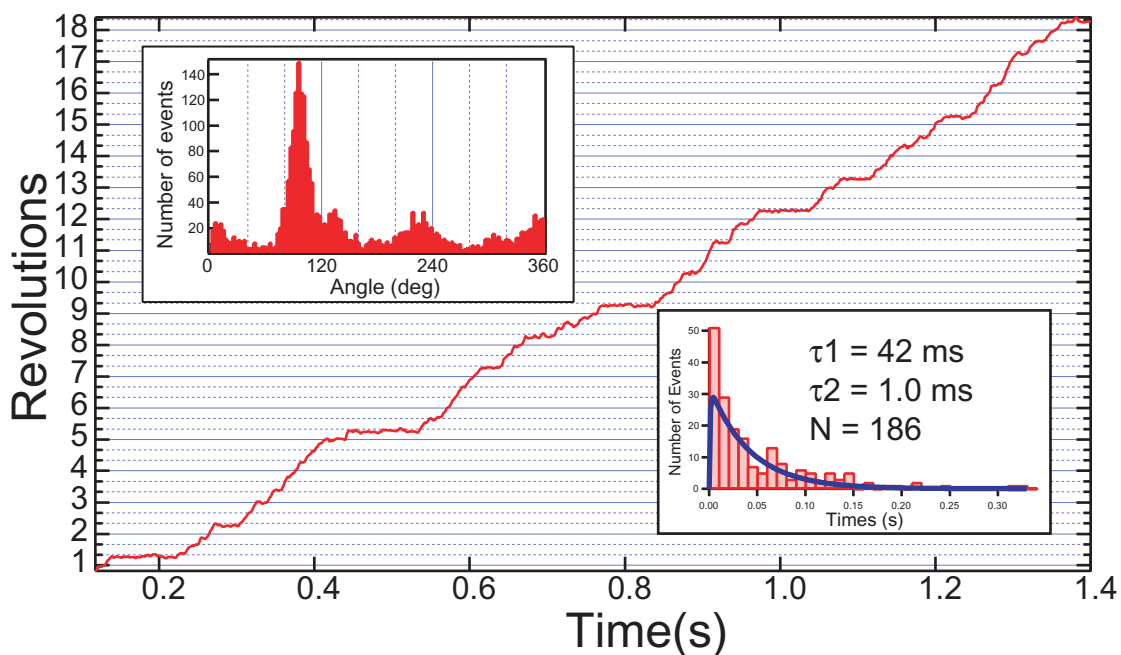


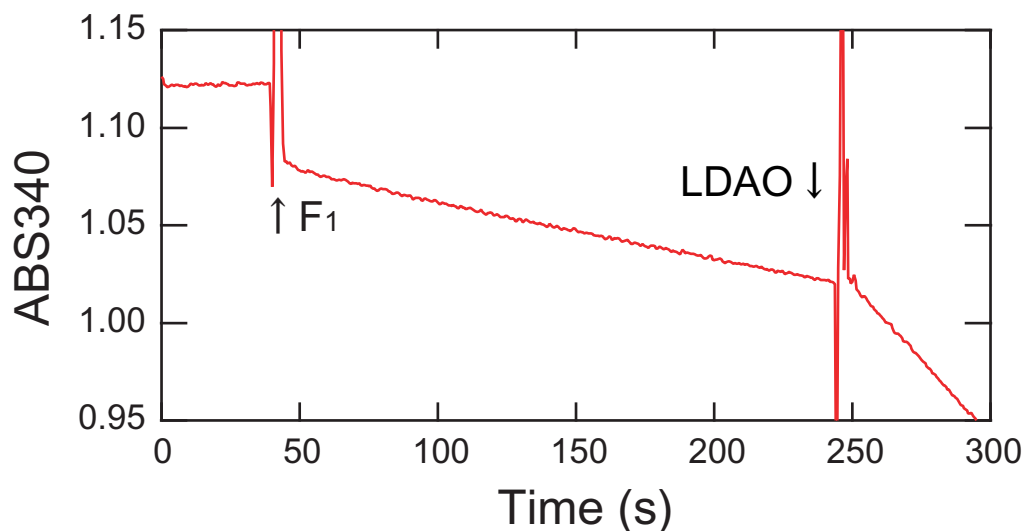
図38  $\beta$ R256H変異体の回転観察

A.  $\beta$ R256H変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)と待ち時間のヒストグラム(右下)を示した。ヒストグラムのフィッティングより二つの時定数が70 msと4.2 msと求められた。[ATP]=10 mM。

B. 1xR256HハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)と長い停止 (Long dwell)の待ち時間のヒストグラム(右下)を示した。ヒストグラムのフィッティングより2つの時定数が42 msと1 msと求められた。[ATP]=10 mM。



### A. $\beta$ R256H変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの活性測定のタイムコース



### B. $\beta$ E201V変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

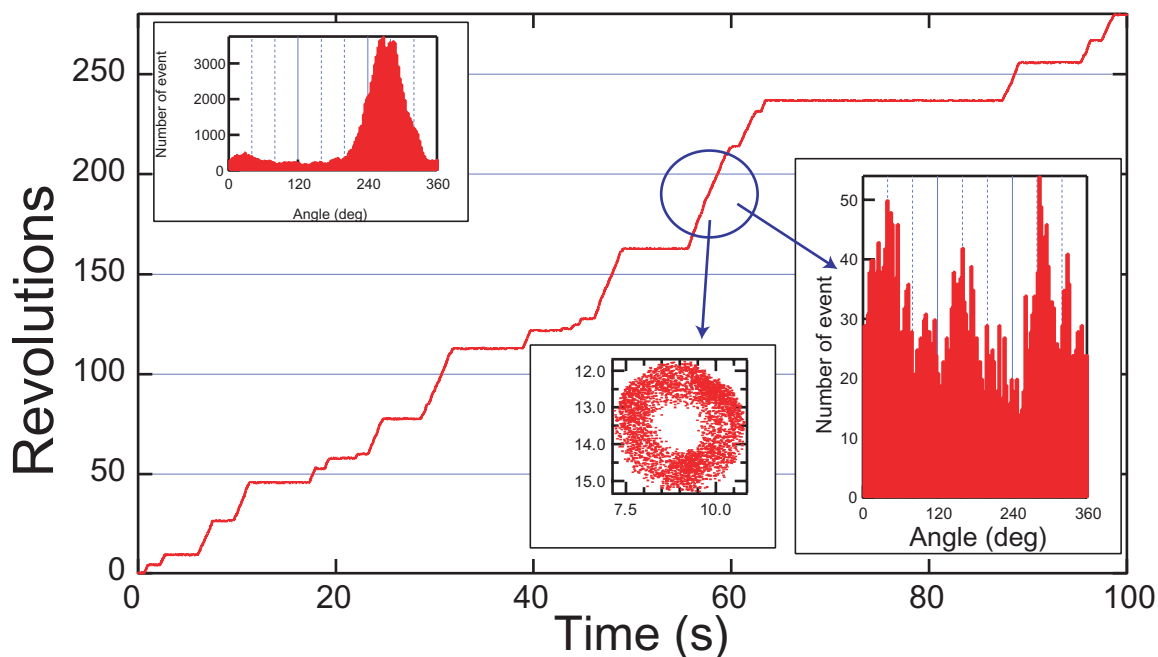


図39  $\beta$ E201V変異体の特性

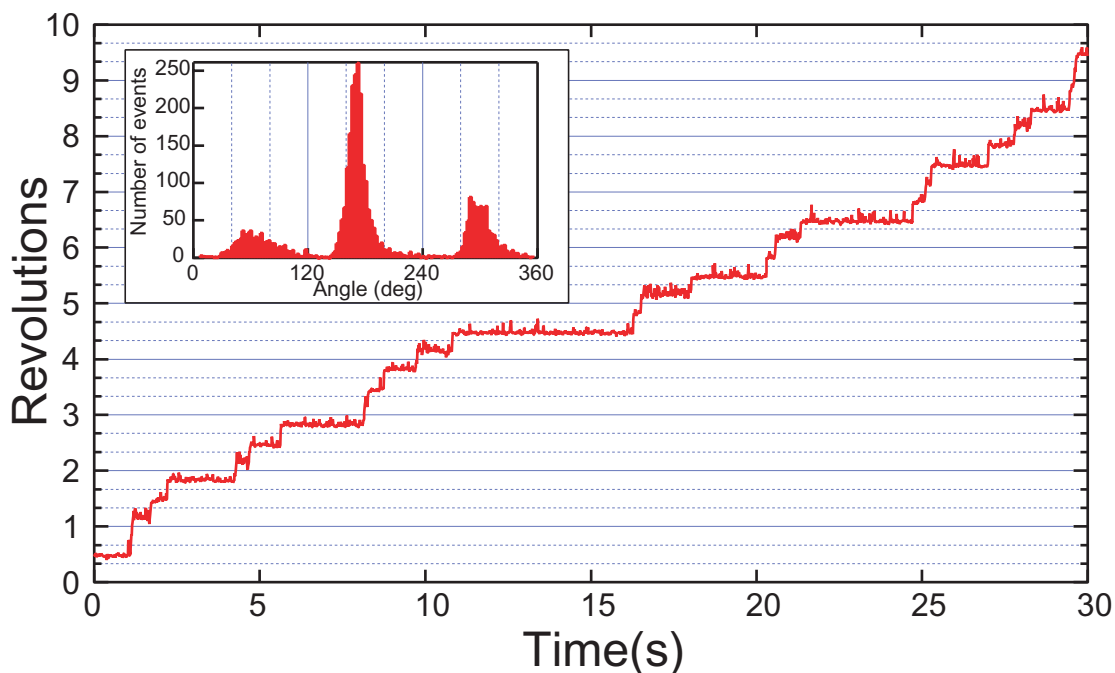
A.  $\beta$ R256H変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの活性測定のタイムコース。

NADHの吸光度の時間変化を示した。F<sub>1</sub>-ATPaseを投入後すぐに steady stateに陥り、LDAOにより活性化した。[ATP]=2 mM。

B.  $\beta$ E201V変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。

回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)を示した。右下のinsetには、連続的に回転している部分(図中青丸で囲まれた部分)での角度分布を示した。[ATP]=10 mM。

## A. $\alpha$ R364K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察



## B. 1x $\alpha$ R364KハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察

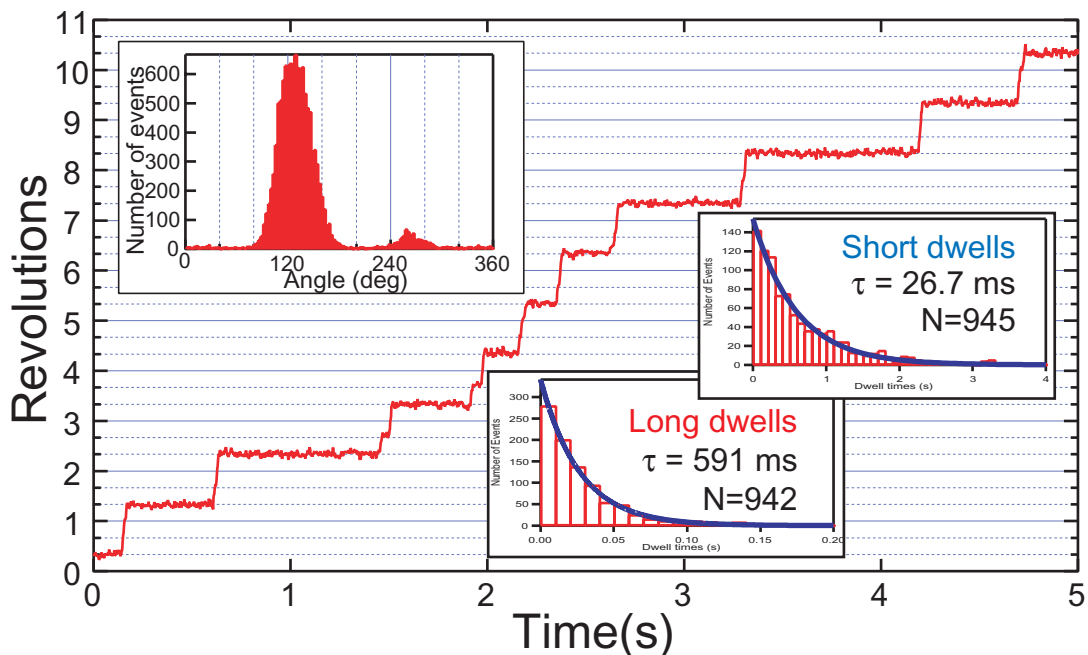


図40  $\alpha$ R364K変異体の回転観察

A.  $\alpha$ R364K変異体F<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布を示した。回転発見頻度を上げるため、ここでは $\phi=0.35 \mu\text{m}$ のビーズを用いて100 FPSで観察した。 $[\text{ATP}]=10 \text{ mM}$ 。

B. 1x $\alpha$ R364KハイブリッドF<sub>1</sub>-ATPaseの回転観察。回転数の時間変化とinsetに角度分布(左上)と長い停止 (Long dwell)と短い停止(Short dwell)の待ち時間のヒストグラム(右下)を示した。ヒストグラムのフィッティングにより、それぞれの時定数がLong=591 msとShort=26.7 msと求められた。 $[\text{ATP}]=10 \text{ mM}$ 。

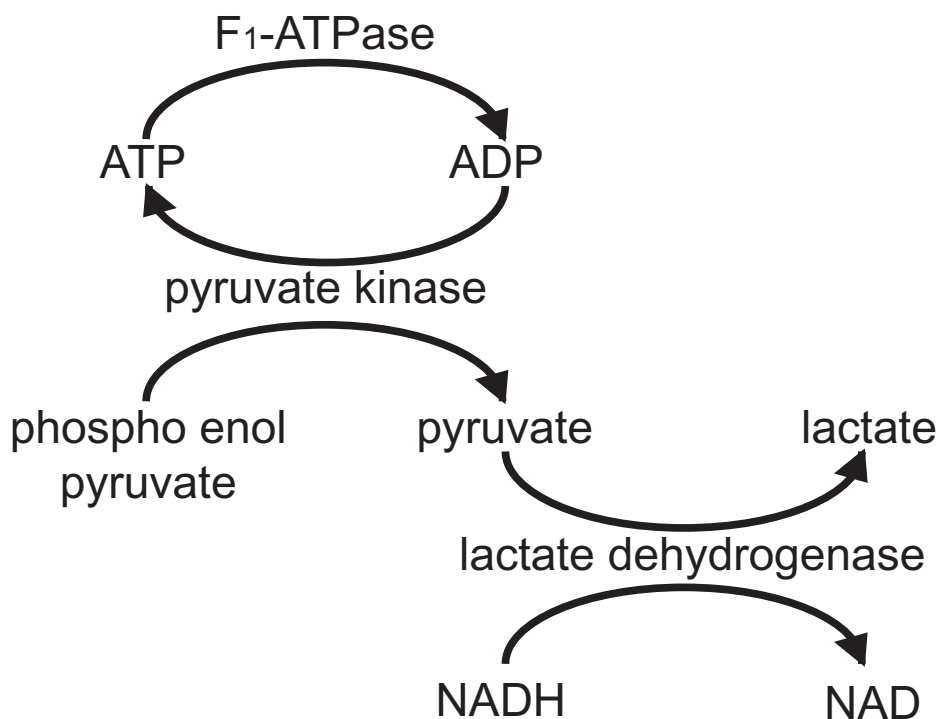


図41 再生系を用いたATP活性測定のスキーム

F1-ATPaseによって分解されたADPは、pyruvate kinaseによってphospho enol pyruvateのリン酸が渡され、ATPになる。脱リン酸化したphospho enol pyruvateはlactate dehydrogenaseによってlactateになり、この反応と共役してNADHがNADになる。NADHは波長340nmに吸収があるが、NADにはないので、この波長の吸収を調べることによりで、ADPが生成する速度すなわちATP加水分解速度が求められる。

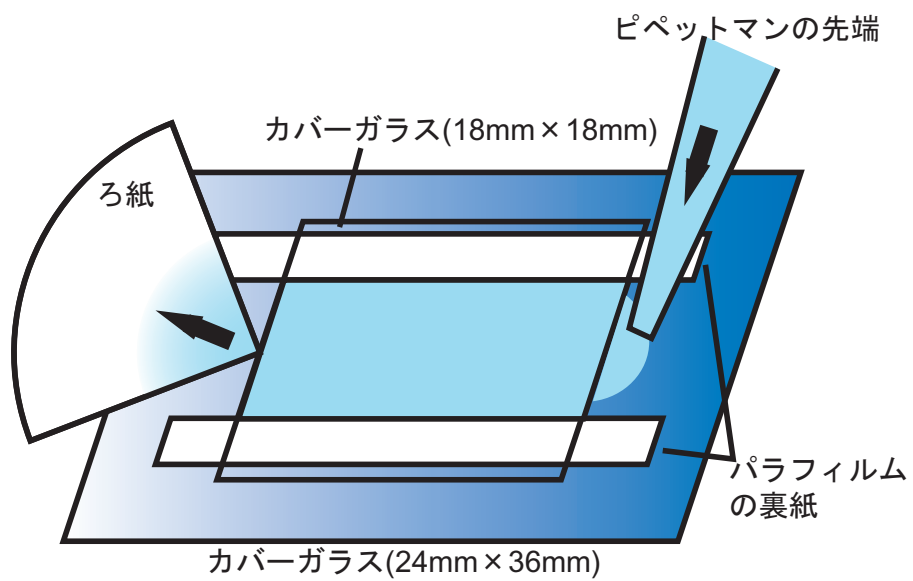


図42 フローセル

24 mm × 36 mm のカバーガラス上に真空グリスを塗った2枚のパラフィルムの裏紙を平行に貼り付け、その上に小さいカバーガラス(18 mm × 18 mm)をのせることにより容積約5  $\mu$ l のフローセルを作った。片側から溶液を加え逆側からろ紙で吸い込むことにより中の溶液を交換することが出来る。

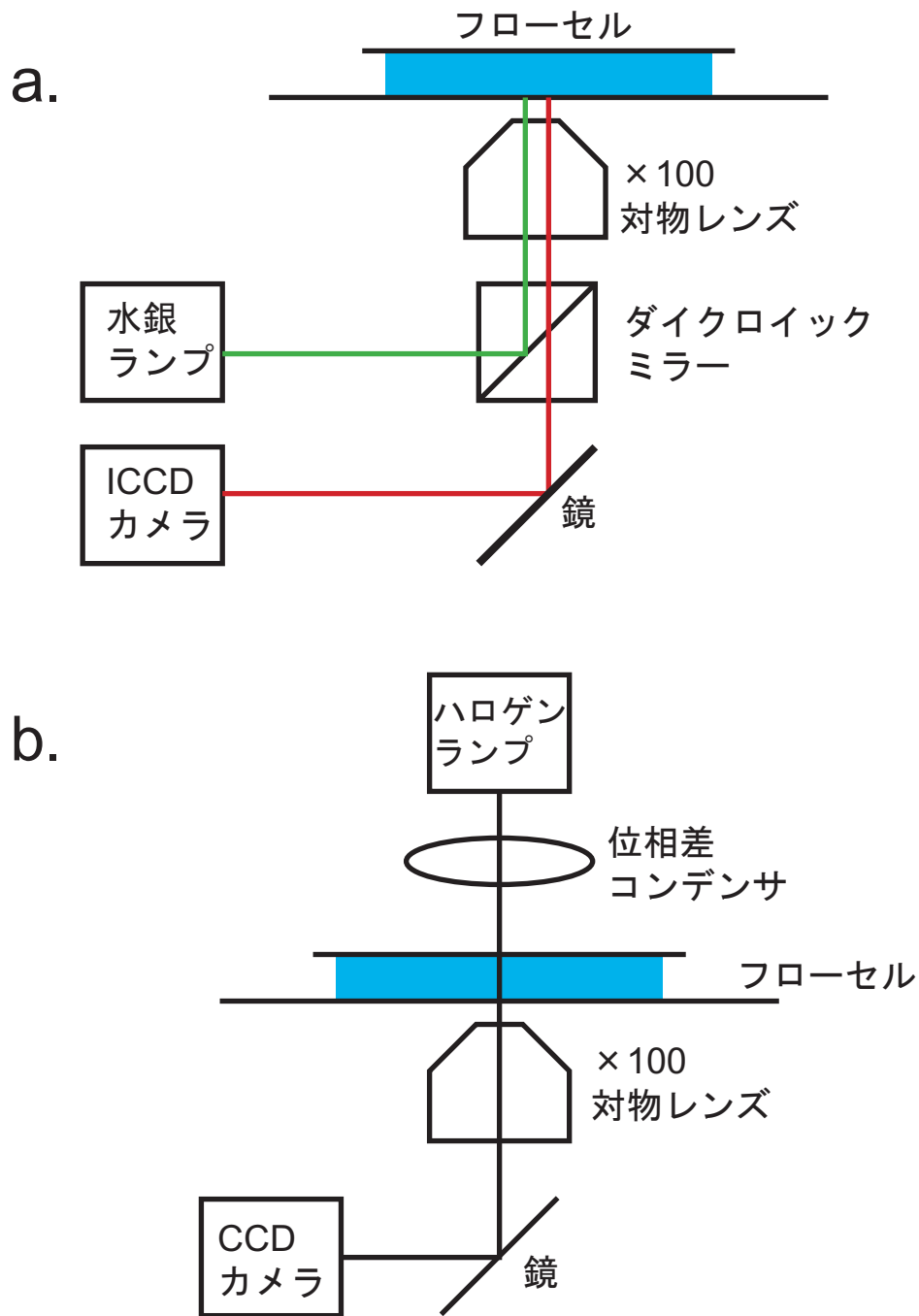


図43 光学系

顕微鏡にはIX70またはIX71 (OLYMPUS)を用いた。アクチンの蛍光観察とビーズの位相差観察では、それぞれ異なった光学系を用いた。

a. 蛍光顕微鏡観察。アクチンフィラメントに結合させた色素を水銀ランプの光で励起し、ICCDカメラを用いて蛍光を増幅して観察した。緑色の励起光と赤色の蛍光を分けるためにダイクロイックミラーセットを用いた。

b. 位相差顕微鏡観察。ビーズの像は位相差顕微鏡を用いて観察した。これにより透明度の高いポリスチレンビーズの明暗をはっきりさせることが出来る。また、高速カメラでの観察には光源としてハロゲンランプの代わりに100Wの水銀ランプを用いた。