

## 審査の結果の要旨

氏名 細川 浩之

本論文は、エネルギー産生において中心的な役割を担っている ATP 合成酵素 (FoF<sub>1</sub>) の回転触媒機構に関する研究成果を述べたものである。ATP 合成酵素 (FoF<sub>1</sub>) は、H<sup>+</sup>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。FoF<sub>1</sub> における H<sup>+</sup>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要である。

これまで、FoF<sub>1</sub> の回転触媒機構に関し、アクチンフィラメント (長さ 0.7  $\mu\text{m}$  から 2  $\mu\text{m}$ ) をプローブとして多くの解析が行われてきた。アクチンフィラメントを用いた場合には、回転速度は ATP 分解速度からの予想速度 ( $\sim 30$  rps) よりも遅く、プローブの大きさに依存したものであった。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。申請者は、アクチンフィラメントを用いた実験系では、FoF<sub>1</sub> の本来の回転様式が研究できないと考え、負荷の小さい金粒子をプローブとして回転機構を解析した。

本論文は次に述べる 5 つの章から構成されている。第 1 章では、ATP 合成酵素 (FoF<sub>1</sub>) に関する既知の知見がまとめられている。第 2 章、第 3 章、第 4 章では、それぞれ、F<sub>1</sub>  $\gamma$  サブユニットに結合した金粒子の回転、FoF<sub>1</sub>  $c$  サブユニットに結合した金粒子の回転、H<sup>+</sup>輸送できない変異 FoF<sub>1</sub> の回転について、申請者による研究成果が述べられている。第 5 章は、本論文の総括となっている。本研究には、大腸菌 FoF<sub>1</sub> が用いられている。

第 2 章では、F<sub>1</sub>  $\gamma$  サブユニットに結合した金粒子の回転を検討し、得られた知見について述べている。申請者は、直径 40 nm から 200 nm の金粒子を F<sub>1</sub>  $\gamma$  サブユニットに結合させ、回転を解析した。直径 40 nm、60 nm の金粒子を用いることにより、回転速度は、それぞれ、460 rps (revolutions per second)、430 rps とほぼ同じとなり、本来の F<sub>1</sub> の回転速度に近い回転が観察できたことを示している。また、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) が、ATPase 活性から見積もられた速度 ( $\sim 30$  rps) よりも 14 倍程度速いこと、および、観察時間を延長すると 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することを示している。すなわち、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ている。さらに、回転速度が刻々と変化し、確率的に揺らいでいることを示唆している。

第 3 章では、FoF<sub>1</sub>  $c$  サブユニットに結合した金粒子の回転について述べている。ATP 合成・分解の化学反応と H<sup>+</sup>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た FoF<sub>1</sub> の回転機構を明らかにすることは重要である。 $c$  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、200 rps で回転することを明らかにしている。FoF<sub>1</sub>  $c$  サブユニットの回転速度は、F<sub>1</sub>  $\gamma$  サブユニットの回転速度より遅く、F<sub>1</sub> の実験時には存在しない  $\delta$ 、 $\epsilon$  サブユニット、および、Fo が回転速度に影響を与えることを示唆している。さらに、FoF<sub>1</sub> においても回転速度は刻々と変化しており、確率的に揺らいでいることを示唆している。

試験管内で ATPase 活性を測定した場合には各分子の平均値しか分からなかった。また、アクチンフィラメントをプローブとし回転を解析した場合には FoF<sub>1</sub> が高速で回転していることは分からなかった。また、F<sub>1</sub>  $\gamma$  サブユニットや FoF<sub>1</sub>  $c$  サブユニットの回転の上述のような性質は、金粒子をプローブとし回転を直接観察することによって初めて明らかとなった。申請者は、粘性抵抗の小さい金粒子をプロー

ブとして FoF<sub>1</sub> の本来の回転速度に近い高速回転を実証した。

第 4 章では、H<sup>+</sup> 輸送に必須な Fo の a サブユニット aArg210 残基および c サブユニット cAsp61 残基の変異によるサブユニット複合体の回転へ影響について述べている。申請者は、H<sup>+</sup> 輸送できない変異酵素が回転できることを明らかにした。この結果は、H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 輸送と分離できることを初めて示したものである。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、回転速度が野生型酵素よりも遅く、H<sup>+</sup> の結合する cAsp61 残基の電荷が回転に影響を与えることを示唆している。申請者は、これらの結果から、H<sup>+</sup> 輸送とサブユニット複合体の回転の共役についての考察を行っている。サブユニット複合体の回転と H<sup>+</sup> 輸送とが分離できるような機構は、これまで、ほとんど議論されておらず、FoF<sub>1</sub> の作動機構を明らかにする上で重要な知見である。

以上、本論文は、FoF<sub>1</sub> が高速で回転すること、回転速度が確率的に揺らぐこと、さらに、ATP 分解時には H<sup>+</sup> 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作動する可能性を示している。1 分子観察により膜タンパク質の作動機構を明らかにする方法を開拓すると共に、本論文で示された ATP 合成酵素 (FoF<sub>1</sub>) の性質は、他の多くの酵素の理解や生命の理解の手がかりとなり、生物学、生体エネルギー学、および、生物薬学に貢献すると考えられる。従って、申請者に対して博士 (薬学) の学位を授与することが適当であると判断した。