

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05591

研究課題名(和文) F型ATP合成酵素の異種エネルギー変換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of heterogeneous energy conversion mechanism of FoF1 ATP synthase

研究代表者

渡邊 力也 (Watanabe, Rikiya)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：30540108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規分析技術の開発に立脚し、F型ATP合成酵素の異種エネルギー変換機構の詳細な解明を目指した。1、技術開発に関しては、新しい生体膜チップなどの開発を行い、異種エネルギー変換機構を解析するための要素技術を確立した。2、異種エネルギー変換機構の解析に関しては、独自の磁気ピンセットを用いた1分子操作計測により、エネルギー変換の制御子であるepsilonサブユニットの役割を詳細に渡り解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to elucidate the detailed mechanism of heterogeneous energy conversion of FoF1 ATP synthase by developing novel analytical systems. 1, We established the platform to analyze aforementioned heterogeneous energy conversion by developing novel analytical technologies including artificial cell-membrane microsystems. 2, We elucidated the role of regulatory subunit, epsilon subunit, on heterogeneous energy conversion by single molecule manipulation using our original magnetic tweezers.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子生物物理学 マイクロ分析装置 F型ATP合成酵素

1. 研究開始当初の背景

F型ATP合成酵素(F_0F_1)は、細胞膜の両側に形成される“プロトン駆動力”を利用して生理的に重要なATPを合成する、タンパク質でできた異種エネルギー変換素子である(図1)。 F_0F_1 は、その生理的な重要性だけでなく、電気・化学間のエネルギー変換の過程で、分子内の回転運動を伴うモータータンパク質であることから、多くの研究者に注目されている。研究開始までに、私たちを含む日本のグループにより、 F_0F_1 の異種エネルギー変換が可逆的かつ変換効率が極めて高いことが明らかにされてきた。現在、この素晴らしいエネルギー変換機構を理解するうえで残された最大の課題は、“電気化学エネルギーを力学エネルギーに変換する触媒部位”と“運動を担う駆動部位”間のエネルギー伝達機構の解明にあった。

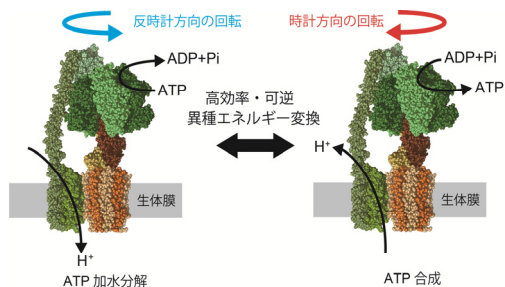


図1 F型ATP合成酵素の異種エネルギー変換

2. 研究の目的

本研究では、私たちが近年開発した膜タンパク質の1分子計測技術を利用することで、触媒反応の素過程ごとに出力される力学エネルギー(回転トルク)を定量計測し、触媒部位における異種エネルギー変換機構を明らかにする。また同時に、触媒部位と駆動部位の物理的な接触点に変異を導入した変異体の解析から、エネルギーの伝達経路を同定する。そして、それらの実験情報に基づき、触媒部位と駆動部位間のエネルギー伝達機構を徹底的に解明し、 F_0F_1 が異種エネルギー変換の可逆化および高効率化を実現する仕組みに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

①触媒部位から駆動部位へのトルク伝達経路の解析

F_1 の触媒部位と駆動部位間の接触点は大きく2つ存在する(図2)。近年、私たちを含む日本のグループは、各接触点にアミノ酸変異を導入し、触媒部位-駆動部位間の相互作用を除去した変異体を開発した(Tanigawara et al., Biophys J 2012)。これらの変異体では、回転トルクが約50%に減少することが明らかにされ、すなわち、両方の接触点がトルク伝

達において重要な役割を担っていることが判明している。

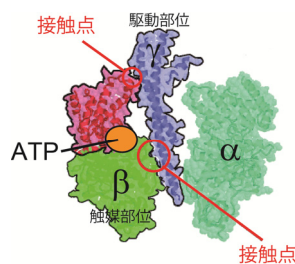


図2 F_1 における触媒部位と駆動部位の接触点

そこで、本研究では、これらの変異体に対して1分子操作計測を施し(図3)、反応素過程ごとに回転子を介したトルクの出力量を算出する。もし、トルク伝達効率が低下しているのであれば、1分子操作計測で算出されるトルクの出力量が減少するはずである。よって、野生型と変異体の測定結果を比較することで、どの反応素過程においてトルク伝達量が減少しているのか同定することが可能になり、すなわち、反応素過程ごとにトルクの伝達経路を同定できる。

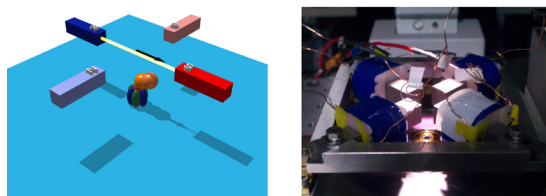


図3 磁気ピンセットを利用した1分子操作計測

②epsilonサブユニットによる異種エネルギー変換効率の制御機構の解析

Epsilonサブユニットは F_1 における化学・力学共役効率を制御しており、Epsilonサブユニットを F_1 に再構成すると、ATP合成時の共役効率が約5倍向上することが知られている。そこで、この制御機構を詳細に解明するため、上述の1分子操作計測を利用し、反応素過程ごとの共役関係を明らかにすることを旨とした。

③新規生体膜マイクロチップの開発

F_0F_1 はイオン駆動力を利用して触媒反応を行うため、 F_0F_1 全体の異種エネルギー変換機構を理解するためには、イオン駆動力を定量的に制御できる新しい分析技術の開発を行う必要がある。そのため、近年私たちが開発した生体膜マイクロチップ(図4)に金ナノ電極を実装した新しい生体膜マイクロチップを開発した。

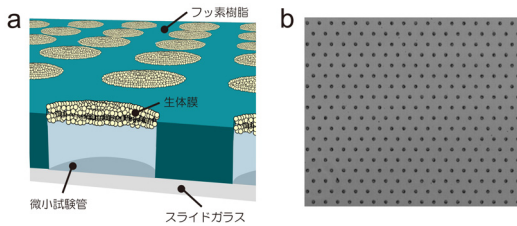


図4 近年開発した生体膜マイクロチップ

(a)チップの模式図、(b)透過光画像

4. 研究成果

①触媒部位から駆動部位へのトルク伝達経路の同定

上部接点にアミノ酸変異を導入した変異体に対して1分子操作計測を施し、反応素過程ごとに回転子を介したトルクの出力量を計測した(図5)。結果、ATPの結合過程のトルク出力量が野生型の約60%に減少していることが明らかになり、すなわち、ATPの結合過程では、上部の接点を介してトルク伝達を行っていることが判明した(Watanabe et al., Biophys J 2015)。

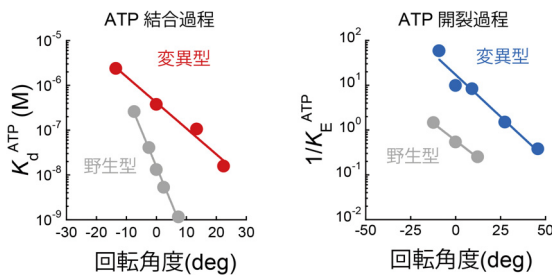


図5 変異体の1分子操作計測結果

(灰色)野生型、(赤色 or 青色)変異型

②epsilon サブユニットによる異種エネルギー変換効率の制御機構の解明

Epsilon サブユニットを再構成した F₁ を利用して、1分子操作計測を行い、素過程ごとの反応速度定数および平衡定数を算出した。結果、epsilon サブユニットによって、ATP加水分解の各反応素過程においては、速度定数が殆ど変化しないのに対し、それらの逆反応においては約5倍程度上昇していることが判明した(図6)。また、今回実測された反応素過程ごとの反応速度定数をもとに、ATP合成反応全体の効率を算出したところ、先行研究と同様に約5倍程度上昇することが示され、すなわち、epsilon サブユニットは反応素過程ごとに合理的にその速度定数を制御し、またその制御機構により ATP合成反応全体の効率を高めることが示唆された(投稿準備中)。

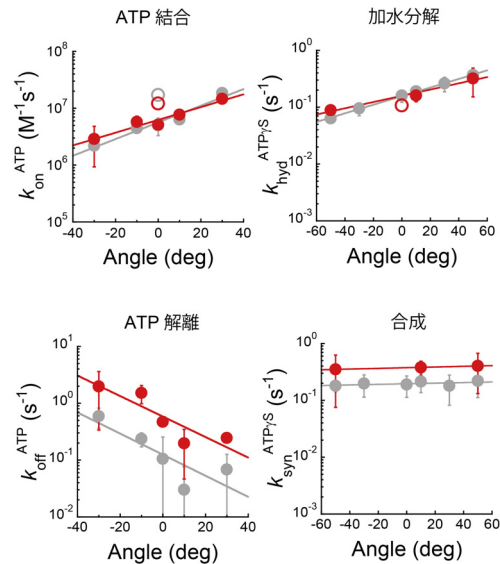


図6 Epsilon サブユニットによる速度定数の変化

③新規生体膜マイクロチップの開発

生体膜マイクロチップに金ナノ電極を実装した新しい生体膜マイクロチップを開発した。当該マイクロチップにおいては、金ナノ電極を利用することで長時間にわたり膜電位を制御することが可能となった(図7)。また、当該チップを利用することで、膜電位による F₀F₁ のプロトン輸送計測が実現した(Watanabe et al., IEEE Trans Nanotechnol 2016)。

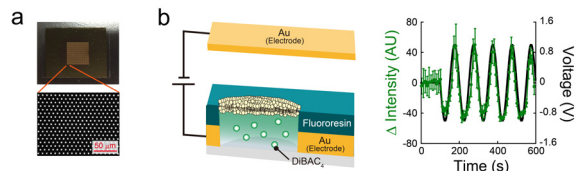


図7 金ナノ電極を実装した生体膜チップ

(a)チップの写真、(b)膜電位差の制御

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Watanabe, R., Soga, N., Ohdate, S., & Noji, H. "Single molecule analysis of membrane transporter activity by using a microsystem" *Methods in Molecular Biology* (in press) (査読有)
- ② Watanabe, R., Soga, N., Hara, M., & Noji, H. "Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis" *Lab on a Chip* (2016) 16, 3043-3048 (査読有)
- ③ Watanabe, R., Soga, N., & Noji, H. "Novel nano-device to measure voltage-driven

membrane transporter activity” *IEEE Transactions on Nanotechnology* (2016) 15, 70-73 (査読有)

- ④ Soga, N., Watanabe, R., & Noji, H. “Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters” *Scientific Reports* (2015) 5, 11025 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 渡邊力也 “生体膜マイクロチップを利用したトランスポーターの高感度機能解析” **第 90 回日本細菌学会総会 シンポジウム**, Mar 19 (2017), Sendai, Japan
- ② 渡邊力也 “マイクロチップが実現する膜輸送体の高感度構造機能解析” **第 97 回日本化学会春季年会 特別企画**, Mar 16 (2017), Yokohama, Japan
- ③ 渡邊力也 “Single molecule analysis of membrane protein activities” **第 64 回日本応用物理学会春季学術講演会 シンポジウム**, Mar 15 (2017), Yokohama, Japan
- ④ 渡邊力也 “マイクロチップが実現する膜輸送体の高感度構造機能解析” **第 39 回日本分子生物学会年会 指定シンポジウム**, Dec 2 (2016), Yokohama, Japan
- ⑤ Watanabe, R. “Artificial cell-membrane microsystems for highly sensitive analysis of membrane proteins” *Cold Spring Harbor Conferences Asia “Synthetic Biology”*, Nov 28 (2016), Suzhou, China
- ⑥ 渡邊力也 “Single molecule analysis of F_0F_1 -ATP synthase” **第 54 回日本生物物理学会年会 シンポジウム**, Nov 25 (2016), Tsukuba, Japan
- ⑦ 渡邊力也 “マイクロデバイスを利用した膜局在型回転分子モーターの 1 分子機能解析” **第 16 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ**, Jun 9 (2016), Fukuoka, Japan
- ⑧ Watanabe, R. “Heterogeneous energy conversion mechanism of F_1 -ATPase” **第 53 回日本生物物理学会年会 シンポジウム**, September (2015), Kanazawa, Japan

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：マイクロリアクタチップおよびその製造方法

発明者：渡邊力也、曾我直樹、野地博行

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-040664

出願年月日：2017 年 3 月 3 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊力也 (WATANABE, Rikiya)

東京大学・大学院工学系研究科・講師

研究者番号： 30540108