

中央大学博士論文

F<sub>1</sub>-ATPase へのヌクレオチドの結合と  
回転メカニズムの関係

Relationship between nucleotide binding and  
rotation mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase

Kikuchi Yohsuke

菊池 洋輔

博士（理学）

中央大学大学院  
理工学研究科  
物理学専攻

2015年3月

# 目次

略語一覧 .....	4
序章 .....	6
1.1 FoF <sub>1</sub> ATP 合成酵素と F <sub>1</sub> -ATPase .....	7
1.1.1 ATP 加水分解反応 .....	7
1.1.2 Mitchell の化学浸透圧説 .....	8
1.1.3 FoF <sub>1</sub> ATP 合成酵素は回転運動をする .....	9
1.1.4 F <sub>1</sub> -ATPase は ATP の加水分解/合成をおこなう .....	11
1.1.5 F <sub>1</sub> -ATPase は GTP, ITP も加水分解する .....	12
1.2 F <sub>1</sub> の回転におけるヌクレオチド結合の役割 .....	13
1.2.1 F <sub>1</sub> を構成するサブユニットと立体構造 .....	13
1.2.2 交代結合説による F <sub>1</sub> の回転メカニズム .....	14
1.2.3 F <sub>1</sub> の一分子回転観察 .....	15
1.2.4 F <sub>1</sub> の回転スキーム .....	17
1.2.5 ヌクレオチド結合によるβサブユニットの構造変化 .....	18
1.3 外力による F <sub>1</sub> の回転運動への影響 .....	19
1.3.1 F <sub>1</sub> のγサブユニットに外部トルクを加える .....	19
1.3.2 一定の外部トルクによる F <sub>1</sub> の平均回転速度の変化 .....	20
1.3.3 stall 状態で回転と反応は 1:1 でカップリングする .....	21
1.3.4 外部トルクによる dwell time の変化 .....	22
1.3.5 dwell time は活性化エネルギーに依存する .....	23
第二章 .....	25
2.1 F <sub>1</sub> へのヌクレオチド結合反応を調べる .....	26
2.1.1 実験の目的 .....	26
2.1.2 タンパク質とヌクレオチドの組み合わせで比較する .....	26
2.2 試料 .....	27
2.2.1 測定用 buffer .....	27
2.2.2 使用するヌクレオチド .....	27
2.2.3 使用するタンパク質 .....	28
2.2.4 βY341W, βE190Q 変異 .....	28
2.3 測定方法と解析方法 .....	31
2.3.1 βY341W 変異体の蛍光強度の時間変化測定 .....	31
2.3.2 消光率のグラフから解離定数を求める .....	32
2.3.3 van't Hoff plot から結合の熱力学的パラメータを求める .....	35
2.4 結果 .....	36

2.4.1	$\beta$ (Y341W)への結合のパラメータ .....	38
2.4.2	$\beta$ (Y341W, E190Q)への結合のパラメータ .....	38
2.4.3	$\alpha_3\beta$ (Y341W) <sub>3<math>\gamma</math></sub> への結合のパラメータ .....	39
2.4.4	$\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) <sub>3<math>\gamma</math></sub> への結合のパラメータ .....	39
2.4.5	塩基が異なるヌクレオチドは <i>Kd</i> が大幅に異なる .....	39
2.4.6	E190Qの影響は単体とサブコンプレックスで異なる .....	40
2.4.7	$\beta$ (Y341W)と $\alpha_3\beta$ (Y341W) <sub>3<math>\gamma</math></sub> の比較 図2.4.3参照 .....	42
2.4.8	$\beta$ (Y341W, E190Q)と $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) <sub>3<math>\gamma</math></sub> の比較 図2.4.4参照 .....	42
2.4.9	複合体の効果のまとめ .....	45
2.5	考察 .....	46
2.5.1	結合の形成によるエントロピーへの寄与 .....	46
2.5.2	水のエントロピー増加による F <sub>1</sub> の回転メカニズム .....	47
第三章	.....	49
3.1	外部トルクによる F <sub>1</sub> の回転への影響 .....	50
3.1.1	外部トルクの大きさで F <sub>1</sub> の反応の方向が決まる .....	50
3.1.2	外部トルクによる dwell time への影響を調べる .....	51
3.2	試料 .....	52
3.2.1	測定用 buffer .....	52
3.2.2	使用する F <sub>1</sub> .....	52
3.3	測定方法とデータの解析 .....	53
3.3.1	チャンバーの組み方 .....	53
3.3.2	回転電場法の測定系 .....	54
3.3.3	一分子回転観察の手順 .....	55
3.3.4	外部トルクの校正 .....	55
3.3.4	ステップ回転の解析法 .....	57
3.3.5	dwell time の時定数の測定 .....	58
3.3.6	Characteristic length の導出 .....	58
3.4	結果 .....	59
3.4.1	0.2 uM ATP, 0.2 uM ADP, 1000 uM Pi での測定結果 .....	59
3.4.2	0.6 uM ATP, 0.6 uM ADP, 1000 uM Pi での測定結果 .....	62
3.4.3	自由エネルギー変化を変えたとき .....	63
3.5	考察 .....	64
3.5.1	Characteristic length の合計が 120° にならなかった .....	64
3.5.2	先行研究で発表されたデータでも $lh + ls < 120^\circ$ である .....	65
3.5.3	Characteristic length が外力に依存する可能性 .....	67
3.5.4	回転のトラジェクトリからポテンシャルの形を見積もる .....	68

3.5.4 計算による予想 .....	69
第四章 .....	70
4.1 蛍光測定の設定 .....	71
4.1.1 測定に使用したヌクレオチドと測定用 buffer の調製 .....	71
4.1.2 $\beta$ 単体と $\alpha_3\beta_3\gamma$ での測定手順の違い .....	72
4.1.3 使用する蛍光測定器と機器の設定 .....	73
4.2 回転電場法による外部トルクの校正 .....	75
4.2.1 回転ブラウン粒子の回転速度から求める方法 .....	75
4.2.2 揺動散逸定理を使った方法 .....	75
参考文献 .....	77
投稿論文・学会発表 .....	84
謝辞 .....	85

## 略語一覧

F<sub>1</sub> : F<sub>1</sub>-ATPase

TF1 :

ATP : アデノシン三リン酸

ADP : アデノシン二リン酸

GTP : グアニン三リン酸

GDP : グアニンリン酸

ITP : イノシン三リン酸

IDP : イノシン二リン酸

NTP : 三リン酸ヌクレオシド。本論文では ATP, GTP, ITP を指す。

NDP : 二リン酸ヌクレオシド。本論文では ADP, GDP, IDP を指す

Nuc : ヌクレオチドのこと。本論文では ATP, ADP, GTP, GDP, ITP, IDP を指す。

P<sub>i</sub> : 無機リン酸

# 序章

## 序章

$F_1$ -ATPase は ATP を加水分解することで回転運動を行う分子モーターである<sup>1,2</sup>。 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが交互に並んだ六量体リングと、リングの中心に突き刺さった回転子である $\gamma$ サブユニットから成る $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスを最小構成単位とする<sup>2i</sup>。1つの ATP を加水分解するたびに $\gamma$ サブユニットが $\alpha_3\beta_3$ リングに対して  $120^\circ$  回転する<sup>3</sup>。この  $120^\circ$  のステップ回転は  $80^\circ$  と  $40^\circ$  のサブステップから構成されていることが明らかになっており、前半の  $80^\circ$  サブステップは ATP の化学結合の切断を伴わない ATP の結合と ADP の解離によって引き起こされる<sup>3,4</sup>。本研究では ATP や ADP 等のヌクレオチドの脱着と、 $80^\circ$  サブステップ前の停止状態の外部トルク依存性を調べた。

2章では触媒部位をもつ $\beta$ サブユニットへのヌクレオチド結合の測定について記す。 $F_1$ には3つの触媒部位があり、ATP が順番に結合することで  $F_1$  は一方向に回転する。3つの触媒部位へのヌクレオチド結合の親和性は異なっており、ヌクレオチドの脱着により結合の親和性が変化する。触媒部位が親和性を変化させることで順番にヌクレオチドを結合して反応するモデルは交代結合説と呼ばれ、Boyer によって提唱された<sup>5</sup>。その後の研究によって加水分解中に回転運動することが確かめられた<sup>2</sup>。触媒部位にヌクレオチドが結合すると $\beta$ サブユニットは全体が折れ曲がるような構造変化をする<sup>6</sup>。この構造変化により中心の $\gamma$ サブユニットの出っ張りを押して回転させていると言われている。単離した $\beta$ サブユニット単体もヌクレオチド結合によって同様の構造変化をする<sup>7,8</sup>。 $\beta$ サブユニット単体は加水分解活性を持たないため、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスと $\beta$ サブユニット単体へのヌクレオチド結合の比較からサブユニットが複合体を作ることの効果を調べることができる。結合の親和性の温度依存性からヌクレオチド結合反応の熱力学的パラメータを求めた。

3章では外力存在下の  $F_1$  の一分子回転観察について記す。 $F_1$  は ATP 加水分解から得られる自由エネルギーを利用して自発的な回転運動を行う。 $F_1$  に逆方向の外部トルクを加えると回転速度は遅くなる<sup>9,10</sup>。外部トルクが  $F_1$  の出すトルクよりも強いときには ATP 加水分解時とは逆方向に回転しながら ATP を合成する<sup>11</sup>。ATP 合成時も  $F_1$  は  $120^\circ$  ずつステップ回転をすることが知られており、外部トルクが強くなると合成方向のステップ頻度も増えていく<sup>10</sup>。平均回転速度が 0 になる平衡状態では、 $120^\circ$  の回転の間に外部トルクが  $F_1$  にする仕事と、 $F_1$  が行う化学反応の自由エネルギー変化が等しいことが明らかになっている<sup>10</sup>。本研究では外部トルクによる  $120^\circ$  ステップの回転と共役した反応速度への影響を調べた。反応速度は遷移状態理論より  $120^\circ$  ステップの間の遷移状態の活性化エネルギーによってきまる。外部トルクを加えた  $F_1$  の回転の dwell time 解析を行うことで遷移状態について調べた。

---

i 以下 $\alpha_3\beta_3\gamma$ を  $F_1$  と呼ぶ

## 1.1 FoF<sub>1</sub>ATP 合成酵素と F<sub>1</sub>-ATPase

### 1.1.1 ATP 加水分解反応

物質の輸送や生体分子の構成など生体内ではエネルギーを必要とする場面が多く存在する。ATP(アデノシン三リン酸)はアデノシンのリボースにリン酸(Pi)が3つ連なって結合した物質(図 1.1.1)で、生体内では様々な反応の際にエネルギー源として利用される。

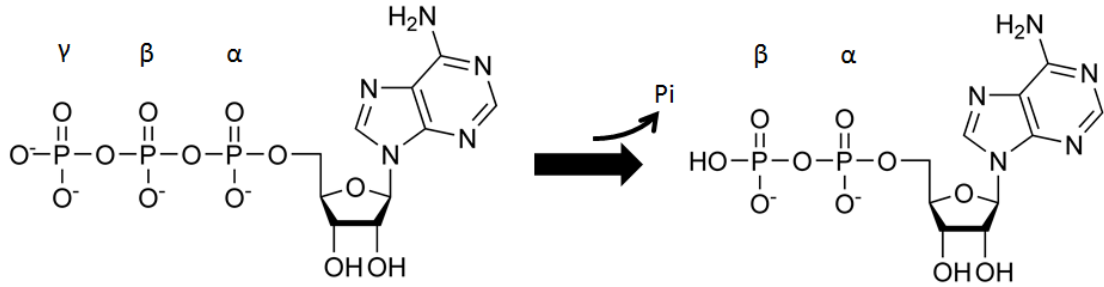


図 1.1.1 ATP はリボース(糖)の両側にアデニン管と3つのリン酸が結合した分子である。加水分解によって ATP の $\gamma$ リン酸と $\beta$ リン酸の化学結合が切れると ADP と Pi に分解される。塩基とリボースが結合した分子をヌクレオシドと呼び、ATP や ADP などのヌクレオシドにリン酸が結合した分子をヌクレオチドと呼ぶ。

ATP が加水分解によって ADP と Pi になる反応は負のギブスの自由エネルギー変化を伴う反応である( $\Delta G < 0$ )。この反応から得られる自由エネルギーの大きさと保存性から ATP は生体内での様々な反応のエネルギー源として使われ、「生体エネルギー通貨」とも呼ばれる。

1 mol の ATP が加水分解した時のギブスの自由エネルギーの変化( $\Delta G_{\text{ATP}}$ )は式(1.1)で表せる。

$$\Delta G_{\text{ATP}} = \Delta G_{\text{ATP}}^0 + RT \ln \left( \frac{[\text{ADP}][\text{Pi}]}{[\text{ATP}]} \right) \quad (1.1)$$

$\Delta G_{\text{ATP}}^0$  は標準自由エネルギー変化、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度[ $\dots$ ]は反応物と生成物の溶液中の濃度である。また ATP 1 分子あたりの $-\Delta G_{\text{ATP}}$ の自由エネルギー変化を $\Delta\mu_{\text{ATP}}$ で表すと、標準自由エネルギー変化 $\Delta\mu^0$ と溶液中の ATP, ADP, Pi の濃度から

$$\Delta\mu_{\text{ATP}} = \Delta\mu_{\text{ATP}}^0 + k_B T \ln \left( \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{Pi}]} \right) \quad (1.2)$$

と表すことができる ( $k_B$  はボルツマン定数で、 $T$  は絶対温度である)。 $\Delta G$  と  $\Delta\mu$  では符号が逆である。熱力学ではよく  $\Delta G$  が使われるが、一分子のエネルギー論を扱った論文では  $\Delta\mu$  を使うこともある。参考文献と符号が逆になることを避けるために第 2 章の溶液系での測定結果と考察では  $\Delta G$  を使い、第 3 章の一分子観察の実験では  $\Delta\mu$  を使用する。



### 1.1.2 Mitchell の化学浸透圧説

生体内ではATP加水分解の生成物であるADPとPiから再びATPを合成することでATPの供給を行っている。酸化的リン酸化は電子伝達系と共役して起きるATP合成反応で、真核生物のミトコンドリア内膜や原核生物の形質膜などでみられる反応である。1961年にMitchellは電気化学ポテンシャルに沿ったプロトンの膜透過が、酸化的リン酸化によるATP合成反応を駆動するという化学浸透共役説を唱えた<sup>12</sup>。電子伝達系は電子の伝達と共役して内膜と外膜の間の空間へのプロトンの膜輸送を行う(図1.1.2)。プロトンの濃度差によって内膜には膜電位( $\Delta\Psi$ )とpH差( $\Delta\text{pH}$ )による電気化学ポテンシャル差が作られており、プロトン駆動力( $\text{pmf}$ )と呼ばれる力が発生する。この $\text{pmf}$ を利用してプロトンの膜透過とATP合成反応を共役するのが $\text{FoF}_1$ ATP合成酵素である。

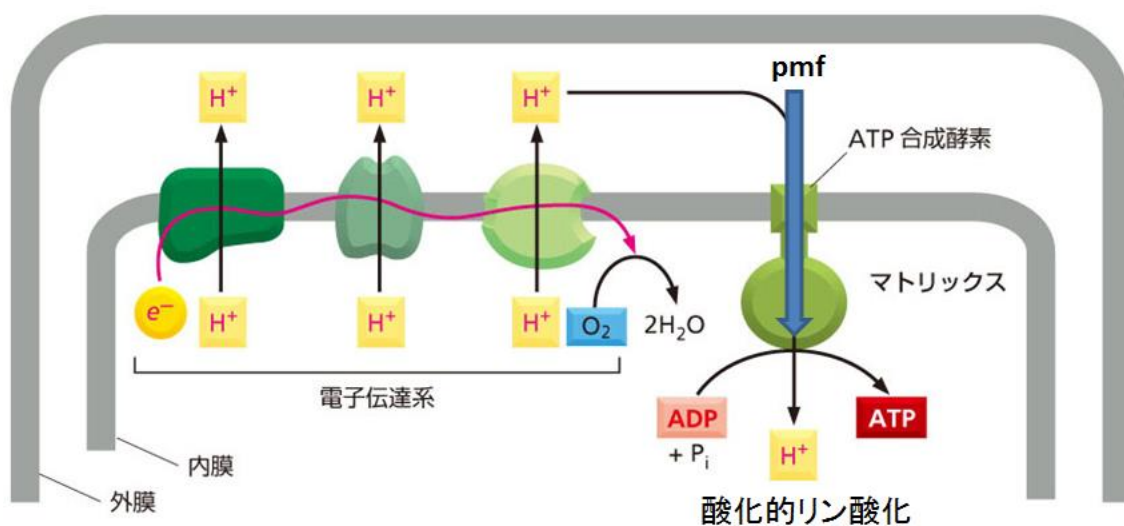


図 1.1.2 電子伝達系を構成する膜タンパク質は電子( $e^-$ )の伝達と共役してプロトン( $H^+$ )の輸送を行う。電子伝達系によって内膜と外膜の間のプロトン濃度が上がるために内膜の内外に電気化学ポテンシャル差が作られる。ATP合成酵素は内膜を貫通するタンパク質で、 $\text{pmf}$ によるプロトンの透過と、酸化的リン酸化によるATP合成を共役する。

(The Cell 5th Edition の図を改訂)

### 1.1.3 FoF<sub>1</sub>ATP 合成酵素は回転運動をする

FoF<sub>1</sub>はプロトンの膜透過と ATP 合成を共役するタンパク質<sup>13,1</sup>で、F<sub>o</sub>と F<sub>1</sub>の 2つのタンパク質の複合体である。F<sub>o</sub>は膜内在性のタンパク質(分子量:約 120 kDa)でプロトンの膜透過を触媒する<sup>14</sup>。F<sub>1</sub>は膜から突き出た部分にあるタンパク質(分子量:約 380 kDa)で ATP 合成反応の触媒部位を持つ。F<sub>o</sub>は a, b, c の 3 種類のサブユニットから構成されている。c サブユニットの数は生物種によって異なり、大腸菌や本研究で用いる好熱菌由来の Fo は 10 個の c サブユニットを持つ<sup>15-17</sup>。c サブユニットはH<sup>+</sup>結合部位を持ち、リング状の c-ring と呼ばれる構造をとる(図 1.1.3 A)<sup>16</sup>。この c-ring はプロトン駆動力によってH<sup>+</sup>が内膜を透過するとき一方方向の回転運動を行う<sup>18-20</sup>。回転運動をするのは c-ring のみで、a, b サブユニットは位置を変えない固定子である<sup>21,22</sup>。F<sub>1</sub> のサブユニット組成はα:β:γ:δ:ε=3:3:1:1:1 である<sup>23,24</sup>。F<sub>1</sub> はβサブユニット上の触媒部位で ATP を合成する時にγ, εサブユニットがα<sub>3</sub>β<sub>3</sub>δに対して回転運動を行う<sup>25,26,11</sup>。ATP 合成時は c-ring と共にγ, εサブユニットが回転をする(図 1.1.3 B)。

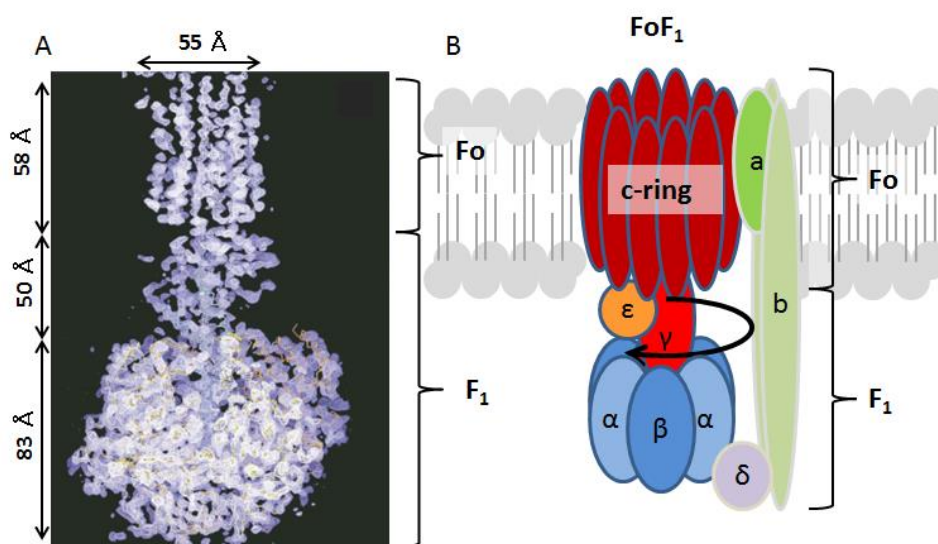


図 1.1.3 A : 酵母由来の FoF<sub>1</sub> の電子顕微鏡図。Fo の a, b サブユニットは構造が不安定なため分解能が悪く見えていない。文献 16 より改変。B : FoF<sub>1</sub> 合成酵素の構造とサブユニット組成。Fo の c-ring は脂質二重膜(薄い灰色)に埋まっており、H<sup>+</sup>は a サブユニットと c サブユニットの間を透過する。矢印は F<sub>1</sub> が ATP を合成する時の回転方向。

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>がATPを合成するときはF<sub>0</sub>側から見て回転子は時計回りに回転をする。それに対してATP合成時とは逆にc-ring, γ, εサブユニットが反時計回りに回転する時はF<sub>1</sub>がATPを加水分解してF<sub>0</sub>は逆方向にH<sup>+</sup>を膜輸送する<sup>27</sup>。回転方向はH<sup>+</sup>の透過によってF<sub>0</sub>が回転する時の自由エネルギー変化 $\Delta G_{F_0}$ とF<sub>1</sub>がATPを加水分解して回転した時の自由エネルギー変化 $\Delta G_{F_1}$ の差で決まる。十分に大きな電気化学ポテンシャル差があれば $\Delta G_{F_0} - \Delta G_{F_1} < 0$ となるためF<sub>0</sub>の回転の駆動力がF<sub>1</sub>より勝り回転方向であるF<sub>0</sub>時計回りに回転する(図1.1.4 A)。一方電気化学ポテンシャル差が十分でないときは $\Delta G_{F_0} - \Delta G_{F_1} > 0$ となりF<sub>1</sub>の回転方向である反時計回りに回転する(図1.1.4 B)<sup>28,29</sup>。どちらの反応も $\Delta G_{F_0} = \Delta G_{F_1}$ になるまで続く。生体内では電子伝達系が膜に加わる電気化学ポテンシャルの大きさを保つため、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>はATPを合成し続ける。

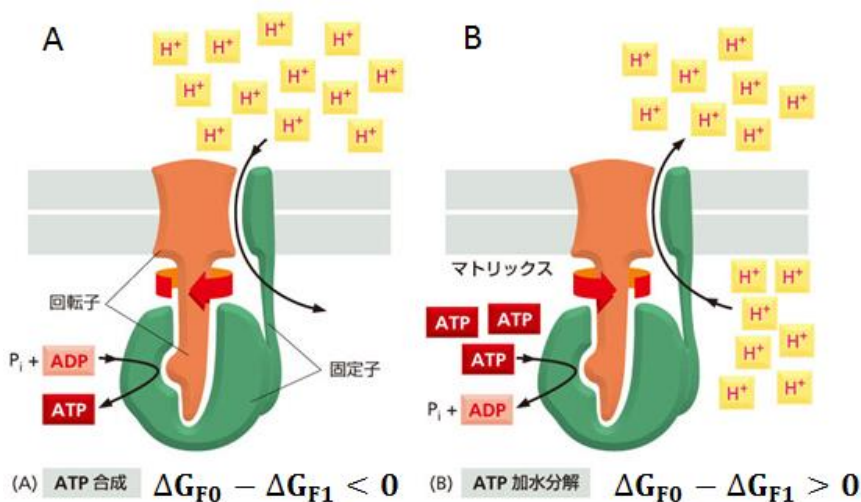


図 1.1.4 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>の反応と回転の方向は pmf に駆動されたプロトンの膜透過による自由エネルギー変化( $\Delta G_{F_0}$ )と、ATP 加水分解による自由エネルギー変化( $\Delta G_{F_1}$ )の値で決まる。

A :  $\Delta G_{F_0} - \Delta G_{F_1} < 0$ の時はH<sup>+</sup>の透過により F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>は合成方向(時計回り)に回転しながら ATP の合成を行う。B :  $\Delta G_{F_0} - \Delta G_{F_1} > 0$ の時は ATP 加水分解により F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>は加水分解方向(反時計回り)に回転しながらH<sup>+</sup>の輸送を行う。(The Cell 5 th Edition の図を改変)

#### 1.1.4 $F_1$ -ATPase は ATP の加水分解/合成をおこなう

$F_0F_1$  合成酵素を構成する  $F_1$  部は単体で ATP 加水分解に駆動された回転運動を行う<sup>2</sup>。 $F_1$  は 5 種類のサブユニットから構成されるが、このうち  $\delta, \epsilon$  サブユニットは無くても機能を発揮するため、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  サブコンプレックスを  $F_1$  の最小構成単位として実験に使うことが多い<sup>2</sup>。 $F_0F_1$  の時は pmf による  $F_0$  の合成方向の回転が  $F_1$  に ATP を作らせていた。ATP の合成は単離した  $F_1$  の  $\gamma$  サブユニットを外部トルクによって合成方向に回転させることでも可能である<sup>11</sup>。Rondelez は  $F_1$  の  $\gamma$  サブユニットに結合させた磁気ビーズを、回転磁場を使い強制的に合成方向に回転させることで  $F_1$  に ATP を合成させる実験を行った<sup>11</sup> (図 1.1.6 A)。外部磁場による強いトラップ力を使うと一定の速さで  $F_1$  の  $\gamma$  サブユニットを回したり、 $\gamma$  サブユニットを決まった角度に固定しておくことができる<sup>30,4,31</sup>。磁気ビーズを結合させた  $F_1$  を fL の体積のチャンバーに閉じ込め、磁気ピンセットを使い加水分解反応時とは逆方向に回転させて ATP を合成させた。チャンバー体積が非常に小さいため 1 つの  $F_1$  分子が合成した ATP 量だけで ATP 濃度が大きく変化する(図 1.1.5)。チャンバー内に閉じ込めた  $F_1$  を合成方向に回転させた後に磁気ビーズを開放すると  $F_1$  が速い速度で加水分解方向に回転することから  $\gamma$  サブユニットが時計回りに回転する時は  $F_1$  は ATP を合成することが確かめられた。

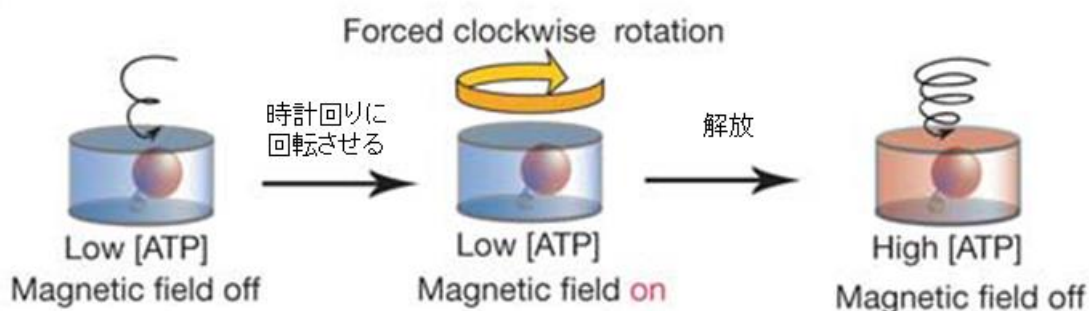


図 1.1.5  $F_1$  に結合させた磁気ビーズを磁気ピンセットを使い時計回りに回転させた。数百回転回した後に磁気ビーズを開放すると、回転させる前よりも速い速度で反時計回りに回転した。 $F_1$  の回転速度は溶液中の ATP 濃度で変化する。チャンバー体積が数 fL なので 1 個の  $F_1$  が作る ATP だけでも溶液中の ATP 濃度が変化する。時計回りに回転させた回数と、回転速度の変化から 1 回転あたり 2~3 個の ATP を作るということが明らかになった。文献 11 より改変

### 1.1.5 F<sub>1</sub>-ATPase は GTP, ITP も加水分解する

F<sub>1</sub>は ATP だけでなく GTP や ITP などのヌクレオチドも加水分解する<sup>32</sup>。ただし一分子回転観察や ATP 加水分解活性測定から調べられた GTP や ITP の親和性 $K_m$ は ATP より低い (表 1.1)。しかし飽和濃度での最大回転速度 $V_{max}$ は近い値になった。また 120° ステップの傾きと水の粘性抵抗の積から求められるステッピングトルク $N_{step}$ も近い値になった (表 1.1)。 $V_{max}$ と $N_{step}$ に大きな違いが無いという事はヌクレオチドの結合以外の反応にかかる時間や、反応と共役した回転運動の速度に差がないことを意味する。そして $K_m$ が異なるという事は ATP, GTP, ITP の触媒部位への結合の親和性が異なることを意味する。

	ATP	GTP	ITP
$K_m$ (uM)	0.69	3.43	13.3
$V_{max}$ (s <sup>-1</sup> )	3.82	3.28	3.95
$N_{step}$ (pN · nm)	32 ± 11	35 ± 11	32 ± 10

表 1.1 ATP, GTP, ITP を加水分解する F<sub>1</sub> の回転の $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $N_{step}$ の値。 $K_m$ は回転速度が $V_{max}$ の半分になる時の ATP, GTP, ITP 濃度の値。ヌクレオチド濃度([Nuc])と平均回転速度( $v$ )のプロットに $v = V_{max}[Nuc]/([Nuc] + K_m)$ の式でフィッティングして求める。 $V_{max}$ は最大回転速度の値で、ATP, GTP, ITP 結合の待ち時間が 0 になっているときの値。 $N_{step}$ は F<sub>1</sub> がプローブを回転させるときに出すトルク。ステップ速度とプローブの粘性抵抗の積から求める。プローブは 2 μm の蛍光アクチンである。文献 32 より引用

## 1.2 F<sub>1</sub>の回転におけるヌクレオチド結合の役割

### 1.2.1 F<sub>1</sub>を構成するサブユニットと立体構造

F<sub>1</sub>の最小構成単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが交互に並んだ六量体リングに $\gamma$ サブユニットが奥まで突き刺さった構造をしている(図 1.2.1 A)<sup>6</sup>。低温で溶液のイオン強度を上げると各サブユニット単体に解離し、イオン強度を下げることで再び $\alpha_3\beta_3\gamma$ の構造をとる<sup>33</sup>。

$\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットはそれぞれ結合部位をもち $\alpha_3\beta_3$ リングには最大で6つのヌクレオチドが結合する。ヌクレオチド結合部位は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの界面に存在しており( $\alpha$ - $\beta$ 界面)、3ヶ所は主に $\alpha$ サブユニットに結合しており、残りは主に $\beta$ サブユニットに結合している(図 1.2.1 B)<sup>6</sup>。 $\alpha$ サブユニットの結合部位はATP加水分解活性を持たないため非触媒部位と呼ばれている。一方 $\beta$ サブユニットの結合部位はATPを加水分解するので触媒部位とよばれる。非触媒部位へのATP結合は直接ATP加水分解反応にはかかわらないが、ADPによる加水分解反応への阻害<sup>34</sup>を解除する役割を持つ<sup>35</sup>。ATP加水分解で重要な役割を果たす残基は $\beta$ サブユニットの触媒部位周辺に存在するが、 $\alpha$ サブユニットにも必要な残基は存在する<sup>36</sup>。

$\gamma$ サブユニットは $\alpha_3\beta_3$ リングから突き出たヘッドドメインと、 $\alpha_3\beta_3$ の中心に突き刺さった2本の $\alpha$ ヘリックスから成る。 $\alpha$ ヘリックスは $\alpha_3\beta_3$ リングの奥まで達している。非対称な構造をしており、ATP加水分解時には $\beta$ サブユニットの構造変化によって回転運動を行う。 $\gamma$ サブユニットの $\alpha$ ヘリックスを削った実験<sup>37,38</sup>や $\gamma$ サブユニットのない $\alpha_3\beta_3$ でもATP加水分解による回転方向への構造変化の伝播が起きることが確認されている<sup>39</sup>。文献31~33の報告によれば一方向の回転と加水分解に重要なのは $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの相互作用であると考えられる。ただし $\gamma$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの相互作用を弱めるとF<sub>1</sub>の出す回転トルクが下がるという報告もある<sup>40</sup>。

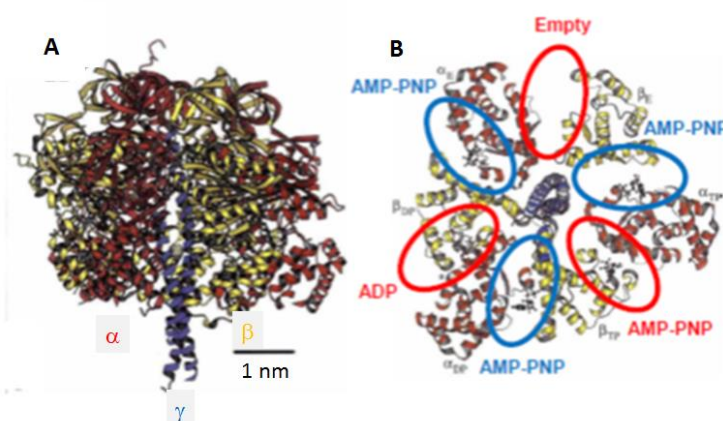


図 1.2.1 牛心筋由来の F<sub>1</sub> の立体構造で分解能は 2.8Å。A : F<sub>1</sub> を横から見た図。B : F<sub>1</sub> を  $\gamma$  サブユニット側から見た図。青い円が非触媒部位の場所で、赤い円が触媒部位の場所である。AMP-PNP は ATP のアナログで F<sub>1</sub> に加水分解されない。文献 6 より改変

### 1.2.2 交代結合説による F<sub>1</sub> の回転メカニズム

F<sub>1</sub> の ATP 合成/加水分解反応の触媒部位は 3 つのβサブユニット上に 1 つずつ存在する。回転の際には 3 つのサブユニットが協働的に働く。Boyer はこの回転メカニズムを説明するために交代結合説(Binding change mechanism)<sup>13,14,5</sup> を唱えた(図 1.2.2)。

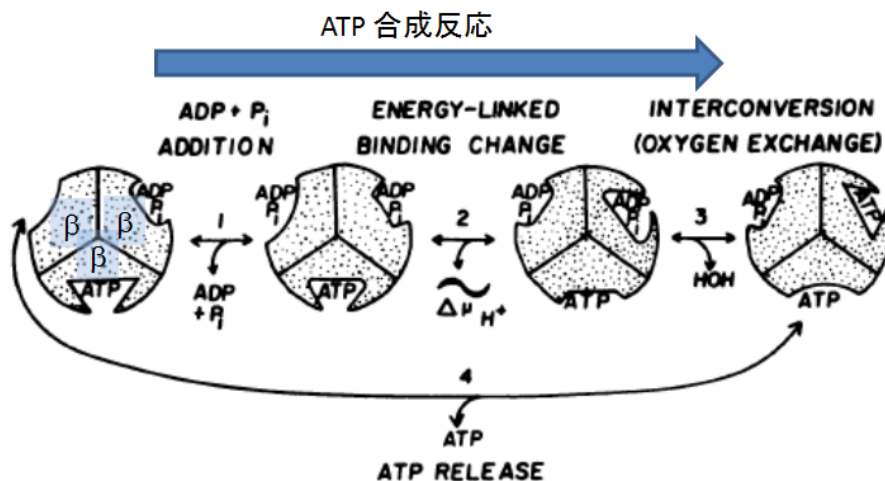


図 1.2.2 Boyer による交代結合説。細かい回転スキームは現在明らかになっているものとは異なるので注意。円を三等分した扇形はそれぞれβサブユニットを表し、ヌクレオチドが結合している窪みが触媒部位の状態と構造を表す。1, 2, 3, 4 の順番に ATP 合成反応が進み、加水分解の場合は逆の順番に進む。1 は ADP と P<sub>i</sub> の脱着で、2 番では親和性の変化と結合の自由エネルギー変化の取り出しを共役している。3 番では ADP と P<sub>i</sub> の化学結合の形成/切断と水の出入りが共役しており、4 番では ATP の脱着が起きている。文献 13 より改変。

彼らは酸素交換反応の測定から ATP の化学結合の切断をする過程は平衡状態に近く ADP と P<sub>i</sub> の化学結合は結合を切断する過程で数回切断と再結合を繰り返していることを明らかにした<sup>5</sup>。この結果は化学結合を切断する過程では大きな自由エネルギー変化はないことを示す。それに対してヌクレオチド結合過程では大きな自由エネルギー変化があるという実験結果<sup>41</sup> から、ヌクレオチドの結合が回転にとって重要な過程であると提唱した。また ATP の触媒部位への結合が別の触媒部位の ADP 解離を引き起こすことから、触媒部位同士は互いにヌクレオチドの親和性を変化させながら反応を進めていると予想した。このモデルは牛心筋からとられた F<sub>1</sub> の結晶構造解析から得られた構造によって強く支持された<sup>6</sup>。

文献 26 で得られた F<sub>1</sub> の結晶は非触媒部位である 3 つのαサブユニット上のヌクレオチド結合部位には全て ATP のアナログである AMP-PNP が結合しておりほぼ同じ立体構造をしていた。触媒部位である 3 つのβサブユニット上への結合状態は異なっていた。1 つ目には AMP-PNP が結合しており、2 つ目には ADP が結合しており、3 つめには何も結合していなかった(図 1.2.1 B)。それぞれのβサブユニットをβ<sub>TP</sub>, β<sub>DP</sub>, β<sub>E</sub>呼びヌクレオチドが結合して

いる $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ と何も結合していない $\beta_E$ の立体構造は大きく異なっていた。結晶化はヌクレオチド濃度が過剰になる条件で行われているので、この結晶はヌクレオチド結合の親和性が $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ と $\beta_E$ で大きく異なることを示唆する。

### 1.2.3 $F_1$ の一分子回転観察

$\gamma$ サブユニットの角度と触媒部位上の状態の関係を調べるのに最も強力な方法は一分子観察である。始めて行われた  $F_1$  の一分子観察は 1997 年に野地らによるものである<sup>2</sup>。ガラスに固定した  $F_1$  の  $\gamma$ サブユニットに蛍光アクチンを結合させて(図 1.2.3)、ATP を加えると蛍光アクチンは反時計回りに回転した。この回転運動は ATP 非存在下や加水分解反応の阻害剤である  $\text{NaN}_3$  存在下では観察されなかったことから、ATP 加水分解を駆動力としたものであることが確かめられた。

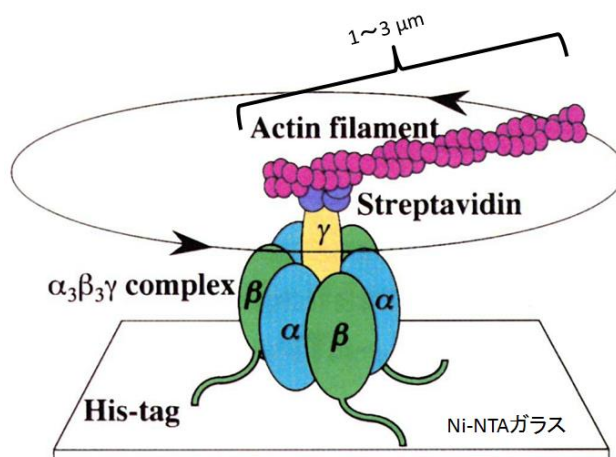
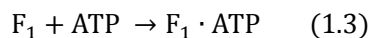


図 1.2.3  $F_1$  の回転の一分子観察の実験系の図。 $\beta$ サブユニットへの遺伝子操作で導入した His-tag で Ni-NTA ガラスに固定している。蛍光アクチンは $\gamma$ サブユニットに特異的に結合させた streptavidin に結合させている。2.6  $\mu\text{m}$ のアクチンの場合最大回転速度は約 0.5 rps である(2 mM ATP)。文献 2 より改変。

溶液中の ATP 濃度が高くプローブの大きさが大きいときは、 $F_1$  の回転は連続的だが ATP 濃度を下げたりプローブを小さくすることで  $F_1$  の回転はステップ状になる<sup>3</sup>。ステップ回転の時は dwell と呼ばれる特定の角度での熱揺らぎを伴った停止状態が表れる(図 1.2.4)。dwell は律速となる反応が完了するのを待っている状態であり、待ち時間である dwell time を解析することで $\gamma$ サブユニットの角度と触媒部位上で起きてる反応と反応の速度を調べることができる。ATP 結合待ちの dwell は ATP binding dwell と呼ばれ ATP 濃度を下げることによって確認することができる<sup>3</sup>。ATP 濃度を下げていくと ATP binding dwell は長くなっていく。ステップとステップの間の dwell の長さ(dwell time)のヒストグラムをとると、ATP binding dwell のヒストグラムは一次反応の速度の式でフィッティングできる(図 1.2.4)。こ



これは ATP binding dwell が ATP 結合反応のみを律速としていることを意味する。 $F_1$  に ATP が結合する反応の反応式は



と書ける。式(1.3)は一次式でこの式から停止時間  $t$  になる確率  $p(t)$  は

$$p(t) = A \exp(-k_{on}[\text{ATP}] \cdot t) \quad (1.4)$$

である。 $k_{on}[\text{ATP}]$  は停止時間の時定数の逆数( $1/\tau$ )である。 $k_{on}$  は ATP 結合の速度定数で、 $[\text{ATP}]$  は溶液中の ATP 濃度である。ATP の結合の速度定数は様々な研究者によって行われており、文献 37 では  $F_1$  で  $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であると報告されている。

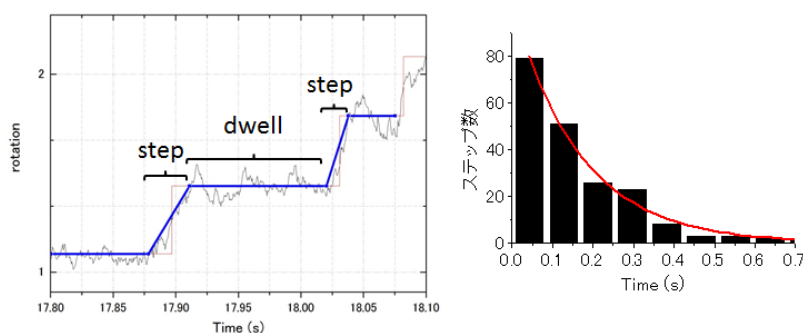


図 1.2.4 ステップ運動をする  $F_1$  に結合したプローブのトラジェクトリと、停止時間のヒストグラム。ATP 濃度は  $0.2 \text{ uM}$  である。トラジェクトリをステップの部分(step)と停止(dwell)に分けて、停止時間のヒストグラムを作る。停止時間のヒストグラムを規格化すると縦軸は式(1.4)の  $p(t)$  になる。十分なステップ数があれば一次の指数関数でフィッティングすることで時定数を求めることができる。

#### 1.2.4 $F_1$ の回転スキーム

$F_1$  の  $\gamma$  サブユニットの角度は 3 つの  $\beta$  サブユニットの触媒部位上の化学状態と対応している。これまでの研究により  $\gamma$  サブユニットの角度と 3 つの  $\beta$  サブユニットの触媒部位上の化学状態の対応を表す回転スキームはほぼ明らかになっている(図 1.2.5)<sup>4,33,3,42-44</sup>。1 個の ATP を加水分解する間に  $\gamma$  サブユニットは  $120^\circ$  ステップ状に回転する。この  $120^\circ$  ステップは  $80^\circ$  と  $40^\circ$  のサブステップから構成されており<sup>42</sup>、ステップとステップの間の停止状態では  $\beta$  サブユニット上の触媒部位での反応が律速となっている。 $80^\circ$  サブステップの律速となる反応が ATP 結合で<sup>3</sup>、 $40^\circ$  のサブステップの律速となるのが ATP の化学結合の切断とリン酸の解離である(図 1.2.5)<sup>4,43</sup>。反応は各触媒部位上で起こり  $120^\circ$  の回転が終わると ATP 結合を待っていた  $\beta$  が ATP 結合状態、ATP が結合していた  $\beta$  が ADP 結合状態、ADP が結合していた  $\beta$  が空の状態になり、 $F_1$  全体が  $120^\circ$  回転するのと同じ状態になる。

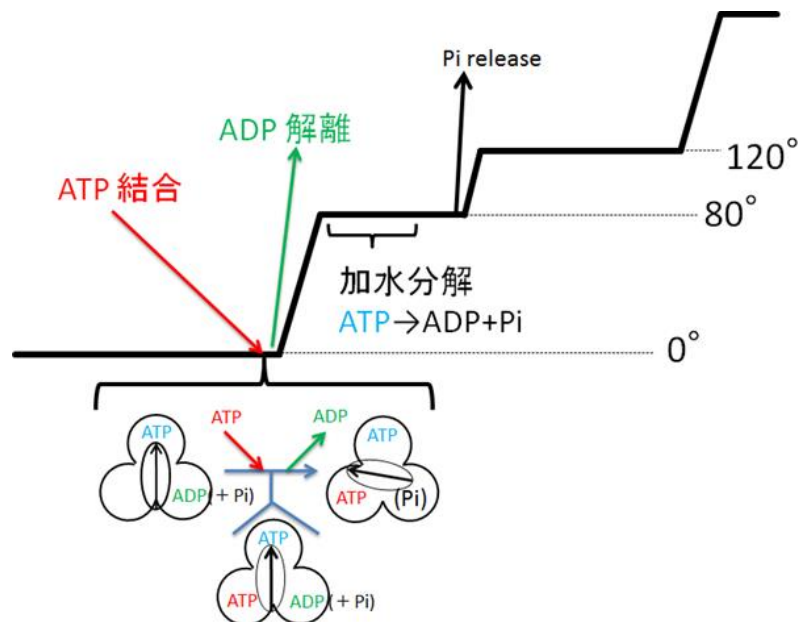


図 1.2.5 加水分解の回転スキーム。 $120^\circ$  の回転の間に一通りの反応は終わるが、各反応素過程は別々の触媒部位上で起きている。各反応素過程の速度はステップ前の停止時間のヒストグラムから求まる。 $F_1$  は ATP を 1 つ加水分解するたびに、 $120^\circ$  ずつ回転する。この回転はさらに  $80^\circ$  と  $40^\circ$  のサブステップに分けることができる。ヌクレオチドの結合していない触媒部位に ATP が結合し、隣の  $\beta$  サブユニットから生成物の ADP が解離すると  $80^\circ$  サブステップする。そして ATP の化学結合の切断と Pi の解離後に残りの  $40^\circ$  のサブステップを行い再び ATP 結合待ちの状態に戻る

### 1.2.5 ヌクレオチド結合によるβサブユニットの構造変化

αサブユニットとβサブユニットは似たような構造をとるが、βサブユニットはヌクレオチドが結合することで構造変化をする<sup>6</sup>。βサブユニットにヌクレオチドが結合すると、Hinge領域と呼ばれるところの周辺の構造変化により全体がくの字のように折れ曲がる。ヌクレオチド結合前の構造はオープン構造と呼ばれ(図 1.2.6 A)、ヌクレオチド結合後の構造はクローズド構造と呼ばれる(図 1.2.6 B)。ATP が結合すると触媒部位の残基同士の結合の一部が切れ新たに結合した ATP のγリン酸と結合を作る。結合を切られた残基は別の残基や ATP と結合を作り、その結合に Hinge の先のαヘリックスが引っ張られる<sup>45</sup>。Hinge 領域と Walker A, Bモチーフ(F<sub>1</sub>のように ATP 加水分解で書いて運動をするタンパクに見られる構造<sup>46</sup>周りの構造変化によって<sup>47</sup>、オープンからクローズド構造へ構造変化する。βサブユニットの構造変化と回転の同時観察を行った実験から、回転運動中にβサブユニットは ATP 結合後クローズド構造になり、ADP 解離後にオープン構造に戻っているのが確かめられている<sup>48</sup>。この構造変化は単体のβサブユニットにヌクレオチドが結合した時も起こっていることが NMR による測定から明らかになっている<sup>7,8</sup>。

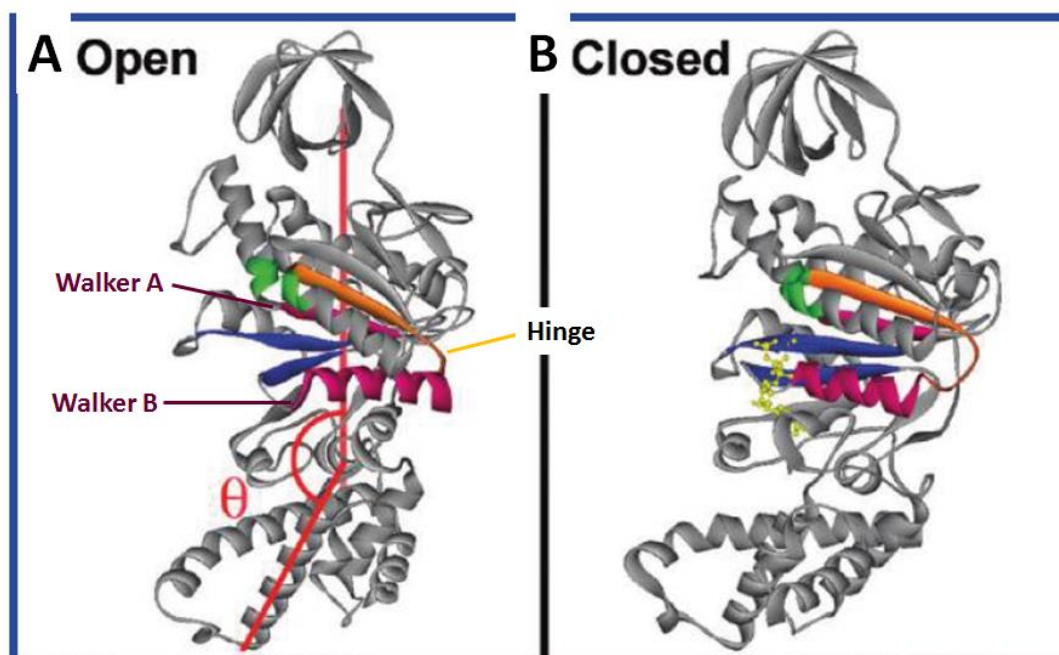
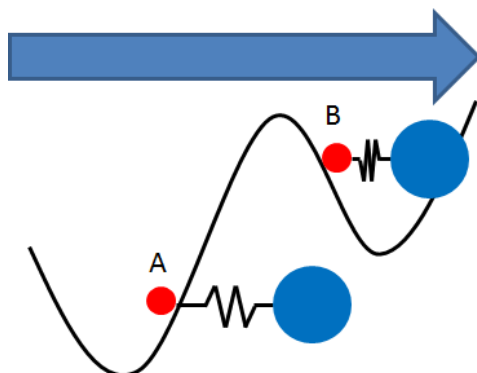


図 1.2.6 A : ヌクレオチド非結合状態のβサブユニットの構造。B : ヌクレオチド結合状態のβサブユニットの構造。ヌクレオチドが結合すると Walker A を含むβシートと Walker B を含むαヘリックス(どちらも紫)を結ぶ Hinge 領域(オレンジ)が構造変化をする。Hinge 領域の押し出しによって Walker B を含むαBヘリックスが動きβサブユニット全体が折れ曲がる。NMR の測定はヌクレオチド結合による A の $\theta$ の角度の変化を測定している。 $\theta$ はβサブユニットの重心軸に対するαヘリックスの角度である。文献 45 より改変

### 1.3 外力による $F_1$ の回転運動への影響

#### 1.3.1 $F_1$ の $\gamma$ サブユニットに外部トルクを加える

$F_1$  の  $\gamma$  サブユニットは ATP 加水分解によって反時計回りに回転するが、強い外部トルクによって時計回りに回転させると ATP を合成する<sup>11</sup>。外部トルクを加えることで  $F_1$  に ATP を合成させるのは、プロトンの膜透過を駆動力とする  $F_0$  が  $F_1$  をと ATP 合成の方向に回転させるのと同じで、外部トルクの大きさを弱くすれば再び ATP 加水分解方向に回転をする<sup>10</sup>。 $\gamma$  サブユニットに外部トルクを加える方法としては磁気ピンセットと回転電場法の 2 つがある。どちらも長所と短所はあり磁気ピンセットの長所はビーズを特定の角度に固定することで、 $\gamma$  サブユニットの角度と親和性の関係を詳細に調べることが可能にする<sup>31</sup>。一方短所は加わる力が磁場の方向とビーズの角度に比例するため、一定の強さの外部トルクを加えられないことである(図 1.3.1)。低濃度 ATP 条件下では  $F_1$  はステップ回転と dwell を繰り返すので、外部トルクの大きさは時間変化する<sup>i</sup>。



**図 1.3.1** ポテンシャルに沿って移動する粒子(赤)とバネに繋がれた粒子(青)。青のビーズを矢印の方向に一定速度で移動させるとバネでつながれた赤の粒子は矢印の方向に引っ張られる。赤の粒子が A にいるときは坂を上っているためバネは伸びる。赤の粒子がポテンシャルの山を越えた B の位置では、赤のビーズはポテンシャルの坂を下るためバネは縮まる。青のビーズが赤のビーズを引っ張る力はバネの伸びに比例するため A と B では赤の粒子に加わる力の大きさが異なる。 $F_1$  の場合は  $\gamma$  サブユニットが赤の粒子で磁気ビーズが青の粒子に対応し、矢印が磁気ピンセットによって磁気ビーズが回転する動きを表す。

回転電場法の長所はビーズの角度に依存しない一定の外部トルクを加えられることである<sup>10</sup>。電場の強さで外部トルクの大きさも変えられるため、外部トルクによる  $F_1$  の回転への影響を定量的に調べるのに適している。一方特定の角度でビーズをトラップするには向いていないので、角度分解能は磁気ピンセットに比べて低くなる。

<sup>i</sup> ビーズの角度をフィードバックすることで外部トルクの大きさを一定に保つことは可能。

### 1.3.2 一定の外部トルクによる $F_1$ の平均回転速度の変化

回転電場法は電場が存在する時に誘電体に作られる誘起双極子モーメントと、高速で回転する電場の位相差を利用して外部トルクを加える方法である。誘電体に電場を加えると誘電体を構成する原子の分極によって誘起双極子モーメントが作られる。電場が高速で回転すると誘起双極子モーメントの向きと電場の向きに位相差が生じる。誘起双極子モーメントは電場の方向に向こうとするため、誘電体には位相差に比例した力が加わる。個々の原子に作られる誘起双極子モーメントとの向きは誘電体の向きには依らないので、電場との位相差は常に一定の値になり、誘電体に加わる力も一定になる。

ATP 加水分解をする  $F_1$  に対して加水分解方向の外部トルクを加えてると、 $F_1$  の回転速度が上がり逆方向の外部トルクを加えると回転速度は遅くなった(図 1.3.2 A)<sup>9</sup>。また外部トルクによる平均回転速度の変化の割合は溶液中の ATP 濃度に依らないことも明らかになっている (図 1.3.2 B)。この結果はこの条件で  $F_1$  の回転速度に対する ATP 濃度と外部トルクの影響は独立したものであることを示す。文献 48 では加水分解によって生じた ADP を直ちに ATP に戻す ATP 再生系存在下で測定しているため、 $F_1$  による ATP 合成反応はほとんど行われぬ。そのためどれだけ強い外力を加えても合成方向に回転することは少なく、回転した場合は空回りするような回転をしていた。この結果は ATP の合成反応と合成方向の回転は強く共役していることを示唆する。

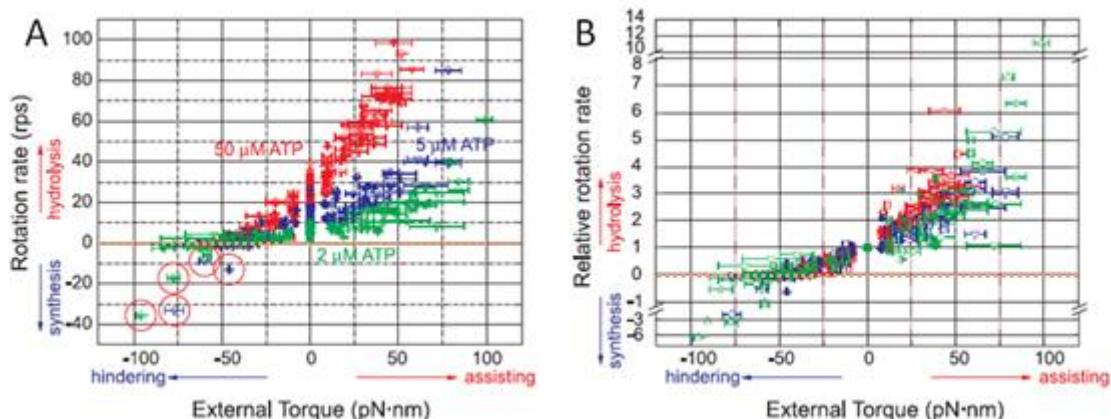


図 1.3.2 A, B : 加水分解方向の回転速度と加水分解方向の外部トルクがプラスである。トルクの大きさはブラウン回転しているビーズの自己相関関数から求めた回転摩擦係数を使って求めている。回転速度の符号はプラスが加水分解方向の回転でマイナスが合成方向の回転である。オレンジの点線は縦軸が 0 の位置を表す。ATP 濃度は 2(緑), 5(青), 50(赤)  $\mu$ M ATP で ATP 再生系が存在する。A のグラフ中の赤い円で囲っている点は合成方向に回転した時のデータ。B は A のグラフを外部トルク 0 での回転速度で規格化したプロット。

文献 9 より改変

### 1.3.3 stall 状態で回転と反応は 1 : 1 でカップリングする

鳥谷部は回転電場法を使った実験系で  $F_1$  の出す最大仕事を求めた<sup>10</sup>。測定は ATP, ADP, Pi 存在下で行い、平均回転速度の外部トルク依存性を調べた。中山による測定の際は ATP 合成ができない条件だったため強い外部トルクを加えても回転速度はほぼ 0 の所で留まった。しかし鳥谷部の測定条件では外部トルクを強くしていくと合成方向に回転した。外部トルクを強くすると加水分解方向の平均回転速度は徐々に小さくなり、合成方向に回転した後は外部トルクの増加と共に合成方向の平均回転速度は大きくなっていった。平均回転速度 0 付近の所では  $F_1$  は加水分解方向と合成方向の両方向にステップしており、 $F_1$  の加水分解反応と合成反応の速度が釣り合った平衡状態になっていた(図 1.3.3 A)。この平均回転速度 0 の状態(以降 stall 状態)では外部トルクと  $F_1$  の出すトルクが釣り合っており、この時の外部トルクが  $120^\circ$  当たりにする仕事(外力)から  $F_1$  が外部トルクに対してする最大仕事 ( $W_{\max} = N_{\max} \times 120^\circ$ ) を求めた。 $W_{\max}$  は溶液中の ATP, ADP, Pi 濃度から計算した  $\Delta\mu_{\text{ATP}}$  とほぼ一致しており(図 1.3.3 B)、stall 状態では  $F_1$  の  $120^\circ$  ステップと ATP の加水分解/合成の反応が 1 : 1 でカップリングしていることが明らかになった。

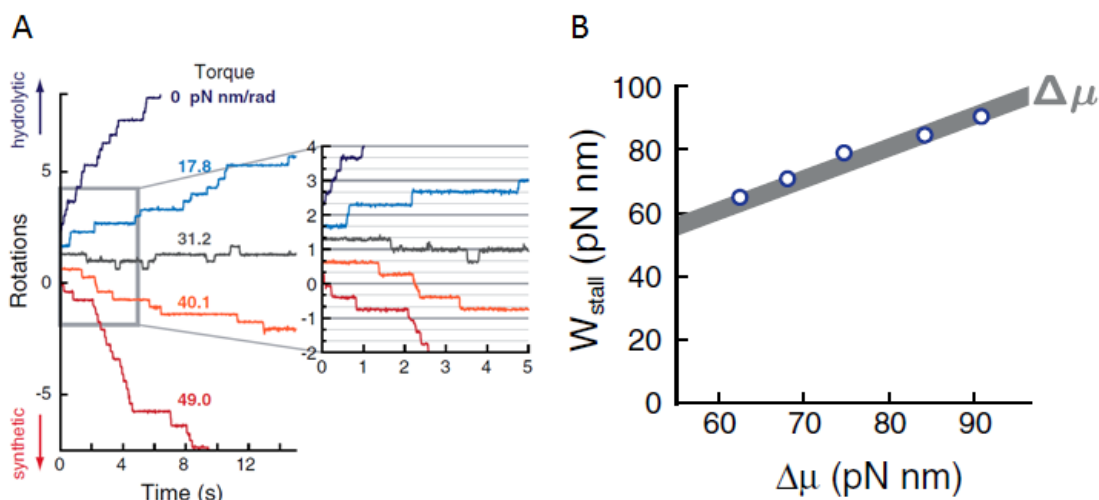


図 1.3.3 A : 外部トルクによる  $F_1$  の回転トラジェクトリの変化。0.4  $\mu\text{M}$  ATP, 4  $\mu\text{M}$  ADP, 1 mM Pi の溶液で測定しているため外部トルクが強いときは合成方向に回転する。トルクの符号はプラスが合成方向である。stall 状態(灰色の実線)では両方向に  $120^\circ$  のステップ回転をする。B :  $F_1$  の出す最大仕事(グラフ中では  $W_{\text{stall}}$ )と ATP 加水分解による自由エネルギー変化の関係。ADP, Pi 濃度を変えることで異なる  $\Delta\mu$  条件で測定を行い  $W_{\text{stall}}$  を求めた。 $\Delta\mu$  は複数の文献のパラメータ<sup>49-52</sup> を使い計算した値で、最小値と最大値の幅で灰色に塗ってある。文献 10 より改変。

### 1.3.4 外部トルクによる dwell time の変化

ATP 濃度を下げると  $F_1$  はステップ回転をするが、ADP 濃度が低ければ合成方向に回転する時もステップ回転をする。合成方向のステップ幅は  $120^\circ$  であった<sup>10</sup>。外部トルクが強くなると加水分解方向のステップの割合( $p_h$ )が減る代わりに、合成方向のステップの割合( $p_s$ )が増えた(図 1.3.4)。stall 状態では  $p_h = p_s = 0.5$  でどちらの方向にも同じ頻度でステップするため平均回転速度は 0 になっていた。 $p_h$  の割合がほぼ 1 の状態でも加水分解方向の外力を加えると、加水分解方向にステップする前の dwell time は短くなり、合成方向の外力を加えると dwell time は長くなった<sup>9</sup>。図 1.3.3 A でも外部トルクが 0 からストールトルクになるにつれて dwell time は長くなっている。しかし合成方向に回転するようになると外部トルクの増加によって dwell time は再び短くなっている。これらの結果は外部トルクが増加すると、加水分解方向にステップする前の dwell は伸びて、合成方向にステップする前の dwell は短くなると考えれば説明できる。

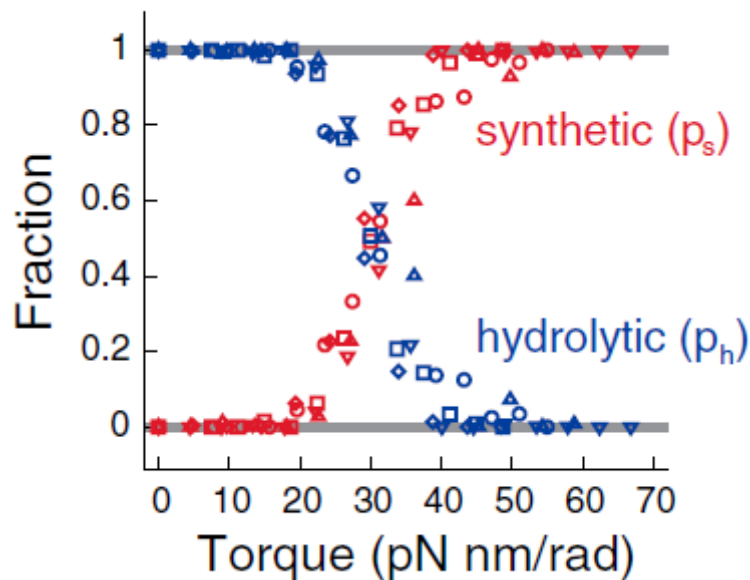


図 1.3.4 加水分解方向のステップの割合( $p_h$ )と合成方向のステップの割合( $p_s$ )の外部トルク依存性。0.4  $\mu\text{M}$  ATP, 4  $\mu\text{M}$  ADP, 1  $\text{mM}$  Pi で測定したデータで 3 点ステップしているものを解析した。 $\Delta\mu$  の値は約 65  $\text{pN} \cdot \text{nm}$  で外部トルクが約 32  $\text{pN} \cdot \text{nm/rad}$  の時に stall 状態になる。文献 10 より改変

### 1.3.5 dwell time は活性化エネルギーに依存する

遷移状態理論によれば dwell time は準安定状態の粒子が、熱揺らぎによって遷移状態を超えるまでの時間である。回転電場法などで使用する大きなビーズを使用する時の準安定状態は ATP binding dwell であり  $120^\circ$  ごとに存在する。この時  $\gamma$  サブユニットに結合したプローブの感じる自由エネルギー地形を考えると  $120^\circ$  ごとに自由エネルギー曲面の底があり、間に遷移状態が存在する(図 1.3.5)。dwell time は準安定状態である自由エネルギー曲面の底で揺らいでいる粒子が活性化エネルギー  $\Delta E$  の山を乗り越えるまでの時間である。活性化状態の山の位置は dwell から  $l$  だけ進んだところで、この  $l$  を **chalcostalistic length** と呼ぶ。遷移状態を通過した後は次の準安定状態に落ち再び dwell 状態になる(ステップ回転)。加水分解方向のステップの時は遷移状態を左から通過する、活性化エネルギーは  $\Delta E_a$  であり、合成方向のステップ時は遷移状態を右から通過するので活性化エネルギーは  $\Delta E_a + \Delta\mu$  になる。dwell 状態の粒子は遷移状態と迅速平衡にあるので、遷移状態を乗り越えるまでの時間はボルツマン分布( $\exp(\Delta E/k_B T)$ )に比例する。 $(k_B$  はボルツマン定数で、 $T$  は絶対温度)。通常の加水分解を測定する条件では  $\Delta\mu$  の値が大きいため、加水分解方向のステップ前の dwell time の時定数( $\tau_h$ )に比べ合成方向のステップ前の dwell time の時定数( $\tau_s$ )は非常に大きいため合成方向のステップはほぼ観察されることは無い。

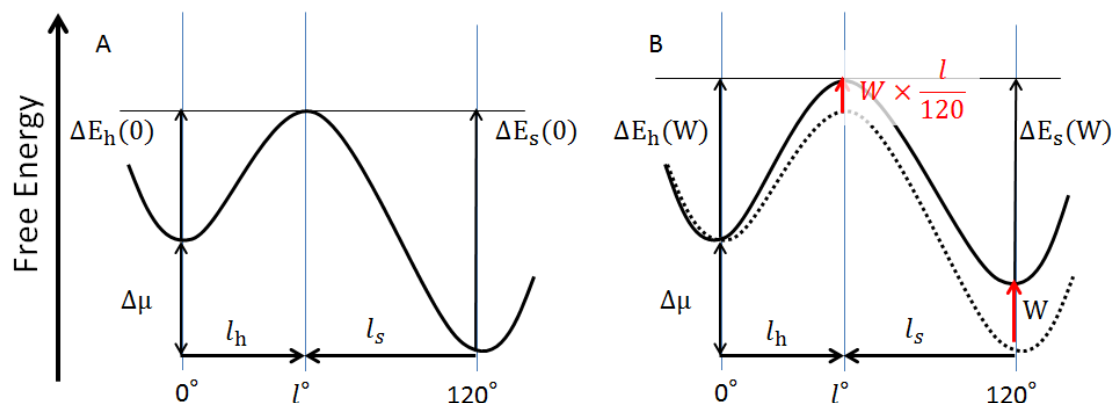


図 1.3.5  $120^\circ$  ステップの間にプローブが感じる自由エネルギー変化の地形。A が外力が存在しない場合で、B が合成方向の外力( $W$ )を加えた時の場合。横軸は回転方向に沿った反応座標で、dwell の角度である  $0^\circ$  と  $120^\circ$  が準安定状態で、 $l^\circ$  が遷移状態の角度を表す。



次に一定の合成方向の外力を加えた時を考える。外力(W)は  $120^\circ$  あたりに外部トルクにされる仕事なので、 $0^\circ$  の位置に対して  $120^\circ$  の位置は W だけ持ち上がる。このとき遷移状態は **characteristic length** の値に比例した量だけ持ち上がる。外力を加えることによって活性化エネルギーは

$$\Delta E_h(W) = \Delta E(0) + \frac{l_h}{120} \times W \quad (1.6)$$

$$\Delta E_s(W) = \Delta E(0) + \Delta\mu - \frac{l_s}{120} \times W \quad (1.7)$$

だけ変化する。活性化エネルギーが変化することで **dwell time** の時定数は

$$\tau_h(W) = \tau_h(0) \times \exp\left(\frac{l_h W}{120k_B T}\right) \quad (1.8)$$

$$\tau_s(W) = \tau_s(0) \times \exp\left(-\frac{l_s W}{120k_B T}\right) \quad (1.9)$$

である。 $l_h, l_s > 0$ より外力を加えることで $\tau_h$ は長くなり $\tau_s$ は短くなる。上記の式は遷移状態の位置が外力を加えても変化しないと仮定した時に成り立つ。遷移状態の位置が変わらないならば、 $l_h, l_s$ は外力に依存しない定数なので W と  $\ln\tau$ のプロットの傾き **a** から求めることができる。**a** の式は(1.10)である。

$$a = \frac{d(\ln\tau)}{dW} \quad (1.10)$$

# 第二章

$\beta$ サブユニットへのヌクレオチド結合反応の  
熱力学的パラメータの測定

## 2.1 F<sub>1</sub> へのヌクレオチド結合反応を調べる

### 2.1.1 実験の目的

F<sub>1</sub> の回転の 2/3 をしめる 80° サブステップは ATP の結合と ADP の解離によって引き起こされる<sup>4</sup>。結晶構造解析や NMR による測定によりヌクレオチドの結合によってβサブユニットは大きな構造変化をすることが明らかになっている<sup>6-8</sup>。この構造変化は ATP の化学結合の切断を伴わないものであり、ヌクレオチドの結合と結合の親和性の変化が F<sub>1</sub> の反応にとって重要であるという交代結合説を裏付けるものである<sup>5</sup>。F<sub>1</sub> の回転メカニズムに対してより詳しく知るために、ヌクレオチド結合反応の熱力学的パラメータを測定した。

### 2.1.2 タンパク質とヌクレオチドの組み合わせで比較する

熱力学的パラメータはヌクレオチド結合反応の情報を含むが、様々な情報が 1 つの値にまとめられるため、求めた熱力学的パラメータだけでは結合反応のことを正確に知ることは難しい。たとえばエントロピー変化の値を求めたとして、その値がヌクレオチドと触媒部位が作った結合によるものなのか、βサブユニットの構造変化によるものなのかは測定した値 1 つだけからは判断することができない。そのため本研究では 4 種類のタンパク質と 6 種類のヌクレオチドの組み合わせで結合反応の熱力学的パラメータを測定した。

測定にはα<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γサブコンプレックスとβサブユニット単体を使った。α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γサブコンプレックスとβサブユニット単体はともにヌクレオチド結合によって構造変化するが、単体のβサブユニットは ATP 加水分解活性を持たない。加水分解活性の有無とサブユニットが複合体を作ることによる熱力学的パラメータへの影響を調べるためにサブコンプレックスとβ単体の比較を行った。また ATP などの加水分解されてしまうヌクレオチド結合の測定を行うために、加水分解活性をほぼ失わせる変異(βE190Q 変異<sup>53</sup>)を導入したサブコンプレックスとβ単体への結合の測定も行った。βE190Q 変異を導入したβ単体の測定を行ったのは、変異によるヌクレオチド結合への影響を調べるためである。

測定に使用したヌクレオチドは ATP や ADP 以外に GTP, GDP, ITP, IDP である。F<sub>1</sub> は GTP や ITP など同様に加水分解して回転運動をする<sup>32</sup>。しかし GTP, ITP の加水分解や回転の親和性(1/K<sub>m</sub>)は ATP に比べて低い。親和性の高さが結合反応の熱力学的パラメータにどのように影響するのか調べるために、これらのヌクレオチド結合との比較も行った。

## 2.2 試料

### 2.2.1 測定用 buffer

蛍光測定用 buffer : 50 mM MOPS-K, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0

蛍光測定用 buffer は測定を行う日に調製したものを使用した。MOPS, KCl は 1 M で、MgCl<sub>2</sub> は 100 mM で保存したものをまぜ Milli-Q で上記の濃度になるように薄めた。調製後 pH が 7 になっているのを確かめ 1 時間ほど脱気してから測定に使用した。測定のたびに buffer を調製する理由は、調製した buffer の蛍光強度が時間とともに上昇してしまうためである。蛍光強度の上昇量は 1 日経過すると 1~2 割ほどである。ヌクレオチド結合の測定への影響は不明だが調製して数時間のものと 1 週間 4℃ で保存したもの(蛍光強度が 2 倍弱になっていた)で比較しても目立った違いは見つからなかった。MOPS, KCl, MgCl<sub>2</sub> を別々に 4℃ で保存している間は数か月たっても蛍光強度の上昇がなかったので、測定をするときは直前に buffer を調製することにした。buffer の脱気を行う理由は測定中の泡の発生を抑えるためである。

### 2.2.2 使用するヌクレオチド

本研究では ATP, ADP, GTP, GDP, ITP, IDP の触媒部位への結合を調べた。GTP, ITP はそれぞれ ATP の塩基部分がグアニン、イノシンの塩基に変わったものであり、GDP, IDP は同じように ADP の塩基部分がグアニン、イノシンになったものである。本研究では ATP, GTP, ITP の三リン酸ヌクレオシドを NTP と呼び、ADP, GDP, IDP などの二リン酸ヌクレオシドを NDP と呼ぶ。ヌクレオチド結合の測定では投入するヌクレオチドと同じ量の Mg を投入するようにした。これは ATP 加水分解には Mg が必要なため結合も同様の条件で調べるためである。ヌクレオチドの溶液は測定前にあらかじめ測定条件の 100 倍の濃度で [Nuc]:[Mg]=1:1 になるように調製して -80℃ で保存したものを測定に使用した。また高濃度のヌクレオチド溶液と Mg の溶液は混ぜると沈殿を作ってしまうため、測定時には Mg の溶液を入れた後にヌクレオチドの溶液を投入して結合の測定を行った。

例 1) 10 uM ATP の結合を測定するとき (低濃度ヌクレオチド)

1 mM MgATP の溶液を 100 倍希釈になるように測定溶液に投入する。

例 2) 500 uM ADP の結合を測定するとき (高濃度ヌクレオチド)

50 mM MgCl<sub>2</sub> の溶液を 100 倍希釈になるように投入して、その後 50 mM ADP の溶液を 100 倍希釈で投入する。

---

塩基と糖からなるヌクレオシドにリン酸が結合したのがヌクレオチドである

### 2.2.3 使用するタンパク質

蛍光測定で使用したタンパク質は2種類の $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスと2種類の $\beta$ 単体の4つである。サブコンプレックスは $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ と $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ で、 $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ は回転観察に使用する HC95 に蛍光測定をするための変異を入れたミュータントである。

$\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ は $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ に加えて ATP 加水分解活性をほぼ失わせるために $\beta E190Q$  変異を導入したタンパク質である。残りの2つのタンパク質は $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ の $\beta$ サブユニット単体である $\beta(Y341W)$ と、 $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ の $\beta$ サブユニット単体である $\beta(Y341W, E190Q)$ 。 $\beta$ サブユニット単体のタンパク質は $\beta$ サブユニットのみを発現するプラスミドを持つ菌体から精製したものである。 $\beta(Y341W)$ のプラスミドの作成には $\beta$ 単体のみを発現させるプラスミド(pUC- $\beta$ )の $\beta$ 部分を切り取り、そこに $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ の $\beta$ 部分の断片をライゲーションした。pUC- $\beta$ と $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ の切り取りは制限酵素の Mlu I、Sma I を使用した。 $\beta(Y341W, E190Q)$ のプラスミドも同様に $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ の $\beta$ を Mlu I、Sma I で切り取り pUC- $\beta$ にライゲーションして作成した。大量発現は大腸菌の JM109 株に形質転換して行った。精製は $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスは Ni-NTA カラムで精製したものを、 $\beta$ 単体は DEAE カラムと Butyl カラムで行った。測定にはあらかじめ結合しているヌクレオチドの数は一個あたり 0.01 個程度であること確認したタンパク質を使用した。

### HC95 に導入されている変異

HC95 は $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスに $\beta$ -His<sub>10</sub>,  $\gamma$ S109C,  $\gamma$ I212C,  $\alpha$ C193S,  $\alpha$ W463F を導入した TF<sub>1</sub> である。 $\beta$ -His<sub>10</sub> は3つある $\beta$ サブユニットの N 末端側への His-tag の導入で、一分子回転観察の時は His-tag とガラスの結合により $\alpha_3\beta_3$ リングをガラスに固定する。 $\gamma$ S109C,  $\gamma$ I212C はビオチンを結合させるためのシステイン(C)を導入させるための変異で、ビオチンはプローブに修飾させたアビジンと特異的な結合を作る。 $\alpha$ C193S はビオチンが $\gamma$ サブユニットのシステインと特異的に結合させるために $\alpha$ サブユニットのシステインを別のアミノ酸に置換する変異である。 $\alpha$ W463F はもともと $\alpha$ サブユニットに存在するトリプトファン(W)をフェニルアラニン(F)に置換する変異である。もともと野生型の TF<sub>1</sub> の $\alpha_3\beta_3\gamma$ に存在するトリプトファンは $\alpha$ W463 のみなので、HC95 にはトリプトファンによる蛍光はない。

### 2.2.4 $\beta$ Y341W, $\beta$ E190Q 変異

今回測定に使用した全てのタンパク質には $\beta$ Y341W の変異を導入してある。加えてそのうちの2つには $\beta$ E190Q 変異が導入されている。 $\beta$ E190Q 変異は $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスへの NTP の結合を見るために導入した加水分解反応がほとんど進まないようにする変異である<sup>53</sup>。 $\beta$ (E190)は NTP の $\gamma$ リン酸と水を介した水素結合を作っており、80° サブステップの後の化学結合の切り離しの時に働く。 $\beta$ (E190Q)変異体はこの190番目のグルタミン酸(E)をグルタミン(Q)に置換することで、 $\gamma$ リン酸との水素結合を失わせたものである。この変異体なら NTP の結合反応を見ても測定中の NTP 加水分解を無視できるので、NTP とサブユ

ニットの結合を見ることが可能になる。

$\beta$ Y341W は 80° のサブステップを引き起こす触媒部位への結合を調べるために導入した変異である。F<sub>1</sub> のヌクレオチド結合部位は $\alpha$ サブユニット上の非触媒部位と $\beta$ サブユニット上の非触媒部位の 2 種類がある。そのため透析法など F<sub>1</sub> に結合したヌクレオチドの量を調べるような実験方法だと結合したのが触媒部位なのか非触媒部位なのかが判断できない。 $\beta$ (Y341W)は触媒部位に結合したヌクレオチドの塩基部分の近くに位置するチロシン(Y)をトリプトファン(W)に置換した変異体である(図 2.2.1 A)。トリプトファンは蛍光をもち 300 nm の励起光を当てられると、350 nm あたりにピークを持つ蛍光を発する。このトリプトファンの蛍光は触媒部位にヌクレオチドが結合すると消える<sup>54-57</sup>。これはヌクレオチドの塩基部分とトリプトファンが相互作用するためだと考えられている。この蛍光強度の変化は非触媒部位にヌクレオチドが結合しても起きない。つまり触媒部位の結合だけ見ることでもできる。溶液系の測定で Y341W 変異体の蛍光強度の変化を測定すると、触媒部位へのヌクレオチドの占有率を見ることができる。溶液にヌクレオチドが含まれない場合占有率は 0 のため蛍光強度は最大である。そこにヌクレオチドを加えると、触媒部位にヌクレオチドが結合していくので蛍光強度は下がる。十分な時間がたてば触媒部位に結合するヌクレオチドの数と解離する数が釣り合う平衡状態になるので蛍光強度は一定になる。触媒部位へのヌクレオチド結合に対応してトリプトファンの蛍光強度は小さくなり、ほぼ全てのトリプトファン変異体の触媒部位にヌクレオチドが結合する飽和濃度では、トリプトファンの蛍光もほぼなくなる(図 2.2.1 B)。つまり蛍光強度の変化とヌクレオチド濃度の関係から、触媒部位へのヌクレオチド結合の親和性を測定することができる。

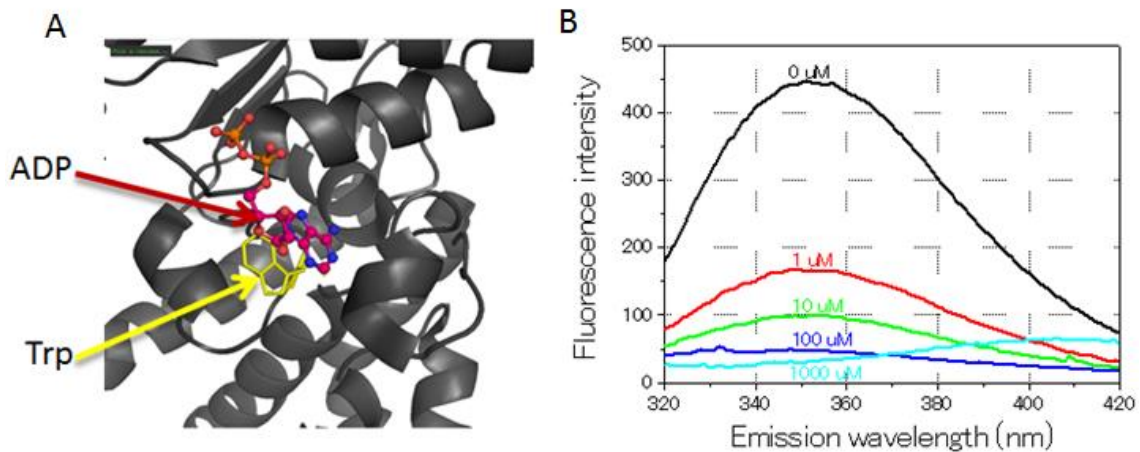


図 2.2.1 A：トリプトファンを導入した位置。トリプトファンは触媒部位に結合したヌクレオチドの塩基部分が結合する位置のチロシンを置換することで導入した。図は PyMOL (<http://www.pymol.org>) で結晶構造のチロシンをトリプトファンに置き換えたもの。灰色はβサブユニットの二次構造である。B：トリプトファン変異体の蛍光スペクトル。実線はヌクレオチド投入後の溶液のスペクトルからトリプトファン変異体投入前の buffer の蛍光スペクトルを引いたもの。グラフ中の数字は投入した MgADP の終濃度。0 uM の時はトリプトファン変異体に結合しているヌクレオチドは無いので、溶液中の全てのトリプトファン変異体が蛍光を発している。投入した MgADP 濃度が高くなるにしたがってヌクレオチドが結合したトリプトファン変異体の割合が増えていくので溶液全体の蛍光も弱くなる。1000 uM MgADP でほぼ全てのトリプトファン変異体の触媒部位に ADP が結合した状態になるのでトリプトファン由来の蛍光は無くなる。水色の実線が 410 nm 付近にピークをもつ蛍光スペクトルになっているのは、投入した ADP に含まれている混入物によるものである。

## 2.3 測定方法と解析方法

### 2.3.1 $\beta$ Y341W 変異体の蛍光強度の時間変化測定

触媒部位へのヌクレオチドの結合を調べるために、トリプトファンの蛍光の時間変化測定を行い、溶液へのヌクレオチド投入による蛍光の消光率を求めた(図 2.3.1 A)。蛍光の消光率とは溶液中にヌクレオチドが存在しないときの $\beta$ Y341W のみの蛍光強度を 1 としたときのヌクレオチド投入によって減少した蛍光強度の割合である。測定の流れを簡単に書くと

1. buffer のみの蛍光強度を測定する。
  2. buffer のみの蛍光スペクトルを測定する。
  3. 溶液に  $F_1$  を投入する
  4.  $F_1$  投入後の蛍光スペクトルを測定する。
  5. 蛍光強度の時間変化測定を開始して、途中でヌクレオチドを投入する。
  6. 最終的な溶液の蛍光スペクトルを測定する。
- 2, 4, 6 の操作は実際にトリプトファンの蛍光が消光しているか確かめるために行っている。トリプトファンの蛍光は 340 nm あたりに 1 つのピークを持つので、蛍光強度の変化の原因がトリプトファンの消光以外だとすると蛍光スペクトルの形がゆがむためである。消光率の測定は 1 と 5 で測定した蛍光強度から求めた。1 で測定した buffer のみのときの蛍光強度( $F_{\text{buffer}}$ )と、5 で測定したヌクレオチド投入前の buffer と  $F_1$  の蛍光強度( $F_{\text{buffer}+F_1}$ )、そして 5 で測定したヌクレオチド投入後の蛍光強度( $F_{\text{buffer}+F_1+\text{Nuc}}$ )を使うと消光率( $\Delta F$ )を求める式は

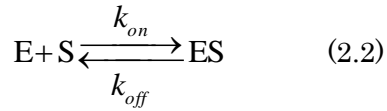
$$\Delta F = 1 - \frac{F_{\text{buffer}+F_1+\text{Nuc}} - F_{\text{buffer}}}{F_{\text{buffer}+F_1} - F_{\text{buffer}}} \quad (2.1)$$

となる。測定は複数のヌクレオチド濃度条件で行い、 $\beta$ 単体の場合はヌクレオチドが殆ど結合していないサンプルの数倍の濃度から、殆どの $\beta$ サブユニットにヌクレオチドが結合した飽和濃度までで測定した。サブコンプレックスの場合は平均して 2 個ずつ結合している濃度から、全ての触媒部位にヌクレオチドが結合した飽和濃度までで測定した。



### 2.3.2 消光率のグラフから解離定数を求める

結合の強さを調べるために、蛍光測定で $K_d$ を求めた。 $K_d$ は解離定数で



の結合反応が平衡状態になっている時の結合の速度定数 $k_{on}$ と解離の速度定数 $k_{off}$ の比で決まる定数である。Eはタンパク質、Sは基質、ESはタンパク質と基質が結合したものを表し、 $k_{on}$ は結合の速度定数、 $k_{off}$ は解離の速度定数である。この値が大きければその結合の親和性は低いということである。また $F_1$ の触媒部位への結合を考えたときには、半分の $F_1$ の触媒部位にヌクレオチドが結合するときの溶液のヌクレオチド濃度でもある。また平衡状態では次の式をみたとす。

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[E]_{eq}[S]_{eq}}{[ES]_{eq}} \quad (2.3)$$

この $K_d$ をTrpミュータントの蛍光の消光率のグラフから求めた(図 2.3.1 B)。

$\beta$ 単体の場合は触媒部位が1つだけなので

$$\Delta F = \frac{[Nuc]}{K_d + [Nuc]}(A_2 - A_1) + A_1 \quad (2.4)$$

から求めた。 $A_1$ ,  $A_2$ はそれぞれヌクレオチド濃度が0と $\infty$ の極限で、測定で調べるのは消光率が $A_1$ から $A_2$ までの変化の様子である。サブコンプレックスの場合触媒部位が3つあるので解離定数も $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $K_{d3}$ の3つ存在する。ただし $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ は $K_{d3}$ に比べて非常に小さい<sup>58</sup>。そのため投入したヌクレオチドの量と溶液中のサブコンプレックスの量の比が2:1を超えるまでは、投入したヌクレオチドのほぼすべてがサブコンプレックスに結合する。2:1を超えると次のヌクレオチド結合の解離定数は $K_{d3}$ なので、ヌクレオチド投入量に対して消光率の変化はなだらかになる(図 2.3.1 B)。今回測定するヌクレオチド濃度では全てのサブコンプレックスに2個ずつヌクレオチドが結合した状態から、3個ずつヌクレオチドが結合した状態の間を見ることになる。そのためサブコンプレックスの $K_{d3}$ を求める式も

$$\Delta F = \frac{[Nuc]}{K_{d3} + [Nuc]}(A_2 - A_1) + A_1 \quad (2.5)$$

から求めた。 $A_1$ ,  $A_2$ の意味は式(2.4)の $A_1$ ,  $A_2$ と同じである。

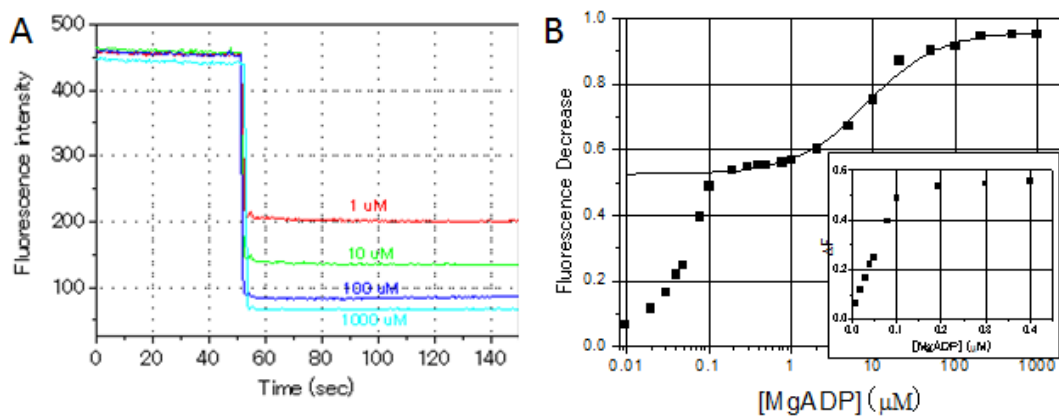


図 2.3.1 A : 蛍光強度の時間変化測定。50 nM  $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_3\gamma$ 投入後から測定を開始して 50 sec で MgADP を投入した。グラフ中の数字は MgADP の終濃度。 $F_{\text{buffer}+\text{F}_1}$ と  $F_{\text{buffer}+\text{F}_1+\text{Nuc}}$ はそれぞれヌクレオチド投入の 10 sec 前と 80sec 後の蛍光強度から求めている。B : 蛍光の消光率とヌクレオチドの終濃度の関係。縦軸が  $\Delta F$  で横軸が [Nuc] である。データは  $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_3\gamma$  と ADP の結合の測定から求めた物である。右下に挿入されたグラフは 0.5  $\mu\text{M}$  ADP 以下の部分を抜き出したもので横軸を線形のプロットにしている。実線は式(2.5)でフィッティングした線である。測定は 50 nM  $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_3\gamma$ で行っており、0.1  $\mu\text{M}$  ADP 以下では結合できる触媒部位よりも溶液中の ADP が少ないので投入した ADP が全て結合する。

$\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ での $K_d$ の出し方

$\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への NTP 結合では $K_{d2} \ll K_{d3}$ だったため $K_{d3}$ は式(2.5)から求めることができた(図 2.3.2 A)。一方 $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への ADP 結合では 0.1  $\mu\text{M}$  ADP でもヌクレオチドが 2 個ずつ結合していない(図 2.3.2 B)。これは $K_{d2}$ が高いために 0.1  $\mu\text{M}$  でも 2 個目の結合の飽和濃度に達していないためである。そのため $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への ADP 結合の解離定数は

$$\Delta F = B_1 + B_2 \times \frac{[\text{Nuc}]}{K_{d2} + [\text{Nuc}]} + B_3 \times \frac{[\text{Nuc}]}{K_{d3} + [\text{Nuc}]} \quad (2.6)$$

から求めた。また GDP と IDP 結合は $K_{d2}$ の値が高く、式(2.6)のフィッティングでも $K_{d3}$ を定量的に求めることはできなかった。

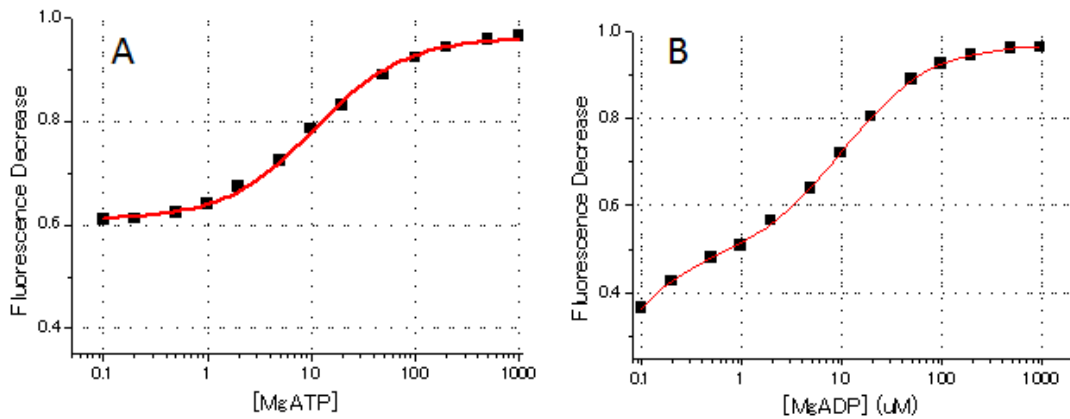


図 2.3.2 A :  $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への ATP 結合のグラフ。赤い実線は式(2.5)のフィッティング。 $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_{3\gamma}$ への ADP 結合と同様に $K_{d2} \ll K_{d3}$ であるため低濃度 ATP のあたりでグラフがプラトーになっている。B :  $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への ADP 結合のグラフ。赤い実線は式(2.6)のフィッティング。A とは異なり $K_{d2}$ の値が $K_{d3}$ に近いため低濃度 ADP のあたりでグラフがプラトーになっていない。

### 2.3.3 van't Hoff plot から結合の熱力学的パラメータを求める

熱力学的パラメータは解離定数の温度依存性から求めた。解離定数の測定は 4~50°C の範囲で行い、縦軸を解離定数の対数、横軸を絶対温度の逆数とする van't Hoff plot を描いた。ギブスの自由エネルギー変化( $\Delta G^0$ )はエントロピー変化( $\Delta S^0$ )とエンタルピー変化( $\Delta H^0$ )から

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2.7)$$

と表すことができる。また $\Delta G^0$ と解離定数の式

$$\Delta G^0 = RT\ln K_d \quad (2.8)$$

から

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad (2.9)$$

の関係を得ることができる。R は気体定数で T は絶対温度である。

エントロピーとエンタルピーの温度依存性が無視できるときは、式(2.9)の両辺を温度の逆数で微分すると。

$$\frac{d(\ln K_d)}{d(1/T)} = \frac{\Delta H^0}{R} \quad (2.10)$$

となりエンタルピーを求めることができる。

van't Hoff plot から熱力学的パラメータの値を精度よく求めるには測定温度の幅を取る必要がある。本研究で調べる TF1 は中等度好熱菌由来のタンパク質であり熱に対して強い耐性をもつ。TF1 は 60°C~4°C の範囲で温度変化が起こっても熱変性せず ATP 加水分解活性を持つ(図 2.3.3)。そのため本研究でも 4~50°C の温度範囲で測定することにした。

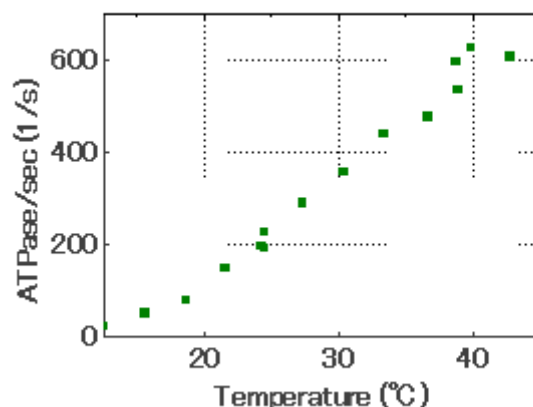


図 2.3.3 4~45° で測定した ATP の加水分解活性。縦軸は F1 一分子あたりの ATP 加水分解速度で LDAO 投入 10 秒後(ADP 阻害状態から回復している状態)での測定結果から求めた。測定中の ATP 濃度は 1 mM で ATP 再生系が含まれている。

## 2.4 結果

今回測定した温度範囲では全ての結合の van't Hoff plot が直線とみなすことができた(図 2.4.1)。そのため今回求めたエンタルピーとエントロピーの温度依存性は、測定した温度範囲で無視することができる。van't Hoff plot から求めた結合の熱力学的パラメータは表 2.1 ~4 にまとめた。表の値は平均値±標準誤差である。

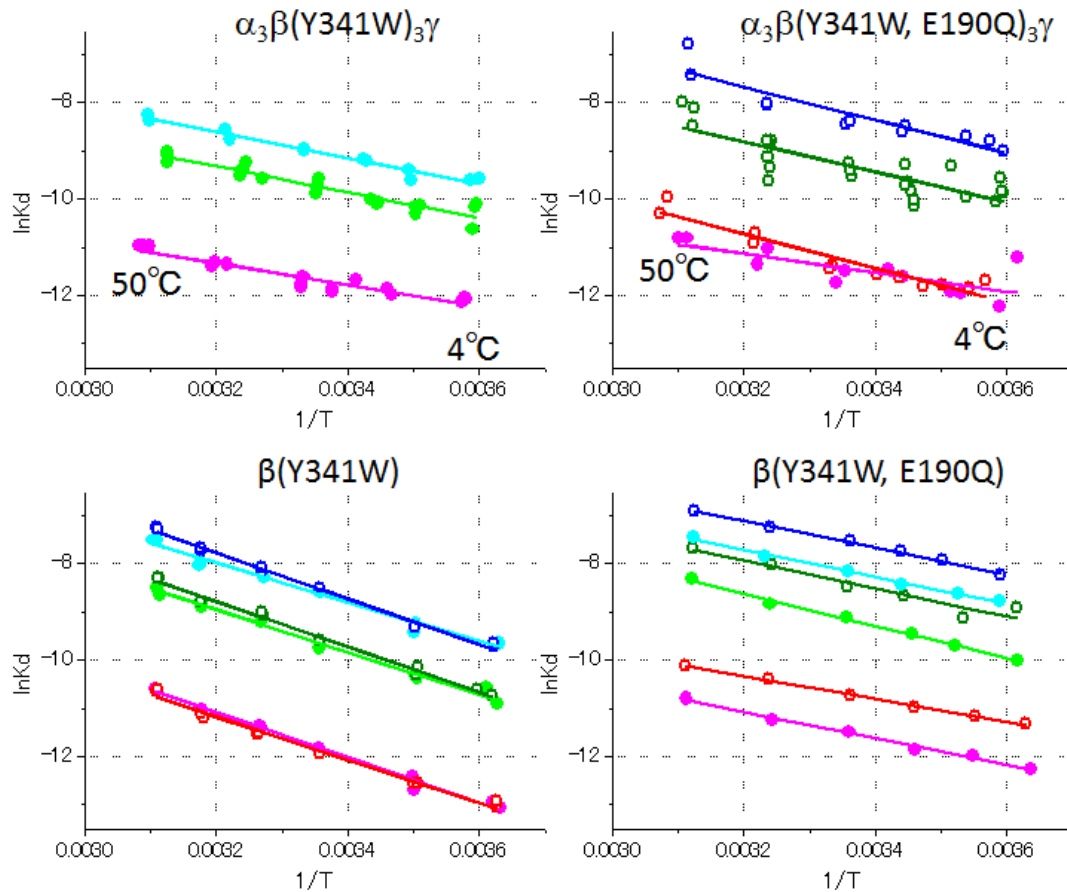


図 2.4.1 各タンパク質へのヌクレオチド結合の van't Hoff plot。各点が測定から求めた  $K_d, K_{d3}$  の値で、実線は  $\ln K_d = \Delta H^0/RT - \Delta S^0/R$  でのフィッティング。赤い○が ATP, ピンクの●が ADP, 緑の○が GTP, 黄緑の●が GDP, 青の○が ITP, 水色の●が IDP のデータである。

表 2.1  $\beta$  (Y341W)単体の結果

Nucleotide	$\Delta H^0$ (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^0$ (J $\cdot$ mol $^{-1}$ $\cdot$ K $^{-1}$ )	$\Delta G^0$ at 25°C (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$K_d$ at 25°C (uM)
	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
<b>ATP</b>	$-36 \pm 1$	$-25 \pm 4$	$-28.7 \pm 0.1$	$7.1 \pm 0.5$
<b>ADP</b>	$-38 \pm 1$	$-31 \pm 4$	$-28.6 \pm 0.1$	$7.5 \pm 0.4$
<b>GTP</b>	$-38 \pm 1$	$-51 \pm 4$	$-23.0 \pm 0.1$	$74 \pm 4$
<b>GDP</b>	$-36 \pm 1$	$-41 \pm 4$	$-23.4 \pm 0.1$	$65 \pm 4$
<b>ITP</b>	$-39 \pm 2$	$-60 \pm 4$	$-20.6 \pm 0.1$	$200 \pm 10$
<b>IDP</b>	$-33 \pm 1$	$-42 \pm 5$	$-20.9 \pm 0.1$	$180 \pm 20$

表 2.2  $\beta$  (Y341W, E190Q)単体の結果

Nucleotide	$\Delta H^0$ (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^0$ (J $\cdot$ mol $^{-1}$ $\cdot$ K $^{-1}$ )	$\Delta G^0$ at 25°C (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$K_d$ at 25°C (uM)
	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
<b>ATP</b>	$-19.3 \pm 0.5$	$22 \pm 2$	$-25.91 \pm 0.01$	$22.7 \pm 0.3$
<b>ADP</b>	$-22 \pm 1$	$20 \pm 4$	$-27.88 \pm 0.06$	$10.1 \pm 0.6$
<b>GTP</b>	$-23 \pm 3$	$-10 \pm 10$	$-20.31 \pm 0.09$	$230 \pm 20$
<b>GDP</b>	$-27 \pm 1$	$-16 \pm 4$	$-22.16 \pm 0.06$	$107 \pm 6$
<b>ITP</b>	$-22.3 \pm 0.9$	$-14 \pm 3$	$-18.28 \pm 0.04$	$530 \pm 20$
<b>IDP</b>	$-23 \pm 1$	$-10 \pm 3$	$-19.74 \pm 0.03$	$290 \pm 10$

表 2.3  $\alpha 3\beta$ (Y341W) $3\gamma$  の結果

Nucleotide	$\Delta H^0$ (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^0$ (J $\cdot$ mol $^{-1}$ $\cdot$ K $^{-1}$ )	$\Delta G^0$ at 25°C (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$K_d$ at 25°C (uM)
	$F_1$	$F_1$	$F_1$	$\beta$ $F_1$
<b>ATP</b>				
<b>ADP</b>	$-18 \pm 1$	$33 \pm 5$	$-28.2 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.6$
<b>GTP</b>				
<b>GDP</b>	$-22 \pm 2$	$6.0 \pm 6$	$-23.6 \pm 0.1$	$59 \pm 5$
<b>ITP</b>				
<b>IDP</b>	$-22 \pm 1$	$-0.4 \pm 1$	$-21.7 \pm 0.1$	$128 \pm 9$

表 2.4  $\alpha 3\beta$ (Y341W) $3\gamma$  の結果

Nucleotide	$\Delta H^0$ (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^0$ (J $\cdot$ mol $^{-1}$ $\cdot$ K $^{-1}$ )	$\Delta G^0$ at 25°C (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ )	$K_d$ at 25°C (uM)
	$F_1$	$F_1$	$F_1$	$F_1$
<b>ATP</b>	$-29 \pm 3$	$-5.0 \pm 9$	$-27.1 \pm 0.1$	$14 \pm 2$
<b>ADP</b>	$-21 \pm 3$	$24 \pm 10$	$-27.9 \pm 0.1$	$10 \pm 1$
<b>GTP</b>	$-28 \pm 3$	$-19 \pm 9$	$-22.3 \pm 0.1$	$100 \pm 10$
<b>GDP</b>				
<b>ITP</b>	$-28 \pm 4$	$-27 \pm 12$	$-19.9 \pm 0.2$	$270 \pm 50$
<b>IDP</b>				

#### 2.4.1 $\beta$ (Y341W)への結合のパラメータ

表 2.1 より、25°Cでの $K_d$ および $\Delta G^0$ の値は同じ塩基のヌクレオチドの間には差がなかった。つまり $\beta$ (Y341W)への結合にヌクレオチドのリン酸の数はほぼ影響していないという事になる。一方塩基の構造は親和性に大きな影響を与えた。親和性は ATP/ADP > GTP/GDP > ITP/IDP となっており、加水分解や回転の親和性と対応する結果となった。

$\Delta H^0$ はどのヌクレオチドでも負の値となった。大きさを比べると ITP < ADP/GTP < ATP/GDP < IDP の順番で ITP と ATP/GDP の差が 1 kJ/mol、ADP/GTP と ATP/GDP の差が 2 kJ/mol、ATP/GDP と IDP の差が 3 kJ/mol である。標準誤差は ITP のみ 2 kJ/mol でそれ以外が 1 kJ/mol である。塩基の違いで比較すると、ATP/ADP と GTP/GDP は(A, G)TP と (A, G)DP の値が 2 kJ/mol 離れているが、ITP と IDP は 6 kJ/mol も離れている。標準誤差も含めて考えると明らかな差があると言えるのは ITP と IDP である。van't Hoff plot を見ると低温では NTP と NDP の $K_d$ はほぼ同じ値であるのに対して高温でわずかな差が出ているようにも見える。

$\Delta S^0$ の値はどのヌクレオチドでも負になった。大きさは ITP < GTP < IDP < GDP < ADP < ATP であり親和性の低い塩基のヌクレオチドの方が大きな負の $\Delta S^0$ だった。これは $\Delta H^0$ がヌクレオチド間であまり差がないのに比べ、塩基の差によって $\Delta G^0$ の違いがはっきり表れたからである。NTP と NDP の $\Delta S^0$ 比較をすると ADP が ATP より 6 J/mol/K 小さい、GDP が GTP より 10 J/mol/K 大きい、IDP が ITP より 18 J/mol/K 大きい値であった。誤差は IDP が J/mol/K、それ以外が J/mol/K である。

25°Cでの $\Delta G^0$ への $\Delta H^0$ と $-T\Delta S^0$ 寄与は $\Delta H^0$ が負の値で、 $-T\Delta S^0$ が正の値であり逆の寄与になった。 $\Delta H^0$ に対して $-T\Delta S^0$ は 4~6 割の大きさなので $\Delta G^0$ は負の値となり、ヌクレオチド結合反応がエンタルピー駆動となっているのが解る。

#### 2.4.2 $\beta$ (Y341W, E190Q)への結合のパラメータ

表 2.2 より、25°Cでの $K_d$ および $\Delta G^0$ の値は同じ塩基のヌクレオチドでも異なり、NTP の $K_d$ は NDP に比べ約 2 倍の値だった。また NTP の $\Delta G^0$ は NDP に比べ 1.5~2 kJ/mol 大きい値だった。van't Hoff plot を見ると明らかに NTP と NDP の結合の親和性は異なっていることがわかる。

$\Delta H^0$ はどのヌクレオチドでも負の値となった。大きさを比べると GDP < GTP/IDP < ITP < ADP < ATP の順番で、GTP/IDP, ITP, ADP にはほとんど差がない。NTP と NDP を比べると NDP < NTP となっており GTP が GDP より 4 kJ/mol kJ 大きく、ATP は ADP より 2.7 kJ/mol 大きく、ITP は IDP より 0.7 kJ/mol おおきい。

$\Delta S^0$ の値は正のものと負のものがある。ATP と ADP は正の値で、それ以外は負の値である。値は GDP < ITP < GTP/IDP < ADP < ATP であり負の値の4つが似た値で、ATP と ADP が近い値である。

25°Cでの $\Delta G^0$ への $\Delta H^0$ と $-T\Delta S^0$ 寄与は $\Delta H^0$ の寄与が大きい。 $\Delta H^0$ と $\Delta G^0$ の値の差は大きくて

も 5 kJ/mol しか差がない。 $-\Delta S^0$ は ATP と ADP が負の値であり残りの 4 つが正の値だが、 $\Delta H^0$ に比べ $-\Delta S^0$ の値は 1/4~1/3 である。

#### 2.4.3 $\alpha_3\beta(Y341W)_{3\gamma}$ への結合のパラメータ

表 2.3 より NTP は加水分解してしまうので ADP, GDP, IDP の結合のデータのみである。25°Cでの $K_d$ および $\Delta G^0$ の値は $K_d$ が ADP < GDP < IDP で $\Delta G^0$ は ADP < GDP < IDP となった。 $\Delta H^0$ は ADP が GDP, IDP よりも 4 kJ/mol 大きく、GDP, IDP はほぼ同じ値だった。 $\Delta S^0$ の値は ADP と GDP が正の値で、IDP が負の値になった。ただし IDP の値は小さくほぼ 0 だと見なせる。

25°Cでの $\Delta G^0$ への $\Delta H^0$ と $-\Delta S^0$ 寄与は ADP と GDP はどちらも負の値で、IDP はほぼ $\Delta H^0$ のみであった。 $\Delta H^0$ と $-\Delta S^0$ 値は ADP が -18 kJ/mol と -10.2 kJ/mol で GDP は -22 kJ/mol と -1.6 kJ/mol であり $\Delta G^0$ は ADP 以外はほぼ $\Delta H^0$ で決まっている。

#### 2.4.4 $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_{3\gamma}$ への結合のパラメータ

表 2.4 より 25°Cでの $K_d$ および $\Delta G^0$ の値は $K_d$ が ADP < ATP < GTP < ITP で $\Delta G^0$ は ADP > ATP > GTP > ITP となった。ATP と ADP の $\Delta G^0$ の値はほぼ同じで差は 0.8 kJ/mol だった。

$\Delta H^0$ は ATP, GTP, ITP がほぼ同じ値であるのに対して、ADP は ATP より 8 kJ/mol 大きい値だった。

$\Delta S^0$ の値は ATP に対して GTP が 14 J/mol/K 低い値で、ITP が 22 J/mol/K 低い値であったのに対し、ADP は 29 J/mol/K 高い値で ADP のみ正の値になった。

25°Cでの $\Delta G^0$ への $\Delta H^0$ と $-\Delta S^0$ 寄与は ADP がどちらも負の値なのに対して、ATP, GTP, ITP は $-\Delta S^0$ は正の値だった。ATP と ADP は $\Delta G^0$ の値はほぼ同じだったが、ATP より ADP の $\Delta H^0$ による寄与が 8 kJ/mol 小さくなるのに対して、 $-\Delta S^0$ の寄与は 8.7 kJ/mol 大きくなっていった。

#### 2.4.5 塩基が異なるヌクレオチドは $K_d$ が大幅に異なる

基本的に同じ塩基を持つヌクレオチドの $K_d$ は似たような値で I(T,D)P > G(T,D)P > A(T,D)P であった。この結果は活性測定、回転観察から求められた ATP, GTP, ITP の親和性の結果と一致する。このことは親和性の大きさには塩基の構造による影響が強いということを表す。 $K_d$ の対数から計算される $\Delta G^0$ では同じ塩基のヌクレオチド同士の差はさらに小さくなる。逆に熱力学的パラメータは塩基以外の要因も大きい。例えば $\beta$ 単体との結合では $\beta(E190Q)$ 変異の有無にかかわらず塩基の構造が変わっても似たような $\Delta H^0$ になるが、 $\beta(E190Q)$ 変異の導入によって大きく $\Delta H^0$ が増加しており、塩基の構造より変異の影響が強い。サブコンプレックスの結果を見ると、 $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_{3\gamma}$ への結合の $\Delta H^0$ は ATP, GDP, ITP は似たような値だが、ADP が明らかに異なる値となっておりこちらはヌクレオチドのリン酸の数の影響が大きい。



$\Delta S^0$ の値は塩基の構造の差が表れている。どのサンプルとの結合でも ATP, ADP が明らかに GTP, GDP, ITP, IDP よりも大きい。サブコンプレックスとの結合では GTP > ITP, GDP > IDP だが、単体との結合は GTP > ITP で GDP と IDP の差は小さくサンプルによって異なっていた。ヌクレオチドの塩基部分はフェニルアラニンやチロシンなどの残基と  $\pi$  結合によって結合している。ATP や ADP が触媒部位に結合するときは、全体が伸びた状態で結合しており、塩基が結合する場所は反応に重要な残基が集まるリン酸部分からは遠い位置にある。塩基の違いによる  $\Delta S^0$  の差はこの  $\pi$  結合の強さの影響が大きいだろう。ATP, ADP が明らかに GTP, GDP, ITP, IDP よりも大きいのは A(T,D)P の  $K_d$  が G(T,D)P の約 10 分の 1 であるのに対して G(T,D)P と I(T,D)P は 2 倍程度しか変わらないのを反映しているためだと考えられる。一方  $\Delta H^0$  は明らかな塩基の違いが表れなかった。これは  $\Delta S^0$  に比べて  $\Delta H^0$  への塩基の構造による寄与が小さいためだと考えられる。

#### 2.4.6 E190Q の影響は単体とサブコンプレックスで異なる

$\beta$ (Y341W, E190Q) 単体への ATP 結合の  $K_d$  は  $\beta$ (Y341W) 単体への ATP 結合の 3 倍くらいに増えているのに対して、ADP 結合の  $K_d$  の上昇は 1.5 倍ほどであった。この変化は  $\Delta G^0$  に直すと ATP は  $\beta$ (Y341W, E190Q) 単体の方が 2.8 kJ/mol の上昇で、ADP は 0.8 kJ/mol の上昇である。一方  $\beta$ (Y341W, E190Q) 単体の熱力学的パラメータは  $\beta$ (Y341W) 単体比べて、ATP 結合の  $\Delta H^0$  は 16.7 kJ/mol 上昇で  $\Delta S^0$  は 47 J/mol/K 上昇 ( $-T\Delta S^0$  だと 14 kJ/mol の減少)、ADP 結合の  $\Delta H^0$  は 16 kJ/mol 上昇で  $\Delta S^0$  は 51 J/mol/K 上昇 ( $-T\Delta S^0$  だと 15 kJ/mol の減少) だった。 $\Delta G^0$  への寄与を見ると  $\Delta H^0$  の上昇と  $-T\Delta S^0$  の減少が打ち消し合うことで結果的には  $\Delta G^0$  があまり変化していない。 $\beta$ E190Q 変異は結合の親和性でなく、結合反応の  $\Delta G^0$  への  $H^0$  と  $-T\Delta S^0$  の寄与を変えたことになる。 $\beta$ E190Q の影響は  $\gamma$  リン酸を囲む水の不安定化であると考えられる。 $\beta$ E190Q 変異によるエントロピー増加とエンタルピー増加は GTP, GDP, ITP, IDP でも確認することができた。ただし ATP, ADP に比べ小さい。塩基の構造の影響は不明だがヌクレオチドの塩基部分と  $\beta$ E190 の距離が非常に離れていることから、塩基部分と  $\beta$ E190Q 相互作用による影響はほぼないと考えている。

単体の時ははっきりと  $\beta$ E190Q の影響が出ていたがサブコンプレックスの場合には逆に影響があまりないように見える。 $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$  と  $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$  への ADP 結合の比較をすると、 $\beta$ E190Q によって  $K_d$  は一割上昇、 $\Delta H^0$  は 3 kJ/mol 小さく、 $\Delta S^0$  は 9 J/mol/K 小さかった。 $K_d$  の値は測定した温度範囲では近い値をとり (図 2.4.2)、 $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  の変化も単体の時に比べ小さい (表 2.5)。ただし  $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$  での NTP 結合の測定はしていないので、 $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$  への NTP 結合の熱力学的パラメータが  $\beta$ E190Q の影響を受けていないとは言い切れない。 $\beta$ E190Q の影響については主に 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は ADP 結合のようにほぼ影響がない場合である。この時は  $\beta$ (Y341W) 単体への NTP 結合と  $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$  への NTP 結合のパラメータを直接比較することができる。もう一つは  $\beta$ (Y341W, E190Q) 単体と同様の影響が  $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$  への NTP 結合のパラメータ

に表れている場合である。 $\beta(\text{Y341W, E190Q})$ 単体への NTP 結合のパラメータは、 $\beta(\text{Y341W})$ 単体への NTP 結合のパラメータに比べ $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ の値が上昇していたので、 $\beta(\text{Y341W})$ 単体と $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ で比較するには $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への NTP 結合の熱力学的パラメータから $\beta\text{E190Q}$ の影響による分だけ引き算して考えなくてはならない。ただし定量的にはどれほどの影響が出ているのか不明なので、 $\beta(\text{Y341W})$ 単体と $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ を直接比較しても定量的な議論は難しいと言える。

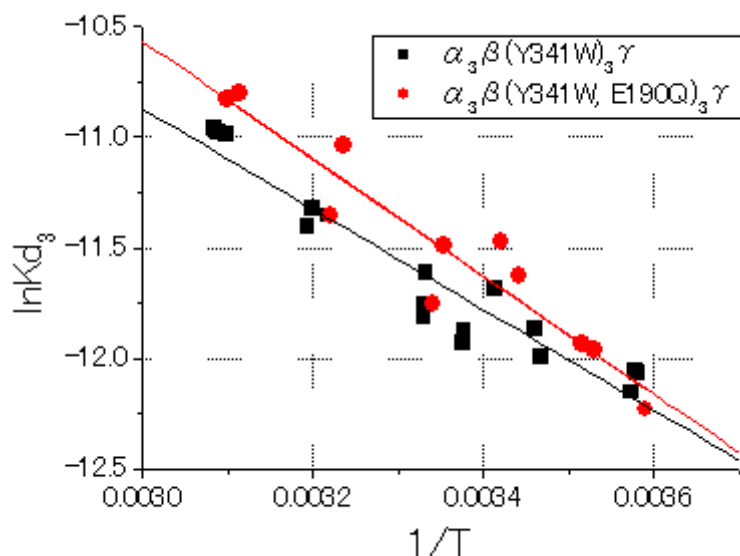


図 2.4.2  $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_{3\gamma}$ と $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ への ADP 結合の van't Hoff plot 実線はそれぞれ式 (2.9) でフィッティングした直線。

	$\Delta H^0$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$-T\Delta S^0$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) at 25°C	$\Delta G^0$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) at 25°C
単体	+16	-15	+0.7
サブコンプレックス	-3	+3	+0.4

表 2.5  $\beta\text{E190Q}$  による ADP 結合の熱力学的パラメータへの影響。単体同士とサブコンプレックス同士のパラメータの差をまとめた。表の値は $\beta(\text{Y341W, E190Q})$ 単体から $\beta(\text{Y341W})$ 単体の値を引いたものと、 $\alpha_3\beta(\text{Y341W, E190Q})_{3\gamma}$ から $\alpha_3\beta(\text{Y341W})_{3\gamma}$ の値を引いた値。

#### 2.4.7 $\beta$ (Y341W)と $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$ の比較 図2.4.3参照

$\beta$ (Y341W)単体と $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$ サブコンプレックスへのNDP結合の熱力学的パラメータを比較した(図 2.4.3)。

$\Delta G^0$ の値には大きな差がなく一番差が大きいのが IDP でサブコンプレックスの方が 0.8 kJ/mol 大きく、一番差が小さいのが GDP でサブコンプレックスの方が 0.2 kJ/mol 小さい。 $\Delta H^0$ はサブコンプレックスの方が大きい値で負の値の減少により発熱量が減っている。差が一番大きいのは ADP でサブコンプレックスは単体より 18 kJ/mol 大きく、差が一番小さいのが IDP でサブコンプレックスの方が 11 kJ/mol 大きい。つまり親和性の高いヌクレオチドの方が差が大きいともいえる。

一方 $\Delta S^0$ はサブコンプレックスの方が単体に比べ大きく ADP と GDP は負の値から正の値になり、IDP は負の値からほぼ 0 になった。単体に比べたサブコンプレックスの $\Delta S^0$ の値は ADP で 64 J/mol/K, GDP で 47 J/mol/K, IDP で 42 J/mol/K と大きく増大していた。エントロピーの増大は $\Delta G^0$ には負の値の寄与であり、 $\Delta H^0$ の負の値の減少をほぼ打ち消すようになっていた。

#### 2.4.8 $\beta$ (Y341W, E190Q)と $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$ の比較 図2.4.4参照

$\beta$ (Y341W, E190Q)単体と $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_{3\gamma}$ サブコンプレックスへのADP結合とNTP結合の熱力学的パラメータを比較した(図 2.4.4)。

まず ADP 結合については $\Delta G^0$ の値にはほぼ差がなくサブコンプレックスの方が 0.02 kJ/mol 小さかった。 $\Delta H^0$ の値はサブコンプレックスの方が 1kJ/mol 増えており、 $\Delta S^0$ の値は 4 J/mol/K の増加で、差は小さかった。

一方 NTP の結合の場合は $\Delta G^0$ の値がほぼ同じであるのは変わらないが、 $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ の値に差が出た。 $\Delta H^0$ はサブコンプレックスの方が小さい値で負の値の増加により発熱量が増えている。差が一番大きいのは ATP でサブコンプレックスは単体より 10 kJ/mol 小さく、差が一番小さいのが ITP でサブコンプレックスの方が 4.7 kJ/mol 大きい。つまり親和性の高いヌクレオチドの方が差が大きいともいえる。

対して $\Delta S^0$ はサブコンプレックスの方が単体に比べ小さく ATP は正の値から負の値になり、GTP と ITP はより大きい負の値になった。単体に比べたサブコンプレックスの $\Delta S^0$ の値は ADP で 27 J/mol/K, GDP で 9 J/mol/K, IDP で 13 J/mol/K と減少。エントロピーの減少は $\Delta G^0$ には正の値の寄与であり、 $\Delta H^0$ の負の値の増加をほぼ打ち消すようになっていた。

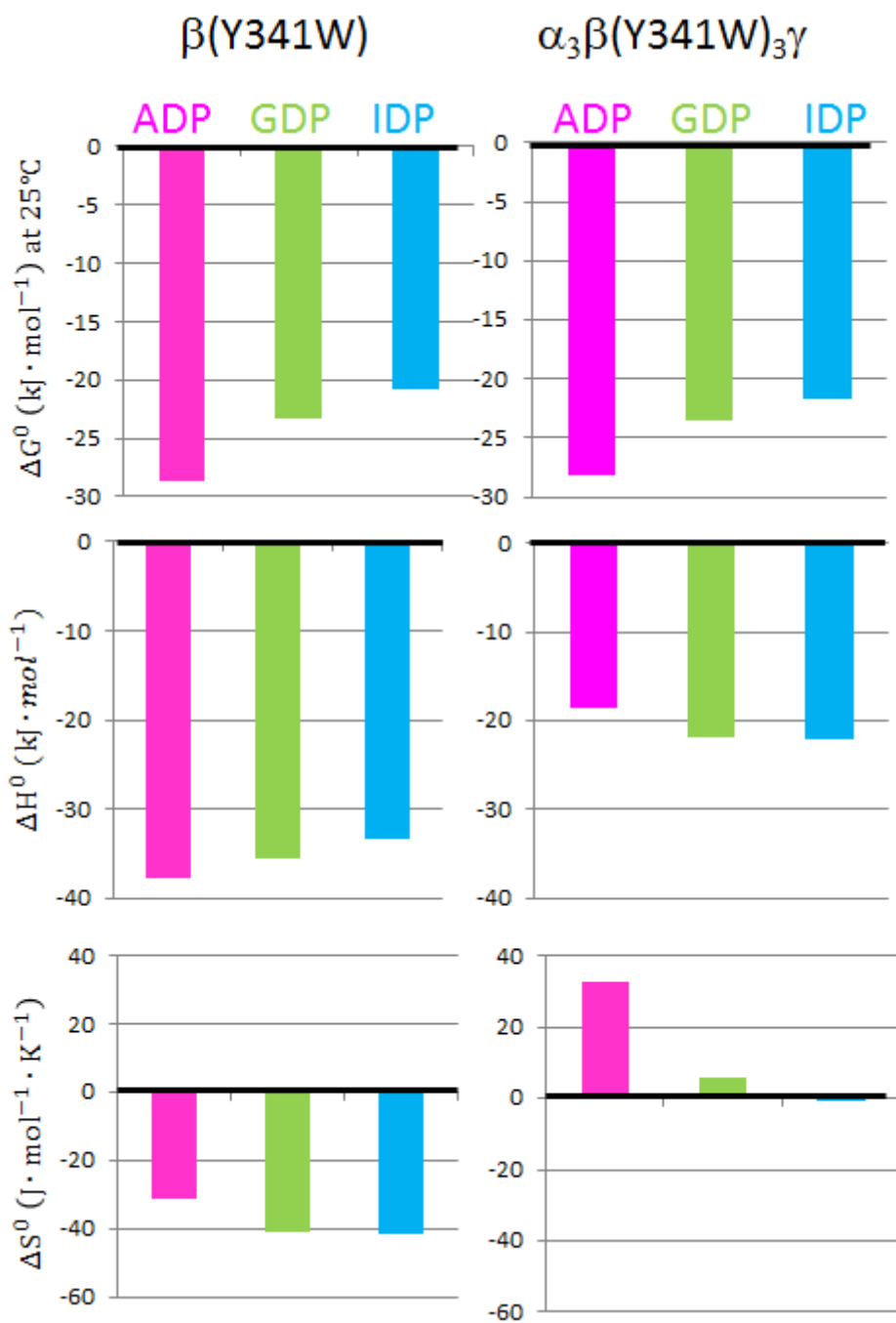


図 2.4.3  $\beta(Y341W)$ 単体と $\alpha_3\beta(Y341W)_3\gamma$ サブコンプレックスへのNDP結合の熱力学的パラメータの比較。

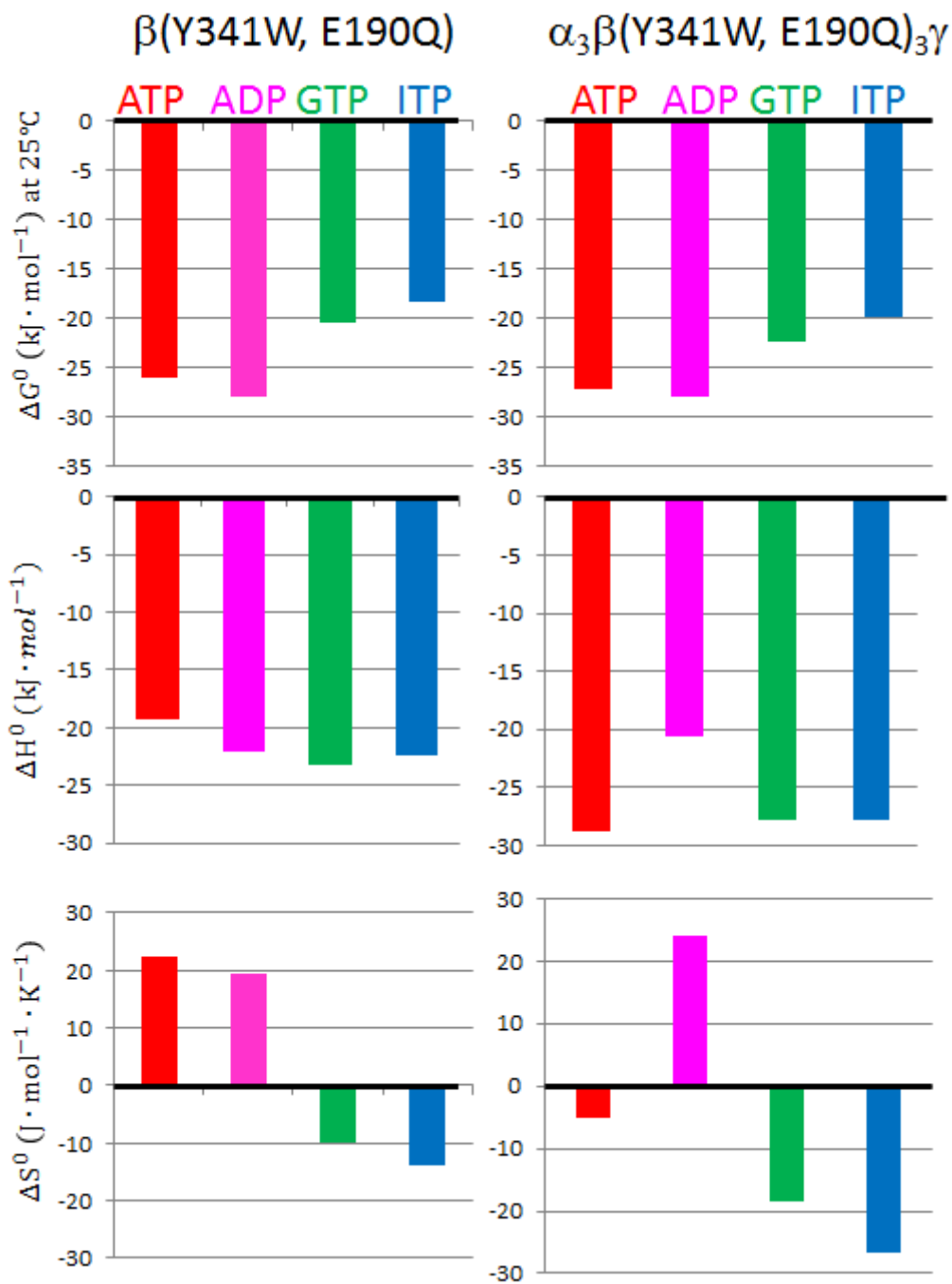


図 2.4.4  $\beta(Y341W, E190Q)$ 単体と $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ サブコンプレックスへの ADP と NTP 結合の熱力学的パラメータの比較。

#### 2.4.9 複合体の効果のまとめ

図2.4.3と図2.4.4から単体に対するサブコンプレックスの効果は次のようにまとめられる。 $\Delta G^0$ には明らかな差がなく $\Delta H^0$ と $-T\Delta S^0$ の差が打ち消し合っている。

NDP の結合は $\Delta H^0$ が増加して、 $\Delta S^0$ も増加する。

NTP の結合は $\Delta H^0$ が減少して、 $\Delta S^0$ も減少する。

また表 2.4 の $\alpha_3\beta(Y341W, E190Q)_3\gamma$ の結果では ATP と ADP の結合の熱力学的パラメータには明らかな差があるのに対して、 $\beta$ 単体への結合の熱力学的パラメータは NTP と NDP で大きな差がない。つまり複合体をつくりサブコンプレックスになることで ATP と ADP 結合に差が生まれていると言える。

## 2.5 考察

### 2.5.1 結合の形成によるエントロピーへの寄与

$\beta$ (Y341W)単体と $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$ へのNDP結合を比較する。単体と比べるとサブコンプレックスへのNDP結合の親和性はあまり変わっていない。単体からサブコンプレックスになることでADP結合の解離定数は7.5  $\mu$ Mから8.9  $\mu$ Mに、GDPは65  $\mu$ Mから59  $\mu$ Mに、IDPは180  $\mu$ Mから128  $\mu$ Mになっている。IDPだけ見ると親和性が上がっているように見えるが、ADPとGDPをみるとあまり変化は無いようにも見える。一方サブコンプレックスの $\Delta H^0$ と $\Delta S^0$ は単体と比較して明らかに上昇した。

興味深いのはNDP結合のエントロピーの上昇である。一般に水素結合が多くなると結合状態は安定化するためエントロピーは減少するはずである。ヌクレオチドの結合部位は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの界面に存在するため、NDP、NTPともに $\alpha$ サブユニットの分だけ $\beta$ 単体よりもサブコンプレックスの方が結合の数は多い(図 2.5.1)。NTPの結合ではサブコンプレックスの方がエントロピーが減少している。結合だけ考えるとADP結合の場合も、サブコンプレックスの方がエントロピーが減少すると考えられる。しかし対し $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_{3\gamma}$ へのADP結合のエントロピーは上昇している。サブコンプレックスと単体の解離定数は近い値なので、結合以外のエントロピーを上昇させる要因が強く出ていると考えられる。サブコンプレックスのエントロピーが大きいことから、サブユニット同士の相互作用による影響が、エントロピー上昇の要因になっていると考えた。

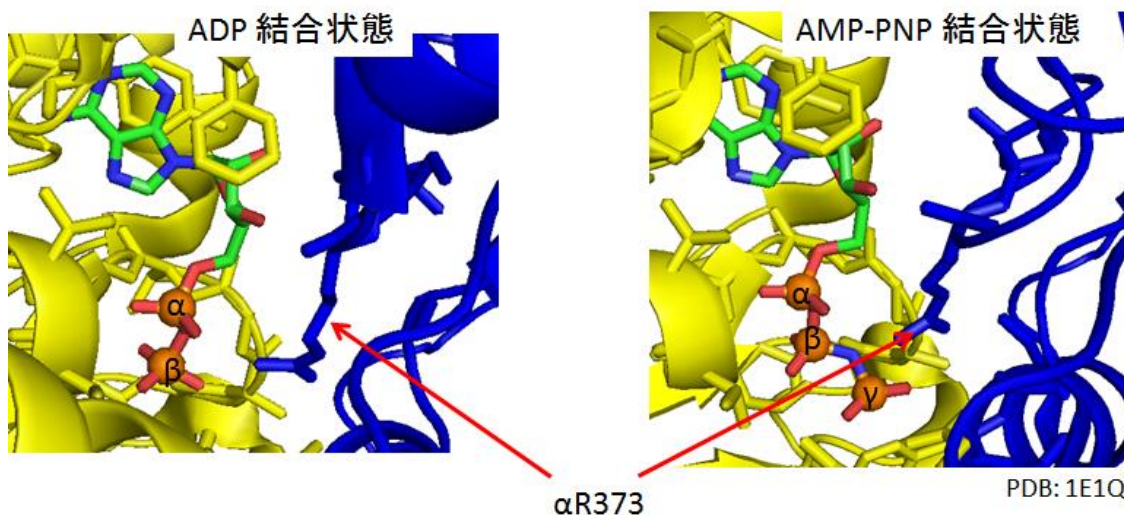


図 2.5.1  $\alpha_3\beta_3\gamma$ の触媒部位の構造。ADP 結合状態と、ATP の代替である AMP-PNP 結合状態のどちらでもヌクレオチドの近くに $\alpha$ サブユニットの残基があり結合を作っている。 $\alpha$ R373 残基は ATP 加水分解に重要な残基であり、リン酸部分と結合を作る。

## 2.5.2 水のエン트로ピー増加による $F_1$ の回転メカニズム

今回の測定結果を説明する論文を探したところ、水の排除体積効果による  $F_1$  の回転メカニズムを説明する論文を見つけた<sup>59</sup>。この論文ではヌクレオチド結合による回転が排除体積効果による水のエン트로ピー増加を利用しているというタイトパッキングについて MD シミュレーションで確かめた。排除体積効果とは表面に水の入り込めない排除空間をもつ疎水性残基がパッキングすることで、排除体積が減少し結果的に水の並進エン트로ピーが増加する効果である(図 2.4.6 A)。エン트로ピー増加はギブスの自由エネルギーを減少させるので、排除体積効果によって疎水性残基がタイトにパッキングする。吉留らは疎水性相互作用によって複合体を作る  $F_1$  の回転メカニズムを排除体積効果によるタイトパッキングによって説明した。図 2.4.6 B は 3 つの  $\beta$  サブユニットに AMP-PNP と ADP と何も結合していないときの構造である。この構造は  $80^\circ$  サブステップごの構造で AMP-PNP が結合している  $\beta$  サブユニットでの加水分解待ちの状態である。触媒部位の存在する  $\alpha$ - $\beta$  界面の内 ADP が結合した界面がタイトにパッキングしており、残りの 2 ヶ所のパッキングは弱い。この結晶構造から MD シミュレーションは  $80^\circ$  サブステップ時に ADP 結合界面からは水の追い出しが起きるが、ATP 結合界面では追い出しが無いことを明らかにした。つまり ADP 結合界面での水のエン트로ピー増加による自由エネルギー変化を利用して  $F_1$  は  $80^\circ$  のサブステップを行っていると考えられる。この計算結果からは ADP 結合でエン트로ピーが増大すること、ATP 結合ではエン트로ピーが増大しない事、 $\alpha$ - $\beta$  界面からの水の追い出しによる効果なので  $\beta$  単体では起こりえない事が言える。この結果は今回の測定結果と同じ傾向である。つまり今回の実験結果はこの論文で提唱されたエン트로ピー増加による  $F_1$  の  $80^\circ$  のサブステップを裏付ける結果であると考えられる。

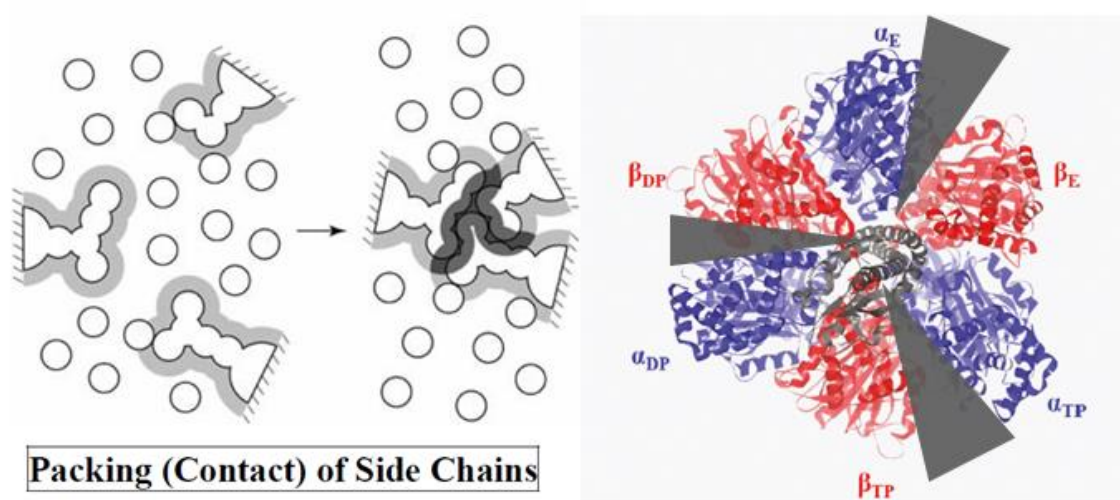


図 2.4.6 A : 水の排除体積効果による疎水性残基のパッキング。残基表面の水の排除空間(灰色)の部分が重なると排除体積が減少するので水が自由に動ける空間が増える。B : 触媒部位の存在する  $\alpha$ - $\beta$  界面のパッキング。3 つの触媒部位の存在する界面のパッキング(灰色の三角)は同じでなく ADP が結合したところが一番強い。MD シミュレーションによって  $80^\circ$



サブステップ後にそれぞれの界面の水の出入りと、それぞれのエントロピーの変化が計算された。文献 59 より改変

# 第三章

外力存在下の  $F_1$  の一分子回転観察

### 3.1 外部トルクによる $F_1$ の回転への影響

#### 3.1.1 外部トルクの大きさで $F_1$ の反応の方向が決まる

第3章の目的は  $F_1$  の回転と外部トルクの関係について調べることである。 $F_1$  は ATP を加水分解することで一方向の回転運動を行うが(図 3.1.1 A)<sup>1</sup>、強い外部からの力で  $\gamma$  サブユニットを逆方向に回転させられると ATP を合成する(図 3.1.1 B)<sup>11</sup>。この反応は外部トルクが  $F_1$  に対して仕事をすることで、 $F_1$  の反応を逆転させているために起きている。溶液の温度などの環境を変えたり、別の触媒を入れることなく  $F_1$  に対する力学的な仕事によって反応の方向を逆転させているのは非常に興味深い。外部トルクと  $F_1$  の回転および反応の方向について詳しく調べるためには  $F_1$  に加えている外部トルクの大きさを正確に知る必要がある。回転電場法は任意の大きさの一定外力を加えることができるため、外部トルクの大きさを変数として  $F_1$  の回転への影響を調べることができる<sup>9,10</sup>。外部トルクと平均回転速度の関係を調べた研究からは、外部トルクを横軸にとると  $F_1$  の平均回転速度は連続的に変化していた<sup>10</sup>。また平衡状態では  $120^\circ$  のステップと ATP 加水分解/合成の反応が 1:1 で対応していることが明らかになった<sup>10</sup>。この結果は外部トルクが  $120^\circ$  の間に  $F_1$  に対する仕事の大きさ  $W$  と ATP 加水分解から得られる自由エネルギー変化  $\Delta\mu$  の大きさで平均的な  $F_1$  の反応の方向を説明できることを意味する。つまり  $W - \Delta\mu < 0$  の時は ATP 加水分解による自由エネルギー変化の量の方が大きいので  $F_1$  は平均して加水分解方向に反応を進め  $\gamma$  サブユニットの回転も ATP 加水分解方向に回る。一方  $W - \Delta\mu > 0$  の時は外部トルクによる仕事の大きさが勝るので  $F_1$  の反応と回転は ATP 合成方向になる。また  $W - \Delta\mu = 0$  の時は平均して反応はどちらの方向にも進まないのので  $F_1$  は平衡状態になり、どちらの方向にも同じ頻度で回転をする。

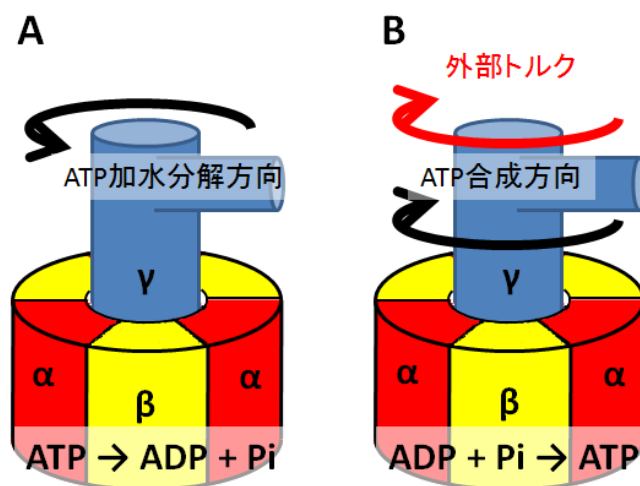


図 3.1.1 A :  $W < \Delta\mu$  で加水分解方向に回転する  $F_1$ 。 B :  $W > \Delta\mu$  で合成方向に回転する  $F_1$ 。外力を段階的に強くしていくと、加水分解方向の平均回転速度( $\bar{v}$ )は 0 に近づき  $W = \Delta\mu$  の時に  $\bar{v} = 0$  になる。さらに外力が強くなると合成方向の回転速度は大きくなっていく。

### 3.1.2 外部トルクによる dwell time への影響を調べる

外部トルクによる  $F_1$  の平均回転速度への影響から、外部トルクと反応の方向の関係が明らかになった。しかし平均回転速度には 1 つ 1 つの  $120^\circ$  ステップの情報が含まれておらず、回転の方向と対応した ATP 加水分解/合成反応の速度が外部トルクによってどのように変化しているのかは不明である。 $\gamma$ サブユニットと共役した反応の速度は dwell time の解析から調べることができる。先行研究により ATP 加水分解方向の反応の速度は外部トルクによって変化することと、合成方向に外部トルクを加えると徐々に加水分解方向のステップが減り合成方向のステップが増えているのが明らかになっている<sup>10</sup>。本研究では遷移状態理論を用いて外部トルクによる dwell time の変化から  $120^\circ$  ステップのエネルギー地形について調べた。また外部トルクによる  $F_1$  のステップ回転について複数の溶液条件で調べることもされていないので、ATP, ADP, Pi 濃度やそこから決まる  $\Delta\mu$  の値がどのように影響するのか調べた。 $\Delta\mu$  の値は ATP の濃度に対する ADP, Pi の濃度の比で決まるため(式 1.2)、ADP を 10 倍にして Pi を 10 分の 1 にすれば  $\Delta\mu$  には影響を与えない。しかし  $F_1$  の各反応素過程を考えると合成方向に回転するときには ADP と Pi 濃度の変化が影響を与えることが予想できる(図 3.1.2)ため調べた。

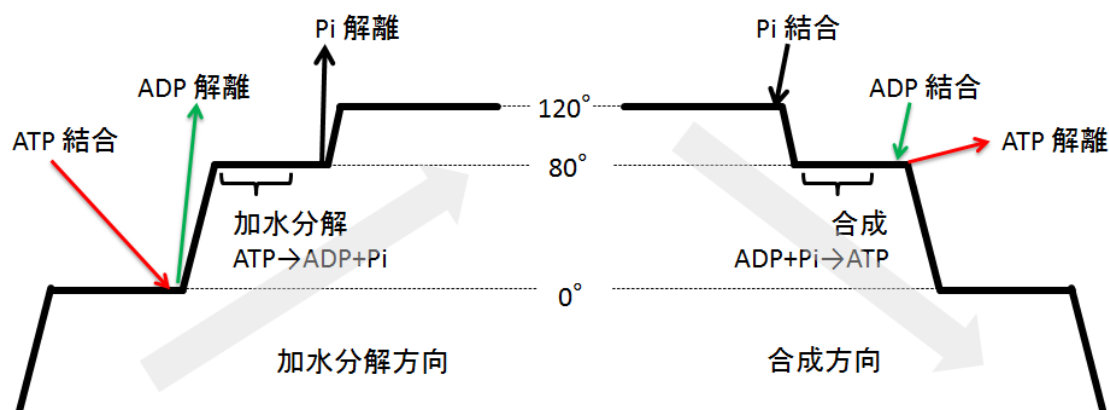


図 3.1.2 明らかになっている ATP 加水分解のスキーム(左)と予想される ATP 合成のスキーム(右)。右のスキームは左のスキームを逆にしたもの。たとえば左のスキームで Pi 解離の後に  $40^\circ$  サブステップをしているが、右の場合では Pi が結合することで  $40^\circ$  逆方向にサブステップをする。回転電場法で使う大きなビーズでは  $0^\circ$  と  $120^\circ$  の停止しか見えないが、Pi の結合と ADP の結合は異なる場所で起きることが予想できるので、Pi, ADP の濃度変化が合成方向のステップ回転に影響を与えることが考えられる。

## 3.2 試料

### 3.2.1 測定用 buffer

回転電場用 buffer : 5 mM MOPS-K, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH =6.9

MOPS-K はモル濃度比が MOPS : KOH = 5 : 2 の溶液を希釈したものを使用した。2 章の測定と組成が異なるのは回転電場法は電極に電圧を加えるため、電極中心では温度が上昇してしまうからである。溶液のイオン強度が上がると同じ電圧でも加わる外部トルクが小さくなってしまうのでより高い電圧を加える必要がある。低い電圧で測定するために MOPS 濃度は普段の測定などで使っている 50 mM の 1/10 にした。この組成では電圧の値が低いときには温度変化は無視できるのは確かであり、今回測定で使った電圧の範囲では温度上昇はほぼ無視できる。

今回の測定では合成方向の回転も見るとため ADP, Pi も溶液に含まれている。初めに  $\Delta\mu$  一定になるように ATP と ADP を同じ割合で変化させた溶液で測定を行った。ステップ解析を行うことができたのは表 3.1 の 4 つの条件である。1 番目と 2 番目の  $\Delta\mu$  は同じ値だが、3, 4 番目は ADP, Pi のみ変化させたため  $\Delta\mu$  の値が変化している。

	ATP (uM)	ADP (uM)	Pi (uM)	$\Delta\mu$ (pN · nm)
1	0.2	0.2	1000	75
2	0.6	0.6	1000	75
3	0.6	0.2	1000	80
4	0.6	0.6	10	95

表 3.1 回転観察をした時の ATP, ADP, Pi の濃度。  $\Delta\mu$  の値は式 1.2 にから求めた。

### 3.2.2 使用する F<sub>1</sub>

測定には HC95 を使用した。あらかじめビオチン化をして -80°C で保存したものを解凍して使用した。一分子回転観察の時は変性せずに活性を残した F<sub>1</sub> の回転を見ればよいので、回転観察用の F<sub>1</sub> は冷凍保存することができる。

### 3.3 測定方法とデータの解析

#### 3.3.1 チャンバーの組み方

F<sub>1</sub>には $\alpha_3\beta_3$ リングを吸着させるための His-tag があり、N<sup>2+</sup>を介してカバーガラスに修飾された NTA と結合している(図 3.3.1)。チャンバーを作る時は終濃度 0.2 nM の F<sub>1</sub> 入り buffer を流し、10 min ほど吸着させた後に buffer で結合していない F<sub>1</sub> を洗い流した。

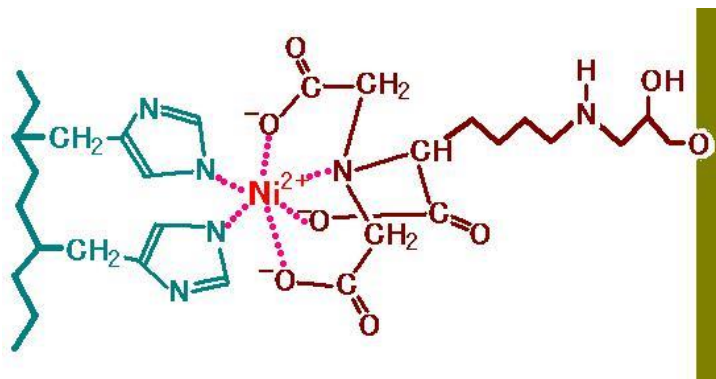


図 3.3.1 His-tag と NTA の結合。His-tag は左の緑の残基で、遺伝子操作のによって F<sub>1</sub> に導入されている。NTA は右の茶色でガラス表面をシラン化した後に、DTT で還元してから修飾した。

プローブは直径 287 nm の polystyrene ビーズを使用した。ビーズの表面はストレプトアビジンで修飾されており、ビオチン化した F<sub>1</sub> の $\gamma$ サブユニットに特異的に結合する。またカバーガラスへの非特異的なビーズの吸着を減らすために、チャンバー作成時につかう buffer には 2 mg/mL の BSA が含まれている。BSA が F<sub>1</sub> の吸着していないところに結合してガラスをコーティングすることで、余分なビーズの吸着を防ぐ。1 mM ATP の条件下では 1 つの視界に 3~4 個の F<sub>1</sub> の回転が確認できた。しかし低濃度 F<sub>1</sub> で 3 点ステップの観察をするためには、低濃度でもきれいに回転している粒子を探す必要がある。

### 3.3.2 回転電場法の測定系

図 3.3.2 は回転電場法の実験系である。F<sub>1</sub> は天井側の Ni-NTA ガラスに結合しており、床はクロムの電極が 4 つ蒸着された電極ガラスである。天井のカバーガラスと床はサランラップスペーサーで区切られており、チャンバー内の溶液の漏れを防ぐためにサランラップ表面にはグリスが塗ってある。グリスでくっついているためカバーガラスは指で押すことが可能で、測定の際には F<sub>1</sub> に結合したビーズが電極の中心に来るように動かした。チャンバーの左右は開いており、測定中は定期的に溶液を交換することで蒸発によるイオン強度の上昇と、ATP の消費による溶液組成の変化がないようにした。

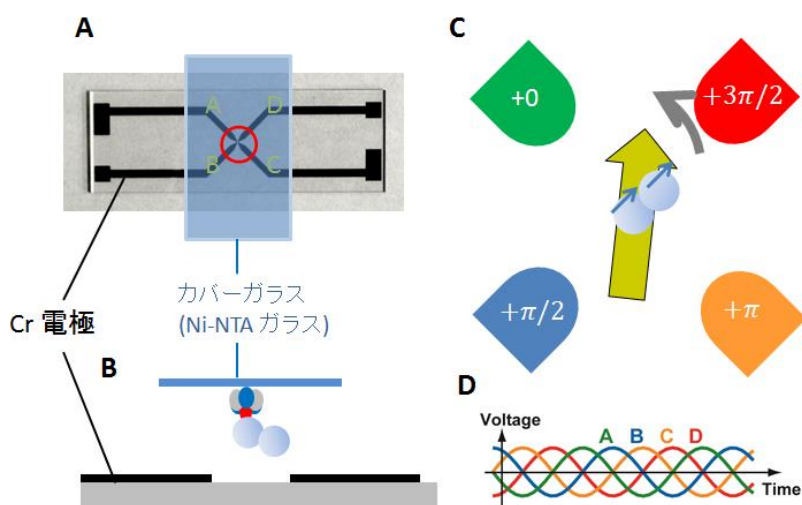


図 3.3.2 A : 床の電極ガラスには Cr の電極が蒸着されている。電極は黒い 4 つのラインで、ガラスの中心で集まっているところには電極間で隙間がある。カバーガラスは Ni-NTA でコーティングされており、ガラスの真ん中あたりに F<sub>1</sub> が結合している。B : F<sub>1</sub> はカバーガラスからぶら下がっており、電極ガラスとカバーガラスの間はサランラップスペーサーのため隙間がある (~15 μm)。C : 4 つの電極には  $\pi/2$  ずつ位相のずれた sin 波の電圧が加えられている (D)。周波数が高いと電場の向き (黄色) と誘電体であるビーズの誘起双極子モーメントの向き (水色) に位相差が生じ、位相差に依存した外部トルクがビーズに加わる。

### 3.3.3 一分子回転観察の手順

ビーズの吸着が完了したチャンバーを顕微鏡のステージにセットする。ビーズの吸着に使用した buffer はイオン強度が高く、電場を加えると大きな電流が流れ電極中心付近の溶液が蒸発してしまうので、まず測定用の buffer に溶液交換する。溶液交換後にブラウン回転している粒子に対して外部トルクを加えて粒子の平均回転速度をチェックする。このとき溶液交換が十分でなかったり、アンプと電極ガラスの電極が繋がっていないと外部トルクが加わらないのでブラウン回転する粒子の平均回転速度で確認した。

その後カバーガラスを指やピンセットで動かすことでステップ回転している  $F_1$  を探す。凝集したビーズや単量体のビーズが結合した  $F_1$  の回転観察ではステップ解析ができないので、二量体ビーズがつき楕円型のように見えている  $F_1$  を探す。回転がきれいな  $F_1$  が見つかったら電極中心の位置に合わせて測定を開始する。

測定では一定の外部トルクと周期変調する外部トルクを使用した。一定の外部トルクは大きさが時間変化しない外部トルクで、外部トルクの大きさに依存したステップ回転を観察するときを使う。周期変調する外部トルクは大きさが周波数  $f_0$  で変化する外部トルクで

$$N(t) = N_0 \sin(2\pi f_0 t) \quad (3.1)$$

で表せられる。周期トルクを加えると  $F_1$  の回転速度も周期的に変化する。加えたトルクに対する  $F_1$  の回転速度の応答を調べることで、各粒子ごとの外部トルクの校正が可能になる(次節参照)。外部トルクの校正をするには  $F_1$  の応答が線形応答になる高周波領域で調べる必要があるので、 $f_0$  の値は 400 Hz とした。

測定はまず外部トルク 0 の時の測定と、周期変化する外部トルクを加えたときの測定を行う。その後一定の外部トルクを加えたときの  $F_1$  のステップ回転を観察する。外部トルクを加えたり時間変化などで、 $F_1$  の回転が遅くなることがあるので定期的に外部トルクなしでの回転観察と、周期変化する外部トルクを加えたときの測定を行う。

### 3.3.4 外部トルクの校正

ビーズに加わる外部トルクの大きさは電場の振幅 ( $V^0$ ) と比例定数 ( $\alpha$ ) を使って

$$N_{\text{ext}} = \alpha \times V_0^2 \quad (3.2)$$

と表すことができる。 $\alpha$  の値は各ビーズごとに異なり、ビーズに加わる外部トルクの大きさを正確に求めるにはビーズごとに  $\alpha$  の値を求め外部トルクの大きさを校正する必要がある。外部トルクの校正には周期変化するトルクを加えたときの  $F_1$  の回転観察のデータを使う。式(3.1)の外部トルクを加えたときの  $F_1$  の回転速度は  $v(t)$  式(3.3)になる。

$$v(t) = \bar{v} + w_0 \sin(2\pi f_0 t + \varphi) \quad (3.3)$$

$\bar{v}$  は平均回転速度で、 $w_0$ ,  $\varphi$  は式(3.1)の外部トルクに応答する  $F_1$  の回転速度の変化の振幅と位相遅れである。 $w_0$ ,  $\varphi$  は  $v(t)$  のグラフを  $1/f_0$  秒ごとに切って重ねたアンサンブルに対して  $\sin$  関数でフィッティングすることで求めることができる。この  $w_0$ ,  $\varphi$  と  $\tilde{C}(f_0)$  から外部トルクの大きさを校正するための比例定数を求めることができる(式(3.4))。



$$\alpha = \frac{2k_B T w_0 \cos\varphi}{\tilde{C}(f_0) V_0^2} \quad (3.4)$$

$\tilde{C}(f)$ は周期的な外部トルクを加えていない F1 の  $v(t) - \bar{v}$  をフーリエ変換した時の実部である。式(3.4)は F1 の回転の高周波成分では揺動散逸意定理が成り立つことから求めることができる。今回は 400 Hz で周期変化する外部トルクを加えたときの  $w_0$ ,  $\varphi$  と  $\tilde{C}(f)$  の 400 Hz の値を使ってトルクの校正を行った(詳しくは 4.4.2 を参照)。

式(3.4)によるトルクの校正が正しく行われているか確認するために、回転ブラウン運動をしている粒子に加わる外部トルクの校正を 2 つの方法を使って行った。一つは上記の周期変化する外部トルクを使う方法で、もう一つは一定の外部トルクを加えた粒子の平均回転速度と、回転摩擦係数  $\Gamma$  の積から求める方法である。回転ブラウン粒子はリンカーで直接ガラスに吸着しているか、壊れた F1 に吸着している粒子で回転方向にランダムな運動をしている粒子である。一定の外部トルクを加えると一方向に回転運動をする。加わる力  $N_{\text{ext}}$  の式は

$$N_{\text{ext}} = 2\pi \times \Gamma \times v \quad (3.5)$$

で表わせる。 $V_0$  を上げていくと回転も速くなり、 $-V_0$  の時は逆方向に回転した(図 3.3.3 A)。回転速度は  $V_0$  の 2 乗に比例して増えた(図 3.3.3 B)。 $V_0$  と  $N_{\text{ext}}$  の間には

$$v = A \times V_0^2 \quad (3.6)$$

$$N_{\text{ext}} = \alpha \times V_0^2 \quad (3.7)$$

が成り立つ( $A$ ,  $\alpha$  は比例定数)。この結果から外部トルクが  $V_0^2$  に比例することが確かめられた。

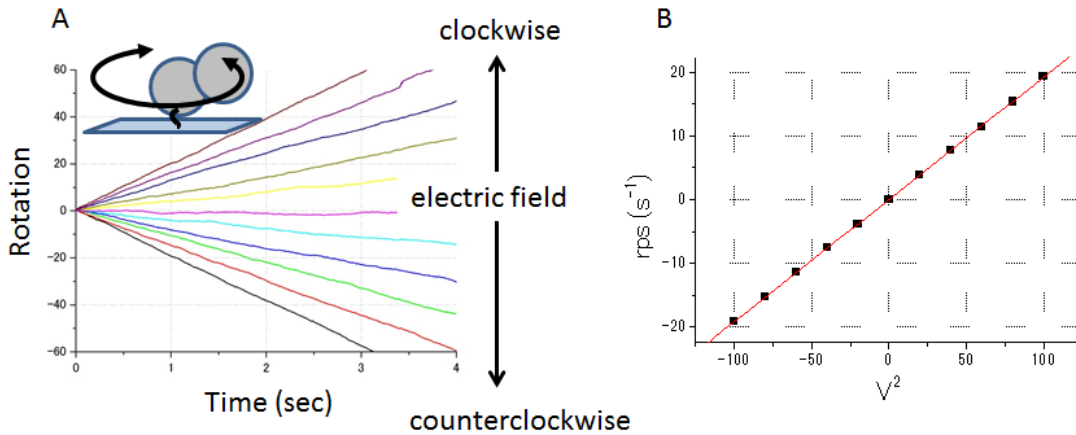


図 3.3.3 A : 回転ブラウン粒子に回転電場で外部トルクを加えたときのトラジェクトリ。電圧  $V_0 = 0$  の時はビーズは回転ブラウン運動をするので平均回転速度は 0 である(ピンクの実線)。 $V_0 > 0$  の時はビーズは時計回りの方向に一定速度で回転した。 $V_0 < 0$  の時は逆に反時計回りに回転した。B : A から求めた  $V_0^2$  と平均回転速度の関係。横軸は  $V_0^2$  に  $V_0$  の符号をかけた値であり、平均回転速度は時計回りの回転を + としている。

2 つの方法で構成したトルクの大きさを比較した(図 3.3.4)。直線フィットがほぼ傾き 1 に

なっていることから、回転ブラウン運動をする粒子に対しては式(3.4)の値を使った場合でも正しく校正できていることが確認できた。F<sub>1</sub> の場合は自発的な回転があるため、平均回転速度と回転摩擦係数の積から求める方法ではトルクの校正ができない。よって周期変化する外部トルクを使い、トルクの校正を行った。

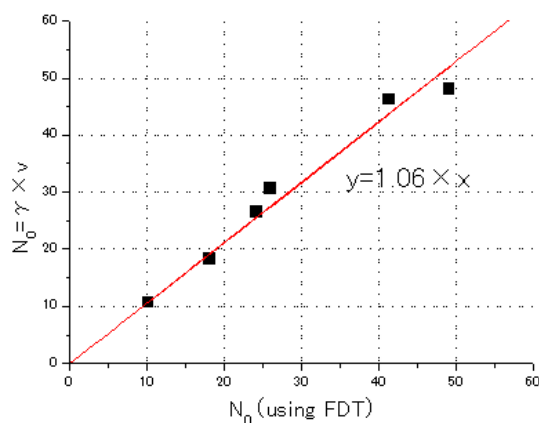


図 3.3.4 外部トルクを平均回転速度と摩擦係数の積から求める方法(縦軸)と周期変化するトルクを使う方法(横軸)の比較。実線は直線フィットの線である。

### 3.3.4 ステップ回転の解析法

ステップ解析には鳥谷部により作成された F<sub>1</sub>Tracker を使った。まず F<sub>1</sub>Tracker で回転観察で撮影した動画ファイルを画像解析して回転のトラジェクトリと角度ヒストグラムを求める。次にステップ解析を行いトラジェクトリを **step** と **dwell** の部分に分けた。dwell time は dwell のひとつ前のステップが終わった場所から次のステップが始まる場所までの時間の長さである。dwell は加水分解方向にステップする前の dwell(加水分解前の dwell) と合成方向にステップする前の dwell(合成前の dwell)に分けた。

### 3.3.5 dwell time の時定数の測定

dwell time のヒストグラムは一次反応の場合

$$p(t) = A \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3.8)$$

の形になる。ここで $\tau$ は停止時間の時定数で、加水分解前の dwell から求めた時定数( $\tau_h$ )、と合成前の dwell から求めた時定数( $\tau_s$ )を外力存在下で求めた。時定数は dwell time の長さの特徴づける値であり、一次反応のばあい $\bar{t} = \tau$ である。

### 3.3.6 Characterestic length の導出

式(1.8), 式(1.9)から Characterestic length の値を求めた。式(1, 10)より Characterestic length は dwell time の対数を縦軸にとり横軸を外部トルクによる F1 への仕事(W)にとった時のプロットの傾きから求められる。W の値は 120° の回転の間に外部トルクが F<sub>1</sub> に対して行う仕事の量なので、ATP 加水分解の自由エネルギー変化( $\Delta\mu$ )との関係も調べるために図 3.4.2~3.4.5 のプロットには $\Delta\mu$ の値のところにラインを入れた。

### 3.4 結果

#### 3.4.1 0.2 $\mu\text{M}$ ATP, 0.2 $\mu\text{M}$ ADP, 1000 $\mu\text{M}$ Pi での測定結果

加水分解方向に回転する  $F_1$  に外力を加えると停止時間の増加と共にステップ頻度は下がり、 $W > \Delta\mu$  で合成方向に回転した(図 3.4.1)。停止位置は  $120^\circ$  ずつ離れた3点で、ステップ回転をしていた。

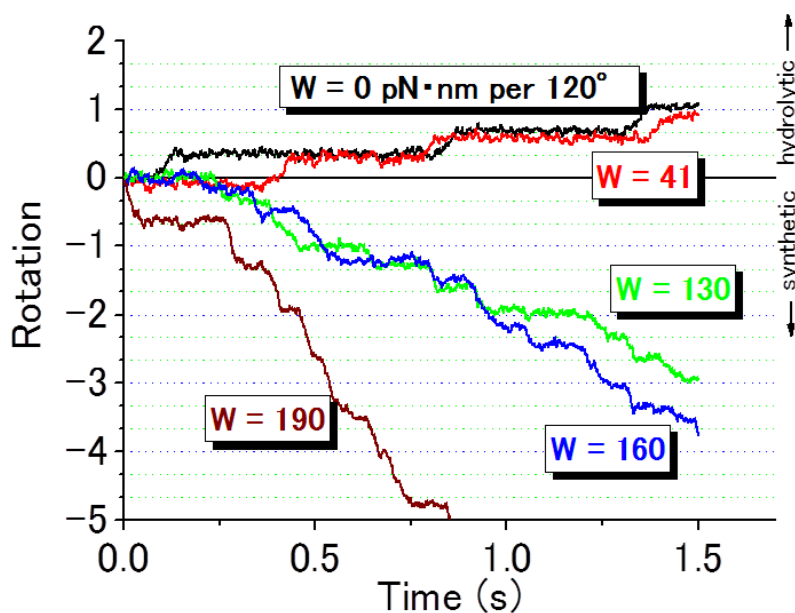


図 3.4.1 外力存在下の  $F_1$  の回転のトラジェクトリ。すべて同じ粒子のデータで三点ステップしていたもののみをまとめた。 $W$  の値は合成方向の外力の大きさを示す。一番強い外力を加えた後無負荷の回転速度を測定したところ、最初に無負荷のときの回転速度と同程度の速度に戻っていた。

合成方向の回転はスリップのようなステップが見られたので、それは除いて停止時間のヒストグラムを式(3.8)でフィッティングをした。加水分解方向の停止時間からは時定数( $\tau_h$ )が求められ、合成方向の停止時間からは時定数( $\tau_s$ )が求められた。 $\tau_h$ は外力の増加と共に大きくなり、 $\tau_s$ は外力の増加と共に減少した(図 3.4.2)。この傾向は鳥谷部の測定したデータの解析結果と同様である。この粒子のデータから Characteristic length を求めると、 $l_h = 13^\circ$  ,  $l_s = 26^\circ$  となった。

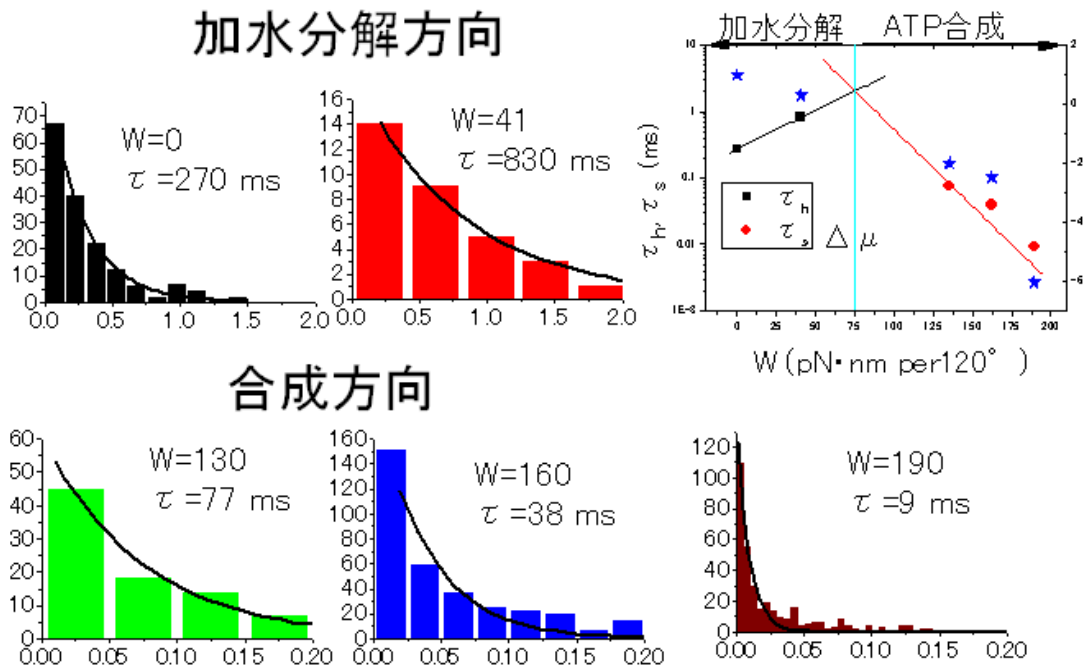


図 3.4.2 図 3.4.1 のトラジェクトリから求めた dwell time のヒストグラム。ヒストグラムの実線は時定数を求めるためのフィッティングである。右上のグラフはこの粒子の時定数の外力依存性。黒と赤は $\tau_h$ と $\tau_s$ へのフィッティング。青の点が平均回転速度で、黒と赤の点がそれぞれ $\tau_h$ と $\tau_s$ である。真ん中の水色の線は stall 状態の外力を表す。

図 3.4.3 A, B は同じ溶液条件下で外力存在下でのステップ回転の解析した 8 粒子のデータである。合成方向のステップ回転からは、極端に時定数が異なる粒子は無かった(図 3.4.3 A)。しかし加水分解方向のステップでは外力存在下のステップ解析ができた粒子が少なく、データのばらつきも大きい。図 3.4.5 と同じようにフィッティングすると $l_h = 13^\circ$  ,  $l_s = 8^\circ$  となった。

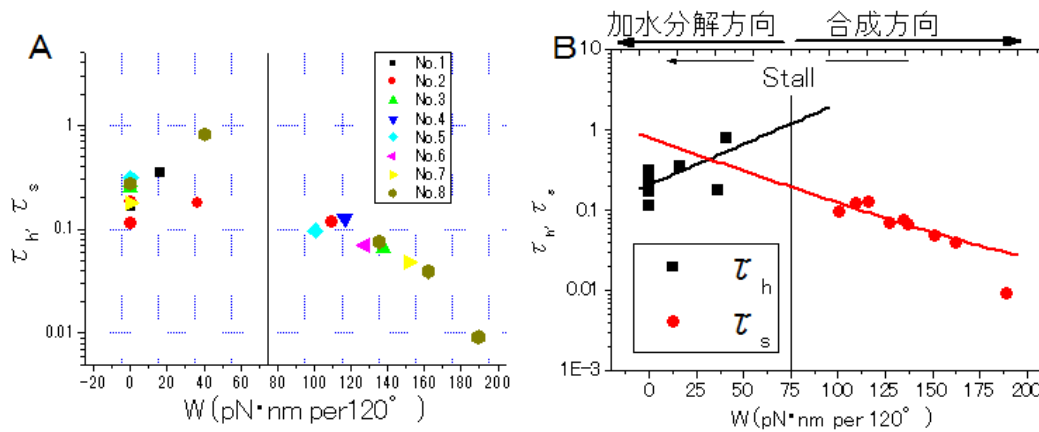


図 3.4.3 A : 8 粒子のデータのまとめで同じ粒子のデータを同じ色でまとめた。多くの外力で dwell time 解析できたのは図 3.4.1 の粒子のみでほとんどは外力 0 の時ともう一つの大きさの外力の時しか解析できなかった。B : 0.2  $\mu$ M ATP, 0.2  $\mu$ M ADP, 1 mM Pi での時定数の外力依存性。A のグラフを加水分解方向と合成方向で色を分けた。黒と赤の実線はそれぞれ Characteristic length を求めるためのフィッティングである。図 3.4.2 のデータと  $l_s$  の値が異なっていたのは  $W = 180$  pN · nm のデータの影響が大きかったためである。

### 3.4.2 0.6 uM ATP, 0.6 uM ADP, 1000 uM Pi での測定結果

図3.4.4は図3.5.4のデータと0.2 uM ATP, 0.2 uM ADP, 1 mM Piのデータの比較である。ATP結合待ちの時間である $\tau_h$ はATP濃度が0.2 uMから0.6 uMに三倍になることで短くなっている。また $\tau_h$ も同様に0.2 uMより0.6 uM ADPのデータの方が短い。つまり $\tau_h$ もADP濃度に依存した値であり、ADP結合待ちの時間を含んだ値であることが考えられる。

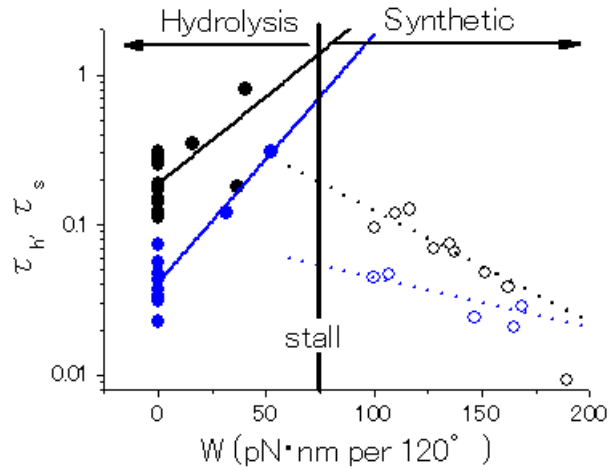


図 3.4.4 0.2 uM ATP=ADP の溶液条件での時定数(黒)と 0.6 uM ATP=ADP の溶液条件での時定数(青)の比較。Pi 濃度はどちらも 1 mM である。実線と点線はそれぞれ $\tau_h$ と $\tau_s$ のデータのフィッティング。

### 3.4.3 自由エネルギー変化を変えたとき

図 3.4.5 は $\Delta\mu$ が異なる溶液での測定結果である。ATP 濃度を 0.6  $\mu\text{M}$  に固定して ADP 濃度を 0.6 から 0.2  $\mu\text{M}$  に下げた場合と Pi を 1000 から 10  $\mu\text{M}$  に下げた場合で測定してみた。合成方向の停止時間が ADP 結合待ちだった場合は、Pi 濃度を下げても変化はなさそうに思える。しかし Pi 濃度を下げることは溶液の $\Delta\mu$ を下げることになる。 $\Delta\mu$ が下がれば  $F_1$  の出す最大トルクも下がるので、ストールの位置での釣り合いを考えると $\tau_s$ は Pi 濃度の低下も反映するはずである。結果としては ADP 濃度の低下は $\tau_s$ を長くしたが、Pi 濃度の低下はデータの定量性が悪く判断ができない。ADP 濃度を下げたデータの $\tau_s$ は 0.6  $\mu\text{M}$  のもの比べて長くなっていた。値は $[\text{ATP}]=[\text{ADP}]=0.2 \mu\text{M}$  の $\tau_s$ に近く、ADP と Pi 濃度のみが $\tau_s$ を決めることを示唆するデータである。一方 Pi を減らしたデータはデータポイントが少ないうえに十分な長さのステップ回転のデータが取れていない。データの傾向としてはと $\tau_h$ の外力依存性が $[\text{Pi}]=1000 \mu\text{M}$  のもの比べて小さくなる代わりに $\tau_s$ の依存性は大きくなっていくようにも見える。加水分解方向のとき Pi が影響を与えるとすれば Pi 解離による 40° サブステップを阻害する Pi の減少による効果だろう。また $\tau_s$ に関しては Pi 結合待ちの影響があげられる。どちらにしても現時点のデータでは詳しいことはわからない。

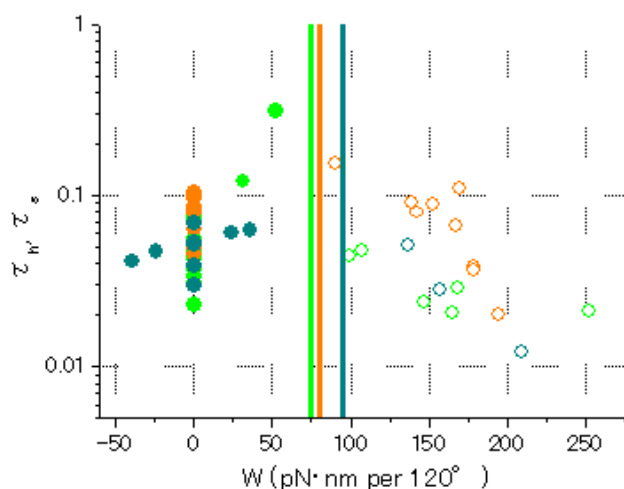


図 3.4.5  $\Delta\mu$ が異なる溶液での測定結果。黄緑の点と実線が 0.6  $\mu\text{M}$  ATP, 0.6  $\mu\text{M}$  ADP, 1 mM Pi での測定結果と $\Delta\mu$ で、オレンジの点と実線が 0.6  $\mu\text{M}$  ATP, 0.2  $\mu\text{M}$  ADP, 1 mM Pi での測定結果と $\Delta\mu$ 、暗い空色の点と実線が 0.6  $\mu\text{M}$  ATP, 0.6  $\mu\text{M}$  ADP, 10  $\mu\text{M}$  Pi での測定結果と $\Delta\mu$ である。黄緑の点は図 3.5.5.のデータと同じものである。残り 2 つのデータはステップ回転しているトラジェクトリの長さが短く、dwell time ヒストグラムからではなく dwell time の平均値から時定数を計算した。



### 3.5 考察

#### 3.5.1 Characteristic length の合計が $120^\circ$ にならなかった

これまでに3つの溶液条件で Characteristic length を測定した。ここの値は時定数のばらつきから誤差が大きいですが、共通して  $l_h + l_s < 120^\circ$  であった。この値は明らかに誤差ではなく、 $l_h$  が  $0^\circ$  から遷移状態までの長さで  $l_s$  が  $120^\circ$  から逆方向に遷移状態まで進んだ長さだとするとおかしな結果である(図 3.5.1)。

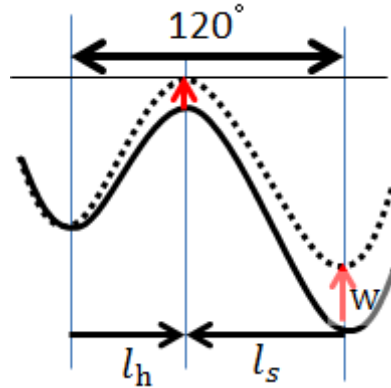


図 3.5.1  $120^\circ$  ステップする間にプローブが感じる自由エネルギーの地形。ATP 合成は ATP 加水分解の逆反応のなので遷移状態の位置は変わらない。

この結果は平衡状態では回転と反応がタイトカップリングしているという以前の結果とも矛盾する。先行研究よりストール状態では  $W = \Delta\mu$  が成り立っていた。また stall 状態では加水分解方向と合成方向の時定数が同じ値になることを考えると

$$\tau_h(W_{\text{stall}}) = \tau_s(W_{\text{stall}}) \quad (3.9)$$

より式(1.8), (1.9)を代入して

$$\begin{aligned} \tau_h(0) \times \exp\left(\frac{l_h W_{\text{stall}}}{120k_B T}\right) &= \tau_s(0) \times \exp\left(-\frac{l_s W_{\text{stall}}}{120k_B T}\right) \\ \frac{\tau_s(0)}{\tau_h(0)} &= \exp\left\{\left(\frac{l_s W_{\text{stall}}}{120k_B T}\right) + \left(\frac{l_h W_{\text{stall}}}{120k_B T}\right)\right\} \end{aligned} \quad (3.10)$$

時定数は反応速度の逆数なので式(3.10)は

$$\frac{k_h(0)}{k_s(0)} = \exp\left\{\frac{(l_h + l_s)W_{\text{stall}}}{120k_B T}\right\} \quad (3.11)$$

$$\frac{k_h(0)}{k_s(0)} = K_{eq}(0) = \exp\left(\frac{\Delta\mu}{k_B T}\right) \quad (3.12)$$

より ( $K_{eq}$  は平衡定数) 式(3.11)と(3.12)から

$$\Delta\mu = \frac{l_h + l_s}{120} \times W_{\text{stall}} \quad (3.13)$$

となる。ここで  $W_{\text{stall}} = \Delta\mu$  が成り立つには  $l_h + l_s$  が  $120^\circ$  になる必要がある。しかし測定値

から出したデータはどう見ても  $l_h + l_s < 120^\circ$  である。

### 3.5.2 先行研究で発表されたデータでも $l_h + l_s < 120^\circ$ である

最初に今回測定したデータが間違っている場合を考えた。図 3.5.2 は文献 10 で発表されたデータを解析して時定数の  $W$  依存性をプロットしたものである。文献 10 では外部トルクによる前後のステップ比は発表されていたが dwell time の外部トルク依存性について報告はされていなかったため今回と同じ方法で測定した。同様に Characteristic length の値を求めると  $l_h = 24^\circ, l_s = 31^\circ$  でいずれにせよ  $l_h + l_s < 120^\circ$  となった。本研究に比べ  $l_h, l_s$  の値が 2~3 倍あるが、ステップ解析できた  $W$  の範囲、ATP, ADP の濃度、 $\Delta\mu$  などが異なるため、値の差についてはっきりとした原因は不明である。

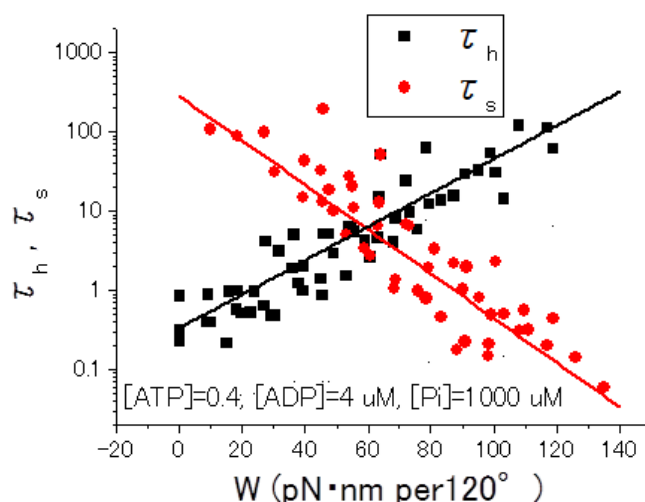


図 3.5.2 0.4 uM ATP, 4 uM ADP, 1000 uM Pi 条件の F1 の回転から dwell time の時定数の  $W$  依存性をプロットした。データは論文 5 で発表されたもの。ステップ数が多いところは dwell time ヒストグラムから時定数を求めているが、ステップ数が少ないところは平均時間から求めている。

次に文献 10 のデータも間違えている場合を考えた。簡単に次の 3 つのパターンを考えた。

- $l_h$  は合っているが  $l_s$  が間違っていて、本当は  $l_s = 110^\circ$  位の結果になるはずだった。
- $l_s$  は合っているが  $l_h$  が間違っていて、本当は  $l_h = 110^\circ$  位の結果になるはずだった。
- どちらも間違っていて、本当は  $l_h = l_s = 60^\circ$  位の結果になるはずだった。

この 3 つのパターンになった場合に時定数が外力に対してどのように変化するかを以下の条件で計算してみた。

- $\tau_h$  は式(1.8)からもとめる。
- 回転がストールするのは  $W = \Delta\mu$  の時で、このとき  $\tau_h(\Delta\mu) = \tau_s(\Delta\mu)$  が成り立つとする。  
 $W = \Delta\mu$  のとき式(1.8)と式(1.9)は

$$\tau_h(\Delta\mu) = \tau_h(0) \times \exp\left(\frac{\Delta\mu l_h}{120k_B T}\right) \quad (3.14)$$

$$\tau_s(\Delta\mu) = \tau_s(0) \times \exp\left(-\frac{\Delta\mu l_s}{120k_B T}\right) \quad (3.15)$$

$\tau_h(\Delta\mu) = \tau_s(\Delta\mu)$  より

$$\begin{aligned} \tau_s(0) &= \tau_h(0) \times \exp\left\{\left(\frac{\Delta\mu l_h}{120k_B T}\right) - \left(-\frac{\Delta\mu l_s}{120k_B T}\right)\right\} \\ &= \tau_h(0) \times \exp\left(\frac{\Delta\mu}{k_B T}\right) \end{aligned} \quad (3.16)$$

より

$$\tau_s(W) = \tau_h(0) \times \exp\left(\frac{\Delta\mu}{k_B T}\right) \times \exp\left(-\frac{\Delta\mu l_s}{120k_B T}\right) \quad (3.17)$$

3.  $\Delta\mu$ は鳥谷部の測定した溶液条件にあわせて  $16k_B T$  を使った。  
計算結果が図 3.5.3 である。

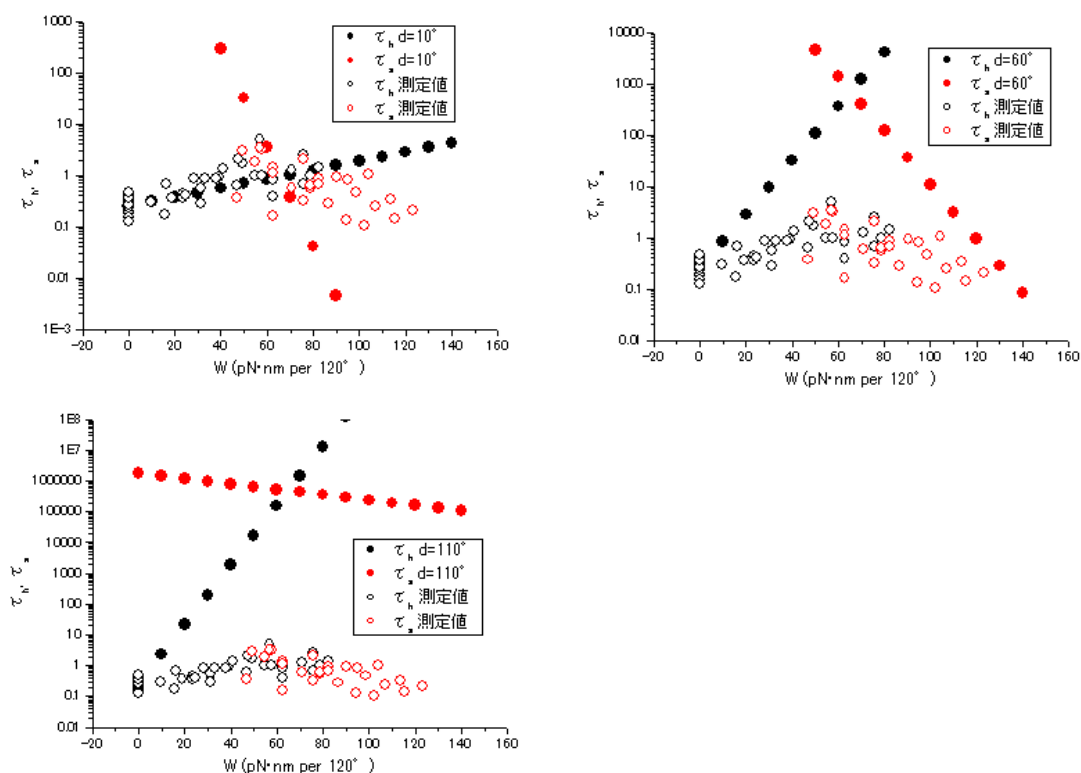


図 3.5.3 a, b, c の 3 つの場合の時定数の外力依存性。○が鳥谷部による実験の測定データであり、●が計算した値。

計算値と測定値には大きな差がある。とくに  $l_h, l_s$  の値が  $60^\circ$  から離れるほど時定数がおか

しい値になっている。 $l_h=10^\circ$  のとき $\tau_s$ が測定値に重なっているが、 $\tau_s$ は大きくずれている。これは $l$ の値が変化すると時定数が指数関数的な変化をしてしまうためである。今回外力を変えてもステップ解析ができたのは、 $l_h$ と $l_s$ の値が小さいためであり、この値が少しでも大きくなると多少の外力の変化で時定数が大幅に変わり測定中にほとんどステップしないか、停止時間が短すぎてどんなにヌクレオチド濃度を下げても連続的な回転になってしまう。ここまでの結果から Characteristic length の値が外力に依存しないという仮定が間違っていると考えた。

### 3.5.3 Characteristic length が外力に依存する可能性

Characteristic length の値が外部トルクによって変化する場合はビーズの感じるポテンシャルの形まで考慮する必要がある。1番簡単な例として $l_h$ が $W$ を変数とする一次関数

$$l_h = aW + b \quad (3.18)$$

で表せるとする。この場合加水分解方向のステップ前の dwell time の長さを決める活性化エネルギー $\Delta E_h$ は $l_h$ と $W$ の関数になり

$$\Delta E_h(l_h, W) = E_h(l_h, 0) - E_h(0, 0) + \frac{aW + b}{120} \times W \quad (3.19)$$

となる。 $E_h(l_h, 0)$ と $E_h(0, 0)$ は角度 $l_h$ と dwell の角度での自由エネルギー変化を表す。右辺の第3項は外部トルクによる $l_h$ の位置の自由エネルギーの上昇量である。 $E_h(l_h, 0)$ の値はポテンシャルの形を知らないと求めることができないので、dwell time の長さだけでなく F1 の運動をより詳細に調べる必要がある。

### 3.5.4 回転のトラジェクトリからポテンシャルの形を見積もる

プローブの感じるポテンシャルの形は、 $F_1$  のトラジェクトリから見積もることができる<sup>60</sup>。  
 $120^\circ$  のステップ回転をする  $F_1$  の回転を 3 つの化学状態間の遷移と考える(図 3.5.4)。

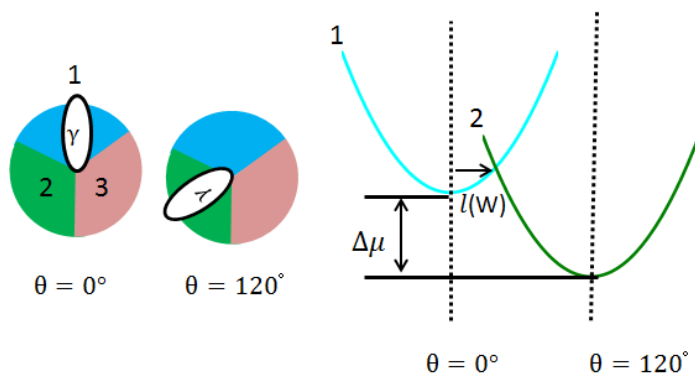


図 3.5.4  $120^\circ$  のステップ回転をする  $F_1$  は 3 つの化学状態(1, 2, 3)の間を遷移する。各化学状態のポテンシャルの形は同じ形でポテンシャルの底の高さが  $\Delta\mu$  だけずれている。各ポテンシャルは  $120^\circ$  回転する間の 1 サイクルの反応を含んでいる。

文献 60 では各化学状態のポテンシャルの形と、ポテンシャル間の遷移の位置を  $F_1$  の回転のトラジェクトリから求めた。ポテンシャルの形は図 3.5.5 のように端が切り立った形をしており、遷移は隣り合うポテンシャルの交点で起こっていた。また遷移角度は停止角度の近くで起こっていることが明らかになった。

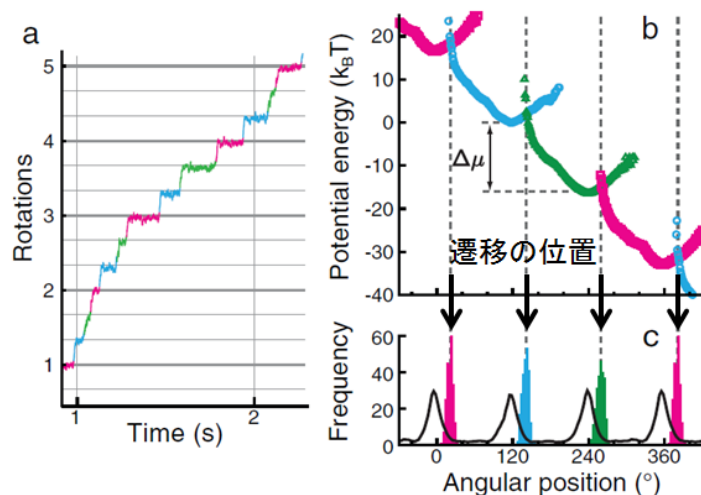


図 3.5.5  $F_1$  の回転トラジェクトリ(外力なし)からのポテンシャルの推定。1 つのステップは 1 つの化学状態に対応するとして、3 つの化学状態に切り分けて状態間の遷移の位置を解析的に求めた。a : 化学状態の切り分け。b : トラジェクトリから求めたポテンシャル。c : ポテンシャル間の遷移位置(色のついたヒストグラム)と角度ヒストグラム(黒の実線)。文献 60 より改変

### 3.5.4 計算による予想

遷移の位置がポテンシャルの交点だとした時に、 $l_h$ の値がどのように変化するか予測した。外部トルクを加えた時に各ポテンシャルの形がどのように変化するか明らかになっていないので、ポテンシャルの形を調和ポテンシャルと仮定した。ポテンシャル 1 とポテンシャル 2 の式はプローブの角度 $\theta$ を使って

$$U_1(\theta) = \alpha\theta^2 + \frac{W\theta}{120}, \quad U_2(\theta) = \alpha(\theta - 120)^2 - \Delta\mu + \frac{W\theta}{120} \quad (3.20)$$

とした。2つのポテンシャルの底の位置は横方向に $120^\circ$ 、縦方向に $\Delta\mu$ だけ離れている。右辺の最後の項は合成方向の外部トルクによるポテンシャルの変化を表す。 $W$ の値を大きくすると $l_h$ の値が増えていき $W = 2\Delta\mu$ の所では $l_h = 110^\circ$ ほどになっていた(図 3.5.6 A)。また交点位置とポテンシャルの底の自由エネルギーの差から求めた活性化エネルギーの値も計算した。図の活性化エネルギーの値を使って時定数を計算して測定値と比較した。計算から求めた時定数は $W = \Delta\mu$ から遠いところでは変化は小さく、 $W = \Delta\mu$ の所で急激に大きくなった。これは活性化エネルギーの変化と対応している。

今回の計算は調和ポテンシャルと仮定した場合である。実際の $F_1$ の作るポテンシャルは異なりかなり荒い近似である。しかし図 3.5.6 Bのように測定値と重ねてみると明らかに実験値から外れているようには見えない。実際に Characteristic length が変化しているのを確かめるためには外力存在下で測定した回転のトラジェクトリから文献 60 と同様の方法でポテンシャルの遷移の位置を求める必要がある。しかし dwell time 解析に使ったデータのフレームレートはポテンシャル推定の解析に必要なフレームレートを満たしていないので、改めて測定する必要あり今後の課題である。

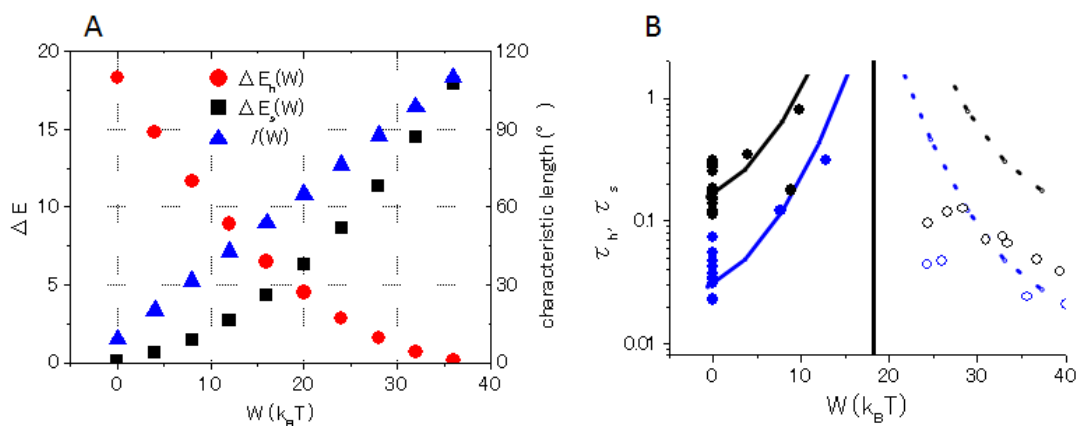


図 111 Characteristic length が変化するときの、遷移角度と活性化エネルギーの見積もり。遷移角度は式(3.20)の 2 つのポテンシャルの交点である。求めた活性化エネルギーから dwell time の時定数の外力依存性を測定値に合うように目測で合わせた。実際の各化学状態のポテンシャルは調和ポテンシャルではないので、実際にこのように Characteristic length が変化しているかは不明である。定性的に加水分解側は再現できていると思われる。

# 第四章

## 測定条件の設定

## 4.1 蛍光測定の設定

### 4.1.1 測定に使用したヌクレオチドと測定用 buffer の調製

蛍光測定で buffer について注意すべきは次の 2 点である。

1 つ目は実験中に泡が発生しないようにすることである。測定中にセル内に泡が発生すると蛍光強度に大きなノイズが出る。このノイズはほおっておいても勝手に消えることは無いと思った方がよい。泡が発生してしまった場合はセルを一度測定器の中から取り出して、セルを指ではじくなどして泡を取り除く必要がある。また buffer をあらかじめ脱気しておくことで泡の発生はかなり抑えられる。またタンパク質の投入時は一度セルを取り出して、ピペットマンのプッシュボタンを一度だけ強く押し込むのがよい。一般にピペットマンで溶液を投入する時には、プッシュボタンを何回もおすピペッティングと呼ばれる方法のように指導されるが、蛍光測定でのトリプトファン変異体投入の時には一度だけのプッシュが効果的であった。なぜピペッティングが良くないのかは詳しく調べていないが、ピペッティングする方法だと、トリプトファン変異体投入による蛍光強度の上昇量が安定しなかった。ただしヌクレオチドの投入はピペッティングの方がよい。

2 つ目は溶液に含まれる不純物により沈殿が発生してしまう事である。今回の測定でヌクレオチドを投入するときはヌクレオチドとマグネシウム濃度が 1:1 の溶液を 100 倍希釈になるように投入するが、高濃度ヌクレオチドとマグネシウムの溶液では白い沈殿が発生しているときがある。経験的に 10 mM 以上のヌクレオチドに同じ濃度のマグネシウムが含まれていると沈殿が確認できた。そのため高濃度ヌクレオチドでの測定ではマグネシウムとを投入後にヌクレオチドを投入した。なお蛍光測定のセル内の終濃度では沈殿が発生する濃度より下で測定している。

蛍光測定用 buffer の組成は蛍光測定用 buffer: 50 mM MPOS-K, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH=7.0 である。MOPS は同仁科学研究所のもの（製品番号：343-01805）を使っている。MOPS は pKa=7.2 で pH6.5~7.9 の buffer を作るのに適している。保管の際には KOH で pH 7.0 に合わせてから 1 M になるよう調製して、冷蔵庫で保存した(4℃、プラスチック容器中)。KOH はナカライテスク株式会社から出ているもの（製品番号：28617-35）である。KCl はナカライテスク株式会社の（製品番号：28514-75）を溶かしたものを使っている。保管の際には 1 M に調製して、冷蔵庫で保存した(4℃、プラスチック容器中)。MgCl<sub>2</sub> ナカライテスク株式会社の（製品番号：20909-55）を溶かしたものを使っている。保管の際には 1 M の濃度で冷蔵庫の中（4℃保存）に保管してある(容器はプラスチック容器)。蛍光測定用 buffer を作る時には、これらの保管された溶液を適当な濃度になるように milliQ で薄めたあとに、KOH(MOPS の pH を調整するのに使用したものと同じもの)で pH=7.0 になるように pH をあわせる。その後蛍光測定用 buffer の濃度にして、1 時間弱脱気をしてから実験に使用する。



#### 4.1.2 $\beta$ 単体と $\alpha_3\beta_3\gamma$ での測定手順の違い

$\beta$ (Y341W)と $\beta$ (Y341W, E190Q)への結合の測定では

1. 測定に使用する buffer は 10 分前から測定温度の water bath で温度を合わせておく。
2. スターリングバーを milli-Q で洗いセルの中に入れる。
3. セルに温度を合わせておいた buffer を 1.3 mL 入れる。
4. 時間変化測定で buffer のみの蛍光強度を、時間変化測定で 30 sec 測定する。
5. buffer のみの蛍光スペクトルを測定する。
6. セルを蛍光測定器から出して $F_1$ を投入する。
7.  $F_1$ 投入して約 10 sec 後に buffer+ $F_1$ の蛍光スペクトルを測定する。
8.  $F_1$ 投入後 1 min 後に時間変化測定を開始する。
9. 時間変化測定で 50 sec の時点で一回目のヌクレオチドを蛍光測定器の蓋に開いた穴から投入する。
10. 100 sec ごとにヌクレオチドを投入する。
11. 時間変化測定終了後 buffer+ $F_1$ +ヌクレオチドの蛍光スペクトルを測定する。
12. 蛍光スペクトル測定後セル内の温度を熱電対温度計で測定する。
13. 測定が終わったセルはスターリングバーを取り出して、ライポン(液体洗剤)、水、milli-Q の順番で洗う。

の手順で測定した。測定した蛍光スペクトルと、蛍光強度の時間変化は図 4.2.1 である。 $\beta$ 単体への結合の測定では一回の蛍光強度の時間変化測定で、ヌクレオチド濃度と消光率の関係を求めることができるので測定時間が短くなる。

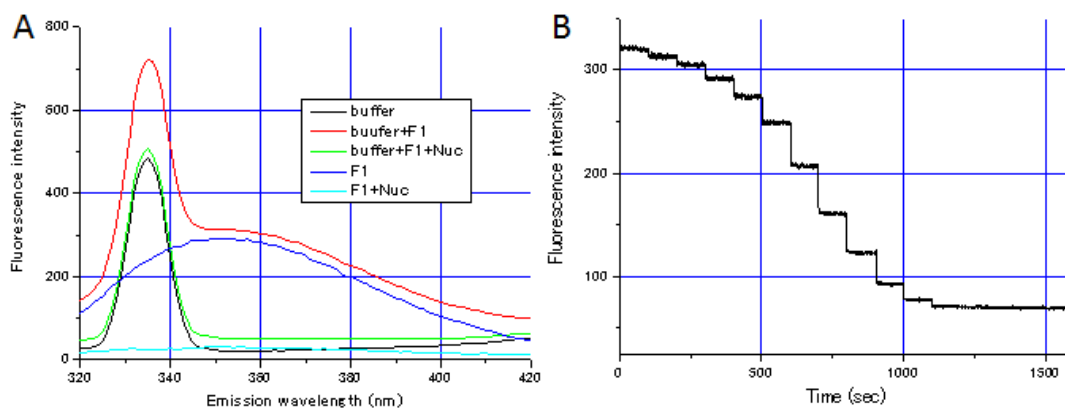


図 4.1.1 25°Cでの $\beta$ (Y341W)への ATP 結合の測定。A が蛍光スペクトルで、B が蛍光強度の時間変化測定。

一方 $\alpha_3\beta$ (Y341W) $_3\gamma$ と $\alpha_3\beta$ (Y341W, E190Q) $_3\gamma$ への結合の測定では、単体の時と同じようにすると、長時間の測定(おおよそ 500 sec 以上)で原因不明の蛍光強度の上昇が見られたので、次の手順で測定した。

1. 測定に使用する buffer は 10 分から測定温度の water bath で温度を合わせておく。
2. スターリングバーを milli-Q で洗いセルの中に入れる。
3. セルに温度を合わせておいた buffer を 1.3 mL 入れる (MgCl<sub>2</sub> とヌクレオチドを別に保管する濃度の測定の時には、この時に MgCl<sub>2</sub> を入れる)。
4. 時間変化測定で buffer のみの蛍光強度を、時間変化測定で 30 sec 測定する。
5. buffer のみの蛍光スペクトルを測定する。
6. セルを蛍光測定器から出して F<sub>1</sub> を投入する。
7. F<sub>1</sub> 投入して約 10 sec 後に buffer+F<sub>1</sub> の蛍光スペクトルを測定する。
8. F<sub>1</sub> 投入後 1 min 後に時間変化測定を開始する(測定時間 150 sec)。
9. 時間変化測定で 50 sec の時点でヌクレオチドを蛍光測定器の蓋に開いた穴から投入する。
10. 時間変化測定終了後 buffer+F<sub>1</sub>+ヌクレオチドの蛍光スペクトルを測定する。
11. 蛍光スペクトル測定後セル内の温度を熱電対温度計で測定する。
12. 測定が終わったセルはスターリングバーを取り出して、ライポン(液体洗剤)、水、milli-Q の順番で洗う。

こちらの手順では図 4.2.2 のような蛍光スペクトルと、蛍光強度の時間変化測定のグラフが得られる。こちらの方法は時間がかかるが(慣れれば単体の方法の 3~4 倍くらい)、投入したヌクレオチド濃度が上がるにつれトリプトファン(Trp)の蛍光のピークが小さくなっていくのが確認できる。

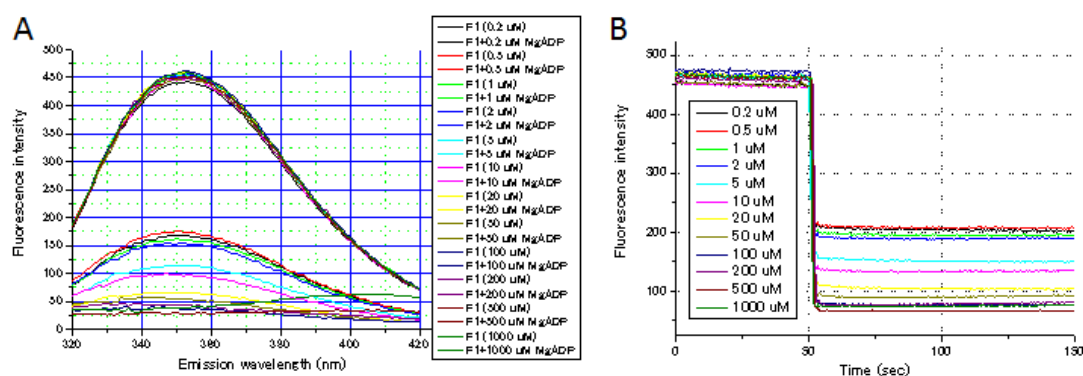


図 4.1.2 25°Cでの $\alpha_3\beta(Y341W)_{37}$ への ADP 結合の測定。A が蛍光スペクトルで、B が蛍光強度の時間変化測定。蛍光スペクトルは各 ADP 濃度での ADP 投入前後の蛍光スペクトルで、buffer のスペクトルを引いたもの。A, B の実線の色は各 ADP 濃度での測定に対応している。

#### 4.1.3 使用する蛍光測定器と機器の設定

測定には蛍光分光器 (JASCO FP-6500) を使用した。本研究では一部の条件を除き励起光を 300 nm で行い蛍光強度の時間変化を測定するときは 345 nm の蛍光強度を測定してい

る。また蛍光のスペクトルは 320~420 nm の波長の蛍光強度から求めている。その他の詳しい測定機器の設定は図 4.2.3 にある。



図 4.1.3 蛍光分光器の設定。左が蛍光スペクトルを測定するときの設定画面で、右が蛍光強度の時間変化を測定するときの設定である。

ただし GTP, GDP の時は励起波長を 312 nm にしてスペクトル測定は 325~425 nm の範囲で行なっている。GTP, GDP の時だけ励起波長が 312 nm になっているのは、G(D,T)P の吸収スペクトルによる蛍光への影響のためである(図 4.2.4 A)。GTP, GDP は 300 nm の励起光を吸収してしまうので、トリプトファン(Trp)の蛍光の測定に影響が出てしまう(図 4.2.4 B) そのため GTP, GDP の吸収がない 312 nm で測定することにした。また 312 nm の励起ではトリプトファン(Trp)の蛍光が弱かったので GTP, GDP の時は他のヌクレオチドの結合の測定と比較して 6 倍のタンパク濃度で測定した。

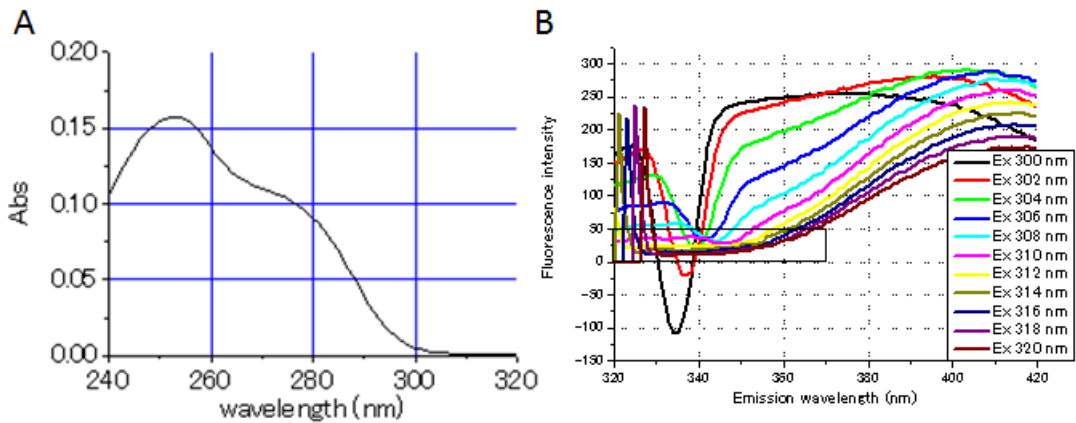


図 4.1.4 A : 10 uM GTP の吸収スペクトル。B : 励起光 300~320 nm で 4.3 mM GDP の溶液の蛍光スペクトル。

## 4.2 回転電場法による外部トルクの校正

### 4.2.1 回転ブラウン粒子の回転速度から求める方法

$$N_{ext} = 2\pi \times \Gamma \times \bar{v} = \alpha \times V^0 \quad (8.1)$$

より回転摩擦係数 $\Gamma$ の粒子を $V^0$ の回転電場で回転させた時の $\bar{v}$ から比例係数 $\alpha$ を求められる。この値は溶液条件、チャンバーの厚さ、ビーズの体積などで決まるので同じ溶液の、同じように2量体ビーズが結合した $F_1$ にも使う事が出来る。回転摩擦係数 $\Gamma$ は拡散係数 $D$ から

$$\Gamma = \frac{T}{D} \quad (8.2)$$

の Einstein's relation から求まる。 $T$ は絶対温度である。 $D$ は回転角度の自己相関関数から

$$2D = \langle (r(t + \Delta t) - r(t))^2 \rangle_{\Delta t} \quad (8.3)$$

で求めることができる。ただし低周波成分は、ガラスとの引っ掛かりなどが影響するので100 Hz以上の高周波成分から $D$ を求めた。

### 4.2.2 揺動散逸定理を使った方法

粒子の運動のある周波数成分が平衡状態である時に外力の変調がある場合に

$$\tilde{C}(f) = 2k_B T \tilde{R}'(f) \quad (8.4)$$

が成り立つ。この式を利用すると外部トルクを高周波で周期変調させると(図 4.2.1 A)、変調周波数 $f$ でアンサンブル平均をとることで、式(8.1)の比例係数 $\alpha$ を求められる。

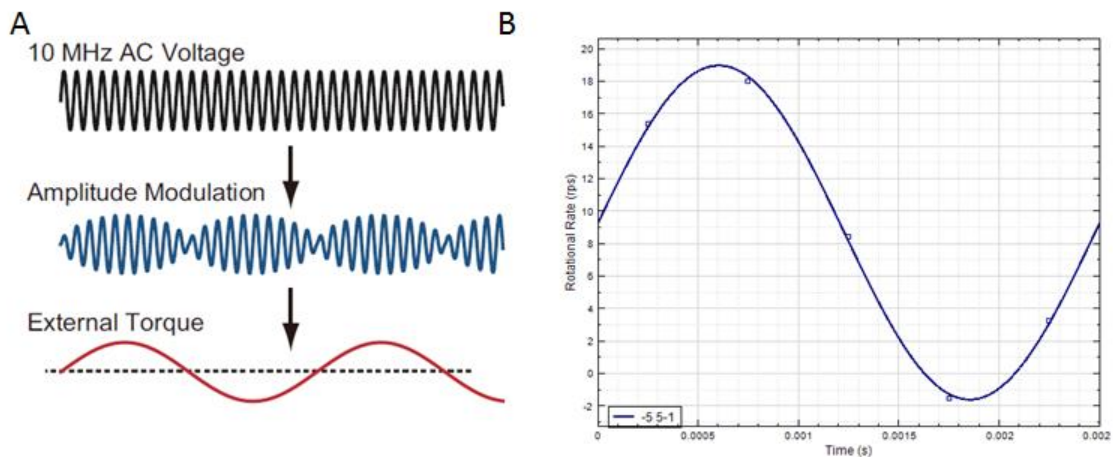


図 4.2.1 A : 周期変化する外部トルクの作り方。10 MHz の電圧を電極に加えることで一定外力を作るが、この高周波の電圧の振幅を周波数 $f$ で変化させることで、周波数 $f$ で変化する外部トルクを作ることができる。B : A の外部トルクを加えた粒子回転速度の周波数 $f$ のアンサンブル平均。縦軸は時刻 $t$ での平均回転速度からのずれである。Aは Toyabe epl 2012 から引用

式(8.4)が成り立つとき回転方向のビーズの速度を

$$v(t) = v_0 + w(t) \quad (8.5)$$

とする。 $v_0$ は外力のない時での速度で、 $w(t)$ は外力によるもの

ここで式(8.5)の両辺のアンサンブル平均をとると

$$\langle w(t) \rangle = v_0 + \int_{-\infty}^t ds R(t-s)N(s) \quad (8.6)$$

ここに  $\sin$  型の外力  $\langle w(t) \rangle = w_0 \sin(2\pi ft + \varphi)$ ,  $N(s) = N_0 \sin(2\pi fs)$  を代入すると

$$w_0 \sin(2\pi ft + \varphi) = \int_{-\infty}^t ds R(t-s)N_0 \sin(2\pi fs) \quad (8.7)$$

また  $w_0 \cos(2\pi ft + \varphi) = \int_{-\infty}^t ds R(t-s)N_0 \cos(2\pi fs)$  (8.8)も成り立つ.

$$\text{式(8.8)} + i \times \text{式(8.7)} \text{ から } w_0 e^{i\varphi} \exp(i2\pi ft) = N_0 \int_{-\infty}^t ds R(t-s) \exp(i2\pi fs) \quad (8.9)$$

ここで  $t-s = t'$ ,  $ds = -dt'$ , 積分範囲は $\infty$ から  $0$  となる( $R(\infty) = 0$  なので).

$$N_0 \int_{\infty}^0 (-dt') R(t') \exp(i2\pi f(t-t')) = N_0 \exp(i2\pi ft) \int_0^{\infty} dt' R(t') \exp(-i2\pi ft') \quad (8.10)$$

ここで  $\tilde{R}(f) = \int_{-\infty}^{\infty} dt \exp(i2\pi ft) R(t)$  とすると

$$\int_0^{\infty} dt' R(t') \exp(-i2\pi ft') = \int_{-\infty}^{\infty} dt' R(t') \exp(-i2\pi ft') \quad (8.11)$$

( $R(t' < 0) = 0$  なので)

式(8.11) =  $\tilde{R}(-f)$  これを式(8.9)に代入すると

$$w_0 e^{i\varphi} \exp(i2\pi ft) = N_0 \exp(i2\pi ft) \tilde{R}(-f) \quad (8.12)$$

$$\tilde{R}(-f) = \frac{w_0}{N_0} e^{i\varphi} \quad \text{実部をとると}$$

$$\tilde{R}'(-f) = \frac{w_0}{N_0} \cos\varphi(-f)$$

$$= \frac{w_0}{N_0} \cos\varphi(f) = \tilde{R}'(f) \quad N_0 = \alpha V_0^2 \text{ を代入して}$$

$$\tilde{R}'(f) = \frac{w_0}{\alpha V_0^2} \cos\varphi$$

$$\tilde{C}(f) = \frac{2k_B T w_0}{\alpha V_0^2} \cos\varphi$$

$$\alpha = \frac{2k_B T w_0 \cos\varphi}{\tilde{C}(f) V_0^2} \quad (8.13)$$

## 参考文献

1. Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T. ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(9):669-77. doi:10.1038/35089509.
2. Noji nature vol.386 1997.pdf.
3. Yasuda R, Noji H. F<sub>1</sub>-ATPase Is a Highly Efficient Molecular Motor that Rotates with Discrete 120 ° Steps. 1998;93:1117-1124.
4. Adachi K, Oiwa K, Nishizaka T, et al. Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell* 2007;130(2):309-21. doi:10.1016/j.cell.2007.05.020.
5. Boyer D. A perspective for ATP. 1989:2164-2178.
6. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994;370(6491):621-8. doi:10.1038/370621a0.
7. Yagi H, Kajiwara N, Iwabuchi T, Izumi K, Yoshida M, Akutsu H. Stepwise propagation of the ATP-induced conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase beta subunit revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 2009;284(4):2374-82. doi:10.1074/jbc.M808212200.
8. Yagi H, Kajiwara N, Tanaka H, et al. Structures of the thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F<sub>1</sub>. 2007;104(27):11233-11238.
9. Watanabe-Nakayama T, Toyabe S, Kudo S, Sugiyama S, Yoshida M, Muneyuki E. Effect of external torque on the ATP-driven rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;366(4):951-7. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.049.
10. Toyabe S, Watanabe-Nakayama T, Okamoto T, Kudo S, Muneyuki E. Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(44):17951-6. doi:10.1073/pnas.1106787108.

11. Rondelez Y, Tresset G, Nakashima T. Highly coupled ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase single molecules. 2005;433(February):773-777. doi:10.1038/nature03315. Published.
12. MITCHELL P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 1961;191(4784):144-148. doi:10.1038/191144a0.
13. Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 1997;66:717-49. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
14. Boyer PD. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1993;1140(3):215-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417777>. Accessed January 24, 2015.
15. Jiang W, Hermolin J, Fillingame RH. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(9):4966-71. doi:10.1073/pnas.081424898.
16. Stock D. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science (80- )*. 1999;286(5445):1700-1705. doi:10.1126/science.286.5445.1700.
17. Mitome N, Suzuki T, Hayashi S, Yoshida M. Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H<sup>+</sup>/ATP ratio and permissive elastic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(33):12159-64. doi:10.1073/pnas.0403545101.
18. Tsunoda SP, Aggeler R, Yoshida M, Capaldi RA. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase. 2000.
19. Börsch M, Diez M, Zimmermann B, Reuter R, Gräber P. Stepwise rotation of the  $\gamma$ -subunit of EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *FEBS Lett.* 2002;527(1-3):147-152. doi:10.1016/S0014-5793(02)03198-8.
20. Hutcheon ML, Duncan TM, Ngai H, Cross RL. Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit a and the c oligomer in the F<sub>o</sub> sector of Escherichia coli ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(15):8519-24. doi:10.1073/pnas.151236798.

21. Suzuki T, Ueno H, Mitome N, Suzuki J, Yoshida M. F<sub>0</sub> of ATP synthase is a rotary proton channel. Obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring. *J. Biol. Chem.* 2002;277(15):13281-5. doi:10.1074/jbc.M111210200.
22. Dimroth P, von Ballmoos C, Meier T. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO Rep.* 2006;7(3):276-82. doi:10.1038/sj.embor.7400646.
23. Kagawa Y. A Highly Stable Adenosine Triphosphatase Bacterium from a Thermophilic. 1975;250(19):7910-7916.
24. Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AGW, Walker JE. The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. 2000;7(11):1055-1061.
25. Duncan TM, Bulygin V V, Zhou Y, Hutcheon ML, Cross RL. Rotation of subunits during catalysis by Escherichia coli F<sub>1</sub>-ATPase. 1995;92(November):10964-10968.
26. Kato-Yamada Y, Noji H, Yasuda R, Kinosita K, Yoshida M. Direct Observation of the Rotation of Subunit in F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1998;273(31):19375-19377. doi:10.1074/jbc.273.31.19375.
27. Soga N, Kinosita K, Yoshida M, Suzuki T. Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J. Biol. Chem.* 2012;287(12):9633-9. doi:10.1074/jbc.M111.335356.
28. Sambongi Y. Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): Direct Observation. *Science (80- )*. 1999;286(5445):1722-1724. doi:10.1126/science.286.5445.1722.
29. Tsunoda SP, Aggeler R, Noji H, Kinosita K, Yoshida M, Capaldi RA. Observations of rotation within the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase : deciding between rotation of the F<sub>0</sub> c subunit ring and artifact. 2000;470:244-248.
30. Hirono-Hara Y, Ishizuka K, Kinosita K, Yoshida M, Noji H. Activation of pausing F<sub>1</sub> motor by external force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(12):4288-93. doi:10.1073/pnas.0406486102.



31. Watanabe R, Iino R, Noji H. Phosphate release in F<sub>1</sub>-ATPase catalytic cycle follows ADP release. *Nat. Chem. Biol.* 2010;6(11):814-20. doi:10.1038/nchembio.443.
32. Noji H, Bald D, Yasuda R, Itoh H, Yoshida M, Kinosita K. Purine but not pyrimidine nucleotides support rotation of F(1)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 2001;276(27):25480-6. doi:10.1074/jbc.M102200200.
33. Ariga T, Muneyuki E, Yoshida M. F<sub>1</sub>-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14(9):841-6. doi:10.1038/nsmb1296.
34. Hirono-hara Y, Noji H, Nishiura M, et al. Pause and rotation of F<sub>1</sub>-ATPase during catalysis. 2001;109(15).
35. Mitome N, Ono S, Suzuki T, Shimabukuro K, Muneyuki E, Yoshida M. The presence of phosphate at a catalytic site suppresses the formation of the MgADP-inhibited form of F<sub>1</sub>-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(1):53-60. doi:10.1046/j.0014-2956.2002.02623.x.
36. Ahmad Z, Senior AE. Involvement of ATP synthase residues alphaArg-376, betaArg-182, and betaLys-155 in Pi binding. *FEBS Lett.* 2005;579(2):523-8. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.022.
37. Kohori A, Chiwata R, Hossain MD, et al. Torque generation in F<sub>1</sub>-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophys. J.* 2011;101(1):188-95. doi:10.1016/j.bpj.2011.05.008.
38. Chiwata R, Kohori A, Kawakami T, et al. None of the rotor residues of F<sub>1</sub>-ATPase are essential for torque generation. *Biophys. J.* 2014;106(10):2166-74. doi:10.1016/j.bpj.2014.04.013.
39. Uchihashi T, Iino R, Ando T, Noji H. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F<sub>1</sub>-ATPase. *Science* 2011;333(6043):755-8. doi:10.1126/science.1205510.
40. Tanigawara M, Tabata K V, Ito Y, et al. Role of the DELSEED loop in torque transmission of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophys. J.* 2012;103(5):970-8. doi:10.1016/j.bpj.2012.06.054.

41. Boyer PD, Cross RL, Momsen W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973;70(10):2837-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 6, 2015.
42. Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Jr KK, Itoh H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. 2001;410(April).
43. Shimabukuro K, Yasuda R, Muneyuki E, Hara KY, Kinoshita K, Yoshida M. Catalysis and rotation of F<sub>1</sub> motor : Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 ° substep rotation. 2003;1(22):1-6.
44. Nishizaka T, Oiwa K, Noji H, et al. Chemomechanical coupling in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004;11(2):142-8. doi:10.1038/nsmb721.
45. Ito Y, Oroguchi T, Ikeguchi M. Mechanism of the Conformational Change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  Subunit Revealed by Free Energy Simulations. 2011:3372-3380.
46. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. nucleotide binding fold Figure IA ). Approximately 220 / of amino acid residues along that useATP Homology between a and ( 3 and otherenzymes. 1982;I(8):945-951.
47. Ito Y, Oroguchi T, Ikeguchi M. Mechanism of the conformational change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit revealed by free-energy simulations. :1-7.
48. Masaike T, Muneyuki E, Noji H, Kinoshita K, Yoshida M. F<sub>1</sub>-ATPase changes its conformations upon phosphate release. *J. Biol. Chem.* 2002;277(24):21643-9. doi:10.1074/jbc.M110297200.
49. Pänke O, Rumberg B. Energy and entropy balance of ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1997;1322(2-3):183-194. doi:10.1016/S0005-2728(97)00079-0.
50. Rosing J, Slater EC. The value of G degrees for the hydrolysis of ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 1972;267(2):275-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4402900>. Accessed February 6, 2015.

51. Guynn RW, Veech RL. The equilibrium constants of the adenosine triphosphate hydrolysis and the adenosine triphosphate-citrate lyase reactions. *J. Biol. Chem.* 1973;248(20):6966-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355193>. Accessed February 6, 2015.
52. Krab K, van Wezel J. Improved derivation of phosphate potentials at different temperatures. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1992;1098(2):172-176. doi:10.1016/S0005-2728(05)80333-0.
53. Yukawa A, Iino R, Watanabe R, Hayashi S, Noji H. Key Chemical Factors of Arginine Finger Catalysis of F1-ATPase Clarified by an Unnatural Amino Acid Mutation. *Biochemistry* 2014. doi:10.1021/bi501138b.
54. Odaka JB 1994.pdf.
55. Weber J, Wilke-mounts S, Lee RS, Grells E, Senior AE. Specific Placement of Tryptophan in the Catalytic Sites of Escherichia coli F1-ATPase Provides a Direct Probe of Nucleotide Binding : Maximal ATP Hydrolysis Occurs with Three Sites Occupied \*. 1993;268(27):20126-20133.
56. Dou C, Fortes PAG, Allison WS. The R<sub>3</sub> ( Y 341 W )<sub>3</sub>  $\gamma$  Subcomplex of the F<sub>1</sub>-ATPase from the Thermophilic Bacillus PS3 Fails to Dissociate ADP When MgATP Is Hydrolyzed at a Single Catalytic Site and Attains Maximal Velocity When Three Catalytic Sites Are Saturated. 1998;3:16757-16764.
57. Ono S, Hara KY, Hirao J, et al. Origin of apparent negative cooperativity of F1-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2003;1607(1):35-44. doi:10.1016/j.bbabi.2003.08.006.
58. Shimo-Kon R, Muneyuki E, Sakai H, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K. Chemo-mechanical coupling in F(1)-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis. *Biophys. J.* 2010;98(7):1227-36. doi:10.1016/j.bpj.2009.11.050.
59. Ito Y, Yoshidome T, Matubayasi N, Kinoshita M, Ikeguchi M. Molecular dynamics simulations of yeast F1-ATPase before and after 16° rotation of the  $\gamma$  subunit. *J. Phys. Chem. B* 2013;117(12):3298-307. doi:10.1021/jp312499u.

60. Toyabe S, Ueno H, Muneyuki E. Recovery of state-specific potential of molecular motor from single-molecule trajectory. *EPL (Europhysics Lett.* 2012;97(4):40004. doi:10.1209/0295-5075/97/40004.

## 投稿論文・学会発表

### 論文

1. Y. Kikuchi, Y. Naka, H. Osakabe, T. Okamoto, T. Masaike, H. Ueno, S. Toyabe, and E. Muneyuki  
“Thermodynamic Analyses of Nucleotide Binding to an Isolated Monomeric b Subunit and the a3b3g Subcomplex of F<sub>1</sub>-ATPase” J. Biophysical. 105: 2541-2548 (2013). DOI: 10.1016/j.bpi.2013.10.018

### 口頭、ポスター発表

1. 日本生物物理学会第52回年回（札幌コンベンションセンター 2014年9月25-27日）  
演題番号: 1P161 Y. Kikuchi, H. Ueno, T. Nakayama, E. Muneyuki, S. Toyabe  
“Observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase under the constant external torque”
2. 日本生物物理学会第51回年回（京都国際会議場 2013年10月28-30日）  
演題番号: 1P176 Y. Kikuchi, T. Nakayama, S. Toyabe, E. Muneyuki  
“Observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase under the external torque using the electrorotation method”
3. 日本生物物理学会第50回年回（名古屋大学東山キャンパス 2012年9月22-24日）  
演題番号: 1PS023 Y. Kikuchi, T. Masaike, S. Toyabe, H. Ueno, E. Muneyuki  
“Effect of nucleotide structure on nucleotide binding and rotation of F<sub>1</sub>-ATPase”
4. 文部科学省新学術領域[水和とATP]第4回領域全体会議（仙台秋保岩沼屋 2012年3月7-9）ポスターNo.40 Y. Kikuchi, Y. Naka, H. Osakabe, T. Masaike, E. Muneyuki,  
“Thermodynamic parameters of nucleotide binding to the catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase”
5. 日本生物物理学会第49回年回（兵庫県立大学姫路書写キャンパス 2011年9月16-18日）  
演題番号: 1L1436 Y. Kikuchi, Y. Naka, H. Osakabe, E. Muneyuki, “Thermodynamic parameters of nucleotide binding to the catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase”
6. 文部科学省新学術領域[水和とATP]第2回領域全体会議（大阪ガーデンパレス 2011年8月9-11）ポスターNo.43 Y. Kikuchi, E. Muneyuki, H. Osakabe, Y. Naka,  
“Thermodynamic parameters of nucleotide binding to the catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase revealed by fluorescence measurement”
7. 日本生物物理学会第48回年回（東北大学川内キャンパス 2010年9月20-22日）  
演題番号: 3P169 Y. Kikuchi, Y. Naka, H. Osakabe, S. Toyabe, H. Ueno, E. Muneyuki,  
“Thermodynamic parameters of nucleotide binding to the catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase revealed by fluorescence measurement”

## 謝辞

本論文をまとめるに当たり多くのご支援とご指導を賜りました。指導教官である宗行英朗教授には深く感謝しております。時に厳しく、時に詳しくご指導いただき、また私自身の至らないところに対しても忍耐強く見守っていただきました。また上野博史助教には実験方法の改善のアドバイスや、一分子観察の指導していただき深く感謝しております。また鳥谷部祥一准教授には(現東北大学応用物理学専攻所属)には、非平衡統計力学の理論など私の理解の至らないところにも、非常にわかりやすく説明していただきました。そして宗行研究室の方々にも研究で問題が発生した時に、非常に良いアドバイスをしていただきました。また学会発表では他大学の研究室の方々と有益な議論ができ、今回の論文に生かすことができました。そして最後に今まで支えてくださった両親に感謝の気持ちとお礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。