

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 小林 稜平

$F_0F_1$ -ATP 合成酵素( $F_0F_1$ )は、生体膜間にかかるプロトンの電気化学ポテンシャル (proton motive force; *pmf*)を用いて ATP を合成する。膜内に存在する  $F_0$  では *pmf* に沿ってプロトンが通り抜ける。一方、膜外に存在する  $F_1$  は ATP の加水分解の際に生じる自由エネルギー変化を利用して触媒反応を行う。*pmf* が十分に大きければ  $F_0$  が  $F_1$  を逆回転させ、 $F_1$  は ATP 合成反応を触媒する。しかし、*pmf* が減少すると  $F_1$  が  $F_0$  を逆回転させ、ATP を加水分解する。このような ATP の浪費を防ぐため、ミトコンドリア種には Inhibitory factor 1 (IF<sub>1</sub>)と呼ばれる阻害因子が  $F_1$  部分に作用し、ATP 加水分解を阻害している。これまで数々の生化学実験や X 線結晶構造解析が行われ、IF<sub>1</sub> 阻害機構が提案されてきた。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<sub>1</sub> 阻害機構については不明な点が多い。本研究では、ウシミトコンドリア由来  $F_1(bMF_1)$  の 1 分子回転解析によってその回転触媒機構を解明し、それをもとにして IF<sub>1</sub> 阻害機構についての研究を行った。本論文の内容は以下の 5 章から構成されている。

第 1 章では序論として研究の背景や目的について説明した。過去の 1 分子回転解析による  $F_1$  の回転スキーム決定と、X 線結晶構造解析の対応付けを目指した研究を述べ、未解決の課題を明確にした。さらに、ミトコンドリア型  $F_0F_1$  の阻害因子である IF<sub>1</sub> に関して現在までに得られている知見を整理し、その課題を議論した。

第 2 章では、1 分子回転解析によって  $bMF_1$  の回転触媒スキームを提案した。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。その結果、 $bMF_1$  は回転の最小単位である 120°内に *binding dwell*(ATP 結合待ち状態)、*long dwell*(より長い停止)、*short dwell*(より短い停止)の 3 種類の回転停止点を示した。ATP $\gamma$ S も  $\beta E188D$  変異体も ATP 開裂反応速度を低下させると考えられることから、*long dwell* は ATP 開裂反応待ち状態(*catalytic dwell*)であると同定した。これに加えて、ATP 開裂反応待ち状態で回転を停止させる基質アナログである AMP-PNP を用いて回転停止位置を調べた結果、この角度位置は *catalytic dwell* の位置と一致した。すなわち、*binding dwell* から見て *catalytic dwell* は +80°の位置にあることが分かった。一方で、*short dwell* がどの素過程を表すかは未だ同定できていないがその角度位置は *catalytic dwell* から見て +50~60°の位置、すなわち *binding dwell* から見て +10~20°の位置にあることが分か

った。他の  $F_1$  との類似性を考えると、*short dwell* はリン酸解離待ち状態であると考えられる。これらの結果から  $bMF_1$  の回転触媒機構を提案した。ある  $\beta$  に ATP が結合した角度を  $0^\circ$  と定義したとき、同じ  $\beta$  で ATP 開裂・リン酸解離が起きるのはそれぞれ  $200^\circ$ 、 $250\sim 260^\circ$  であると考えられる。また、AMP-PNP を用いた実験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 *catalytic dwell* に対応することも解明された。

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、 $IF_1$  は2段階ステップを経て  $F_1$  の活性を阻害することが提案されていた。しかしこれを実証した速度論的解析は存在しなかった。本章では幅広い  $IF_1$  濃度、ATP 濃度で生化学実験を行うことで2段階阻害機構の実証に成功した。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。さらに  $IF_1$  阻害に重要とされる2つの残基の変異体を作成し、それらの残基が2段階阻害のどの反応ステップに影響をもたらすかを議論した。

第4章では  $bMF_1$  の1分子回転観察系に  $IF_1$  を導入して、 $bMF_1$  の回転/停止という観点から  $IF_1$  阻害状態を観察した。 $IF_1$  の基本的な性質を解明するために、 $IF_1$  阻害による  $bMF_1$  の回転停止位置を解析した。その結果、 $IF_1$  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、 $IF_1$  は  $bMF_1$  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明らかになった。 $IF_1$  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  $IF_1$  阻害  $bMF_1$  の操作を行った。その結果、ATP/ADP/ $P_i$  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、 $bMF_1$  の回転が再開することがわかった。これは、 $F_1$  が ATP 合成反応を行える場合のみ  $IF_1$  が解離して  $bMF_1$  粒子は回転を再開できることを意味する。さらに、 $IF_1$  阻害  $bMF_1$  を定められた角度で一定時間拘束したあとに解放することで、 $IF_1$  解離の角度依存性を探索した。その結果、 $IF_1$  解離は  $F_1$  の回転角度や反応素過程に強く依存していることが分かった。また、それは結晶構造解析から提案されていた  $IF_1$  阻害機構と一致していた。以上のように、 $bMF_1$  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  $IF_1$  の解離機構に新たな知見を与えた。

第5章では、本論文の総括を行った。また、本研究で実証された知見をさらに検証するための新規観察技術系の提案を行い、タンパク質工学と薬剤開発への発展性を議論した。

以上のように、本論文ではウシミトコンドリア由来  $F_1$ -ATPase の回転触媒機構を解明し、それをもとにして ATP 合成酵素の阻害因子として知られる  $IF_1$  の作用機序を提案した。これらの成果は学术界のみならず、医療・産業分野に対しても新たな知見を与えることが期待される。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。