



Title	回転分子モーターの触媒反応の素過程に関する研究
Author(s)	渡邊, 力也
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57452">https://hdl.handle.net/11094/57452</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文審査の結果の要旨

氏名	わた なべ りき や 渡 邊 力 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 3 4 3 5 号
学位授与年月日	平成 21 年 12 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	回転分子モーターの触媒反応の素過程に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 野地 博行 (副査) 教授 金谷 茂則 教授 藤山 和仁 教授 福崎英一郎 教授 原島 俊 教授 渡邊 肇 教授 福井 希一 教授 大竹 久夫 教授 紀ノ岡正博 教授 仁平 卓也

## 論文内容の要旨

私達の細胞の中には、生理的に重要なATP合成の大半を担っているF型ATPaseと呼ばれるタンパク質でできた回転分子モーターがある。F型ATPaseはF<sub>0</sub>、F<sub>1</sub>と呼ばれる2つのモーターから構成され、F<sub>1</sub>単独ではATPの加水分解反応で得られるエネルギーを駆動力として回転することが知られている。一方、F<sub>0</sub>は膜を介したH<sup>+</sup>の濃度勾配(電気化学ポテンシャル)を利用して、H<sup>+</sup>の透過と共役して回転する。細胞内ではF<sub>0</sub>はF<sub>1</sub>と結合しており、H<sup>+</sup>の透過に伴ってF<sub>1</sub>を逆回転させATPを合成している。これは水力発電におけるタービンと発電用モーターの関係の様である。博士課程では、私はF<sub>1</sub>に注目し、その回転運動とATPの加水分解反応の共役機構を解明すべく回転運動の1分子観察を行った。

F<sub>1</sub>が実際に回転モーターであることは、指導教官の野地らによって1997年に明らかにされた。(Nature 386, p299)。その検出手法は非常にユニークで、F<sub>1</sub>の固定子をガラス基板上に固定した上で回転子に大きなプローブを付けその回転を計測するものであった。更に私が研究を開始する前に(i)1回のATPの加水分解で回転子が120°回転する(Cell 93, p1117) (ii)この120°の回転ステップは80°と40°の回転から構成され、80°の回転はATP結合が、40°の回転はATPの解裂が引き金となること(PNAS 100, p14731)などATPの加水分解反応の反応素過程の一部と回転運動との関係が明らかにされていた。しかし、その当時はATP加水分解の反応生成物であるADPと無機リン酸の排出と回転運動との関係が未解明であり、私はこの命題に取り組むことにした。では、なぜ反応生成物の排出機構と回転運動の関係が未解明であったのか?その原因として排出反応の反応速度が非常に速く検出することができなかったことが挙げられる。そこで、私は、その当時世界でも類を見ない低温環境下での1分子計測実験を行い、排出機構の反応速度を低下させることによって排出機構のリアルタイム検出を試みた。その結果、反応生成物であるADPや無機リン酸の排出機構を明らかにすることはできなかったが、通常の酵素反応では類を見ないほどの温度感受性の高い反応中間体を顕在化させることに成功した。また、その反応中間体がATP結合反応と共に80°ステップの引き金となっていることが判明した。

本論文はタンパク質でできた回転分子モーターであるF<sub>1</sub>-ATPaseの回転-触媒共役機構に関する研究成果をまとめたものである。第1章の序論、第2-6章の本文、第7章の総括から構成される。以下に本論文の要旨を各章ごとに示す。

第1章では、先行研究によって部分的に明らかにされた回転-触媒共役機構に関する知見を記述している。具体的には、1)ATP加水分解反応を構成する4つの反応素過程(ATP結合、開裂、ADP解離、リン酸解離)のうちATP結合、ATP開裂、ADP解離と回転運動との共役関係が既に解明されており、ATP開裂、ADP解離反応はATPとして触媒部位に結合してから回転子が200°、240°反時計方向に回転した角度で発生すること。2)この反応素過程と回転運動との共役関係から、反応素過程の反応速度がモーターの回転子の角度に依存して変化することが予測されていること。3)ADP阻害状態と呼ばれるATP加水分解活性の不活性化状態が存在することを紹介している。この現状を踏まえ、本研究の目的として1)最後の未同定の反応素過程であるリン酸解離反応と回転運動との共役関係、2)モーター回転子の角度と反応速度の関係、3)未解明であるADP阻害状態の発生メカニズムについて明らかにする旨を述べている。

第2章では、未解明の回転-触媒共役機構の解明に用いた実験装置について記述している。具体的には、F<sub>1</sub>-ATPaseの回転運動を1分子レベルで検出し、操作する仕組みについて紹介している。

第3章では、リン酸解離反応と回転運動の共役関係を解明する過程で、副次的に確認された温度感受性の非常に強い反応中間体に関して記述している。この新たに確認された反応中間体は、1)ATP結合やATP開裂反応などの他の酵素反応に比べ約5倍の温度感受性を有しており、つまりは非常に大きな活性化エネルギー障壁を有する反応であること。2)ATP結合反応と協働して回転運動に寄与していることが明らかにされた。

第4章では、磁気ピンセットを利用した分子操作によりリン酸解離反応と回転運動の共役関係を解明し、リン酸解離反応がATPとして触媒部位に結合してから回転子が320°回転した角度で発生することを証明した。また、リン酸解離反応が回転子の角度に依存して劇的にその反応速度を変化させていることを明らかにし、回転トルクの約55%がこのリン酸解離反応によって賄われていることを詳らかにした。

第5章では、リン酸解離反応がATP開裂直後に発生すると本来リン酸が解離する角度でADP阻害状態と呼ばれる不活性化状態に陥ることを明らかにした。F<sub>1</sub>-ATPaseの元来の役割はF<sub>0</sub>モーターと結合してATPを合成することであり、加水分解活性は本来望まれない性質である為、その活性を下げる効果のあるADP阻害状態の発生メカニズムを解明できたのは、回転-触媒共役機構を理解する上で重要な知見である。

第6章では、ATP開裂の反応速度と回転子の角度との関係を明らかにした。ATP開裂反応もリン酸の解離反応と同様、回転子の角度に依存して反応速度を変化させているが、回転トルクへの寄与は約21%と小さいことが証明された。

以上の様に、本論文はF<sub>1</sub>-ATPaseの回転-触媒共役機構の解明を1分子操作技術を利用して網羅的に行った数少ない研究であり、この研究成果はF<sub>1</sub>-ATPaseの工学的応用を考えた上で重要な知見である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。