

論文の内容の要旨

論文題目 ATP 合成酵素 (FoF1) のサブユニット複合体の回転： 金粒子をプローブとした回転機構の解析

氏名 細川 浩之

【はじめに】

ATP 合成酵素 (FoF1) は、 H^+ の電気化学的ポテンシャル差と共役して ADP と無機リン酸から ATP を合成する。細菌から真核生物まで広く保存されており、エネルギー産生において中心的な役割を担っている。FoF1 の反応は可逆的であり、生物によっては ATP の加水分解に伴い H^+ を輸送するポンプとして機能している。FoF1 の作動機構を解明することは、生物が如何にしてエネルギー産生しているかを理解するために重要である。 H^+ 輸送と ATP 合成・分解の共役には、 $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$ サブユニットに対して $\gamma\epsilon c_{10}$ サブユニット複合体が回転することが必須である。そこで、本研究では FoF1 の ATP 分解に伴うサブユニット複合体の回転機構を明らかにすることを目的とした。直径 40 nm から 200 nm の金粒子をプローブとすることによって、大腸菌 FoF1 の本来の回転速度に近い高速回転を実証し、回転機構に関して新しい成果を得た。

【結果】

F1-ATPase γ サブユニットに結合した金粒子の回転

FoF1 の膜から突き出ている部分 ($\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$)は F1 と呼ばれる (図 1)。ATP 加水分解の触媒部位が、3 つある β サブユニットそれぞれに存在しており、F1 は単独で ATPase 活性を持っている。この 3 箇所の活性中心では、協同的に反応が進行しており、ATP 加水分解に伴い $\alpha_3\beta_3\delta$ サブユニットに対し $\gamma\epsilon$ サブユニットが回転する。したがって、 γ サブユニットに適切なプローブを結合させることにより回転を観察できる。

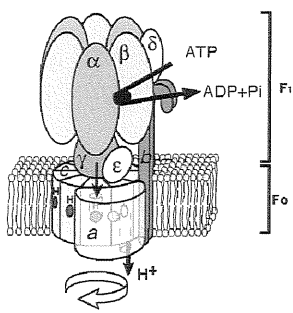


図1 FoF1の模式図

F1におけるATP合成・分解の化学反応とFoにおけるH⁺輸送とは、サブユニット複合体の回転を介して共役している。

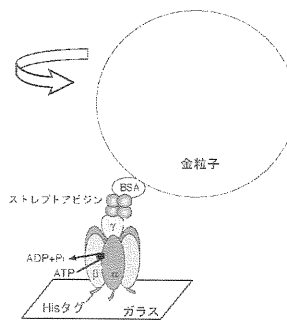


図2 実験系の模式図

F1 αサブユニットに導入したHisタグを利用してガラス表面に固定、γサブユニットに金粒子を結合した。

大きなプローブ（アクチンフィラメント、長さ 0.7 μm から 2 μm）を用いた実験が数多く報告されているが、回転速度はプローブの大きさに依存していた。これは、プローブによる負荷が大きすぎるためと考えられる。このような実験系では、本来の回転様式が研究できないため、粘性抵抗の小さい金粒子をプローブとして回転を観察した（図2）。

直径 40 nm から 200 nm の金粒子を用い、0.2 秒程度、観察したところ、金粒子の直径が小さくなるに従い、F1 γサブユニットの回転速度は増したが、直径 60 nm、40 nm の金粒子では、それぞれ、430 rps (revolutions per second)、460 rps とほぼ同じ速度となった（図3）。この結果は、直径 60 nm、40 nm の金粒子では、負荷が十分に小さく、本来のF1の回転速度に近い回転を観察できたことを示している。

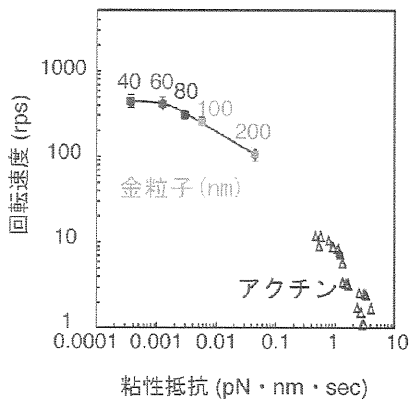


図3 プローブへの粘性抵抗とF1回転速度

F1 γサブユニットに結合した直径 40 nm から 200 nm の金粒子の回転速度を計測した。直径 40 nm、60 nm では、速度は、それぞれ、430 rps、460 rps とほぼ同じだった。

F1 に 3 箇所の触媒部位が存在することから、3 分子の ATP 加水分解により 1 回転すると仮定し、定常状態の ATPase 活性より回転速度を推定すると ~30 rps となる。直径 60 nm の金粒子をプローブとして計測した回転速度（430 rps）は、ATPase 活性から見積もられた速度（30 rps）よりも 14 倍程度速かった。この結果は、ミリ秒単位の時間分解能で見た場合には、10% 程度の分子だけが回転していることを示唆している。

そこで、2 秒間回転を観察したところ、100 ミリ秒をこえるような長い停止を示した後、再び、回転する粒子が存在した。すなわち、F1 分子は回転と長い停止を繰り返しており、ミリ秒単位の分解能で見た場合には、一部の分子だけが回転していることを明らかにした。変異酵素等を用いた報告より考察し、100 ミリ秒を越えるような長い停止は加水分解産物

である Mg · ADP による阻害であると結論した。

さらに、金粒子の回転を検討すると、回転速度は刻々と変化していた。ATP 加水分解の触媒部位は、3 つある β サブユニットそれぞれに存在し、協同的に働いていることから、1/3 回転、すなわち 120° 回転する時に 1 分子の ATP が分解されると考えられる。そこで、 120° 回転に要した時間を調べると、図 4 のような分布が見られた。図 4 には 10 個の F₁ 分子の結果をまとめて示しているが、1 分子ごとに調べても同様の分布が見られ、回転速度が確率的にゆらいていることが示唆された。

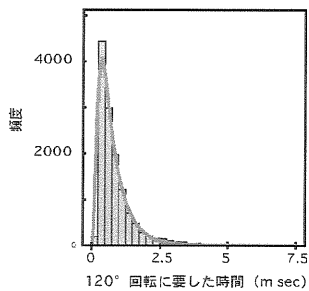


図 4 F₁ の 120° 回転に要する時間の分布

F₁ γ サブユニットに結合した 60 nm の金粒子の回転
10 粒子分を調べ、合計した。 120° 回転に要する時間
は確率的にゆらいていた。

F_oF₁ の回転

サブユニット複合体の回転は ATP 合成・分解の化学反応と H⁺ 輸送との共役に必要である。FoF₁ は、ATP 合成・分解の化学反応と H⁺ 輸送の共役した反応を行うための全てのサブユニットを備えており、回転機構を明らかにすることは重要である。また、H⁺ 輸送路である Fo 部分 (ab_2c_{10}) の存在が γ サブユニットの回転に影響を与える可能性がある。上で示した実験系を用い、c サブユニットに金粒子を結合させ ATP 分解に伴う回転を観察した。直径 60 nm から 100 nm の金粒子の回転速度は 200 rps とほぼ同じであり、本来の FoF₁ の回転速度に近い回転が観察できた。FoF₁ c サブユニットに結合した直径 60 nm の金粒子の回転速度は、F₁ γ サブユニットに結合した金粒子より遅く、F₁ の実験時には存在しない δ 、 ϵ サブユニット、Fo が回転速度に影響を与えることが示唆された。FoF₁ においても回転速度は刻々と変化しており、 120° 回転に要した時間は、F₁ と同様な分布を持ち、FoF₁ の回転速度が確率的にゆらいていることが示唆された。

H⁺ 輸送残基の変異と FoF₁ サブユニット複合体の回転

Fo の a サブユニット aArg210 残基および c サブユニット cAsp61 残基が H⁺ 輸送に必要なアミノ酸残基である。cAsp61 残基のカルボキシル基への H⁺ の結合と解離を介して H⁺ が輸送されると考えられている。a サブユニットの膜貫通ヘリックスは、膜の両側から中央付近まで水分子の侵入可能なチャンネルを形成しており、このチャンネルを通り H⁺ が cAsp61 残基へ到達する。aArg210 は cAsp61 からの H⁺ の解離を助ける。H⁺ 輸送残基がサブユニット複合体の回転へ影響を及ぼすか検証するため、H⁺ 輸送できない aArg210Lys、aArg210Ala、aArg210Gln、cAsp61Asn、cAsp61Gly 変異酵素の回転を調べた。アクチンフィラメントを用いたところ、全ての変異酵素が回転した。この結果は、

H⁺の電気化学的ポテンシャル差が存在しない時の ATP 分解に伴うサブユニット複合体の回転は、H⁺輸送と分離できることを示している。さらに、直径 60 nm の金粒子をプローブとして cAsp61Asn 変異酵素の回転を調べた (図 5)。120° 回転に要した時間から推定した回転速度は 180 rps であり、同様に推定した野生型酵素 290 rps よりも遅かった。したがって、H⁺の結合する cAsp61 残基の電荷が回転に影響を与えると考えられる。

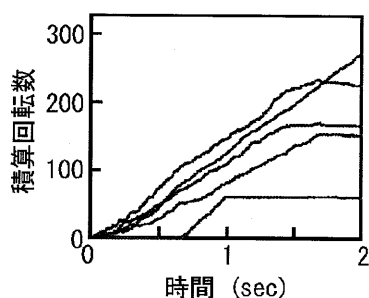


図 5 H⁺輸送できない cAsp61Asn 変異 FoF₁ の回転

c サブユニットに結合した直径 60 nm の金粒子を用い回転を検出した。

[まとめ]

直径 60 nm の金粒子をプローブとし、ATP 合成酵素 (FoF₁) の本来の回転速度に近い高速回転を観察する系を確立した。この系を用いて F₁ および FoF₁ が、それぞれ 430 rps、200 rps と高速で回転することを明らかにした。いずれの回転も確率的にゆらぐことを明らかにした。また、F₁ および FoF₁ は回転と停止を繰り返しており、ミリ秒の分解能で見た場合に一部の分子のみが回転していることを明らかにした。

さらに、FoF₁ の回転速度が F₁ より遅く、 δ 、 ϵ サブユニット、Fo が回転に影響を与えると推定した。H⁺輸送できない変異酵素においても、サブユニット複合体が回転した。cAsp61Asn 変異酵素では回転速度が低下していた。H⁺結合残基である cAsp61 残基の電荷が回転に影響を与えることを推定した。

1 分子ごとに観察することにより FoF₁ の確率的な振る舞いが明らかになった。ATP 分解時には H⁺輸送とサブユニット複合体の回転が分離できるような機構で FoF₁ が作動していると考えられる。