

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770139

研究課題名（和文） 回転分子モーター F_1 -ATPase の活性型—阻害型制御機構研究課題名（英文） Regulatory mechanism for inactivation of F_1 -ATPase

研究代表者

昆 理恵子（KON, Rieko）

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：80392877

研究成果の概要：私たちの体内で生命維持に必要なエネルギー源ATPを合成する酵素は、どのように活動と休止を決めているのだろうか？実験系の単純化のためATP合成の最小部位 F_1 -ATPaseのATP加水分解反応(合成の逆反応)の活動—休止の移り変わりとそれぞれの状態でのヌクレオチド結合数を調べた。その結果、活動中も休止中もヌクレオチドの結合数は同じであることが分かった。今後は、この結合ヌクレオチドがATPかADPかを調べていきたい。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	3,600,000	270,000	3,870,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード： 酵素の作用機作と調節、1 分子計測・操作、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生命維持に必要なエネルギー源ATPは細胞内のミトコンドリアでATP合成酵素によって作られている。ATP合成酵素はミトコンドリアの内膜に埋め込まれた部分 F_0 と膜の外側にある F_1 からなる。ATP合成（加水分解）に必要な最小単位は F_1 を構成する $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ サブユニットのうち3種類7つのサブユニット $\alpha_3\beta_3\gamma$ （以降 F_1 -ATPase）からなる。 F_1 -ATPaseの構造は3つの α, β が交互に並んで筒のように配列し、棒状の γ を囲んだ構造をしている（図1）。単離された F_1 -ATPaseはATP加水分解活性を持つが、そのATP加水分解サイトは β サブユニット上にあり（1つの F_1 -ATPase分子には3つの β サブユニットがあるから、1分子あたりの加水分解サイトは3つ）、 α サブユニットにはATP結合サイトがあるが加水分解活性を持たないことが分かっている。また、ATP加水分解活性に伴って、 γ サブユニットがまわりの筒状の $\alpha_3\beta_3$ に対して回転するが、回転がぱたりと止まる阻害状態を持ち、阻害状態と活性状態を遷移することが知られている。

これまで F_1 -ATPaseの加水分解機構を明らかにするために多くの研究が、特に多分子系での実験が、なされてきた。しかし、他のモーター蛋白質とは異なり、 F_1 -ATPaseは1つの溶液条件下においても活性型と阻害型の2状態をとることから（カルシウムイオン濃度など溶液条件が変われば阻害型をとるというモーター蛋白質はあるが）、多分子系の実験ではそれら2状態の性質をそれぞれ区別して調べるのが困難であり、その結果、実験結果の解釈を困難にしてきた。そのため、活性型の加水分解機構もいまだ議論の余地が十分にあり、そのうえ、活性型と阻害型との遷移のメカニズムについては殆ど明らかにされていない。本研究課題である、活性型—阻害型の遷移のメカニズムを明らかにすることは、分子自身が持つ“働く—休む”の自己制御法の発見だけでなく、活性型—阻害型の遷移を自在にコントロールすることで、これからの F_1 -ATPaseの研究をより明瞭にすることが期待できる。

これまでに明らかにされている F_1 -ATPaseの活性型—阻害型の特徴を以下に述べる。まず最初に、ADP存在下では F_1 -ATPaseが阻害型を取りやすいことが明らかにされている。また、 F_1 -ATPaseの α サブユニットのATP結合サイト近傍が阻害型—活性型の移行に重要であることが明らかにされているが（T. Matsui et al. J.B.C., Vol. 272 8215-8221(1997)、この論文で α サブユニットにATPまたはADPが結合できない変異体では阻害型から活性型への回復がみられないことが明らかにされている）、活性型への移行の直接の原因が何かは分からない。

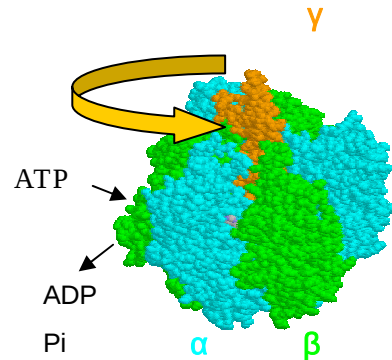


図1

1分子回転観察の系を用いた実験から、阻害型のときの回転子 γ サブユニットは、ATP待ちの角度から90度進んだところでぱたりと止まることが明らかにされている（Y. Hirono-Hara et al. P.N.A.S., Vol 98 13649-13654(2001)）。また、 γ サブユニットを阻害型の位置から反応を進める方向に機械的に回転させると再び回転し始める、つまり阻害型から活性型へ変化することが明らかにされている（Y. Hirono-Hara and K. Ishizuka et al. P.N.A.S., Vol 102 4288-4293(2005)）。このように、 α, γ サブユニットと阻害型の関係については報告がされているが、ATP加水分解活性をもついわば主役の β サブユニットで何が起きているかは明らかにされてきていない。しかし、上で述べたようにADPが阻害型の形成と密接な関係があることから、ADPと最も強い結合力を持つ β サブユニットが阻害型の形成に重要な役割を果たしていることが予想される。

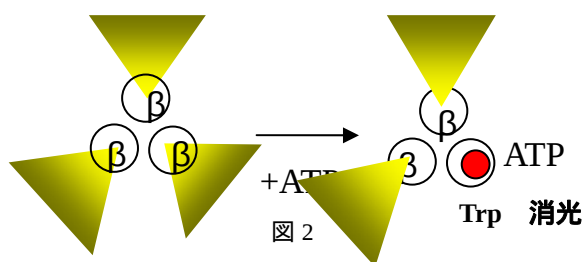
2. 研究の目的

本課題の目的は、ATP加水分解酵素である F_1 -ATPaseが持つ2つの状態、活性型—阻害型の遷移の機構を明らかにすることである。1で上述したように、 F_1 -ATPaseはATP存在下でATP加水分解活性を持つ活性型と加水分解活性を持たない阻害型の2つの状態をとり、この2状態を確率的に行き来することが知られている。また、そのときに α, γ サブユニットがどういう働きをしているかについても、いくつかの報告がなされている。本研究では、ATP加水分解活性部位を持つ β サブユニットが活性型—阻害型の遷移でどういう変化をするのかを調べたい。具体的には、 F_1 -ATPase 1つにつき3つある β サブユニット（図1参照）のヌクレオチド状態（ATPまたはADPを結合しているのか、それとも何も結合していないのか）を活性型、阻害型それぞれの状態について調べることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、系の単純化のため、活性型から阻害型への遷移しか起こらない変異体を用いた。

多数の分子がそれぞれ活性型から阻害型、阻害型から活性型への2方向に遷移を行う系では、結果の解釈が困難になることが予想されるためである。この変異体では、阻害型から活性型へ遷移するためのスイッチの役割を果たすといわれる α サブユニットへのヌクレオチドの結合ができない。この変異体を用いると反応開始直後はすべての分子が活性型をとっているが、時間がたつにつれて阻害型の分子の割合が増え最終的には全ての分子が阻害型をとる。この性質を利用して、阻害型への遷移速度を調べることができ、また、それと平行して、ヌクレオチド結合数の時間変化を同じ溶液条件下で測定することができれば、阻害型、活性型、それぞれのヌクレオチド結合数を調べることができる。阻害型への遷移の速度を調べる方法としては、ATPase 活性測定を用い、活性の減少速度から、阻害型に陥いる速度を見積もった。また、この測定は ATP 加水分解の分解産物である ADP を ATP に再生する”ATP 再生系”存在下で行った。この系を用いると、溶液中の ATP の濃度を一定に保ちながらしかも ADP を排除することができる。ADP は阻害型の形成を促進するため、この濃度が時間とともに増加すると実験結果の解釈が非常に困難になる。 β サブユニットへのヌクレオチドの結合数はヌクレオチド結合部位近傍に Trp を導入した Trp 変異体を用いた。この変異体では、ヌクレオチドが結合すると、導入された Trp の蛍光が消光することから、蛍光強度の変化を測定することで、ヌクレオチドの結合数を測定することができる(図2)。



このとき、先に述べた阻害型への遷移速度の測定とヌクレオチド結合数の測定を同じ条件で行うことが非常に重要である。これまで、Trp 変異体を用いたヌクレオチド結合数の測定は他の研究者によっても行われてきたが、それらはすべて ATP が再生されない系を用いたものであった。そのため、ATP の濃度がどんどん減少し、それに伴って ADP の量がどんどん増加するような系であった。このような系では、ATP 濃度が一定に保たれないだけでなく、ADP が溶液中に存在するため、阻害型の形成が ATP 活性測定から見積もられたものとは異なることが予想さ

れる。しかし、ATP 再生系に含まれる酵素が蛍光を持つことから、Trp 変異体の蛍光測定を ATP 再生系存在下で行うことは不可能であった。そこで、わたしは蛍光を持たない ATP 再生系を用いることを試みた。こうして、初めて阻害型への遷移速度とヌクレオチド結合数の変化を調べることが可能となった。

4. 研究成果

● F_1 -ATPaseの濃度測定

F_1 -ATPaseのヌクレオチドの結合数を測定するという、いわば絶対値を計測する実験においては、 F_1 -ATPaseの濃度を正確に測定することが非常に重要である。そこで、アミノ酸分析を行い、そこから見積もられた F_1 -ATPaseの濃度と吸光度の関係から、 F_1 -ATPaseの濃度を決定した。

● 阻害型への遷移の速度

ATP 再生系存在下で、ATPase 活性測定を行った。その結果、阻害型の形成速度を見積もることができた(図3)。図3で、この変異

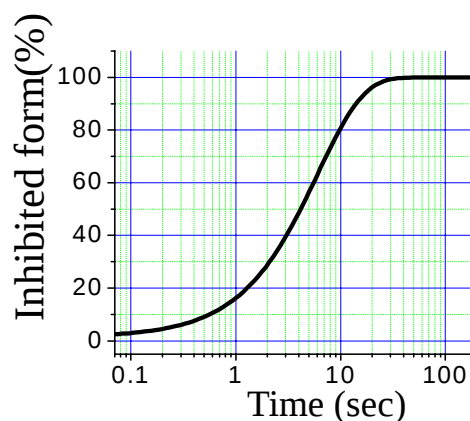


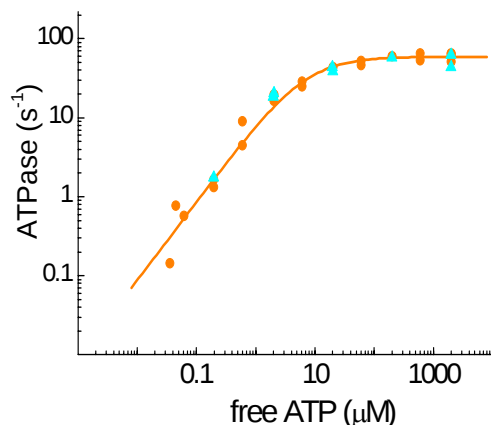
図3

体では1分後にはすべての分子が阻害型を取ることが分かった。また、阻害型への遷移の時定数は約8秒で、これはATP濃度に依存せず一定であった。

● 蛍光を持たないATP再生系

上で述べたATPase活性測定は、ATP再生系として、PyruvateKinase, Phosphoenol Pyruvate (以下 PEP) を使用したが、Wild TypeのPyruvateKinaseは蛍光を持つ。わたしは蛍光測定の邪魔をせず、ADPからATPを再生させるために、静岡県立大学の酒井坦先生から蛍光を持たないように変異を導入したPyruvateKinaseのプラスミドを提供していただき、これを精製した。こうして得られたPyruvateKinaseは野生型のPyruvateKinaseと同じ活性を持ち、これを用いた F_1 -ATPaseの活性測定も野生型を用いた場合と同じ結果であっ

た(図4)。



● ATP再生系存在下でのヌクレオチド結合数の測定

Trp変異体の蛍光強度変化からヌクレオチド結合数を見積もった。この変異体では、ATP(またはADP)が結合すると、蛍光強度が減少する(図5)。このとき、蛍光強度の

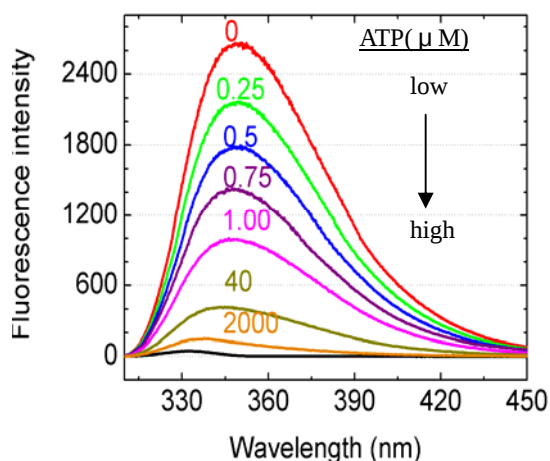


図5

減少とヌクレオチド結合数は比例することをヌクレオチド結合数の直接測定との比較から確かめた。この変異体を用いて、ATP再生系存在下で、ヌクレオチド結合数の測定を行った。実験計画の段階での予想に反して活性型、阻害型においてヌクレオチドの結合数は同じであった。結合ヌクレオチドの種類、ATPまたはADP、については現在実験中である。

● PEPの効果

本研究の最終目的ではなかったが、ATP再生系の要素であるPEPが F_1 -ATPaseへのヌクレオチドの結合を競合的に阻害することがわかった(図6)。図6で、PEP存在下

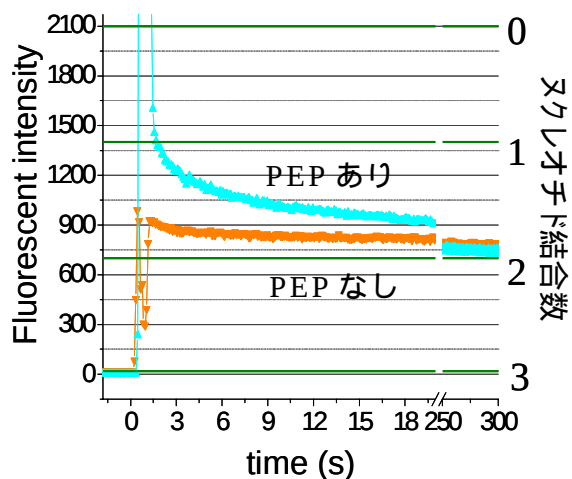


図6

では(水色線)PEPなし(オレンジ線)のときに比べて、蛍光強度がゆっくり減少していることがわかる。これは、PEP存在下では、 F_1 -ATPaseへのヌクレオチド結合速度が遅くなることを示している。これまで、他の研究者により、リン酸が F_1 -ATPaseへのヌクレオチドの結合を競合的に阻害すること、また活性型—阻害型の平衡を活性型が多いほうへシフトすることが報告されていたが、PEPは競合阻害はするが活性型—阻害型の平衡には影響を及ぼさなかった。本課題の遂行において、測定溶液中のATP濃度を一定に保つことは必須であったため、上述のPEPは殆どすべての実験で用いられていた(本研究だけでなく、ATPを再生させるために、多くの実験でPEPは使われてきた)。こうして、これまで解釈が困難であった実験結果の理解を助け、 F_1 -ATPaseのATP加水分解機構の解明に貢献できたと感じている。これらの実験結果・考察について現在論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) Shou Furuike, Kengo Adachi, Naoyoshi Sakaki, Rieko Shimo-Kon, Hiroyasu Itoh, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita, Jr., "Temperature dependence of the rotation and hydrolysis

activities of F_1 -ATPase", Biophys. J., [査読有] 95 (2008) 761-770

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 昆 理恵子 「 F_1 -ATPaseのATP加水分解中のヌクレオチド結合数、非触媒部位にヌクレオチドが結合できない変異体を使って」第 45 回日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 23 日、パシフィコ横浜(神奈川)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

昆 理恵子 (KON RIEKO)
早稲田大学・理工学術院・助手
研究者番号 : 80392877