

外部トルクによる TF1 β E190D 変異体の回転への影響
 Effect of external torque on the rotation of TF1 β E190D mutant

博士前期課程 理工学研究科 物理学専攻 宗行研究室
 11N2100008G 河上 知広

1 Introduction

〈F₁は回転するモーター〉

私達のご飯を食べて生きている．食べたご飯から得られたエネルギーは ATP(アデノシン三リン酸)を合成することで蓄えられ，ATP を加水分解した際に得られる自由エネルギーが細胞活動，物質輸送，情報伝達などの生命現象の多くに利用される．ATP は生命活動を営む上で必要不可欠である．ATP はミトコンドリアの内膜にある膜たんぱく質の FoF₁-ATP 合成酵素によって膜の両側のプロトンの電気化学ポテンシャル差を使って合成される(図 1 左)．FoF₁-ATP 合成酵素は F₀ 部分と F₁ 部分で構成されていて，その 2 つを簡単に分けることができる．その F₁ 部分は FoF₁-ATP 合成酵素とは逆に ATP を ADP(アデノシン二リン酸)と Pi(リン酸)に加水分解する酵素となり，F₁-ATPase と呼ばれている．また，ATP の加水分解に伴って回転する世界最小の分子モーターであることで知られている(図 1 右)．F₁-ATPase(以下 F₁)は α サブユニット(以下 α)3 つ，ATP が結合する触媒部位の β サブユニット(以下 β)3 つ， α 3 β 3 で作られるリングを固定子にしたときの回転子である γ サブユニット(以下 γ)の他， ϵ と δ サブユニットで構成されるが， α 3 β 3 γ 複合体で F₁ の性質はほぼ再現されるので，実際の研究では α 3 β 3 γ 複合体を使い，以下，本修士論文では F₁ といえばこの複合体を指すものとする．

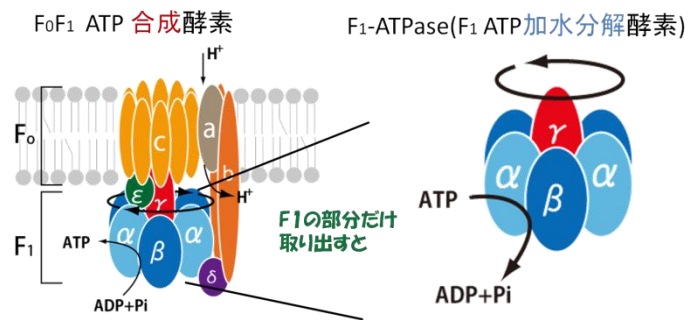


図 1 FoF₁-ATP 合成酵素と F₁-ATPase

〈加水分解の機構〉

F₁ の加水分解と回転機構は様々な研究者によって解き明かされてきた．現在もっとも有力な説を下に示す(図 2)．まず空の β に ATP が結合し 120° 時計回りに回った位置の β から ADP が解離して γ が 80° 回転する．次に，120° 反時計回りに回った位置の β に結合していた ATP を加水分解し Pi を解離して 40° 回転する．反時計回り，時計回りについては図を確認のこと．これを 3 回繰り返して ATP を 3 つ加水分解して状態変化が一周し元の状態に戻る．ATP が低濃度だと，なかなか ATP が触媒部位に来ないので， γ の回転

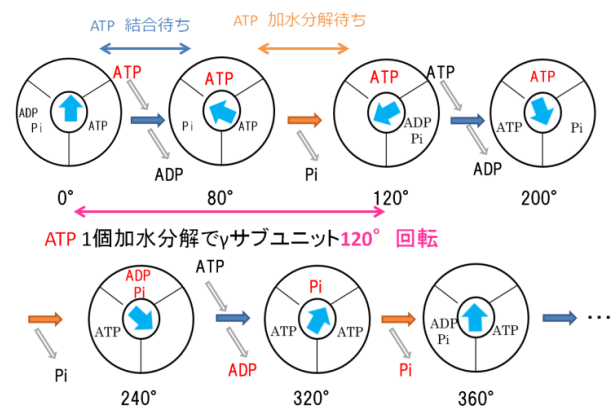


図 2 F₁ の回転機構

円の中心の矢印は γ サブユニットの向き，3 つのスペースは触媒部位である β を表わしている．

が停止し、 120° ごとにステップするように観察される(図 3). この 120° は上記のように ATP 結合後の 80° と ATP 加水分解後の 40° に分けることができるが ATP 加水分解の待ち

時間は \sim ms ととても短く、一分子観察においては回転プローブを十分小さくし時間分解能を ms 以下にしないと観察が難しい.

〈 F_1 のエネルギー変換〉

F_1 の回転の駆動力は ATP を加水分解で得られる自由エネルギーである. 先行研究で鳥谷部らは F_1 が 1ATP の加水分解に伴って 120° 回転するという性質から, ATP 加水分解で得られる自由エネルギーは F_1 によりどれくらい力学的な仕事に変換されているのかを調べた. 方法として, まず, 回転電場法を用いて F_1 に回転を妨げる方向に外力をかける. そして平均回転速度が 0 になる (F_1 のトルクと釣り合う)トルクをストールトルク(最大トルク)と定義し, 最大トルクにより 120° 回転する仕事(最大仕事)と自由エネルギーを比較した(図 4). その結果, 自由エネルギーと最大仕事はほぼ一致し, F_1 は自由エネルギーと仕事をほぼ 100%のエネルギー変換効率でカップリングさせていることを示した. さらに, 外部トルクによって ATP 結合待ちの時間が延びることを報告したが ATP 加水分解の待ち時間の延びは観測されなかった.

2 目的

この高い効率を持つ F_1 モーターの内部のトルク機構は未解明であり, エネルギー入出におけるメカニズムを知ることは大変重要なことである. そこで, 加水分解活性が 100 倍低くなる変異をいれた β E190D 変異体を用いて, 効率が変化するかどうかを調べる. また, 加水分解活性が低くなることで β E190D 変異体の回転中, 加水分解の待ち時間が発生し γ が停止するので ATP 高濃度でもステップが観察できる. したがって, 先行研究では確認されなかった ATP 加水分解の待ち時間(γ の停止時間)のトルク依存性があるかを調べる.

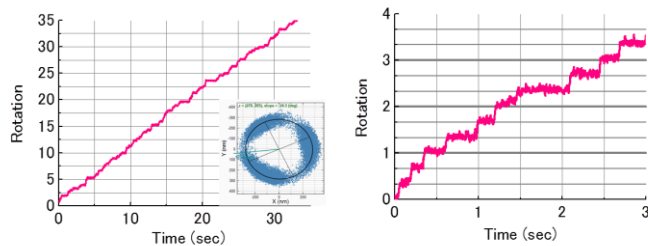


図 3 ATP 低濃度では F_1 は 120° ずつステップする

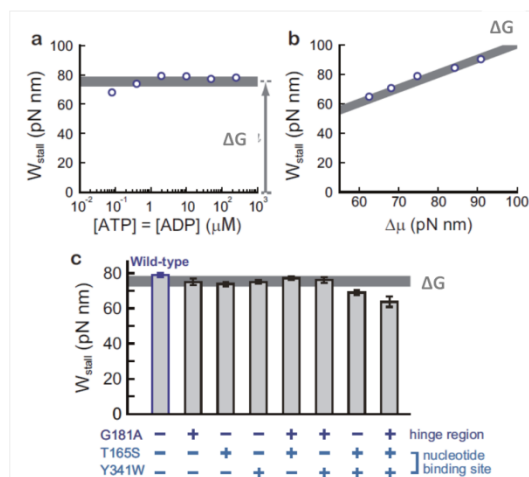


図 4 自由エネルギーと最大仕事の比較

鳥谷部はストールトルクがする仕事と自由エネルギーを比較を行った.

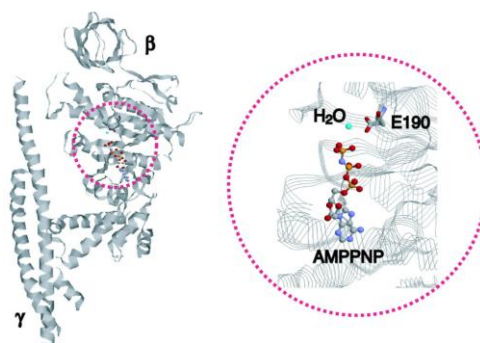


図 5 β E190D 変異体

この変異体は触媒部位の β の C 末端から数えて 190 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に変異したものの

3 実験系

〈F₁の一分子観察の実験系〉

まず、F₁ を特異的な修飾を施したガラスに固定する。γの動きを知るためにγの先端にポリスチレンのビーズの二量子体をつけ、ビーズの動きをγの動きとして解析に用いる(図 6)。

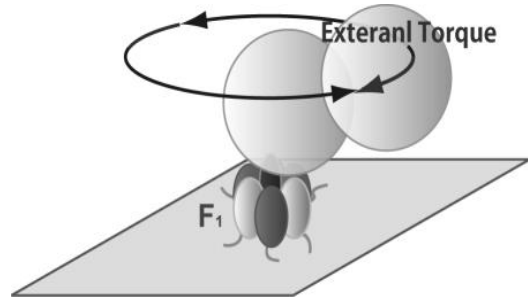


図 6 一分子観察の実験系

〈回転電場法〉

F₁ にトルクをかける手段として回転電場法を用いた。回転電場法とは4つの電極にそれぞれ位相が90°ずつ異なる電場をかけると、電極中心にある誘電体は双極子モーメントが発生し電場との遅れから偶力が発生しトルクがかかるという仕組みである(図 7)。

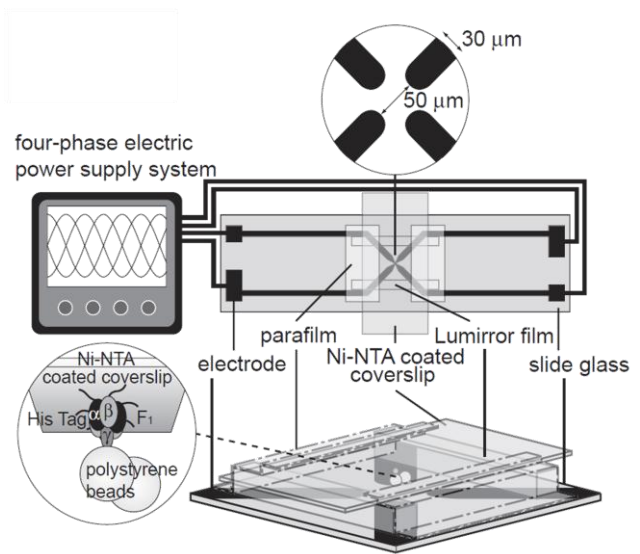
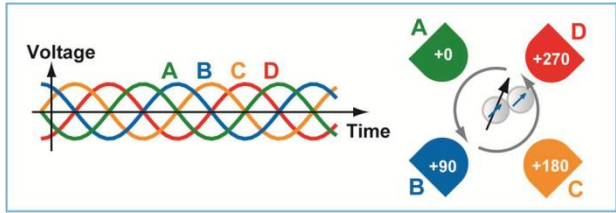


図 7 回転電場法の実験系



4 結果

〈F₁(変異なし)の最大仕事と自由エネルギーの比較〉

追実験として変異を入れていない F₁ の最大仕事と自由エネルギーの比較を行った(図 8)。F₁ の回転を邪魔するようにトルクをかけていき、平均回転速度が0のトルクを F₁ が出しうる最大トルクとし、トルクが 120° 動く仕事と自由エネルギーを比較、結果、先行研究と同じように最大仕事は自由エネルギーとほぼ等しくなった(図 8)。

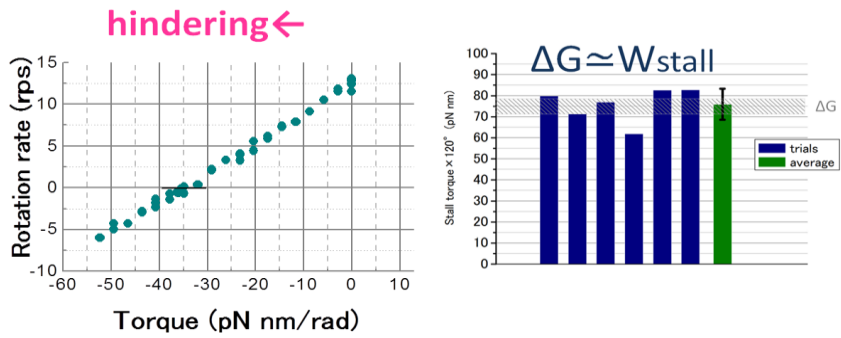


図 8 F₁(変異なし)はカップリング効率ほぼ 100%.

左図は平均回転速度と印加するトルクの関係平均回転速度0のトルクを F₁ の最大トルクとする。

〈F₁(E190D)の最大仕事と自由エネルギーの比較〉

加水分解活性が落ちる E190D 変異体を用いて変異なしと同じように実験行った。比較すると最大仕事は自由エネルギーを下回った(図 9)。これはストールトルクの定義は平均回転速度が 0 になるトルク=合成方向に回転するぎりぎりのトルクである。ATP を加水分解で得られる自由エネルギーは逆に ATP 合成の為に必要な仕事であり、仕事が自由エネルギーを下回るとは ATP 合成を行わずして回転していることに他ならない。E190D 変異体はカップリング効率が悪い変異体であることがわかった。

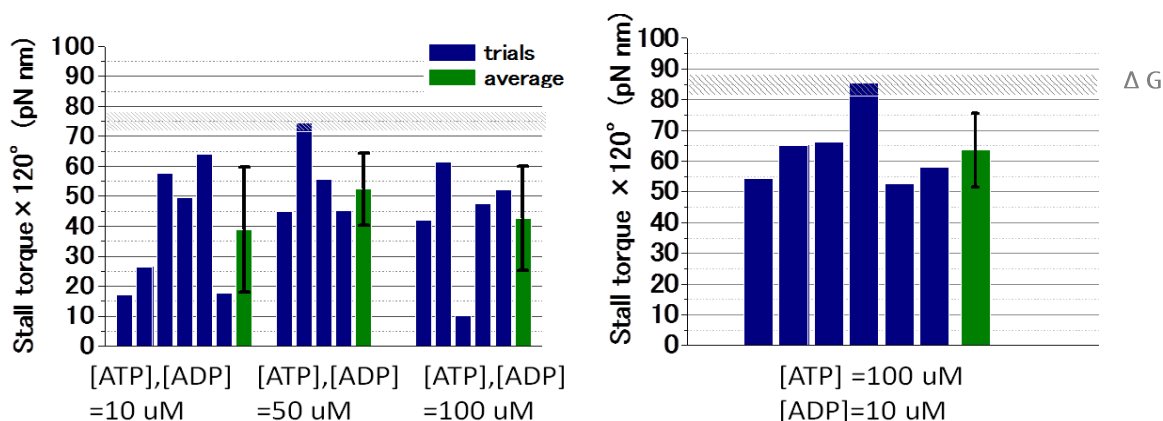


図 9 変異体の最大仕事は自由エネルギーを下回った

〈ATP 加水分解の待ち時間のトルク依存性〉

回転している E190D に回転を妨げる方向にトルクをかけていくと回転速度は遅くなった。この原因は回転のトラジェクトリの解析から ATP 加水分解の待ち時間が長くなることによるものであった。しかし、先行研究とは逆に ATP 結合の待ち時間は観測できず、停止角度は 3 つのままとなった。トルクを大きくしていても停止角度がずれないことから、観察しているのは加水分解の待ち時間由来の停止であると考えるのが自然である。したがって、これは初めて加水分解の待ち時間のトルク依存性を示した結果になった。

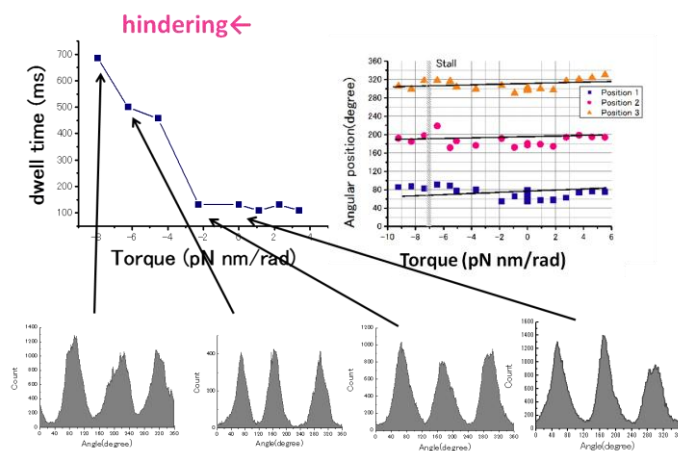


図 10 加水分解の待ち時間を観測した。

5 まとめと今後の展望

- ・加水分解活性が低くなる E190D 変異体はカップリング効率が低い変異体であることを発見した。他の加水分解活性が低くなる変異体の効率を調べてみたい。
- ・ATP 加水分解の待ち時間のトルク依存性を初めて示した。ATP 低濃度の条件下で E190D にトルクをかけ ATP 結合、ATP 加水分解の待ち時間を両方観測できるはずなので、その条件で実験を行う。