

氏 名 榑 直由

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 833 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 極低 ATP 濃度における F1-ATPase の回転

論文審査員	主査	教授	青野 重利
		教授	木下 一彦
		助教授	藤井 浩
		助教授	川口 博之
		教授	神山 勉（名古屋大学）

## 論文内容の要旨

F<sub>1</sub>-ATPaseはタンパク質1分子でできた回転モーターである。F<sub>1</sub>-ATPaseを構成している $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットはそれぞれ3つずつあり、交互に並んで六角形の筒状構造をつくっている。その中央部には、回転子である $\gamma$ サブユニットがある。触媒部位は $\beta$ サブユニットに存在し、3つの $\beta$ サブユニットでATPが順番に加水分解されることによって $\gamma$ サブユニットが回転する。 $\gamma$ サブユニットはATPが1つ消費されるごとに120°回転(120°ステップ)する。

F<sub>1</sub>-ATPaseが回転しているときに触媒部位に結合しているヌクレオチド(ATPまたはADP)の数(触媒部位占有数)がどのように移り変わっているかはよくわかっていない。現在、ヌクレオチドの触媒部位占有数が1と2を交互に繰り返しながら回転(bi-site回転)しているのだとするbi-siteモデルと、2と3を交互に繰り返しながら回転(tri-site回転)しているのだとするtri-siteモデルが有力である。ATP濃度が高い場合はF<sub>1</sub>-ATPaseはtri-site回転すると多くの研究者が考えているが、ATP濃度が低い場合についてはよくわかっていない。

本研究では、ATP濃度が低くなるとヌクレオチドの触媒部位占有数が減少してbi-site回転に移行するかもしれないと考え、F<sub>1</sub>-ATPaseの回転速度とトルクを極めて低いATP濃度まで測定し、それらのATP濃度依存性を調べた。

F<sub>1</sub>-ATPaseの回転は光学顕微鏡によって観察した。F<sub>1</sub>-ATPaseをガラス表面に固定し、 $\gamma$ サブユニットにプラスチックの微小球体(ビーズ)をつけることによって、F<sub>1</sub>-ATPaseの回転を可視化した。

ATP濃度が低くなると回転しているF<sub>1</sub>-ATPaseの数が減少してしまう問題があったが、あらかじめF<sub>1</sub>-ATPaseを高濃度のATPと混ぜてしばらく置いておくこと(ATPプレインキュベーション)によってそれが改善されることがわかった。そこで、600 nM ATP以下で回転観察する場合は、2  $\mu$ Mまたは6  $\mu$ M ATPで1時間プレインキュベーションした。これまでの報告では20 nM ATP以上でしか回転観察されていなかったが、200 pMという極めて低いATP濃度でもF<sub>1</sub>-ATPaseは回転することがわかった。

回転速度のATP濃度依存性は、直径が0.287  $\mu$ mまたは0.49  $\mu$ mのビーズを使用して調べた。少なくとも0.2-600 nMの範囲では回転速度はATP濃度にはほぼ比例し、ATPの見かけの結合速度定数は $2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>であると見積もられた(それ以上のATP濃度では、溶液の粘性抵抗のためにビーズの回転速度が頭打ちになった)。この結果は、少なくともこのATP濃度領域ではATPの結合速度が律速となっており、回転メカニズムが変化していないことを示している。実質的に無負荷であるとみなせる40 nmの金コロイドを使用した場合でも20 nM ATPから6 mM ATPの範囲で回転メカニズムが1つであるとする報告があることから、F<sub>1</sub>-ATPaseはnMからmMまでの広いATP濃度領域にわたって同一のメカニズムで回転していると考えられる。

トルクのATP濃度依存性は、同一のF<sub>1</sub>-ATPase分子を観察しながらATP濃度を2 nM、60 nM、2 mMの順に変えて調べた。トルクはステップする瞬間の回転速度とビーズに働く溶液からの粘性抵抗から求めた。直径0.95  $\mu$ mのビーズを使用してステップする瞬間の回転速度を遅くし、ビデオレート(30フレーム/秒)でもステップの様子を詳細にとらえられるようにした。その結果、トルクはATP濃度によらずほぼ一定で、約40 pN $\cdot$ nmであることがわかった。

以上のような結果から、ATP濃度によって回転メカニズムが切り替わることはなことはないと考えられる。ただし、ATPの見かけの結合速度定数が同じである2つの回転メカニズムが存在する可能性は否定できない。また、1 nM ATPより低い濃度では、それより高いATP濃度ではあまり見られないステップが観察されたことから、そのような極めて低いATP濃度では別の回転メカニズムが存在するかもしれない。

## 論文審査結果の要旨

F<sub>1</sub>-ATPaseというたんぱく質分子は、ATP駆動の回転モーターであることが分かっている。3組の $\alpha\beta$ サブユニットが筒状に並んだ中を、 $\gamma$ サブユニットが回転する。3つの $\beta$ サブユニットにそれぞれ1ヶ所ある合計3つの活性部位で、順にATPが加水分解される度に、120度の回転が起きる。3つの活性部位がどのように協調して回転を引き起こすのかはまだよく分かっていない。回転中に何個のヌクレオチド(ATPまたはADP)が活性部位に結合しているかすらまだ論争中で、結合数が2(ATP待ち) - 3 - 2(次のATP待ち)・・・と変化するというtri-site説と1 - 2 - 1・・・と変化するbi-site説の間で決着がつかない。そこで本論文では、ATP濃度を従来の測定範囲を大きく超えて極端に低いところまで変化させながら回転観察を行い、濃度減少とともにtri-siteからbi-siteへの切り替わりが起きるかどうかを問うた。

第1章は序論で、F<sub>1</sub>-ATPaseに関する従来の知識をまとめた上で、上記問題を設定している。

第2章では、回転速度のATP濃度依存性を調べている。ガラス面上に固定したF<sub>1</sub>-ATPaseの $\gamma$ サブユニットに、直径0.3ないし0.5  $\mu\text{m}$ のプラスチックビーズを結合させ、個々の分子の回転を光学顕微鏡の下で観察した。ATP濃度がnMレベル以下になると、回転している分子の数が極端に減るという実験上の困難があったが、あらかじめF<sub>1</sub>-ATPaseを高濃度ATP溶液に1時間程度さらすと回転確率が増すことを発見し、200 pMという低濃度までの回転観察が可能となった。その結果、600 nMから200 pMの範囲で、時間平均した回転速度はATP濃度に比例することが分かった。従来の結果とも合わせ、nMからmMという広い濃度範囲で回転機構が同一であることが示唆される。

一方、600 pMと200 pMにおいては、詳細な観察の結果、従来から観察されていた120度おきのステップの他に、40度のバックステップや、バックした位置からの120度ステップなどがかなり頻繁に起きることが分かった。これは、nM以下の濃度領域において別の回転機構が出現することを示唆する。

第3章では、回転力(トルク)のATP濃度依存性が調べられている。トルクは、ビーズに働く粘性抵抗から求めた。低ATP濃度では回転がステップ状になるが、ステップ中の回転速度に粘性による摩擦係数をかけて、トルクを求めた。同一分子につきATP濃度を2 nM、60 nM、2 mMと変えて回転観察した結果、3つの濃度でほぼ同じトルク(いずれも約40 pN $\cdot$ nm)を出すことが分かった。この結果も、nM以上では回転機構が同一であることを示唆する。

第4章は考察で、あらかじめ高濃度ATPにさらすことで回転する分子の数が増えることの原因や、回転機構の切り替わりの可能性などにつき議論している。ATP濃度mMからnMの範囲では回転機構はおそらく同一、nM以下になって別の回転機構が出現、という結果は、他の研究者の結果とも合わせ、nM以上はtri-site、nM以下になってbi-site、と解釈するのが一番自然である。ただし、nM以上の濃度範囲での回転機構の切り替わりを完全に否定することはできない。2つの回転機構において、ATP結合の速度定数(これが時間平均した回転速度を決める)とトルクがともに共通なら、本論文の実験結果からは見分けが付かないからである。

第5章には結論がまとめられている。

これら一連の研究成果は、すでに英文論文としてBiophysical Journalに印刷中であり、本審査委員会は、榊 直由君の提出論文は学位を与えるに相応しいものとなっていると判定した。