

Rikiya Watanabe, **Ryota Iino**, Katsuya Shimabukuro, Masasuke Yoshida, **Hiroyuki Noji**

1)はじめに

F₁-ATPase(F₁)はタンパク質で出来た分子モーターであり、ATP加水分解のエネルギーを駆動力として回転する¹⁾。F₁を構成するサブユニットのうち回転に必要な最小単位は $\alpha_3\beta_3\gamma$ であり、 $\alpha_3\beta_3$ で形成されたリング状構造の中に刺さった γ が、触媒サブユニットである β 上でのATP加水分解に伴い回転する。F₁の回転運動が1分子観察によって直接可視化されて以降²⁾、F₁のATP加水分解反応と力学的回転がどのように共役しているのかを知るための精力的な研究がなされてきた。そしてこれまでに、1個のATP加水分解で γ は120°回転すること(つまり1回転で3個のATPを加水分解する)³⁾、120°の回転ステップはATP結合による80°の回転→ATP加水分解(回転なし)→40°の回転⁴⁾、⁵⁾、というさらに細かなステップに分けられることが明らかとなっていた。一方、40°の回転を引き起こすのは生成物(ADP または無機リン酸)の解離だと予想されていたが、実験的証拠は得られていなかった。

我々は今回、4°C付近の低温でF₁の回転を1分子観察し、ADPの解離はATP結合と同じ角度で起こることを明らかにした。また、無機リン酸の解離が40°の回転を引き起こすことを強く示唆する結果を得た。

2)実験方法

固定子である $\alpha_3\beta_3$ リングに導入したヒスチジンタグを介し、Ni-NTAで修飾した基板にF₁を固定した。回転を可視化するプローブには直径200nmの磁気ビーズを用い、アビジン-ビオチン結合を介して回転子である γ に結合させた。ビーズの回転は、明視野法または位相差法により光学顕微鏡で観察した。顕微鏡全体を低温室に入れ、対物レンズヒーターを用いて温度制御を行った。

3)結果と考察

4°C付近の低温では、ATP結合が律速とならないATP高濃度条件下でも120°毎の3点のステップ回転が観察された(図1)。回転観察時にATPから加水分解の遅いATPアナログであるATP γ Sに溶液交換を行った実験や(図2A-C)、ATP γ S存在下で温度を変化させた回転観察により(図2D-F)、低温、ATP高濃度で観察されるステップの角度はATP結合の角度と同じであることが明らかとなった。さらに、ATPに加えて高濃度のADPまたは無機リン酸を加えて回転を観察した結果、ADPではステップの位置は変化しないが滞在時間が延びること(図3A,B,D,E,G,H)、および無機リン酸では-40°の角度に新たなステップが現れることが明らかとなった(図3C,F,I)。以上の結果は、1)ADPの解離はATP結合と同じ角度で起こること、2)無機リン酸の解離はATP加水分解の角度で起こり40°の回転を引き起こすこと、を強く示唆した。以上の結果をもとに、F₁のATP加水分解と力学的回転の共役のモデルを提案した(図4)。

4)まとめ

4°C付近の低温でF₁の回転を観察し、25°C付近の室温では観察されていなかった新規な反応中間体を同定した。この反応中間体はADPを解離する前の状態に相当し(図4B)、回転子である γ の角度はATP結合待ちの状態(図4AおよびG)と同じであった。また、無機リン酸の解離はATP加水分解の角度で起こり40°の回転を駆動することが示唆された(図4F,G)。尚、本研究の結論は、最近発表された蛍光ATPを用いた1分子計測でも支持されている⁶⁾。

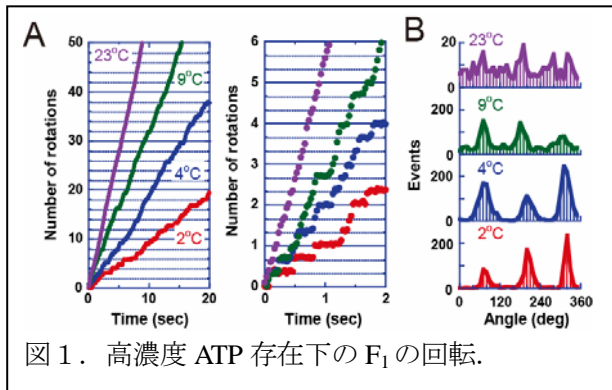


図1. 高濃度 ATP 存在下の F_1 の回転.

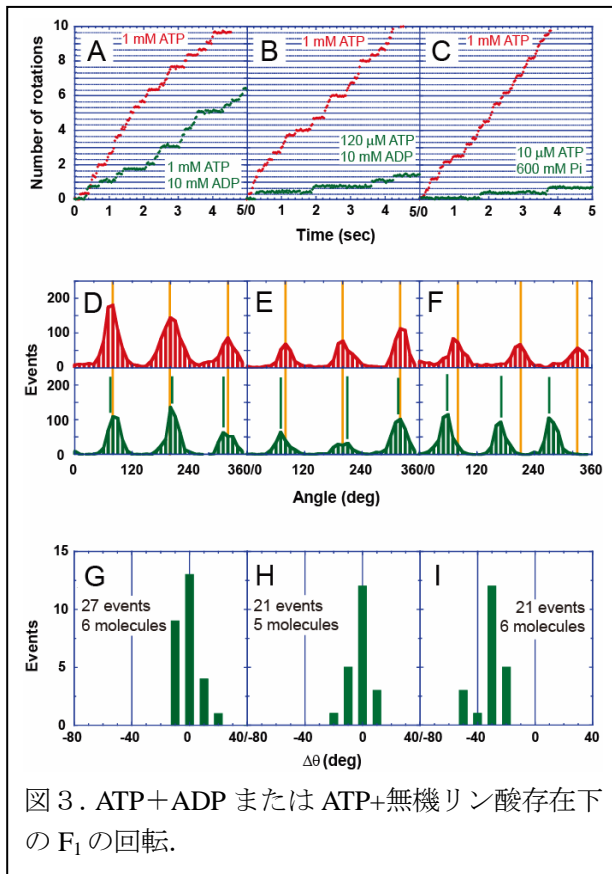


図3. ATP+ADP または ATP+無機リン酸存在下の F_1 の回転.

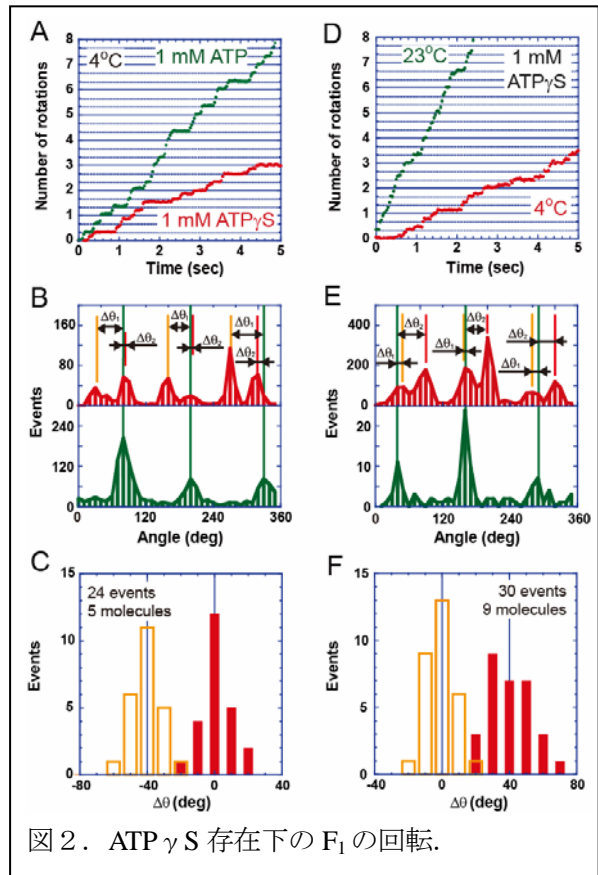


図2. ATP γ S 存在下の F_1 の回転.

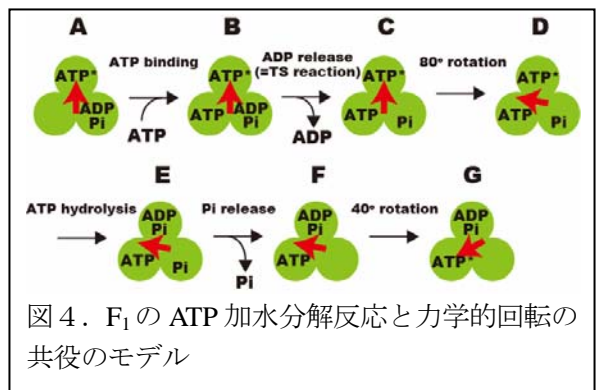


図4. F_1 の ATP 加水分解反応と力学的回転の共役のモデル

参考文献

- 1) Masasuke Yoshida, Erio Muneyuki, Toru Hisabori. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 669–677 (2001)
- 2) Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinosita Jr. *Nature.* **386**, 299–302 (1997).
- 3) Ryohei Yasuda, Hiroyuki Noji, Kazuhiko Kinosita Jr., Masasuke Yoshida. *Cell.* **93**, 1117–1124 (1998).
- 4) Ryohei Yasuda, Hiroyuki Noji, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinosita Jr., Hiroyasu Itoh. *Nature.* **410**, 898–904 (2001).
- 5) Katsuya Shimabukuro, Ryohei Yasuda, Erio Muneyuki, Kiyotaka Y. Hara, Kazuhiko Kinosita Jr., Masasuke Yoshida. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 14731–14736 (2003).
- 6) Kengo Adachi, Kazuhiro Oiwa, Takatyuki Nishizaka, Shou Furuike, Hiroyuki Noji, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinosita Jr. *Cell.* **130**, 309–321 (2007).