

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院生研究
2006年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院			理学研究科	生命理学専攻
指導教員	所属・職名		氏名		
	理学部・講師		山田 康之 印		
自然・人文の別	自然		個人・共同の別	個人	
研究課題名	好熱菌 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節の 1 分子操作による解析				
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
	理学研究科・生命理学専攻 博士前期課程 1 年		春山 隆充 印		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名		
研究期間	2006 年度				
研究経費	500 千円				

研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

ATP 合成酵素は F_0 部分と F_1 部分で構成され、 F_1 部分の ϵ サブユニットは ATP 加水分解を制御している。この制御の詳細を調べるために、 F_1 の分子モータータンパク質としての性質を利用した 1 分子観察の実験系を用いた研究を行ってきた。そして、 ϵ サブユニットによる ATP 加水分解の制御の様子を 1 分子観察し、不活性型から活性型になるときの状態の変化を明らかにしてきた。本研究ではさらに、磁気ピンセットにより、 F_1 1 分子を直接操作することで、膜ポテンシャルが ϵ サブユニットによる ATP 合成酵素の制御にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

キーワード (研究内容をよく表しているものを 3 項目以内で記入。)

[阻害] [1 分子観察] [停止]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

好熱菌 *Bacillus* PS3 由来の $F_1(TF_1)$ の ϵ サブユニットによる活性調節について、以下のことがわかった。

1. TF_1 の ϵ サブユニットによる阻害形式

ATPase 活性測定の結果から TF_1 の ϵ サブユニットによる阻害形式は、① γ サブユニットの回転を停止している ② γ サブユニットの回転を遅くしている ③ ①②以外の3つのパターンが考えられた。そこで1分子観察を行い、 ϵ サブユニットによる阻害形式を決定することにした。 TF_1 を Ni-NTA で処理したガラスに固定し、そこに $50 \mu\text{M}$ ATP を加え、 TF_1 分子の挙動を観察したところ ATP を加えた直後は停止していて、しばらくしてから回転が始まる様子が観察された。これより TF_1 の ϵ サブユニットは γ サブユニットの回転を停止していることが分かった。

2. TF_1 の ϵ サブユニットによる阻害状態での停止位置

ϵ サブユニットによる阻害状態で γ サブユニットの回転が停止していることが分かったので、次にこの停止位置を決定することにした。 γ サブユニットは ATP 1 分子あたり 120 度ずつ、反時計回りに回転することが知られている。この 120 度のステップは更に 80 度と 40 度のサブステップに分けられる。80 度のサブステップは ATP の結合に伴って起こり、40 度のサブステップは ADP, P_i の解離に伴って起こる。ATP 濃度が低いときに観察される停止状態は、ATP の結合を待っているものであり、その寿命は ATP 濃度に依存する事が知られている。ATP 結合を待っている角度を 0 度、120 度、240 度とすると、80 度、200 度、320 度の位置では ATP 加水分解、生成物の遊離を待っている状態が観察でき、その寿命は野生型の TF_1 では約 2 m s であることが知られている。 ϵ サブユニットによる阻害状態での停止位置を ATP 加水分解の位置と比較するために加水分解される速度が非常に遅い ATP アナログである $ATP\gamma S$ を用いて実験を行った。これにより、加水分解、生成物の遊離を待っている状態の寿命が長くなり、その位置をビデオレートでの観察でも特定する事が出来る。両者の位置を比較することで ϵ サブユニットによる阻害状態での停止位置を決定したところ、停止位置は ATP 加水分解の位置より反時計回りに 10 度進んだところということが分かった。

3. TF_1 の ϵ サブユニットによる阻害状態での γ サブユニットの揺らぎのポテンシャル

ϵ サブユニットによる阻害状態で γ サブユニットをどれくらい堅く固定しているのかを調べた。阻害状態で停止しているビーズのブラウン運動の様子を高速シャッターにより録画し、その様子から停止状態における γ サブユニットの揺らぎの大きさを求めた。比較のために γ サブユニットが ADP 阻害により停止している状態でのポテンシャルも求めた。両者を比較したところポテンシャルの形状に違いは見られなかった。この結果から ϵ サブユニットが γ サブユニットを堅く固定しているわけではないことがわかった。

研究成果の概要 つづき

ここまでの結果をまとめていたが、データを詳細に解析すると以下に示すような問題が明らかになった。

1. 1分子観察中にフォーカスとステージのドリフトが発生し、観察試料の位置がずれてしまう。これにより、角度決定の精度が無視できない程度に低下してしまう。
2. バッファの pH の違いが ϵ サブユニットによる阻害に大きく影響する。
3. 反応液中に含まれる界面活性剤、LDAO 濃度のわずかな違いが ϵ サブユニットによる阻害に大きく影響する。

1. の問題を解決するために、顕微鏡に超安定性ステージとステージコントローラーを導入し、測定の安定性を向上させる事を試みた。その結果、長時間、安定した測定が行えるようになった。また、2.、3. のように、1分子観察と多分子での ATPase 活性測定の場合の微妙な差異が結果に影響を与えることから、バッファの pH と LDAO 濃度を厳密に揃えて、1分子観察、ATPase 活性測定を行う必要がある。そのために最適な実験条件を検討した。

最適な実験条件が把握できたので、現在その条件でデータを取り直しているところである。

また、1分子操作の実験に必要な磁気ピンセットは、制作を依頼し完成した。現在は、必要な制御プログラムの変更に取り組んでおり、上記実験が終了し次第、1分子操作の実験に取りかかる予定である。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①~④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

学会発表

ϵ Subunit Stops Rotation of Thermophilic F_1 -ATPase; Single Molecular Analysis of the Inhibition by the ϵ Subunit.

○ **Takamitsu Haruyama**¹, Yoko Hirono-Hara², Hiroyuki Noji³, Yasuyuki Kato-Yamada¹

¹Department of Life Science, College of Science, Rikkyo (St. Paul's) University ²Institute of Industrial Science, The University of Tokyo ³The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

第44回日本生物物理学会年会 第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議
(沖縄コンベンションセンター、2006年11月13日)

好熱菌 F_1 -ATPase の ϵ サブユニットによる活性調節の1分子解析

○ **春山隆充**¹、原陽子²、野地博行³、山田康之¹

(¹立教大・理、²東大・生産研、³阪大・産研)

日本生体エネルギー研究会 第32回討論会

(東京工業大学大岡山キャンパス・デジタル多目的ホール、2006年12月15日)