

2015年度は、2015年1月に発表した論文 (New J. Phys. 17 (2015) 015008) と、それに関係する川口氏らによる理論面から F1-ATPase のエネルギー論を検討した論文 (Kawaguchi, Sasa, Sagawa Biophys. J. 106, 2450–2457 (2014)) の内容を比較検討し、基質濃度が低くなるような領域での回転速度やエネルギー散逸の外部トルク依存性を検討すべきであるという方針が立った。しかし、長時間安定したピントを維持して観察を行うための顕微鏡システムの改良に時間がかかって、現時点で報告できるような結果は残念ながら得られていない。顕微鏡のピント維持機構は、九州大学の水野博士のマイクロレオロジー観察に用いられている顕微鏡を班会議の際に見学させて頂き、当研究室の助教の上野氏 (現 東京大学)、中山氏の協力で開発することができた。我々の装置では、必ずしも視野の中心にいるとは限らない回転するビーズに対してピントを合わせ続ける必要があるため、ピントの検出には画面の濃度の標準偏差を目安にすることにしたが、今のところ 10 分前後の連続した観察を安定して行っており (それ以上の長さでは試していない) 十分な性能を持つものが出来たと考えている。今後この装置を用いて鋭意実験を進めてゆく予定である。

一方、ATPase 活性が落ちた変異体でどのように回転の性質が変わるかを検討すれば、化学反応と力学的な動きの共役に関する知見が得られることを期待して  $\beta$ E190D 変異体の回転について、外部トルク依存性などを調べた。 $\beta$ E190D 変異は、加水分解反応に重要な水からのプロトンの引き抜きに関与する  $\beta$ サブユニットの 190 番目のグルタミン酸 (E) をアスパラギン酸 (D) に置換したもので、触媒活性が 1/100 に低下し、通常のポリスチレンビーズを回転プローブに用いた観察では見る事の出来ない ATP 加水分解待ちの  $80^\circ$  での停止状態が見えるという特徴があり (図 1A), F1-ATPase の変異体の中では最もよく調べられたものの一つである。しかし、この変異体に外部トルクをかけると、実験ごとに大きくばらつく結果が得られた (図 1B)。その結果、ストールトルクも大きくばらついた値が得られ、それ

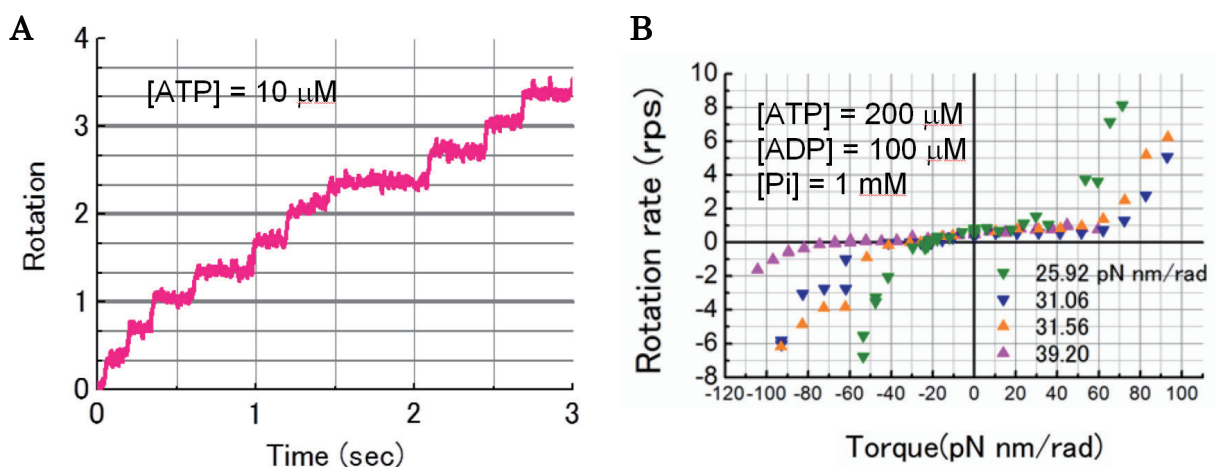


図 1  $\alpha_3\beta(\text{E190D})\gamma$  の回転特性

A. ATP 濃度  $10\mu\text{M}$  で見られるステップ回転. B. 外部トルクの回転速度に対する影響.

らはすべて ATP の加水分解の自由エネルギー差から期待されるものより低くなっていた。

以上の結果は、 $\beta$ E190D 変異が加水分解反応に影響するだけでなく、モーターの機械的な安定性を低下させ、回転にスリップが起こったことを示唆している。実際に熱処理を行って野生型と比較したところ、74 °C で安定性が明らかに低下しており、また、 $\gamma$ サブユニットのない $\alpha_3\beta_3$ 複合体の発現系をつくってゲル濾過で安定性を調べたところ、 $\gamma$ サブユニットがないと $\beta$ E190D 変異は $\alpha_3\beta_3$ 複合体を安定に形成できないことが分かった。凶らずも、ATPase 活性の低下した変異体の回転への影響が、分子全体の機械的な強度の不安定化という形で現れたのであるが、F1-ATPase が $\beta$ サブユニットでの ATP 加水分解活性と $\gamma$ サブユニットの回転をカップルすることを考えると、加水分解活性に重要なアミノ酸残基が機械的な動きに関してもそれを支える形で重要な役割を果たすのは合理的かも知れない。従来の研究で $\beta$ E190 残基周りの構造変化はほとんど注目を集めてきていなかったが、出来れば分子動力学計算などの手法も用いて更に検討してゆきたい。そのためには、2014 年度に報告した ATP の改良版 CHARM 力場 (J. Chem. Theory Comput. (2014) 10:4133–4142) が役にたつと期待される。

さらに分子機械のメカニズムの解明の一環として、松山大学の田母神氏らとの共同研究で、海洋性細菌の持つ光駆動型プロトンポンプであるプロテオロドプシンのプロトンポンプ活性について研究をおこなった。パルス光照射後の吸光度変化を広い pH 範囲で精査したところ、アルカリ性で新たな中間体を含むフォトサイクルが見つかり、そのフォトサイクルではプロトンを輸送するときのプロトンのポンプ蛋白への取込と吐き出しの順番が中性と異なっていることがわかった。更に驚くべきことに、中性条件とアルカリ性条件ではプロトン輸送の方向が逆転することを示唆する結果が我々の電流測定から得られた (Biochemistry in press (2016)). 我々は以前にラチェットモデルにもとづくイオン輸送のモデルを提案しており (Phys. Rev. E (2010) 81, 011137.), ラチェットモデルの範疇でこのような環境に対する多様な応答を再現できるかに興味を持たれる。

#### 参考文献：

- (1) S. Toyabe, and E. Muneyuki, *New J. Phys.* **17**, 015008 (2015).
- (2) K. Kawaguchi, S.-i. Sasa, T. Sagawa, *Biophys. J.* **106**, 2450–2457 (2014).
- (3) Y. Komuro, S. Re, C. Kobayashi, E. Muneyuki, and Y. Sugita, *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4133–4142 (2014).
- (4) J. Tamogami, K. Sato, S. Kurokawa, T. Yamada, T. Nara, M. Demura, S. Miyauchi, T. Kikukawa, E. Muneyuki, N. Kamo, *Biochemistry in press* (2016).
- (5) E. Muneyuki, and K. Sekimoto, *Phys. Rev. E* **81**, 011137 (2010).