

「ストップフロー法を用いた好熱菌 F1 の β Y341W 単体への ATP 結合速度定数の測定」

“Measurement of ATP binding rate constant to isolated β Y341W of thermophile F1 using stopped flow technique”

物理学専攻 宗行研究室 11N2100007I 小原 清志

1. 序論

F_0F_1 -ATP 合成酵素は生命活動に必要なほとんどの ATP を生体内で合成している。図 1 の左図が F_0F_1 -ATP 合成酵素であり、脂質二重膜に F_0 部分が埋まっている。脂質二重膜から（膜の表面に）突き出た部分が F_1 部分である。 F_0F_1 -ATP 合成酵素は生体膜の内外にできたプロトン勾配によって生じる電気化学ポテンシャル差によって F_0 部分をプロトンが移動する。それに伴い c サブユニットで構成された c リングが回転する。その c リングに繋がっている F_1 部分

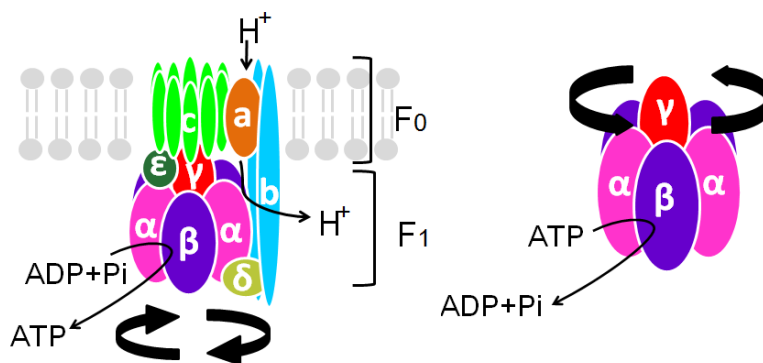


図 1, F_0F_1 -ATP 合成酵素 (左) と F_1 -ATPase (右)

の γ サブユニットが $\alpha\beta\beta_3$ に対して回転し、そのエネルギーを使って F_1 部分が ADP と P_i から ATP を合成する。1980 年代に Boyer は ATP を合成する際に回転のエネルギーは酵素上にできた ATP の解離に使われることを提唱した。 F_1 部分は ATP を ADP と P_i に加水分解するので F_1 -ATPase と呼ばれている。 F_1 -ATPase の回転の最小単位は $\alpha\beta\beta_3\gamma$ の 3 種類のサブユニットからなり、加水分解の際に回転する。Boyer によると、回転のメカニズムは β サブユニットにある触媒部位に ATP が結合することで起こる構造変化が主な要因であり、この結合によって γ サブユニットが 80° 回転する。このとき化学反応としての加水分解は起こらず、回転と共役しない段階で加水分解が起こる。以上のことから ATP の結合はこの回転機構を理解する上で非常に重要である。

2. 研究背景

F_1 -ATPase に対する ATP の結合速度定数は一分子回転観察により求められている ($k_{on} = 2.2 \sim 2.7 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, $22 \sim 24^\circ C$) が、触媒部位のある β サブユニット単体に対する ATP の結合速度定数は分かっていない。そこで本研究は β サブユニット単体に注目し、複合体との違いを調べることにした。 $\alpha\beta\beta_3\gamma$ の複合体では P_i を加えると ATP の結合速度が遅くなるという結果や、回転観察においてトルクに影響があることが報告されている。以上のことから β サブユニット単体に対して P_i の有無で結合速度の変化があるのかも調べ、この結果を $\alpha\beta\beta_3\gamma$ 複合体と比較することにより複合体を作ることでどのような変化が出てくるかを理解することを目指した。方法としては β Y341W 変異体とストップフロー法の組み合わせを用いた。

β Y341W 変異体は β サブユニットの触媒部位付近にある 341 番目のタイロシン (Y) をトリプトファン (W) に置換した変異体である。トリプトファンには、300 nm の励起光を当てると 345 nm 付近の蛍光を放出する性質がある。これはトリプトファンのインドール環によるものである。ATP が結合するとこれが ATP のアデニン環と重なり合うことで励起光を当てても蛍光が見えなくなる。

図2はβY341W 変異体に記されている濃度のADPを50sのところで加えたときの消光の様子である。なおADPではあるが、Piが1つ外れているだけのヌクレオチドであるため、本質的な消光に影響はないため、ADPでの結果を掲載した。この結果の横軸に注目すると秒単位でしか反応を追えていないことが分かる。そこでさらに細かい時間で測定するために、本研究の肝であるストップフロー法を用いた。

図3がストップフロー法の概略図である。2本のシリンジに蛍光を示す溶液(βY341W)と消光させる溶液(ATP)を入れ、同時にピストンを押すと2つの液は混合室で混ざり合いセルを通してストップシリンジに流れ込む。そのタイミングでトリガースイッチが押され、そのときの蛍光を蛍光分光器から電圧として

LabVIEWという計測ソフトを通してコンピュータに取り込んだ。この方法の最大の利点はミリ秒のオーダーで測定できることであるが、逆に大量のサンプルを消費するという欠点もある。

この実験で得られる消光のシグナルはATPの濃度がβサブユニットの濃度に対して大過剰であるときにexpでフィットすることができ、その関数の時定数をTとすると、

$$\frac{1}{T} = k_{on}[ATP] + k_{off}$$

と書くことができ、一次方程式で表すことができる。この直線の傾き k_{on} が結合速度定数となる。

3. 目的

好熱菌由来F₁のβサブユニット単体(βY341W)へのATPの結合速度定数を、ストップフロー法とトリプトファンの蛍光観察から求める、というのが本研究の目的である。しかし私の研究はここまでであったが、大目的はトリプトファンの変異導入を用いた好熱菌由来F₁-ATPaseへのATPの結合速度定数の測定である。

4. 結果

F₁-ATPaseの回転観察は室温で問題なくできる。そこでストップフロー法による実験も始めは室温で行った。使ったbuffer(緩衝液)は50 mM MOPS-KOH / 50 mM KCl / 2 mM MgCl₂ / pH 7.0である。しかし室温では反応が早く終わってしまうため、期待するシグナルを見ることはできなかった。そこで実験系の温度を6.3°Cま

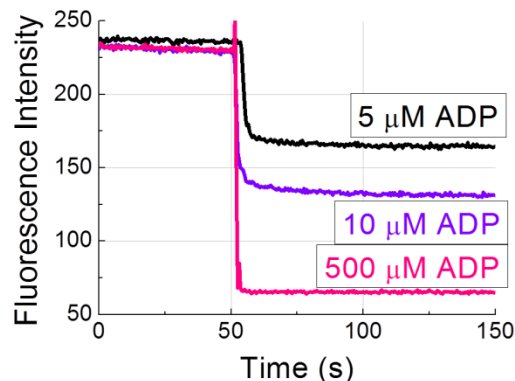


図2, ADPによるβY341W 変異体の消光の様子

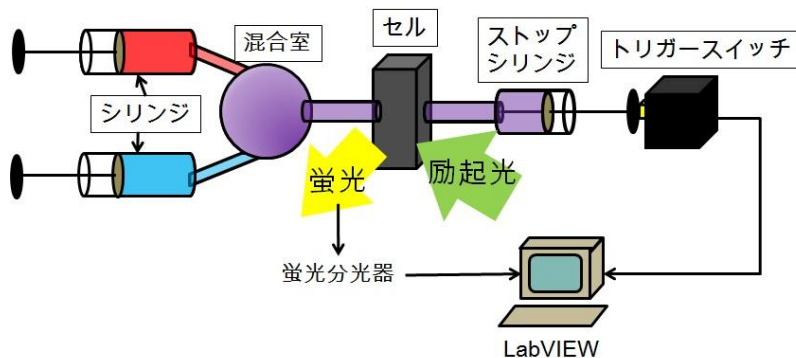


図3, ストップフロー法の概略図

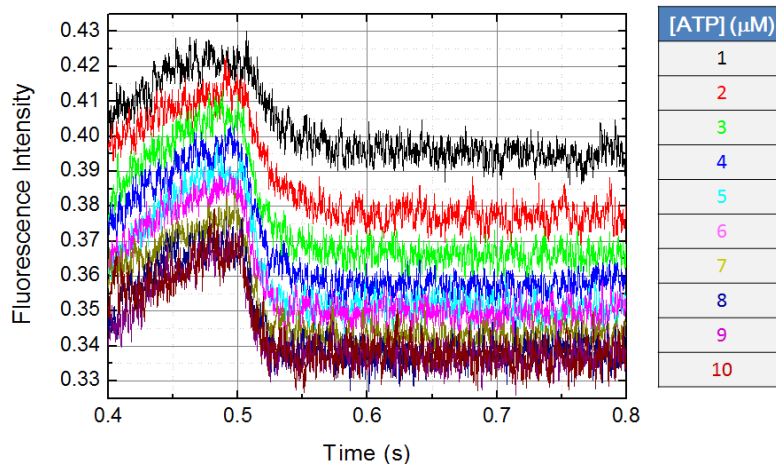


図4, 6.3°Cでの実験結果

で下げて実験したところ期待するシグナルを観測することができた。

図4が6.3°Cという低温の条件下での実験結果である。このときβサブユニット単体(βY341W)の濃度は0.1 μMで固定し、ATPの濃度は1 μMから始めて1 μMずつ上げていき最終的に10 μMまで実験した。0.5秒でトリガーがかかるよう誠意呈しているため、そこから減衰していく様子が観測された。この曲線をexpで減衰する関数でフィッティングし、時定数の逆数をATPの濃度に対してプロットした。しかし1回の実験では信憑性が低いので、同じような条件で実験を繰り返しそれも重ねてプロットした結果が図5である。

図5における青い下向き三角形は図4での結果である。シンボルの違いは違う日に行った実験の結果であるということである。図5を見るとほとんどのシンボルはそれぞれ近い値となった。ただし○で囲んでいる3つの点は蛍光強度が低く無理矢理フィッティングした結果であるので、異常に早い速度定数となった。この3点を除いて直線を引いてみた結果が図6である。

直線を引いたときその傾きが、求めたいATPの結合速度定数 k_{on} である。そうして求めた k_{on} は

$$k_{on} = 1.2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$$

となった。また切片は

$$k_{off} = 25 s^{-1}$$

と、図6から求められた。この k_{on} と k_{off} からATPのβサブユニット単体に対する解離定数 k_d を求めると

$$k_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = 2 \mu M$$

となった。

この値を評価するために本研究室の先輩である菊池さんの結果を参考にした。菊池さんは蛍光分光器での蛍光観察により、ATPのβサブユニット単体に対する解離定数 k_d は2.6°Cで2.1~2.4 μMであると示した。

私の結果は温度が6.0~7.5°Cでの結果であるが、ほぼ等しい結果となった。この温度差は絶対温度で考えると、ほとんど無いといえる。

このことからストップフロー法で得られる結果は信頼してよいとみなし、求めたい結合速度定数は $k_{on} = 1.2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ となった。

またPiについての結果も掲載する。bufferの条件は同じであるが、違いは両方のシリンジにPiを加えるということである。まずは50 mMのPiを加えて実験した。以下に載せる結果は時定数の逆数をATPの濃度に対してプロットした結果である。

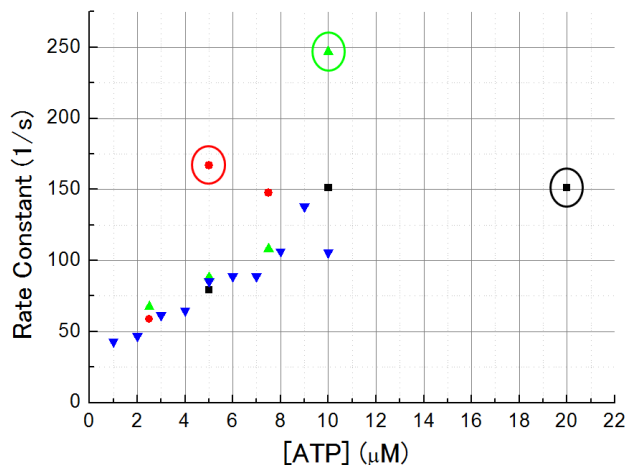


図5, 実験で得られた曲線の時定数の逆数を、

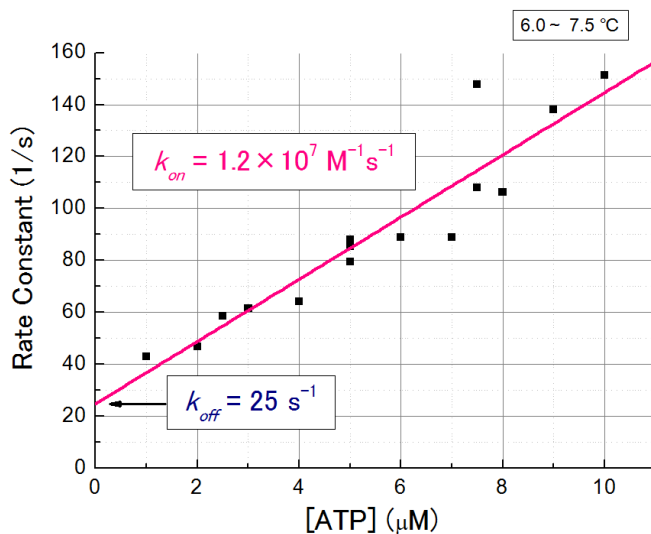


図6, 図5において○で囲った3点を除いて直線を引いた結果。

図7がその結果である。点が複数あるのは、複数回実験した結果を重ねているからである。図7を見ても一概に結合速度が速くなるまたは遅くなるとは言い切れない結果となった。

そこで別日に Pi の濃度を 100, 300, 500 mM にして実験した。図8がその結果である。これも統一性がある結果とはならなかった。また Pi の濃度が 300 mM のときと 500 mM のときはシグナルが安定しなかったり、蛍光強度の山が低いという結果になった。

Pi の実験に関して、本研究では期待した結果を得ることはできなかった。

4. まとめと今後の展望

今回の研究では室温で観測することはできなかった。ただ低温の条件下では $k_{on} = 1.2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, $k_{off} = 25 s^{-1}$ という結果になった。これから求めることができる解離定数 k_d は $2 \mu M$ となり、先輩の先行研究の値と比較しても同様な値となった。このことから今回求めた実験値は非常によい精度であることが分かった。また私が行った実験は低温という限定された条件での結果である。低温で上記の結合速度定数になったので、もし室温だったと考えると結合速度定数は一桁以上早くなるかもしれない。室温での観測とトリプトファンの変異導入を用いた F_1 -ATPase での実験は残念ながらできなかったので、課題として残ってしまった。

また Pi を用いた実験では、Pi の解離や結合の状態が繰り返し広げられている状態を作り出し、そこに ATP を混ぜ合わせるため結合速度になにかしらの影響がでるのではないかと考えた。確かにストップフロー法によって得られたシグナルでは Pi が 300 mM と 500 mM のときに、遅くなっているような結果にはなった（本項参照）。しかし実際に結果を出しても明確な違いはなかった。以上のことからリン酸の結合に及ぼす影響は $\alpha\gamma$ サブユニットの影響が強いのかもかもしれない。

本研究は先輩方で取り組んでいた方はおらず、私が初の実験者となった。大目的を達成することはできなかったが β サブユニット単体についての実験は信頼できる結果となったと自負している。まだ F_1 複合体での実験や Pi の有無についての結果をまとめることができなかったが、今後の課題として後輩たちに取り組んでもらいたいと思っている。

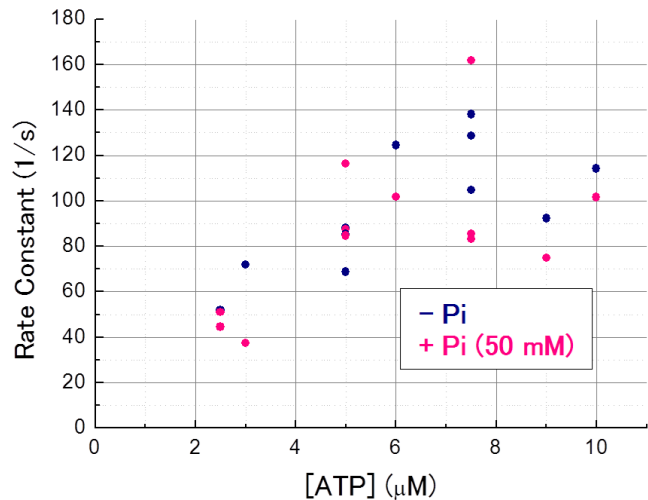


図7, ATP の濃度に対して時定数の逆数をプロットした結果。ピンクは Pi 有、紺は Pi 無。

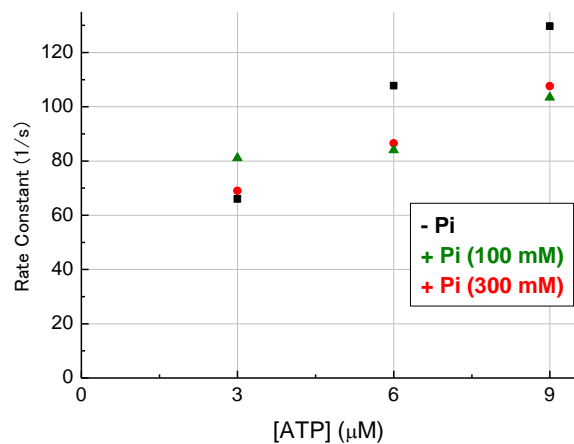


図8, ATP の濃度に対して時定数の逆数をプロットした結果。