

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14373

研究課題名（和文）F1-ATPaseの高效率なエネルギー変換を実現するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism behind highly efficient energy transduction of F1-ATPase

研究代表者

中山 洋平（NAKAYAMA, Yohei）

東北大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：20757728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：分子モーターのエネルギー変換効率を、エネルギー源となる化学反応に関する自由エネルギー変化を独立に測ることなく、一分子実験のみによって調べることができる方法を確立した。一分子実験で自由エネルギー変化の値を測定する、というアプローチは、理論的に必要になる仮定が実験では成り立っていないため、うまく働かないことを発見し、その代わりとして、分子モーターのする仕事が化学反応する分子の濃度に対してどのように依存するかにもとづいて、エネルギー変換効率を評価する枠組みを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、生体分子モーターのエネルギー変換効率は、「生体内のエネルギー通貨」と呼ばれる分子であるアデノシン三リン酸をエネルギー源とする場合のみしか調べることができなかったが、今回の成果によりそれ以外の分子をエネルギー源とするときも議論がおこなえるようになった。人工的に設計された分子モーターのエネルギー源の種類は多岐にわたっているため、今回の成果は、それらのエネルギー変換効率の測定に道筋がついたという意義がある。

研究成果の概要（英文）：We established a way to investigate the energy transduction efficiency of molecular motors in single molecule experiments without measuring independently the free energy change associated with chemical reactions. We revealed that the free energy change may not be obtained only from single molecule experiments, since a theoretical assumption is not always valid in the experimental situations. Instead, we developed a framework where the energy transduction efficiency is evaluated from the dependence of the work done by molecular motors on the concentrations of molecules involved in the chemical reaction.

研究分野：非平衡熱・統計力学

キーワード：分子モーター 生体エネルギー変換 非平衡熱力学 非平衡統計力学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子モーターF₁-ATPaseは、好気呼吸による酸素を利用するエネルギー代謝の最終段階を担う酵素であるため、そのエネルギー変換の効率は様々な側面から測定・議論が行われてきた。その中でも、エネルギー源であるATP(アデノシン三リン酸)分子の加水分解によって生じる自由エネルギー変化と、モーターが外部に対して行う仕事との間の変換効率は、精密な一分子実験によって100%に達することが明らかにされており、F₁-ATPaseの非凡な特徴のひとつであるとみなされている。

F₁-ATPaseが100%のエネルギー変換効率をどのようなメカニズムによって実現しているかを明らかにするアプローチとして、遺伝子操作によってF₁-ATPaseにアミノ酸変異を導入することで、エネルギー変換効率がどのように変化するかを調べる方法がある。従来は、エネルギー変換効率の低下を引き起こすには、複数のアミノ酸変異を導入しなければならなかったが、近年、ひとつのアミノ酸変異であっても、エネルギー変換効率が大幅に低下させる例が発見され、そのアミノ酸が果たしている役割から、エネルギー変換効率を高く保つために必要な因子をある程度絞り込むことができるようになってきた。

2. 研究の目的

本研究課題では、F₁-ATPaseの高いエネルギー変換効率が、アミノ酸ひとつを変異させることによっても低下することを踏まえて、F₁-ATPaseの基質をATP以外の分子に変更することで、F₁-ATPaseのエネルギー変換効率がどのように変化するかを調べることを目的とした。基質の分子としては、エネルギー変換効率を低下させるアミノ酸変異がF₁-ATPaseによるATPの加水分解速度を低下させることから、加水分解速度の遅いATPの類似体を候補とすることとした。

この目的を達成するためには、ATPの類似体を基質とした場合にF₁-ATPaseが外部に対して行う仕事を測定する他に、ATPの類似体の加水分解によって生じる自由エネルギー変化を測定する必要がある。従来の自由エネルギー変化の測定法は決して簡便な方法ではないため、本研究課題では自由エネルギー変化の値についても一分子実験によって求めることとした。

3. 研究の方法

(1) F₁-ATPaseの一分子実験の数値計算で得られるデータから基質分子の自由エネルギー変化を統計推定に基づいて求める方法は、すでに確立できていた。そこで、実際の実験で得られるデータに対してこの方法が有効であるかどうかを確認するために、ATPの類似体を基質とした場合と類似の回転運動を示す条件で、ATPを基質として一分子実験を行い、得られたデータから既知のATPの自由エネルギー変化を求めることができるか調べた。

(2) 後述するように、上記の統計推定に基づく方法は数値計算で得られるデータに対しては有効であったものの、実際の実験で得られるデータからは自由エネルギー変化をうまく求めることができなかった。その原因を探るため、ATPの類似体を基質とする場合に近い運動に限らず、一分子実験によって基質分子の自由エネルギー変化を求めることを試みた。具体的には、ATP濃度を高くする、あるいは一分子観察用のプローブ粒子を大きくすることによって、F₁-ATPaseが連続的に回転している条件で実験を行なった。

(3) また、自由エネルギー変化の値を使わずに、F₁-ATPaseのエネルギー変換効率を議論する方法についても検討した。

4. 研究成果

(1) F₁-ATPaseの一分子実験をATPを基質として行い、得られた時系列データを統計推定に基づく方法によって解析した。ATPの類似体を基質とした場合に似た、120°ずつのステップ的な回転を繰り返す、基質であるATPの濃度が低い条件で実験を行なったところ、数値計算で得られるデータを解析した場合とは異なり、既知のATPの自由エネルギー変化の値を正しく求めることはできないことが明らかになった。ATPの自由エネルギー変化が異なる値をとる条件でも、同様の実験・解析を行ったが、やはり正しい自由エネルギー変化の値

は得られなかった。この結果によって、数値計算で用いられているモデルにおける基本的な仮定が、実際の実験では成り立っていない可能性が示唆された。

- (2) 基質であるATPの濃度が低い状況に限定せず、逆に濃度が十分高いときにうまく働くと期待される方法でATPの自由エネルギー変化を求めることを試みた。ATPの濃度が低い条件では、回転運動による角度の変化に加えてF₁-ATPaseの内部状態を表す変数の変化を考慮する必要があるが、ATPの濃度が高いときには内部状態が変化する時間スケールは短くなることによって、角度変数だけのモデルを使うことが正当化されるため、よりシンプルに自由エネルギー変化の評価が行えると考えられた。ところが期待に反して、一分子実験で得られたデータを角度変数だけのモデルで解析した場合も、ATPの自由エネルギー変化の値を正しく求めることはできなかった(図1)。角度変数が一般の確率過程にしたがうと考えて、局所詳細釣り合い条件と呼ばれる関係式を使った場合と、Brown運動をしながらの回転を記述するLangevin方程式にしたがうと考えた場合の、2つの方法で自由エネルギー変化を求めたが、異なる方法で求めた値同士は実験誤差の範囲内で等しいが、自由エネルギー変化の正しい値よりは常に小さかった。

- (3) また、内部状態が変化する時間スケールが短い、という仮定が妥当であることを検証するために、プローブ粒子の直径を大きくすることで、角度方向の運動の時間スケールを長くして、同じように自由エネルギー変化を求めたが、得られる値に変化はなかった。これによって、時間スケールについての仮定には問題がないことが明らかになった。

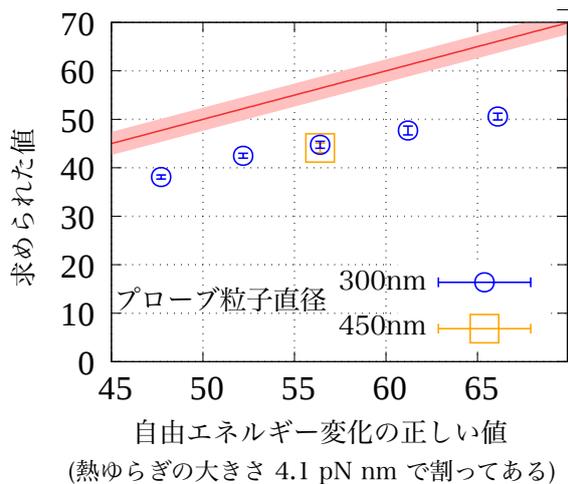


図1: 角度変数だけのモデルによって求めた自由エネルギー変化

- (4) 次に、自由エネルギー変化の値を求めるときに基準となる、熱ゆらぎの大きさに関する仮定に問題がある可能性を検討した。熱ゆらぎが通常仮定される大きさからずれることが示されている理論的なモデルでは、回転運動のゆらぎの大きさ(拡散係数)が測定の時間スケールによって変化することが知られていた。そこで、高い時間分解能でのF₁-ATPaseの回転運動の測定を行ったところ、拡散係数が一定ではなく変化していることを発見した。熱ゆらぎの大きさに関する仮定は、熱ゆらぎの顕著な系でエネルギーに関する測定を行う際にはしばしば基本となる仮定であるため、生体分子モーターというエネルギー変換に実際上の関心のある系でこの仮定が破れていることを示したことは、今後熱ゆらぎの顕著な系でエネルギー測定をする際の方法論について、大きなインパクトであると考えられる。
- (5) 以上の結果を踏まえて、自由エネルギー変化の値を必要とせずに分子モーターの効率を議論する方法について検討した。そして、自由エネルギー変化が基質濃度の関数としてどのように変化するかは理論的によく分かっていることを利用すれば、分子モーターが外部に対してする仕事を複数の基質濃度で測定することによって、効率が100%であるかそうではないかについては議論できることを発見した。この方法は、基質分子の種類を変えた場合だけではなく、自由エネルギー変化の値が実測されていない極端な実験状況にも応用できるため、今後の展望として分子モーターのエネルギー変換効率を実験的に調べられる状況を広げて行くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakayama Yohei, Kawaguchi Kyogo, Nakagawa Naoko | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 Unattainability of Carnot efficiency in thermal motors: Coarse graining and entropy production of Feynman-Smoluchowski ratchets | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Physical Review E | 6. 最初と最後の頁 022102-1-22 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevE.98.022102 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Miyazaki Kunimasa, Nakayama Yohei, Matsuyama Hiromichi | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 Entropy anomaly and linear irreversible thermodynamics | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Physical Review E | 6. 最初と最後の頁 022101-1-4 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevE.98.022101 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 中山 洋平, 田中 真奈, 宗行 英朗 |
| 2. 発表標題 F1-ATPaseの自由エネルギー地形と反応速度係数の実験的決定 |
| 3. 学会等名 日本物理学会2018年秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 宮崎州正, 中山洋平, 松山洋道 |
| 2. 発表標題 異常エントロピー生成と線形非平衡熱力学 |
| 3. 学会等名 日本物理学会2018年秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡庭有明, 中山洋平, 宗行英朗 |
| 2. 発表標題 温度上昇がF1-ATPaseのエネルギー変換効率に与える影響 |
| 3. 学会等名 日本物理学会2018年秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoaki Okaniwa, Yohei Nakayama, Eiro Muneyuki |
| 2. 発表標題 Thermodynamic Efficiency of F1-ATPase at High Temperature |
| 3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the BSJ |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naomichi Tobita, Eiro Muneyuki, Yohei Nakayama |
| 2. 発表標題 Langevin description of rotational motion of F1-ATPase |
| 3. 学会等名 International Conference on APEF 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomoaki Okaniwa, Yohei Nakayama, Eiro Muneyuki |
| 2. 発表標題 Measurement of Thermodynamic Efficiency of F1-ATPase at High Temperature |
| 3. 学会等名 International Conference on APEF 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naomichi Tobita, Eiro Muneyuki, Yohei Nakayama |
| 2. 発表標題 Unreliability of stochastic thermodynamics to quantify the energy balance of F1-ATPase |
| 3. 学会等名 Sendai Workshop 2018, An Update on Molecular Motors: Open Challenges and New Perspectives (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 H. Narita, H. Hoshina, Y. Nakayama, H. Ueno, E. Muneyuki |
| 2. 発表標題 Coupling of Mechanical Rotation and ATPase Reaction in the F1-ATPase |
| 3. 学会等名 「ゆらぎと構造の協奏」第4回領域研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 H. Narita, H. Hoshina, Y. Nakayama, H. Ueno, E. Muneyuki |
| 2. 発表標題 Elucidation of the Timing of Phosphate Release during the Rotation of Thermophilic F1-ATPase |
| 3. 学会等名 SFS2017: International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Y. Nakayama, M. Tanaka, E. Muneyuki |
| 2. 発表標題 Maximum Likelihood Estimation of Stochastic Model of F1-ATPase |
| 3. 学会等名 SFS2017: International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 N. Tobita, Y. Nakayama, E. Muneyuki |
| 2. 発表標題 Heat Dissipation from Rotating F1 Motor |
| 3. 学会等名 SFS2017: International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 飛田直通, 中山洋平, 宗行英朗 |
| 2. 発表標題 F1-ATPaseにゆらぎの熱力学を適用する上での困難 |
| 3. 学会等名 日本物理学会 第73回年次大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 岡庭有明, 田中真奈, 中山洋平, 宗行英朗 |
| 2. 発表標題 F1-ATPaseのエネルギー変換効率と熱安定性 |
| 3. 学会等名 日本物理学会 第73回年次大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|