

## 高速度撮影による変異体 F<sub>1</sub>-ATPase の化学反応過程と 回転角度の共役機構の研究

学習院大学理学部物理学科教授 西坂 崇之  
EF 共同研究員 下澤 東吾

### 【背景と概要】

ほとんどの原核および真核細胞には F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素とよばれるタンパク質が存在し、生理的に重要な役割を担っている。その可用性部分である F<sub>1</sub>-ATPase (以下 F<sub>1</sub>) は、 $\alpha$   $\beta$  サブユニット各 3 個からなるリングと、リング中心に位置し回転軸となる  $\gamma$  サブユニット (以下  $\gamma$ ) で構成される回転分子モーターである。F<sub>1</sub> は ATP の分解・合成反応と  $\gamma$  の回転運動が可逆的に共役して化学-力学エネルギー変換を行う、つまり ATP 加水分解エネルギーが  $\gamma$  の回転運動に変換され、 $\gamma$  を強制的に逆回転させると ADP と無機リン酸から ATP が合成されることが知られている (図 1)。また ATP 加水分解時は 100% に近い変換効率を実現できることが報告されている [1]。このような可逆で高効率という理想的なエネルギー変換特性は現在の先端技術でも実現できない特性であり、F<sub>1</sub> の化学-力学エネルギー変換機構を詳細に理解することは非常に意義深いと考えられる。

これまで ATP 加水分解時の共役については、光学顕微鏡による 1 分子回転観察から ATP 1 個あたり  $\gamma$  が 120° 回転すること、そのサブステップとして ATP 結合で 80°、その後の ATP 加水分解と生成物の放出で 40° 回転することが解っている (図 1) [2, 3]。しかしこの共役機構やサブステップ角度の決定に重要な分子 (アミノ酸残基) 間相互作用はまだ明らかになっていない。そこで本課題では、詳細な解析を高時間分解能で行うことのできる測定系のブラッシュアップを進め、反応過程と回転角度の共役に重要な分子間相互作用の同定を目指した。十分な空間分解能および時間分解能が達成できれば、F<sub>1</sub> の化学-力学エネルギー変換機構の理解がより深まるはずである。

### 【研究の内容と成果】

[試料]  $\gamma$  の機能に着目すると、これまでに  $\gamma$  自体は 1 方向の回転には必須ではないが、正常な反応には  $\gamma$  と  $\alpha_3\beta_3$  の 2 つの相互作用領域の協調が重要であること報告されている。そこで我々は、F<sub>1</sub> の回転における  $\gamma$  の機能を探るために、2 つの領域間にあるアミノ酸 1 残基を削除して中心軸をね

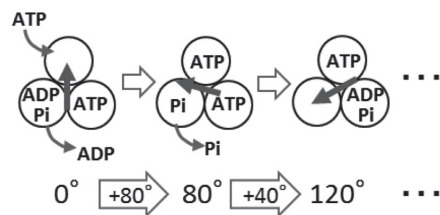


図 1: 知られている野生型 F<sub>1</sub> の ATP 加水分解時の化学反応過程と回転角度のカップリングスキームの一つ。矢印:  $\gamma$  の角度、黒丸:  $\beta$ 、 $\alpha$  は省略した

じった (2つ相互作用領域の協調を乱した) 変異体である  $\gamma \Delta A275$  を作製して回転特性を高時間・空間分解能において解析した。

[装置] 回転モーターの観察において、サブステップ数とサブステップ角度を高速・高精度で測定できる改良した観察方法および解析方法を構築した。この方法論は、将来的に様々な ATP 濃度・無機リン酸濃度下および ATP アナログ種存在下での回転観察と各サブステップの待機時間の解析を効率的に行うことができ、さまざまな変異体の各サブステップの律速反応過程を同定や、変異による化学反応過程への影響の検討につながるはずである。

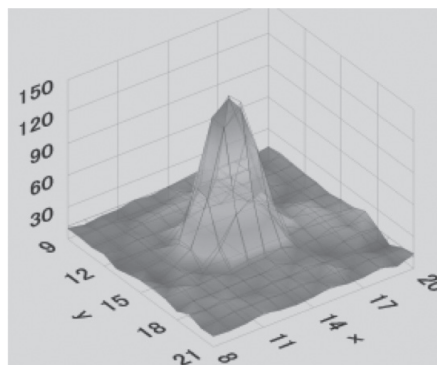


図2: 時間分解能  $100 \mu\text{s}$  で取得した金コロイド画像と2次元ガウス関数によるフィッティング結果。高 S/N の画像が得られていることがわかる。横軸: ピクセル、縦軸: 光強度、1 ピクセル:  $85 \text{ nm}$

変異体の回転では、野生型では観察されていない高速な反応過程を含んでいる可能性がある。このため、より高い時間・空間分解能をもつ観察方法が必要となった。F<sub>1</sub> の回転観察方法では現時点で最高の時間・空間分解能である全反射型暗視野観察法 [4] と金コロイド標識法を用いている。標識した金コロイドの位置解析は、これまでは画像を2次元ガウス関数でフィッティングすることで行ってきたが、解析の時間コストを大幅に減少する画像解析の方法論も取り入れた [5]。現在のところ、時間分解能  $100 \mu\text{s}$  での撮影条件で約  $3 \text{ nm}$  の空間分解能が得られている (図2)。高速度撮影は取得画像のデータ量が膨大となるため、フィッティングの計算時間がデータ解析の大部分を占める。フィッティングアルゴリズムの最適化・自動解析プログラム・計算機環境についても検討し、得られた画像データを迅速に解析して次回の実験条件の検討時にフィードバックを可能にした。これらの技術開発を通じ、質・量ともに高いレベルのデータを得ることで F<sub>1</sub> の化学-力学エネルギー変換機構の理解を深める結果を導くことができる。

[結果] 回転の挙動を詳細に観察するために、 $\gamma$  を avidin-biotin を介して結合させた  $\phi 40 \text{ nm}$  の金コロイド粒子により標識し、全反射型レーザー暗視野照明法により  $4,000 - 10,000 \text{ fps}$  の高速観察を行った。また高速観察に特有の膨大なフレーム数の画像データを迅速に解析するために、高速 ( $5,000 \text{ frame/sec}$ ) 画像解析ソフトウェアを開発した。画像解析より得られた ATP 濃度と回転速度の関係のプロットは、Michaelis-Menten 式でよく近似できた。近似の結果より求めた酵素活性の KM と Vmax はそれぞれ  $2.1 \mu\text{M}$  と  $14.4 \text{ r.p.s.}$  であり、野生型の Vmax に比べ約  $1/10$  の値であった。KM 付近である  $[\text{ATP}] = 1 \mu\text{M}$  において、明確なステップ状の回転軌跡を示す分子について解析したところ9点の停止点が観察された。これは変異体も含めて F<sub>1</sub> の回転観察でこれまでに報告されている“6点の停止点”とは異なる停止点を持つ変異体であることが解った。さらにこの回転

の軌跡を詳細に解析すると、9点のうちの6点(2点×3)は2点間の頻繁な往復運動を伴う dwell (2 pause-dwell: 2 p-dwell)、残りの3点(1点×3)は往復運動を伴わない通常の dwell (1 pause-dwell: 1p-dwell) であり、2p-dwell と 1p-dwell が交互に現れていた。ATP 濃度を変化させて 2p-dwell と 1p-dwell の持続時間を解析したところ、1p-dwell の持続時間は ATP 濃度に依存し、2p-dwell の持続時間は ATP 濃度に依存しなかった。また ATP  $\gamma$  S を用いた実験では 2p-dwell の持続時間が増加し、また ATP  $\gamma$  S 濃度には依存しなかったことから、1p-dwell が ATP 結合待ち、2s-dwell が ATP 分解待ちに対応すると結論した。定量的な解析から、2p-dwell の ATP 結合待ちの  $k_{onATP}$  は、 $\sim 4.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となり野生型と同程度であった。

### 【展望】

$\gamma$   $\Delta$  A275 は野生型と比較して、 $k_{onATP}$  には大差がなく  $k_{cat}$  が大きく減少したことから、 $\gamma$  と  $\alpha_3$   $\beta_3$  の2箇所の相互作用は ATP 分解過程に重要と考えられる。今回見出された往復運動中の2つの各 dwell が野生型では顕在化しない ATP 状態と ADP・Pi 状態に対応する可能性がある。今後、2つの各 dwell の化学状態を、AMPPNP 等のヌクレオチドアナログの流入時の回転停止角度の検出と、チオリン酸の存在化での回転挙動の変化、から解析する予定である。また、 $\gamma$  をねじったことによる化学状態と絶対的な3次元構造の関係の変化についても、Cystein を特定部位に導入した変異体を用いたクロスリンク実験により明らかにしたいと考えている。

【謝辞】 計算機センターのスタッフの方には、本研究費の執行に当たり、惜しめないサポートをいただきました。感謝いたします。また本研究課題は、西坂研究室で2013年度まで進められた「最先端・次世代研究開発支援プログラム」とは関わりなく、課題内容や研究設備、消耗品についても一切オーバーラップが無いよう、十分な注意を払っています。

### 【文献】

- [1] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita, Jr., and M. Yoshida. "F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete  $120^\circ$  steps," *Cell*, vol. 93, pp. 1117-1124, 1998.
- [2] T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr. "Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, pp. 142-148, 2004.
- [3] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita, Jr., and H. Itoh. "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase," *Nature*, vol. 410,

pp. 898-904, 2001.

[4] H. Ueno, S. Nishikawa, R. Iino, K. V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida, and H. Noji. "Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution," *Biophys J*, vol. 98, pp. 2014-2023, 2010.

[5] R. Parthasarathy. "Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers," *Nature methods*, vol. 9, pp. 724-726, 2012.