

博士論文

ウシミトコンドリア由来 ATP 合成酵素の  
基本特性とその制御に関する 1 分子解析

小林 稜平

略語一覧 .....	6
第 1 章 序論 .....	8
1.1 F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP 合成酵素 .....	8
1.1.1 生理的役割 .....	8
1.1.2 構造と機能 .....	9
1.2 F <sub>1</sub> -ATPase と回転触媒説 .....	11
1.2.1 回転触媒説の提案 .....	11
1.2.2 結晶構造解析による回転触媒説の補強 .....	11
1.2.3 1 分子回転観察による回転触媒説の直接証明 .....	13
1.3 好熱菌 F <sub>1</sub> -ATPase を用いた 1 分子回転観察 .....	14
1.3.1 ATP 結合待ち状態の発見 .....	14
1.3.2 サブステップの発見 .....	15
1.3.3 ATP 開裂角度の決定 .....	15
1.3.4 ADP 解離角度の同定 .....	17
1.3.5 リン酸解離角度の同定 .....	19
1.3.6 ADP 阻害状態とその角度位置 .....	20
1.3.7 TF <sub>1</sub> の回転スキーム .....	21
1.4 磁気ピンセットによる 1 分子操作を用いた実験 .....	22
1.4.1 ADP 阻害状態への知見 .....	22
1.4.2 リン酸解離角度の同定 .....	24
1.4.3 反応素過程の角度依存性 .....	25
1.5 ミトコンドリア由来 F <sub>1</sub> の知見 .....	27
1.5.1 酵母ミトコンドリア由来 F <sub>1</sub> の回転観察 .....	27
1.5.2 ヒトミトコンドリア由来 F <sub>1</sub> の回転観察 .....	28
1.5.3 ウシミトコンドリア由来 F <sub>1</sub> の結晶構造解析 .....	31
1.6 F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP 合成酵素の制御 .....	33
1.6.1 ADP 阻害 .....	33
1.6.2 ε サブユニットによる阻害 .....	33
1.6.3 植物葉緑体における γ サブユニット内での分子内ジスルフィド結合の形成 .....	34
1.6.4 ミトコンドリアの IF <sub>1</sub> と α-proteobacteria の ζ サブユニット .....	35
1.7 IF <sub>1</sub> の性質 .....	36
1.7.1 ウシミトコンドリア由来 IF <sub>1</sub> の配列と構造 .....	36
1.7.2 研究初期の生化学実験による IF <sub>1</sub> 阻害の基本的な性質 .....	37
1.7.3 結晶構造解析から導かれる IF <sub>1</sub> の阻害機構 .....	39
1.7.4 速度論をもとにした IF <sub>1</sub> の生化学実験 .....	42
1.8 本研究の目的と概要 .....	43



<b>第2章</b>	<b>1 分子解析によるウシミトコンドリア由来 <math>F_1</math> の回転機構解明</b>	<b>44</b>
2.1	本章の目的	44
2.2	ATP 溶液中での回転	45
2.3	ATP $\gamma$ S 溶液中での回転	48
2.4	変異体 $bMF_1(\beta E188D)$ の回転	54
2.5	AMP-PNP による回転の停止	58
2.6	アジ化ナトリウムによる回転の停止	59
2.7	Stall-Release 反応速度定数と平衡定数の算出	60
2.8	本章の総括	64
2.8.1	<i>Long dwell</i> と <i>short dwell</i> に対応する加水分解素反応	64
2.8.2	$bMF_1$ の回転触媒スキーム	65
2.8.3	結晶構造との関係性	67
2.8.4	$bMF_1$ における素反応の角度依存性	67
<b>第3章</b>	<b>生化学実験による <math>IF_1</math> の速度論的解析</b>	<b>69</b>
3.1	本章での目的	69
3.2	$bMF_1$ の ADP 阻害の定量	69
3.3	$IF_1$ 阻害の時間変化	71
3.4	$k_{lock}$ と $K_M^{IF_1}$ の ATP 濃度依存性	73
3.5	$IF_1(E30A)$ と $IF_1(Y33A)$ 変異体を用いた解析	75
3.6	本章の総括と今後への課題	77
3.6.1	$k_{on}^{eff}$ の ATP 濃度依存性	77
3.6.2	$IF_1$ 阻害機構と結晶構造解析との対応付け	78
<b>第4章</b>	<b>1 分子解析による <math>IF_1</math> の制御機構解明</b>	<b>80</b>
4.1	本章の目的	80
4.2	$IF_1$ 阻害定数の算出	80
4.3	$IF_1$ 阻害による停止位置	83
4.4	磁気ピンセットによる回転再開条件の探索	85
4.5	回転再開割合の拘束角度依存性	87
4.6	本研究の総括と今後への課題	90
4.6.1	$IF_1$ の 2 段階阻害機構と速度定数の算出	90
4.6.2	$IF_1$ 停止角度と結晶構造との対応づけ	90
4.6.3	$IF_1$ 解離条件と生理的意味	91
4.6.4	$IF_1$ 解離の角度依存性と結晶構造から想定される解離スキーム	93
<b>第5章</b>	<b>本研究の総括</b>	<b>95</b>
<b>第6章</b>	<b>実験手法</b>	<b>97</b>
6.1	遺伝子変異導入	97

6.1.1	培地・buffer 調製 .....	97
6.1.2	遺伝子操作 .....	98
6.2	$bMF_1$ の精製 .....	104
6.2.1	培地・buffer 調製 .....	104
6.2.2	SDS-PAGE の準備 .....	106
6.2.3	精製 .....	108
6.3	$IF_1$ の精製 .....	113
6.3.1	培地・buffer 調製 .....	113
6.3.2	精製 .....	114
6.4	1 分子回転観察 .....	119
6.4.1	ガラスの準備 .....	119
6.4.2	プローブの準備 .....	120
6.4.3	1 分子回転観察の準備 .....	122
6.4.4	顕微鏡セットアップ .....	123
6.4.5	データ解析と実験方法の詳細 .....	124
6.4.5.1	粒子の選定方法 .....	124
6.4.5.2	回転速度の算出 .....	124
6.4.5.3	温度依存性実験 .....	125
6.4.5.4	Response time の計測(パワースペクトル解析)の方法と意味 .....	125
6.4.5.5	ドリフト解析 .....	125
6.4.5.6	Dwell time 解析 .....	126
6.4.5.7	角度差の算出 .....	126
6.4.5.8	Change-Point analysis .....	127
6.5	磁気ピンセットの概要 .....	128
6.6	生化学実験 .....	129
6.6.1	実験手順 .....	129
6.6.2	解析方法 .....	131
<b>第 7 章</b>	<b>付録 .....</b>	<b>133</b>
7.1	補足データ .....	133
7.1.1	最大回転速度の温度依存性 .....	133
7.1.2	1 分子計測系の Response time の測定 .....	134
7.1.3	Dwell time 解析の追加データ .....	135
7.1.4	ATP 開裂反応の角度依存性 .....	136
7.1.5	Stall-Release 実験から求められる反応ごとに生み出されるトルクの見積もり .....	137
7.1.6	生化学実験での ADP 阻害状態の解析と $IF_1$ 阻害との関連性 .....	138
7.1.6.1	活性が低い測定条件での $bMF_1$ の ADP 阻害状態 .....	138

7.1.6.2	活性状態と ADP 阻害状態の平衡状態の速度論的解析.....	139
7.1.7	IF <sub>1</sub> 阻害状態タイムコースのフィッティング .....	141
7.1.8	1 分子回転計測による ADP 阻害の定量.....	145
7.1.9	ガラス面での IF <sub>1</sub> <sup>1-60</sup> mScarlet 分子の吸着量の評価.....	146
7.2	IF <sub>1</sub> 阻害タイムコースの解析プログラム.....	148
7.2.1	1 指数関数フィッティングのためのプログラム .....	148
7.2.2	2 指数関数フィッティングのためのプログラム .....	150
7.3	数式の導出 .....	153
7.3.1	ミカエリスメンテン式と基質結合定数の導出.....	153
7.3.2	Dwell time 解析で用いた減衰指数関数の導出.....	155
7.3.3	IF <sub>1</sub> 阻害メカニズムに基づく見た目の阻害定数の導出 .....	157
7.3.4	Survival Probability と時間の関係を表す減衰指数関数の導出.....	158
7.4	Change-Point analysis の概略 .....	159
参考文献 .....		162
研究業績 .....		171
謝辞 .....		174

## 略語一覧

ADP	adenosine 5'- diphosphate
AMP-PNP	adenylyl imidodiphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATP $\gamma$ S	adenosine 5'-( $\gamma$ -thio) - triphosphate
<i>b</i> MF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -ATPase from bovine mitochondria
bp	base pair
BSA	albumin bovine serum
CBB	coomassie brilliant blue
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -ATPase from <i>Escherichia coli</i>
fps	frame per second
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HEPES-KOH	KOH で pH 調整した HEPES 水溶液
<i>h</i> MF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -ATPase from human mitochondria
HPLC	high performance liquid chromatography
IF <sub>1</sub>	ATPase Inhibitory Factor 1
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KP <sub>i</sub>	potassium phosphate buffer
MilliQ	超純水
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	optical density (光学濃度)
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	phosphoenolpyruvic acid
P <sub>i</sub>	inorganic phosphate
PK	pyruvate kinase
<i>pmf</i>	proton motive force
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
rps	revolutions per second
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate

SMP	sub-mitochondrial particle
TAE	Tris Acetate EDTA
TE	Tris-EDTA
TF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -ATPase from thermophilic <i>bacillus</i> PS3
Thio-P <sub>i</sub>	thiophosphate
γMF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -ATPase from yeast mitochondria

## 第1章 序論

私たちの体の中には多くの種類の生体分子モーターが存在し、それぞれの特性を活かしながら生命活動の維持に貢献している。それらの多くは、「生体内のエネルギー通貨」としても知られる ATP を ADP と無機リン酸( $P_i$ )に加水分解する触媒であり、そのときに得られる ATP の加水分解エネルギーを利用して運動を行う。その中でも  $F_0F_1$  ATP 合成酵素の一部で回転分子モーターとして知られる  $F_1$ -ATPase ( $F_1$ )は、ATP 加水分解反応の際に非常に特徴的でダイナミックな構造変化があることが知られている。他の分子モーターと比較したとき、 $F_1$  が持つ最も特徴的な性質は化学力学共役機構が可逆だということである。 $F_1$  は数多く存在する分子モーターの中でも、「化学エネルギーの利用による効率的な力学エネルギー変換メカニズム」と「外部からの力学操作によって触媒反応制御」という両面を調べることができるため、モデルタンパク質として長く研究されてきた。

本研究では  $F_1$ -ATPase、特にウシミトコンドリア由来  $F_1$ -ATPase( $bMF_1$ )を研究の対象とし、その動作原理を結晶構造との知見と合わせて解明することを目指した。以下では、 $F_1$  と  $F_0F_1$  ATP 合成酵素、さらにその制御機構について説明する。

### 1.1 $F_0F_1$ ATP 合成酵素

#### 1.1.1 生理的役割

生体内で行われている筋肉の収縮、生体分子の合成、細胞成長や分裂、物質の輸送など、エネルギーを必要とする細胞活動には、共通して ATP を加水分解する反応を必要とする。そのため、私たちが生きていくにあたり ATP は細胞活動によって大量に消費され、それらを補うため大量に生産されている。

動物の場合、ATP は主に解糖系と酸化的リン酸化の 2 つの過程で生産される。解糖系では体内に入ってきたグルコースのリン酸化などを経て ATP 分子が作られる。解糖系の反応は酸素がなくても進行するため、主に嫌気条件下でも ATP は合成されるが、その量は少ない。一方、酸化的リン酸化は好気条件で進む反応であり、体内で生産される ATP はほとんどこれによって生産されている。酸化的リン酸化の過程では、呼吸鎖の電子伝達系によって生じたプロトンの濃度勾配を利用して  $F_0F_1$  ATP 合成酵素が ATP を合成する(図 1-1)。類似のシステムは光合成生物でも存在しており、日光のエネルギーを利用して電気化学ポテンシャル差を作り出し、 $F_0F_1$  ATP 合成酵素が ATP を生産している。

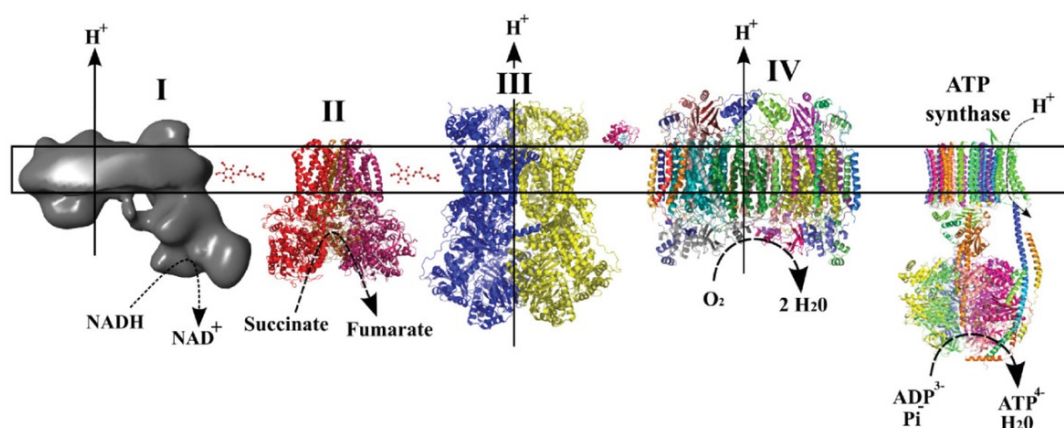


図 1-1 呼吸鎖に関わる 5 つの酵素<sup>1</sup>

Complex I~IV では電子をやりとりしながらプロトンの濃度勾配を形成する。Complex V としても知られる ATP 合成酵素が本研究の対象である。

### 1.1.2 構造と機能

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP 合成酵素(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>)は真核生物ではミトコンドリアの内膜、バクテリアでは原形質膜、植物では葉緑体のチラコイド膜など普遍的に存在する膜タンパク質である。分子量は約 500 kDa 前後で複数のサブユニットから構成される複雑な構造をとっている。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は生体内では膜間のプロトンの濃度差によって生じるプロトン駆動力(proton motive force; *pmf*)を利用して ADP と無機リン酸(P<sub>i</sub>)から ATP を合成する反応を触媒する。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> はその名の通り、2 つの分子モーターF<sub>0</sub>と F<sub>1</sub> からなる。F<sub>0</sub>は膜内在性タンパク質であり、プロトンの透過路を有している。数多くの構造解析から、c サブユニットの構成数が種によって異なることが報告されており、その最小構成要素は ab<sub>2</sub>c<sub>8-15</sub> である<sup>2-9</sup>(ウシミトコンドリア; 8、大腸菌・好熱菌・酵母; 10、ホウレンソウ葉緑体; 14、シアノバクテリア; 15 など)(図 1-2)。ab<sub>2</sub> サブユニットに対して、膜内でリングを形成する c サブユニットが回転しながらプロトンを輸送するというメカニズムは種によらず共通している。近年の低温電子顕微鏡(Cryo-EM)技術の発達で得られた F<sub>0</sub>の高解像構造により、a サブユニットと c リングが協働した詳細なプロトン輸送機構が提案されている<sup>10</sup>。いずれにしても、F<sub>0</sub>が膜外から膜内へプロトンを輸送するとき、膜外から見て回転子を時計回り方向に回転させる。一方で、F<sub>1</sub>は膜外に存在するタンパク質で、ATP 合成反応の活性中心を持つ。構造の詳細については次項で述べることにする。F<sub>1</sub> 単独では ATP の加水分解の際に生じる自由エネルギー差を利用して、回転子を反時計回りに回転させる。

F<sub>0</sub>のプロトン輸送と F<sub>1</sub>の ATP 合成/加水分解反応は共通の回転子  $\gamma$  や OSCP などの peripheral stalk を通して共役している(図 1-3)。そのため、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> 内部ではプロトンの電気化学エネルギーと ATP の化学エネルギーが相互に変換できるようになっている。生体内条件のように *pmf* が十分に大きい場合には、F<sub>0</sub>は F<sub>1</sub> を逆回転させてプロトンを膜内に輸送して ATP を合成する。しかし、低酸素状態や疾病などにより *pmf* が十分に担保されないと、F<sub>1</sub>が F<sub>0</sub>の回転方向を逆転させ、F<sub>1</sub>は ATP 加水分解を行い、膜内外のプロトン濃度勾配を作り出

そうとする。このような ATP 浪費を防ぐため、さまざまな制御機構があることが知られている。詳細は後述することにする。

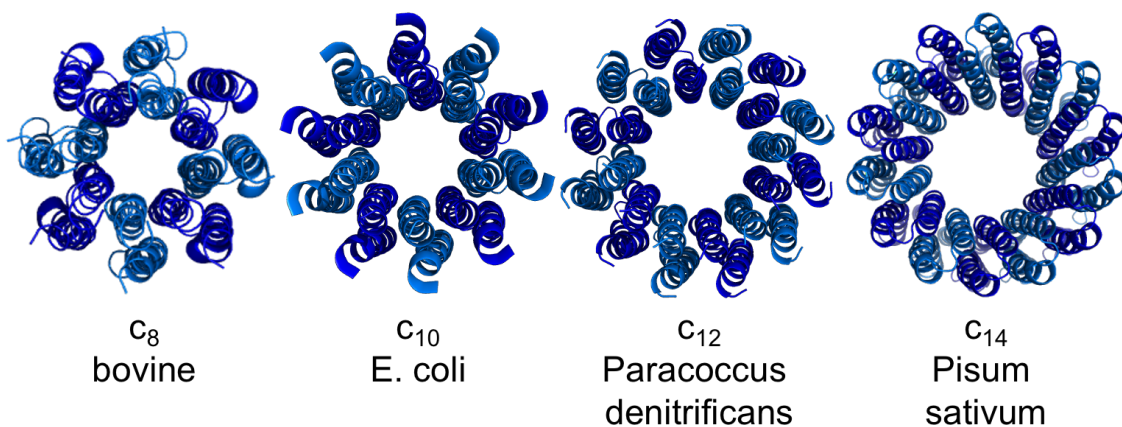


図 1-2  $F_0$  の c-ring の数(本文中で示したものうち、4 種類のみを示した)

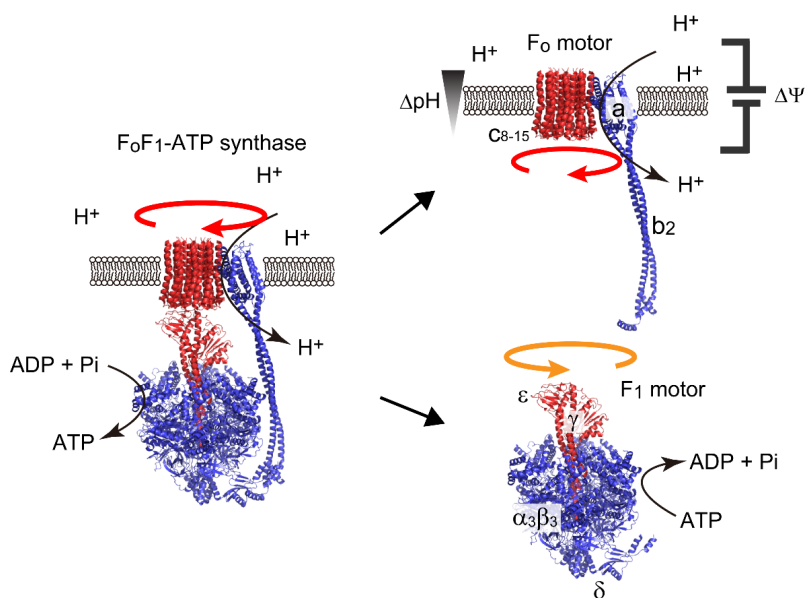


図 1-3 ATP 合成酵素を構成する  $F_0$  と  $F_1$ <sup>11</sup>

$F_0$  は回転子の c リングを時計回り方向に回転させる。一方、 $F_1$  は ATP の加水分解の際に固定子の  $\alpha_3\beta_3$  リングを反時計回り方向に回転させる。 $\Delta pH$  と膜間の電位差  $\Delta\Phi$  によって形成される  $pmf$  が ATP の加水分解エネルギーより大きいと、 $F_0$  が  $F_1$  を逆回転させて、 $F_0F_1$  全体では ATP を合成する。しかし、 $pmf$  によって  $F_0$  が生み出すトルクが ATP の加水分解エネルギーによって  $F_1$  が生み出すトルクより小さいと  $F_1$  が  $F_0$  を逆回転させて、 $F_0F_1$  全体では ATP を加水分解する。



## 1.2 F<sub>1</sub>-ATPase と回転触媒説

膜内在性の F<sub>0</sub> と比べて、水溶性の F<sub>1</sub> は取り扱いやすさと高い安定性から重点的に研究されてきた。F<sub>0</sub> から切り離されると、F<sub>1</sub> だけでは ATP を ADP と P<sub>i</sub> に加水分解する。触媒反応に伴って、F<sub>1</sub> は固定子に対して回転子を反時計回りに回転させる。バクテリア型でもミトコンドリア型でも、F<sub>1</sub> は  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  から構成されている。 $\delta$  と  $\epsilon$  の役割はバクテリア型とミトコンドリア型で異なることが報告されている<sup>12</sup> が、回転分子モーターとしての最小単位は  $\alpha_3\beta_3\gamma$  である。以降では、F<sub>1</sub> という場合にはこの最小単位  $\alpha_3\beta_3\gamma$  を指す。

### 1.2.1 回転触媒説の提案

1978 年、プロトンの電気化学ポテンシャルが ATP の合成に関与しているという化学浸透圧説<sup>13</sup> を唱えた Peter Mitchel がノーベル化学賞を受賞した。その後の ATP 合成に関する研究者の興味はそのメカニズムへと向かっていった。すなわち、「F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> はどのように ATP を合成するのか」という点である。1981 年、Paul Boyer が「3 つの  $\beta$  が協働的に ATP 合成/分解反応を触媒し、中心の回転軸  $\gamma$  がそれを伝えていく」という回転触媒説を唱えた<sup>14</sup> (図 1-4)。当時、回転しながら触媒反応を行う酵素はバクテリアのべん毛しか知られていなかったもので<sup>15</sup>、この提案を信じる科学者はそう多くなかった。

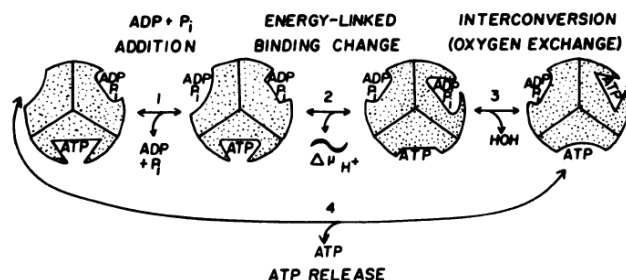


図 1-4 Paul Boyer によって提唱された回転触媒説<sup>14</sup>

### 1.2.2 結晶構造解析による回転触媒説の補強

Paul Boyer の提案から 10 年以上たった 1994 年、John Walker らのグループはウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>(bMF<sub>1</sub>)の結晶構造が解明された<sup>16</sup>。その構造によると、3 個の  $\alpha$  と  $\beta$  が交互に並んだ 6 量体リングを形成しており、そこにできた空隙に棒状の  $\gamma$  サブユニットが突き刺さっていた。また、触媒部位は  $\alpha\beta$  の界面付近であるとされた。触媒反応に関わる残基は主に  $\beta$  サブユニットに存在し、general base と呼ばれる Glu188 残基、NTPase 加水分解酵素に広く存在する P-loop 配列内の Lys162 などが発見された。一方で、 $\alpha$  サブユニットではアルギニンフィンガーと呼ばれる Arg373 残基<sup>17,18</sup> が発見された程度だった。のちの量子化学計算<sup>19,20</sup> や変異体 TF<sub>1</sub> を用いた 1 分子計測<sup>21</sup> によって、これらの残基の重要性は再度確認された。

回転触媒説をさらに確固たるものにしたのは、サブユニットに結合したヌクレオチド

の状態であった。 $\alpha$  サブユニットは 3 つとも AMP-PNP と呼ばれる ATP アナログを結合しており、その構造変化は小さくどれも同じような構造をとっていた。一方で  $\beta$  サブユニットは 3 つとも大きな構造変化を伴い、ヌクレオチドの結合状態もそれぞれ異なっていたことから触媒サブユニットであると考えられた。1 つ目の  $\beta$  サブユニットは AMP-PNP を結合しており、これは加水分解前状態として  $\beta_{TP}$  と定義された。2 つ目の  $\beta$  は ADP を結合した状態で、加水分解後状態として  $\beta_{DP}$  と名付けられた。基質を結合した状態である  $\beta_{TP}$  と  $\beta_{DP}$  ではその C 末端部分が  $\gamma$  サブユニット側に大きく倒れこんだ closed 構造をとっていた。残るひとつの  $\beta$  サブユニットにはヌクレオチドが結合していない空状態として  $\beta_E$  と名付けられた。この状態は、ATP の分解と生成物の解離が終わり次のヌクレオチドの結合を待っている状態である。 $\beta_E$  のヌクレオチド結合サイトは空いた状態であり、その C 末端部分も倒れこんだような構造は取っていないため、open 構造と呼ばれる状態だと定義された。

以上のように、John Walker グループによって明らかになった結晶構造は、3 つの  $\beta$  が非対称にヌクレオチドとの結合状態を変えて、それが  $\gamma$  に伝わって回転が進行するという回転触媒説を強く支持するものであった。John Walker グループによって発表された *b*MF<sub>1</sub> の結晶構造は数多く存在し、阻害剤やリン酸アナログ共存状態での構造解析も進められた。

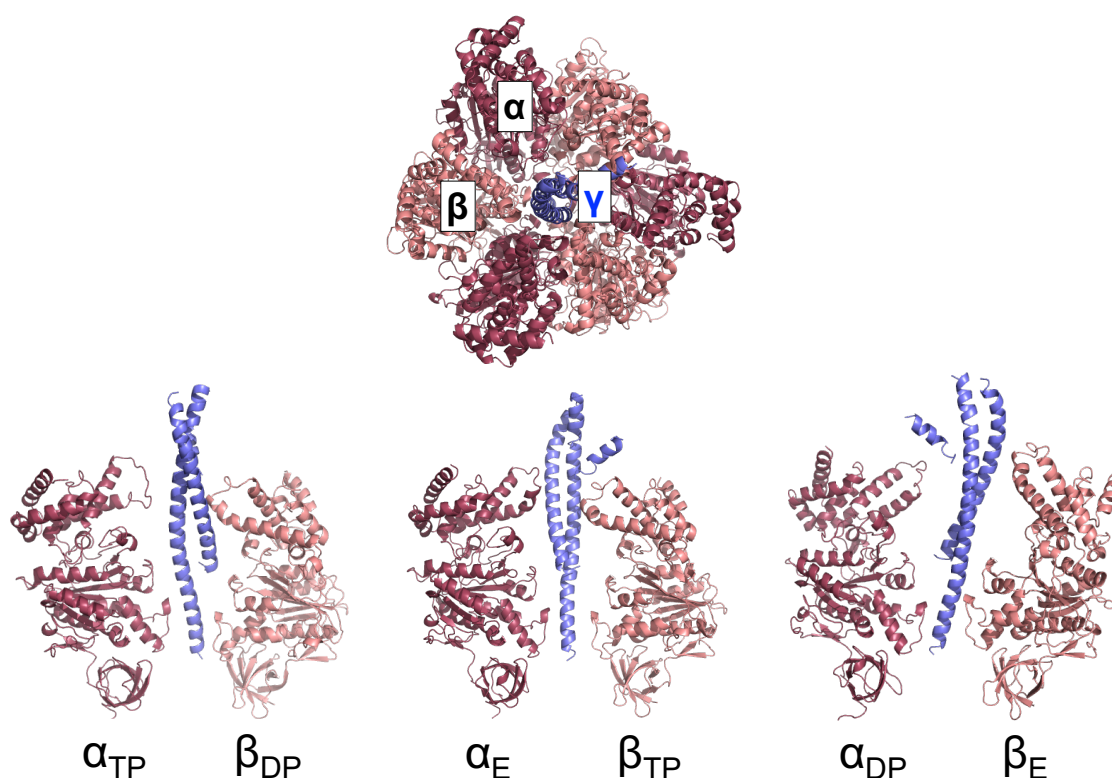


図 1-5 John Walker グループによって解明された結晶構造<sup>16</sup>

### 1.2.3 1 分子回転観察による回転触媒説の直接証明

Paul Boyer の回転触媒説を直接証明しようとする数々の生化学実験<sup>22,23</sup>が行われたが、それらの溶液系の実験であり間接的な情報しか得られなかった。そこで、野地・安田らは  $F_1$  の回転を直接観察できるような系を組み立て、この問題の解決を目指した<sup>24</sup>。 $F_1$  の固定子リング  $\alpha_3\beta_3$  の N 末端部分にヒスチジンタグ(His-tag)と呼ばれる化学修飾を導入し、Ni-NTA ガラス表面に固定できるようにした。さらに中心軸である  $\gamma$  サブユニットに変異を導入したのちビオチン化することで、回転を検出できるようなプローブを結合できるようにした(図 1-6 (A))。ここで用いたプローブはアクチンフィラメントを蛍光色素で標識したものである。これらの実験系を整えたのち、蛍光顕微鏡を用いて ATP 存在下でプローブの動きを観察したところ、反時計方向に回転するものがいくつも観察された。ATP 非存在下や阻害剤添加時では回転が観察されなかったことや、回転速度にアクチンフィラメントの長さ依存性も観察された(図 1-6 (B))ことから、 $F_1$  が ATP 加水分解を駆動力としてはたらく回転分子モーターであることが明らかになった。この結果がもとになり、回転触媒説を唱えた Paul Boyer と結晶構造を明らかにした John Walker は 1997 年、ノーベル化学賞を受賞した。

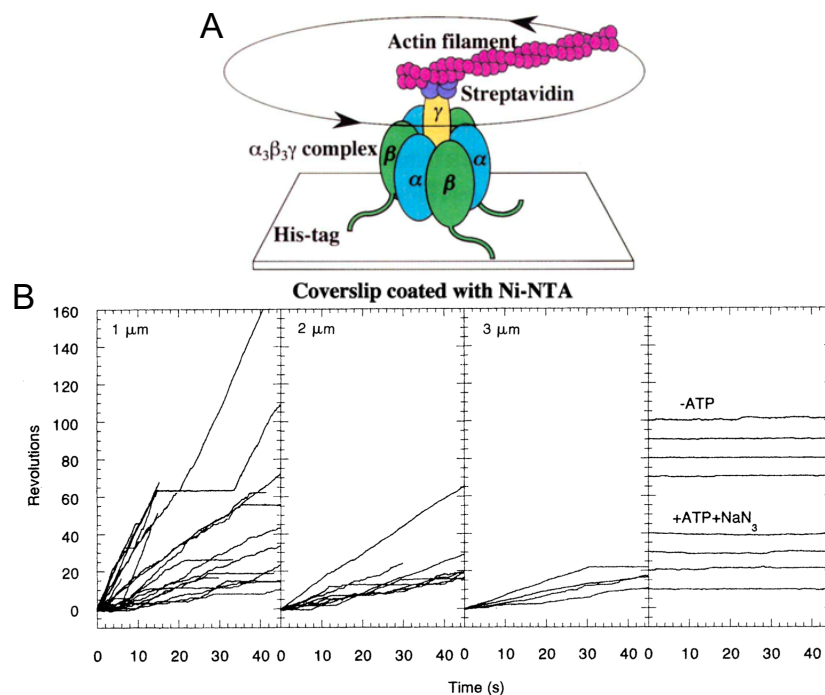


図 1-6  $F_1$  の回転証明(参考文献<sup>24</sup>をもとに図を作成)

(A) 1 分子回転観察系。 $F_1$  は His-tag を介してガラス面に固定されている。回転子の  $\gamma$  サブユニットには蛍光標識したアクチンフィラメントが結合されている。(B)  $\gamma$  サブユニットの回転トラジェクトリーの例(横軸が経過時間、縦軸が累積回転数)。図中には、アクチンフィラメントの長さを示しており、左から 1  $\mu\text{m}$ 、2  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$  のデータを表す。右端のデータは ATP 非存在下と ATP(2 mM)と阻害剤の NaN<sub>3</sub>(10 mM)存在下の結果である。これらの条件では回転は観察されなかった。

### 1.3 好熱菌 F<sub>1</sub>-ATPase を用いた 1 分子回転観察

これまで数々の 1 分子回転観察が行われ、プローブ<sup>25</sup>や顕微鏡システム<sup>26</sup>の改良がなされた。しかし、固定子  $\alpha_3\beta_3$  をガラス面に、回転子  $\gamma$  に回転検出用プローブを結合するという野地・安田らによって開発された系からその根本的な方法は変わっていない。これらの実験は F<sub>1</sub> の特徴的な性質を解明するのに欠かせない役割を果たしてきた。本章では、2000 年代に精力的に行われた好熱菌由来 F<sub>1</sub>(TF<sub>1</sub>)の回転触媒機構解明に絞ってその歴史と発見を概略する。また、TF<sub>1</sub> の機構解明時に用いられた技術のいくつかを *b*MF<sub>1</sub> の機構解明時に応用している。そのような技術は本文中、青字強調した。

<p>1. ATP結合待ち状態の発見</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● ATP低濃度での実験</li> <li>● 回転の3回対称性を発見</li> <li>● 停止時間がATPの濃度に依存</li> </ul>	<p>2. サブステップの発見</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● プローブとして金コロイドを</li> <li>● <math>K_m</math>付近のATP濃度での実験</li> <li>● 90°/30°のステップの分割</li> <li>● 90°のステップはATP結合反応により駆動</li> </ul>	<p>3. ATP開裂角度の特定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● ATPγSとF<sub>1</sub>変異体(βE190D)を用いた実験</li> <li>● ATP開裂反応速度が低下</li> <li>● ATP開裂待ち停止がATP結合待ち停止の+200°の位置に存在</li> </ul>
<p>4. ADP解離角度の同定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 蛍光ATP(Cy3-ATP)を用いた実験</li> <li>● 回転と蛍光強度を同時に計測</li> <li>● ATP開裂待ち停止がATP結合待ち停止の+240°の位置に存在</li> </ul>	<p>5. リン酸解離角度の同定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 80°の停止時間がリン酸濃度依存的に変化</li> <li>● 磁気ピンセットを用いた実験</li> <li>● リン酸解離待ち停止がATP結合待ち停止の+320°の位置に存在</li> </ul>	

図 1-7 TF<sub>1</sub> の回転スキーム解明の概略

#### 1.3.1 ATP 結合待ち状態の発見

ATP 存在下での連続回転を発見した安田らは次に、ATP 濃度を下げて 1 μM 以下の条件で回転を観察した<sup>27</sup>。その結果、F<sub>1</sub> が 120°ごとに停止して 3 点のステップ回転をすることを発見した(図 1-8)。ATP 濃度を変化させたときの停止時間(dwell time)の解析からこの停止が ATP 結合待ち時間に起きる停止状態だと特定した。さらに、構造解析で観察された結果と一致して、F<sub>1</sub> は 1 回転中で 3 つの ATP を加水分解することも明らかになった。

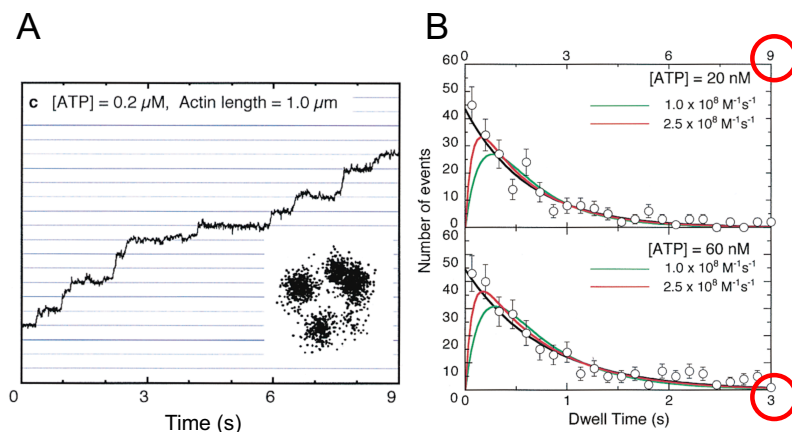


図 1-8 120°ステップの解析 (図は参考文献<sup>27</sup>をもとに作成)

(A) ATP 低濃度条件での 3 回対称ステップ。(B) ATP 低濃度条件で現れる停止の dwell time 解析。ATP 濃度が 3 倍変化すると、停止時間の長さも約 3 倍変化した。

### 1.3.2 サブステップの発見

長さ  $1\ \mu\text{m}$  以上のアクチンフィラメントを用いた解析では、溶液から受ける粘性抵抗は  $F_1$  が生み出す回転トルクに対して無視できないほど大きく、 $F_1$  本来の回転が観察できなかった。さらなる改良として、安田らは  $40\ \text{nm}$  の金コロイドを回転プローブとして使用し、粘性抵抗の影響を無視できる実験環境を構築した<sup>28</sup>。その結果、最大回転速度が  $130\ \text{rps}$  と見積もられ、これは生化学実験で算出された値とほぼ一致した(図 1-9 (A))。さらに、ATP 濃度が  $K_m$ (ミカエリスメンテン定数)付近において、アクチンフィラメント使用時には観察されなかった非常に短い回転停止点を発見した。ATP 結合待ちの  $120^\circ$  ほどの停止の他に発見されたこれらの停止の角度差は  $90^\circ$ 、 $30^\circ$ であった(のちに  $80^\circ/40^\circ$ に修正、後述)。図 1-9 (B) のインセット中で緑色の停止は ATP 濃度依存的にその停止時間が変わったことから、以前発見された ATP 結合待ち状態だと断定された。一方で、赤色の停止は ATP 濃度に依存しなかった。さらに、待ち時間の解析から、この停止には長さがともに  $1\ \text{ms}$  程度の 2 つの反応素過程が含まれることも明らかになった。次項でこの詳細を述べる。なお、以下では、ATP 結合待ち状態と特定された緑色の停止に対して赤色の停止は  $90(80)^\circ$ 先にあることから、赤色の停止を「ATP 結合待ち角度から  $90(80)^\circ$ 先にある停止」と呼ぶことにする。

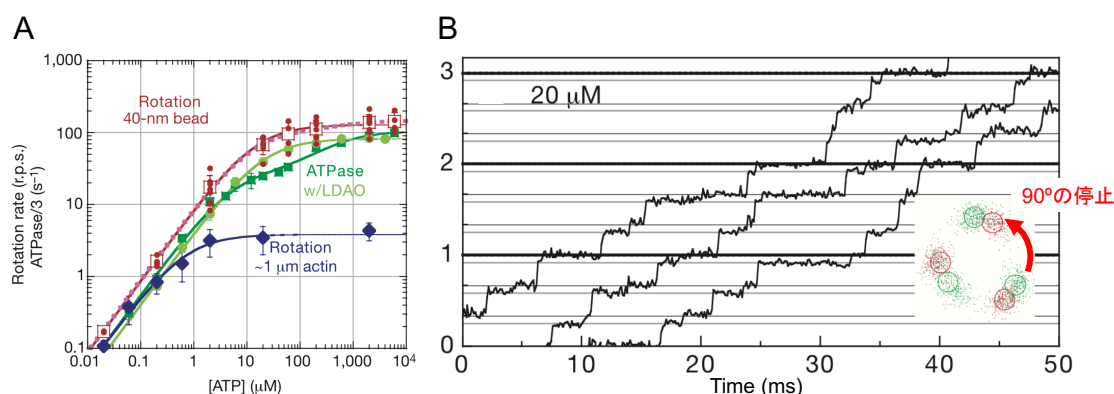


図 1-9 安田らによる実験結果 (図は参考文献<sup>28</sup>をもとに作成)

(A) 多分子系と 1 分子解析系での加水分解速度の比較。(B)  $20\ \mu\text{M}$  ATP 条件でのタイムコースとプローブ重心の XY プロット。緑色の  $0^\circ$  の停止が ATP 結合待ち状態に対応する。

### 1.3.3 ATP 開裂角度の決定

島袋らは  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  という ATP アナログと触媒サイトの 1 残基に変異を加えた  $\text{TF}_1(\beta\text{E190D})$  を用いた回転観察を行い、ATP 結合待ち角度から  $90(80)^\circ$  先にある停止に含まれる反応素過程のうちのひとつが ATP 開裂待ち状態であることを特定した<sup>29</sup>。

$\text{ATP}\gamma\text{S}$  は ATP の三リン酸部分末端の酸素原子が硫黄原子に変わった構造で、加水分解反応を遅くする ATP アナログとして知られている。また、結晶構造解析から  $\beta$  サブユニットの E188 残基( $b\text{MF}_1$  の場合)は触媒反応に重要な役割を果たす残基のひとつであることが知られていた。後続の理論研究<sup>20</sup> から、この残基は加水分解時のプロトンの受け渡しを担う残基であることが明らかになった。筆者らは  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  と、 $b\text{MF}_1$  の  $\beta\text{E188}$  に相当する  $\beta\text{E190}$



残基のアスパラギン酸変異体  $TF_1(\beta E190D)$  の 2 つを使って 1 分子回転解析を行った。その結果、両者ともに「ATP 結合待ち角度から  $90(80)^\circ$  先にある停止」のうちのひとつの反応を極端に遅くすることが明らかになった(図 1-10)。彼らは、これらの摂動によって影響を受けた反応を ATP 開裂待ち状態と断定した。この実験で  $90/30^\circ$  の角度位置は  $80/40^\circ$  に訂正された。本論文でもこれ以降では  $80/40^\circ$  という数値を用いることにする。

1 分子回転観察の結果は一般的に、 $120^\circ$  回転中の停止位置を定めるだけの系であり、 $\beta$  の協働性を仮定した上で 1 回転中のスキームを考慮している。「あるひとつの ATP 分子に着目した場合の ATP 開裂反応場所」の特定をするため、有賀らは 3 つの  $\beta$  のうち、ひとつにだけ変異体  $\beta E190D$  を導入して対称性を崩した hybrid  $F_1$  を用いての回転観察を行った<sup>30</sup>(図 1-11 (A))。島袋らの実験によって  $TF_1(\beta E190D)$  の ATP 開裂反応が 320 倍(1 ms から 320 ms)伸びるだけでなく、ATP 結合定数も 10 倍( $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  から  $3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )変化することも利用した。すなわち、野生型  $\beta$  で ATP が結合・開裂する場合に比べて、変異  $\beta$  における ATP 結合・開裂する場合の方がともに反応が遅く、回転停止状態として検出できるという系を組み立てた。その結果、ATP 結合待ち停止に対して  $200^\circ$  先の位置で ATP 開裂待ち状態が存在することが明らかになった(図 1-11 (B))。

本論文、2.2 では  $ATP\gamma S$  を用いた回転観察の結果を、2.3 では変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  を用いた結果を詳述する。

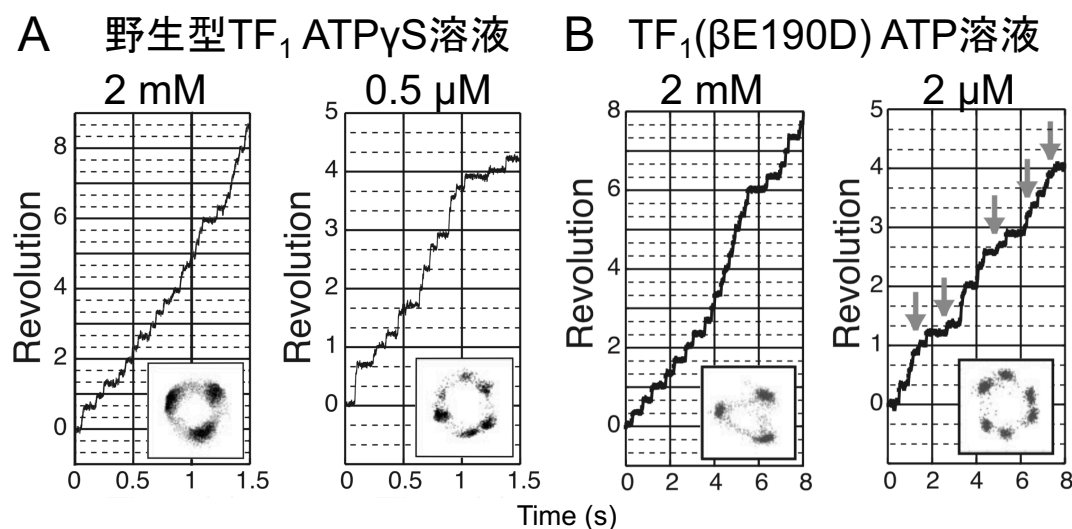


図 1-10 (A)  $ATP\gamma S$  と(B)  $TF_1(\beta E190D)$ を用いた回転観察 (図は参考文献<sup>29</sup>をもとに作成) いずれも、基質高濃度では濃度に依存しない  $80^\circ$  の停止のみが、基質低濃度では  $0^\circ$  と  $80^\circ$  の 2 種類の停止が観察された。

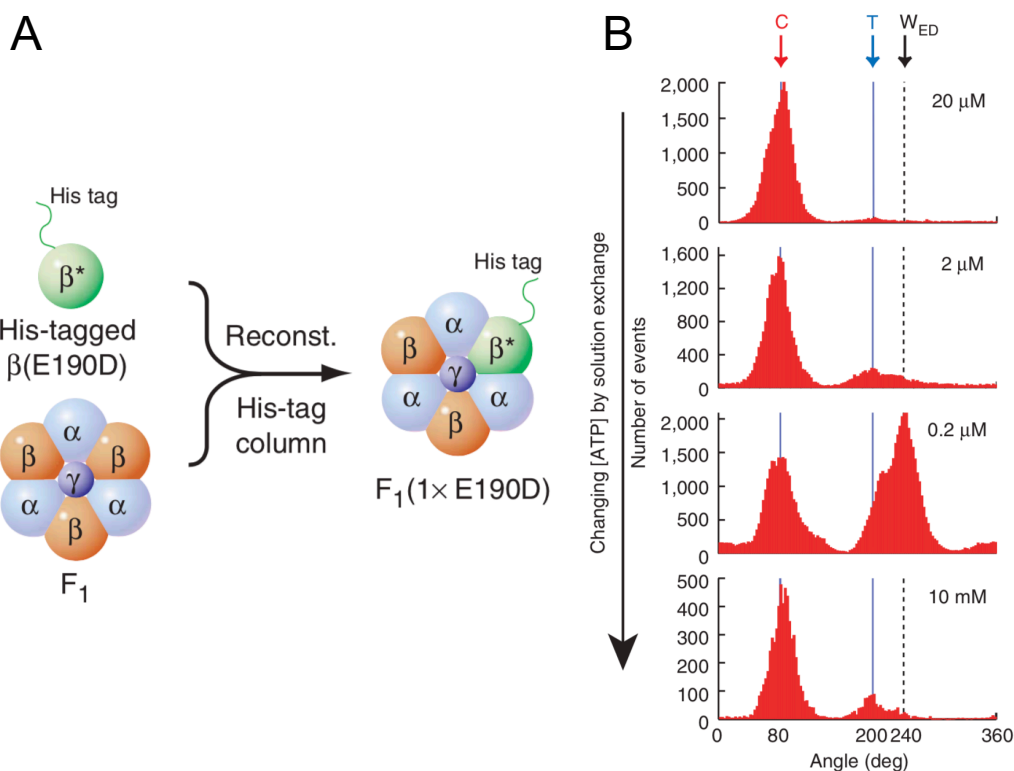


図 1-11 Hybrid F<sub>1</sub>を用いた ATP 開裂反応角度の同定<sup>30</sup>

(A) Hybrid F<sub>1</sub>の構成。確率的に βE190D が 2 つ以上入る可能性もあるが、筆者らはそれらを回転観察の結果によって区別している。(B) ATP 濃度別の角度ヒストグラムの変化。図中、C は βE190D による ATP 開裂反応位置で 80°に相当、T は βE190D による「ATP 開裂反応ではないもうひとつの反応」位置で 200°に相当、W<sub>ED</sub> は βE190D による ATP 開裂反応位置で 240°に相当する。「ATP 開裂反応ではないもうひとつの反応」は直後の足立らの実験によってリン酸解離反応であることが明らかになった。

#### 1.3.4 ADP 解離角度の同定

ATP 開裂の角度位置が定まったため、次に生成物である ADP とリン酸の解離角度への探索が行われた。TF<sub>1</sub> を用いた既存の 1 分子回転観察系では ADP 解離に基づく回転停止点は観察されにくく、別の観察系の構築によってその実験が進められた。西坂らは基質として蛍光ラベルされた ATP(Cy3-ATP)を使うだけでなく、観察系の照明システムにも工夫を加えた<sup>31</sup>。蛍光色素を励起する光の偏光を周期的に調節することで、それに伴って生じる蛍光強度にも周期性が生まれる(図 1-12(A))。F<sub>1</sub> と Cy3-ATP/Cy3-ADP が結合解離することで、蛍光強度の周期的な変化が崩れてずれが生じる。蛍光強度とビーズの回転をともに観察することで、Cy3-ATP の結合位置と生成物として生じる Cy3-ADP の角度位置の特定を行った。その結果、Cy3-ATP が結合してから 240°から 320°の位置で Cy3-ADP 由来の蛍光が観察された(図 1-12 (B))。

足立らはこのシステムに磁気ピンセット(後述)による操作を加え、角度決定精度を向上

させた<sup>32</sup>(図 1-13 (A))。磁気操作で加水分解方向にゆっくりと強制回転させて、それに伴う蛍光強度の変化を観察した。その結果、この実験からも ADP 解離は ATP 結合待ち角度から 240°の位置で起きることが分かった(図 1-13 (B))。後続の研究では ATP と ADP の結合解離の角度依存性から ATP 合成時の知見についても得られている<sup>33</sup>。

なお、近年 F<sub>1</sub> の類縁体である V<sub>1</sub>-ATPase(*Enterococcus hirae* 由来)の回転観察が行われ、40 nm 金コロイドを用いた観察系でも ADP 解離待ち状態由来の停止が観察された<sup>34</sup>。TF<sub>1</sub> との違いは ADP との親和性の違いによるもので、回転分子モーター種によってはっきり分かれるものであろう。

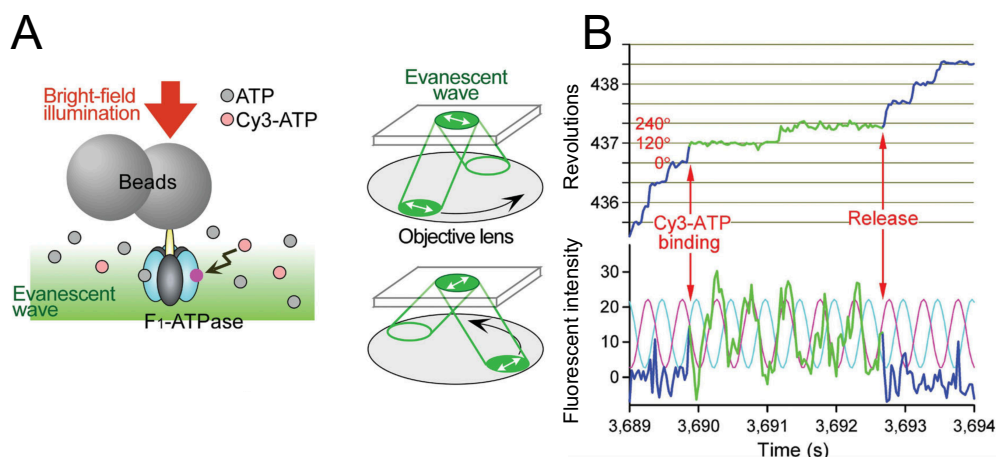


図 1-12 西坂らによる回転と蛍光の同時計測系(図は参考文献<sup>31</sup>をもとに作成)  
(A) 同時計測系の実験系と光学系。ATP の結合解離を全反射型蛍光顕微鏡で、 $\gamma$ サブユニットに結合したビーズの動きを明視野顕微鏡で観察している。(B) 50 nM Cy3-ATP と 550 nM ATP の混合溶液での実験データ。Cy3-ATP と F<sub>1</sub> が結合していると思われる時間を緑色で示してある。

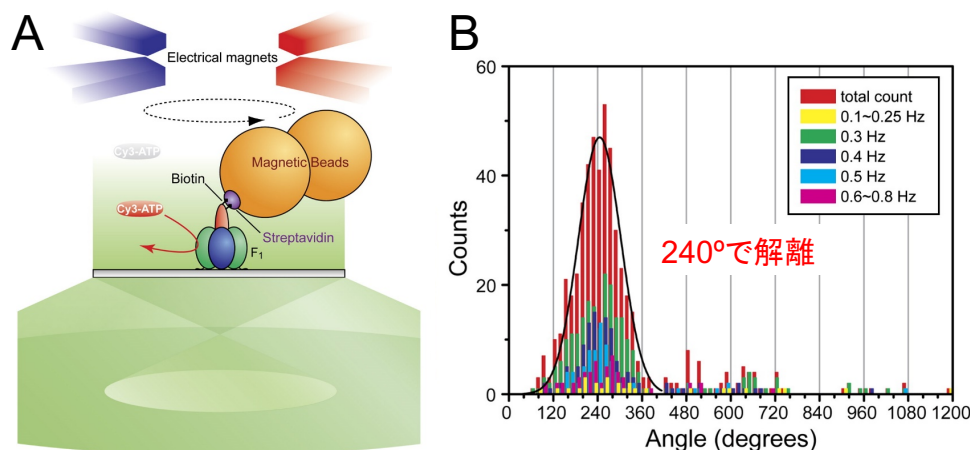


図 1-13 足立らによって構築された実験の概要(図は参考文献<sup>33</sup>をもとに作成)  
(A) 磁気ピンセットと同時計測系を組み合わせた実験系。(B) 磁気ピンセットによって制御された回転条件での ADP 解離角度の同定。色は磁気ピンセットによる制御された回転の回転速度を表す。Cy3-ATP の結合角度から見た Cy3-ADP の解離角度が 240°先であると示された。



### 1.3.5 リン酸解離角度の同定

ATP 加水分解に関わる基質結合・解離・生成物である ADP とリン酸の解離という 4 つの素過程のうち、リン酸解離角度の決定のみが残された課題であった。足立らの研究では、リン酸添加時の回転観察を行い、80°の停止での待ち時間のうち、ATP 開裂に関わる待ち時間でない方が大幅に長くなることが分かった<sup>32</sup>(図 1-14 (A))。リン酸以外の添加物でも待ち時間は伸びたが、リン酸添加時に比べるとその伸び幅は小さく、リン酸固有で生じている現象であった。さらに、ATP 濃度がそれほど高くない 2~20  $\mu\text{M}$  条件で大過剰量のリン酸を添加すると、ATP 結合待ち状態(120°)から 80°の停止へのバックステップが観察された(図 1-14 (B))。これはリン酸を解離したあとの ATP 結合待ちの角度位置で、ATP が結合する前にリン酸が再結合することによるものと解釈された。これらの知見より、80°の停止は ATP 開裂反応とリン酸解離反応で成り立っていることが明らかになった。

しかし、この実験では 120°間のリン酸解離の相対角度位置(80°)を定めたのみで、ATP 開裂反応のように、0°で結合した ATP に由来するリン酸解離位置を同定したことにはならない。実際、ATP 開裂が 200°で起きたことを考慮すると、リン酸解離は 200°か 320°で起きると考えられる。生成物の ADP との解離の順番を表すため、前者は「リン酸先抜けモデル」、後者は「リン酸後抜けモデル」という名前でも呼ばれている。それを決定するひとつの実験は渡邊らによって行われた Stall-Release 実験である<sup>35</sup>。詳細は後述するが、この実験によりリン酸先抜け(200°解離)説とは矛盾する結果が得られ、リン酸後抜け(320°解離)説の可能性が高まった。

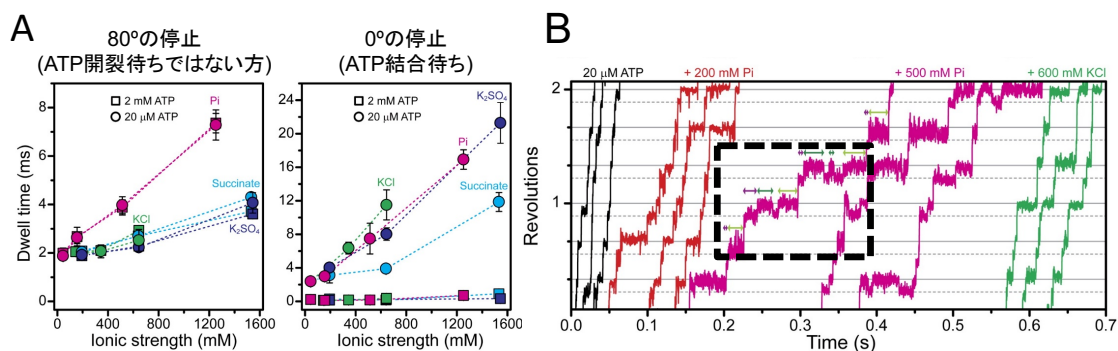


図 1-14 添加物の影響(参考文献<sup>32</sup>をもとに図を改変)

(A) 80°の停止と 0°(ATP 結合待ち)の停止の dwell time 解析。横軸はイオン強度とした。リン酸以外を添加したときでも時定数は伸びているが、80°の停止のリン酸添加時のみが優位に時定数が伸びていると判断できる。(B) 20  $\mu\text{M}$  ATP 条件でリン酸を添加したときのタイムコース。500 mM  $\text{P}_i$  添加時の黒点線で囲んだ部分に ATP 結合待ち停止(120°)と 80°の停止の往復運動が観察される。

### 1.3.6 ADP 阻害状態とその角度位置

以上の実験で加水分解反応に基づく反応素過程の角度位置の同定はほぼ完成に近づいた。反応素過程ではないものの、 $F_1$  の回転観察中に頻繁に表れる現象として ADP 阻害状態があげられる。ADP 阻害は回転観察が行われたほぼすべての  $F_1$  で観察されている現象であり、触媒反応中に  $F_1$  が確率的に陥る不活性な状態である。原-弘埜らの回転観察実験によると、溶液中に  $F_1$  の阻害タンパク質や阻害剤が含まれていなくても、数秒オーダーの停止を頻繁に繰り返す現象が観察された<sup>36</sup>(図 1-15 (A))。また、ADP 阻害状態は ATP 結合待ち状態から  $37^\circ$  前の位置(図 1-15 (B)-(C))、すなわち、ATP 開裂待ち状態とほぼ同じ角度位置で停止を続けることが分かった。磁気ピンセットを用いた ADP 阻害からの復活現象も観察されているが、これは次項の磁気ピンセットについての項でまとめて述べることにする。ADP 阻害状態は非触媒部位の  $\alpha$  サブユニットに ADP が結合すること<sup>36</sup>や、ATP 開裂直後にリン酸が抜けることで触媒部位に ADP が強固に結合した状態に陥ること<sup>37</sup>などがメカニズムとして提案されている。

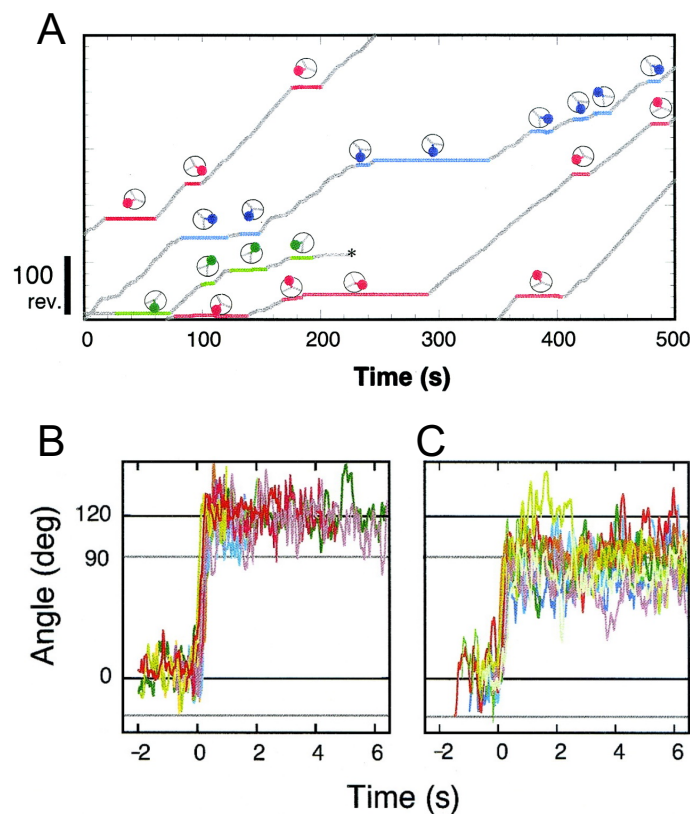


図 1-15 ADP 阻害状態の解析<sup>36</sup>

(A) 磁気ビーズを用いたときのタイムコースの例(ATP 2 mM)。 (B)-(C) ATP 結合待ち状態からのステップ例(ATP 200 nM)。  $0^\circ$  と  $120^\circ$  を ATP 結合待ち状態としている。 (B)は次の ATP 結合待ち状態に回転する様子、 (C)は数秒間の停止状態に陥るときの様子である。この停止点は ATP 結合待ち角度から  $37^\circ$  手前に存在した。

### 1.3.7 TF<sub>1</sub>の回転スキーム

TF<sub>1</sub>の1分子回転観察実験では120°以内に基質結合待ち停止とATP開裂待ち停止の2つが発見された。これらをもとにhybrid F<sub>1</sub>を用いた実験や蛍光ATPの結合解離実験、磁気ピンセットを用いたリン酸解離角度の同定などから、以下のように反応機構が提案された(図1-16)。0°でATP分子が結合したとすると、200°でATPが開裂し、240°でADPが解離、320°でリン酸が解離するということが明らかになった。βで起きる反応について位相を120°ずつずらすことで1回転分のスキームが完成する。ヌクレオチドの結合状態についてはbMF<sub>1</sub>の結晶構造解析を参考に、つねに2つ以上のヌクレオチドが結合していることを前提とした。

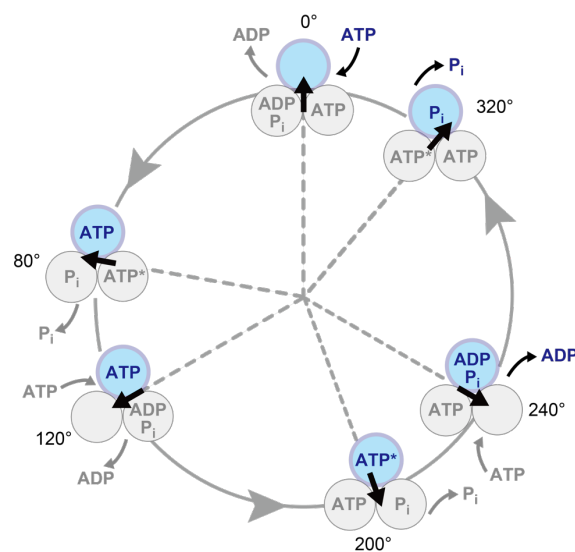


図 1-16 TF<sub>1</sub>の回転スキーム(参考文献<sup>35</sup>をもとに作成)

図中で丸はβサブユニット、矢印はγサブユニットの回転角度を表している。青のβでの反応素過程は以下のように描いてある: ATP結合、ATP開裂、ADP解離、リン酸解離をそれぞれ、0°、200°、240°、320°で起きるとした。ひとつのβの反応スキームを残り2つのβに、位相を120°ずらしながら描くことで3つのβが協働して回転を駆動するスキームが完成する。

## 1.4 磁気ピンセットによる 1 分子操作を用いた実験

$F_1$  の研究は 1 分子観察技術により飛躍的に進展した。 $F_1$  研究の発展でもうひとつ欠かせない技術が 1 分子操作技術である。 $F_1$  は内部の触媒反応とその構造変化が連動している。すなわち、外部から力をかけて構造変化を誘発すれば、触媒反応を制御できるということである。 $F_1$  研究で用いられている方法のひとつとして、回転プローブに磁気ビーズを用いての磁気ピンセットによる操作がある。

磁気ピンセットとは顕微鏡上に設置した 2 組の電磁石による磁場制御システムである<sup>38-40</sup>。位相を  $90^\circ$  ずらして交流電圧をかけることで磁場を生じさせ、プローブの磁気ビーズの動きを制御している。以下では、磁気ピンセットによる操作によって明らかになった知見をまとめる。

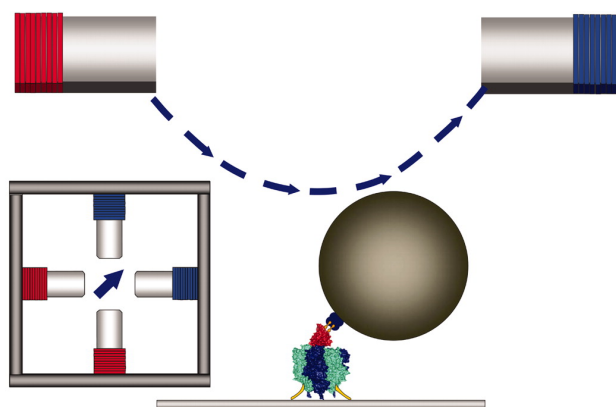


図 1-17 磁気ピンセットの概要<sup>40</sup>

### 1.4.1 ADP 阻害状態への知見

原-弘埜らによる ADP 阻害状態についての研究では、磁気ピンセットによる ADP 阻害状態からの解放についての実験も行われていた<sup>40</sup>。筆者らは ADP 阻害状態に陥った粒子を磁気ピンセットで一定角度・一定時間拘束した後に  $F_1$  が回転を再開するかどうかを観察した。その結果、ADP 阻害状態の角度位置から反時計方向に大きな角度で、長時間拘束すると ADP 阻害状態から解放されやすいことが分かった。これは力学的な操作により、触媒部位と ADP の親和性が変化して ADP 阻害状態から解放される現象であると解釈された。

後述の Stall-Release 実験を用いて ADP 阻害の詳細解析も行われた<sup>37</sup>。前述の hybrid  $F_1$  を用いて ADP より先にリン酸を解離させるように磁気ピンセットで操作した後の粒子の挙動を観察すると、 $F_1$  は長時間の停止状態に陥りやすくなった。この不活性な状態を ADP 阻害状態であるとする、リン酸が先に解離することで ADP 阻害に陥りやすくなるということが示唆された。

本論文の第 4 章では ADP 阻害状態の  $bMF_1$  を磁気ピンセットで操作してその回転再開割合を調べることで、ADP 阻害状態と  $IF_1$  阻害を区別した。

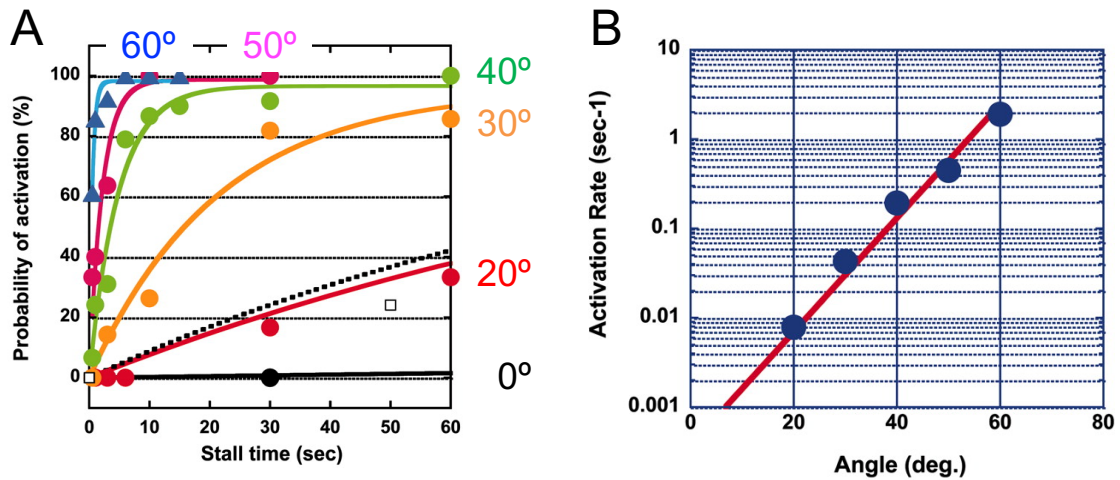


図 1-18 磁気ピンセット操作による ADP 阻害の解放(参考文献<sup>40</sup>をもとに図を改変)  
 (A) 拘束角度・拘束時間別の ADP 阻害粒子の回転再開割合。拘束角度は図中に記載した通りである。実線はプロットを  $\text{Probability of activation} = 100\{1 - \exp(-kt)\}$  ( $k$ は ADP 阻害からの解法を表す速度定数、(B)の Activation Rate と同じ)の式でフィッティングしたものである。(B) 拘束角度と Activation Rate ( $k$ )の関係性。

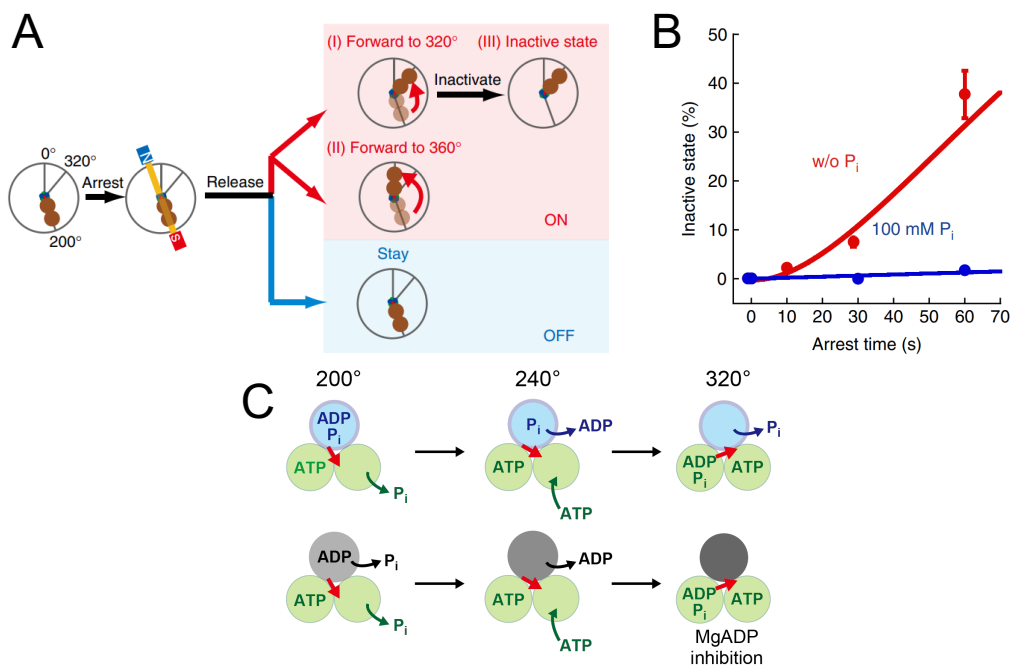


図 1-19 磁気ピンセットと Hybrid F<sub>1</sub> を用いた ADP 阻害についての解析<sup>37</sup>  
 (A) 実験手順。磁気ピンセットを用いて  $\beta$ E190D 由来の回転停止点で拘束したあとに解放すると、F<sub>1</sub>は3種類の挙動を示した。(B) (A)の(III)で示される阻害状態に陥る粒子の割合。リン酸を添加すると阻害状態に陥りにくくなった。(C) 想定される ADP 阻害状態のスキーム(参考文献<sup>37</sup>から図を作成)。320°でリン酸が解離するリン酸あとと抜けモデル(上段)に対して、200°でリン酸が誤って解離してしまうと、320°で ADP 阻害状態に陥りやすくなる(下段)。

#### 1.4.2 リン酸解離角度の同定

足立らの研究<sup>32</sup>によりリン酸解離の相対角度位置が定まった後でも、その解離が「リン酸先抜けモデル」に基づく  $200^\circ$ なのかと「リン酸後抜けモデル」に基づく  $320^\circ$ なのかは決定できなかった。それを解決するため、渡邊らの実験では Stall-Release 実験と呼ばれる実験系を構築し、拘束解放後の粒子の挙動の割合から速度定数などの算出に成功した<sup>35</sup>(図 1-20(A))。一般に Stall-Release 実験では標的反応素過程で停止している  $F_1$  粒子に対して磁気ピンセットで操作して一定時間、一定角度ずれた場所で拘束する。設定した時間が経過したのちに  $F_1$  を解放すると、もとの角度位置で停止するか、次の停止角度に進むかのどちらかの挙動を示した。元の場所で停止する場合は、 $F_1$  の反応は未完了であることを意味する。一方、次の停止角度に進む場合では、 $F_1$  は反応を終えており、回転トルクが発生していることを意味する。次の角度位置に進んだ割合( $P_{ON}$ )の割合を算出し、それらを指数関数でフィッティングすることで速度定数を求めることができる。以下で述べる Stall-Release 実験はすべてこのような実験方法に基づいている。

渡邊らの実験では変異体  $TF_1(\beta E190D)$  と基質アナログである  $ATP\gamma S$  を用いて、ATP 開裂反応待ち状態で  $F_1$  粒子を拘束して解放後の粒子の挙動を観察した。その結果、 $P_{ON}$  は 2 段階の上昇を示した。しかし、大過剰量のリン酸を添加するとこのような 2 段階上昇は観察されなかった(図 1-20(B))。ATP 開裂反応のみが対象であるならば、このような 2 段階の上昇は観察されないはずである。筆者らは 2 段階の上昇をリン酸が間違ったタイミングで抜ける副反応によるものだと説明し、「リン酸先抜けモデル」では決して現れない現象だとした。すなわち、「リン酸先抜けモデル」と矛盾する結果であり、リン酸は  $320^\circ$  で解離する説が裏付けられた。

なお、これは可逆反応としての ATP 合成反応を考えたときにも自然な説である。すなわち、生体内では  $F_1$  は ADP とリン酸を結合して ATP を合成している。生体内の ADP 濃度 ( $\sim 100 \mu M$ ) は ATP 濃度 ( $2 \sim 8 mM$ ) より 10 倍以上低く、ATP に対して ADP を優先的に結合する仕組みは未解明なままであった。しかし、リン酸後抜けモデルはこの謎に説明を与える。ATP を合成するときにはリン酸が先に結合し、ATP が結合しづらくなっていることを意味している。ゆえに  $F_1$  は生体内のような ATP 過剰条件でも ATP 合成反応時は ADP が優先的に結合できる機構を有しているのである。



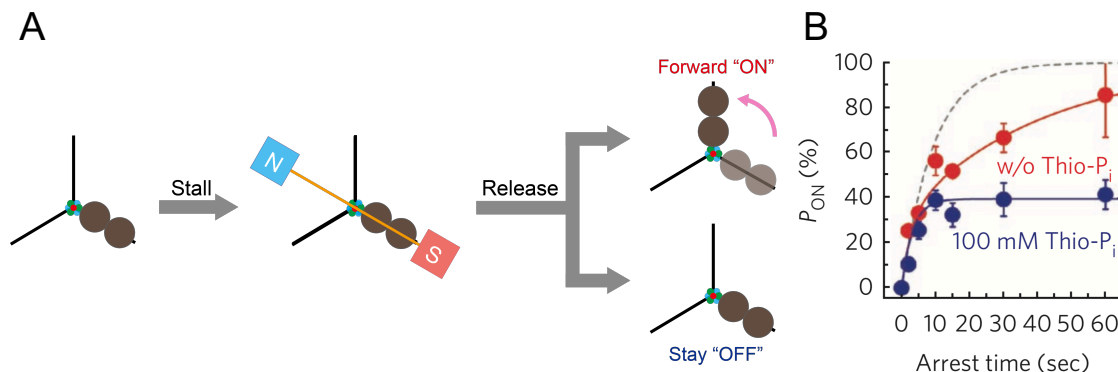


図 1-20 磁気ピンセットを用いたリン酸解離のタイミング決定(参考文献<sup>35</sup>をもとに図を作成)  
 (A) 磁気ピンセットの概略(詳細は図 2-20)。この実験では ATP 開裂反応角度( $0^\circ$ )での反応進行割合を計算している。(B) ATP 開裂角度の反応進行割合の拘束時間依存性。赤はチオリン酸非存在下、青は 100 mM チオリン酸添加時の挙動である。また点線は回転の dwell time 解析から想定される反応進行割合を示している。

#### 1.4.3 反応素過程の角度依存性

$F_1$  の特徴的な性質として角度依存的に基質との親和性や反応の平衡状態を調節しているという点である。回転角度ごとの ATP 結合・解離反応と ATP 開裂・合成反応の反応速度定数を計測するため、Stall-Release 実験が行われた<sup>41,42</sup>。その結果、ATP 結合・解離反応の角度依存性の方が、ATP 開裂・合成反応の角度依存性より大きいことが分かった。反応速度定数の角度依存性から導かれる自由エネルギー変化は回転トルクのパロメータともなるため、この知見は ATP 結合・解離反応の方が ATP 開裂・合成反応より大きな回転トルクを発生させることも明らかになった。

本論文、2.7 では Stall-Release 実験を  $bMF_1$  に対しても適用し、 $bMF_1$  の ATP 結合と ATP 開裂反応の回転角度依存性を調べた。

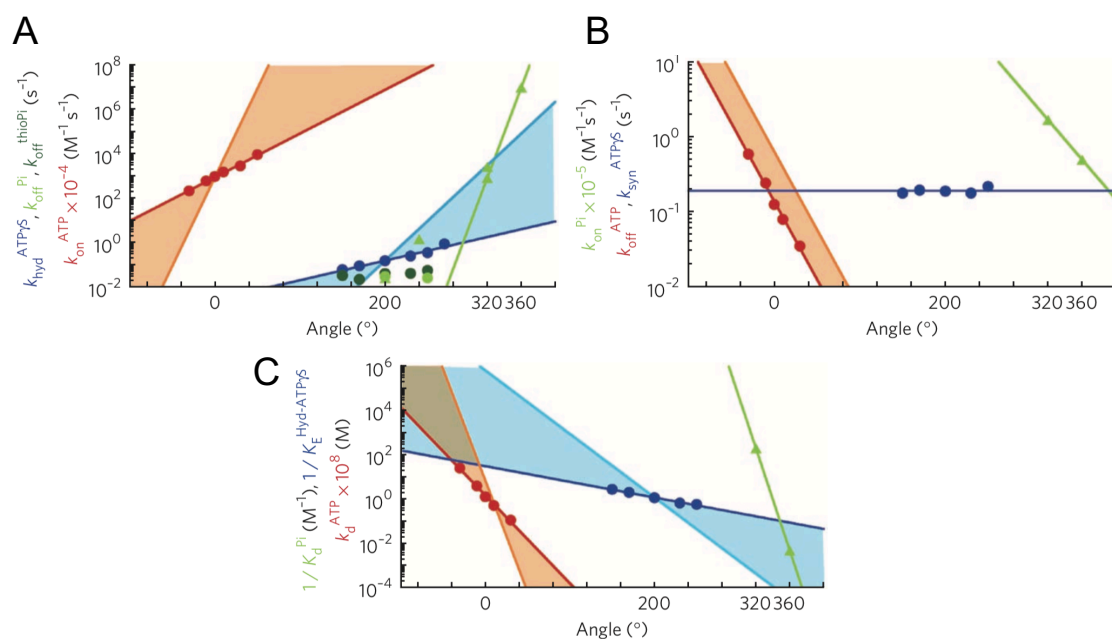


図 1-21 TF<sub>1</sub>の角度依存性実験の結果

(A) 順方向の反応(ATP 結合反応、ATP 開裂反応、リン酸解離反応)、(B) 逆方向の反応(ATP 解離、ATP 合成、リン酸結合)、(C) 平衡定数についての角度依存性。ATP 結合/解離反応は 0°、ATP 開裂/合成反応は 200°、リン酸解離/合成反応は 320°を中心に表現してある。



## 1.5 ミトコンドリア由来 $F_1$ の知見

$TF_1$  を用いた 1 分子回転解析は回転の証明だけではなく、ATP 加水分解の詳細な回転触媒機構を解明し、外部からの力に応答して内部の化学反応を制御するという  $F_1$  固有の性質までも明らかにした。一方で、ミトコンドリア由来  $F_1$  の知見は乏しいままだった。1994 年に発表された  $F_1$  の高解像結晶はウシミトコンドリア由来( $bMF_1$ )のものであり、その後も結晶構造解析のモデル  $F_1$  としてその構造が詳細に解明された。私たち人間の病理解明や疾病防止のためにもミトコンドリア由来、特に哺乳類由来のタンパク質の機能解析は多くの酵素で望まれている研究のひとつである。本章ではミトコンドリア由来  $F_1$  の 1 分子解析の結果、および長年行われてきた  $bMF_1$  の結晶構造解析の結果をまとめる。

### 1.5.1 酵母ミトコンドリア由来 $F_1$ の回転観察

Bradley C. Steel らによって行われた酵母ミトコンドリア由来  $F_1$ ( $yMF_1$ ) の 1 分子回転観察は、溶液交換と変異体を用いた解析が中心であった<sup>43</sup>。粘性抵抗を無視できる 60 nm の金コロイドを用いた回転速度は約 470 rps であり、 $TF_1$ (130 rps)<sup>28</sup> の回転速度より数倍早いことが分かった。ATP 濃度を変えた同一粒子の挙動を追跡するために行った溶液交換実験では、ATP 低濃度条件で現れた 3 つの停止位置と ATP 高濃度条件で 3 つの回転停止点は  $87^\circ$  ずれていることが分かった。すなわち、ATP 結合待ち停止から見て ATP 開裂待ち停止が  $87^\circ$  先にあることを意味し、 $TF_1$  で得られたスキームと類似すると示唆された。変異体  $yMF_1$ ( $\beta R408I$ ) を用いた解析では ATP 高濃度条件でも 6 つの回転停止点が観察された。ATP 結合定数 ( $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) を考えると ATP 3 mM 条件では ATP 結合待ち時間は 0.02 ms 以下であり、この撮影条件(10000 fps=0.1 ms per frame)では観察されない。この角度関係が溶液交換実験で発見されたものと似ているため、筆者らは ATP 結合待ち角度で ATP 結合反応以外の、ATP 濃度に依存しない別の反応素過程が起きていると考えた。しかし、その詳細な解析は行われておらず、反応素過程角度の同定やスキームの決定までは至っていない。

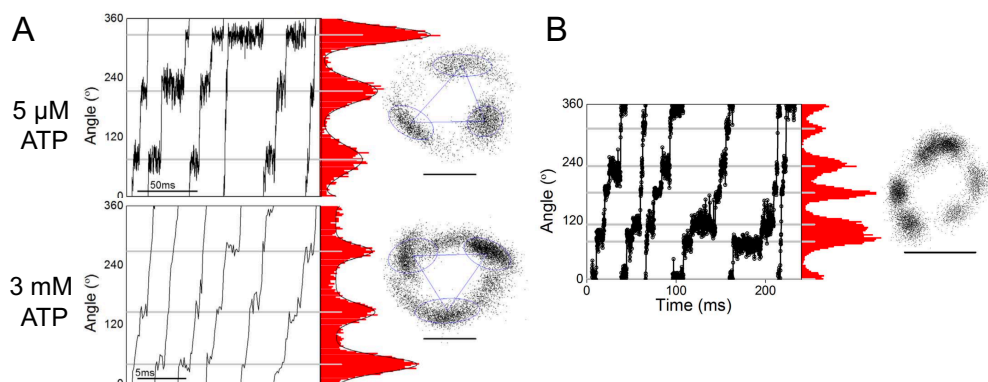


図 1-22 酵母由来  $F_1$ ( $yMF_1$ ) の 1 分子解析の結果<sup>43</sup>

(A) 野生型  $yMF_1$  を用いた溶液交換実験。ATP 5  $\mu\text{M}$  条件で観察されたピークと ATP 3 mM 条件で観察されたピークの角度差は  $33^\circ$ ( $87^\circ$ )であった。(B) ATP 3 mM 条件での変異体  $\beta R408I$  を用いた回転観察。スケールバーはともに 40 nm を表す。

### 1.5.2 ヒトミトコンドリア由来 $F_1$ の回転観察

鈴木らは  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  のサブユニットだけではなく、2 種類の分子シャペロン AF1、AF2 を同時に発現させることで、大腸菌を用いたヒトミトコンドリア由来  $F_1$  (human mitochondrial  $F_1$ ;  $hMF_1$ ) の発現系を構築した<sup>44</sup>。この技術を用いて鈴木らは  $hMF_1$  の 1 分子回転観察を行った<sup>45</sup>。

40 nm 金コロイドを用いた回転速度の計測では、26°C の ATP 高濃度条件で約 700 rps と他の  $F_1$  と比べて極めて速く回転することが分かった( $TF_1$ ; 129 rps<sup>28</sup>、 $EF_1$ ; 449 rps<sup>46</sup>、 $yMF_1$ ; 471 rps<sup>43</sup>)。同じ条件で反応停止点の解析を行うと、120°以内に異なる 2 つの停止点(1<sup>st</sup> dwell と 2<sup>nd</sup> dwell)が発見された(図 1-23(A))。基質として ATP $\gamma$ S を用いても同様の観察結果が報告された(図 1-23(B))。基質低濃度条件ではこれら 2 つの停止点の他に基質結合待ちに対応する 3 つ目の停止点(3<sup>rd</sup> dwell、*ATP-binding dwell*)も発見された。すなわち、 $hMF_1$  は 120°以内に異なる 3 つの停止点を示すことが明らかになった。これは長年 1 分子回転観察の研究対象であった  $TF_1$  とは異なる性質である。

同じ研究では阻害剤を用いての回転停止角度も調べられた(図 1-24)。ATP 低濃度条件で ATP 結合待ち状態を顕在化させたあと、同濃度の ATP と阻害剤の混合溶液をフローセル中に導入した。阻害剤存在下でも回転はしばらく続いたが、やがて回転を停止した(図 1-24(A))。そのときの阻害剤による停止位置と直前の ATP 結合待ち角度との角度差を計測した。ATP アナログである AMP-PNP は 3 リン酸基の  $\beta$ - $\gamma$ -リン酸基の間の元素が窒素原子に置き換わっており、ATP 開裂反応を阻害することが知られている。結晶構造解析では ATP の代わりに用いられている場合が多く、結晶の安定化に寄与している。AMP-PNP による回転停止点は ATP 結合待ち角度から見て 90°の位置にあり(図 1-24(B))、これは金コロイドを用いた回転観察中で発見された 2<sup>nd</sup> dwell に対応すると考えられた。すなわち、これが ATP 開裂待ち状態である。一方で、AMP-PNP 溶液に大過剰量のチオリン酸を添加して回転停止位置を調べると、チオリン酸なしの溶液での結果よりその回転停止位置が 10-20°手前側にずれていった(図 1-24(C))。これはリン酸を解離して ATP 開裂角度に回転した  $F_1$  に再度リン酸が結合することによって生じるバックステップのためだと結論付けられた。この実験から、リン酸解離待ち角度は ATP 結合待ち角度から見て 65°の位置にあり、これは 1<sup>st</sup> dwell に対応するものとされた。

AMP-PNP 以外にも  $F_1$  の回転を停止させる阻害剤や阻害タンパク質を添加しての実験が行われた。ADP を添加して頻発した停止は ADP 阻害状態と対応付けられた。ADP 添加時の方が ADP なしのときより停止の頻度は上がったが、その停止位置は変わらず 90°であった(図 1-24(D))。すなわち、ADP 阻害は ATP 開裂待ち角度で起きることが分かった。また、広く ATPase の阻害剤として知られる  $NaN_3$  を添加したときの停止位置は 65°であり、リン酸解離待ち角度と一致した(図 1-24(E))。一般に  $NaN_3$  による阻害は ADP 阻害状態をもとにしたより強固な阻害状態と認識されていた<sup>47</sup>。しかし、 $NaN_3$  による停止位置は ADP 阻害状態の角度位置と異なる場所で停止したため、 $NaN_3$  の阻害状態の再解析が必要かもしれない。

い。最後に、ミトコンドリア型固有の阻害タンパク質として知られている  $IF_1$  による停止位置は  $90^\circ$  で、これは ATP 開裂待ち角度と一致した(図 1-24(F))。以上より、 $hMF_1$  の回転スキームが提案された(図 1-25)。また、阻害剤による停止位置を基にして  $bMF_1$  の結晶構造との対応付けが行われた。次項でその詳細を述べることにする。

本論文の第 2 章、第 4 章では AMP-PNP(2.5)、 $NaN_3$ (2.6)、 $IF_1$ (4.3)を使用してその停止位置をそれぞれ調べた。

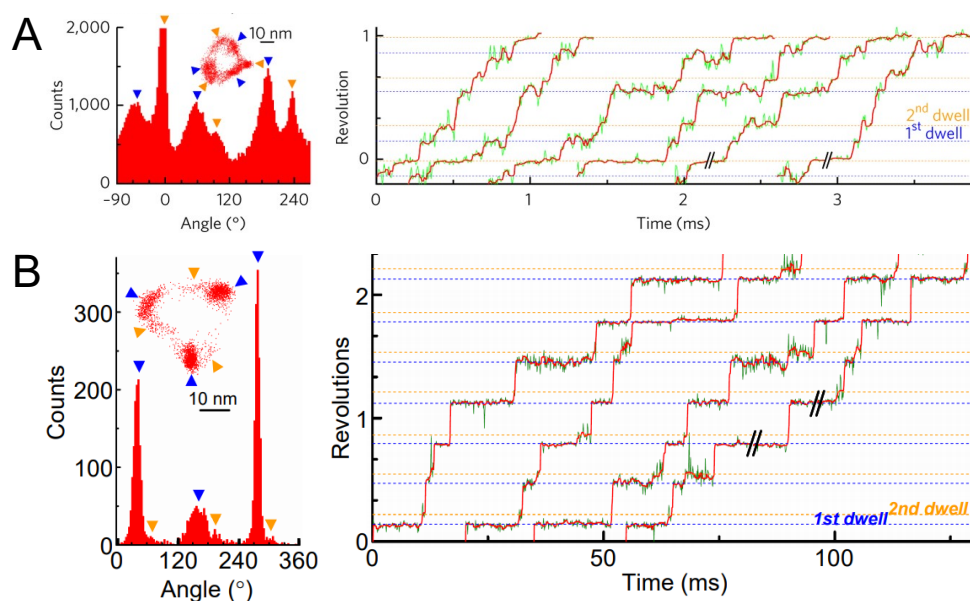


図 1-23 高濃度(A) ATP、(B)  $ATP\gamma S$  溶液中での  $hMF_1$  の回転挙動

いずれの場合も 1<sup>st</sup> dwell(青)と 2<sup>nd</sup> dwell(オレンジ)の 2 種類の回転停止点が観察され、阻害剤を用いた実験でそれぞれ ATP 開裂待ち状態とリン酸解離待ち状態と特定された。

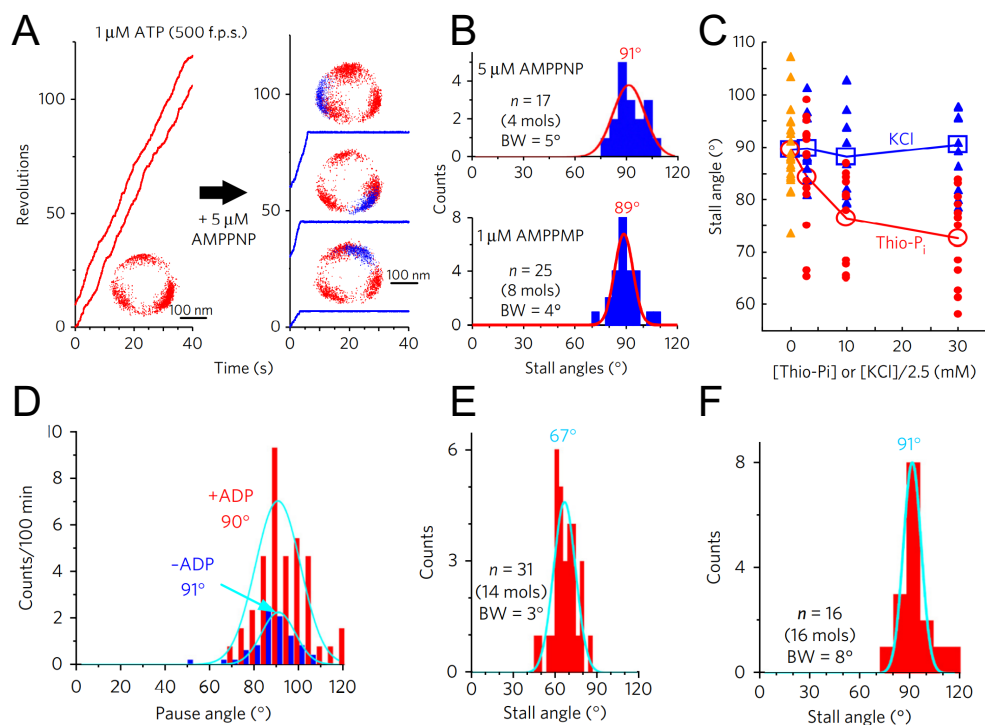


図 1-24  $hMF_1$  の阻害状態による停止点

(A) 阻害剤を用いた場合の実験概要。1  $\mu M$  ATP 条件で回転を観察したあと、同じ粒子に対して ATP と阻害剤の混合溶液を添加した。5  $\mu M$  AMP-PNP を用いた場合には回転は数分以内で停止した。(B) 直前の ATP 結合待ち状態と AMP-PNP による回転停止点の角度差。90°の位置で回転が停止したことから、1<sup>st</sup> dwell に対応する 90°の角度位置は ATP 開裂待ち状態と特定された。(C) (A)、(B)の実験に KCl とチオリン酸を添加した場合の回転停止位置の変化。(D) ADP 阻害による回転停止点。ADP を添加した場合の方が回転停止は頻繁に起きたが、いずれの場合も 90°の位置で回転が停止した。(E)  $NaN_3$  による回転停止点。65°の位置で回転が停止し、この角度はリン酸解離待ち状態に相当する 2<sup>nd</sup> dwell の角度位置と一致した。(F)  $IF_1$  による回転停止位置。ATP 開裂待ち状態の角度と一致した。

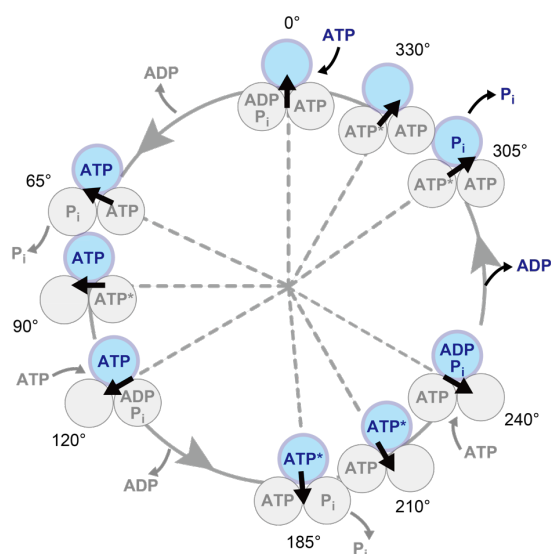


図 1-25  $hMF_1$  の回転スキーム(参考文献<sup>45</sup>をもとに作成)

図中で丸は  $\beta$  サブユニット、矢印は  $\gamma$  サブユニットの回転角度を表している。青の  $\beta$  での反応素過程は以下のように描いてある: ATP 結合、ATP 開裂、リン酸解離をそれぞれ、 $0^\circ$ 、 $210^\circ$ 、 $305^\circ$  で起きるとした。ADP 解離については  $hMF_1$  の結晶構造解析のヌクレオチド結合状態を参考に、 $240^\circ$ ~ $305^\circ$ の間で起きるとした。

### 1.5.3 ウシミトコンドリア由来 $F_1$ の結晶構造解析

1994 年に  $hMF_1$  の高分解能結晶<sup>16</sup>が得られて以来、 $F_1$  の結晶構造解析は主に  $hMF_1$  を用いて行われてきた。一般に結晶構造の安定化のためには阻害剤が用いられており、それによって  $F_1$  の触媒状態が左右される可能性も危惧された。2007 年に発表された  $hMF_1$  の結晶構造<sup>48</sup>(PDB: 2jdi)には、ADP とヌクレオチドアナログの AMP-PNP 以外には阻害剤が含まれておらず、活性化状態の  $F_1$  を描写している構造として ground state structure と呼ばれている。1994 年に発表された構造<sup>16</sup> (PDB: 1bmf、以下 reference structure と呼ぶ)と違いは、 $\beta_{DP}$  サイトに結合しているヌクレオチドの種類である。Reference structure には ADP が結合しているが、ground state structure には AMP-PNP が結合している。以上より、ground state structure は  $F_1$  が活性をもった状態の 1 描写である一方で、reference structure や  $NaN_3$  込み溶液での結晶<sup>47</sup>(PDB: 2ck3)は ADP 阻害状態の 1 描写ではないかと考えられている。

2011 年には岡崎らによって理論計算を用いながら  $hMF_1$  の結晶構造解析の結果がまとめられた<sup>49</sup>。図 1-26 に岡崎らによって計算された回転子  $\gamma$  の相対回転角度を示す。ここでは reference structure の  $\gamma$  の位置を  $0^\circ$  としている。図 1-26 での計算は 1 分子観察条件で観察される  $\gamma$  の回転角度を完全に模倣をしているわけではないが、ここで示す  $hMF_1$  構造の中で  $\gamma$  の回転角度は最大でも  $30^\circ$  程度であり、その間に収まる構造がほとんどである。

2014 年に発表された  $hMF_1$  の報告<sup>45</sup>に従うように、2015 年には Bason らによって  $\beta$  にチオリン酸が結合した構造(PDB: 4xyz)が明らかになった<sup>50</sup>。同グループの解析によると、ground state structure との  $\gamma$  の角度差はほとんどなく、どちらもリン酸解離直前の状態(pre- $P_i$ -

release)を表していることが示唆された。一方、ATP 開裂状態で回転を止めるとされる IF<sub>1</sub> が結合した構造<sup>51</sup>(PDB: 2v7q)の  $\gamma$  の角度と比較すると、今回発見された構造は約 30°手前側にずれていることが分かった(参考文献<sup>50</sup>による計算)。この知見は一見すると *h*MF<sub>1</sub> の 1 分子回転解析から導かれた結果に従うように見える。これを支持するように、*h*MF<sub>1</sub> と *b*MF<sub>1</sub> のアミノ酸配列の相同性を比較すると、 $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットで 99%以上、 $\gamma$  サブユニットで 93% であり(図 1-27)、他のタンパク質に比べればこの値は非常に高い<sup>50</sup>。しかし、同じ構造間の  $\gamma$  の回転角度が約 3-4 倍異なっており(2jdi と 2v7q の角度差の場合、岡崎らの方法<sup>49</sup>では約 9°、Bason らの方法<sup>50</sup>では 31.7°)、両者の計算方法の違いが明確に出ている。また、*h*MF<sub>1</sub> の 1 分子回転解析の結果と *b*MF<sub>1</sub> の結晶構造解析の結果を単純に比較していいのかという問題もある。ゆえに、1 分子解析の結果と結晶構造解析の結果は同一種のサンプルによってしか比較できず、これらの相関関係はいまだに明らかになっていない。

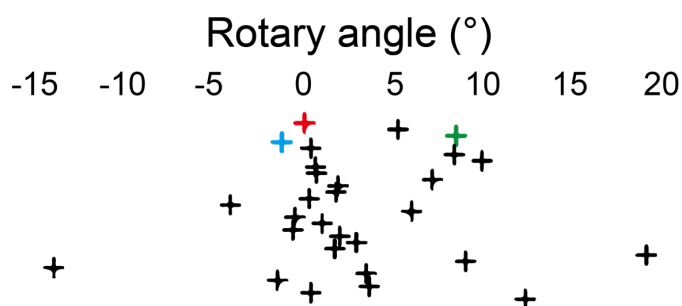


図 1-26 岡崎らによって行われた、結晶構造の  $\gamma$  の回転角度の計算<sup>49</sup>

図中の印(+)がひとつの結晶構造に対応する。Reference structure<sup>16</sup> (PDB: 1bmf、赤)の  $\gamma$  の角度を基準として 0°として定義した。また、青は ground state structure<sup>48</sup> (PDB: 2jdi)、緑は IF<sub>1</sub> 結合構造<sup>51</sup> (PDB: 2v7q)を表している。図中には *b*MF<sub>1</sub> だけではなく、*y*MF<sub>1</sub> の構造も含まれている。

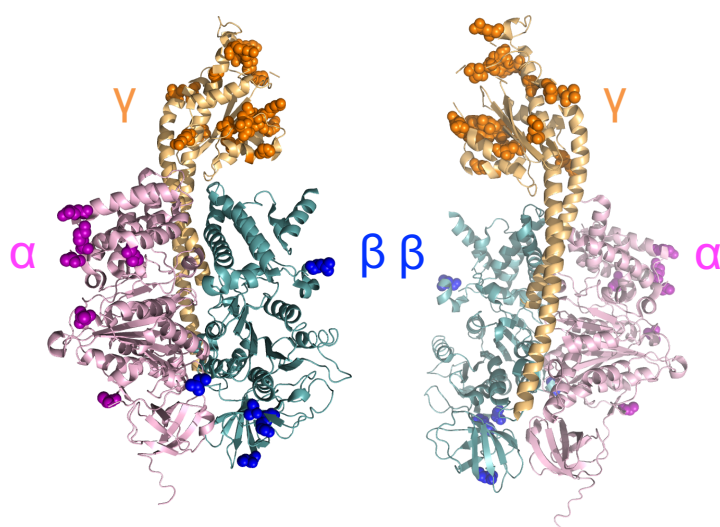


図 1-27 *b*MF<sub>1</sub> と *h*MF<sub>1</sub> のアミノ酸残基の違い(構造は PDB: 2jdi による)

*b*MF<sub>1</sub> と *h*MF<sub>1</sub> で異なる残基を球で示した。なお、 $\alpha$ V8 残基と  $\gamma$ A97 残基はプロットしていない。違いはタンパク質外側がほとんどで、 $\alpha/\beta/\gamma$  が相互作用するような内側には違いは見られない。

## 1.6 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP 合成酵素の制御

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP 合成酵素中の 2 つのモータータンパク質 F<sub>0</sub> と F<sub>1</sub> は共通の回転軸  $\gamma$  でつながっているため、F<sub>0</sub> によるプロトン輸送と F<sub>1</sub> による ATP 合成/加水分解反応は共役している。通常、生体内では十分に *pmf* が大きいので ATP を合成しているが、何らかの原因で *pmf* が小さくなると膜内外のプロトン濃度勾配を作るために ATP を加水分解してしまう。このような ATP 浪費反応は生体にとっては不都合であり、非効率なエネルギー消費である。これを避けるため、F<sub>1</sub> 部の加水分解反応を抑制する阻害メカニズムや制御タンパク質が存在する。一般に以下の 4 種類が知られている。

### 1.6.1 ADP 阻害

ADP 阻害はほとんどすべての F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> で保存されていると考えられている制御機構である。これは F<sub>1</sub> が自発的に阻害に陥るという最も基本的な阻害機構である。F<sub>1</sub> の回転観察を行うと、頻繁に回転と停止状態を繰り返す現象が観察される<sup>28,43,52,53</sup>。原-弘埜らの研究<sup>36</sup>によると ADP 阻害状態は ATP 濃度依存的に発生することが示唆されている。詳細は 1.3.6 や 1.4.1 を参照されたい。

### 1.6.2 $\epsilon$ サブユニットによる阻害

本項で述べる  $\epsilon$  サブユニットは細菌や植物葉緑体に対するものである。ミトコンドリアの F<sub>1</sub> では  $\delta$  サブユニットと呼ばれるものが、本項で述べる  $\epsilon$  サブユニットに対応する<sup>12</sup> がここでは言及しない。

$\epsilon$  サブユニットは分子量 15 kDa 程度の小さなタンパク質である。 $\epsilon$  の N 末端領域には  $\beta$  サンドイッチ構造、C 末端領域には 2 本の  $\alpha$  ヘリックスのコイルドコイルと 2 つのドメインからなる構造をとる<sup>54</sup>(図 1-28)。TF<sub>1</sub> の場合、 $\epsilon$  は  $\gamma$  の先端付近に結合している。ATP の加水分解反応に必要な F<sub>1</sub> の最小単位は  $\alpha_3\beta_3\gamma$  であることから分かる通り、 $\epsilon$  は F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> を構成するひとつではあるものの触媒反応やトルクの発生に直接関与するわけではなく、その反応を制御するための因子だと考えられてきた。変異体を用いた実験や硫黄原子同士のクロスリンクを用いた実験により、 $\epsilon$  の N 末端領域は F<sub>0</sub> と F<sub>1</sub> の反応を共役させるために必要であることがわかった<sup>55-57</sup>。一方で、 $\epsilon$  の C 末端領域は  $\alpha_3\beta_3$  の界面に突き刺さり  $\gamma$  の回転を阻害している<sup>58-65</sup>。大腸菌や葉緑体の場合、 $\epsilon$  は F<sub>1</sub> 複合体と結合/解離することで F<sub>1</sub> の ATPase 活性を調節している<sup>66,67</sup>。すなわち、F<sub>1</sub> に  $\epsilon$  が結合していれば F<sub>1</sub> の加水分解活性は阻害され、逆に  $\epsilon$  が F<sub>1</sub> から解離していれば F<sub>1</sub> は加水分解できるということである。これは細胞内での F<sub>1</sub> による ATP 浪費を防ぐという観点からいえば理にかなった機構である。

しかし好熱菌由来の場合、 $\epsilon$  が F<sub>1</sub> に結合していても活性を持つ F<sub>1</sub> の状態が存在することが示された<sup>68</sup>。すなわち、 $\epsilon$  は単なる阻害因子ではなく活性調節の役割を持っているものと示唆される結果であった。これに加え、山田らは  $\epsilon$  が ATP 結合能を持つことを発見し<sup>69</sup>、その解離定数が 3  $\mu$ M (25°C) という非常に高い特異性を持つことを示した<sup>60</sup>。これらの結果



と結晶構造解析<sup>70</sup>、変異体解析<sup>69</sup>、蛍光標識  $\epsilon$  を用いた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)<sup>60</sup>の結果から、 $\epsilon$  が取る折りたたまれた構造(folded 型)と伸びた構造(extended 型)のうち、ATP は  $\epsilon$  の folded 型に結合しており、この状態では  $F_1$  の加水分解活性は阻害しないことが報告された。以上より、好熱菌由来  $F_0F_1$  の場合、以下のような 3 つの状態が存在することが提案された。すなわち、(1) ATP なし extended 型  $\epsilon$  が  $F_1$  の加水分解活性を阻害する阻害型、(2) ATP なし folded 型  $\epsilon$  が  $F_1$  を阻害しない活性型、そして(3) ATP あり folded 型  $\epsilon$  が  $F_1$  を阻害しない活性型の 3 種類である。このスキームから外部の ATP 濃度によって平衡が維持されており、膜間の *pmf* とのバランスを取っていることが示唆された。

なお、 $\epsilon$  の ATP 結合能は枯草菌でも確認され、その解離定数が 2 mM(25°C)であった<sup>71</sup>。これは細胞内の ATP 濃度とほぼ一致すると考えられたため、ATP の結合解離に伴う  $\epsilon$  の構造変化を利用した ATP 濃度測定のためのセンサータンパク質の開発なども行われた<sup>72,73</sup>。また、 $\epsilon$  が  $TF_1$  の反応素過程に反応素過程ごとにどのような影響を与えるのかを評価するため、前述の Stall-Release 実験も行われた<sup>59</sup>。その結果、ATP 結合定数や ATP 加水分解速度には影響を与えないが、ATP 解離速度や ATP 合成速度が 2~5 倍大きくなるという結果を得た。これは  $\epsilon$  存在下で ATP 合成効率が 5 倍程度上昇するという過去の知見<sup>39,74</sup>と一致する結果である。

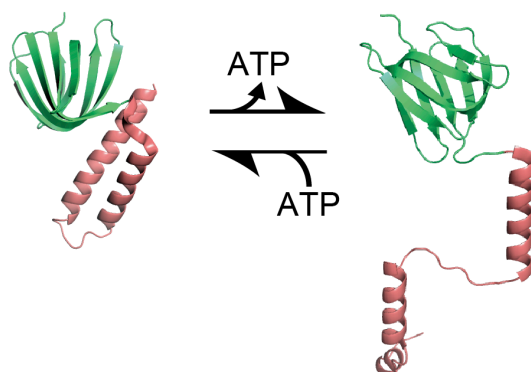


図 1-28  $TF_0F_1$  の  $\epsilon$  subunit の構造変化

N 末端の  $\beta$  サンドイッチ構造を緑で、C 末端のヘリックス構造を赤で描いた。図は(左; folded 型) PDB: 1aqt、(右; extended 型) PDB: 3oaa で作成した。どちらも *E. coli* 由来の  $\epsilon$  であるが、folded 型と extended 型を表すため、模式図として描画した。

### 1.6.3 植物葉緑体の $\gamma$ サブユニットにおける分子内ジスルフィド結合の形成

植物では光化学系によって ATP 合成を行なっている。しかし、太陽光が得られない夜間は光化学系を動かすことができず ATP 合成を行うことができない。この間の ATP 加水分解反応を抑制する仕組みとして、葉緑体では固有のシステムを持つ。光化学系からの還元力が提供されなくなり、系が酸化的になると  $\gamma$  サブユニットに存在する 2 つのシステイン残基が分子内でジスルフィド結合を形成して回転を停止する<sup>75</sup>。植物葉緑体の  $\gamma$  サブユニットには細菌やミトコンドリアのそれが持たない、30-40 残基程度で形成される  $\beta$  ヘアピン状の挿入配列が存在している<sup>76</sup>。その中の 2 つのシステイン残基によってジスルフィド結合が



形成される<sup>77,78</sup>。そのため、この阻害様式は葉緑体由来  $F_0F_1$  特有の制御機構と言える。シアノバクテリア由来  $F_0F_1$  の  $\gamma$  サブユニットもこのような挿入配列を持っている<sup>79</sup>が、この中にシステイン残基は存在しておらず、ジスルフィド結合を形成することはない。最近の研究<sup>80</sup>では、シアノバクテリア由来  $F_0F_1$  の  $\gamma$  サブユニットに存在する挿入配列内に 2 つのシステイン残基を入れると、葉緑体同様、分子内ジスルフィド結合を形成し、ATPase 活性を低下させることが分かった。

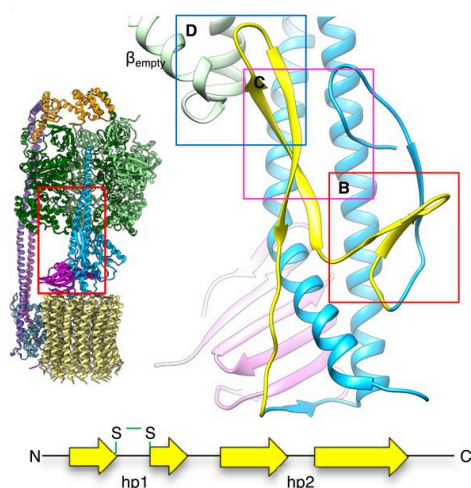


図 1-29 植物葉緑体由来  $F_0F_1$  の構造と  $\gamma$  サブユニット内の挿入配列<sup>75</sup>

右側の拡大図は  $\gamma$  サブユニットを表す。挿入配列によって 2 つの  $\beta$  ヘアピン構造が形成されている。L 型ループ(黄色)は阻害に直接関与する領域である。

#### 1.6.4 ミトコンドリアの $IF_1$ と $\alpha$ -proteobacteria の $\zeta$ サブユニット

ミトコンドリア種の  $F_0F_1$  が持つ阻害因子が ATPase inhibitory factor 1 ( $IF_1$ ) と呼ばれる阻害タンパク質である<sup>81</sup>。これはウシ<sup>81</sup>やヒト<sup>82</sup>、酵母<sup>83</sup>だけではなく、植物<sup>84,85</sup>やエビ<sup>86</sup>も持つことが知られている。回転子  $\gamma$  の先端に結合している  $\epsilon$  サブユニットとは違い、 $IF_1$  は  $F_0F_1$  の構成要素ではなく、阻害環境でのみ  $F_0F_1$  の機能を制御している。 $IF_1$  は  $F_1$  の固定子と回転子の間にその N 末端部分を突き刺すことで、 $F_1$  の加水分解活性を阻害する。その詳細な阻害機構については次項で述べることにする。

一方で、ミトコンドリア種の祖先とされる  $\alpha$ -proteobacteria 種に属する *Paracoccus denitrificans* の  $F_0F_1$  にも  $\zeta$  サブユニットという阻害タンパク質が存在する<sup>8,87-89</sup>。 $IF_1$  と  $\zeta$  サブユニットの間のアミノ酸配列相同性は低いものの、N 末端部分の構造は非常に似ている。すなわち、ともに  $\alpha$  ヘリックス構造をとり、 $F_1$  の  $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  サブユニットに結合して  $F_1$  の活性を阻害していることが知られている。進化の過程でその配列は変化したがる、 $IF_1$  と  $\zeta$  サブユニットの役割や構造は類似していることが示唆されている。

## 1.7 IF<sub>1</sub>の性質

本項では、ミトコンドリア種特有の F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の内在性阻害因子 IF<sub>1</sub> について解説する。IF<sub>1</sub> は 1963 年に Pullman と Monroy によって、ウシの心筋ミトコンドリアから発見・単離された熱安定性タンパク質<sup>81</sup>で、ウシの場合は 84 残基<sup>90</sup>、酵母の場合は 63 残基<sup>91</sup>からなる非常に短いタンパク質である。研究開始当初<sup>81</sup>から、IF<sub>1</sub> は ATP 加水分解環境での加水分解反応を抑制するが、ATP 合成環境ではその合成反応を阻害しないという性質を持つことが報告されている。ただし、解釈が分かれる主張であることを注意したい(詳細は 1.7.2)。以下ではまず、IF<sub>1</sub> の一般的な性質について紹介した後、結晶構造解析に基づく詳細な阻害機構とそれを解明しようとする近年の生化学実験について述べる。

### 1.7.1 ウシミトコンドリア由来 IF<sub>1</sub> の配列と構造

図 1-30 にウシ IF<sub>1</sub> の配列と、比較のために他の哺乳類 IF<sub>1</sub> の配列も一緒に示す。ヒトやマウスなど哺乳類動物間では高い配列相同性を保持しており、ウシ-ヒト間で約 75%、ウシ-マウス間で約 65%一致している。そのため、異なる種由来どうしの F<sub>1</sub>/IF<sub>1</sub> の組み合わせでも阻害を確認したという研究例もある<sup>45,92</sup>。残基 10-50 ではその一致率が特に高いため、この領域は進化を経ながらも維持されてきた IF<sub>1</sub> の共通阻害配列とされる。ウシ IF<sub>1</sub> の最小阻害配列を調べた研究<sup>93</sup>では、残基 10(14)-47 を残しただけでも IF<sub>1</sub> 全長(1-84)と同等の阻害能を示したと報告されている。

IF<sub>1</sub> の配列と構造を見比べると 2 つの大きな特徴がある。ひとつは、IF<sub>1</sub> の N 末端領域が溶液中で天然変性領域だということである<sup>94</sup>。この領域は可動性が高く安定した構造を取らない。しかし、F<sub>1</sub> と結合すると変性状態から徐々に  $\alpha$  ヘリックス構造をとり始めることが知られている(1.7.3 参照)。もうひとつの特徴は C 末端の二量化領域である<sup>90</sup>。この領域には 5 つのヒスチジン残基が含まれており、それらが pH 依存的に構造を変化させる。pH が 6.5 前後では IF<sub>1</sub> は最大阻害能を示し<sup>95</sup>、IF<sub>1</sub> は互いの C 末端(49-81)同士が anti-parallel coiled-coil(逆平行型のコイルドコイル)構造をとった二量体を形成している。それらの N 末端部分はそれぞれ別々の F<sub>1</sub> 部分に結合しているため、(F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>)<sub>2</sub> のような構造を取っていることが明らかになっている<sup>96</sup>。一方で pH が 8 以上の環境では、IF<sub>1</sub> は四量体かそれ以上の凝集した構造をとる。IF<sub>1</sub> の N 末端領域もこのようなオリゴマー形成に関係していると考えられており、F<sub>1</sub> への結合領域が減少するため、結果として IF<sub>1</sub> の阻害能は低下する。二量化に必要とされるヒスチジンのひとつに変異を導入した H49K を用いると IF<sub>1</sub> 阻害の pH 依存性は失われ、pH が 8 以上の環境でも pH6.5 で示した阻害能と近い値を示した<sup>95</sup>。また、二量体から四量体へ異性化するためには、残基 32-43 の存在が必要であることも示されている<sup>95</sup>が、その詳細は不明である。

近年、ウシ IF<sub>1</sub> の C 末端部分の二量体形成領域 61-84 を削除した変異体 IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> が作られ<sup>51,97</sup>、その最大阻害能は全長 IF<sub>1</sub> と変わらず、pH 依存性を持たないことが示された。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> は生化学実験や結晶構造解析で用いられる最も単純な IF<sub>1</sub> として使用されている。

Bovine GSESGDNVRS SAGAVRDAGG AFGKREQAEE ERYFRARAKE QLAALKKHHE NEISHHAKEI ERLQKEIERH KQSIKKLKQS EDDD  
 Human GSDQSENVDR GAGSIREAGG AFGKREQAEE ERYFRAQSRE QLAALKKHHE EEIVHHKKEI ERLQKEIERH KQKIKMLKHD D  
 Rat GSDSSESMD S GAGSIREAGG AFGKREKAEE DRYFREKTRE QLAALKKHHE DEIDHHSKEI ERLQKQIERH KKKIKYLNKNS EH  
 Murine VSDSSDSMDT GAGSIREAGG AFGKREKAEE DRYFREKTKE QLAALRKHHE DEIDHHSKEI ERLQKQIERH KKKIQQLKNN H

図 1-30 ウシ IF<sub>1</sub> と他の哺乳類由来 IF<sub>1</sub> の配列

ウシ IF<sub>1</sub> 中の赤字は阻害領域の N 末端(1-44)、青字は二量化領域の C 末端(49-81)、下線は四量化に必須と考えられている残基(32-43)を示している。また、pH 依存性を示すのに重要な His49 を太字で強調してある。

### 1.7.2 研究初期の生化学実験によって解明された IF<sub>1</sub> 阻害の基本的な性質

研究初期の IF<sub>1</sub> 研究では、サブミトコンドリア粒子(sub-mitochondrial particle; SMP)を用いた解析が一般的であった。SMP とはミトコンドリアから採取した膜断片を超音波にかけることで、ミトコンドリア内膜部分を裏返して外側に露出させた球状の小胞である。そのため、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の F<sub>1</sub> 部分は反転して膜外部分に露出した状態になる。溶液に尿素などを加えると、F<sub>1</sub> 部分だけ溶出させ単離することも可能である。また、膜上に存在する電子伝達系に関連する複合体はそのまま残っているため、電子伝達系関連の複合体の評価に用いるのに簡便な系と言える。

1963 年に発見された IF<sub>1</sub> ではあったが、当時は酸化的リン酸化に関連する数ある酵素の中でも特に重要視されていたわけではなく、機能解析が精力的に行われるようになったのはその数年後からであった。SMP や単独の F<sub>1</sub> を用いた多くの実験で、IF<sub>1</sub> 阻害には Mg<sup>2+</sup> と ATP(Mg-ATP)が必要であることが幾度となく示された<sup>98-102</sup>。一方で、ATP の代わりに AMP-PNP を用いた場合には、SMP や F<sub>1</sub> への IF<sub>1</sub> の結合反応がそれほど進まず IF<sub>1</sub> 阻害に陥りにくい状況であることも報告された<sup>103</sup>。これと同様に ADP やリン酸の場合でも IF<sub>1</sub> 阻害は促進されなかった。また、SMP を用いた場合に膜電位が与えられても、SMP への IF<sub>1</sub> 結合反応は進行しなかった<sup>99</sup>。以上から、IF<sub>1</sub> 阻害には ATP 加水分解反応が必要であり、IF<sub>1</sub> はミトコンドリア F<sub>1</sub> における ATP 加水分解のある中間状態と優先的に結合することが示された<sup>101</sup>。Mg-ATP の必要性のみならず、IF<sub>1</sub> は F<sub>1</sub> と等量(1:1)で結合すれば F<sub>1</sub> の活性を阻害するのに十分であること<sup>101,104-107</sup>、その結合領域は F<sub>1</sub> の β サブユニットであること<sup>104,108</sup> も報告された。

IF<sub>1</sub> による ATP 加水分解反応の阻害条件の特定に対して、IF<sub>1</sub> が ATP 合成反応を阻害するかという問いに対する答えはそれほど簡単ではなく、研究者によって多くの議論がなされた。同時にこれは IF<sub>1</sub> の解離条件を探索も困難を極めたという意味でもある。IF<sub>1</sub> の解離条件を調べた最初の研究<sup>99</sup>では、ミトコンドリアから調製した IF<sub>1</sub> 付き SMP を ADP やコハク酸などを添加した溶液中で遠心処理すると、操作後の SMP の ATPase 活性が上昇したという結果が得られた。これはすなわち、ATP 合成環境下で IF<sub>1</sub> が SMP から解離していることを示唆している。しかし、この実験では操作後の IF<sub>1</sub> 解離の程度を ATPase 活性から算出していた。すなわち、合成環境では IF<sub>1</sub> が ATP 合成反応を阻害しないかは解明されなかった。後続の研究<sup>100</sup>では、ATP 合成と ATP 加水分解反応が同一の実験で測定できる系が用いら

れ、ATP 合成反応に対する  $IF_1$  の影響が測定された。その結果、 $IF_1$  付き SMP を合成環境下におくと、数秒程度のラグがあったのちに ATP 合成反応を開始するデータが得られた。このラグは、 $F_0F_1$  に結合している  $IF_1$  が解離するのに必要な時間だと解釈された。すなわち、ATP 合成環境においては  $F_0F_1$  に結合している  $IF_1$  が解離して ATP 合成反応を開始できると解釈された。本論文ではこのような結果をもとに、「ATP 合成環境では  $IF_1$  は ATP 合成反応を阻害しない」と書くことにする。しかしながら、これらの *in vitro* での研究とは異なり、*in vivo* での実験結果の中には ATP 合成反応に影響を与えるとするという論文も発表されていることには注意したい<sup>109-111</sup>。使用するサンプル準備方法や実験条件によって得られる値も変わる可能性がある。また、生体内では翻訳後修飾によりタンパク質の化学的特性や構造が少し変わっていることも考慮しなければならない。実際、ヒト  $IF_1$  の残基のひとつ(S39)がリン酸化を受けているために、その結合解離が調節されているという研究<sup>112</sup>も報告されている。なお、この残基はその他の  $IF_1$  には存在しておらず、種依存的な残基ではないようである。

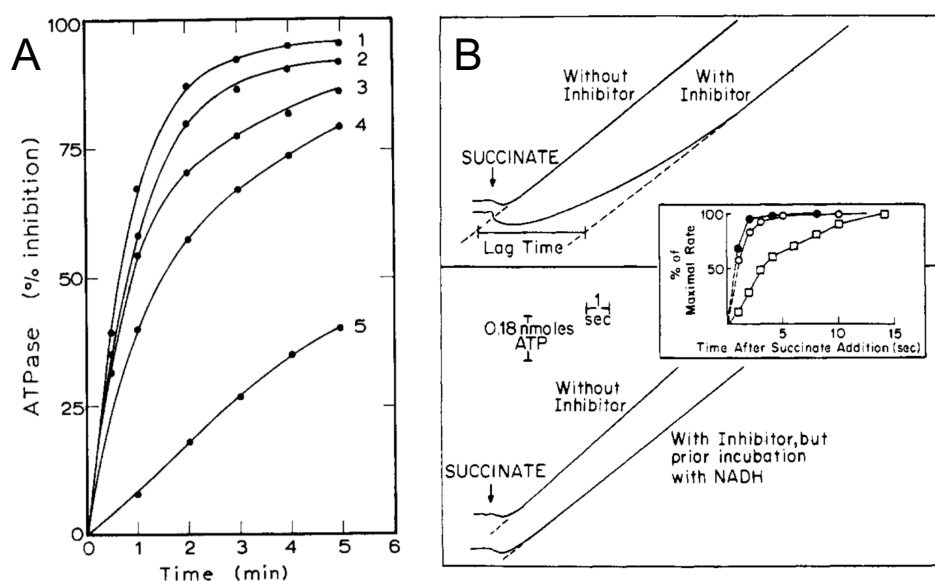


図 1-31 SMP を用いた  $IF_1$  の生化学実験(参考文献<sup>99,105</sup>をもとに図を作成)

(A)  $IF_1$  付き SMP をさまざまな基質で処理した後の ATPase 活性の変化。数字はそれぞれ(1) コントロール実験(基質なし)、(2) NADH、(3) オリゴマイシンとコハク酸、(4) NADH、オリゴマイシンとアンチマイシン、(5) NADH とアンチマイシンを示す。(B) ATP 合成の初期速度の比較。(上)  $IF_1$  付き SMP の合成活性を、あとから添加した  $IF_1$  の有無による 2 サンプルで比較した。 $IF_1$  添加サンプルにはラグが観察される。(下)  $IF_1$  除去サンプルと、 $IF_1$  を添加したが NADH で処理したサンプルの 2 つで比較した。両者の合成活性はほとんど同じで、上図で確認されたラグは観察されなかった。

### 1.7.3 結晶構造解析から導かれる IF<sub>1</sub>の阻害機構

ウシミトコンドリア由来の IF<sub>1</sub> と bMF<sub>1</sub> を用いた結晶構造解析により、IF<sub>1</sub> の阻害機構が提案された。2003 年に発表された IF<sub>1</sub> 全長(1-84)を用いての結晶構造解析<sup>113</sup>では、二量体 IF<sub>1</sub> の両側に bMF<sub>1</sub> がひとつずつ結合した結晶構造(bMF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>)<sub>2</sub> の結晶構造が明らかになった。その結果、IF<sub>1</sub> の C 末端部分が相互作用して二量体を形成する一方で、IF<sub>1</sub> の N 末端の部分が bMF<sub>1</sub> の  $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  の C 末端部分と結合していることが示唆された。しかし、この構造では残基レベルの相互作用までは解明できなかった。

2007 年、二量化領域となる C 末端を削除した IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> を用いた結晶構造解析により、IF<sub>1</sub> 阻害機構の解明が進んだ<sup>51</sup>。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> は二量化せず単量体として存在するため、今回明らかになったのは bMF<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> が 1:1 で結合した構造 bMF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> である。この構造によると、IF<sub>1</sub> の N 末端部分が  $\alpha$  ヘリックス構造をとって  $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  に深く突き刺さり  $\gamma$  の回転を阻害する lock 状態をとることが明らかになった。これに続く形で、2014 年にはひとつの bMF<sub>1</sub> に 3 つの IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> が結合した bMF<sub>1</sub>-(IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>)<sub>3</sub> の構造も解明された<sup>114</sup>。この構造では 3 つの触媒部位にそれぞれ異なる状態の IF<sub>1</sub> が結合していたことから、IF<sub>1</sub> が bMF<sub>1</sub> を段階的に阻害する様子が明らかになった。 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  に結合している IF<sub>1</sub> はその N 末端のフォールディングが最も進んだ状態で、bMF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> で観察されたような最終阻害状態であると予想された。 $\alpha_{TP}\beta_{TP}$  に結合している IF<sub>1</sub> は  $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  のものよりはフォールディングが進んでいないものの、部分的には  $\alpha$  ヘリックス構造をとっていた。 $\alpha_E\beta_E$  に結合している IF<sub>1</sub> の N 末端のフォールディングはそれほど進んでおらず、大部分が変性状態のままだった。

これらの知見から以下のような IF<sub>1</sub> 阻害機構が予想された<sup>51,114</sup>。まず、IF<sub>1</sub> は bMF<sub>1</sub> の  $\alpha_E\beta_E$  サイトに結合する。この時点では IF<sub>1</sub> の N 末端のフォールディングも進んでおらず、bMF<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の相互作用の数も限られている。IF<sub>1</sub> と bMF<sub>1</sub> は緩く結合したような状態で、bMF<sub>1</sub> の触媒活性は阻害されない。次に、IF<sub>1</sub> の N 末端のフォールディングが進むにつれて、 $\alpha$  ヘリックス構造をとり、 $\alpha\beta$  界面の奥深くに突き刺さるようになる。 $\alpha\beta$  のヌクレオチドの結合状態が変わっていることを考慮すると、IF<sub>1</sub> の阻害には  $\gamma$  の回転が必要なことも示唆される。最後に IF<sub>1</sub> のフォールディングが完了すると bMF<sub>1</sub> は完全に活性を失い、bMF<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の最終阻害複合体ができる。すなわち、IF<sub>1</sub> が bMF<sub>1</sub> に結合したのち、不活性な最終阻害状態に陥るという 2 段階の阻害機構が提案された。

これらの結晶構造解析から、阻害に重要な IF<sub>1</sub>、bMF<sub>1</sub> の残基もいくつか特定された<sup>51,114</sup> (表 1-1)。 $\alpha_E\beta_E$  に結合した IF<sub>1</sub> の中で bMF<sub>1</sub> の残基と結合するものはわずか 3 残基しかなかった。その中で IF<sub>1</sub> の 33 番目の残基であるチロシン(Y33)は bMF<sub>1</sub> の  $\beta_K401$  と相互作用していた。なお、この相互作用は  $\alpha_{TP}\beta_{TP}$ 、 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  と結合した IF<sub>1</sub> にも観察された。一方、 $\alpha_{TP}\beta_{TP}$ 、 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$  に結合した IF<sub>1</sub> と bMF<sub>1</sub> の相互作用の中で最も重要な残基が IF<sub>1</sub> の 30 番目の残基であるグルタミン酸(E30)である。この残基は bMF<sub>1</sub> の  $\beta_R408$  と塩橋を形成していることも示された。疎水環境下でのイオン性相互作用は解離しにくいいため、最終阻害生成物は不可逆な安定状態に達していると考えられる。なお、この相互作用は  $\alpha_E\beta_E$  では観察されず、IF<sub>1</sub> 結合に

は関与しないと推察される。

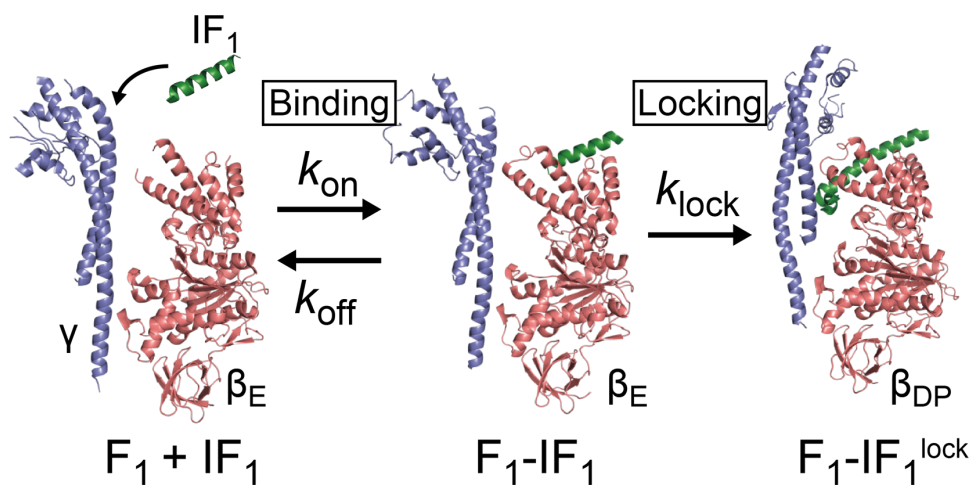


図 1-32 IF<sub>1</sub>による2段階阻害機構<sup>51,114</sup>

IF<sub>1</sub>はまず *b*MF<sub>1</sub>の  $\beta_E$ にゆるく結合し、中間体  $F_1-IF_1$ を形成する。この時点では *b*MF<sub>1</sub>の触媒機能は阻害されず、回転しながら ATP を加水分解することができる。その反応に伴い、IF<sub>1</sub>の N 末端部分のフォールディングが進んでいき、最終阻害生成物  $F_1-IF_1^{lock}$ に至る。 $\beta$ のヌクレオチド結合状態も変化し、ATP 加水分解完了状態( $\beta_{DP}$ )に達している。詳細は 1.7.3 と 3.1 を参照されたい。

表 1-1 各  $\beta$  サブユニットに結合した IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> のアミノ酸残基と相互作用する F<sub>1</sub> のアミノ酸残基  
参考文献<sup>114</sup> 中の表には誤植があったため、修正したものを新たに作成した。

	$\beta_E$	$\beta_{TP}$	$\beta_{DP}$	$\gamma$	$\alpha_{DP}$	$\alpha_E$
IF <sub>1</sub> <sup>1-60</sup> <sub>E</sub>						
E31	R408					
Y33	K401					
Q41	D450					
IF <sub>1</sub> <sup>1-60</sup> <sub>TP</sub>						
R25				E241		
E30		R408				
Y33		K401				
F34		E454 S405 R408				
Q41		D450				
IF <sub>1</sub> <sup>1-60</sup> <sub>DP</sub>						
S11				N15		
A12						E353
G13			D386			
V15			D386			
D17			D386			
F22		D386 I390 L391		I16		
E30			R408			
Y33			M393 D394 K401			
F34			V404 S405			
			R408 E454			
R35					E399	
Q41			D450			
			P453 L473			
L42			A474 H477			
L45			A470 D471 A474			

#### 1.7.4 速度論をもとにした IF<sub>1</sub> の生化学実験

以前から IF<sub>1</sub> の阻害条件を探索するための生化学実験は数多く行われていた。その中で ATP が存在しない場合には IF<sub>1</sub> の阻害能は低いが、ATP 存在下では IF<sub>1</sub> は F<sub>1</sub> の活性を阻害するデータが得られていた。これは十分な IF<sub>1</sub> 阻害のためには F<sub>1</sub> の回転が必要であり、結晶構造解析から得られた知見と一致していた。酵母 F<sub>1</sub>(yMF<sub>1</sub>) と IF<sub>1</sub>(yIF<sub>1</sub>) を用いた解析<sup>115,116</sup> では、ヌクレオチドの結合状態をもとに IF<sub>1</sub> 阻害の ATP 濃度依存性が調べられた。その結果、ATP 高濃度領域を除いて、IF<sub>1</sub> 阻害の速度定数は ATP 濃度と一致して上昇していく現象が観察された。一方で、ATP 高濃度領域で観察された阻害定数の減少<sup>102,115,116</sup> は、溶液中の Mg<sup>2+</sup> 濃度の上昇や F<sub>1</sub> に 3 つの ATP が結合することによるものと提案されている。幅広い ATP 濃度条件で IF<sub>1</sub> 阻害の定量が行われたが、これら実験は IF<sub>1</sub> 低濃度でのみ行われただけだった。

また別のグループによる生化学実験として、結晶構造で特定された重要残基をもとにした変異体解析も行われた<sup>97</sup>。筆者らは 30 を超える IF<sub>1</sub> 変異体を作成し、その阻害能の変化を調べた。その結果、いくつかの変異体(IF<sub>1</sub>(E30A)や IF<sub>1</sub>(Y33A))では観察されないほど阻害能が低下していたが、ほとんどすべての変異体で結晶構造解析によって予想されたようなデータが得られた。この研究では IF<sub>1</sub> 阻害に携わる残基の役割は明確化されたものの、IF<sub>1</sub> 結合・解離反応にしか注目しておらず、IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構は実証されていない。

結晶構造解析で提案された IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構を実証するためには、「IF<sub>1</sub> 阻害定数が IF<sub>1</sub> 濃度に応じて上昇し、やがて飽和に達する」という双曲線(ミカエリスメンテン)型の関係が必要である。また、bMF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> 中間体から最終阻害生成物までの反応が ATP 濃度依存であるとするならば、IF<sub>1</sub> 阻害定数が示す飽和点も ATP 濃度依存を示すはずである。しかし、上述の生化学実験からはそのような結果は読み取れない。したがって、長年研究が行われた生化学実験でも IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構を実証する研究はなされていない。

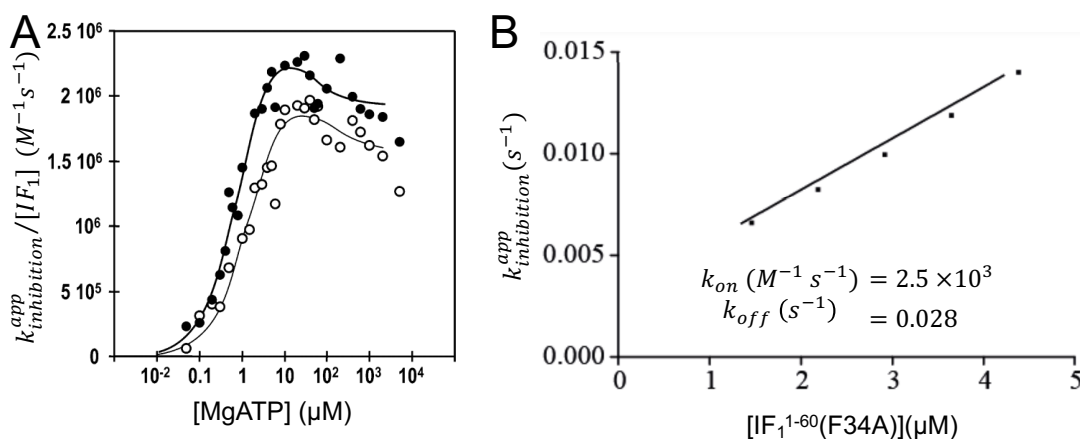


図 1-33 速度論的解析に基づく生化学実験(参考文献<sup>97,115</sup>をもとに図を作成)

(A) 酵母由来 yMF<sub>1</sub> と yIF<sub>1</sub> を用いた IF<sub>1</sub> 阻害の ATP 濃度依存性。縦軸は IF<sub>1</sub> 結合定数を表していることに注意する。(B) ウシ由来 bMF<sub>1</sub> と bIF<sub>1</sub> を用いた変異体解析。変異体 IF<sub>1</sub>(F34A) のデータを示した。ここでの縦軸は見た目の IF<sub>1</sub> 阻害定数であり、これを 1 次反応に基づき直線フィッティングを行って、パラメータを算出した。



## 1.8 本研究の目的と概要

上述のように  $F_1$  の研究は 1 分子回転解析と結晶構造解析を両輪として著しく発展してきた。しかし、両者が研究対象とする  $F_1$  が異なっていた。1 分子計測では好熱菌 *Bacillus* 由来  $F_1(TF_1)$  が、構造解析では  $bMF_1$  がそれぞれ用いられてきた。「 $TF_1$  の反応スキームは  $bMF_1$  と同一」という前提の下、1 分子計測の知見は高分解能の構造が得られている  $bMF_1$  の結晶構造をもとに議論されてきた。ところが、近年ヒトミトコンドリア由来  $F_1(hMF_1)$  の 1 分子計測によって、「バクテリア型とミトコンドリア型の回転スキームは同一ではない」ことが示唆され、前提が大きく揺らいでいる。ともに哺乳類由来である  $bMF_1$  と  $hMF_1$  は高い配列相同性を示しているが、1 分子解析の結果と結晶構造解析の結果を厳密に対応付けするには、両者の解析で同一種の  $F_1$  を用いる必要がある。本論文の第 2 章では、結晶構造が豊富に存在する  $bMF_1$  の回転運動を 1 分子解析することで、1 分子計測と結晶構造解析を厳密に対応付けさせることを目的とした。

本論文の第 3 章と第 4 章では  $F_0F_1$  ATP 合成酵素の制御について議論した。生体内では、低 *pmf* 条件下で生じる ATP の加水分解は ATP の浪費につながるため厳密に制御されている。ミトコンドリア型  $F_0F_1$  では、Inhibitory factor 1( $IF_1$ )と呼ばれる制御タンパク質が  $F_1$  部位に作用し、ATP 加水分解を阻害している。上述のように  $IF_1$  によって阻害された  $bMF_1$  の結晶構造解析から  $IF_1$  の 2 段階阻害機構が提案された。しかし、これを実証する速度論的解析や 1 分子計測は行われておらず、 $IF_1$  阻害機構については不明な点が多い。本論文の第 3 章では生化学実験から  $IF_1$  の 2 段階阻害機構の実証を行った。さらに第 4 章では、 $bMF_1$  の 1 分子解析系に  $IF_1$  を導入して、 $IF_1$  の阻害状態を  $bMF_1$  の回転・停止から議論した。この章では、第 2 章で行った  $bMF_1$  の 1 分子解析から得られた回転特性と、第 3 章の解析から得られた  $IF_1$  の阻害特性を利用して実験を行った。さらに、 $IF_1$  の解離条件を探索するため、1 分子操作技術として知られる磁気ピンセットを利用して  $IF_1$  阻害  $bMF_1$  の回転再開を試みる実験を行った。

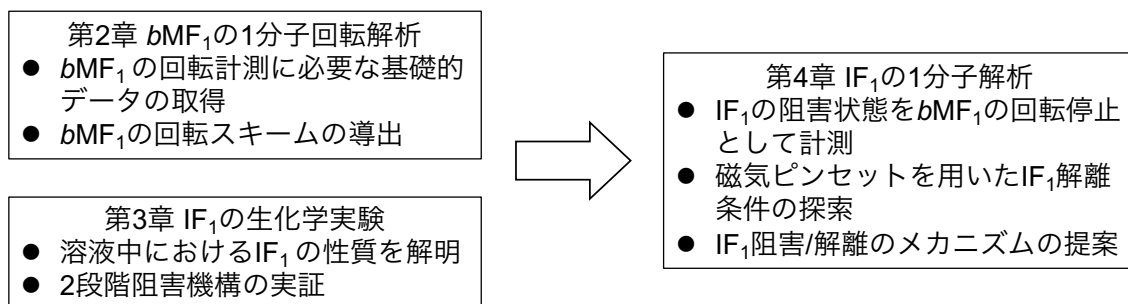


図 1-34 本論文の流れ

## 第2章 1 分子解析によるウシミトコンドリア由来 $F_1$ の回転機構解明

### 2.1 本章の目的

本章では結晶構造が豊富に存在する  $bMF_1$  の回転運動を 1 分子解析することで、1 分子計測と結晶構造解析を厳密に対応付けさせることを目的とした。

本章では  $bMF_1$  の回転を ATP(2.2)と  $ATP\gamma S$ (2.3)の 2 種類の基質で観察した。また、変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  を精製して回転観察を行なった(2.4)。2.5 と 2.6 では  $bMF_1$  の回転を停止する AMP-PNP とアジ化ナトリウムを用いてその回転停止点を調べた。2.7 では磁気ピンセットを用いて Stall-Release 実験を行い、 $bMF_1$  が回転角度に応じてどのように化学反応を調節しているかを調べた。

1 分子の  $F_1$  の回転運動を可視化する試みは野地らによって実現されて以来、観察プローブや計測系の向上など少しずつその方式は変化している。しかし、 $F_1$  の固定子リング  $\alpha_3\beta_3$  をガラス面に、回転子である  $\gamma$  に回転プローブを結合させるという点は共通している。本章で行なった回転観察ではプローブとして  $\phi 40\text{ nm}$  の金コロイド(2.2~2.4)か、 $\sim 300\text{ nm}$  程度の磁気ビーズ(2.5~2.7)を用いた。

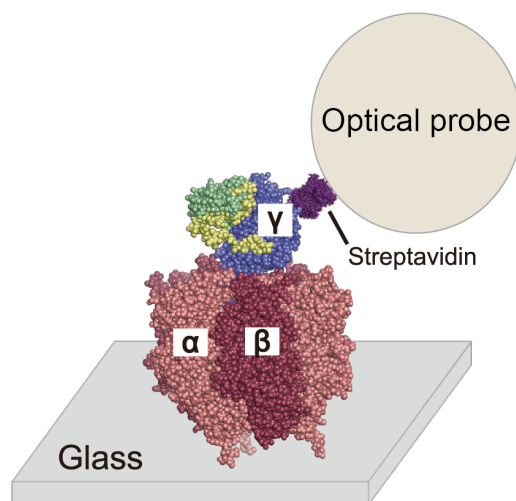


図 2-1  $F_1$  の 1 分子回転観察系

## 2.2 ATP 溶液中での回転

はじめに  $bMF_1$  本来の触媒速度を測定するため、さまざまな ATP 濃度における  $bMF_1$  の回転速度を計測した。溶液の粘性抵抗による影響を小さくするため、プローブとして 40 nm の金コロイドを使用し、 $bMF_1$  の回転を暗視野顕微鏡で観察した<sup>26</sup>。カメラのフレームレート(撮影速度)は ATP 濃度と  $bMF_1$  の回転速度に応じて 125 fps から 45,000 fps (22-8000  $\mu$ s/frame)の間で変えながら動画を撮影した。実験は室温(23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)で行った。

結果を図 2.2 に示す。 $bMF_1$  の回転速度(図 2.2 赤)は他の  $F_1$  と同様に、ミカエリスメンテン式

$$V = \frac{V_{max} [ATP]}{K_m + [ATP]} \quad \text{式(2.1)}$$

に従うことが分かった。このフィッティングから最大回転速度( $V_{max}$ )とミカエリスメンテン定数( $K_m$ )はそれぞれ、707 rps、77  $\mu$ M と算出された。最大回転速度は、同じ哺乳類ミトコンドリア由来でアミノ酸配列の相同性も非常に高い  $hMF_1$  の値(741 rps at 26 $^{\circ}$ C)<sup>45</sup> と非常に近い値を示した。一方で、好熱菌由来  $TF_1$ (129 rps)<sup>28</sup> や大腸菌由来  $EF_1$ (449 rps)<sup>46</sup> と比べると大きい値であった。

$F_1$  は 3 つの触媒部位を持っているため、1 回転で 3 つの ATP を加水分解できる。最大回転速度 707 rps という値は、1 秒間で最大約 2100 個の ATP を加水分解できることを意味する。図 2.2 では  $bMF_1$  の回転速度(図 2-2 赤)とともに、ATP 再生系を用いた溶液中における ATPase のデータ(図 2-2 青)も掲載した。ATPase 測定から算出された最大触媒速度  $V_{max}^{ATPase}$  とミカエリスメンテン定数  $K_m^{ATPase}$  はそれぞれ、1037/s と 218  $\mu$ M であった。測定したすべての ATP 濃度で ATPase 活性は回転速度を下回ることとなった。この現象は他の  $F_1$  でも幾度となく観察されている ADP 阻害によるものであると考えられる<sup>28,43,52,53</sup>。 $F_1$  は回転触媒反応の間に一時的な停止状態に陥り、不活性な状態を示す。ADP 阻害状態によって、1 分子回転解析系で観察される回転速度の時間平均や、ATPase 測定で計測される加水分解活性の多粒子平均の値は小さく算出される。図 2-2 赤で示したデータでは、ADP 阻害の影響を除いて回転速度を算出しているため、 $bMF_1$  の本来の回転速度に近い値を算出できていると考えられる。なお、ATPase 測定のデータについては 3.2 や 7.1.6 でさらに詳細な解析を行なった。

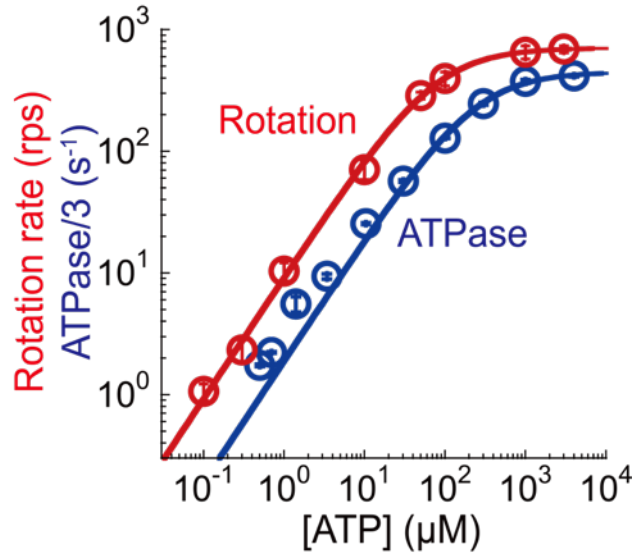


図 2-2 ATP 濃度と回転速度(赤)、ATPase/3(青)の関係

フィッティングはミカエリスメンテン式、エラーバーは各測定から得られた SD(回転速度では  $N=20-25$ 、ATPase では  $N=3$ )を表す。回転速度の場合、 $V_{max}$ :  $707 \pm 5$  rpm、 $K_m$ :  $77 \pm 2$   $\mu\text{M}$ 、ATPase/3 の場合、 $V_{max}^{ATPase}$ :  $346 \pm 11$  rpm、 $K_m^{ATPase}$ :  $218 \pm 26$   $\mu\text{M}$  と算出された。

次に  $b\text{MF}_1$  の回転特性を調べるため、重心のプロットや累積角度の時間変化の詳細な解析を行った。 $K_m(77 \mu\text{M})$ より十分に低い ATP 濃度では、 $b\text{MF}_1$  は  $120^\circ$ おきの明確な 3 つの停止を示した(図 2-3)。これらは ATP 結合待ち状態による停止だと考えられる。ステップ間の待ち時間(Dwell time)を集めたヒストグラムを 1 次の減衰指数関数

$$\text{Counts} = A \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{式(2.2)}$$

でフィッティングを行い、時定数  $\tau$  を算出した( $A$  は定数、 $t$  は時間)。算出された時定数  $\tau$  は予想通り ATP 濃度に比例した(図 2-4)。また、この条件では時定数  $\tau$  と ATP 結合定数  $k_{on}^{ATP}$  の間には

$$k_{on}^{ATP} = \frac{1}{\tau [\text{ATP}]} \quad \text{式(2.3)}$$

の関係性がある。時定数  $\tau$  には ATP 濃度依存性があるものの、 $k_{on}^{ATP}$  はほぼ一定の値を示した( $3.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )。この値も他の  $\text{F}_1$  から算出された値と非常に近い( $\text{TF}_1^{28}$ :  $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $h\text{MF}_1^{45}$ :  $2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )。

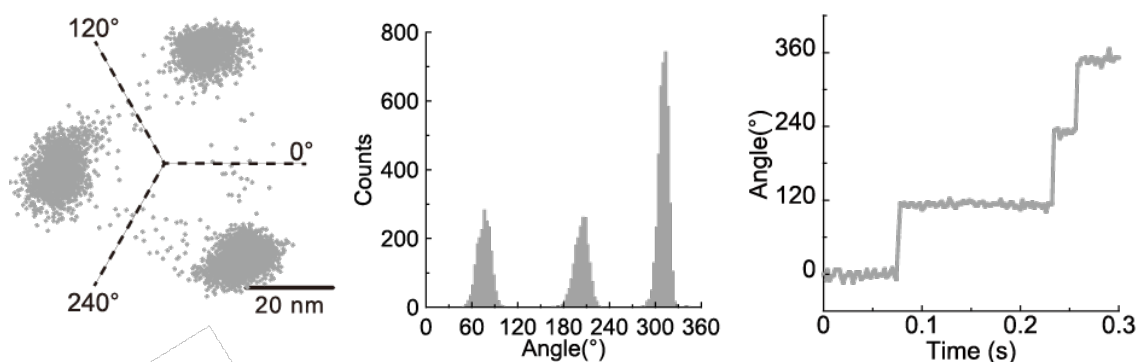


図 2-3 ATP 300 nM 条件における粒子の例 (撮影速度は 500 fps)

図はそれぞれ(左) 重心のXY プロット、(中) 角度ヒストグラム、(右) タイムコースを示す。

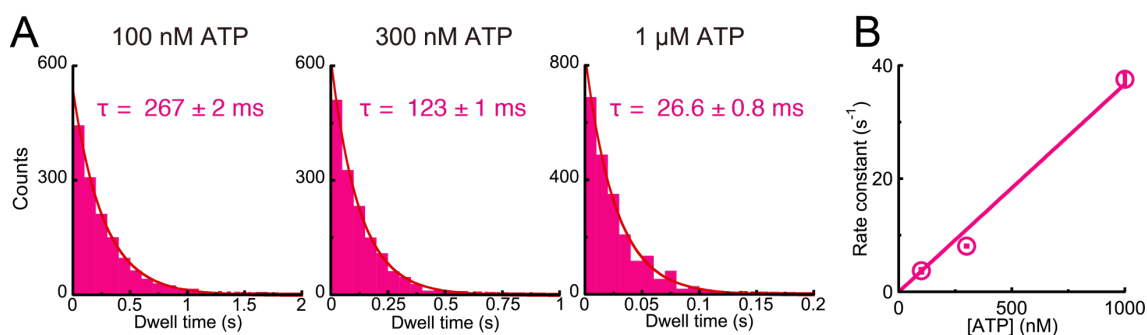


図 2-4 低濃度 ATP 条件における Dwell time 解析

(A) Dwell time ヒストグラム(時定数  $\tau$  はフィッティングパラメータ  $\pm$  フィッティングエラーで表されている) (B) ATP 結合待ち速度定数と ATP 濃度の関係(撮影速度は 125-500 fps)

次に ATP 高濃度条件( $>>K_m$ )での粒子の挙動について述べる。この条件では、すべての粒子ではないが、 $bMF_1$  粒子は 6 つの停止点を示した(図 2-5)。タイムコース(図 2-5 右)では、1 回転中に 4 つ以上の停止が確認できる。TF<sub>1</sub> や  $hMF_1$  の 1 分子回転観察実験で確認されたように、このうち 3 つは ATP 加水分解待ち(*catalytic dwell*)に対応すると考えられる。3 mM ATP 条件では、ATP 結合待ちによる停止は 10  $\mu$ s 以下であり、無視できるほど短い。すなわち、この条件で観察される停止は ATP 結合待ち停止ではない。したがって、 $bMF_1$  は ATP 加水分解待ち停止の他に ATP 結合待ちではない停止を持つことが示唆される結果である。しかしながら、40 nm を用いた実験系の応答時間は 0.1 ms 程度(7.1.2)であり、図 2-5 に示すような 0.1 ms 以下の反応停止は解析するのが難しい。以上より、ATP 高濃度条件での Dwell time 解析は行わず、次項に続く解析を行うことにした。

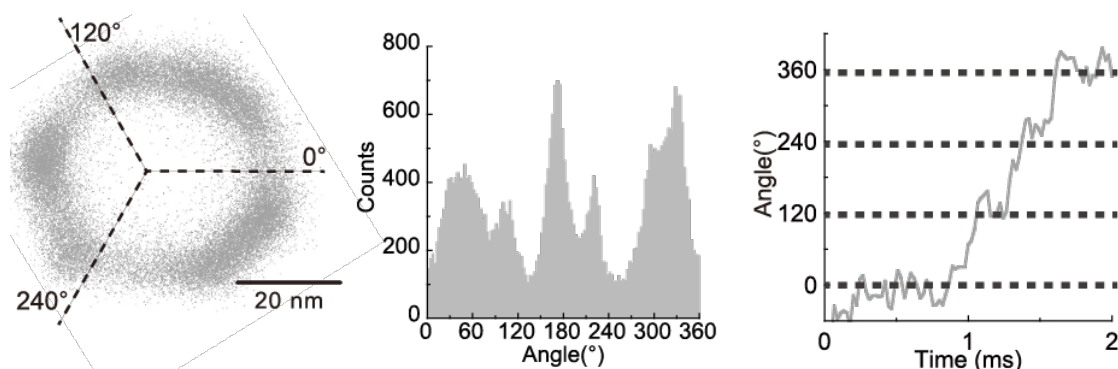


図 2-5 ATP 3 mM 条件における粒子の例 (撮影速度は 45000 fps)

(左) 重心のXY プロット、(中) 角度ヒストグラム、(右) タイムコース

### 2.3 ATP $\gamma$ S 溶液中での回転

$b\text{MF}_1$  の回転や dwell をさらに明確に解析するため、ATP アナログとして知られる ATP $\gamma$ S 溶液中における  $b\text{MF}_1$  の回転挙動を調べることにした。TF $_1$ <sup>28</sup> や  $h\text{MF}_1$ <sup>45</sup> の 1 分子回転実験でも使用された ATP $\gamma$ S はそれぞれ ATP 加水分解、チオリン酸解離の速度を低下させたとされている。

まず、ATP $\gamma$ S が  $b\text{MF}_1$  の活性にどのような影響を与えるか調べるため、さまざまな ATP $\gamma$ S 濃度で  $b\text{MF}_1$  の回転速度を算出し、ミカエリスメンテンカーブを描いた(図 2-6)。  $V_{\text{max}}$  と  $K_m$  はそれぞれ 20.3 rps、2.2  $\mu\text{M}$  と算出された。予想通り、 $V_{\text{max}}$  の値は ATP 溶液での回転で算出された値(707 rps)より約 35 倍小さくなった。また、 $3 \times V_{\text{max}}/K_m$  で計算される  $k_{\text{on}}^{\text{ATP}\gamma\text{S}}$  は  $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  と求められた。この値は  $k_{\text{on}}^{\text{ATP}}$  ( $3.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) とほぼ一致した結果である。

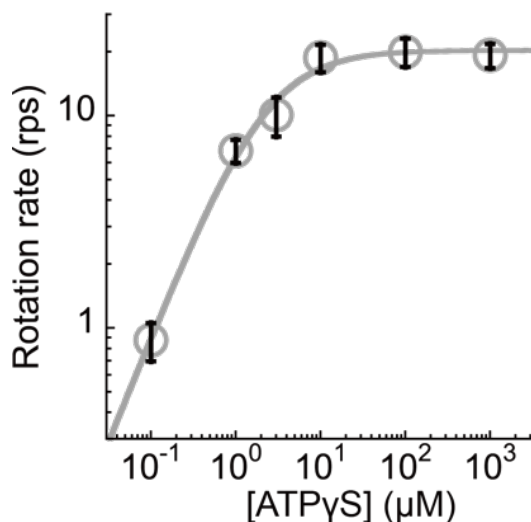


図 2-6 ATP $\gamma$ S 濃度と回転速度の関係

フィッティングはミカエリスメンテン式、エラーバーは各測定から得られた SD(回転速度では  $N=21-27$ )を表す。  $V_{\text{max}}$ :  $20.3 \pm 1.0 \text{ rps}$ 、  $K_m$ :  $2.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$  と算出された。

次に、ATP $\gamma$ S 濃度別の  $b\text{MF}_1$  の回転挙動を調べた。 $K_m(2.2 \mu\text{M})$ より十分高い ATP $\gamma$ S 高濃度条件では、粒子の重心を示す XY プロットで 120 度おきに分かれて明確な 3 つのクラスター(図 2-7 青)のみが観察された。しかし、タイムコースを詳細に解析してみると、120 度おきの明確な 3 ステップの間に非常に短い停止(図 2-7 オレンジ)が観察できる。すなわちこれは、 $b\text{MF}_1$  は 120 度おきに 2 種類の停止を示すということである。以降、*long dwell/pause*(青)、*short dwell/pause*(オレンジ)と表すことにする。ただし、*short dwell* は非常に短いため、120 度おきのステップで必ず観察されるわけではないことを注意したい。

これらの停止やステップを客観的に評価するため、タイムコース中の角度変化を検出できる Change-Point analysis<sup>117</sup> という方法を用いた。Change-Point analysis でも *short dwell* の検出に成功した。図 2-7(B)に 1 mM ATP $\gamma$ S 条件における粒子の例を示す。上段のヒストグラムは従来の角度ヒストグラムであり、すべてのデータポイントから構成されているものである。一方で、下段のヒストグラムは、Change-Point analysis で検出された *dwell* が 1 つのデータを意味している。すなわち、2 つの連続する Change-Point 間の停止をひとつの停止としてみなし、その角度位置の累積が図 2-7(B)下段の角度ヒストグラムである(以後、Change-Point ヒストグラムと呼ぶ)。従来の角度ヒストグラムでは明確な 3 つのピークしか観察されないが、Change-Point ヒストグラムでは *long dwell*(青)の間に *short dwell*(オレンジ)に起因する 3 つのピークが観察できる。Change-Point ヒストグラム上で左側の *long dwell* からその次の *short dwell* の距離を求めると 59.8 度であった(図 2-7(C))。さらに、これらの *long dwell* と *short dwell* を別々に集め、*dwell time* 解析を行った。その結果、ATP $\gamma$ S 濃度を変えても、どちらのヒストグラムも 1 次の減衰指数関数でフィットすることができ、時定数としてそれぞれ 14~15 ms(*long dwell*)、0.7~0.9 ms(*short dwell*)を得た(図 2-8)。すなわち、ATP $\gamma$ S 濃度によらない加水分解素過程に対応すると考えられる。

ATP $\gamma$ S 高濃度条件の回転では、*long dwell* と *short dwell* の他に、1 秒を超える長い停止も頻繁に観察された(図 2-9)。これまでに回転観察実験がなされた他の  $\text{F}_1$  でも数秒程度の長い停止は観察されている<sup>36,46,52,89</sup>。それらは ADP 阻害状態であり、ATP 開裂待ち状態と特定されてきた。今回発見された  $b\text{MF}_1$  中の長い停止についても ADP 阻害状態だと考えた。ADP 阻害状態(図 2-9 緑)の角度位置は *long dwell* の角度位置(図 2-9 青)と一致した。すなわち、*long dwell* は ATP 開裂状態待ちであることが示唆された。



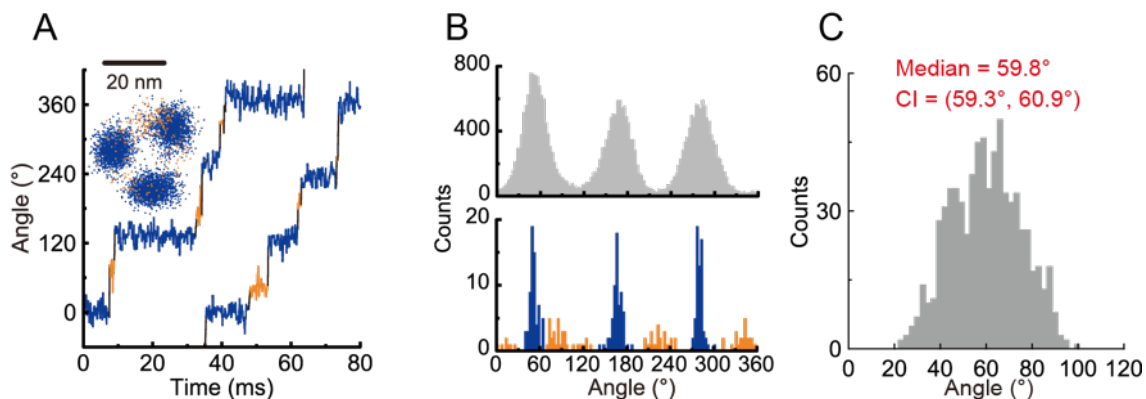


図 2-7 1 mM ATP $\gamma$ S 条件での粒子の挙動(撮影速度: 10000 fps)

青は *long dwell*、オレンジは *short dwell* を表す。(A) 代表粒子のタイムコース(インセットは重心の XY プロット)。(B) (A)で示された粒子の角度ヒストグラム。(上) 従来の角度ヒストグラム(すべてのデータポイントから構成されている)。(下) Change-Point ヒストグラム(ひとつのデータポイントは1つの dwell 位置を表す)。(C) *Long dwell* から見た *short dwell* の位置を表すヒストグラム(N = 15 mols, 727 steps)。CI は 68% bootstrap confidence intervals を表す。

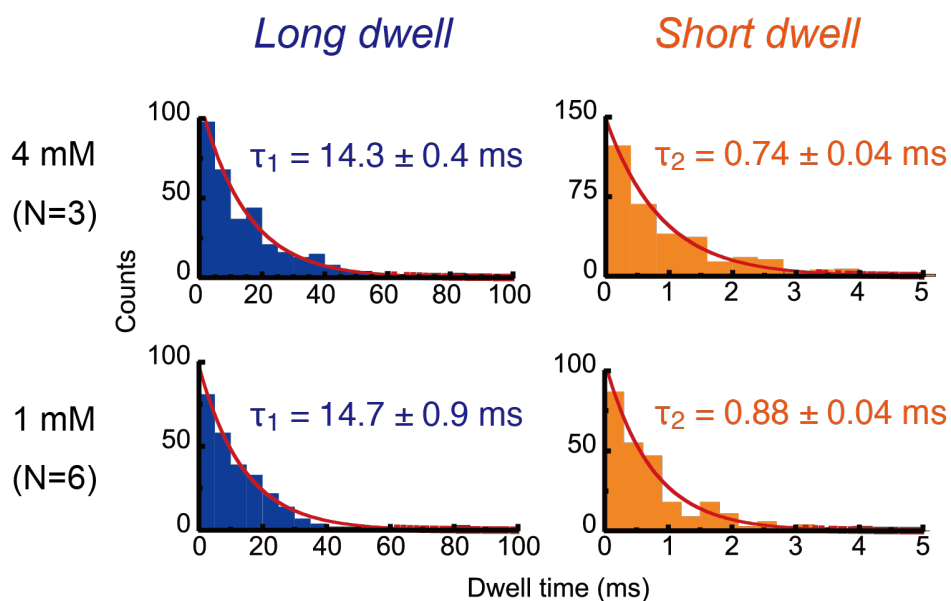


図 2-8 高濃度 ATP $\gamma$ S 濃度における *long dwell* と *short dwell* の時定数解析

フィッティングは1次の減衰指数関数を表す。時定数はフィッティングパラメータ $\pm$ フィッティングエラーで示されている。

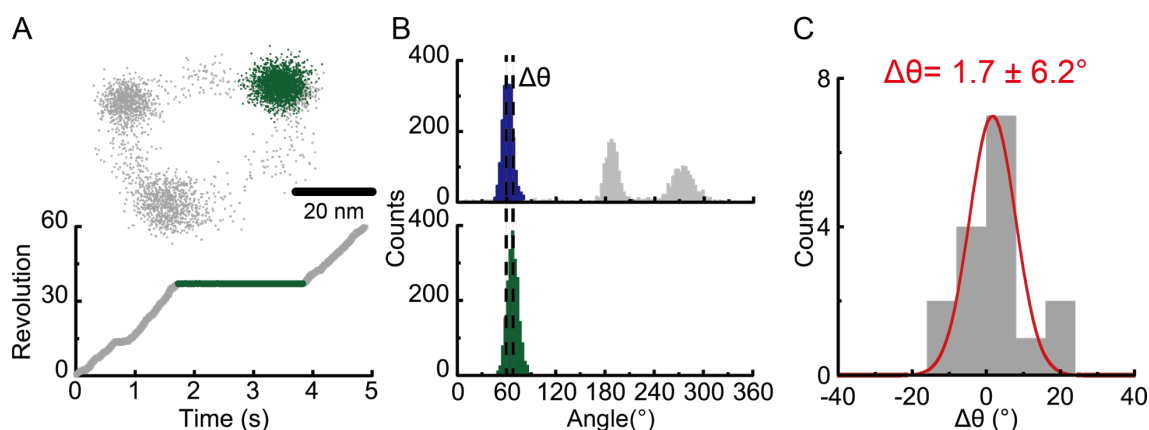


図 2-9 1 mM ATP $\gamma$ S 条件における ADP 阻害状態の解析(撮影速度: 1000 fps)

(A) 重心の XY プロットとタイムコース(緑色の停止が ADP 阻害) (B) (上) 回転状態と(下) ADP 阻害状態の角度ヒストグラム (C) (B)で定めた  $\Delta\theta$  の角度ヒストグラム(N=16)

今度は ATP $\gamma$ S 低濃度から  $K_m$  付近の回転特性について調べた。比較的長い時間観察するため、撮影速度は 1000 fps とした。この条件では ATP $\gamma$ S 濃度が十分低いことから、ATP $\gamma$ S 高濃度条件で発見された *long dwell* だけではなく、ATP $\gamma$ S 結合待ち状態の停止も観察されることが考えられる。その結果、角度ヒストグラムとタイムコースの両方で 120 度回転の間に 2 種類の回転停止点が観察された。図 2-10 に示すのは ATP $\gamma$ S 1  $\mu$ M 条件での粒子の例である。 $K_m$  (2.2  $\mu$ M) より 2 倍程度低い条件であるので、ATP $\gamma$ S 結合待ち状態が全体の律速過程となる。すなわち、ATP $\gamma$ S 結合待ち停止の方が *long dwell* より長く表れやすいということである。図 2-10 のタイムコースや角度ヒストグラムで、より長い停止を ATP $\gamma$ S 結合待ち停止(ピンク)、短い方を *long dwell* (青)とした。ATP $\gamma$ S 結合待ち停止から *long dwell* の角度差を算出すると 77°であった(図 2-10(B)下段)。ADP 阻害の停止位置と *long dwell* の角度位置が一致することを考えると、ATP 結合待ち状態から見て ATP 加水分解待ち状態は 80°の位置にあることを意味している。これは TF<sub>1</sub>(80°)<sup>28</sup> と hMF<sub>1</sub>(90°)<sup>45</sup> とほぼ一致する結果である。ATP $\gamma$ S 濃度を変えて実験をしてみると、それに従って ATP $\gamma$ S 結合待ち停止の長さも変わった(図 2-11)。時定数  $\tau$  から計算される ATP $\gamma$ S 結合定数  $k_{on}^{ATP\gamma S}$  の値は  $2.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  であり、ミカエリスメンテン式のフィッティングパラメータから得られた値( $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )と一致した。一方で、ATP $\gamma$ S 濃度によらず *long dwell* の長さは 11~13 ms で一定で、ATP $\gamma$ S 高濃度で算出された値(14~15 ms)と一致した。すなわち、この条件で観察される 2 種類の停止は *long dwell* と ATP $\gamma$ S 結合待ちであることが再度確認された。ATP $\gamma$ S 低濃度条件の回転中にも、ATP $\gamma$ S 高濃度条件で観察された非常に長い停止は頻繁に観察された。ADP 阻害と思われるこの停止の角度位置は *long dwell* のそれと一致した(図 2-12)。なお、この条件では *short dwell* は検出できなかった。*Short dwell* は非常に短く(0.7~0.9 ms)、今回の撮影速度(1000 fps = 1 ms/frame)では検出できなかったことが理由だと思われる。

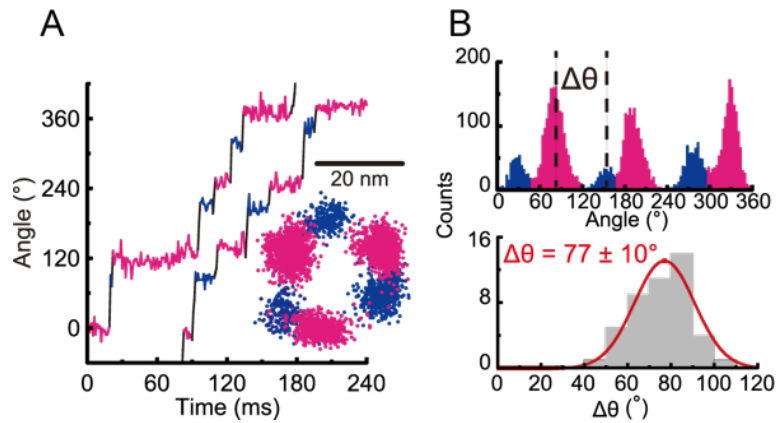


図 2-10 1  $\mu\text{M}$  ATP $\gamma\text{S}$  条件での粒子の挙動(撮影速度: 1000 fps)

青は *long dwell*、ピンクは *binding dwell* を表す。(A) 代表粒子のタイムコース(インセットは重心の XY プロット)。(B) 角度ヒストグラム。(上) 従来の角度ヒストグラム(すべてのデータポイントから構成されている)。(下)(上)で定めた角度差  $\Delta\theta$  のヒストグラム( $N = 45$  pauses, 15 mols)。値は平均 $\pm$ SD を表す。

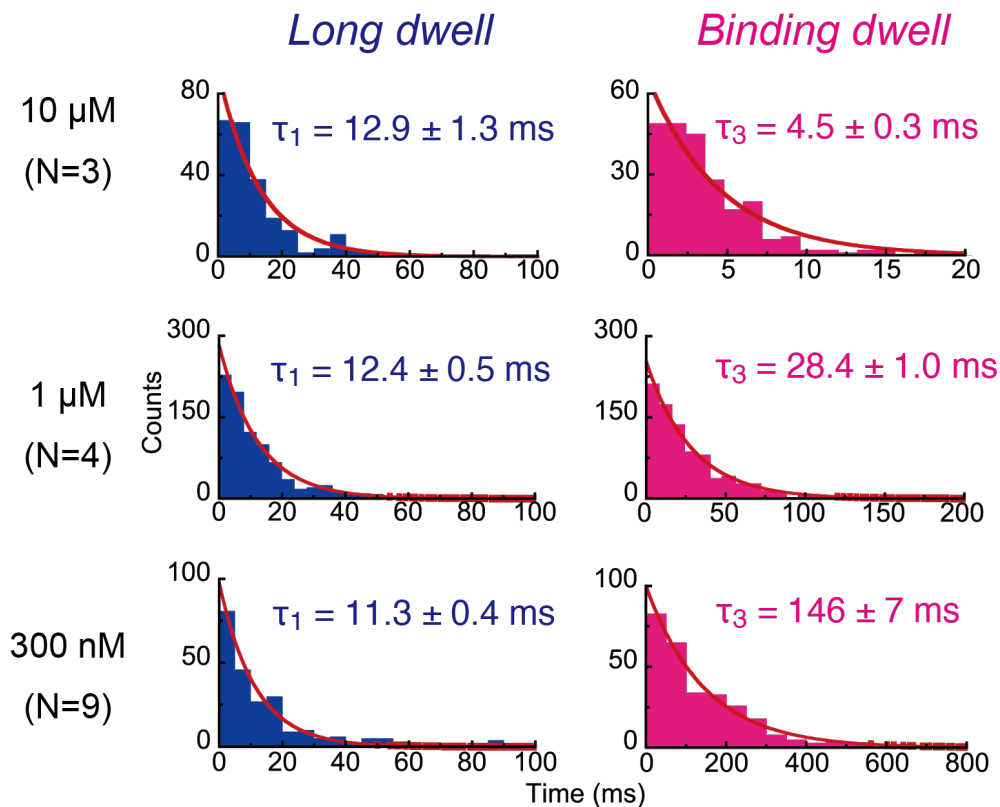


図 2-11 低濃度 ATP $\gamma\text{S}$  濃度における *long dwell* と *binding dwell* の時定数解析  
フィッティングは 1 次の減衰指数関数を表す。時定数はフィッティングパラメータ $\pm$ フィッティングエラーで示されている。

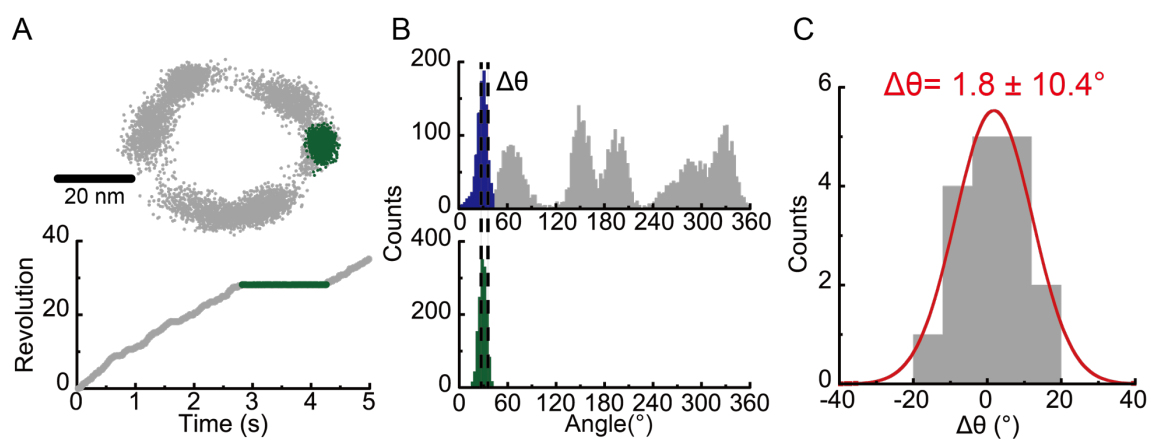


図 2-12 1  $\mu\text{M}$  ATP $\gamma$ S 条件における ADP 阻害状態の解析(撮影速度: 1000 fps)

(A) 重心の XY プロットとタイムコース(緑色の停止が ADP 阻害) (B) (上) 回転状態と(下) ADP 阻害状態の角度ヒストグラム (C) (B)で定めた  $\Delta\theta$  の角度ヒストグラム(N=17)

## 2.4 変異体 $bMF_1(\beta E188D)$ の回転

前章で観察された、*long dwell* が *binding dwell* の  $80^\circ$  先にあるという結果を確認するため、 $bMF_1$  変異体  $\beta E188D(bMF_1(\beta E188D))$  の回転を観察した。 $\beta$  サブユニットの 188 番目のグルタミン酸は  $F_1$  種を問わず保存性の高い残基である。結晶構造では、 $\beta E188$  残基が隣接する水分子を介して、ATP の  $\gamma$  リン酸と相互作用していることが明らかになっている<sup>48</sup>。量子力学的計算(QM/MM)によって、この残基が ATP 開裂反応を加速させており、律速段階であるプロトンのやり取りを促進する役割を持っていることがわかった<sup>20</sup>。過去の  $TF_1$  の 1 分子回転観察の場合でも、この残基に相当する  $\beta E190$  残基をアスパラギン酸に変えた  $\beta E190D$  変異体が作成され、ATP 開裂反応を約 320 倍低下させたという報告がある<sup>29</sup>。

まず、ATP 濃度ごとの  $bMF_1(\beta E188D)$  の回転速度を調べた(図 2-13)。野生型の場合と同様、ミカエリスメンテン式でフィットでき、 $V_{max}$  と  $K_m$  の値がそれぞれ、1.2 rps、1.2  $\mu M$  と算出された。予想通り、 $V_{max}$  の値は大きく減少し、野生型の場合と比べ約 600 倍低下した。これら 2 つのパラメータから ATP 結合定数  $k_{on}^{BE188D-ATP}$  は  $3.2 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$  と求められ、こちらも野生型の値と比べ 10 倍低下した。

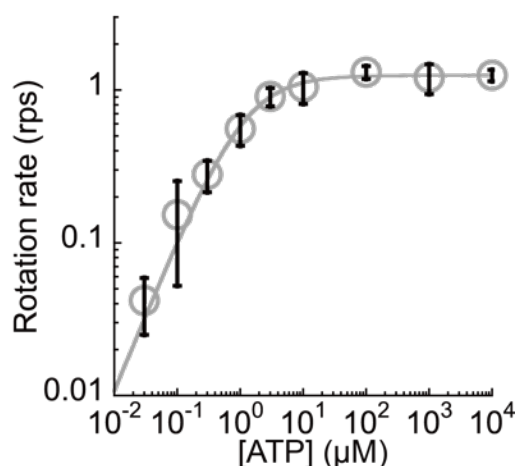


図 2-13 変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP 濃度と回転速度の関係

フィッティングはミカエリスメンテン式、エラーバーは各測定から得られた SD(回転速度では  $N=19-34$ )を表す。 $V_{max}$ :  $1.24 \pm 0.03$  rps、 $K_m$ :  $1.15 \pm 0.13$   $\mu M$  と算出された。

変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の詳細な回転特性は、前章で述べた野生型  $bMF_1$  の  $ATP\gamma S$  溶液中での回転特性に非常によく似ていた。ATP 高濃度条件では  $120^\circ$  ステップの間に *long dwell* と *short dwell* の 2 種類の停止が観察された(図 2-14)。 $\beta E188$  残基が ATP 開裂に重要な役割を果たすことを考えると、*long dwell* が *catalytic dwell* に相当すると考えるのが自然である。ATP 1 mM のデータについて、再度 Change-Point analysis を用い、*long dwell* 間の *short dwell* の角度位置を算出してみると  $48^\circ$  であった(図 2-14(C))。この結果は、野生型  $bMF_1$  の  $ATP\gamma S$  溶液中で観察された *short dwell* の角度位置( $60^\circ$ )とほぼ一致している。また、*long dwell* と *short dwell* の時定数ヒストグラムは 1 次の減衰指数関数でフィットでき、それぞれ 220~280 ms、

6~12 ms と時定数を得た(図 2-15)。これらは ATP 濃度によらず一定だと考えられる。

ATP 低濃度条件では変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  は *long dwell* と *binding dwell* の 2 種類の停止を示した(図 2-16)。 *Binding dwell* を基準としたとき、 *long dwell* は  $84^\circ$  の位置にあり、これも野生型  $bMF_1$  の ATP $\gamma$ S 溶液中での結果( $77^\circ$ )と一致している。時定数解析によって、 *long dwell* に相当する停止は 180~230 ms と ATP 濃度によらない値を示したのに対し、 *binding dwell* はそれぞれ 251 ms (1  $\mu$ M)、 75 ms (3  $\mu$ M)、 27 ms (10  $\mu$ M) と ATP 濃度によって大きく変化した(図 2-17)。この結果から、変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP 結合定数  $k_{on}^{\beta E188D-ATP}$  は  $4.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  と算出され、ミカエリスメンテン式のパラメータから求められた値( $3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )とよく一致した。したがって、前章の結果と合わせて、野生型  $bMF_1$  の ATP $\gamma$ S 溶液中での回転特性と、変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP 溶液中での回転特性は類似しており、以下の 2 つのことが確認された。すなわち、(1) ATP 結合待ちの角度位置から見て *long dwell* (*catalytic dwell*) は  $+80^\circ$  の位置にあること、(2) *long dwell* から見て *short dwell* が  $+50 \sim 60^\circ$  の位置にある、つまり、ATP 結合待ちの角度位置から見て  $+10 \sim 20^\circ$  の位置にあることの 2 点である。

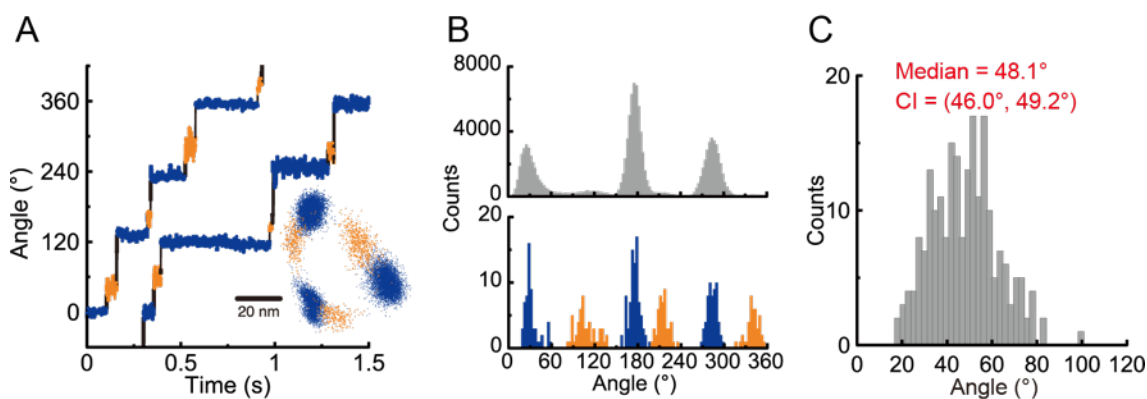


図 2-14 1 mM ATP 条件での変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  粒子の挙動(撮影速度: 2000 fps)

青は *long dwell*、オレンジは *short dwell* を表す。(A) 代表粒子のタイムコース(インセットは重心の XY プロット)。(B) (A)で示された粒子の角度ヒストグラム。(上) 従来の角度ヒストグラム(すべてのデータポイントから構成されている)。(下) Change-Point ヒストグラム(ひとつのデータポイントは 1 つの dwell 位置を表す)。(C) *Long dwell* から見た *short dwell* の位置を表すヒストグラム(N = 10 mols, 215 steps)。CI は 68% bootstrap confidence intervals を表す。

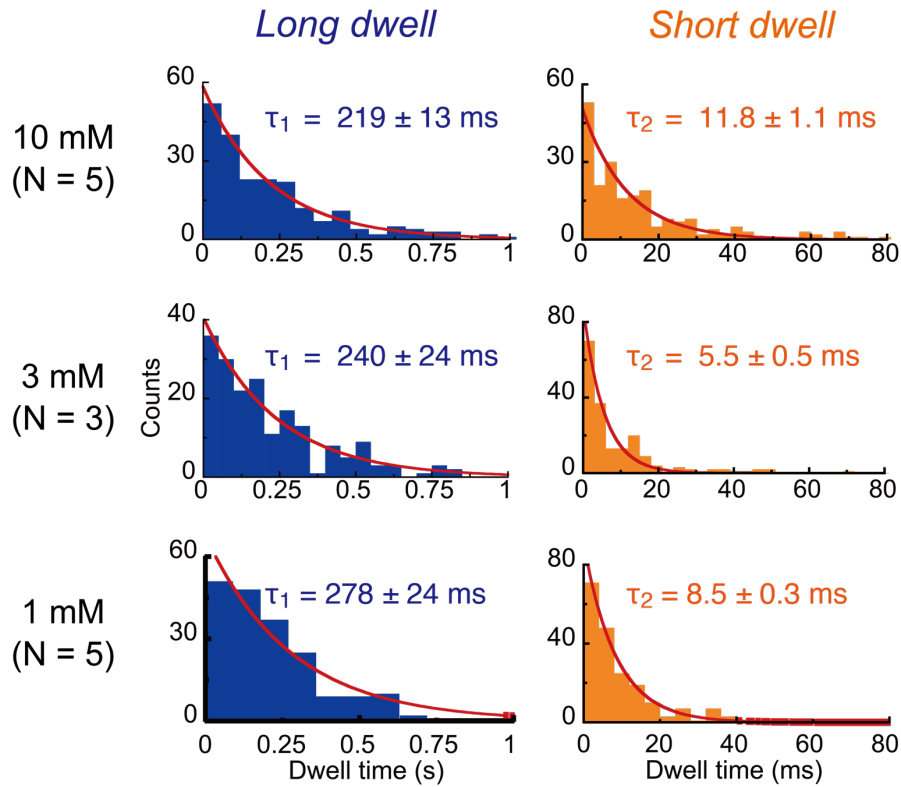


図 2-15  $bMF_1(\beta E188D)$  高濃度 ATP 濃度における *long dwell* と *short dwell* の時定数解析  
 フィッティングは 1 次の減衰指数関数を表す。時定数はフィッティングパラメータ  $\pm$  フィッティングエラーで示されている。

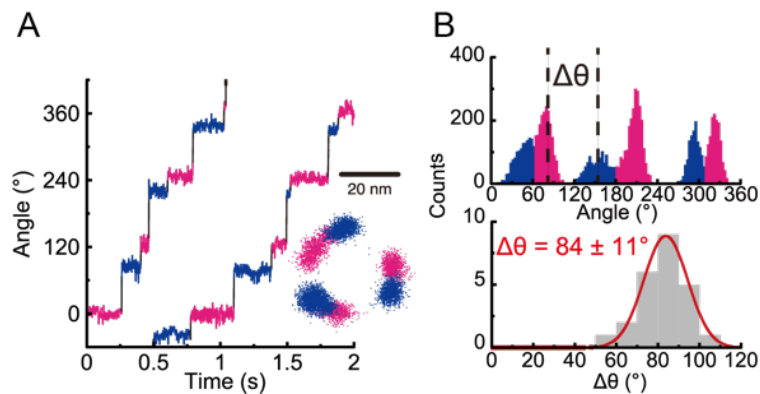


図 2-16 1  $\mu$ M ATP 条件での変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  粒子の挙動(撮影速度: 500 fps)  
 青は *long dwell*、ピンクは *binding dwell* を表す。(A) 代表粒子のタイムコース(インセットは重心の XY プロット)。(B) 角度ヒストグラム。(上) 従来の角度ヒストグラム(すべてのデータポイントから構成されている)。(下) (上)で定めた角度差  $\Delta\theta$  のヒストグラム(N = 45 pauses, 15 mols)。値は平均  $\pm$  SD を表す。



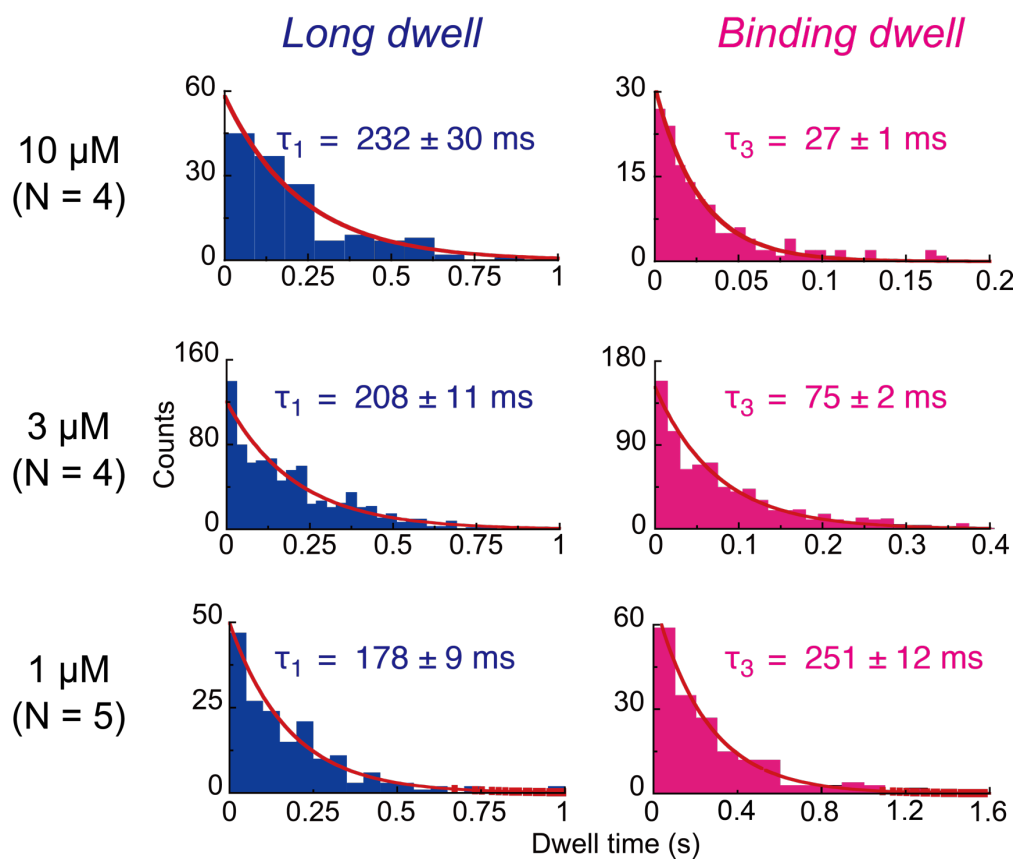


図 2-17 *bMF*<sub>1</sub>(βE188D) 低濃度 ATP 濃度における *long dwell* と *binding dwell* の時定数解析  
 フィッティングは 1 次の減衰指数関数を表す。時定数はフィッティングパラメータ±フィッティングエラーで示されている。

## 2.5 AMP-PNP による回転の停止

前章までの ATP $\gamma$ S や変異体 *b*MF<sub>1</sub>( $\beta$ E188D)の回転観察実験によって、*long dwell* が *binding dwell* の 80°先にあることが明らかになった。また、*long dwell* と ADP 阻害状態が示す角度位置が一致したことによって、*long dwell* が ATP 開裂反応(Catalytic dwell)に対応することも示唆された。これらをさらに検証するため、*catalytic dwell* で回転を停止させる<sup>118</sup> 非分解性 ATP アナログである AMP-PNP による回転停止位置を調べた。

阻害剤による回転停止点を調べる実験(2.5、2.6)では、回転プローブとして磁気ビーズを用いた。これは、AMP-PNP によって回転停止した *b*MF<sub>1</sub> 粒子を磁気ピンセットで操作することで回転を復活させ、同一粒子で複数回実験するためである。ここでは、まず 100 nM ATP 条件、撮影速度 30 fps で回転を観察した。この条件では、ATP 結合待ちによる 3 つの停止点を持つ回転が観察される。これを確認したあと、フローセル内に 100 nM ATP と 500 nM AMP-PNP の混合溶液を静かに流し入れ、継続して回転を観察した。多くの粒子は溶液を導入して 3 分以内に回転を停止した。いったん回転を停止した粒子は磁気ピンセットで強制的に 1 回転させない限り、回転が復活することはなかった。なお、この条件では ADP 阻害状態はめったに表れない(図 7-3(A))。また、ADP 阻害状態による平均停止時間はおよそ 30 秒であった(表 7-1)。これは 5 分以上続く AMP-PNP による停止時間よりはるかに短いものである。この実験では、5 分以上停止した粒子に対して「AMP-PNP によって回転を停止した粒子」として定めることにした。AMP-PNP による停止位置は *binding dwell* の角度位置とは全く異なる角度位置だった。直前(角度ヒストグラムで左側)の *binding dwell*(図 2-18(A)、ピンク)と AMP-PNP による停止位置(図 2-18(A)、青)の距離 $\Delta\theta$ を求めると 76°であった(図 2-18(B))。これは前述の *long dwell* の角度位置と一致する。したがって、*long dwell* に相当する ATP 開裂反応待ちの角度位置は ATP 結合待ちの角度位置の 80°先であることが確認された。

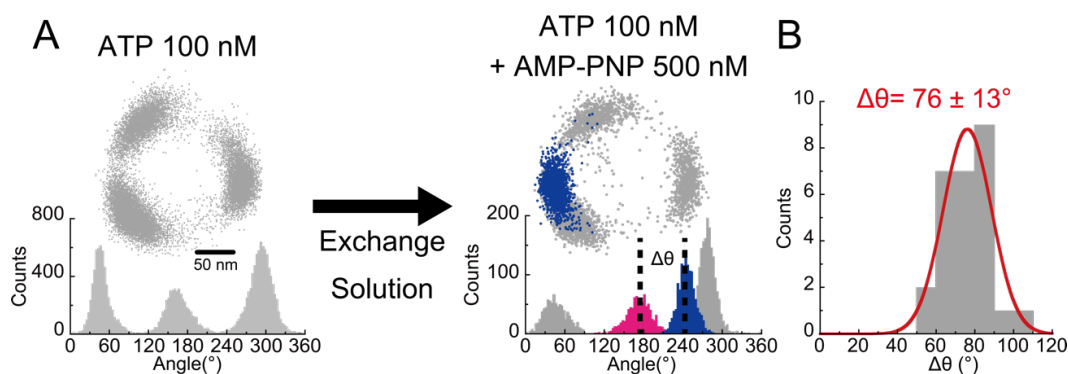


図 2-18 AMP-PNP による回転の停止

(A) 実験手順と分子の例。(左) 100 nM ATP 条件で *binding dwell* を確認した後、(右) 100 nM ATP と 500 nM AMP-PNP の混合溶液を導入した。AMP-PNP による停止を青で示した。(B) 直前の *binding dwell*(ピンク)との AMP-PNP 停止(青)の角度差 $\Delta\theta$ の角度ヒストグラム(N=27)。値は平均 $\pm$ SD を表す。

## 2.6 アジ化ナトリウムによる回転の停止

結晶構造中では多くの阻害剤が用いられ  $F_1$  の安定化に寄与している。前章で用いた非分解性 ATP アナログである AMP-PNP は、結晶構造中で主に ATP の代わりに用いられていることが多い。Reference structure として知られる  $F_1$  の構造には ADP や AMP-PNP だけではなく、アジ化ナトリウムも含まれていた<sup>16</sup>。Reference structure はその後修正され、 $N_3$  分子が  $\beta_{DP}$  サイト中で ATP の  $\gamma$  リン酸基が結合する場所に存在し、ADP の  $\beta$  リン酸基と相互作用していた<sup>47</sup>。つまり、 $N_3$  分子によって  $\beta_{DP}$  中のヌクレオチドの側鎖が安定的に結合することができるようになっていた。よって  $N_3$  分子は  $F_1$  と ADP の親和性を上げ、ADP 阻害状態を安定化させることが分かった。本章では結晶構造解析で得られたこの知見を確かめるため、前章と同様にアジ化ナトリウムによる回転停止実験を行う。

観察条件は 2.5 と同様である。100 nM ATP 条件で ATP 結合待ち状態に由来する 3 つの回転停止点を観察したあと、ATP とアジ化ナトリウムの混合溶液を導入する。アジ化ナトリウム 50 mM という高濃度条件に関わらず、回転停止までに 20 分程度時間を要した。AMP-PNP による阻害状態と同様に、1 度回転を停止した粒子は外部操作なしでは回転が復活しなかった。5 分以上停止した粒子に対して「アジ化ナトリウムによって回転を停止した粒子」として定めた。アジ化ナトリウムによる停止位置も AMP-PNP 阻害による停止位置と非常によく似た傾向を示した。直前の *binding dwell*(図 2-19(A)、ピンク)とアジ化ナトリウムによる停止位置(図 2-19(A)、青)の距離  $\Delta\theta$  は  $80^\circ$  であった(図 2-19(B))。すなわち、アジ化ナトリウムによる停止位置も *long dwell* の角度位置と一致した。一方で、2.3 では *long dwell* の位置と ADP 阻害による停止角度が一致することを示した(図 2-9、図 2-12)。したがって本章で得られた結果は、*long dwell* で時々観察される ADP 阻害状態がアジ化ナトリウムによって安定化されるということを示唆している。100 nM ATP 条件では ADP 阻害が減多に観察されないために、アジ化ナトリウムによる回転停止までに時間がかかったのかもしれない。

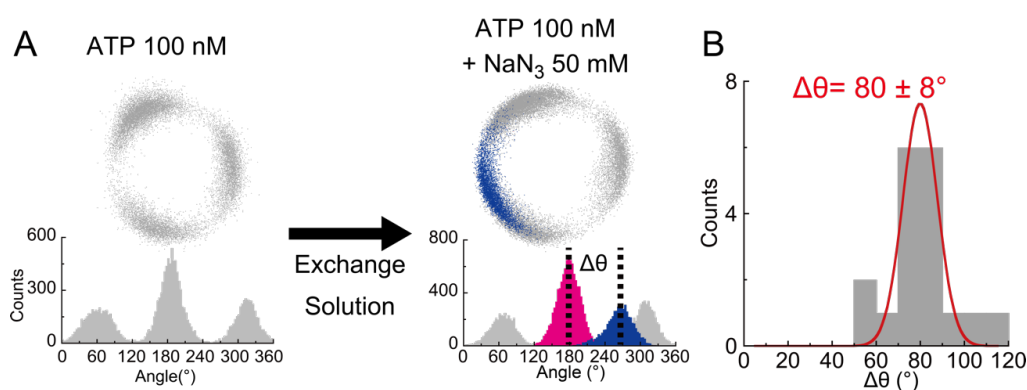


図 2-19 アジ化ナトリウムによる回転の停止

(A) 実験手順と分子の例。(左) 100 nM ATP 条件で *binding dwell* を確認した後、(右) 100 nM ATP と 50 mM アジ化ナトリウムの混合溶液を導入した。アジ化ナトリウムによる停止を青で示した。(B) 直前の *binding dwell*(ピンク)とのアジ化ナトリウム停止(青)の角度差  $\Delta\theta$  の角度ヒストグラム(N=18)。値は平均 $\pm$ SD を表す。

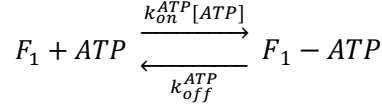
## 2.7 Stall-Release 反応速度定数と平衡定数の算出

ここまで、 $bMF_1$  の化学反応の角度位置に注目してそれらの同定を行ってきた。ATP 結合反応と ATP 開裂反応の角度位置を同定することは、 $F_1$  がどのように ATP の加水分解エネルギーを力学的なエネルギーに変換しているかを解明する上で非常に重要である。他の分子モータータンパク質と比較したときに  $F_1$  がもつ最も顕著な特徴のひとつは、回転角度に応じて反応素過程の平衡を調節しているという点、すなわち、加水分解反応とは逆方向に回転することで ATP を合成できるということである<sup>38,39</sup>。回転角度ごとに ATP 結合反応と ATP 開裂反応の反応速度定数と平衡定数を計測するため、過去の  $TF_1$  の研究で磁気ピンセットを用いた Stall-Release 実験が行われた<sup>42</sup>。この実験によって、従来から提唱されている binding-change mechanism を定量的に評価することが可能となった。すなわち、 $TF_1$  は ATP との親和性を指数的に上昇させ、 $60^\circ$  の回転によって 235 倍変化した。一方で、ATP 開裂・解離反応はそれほど大きな変化はなく、 $60^\circ$  の回転で 3 倍の変化にとどまった。これらの結果から、回転トルク発生における化学反応素過程ごとの寄与についても見積もられ、ATP 結合反応で 21-54 pN nm、ATP 開裂反応では 4-17 pN nm と算出された。

$bMF_1$  において、ATP との親和性や ATP 開裂反応の平衡が回転角度によってどのように調節されているかを調べるため、本研究でも Stall-Release 実験を行った。実験手順を以下で簡潔に述べる(図 2-20)。ATP 結合反応、もしくは ATP 開裂反応が律速段階となる条件で回転を観察する。ATP 結合反応の場合は野生型の  $bMF_1$  を用い、100 nM ATP 条件で実験を行う。他の反応は 1 ms 以下の短い反応であるのに対し、ATP 結合待ち反応の時定数は 0.9 s であった(図 7-3(A))。一方で、野生型の  $bMF_1$  の ATP 開裂反応は 0.5 ms 以下であり、磁気ピンセットによる操作はできない。したがって ATP 開裂反応に注目するときは変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  を用い、さらに基質として ATP $\gamma$ S を用いることにした。1 mM ATP $\gamma$ S 条件で変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  は ATP 開裂待ちに対応する 3 つの停止点を示し、その時定数は 4.0 s であった(図 7-3(B))。標的とする反応素過程待ち時間による停止で  $F_1$  が停止している時間を見計らって磁気ピンセットを操作し、 $F_1$  を標的とする角度で拘束する。設定時間が経過したのち、磁気ピンセットによる拘束をやめ  $F_1$  を解放すると、 $F_1$  は以下のどちらかの挙動をとる(図 2-20)。すなわち、(1) もとの角度位置に戻るか、(2) 次の角度位置に進むか、の 2 種類である。(1) もとの角度位置に戻ってしまう場合、磁気ピンセットで拘束されている間に  $F_1$  はその角度位置で反応を終えていないことを意味する(OFF)。一方で、(2) 次の角度位置に進むことは、拘束されている間に  $F_1$  はその角度位置での反応を終えており、トルクが発生しているということである(ON)。ON の割合( $P_{ON}$ )を決定することで、回転角度に対する反応進行度合いを見積もることができる。

図 2-21(A)は 100 nM ATP 条件で測定した、拘束時間ごとの ATP 結合反応の進行割合  $P_{ON}^{binding}$  を拘束角度ごとに色分けして示したものである。拘束時間を延ばすと、 $P_{ON}^{binding}$  は指数的に増加していき、やがて飽和に達した。しかし、その飽和点は必ずしも 100%ではない。すなわちこれは、ATP 結合反応は可逆的で ATP 解離反応との平衡状態が保たれていること

が示される結果である。ここで、可逆的な ATP 結合反応のモデルとして、



を仮定する。図 2.21 のグラフを拘束角度ごとに

$$P_{ON}^{binding} = 100 \frac{k_{on}^{ATP}[ATP]}{k_{on}^{ATP}[ATP] + k_{off}^{ATP}} [1 - \exp\{-(k_{on}^{ATP}[ATP] + k_{off}^{ATP})t\}] \quad \text{式(2.4)}$$

でフィットし、ATP 結合定数 $k_{on}^{ATP}$ と ATP 解離定数 $k_{off}^{ATP}$ を算出した。図 2-21(B)は 1 mM ATP $\gamma$ S 条件で測定した、拘束時間ごとの ATP 開裂反応の進行割合 $P_{ON}^{hydrolysis}$ を示したものである。 $P_{ON}^{hydrolysis}$ も $P_{ON}^{binding}$ の場合と似たような傾向を示し、

$$P_{ON}^{hydrolysis} = 100 \frac{k_{hyd}^{ATP\gamma S}}{k_{hyd}^{ATP\gamma S} + k_{syn}^{ATP\gamma S}} [1 - \exp\{-(k_{hyd}^{ATP\gamma S} + k_{syn}^{ATP\gamma S})t\}] \quad \text{式(2.5)}$$

でフィッティングを行い、開裂反応の速度定数 $k_{hyd}^{ATP\gamma S}$ と合成反応の速度定数 $k_{syn}^{ATP\gamma S}$ を得た。

図 2-21(C)-(E)は図 2-21(A)-(B)から算出された速度定数と

$$K_d^{ATP} = \frac{k_{off}^{ATP}}{k_{on}^{ATP}} \quad \text{式(2.6)}$$

$$\frac{1}{K_E^{Hyd-ATP\gamma S}} = \frac{k_{syn}^{ATP\gamma S}}{k_{hyd}^{ATP\gamma S}} \quad \text{式(2.7)}$$

で定義される平衡定数を拘束角度ごとにプロットしたものである。ここで、 $0^\circ$ は ATP 結合待ち状態と ATP 開裂待ち状態の中心の角度位置と定義した。また、順方向(forward)と逆方向(backward)はそれぞれ加水分解(反時計回り)方向と合成(時計回り)方向と定義した。ATP 結合反応と ATP 開裂反応の両方の場合において、順方向(ATP 結合反応、ATP 解離反応)の速度定数は順回転方向に従い、指数的に増加していった。一方で、逆方向(ATP 解離反応、ATP 合成反応)の速度定数は指数的に減少していった(図 2-21(C)-(D))。それらに従い、平衡定数も回転角度に従い指数的に変化していき、ATP 結合や ATP 開裂反応の安定化に寄与した。算出されたすべての速度定数や平衡定数は、角度ごとに 1 次の指数関数でフィットできた(表 2-1)。これらの結果から、ATP 結合過程の方が ATP 開裂過程より回転角度に依存的であることがわかる。回転角度位置が $-30^\circ$ から  $30^\circ$ に変化すると、 $k_{on}^{ATP}$ と $k_{off}^{ATP}$ はそれぞれ 20 倍、2.4 倍、平衡定数 $K_d^{ATP}$ は 49 倍変化した。その一方で、 $-50^\circ$ から  $50^\circ$ に変化しても、 $k_{hyd}^{ATP\gamma S}$ と $k_{syn}^{ATP\gamma S}$ はそれぞれ 3.4 倍、1.4 倍、平衡定数の逆数 $1/K_E^{Hyd-ATP\gamma S}$ も 4.5 倍にしか変化しなかった。すなわち、ATP の結合親和性は ATP 開裂の平衡よりも大きく調節されていた。

ここで、発生するトルクの大きさについて考えたい。図 2-21(E)で示す 2 つの平衡定数の対数微分、すなわち、回転角度に対する $\ln K_d^{ATP}$ と $\ln 1/K_E^{Hyd-ATP\gamma S}$ の微分は自由エネルギーの変化を表している。したがってこれは回転トルク $N$ の指標となる。今回算出された速度定数と平衡定数から自由エネルギー変化を求めた結果、ATP 結合反応については 17~49 pN nm、ATP 開裂反応については 7~16 pN nm となった(詳細な導出については 7.1.5 を参照)。

すなわち、回転トルクへの寄与は ATP との親和性が変化することが開裂/合成反応の平衡定数が増えることより大きな影響を与えることを意味する。 $bMF_1$  の自由エネルギー変化は  $TF_1$  よりわずかに小さいものの、特徴としては一致していた<sup>42</sup>。

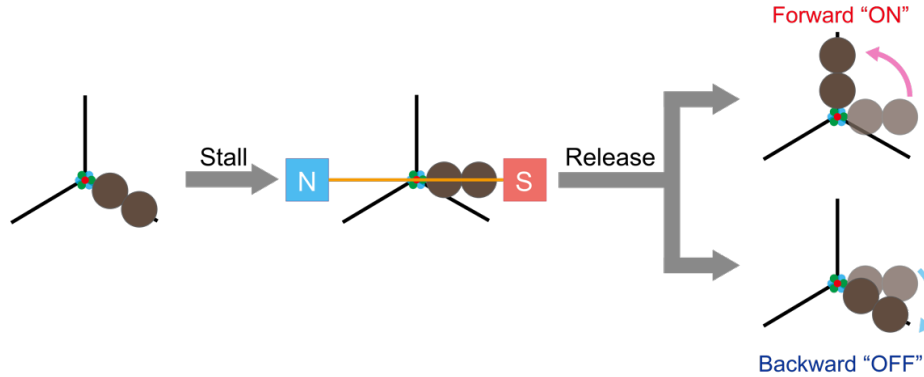


図 2-20 Stall-Release 実験の概要

$F_1$  が反応(ATP 結合 or ATP 開裂)待ち時間で停止したら、磁気ピンセットを操作して標的とする角度で  $F_1$  を拘束し、ある一定時間が経過したら  $F_1$  を解放する。解放された  $F_1$  は次の反応待ち角度に進む(ON)か、元の反応待ち角度に戻る(OFF)のいずれかの挙動をとる。すなわち、拘束時間内に反応を終えた(ON)か終えてない(OFF)かを意味する。

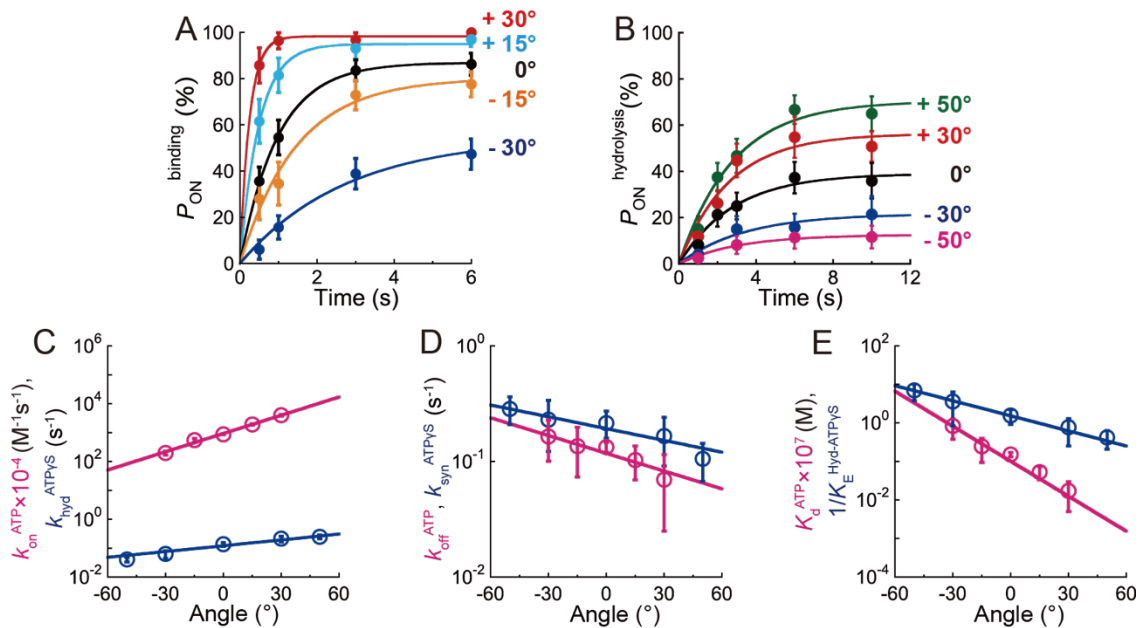


図 2-21  $bMF_1$  における ATP 結合反応と ATP 開裂反応の角度依存性

(A) 野生型  $bMF_1$  の ATP 100 nM 条件における  $P_{on}^{binding}$  の時間変化(各測定データは 5~13 分子、21~67 挙動の平均)。(B) 変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP  $\gamma$  S 1 mM 条件における  $P_{on}^{hydrolysis}$  の時間変化(各測定データは 3~8 分子、28~64 挙動の平均)。(A)、(B)でのエラーバーは  $\sqrt{P_{ON}(100 - P_{ON})/N}$  ( $N$ は試行回数)によって定めた。(C)-(E) 速度定数と平衡定数の角度依存性。0°は操作前の ATP 結合/開裂反応の角度位置を表す。順方向(forward)反応と逆方向(reverse)反応はそれぞれ、ATP 結合・開裂反応(反時計回り)、ATP 解離・合成反応(時計回り)を表す。ピンクと青はそれぞれ、ATP 結合/解離反応、ATP 開裂/合成反応を表す。

表 2-1 Stall-Release 実験で求められた反応速度の角度依存性

	Angle dependence
$k_{on}^{ATP} (M^{-1}s^{-1})$	$(9.4 \pm 0.4) \times 10^6 \times \exp[(0.049 \pm 0.002) \times \theta]$
$k_{off}^{ATP} (s^{-1})$	$(0.12 \pm 0.01) \times \exp[-(0.012 \pm 0.002) \times \theta]$
$K_a^{ATP} (M^{-1})$	$(6.6 \pm 0.6) \times 10^7 \times \exp[(0.072 \pm 0.003) \times \theta]$
$K_d^{ATP} (M)$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-8} \times \exp[-(0.070 \pm 0.007) \times \theta]$
$k_{hyd}^{ATP\gamma S} (s^{-1})^*$	$(0.12 \pm 0.01) \times \exp[(0.015 \pm 0.002) \times \theta]$
$k_{syn}^{ATP\gamma S} (s^{-1})^*$	$(0.19 \pm 0.01) \times \exp[-(0.008 \pm 0.001) \times \theta]$
$K_E^{Hyd-ATP\gamma S}^*$	$(0.59 \pm 0.03) \times \exp[(0.028 \pm 0.001) \times \theta]$

\*変異体 *b*MF<sub>1</sub>(βE188D)を用いて求めた



## 2.8 本章の総括

### 2.8.1 Long dwell と short dwell に対応する加水分解素反応

本章では、主に3つの条件で  $bMF_1$  の回転を観察し基本特性を明らかにした。すなわち、(1) ATP 溶液中での回転(2.2)、(2) ATP $\gamma$ S 溶液中での回転(2.3)、(3) 変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP 溶液中での回転(2.4)である。ATP $\gamma$ S や変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  を用いたのは、ATP 開裂反応の反応速度を低下させ、回転中の短いステップ(サブステップ)を明確にするためである。これらすべての条件で、基質飽和条件での *long dwell* と *short dwell*、 $K_m$  濃度付近で *long dwell* と *binding dwell* の2つの停止をそれぞれ発見した。野生型  $bMF_1$  の ATP 溶液中での回転では *short dwell* に現れなかったが、ATP $\gamma$ S 溶液中や変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の2つの条件で現れた *long dwell* と *short dwell* の角度差は一致していた。以上の結果をまとめると、*binding dwell* の角度を  $0^\circ$  とした場合、*long dwell* は  $+80^\circ$ 、*short dwell* は  $+10\sim 20^\circ$  の角度位置であった。

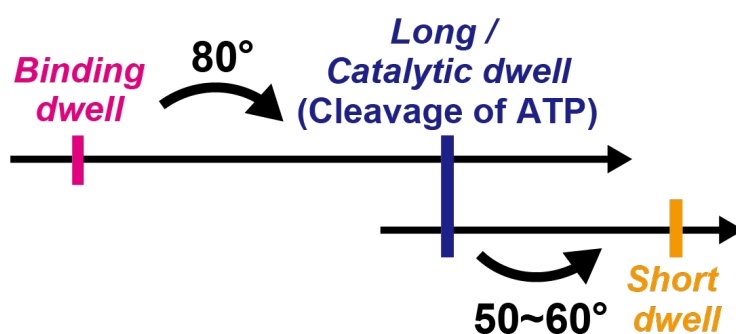


図 2-22 今回の実験で発見された3つの停止状態とその角度差

基質アナログ ATP $\gamma$ S や変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  は、リン酸解離反応やチオリン酸解離反応にも多少影響するが<sup>45</sup>、主に ATP 開裂に関わる反応速度が低下することが知られている<sup>20,29</sup>。したがって、*long dwell* を ATP 開裂反応待ち状態とみなすことにする。この主張を支える観察結果のひとつが、ATP $\gamma$ S 溶液中で変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の回転を観察して得られた結果である。この条件で観察される回転停止点について dwell time 解析を行うと、時定数が  $4.0\text{ s}$  であった(図 7-3)。野生型  $bMF_1$  の ATP 溶液中で現れた *long dwell* が  $0.5\text{ ms}$  程度であったことを考えると、ATP $\gamma$ S と  $bMF_1(\beta E188D)$  の組み合わせによって  $8000$  倍遅くなったことを意味する。ATP $\gamma$ S だけでは  $30$  倍(野生型 ATP で  $0.5\text{ ms}$ 、野生型 ATP $\gamma$ S で  $15\text{ ms}$ )、 $bMF_1(\beta E188D)$  で  $400$  倍(野生型 ATP で  $0.5\text{ ms}$ 、変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  の ATP で  $200\text{ ms}$ )影響があったので、理論的にはこれらの組み合わせによって *long dwell* は  $12000$  倍延びると予想される。すなわち、実験的に得られた値と理論的に導出した値はほぼ一致した。したがって、ATP $\gamma$ S と  $bMF_1(\beta E188D)$  はともに ATP 開裂反応という同じ反応素過程に影響を与えていることが分かった。

*Long dwell* が ATP 開裂反応に対応することを支持するもうひとつの観察結果は ADP 阻害状態の解析である(図 2-9、図 2-12)。回転観察中に  $bMF_1$  は一時的な回転停止状態に陥り、

その角度位置は *long dwell* の角度位と一致した。現在までに回転解析されている  $F_1$  はすべて ATP 開裂の角度位置で ADP 阻害状態に陥ることが示されている。また、ADP 阻害状態についての観察結果は AMP-PNP による阻害停止点と一致した(図 2-18)。AMP-PNP は ATP 開裂の角度位置で回転を停止することが知られている。しかし、ADP 阻害状態とは違って、AMP-PNP によって回転停止した粒子は磁気ピンセットで強制的に回転させない限り回転再開しなかった。そして今回の実験では、 $bMF_1$  の AMP-PNP による回転停止点は *long dwell* の角度位置と一致した。これらの実験結果はすべて、*long dwell* が ATP 開裂反応待ち状態に対応することを示す結果である。同時に、ATP 開裂待ち反応が  $+80\sim 90^\circ$  で起きるという  $TF_1^{29}$  や  $hMF_1^{45}$  の場合と一致する。

しかしながら、これらの結果だけでは *short dwell* に対応する反応素過程は断定できない。同じ哺乳類ミトコンドリア由来  $F_1$  である  $hMF_1$  と  $bMF_1$  のアミノ酸配列が非常に高いことを考えると、*short dwell* は  $hMF_1$  の回転観察<sup>45</sup> で発見された 1<sup>st</sup> dwell に対応することが予想され、これはリン酸解離待ちに対応する。実際、 $bMF_1$  で発見された *short dwell* と  $hMF_1$  で発見された 1<sup>st</sup> dwell はどちらも *binding dwell* と *long dwell* (ATP 開裂待ち停止)の間で発見されている。よって、 $bMF_1$  で発見された *short dwell* はリン酸解離待ち状態に対応することが考えられる。しかし、チオリン酸濃度が  $10\ \mu\text{M}\sim 100\ \text{mM}$  の間で  $bMF_1$  の回転を観察しても回転速度や回転挙動に大きな影響は観察されなかった(図 2-23)。ゆえに、 $bMF_1$  の *short dwell* の反応素過程同定については今後解決しなければならない課題である。

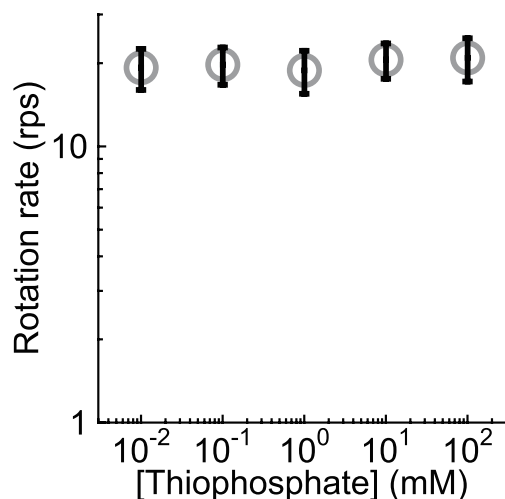


図 2-23 1 mM ATP $\gamma$ S 条件下における回転速度のチオリン酸濃度依存性  
円は測定の平均値、エラーバーは SD を表す(N=22-27)。

### 2.8.2 $bMF_1$ の回転触媒スキーム

本研究から解明された  $bMF_1$  の回転触媒スキームを図 2-24 に示す。ここでは触媒部位  $\beta$  サブユニットに常に 2 個か 3 個のヌクレオチドが結合しているという  $bMF_1$  の結晶構造解析をもとに表現した。あるひとつの  $\beta$  サブユニットに ATP が結合する角度を  $0^\circ$  とすると、

同じ  $\beta$  で ATP が開裂するのは  $200^\circ$  であると考えられる。この角度位置自体は  $TF_1$  や  $hMF_1$  で発見されたスキームと一致している。種による最も顕著な違いはサブステップの数である。 $TF_1$  の場合は  $120^\circ$  回転で 2 つのサブステップ ( $80^\circ$  と  $40^\circ$ ) を持つ。詳細なデータ解析 (Change-point analysis) によって、 $80^\circ$  の停止位置で  $10^\circ$  程度の小さなステップを示しているという報告もある<sup>117</sup> が、ここでは従来法で決定された  $80^\circ$  のみの停止を考えることにする。一方で哺乳類ミトコンドリア  $F_1$  はどちらも 3 つのサブステップを持つ。しかし、 $hMF_1$  と  $bMF_1$  の間にも違いは存在し、それは *binding dwell* と *catalytic dwell* の間に存在する *dwell* の角度位置である。すなわち、 $hMF_1$  の場合は  $+65^\circ$  であるが、 $bMF_1$  の  $10\sim20^\circ$  である。結果として、サブステップのステップ幅も変わる。 $hMF_1$  の場合は  $65^\circ/25^\circ/30^\circ$  であるのに対し、 $bMF_1$  の場合は  $10\sim20^\circ/60\sim70^\circ/40^\circ$  である。

$hMF_1$  と  $bMF_1$  は  $V_{max}$  と  $K_m$  などのパラメータで表される回転速度に関しては非常に似た性質を持つが、詳細な回転特性をみると明確な違いがいくつかある。そのうちのひとつが *long dwell* と *short dwell* ( $hMF_1$  の場合の 1<sup>st</sup> dwell = *P<sub>i</sub>-release dwell* と 2<sup>nd</sup> dwell = *catalytic dwell*) の関係性である。 $bMF_1$  では *long dwell* (*catalytic dwell*) は常に *short dwell* より長い。しかし、 $hMF_1$  の場合は  $bMF_1$  の場合と逆で、1<sup>st</sup> dwell が 2<sup>nd</sup> dwell (= *catalytic dwell*) より長いことが報告されている。回転停止点の位置やその速度論的な関係性の違いがどこにあるかはいまだ不明である。 $bMF_1$  と  $hMF_1$  のアミノ酸配列の相同性は非常に高く、 $\alpha$  や  $\beta$  サブユニットでは 99% 以上一致している<sup>50</sup>。しかし、 $\gamma$  サブユニットでは 93% と  $\alpha \cdot \beta$  サブユニットに比べれば低い。よって、 $\gamma$  サブユニットのアミノ酸配列や構造的なわずかな違いが回転特性の違いに寄与していると考えるのが自然であろう。

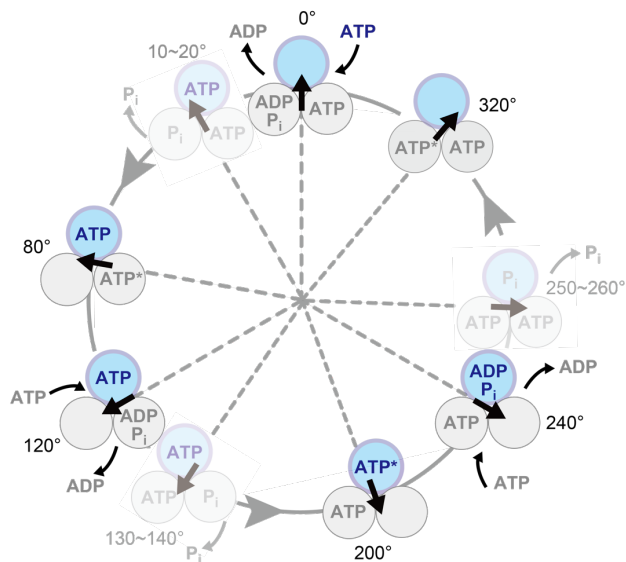


図 2-24 本実験から導かれる  $bMF_1$  の回転触媒スキーム

図中で  $\beta$  サブユニットを円で、 $\gamma$  サブユニットの回転方向を矢印で表した。 $\beta$  サブユニット中に記載してある「ATP」の後の「\*」は ATP が加水分解される直前の状態であることを意味する。

### 2.8.3 結晶構造との関係性

本章では  $bMF_1$  が少なくとも 3 つの安定状態を持つことが分かった。つまり、*binding dwell* 状態、*short dwell* 状態、そして *long dwell* 状態である。フッ化ベリリウムなどの安定化剤を用い遷移状態を表している結晶構造や、それらの結晶構造を用いた理論研究によって支持されているように、現在解明されているほとんどの結晶構造は  $F_1$  が活性を維持した状態だと示唆されている。現在までに多くの結晶構造が報告されているが、それらは  $\beta$  サブユニットに結合しているヌクレオチドの状態、リン酸種( $PO_4^{2-}$ や  $SO_4^{2-}$ )、阻害剤の種類、サブユニットの立体構造が少しずつ異なっている。特に、 $\gamma$  サブユニットの回転角度も結晶構造によって違いが生じている。解析方法にも強く依存するが、 $\gamma$  サブユニットの回転角度は結晶構造間で最大  $30^\circ$  程度違いがあることも報告されている(図 1-26)。具体的には、 $\beta_E$  サイトにチオリン酸が結合しているものは  $IF_1$  が結合したものより  $30^\circ$  程度 ATP 結合待ち停止方向にずれている。この特徴は  $hMF_1$  の回転スキームにも表れている。すなわち、リン酸解離待ち停止は  $+65^\circ$  の位置で、加水分解待ち停止は  $+90^\circ$  の位置で起きることが、結晶構造で観察される最大  $30^\circ$  のずれをよく表現していると考えられていた。しかし、本章で明らかになった  $bMF_1$  の回転スキーム上では、*catalytic dwell* の  $-30^\circ$  の位置に停止は存在しない。*Short pause* をリン酸解離待ち状態と考えるのは自然であるが、*short dwell* と *catalytic dwell* の角度差は  $60-70^\circ$  程度あり、結晶構造で観察されるズレとしては大きすぎる。したがって、どの結晶構造が *short dwell* 状態を表しているかは不明のままである。

### 2.8.4 $bMF_1$ における素反応の角度依存性

$F_1$  と他の分子モーターの最も大きな違いは、 $F_1$  が持つ反応の可逆性である。 $F_1$  単体では ATP を加水分解するが、回転方向を逆にすることで ADP と無機リン酸から ATP を合成できるという特徴がある。これは、 $F_1$  自身が回転角度によってすべての反応を調節しているということ意味する。この特徴を詳細に調べるため、以前当研究室では Stall-Release 実験という系が構築された。 $TF_1$  を用いた Stall-Release 実験では、元の停止点から順(反時計回り)方向に操作するに従い、ATP との親和性が指数的に大きくなることが示された。その一方で、加水分解の平衡定数はわずかに上昇しただけだった。この実験から計算された自由エネルギー変化は ATP の結合・解離の場合に  $21\sim 54$  pN nm、ATP 加水分解・合成の場合に  $4\sim 17$  pN nm であった。ここで、値に幅があるのは軸となる  $\gamma$  サブユニットの弾性を考慮しているためである<sup>119</sup>。詳細については補助データの 7.1.5 を参照されたい。

本研究では、Stall-Release 実験を  $bMF_1$  にも適用し、素反応の反応角度依存性を明らかにした。過去の  $TF_1$  の知見と一致して、回転角度が大きくなるにつれて ATP との親和性は指数関数的に大きくなった一方で、ATP 加水分解の平衡はわずかに大きくなっただけだった。自由エネルギー変化を計算するとそれぞれ、 $17\sim 49$  pN nm(ATP 結合・解離)、 $7\sim 16$  pN nm(ATP 開裂・合成の場合)と求められた。 $TF_1$  の場合より値はわずかに小さいものの<sup>42</sup>、非常によく似た傾向が観察された。同様の実験は  $TF_1$  だけではなく、好熱菌由来  $V_1$ -

ATPase(TV<sub>1</sub>)にも適用された<sup>120</sup>が、ATPとの親和性はTF<sub>1</sub>やbMF<sub>1</sub>の場合と比べはるかに小さかった。すなわち、ATPとの親和性を大きく変えるという性質は、種を問わずF<sub>1</sub>全体に共通する特徴だと言える。

## 第3章 生化学実験による IF<sub>1</sub> の速度論的解析

### 3.1 本章での目的

ウシミトコンドリア由来 IF<sub>1</sub> と *b*MF<sub>1</sub> の X 線結晶構造解析から IF<sub>1</sub> の阻害機構が以下のように提案されている<sup>51,114</sup> (図 3-1)。まず、天然変性部位である IF<sub>1</sub> の N 末端部分が *b*MF<sub>1</sub> の  $\beta_E$  と可逆的に結合し、中間体を形成する。この段階では F<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の相互作用は非常に弱く、F<sub>1</sub> の触媒機能は停止しない。次に IF<sub>1</sub> の N 末端のフォールディングが進み、 $\alpha$ -helix 構造をとることで  $\gamma$  の回転を阻害する。同時に、 $\beta$  に結合したヌクレオチド状態が変化して ATP 結合状態から ADP 結合(加水分解完了)状態に変化する。つまり、IF<sub>1</sub> は F<sub>1</sub> にゆるく結合したのち、ATP 加水分解による  $\gamma$  の回転を伴い不可逆的な阻害状態に陥るという 2 段階阻害機構が提唱されている(図 3.1)。一般に 2 段階阻害の場合、阻害定数は低濃度で単調増加し、その後飽和に達するという双曲線型の関係を示すことが予想される。しかし、過去の生化学実験では双曲線型の関係は得られておらず、IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構は実証されていない。本研究では IF<sub>1</sub> の阻害機構を検証するため、幅広い [IF<sub>1</sub>]、[ATP] 濃度で実験を行い、2 段階阻害機構の実証を試みた。

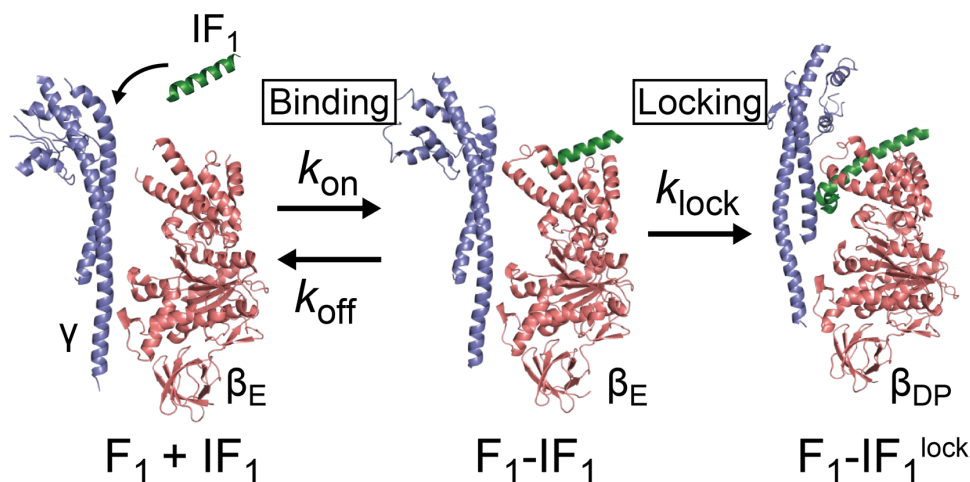


図 3-1 IF<sub>1</sub> による 2 段階阻害機構(図 1-32 を同等)

### 3.2 *b*MF<sub>1</sub> の ADP 阻害の定量

*b*MF<sub>1</sub> による ATP 加水分解活性は、ATP 再生系と組み合わせて NADH の吸光変化をもとに定量する系を用いた(図 3-2)。この系では、*b*MF<sub>1</sub> が ATP を加水分解すると、NADH の酸化によって 340 nm での NADH の吸光が減少していく(図 3-3(A))。2.2 でも述べたように、溶液中に阻害剤や阻害タンパク質がなくても F<sub>1</sub> は触媒反応中に一時的に不活性な状態に陥る。これは ADP 阻害状態と呼ばれ、溶液中の F<sub>1</sub> は活性状態と不活性状態を行き来している。IF<sub>1</sub> 阻害の結果から ADP 阻害の影響を取り除くため、ここでは *b*MF<sub>1</sub> の溶液中での ADP

阻害状態の定量を行った。

図 3-3(B)は 1 mM ATP 条件での  $b\text{MF}_1$  の加水分解活性の時間変化を示した。溶液中に  $b\text{MF}_1$  を添加すると、はじめは急速に ATP を加水分解する様子が観察されるが、その後ゆっくりと減速する様子が観察される。 $b\text{MF}_1$  投入直後では ADP 阻害状態に陥っている  $b\text{MF}_1$  は少ないと考えられるが、時間が経つにつれ、より多くの  $b\text{MF}_1$  が ADP 阻害状態に陥り、ATP 加水分解活性は小さくなっていく。最終的に、反応は平衡に達して加水分解活性は一定になる。ADP 阻害に陥る時定数を算出するため、この実験を ATP 1  $\mu\text{M}$  から 4 mM 条件で行った。 $b\text{MF}_1$  投入直後から平衡状態に達するまでの ATP 加水分解活性の減衰を

$$y = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_{ADP\text{ inh}}^{app}}\right) + B \quad \text{式(3.1)}$$

という指数関数でフィッティングを行い(図 3-3(B)、赤)、ADP 阻害の時定数  $\tau_{ADP\text{ inh}}^{app}$  と、平衡状態での残存活性  $B$  を求めた( $A$ は定数)。その結果、最大活性と比較した平衡状態での残存活性  $B$  は弱い ATP 濃度依存性が観察されたものの、その値は 30-50% でほぼ一定であった(図 3-3(C))。これはどのような ATP 濃度条件でも平衡状態では半分以上の  $b\text{MF}_1$  が不活性な状態に陥っていることを意味する。ADP 阻害の時定数  $\tau_{ADP\text{ inh}}^{app}$  は明確な ATP 濃度依存性を示したが、そのオーダーは 10-100 秒前後であり(図 3-3(D))、その後は  $b\text{MF}_1$  の加水分解活性は一定になることを示している。さらに詳細な解析は補足データ 7.1.6.2 で行ったのでそちらを参照されたい。

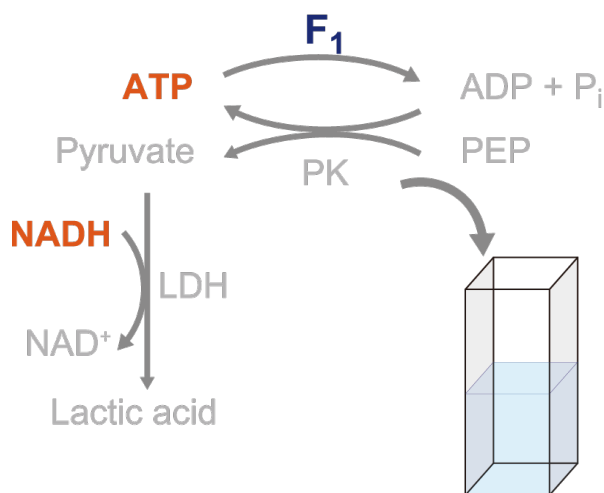


図 3-2  $F_1$  による ATPase 活性測定系



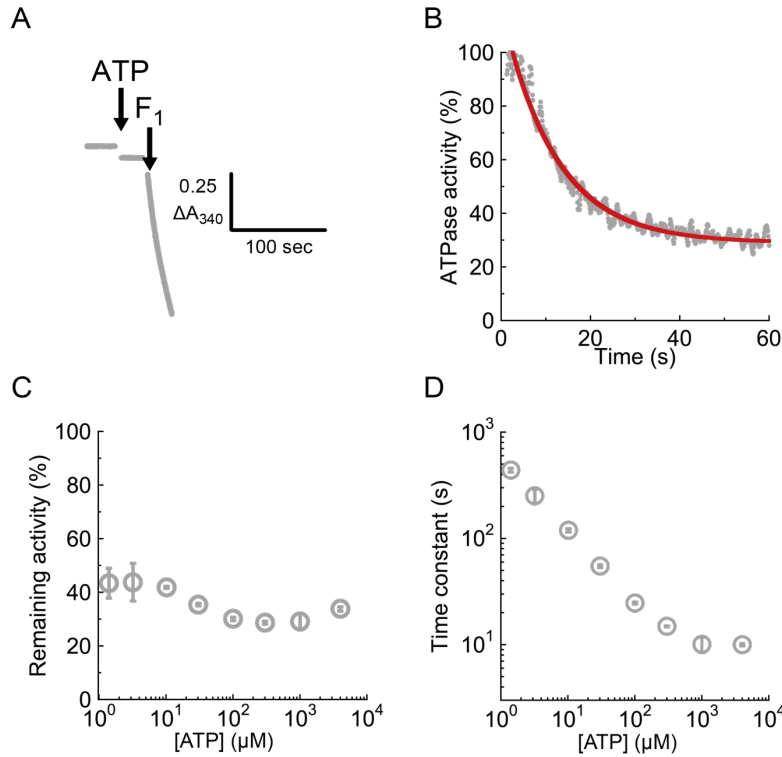


図 3-3  $bMF_1$  の ADP 阻害状態の解析

(A) ATP 1 mM 条件における 340 nm での NADH の吸光量の変化。F<sub>1</sub> を添加すると、吸光度は急激に減少する。(B) (A) を  $bMF_1$  の活性変化に変換した場合の時間変化。フィッティング(赤)は式 (3.1)を表している。(C) [ATP]と残存活性(B)の関係。(D) [ATP]と $\tau_{ADP\ inh}^{app}$ の関係。(C)と(D)において、測定の SD はエラーバーで示されている。測定値は 3 回の測定の平均値である。

### 3.3 IF<sub>1</sub> 阻害の時間変化

前項 3.2 より、 $bMF_1$  の溶液中での ADP 阻害は 10~100 秒のオーダーで平衡に達することが分かった(図 3-3(D))。したがって、 $bMF_1$  を添加してから 180 秒後に IF<sub>1</sub> を添加し、 $bMF_1$  の加水分解活性の減衰を観察することにした(図 3-4(A))。

図 3-4(B)は ATP 1 mM 条件での IF<sub>1</sub> 添加後の時間変化である。IF<sub>1</sub> を添加して間もなく活性は低下していき、最終的に活性はほぼ 0 になる。この時間変化を

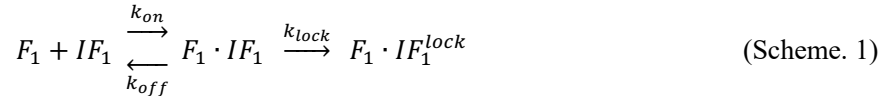
$$y(t) - y_0 = V_{\infty} t^{\infty} + \frac{V_0 - V_{\infty}}{k_{inhibition}^{app}} \{1 - \exp(-k_{inhibition}^{app} t)\} \quad \text{式(3.2)}$$

でフィッティングを行い、見た目の IF<sub>1</sub> 阻害定数 $k_{inhibition}^{app}$ を算出した。ここで、 $y(t)$ と $y_0$ はそれぞれ時間  $t$  と時間 0 での NADH の吸光の値、 $V_0$ と $V_{\infty}$ は時間 0 と無限遠での反応速度である。IF<sub>1</sub> 濃度が大きくなると $k_{inhibition}^{app}$ も大きくなっていくが、0.65 μM あたりから飽和に達した。この実験を 100 nM から 1 mM ATP 条件という幅広い ATP 濃度域で行い、 $k_{inhibition}^{app}$ を求めた。図 3-5 に $k_{inhibition}^{app}$ と[IF<sub>1</sub>]の関係を示す。測定したすべての ATP 濃度条件で、IF<sub>1</sub> 濃度が大きくなると $k_{inhibition}^{app}$ も大きくなるが、その後飽和に達するという双曲線型の関係を示した。C 末端に融合した蛍光タンパク質 mScarlet の影響を確認するため、mScarlet なし



の IF<sub>1</sub>(IF<sub>1</sub><sup>1-60ΔmScarlet</sup>)を精製し、ATP 1 mM 条件でその阻害能も検証した(図 3-6)。その結果、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> の阻害定数は mScarlet つきの IF<sub>1</sub>(IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet)と一致した。すなわち、C 末端の mScarlet は IF<sub>1</sub> 阻害には影響を与えないことが分かった。

図 3-5 で得られた双曲線型の関係は、「IF<sub>1</sub> が可逆的に F<sub>1</sub> に結合してできた F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub> 中間体から最終阻害生成物ができる」という 2 ステップ阻害モデルを支持するものである。ここで IF<sub>1</sub> 阻害について以下のような化学反応式を仮定する。



ここで、F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub><sup>lock</sup>は中間体F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub>から異性化してできた最終阻害生成物を意味する。また、k<sub>on</sub>、k<sub>off</sub>は IF<sub>1</sub> の結合/解離の速度定数、k<sub>lock</sub>は中間体から最終阻害生成物への異性化の速度定数である。この反応スキームからk<sub>inhibition</sub><sup>app</sup>は以下のように計算される。

$$k_{inhibition}^{app} = \frac{[IF_1]}{K_M^{IF_1} + [IF_1]} \cdot k_{lock} \quad \text{式(3.3)}$$

$$K_M^{IF_1} \equiv \frac{k_{off} + k_{lock}}{k_{on}} \quad \text{式(3.4)}$$

今回の実験で得られた[IF<sub>1</sub>]とk<sub>inhibition</sub><sup>app</sup>の関係はすべて式(3.1)でフィッティングを行い、2 つのフィッティングパラメータk<sub>lock</sub>とK<sub>M</sub><sup>IF<sub>1</sub></sup>を求めた。

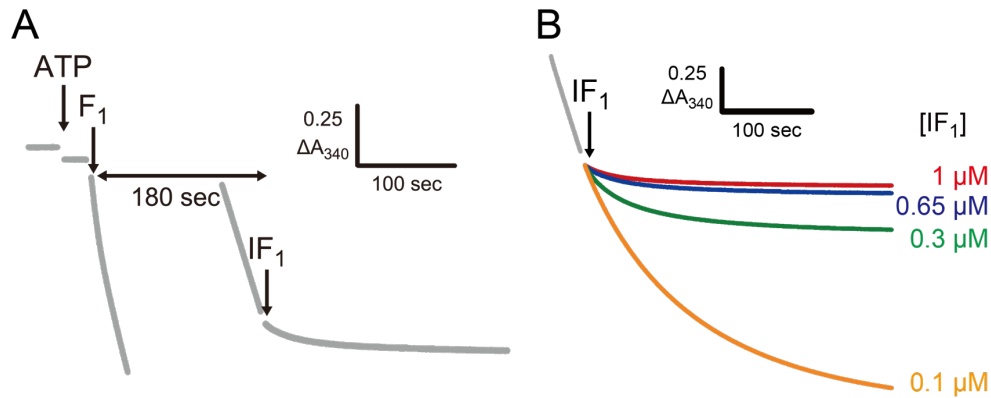


図 3-4 ATP 1 mM 条件における IF<sub>1</sub> 阻害の例

(A) 実験手順。bMF<sub>1</sub> を添加して 180 秒後に IF<sub>1</sub> を添加した。(B) IF<sub>1</sub> 濃度別の IF<sub>1</sub> 阻害のタイムコース。

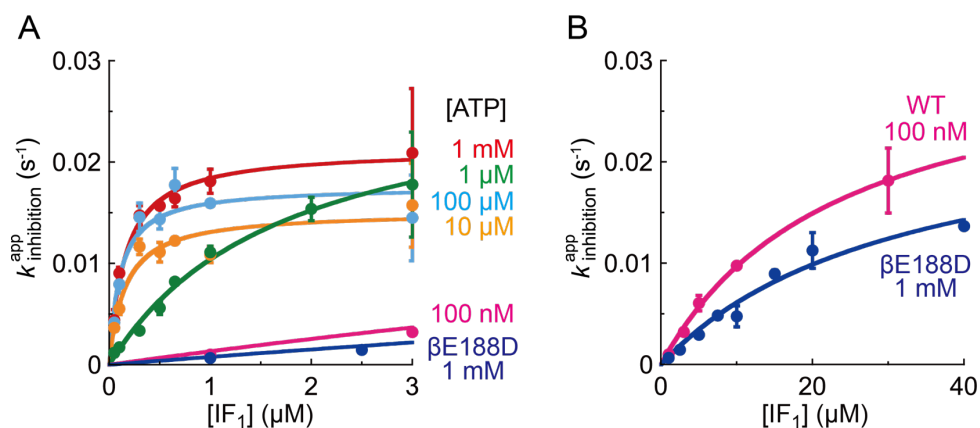


図 3-5  $k_{inhibition}^{app}$  と  $[IF_1]$  の関係

(A)では 0~3  $\mu M$   $IF_1$  の範囲のみを示した。(B)ではより高い  $IF_1$  濃度を要した 2 条件について、0-40  $\mu M$  の範囲でデータを示した。測定値は 3 回の測定の平均値である。なお、フィッティングは式(3.3)を表している。

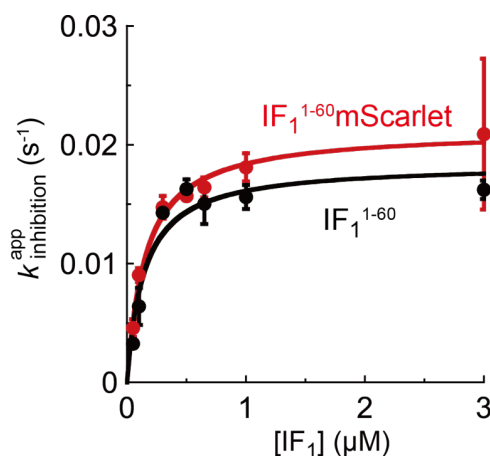


図 3-6  $IF_1$  の C 末端に融合した mScarlet の有無による阻害能の違い

測定値は 3 回の測定の平均値である。

### 3.4 $k_{lock}$ と $K_M^{IF_1}$ の ATP 濃度依存性

図 3-7(A)は式(3.3)のフィッティングにより得られた  $k_{lock}$  と  $[ATP]$  の関係を示す。若干のばらつきはあるものの、 $[ATP]$  濃度によらず  $k_{lock}$  は  $0.02 s^{-1}$  であった。この値は先行研究で推定された値と一致する。算出された  $k_{lock}$  の値はこの測定条件における  $F_1$  の触媒速度 1~200  $s^{-1}$  と比べ明らかに小さい。すなわちこれは、中間体  $F_1 \cdot IF_1$  から最終阻害生成物  $F_1 \cdot IF_1^{lock}$  への異性化の過程は、 $F_1$  の ATP 加水分解中で起きることを意味する。言い換えれば、1 回の回転で異性化するのではなく、 $bMF_1$  が回転を繰り返しながらその中のある 1 回で異性化反応が起きると考えられる。

図 3-7(B)はフィッティングにより得られた  $K_M^{IF_1}$  と  $[ATP]$  の関係を示す。 $K_M^{IF_1}$  ははっきり

と ATP 濃度依存性を示し、その値は 100 nM から  $\mu\text{M}$  の範囲にあると求められた。この値は、 $F_1$  のみを使用した研究や sub-mitochondrial particle を使用した研究で求められた値と一致する。 $k_{lock}$  の値がほぼ一定だったことを考えると、 $K_M^{IF_1}$  の濃度依存性は  $F_1$  と  $IF_1$  の結合定数が双曲線型の関係を示すことを意味する。ここで、実効  $IF_1$  結合定数  $k_{on}^{eff}$  として、

$$k_{on}^{eff} \equiv \frac{k_{lock}}{K_M^{IF_1}} \quad \text{式(3.5)}$$

と定義する。図 3-7(C)は  $k_{on}^{eff}$  と  $[\text{ATP}]$  の関係を示す。予想通り、 $k_{on}^{eff}$  は双曲線型の関係を示した。 $IF_1$  自体は ATP と結合することはないので、 $k_{on}^{eff}$  の濃度依存性は  $F_1$  の ATP 結合と関係していると考えるのが自然である。ATP 濃度が大きくなっていくと  $k_{on}^{eff}$  も大きくなっていくことから、 $F_1$  と  $IF_1$  の結合は  $F_1$  の ATP 結合待ち状態ではなく ATP が結合した後の状態で起きると考えられる。第 2 章で述べたように、 $b\text{MF}_1$  の触媒状態として ATP 結合待ち状態と ATP 開裂状態待ちの 2 つがある。ここでは *short dwell/pause* はその滞在時間が非常に短いことから無視するものとする。これを踏まえると、 $IF_1$  結合は  $F_1$  の ATP 開裂状態待ちで起きることが想定される。

この知見を検証するため、 $b\text{MF}_1$  の変異体  $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  を用いて  $IF_1$  阻害を調べることにした。前章でも述べた通り、 $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  では ATP 開裂待ち状態が野生型と比べおよそ 400 倍延びることが分かった。すなわち、この変異体では野生型に比べ ATP 開裂状態待ち時間が非常に長く、野生型と比べ  $IF_1$  阻害の様子に変化があることが予想される。実験は ATP 1 mM 条件で行った。図 3-5、図 3-7 で、濃青色で示したのが  $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  の結果である。予想とは違い、 $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  の  $IF_1$  阻害は野生型  $b\text{MF}_1$  と比較しても増加しなかった。図 3-5 で示した  $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  の双曲線カーブは、野生型  $b\text{MF}_1$  の ATP 100 nM 条件の結果とほぼ一致した。この条件では ATP 結合待ち状態が反応を支配しており、ATP 開裂待ち状態が支配的な  $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  の ATP 1 mM 条件とは  $b\text{MF}_1$  の反応待ち状態がまったく異なる。この理由としては  $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  による予期しない変化が起きていることがあげられる。第一に、 $b\text{MF}_1(\beta\text{E188D})$  の *long dwell* は *catalytic dwell* (ATP 開裂待ち状態) と特定されたが、その触媒状態は野生型と違いがある可能性がある。第二に、変異を加えたことによって  $IF_1$  結合に影響を与えた可能性である。しかし、 $\beta\text{E188}$  残基は  $F_1$  と  $IF_1$  の相互作用部位とは離れているため、この可能性は低いだろう。

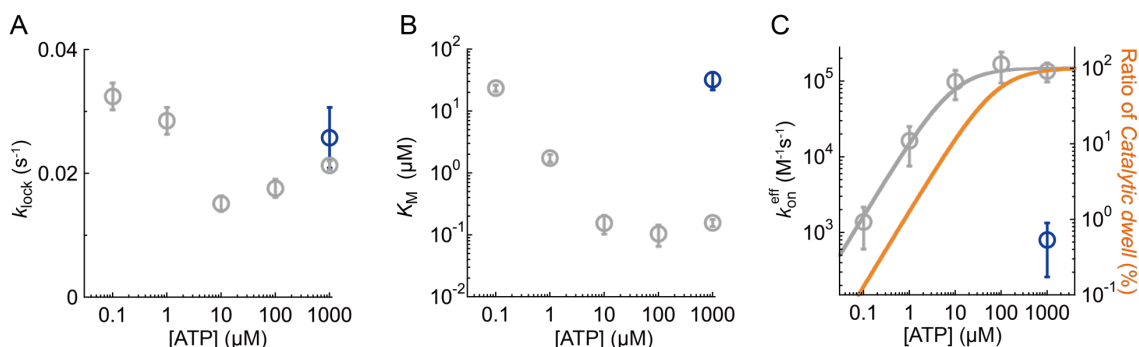


図 3-7 図 3-5 のフィッティングから得られたパラメータ (A)  $k_{lock}$ 、(B)  $K_M^{IF_1}$ 、(C)  $k_{on}^{eff}$  図中でグレーは野生型 *bMF1* から得られた結果、青は変異体 *bMF1* (βE188D) から得られた結果を示す。測定値は 3 回の測定の平均値である。なお、(C)においてオレンジの曲線は 1 分子回転解析から求められた *bMF1* の ATP 開裂反応待ち状態 (catalytic dwell) の存在割合である。

### 3.5 IF<sub>1</sub>(E30A)と IF<sub>1</sub>(Y33A)変異体を用いた解析

結晶構造解析では、IF<sub>1</sub> の 30 番目のグルタミン酸残基(E30)と 33 番目のチロシン残基(Y33)は IF<sub>1</sub> 阻害機構の中で最も重要な役割を果たす残基と特定された。以前の生化学実験では、これらの残基をアラニンに置換した変異体 E30A、Y33A ではほぼ阻害能がなくなり検出できないと報告されていた。ここでは、これらの残基の 2 段階阻害機構中での役割を明確にするため、IF<sub>1</sub>(E30A)と IF<sub>1</sub>(Y33A)の阻害能を再度検証することにした。

両者の変異体でも、実験は ATP 1 mM 条件で行った。図 3-8(A)は 3 つの異なる IF<sub>1</sub>(E30A)での時間変化を示す。実験を行った濃度範囲(0.3-3 μM)は野生型 IF<sub>1</sub> とほぼ同じである。タイムコースを見ると、IF<sub>1</sub> を投入しても F<sub>1</sub> の活性減少量は小さく、定常状態でも活性が残っていることが分かる。すなわちこれは IF<sub>1</sub>(E30A)の阻害は不可逆ではないことを意味している。式(3.3)のフィッティングにより求められた阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  は野生型 IF<sub>1</sub> と似た値を示した(図 3-8(B))。結果として得られるフィッティングパラメータ  $k_{lock}$  と  $K_M^{IF_1}$  も野生型と同等である。すなわちこれは、IF<sub>1</sub>(E30A)による阻害も 2 ステップ阻害機構に従うことが示唆される結果である。しかし、IF<sub>1</sub>(E30A)による阻害のもっとも特徴的な点はその阻害効率である。図 3-8(C)で示すのは測定終了(IF<sub>1</sub> 投入後 360 秒)時点での *bMF1* の残存活性割合である。野生型 IF<sub>1</sub> なら残存活性は 0 になるが、IF<sub>1</sub>(E30A)では 10~40%の活性が残っていた。

次に、IF<sub>1</sub>(Y33A)の阻害について述べる。(図 3-8(D))は 3 つの異なる IF<sub>1</sub>(Y33A)での時間変化を示す。まず注目すべきはその濃度範囲である。阻害が十分観察されるには 10 μM 以上の IF<sub>1</sub>(Y33A)が必要であった。しかし、IF<sub>1</sub>(E30A)とは違い、IF<sub>1</sub>(Y33A)は *bMF1* の活性をほぼ 0 にまで阻害することが分かった(図 3-8(F))。つまり、IF<sub>1</sub>(Y33A)は野生型 IF<sub>1</sub> と比べると F<sub>1</sub> との親和性が低く阻害までの時間はかかるけれども、最終的な阻害能としては野生型と同等程度あるということであることが示唆される結果である。図 3-8(E)で示す阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  と [IF<sub>1</sub>] の関係は双曲線型の関係を示し、IF<sub>1</sub>(Y33A)も 2 段階阻害機構に従うことが

分かった。 $k_{lock}$ の値は $0.019\text{ s}^{-1}$ であり、野生型のそれとほぼ一致した(表 3-1)。野生型との大きな違いは $K_M^{IF_1}$ の値であり、 $IF_1(Y33A)$ では $25\text{ }\mu\text{M}$ と求められた。これは野生型と160倍大きな値である。

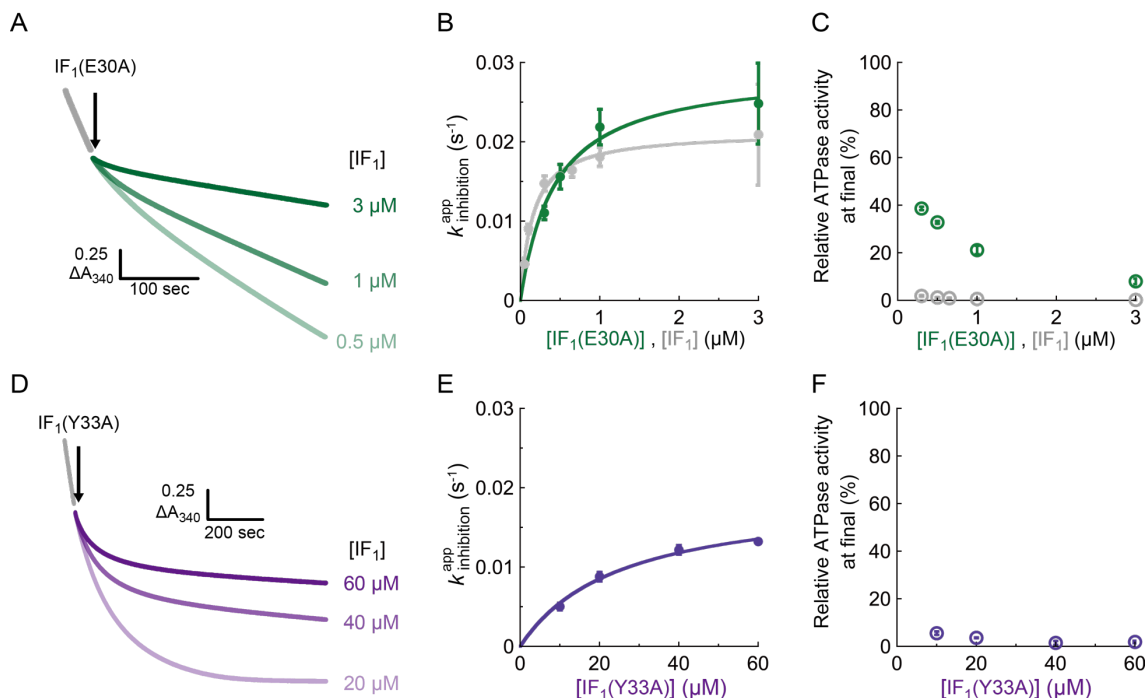


図 3-8 ATP 1 mM 条件での変異体  $IF_1$  の解析結果((A)-(C)  $IF_1(E30A)$ 、(D)-(F)  $IF_1(Y33A)$ )  
(A)、(D)  $IF_1$  阻害のタイムコース。(B)、(E)  $k_{inhibition}^{app}$  と  $[IF_1]$  の関係。(B)では同条件での  $IF_1$  の結果(グレー)を一緒に掲載した。(C)、(F) 測定終了時点( $IF_1$  投入から 360 秒後)の  $bMF_1$  の残存活性。測定の SD はエラーバーで示されている。測定値は3回の測定の平均値である。

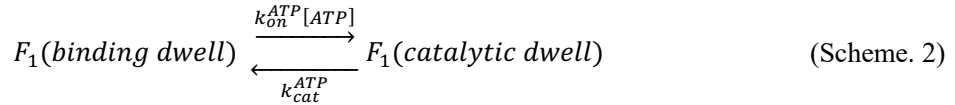
表 3-1 4 種類の  $IF_1$  における  $k_{lock}$  と  $K_M^{IF_1}$  の比較(ATP 1 mM 条件)

$IF_1$	$k_{lock}\text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{on}^{eff}\text{ (M}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{)}$
$IF_1^{1-60}\text{mScarlet}$	0.022	$1.4 \times 10^5$
$IF_1^{1-60}$	0.018	$1.3 \times 10^5$
$IF_1(E30A)$	0.029	$6.7 \times 10^4$
$IF_1(Y33A)$	0.019	$7.6 \times 10^2$

### 3.6 本章の総括と今後への課題

#### 3.6.1 $k_{on}^{eff}$ の ATP 濃度依存性

本章では、IF<sub>1</sub>の実効結合定数 $k_{on}^{eff}$ が[ATP]濃度依存的に双曲線型の関係を示すことが分かった(図 3-7(C))。IF<sub>1</sub>自体は ATP と結合することはないので、 $k_{on}^{eff}$  の ATP 濃度依存性は bMF<sub>1</sub> の特性によるものである。数々の生化学実験や結晶構造解析から、IF<sub>1</sub> 阻害には bMF<sub>1</sub> の ATP 加水分解による回転触媒反応が必要であることが示されている。したがって、 $k_{on}^{eff}$  の ATP 濃度依存性は bMF<sub>1</sub> の ATPase 活性のミカエリスメンテン型の関係に由来するものだと考えるのが自然である。前章で述べた bMF<sub>1</sub> の回転解析によると、bMF<sub>1</sub> は主に ATP 結合待ち状態と ATP 開裂待ち状態の 2 つの触媒状態をとることが分かっている。bMF<sub>1</sub> は ATP 結合待ち状態と ATP 開裂待ち状態とは別に *short dwell* という第 3 の状態をとることも分かっている。しかし、ATP 結合待ち状態と ATP 開裂待ち状態と比べると *short dwell* の待ち時間は非常に短いためここでは無視する。ATP 結合待ち状態の待ち時間は ATP 濃度に反比例する( $=1/k_{on}^{ATP}$  [ATP]、 $k_{on}^{ATP}$  は bMF<sub>1</sub> の ATP 結合定数で  $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )。一方で、ATP 開裂待ち状態の待ち時間は ATP 濃度によらず一定でおよそ 0.3 ms である。以上を踏まえ、溶液中での bMF<sub>1</sub> の状態を以下のように仮定する。



ここで、 $k_{cat}^{ATP}$  は ATP 開裂待ち状態の速度定数を示す。ここでは簡単に  $3 \times V_{max}$  として算出した。 $k_{on}^{eff}$  の ATP 濃度依存性を説明するため、IF<sub>1</sub> は選択的に F<sub>1</sub> の ATP 開裂待ち状態で結合すると仮定する。ここで、反応全体の待ち時間に対し、ATP 開裂待ち状態の割合を  $R_c$  とおき、以下のように定義する。

$$R_c = \frac{[\text{ATP}]}{K_m^{ATP} + [\text{ATP}]} \quad \text{式(3.6)}$$

ここで、 $K_m^{ATP}$  はミカエリスメンテン定数で  $k_{cat}^{ATP}/k_{on}^{ATP}$  で定義される。前章の 1 分子回転解析から  $K_m^{ATP} = 77 \text{ } \mu\text{M}$  である。式(3.5)と式(3.6)に基づき、 $k_{on}$  と  $k_{on}^{eff}$  を以下のように再定義する。

$$k_{on} = R_c \cdot k'_{on} \quad \text{式(3.7)}$$

$$k_{on}^{eff} = \frac{k_{lock}}{k_{off} + k_{lock}} \cdot k_{on} = \frac{k_{lock} k'_{on}}{k_{off} + k_{lock}} \cdot \frac{[\text{ATP}]}{K_m^{ATP} + [\text{ATP}]} \quad \text{式(3.8)}$$

$k'_{on}$  は ATP 開裂待ち状態での IF<sub>1</sub> 結合定数の最大値である。図 3-7(C)で、オレンジ色で示した曲線は式(3.5)で示した $k_{on}^{eff}$ の規格化済み理論曲線である。すなわち、bMF<sub>1</sub> の 1 分子回転解析から得られた「全停止時間に対する *catalytic dwell* の停止時間」と定義できる。一方で実験データ(図 3-7(C)、グレー)をフィッティングすることで、2 つのパラメータ  $K_m^{ATP}$  と  $k_{lock} k'_{on}/(k_{off} + k_{lock})$  を得た。ここで、本研究で算出された  $k_{lock}$  の値として  $0.02 \text{ s}^{-1}$ 、本研

究では算出できなかった $k_{off}$ の値として、先行研究の値を引用して $k_{off}=0.0017\text{ s}^{-1}$ と仮定する。このとき、 $k_{lock}k'_{on}/(k_{off}+k_{lock})$ の値は

$$\frac{k_{lock}k'_{on}}{k_{off}+k_{lock}} = \frac{0.02}{0.0017+0.02}k'_{on} \sim k'_{on}$$

と見積もることができる。これらの前提とフィッティングから、 $k_{on}^{eff}$ の最大値として $k'_{on}$ が $1.5 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ と算出された。この値は先行研究で $k'_{on}$ に類するものとして $10^4 \sim 10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ と求まっているものとよく一致している。一方で、フィッティングから $K_m^{ATP}$ は $9\text{ }\mu\text{M}$ と算出された。これは $b\text{MF}_1$ の回転解析から求めた $77\text{ }\mu\text{M}$ よりはるかに小さい。この原因のひとつとして考えられるのが実験条件の違いである。回転解析では回転している粒子のみを選択的に解析しているが、本章の生化学実験では溶液中に存在する多数の分子を解析している。そのため、後者では算出できる値はあくまで粒子平均であり、ADP 阻害のような不活化した粒子も含まれている。これを解決するには $\text{IF}_1$ 阻害を1分子レベルで解析することが必要であろう。

### 3.6.2 $\text{IF}_1$ 阻害機構と結晶構造解析との対応付け

本章で得られた結果を、前章の1分子回転解析や過去の結晶構造解析の結果と合わせて考えると、以下のような $\text{IF}_1$ 阻害機構が提案される(図 3-9)。まず、 $\text{IF}_1$ はATP開裂待ち状態で $\text{F}_1$ と弱く結合する。これはすなわち、可逆的な結合解離過程を経て得られる $\text{F}_1 \cdot \text{IF}_1$ のように表される2段階阻害モデルの中間状態に相当する。この状態は、 $\text{IF}_1$ が3個結合した $b\text{MF}_1$ の結晶構造において、 $\alpha_E\beta_E$ 部位に結合した $\text{IF}_1$ を表していると仮定している。 $\text{IF}_1$ のN末端の $\alpha$ ヘリックスのごく一部のみがフォールディングされており、数残基の相互作用を介して $\beta_E$ と結合している。これらの相互作用は $\gamma$ サブユニットとは遠く離れている。したがって、 $\text{IF}_1$ は $\text{F}_1$ の回転や触媒作用を阻害しないと考えられる。 $\text{IF}_1$ のTyr33は $\beta_E$ のLys401と相互作用している。本研究では、変異体 $\text{IF}_1(\text{Y33A})$ は $\text{IF}_1$ の結合過程を遅くすることを示した。つまり、変異体 $\text{IF}_1(\text{Y33A})$ は2段階阻害機構のうち反応初期の $\text{F}_1 \cdot \text{IF}_1$ 複合体の形成を抑制していると考えられる。

$\text{F}_1 \cdot \text{IF}_1$ 複合体が形成された後は、 $\beta$ に結合したヌクレオチドの状態を変えながら $\text{IF}_1$ のN末端のフォールディングが進行していく。結晶構造中の $\alpha_{DP}\beta_{DP}$ に結合している $\text{IF}_1$ が示すように、N末端のヘリックス構造が $\alpha\beta$ 界面に深く入り込んでいき、N末端のフォールディング領域が増えていく。この状態まで到達すると、 $\text{F}_1$ の回転と触媒作用は完全に阻害状態になる(スキーム中 $\text{F}_1 \cdot \text{IF}_1^{lock}$ )。 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$ に結合した $\text{IF}_1$ のGlu30は $\beta_{DP}$ や $\beta_{TP}$ のArg408と塩橋を形成しており、 $\text{IF}_1$ 阻害を司る重要な残基である。しかし、この残基は、 $\beta_E$ のArg408とは塩橋を形成していないことから、Glu30は中間状態から最終状態への異性化にのみ関係していることが示されていた。本研究で検証した $\text{IF}_1(\text{E30A})$ 変異体は結晶構造の知見と矛盾せず、阻害初期の $\text{F}_1 \cdot \text{IF}_1$ 中間体形成には影響を与えずに最終阻害状態のみを不安定化することを示した。

本章で求められたように、 $F_1 \cdot IF_1$  中間体から最終阻害状態に至るまでの異性化の平均時定数は約 50 秒( $= 1/k_{lock}$ )であり、これは回転の平均時間(5~1000 ms)よりも有意に長い。すなわちこれは、 $F_1$  と  $IF_1$  が緩く結合した状態のまま数百から数千の回転が必要であることを意味している。言い換えれば、 $IF_1$  は  $F_1$  の回転/触媒中に異性化に失敗し続けていることになる。

しかしこれは、 $IF_1$  が  $F_1$  の ATP 開裂待ち状態と選択的に結合して中間体を形成するという結論と矛盾しているように思える。 $IF_1$  と  $F_1$  が結合した状態でも  $F_1$  は回転し続けることができるということは、 $F_1$  は ATP 開裂待ち状態以外のどの状態でも  $IF_1$  と何らかの親和性を持っていることを意味している。現状の実験結果ではこの理由をうまく説明することはできない。考えられるひとつの原因は反応機構を単純化しすぎたことかもしれない。実際の  $F_1$  の状態や  $F_1$ - $IF_1$  の結合状態は複雑で現状のスキームでは表現しきれていない面がある可能性がある。結晶構造解析によれば  $IF_1$  がとりうる 3 つの構造状態( $\alpha_E\beta_E$ 、 $\alpha_{TP}\beta_{TP}$ 、 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$ )を示唆しているのに対し、今回のモデルでは 2 つの状態( $\alpha_E\beta_E$ 、 $\alpha_{DP}\beta_{DP}$ )のみを採用して中間状態( $\alpha_{TP}\beta_{TP}$ )を無視している。もうひとつ考えられる理由は溶液系での実験だということである。多数の分子が存在するため結果は平均値でしか得られないことや、 $IF_1$  添加後の時間変化を単純な 1 指数関数をベースにした関数でフィッティングを行っている。そのため、少数の分子のみが示すマイナーな状態が無視されている可能性がある。ADP 阻害状態などによる  $F_1$  分子間の状態が不均一であることを考慮すると、この問題を解決するには既存の溶液系の実験ではなく、分子の不均一性を評価できるまったく新しい系の構築が必要かもしれない。

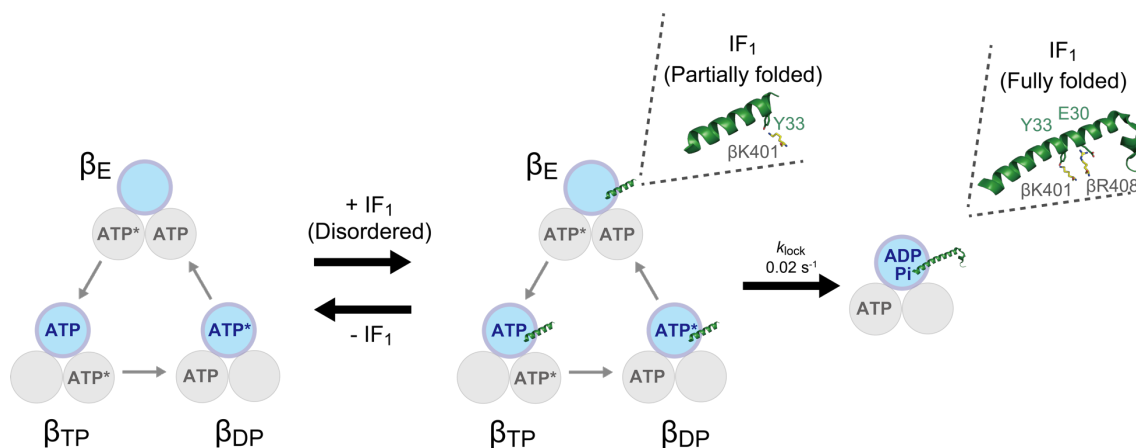


図 3-9 本実験から導かれる  $IF_1$  阻害スキーム

図中の円は  $\beta$  サブユニットを表す。 $\beta$  サブユニット中に記載してある「ATP」の後の「\*」は ATP が加水分解される直前の状態であることを意味している。



## 第4章 1 分子解析による IF<sub>1</sub> の制御機構解明

### 4.1 本章の目的

前章では溶液中での実験から IF<sub>1</sub> 阻害の基本的な特性を明らかにした。以前の結晶構造解析から提案されていた通り、IF<sub>1</sub> 阻害が 2 つの素過程で構成されていることが明らかになった。さらに、2 つの素過程のうち、IF<sub>1</sub> は F<sub>1</sub> の ATP 開裂待ち状態(*catalytic dwell*)と選択的に結合すること、IF<sub>1</sub> の最終状態への異性化反応を司っているのは IF<sub>1</sub> の N 末端に存在する天然変性部位のフォールディング反応であることが分かった。

生体内で IF<sub>1</sub> はその環境変化に応じて F<sub>o</sub>F<sub>1</sub> と結合・解離を行い、その機能を制御する。しかし、結晶構造解析から提案された IF<sub>1</sub> 阻害機構(図 3-1)によると、第二段階の異性化過程は原理的に不可逆である。また、野生型 IF<sub>1</sub> の生化学実験の結果(図 3-8(B)、グレー)からは、IF<sub>1</sub> 投入後十分時間が経過したときの *b*MF<sub>1</sub> の活性はほぼ 0 に等しいことが示された。これはすなわち、一度 IF<sub>1</sub> 阻害に陥った *b*MF<sub>1</sub> は触媒活性を失ったままの状態であると示唆される。これらの知見は生体内での IF<sub>1</sub> の機能、特に IF<sub>1</sub> の解離を十分に表せていないことを意味している。すなわち、F<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> を用いた生化学実験では IF<sub>1</sub> の解離条件を十分に探索できず、生体内での IF<sub>1</sub> 制御機構の解明は不可能であった。

本章では *b*MF<sub>1</sub> の 1 分子計測系に IF<sub>1</sub> を導入し、IF<sub>1</sub> 阻害状態を *b*MF<sub>1</sub> の回転・停止をもとに議論する。IF<sub>1</sub> の解離条件を重点的に調べるため、*b*MF<sub>1</sub> 分子の回転を操作できる磁気ピンセットを使用した。IF<sub>1</sub> 阻害状態にある *b*MF<sub>1</sub> を磁気ピンセットで操作し、回転を再開するかどうかを調べ、IF<sub>1</sub> 解離の角度依存性を算出した。

### 4.2 IF<sub>1</sub> 阻害定数の算出

1 分子回転観察系で IF<sub>1</sub> 阻害が見積もれるか検証するために、前章の生化学実験の結果をもとに 1 分子回転解析系で IF<sub>1</sub> 阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  の算出を行った。手順は以下のとおりである(図 4-1)。回転プローブとして磁気ビーズを用い、撮影条件は 30 fps である。まず IF<sub>1</sub> を含まない溶液で回転観察を行い、回転する *b*MF<sub>1</sub> 粒子を探した。次にフローセル中に IF<sub>1</sub> を含む溶液を流し入れ、継続して回転を観察した。回転対象に選んだ粒子は IF<sub>1</sub> を導入してから数分以内に回転を停止した。数十秒のオーダーで回転を再開する ADP 阻害とは異なり、一度 IF<sub>1</sub> 阻害に陥った粒子は回転再開することなく停止状態のままだった。ここでは 10 分以上停止した粒子に対して IF<sub>1</sub> 阻害粒子と定義した。

IF<sub>1</sub> 阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  は回転開始から回転停止までの時間(回転継続時間)を計測して、そのプロットを

$$Survival\ probability(\%) = 100\{1 - f(t)\} = 100\exp(-kt) \quad \text{式(4.1)}$$

でフィッティングすることで求めた。これは反応素過程が 1 つのみであることを仮定した場合であり、1 つの指数関数をもとにフィッティングを行うことができる。2 つの反応素過程が考えられる場合は 2 つの指数関数を組み合わせた

$$Survival\ probability(\%) = 100 \frac{k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)}{k_2 - k_1} \quad \text{式(4.2)}$$

でフィッティングを行った。詳細は 7.3.4 を参照されたい。

また、回転開始時点は以下の 2 種類のどちらかで定義した。IF<sub>1</sub> 溶液を流し入れている最中はフローセル中に溶液の流れが発生しているため、bMF<sub>1</sub> に取り付けられた磁気ビーズは流れの方向を向いている。すなわち、溶液導入操作時に bMF<sub>1</sub> が回転していることはない。溶液交換が終わり、フローセル中の流れが落ち着いたところで bMF<sub>1</sub> は回転を再開する。この場合、溶液交換後の回転再開のタイミングを回転再開時点と定義した。一方で、溶液交換を終えても回転を再開しない bMF<sub>1</sub> も一定数存在した。これは溶液交換の最中に ADP 阻害状態などに陥り回転を停止していたと解釈した。そのような粒子の多くは数十秒以内に阻害状態から解放され回転を再開したので、この時点を経験した時間を回転再開時点と定義した。また、IF<sub>1</sub> を導入しても ADP 阻害のような数十秒単位の短い停止を繰り返した後、やがて 10 分以上の長い停止を示す粒子も観察された。その場合は IF<sub>1</sub> 阻害による停止以外の短い停止時間を除き、実際に回転していた時間のみを足し合わせることで回転継続時間とした。

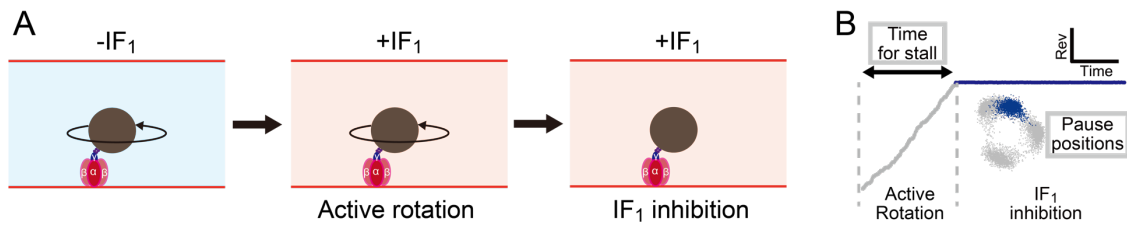


図 4-1 IF<sub>1</sub>を導入した bMF<sub>1</sub>の 1 分子回転実験の概要

(A) 実験手順。IF<sub>1</sub> なし溶液で回転している bMF<sub>1</sub> 粒子を見つけたあと、溶液交換により IF<sub>1</sub> あり溶液を導入する。粒子はしばらく回転しているが、やがて回転を停止する。(B) IF<sub>1</sub> 阻害粒子の例 (ATP 100 nM、IF<sub>1</sub> 5 μM 条件)。IF<sub>1</sub> 阻害に陥るまでの時間(“Time for stall”、4.2)と IF<sub>1</sub> 阻害による回転停止点(“Pause positions”、4.3)を調べた。

図 4-2 に、さまざまな ATP 濃度、IF<sub>1</sub> 濃度条件での  $k_{inhibition}^{app}$  の算出結果を示す。ATP 1 mM の場合、1 μM と 3 μM の 2 つの IF<sub>1</sub> 濃度条件で実験を行った(図 4-2 赤)。その結果、両方の条件で求められた  $k_{inhibition}^{app}$  は 0.05 s<sup>-1</sup> で一致した。前章の生化学実験の結果を参照すると、ATP 1 mM 条件での IF<sub>1</sub> 阻害の  $K_M$  は 100 nM であり、今回の 1 分子実験の濃度条件は  $K_M$  の 10 倍以上である。今回の 2 つの IF<sub>1</sub> 条件は飽和条件であり、IF<sub>1</sub> 結合待ち時間は短いものとして考える。すなわち、これら 2 条件で求めた速度定数は第 2 段階の異性化の速度定数  $k_{lock}$  の値としてみなすことができる。

次に ATP 1 μM の実験結果について図 4-2 青で示す。生化学実験から算出された  $K_M$  の値は 2 μM である。今回は  $K_M$  とほぼ一致する 3 μM IF<sub>1</sub> と、 $K_M$  の 10 倍である 20 μM IF<sub>1</sub> の 2 条件で実験を行った。ATP 1 mM の場合、磁気ビーズ付きの bMF<sub>1</sub> は約 5 rps で回転するのに対し、ATP 1 μM では回転速度は約 1.5 rps まで低下した。IF<sub>1</sub> 3 μM 条件では回転継続時間

のプロットから求められた $k_{inhibition}^{app}$ は $0.01\text{ s}^{-1}$ であった。これは $1\text{ mM ATP}$ 、 $3\text{ }\mu\text{M IF}_1$ 条件で求められた $k_{inhibition}^{app}$ より明らかに小さな値である。同 $\text{IF}_1$ 濃度であるにもかかわらず $\text{ATP}$ 濃度が異なると得られる速度定数が異なることから、 $\text{IF}_1$ 阻害には $\text{ATP}$ 濃度依存性があることが示唆される結果である。一方、 $\text{IF}_1$ 濃度を $20\text{ }\mu\text{M}$ まで上げると、 $k_{inhibition}^{app}$ は $0.055\text{ s}^{-1}$ まで大きくなり、 $\text{ATP } 1\text{ mM}$ 条件で算出された2つの速度定数とよく一致した。以上の結果から、第2段階の異性化の速度定数 $k_{lock}$ の値は $\text{ATP}$ 濃度によらず $0.05\text{--}0.06\text{ s}^{-1}$ であること、同じ $\text{ATP}$ 濃度でも $\text{IF}_1$ 濃度依存性があることの2点が示された。生化学実験では $k_{lock}$ の値は約 $0.02\text{ s}^{-1}$ と求まっていたので、1分子の結果と比較すると3倍小さい。生化学実験は溶液中の多数の粒子を対象としており、得られる値も粒子全体の平均値である。したがって、 $\text{ADP}$ 阻害のような不活性な粒子も解析対象になっているため、多粒子平均の値として $k_{inhibition}^{app}$ が小さく見積もられている可能性がある。

ここまでの4条件での解析結果はすべて、回転継続時間のプロットを1次の指数関数で(式(4.1))フィッティングしたもので、得られる $k_{inhibition}^{app}$ も1つのみである。そのうち、3つのデータ( $\text{ATP } 1\text{ mM}$ 条件での $1\text{ }\mu\text{M}$ と $3\text{ }\mu\text{M IF}_1$ 、 $\text{ATP } 1\text{ }\mu\text{M}$ 条件での $20\text{ }\mu\text{M IF}_1$ )は $\text{IF}_1$ 飽和濃度での測定であり、異性化過程のみが律速だとみなせる。一方、 $K_M$ 付近でのデータ( $\text{ATP } 1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\text{IF}_1 3\text{ }\mu\text{M}$ )では律速過程は1つだけではない。すなわち、 $\text{IF}_1$ 飽和条件とは違い、 $\text{IF}_1$ 結合待ち時間が無視できないため、回転継続時間に影響を与えている。一般に2つの反応素過程が連続的に反応する逐次反応の場合、待ち時間のヒストグラムは2つの指数関数でフィットできることを考え、 $\text{ATP } 1\text{ }\mu\text{M}$ 条件での $3\text{ }\mu\text{M IF}_1$ のデータを逐次反応モデル(式(4.2))でフィットすることにした。その結果、2つの速度定数は $k_1=0.013\text{ s}^{-1}$ と $k_2=0.038\text{ s}^{-1}$ と算出され、その反応の順番から $k_1$ は $\text{IF}_1$ 結合待ちに、 $k_2$ は異性化過程に対応する速度定数と考えられる。 $\text{IF}_1$ 飽和条件の実験から得られた $k_{lock}$ の値と比較すると $k_2$ の値は少し小さいものの、異性化過程の速度定数を表していると考えられる。一方、 $\text{IF}_1$ 結合待ちの速度定数を $k_{on}^{eff} = k_1/[\text{IF}_1]$ として得られる実効 $\text{IF}_1$ 結合定数は $4.3\times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ であった。

最後に $\text{ATP } 100\text{ nM}$ 、 $\text{IF}_1 5\text{ }\mu\text{M}$ 条件での実験結果を示す(図 4-3)。 $\text{ATP } 100\text{ nM}$ では、 $b\text{MF}_1$ は $\text{ATP}$ 結合待ちの3点ステップを示し、その回転速度は約 $0.4\text{ rps}$ である。また、 $\text{ADP}$ 阻害のような短い回転停止状態はほとんど観察されない。1指数関数フィッティングで得られた $k_{inhibition}^{app}$ は $0.0022\text{ s}^{-1}$ と他の条件に比べると極めて小さな値となった。また、このプロットを逐次反応モデルに基づき2指数関数でフィットすると、 $k_1=0.0023\text{ s}^{-1}$ と $k_2=0.046\text{ s}^{-1}$ と算出された。上記と同様に $k_1$ は $\text{IF}_1$ 結合待ちに、 $k_2$ は異性化過程に対応する速度定数と考えられる。 $k_2$ は $\text{IF}_1$ 飽和濃度条件で得られた値とよく一致した。また、 $k_{on}^{eff} = k_1/[\text{IF}_1]$ として得られる実効 $\text{IF}_1$ 結合定数は $4.8\times 10^2\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ であった。

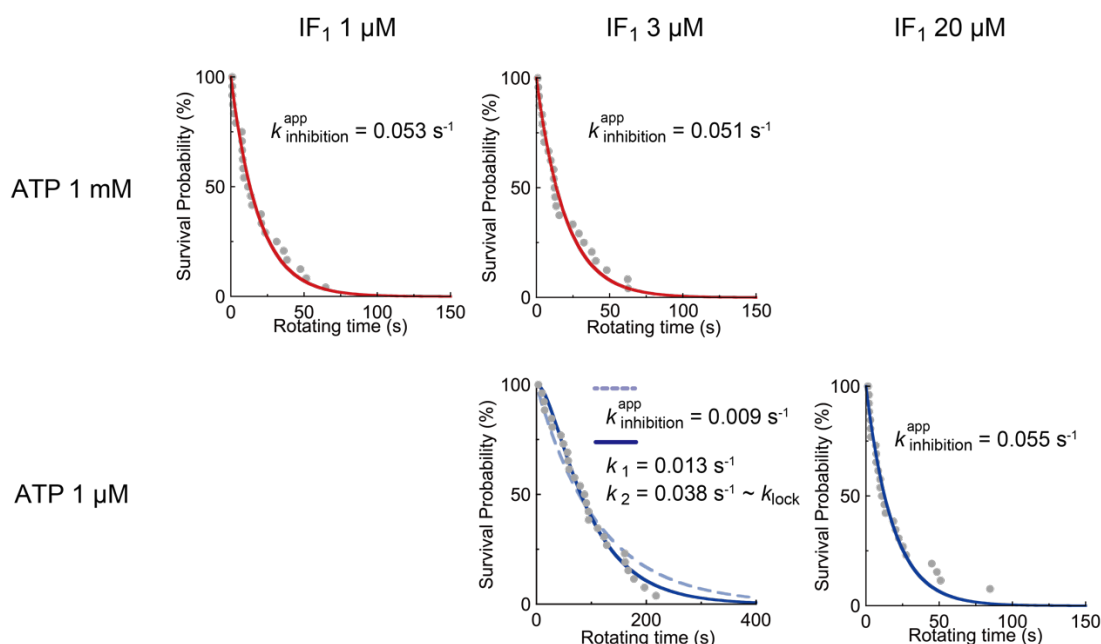


図 4-2 4 条件での回転継続時間から算出した  $k_{inhibition}^{app}$

ATP 濃度の違いをフィッティングの線の色で表してある。ATP 1  $\mu$ M、IF<sub>1</sub> 3  $\mu$ M 条件以外の 3 条件では 1 指数関数フィッティング(式(4.1))のみを示した。ATP 1  $\mu$ M、IF<sub>1</sub> 3  $\mu$ M では点線で 1 指数関数フィッティング、実線で 2 指数関数フィッティング(式(4.2))をそれぞれ示した。

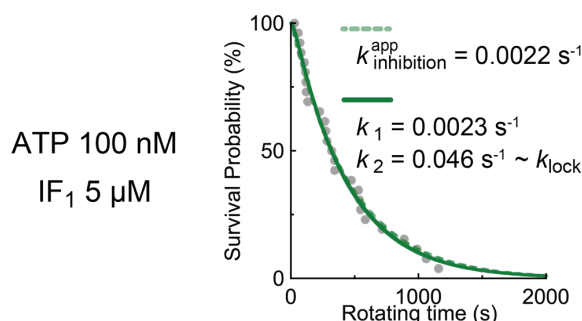


図 4-3 ATP 100 nM、IF<sub>1</sub> 5  $\mu$ M 条件で回転継続時間から算出した  $k_{inhibition}^{app}$

図 4-2 と同様に、点線で 1 指数関数フィッティング(式(4.1))、実線で 2 指数関数フィッティング(式(4.2))をそれぞれ示した。

### 4.3 IF<sub>1</sub> 阻害による停止位置

IF<sub>1</sub> 阻害に陥った粒子は自発的に回転再開することなく、同じ角度位置に停止し続けたままだった。ここでは IF<sub>1</sub> 停止位置を明らかにするため、ATP 結合待ち律速条件で実験を行い、ATP 結合待ち状態との相対角度差を算出した。

実験方法は AMP-PNP(2.5)やアジ化ナトリウム(2.6)による停止位置を求めたときと同じである。ATP 100 nM 溶液で ATP 結合待ち状態による 3 点の停止を確認した後、ATP(100 nM)と IF<sub>1</sub>(5  $\mu$ M)の混合溶液をフローセル中に導入した。前章の通り、IF<sub>1</sub> 阻害停止までの平均回

転継続時間は約 400 秒( $= 1/k_{inhibition}^{app} = 1/0.0023 \text{ s}$ )で、ATP と IF<sub>1</sub> の混合溶液を添加した後も bMF<sub>1</sub> はしばらく回転を続けた。その回転停止位置について図 4.3 に示す。IF<sub>1</sub> による停止位置は *binding dwell* とは異なる位置で、直前の *binding dwell* の角度との距離は 89°であった。これは bMF<sub>1</sub> の回転中で現れた *catalytic dwell* や AMP-PNP(2.5)、アジ化ナトリウム(2.6)により停止位置とほぼ一致しているが、10°程度 *catalytic dwell* から直後の *binding dwell* 側にずれている。過去の結晶構造解析や結晶構造をもとにした計算科学でも、IF<sub>1</sub> 停止状態の構造は ground state structure よりも+10°ずれていることが明らかになっている。今回の 1 分子回転解析の結果は、結晶構造解析で確認されている  $\gamma$  の回転角度のずれを表しているのかもしれない。

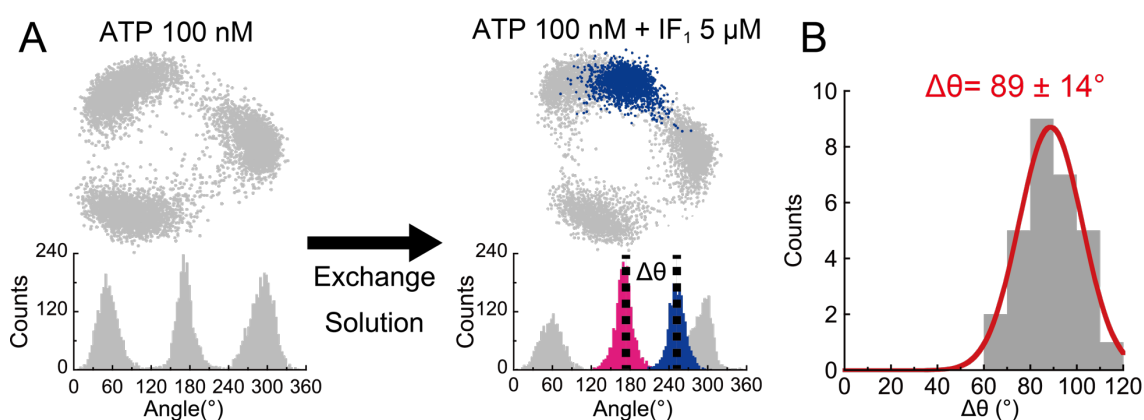


図 4-4 IF<sub>1</sub>による回転の停止

(A) 実験手順と分子の例。(左) 100 nM ATP 条件で *binding dwell* を確認した後、(右) 100 nM ATP と 5  $\mu$ M IF<sub>1</sub> の混合溶液を導入した。IF<sub>1</sub> による停止を青で示した。(B) 直前の *binding dwell* (ピンク) との AMP-PNP 停止(青)の角度差  $\Delta\theta$  の角度ヒストグラム(N=29)。値は平均  $\pm$ SD。

#### 4.4 磁気ピンセットによる回転再開条件の探索

ここまで  $IF_1$  の停止についての基礎的な特性を 2 点確認した。しかし、 $IF_1$  を含む溶液中で観察を続けていても、 $IF_1$  停止状態に陥った  $bMF_1$  は自発的に回転を再開することなく停止状態を続けた。さらに、 $IF_1$  を含まない溶液に交換しても、回転再開する粒子は見当たらなかった。本章では、 $IF_1$  を含まない溶液に交換した後に、磁気ピンセットで外部から力学的な操作を加えることで  $IF_1$  阻害粒子の回転再開条件を探索した。

溶液条件として ATP 1 mM のみ条件(ATP 条件)か、ATP (100  $\mu$ M)、ADP (100  $\mu$ M)と  $P_i$  (1 mM)も加えた条件(ATP/ADP/ $P_i$ )の 2 つの条件で実験を行った。さらに磁気ピンセットによる操作条件として、停止位置から反時計回り、もしくは時計回りに強制的に 1 回転、計 4 条件で実験を行った。その結果、ATP/ADP/ $P_i$  の混合溶液で時計回り方向に 1 回転させた場合のみ、高い回転再開割合を示した(図 4-5)。そのほかの 3 つの条件では回転再開割合は極めて低かったが、この条件では 50%以上の高い回転再開割合を示したことから、これらの条件間で明確な差が生まれた。

高い回転再開割合を示した条件について考える。今回行った条件は細胞内条件を模倣した条件で、ADP と  $P_i$  を含む溶液である。一般に細胞内環境は(数百  $\mu$ M~数 mM の ATP、100  $\mu$ M ADP、~10 mM  $P_i$  程度の条件であり、今回の実験と類似している。外部操作を用いた過去の  $F_1$  研究の中には、今回の溶液条件下で  $F_1$  が ATP を十分合成できる条件であることが報告されている<sup>121,122</sup>。さらに、時計回り操作は  $F_1$  が ATP 合成反応を行うときの回転方向である。これらの知見を統合すると、 $F_1$  が ATP 合成反応を行える場合のみ、 $IF_1$  が解離して  $bMF_1$  粒子は回転を再開することができると考えられる。

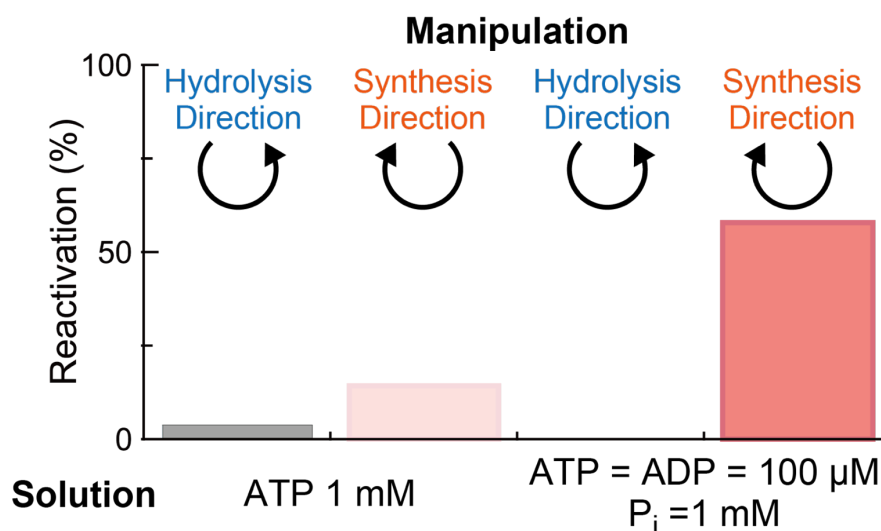


図 4-5  $IF_1$  阻害粒子の回転再開条件の探索

2 つの溶液条件、2 つの操作条件の計 4 条件での回転再開割合を算出した。磁気ピンセットによる操作は反時計回り(加水分解)方向か、時計回り(合成)方向に強制的に 1 回転させた。

IF<sub>1</sub> 解離の際に *b*MF<sub>1</sub> が ATP を合成しているかをさらに確かめるため、磁気ピンセットによる回転方向はそのままに、高い回転再開割合を示した溶液組成から ADP と P<sub>i</sub> をそれぞれ抜いた溶液でも実験を行った。図 4-6 に ATP/ P<sub>i</sub> 溶液と ATP/ADP 溶液で行った実験の結果をそれぞれ示す。その結果、ATP と P<sub>i</sub> をともに含む溶液に比べてこれら 2 条件ではその回転再開割合が減少した。IF<sub>1</sub> 解離には、ATP を合成できるように ADP と P<sub>i</sub> が共存した状態が必要であることがさらに根拠づけられた。なお、ATP/P<sub>i</sub> 溶液に比べて ATP/ADP 溶液ではその回転再開割合が極めて低いことが示された。この違いから *b*MF<sub>1</sub> に結合した P<sub>i</sub> 分子の必要性や IF<sub>1</sub> 結合時の *b*MF<sub>1</sub> の P<sub>i</sub> 親和性の変化などが起きていることも考えられる。

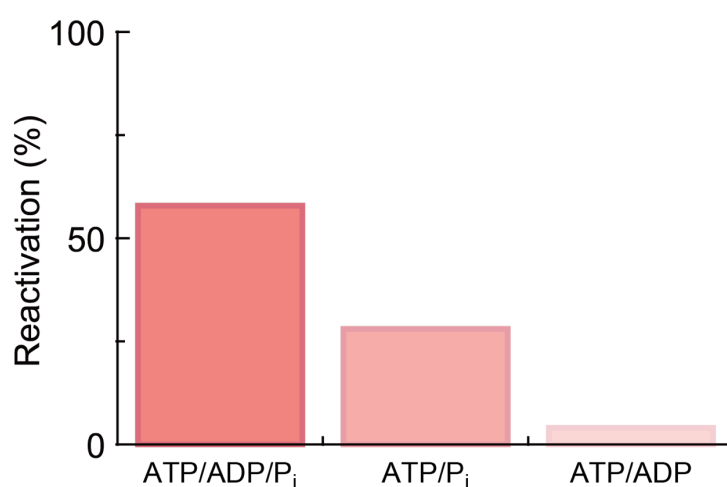


図 4-6 ADP と P<sub>i</sub> による回転再開割合への影響

溶液の濃度は ATP と ADP は 100 μM、P<sub>i</sub> は 1 mM である。ATP/P<sub>i</sub> 溶液では ATP 再生系を使用して、溶液中の ADP を排除した。

## 4.5 回転再開割合の拘束角度依存性

これまでの発見で、 $F_1$  が ATP 合成を行える溶液条件で、磁気ピンセットで時計回り方向に 1 回転させると、 $IF_1$  阻害  $bMF_1$  粒子から  $IF_1$  が解離して  $bMF_1$  が回転再開することが示された。さまざまな研究<sup>21,35,37,41,42</sup> から、 $F_1$  は外部からの力学的な操作に応じて内部の触媒反応を制御していることが報告されている。すなわち  $IF_1$  解離においても、回転角度に応じて  $F_1$  と  $IF_1$  の親和性が変わり  $IF_1$  解離方向に平衡を調節していることが示唆される。この仮説を検証するため、2.7 章で行った Stall-Release 実験を適用し、 $IF_1$  解離の角度依存性を調べた。

溶液条件は ATP/ADP/ $P_i$  の混合溶液とした。前章では  $IF_1$  を含む溶液中で  $IF_1$  阻害粒子を観察した後に  $IF_1$  なし溶液への交換作業を行い、回転再開割合を算出した。しかし、溶液交換作業は時間がかかる作業で繰り返して実験を行うには非効率である。そこで本章で行う Stall-Release 実験は、 $IF_1$  阻害粒子を確認したあと、 $IF_1$  を含む溶液のまま実験を継続して行った。また磁気ピンセットで操作した後の  $bMF_1$  粒子も、操作なしの  $bMF_1$  粒子と同程度の阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  を示した(図 4-7(A))。また、磁気ピンセット操作後に観察できる  $IF_1$  停止位置も、3 つの  $IF_1$  阻害位置で均等に停止していた(図 4-7(B))。これらの結果から、 $IF_1$  阻害粒子を磁気ピンセットで操作しても、その阻害能や  $bMF_1$  の機能に影響を与えないことが分かった。

実験手順を簡潔に説明する(図 4-8)。 $IF_1$  で阻害状態に陥り回転を完全に停止させている  $bMF_1$  粒子を磁気ピンセットで操作して標的とする角度で拘束する。ここでは時計回り(ATP 合成)方向を正として示すことにする。設定時間が経過したのち、磁気ピンセットによる拘束をやめ  $IF_1$  阻害  $bMF_1$  を解放した。 $bMF_1$  は反時計回り回転を経て、もとの  $IF_1$  阻害角度に戻ったのち、以下のどちらかの挙動をとった。すなわち、(1) 回転を再開するか、(2)  $IF_1$  阻害角度で停止を続けるかの 2 種類である。(1) 回転を再開する場合、拘束されている間に  $IF_1$  は  $F_1$  から解離してその触媒機能が復活し、回転トルクが発生したということである(ON)。その一方で、(2) 停止を続けるということは、磁気ピンセットによる操作でも  $IF_1$  は  $F_1$  から解離しなかったことを意味する。ON の割合( $P_{ON}$ )を決定することで、回転角度に対する  $IF_1$  解離割合反応進行度合いを見積もることができる。粒子が正常な機能を維持しているかを判断するため、時計回り方向 1 回転の操作を行い、回転再開した粒子に対してのみ Stall-Release 実験を行った。なお、磁気ピンセットによる拘束操作の直後に、もとの  $IF_1$  停止位置に戻らずに拘束位置で停止状態を続ける粒子や、 $280^\circ$ 以上の大きな回転を要する拘束の場合にもとの  $IF_1$  停止位置に戻る際に時計回り回転を経ることもあった。しかし、これらの粒子の割合は全体の 5%以下であり、このような現象が観察された場合は、当該粒子での実験を終えることにした。以下に示す結果の中にはこのような観察結果は含まれていない。

図 4-9 に拘束時間別の回転再開割合を示す。まず、拘束角度  $-80^\circ$  の条件では回転再開粒子は観察されなかった。時計回り方向を正としているため、加水分解方向で拘束したことを意味する。過去の  $TF_1$  の 1 分子操作実験<sup>40</sup> では、ADP 阻害粒子を加水分解方向  $80^\circ$  で数秒間



拘束したのち解放すると、ADP 阻害状態からほぼ 100%開放されることが報告されている。この知見と実験結果を考慮すると、今回の実験で観察していたのは IF<sub>1</sub> 阻害粒子であり、ADP 阻害粒子は混在していないことを意味する。一方で、拘束角度を時計回り方向に大きくしていくと回転再開割合に顕著な変化が観察された。拘束角度が 0~120°の条件では、IF<sub>1</sub> 阻害 bMF<sub>1</sub> 粒子の回転再開割合は観察されなかったが、拘束角度が 200°を超えると回転再開割合が急激に上昇した。これは拘束時間を問わず観察された現象であり、IF<sub>1</sub> 解離が F<sub>1</sub> の回転角度に依存して起きていることを示す結果である。

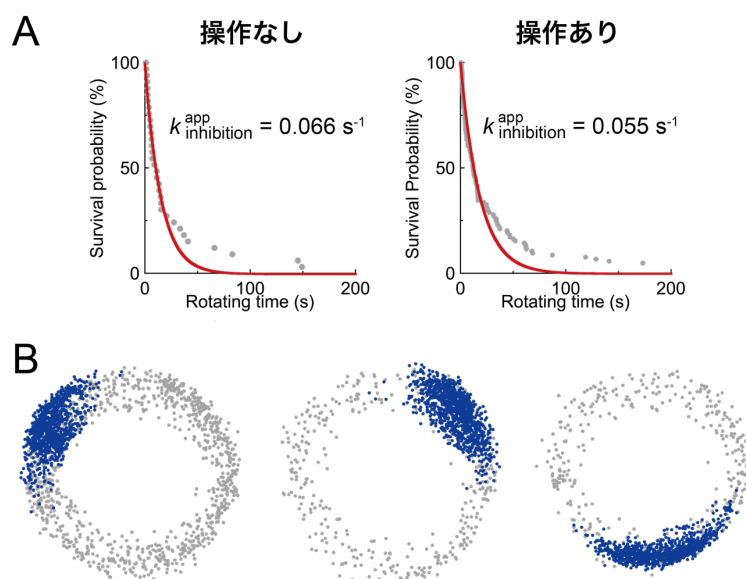


図 4-7 磁気ピンセット操作による粒子への影響

溶液条件は ATP=ADP=100  $\mu$ M、P<sub>i</sub>=1 mM である。(A) 磁気ピンセット操作前・操作後の  $k_{inhibition}^{app}$  の算出結果。完全に一致しているわけではないが、その値はともに 0.06 s<sup>-1</sup> と見積もることができる。(B) 同一粒子の IF<sub>1</sub> 停止角度の違い。磁気ピンセットを繰り返し用いて IF<sub>1</sub> 阻害停止位置を調べると、3 つの回転停止位置が均等に観察された。

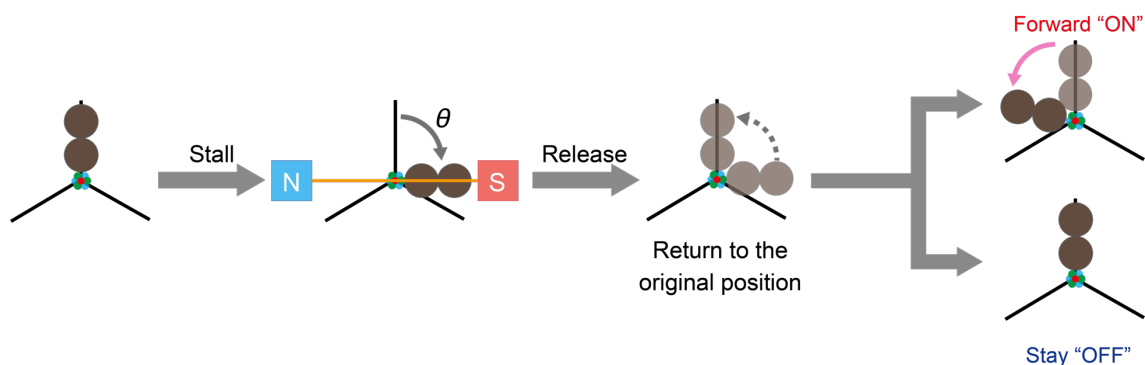


図 4-8 IF<sub>1</sub> 阻害解放の角度依存性を調べるための Stall-Release 実験

IF<sub>1</sub> 阻害状態で停止している *b*MF<sub>1</sub> に対して、磁気ピンセット操作により標的とする角度で *b*MF<sub>1</sub> を拘束し、ある一定時間が経過したら *b*MF<sub>1</sub> を解放した。解放された *b*MF<sub>1</sub> はもとの IF<sub>1</sub> 阻害停止位置に戻ったのち、以下の 2 種類の挙動のいずれかをとる。すなわち、(1) 次の反応待ち角度に進む(ON)か、(2) 元の反応待ち角度に戻る(OFF)かのどちらかである。これらはすなわち、拘束時間内に IF<sub>1</sub> が解放された(ON)か、IF<sub>1</sub> が解放されていない(OFF)かを意味する。

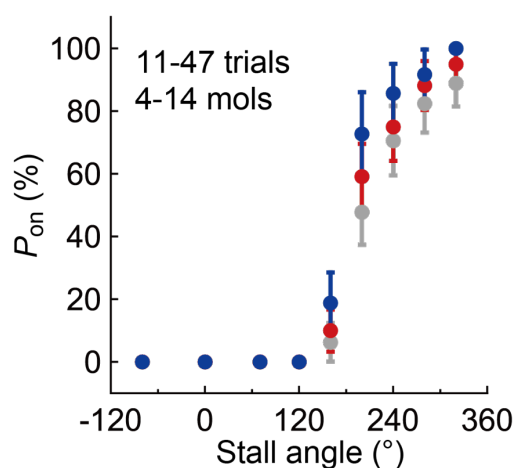


図 4-9 IF<sub>1</sub> 解離の拘束角度依存性

溶液条件は ATP=ADP=100 μM、P<sub>i</sub>=1 mM である。時計回り方向に 1 回転させたときに回転再開する粒子のみを選んで実験を行った。そのため、P<sub>ON</sub> の最大値は 100% であり、図 4-5 で示した回転再開割合(約 56%)とは異なることに注意したい。エラーバーは  $\sqrt{P_{ON}(100 - P_{ON})/N}$  (*N* は試行回数)によって定めた。

## 4.6 本研究の総括と今後への課題

### 4.6.1 IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構と速度定数の算出

本研究では IF<sub>1</sub> の阻害状態を *b*MF<sub>1</sub> の 1 分子回転観察系により観察した。回転している *b*MF<sub>1</sub> に対して溶液を交換して IF<sub>1</sub> 溶液を添加すると、*b*MF<sub>1</sub> の回転は停止した。IF<sub>1</sub> 阻害は *b*MF<sub>1</sub> の回転を完全に停止させ、外部から操作しない限り回転再開することはなかった。

IF<sub>1</sub> の停止状態と停止状態に至るまでの過程を 2 つのパラメータで評価した。ひとつは溶液交換後から *b*MF<sub>1</sub> の回転が停止するまでの回転継続時間である。これらの実験では、IF<sub>1</sub> 飽和濃度で観察される  $k_{inhibition}^{app}$  が  $0.05\text{ s}^{-1}$  でほぼ一致した。これはすなわち、IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構における  $k_{lock}$  の速度定数を表すことを意味する。第 3 章で算出した  $k_{lock}$  の値は  $0.02\text{ s}^{-1}$  程度であることを考えると、本章で算出された値は 2-3 倍程度小さいことになる。この違いは測定方法によるものだと考えるのが自然である。生化学実験では活性状態のみならず不活化した粒子も存在しており、得られる値はそれらの平均値である。一方で、1 分子計測系では活性状態の粒子の回転のみを対象としており、不活化粒子は除外できている。したがって、1 分子計測から得られた値の方が、分子自身の性質を表せていると考えられる。

IF<sub>1</sub> 濃度を下げてこの実験を行うと、IF<sub>1</sub> 結合にかかる時間も無視できなくなる。本章では IF<sub>1</sub> 飽和濃度以外での測定として 2 条件での実験を示した。それらの回転継続時間のプロットを逐次反応モデルに基づく、2 つの指数関数を組み合わせた式でフィッティングした。それらから得られた 2 つの速度定数のうち、前者は IF<sub>1</sub> 結合にかかる時間を表すはずである。実効 IF<sub>1</sub> 結合定数  $k_{on}^{eff}$  は溶液系の実験で求められた値より数倍小さかった。この理由として IF<sub>1</sub> 粒子のガラス面への吸着が考えられる。今回使用した IF<sub>1</sub> の C 末端部分には蛍光色素 mScarlet が結合しており、ガラス面へ吸着する可能性は多分にある。しかし、フローセルを通した IF<sub>1</sub> 溶液の蛍光強度を見積もった実験でも、フローセルを通さなかった溶液の蛍光強度の 20%程度しか減少しておらず(7.1.9)、実効 IF<sub>1</sub> 結合定数  $k_{on}^{eff}$  の数倍の低下には結びつかない。実効 IF<sub>1</sub> 結合定数とフローセル中の厳密な濃度定量の関係性解明は今後の課題である。

### 4.6.2 IF<sub>1</sub> 停止角度と結晶構造との対応づけ

本研究で IF<sub>1</sub> 阻害を評価するために解析したもうひとつのパラメータが阻害状態での角度位置である。これは結晶構造によって示される安定化された最終阻害状態を表していると考えられる。以下の図 4-10 では IF<sub>1</sub> 阻害状態だけではなく、第 2 章で得られた AMP-PNP とアジ化ナトリウムの結果も合わせて示している。3 つの結果すべてが 80-90°を示した。*b*MF<sub>1</sub> の回転スキームを考えると、これらの阻害剤はすべて ATP 開裂待ち状態(80°)で回転を停止させると考えるのが自然である。

一方、結晶構造でもこれらの阻害剤/阻害タンパク質と一緒に結晶化された *b*MF<sub>1</sub> の構造も得られている。これらに基づく理論研究<sup>49</sup>によって構造ごとの  $\gamma$  の相対回転角度が明らかになった(図 1-26 参照)。これによると、AMP-PNP 結合構造(PDB: 2jdi, ground state structure)

や  $\text{NaN}_3$  結合構造(PDB: 2ck3)とは異なり、 $\text{IF}_1$  結合構造(PDB: 2v7q)は  $10^\circ$ ほど加水分解方向に  $\gamma$  が回転しているという結果が報告されている。1 分子計測系で  $10^\circ$ の角度位置のズレを捉えられるかは不明ではあるが、今回の実験結果は理論計算と矛盾しないものである。

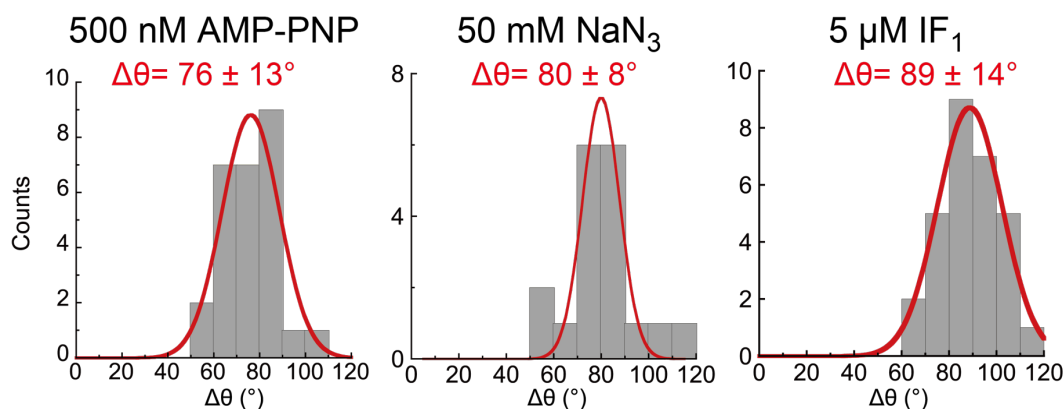


図 4-10 ATP 100 nM 条件における阻害状態の角度位置

値は直前の ATP 結合待ち角度からの角度差を示している。溶液条件は ATP 100 nM 溶液に、グラフ上部に示す濃度で阻害剤を添加した。それぞれ、図 2-18(B)、図 2-19(B)、図 4-4(B)のグラフと同じである。

#### 4.6.3 $\text{IF}_1$ 解離条件と生理的意味

他の  $\text{IF}_1$  研究と本研究を明確に分ける点が  $\text{IF}_1$  の解離条件の探索とその角度依存性の解明である。これまでの  $\text{IF}_1$  研究は主に生化学実験と結晶構造解析が中心であった。生化学実験では  $\text{F}_1$  を酵素としてのみ捉えており、反応素過程や回転停止点などの回転特性をもとに行われた研究は少なかった。一方、結晶構造解析から得られるのは最終阻害状態のみであり、中間状態の描写や反応の時間情報については得るのが難しい。本研究では  $\text{IF}_1$  の阻害状態を  $\text{F}_1$  分子の回転特性に基づいて調べた研究である。特に磁気ピンセットを用いた  $\text{IF}_1$  解離反応を観察する実験は他に類を見ないものであり、生体内での  $\text{IF}_1$  の機能解明に大きな知見を与える。というのも、本実験でも解明されたように、 $\text{F}_1$  単体では一度  $\text{IF}_1$  阻害に陥った  $\text{F}_1$  が自発的に触媒活性を取り戻すことはない。そのため、 $\text{F}_1$  のみの条件で  $\text{IF}_1$  阻害解放を調べた研究は存在しない。 $\text{F}_1$  だけではなく  $\text{F}_0$  も含めて実験を行っている研究は何例か存在する。当然ながら  $\text{F}_0$  の機能を維持するには脂質膜が必要である。そのため、ミトコンドリア自体を超音波にかけてミトコンドリア内膜を裏返しにして生成する submitochondrial particle (SMP)を用いる実験が多数である。しかし、その膜には  $\text{F}_0\text{F}_1$  以外の酵素、例えば呼吸鎖に属する complex I-IV も多数存在しているため、得られる結果から一意に特定の酵素の機能と結びつけるのが難しい。目的タンパク質以外の不純物が少ない系としては、大腸菌等から発現・精製した  $\text{F}_0\text{F}_1$  を任意の脂質膜に再構成させた系が考えられる。しかし好熱菌由来  $\text{F}_0\text{F}_1$  ではこのような例があるが、ミトコンドリア由来  $\text{F}_0\text{F}_1$  での実験は行われていない。ミトコンドリア由来  $\text{F}_0\text{F}_1$  ではその構成要素が多いことも原因のひとつであろう。以上のように、

IF<sub>1</sub> の解離条件に明確に迫るために必要な F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の系は確立されておらず、IF<sub>1</sub> の生理条件での機能解析についてはいまだに謎が多い。

本研究で発見された IF<sub>1</sub> の解離条件について考える。今回の実験では、ATP や ADP、P<sub>i</sub> を含む溶液中で IF<sub>1</sub> 阻害粒子を時計回りに回転させると回転再開割合が急激に上昇した(図 4-5)。これは ATP 合成条件での F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の回転を阻害しないという IF<sub>1</sub> の一方向制御特性にも合致する結果である。この結果と、F<sub>0</sub> の機能や IF<sub>1</sub> が作用する外的環境と合わせて考えると、以下のような作用メカニズムが推察される(図 4-11)。IF<sub>1</sub> が作用する場面は、ATP 合成に必要な膜内外のプロトン濃度差が小さく、ATP の加水分解による化学エネルギーが大きい条件である。このような条件では F<sub>0</sub> を時計回り(ATP 合成)方向に回転させようとする *pmf* が小さいために、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> 全体としては F<sub>1</sub> による ATP の加水分解が優先される。これを防止するのが IF<sub>1</sub> の役割である。IF<sub>1</sub> によって F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は加水分解も合成も完全に停止する。その間に、他の酵素の働きによって *pmf* が大きくなり、ATP 合成をするのに必要な水準まで復活したと仮定する。このとき、F<sub>0</sub> を時計回り(ATP 合成)方向に回転させようとする *pmf* が大きくなり、F<sub>0</sub> は回転子  $\gamma$  を時計回り方向に回転させようとする。 $\gamma$  は F<sub>1</sub> の固定子  $\alpha_3\beta_3$  リングにこの力を伝えて、 $\alpha_3\beta_3$  リングの構造変化を誘引する。時計回り方向の力が加えられて構造変化が起きることで、F<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の親和性は小さくなる。結果として、IF<sub>1</sub> は F<sub>1</sub> から解離して、ATP 合成が再度行われるというメカニズムである。ここで重要なのは、時計回り方向の回転が必要なだけではなく、実際に ATP 合成反応が起きることも必須ということである。実験結果(図 4-6)によると、ADP と P<sub>i</sub> のその片方が欠けてもその回転再開効率は低下した。これは、ATP が合成される反応自体が IF<sub>1</sub> 解離には必要だということである。特に、P<sub>i</sub> 非存在下ではほとんど回転再開が観察されなかったことから、IF<sub>1</sub> 解離には特に P<sub>i</sub> が重要であり、溶液中から P<sub>i</sub> を取り込んでいる可能性があることと示唆される。この検証は今後の課題である。

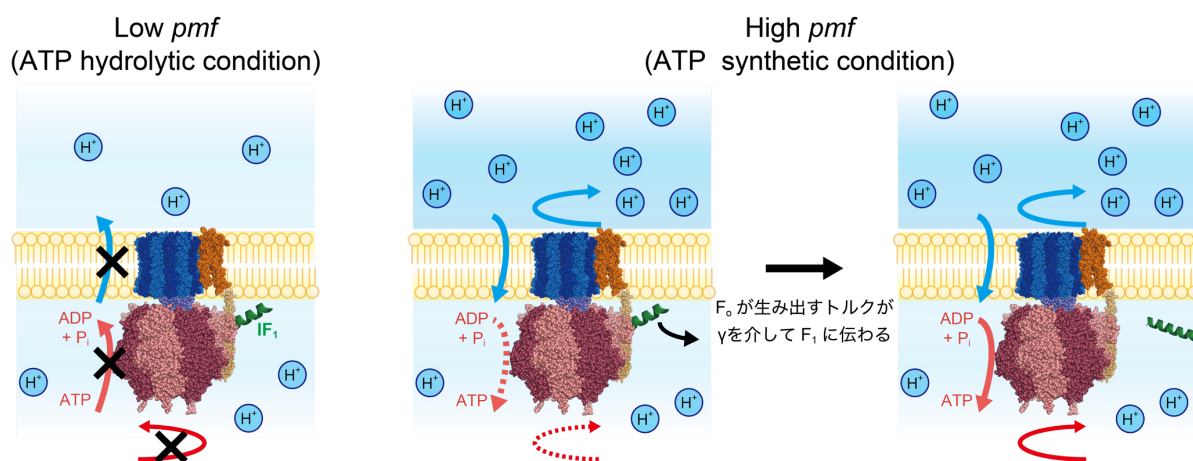


図 4-11 想定される生体内でのミトコンドリア F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の制御メカニズム

ATP 加水分解環境(左)では F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は ATP を加水分解して H<sup>+</sup> をくみ出そうとするが、IF<sub>1</sub> が作用しその機能を止める。ATP 合成環境(右)では F<sub>0</sub> の c リングによるプロトン輸送が開始され、 $\gamma$  を時計回り方向に回転させようとする。そのトルクが  $\gamma$  を介して F<sub>1</sub> に伝わる。結果として、IF<sub>1</sub> と F<sub>1</sub> の親和性が小さくなり、IF<sub>1</sub> は解離して F<sub>1</sub> 部分で ATP 合成が開始される。

#### 4.6.4 IF<sub>1</sub> 解離の角度依存性と結晶構造から想定される解離スキーム

生理条件と近い環境で行った回転再開割合の角度依存性を調べる実験(図 4-9)からは、拘束角度 200°を超えたあたりからその回転再開割合が急激に上昇するという結果が得られた。この結果を *b*MF<sub>1</sub> の反応スキームや *b*MF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> の結晶構造をもとに議論する(図 4-12)。

参考文献<sup>51,114</sup>が導かれる *b*MF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> の阻害メカニズムでは、IF<sub>1</sub> 結合状態から最終阻害状態に至るまでに IF<sub>1</sub> の N 末端部分のフォールディングが進んだだけではなく、IF<sub>1</sub> 結合  $\beta$  サブユニットのヌクレオチド結合状態が変化していた。IF<sub>1</sub> が結合するのはヌクレオチド非結合状態である  $\beta_E$  であるが、もっとも IF<sub>1</sub> のフォールディングが進んだ  $\beta$  は  $\beta_{DP}$  であり、これが最終阻害状態に相当する。すなわち、IF<sub>1</sub> が結合してから最終阻害状態に至るのに、ふたつの ATP が加水分解される必要がある。第 2 章で求められた *b*MF<sub>1</sub> の回転スキームでは、あるひとつの  $\beta$  に ATP が結合する角度を 0°とすると、その ATP が加水分解されるのは 200°の位置であった。結晶構造解析から得られた知見では、IF<sub>1</sub> 阻害には 200°分の *b*MF<sub>1</sub> の回転が必要であると言える。さらに言えば、第 3 章から得られた知見により、IF<sub>1</sub> 結合反応は *b*MF<sub>1</sub> の ATP 開裂待ち状態で起きることが示唆された。ここでは少し幅をもたせて-40°から次の ATP 結合待ち状態の間に IF<sub>1</sub> が結合するとする。上記の *b*MF<sub>1</sub> の反応スキームをもとにすれば、IF<sub>1</sub> 結合位置は-40°から 0°の間の位置であると説明するのが自然である。また第 4 章の議論から、IF<sub>1</sub> による最終阻害角度は ATP 開裂角度(80°)か、それより 10°だけ反時計回り方向にずれた位置(90°)であった。これも *b*MF<sub>1</sub> の反応スキームと合わせて考えると、IF<sub>1</sub> の阻害角度は 200~210°であることが示される結果である。

以上の議論をまとめると、結晶構造解析だけではなく、本研究の第 2 章から第 4 章で得られた結果も、IF<sub>1</sub> の解離には 200°程度の回転が必要だとすることを意味している。この結果は 1 分子操作実験から得られた結果(図 4-9)と矛盾しない。すなわち、1 分子レベルの回転からも 200°以上の強制回転によって IF<sub>1</sub> 解離が急激に促進されることが主張された。しかし、今回の結果だけでは正確な IF<sub>1</sub> 解離角度については分からない。図 4-9 の実験でさらに幅広い拘束時間で実験を行うことで反応角度ごとの回転再開割合が算出できる。この結果から IF<sub>1</sub> 解離の反応速度定数を求めてその拘束角度依存性を調べる必要があるであろう。

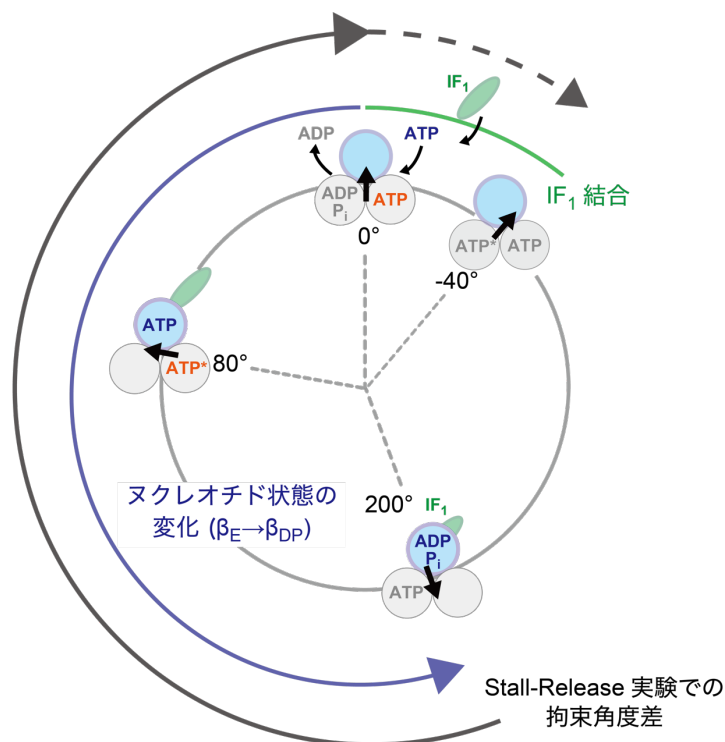


図 4-12 IF<sub>1</sub> 解離のメカニズム

図中の円は触媒サブユニット  $\beta$  を表し、3 つの  $\beta$  に囲まれた矢印は  $\gamma$  の回転角度、緑色の楕円は IF<sub>1</sub> を表す。図中央のスキームは  $bMF_1$  の回転触媒スキーム(図 2-24)の中から必要な要素だけを抜き出したものである。青の  $\beta$  で ATP が結合する角度を 0°として定義した。スキームの外側の緑線は IF<sub>1</sub> 結合角度と想定される領域(-40°~0°)を表している。結晶構造解析では IF<sub>1</sub> は  $\beta_E$  に結合すると提案されているが、第 3 章の結果(図 3-7(C))を考慮して幅をもたせてある。青線はあるひとつの  $\beta$ (青)のヌクレオチド状態が空( $\beta_E$ )から加水分解完了状態( $\beta_{DP}$ )になるのに必要な角度差(0°~200°)を表している。なお、オレンジの ATP が最初に、青の ATP が 2 番目に加水分解されると考えられる。以上を考慮すると時計回り 200°程度の回転で IF<sub>1</sub> が解離することがわかる。さらにその外側の黒線は Stall-Release 実験で定義した拘束角度差を表している。

## 第5章 本研究の総括

本研究ではウシミトコンドリア由来  $F_1(bMF_1)$  を研究対象として、その基本的な回転特性と制御タンパク質  $IF_1$  の阻害状態の解析を行った。

第2章では、 $bMF_1$  の回転触媒機構を解明するため、 $bMF_1$  の回転を1分子レベルで解析して、得られた反応スキームと結晶構造と比較した。回転停止点の詳細解析のために、基質アナログである  $ATP\gamma S$  と変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  を用いた。両条件で、 $bMF_1$  は3種類の異なる停止状態を示した。すなわち、基質結合待ち状態(*binding dwell*)と *long dwell* と *short dwell* である。基質飽和条件では *long dwell* と *short dwell* の2つの回転停止点が観察された。以前の  $TF_1$  の回転解析から、 $ATP\gamma S$  と変異体  $bMF_1(\beta E188D)$  はともに ATP 開裂反応の反応速度を低下させると考えられるため、より長い反応時定数を持つ *long dwell* が ATP 開裂待ち状態であると特定した。一方、すでに解明されている他の  $F_1$  の回転触媒機構を参考にとると、*short dwell* はリン酸解離待ち状態であると考えられる。基質結合待ち状態からみて、*long dwell* (ATP 開裂待ち状態)は $+80^\circ$ の位置に、*short dwell* (リン酸解離待ち状態)は $+10-20^\circ$ の位置にあることがわかった。以上の結果より、 $bMF_1$  の回転触媒スキームを決定した(図 2-24)。また、ATP 開裂待ち状態で回転を停止させる ATP アナログである AMP-PNP を用いて回転停止点を調べると、それは *long dwell* の角度位置と一致した。AMP-PNP は  $bMF_1$  の構造安定化のために結晶構造解析にも用いられている。この結果から、現在までに明らかになっている結晶構造のほとんどは ATP 開裂待ち状態を表していることが明らかになった。しかし、現在までに明らかになっている結晶構造の中には、 $\gamma$  の回転角度のズレは  $30^\circ$  以内であり、*short dwell* に対応する $+50-60^\circ$ ほど大きく回転した構造は現在までには発見されていない。*Short dwell* に対応する反応素過程の厳密な対応づけは今後の課題である。

第3章ではミトコンドリア型 ATP 合成酵素の制御因子である  $IF_1$  の阻害機構を、生化学実験によって解明を試みた。 $IF_1$  が結合した  $bMF_1$  の結晶構造から、 $IF_1$  の阻害機構は以下のような2段階であることが提案されていた。すなわち、 $IF_1$  が  $bMF_1$  の表面付近にゆるく結合したのち、 $bMF_1$  の回転とともに  $bMF_1$  内部に深く突き刺さり回転を阻害するという2段階である。しかしこれを実証した生化学実験などは存在していなかった。今回の実験では幅広い  $IF_1$  濃度、ATP 濃度で実験を行うことで2段階阻害機構の実証に成功した(図 3-5)。反応速度論の考えに基づいて得られたパラメータの ATP 濃度依存性を調べることで、 $IF_1$  阻害を構成する2つの反応を  $bMF_1$  の反応素過程と結びつけた。すなわち、 $IF_1$  が  $bMF_1$  に結合する過程では明確な ATP 濃度依存性が観察されたことから、 $IF_1$  は  $bMF_1$  の ATP 開裂待ち状態と選択的に結合することが示唆された。一方、 $bMF_1$  に結合した  $IF_1$  が深く内部に突き刺さり反応を完全に阻害する過程では ATP 濃度依存性が観察されなかったことから、この過程は  $bMF_1$  の回転に依存しない、すなわち、 $IF_1$  の N 末端のフォールディングが支配しているのではないかと考えられた。さらに本実験では  $IF_1$  阻害に重要だと考えられる2つの残基 Glu30 と Tyr33 の変異体を作成し、その役割を明確にした。その結果、Glu30 は  $IF_1$  結合後の



異性化過程に作用していること、Tyr33 は  $\text{IF}_1$  の結合過程に影響を与えて  $b\text{MF}_1$  と結合するのに重要な残基であることが示された。

$\text{IF}_1$  阻害状態をさらに解析するため、第 4 章では  $b\text{MF}_1$  の 1 分子回転観察系に  $\text{IF}_1$  を導入して、 $b\text{MF}_1$  の回転/停止という観点から  $\text{IF}_1$  阻害状態を観察した。まず  $\text{IF}_1$  の基本的な性質を解明するために、 $b\text{MF}_1$  の回転が停止する停止位置を解析した。その結果、 $\text{IF}_1$  阻害位置は ATP 開裂待ち状態の角度位置とほぼ一致した。同時に今回の実験を通して、 $\text{IF}_1$  は  $b\text{MF}_1$  の回転を完全に停止させ、外部操作なしでは自発的に回転再開しないことがわかった。 $\text{IF}_1$  の解離条件を探索するため、磁気ピンセットと呼ばれる外部磁場制御システムを用いて  $\text{IF}_1$  阻害  $b\text{MF}_1$  の操作を行った。その結果、ATP/ADP/ $\text{P}_i$  の混合溶液の中で時計回り方向に回転させた条件でのみ、 $b\text{MF}_1$  の回転が再開することがわかった。これはすなわち、 $\text{F}_1$  が ATP 合成反応を行える場合のみ、 $\text{IF}_1$  が解離して  $b\text{MF}_1$  粒子は回転を再開することができると考えられる。生体内では  $\text{F}_1$  はプロトン透過路を持つ  $\text{F}_0$  と協働して ATP を合成していることを考えると、以下のような  $\text{IF}_1$  解離機構が考えられる。プロトン駆動力が小さく  $\text{F}_1$  部分で ATP を加水分解しようとするのを防ぐのが  $\text{IF}_1$  の役割である。 $\text{IF}_1$  が ATP 合成酵素の機能を停止している間に十分なプロトン濃度勾配が担保されると、 $\text{F}_0$  は ATP を合成する方向に回転できるようになる。その動きは共通の回転子  $\gamma$  などを通して  $\text{F}_1$  部分に伝わる。よって、 $\text{IF}_1$  が不要になるくらい膜の内外にプロトン濃度勾配が発生すると、 $\text{F}_1$  部分に突き刺さった  $\text{IF}_1$  が解離できる、という機構が考えられる。以上のように本章では、 $b\text{MF}_1$  の 1 分子回転観察技術に 1 分子操作技術を組み合わせることで、 $\text{IF}_1$  の解離機構に新たな知見を与えた。

$\text{IF}_1$  研究の今後の展望としては、2 段階阻害機構のさらなる実証である。本論文では反応速度論をもとにして  $\text{IF}_1$  の 2 段階阻害機構の実証を試みた。さらに直接的な証明方法は、それらを実際に可視化してしまうことである。 $\text{IF}_1$  を蛍光分子でラベルすることで  $\text{IF}_1$  分子を直接観察できる。それと、 $b\text{MF}_1$  の回転運動を同時に観察すれば、 $\text{IF}_1$  の結合/解離と  $b\text{MF}_1$  の回転状態を結びつけて解析を行うことができる。またこの系に磁気ピンセットを組み合わせれば、磁気ピンセット操作中に  $\text{IF}_1$  が解離する瞬間をイメージングできる可能性がある。回転と蛍光の同時計測系の構築によって  $\text{IF}_1$  阻害状態はさらに明確になるだろう。

本研究で明らかになった  $b\text{MF}_1$  の回転触媒機構と結晶構造解析との比較は、タンパク質科学に必要とされる機能と構造の対応付けを推し進めた研究として重要な意義を持つ。これはすなわち、目的とする機能を持つ触媒や分子モーターを自作できるという将来像を描くことができる。また、 $\text{IF}_1$  の詳細解析は私たち人間の代謝機能の向上につながる可能性がある。本研究が対象とした ATP 合成酵素は体内の ATP の 90%以上を合成する触媒である。近年、代謝に異常をきたす生活習慣病などの病気が増えており、基本的な代謝活動である ATP 合成・分解を司る ATP 合成酵素は薬剤のターゲットとして注目されている。 $\text{IF}_1$  のように ATP 合成酵素の機能を自在に調整できる小分子の開発は活性調節機構解明の手がかりとなると考えられる。

## 第6章 実験手法

### 6.1 遺伝子変異導入

当研究室の上野助教によって作成されたプラスミド DNA(*b*MF<sub>1</sub>(WT)、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet)をベースに、*b*MF<sub>1</sub> 変異体として *b*MF<sub>1</sub>(βE188D)、IF<sub>1</sub> 変異体として IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> (mScarlet なし)、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(E30A)、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(Y33A)の計 4 種類の変異体を作製した。いずれも鋳型 DNA に対し変異を導入したプライマーを用意し、PCR 反応で増幅させたものをインサートとして精製した。その後、精製したインサートと鋳型 DNA を同一の制限酵素サイトで切断し、ligation 反応によって組み合わせることで変異導入プラスミドを作成した。以下では、IF<sub>1</sub> 変異体(IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(E30A)、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(Y33A))を作成したときの具体的な操作について述べる。

#### 6.1.1 培地・buffer 調製

##### (1) 50×TAE buffer (アガロースゲル電気泳動用 buffer)

試薬・溶液	使用量	終濃度
Tris	242 g	2 M
酢酸	57.1 mL	1 M
500 mM EDTA (pH8.0)	100 mL	50 mM

MilliQ で 1 L にメスアップ

実際に使用するときには 1 倍の濃度になるように希釈する必要がある。共用のストックから使用した。

##### (2) 1×TE buffer

試薬・溶液	使用量	終濃度
1 M Tris-HCl	5 mL	10 mM
500 mM EDTA (pH8.0)	100 mL	50 mM

MilliQ で 500 mL にメスアップ

##### (3) LB 培地(200 mL)

試薬・溶液	使用量
Bacto Tryptone	2 g
Bacto Yeast Extract	1 g
NaCl	2 g

MilliQ で 200 mL にメスアップ

オートクレーブ後は常温で保存し、使用する直前に抗生物質を加えた。寒天プレートを作る際には、寒天(agar)を 3 g / 200 mL の割合で加えた。オートクレーブ時に攪拌子を一緒に入れておくと、素早く冷ますことができる。冷めたのを確認した後に抗生物質を加える。

## 6.1.2 遺伝子操作

### 1. PCR 反応

設計されたプライマーを用いて PCR 反応を行い、インサート部の作成を行った。Forward/Reverse プライマーは FASMAC に外注合成したものを使用した。なお、PCR 反応は、94°C 2 分→(98°C 10 秒→68°C 29 秒)×30 サイクル→4°C で行った。ここでは Template DNA(197.3 ng/μL)を滅菌水で 1 μL : 9 μL で希釈したものを用いた。また、切り出されるインサートの大きさ(968 bp)から Extension 時間 29 秒と計算した。以下に用いるものの中で、PCR 用の酵素(KOD Plus NEO DNA polymerase) 以外は常温で放置しても構わない。酵素以外のものをすべて PCR チューブに入れたあと、-30°C 冷凍庫から酵素を取り出す。規定量入れてスピンドウンしたのち、ピペッティングで攪拌する。PCR 操作までは氷上で冷やしておく。

#### [PCR 溶液組成]

試薬・溶液	使用量
滅菌水	33 μL
PCR Buffer(10×KOD)	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL
10 pmol/μL プライマー(Forward、Reverse)	各 1 μL
Template DNA (IF <sub>1</sub> -mScarlet, 197.3 ng/μL ×1/10)	1 μL
KOD Plus NEO DNA polymerase(東洋紡)	1 μL
Total 50 μL	

### 2. アガロース電気泳動(インサートの確認)

得られた PCR 産物に変異が導入されているか確かめた。

- 2-1 PCR 反応を行っている間にアガロースゲルを作成しておく。今回は 1.2%のゲルを作成する(分離範囲 : 2000~6000 bp)。三角フラスコにアガロース粉末(STAE Agarose Powdered 100 g) 0.6 g と 1×TAE buffer 50 mL を入れ、軽くラップをしてから電子レンジで加熱をする。加熱は長めに行い、溶け残りが無いことを丁寧に確認する。よく混合し、溶液が固まらないうちに専用の型に入れてゲルを固める。なお、アガロースタブレット MIDORI GREEN ADVANCE Agarose Tablets(Genetics)を用いても良い。この場合は染色用のみどりグリーン(下記参照)が含まれているため、後から添加する必要はない。
- 2-2 得られた PCR 産物に 6×Loading buffer を入れる。アガロースの粉末からゲルを作成した場合には、ここにさらに染色用のみどりグリーン Direct を添加する。PCR 産物:みどりグリーン=20 μL : 1 μL の比率で混合するとちょうどよい。サンプルはゲル作成のときに作ったサンプル導入口のサイズに合わせて 100 μL 入れた。マーカーは 100 bp と 500 bp とした。ともにみどりグリーンを 1:10(2:10)の割合で混合しておく。アガロース

ゲルのレーンに各 10  $\mu$ L ずつ添加した。

- 2-3 作成したアガロースゲルを電気泳動層にセットし、反応溶液と DNA マーカーを流し、100 V で 35 分泳動を行った。
- 2-4 バンドが薄い場合は SYBR Safe (0.1%) 溶液に 30 分ほどつけて DNA の後染めを行う。
- 2-5 バンドが確認できたらカッターナイフを用いて泳動後のゲルを切り出し、目的の DNA 断片を得る。アガロースの量が多すぎると、次に行う濃度定量の精度が落ちるため気をつける。なお、使用するカッターナイフは使用前に水で洗いよくふいておくこと。

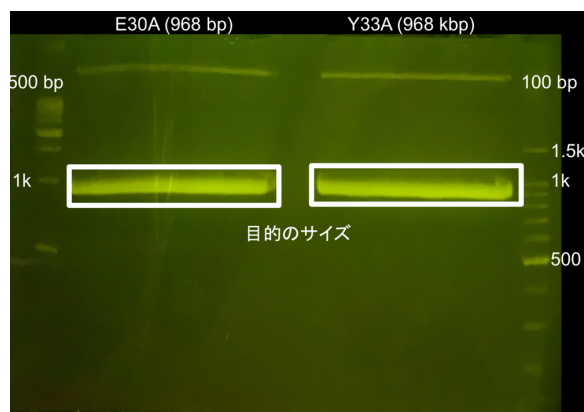


図 6-1 PCR 反応後のアガロース電気泳動の結果

### 3. インサートの精製

得られたゲルを FastGene™ Gel and PCR Extraction kit (NIPPON Genetics)を用いて DNA のゲル抽出を行う。

- 3-1 マイクロチューブに切り出したゲル(~300 mg)に、GP1 Buffer を 500  $\mu$ L 程度入れボルテックスをする。さらに 55°C で約 10~15 分加熱しゲルを完全に溶かす。ゲルが溶けきらない場合は加熱時間を延ばす。
- 3-2 メンブレンに DNA を結合させる。専用のチューブセットに溶かしたゲル溶液を入れ、13,000 rpm で 30 秒遠心する。
- 3-3 メンブレンの洗浄のため、カラムに GP2 buffer 600  $\mu$ L を入れ 13,000 rpm で 30 秒遠心する。
- 3-4 カラムの洗浄が終了したら、カラムを乾かすため上のふたをあけずに 13000 rpm で 5 分遠心する。もしくは、ふたをあけずに 5 分間遠心してエタノールを飛ばす。
- 3-5 最後にカラムに結合した DNA を溶出する。GP3 buffer 20~30  $\mu$ L が膜全体にかかるようにする。13000 rpm で 2 分遠心する操作を 2 度繰り返す。
- 3-6 NanoDrop 2000c(Thermo Fisher Scientific)による濃度定量を行う。今回の精製では 165.8 ng/ $\mu$ L (E30A)、189.8 ng/ $\mu$ L (Y33A)得られた。

### 4. 制限酵素による切断

作成したインサートとベクター(IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>-mScarlet)に対して、2種類の制限酵素(AlwNI と Pml I)による切断を行う。以下に今回用いた溶液組成の例を示す。必要に応じて滅菌水を用い、量を調整する。混合した溶液は 37°C で 1 時間以上放置しておく。制限酵素の unit 数(1 µg の DNA を 1 時間で完全に切断できる量)や緩衝液による酵素活性の変化に気をつけて制限酵素を選ぶと良い。今回用いたのは Cut Smart である。なお、希釈の進み具合を考えて、最初に滅菌水+buffer を入れてから、DNA+酵素を入れるという手順で行なった。

[インサート]

● E30A 変異体

試薬・溶液	使用量
165.8 ng/µL DNA	6 µL (= 1 µg)
AlwNI (5' side)	2 µL
Pml I (3' side)	1 µL
CutSmart	4 µL
滅菌水	27 µL
合計 40 µL	

● Y33A 変異体

試薬・溶液	使用量
189.8 ng/µL DNA	6 µL (= 1 µg)
AlwNI (5' side)	2 µL
Pml I (3' side)	1 µL
CutSmart	4 µL
滅菌水	27 µL
合計 40 µL	

[ベクター]

試薬・溶液	使用量
197.3 ng/µL DNA (IF <sub>1</sub> -mScarlet)	11 µL (=2 µg)
AlwNI (5' side)	2 µL
Pml I (3' side)	1 µL
CutSmart	4 µL
滅菌水	22 µL
合計 40 µL	

5. アガロース電気泳動(インサートとベクターの切断を確認)

基本的な工程は2と同じである。ゲル濃度は2% (インサート)、1% (ベクター)とした。また、DNA マーカーについても以下のように分けて用意した。これらのサンプルにも6×loading buffer やみどりグリーンを入れることを忘れないこと。

- インサート用ゲル(2%) : Agarose 0.5 g in 25 mL TAE
- ベクター用ゲル(1%) : Agarose 0.25 g in 25 mL TAE
- インサートのサイズ: PCR 時に 968 bp が制限酵素処理で 867 bp → マーカー 200 bp
- ベクターのサイズ: 3.75 kbp が制限酵素処理で 2.86 kbp → マーカーは 500 & 1k bp

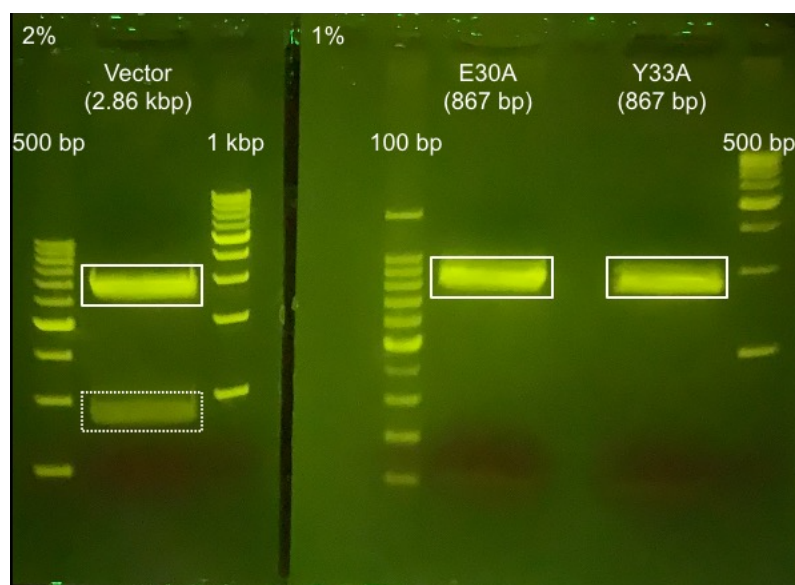


図 6-2 制限酵素処理後のアガロース電気泳動の結果

ベクター側の白点線で囲まれたバンドは、制限酵素で処理された短い方の断片のサイズと一致している。

#### 6. インサート部とベクター部の精製

基本的な工程は3と同じである。今回の操作では以下のような結果が得られた。

- インサート: (E30A) 15.0 ng/μL、(Y33A) 11.6 ng/μL
- ベクター: 23.9 ng/μL

#### 7. Ligation 反応

精製した DNA 断片を、インサート:ベクター = 6:1(モル比)となるように混合する。このとき、ベクターの量が 50~150 ng 程度になるように調整する。さらに、2×ligation buffer をインサートとベクターの体積の和と同量入れる。その後、16°C で 30 分インキュベートする。計算式は以下の通りである。

$$Insert : Vector = 6 : 1 = \frac{x}{867 (bp)} : \frac{50 \sim 150 (ng)}{2860 (bp)}, x = 90 \sim 270 (ng)$$

ベクター部を 2.5 μL = 60 ng としたとき、 $x = 109$  ng と計算できるので、

(E30A) インサート 7.3  $\mu$ L + ベクター 2.5  $\mu$ L + Ligation mix 9.8  $\mu$ L = 19.6  $\mu$ L

(Y33A) インサート 9.4  $\mu$ L + ベクター 2.5  $\mu$ L + Ligation mix 11.9  $\mu$ L = 23.8  $\mu$ L

## 8. トランスフォーメーション

氷上で融解した発現用コンピテントセル(JM109) 80  $\mu$ L に、7で作成した ligation 溶液を加え、ピペッティングで攪拌する。氷上で 30 分インキュベートしたあと、42°C の恒温槽で 45 秒ヒートショックを行う。再度氷上に戻し 3 分インキュベートする。その溶液を LB 寒天培地(抗生物質はアンピシリン)に均一に塗布し、37°C で 12~16 時間程度放置した。なお、JM109 の場合は効率よくトランスフォーメーションできるのでインキュベーション時間やヒートショックについては改良の余地がある。プレートを複数枚用意して塗布するサンプルの量を変えておけば、適切な数のコロニーが発生したプレートが準備できる。

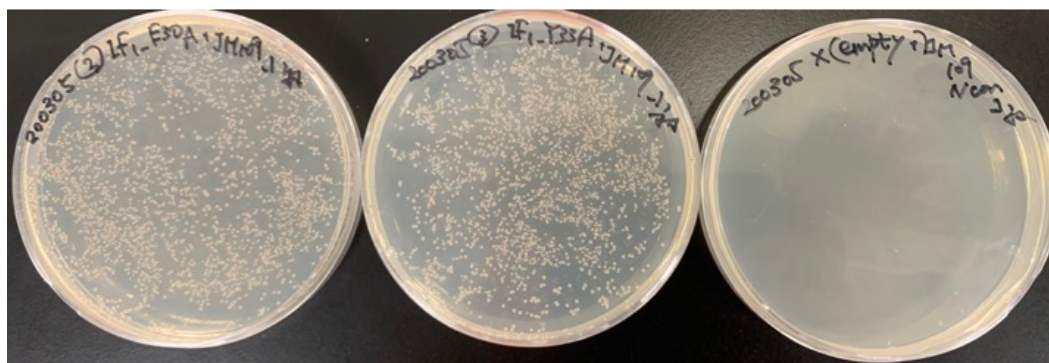


図 6-3 JM109 へのトランスフォーメーション後の寒天プレート  
左から E30A、Y33A、JM109 のみを塗布したコントロール用プレートを表している。

## 9. DNA のミニプレップ

今回は FastGene<sup>TM</sup> Plasmid mini kit (NIPPON Genetics)を用いてミニプレップを行った。

- 9-1 出来たコロニーをつついてカルベニシリンを入れた LB 培地 10~20 mL に入れて 37°C、200 rpm 程度で培養する。
- 9-2 数時間後、培養液がにごっているのを確認したあと、マイクロチューブに移し替えて 13,000 rpm で 2 分間遠心をする。
- 9-3 上清を取り除いて沈殿だけにしたあと、mP1 buffer を 400  $\mu$ L 加えよく懸濁する。
- 9-4 mP2 buffer を 400  $\mu$ L 加えたあと、転倒攪拌し室温で 5 分放置する。
- 9-5 mP3 buffer を 600  $\mu$ L 加え、転倒攪拌し室温で 5 分放置する。
- 9-6 この溶液を 13000 rpm で 3 分間遠心する。
- 9-7 上清を専用のカラムに入れ、13000 rpm で 1 分間遠心する。
- 9-8 mP4 buffer を 400  $\mu$ L 加え、13000 rpm で 1 分間遠心する。
- 9-9 さらに、mP5 buffer を 600  $\mu$ L 加え、13000 rpm で 1 分間遠心する。
- 9-10 メンブレンを乾かすため、ふたを開けたまま 13000 rpm で 2 分遠心する。



9-11 最後に mP6 buffer を 20~50  $\mu\text{L}$  加え室温で 2 分放置したのち、13000 rpm で 2 分遠心してプラスミドを溶出する。

9-12 濃度定量を行う。今回は 200~500 ng/ $\mu\text{L}$  のサンプルが得られた。

#### 10. シークエンス解析

得られた DNA が目的産物かどうかを確認するためシークエンス解析を行う。DNA は 300~600 ng 程度含まれるように調整する。溶液量は 14  $\mu\text{L}$  である。以下では E30A の値を例として示している。

[シークエンス解析用溶液組成]

試薬・溶液	使用量
267.0 ng/ $\mu\text{L}$ DNA	2 $\mu\text{L}$ (= 534 ng)
Forward プライマー(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	0.64 $\mu\text{L}$
滅菌水	11.36 $\mu\text{L}$
合計 14 $\mu\text{L}$	

#### 11. タンパク発現用コンピテントセルへのトランスフォーメーション

JM109 へのトランスフォーメーションとは違い、次はタンパク発現用コンピテントセルへのトランスフォーメーションを行う。*b*MF<sub>1</sub> の場合は BL21 $\Delta unc$ 、IF<sub>1</sub> の場合は C43 をそれぞれ用いた。基本的な操作は 8 と同じである。下記に示すのは IF<sub>1</sub>(E30A)、IF<sub>1</sub>(Y33A)を作成したときの寒天プレート例である。15  $\mu\text{L}$  に対し、プラスミド 0.7  $\mu\text{L}$  程度加えただけであるが、それでも十分にコロニーが確認できる。

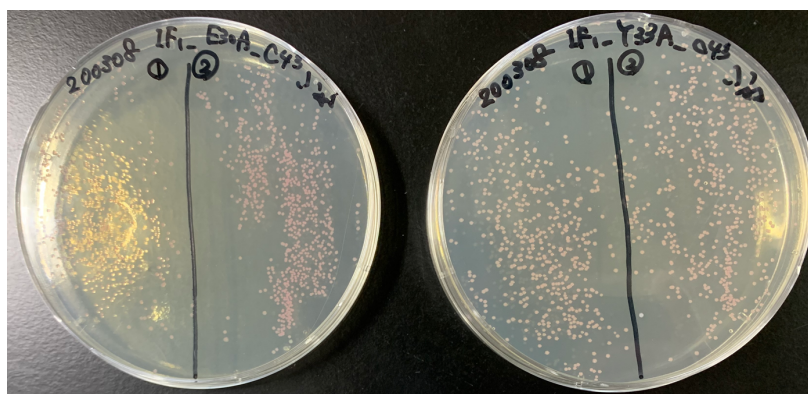


図 6-4 C43 へのトランスフォーメーション後の寒天プレート

左から E30A、Y33A を表す。なお、E30A の左側のコロニーについて、光の都合で透明に見えるが実際は赤色である。



## 6.2 *b*MF<sub>1</sub> の精製

### 6.2.1 培地・buffer 調製

#### (1) SB (Super Broth) 培地 (1 L)

試薬・溶液	使用量
Bacto Tryptone	32 g
Bacto Yeast Extract	20 g
NaCl	5 g
(1M NaOH	5 mL)

MilliQ で 1L にメスアップ

オートクレーブ後、よく冷めたのを確認してから終濃度が 100 µg/mL となるようにカルベニシリンを、終濃度が 25 µg/mL となるようにテトラサイクリンをそれぞれ加えた。なお、NaOH については入れなくてもよい。

#### (2) 2×*b*MF<sub>1</sub> 基本 Buffer (500 mL)：精製 2 回分

試薬・溶液	使用量	終濃度
1 M KP <sub>i</sub> (pH7.5)	20 mL	40 mM
500 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mL	200 mM
Glycerol	100 mL	20%

MilliQ で 500 mL にメスアップ

なお、(3) Wash buffer 1、(4) Wash buffer 2、(5) Elution buffer、(6) ゲル濾過用 buffer には *b*MF<sub>1</sub> の構造を安定化させるために ATP を加えるようにしている。これらについては準備の段階であらかじめ秤量しておき、使用直前に加えること。

本研究では *b*MF<sub>1</sub> の活性測定を ATP 100 nM でも行った。その場合、精製中に含まれる持ち込みの ATP さえ無視できないことになる。例えば、生化学実験には 2 µL の精製 F<sub>1</sub> を 1 mL の活性測定 buffer に添加している。ゲルろ過 buffer に含まれる ATP は 200 µM であるため、その場合の持ち込みの ATP 量は、 $2\ \mu\text{L} \times 200\ \mu\text{M} / 1000\ \mu\text{L} = 400\ \text{nM}$  となる。すなわち、測定条件を超える ATP 量が添加されてしまう。これを避けるため、ATP 低濃度で活性測定を行う場合にはゲルろ過 buffer だけではなく、Wash buffer や Elution buffer も含めたすべての ATP を抜いて精製を行った。ATP の有無によって *b*MF<sub>1</sub> の活性は変わらないことを確認した。HPLC の結果を見ると void に相当するピークが大きくなり、全体として収量が若干低下するが、それほど影響はなさそうである。

(3) Wash buffer 1 (200 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
		40 mM $\text{KPi}$
$2\times b\text{MF}_1$ 基本 Buffer	100 mL	100 mM $\text{K}_2\text{SO}_4$
		10% Glycerol
2 M Imidazole-HCl(pH7.2)	5 mL	50 mM
ATP	22 mg	0.2 mM

MilliQ で 200 mL にメスアップ

(4) Wash buffer 2 (200 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
		40 mM $\text{KPi}$
$2\times b\text{MF}_1$ 基本 Buffer	100 mL	100 mM $\text{K}_2\text{SO}_4$
		10% Glycerol
2 M Imidazole-HCl(pH7.2)	10 mL	100 mM
ATP	22 mg	0.2 mM

MilliQ で 200 mL にメスアップ

(5) Elution buffer (50 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
		40 mM $\text{KPi}$
$2\times b\text{MF}_1$ 基本 Buffer	25 mL	100 mM $\text{K}_2\text{SO}_4$
		10% Glycerol
2 M Imidazole-HCl (pH7.2)	10 mL	400 mM
ATP	5.5 mg	0.2 mM

MilliQ で 50 mL にメスアップ

(6) ゲル濾過用 buffer (500 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
1M Tris-HCl (pH7.5)	20 mL	40 mM
4M NaCl	25 mL	200 mM
0.5 M EDTA (pH8.0)	500 $\mu\text{L}$	0.5 mM
Glycerol	50 mL	10 %
ATP	55.114 mg	0.2 mM

MilliQ で 500 mL にメスアップ

### 6.2.2 SDS-PAGE の準備

SDS-PAGE では移動度は分子量のみに依存する。界面活性剤である SDS によってタンパク質を変性させ、均一に負電荷を帯びた状態にする。同時に還元剤によってタンパク質内のジスルフィド結合が切られるので、完全に変性する。上段の濃縮ゲルによってタンパク質を濃縮し、下段の分離ゲルにおいて分子ふるい効果を利用してタンパク質を分離する。以下でその作成方法を述べる。なお、今回用いた分離ゲルの濃度は 13~20%である。以下では、13%のゲルについて示している。濃度を変えたい場合には 30%アクリルアミドビスと MilliQ の混合割合を変えればよい。

#### 《溶液組成》

##### (1) SDS-PAGE 用分離ゲル(13%)

試薬・溶液	使用量
30% アクリルアミドビス	3 mL
1.5 M Tris-HCl (pH8.8) + SDS	1.8 mL
APS	スパチュラ 約 1/2
TEMED	7 $\mu$ L
MilliQ	2.2 mL

##### (2) SDS-PAGE 用濃縮ゲル

試薬・溶液	使用量
30% アクリルアミドビス	0.5 mL
1.5 M Tris-HCl (pH8.8) + SDS	0.8 mL
APS	スパチュラ 約 1/4
TEMED	3 $\mu$ L
MilliQ	1.7 mL

なお、TEMED を入れるとゲルが固まり始めてしまうため、TEMED はゲル作りの直前に加えること。

##### (3) SDS-PAGE 用 4×サンプルバッファー

試薬・溶液	使用量	終濃度
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 mL	250 mM
Glycerol	2 mL	40%
SDS	0.2 g	4 %
1 M DTT	1 mL	200 mM

MilliQ で 5 mL にメスアップ

なお、還元剤としてはメルカプトエタノールも一般的に使用される。最後にブロモチモールブルーを少量(マイクロピペット用チップの先端につける程度)加えると溶液が青くなる。

#### 《ゲル作成手順》

1. ゲル作り用ガラス板を 1 組用意し、その間にゴムパッキンをはさみクリップで固定する。
2. 上から 1 cm 程度の場所に印をつけておく。
3. TEMED を除いた分離ゲル溶液を調製しておく。TEMED を加えよく混ぜたあと、ガラス板の間に分離ゲル溶液をあらかじめつけておいた印のところまで流し込む。そのあとすぐに 70%エタノールを流し込みふたをする。重合を阻害する酸素が入らないようにするためである。
4. ゲルは 10 分程度で固まる。余った分離ゲル溶液でその固まり具合を確認しておくとい。この間に TEMED を除いた濃縮ゲル溶液を調製しておく。
5. ゲルが固まったら、70%エタノールを完全に取り除く。
6. 次に濃縮ゲル溶液に TEMED を加えよく混ぜたあと、容量いっぱいまで濃縮ゲル溶液を流し込む。そのあとすぐにコームをさす。
7. 濃縮ゲルも 10 分程度で固まる。すぐに使わない場合はクリップを外し、湿らせた紙タオル、ラップなどでくるみ 4℃ で保存する。

### 6.2.3 精製

#### 1. 前培養・本培養

- 1-1 試験管に LB 5~10 mL にカルベニシリンとテトラサイクリンを終濃度がそれぞれ 100  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  となるように入れる。グリセロールストックからつまようじなどで必要量取り、試験管の中に入れる。前培養の培養条件は 37°C、200 rpm とする。
- 1-2 あらかじめ SB 培地 1 L を 3 L のバッフル付き三角フラスコに調製し、オートクレーブしておく。
- 1-3 オートクレーブした SB 培地が冷めたのを確認して、カルベニシリンとテトラサイクリンを入れる。その後、前培養した溶液を入れ、本培養を開始する。本培養の培養条件は 27°C、170 rpm、培養時間は 24 時間程度とする。

#### 2. 集菌・菌体破碎・遠心分離

- 2-1 得られた懸濁液を 1 L の遠沈管に移し、7000 rpm、25°C で 8 分間遠心分離操作をする。
- 2-2 上澄みの培地は捨て、沈殿した菌体を葉さじでコーニングチューブに集める。必要に応じて Wash buffer 1 を加え、再び 7000 rpm で 5 分間遠心を行い、およその菌体量を確認する。野生型の場合、1 L の培地から 5~6 g 程度得られるはずである。なお、集菌のみで終わる場合、ここで液体窒素を使い凍結し-30°C の冷凍庫で保管する。
- 2-3 菌体破碎用 Wash buffer 1 を 20 mL 程度加えて懸濁液を作る。このとき菌体を破碎した時に溶液中に放出されるプロテアーゼの活性を抑えるため、あらかじめプロテアーゼインヒビターカクテル(Complete EDTA-free, Roche)を 1 錠入れておく。
- 2-4 水中で冷やしながら超音波破碎を行い、菌体を破碎する。過度の温度上昇を抑えるため、1 秒 on→1 秒 off のプログラムで行う。まず、3 分の菌体破碎後様子を見ながらさらに 3 分の菌体破碎を行う。*b*MF<sub>1</sub> は低温で分解する性質があるため、氷浴では行っていない(PAGE 用サンプリング)。さらにこの溶液を超遠心用のチューブにうつし、25°C、81000×g、20 分間で超遠心を行い、膜画分を沈殿させる。この上清を回収する(PAGE 用サンプリング)。

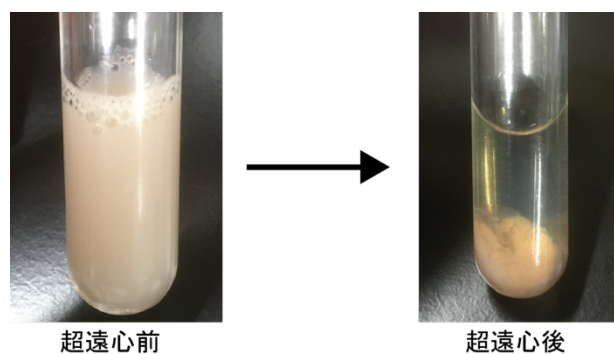


図 6-5 超遠心前後の溶液の違い

### 3. Ni-Sepharose アフィニティクロマトグラフィー

- 3-1 Ni-Sepharose6 FF(GE healthcare) 10 mL をカラムに入れたあと、3 カラム程度(~30 mL)の MilliQ で洗浄後、3 カラム程度の Wash buffer 1 で平衡化しておく。
- 3-2 2-4 で得られた上清を 3 回ほどカラムに流す。3 回目の溶液の一部を FT(フロースルー)画分としてサンプリングする(PAGE 用サンプリング)。
- 3-3 Wash buffer 1 を 150 mL、Wash buffer 2 を 200 mL を順にカラムに流す。これによって約 75 kDa のタンパク質が取り除かれ純度の高い bMF<sub>1</sub> が得られる。
- 3-4 Elution buffer を 5 mL ずつ程度 4 回流していき、順に回収していく(Elution 1~4)。最後に残った Elution buffer をすべて流し(Elution 5)、これも回収する(PAGE 用サンプリング)。Elution buffer の量は菌体量などに合わせて変えるとよい。
- 3-5 ブラッドフォード試薬を準備する。Bio-Rad Protein Assay(BIO-RAD) 20  $\mu$ L に対し、MilliQ を 80  $\mu$ L 入れたチューブを用意する。そこに Elution 1~5 の溶液をそれぞれ 3~10  $\mu$ L 入れ、色の変化を確認する。主に Elution 2~3 の色の変化が確認できる(下図参考)。
- 3-6 回収した溶液に EDTA(pH8.0) と DTT をそれぞれ終濃度 0.5 mM、5 mM となるように加える。
- 3-7 使用した Ni-Sepharose カラムは 1 M imidazole (pH7.2) 50 mL を流した後、100 mL 程度の MilliQ でよく洗い、20 mL の 20 % EtOH を流す。保存の際はカラムが乾燥して枯れないように、1 cm 分ほど 20%EtOH を残してカラムの上下をパラフィルムで巻く。必ず垂直に立てたまま 4°C で保存する。

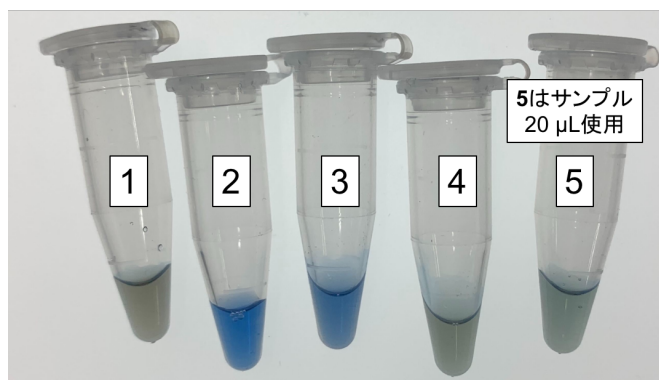


図 6-6 ブラッドフォード溶液の色の違い

ブラッドフォード原液 20  $\mu$ L + MilliQ 80  $\mu$ L に各 Elution 溶液を 10  $\mu$ L ずつ(5 は 20  $\mu$ L) 加えた。

### 4. ゲル濾過 HPLC

- 4-1 ブラッドフォード試薬によって色の変化が確認されたフラクションの溶液をまとめる。Amicon 50Kcut を用いて 5000 $\times$ g で 30 分程度遠心操作し、500  $\mu$ L 以下になるまで濃縮を行う。Amicon 50Kcut はグリセリンなどが付着しているのであらかじめ MilliQ を通しておく。
- 4-2 濃縮した溶液を 0.22  $\mu$ m のフィルターにかける。

- 4-3 サンプルループ内をゲル濾過バッファーで 10 ループ分シリンジを使って洗浄する。今回使用したサンプルループは 1 mL 用である。
- 4-4 ゲル濾過 HPLC を行う。カラム内に空気が入らないように気をつける。今回使用したカラムは Superdex™ 200 Increase 10/300 GL である。流速は 0.50 mL/min、最大圧力は 3 MPa である。
- 4-5 20 分以降に現れるピークが  $bMF_1$  コンプレックスであるので、確認してフラクションを回収する。
- 4-6 回収したサンプルをまとめ、Amicon 30Kcut の限外濾過膜を用いて濃縮を行う。4-1 と同様に Amicon にはあらかじめ MilliQ を通しておく。
- 4-7 HPLC の片付けをする。ゲル濾過カラムは MilliQ、次いで 20% EtOH に置換する。サンプルループは LOAD の状態を確認し、ゲル濾過バッファー、MilliQ の順にそれぞれ 10 loop volume ずつシリンジを使って洗浄する。HPLC の針は MilliQ、20% EtOH、100% EtOH の順にそれぞれ 5 mL ずつで洗浄する。

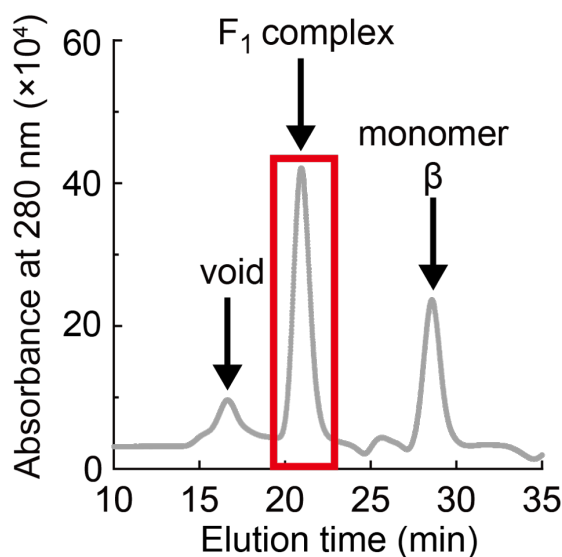


図 6-7 HPLC のピーク(赤で囲んだ領域のみを今後の解析に用いた)

22 分付近の大きなピークが目的タンパク質である。カラムは Superdex 200 Increase 10/300 (GE healthcare)を用いた。

## 5. BCA 法による濃度定量

BCA 法はビウレット反応(Biuret test)によって生じる、タンパク質と銅イオンのキレート錯体による吸収を調べることでタンパク質の濃度定量を行う方法である。検量線としては BSA を用いる。

- 5-1 段階希釈によって BSA 溶液を 5 濃度分 20  $\mu$ L ずつ用意する。さらに 4-4 で得られた  $F_1$  溶液(10 倍程度に希釈)、MilliQ、ゲル濾過用 buffer も各 20  $\mu$ L ずつ用意する。
- 5-2 5-1 で調製した BSA 溶液・タンパク質溶液など各 20  $\mu$ L に、BCA 法で用いられる A 液

と B 液を 2 mL : 40  $\mu$ L (50 : 1 の比率)で混ぜた溶液 180  $\mu$ L 加える。混合によって直ちに反応が開始するため、手早く混合を行う。

- 5-3 溶液を 37°C で 30 分放置し反応を進める。
- 5-4 562 nm での吸収を測定し、検量線からタンパク質濃度[mg/mL]を見積もる。さらに  $bMF_1$  の分子量 375.92 kDa から濃度[ $\mu$ M]を計算する。
- 5-5 生化学実験がしやすいように濃度定量後に濃度を調整してもよい。濃縮済みの  $bMF_1$  サンプルにゲルろ過 buffer を加える。4~5  $\mu$ M 程度にすると使用しやすい。

## 6. ビオチン化

1 分子回転観察を行うためには、 $bMF_1$  に観察できるような大きさのプローブを付ける必要がある。 $bMF_1$  とプローブをビオチンとストレプトアビジンの間の強力な非共有結合によって結びつけるため、 $bMF_1$  をビオチン化する処理を行う。生化学実験にしか使用しないときでもビオチン化を行った。

- 6-1 Biotin-PEAC5-maleimide (Dojindo) 1 mg程度を $bMF_1$ 濃度の400倍になるようにDMSOに溶かす。
- 6-2 モル濃度比で  $bMF_1$ :ビオチン= 1:4になるようビオチンを加える。すなわち、ビオチン溶液を $bMF_1$ の溶液量に対して100分の1加えればよい。この溶液を室温で30分から1時間程度放置しビオチン化を行う。
- 6-3 反応を停止させるため、DTT 溶液を終濃度が 5 mMとなるように加え10分放置する。その後適当に分注して-80°Cで保存する。

## 7. SDS-PAGE 電気泳動

得られたサンプルと HPLC フラクシオンを電気泳動にかけてバンドを確認する。なお、未知試料に対しては、BCA 法による濃度定量の前にこの操作を行う方がよい。

- 7-1 各フラクションに SDS 用のサンプル buffer を混ぜて泳動用サンプルを調製する。ウェルにアプライする量は、(1) ソニケーション後、超遠心後、FT(フローズルー)や HPLC 溶液などは 4 倍程度希釈した溶液を 2~3  $\mu$ L、(2) Ni-Sepharose カラムからの分画溶液については原液を 2~3  $\mu$ L 程度でちょうどよい。Protein Marker(バイオクラフト)についても 2  $\mu$ L 程度使用すれば十分である。
- 7-2 泳動用サンプルを 5 分間 95°C で加熱をする。
- 7-3 泳動を行う。泳動端がゲルの端まできたら終了する。定電流の場合は 30~70 mA、定電圧の場合は 150V 程度で泳動を行うと、およそ 1~1.5h 程度で泳動完了となる。
- 7-4 へらなどを使ってゲル板からゲルを剥がし、プラスチック容器に入れ MilliQ を交換しながら数回すすぐ。SDS が残っていると CBB で染まりにくくなるため、ここで SDS をよく抜いておく。水に浸したまま長時間おくとタンパクが拡散してバンドがスメアになってしまうため手早く行う。



- 7-5 Quick CBB Plus (Wako)と MilliQ を 1 : 1 の割合で入れ、ゲルが軽くひたる程度にし、溶液が少し沸騰するまで電子レンジで加熱する。その後 5 分間震盪、染色する。CBB には固定液が含まれているため、染色すると同時にタンパクの拡散を防ぐことができる。
- 7-6 CBB を除き、キムワイプと多めの MilliQ を入れて、溶液が沸騰するまで電子レンジで加熱する。キムワイプと MilliQ を交換しながらこの操作を繰り返すとバックグラウンドが減ってきれいになる。
- 7-7 よく水を切って、クリアシートの中に入れて保存する。

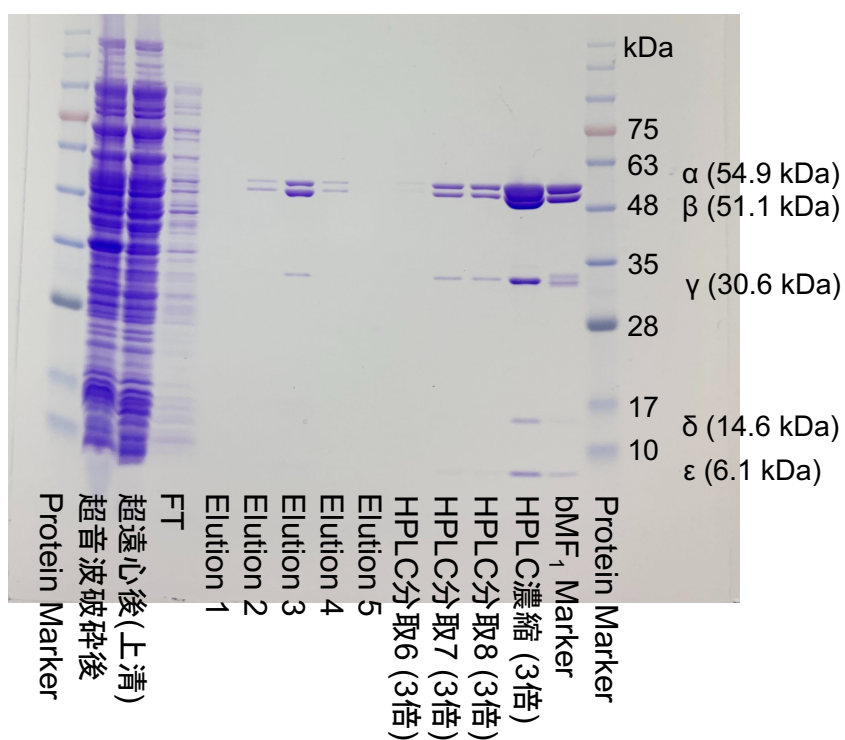


図 6-8 *bMF1*(WT)精製時の SDS-PAGE の結果

## 6.3 IF<sub>1</sub> の精製

### 6.3.1 培地・buffer 調製

#### (1) SB (Super Broth) 培地

オートクレーブ後、よく冷めたのを確認してから終濃度が 100 µg/mL となるようにカルベニシリンを加えた。なお、bMF<sub>1</sub> と比べると IF<sub>1</sub> は発現量も多いため、1L 分の菌体を一度に使用して精製するのは稀である。集菌時に 3~5 g ずつ分けて保存したり、初期の SB 培地の量を減らしたりすべきである。

#### (2) 500 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 溶液

MilliQ に規定量の IPTG を溶かした後、0.22 µm のフィルターをかけて-30°C で保存する。

#### (3) 2×IF<sub>1</sub> 基本 Buffer (500 mL) : 精製 3 回分

試薬・溶液	使用量	終濃度
1 M KPi (pH7.5)	50 mL	100 mM
KCl	14.91 g	400 mM
Glycerol	100 mL	20%
MilliQ で 500 mL にメスアップ		

#### (4) Wash buffer (250 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
2×IF <sub>1</sub> 基本 Buffer	125 mL	50 mM KPi
		200 mM KCl
		10% Glycerol
2 M Imidazole-HCl(pH7.2)	6.25 mL	50 mM
MilliQ で 250 mL にメスアップ		

#### (5) Elution buffer (50 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
2×IF <sub>1</sub> 基本 Buffer	25 mL	50 mM KPi
		200 mM KCl
		10% Glycerol
2 M Imidazole-HCl(pH7.2)	12.5 mL	500 mM
MilliQ で 50 mL にメスアップ		

(6) ゲル濾過用 buffer (500 mL)

試薬・溶液	使用量	終濃度
1M HEPES-KOH (pH7.5)	10 mL	20 mM
KCl	3.73 g	100 mM
Glycerol	50 mL	10%
MilliQ で 500 mL にメスアップ		

(7) TEV 処理用 buffer

試薬・溶液	使用量	終濃度
1M KPi (pH8.0)	400 $\mu$ L	20 mM
4M NaCl	250 $\mu$ L	50 mM
MilliQ で 500 mL にメスアップ		

### 6.3.2 精製

#### 1. 前培養・本培養

- 1-1 試験管に LB 5~10 mL にカルベニシリンを終濃度が 100  $\mu$ g/mL となるように入れる。グリセロールストックからつまようじなどで必要量取り、試験管の中に入れる。前培養の培養条件は 37°C、200 rpm とする。
- 1-2 あらかじめ SB 培地 1 L を 3 L のバッフル付き三角フラスコに調製し、オートクレーブしておく。
- 1-3 オートクレーブした SB 培地が冷めたのを確認して、カルベニシリンを入れる。その後、前培養した溶液を入れ、37°C、170 rpm で本培養を開始する。
- 1-4 3 時間くらい経過して OD が 0.6 くらいになったのを確認した後、終濃度が 1 mM になるように IPTG を加える。温度を 20°C に下げて培養を再開する。培養時間は 24 時間程度が目安である。

#### 2. 集菌・菌体破碎・遠心分離

bMF<sub>1</sub> とは違い、IF<sub>1</sub> は低温(4°C)で精製を行うことに気をつける。

- 2-1 得られた懸濁液を遠沈管に移し、7000 rpm、4°C で 8 分間遠心分離操作をする。
- 2-2 沈殿した菌体を集めて菌体量を測定する。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet の場合、1 L の培地から 20~25 g の菌体得られるはずである。3~5g ぐらいずつ分けて冷凍保存するとよい。液体窒素を使い凍結し-30°C の冷凍庫で保管する。なお、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet を精製する場合、菌体の色も赤くなっているので、この時点で少なくとも mScarlet が発現しているかどうかはわかる。
- 2-3 菌体破碎用 Wash buffer を 20 mL 程度加えて懸濁液を作る。プロテアーゼインヒビター

カクテル(Complete EDTA-free, Roche)を1錠入れるのを忘れない。

- 2-4 氷で冷やしながら超音波破碎を行い、菌体を破碎する。過度の温度上昇を抑えるため、1秒 on→1秒 off のプログラムで行う。まず、3分の菌体破碎後様子を見ながらさらに3分の菌体破碎を行う **PAGE 用サンプリング**。さらにこの溶液を超遠心用のチューブにうつし、4°C、81000×g、20分間で超遠心を行い、膜画分を沈殿させる。この上清を回収する (**PAGE 用サンプリング**)。

### 3. Ni-Sepharose アフィニティクロマトグラフィー (His-tag つきタンパク質の精製)

以下の操作はすべて4°C(クロマトチャンバー)で行った。

- 3-1 Ni-Sepharose6 FF(GE healthcare) 10 mL をカラムに入れたあと、3カラム程度(~30 mL)の MilliQ で洗浄後、3カラム程度の Wash buffer 1 で平衡化しておく。
- 3-2 2-4 で得られた上清を3回ほどカラムに流す。3回目の溶液の一部を FT(フローズルー)画分としてサンプリングする (**PAGE 用サンプリング**)。
- 3-3 Wash buffer 1 を 100 mL をカラムに流す。
- 3-4 Elution buffer を 5 mL ずつ6回流していき、順に回収していく (Elution 1~6、**PAGE 用サンプリング**)。最後に残った Elution buffer はカラムの洗浄のためにすべて流すが、回収はしなくてもよい。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet を精製する場合、サンプルは赤色をしているため、目的タンパク質の有無は溶液の色を見るだけで容易に判断できる。
- 3-5 使用した Ni-Sepharose カラムは bMF<sub>1</sub> のときと同様に imidazole と MilliQ による洗浄を行った後に 20% EtOH を流して 4°C で保存する。

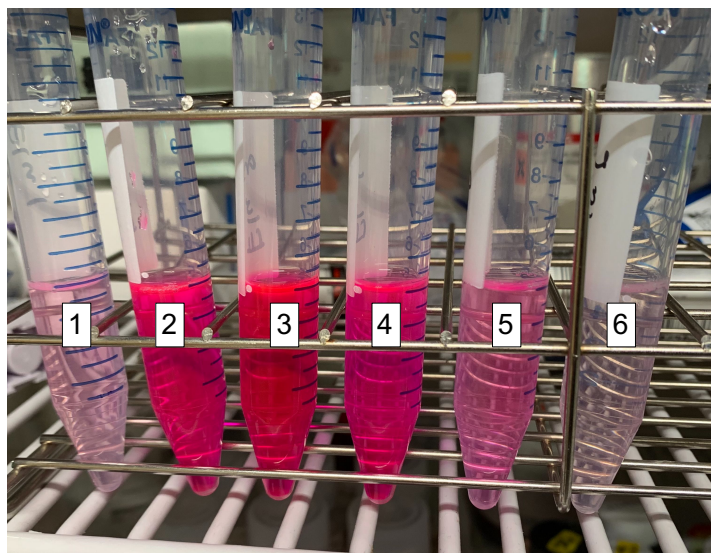


図 6-9 mScarlet つき IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> を精製した場合の Elution 溶液

IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> に融合してある mScarlet による赤色でタンパク質の量を簡易的に見積もることができる。

#### 4. TEV 処理

- 4-1 赤く色づいたフラクションをまとめる。Amicon 10Kcut (IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet とその変異体)、もしくは 3Kcut (IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>)を用いて 4°C、5000×g で遠心操作し、500 μL 以下になるまで濃縮を行う。合計の遠心時間は 3 時間(10K cut)から 5 時間(3K cut)にも及ぶので、早めに遠心操作に入るとよい。
- 4-2 TEV 処理 buffer 10 mL に濃縮サンプル 500 μL、2-mercaptoethanol を 4 μL 加える。ここに 10 mg/ml の TEV protease を 100 μL 加えて TEV による切断反応を開始する。TEV protease は研究室にストックされているものを用いた。溶液は 4°C で保存、反応時間の目安は 16 時間程度である。

#### 5. Ni-sepharose アフィニティクロマトグラフィー (His-tag なしタンパク質の精製)

- 5-1 再び Amicon を用いて 4°C、5000×g で遠心操作し、500 μL 以下になるまで濃縮を行う。この操作も 2 時間以上かかる。
- 5-2 濃縮サンプルに Wash buffer を 15 mL 程度加える。
- 5-3 Wash buffer で平衡化済みの Ni-Sephrose6 FF(GE healthcare)にサンプルを 3 回ほど流してそれらを回収する。TEV 処理によって His-tag が切断されているので、カラムに吸着しないものが求めるサンプルになる。そのため FT 画分の取り扱い等にも気をつけるようにする。
- 5-4 Wash buffer を 5 mL ずつ 4 回に分けてカラムに流してそれらを回収する。
- 5-5 FT 画分と Wash buffer の合計 35 mL の溶液に、終濃度 5 mM になるように DTT 加える。

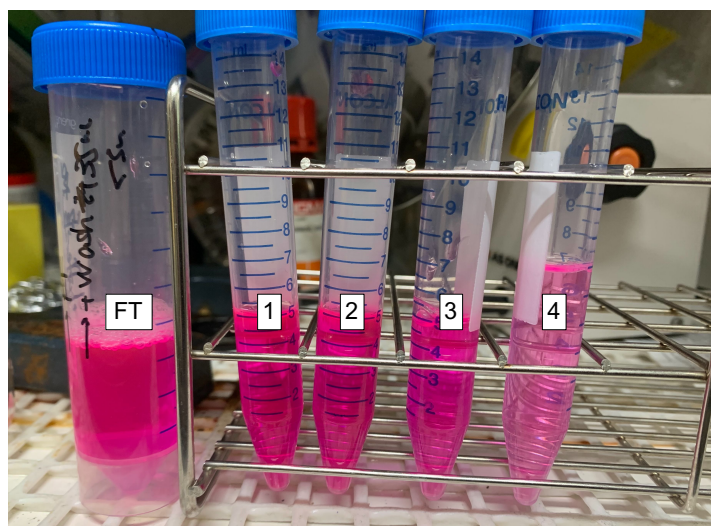


図 6-10 TEV 処理後の Ni-Sephrose アフィニティクロマトグラフィーによる溶出画分  
His-tag が切断されているので IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> は Ni-Sephrose と結合しない。そのため FT や Wash buffer に目的のタンパク質が確認される。

## 6. ゲル濾過 HPLC

- 6-1 Amicon を用いて 4°C、5000×g で遠心操作し、500 μL 以下になるまで濃縮を行う。この操作も 3 時間以上かかる。時間がかかる場合は 4°C にキープしたまま、オーバーナイトで遠心操作を行ってもよい。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> (7 kDa) の場合は特に時間がかかるので注意したい。
- 6-2 濃縮した溶液を 0.22 μm のフィルターにかける。
- 6-3 サンプルループ内をゲル濾過バッファーで洗浄する。
- 6-4 IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet とその変異体の場合には Superdex™ 200 Increase 10/300 GL(Increase でもよい)、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> の場合には Superdex 75 10/300 GL(3~75 kDa)を用いてゲル濾過 HPLC を行う。流速は 0.50 mL/min である。
- 6-5 フラクションを回収する。IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet の場合には色がついているサンプルを回収すればほぼ間違いない。
- 6-6 回収したサンプルをまとめ、必要に応じて Amicon を用いて濃縮を行う。HPLC の片付けも行っておくとよい。

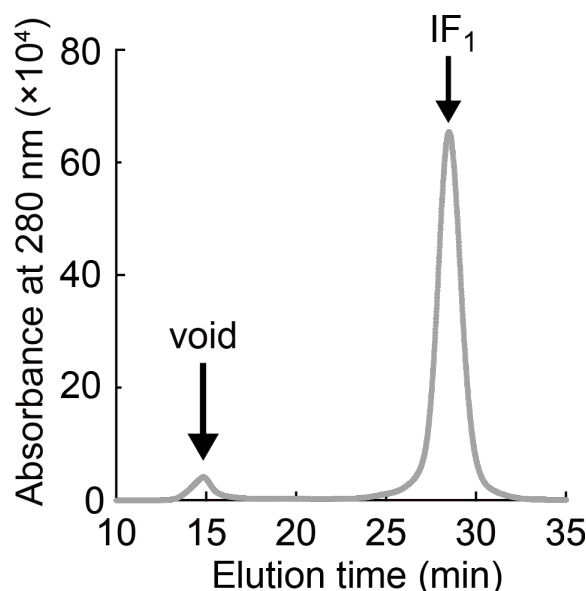


図 6-11 mScarlet 付き IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> を精製した場合の HPLC のスペクトル

28 分付近の大きなピークが目的タンパク質(35 kDa)である。カラムは Superdex 200 (Increase) 10/300 (GE healthcare)を用いた。なお、サンプル量は通常の精製時の 1/50 程度である。

## 7. SDS-PAGE 電気泳動

菌体 5 g 前後から精製を開始すると大過剰量の IF<sub>1</sub> が精製できる。SDS-PAGE 用にサンプリングしておいた溶液にも大量のタンパク質が含まれている。そのため、サンプリングした溶液をそのまま SDS-PAGE にかけてバンドが太くきれいなゲルが得られない。SDS-PAGE を行うときにはサンプルを 5 倍程度希釈してから使用するとよい。



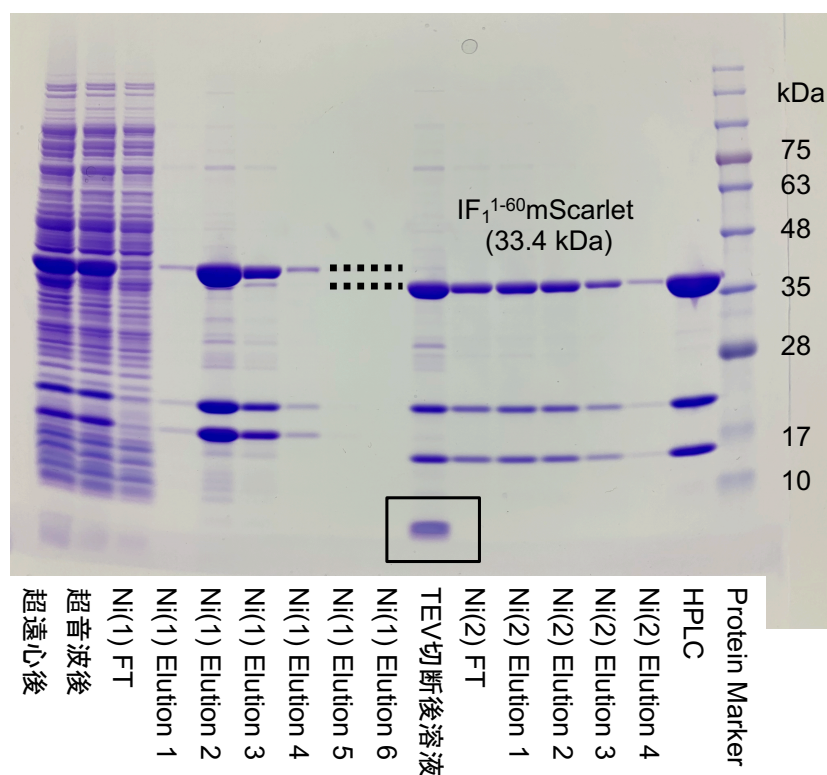


図 6-12 IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(Y33A)精製時の SDS-PAGE の結果

Ni のあとの(1)は His あり IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(Y33A)の溶出(手順 3)、(2)は His なし IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>(Y33A)の溶出(手順 5)の過程を示している。画像中の点線と四角は TEV 処理されたあとの His の切断に基づくバンドで、それぞれ切断された His の分子量の違いと、切断された His の切れ端に相当すると考えられる。mScarlet 付き IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> の分子量は 33.4 kDa だが、SDS-PAGE では少し大きく 37 kDa 付近にバンドが観察される。また、20 kDa と 15 kDa 付近の 2 つのバンドは、SDS-PAGE のサンプル処理過程のひとつである熱処理によって、mScarlet の蛍光団の分裂されたことに由来すると考えられる。

## 8. 濃度定量

分光器を用いて 280 nm の吸光度から IF<sub>1</sub> の濃度を定量する。モル吸光係数は IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet やその変異体の場合は 35,870 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup> の場合は 1,490 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>(いずれも ProtParam tool, ExPASy を用いての計算)である。濃度定量ができれば、10 μL ずつ分注して液体窒素で凍結、-80°C で保存する。

## 6.4 1 分子回転観察

$F_1$  の動きを可視化するためには、 $F_1$  をガラス表面に固定して、 $F_1$  の  $\gamma$  サブユニットにプローブを取り付けることが必要である。6.4.1 ではガラスの準備を、6.4.2 ではプローブの準備方法をそれぞれ説明する。6.4.3 では具体的な実験方法を、6.4.4 では顕微鏡のセットアップについて示す。

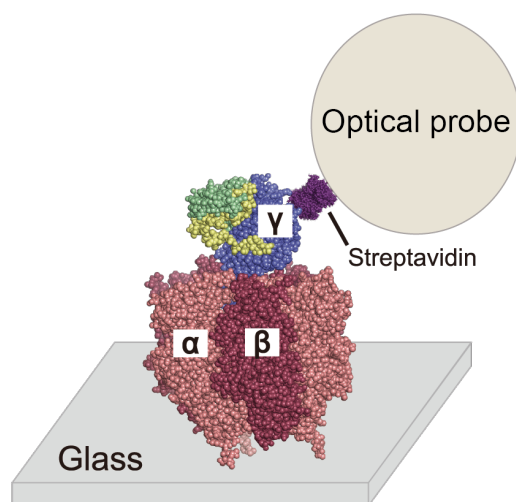


図 6-13 1 分子回転観察実験の模式図(図 2-1 と同じ)

### 6.4.1 ガラスの準備

本研究では 2 種類のガラスを使用した。以下でその準備方法をそれぞれ説明する。

#### (1) Ni-NTA ガラス

$F_1$  のガラスへの固定はサブユニットに発現させたヒスチジンタグ(His-tag)と、ガラス表面に修飾させた Ni-NTA の相互作用によって行う。このガラスはシラン化した後、マレイミド反応で NTA を導入したガラスである。 $Ni^{2+}$  と錯形成させると、NTA は  $Ni^{2+}$  に四配位する。6 配位ある  $Ni^{2+}$  の残りの 2 配位と  $F_1$  の  $\beta$  サブユニットにある His-tag が配位結合することによって、 $F_1$  をガラス表面に固定することができる。

1. 磁性ガラス立てに、24×32 mm ガラス(MATSUNAMI) 12 枚を立て、エタノールにつけて 10 分間ソニケーションする。この操作を 2 回行ったのち、MilliQ で 10 回洗浄する。
2. ガラスを洗浄するため、MilliQ で 20%に希釈したセルオチル液(無リン酸洗浄液、藤原製作所)中で一晩以上保存する。
3. セロチル液から出したガラスは MilliQ で 10 回洗浄してセルオチル液が完全に洗い流されたことを確認する。ガラス表面に水滴が残っていると次に行うシラン化がうまくいかないため、高温(180°C)でよく乾燥させる。30 分から 1 時間程度が目安である。
4. 120 mL のトルエンと 240  $\mu$ L の(3-Mercaptopropyl)-trimethoxysilane(東京化成工業株式会社)を混合させ、0.2%シラン溶液を準備しておく。



5. 乾燥を終えて常温まで冷ましたガラスをシラン溶液に浸し、攪拌しながら 3 時間程度室温で反応させる。この操作はドラフトで行うとよい。
6. シラン化を終えたガラスはエタノール、MilliQ の順番に各 3 回ずつ洗浄する。このとき、ガラス表面が水をよくはじくことを確認する。
7. DTT 0.93 g、1 M  $\text{KPi}$ (pH7.0) 2.4 mL を混合して MilliQ で 120 mL となるようにメスアップした 50 mM DTT 溶液(20 mM  $\text{KPi}$ )を作成する。
8. DTT 溶液の中にガラスを浸し、攪拌しながら 3 時間以上室温で反応させる。
9. DTT 処理を終えたガラスは MilliQ で 10 回洗浄する。そのガラスは MilliQ で保存しておく。なお、この時点でもガラスは疎水性であるため水をよくはじくはずである。
10. Maleimide-C3-NTA (Dojindo) 1~2 mg をマイクロチューブに秤量しておく。これと 200 mM  $\text{KPi}$ (pH7.0)も別に準備しておき、両方ともよく冷やしておく。
11. Maleimide-C3-NTA が入ったマイクロチューブ中に 200 mM  $\text{KPi}$ (pH7.0)を 1 mL 加えよく混合する。なお、Maleimide-C3-NTA の劣化を防ぐため、10~12 の作業は手早く行う。
12. シャーレの中央に 11 で作った混合溶液を 75  $\mu\text{L}$  を垂らし、その上に水気をよく切ったガラスを 1 枚重ねる。このガラスの上に混合溶液を 75  $\mu\text{L}$  を垂らし、その上に水気をよく切ったガラスを 1 枚重ねる。この作業を繰り返し、室温で一晩放置し反応させる。
13. 反応させたガラスは 1 枚ずつ磁性ガラス立てに立て直し、MilliQ で 10 回洗浄する。
14. このガラスは MilliQ 中に保存する。使用する直前に 30 分以上 100 mM  $\text{NiSO}_4$  溶液に浸しておく必要がある。

## (2) シランコートガラス

この方法では  $\beta$  サブユニットに発現させた His-tag とは無関係に、ガラス表面と  $\text{F}_1$  間の静電相互作用によってガラスと  $\text{F}_1$  を固定する。上記 Ni-NTA ガラスの作成方法中でシラン化まで(1~6)の反応を行う。それ以降の作業は行わず反応溶液中(6 の溶液)で保存すればよい。MilliQ 中で保存すると、ガラス表面の疎水性がすぐに失われてしまうので注意すること。

## 6.4.2 プローブの準備

本研究では 2 種類のプローブを実験により使い分けた。主に  $b\text{MF}_1$  本来の回転特性を調べるときは 40 nm の金コロイドを、磁気ピンセットにより回転を制御する場合には磁気ビーズを用いた。以下でその準備方法をそれぞれ説明する。

### (1) 金コロイド

今回用いた金コロイドは主に 40 nm であるが、 $\text{F}_1$  研究では主に 40~80 nm のサイズのものが使用される。これらはとても小さく、 $\text{F}_1$  が生み出すトルクの大きさに比べ粘性抵抗が非常に小さい。そのため、プローブの影響を受けにくく、 $\text{F}_1$  本来の回転が観察できるプローブとして広く利用されている。修飾されていない製品の金コロイドにアビジン修飾を行い、 $\text{F}_1$

の  $\gamma$  サブユニットに結合させる。

なお、以下の 1~5 については使用する金コロイドのサイズによって試薬の量が異なる。金コロイドのサイズによって溶液中に含まれる粒子数が異なるためである。以下では 40~60 nm の金コロイド調製について述べる。

1. 15 mL マイクロチューブに金コロイド(BBI Solutions) 10 mL と 10 % Tween 20 を 200  $\mu$ L を入れ軽く混合したのち、20 分放置する。
2. 1 の溶液に 1 M  $KP_i$  (pH8.0)を 100  $\mu$ L を加えよく混ぜ、10 分間放置する。
3. 別のマイクロチューブに、10% Carboxy-EG6-undecanethiol を 40  $\mu$ L、10% Hydroxy- EG6-undecanethiol を 10  $\mu$ L、1 mg/mL biotin 溶液を 100  $\mu$ L を一緒にいれてよく混ぜておく。
4. 2 と 3 で作成した溶液をよく混ぜ、70°C で一晩放置する。
5. 4 の混合溶液を 5 分間 15000 rpm で遠心する。金コロイドのペレットのみを残して、上澄み液を捨てる。
6. 1 M  $KP_i$  (pH8.0) を 500  $\mu$ L、10 % Tween 20 を 1 mL を MilliQ で 50 mL までメスアップして金コロイド洗浄液を作成する。
7. 5 の溶液に 6 で作成した金コロイド洗浄液を 1 mL を加える。よく混ぜたあと、5 と同じ条件で遠心する。この操作を 6 回繰り返したあと、金コロイド洗浄液を 500  $\mu$ L 入れ再懸濁しておく。
8. 新しいマイクロチューブに、1 mg の streptavidin と 1 mL の MilliQ を入れ、30 分間ゆっくり回して streptavidin を溶かす。
9. 8 に 1 M  $KP_i$  (pH8.0) 10  $\mu$ L と 10 % Tween 20 を 20  $\mu$ L を加えよく混ぜ streptavidin 溶液を調製する。
10. 7 のマイクロチューブに 9 で調製した streptavidin 溶液を 500  $\mu$ L を加え、ゆっくり回しながら一晩放置する。
11. 10 の混合溶液を 5 分遠心し、金コロイドのペレットを残して上澄み液を捨てる。遠心の条件は 5 と同じである。
12. 7 と同様に金コロイドの洗浄操作を繰り返して行う。
13. 最後に残ったペレットに 10 mM  $KP_i$  (pH8.0) を 100  $\mu$ L 加えて完成である。4°C 冷蔵庫内で保存する。
14. 使用する場合には金コロイド溶液 1  $\mu$ L に対し、回転観察用 buffer 100  $\mu$ L で希釈して使う。なお、80 nm 金コロイドは buffer 濃度内の塩濃度が高いと金コロイドが凝集しやすくなるため注意が必要である。

## (2) 磁気ビーズ

製品の磁気ビーズ(GE healthcare)は平均径が 700 nm 程度であり、光学顕微鏡でも十分観察できる。しかし、 $F_1$  の観察には少し大きいので調製後に遠心操作を行い、200~300 nm の

ビーズを使用するようにする。また、製品の磁気ビーズ溶液には F<sub>1</sub> の回転の阻害剤となるアジ化ナトリウムが少量含まれているため、洗浄をする必要がある。

1. 磁気ビーズのストック溶液を、沈殿がなくなるようによく懸濁する。
2. 50 mM HEPES-KOH(pH7.5)と 50 mM KCl を含む磁気ビーズ保存用 buffer を作成する。
3. 1 の溶液 30  $\mu$ L に 2 の磁気ビーズ保存用 buffer 1 mL を加えてよく混ぜる。
4. 3 の溶液が入ったマイクロチューブを磁気スタンドに立ててビーズをトラップし、上澄みを捨てる。この操作は 1 回だけで十分である。
5. 最後に上澄み液を捨てた後、磁気ビーズ保存用 buffer を 100  $\mu$ L 加える。4°C 冷蔵庫内で保存する。
6. 溶液が少なくなっても磁気ビーズ保存用 buffer を加えることで続けて使用できる。ただしこの調製法では保存用のアジドを抜いているため、保存は 2 週間程度が限度であるとされる。また、溶液を使用するたびに F<sub>1</sub> の回転観察にちょうど良い 200-300 nm のビーズが少なくなり、回転粒子の発見が難しくなっていくため注意が必要である。

なお、使用直前に以下の操作を行う。

1. ピペッティングやボルテックス操作などによって磁気ビーズを十分に懸濁させる。
2. 懸濁させた磁気ビーズを 10 秒程度ソニケーションする。
3. 卓上遠心器に 15 秒程度かけて、その上澄みを使用する。チューブ内の上澄み液の色の濃淡を見ながら遠心時間を調節する。

#### 6.4.3 1 分子回転観察の準備

作成したガラスの上にスペーサーとなるカプトンテープをはり、その上にカバーガラスを重ねてのせることによって 1 レーンの体積が約 5  $\mu$ L 程度のチャンバーを作ることができる。毛細管現象を利用して溶液を導入することで観察用サンプルを作成する。

##### 1 分子回転観察用 buffer

試薬・溶液	終濃度
HEPES-KOH (pH7.5)	50 mM
KCl	50 mM
	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	(より高い ATP 濃度の実験の場合は、設定 ATP 濃度から 1~2 mM 多く入れておく)
PK	50 $\mu$ g/mL
PEP	1 mM

なお、ATP $\gamma$ S を用いる実験では PK、PEP を含めず溶液を調製した。ATP 再生により ADP から ATP を産生してしまうため、これらの実験では不適切だからである。

#### 手順

1. ガラスを MilliQ など洗ったあと、エアダスターなどで水滴を取り除く。
2. スペーサー用のカプトンテープをガラスに貼る。
3. カバーガラスを上に乗せ、スライドガラス・スペーサー・カバーガラスを密着させる。
4. 1 レーンの容積が約 5  $\mu\text{L}$  のチャンバーが出来上がる(下参照)。

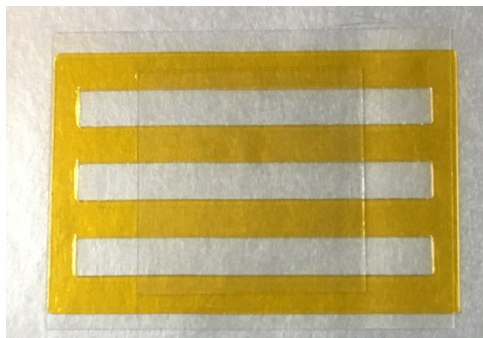


図 6-14 1 分子観察用フローセル

5. 1 分子回転観察用 buffer で 500 pM 程度に希釈した  $F_1$  溶液をチャンバー内に流す。10 分程度放置し、 $F_1$  をガラスに固定させる。 $F_1$  の濃度は使用する  $F_1$  種などによって 200 pM から 10 nM 程度まで濃度を調整する必要がある。
6. 5 の待ち時間で BSA 溶液とプローブ(金コロイド、磁気ビーズ)を準備する。
7. 次に、1 分子回転観察用 buffer 40  $\mu\text{L}$  を流し、ガラス上に吸着しなかった  $F_1$  を洗い流す。このとき、チャンバーの一方から溶液を流し、他方から小さく切ったろ紙などで溶液を吸収させることによって溶液交換ができる。
8. プローブがガラス表面に非特異的に吸着しないように、約 10 mg/mL の BSA 溶液 40  $\mu\text{L}$  をチャンバーに流す。
9. 次にプローブ溶液を流す。(1) 金コロイドの場合には原液を適当に希釈した溶液 40  $\mu\text{L}$  をチャンバーに流す。(2) 磁気ビーズの場合には、卓上遠心器にかけた後、使用直前に行う操作)の上澄み 5~10  $\mu\text{L}$  を流す。いずれも 5~10 分程度放置する。
10. 結合しなかったプローブを取り除くため 1 分子回転観察用 buffer 50  $\mu\text{L}$  を流す。
11. 最後に ATP 溶液 50  $\mu\text{L}$  を流し、回転を観察する。1 枚のガラスで複数のレーンを用いて回転観察を行う場合、最初に使用するレーンにのみ ATP 溶液を添加して回転を観察する。他のレーンは buffer による洗浄(10)の段階で止めておいてもよい。乾燥しないように気をつける必要がある。

#### 6.4.4 顕微鏡セットアップ

観察に用いるプローブの種類によって使用する顕微鏡が異なる。金コロイドを用いる

場合は顕微鏡 OLYMPUS、IX-70 もしくは 71 を、カメラは撮影速度 60~109500 fps の高速カメラ (FASTCAM-1024PCI、Photron) を用いた。磁気ビーズを用いた回転実験では位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX-71) を、撮影したカメラは撮影速度 30 fps の CCD ビデオカメラ (竹中システム機器株式会社) を用いた。ただし、磁気ビーズを用いた回転観察でも停止状態の回転ゆらぎを計測する場合には高速カメラ (2000 fps 程度) で撮影する必要がある。

#### 6.4.5 データ解析と実験方法の詳細

撮影した動画は動画解析ソフト Image J とそのプラグインとして足立らによって作成された Center3 と動画読み込み用 AVI reader などを用いて解析を行った。グラフは KaleidaGraph (ヒューリンクス) によって描き、必要に応じて Adobe Illustrator CS5 を用いて図の融合等の作業を行った。実験を行いながらの簡易的な解析は、鳥谷部らによって開発された F<sub>1</sub> tracker も用いた。以下では第 2 章、第 4 章で行った 1 分子回転観察系の回転解析法について述べる。

##### 6.4.5.1 粒子の選定方法

回転観察中にはさまざまな粒子が存在している。ガラス上に非特異的に吸着した粒子だけではなく、ゆらゆらと小さな振動を繰り返してはいるが回転していないものなど、解析に用いるか非常に悩ましい粒子も多数存在した。今回の論文では、解析の種類に基づいて以下の順で粒子の選択を行った。

まず、回転速度を算出する程度であるならば、(1) 回転中心がはっきりとわかる程度の粒子で良いとした。また、回転停止が明確に判別できる濃度条件であるときは、(2) 角度ヒストグラム上で、明確な停止が確認できることも条件とした。Dwell time の解析を行う場合には条件は厳しくなり、(3) タイムコース上で、各ステップが明確に区別できることが条件となる。この条件にかなう粒子の選択は非常に難しかった。というのも、2.3 で示したような粒子では *long dwell* に対して *short dwell* が非常に短く、停止がスキップされやすいからである。これは島袋らによって発表された *alternative pathway*<sup>123</sup> の考え方に基づくものとされる。

##### 6.4.5.2 回転速度の算出

bMF<sub>1</sub> の回転は磁気ビーズを用いた回転観察では撮影速度 30 fps の CCD ビデオカメラを、金コロイドを用いた回転観察では撮影速度 60~10000 fps の高速カメラを用いて撮影した。その動画を Image J など解析して、回転中心を決定することで累積回転数を計算した。累積回転数は反時計回り (ATP 加水分解) 方向を正とした。粒子のタイムコース (横軸を時間、縦軸を累積回転数とするグラフ) のグラフの傾きをもとに回転速度を算出した。金コロイドを用いる場合にはレーザーを使用する必要があるが、レーザー強度はできる限り低い値で一定として動画を撮影した。

#### 6.4.5.3 温度依存性実験

本論文で言及のない部分は顕微鏡室の室温( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ )で実験を行ったが、後述する 7.1.1 では  $b\text{MF}_1$  の回転速度の温度依存性を調べた。実験は  $17^{\circ}\text{C}$ 、 $23^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $35.5^{\circ}\text{C}$  の 4 つの温度で行った。室温より低い条件( $17^{\circ}\text{C}$ )の実験は冬(2019 年 2 月 1 日~2 日)に行い、窓を開けた上で空調の設定を最低温度( $20^{\circ}\text{C}$ )とし、外気を取り入れるため扇風機を稼働させて実験した。また、室温より高い条件( $30^{\circ}\text{C}$  と  $35.5^{\circ}\text{C}$ )については顕微鏡の対物レンズをヒーター(MATS-75R、東海ヒット)で加熱した。どちらの条件でもサンプルの温度はフローセルに取り付けた熱電対で測定した。温度誤差は設定温度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$  とする。

#### 6.4.5.4 Response time の計測(パワースペクトル解析)の方法と意味

後述する(7.1.2)で述べる Response time の計測では、 $b\text{MF}_1$  が示す停止状態をパワースペクトル解析することで求めた。ATP 結合待ち状態を計測するため、40 nm 金コロイドを用いて ATP 100 nM 条件で回転観察を行った。この条件で観察される少し長めの停止をひとつ抽出してその停止をフーリエ変換すると、時間情報だった粒子のタイムコースを周波数成分に分解することができる。図 7-2 で示すグラフは横軸が周波数、縦軸がパワースペクトルとなっている。このグラフで横軸の大きさは運動がどれくらい速い運動なのか、縦軸の大きさはその運動がどれくらいエネルギーを持っているかを意味していると考えられる。すなわち、ある周波数まではほぼ同じエネルギーを持った運動であるが、それを超えると減衰していく。それをローレンツ関数  $P = C / \{1 + (f/f_c)\}$  でフィッティングすることでカットオフ周波数( $f_c$ )を求めている。なお、一般に観察系のゆらぎ(防振台などのノイズ)は低周波領域に現れることや、電気的なノイズは観察対象としている周波数帯では一定であることを考える(<https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishijima/trap-03.html> 参照)と、今回観察した周波数は  $b\text{MF}_1$  自体が与える揺らぎであると考えられる。

#### 6.4.5.5 ドリフト解析

磁気ビーズを用いての回転観察、特に阻害剤を用いての停止角度を決定する実験(2.5、2.6 と 4.3)では長時間の撮影が必要な上に、粒子の角度位置を正確に決定しなければならない。しかしながら、顕微鏡周辺のわずかな温度変化などにより、粒子がドリフトしているような挙動によって解析が難しい粒子が多数見られた。その場合には、林、渡邊らによって作成された LabVIEW プログラム(National Instruments)を使用してドリフト補正を行なった。ドリフト補正には対象とする回転粒子の他に、ガラス上で非特異的に吸着しているような動きがほとんどない粒子が必要である。撮影時間内での粒子の動きを解析した 2 種類のテキストデータを LabVIEW プログラムにかける。補正後のデータは(回転粒子の挙動)-(非特異吸着粒子の挙動)の引き算を行うことで、回転のみの動きを抽出することができる。

#### 6.4.5.6 Dwell time 解析

粒子が停止位置で示す平均の滞留時間(時定数)を算出するために行ったのが dwell time 解析である。この解析も林、渡邊らによって作成された LabVIEW プログラムをもとに行った。タイムコース中から dwell に相当する部分を抽出してそれらを多数集める。得られたデータによって横軸が時間、縦軸が頻度数のヒストグラム(図 2-8 など参照)を描き、それを指数関数でフィッティングすることで時定数 $\tau$ を得た。フィッティング式については 7.3.2 を参照されたい。なお、本編の解析では 1 次のフィッティングのみを適用した。しかし、各 dwell に含まれる反応素過程が 2 つあると考えられる場合は 2 次でのフィッティングが必要である。今回行った解析では dwell は 1 つの反応素過程に基づくものとして解析を行った。

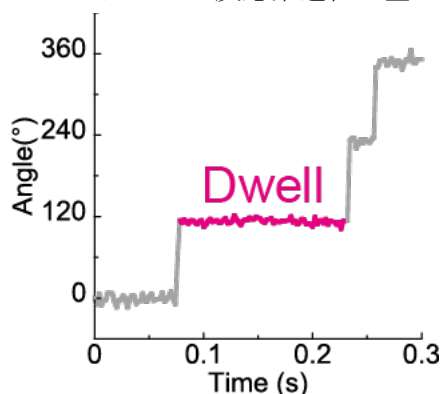


図 6-15 Dwell の一例(図 2-3(C)に加筆したもの)

#### 6.4.5.7 角度差の算出

第 2 章と第 4 章ではさまざまな回転停止点どうしの相対角度差を算出した。本項でその詳細を述べることにする。

基質低濃度条件で観察される ATP 結合待ち状態(*binding dwell*)と ATP 開裂待ち状態(*long dwell/catalytic dwell*)の角度差の算出(図 2-10、図 2-16)は以下のように行った。粒子の動きをテキストデータに起こしたあと、それらから角度ヒストグラムを描いた。この条件では  $360^\circ$  内で合計 6 つのピークが観察されるはずである。それらのピークを 2 つずつ、3 つのグラフにそれぞれ分割した。それぞれ ATP 結合待ち状態に基づくピークと ATP 開裂状態待ちに基づくピークが存在するはずなので、それらのピークを 2 つの正規分布の足し合わせでフィッティングを行った。ここで隣り合う ATP 結合待ち角度どうしの角度差を  $\theta_{bind-bind}$ 、ATP 結合待ち角度から見た次の *long dwell* との角度差を  $\theta_{long-bind}$  と表すことにする。 $\theta_{bind-bind}$  は常に  $120^\circ$  になるわけではなく多少の誤差を含むため、角度差は  $120 \times \theta_{long-bind} / \theta_{bind-bind}$  という比から算出した。

ADP 阻害状態の角度位置(図 2-9、図 2-12)や阻害剤による停止位置(図 2-18、図 2-19、図 4-4)の決定は以下のように角度ヒストグラムをもとに行った。中心を決定して粒子の運動をテキストデータに起こしたものの中で、阻害状態以外の回転状態のトレースを抜き出し、それらでのみ角度ヒストグラムを描いた。ATP $\gamma$ S 低濃度条件(図 2-12)以外では回転運動

は 3 つの対称的なピークとしてのみ現れるはずなので、角度ヒストグラムを 3 つの正規分布の足し合わせでフィッティングして 3 つの角度位置を算出した。ATP $\gamma$ S 低濃度条件の角度ヒストグラムは前段に示したように分割してフィッティングして角度位置を求めた。阻害状態のみを切り出して上記と同様に角度ヒストグラムを描く。これは 1 つの正規分布でフィッティングすれば十分である。ADP 阻害状態の角度位置(図 2-9、図 2-12)の場合は ADP 阻害の角度位置と *long dwell* の角度位置はほぼ重なるため、阻害状態ともっとも近い *long dwell* の角度位置をもとに  $\theta_{inhibition-long}$  を角度差として定義した。本来、上述のように基準となる *long dwell* どうしの角度差( $\theta_{long-long}$ )との比を求めるべきであるが、今回の場合は  $\theta_{inhibition-long}$  が 0 に近いため、比を求めなくても値はほとんど変わらない。また、阻害剤による停止位置(図 2-18、図 2-19、図 4-4)の場合は基準となる ATP 結合待ちとの角度差を求めればよいから、 $120 \times \theta_{inhibition-bind} / \theta_{bind-bind}$  の比をもとに算出した。

最後に、基質飽和濃度条件で観察された *long dwell* と *short dwell* の角度差(図 2-7 と図 2-14)であるが、これは次項で説明する。

#### 6.4.5.8 Change-Point analysis

第 2 章で行った解析の中で、*short dwell* の抽出や *long dwell* からの相対角度決定に用いたのが Change-Point analysis である。これは Chun-Biu Li らによって開発された変化点(Change-Point)検出法である<sup>117</sup>。Change-Point 解析は主に、(1) 変化点の検出、(2) 変化点の位置決定、(3) 不要な変化点の除去(Clean-up process)の 3 つから構成される。それぞれの概略は後述(7.4)することにして、ここでは解析後の *short dwell* の相対角度位置決定の過程について図 2-7 をもとにして簡潔に述べる。この条件では *long dwell* と *short dwell* に相当する合計 6 つの停止箇所があることに注意したい。

Clean-up の後に得られるデータは変化点間の長さとその角度位置の中央値である。前者は時定数と同等であるが、本論文では時定数解析の手段として Change-Point 解析は用いていない。後者は停止位置の平均角度位置を意味しており、本解析ではこちらを使用する。それぞれの停止角度位置や停止時間の長さをもとに、各停止位置を *long dwell* か *short dwell* のどちらに割り当てることができる。ここで隣り合う *long dwell* どうしの角度差を  $\theta_{long-long}$ 、*long dwell* から見た次の *short dwell* との角度差を  $\theta_{short-long}$  と表すことにする(図 7-11)。前項でも述べたように、解析では *long dwell* に相当する停止の間隔が 120°に近いものを選んではいないが、粒子の特性や撮影面の傾きなどにより  $\theta_{long-long}$  はつねに 120°になるわけではない。したがって、*long dwell* から見た *short dwell* の角度位置は  $\theta_{short-long} / \theta_{long-long}$  の比をもとに評価した。また、図 2-7 図 2-15 と図 2-14 で示される誤差は 68%ブートストラップ信頼区間にもとづいて示した。



## 6.5 磁気ピンセットの概要

磁気ピンセットは顕微鏡上にセットした2組の電磁石のことである。PC上ではソフトウェア Celery を用いて磁場を制御した。PCからの制御命令はコントロールボードを経て電源(プログラマブル交流電源、NF回路)に到達する。電源ではPCからの出力電圧を最大100倍程度まで増幅できる。今回はPCからの出力2Vに対して、電源で7.5倍程度の増幅、すなわち15V程度の交流電圧を電磁石に送り込み磁場を発生させるように設定した。これによって生じる磁場の大きさは、顕微鏡のレンズ上(サンプル直上)で40~60G(ガウス)程度だった。

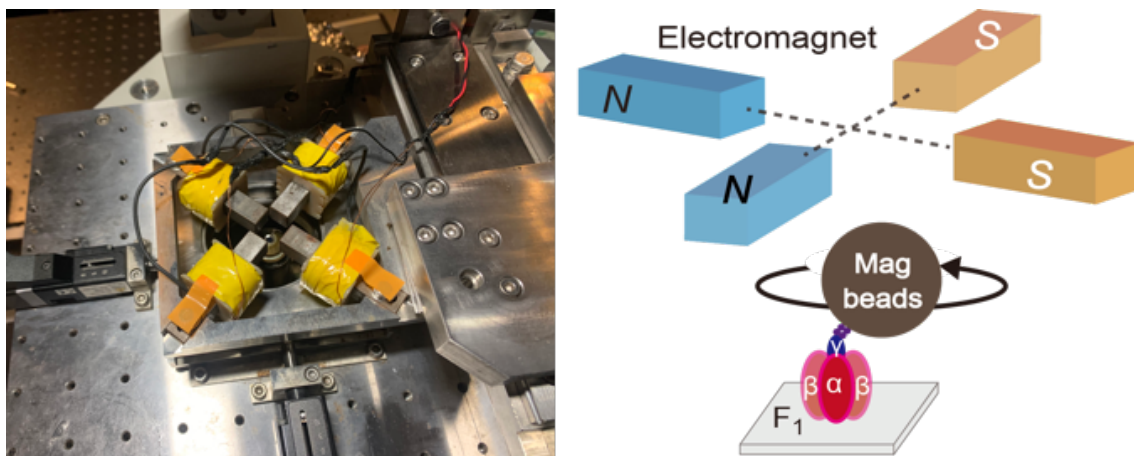


図 6-16 磁気ピンセットの概略図

## 6.6 生化学実験

生化学実験では ATP 再生系を利用して NADH の 340 nm での吸光度変化から  $F_1$  の ATP 加水分解活性を見積れる系を利用した。以下の 6.6.1 では具体的な実験手法、6.6.2 ではデータの解析方法について述べる。

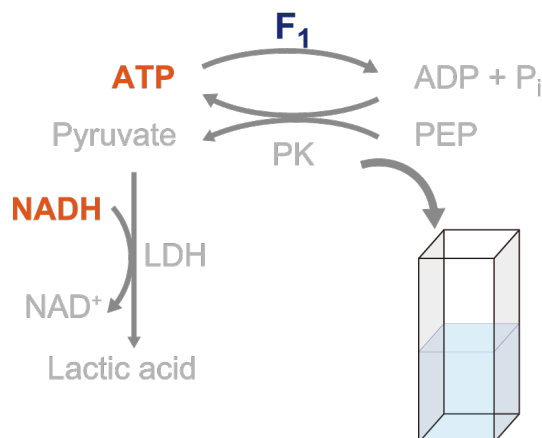


図 6-17  $F_1$  による ATPase 活性測定系(図 3-2 と同じ)

### 6.6.1 実験手順

NADH の 340 nm での吸光度変化を紫外可視赤外分光光度計(V-660、JASCO)によって計測しながら実験を行なった。以下にその詳細を述べる。

吸光度測定用のセルには石英セル、もしくはディスポセル(アズワン)を用いた。測定を開始する前には空のセルを設置してゼロ補正を行うとよい。その後、以下に示す 1000  $\mu$ L 程度の測定 buffer と、溶液攪拌用の攪拌子を入れた。分光光度計の付属品として水冷ペルチェセルホルダー(ETCS-761)を設置して温度を一定に保つようにした。測定は 25°C、攪拌子は 500 rpm で回転させて実験を行った。下記の溶液組成の場合、初期の吸光度の値はおよそ 0.8 程度である。 $F_1$  の加水分解が急速に行われると NADH がすぐに尽きてしまい、吸光度がすぐに 0 付近に到達してしまうことがある。ADP 阻害や  $IF_1$  阻害状態の解析では、吸光度の一連の時間変化が必要であるため、測定途中の NADH 添加は難しい。それを避けるために、測定開始前のセルに buffer だけではなく、NADH をあと入れして吸光度を上げておいてもよい。しかし、今回実験を行なった分光器では測定の線型性が保たれる範囲は吸光度が 2.0 程度までであるので気をつけなければならない。20 mM NADH を 10  $\mu$ L 程度添加すると吸光度が 1.8 程度まで上昇したので、これを基準とした。

この溶液を攪拌しながら測定を行う(図 3-3 参照)。測定の途中に必要な溶液を添加しながら実験する。測定開始後 20 秒程度は溶液には何も加えずベースラインの変化を確認する。セル内に気泡が入っている場合や、攪拌子の回転が一定でない場合はベースラインの振動が大きくなる。これらの場合は、気泡を取り除く、攪拌子を交換するなどしてベースラインが一定になるようにする。測定開始 30 秒ごろに ATP 溶液を添加し再びベースラインの変化

を観察する。ATP 溶液には分解された ADP がわずかながら含まれていることがあり、それによって ATP 再生系が機能するため吸光度が若干低下する。この現象は ATP 高濃度の方が大きな吸光度減少として観察される。ただし、継続的な NADH 量の変化はないため、一旦吸光度減少が観察されたあとは一定の値を示すはずである。再度、吸光度が一定であることを確かめたら、測定開始 60 秒で  $F_1$  を添加する。 $F_1$  による ATP 加水分解反応が開始されるので、継続的な NADH 減少が観察される。吸光度の時間変化の傾きから  $F_1$  の ATP 加水分解速度が算出できる。ATP 加水分解速度の定量(図 2-2)と ADP 阻害状態の解析(図 3-3、図 7-5、図 7-6)の場合には操作は終了である。吸光度が 0 付近に到達した場合は NADH を添加して測定を続けてもよい。基本的には測定開始 600 秒まで観察を続けた。

$IF_1$  の阻害状態の解析(第 3 章)にはさらに実験を継続する。今回の実験では  $F_1$  投入後 180 秒(測定開始 240 秒)の時点で  $IF_1$  を投入した。吸光度が 0 付近まで低下したら、必要に応じて NADH を添加しなければならない。また吸光度変化を安定させるため、NADH の添加から  $IF_1$  添加までは 60 秒以上(通常は 80 秒)あけることに気を付けて実験を行った。

#### 生化学実験用 buffer

試薬・溶液	終濃度
HEPES-KOH (pH7.5)	50 mM
KCl	50 mM
	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	(より高い ATP 濃度の実験の場合は、設定 ATP 濃度から 1-2 mM 多く入れておく)
PK	200 µg/mL
PEP	2.5 mM
LDH	50 µg/mL
NADH	0.2 mM

表 6-1 生化学実験の例

測定開始からの時間	添加するもの	添加量(例)	合計液量
0 sec (測定開始前)	Buffer + NADH	958+ 10 µL	968 µL
30 sec	ATP	10 µL	978 µL
60 sec	$F_1$	2 µL	980 µL
160 sec	NADH	20 µL	1000 µL
240 sec	$IF_1$	10 µL	1010 µL

表 6-2 生化学実験の測定条件

設定項目	設定値
データ取り込み間隔	0.1 sec
UV/Vis バンド幅	2.0 nm
レスポンス	Mediun
測定波長	340 nm
光源切り替え、光源	350 nm、D2/WI
設定温度	25°C
攪拌子の回転速度	500 rpm

### 6.6.2 解析方法

実験データはテキストデータとして保存し、Excel や Python(後述)で解析を行った。以下では、ATPase 活性測定、ADP 阻害、IF<sub>1</sub> 阻害に分けてその解析方法を説明する。

ATPase 活性測定(図 2-2)では、以下の式を用いて NADH の吸光度変化を F<sub>1</sub> の活性に変換した。

$$\text{Turnover (s}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta \text{Abs}_{340} \text{ (s}^{-1}\text{)} \times z \text{ (}\mu\text{l)}}{x \text{ (M)} \times y \text{ (}\mu\text{l)} \times 6220 \text{ (cm}^{-1}\text{ M}^{-1}\text{)} \times 1 \text{ (cm)}} \quad \text{式(6.1)}$$

ここで、 $x$ は投入した F<sub>1</sub> の濃度、 $y$ は F<sub>1</sub> 投入量、 $z$ は総溶液量、 $6220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  は NADH のモル吸光係数、 $1 \text{ cm}$  はセル幅を表す。また、 $\Delta \text{Abs}_{340}$  は 1 秒あたりの吸光度変化である。ATPase 活性測定(図 2-2)では活性の大きさに応じて 5 秒間、もしくは 20 秒間の吸光度変化を算出し、その値が最大となるものを採用した。

ADP 阻害の定量(図 3-3(B))では以下のように解析を行った。まず、上記と同様に測定値の中で最大の傾きを示す領域を選択し、その活性を 100%とおく。それ以外の領域に対しては傾きを計算された最大傾きで割って 100 をかけたものを相対活性(%)として定義し、時間ごとにプロットした。相対活性の減衰は

$$y = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{ADP inh}}^{\text{app}}}\right) + B \quad \text{式(3.1)}$$

でフィッティングを行う(図 3-3(B)赤線)ことで、ADP 阻害に陥る見ための時定数  $\tau_{\text{ADP inh}}^{\text{app}}$  を算出した。

IF<sub>1</sub> 阻害状態の解析には IF<sub>1</sub> 添加後の吸光度の変化のタイムコースを用いた。本文中で用いた解析結果では IF<sub>1</sub> 添加後 60 秒経過時点からのタイムコースを

$$y(t) - y_0 = V_{\infty} t^{\infty} + \frac{V_0 - V_{\infty}}{k_{\text{inhibition}}^{\text{app}}} \{1 - \exp(-k_{\text{inhibition}}^{\text{app}} t)\} \quad \text{式(3.2)}$$

でフィッティングを行って、IF<sub>1</sub> 阻害に陥る見ための速度定数  $k_{\text{inhibition}}^{\text{app}}$  を算出した。また、図 3-8(C)と(F)で示した相対活性の算出は以下のように行った。まず、IF<sub>1</sub> 添加直前(230~235 秒)での吸光度変化の傾きを計算して、この大きさを 100%と定義する。次に、IF<sub>1</sub> 添加後か

らの傾きの変化を計算し、IF<sub>1</sub>添加直前の傾きで割って 100 をかけることで相対活性とした。ADP 阻害状態の解析と同様に、相対活性を時間に対してプロットしたグラフ(図 6-18)を

$$y = A \exp(-k_{inhibition}^{app} t) + B \quad \text{式(3.1)'}$$

でフィッティングを行った。IF<sub>1</sub>添加して十分時間が経った後の残存活性は $B$ に現れるため、図 3-8(C)と(F)ではこの値をプロットした。

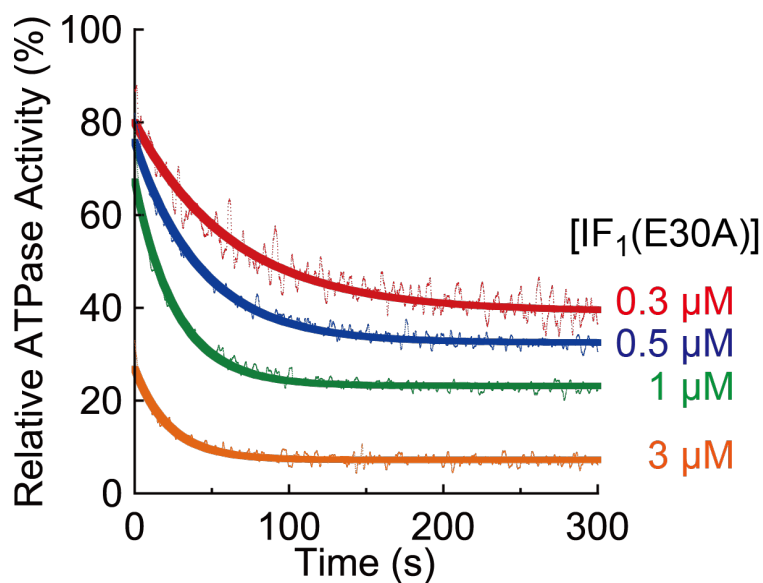


図 6-18 IF<sub>1</sub>(E30A)の活性の変化(図 3-8(C)緑色のプロット参照)

実線は式(3.1)'によるフィッティング、点線は生データを表す。色は右側に示す IF<sub>1</sub>(E30A)の濃度を表す。

## 第7章 付録

### 7.1 補足データ

本項では、結果の本編に掲載できなかった実験データ・解析等をまとめて掲載することにする。

#### 7.1.1 最大回転速度の温度依存性

本編で述べた 1 分子実験はすべて室温(23±2°C、顕微鏡室)で行った。しかし、哺乳類の生理的温度は 37°C であり、今回の実験温度とは 10°C 以上の違いがある。生理的温度付近でも回転スキームが変わらないことを確かめるため、*b*MF<sub>1</sub> の最大回転速度を 17°C、23°C、30°C、35.5°C の 4 点で計測し、その温度依存性を観察した。この実験では、F<sub>1</sub> 本来の回転速度を検出できるように回転プローブとして φ40 nm の金コロイドを用いた。また、最大回転速度に近い回転を計測できるように、溶液条件は基質飽和濃度である 1 mM で行った。野生型 *b*MF<sub>1</sub>(WT) の ATP 1 mM 条件だけではなく、本編で述べた ATPγS(2.3)や *b*MF<sub>1</sub>(βE188D)(2.4)も使い、計 3 条件で回転速度を算出した。

結果を図 7-1 に示す。横軸に温度の逆数、縦軸に回転速度の自然対数をとったアレニウスプロット(Arrhenius plot)はすべて直線性を示した。これは 17°C から 35.5°C の条件ではつねに *catalytic dwell* が律速段階であり、反応全体の速度を決めていることを示唆する結果である。すなわち、室温で計測・解析され導かれた回転スキームは幅広い温度域で適用できることを意味している。

今回の結果は、*b*MF<sub>1</sub> の回転速度の温度依存性が TF<sub>1</sub> と同等であることを意味している。化学反応の温度依存性を表す指標として Q<sub>10</sub> factor がある。これは測定温度が 10°C 変わったときに、反応速度がどれだけ変わるかを示すものである。一般の酵素での Q<sub>10</sub> は 2 程度である。基質飽和濃度での測定の場合、TF<sub>1</sub> の ATP 開裂反応(*catalytic dwell*)とリン酸解離はそれぞれ 1.9、1.6 であることが報告されており<sup>124</sup>、一般の酵素反応から予測される値と大きな違いはない。回転速度から算出された *b*MF<sub>1</sub> の Q<sub>10</sub> も 1.3~1.9 であり、TF<sub>1</sub> の場合と相違ない。

ここで以下のようなアイリングの式が成り立つことに注意する。*k* は反応速度定数(ここでは簡易的に回転速度とする)、*k<sub>B</sub>* はボルツマン定数、*T* は温度、*h* はプランク定数、*R* は気体定数、Δ*H* は活性化エンタルピー、Δ*S* は活性化エントロピーである。

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right) \quad \text{式(7.1)}$$

両辺の対数をとって整理すると、

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{式(7.2)}$$

を得る。図 7-1 の直線の傾き(*m*<0)と *y* 切片(*y*<sub>0</sub>)を用いると、Δ*H*とΔ*S*について以下の等式が

成り立つ。

$$\Delta H = -mR \quad \text{式(7.3)}$$

$$\Delta S = R \left( y_0 - \ln \frac{k_B}{T} \right) \quad \text{式(7.4)}$$

これらの値と、 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ の関係式を使用すると、23°C におけるギブズの活性化自由エネルギーは 56~72 kJ/mol と算出される。この値も先行研究の  $\text{TF}_1$ (53~56 kJ/mol)<sup>124</sup> の値や  $\text{EF}_1$ (57~76 kJ/mol)<sup>125,126</sup> の値とよく一致している。すなわち、 $b\text{MF}_1$  における ATP 加水分解反応の遷移状態も  $\text{TF}_1$  などの他の  $\text{F}_1$  と同等であると言える。

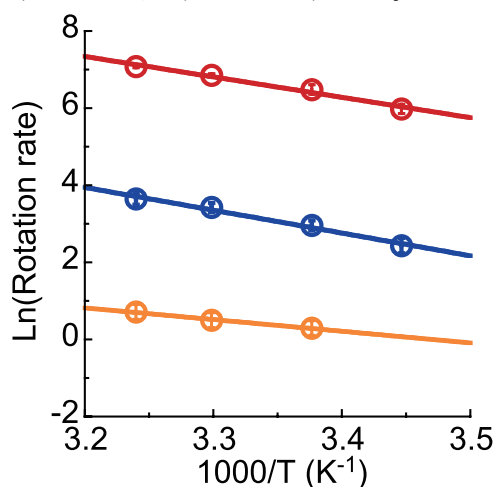


図 7-1 基質飽和条件での回転速度のアレニウスプロット(N=6-33)

(赤) 野生型  $b\text{MF}_1$ (WT)の ATP 1 mM 条件、(青) 野生型  $b\text{MF}_1$ (WT)の  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  1 mM 条件、(オレンジ) 変異体  $b\text{MF}_1$ ( $\beta\text{E188D}$ )の ATP 1 mM 条件の結果を表す。エラーバーは各測定から得られた SD を表す。

### 7.1.2 1 分子計測系の Response time の測定

今回使用した 1 分子計測系が与える揺らぎを計測して時間分解能(カメラの撮影速度)の検証をするため、以下に示すようなパワースペクトル解析を行った<sup>127</sup>。実験は ATP 100 nM 条件で行い、プローブとして 40 nm 金コロイドを用いた。撮影は 27000 fps で行った。タイムコース上で ATP 結合待ちによる停止を切り取り、フーリエ変換をすることでパワースペクトルを求めた。それをローレンツ関数  $P = C / \{1 + (f/f_c)\}$  でフィッティングすることで回転揺らぎのカットオフ周波数( $f_c$ )を求めた(図 7-2)。その結果、今回使用した系の回転揺らぎの周波数はおよそ 14000 Hz (0.07 ms)程度だった。 $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (2.3)や変異体  $b\text{MF}_1$ ( $\beta\text{E188D}$ )(2.4)の解析で得られた時定数は 0.7 ms 以上であり  $f_c$  より大きいとみなせる。しかし、野生型  $b\text{MF}_1$ (WT)の ATP 高濃度(2.2)で得られた時定数は極めて短く、パワースペクトルの結果を考慮すると dwell time の算出などの解析には不適切だと考えられる。したがって、2.2 では dwell time の解析等を行っていない。

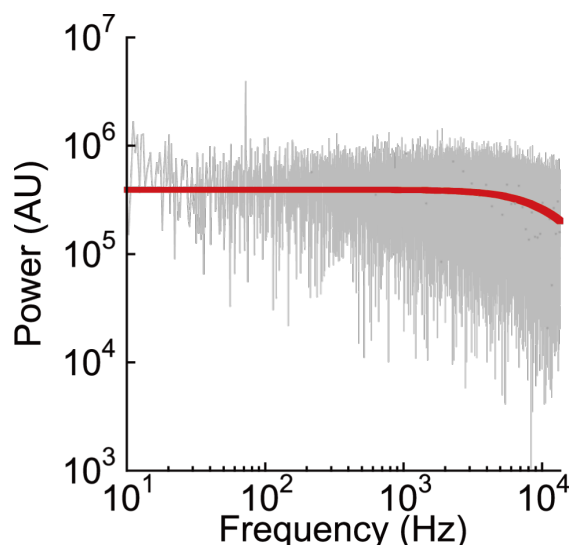


図 7-2 ATP 結合待ち状態のパワースペクトル解析の例

生データをフーリエ変換して得られたプロット(グレー)をローレンツ関数  $P = C / \{1 + (f/f_c)\}$  (赤)でフィッティングした。

### 7.1.3 Dwell time 解析の追加データ

本論文では行った磁気ビーズを用いた実験では、 $bMF_1$  が 3 つの停止点のみ持つ条件での観察を中心に行った。阻害剤・阻害タンパク質を用いた実験では ATP 100 nM 条件での  $bMF_1$ (WT)の回転をもとにその停止場所を調べた。Stall-Release 実験では、ATP 結合反応の角度依存性を調べるためには ATP 100 nM 条件での  $bMF_1$ (WT)の回転を、ATP 開裂反応の角度依存性を調べるためには ATP $\gamma$ S 1 mM 条件での  $bMF_1$ ( $\beta$ E188D)の回転をそれぞれ観察し、その停止状態を磁気ピンセットで操作した。以下ではこれら 2 条件の dwell time 解析の結果について掲載する。

実験結果を図 7-3 に示す。時定数はそれぞれ 0.9 sec、4.0 sec と求められた。これら 2 条件では ADP 阻害状態のような長い停止はほとんど観察されなかった。ADP 阻害状態は回転数に応じて確率的に陥る阻害状態と考えられているため、その回転速度が極めて遅いこれら 2 条件では観察されにくい現象なのだろう。ATP 100 nM 条件での  $bMF_1$ (WT)の場合、この知見は阻害剤添加条件での停止の判断に利用できる。阻害剤を添加すると数分以内に回転が停止した。これらは阻害剤による停止だと考えられる。またこれらの停止は 10 分以上継続した。自発的に回転が再開する ADP 阻害とは異なる現象である。すなわち、これら 2 点の違いから、ADP 阻害状態とあとから添加した阻害剤の停止状態を区別したのである。

ATP $\gamma$ S 1 mM 条件での  $bMF_1$ ( $\beta$ E188D)の回転で重要なのはその時定数である。2.8.1 でも述べた通り、ATP $\gamma$ S と  $bMF_1$ ( $\beta$ E188D)をそれぞれ用いたときの時定数の増幅倍率を考慮すると、時定数 4.0 sec の停止が ATP 開裂待ち状態に対応することが分かる。以上より、ATP $\gamma$ S と  $bMF_1$ ( $\beta$ E188D)によって大きな変化を生じる反応素過程は ATP 開裂待ち状態であると想定される。



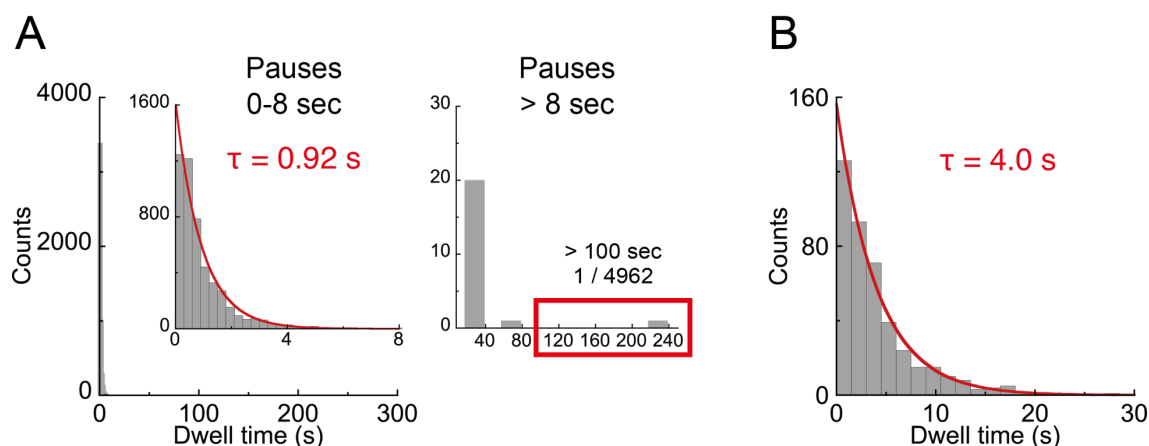


図 7-3 3 点ステップが観察される条件での時定数(プローブは磁気ビーズ)

(A) *bMF1*(WT)を用いての ATP 100 nM 条件での時定数解析。Dwell time は 0~8 秒と 8 秒以上の 2 つに分けて示した。0~8 秒の停止点から構成される時定数は 0.92 秒と算出された。また 100 秒以上の長い停止はほとんど現れなかった。(B) *bMF1*( $\beta$ E188D)を用いての ATP  $\gamma$ S 1 mM 条件での時定数解析。

#### 7.1.4 ATP 開裂反応の角度依存性

2.7 で述べた Stall-Release 実験では ATP 結合反応と ATP 開裂反応の角度依存性を調べた。その速度定数が以前解明された *TF1* の特性とよく一致しており、一見すると *bMF1* と *TF1* の実験結果は完全に一致しているように見える。

*TF1* で現れた特徴的な性質は  $P_{ON}^{hydrolysis}$  の 2 段階上昇である<sup>42</sup>。*TF1* の ATP 開裂待ち反応の拘束時間依存性は、変異体 *TF1*( $\beta$ E190D)を用いて 1 mM ATP $\gamma$ S 条件で測定された。その結果、拘束時間 10 秒程度まで  $P_{ON}^{hydrolysis}$  は急激に上昇し、その後は飽和に達することなくゆるやかに上昇し続けた。これは ATP 開裂待ち反応に続いてリン酸が解離する反応によるものである。あるひとつの ATP 分子に着目したとき、*TF1* では ATP 開裂反応が 200°で、リン酸解離反応が 320°で起きる。これらの反応は位相が 120°異なるだけで、 $\gamma$  が同じ方向を向いているときに異なる  $\beta$  で連続的に起きる反応である。*TF1* で観察された 2 段階上昇は標的  $\beta$  で ATP が開裂したあと、同じ  $\beta$  でリン酸が解離する副反応によるものと解釈された。

$P_{ON}^{hydrolysis}$  が 2 段階で上昇していく現象が *bMF1* でも観察されるかを調べるために、拘束角度 0°で長時間拘束する Stall-Release 実験を行った。結果を図 7.3 に示す。拘束時間を 60 秒までのばしても  $P_{ON}^{hydrolysis}$  は緩やかな上昇を示さなかった。*TF1* と *bMF1* の観察結果の違いは反応スキームの違いに基づくと考えられる。本研究で明らかになった *bMF1* の回転スキームでは、ATP 開裂反応とリン酸解離反応はそれぞれ 200°、250~260°で起きることが分かった。すなわち、これらの反応は  $\gamma$  が異なる方向を向いているときに起きることを意味する。磁気ピンセットによって、ATP 開裂反応待ち角度で  $\gamma$  を固定しているときにはリン酸解離反応は起きえない。以上より、*TF1* で観察された 2 段階上昇が現れなかったと考えられる。

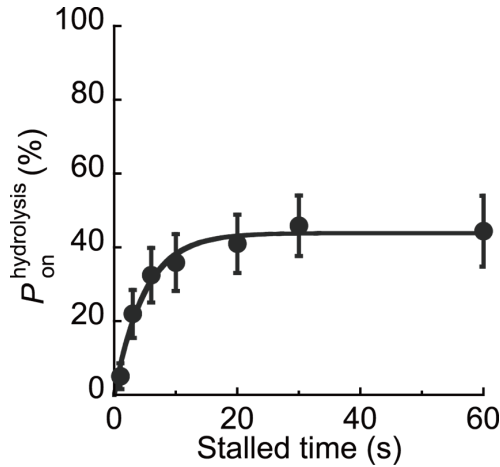


図 7-4 0°で拘束したときの $P_{on}^{hydrolysis}$ の結果(各測定データは3~8分子、20~61挙動の平均)フィッティング(黒実線)は式(2.5)による。

#### 7.1.5 Stall-Release 実験から求められる反応ごとに生み出されるトルクの見積もり

2.7 では Stall-Release 実験から反応速度定数の角度依存性を求め、反応素過程によって章じるトルクの大きさを見積もった。ここでは本編で掲載できなかったトルクの見積もり方法と、 $F_1$  の測定系全体を含めたトルクの値の幅を考慮したい。

図 2-21(E)で示す 2 つの平衡定数の対数微分、すなわち、回転角度に対する  $\ln K_d^{ATP}$  と  $\ln 1/K_E^{Hyd-ATP\gamma S}$  の微分は自由エネルギーの変化を表している。したがってこれは回転トルク  $N$  の指標となる。表 2-1 に示すように、速度定数や平衡定数はそれぞれ回転角度の関数で 1 次の指数関数の形で書かれている。ここでは一般に、

$$K_E^{reaction} = A_{eq} \times \exp(-B_{eq}t) \quad \text{式(7.5)}$$

の形で表現する。 $A_{eq}$  と  $B_{eq}$  はともにフィッティングパラメータで、 $A_{eq}$  は 0°のときの値、 $B_{eq}$  は回転角度依存性を表す指標である。これと同様に順方向、逆方向の速度定数も

$$k_{forward} = A_{forward} \times \exp(B_{forward}t) \quad \text{式(7.6)}$$

$$k_{backward} = A_{backward} \times \exp(-B_{backward}t) \quad \text{式(7.7)}$$

と表す。 $K_E^{reaction}$  は式(7.5)で導出されることを考えると、 $B_{eq}$  は速度定数の回転角度依存性を表す 2 つのフィッティングパラメータ  $B_{forward}$ 、 $B_{backward}$  を用いて

$$B_{eq} = B_{forward} + B_{backward} \quad \text{式(7.8)}$$

と簡易的に表すことができる。実際の値は完全に一致しないことに注意したい。

$\Delta G^{0'} = k_B T \ln K_E^{reaction}$  より、回転トルク  $N$  は自由エネルギーの微分形

$$\frac{\partial \Delta G^{0'}}{\partial \theta} = k_B T \frac{\partial \ln K_E^{reaction}}{\partial \theta} = k_B T B_{eq} = k_B T (B_{forward} + B_{backward}) \quad \text{式(7.9)}$$

と表される。過去の  $F_1$  実験の系全体の弾性(stiffness)を調べた研究によると、順方向の反応では磁気ビーズの角度位置と実際の  $\gamma$  サブユニットの角度位置には 4 倍の違いがあることが示唆されている<sup>42,119</sup>。したがって、実際の角度依存性は測定されたパラメータの 4 倍大

きい可能性がある。一方、逆方向の反応では、角度位置に一定のずれは存在するものの、順方向の場合のような大小の変化はない。以上より、回転トルクの大きさには幅を持たすのが適当である。回転トルクの最小値は上述した式(7.9)の場合であるが、最大値の場合は順方向のパラメータが4倍大きくなることを考慮して、

$$k_B T B_{eq} = k_B T (4 \times B_{forward} + B_{backward}) \quad \text{式(7.10)}$$

としなければならない。本論文ではこれら2つの値を最小値、最大値として回転トルクの大きさを記述した。

### 7.1.6 生化学実験での ADP 阻害状態の解析と IF<sub>1</sub> 阻害との関連性

本編では、IF<sub>1</sub> 阻害を定量する前準備として bMF<sub>1</sub> が ADP 阻害状態に陥るまでの時定数を算出し、IF<sub>1</sub> を投入するタイミングを決定した。ここでは、ADP 阻害状態の詳細解析を行い、bMF<sub>1</sub> が溶液中で活性状態と ADP 阻害状態の平衡状態にあることを仮定して反応速度定数を算出した。さらに、IF<sub>1</sub> 阻害のタイムコースをもとにして bMF<sub>1</sub> の ADP 阻害状態が IF<sub>1</sub> 阻害に陥る阻害経路の考察を行う。

#### 7.1.6.1 活性が低い測定条件での bMF<sub>1</sub> の ADP 阻害状態

図 3-3 では bMF<sub>1</sub>(WT)の ATP 1 μM から ATP 4 mM までの結果を示した。しかし、第3章での IF<sub>1</sub> 研究では bMF<sub>1</sub>(WT)の ATP 100 nM 条件や、bMF<sub>1</sub>(βE188D)の ATP 1 mM 条件でも測定を行った。これら2条件では ATPase 活性はともに 1 s<sup>-1</sup> 程度であり、溶液系での計測限界付近ほどの小さい活性しか持たないことに注意したい。

図 7-5 に示すのは NADH の吸光量の変化と算出された相対活性である。図 3-3(B)に示したような bMF<sub>1</sub>(WT)の ATP 高濃度での測定とは違い、F<sub>1</sub> 投入後にわずかに活性が上昇した後は、1000 秒経過してもほぼ一定の活性を持ち続けた。図 3-3(D)では ADP 阻害状態が ATP 濃度に強く依存することが示されたが、これは、F<sub>1</sub> の活性の大きさに依存するともとらえられる。ADP 阻害状態は F<sub>1</sub> が回転を伴いながら触媒反応を行っている最中に確率的に陥る不活性な状態である。すなわち、図 7-5 で示された2条件では活性があまりにも小さく、ADP 阻害状態に陥りにくいため、一定の活性を維持し続けたことが想定される。以上より、これら2条件では ADP 阻害状態による活性減衰を考える必要は少ないため、他条件と同じように F<sub>1</sub> 投入後 180 秒経過してから IF<sub>1</sub> を添加することにした。また、活性変化が小さく ADP 阻害に陥る時定数  $\tau_{ADP\ inh}^{app}$  が実験的に算出できないため、以下に続く解析ではこれら2条件は除外した。

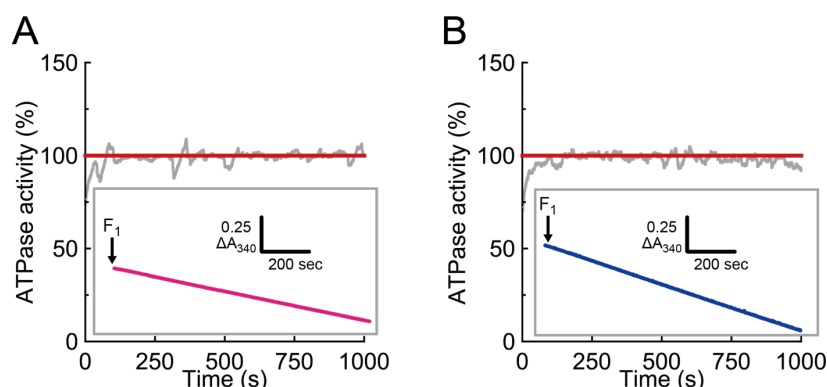


図 7-5 活性が低い条件での NADH の変化計測(インセット)と活性変化

(A) 野生型  $bMF_1$ (WT)の ATP 100 nM 条件、(B) 変異体  $bMF_1$ ( $\beta E188D$ )の ATP 1 mM 条件の計測。

#### 7.1.6.2 活性状態と ADP 阻害状態の平衡状態の速度論的解析

本編 3.2 では  $bMF_1$  添加後の活性減衰を 1 次の指数関数

$$y = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_{ADP\,inh}^{app}}\right) + B \quad \text{式(3.1)}$$

でフィットして残存活性  $B$  (図 3-3(C)) と ADP 阻害に陥る時定数  $\tau_{ADP\,inh}^{app}$  (図 3-3(D)) を計測した。一般に、ATP 加水分解を行える活性状態と ADP 阻害状態は平衡状態にあるとして、過去の研究<sup>36</sup>に従い、



と仮定する。ここで、 $F_1^{act}$  と  $F_1^{inh}$  はそれぞれ活性状態、ADP 阻害状態の  $F_1$  の状態を表す。また、 $k_{a-i}$  と  $k_{i-a}$  はそれぞれ ADP 阻害状態に陥る速度定数と、ADP 阻害状態から復活して活性状態に戻る速度定数を表す。これら 2 つの速度定数と、残存活性  $B$ 、ADP 阻害に陥る時定数  $\tau_{ADP\,inh}^{app}$  の関係式は以下のとおりである。

$$\frac{1}{\tau_{ADP\,inh}^{app}} = k_{a-i} + k_{i-a} \quad \text{式(7.10)}$$

$$\frac{B}{100} = \tau_{ADP\,inh}^{app} \times k_{i-a} \quad \text{式(7.11)}$$

これらの関係式から計算された  $k_{a-i}$  と  $k_{i-a}$  の ATP 濃度との関係性を図 7-6 に示す。両者とも  $\tau_{ADP\,inh}^{app}$  と同様に明確な ATP 濃度依存性を示した。最大の速度定数に対して半分の速度定数を与える ATP 濃度 ( $K_m$ ) の値はいずれも 200  $\mu M$  となり、図 2-2 で ATPase 活性に対して求められた  $K_m^{ATPase}$  の値と一致する。

本編で述べた  $IF_1$  阻害状態について未解決問題のひとつが実効  $IF_1$  結合定数  $k_{on}^{eff}$  の ATP 濃度依存性である。図 3-7(C) で算出されたミカエリスメンテン定数は 9  $\mu M$  で、この値は 1 分子計測から求められたミカエリスメンテン定数 77  $\mu M$  と一致しない。その理由として、この実験を溶液系で行っているためであり ADP 阻害状態を無視できないことが考えるのが

自然である。しかし、図 7-6 で求めたように溶液系で算出された速度論的パラメータはすべて、ミカエリスメンテン定数(最大値の半分の値を与える ATP 濃度)として  $200\text{ }\mu\text{M}$  という値を示した。これは  $k_{on}^{eff}$  の ATP 濃度依存性を説明できないと考えられる。とはいえ、溶液中に存在する粒子は活性状態と ADP 阻害状態の 2 つのみに分けられるわけではなく、さまざまな状態の  $F_1$  が混在している。これを解決するには生化学実験ではなく、1 分子レベルで詳細な解析が必要かもしれない。

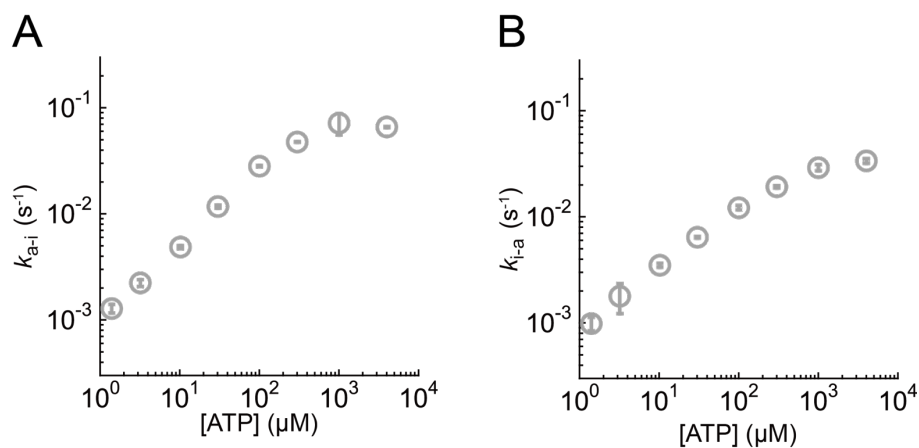


図 7-6 ADP 阻害の詳細解析

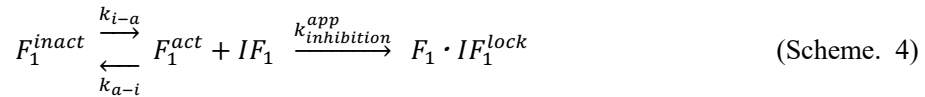
(A)  $k_{a-i}$  と(B)  $k_{i-a}$  の ATP 濃度依存性。測定の SD はエラーバーで示しており、測定値は 3 回の測定の平均値である。ミカエリスメンテン定数(最大値の半分の値を与える ATP 濃度)はともに  $200\text{ }\mu\text{M}$  程度である。

### 7.1.7 IF<sub>1</sub> 阻害状態タイムコースのフィッティング

本編では図 3.3 に示すデータは IF<sub>1</sub> 添加 60 秒後からのデータのみを用いた。これは IF<sub>1</sub> 投入直後に観察される  $bMF_1$  の急激な活性減少や IF<sub>1</sub> 投入時に生じるノイズを取り除き、定常状態に近い状態での IF<sub>1</sub> 阻害定数を算出するためである。さらに 2 つの解析方法を試した結果を示す。

1 つ目の方法では、フィッティングに用いるデータの開始時間を変えて解析を行った。図 7-7 に示すのは、IF<sub>1</sub> 添加直後(0 秒後)からのデータを用いた場合の解析結果を示す。ATP 濃度ごとに多少違いはあるものの、IF<sub>1</sub> 投入直後からの解析データの方が 60 秒経過のデータを解析して得られた値より大きな値を示すことは共通している。フィッティングから求められた  $k_{lock}$  は IF<sub>1</sub> 投入直後から解析した方が大きな値を示したものの、結果として得られた  $k_{on}^{eff}$  は解析方法によらず似たような ATP 濃度依存性を示した。IF<sub>1</sub> 投入直後はさまざまな化学反応が複合的に起きており、IF<sub>1</sub> 阻害定数も比較的大きく算出されるが、十分時間が経過した後は IF<sub>1</sub> 阻害のみが反応全体を支配するようになることが考えられる。

2 つ目の方法ではフィッティング式(3.2)を拡張した式でフィッティングを行った。本編 3.6.2 の考察でも述べたように、本編の解析と上記の解析では IF<sub>1</sub> 添加後の活性の変化を式(3.2)に基づき、1 本の指数関数でフィッティングをしている。しかし、前述のように溶液中には活性を持つ F<sub>1</sub> だけではなく活性を持たない F<sub>1</sub> も混在しており、それらが平衡状態にある。すなわち、IF<sub>1</sub> を添加した直後では不活性な状態の F<sub>1</sub> が、反応が進むにつれて活性状態へ復活し、その後それらが IF<sub>1</sub> 阻害状態に陥るというスキームも十分に考えられる。この現象を以下のように化学反応式で表す。



このスキームをもとにすると、IF<sub>1</sub> 添加後の NADH の吸光の変化は以下のような 2 段階で進行する可能性がある。すなわち、(1) IF<sub>1</sub> 添加時に活性のある F<sub>1</sub>( $F_1^{act}$ )が IF<sub>1</sub> 阻害に陥り、その後(2) IF<sub>1</sub> 添加時には不活性な状態だった F<sub>1</sub>( $F_1^{inact}$ )が阻害状態から復活して活性のある状態に戻り IF<sub>1</sub> 阻害に陥る、という 2 経路である。IF<sub>1</sub> の添加後はひとつの化学反応のみが起きていると仮定したが、上記を仮定する場合、異なる 2 種類の反応が律速になっていることを意味する。ここでは式(3.2)を 2 つの指数関数の組み合わせに拡張して、以下の式(7.12)でフィッティングを行った。

$$y(t) - y_0 = V_{\infty}t + (V_0 - V_{\infty}) \left\{ \alpha \frac{1 - \exp(-k_a t)}{k_a} + (1 - \alpha) \frac{1 - \exp(-k_b t)}{k_b} \right\} \quad \text{式(7.12)}$$

ここで、 $k_a$  と  $k_b$  は 2 種類の反応(a)と(b)に対応する反応速度定数( $k_a < k_b$ とした)、 $\alpha$  はこれらの反応の存在比率を示す。

図 7-8 に ATP 濃度別の結果を示す。測定したすべての条件で、 $k_a$  は図 3-5 に示す  $k_{inhibition}^{app}$  と似た値を示した。その一方、 $k_b$  は ATP 濃度、IF<sub>1</sub> 濃度によって一貫した値は得られなかった。しかし、IF<sub>1</sub> 低濃度(図 3-7(B)に示す  $K_M^{IF_1}$  以下)条件では、 $k_b$  は  $k_a$  と同じ値を示す

か、極端に大きな値( $k_b > 1$ )を示した。この傾向は  $\alpha$  の値と連動した。すなわち、ある IF<sub>1</sub> 濃度以下では  $\alpha$  の値はほぼ 1 に収束し、IF<sub>1</sub> 添加後の反応はほとんど反応(a)によって支配されることを意味する。IF<sub>1</sub> 濃度が比較的低いことを考えると、F<sub>1</sub> に対する IF<sub>1</sub> の結合反応が律速であり、 $k_a$  は IF<sub>1</sub> 阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  に相当すると結論付けるのが自然である。一方で、IF<sub>1</sub> 飽和濃度付近になってくると、 $k_b$  と  $\alpha$  の値は相互に連動してある一定の値に達する傾向がみられた。この条件では、F<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の中間状態から最終状態への異性化の過程が律速段階のひとつになる。その場合、もう一方の速度定数は ADP 阻害から活性化状態への変化を表す速度定数( $k_{i-a}$ )に対応するはずである。しかし、 $k_b$  の値として一貫した性質は観察されなかった。また、ADP 阻害の詳細解析によって ADP 阻害状態での最終残存活性が 30~50%だったことから、 $\alpha$  の値もその値を示すことが予想される。実際、IF<sub>1</sub> 飽和濃度領域では  $\alpha$  の値も 0.3 前後で一定の値を示す傾向が見られたが、これは意味付けとしては想定 inverse である。つまり、 $\alpha$  は IF<sub>1</sub> 投入時に活性状態の F<sub>1</sub> の割合、 $1-\alpha$  は IF<sub>1</sub> 投入時に不活性状態の F<sub>1</sub> の割合のことである。しかし、IF<sub>1</sub> 投入時に不活性状態の F<sub>1</sub> が速度定数  $k_b$  として大きな値をもつのは矛盾しているように思える。ゆえに、 $\alpha$  の値自体もばらつきが大きく  $k_b$  の値との意味付けはできそうにない。実際、したがって、上述の仮説は本解析では証明されなかった。この理由としては、溶液中での bMF<sub>1</sub> と IF<sub>1</sub> の阻害状態はスキームよりも複雑であることや、タイムコースのフィッティングの精度が不足していることが考えられる。よって、本編では 1 指数関数のフィッティングによりひとつの阻害定数  $k_{inhibition}^{app}$  を算出するだけにした。

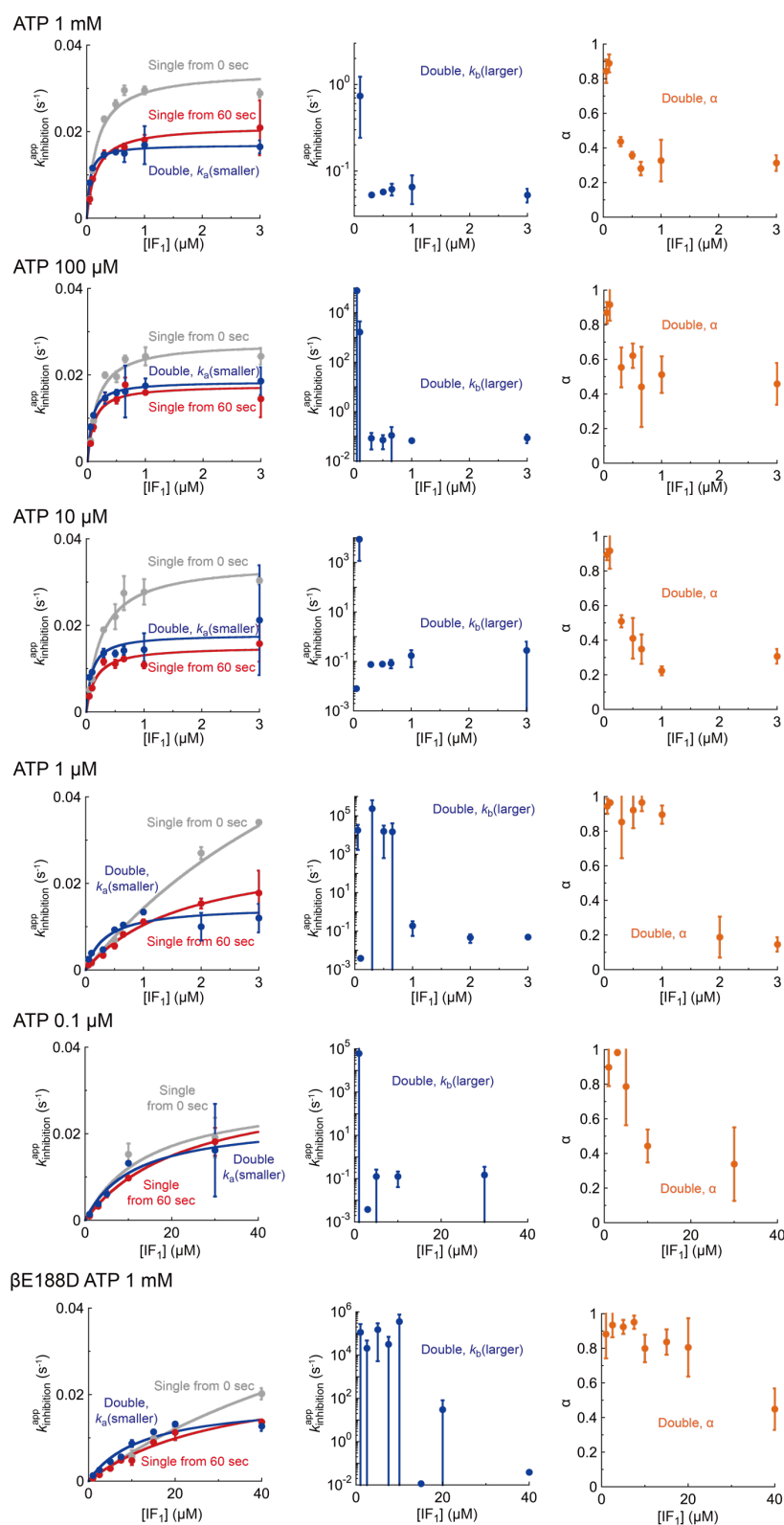


図 7-7 解析時間ごとの結果

(左) 解析時間 0 秒(グレー)、60 秒(赤)から開始した  $k_{inhibition}^{app}$  と 2 指数関数フィッティングでの  $k_a$  (中) 2 指数関数フィッティングでの  $k_b$  (右) 2 指数関数フィッティングでの  $\alpha$  の値。



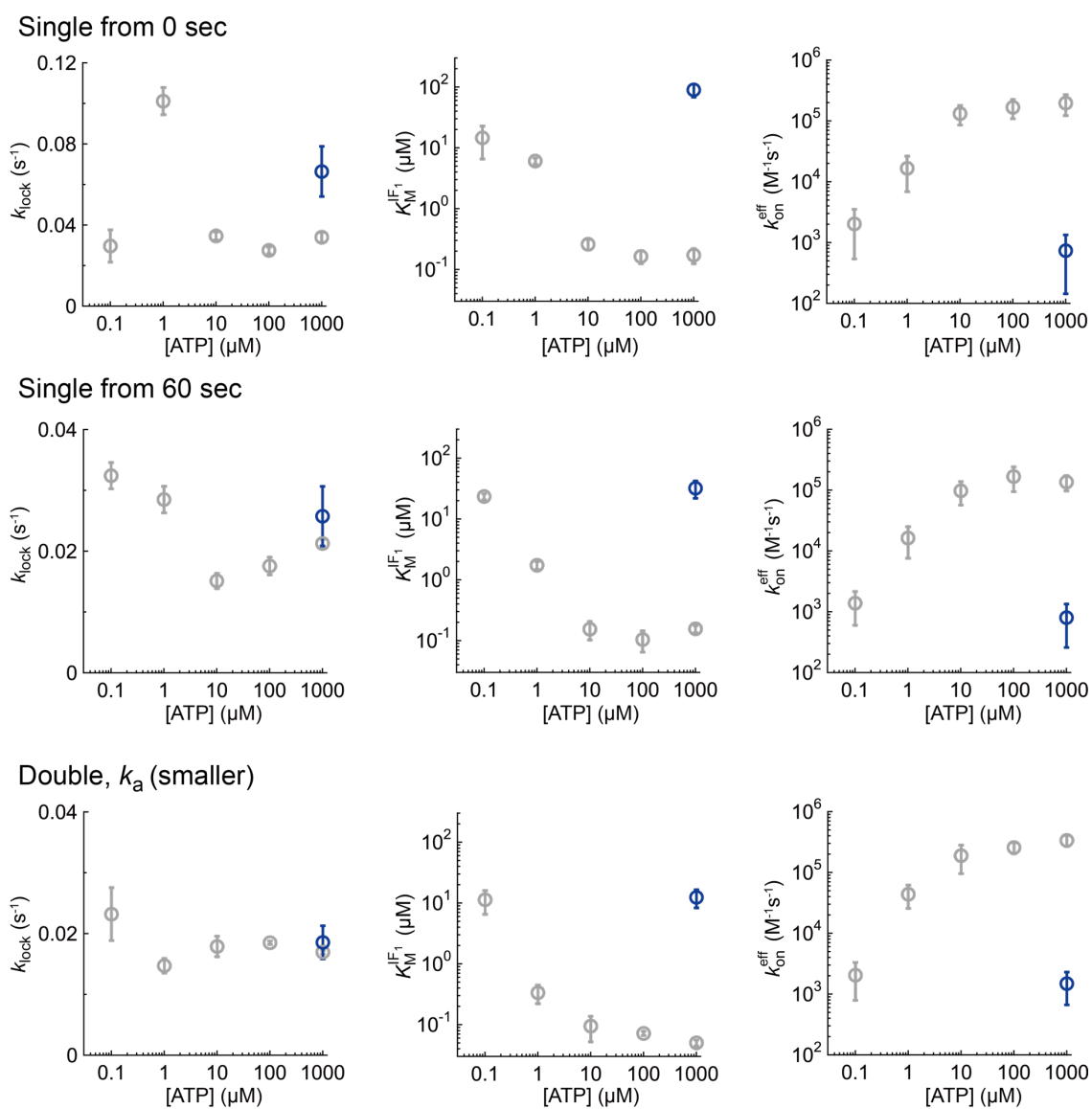


図 7-8 図 7-7 から算出された解析方法別の速度定数

横列は同じ解析方法、縦列は同じパラメータ(左)  $k_{lock}$ 、(中)  $K_M^{IF1}$ 、(右)  $k_{on}^{eff}$  を表す。

### 7.1.8 1 分子回転計測による ADP 阻害の定量

本項では 1 分子回転観察中に現れる停止の長さと同頻度を検証した結果について述べる。阻害剤なしの条件でも  $F_1$  が活性を失う現象は ATPase 活性測定でも観察されるが、1 分子計測ではそれらは粒子の回転、停止という形で現れる。 $F_1$  粒子を長時間計測することにより回転、停止時間をそれぞれ集めそれらのヒストグラムから時定数を算出した。回転継続時間については 1 指数関数からなるフィッティング式からひとつの時定数 $\tau_{rot}$ を算出した。一方で、停止時間については先行研究に基づき、

$$Counts = A_{sp} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{sp}}\right) + A_{lp} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{lp}}\right) \quad \text{式(7.13)}$$

でフィッティングした。ここで sp は比較的短い停止(short pause)、lp は比較的長い停止(long pause)を意味し、それらの時定数はそれぞれ $\tau_{sp}$ と $\tau_{lp}$ である。なお、第 2 章で登場する *short pause/dwell*、*long pause/dwell* とは異なるものであることに注意する。まず、停止時間のうち 5 秒以内の比較的短い停止のみを集めてヒストグラムを描く。それらを 1 指数関数でフィッティングを行い、時定数 $\tau_{sp}$ を決定した。次にすべての停止をひとつのヒストグラムに集めて式(7.13)でフィッティングを行い、時定数 $\tau_{lp}$ を決定した。なお、5 秒以内の停止を集めたヒストグラムからは $\tau_{sp}$ がうまく決定できないこともあるが、 $\tau_{lp}$ に与える影響は小さいことためそれほど問題はない。過去の研究で short pause は磁気ビーズを用いたことによるリン酸解離待ち状態の伸長と解析されている。本解析に必要な ADP 阻害状態による停止は long pause (時定数 $\tau_{lp}$ )の方に対応すると考える。

この実験を ATP 溶液だけではなく、ADP や  $P_i$  との混合溶液でも行った。図 7-9 に結果の例(ATP 100  $\mu$ M、ADP 100  $\mu$ M、 $P_i$  1 mM 条件)を、表 7-1 にそれらをまとめた結果を示す。例えば、ATP 100  $\mu$ M、ADP 100  $\mu$ M 条件では  $P_i$  の有無(表 7-1 の 2 行目、5 行目)によって回転継続時間が伸長したことが分かる。これは以前の研究で示されていたように、 $P_i$  の添加によって ADP 阻害に陥りにくくなったことが示唆される結果である。また、 $P_i$  なし条件(表 7-1 の 4 行目)の停止時間の分布では、時定数の 3 倍の長さ以上(> 80 秒)の停止も散見されたことから、単なる時定数では表すことができないような状態の分子も一定数存在することが示唆された。停止時間だけを考えると、これらの粒子は  $IF_1$  阻害粒子と区別がつかない。それらを見極めるために磁気ピンセットでの操作を行った。 $IF_1$  阻害は反時計回り操作では解放されないのに対し、ADP 阻害粒子は反時計回り方向操作で解放されやすいことがわかっている。そのため、停止粒子を反時計回り回転、もしくは停止位置から反時計回り方向に 80°の位置で 2 秒程度拘束して、解放しても粒子が自発的に回転再開しないことを確かめてから  $IF_1$  阻害解析を行った。

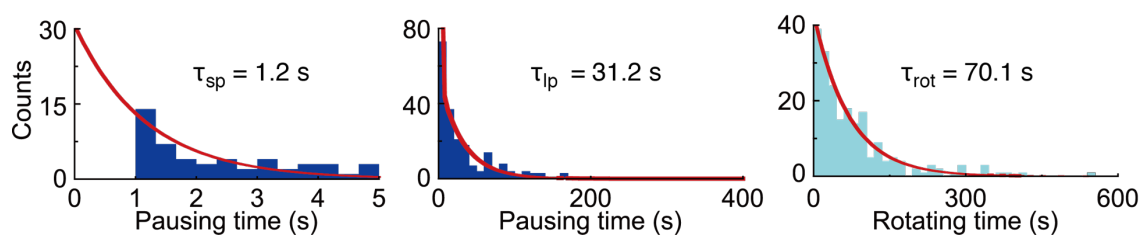


図 7-9 ATP 100  $\mu$ M、ADP 100  $\mu$ M、 $P_i$  1 mM 条件での回転、停止時間の解析

(左) 5 秒以内の停止時間を集めたヒストグラム。(中) すべての停止時間を集めたヒストグラム。フィッティングは式(7.13)を表す。(右) 回転継続時間を集めたヒストグラム。

表 7-1 連続回転から算出される $\tau_{sp}$ 、 $\tau_{lp}$ と $\tau_{rot}$

溶液条件			$\tau_{sp}$ (s)	$\tau_{lp}$ (s)	$\tau_{rot}$ (s)
ATP	ADP	$P_i$			
1 mM (注)			1.7	17.2	54.0
100 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	1.2	31.2	70.1
100 $\mu$ M	100 $\mu$ M	10 mM	0.9	71.4	113
100 $\mu$ M (注)		1 mM	1.3	26.4	72.9
100 $\mu$ M	100 $\mu$ M		0.9	28.4	26.2

(注) これらの条件(ADP なし)では ATP 再生系を使用した。

#### 7.1.9 ガラス面での IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet 分子の吸着量の評価

本研究では主に mScarlet が結合してある IF<sub>1</sub> を用いた。よって蛍光分子のガラス面の吸着により、フローセル内での実効濃度が低下している可能性がある。本項では、フローセルを通り抜けた溶液を回収し、その蛍光強度を測定することによってフローセル中に存在している IF<sub>1</sub> 分子の濃度を定量した。

IF<sub>1</sub><sup>1-60</sup>mScarlet を 3 濃度(1  $\mu$ M、3  $\mu$ M、5  $\mu$ M)用意して、それらを通常のリターン観察と同様に用意したフローセルに流し込む。40  $\mu$ L の溶液を流し込んだあと、フローセルの両端にできた溶液導入口のうち、溶液を導入していない方から 5  $\mu$ L 程度の溶液を回収した。回収溶液を 4  $\mu$ L、リターン観察用の buffer を 11  $\mu$ L 混合して測定サンプルを作成し、プレートリーダーでその蛍光強度を測定した。同様にフローセルを通していない溶液についてもリターン観察 buffer で希釈を行なって蛍光強度を測定し、その比率から実効濃度を求めた。プレートリーダーの測定条件は表 7-2 に示した。

結果を図 7-10 に示す。測定した 3 種類の溶液すべてで結果は一貫しており、フローセルを通り抜けた溶液の蛍光強度は、フローセルを通していない溶液のそれと 2 割程度減少した。この結果から、フローセル中の実効濃度は設定濃度の約 8 割と見積もることができた。より正確な定量をするためには、フローセルから回収した溶液の SDS-PAGE を行い、銀染色などによってタンパク量を見積もるなどの方法があるだろう。

表 7-2 プレートリーダーの測定条件

設定項目	設定値
測定種	Spectrum
Read Mode	Fluorescence/Bottom Read
Wavelength (励起光)	560 nm
Wavelength (測定)	570~650 nm (1 nm 間隔)
Cutoff	590 nm
Sensitivity	Reading6/Medium
AutoCalibrate	On
Temperature	25°C

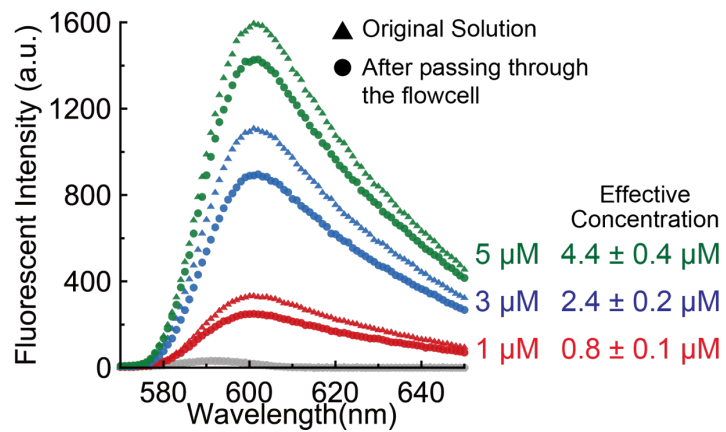


図 7-10 フローセル中の IF<sub>1</sub> 濃度の定量

色の違いは IF<sub>1</sub> 濃度の違い、記号の違いはフローセルを通過したかどうかを表す。測定は 3 回行い、それらの平均値と SD から実効 IF<sub>1</sub> 濃度を表記した

## 7.2 IF<sub>1</sub> 阻害タイムコースの解析プログラム

第3章ではIF<sub>1</sub>添加後のNADH吸光度の時間変化を、プログラミングソフトpythonを用いたカーブフィッティングをもとに行った。当研究室に所属していた森創梧くんによって作成されたものを改変したプログラムを記載する。

### 7.2.1 1 指数関数フィッティングのためのプログラム

解析開始時間を変えるにはプログラム中の $t_s$ (赤字)を変更すればいい。ここで $t_s$ は実時間ではなくデータ数であることに注意したい。つまり、今回のデータは0.1秒刻みで記録されているため、IF<sub>1</sub>添加60秒後から解析を行いたい場合は $t_s = 600$ と記入すればよい。

```
import pandas as pd
import numpy as np
from statistics import mean, median, variance, stdev
import openpyxl
import os
import glob
import math
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy import optimize

os.getcwd()

#解析するデータ
#inputfilenameを変えること
input_file_name='XXX/YYY.xlsx'
input_book=pd.ExcelFile(input_file_name)
#sheet_names メソッドでシート名のリストを取得できる
input_sheet_name=input_book.sheet_names
#len でシートの総数を確認
num_sheet=len(input_sheet_name)
print("sheet の数:",num_sheet)
print(input_sheet_name)
#Dataframe として1つ目のシートを読み込み
sheet_title=input_sheet_name[25]
input_sheet_df=input_book.parse(sheet_title)
#読み込んだシートの確認
print("sheet 名:",sheet_title)

input_sheet_df.head(20)

#Set the starting time for analysis
ts=600

#y0:initial での吸光度
y0=input_sheet_df.iloc[int(ts), 5]
print(y0)

#t,y を設定

datat=input_sheet_df['time0']
datay=input_sheet_df['absorbance.1']

datat.isnull()

print(datat.dtype)

#どこの値まで取るかを決定する
threshold=1
for i in range(len(datat)):
    if datat.iloc[i] > 0:
        threshold+=1
threshold

#改めて t,y を設定
#この時間を変更する

datat=input_sheet_df['time0'][0:threshold-int(ts)]
#t の生データ
datay=input_sheet_df['absorbance.1'][int(ts):threshold] #y の生データ
datat.dtype
print(datay.dtype)
print(len(datat))
datat1=datat
datay1=datay.reset_index(drop=True)

#近似したい式を定義
```

```

def fit_func(parameter,y,t):
    kinh=parameter[0]
    V0=parameter[1]
    Vinf=parameter[2]
    #residual=y-y0-Vinf*tinf-(((V0-
Vinf)/kinh)*(1-np.exp(-kinh*t)))
    residual=y-y0-Vinf*t-(((V0-Vinf)/kinh)*(1-
np.exp(-kinh*t)))
    return residual

#fit
#param の初期値として param0 を設定
param0=[0.01, -0.001, -0.0001]
#leastsq による fitting
result=optimize.leastsq(fit_func,param0,args=(dat
ay1,datat1))
print("result_fit=", result)
kinh_fit=result[0][0]
V0_fit=result[0][1]
Vinf_fit=result[0][2]
kinh_fit.dtype
V0_fit.dtype
Vinf_fit.dtype

#R2 をコード
residuals = datay1 - (y0+Vinf_fit*datat1+((V0_fit-
Vinf_fit)/kinh_fit)*(1-np.exp(-kinh_fit*datat1)))
rss = np.sum(residuals**2)#residual sum of
squares = rss
tss = np.sum((datay-np.mean(datay1))**2)#total
sum of squares = tss
r_squared = 1 - (rss/ tss)
print("result_R2=",r_squared)

residuals = datay1 - y0-Vinf_fit*datat1-(V0_fit-
Vinf_fit)/kinh_fit*(1-np.exp(-kinh_fit*datat1))
print("residuals=",residuals)

fig,ax=plt.subplots()
ax.plot(datat,residuals,'bo',

label='Residuals.',markersize=1)
plt.xlabel('Time')
plt.ylabel('Residuals')
plt.legend(loc='best',fancybox=True,
shadow=True)
plt.grid(True)
plt.savefig(os.path.join('XXX',"Residuals_" +sheet
_title+".png"))

#plot
fig,ax=plt.subplots()
ax.plot(datat1,datay1,'bo',
label='Exp.',markersize=1)
ax.plot(datat,y0+Vinf_fit*datat1+(V0_fit-
Vinf_fit)/kinh_fit*(1-np.exp(-kinh_fit*datat1)), 'k-',
label='fitted line', linewidth=5, alpha=0.3, )
plt.xlabel('Time')
plt.ylabel('Abs')
plt.legend(loc='best',fancybox=True,
shadow=True)
#plt.text(1, 1.05, f'kinh={kinh_fit}')
ax.annotate(f'kinh_fit={kinh_fit}', xy=(0.4, 0.7),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f'V0={V0_fit}', xy=(0.4, 0.6),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f'Vinf={Vinf_fit}', xy=(0.4, 0.5),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f'R$^{2}$={r_squared}', xy=(0.4,
0.4), xycoords='axes fraction', fontsize=12)
plt.grid(True)
#plt.savefig('max_initial_end=160.png')
plt.savefig(os.path.join('XXX',sheet_title+".png")
)

#得られた kinh_fit とファイル名をテキストフ
ァイルとして保存
import csv
with open('Summary.csv','a',newline=") as f:
    writer = csv.writer(f)
    writer.writerow([sheet_title, r_squared,
V0_fit,Vinf_fit, kinh_fit])

```

## 7.2.2 2 指数関数フィッティングのためのプログラム

2 指数関数フィッティングの場合、算出すべき変数が増えるため計算が複雑になる。1 指数関数フィッティングのときと同様に $V_0$ や $V_{inf}$ などの値もフィッティングパラメータとして算出しようとしたが、計算できない場合もあった。そのため、 $V_0$ や $V_{inf}$ のパラメータは特定の領域の直線フィッティングから個別に算出している。

```
import pandas as pd
import numpy as np
from statistics import mean, median, variance, stdev
import openpyxl
import os
import glob
import math
import matplotlib.pyplot as plt
import scipy.optimize
from scipy import optimize
from scipy.optimize import least_squares
from scipy.optimize import curve_fit

os.getcwd()

#解析するデータ
#inputfilename を変えること
input_file_name='XXX/YYY.xlsx'
input_book=pd.ExcelFile(input_file_name)
#sheet_names メソッドでシート名のリストを取得できる
input_sheet_name=input_book.sheet_names
#len でシートの総数を確認
num_sheet=len(input_sheet_name)
print("sheet の数:",num_sheet)
print(input_sheet_name)
#DataFrame として 1 つ目のシートを読み込み
sheet_title=input_sheet_name[23]
input_sheet_df=input_book.parse(sheet_title)
#読み込んだシートの確認
print("sheet 名:",sheet_title)

input_sheet_df.head(20)

#初期値を設定
#y0:initial での吸光度
y0=input_sheet_df.iloc[0,7]

#t,y を設定

datat=input_sheet_df['time0']
datay=input_sheet_df['absorbance.1']

datat.isnull()

print(datat.dtype)

#どこの値まで取るかを決定する
threshold=1
for i in range(len(datat)):
    if datat.iloc[i] > 0:
        threshold+=1
threshold

#改めて t,y を設定

datat=input_sheet_df['time0'][0:threshold] #t の生データ
datay=input_sheet_df['absorbance.1'][0:threshold]
#y の生データ
datat.dtype
print(datay.dtype)
print(len(datat))

#initial の傾きと steady の傾きを計算する
def fit_linear(t, a, b):
    return a*t + b

#近似したい式を定義
def fit_func(t, k1, k2, A1):
    return y0+Vinf*t+((V0-Vinf)*((A1*(1-np.exp(-k1*t))/k1)+(1-A1)*(1-np.exp(-k2*t))/k2))

#initial の配列を作成
initial_array=np.linspace(10, 200, 20)
R2_list=[]
param_initial=[0.03, 2]
```

```

for i in range(20):
    #initial を再定義
    print("これは", i, "ばんめ")
    initial_end=int(initial_array[i])
    t_initial=datat[0:initial_end]
    y_initial=datay[0:initial_end]
    t_steady=datat[threshold-300:threshold]
    y_steady=datay[threshold-300:threshold]

    #initial と steady の速度を入手
    param_initial, cov_initial =
optimize.curve_fit(fit_linear, t_initial, y_initial)
    print("result_initial=", param_initial)
    a=param_initial[0]
    b=param_initial[1]
    V0=a
    param_steady, cov_steady =
optimize.curve_fit(fit_linear, t_steady, y_steady)
    print("result_steady=", param_steady)
    c=param_steady[0]
    d=param_steady[1]
    Vinf=c

    #fit
    #param の初期値として param0 を設定
    param0=[0.01, 0.07, 0.3]
    param_bounds=[[0.0, 0.0, 0.0], [1.0, 1.0, 1.0]]
    param_fitting, cov_fitting
=optimize.curve_fit(fit_func, datat, datay,
p0=param0, bounds=param_bounds)

    print("result_fit=", param_fitting)

    k1_fit=param_fitting[0]
    k2_fit=param_fitting[1]
    A1_fit=param_fitting[2]

    k1_fit.dtype
    k2_fit.dtype
    A1_fit.dtype

    #R2 をコード
    residuals = datay-fit_func(datat, k1_fit, k2_fit,
A1_fit)
    rss = np.sum(residuals**2) #residual sum of
squares = rss

    tss = np.sum((datay-np.mean(datay))**2)
    #total sum of squares = tss
    r_squared = 1 - (rss/ tss)
    R2_list.append(r_squared)
    print("result_R2=",r_squared)
    print(R2_list)

    #出てきた R2 の値のリストを格納
    #R2 の値の最大値をとるときの initial を返す

    #R2 の最大値を抽出
    max_initial_end_index=R2_list.index(max(R2_lis
t))
    max_initial_end=int(initial_array[max_initial_end
_index])
    print(max_initial_end)

    #initial を再定義
    param_initial=[0.03, 2]
    t_initial=datat[0:max_initial_end]
    y_initial=datay[0:max_initial_end]
    t_steady=datat[threshold-500:threshold]
    y_steady=datay[threshold-500:threshold]

    param_initial, cov_initial =
optimize.curve_fit(fit_linear, t_initial, y_initial)
    print("result_initial=", param_initial)
    a=param_initial[0]
    b=param_initial[1]
    V0=a

    param_steady, cov_steady =
optimize.curve_fit(fit_linear, t_steady, y_steady)
    print("result_steady=", param_steady)
    c=param_steady[0]
    d=param_steady[1]
    Vinf=c

    #PLot_fitting(initial)
    plt.figure(figsize=(8,5))
    plt.plot(t_initial,y_initial,'bo', label='Exp.')
    plt.plot(t_initial,a*t_initial+b, label='fitted line',
linewidth=10, alpha=0.3)
    plt.xlabel('Time',fontsize=15)
    plt.ylabel('Abs',fontsize=15)
    plt.legend(loc='best',fancybox=True,

```



```

shadow=True,fontsize=15)
plt.grid(True)
#plt.savefig('initial 例.png')
plt.show()

#PLot_fitting(initial)
plt.figure(figsize=(8,5))
plt.plot(t_steady,y_steady,'bo', label='Exp.')
plt.plot(t_steady,c*t_steady+d, label='fitted line',
linewidth=10, alpha=0.3)
plt.xlabel('Time',fontsize=15)
plt.ylabel('Abs',fontsize=15)
plt.legend(loc='best',fancybox=True,
shadow=True)
plt.grid(True)
#plt.savefig('steady 例.png')
plt.show()

#param の初期値として param0 を設定
param0=[0.01, 0.07, 0.3]
param_bounds=[[0.0, 0.0, 0.0], [np.inf, np.inf,
1.0]]
param_fitting, cov_fitting
=optimize.curve_fit(fit_func, datat, datay,
p0=param0, bounds=param_bounds)

print("result_fit=", param_fitting)

k1_fit=param_fitting[0]
k2_fit=param_fitting[1]
A1_fit=param_fitting[2]

k1_fit.dtype
k2_fit.dtype
A1_fit.dtype

print(V0)

residuals = datay - (y0+Vinf*datat+((V0-
Vinf)*((A1_fit*(1-np.exp(-
k1_fit*datat))/k1_fit)+(1-A1_fit)*(1-np.exp(-
k2_fit*datat))/k2_fit)))
print("residuals=",residuals)

fig,ax=plt.subplots()
ax.plot(datat,residuals,'bo',
label='Residuals.',markersize=1)
plt.xlabel('Time')
plt.ylabel('Residuals')
plt.legend(loc='best',fancybox=True,
shadow=True)
plt.grid(True)
plt.savefig(os.path.join('XXX',"Residuals_"+"sheet
_title+".png"))

#plot
fig,ax=plt.subplots()
ax.plot(datat,datay,'bo', label='Exp.',markersize=1)
ax.plot(datat,y0+Vinf*datat+((V0-
Vinf)*((A1_fit*(1-np.exp(-
k1_fit*datat))/k1_fit)+(1-A1_fit)*(1-np.exp(-
k2_fit*datat))/k2_fit)),k-', label='fitted line',
linewidth=5, alpha=0.3, )
plt.xlabel('Time')
plt.ylabel('Abs')
plt.legend(loc='best',fancybox=True,
shadow=True)
#plt.text(1, 1.05, f"kinh={kinh_fit}")
ax.annotate(f"k1_fit={k1_fit}", xy=(0.4, 0.7),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f"k2_fit={k2_fit}", xy=(0.4, 0.6),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f"A1_fit={A1_fit}", xy=(0.4, 0.5),
xycoords='axes fraction', fontsize=12)
ax.annotate(f"R$^{2}$={max(R2_list)}", xy=(0.4,
0.4), xycoords='axes fraction', fontsize=12)
plt.grid(True)
#plt.savefig('max_initial_end=160.png')
plt.savefig(os.path.join('XXX',sheet_title+".png")
)

#得られた kinh_fit とファイル名をテキストフ
ァイルとして保存
import csv
with open('Summary.csv','a',newline=") as f:
    writer = csv.writer(f)
    writer.writerow([sheet_title,max_initial_end,
max(R2_list), V0 ,Vinf, k1_fit, k2_fit, A1_fit])

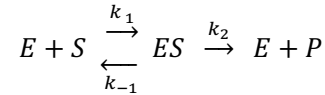
```

### 7.3 数式の導出

分子モーター研究に欠かせないのは数式を用いた速度論的な解析である。ここでは、本論文で用いた数式の導出を行う。

#### 7.3.1 ミカエリスメンテン式と基質結合定数の導出

酵素が触媒する化学反応はミカエリスとメンテンによると以下の化学反応式に従って進む。ただし  $E$  は酵素、 $S$  は反応の基質、 $ES$  は酵素基質複合体、 $P$  は反応の生成物を示す。また、 $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_2$  は速度定数である。



最終的に求めたいのは生成物  $P$  が生じる速度  $V$  である。

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \text{式(S1.1)}$$

また、酵素基質複合体  $ES$  の濃度が時間に依存して変化する様子は

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{式(S1.2)}$$

と表される。以下では酵素反応が定常状態にあるとする(=定常状態近似)。すなわち、反応中間体が時間に対して濃度変化しないことを仮定すれば、(式 S1.2)=0 より

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[ES]}{k_1[S]} \quad \text{式(S1.3)}$$

と表される。

ここで、反応に添加した酵素の総量を定数  $E_0$  とすると、これは「基質を結合していない酵素」濃度と「基質を結合した酵素」濃度の合計と等しく、

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad \text{式(S1.4)}$$

と表される。(式 3)と(式 4)より  $[E]$  を消去すれば、

$$[ES] = \frac{k_1 E_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} \quad \text{式(S1.5)}$$

と求められる。(式 S1.1)と(式 S1.5)より  $V$  を  $[E_0]$ 、 $[S]$ 、速度定数  $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_2$  を用いて、

$$V = \frac{k_2 E_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad \text{式(S1.6)}$$

と表せる。ここで、

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{式(S1.7)}$$

$$V_{max} = k_2 E_0 \quad \text{式(S1.8)}$$

とすれば、

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{式(S1.9)}$$

が得られる。ミカエリスメンテン定数 $K_m$ は酵素と基質の親和性を表し、この値が大きければ、酵素-基質の親和性が低いことを示す。

$V_{max}$ が求まれば分子活性 $k_{cat}$ も求めることが可能となる。 $k_{cat}$ はもうひとつの $V_{max}$ の表し方であり、 $[E_0]$ に依存しないことから酵素の触媒数、すなわち単位時間あたりに酵素 1 モルによって変換される基質の物質量を表している。 $[E_0]$ は酵素の物質量が未知の場合は不明であることから、暫定的に  $V_{max}$  を代用することも少なくない。単純なミカエリスメンテン機構であれば、 $k_{cat}$ は $k_2$ に等しく、 $k_{cat}$ は活性化エネルギーの算出や触媒能の比較などの際に用いられる。一方、 $K_m$ は酵素に固有な定数で、細胞内基質レベルの推定、同種酵素間の比較、生理活性物質の探索、および酵素反応機構の解明などを行う上で重要な意義がある。 $k_{cat}$ と $K_m$ が求まれば特異性定数または触媒反応効率と呼ばれる $k_{cat}/K_m$ も求めることができる。これは異なる基質濃度における特異性を比較する際に用いられる定数であり、値が高いほど特異性が高いことを示す。以下では  $F_1$  の場合における ATP 結合定数 $k_{on}^{ATP}$ の導出を行う。

一般に、基質結合にかかる時間を  $\tau_{binding}$ 、基質結合以外(加水分解、生成物解離など)にかかる時間を $\tau_{hydrolysis}$ とする。回転はこれら 2 つの要素で成り立つ。すなわち、

$$\frac{1}{V} = \tau_{binding} + \tau_{hydrolysis} \quad \text{式(S1.10)}$$

である。 $[S] = K_m$  のとき、基質結合にかかる時間  $\tau_{binding}$  と基質結合以外にかかる速度  $\tau_{hydrolysis}$  は等しい。すなわち、

$$\tau_{binding} = \tau_{hydrolysis} \quad \text{式(S1.11)}$$

が成り立つ。また、式(S1.10)に  $[S] = K_m$  を代入することで、このときの回転速度  $V_{K_m}$  は

$$V_{K_m} = \frac{V_{max}}{2} \quad \text{式(S1.12)}$$

と表される。よって、(S1.10)~(S1.12)より  $[S] = K_m$  のときにおいて

$$\tau_{binding} = \tau_{hydrolysis} = \frac{1}{2V_{K_m}} = \frac{1}{V_{max}} \quad \text{式(S1.13)}$$

が成り立つ。

ここで、基質結合定数を  $k_{on}$  とする。基質結合速度はミカエリスメンテン式の定義より、

$$\frac{1}{\tau_{binding}} = k_{on}[S] \quad \text{式(S1.14)}$$

と表される。 $[S] = K_m$  のときに式(S1.13)、式(S1.14)を適用すると

$$V_{max} = k_{on}[S] = k_{on}K_m \quad \text{式(S1.15)}$$

である。ここで、1 回転ごとに基質は 3 つ結合することに気を付けると、

$$k_{on}^{ATP} = \frac{3 V_{max}}{K_m} \quad \text{式(S1.16)}$$

を得る。

この方法では基質の解離定数  $k_{off}$  を考慮していない。以下では結合が律速となる低濃度条件で dwell time を解析することで基質結合定数  $k_{on}^{ATP}$  を算出することができる。

### 7.3.2 Dwell time 解析で用いた減衰指数関数の導出

律速過程が 1 つのとき、以下のような 1 段階の反応(反応速度定数  $k_1$ )を仮定する。



A の時間変化は

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \quad \text{式(S2.1)}$$

である。初期濃度  $[A]_0 = A_0$  とすることで、

$$[A] = A_0 \exp(-k_1 t) \quad \text{式(S2.2)}$$

となる。反応待ち時間は生成物の時間変化と等しく

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] = k_1 A_0 \exp(-k_1 t) = A_1 \exp(-k_1 t) \quad \text{式(S2.3)}$$

となる。ここで、時定数  $\tau_1$  を

$$\tau_1 = \frac{1}{k_1} \quad \text{式(S2.4)}$$

と定義することで、Dwell time のヒストグラムは

$$Counts = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \quad \text{式(S2.5)}$$

でフィッティングすることができる。

特に ATP 結合の反応については、

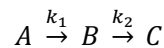
$$k_1 = k_{on}^{ATP} [ATP] \quad \text{式(S2.6)}$$

とかけるので、式(S2.4)、式(S2.6)より時定数から求めた ATP 結合定数  $k_{on}^{ATP}$  は

$$k_{on}^{ATP} = \frac{1}{\tau[ATP]} \quad \text{式(S2.7)}$$

と導出される。

律速過程が 2 つのとき、以下のような 2 段階反応(反応速度定数  $k_1$ 、 $k_2$ )を仮定する。



上記を参考にとすると、

$$[A] = A_0 \exp(-k_1 t) \quad \text{式(S2.2)}$$

である。次に、

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] = k_1A_0 \exp(-k_1t) - k_2[B] \quad \text{式(S2.8)}$$

を解く。一階線型常微分方程式の解を考えると、

$$[B] = e^{-\int k_2 dt} \left( \int k_1A_0 e^{-k_1t} e^{\int k_2 dt} dt + C_0 \right) \quad (C_0 \text{は積分定数}) \quad \text{式(S2.9)}$$

であるから、初期濃度  $[B]_0 = 0$  とすることで、

$$[B] = \frac{k_1A_0}{k_2 - k_1} \{ \exp(-k_1t) - \exp(-k_2t) \} \quad \text{式(S2.10)}$$

となる。反応待ち時間は生成物の時間変化と等しく

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] = \frac{k_1k_2A_0}{k_2 - k_1} \{ \exp(-k_1t) - \exp(-k_2t) \} \quad \text{式(S2.11)}$$

を得る。2つの反応の時定数をそれぞれ

$$\tau_1 = \frac{1}{k_1}, \quad \tau_2 = \frac{1}{k_2}$$

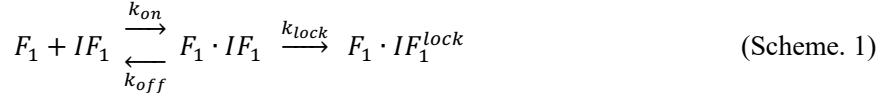
と定義することで、dwell time のヒストグラムは

$$Counts = A \left\{ \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right\} \quad \text{式(S2.12)}$$

でフィッティングすることができる。

### 7.3.3 IF<sub>1</sub> 阻害メカニズムに基づく見た目の阻害定数の導出

IF<sub>1</sub> の 2 段階阻害機構を以下のように表す。



ここで、 $k_{on}$ と $k_{off}$ はF<sub>1</sub>に対するIF<sub>1</sub>の結合・解離の速度定数、 $k_{lock}$ は中間状態から最終阻害状態への異性化過程の速度定数を表す。初期状態F<sub>1</sub>と中間体F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub>は活性を持つが、F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub><sup>lock</sup>は不活性な状態である。第1段階ではIF<sub>1</sub>はF<sub>1</sub>にゆるく結合して中間体を形成する。このあとにIF<sub>1</sub>がF<sub>1</sub>の中に深く突き刺さりF<sub>1</sub>の触媒活性をロックする。

上記の化学反応式に基づき微分方程式を解いていく。各化学種の時間変化は以下のようにならされる。

$$\frac{d[F_1]}{dt} = -k_{on}[F_1][IF_1] + k_{off}[F_1 \cdot IF_1] \quad \text{式(S3.1)}$$

$$\frac{d[F_1 \cdot IF_1]}{dt} = k_{on}[F_1][IF_1] - (k_{off} + k_{lock})[F_1 \cdot IF_1] \quad \text{式(S3.2)}$$

$$\frac{d[F_1 \cdot IF_1^{lock}]}{dt} = k_{lock}[F_1 \cdot IF_1] \quad \text{式(S3.3)}$$

初期状態( $t = 0$ )のとき、F<sub>1</sub>とIF<sub>1</sub>の複合体(F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>・IF<sub>1</sub><sup>lock</sup>)は存在しないと仮定すれば、

$$[F_1 \cdot IF_1^{lock}] = C_0 \frac{2\beta + (\alpha - \beta)e^{-\frac{1}{2}(\alpha+\beta)t} - (\alpha + \beta)e^{-\frac{1}{2}(\alpha-\beta)t}}{2\beta} \quad \text{式(S3.4)}$$

と表される。ここで、

$$\alpha = k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock} \quad \text{式(S3.5)}$$

$$\beta = \sqrt{(k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock})^2 - 4k_{on}[IF_1]k_{lock}} \quad \text{式(S3.6)}$$

とおいた。また、C<sub>0</sub>は定数である。ここで、 $\alpha - \beta \gg 0$ であるから、 $(\alpha - \beta)/2$ と $(\alpha + \beta)/2$ はともに正であることに気を付ける。疑似的にIF<sub>1</sub>阻害がひとつの反応速度定数で表されるとすると、そのタイムコースは $y = A \exp(-k_{inhibition}^{app}t)$ によって表される。また、

$$\frac{\alpha - \beta}{2} - \frac{\alpha + \beta}{2} = -\beta \ll 0 \quad \text{式(S3.7)}$$

であるから、絶対値が小さいのは $(\alpha - \beta)/2$ の方である。最終的に得られる $k_{inhibition}^{app}$ は2つの指数関数の中身から絶対値が小さい方を取ればよく、

$$k_{inhibition}^{app} = \frac{k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock}}{2} \left( 1 - \sqrt{1 - \frac{4k_{on}[IF_1]k_{lock}}{(k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock})^2}} \right) \quad \text{式(S3.8)}$$

である。ここで、

$$\frac{4k_{on}[IF_1]k_{lock}}{(k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock})^2} \ll 1 \quad \text{式(S3.9)}$$

を仮定すれば、マクローリン展開を適用することができるので、

$$k_{inhibition}^{app} \sim \frac{k_{on}[IF_1]k_{lock}}{k_{on}[IF_1] + k_{off} + k_{lock}} = \frac{k_{lock}[IF_1]}{\frac{k_{off} + k_{lock}}{k_{on}} + [IF_1]} \quad \text{式(S3.10)}$$

を得る。

### 7.3.4 Survival Probability と時間の関係を表す減衰指数関数の導出

7.3.2 で求めた数式は、dwell time を集めたヒストグラムに対して適用できるものである。ヒストグラムを用いた時定数の算出は分野を問わず使用されているもっとも一般的な方法ではあるが、ビンサイズの決定により得られる値が若干変動したり、データ数が必要となったりするという問題がある。第4章での1分子計測では survival probability という積算解析法を導入した。これは生データを大きさ順に並び変えて、その結果をすべてプロット、フィッティングをするという方法である。この方法はビンを必要としないため、ビンサイズを気にする必要がなく、実験サンプル数が十分になくともある程度正確な値が得られるというのが利点である。7.3.2 で求めた数式を積分して規格化すればいいだけなので、積分さえできればどのような反応に対しても適用可能である。以下では1段階反応、2段階(逐次)反応の場合について、その数式を導出する。

律速段階が1つの場合、7.3.2 によると

$$y = A_1 \exp(-k_1 t) \quad \text{式(S2.3)}$$

であった。これを積分して全体の面積を1と規格化すると、

$$f(t) = 1 - \exp(-kt) \quad \text{式(S4.1)}$$

となる。今回はデータポイントを小さい方から並び替えるので、

$$\text{Survival probability}(\%) = 100\{1 - f(t)\} = 100 \exp(-kt) \quad \text{式(4.1)}$$

と表される。

一方、逐次反応の場合、

$$y = \frac{k_1 k_2 A_0}{k_2 - k_1} \{ \exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t) \} \quad \text{式(S2.11)}$$

であった。これを積分して全体の面積を1と規格化すると、

$$f(t) = \frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1} \left\{ -\frac{\exp(-k_1 t)}{k_1} + \frac{\exp(-k_2 t)}{k_2} + \frac{k_2 - k_1}{k_1 k_2} \right\} \quad \text{式(S4.2)}$$

となる。したがって、

$$\text{Survival probability}(\%) = 100 \frac{k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)}{k_2 - k_1} \quad \text{式(4.2)}$$

を得る。

## 7.4 Change-Point analysis の概略

Change-Point analysis は粒子のタイムコースの中で、その値が大きく変化した点を変化点(Change-Point)として検出する方法である。本論文では Chun-Biu Li 准教授(ストックホルム大学)によって作成された粒子のステップ解析方法を使用した。

Change-Point 解析では、回転のタイムコースをいくつかの要素に分割し、その中に変化点が存在するかを仮説検定する。すなわち、time  $n$  の間に平均  $\bar{\theta}$  とする分割されたタイムコース  $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_n$  が存在すると仮定した場合に、permutation test(2 つの変数間に関係がないという帰無仮説をもとに比較する検定法)を用いて変化点があるかどうかを逐一判断する。ここで主たる仮説は変化点なし( $H_0$ )であり、もう一方は変化点あり( $H_1$ )である。ここで統計量として以下の CUSUM(cumulative sum; 累積和)を定義する。

$$\text{CUSUM}(t) = \sum_{t'=1}^t (\theta_{t'} - \bar{\theta})$$

この式は平均  $\bar{\theta}$  との角度差を累積したものと解釈できる。CUSUM の総変動量として以下の  $D$  を新たに定義する。

$$D = \max[\text{CUSUM}(t)] - \min[\text{CUSUM}(t)]$$

この値は変化点が存在する可能性が高い場合、より大きな値を持つと考えられる。次に、分割区間内の時間順を無作為に並べ替えて  $D$  の帰無分布を構築した。帰無分布については、ある規定の信頼度(98%)に達したときに帰無仮説が棄却できるとして、その場合に少なくとも 1 つ変化点があると宣言できる。

変化点が存在するとわかったあとに、その存在場所の特定を行う。あるデータ点に対して二乗誤差にもとづき判断し、その値が最も小さい時間点を変化点の場所として特定した。最後に上記の過程をタイムコース全体に対して繰り返して行い、複数の変化点を検出した。より長いタイムコースについては、存在がわかった変化点によって 2 つに分割し、分離されたタイムコースに対して permutation test を行なった。以上の過程を変化点がなくなるまで適用して解析を行なった。

図 7-11(A)と(B)に示すのは ATP $\gamma$ S 1 mM 条件での bMF $_1$ (WT)のタイムコースの例である。Change-Point analysis では 2 つの連続した変化点の間を dwell(停止)として定義し、dwell の位置をそれらの中央値で代表している。生データでは分子特有の揺らぎが確認されるが図 7-11(B)の赤線で示されるように、タイムコース中の揺らぎが除去されてヒストグラムのピークがシャープに確認できることがわかる。その中でも図 7-11(A)の矢印で示されるような、非常に短い停止(約 1 ms)も発見された。しかし、これらは非常に短いために生データ(図 7-11(A))とノイズ除去タイムコース(図 7-11(B))だけでは解析が難しかった。これらを識別するために、以下に示すような Change-Point ヒストグラムを作成した(図 7-11(C))。これは連続する変化点(dwell)の角度の中央値を角度ヒストグラム上にプロットしたものである。ここでは dwell の長さに関わらず、1 つの dwell は 1 つのカウントとして掲載されている。Change-Point ヒストグラムでは 6 つの停止がはっきりと検出できる。



以上のように、Change-point analysis では非常に短い停止点も検出することができる。しかし、この解析中では粒子の状態変化に関連しない、望ましくない変化点も検出することがある。図 7-11(A)の点線に示されるように、長い停止が2つの短い要素に分断されるようなことが時々起きる。これによって停止の長さが短く見積もられることがあるため、このような変化点は取り除く必要がある。余分な変化点を除去するため、Change-Point analysis では以下のような Clean-up 過程を備え付けてある。

検出した隣り合う変化点の中央値を $\tilde{\theta}_1, \tilde{\theta}_2, \tilde{\theta}_3, \dots$ と仮定する。さらに、中央値の絶対偏差を MAD と書くことにする。 $n$  個のデータ点を持つ  $a$  番目の変化点までの MAD を $M_a$ と書くことにして、これを

$$M_a = \text{Median}(|\theta_1 - \tilde{\theta}_a|, |\theta_2 - \tilde{\theta}_a|, \dots, |\theta_n - \tilde{\theta}_a|)$$

で定義する。ここで $\tilde{\theta}_a$ はこの区間全体の中央値を表すものとする。 $M_a$ は dwell の角度の変化量を定量化した変数として捉えられる。2つの連続した変化点区間の角度変化が小さい場合、その変化点では「角度変化は起こっていない」とみなすことができる。具体的にいえば、

$$|\tilde{\theta}_a - \tilde{\theta}_{a+1}| < A \cdot (M_a + M_{a+1})$$

となる場合に変化点が除去されることになる。ここで $A$ は一種の制御変数のようなもので、変化点をより取り除くか、そのまま維持するかを調整できるパラメータである。 $A$ が大きい場合はより多くの変化点を除去することになる。

Clean-up 過程ではあまりに多くの変化点を除去しすぎないように、 $A$ の値を0から代入していったその変化点の除去程度を調べていった。ある $A$ の値によって除去される変化点が定まると、残された変化点によって再度 dwell やその中央角度位置などが決定され、変化点が除去されていないもともとのタイムコースとの二乗誤差を計算した。この操作を異なる $A$ の値によって繰り返していき、二乗誤差を $A$ の関数として表示した(図 7-11(D))。  $A$ の値が小さいもともとの状態と違いは少ないため、除去される変化点の個数も少なく、二乗誤差の値も小さい。しかし、 $A$ の値がある一定の値まで上昇すると、「望ましくない変化点」だけでなく、「粒子の状態変化に伴う本当の変化点」まで除去されることになる。結果として、二乗誤差の値も急激に上昇する。本論文では $A$ の値を二乗誤差が急激に上昇する直前として定義した。その値は0.8~1.2程度であった。

望ましくない Clean-up を除去したあとに再度 Change-Point ヒストグラムを描いた(図 7-11(E))。これと Clean-up 前の Change-Point ヒストグラム(図 7-11(C))を比較すると、ピークがさらにシャープになり6つの停止点がより明確に分離できていることがわかる。以上の過程により、*short dwell/pause* が明確に検出できた。

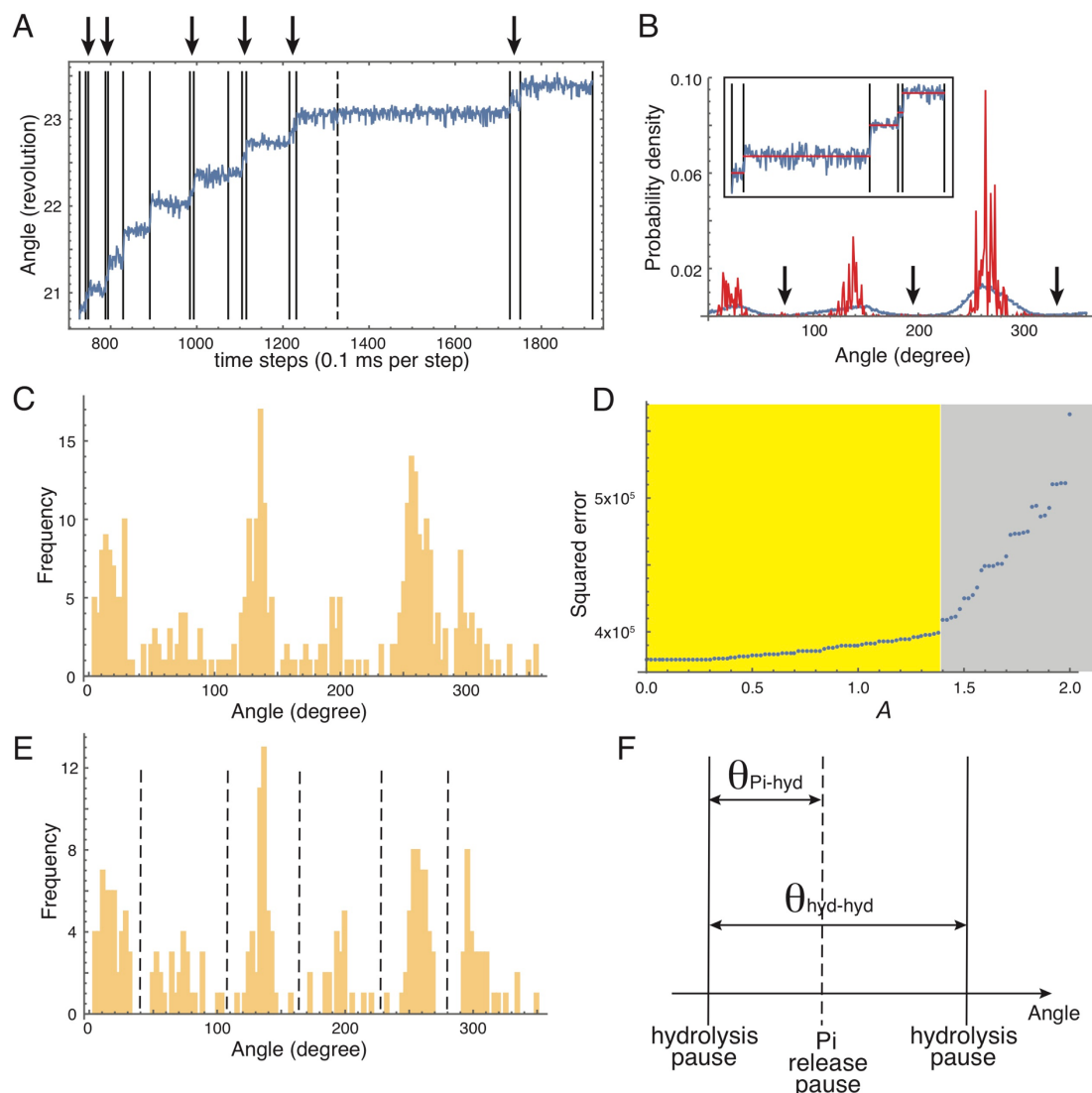


図 7-11 Change-Point 解析による停止数とステップサイズの決定方法

(A) タイムコースの例と Change-Point の検出(Clean-up 前)。矢印は *short dwell* を示している。実線と破線はともに Change-Point の角度位置を表しているが、破線は Clean-up によって取り除かれる望ましくない(誤検出された)Change-Point である。(B) 生データ(青)と各停止を中央値で表してできるヒストグラム(赤)。矢印は *short dwell* を表しているが、非常に短くヒストグラム中では観察できない。インセットはタイムコースの例を示している。(C) Change-Point 間の角度位置を表したヒストグラム(本文中、Change-Point ヒストグラム)。Dwell の長さは関係なく、Change-Point によって区切られる停止位置が 1 カウントとして表示されている。6 つの停止が観察されるようになった。(D) Clean-up で除去する Change-Point の数を決定するために A の関数としてプロットされた二乗誤差。黄色の領域は望ましくない Change-Point が除去された領域、灰色の領域は真の Change-Point も除去されてしまった領域を表している。(E) Clean up 後の Change-Point ヒストグラム。破線で示されるように 6 つの停止点が明確に分離できる。(F) *Long dwell* と *short dwell* の角度差の決定。粒子の特性や観察面の傾きなどにより、 $\theta_{\text{long-long}}$  は必ず  $120^\circ$  になるわけではないので、 $\theta_{\text{short-long}}/\theta_{\text{long-long}}$  の比をもとに角度差を算出した。

## 参考文献

1. Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. & Bhattarai, H. K. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol. Concepts* **10**, 1–10 (2019).
2. Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. & Dimroth, P. Structure of the rotor ring of F-type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* (80-. ). **308**, 659–662 (2005).
3. Pogoryelov, D., Yildiz, Ö., Faraldo-Gómez, J. D. & Meier, T. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1068–1073 (2009).
4. Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16823–16827 (2010).
5. Saroussi, S., Schushan, M., Ben-Tal, N., Junge, W. & Nelson, N. Structure and Flexibility of the C-Ring in the Electromotor of Rotary F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase of Pea Chloroplasts. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
6. Preiss, L. *et al.* The c-ring ion binding site of the ATP synthase from *Bacillus pseudofirmus* OF4 is adapted to alkaliphilic lifestyle. *Mol. Microbiol.* **92**, 973–984 (2014).
7. Preiss, L. *et al.* Structure of the mycobacterial ATP synthase F<sub>0</sub> rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci. Adv.* **1**, 1–9 (2015).
8. Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 13231–13236 (2015).
9. Guo, H., Suzuki, T. & Rubinstein, J. L. Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife* **8**, e43128 (2019).
10. Allegretti, M. *et al.* Horizontal membrane-intrinsic α-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature* **521**, 237–240 (2015).
11. Noji, H., Ueno, H. & Kobayashi, R. Correlation between the numbers of rotation steps in the ATPase and proton-conducting domains of F- and V-ATPases. *Biophys. Rev.* 303–307 (2020) doi:10.1007/s12551-020-00668-7.
12. Walker, J. E., Runswick, M. J. & Saraste, M. Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPases. *FEBS Lett.* **146**, 393–396 (1982).
13. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
14. Boyer, D. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* **3**, 2164–2178 (1989).
15. SILVERMAN, M. & SIMON, M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**, 73–74 (1974).
16. Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-

- ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621–628 (1994).
17. Komoriya, Y. *et al.* Principal role of the arginine finger in rotary catalysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **287**, 15134–15142 (2012).
  18. Yang, W., Gao, Y. Q., Cui, Q., Ma, J. & Karplus, M. The missing link between thermodynamics and structure in F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 874–879 (2003).
  19. Dittrich, M., Hayashi, S. & Schulten, K. ATP hydrolysis in the  $\beta_{TP}$  and  $\beta_{DP}$  catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophys. J.* **87**, 2954–2967 (2004).
  20. Hayashi, S. *et al.* Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by molecular simulations and single-molecule observations. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8447–8454 (2012).
  21. Watanabe, R., Matsukage, Y., Yukawa, A., Tabata, K. V & Noji, H. Robustness of the rotary catalysis mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **289**, 19331–19340 (2014).
  22. Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L. & Cross, R. L. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10964–10968 (1995).
  23. Sabbert, D., Engelbrecht, S. & Junge, W. Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* vol. 381 623–625 (1996).
  24. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinoshita, K. Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **386**, 299–302 (1997).
  25. Enoki, S. *et al.* High-speed angle-resolved imaging of a single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision. *Anal. Chem.* **87**, 2079–2086 (2015).
  26. Ueno, H. *et al.* Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys. J.* **98**, 2014–2023 (2010).
  27. Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita Jr., K. & Yoshida, M. F<sub>1</sub>-ATPase Is a Highly Efficient Molecular Motor that Rotates with Discrete 120° Steps. *Cell* **93**, 1117–1124 (1998).
  28. Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Jr, K. K. & Itoh, H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* vol. 410 (2001).
  29. Shimabukuro, K. *et al.* Catalysis and rotation of F<sub>1</sub> motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 substep rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14731–14736 (2003).
  30. 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.* **14**, 841–846 (2007).
  31. Nishizaka, T. *et al.* Chemomechanical coupling in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 142–148 (2004).
  32. Adachi, K. *et al.* Coupling of Rotation and Catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation. *Cell* **130**, 309–321 (2007).
  33. Adachi, K., Oiwa, K., Yoshida, M., Nishizaka, T. & Jr, K. K. Controlled rotation of the F<sub>1</sub>-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nat. Commun.* **3**, 1012–1022 (2012).

34. Iida, T. *et al.* Single-molecule analysis reveals rotational substeps and chemo-mechanical coupling scheme of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **294**, 17017–17030 (2019).
35. Watanabe, R., Iino, R. & Noji, H. Phosphate release in F<sub>1</sub>-ATPase catalytic cycle follows ADP release. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 814–820 (2010).
36. Hirano-Hara, Y. *et al.* Pause and rotation of F<sub>1</sub>-ATPase during catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13649–13654 (2001).
37. Watanabe, R. & Noji, H. Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein. *Nat. Commun.* **5**, 1–7 (2014).
38. Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K. & Noji, H. Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **427**, 465–468 (2004).
39. Rondelez, Y. *et al.* Highly coupled ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase single molecules. *Nature* **433**, 773–777 (2005).
40. Hirano-hara, Y., Ishizuka, K., Kinoshita, K., Yoshida, M. & Noji, H. Activation of pausing F<sub>1</sub> motor by external force. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 1–6 (2005).
41. Iko, Y., Tabata, K. V., Sakakihara, S., Nakashima, T. & Noji, H. Acceleration of the ATP-binding rate of F<sub>1</sub>-ATPase by forcible forward rotation. *FEBS Lett.* **583**, 3187–3191 (2009).
42. Watanabe, R. *et al.* Mechanical modulation of catalytic power on F<sub>1</sub>-ATPase. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 86–92 (2012).
43. Steel, B. C. *et al.* Comparison between single-molecule and X-ray crystallography data on yeast F<sub>1</sub>-ATPase. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
44. Suzuki, T. *et al.* Expression of mammalian mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase in *Escherichia coli* depends on two chaperone factors, AF1 and AF2. *FEBS Open Bio* **6**, 1267–1272 (2016).
45. Suzuki, T., Tanaka, K., Wakabayashi, C., Saita, E. I. & Yoshida, M. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase motor. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 930–936 (2014).
46. Bilyard, T. *et al.* High-resolution single-molecule characterization of the enzymatic states in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20120023–20120023 (2012).
47. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8646–8649 (2006).
48. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Ground state structure of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **282**, 14238–14242 (2007).
49. Okazaki, K. I. & Takada, S. Structural comparison of F<sub>1</sub>-ATPase: Interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations. *Structure* **19**, 588–598 (2011).
50. Bason, J. V., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How release of phosphate from mammalian F<sub>1</sub>-ATPase generates a rotary substep. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 6009–6014 (2015).
51. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How the regulatory protein,

- IF<sub>1</sub>, inhibits F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15671–15676 (2007).
52. McMillan, D. G. G., Watanabe, R., Cook, G. M., Ueno, H. & Noji, H. Biophysical Characterization of a Thermoalkaliphilic Molecular Motor with a High Stepping Torque Gives Insight into Evolutionary ATP Synthase Adaptation. *J. Biol. Chem.* **291**, 23965–23977 (2016).
  53. Spetzler, D. *et al.* Single molecule measurements of F<sub>1</sub>-ATPase reveal an interdependence between the power stroke and the dwell duration. *Biochemistry* **48**, 7979–7985 (2009).
  54. Uhlin, U., Cox, G. B. & Guss, J. M. Crystal structure of the  $\epsilon$  subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure* **5**, 1219–1230 (1997).
  55. Xiong, H., Zhang, D. & Vik, S. B. Subunit  $\epsilon$  of the *Escherichia coli* ATP synthase: Novel insights into structure and function by analysis of thirteen mutant forms. *Biochemistry* **37**, 16423–16429 (1998).
  56. Kuki, M., Noumi, T., Maeda, M., Amemura, A. & Futai, M. Functional domains of epsilon subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>). *J. Biol. Chem.* **263**, 17437–17442 (1988).
  57. Nowak, K. F., Tabidze, V. & McCarty, R. E. The C-terminal domain of the  $\epsilon$  subunit of the chloroplast ATP synthase is not required for ATP synthesis. *Biochemistry* **41**, 15130–15134 (2002).
  58. Feniouk, B. A., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M. & Suzuki, T. Conformational transitions of subunit  $\epsilon$  in ATP synthase from thermophilic bacillus PS3. *Biophys. J.* **98**, 434–442 (2010).
  59. Watanabe, R., Genda, M., Kato-Yamada, Y. & Noji, H. Essential Role of the  $\epsilon$  Subunit for Reversible Chemo-Mechanical Coupling in F<sub>1</sub>-ATPase. *Biophys. J.* **114**, 178–187 (2018).
  60. Iino, R. *et al.* Real-time monitoring of conformational dynamics of the  $\epsilon$  subunit in F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **280**, 40130–40134 (2005).
  61. Feniouk, B. A. & Junge, W. Regulation of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase: The conformation of subunit  $\epsilon$  might be determined by directionality of subunit  $\gamma$  rotation. *FEBS Lett.* **579**, 5114–5118 (2005).
  62. Cingolani, G. & Duncan, T. M. Structure of the ATP synthase catalytic complex (F<sub>1</sub>) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 701–707 (2011).
  63. Saita, E. I. *et al.* Activation and stiffness of the inhibited states of F<sub>1</sub>-ATPase probed by single-molecule manipulation. *J. Biol. Chem.* **285**, 11411–11417 (2010).
  64. Krah, A., Zarco-Zavala, M. & McMillan, D. G. G. Insights into the regulatory function of the  $\epsilon$  subunit from bacterial F-type ATP synthases: A comparison of structural, biochemical and biophysical data. *Open Biol.* **8**, 1–11 (2018).
  65. Feniouk, B. A., Suzuki, T. & Yoshida, M. Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit  $\epsilon$  in bacterial ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **282**, 764–772 (2007).
  66. Nelson, N., Nelson, H. & Racker, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **247**, 7657–7662 (1972).
  67. Sternweis, P. C. & Smith, J. B. Characterization of the Inhibitory ( $\epsilon$ ) Subunit of the Proton-

- Translocating Adenosine Triphosphatase from Escherichia Coli. *Biochemistry* **19**, 526–531 (1980).
68. Kato, Y. *et al.* Thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase is activated without dissociation of an endogenous inhibitor,  $\epsilon$  subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 24906–24912 (1997).
  69. Kato-Yamada, Y. & Yoshida, M. Isolated  $\epsilon$  subunit of thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase binds ATP. *J. Biol. Chem.* **278**, 36013–36016 (2003).
  70. Yagi, H. *et al.* Structures of the thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase  $\epsilon$  subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11233–11238 (2007).
  71. Kato-Yamada, Y. Isolated  $\epsilon$  subunit of Bacillus subtilis F<sub>1</sub>-ATPase binds ATP. *FEBS Lett.* **579**, 6875–6878 (2005).
  72. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15651–15656 (2009).
  73. Yaginuma, H. *et al.* Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
  74. Cipriano, D. J. & Dunn, S. D. The role of the  $\epsilon$  subunit in the Escherichia coli ATP synthase: The C-terminal domain is required for efficient energy coupling. *J. Biol. Chem.* **281**, 501–507 (2006).
  75. Hahn, A., Vonck, J., Mills, D. J., Meier, T. & Kühlbrandt, W. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science (80-. ).* **360**, (2018).
  76. Hisabori, T., Ueoka-Nakanishi, H., Konno, H. & Koyama, F. Molecular evolution of the modulator of chloroplast ATP synthase: Origin of the conformational change dependent regulation. *FEBS Lett.* **545**, 71–75 (2003).
  77. Nalin, C. M. & McCarty, R. E. Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **259**, 7275–7280 (1984).
  78. Miki, J., Maeda, M., Mukohata, Y. & Futai, M. The  $\gamma$ -subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence. *FEBS Lett.* **232**, 221–226 (1988).
  79. Werner-Grüne, S., Gunkel, D., Schumann, J. & Strotmann, H. Insertion of a ‘chloroplast-like’ regulatory segment responsible for thiol modulation into  $\gamma$ -subunit of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase of the cyanobacterium Synechocystis 6803 by mutagenesis of *atpC*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **244**, 144–150 (1994).
  80. Akiyama, K. *et al.* The  $\beta$ -hairpin region of the cyanobacterial F<sub>1</sub>-ATPase  $\gamma$ -subunit plays a regulatory role in the enzyme activity. *Biochem. J.* **476**, 1771–1780 (2019).
  81. PULLMAN, M. E. & MONROY, G. C. a Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762–3769 (1963).
  82. ICHIKAWA, N., USHIDA, S., KAWABATA, M. & MASAZUMI, Y. Nucleotide Sequence of cDNA Coding the Mitochondrial Precursor Protein of the ATPase Inhibitor from Humans. *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem.* **63**, 2225–2227 (1999).
83. Ebner, E. & Maier, K. L. A protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase (F<sub>1</sub>) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**, 671–676 (1977).
  84. Harris, D. A. & Crofts, A. R. The initial stages of photophosphorylation. Studies using excitation by saturating, short flashes of light. **502**, 87–102 (1978).
  85. NORLING, B., TOURIKAS, C., HAMASUR, B. & GLASER, E. Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria: Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **188**, 247–252 (1990).
  86. Chimeo, C., Fernandez-Gimenez, A. V., Campanella, M., Mendez-Romero, O. & Muhlia-Almazan, A. The shrimp mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase inhibitory factor 1 (IF<sub>1</sub>). *J. Bioenerg. Biomembr.* **47**, 383–393 (2015).
  87. Mukherjee, S. & Warshel, A. Dissecting the role of the  $\gamma$ -subunit in the rotary-chemical coupling and torque generation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2746–2751 (2015).
  88. Varghese, F., Blaza, J. N., Jones, A. J. Y., Jarman, O. D. & Hirst, J. Deleting the IF<sub>1</sub>-like  $\zeta$  subunit from *Paracoccus denitrificans* ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biol.* **8**, (2018).
  89. Zarco-Zavala, M. *et al.* The 3 × 120° rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans* F<sub>1</sub>-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 202003163 (2020) doi:10.1073/pnas.2003163117.
  90. Cabezón, E., Arechaga, I., Butler, P. J. G. & Walker, J. E. Dimerization of bovine F<sub>1</sub>-ATPase by binding the inhibitor protein, IF<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* **275**, 28353–28355 (2000).
  91. MATSUBARA, H., HASE, T., HASHIMOTO, T. & TAGAWA, K. Amino Acid Sequence of an Intrinsic Inhibitor of Mitochondrial ATPase from Yeast. *J. Biochem.* **90**, 1159–1165 (1981).
  92. Ichikawa, N. & Ogura, C. Overexpression, Purification, and Characterization of Human and Bovine Mitochondrial ATPase Inhibitors: Comparison of the Properties of Mammalian and Yeast ATPase Inhibitors. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 399–407 (2003).
  93. Van Raaij, M. J. *et al.* The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: The minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* **35**, 15618–15625 (1996).
  94. Gordon-Smith, D. J. *et al.* Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from Bovine IF<sub>1</sub>: The inhibitor protein of F<sub>1</sub> ATPase. *J. Mol. Biol.* **308**, 325–339 (2001).
  95. Cabezon, E., Butler, P. J. G., Runswick, M. J. & Walker, J. E. Modulation of the oligomerization state of the bovine F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein, IF<sub>1</sub>, by pH. *J. Biol. Chem.* **275**, 25460–25464 (2000).
  96. Clyde Gibbons, Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. The structure of the central stalk in bovine F<sub>1</sub>-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055–1061 (2000).
  97. Bason, J. V., Runswick, M. J., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. Binding of the inhibitor protein IF<sub>1</sub>



- to bovine F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Mol. Biol.* **406**, 443–453 (2011).
98. Weidemann, M. J., Erdelt, H. & Klingenberg, M. Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria Identification of Carrier Sites. *Eur. J. Biochem.* **16**, 313–335 (1970).
  99. STADT, R. J. VAN DE, BOER, B. L. DE & DAM, K. VAN. THE INTERACTION BETWEEN THE MITOCHONDRIAL ATPase (F<sub>1</sub>) AND THE ATPase INHIBITOR. *BBA* **292**, 338–349 (1973).
  100. Cintrón, N. M., Hullihen, J., Schwerzmann, K. & Pedersen, P. L. Proton-Adenosinetriphosphatase Complex of Rat Liver Mitochondria: Effect of Its Inhibitory Peptide on Adenosine 5'-Triphosphate Hydrolytic and Functional Activities of the Enzyme. *Biochemistry* **21**, 1878–1885 (1982).
  101. Gomez-Fernandez, J. C. & Harris, D. A. A thermodynamic analysis of the interaction between the mitochondrial coupling adenosine triphosphatase and its naturally occurring inhibitor protein. *Biochem. J.* **176**, 967–975 (1978).
  102. Milgrom, Y. M. An ATP Dependence of Mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase Inactivation by the Natural Inhibitor Protein Agrees With the Alternating-Site Binding-Change Mechanism. *FEBS Lett.* **246**, 202–206 (1989).
  103. Klein, G., Satre, M. & Vignais, P. Natural Protein ATPase Inhibitor From *Candida Utilis* Mitochondria. Binding Properties of the Radiolabeled Inhibitor. *FEBS Lett.* **84**, 129–134 (1977).
  104. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C. & Vignais, P. V. Radiolabeling of Natural Adenosine Triphosphatase Inhibitor with Phenyl[<sup>14</sup>C] Isothiocyanate and Study of its Interaction with Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. Localization of Inhibitor Binding Sites and Stoichiometry of Binding. *Biochemistry* **19**, 2919–2925 (1980).
  105. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C. & Vignais, P. V. Photoaffinity Labeling of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase by an Azido Derivative of the Natural Adenosine Triphosphatase Inhibitor. *Biochemistry* **20**, 1339–1344 (1981).
  106. Wong, S. Y., Galante, Y. M. & Hatefi, Y. Equilibrium Binding of <sup>125</sup>I-Labeled Adenosinetriphosphatase Inhibitor Protein to Complex V of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. *Biochemistry* **21**, 5781–5787 (1982).
  107. HASHIMOTO, T., NEGAWA, Y. & TAGAWA, K. Binding of Intrinsic ATPase Inhibitor to Mitochondrial ATPase-Stoichiometry of Binding of Nucleotides, Inhibitor, and Enzyme. *J. Biochem.* **90**, 1151–1157 (1981).
  108. HARRIS, D. A. *et al.* Interaction between the soluble F<sub>1</sub> ATPase and its naturally occurring inhibitor protein. *Eur. J. Biochem.* **157**, 181–186 (1986).
  109. García-Bermúdez, J. & Cuezva, J. M. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF<sub>1</sub>): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857**, 1167–1182 (2016).
  110. García-Aguilar, A. & Cuezva, J. M. A review of the inhibition of the mitochondrial ATP synthase

- by IF<sub>1</sub> in vivo: Reprogramming energy metabolism and inducing mitohormesis. *Front. Physiol.* **9**, 1–10 (2018).
111. Esparza-Moltó, P. B., Nuevo-Tapióles, C. & Cuezva, J. M. Regulation of the H<sup>+</sup>-ATP synthase by IF<sub>1</sub>: a role in mitohormesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2151–2166 (2017).
  112. García-Bermúdez, J. *et al.* PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP Synthase. *Cell Rep.* **12**, 2143–2155 (2015).
  113. Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. The structure of bovine F<sub>1</sub>-ATPase in complex with its regulatory protein IF<sub>1</sub>. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744–750 (2003).
  114. Bason, J. V., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11305–11310 (2014).
  115. Corvest, V., Sigalat, C. & Haraux, F. Insight into the bind-lock mechanism of the yeast mitochondrial ATP synthase inhibitory peptide. *Biochemistry* **46**, 8680–8688 (2007).
  116. Corvest, V. *et al.* The binding mechanism of the yeast F<sub>1</sub>-ATPase inhibitory peptide: Role of catalytic intermediates and enzyme turnover. *J. Biol. Chem.* **280**, 9927–9936 (2005).
  117. Li, C. B., Ueno, H., Watanabe, R., Noji, H. & Komatsuzaki, T. ATP hydrolysis assists phosphate release and promotes reaction ordering in F<sub>1</sub>-ATPase. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
  118. Okuno, D. *et al.* Correlation between the conformational states of F<sub>1</sub>-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20722–7 (2008).
  119. Okuno, D., Iino, R. & Noji, H. Stiffness of  $\gamma$  subunit of F<sub>1</sub>-ATPase. *Eur. Biophys. J.* **39**, 1589–1596 (2010).
  120. Tirtom, N. E., Okuno, D., Nakano, M., Yokoyama, K. & Noji, H. Mechanical modulation of ATP-binding affinity of V<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **288**, 619–623 (2013).
  121. 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.* **108**, 17951–17956 (2011).
  122. Nakayama, Y. & Toyabe, S. Kinetic ratchet mechanism of ATP synthase circumvents rectification trade-off for inhibiting futile ATP consumption. *arXiv* arXiv:2008.07106 [physics.bio-ph] (2020).
  123. Shimabukuro, K., Muneyuki, E. & Yoshida, M. An alternative reaction pathway of F<sub>1</sub>-ATPase suggested by rotation without 80°/40° substeps of a sluggish mutant at Low ATP. *Biophys. J.* **90**, 1028–1032 (2006).
  124. Watanabe, R., Minagawa, Y. & Noji, H. Thermodynamic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase rotary catalysis using high-speed imaging. *Protein Sci.* **23**, 1773–1779 (2014).
  125. Sekiya, M., Nakamoto, R. K., Al-Shawi, M. K., Nakanishi-Matsui, M. & Futai, M. Temperature dependence of single molecule rotation of the Escherichia coli ATP synthase F<sub>1</sub> sector reveals the

- importance of  $\gamma$ - $\beta$  subunit interactions in the catalytic dwell. *J. Biol. Chem.* **284**, 22401–22410 (2009).
126. Al-Shawi, M. K., Parsonage, D. & Senior, A. E. Thermodynamic Analyses of the Catalytic Pathway of F<sub>1</sub>-ATPase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **265**, 4402–4410 (1990).
127. Watanabe, R., Hayashi, K., Ueno, H. & Noji, H. Catalysis-enhancement via rotary fluctuation of F<sub>1</sub>-atpase. *Biophys. J.* **105**, 2385–2391 (2013).

## 研究業績

### 1. 学術雑誌(査読あり)

- (1) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Chun-Biu Li, and Hiroyuki Noji. “Rotary catalysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase studied by single-molecule experiments”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117 (3), 1447-1456 (2020)
- (2) Ryohei Kobayashi, Sougo, Mori, Hiroshi Ueno, and Hiroyuki Noji. “Kinetic analysis of the inhibition mechanism of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitory protein using biochemical assay”, *Journal of Biochemistry (under revision)*
- (3) Ryohei Kobayashi, Sougo, Mori, Hiroshi Ueno, and Hiroyuki Noji. (*in preparation*)

### 2. 英語総説 (査読あり)

- (1) Hiroyuki Noji, Hiroshi Ueno, and Ryohei Kobayashi, “Correlation between the numbers of rotation steps in the ATPase and proton-conducting domains of F- and V-ATPases”, *Biophysical Review*, 12, 303-307 (2020)

### 3. 国際学会・シンポジウムにおける発表

- (1) Ryohei Kobayashi, Sadao Ota, and Hiroyuki Noji, “Digital bioassay in digital microfluidic platform”, International Conference on Single Cell Research 2016 Tokyo, Ito International Research Center (Tokyo) (2016.11, Poster)
- (2) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, and Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states”, 20<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference, Semmelweis University (Hungary) (2018.8, Poster)
- (3) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Chun-Biu Li, and Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for the direct assignment of crystal structures to the rotational pausing states”, 2<sup>nd</sup> Tokyo ATPase Workshop, Sanjo Conference Hall (Tokyo) (2019.9, Oral)

### 4. 国内学会における発表

- (1) Ryohei Kobayashi, Sadao Ota, and Hiroyuki Noji, “Digital bioassay in digital microfluidic platform (デジタルマイクロ流体技術を用いたデジタルバイオアッセイ)” (1P301), 日本生物物理学会第54回年会, 茨城県つくば市 つくば国際会議場, 2016年11月(ポスター発表)
- (2) 小林稜平, 上野博史, 鈴木俊治, 原舞雪, 野地博行, 「Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states

(結晶構造との対応付けを目指したミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の 1 分子回転解析)」、第 3 回 THE TOKYO Molecular Motor Show、立教大学、2017 年 3 月(口頭発表)

- (3) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Mayu Hara, and Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states (結晶構造との対応付けを目指したウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の回転解析)” (1P-078), 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 宮城県仙台市 仙台国際センター, 2017 年 6 月(ポスター発表)
- (4) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Mayu Hara, and Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states (結晶構造との対応付けを目指したウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の回転解析)”(1B1450\*), 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本県熊本市 熊本大学, 2017 年 9 月(口頭発表)
- (5) 小林稜平、上野博史、鈴木俊治、原舞雪、野地博行、「Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states (結晶構造との対応付けを目指したウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の 1 分子回転解析)」、第 5 回 THE TOKYO Molecular Motor Show、東京大学、2018 年 3 月(口頭発表)
- (6) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Mayu Hara, and Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase for direct assignment of crystal structures and rotational pausing states (結晶構造との対応付けを目指したウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の回転解析)” (2E1424), 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山県岡山市 岡山大学, 2018 年 9 月 (口頭発表)
- (7) Ryohei Kobayashi, Hiroshi Ueno, an Hiroyuki Noji, “Single-molecule analysis of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase (ウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の一分子回転解析)” (1Pos127), 第 57 回日本生物物理学会年会, 宮崎県山崎町 シーガイアコンベンションセンター, 2019 年 9 月 (ポスター発表)
- (8) Ryohei Kobayashi, Sougo Mori, Hiroshi Ueno, and Hiroyuki Noji, “Elucidation of inhibition mechanism by IF<sub>1</sub>, a natural inhibitor protein for bovine mitochondrial ATP synthase (ウシミトコンドリア由来 ATP 加水分解酵素における阻害因子 IF<sub>1</sub> の阻害機構解明)” (20194G), 第 58 回日本生物物理学会年会, オンライン開催, 2020 年 9 月(ポスター発表)
- (9) Ryohei Kobayashi, “Biochemical assay and single-molecule analysis revealed the inhibition mechanism of the Bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase Inhibitory protein (生化学実験と 1 分子回転解析によるウシミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase 内在性阻害因子 IF<sub>1</sub> の阻害機構解明)” (034), 第 20 回東京大学生命科学シンポジウム, オンライン開催, 2020 年 10 月(ポスター発表)

他、共著者の発表が 9 件

## 5. その他

- (1) 第 17 回日本蛋白質科学会年会 ポスター賞 受賞、2017 年 6 月
- (2) 第 55 回日本生物物理学会年会」学生発表賞 受賞、2017 年 9 月

## 謝辞

博士論文を執筆するにあたり、多くの方々の手助けをいただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

まず、指導教員である野地博行教授にお礼申し上げます。F<sub>1</sub> 研究の第一人者の野地教授のアドバイスは的確で、そのおかげで円滑な研究を行うことができました。論文執筆の際にはその英語表現、読者に配慮した論の展開、revise への対応など修正された原稿を見て学ぶことが多くありました。私が博士課程で研究を続けたいと思った理由のひとつに、自分の研究を自分でまとめて原著論文を書いてみたいという考えがありました。論文を執筆しながら行ったやりとりは苦しくもありましたが、博士課程に進学して得られた能力のひとつであることは間違いありません。その一方で研究面だけでなく、私の実家の事情を配慮して生活面でも細やかに声掛けいただきました。大変お世話になりました。

上野博史助教には実験を行うときのサポートでお世話になりっぱなしでした。生化学実験のプロである上野さんには何を聞いても答えが返ってきたような気がします。早く上野さんレベルの知識と技術を習得したいと思います。田端和仁准教授には奨学金などの事務的な情報をいち早く教えていただき大変助かりました。今後の進路についてもそう段差 s ていただきました。小林美加特任講師と実験中のふとした会話で教えていただくことも多く、私自身の知見が広がりました。渡邊力也講師(現、理化学研究所主任研究員)には実験のコツやデータの解釈などを細かに教えていただきました。曾我直樹助教(現、トヨタ自動車株式会社)には頻繁にプライベートな相談に乗っていただきました。ラボ生活の心の支えでした。

佐久間守仁研究員(現、ブリティッシュコロンビア大学)は今後の進路を常に心配してくださり、学会や公募の情報を提供してくださいました。鈴木俊治主幹研究員(現、東京工業大学)からは bMF<sub>1</sub> のプラスミドを提供していただき、研究開始直後に F<sub>1</sub> 研究の初歩を教えてくださいました。太田禎生さがけ研究員(現、東京大学先端科学技術研究センター)には学部時代の研究でお世話になり、研究姿勢と発表スタイルの基礎を教わりました。Marielit Zarco 博士研究員とは一緒に F<sub>1</sub> の研究を作り上げていくために、普段の実験や解析でお互いに助け合いながら研究させていただきました。赤間健司さん(現、シスメックス株式会社)が企業研究のイロハや数多くのプロジェクトをまとめる過程についてお話を伺いました。森泉芳樹さん(現、アボットジャパン株式会社)は私が研究生活をはじめたときから親しくさせていただき感謝しています。みなさんからは、先輩研究者としての研究に対する取り組み、考え方を学びました。

秘書の太田希久代さんには研究室でのほとんどすべての事務手続きをお願いしてしまいました。私的な相談も含めて太田さんがいらっしやらなかったらこの 3 年間は乗り越えられなかったと思います。今後ともよろしくお願いします。学術支援専門職員の高久春雄さんには Tokyo ATPase Workshop の書類の準備で大変お世話になりました。技術補佐員のみな

さん、特に原舞雪さんと小野真菜さんには実験手法を細かに教えていただく機会も多く、本当に助かりました。

学生のみなさんとは、ときに研究に取り組む仲間として、ときに年齢が近い友達や先輩・後輩の関係として長い時間を過ごしてきました。博士課程に入って先輩として過ごす時間が増えましたが、先輩らしいことはほとんどできませんでした。それでも、こんな人間の雑談を聞いてくれて僕自身の気分転換になりました。同僚と何かを一緒に作り上げていく創作活動自体が好きな私にとって、みなさんと話し合いながら考える時間は貴重なものでした。最終年度、コロナ禍で自由に話ができない環境は苦痛でしたが、みなさんが研究を頑張る姿は私自身がもうひと踏ん張りしようと思えるいちばん身近なきっかけでした。本田信吾さんとは頻繁に研究の相談させていただきました。酸いも甘いも経験した人生の先輩としてのアドバイス、そして苦楽をともにする博士課程の学生としての共感は本当に励みになりました。渡邊亮くんは直属の後輩として実験の話を数えきれないほどしました。勉強熱心で、結晶構造や理論計算の話を何度も教わりました。本田さん、渡邊亮くん、次はおふたりの番です。がんばってください。

野地研究室外のみなさんにもお世話になった方がたくさんいます。特に Chun-Biu Li 准教授(ストックホルム大学)には基本的な統計とデータ解析について教えていただきました。ウェブミーティングだけではなく、博士課程 1 年次には実際に研究室にもお邪魔させていただきました。有益な研究のディスカッションができただけでなくスウェーデンの観光にもお付き合いいただきました。博士課程在学中の思い出のひとつです。一緒に行っていた研究が論文化できてほっとしております。

博士課程では東京大学生命科学技術国際卓越大学院プログラム(WINGS-LST)に参加させていただきました。医・薬・理・工の分野から学生が集まって行うミーティングでは、年齢が近いのにこんなにすごい学生がいるのかと圧倒されることもしばしばでした。同時に、自分も頑張らなくてはとモチベーションの維持にもつながり、大変いい経験になりました。そして卓越大学院プログラムから支給される奨学金により、博士課程の 3 年間を生活することができました。

そして、学部時代からサークル活動も合わせて 9 年間一緒だった野田悠太くんには感謝してもしきれません。いつも私が愚痴っているのを軽いツッコミを入れながら聞いてくれました。そんなやりとりをしていると不思議と嫌な気持ちも薄れていくような気がしました。今後は選ぶ道が異なりますが、各々の道で全力を尽くしましょう。そしてまた一緒に高校野球を見に行きましょう。

このように謝辞を書きながら 3 年前の修士論文を見返してみると、「周りに流されない、正しい研究をやっていきます」と宣言していました。その点に関しては胸を張って宣言を守れたといえます。それに修士時代では経験・習得できない能力も身につけられたと思います。一般に博士課程では自らの研究においては世界でいちばん詳しくなるものだと言われます。



しかし、この3年間を経ても野地教授を超えられたとは到底思えません。さらに、周囲の研究者に比べるとどうしてもまだ意識・意欲・知識・技能などそのすべての点で研究者として足りていないように感じてしまいます。その能力差を実感しながら生きていくのは大変ではありますが、上を目指して頑張りたいと思います。

最後に9年間の学生生活を支えてくれた両親に感謝します。修士2年の4月に博士課程に進学したいと電話で話したときも、父は「お前の好きなようにやれ。お金のことは気にするな。」と迷うことなく後押ししてくれました。他の学生よりも学生時代を長く過ごしましたが、やっとひとりの社会人として働く姿を見せることができます。きっと、楽しみに見ていることだと思います。母にはこの3年間も迷惑をかけっぱなしでした。何もしてあげることではできませんでした。これからは僕が助けていく番です。

学生時代の最後の仕事として博士論文を無事に書き上げることができました。お世話になったすべての人に感謝いたします。

小林 稜平