

審査の結果の要旨

氏名 皆川 慶嘉

V_0V_1 -ATPase(V_0V_1)は ATP を ADP と無機リン酸に加水分解し、その際に得られる自由エネルギーを利用して回転運動を行い、最終的にイオンを輸送することにより濃度勾配を形成する生理的に重要なタンパク質である。このような分子モーターの持つエネルギー変換の仕組みを解明し、生命現象の理解に繋げることは大変重要である。本論文では真正細菌 *Enterococcus hirae* に由来する V_0V_1 (以降 $Enterov_0V_1$)を対象として、1分子計測による回転機構解明を目的に、 $Enterov_0V_1$ とその親水部位である $Enterov_1$ の回転機構及び化学力学共役機構について調べた結果をまとめたものである。本論文は以下の7章から構成されている。

第1章は序章であり、 $Enterov_0V_1$ の生理的重要性及び生理的には ATP を合成する回転分子モーターである F_0F_1 の親水部位である F_1 の化学力学共役について詳細に記述されている。また、*Enterococcus hirae* 以外の種に由来する V_1 の回転運動についても記述され、ATP 加水分解反応素過程である ATP 結合、ATP 開裂、ADP 解離、 P_i 解離と回転運動の共役関係については未解明であることが述べられている。さらに、結晶構造が明らかである $Enterov_1$ を対象とすることの利点が解説されている。

第2章では $Enterov_1$ の基本的な回転特性について述べられている。 $Enterov_1$ の回転軸に可視化プローブである金コロイドを結合させ、全反射顕微鏡を用いて1分子回転計測を行っている。その結果、 $Enterov_1$ は別の種に由来する V_1 と同様にして、ATP 濃度に依らず 120° 毎のステップと3つの停止点を示すことを見出した。この結果から、 120° ステップが幾つかのサブステップに分かれる F_1 と V_1 で違った回転特性を所持していることを明らかにした。

第3章では $Enterov_0V_1$ と $Enterov_1$ の固定子と回転軸の相互作用について述べられている。 $Enterov_0V_1$ と $Enterov_1$ にそれぞれ可視化用のプローブとしてポリスチレンビーズを結合させ、位相差顕微鏡を用いて1分子回転計測を行っている。 $Enterov_0V_1$ と $Enterov_1$ のトルクは熱力学的な法則である揺らぎの定理を適用することにより計算されている。 $Enterov_0V_1$ のトルクは $Enterov_1$ の2倍であり、トルクは固定子と回転軸の相互作用の強さと相関があることから、 $Enterov_0V_1$ の相互作用は $Enterov_1$ に比べ安定化されていることが明らかとなった。それらは、 V_1 と V_0 を結合させているペリフェラルストークに由来していると解釈された。

第4章では $Enterov_1$ の触媒サイトの ATP と相互作用するアミノ酸残基に変異を入れて、ATP 加水分解反応にどのような影響があるのかが述べられている。ATP のアデニン環と相互作用するフェニルアラニングルタミン酸に置換した A(F425E)変異体、A(F506E)変異

体は野生型に比べて ATP 結合速度が 1/4000 と 1/40 になっており、基質認識に深く関与していることを示した。また、A(F425E)変異体では ATP 結合以外の他の反応素過程も遅くなっていた。一方、それら 2 つの変異体の 120°のステップから見積もられるトルクは野生型のそれとほぼ同一の値であり、トルク発生には寄与しないことが明らかとなった。F₁でも同様の結果が得られていることから、回転分子モーターのアデニン環に相互作用するフェニルアラニンの役割が明らかとなった。

また、ATP のリン酸部位と相互作用するアルギニンをリジンに置換した B(R350K)変異体では ATP 結合速度は野生型と変わらなかったが、V_{max} が 1/360 となっていた。更に、ADP 高濃度条件下において B(R350K)変異体は野生型では観察されなかったバックステップ現象が観察された。この結果から ADP の解離が V₁ のトルク発生に関与していることが明らかとなった。

第 5 章では、野生型と変異体のハイブリッド EnteroV₁ を作製し、その回転特性を評価したことについて述べられている。まず、第 4 章で得られた 2 つの反応素過程が遅い A(F425E)変異体を野生型の 3 つある内の 1 つの A サブユニットに導入したハイブリッド EnteroV₁ の作製に成功している。ハイブリッド EnteroV₁ の回転は 3 つの停止時間の違う停止点を示していた。その内の 1 つの停止点のみが ATP 濃度依存性を示したことから、ATP が 0°で結合すると、もう 1 つの遅い反応素過程は 240°で起こることが示唆されている。この結果は、240°回転するまで生成物が残っていることから、2 つのヌクレオチドが結合した状態での回転を支持している。

第 6 章では、EnteroV₁ の ATP の結合角度と ADP の解離角度を同定したことについて述べられている。具体的には蛍光色素でラベルされている ATP と回転軸に結合した金コロイドの回転を同時に計測した。Cy3-ATP が結合すると 120°のステップが観察され、結合している間に 1 度 120°のステップが起こり、生成物である Cy3-ADP が解離した後に 120°のステップが起こった。結果として、ATP が 0°で結合すると、ADP は 240°回転した後に解離することが明らかとなった。

第 7 章では、これらの結果を総括し、結晶構造と合わせて EnteroV₁ の化学力学共役のモデルについて述べている。本研究で示された EnteroV₁ の回転機構と F₁ の回転機構の違いについて生理的な機能を基に考察している。

以上のように本論文では、V_oV₁ 及び V₁ の回転特性を明らかとするとともに、これまで不明であった V₁ の化学力学共役スキームの 1 部を解明した。これらの成果は、回転分子モーターの共通な作動機構や生理的機能の違いによる回転機構の違いの解明に寄与するものとして高く評価される。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。