

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18770134
研究課題名 (和文) プロトン駆動力で回転する生体分子モーター—ATP 合成酵素の 1 分子計測
研究課題名 (英文) Single-molecule measurement of a biological rotary motor, ATP synthase, driven by proton motive force
研究代表者 飯野 亮太 (IINO RYOTA) 大阪大学・産業科学研究所・助教 研究者番号：70403003

研究成果の概要：

1. 大腸菌由来の F_0F_1 -ATP 合成酵素 (EF_0F_1) の ATP 合成活性を多分子計測により徹底的に調べ、回転子を構成する ϵ サブユニットが ATP 加水分解時のみでなく ATP 合成時においても、基質の結合と生成物の解離を抑制することを明らかにし、阻害の新規モデルを提案した。
2. 基板支持人工脂質二重膜に再構成した EF_0F_1 の回転 (ATP 加水分解駆動) を直接可視化することに成功した。さらに F_0 モーターのプロトン輸送が低下した変異体を作製し、プロトン輸送律速の 36° ステップを直接観察することに世界で初めて成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1 分子計測・操作

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、プロトン駆動力による ATP 合成時の F 型 ATP 合成酵素 (F_0F_1) の回転に関しては、ドイツのグループが 1 蛍光分子間での共鳴エネルギー移動 (1 分子 FRET) を用い、1) 加水分解とは逆方向に回転すること、2) 1 回転中に 3 つのステップが存在することを示していた (Diez et al., Nat Struct Mol Biol 2004)。しかしながら回転運動を直接観察したわけではなく、回転ステップの特定数が膜電位差、プロトン濃度差、ヌクレオチドおよびリン酸濃度にどう依存するのかは全

く明らかになっていなかった。V 型 ATPase (V_0V_1) については 1 分子 FRET 法による知見もなかった。

尚、当初から、 F_0F_1 、 V_0V_1 の 1 分子計測は申請者の所属グループを含む日本勢が世界をリードしている。ATP 加水分解時の F_1 の回転の直接観察 (Noji et al., Nature 1997)、回転のサブステップの検出 (Yasuda et al., Cell 1998; Nature 2001)、ATP の結合解離と回転の同時観察 (Nishizaka et al., Nat Struct Mol Biol 2004)、力学的逆回転による ATP の合成 (Itoh et al., Nature 2004) 等がすべて日本で達成され

ている。さらに申請者のグループは、回転磁気ピンセット法、フェムトリッターチャンバー法等の独自に開発した1分子計測技術を用い、さらに多くの知見を最近得ている (Hirono-Hara et al., PNAS 2005; Rondelez et al., Nature 2005)。また ATP 加水分解時の V_1 の回転の直接観察は申請者の共同研究者である Yokoyama らによりなされ (Imamura et al., PNAS 2003)、回転機構が F_1 と異なることが示されている (Imamura et al., PNAS 2005)。

2. 研究の目的

F_0F_1 および V_0V_1 がプロトン駆動力により回転することを光学顕微鏡下で直接観察し証明することを目的とした。具体的には、1) プロトンが濃度差という統計的力によって流れる場合と、電位差という力学的力によって流れる場合で回転の挙動は同じなのか、2) ATP 合成反応の機構は ATP 加水分解と同じなのか (図2)、に焦点を当て F_0F_1 と V_0V_1 の回転機構を比較することを目的とした。さらに F_0 または V_0 単独での回転観察をも目的とし、回転が膜電位差およびプロトン濃度差にどう依存するか、特に F_0 、 V_0 はプロトン駆動力が熱ゆらぎのエネルギーと同程度まで小さくなった場合にも一方向に滑らかに回転できるのかに焦点を当てた。

3. 研究の方法

まず、井出ら (Ide et al., BBRC 1999) が開発した水平平面膜法を改変し、ATP 合成酵素のプロトン駆動力 (細胞膜を介するプロトンの濃度差と膜電位により形成) による回転運動を直接観察する実験系の構築を行った。

その後、ガラス基板に支持された脂質二重膜に ATP 合成酵素を再構成する方法に変更した。

また並行して、試料の性質を生化学測定により徹底的に解析するとともに、より ATP 合成活性の高い改変 F_0F_1 の作製を行った。

4. 研究成果

平成 18 年度

大腸菌由来 F_0F_1 および好熱菌由来 V_0V_1 の、ATP 加水分解駆動による回転の観察に成功した。しかしながら、1) 回転の発見頻度が非常に低い、2) 回転速度に対する明確な膜電位依存性がみられない、という問題点に突き当たった。

上記 1) の問題点を解決するためにまず、平面膜に再構成した ATP 合成酵素が機能を保持していることの確認実験に取り組んだ。具体的には、ATP 合成酵素の触媒部位に結合した蛍光化 ATP (ADP) の解離が膜電位によ

って促進されるかを検証した。しかしながら、明確な結論は出せなかった。

また、上記 2) の問題を解決するため、我々が回転観察に用いている F_0F_1 の ATP 合成活性を多分子計測により徹底的に調べた。ATP 合成活性の基質濃度依存性、プロトンの濃度差および膜電位依存性を調べた結果、1) プロトンの濃度差のほうが膜電位よりも ATP 合成の駆動力として効率的であること、および 2) ATP 合成に必要なプロトン駆動力には閾値が存在しプロトン駆動力が 150mV 以下ではほとんど ATP を合成しないこと、を明らかにした。

平成 19 年度

1) ガラス基板に支持された脂質二重膜の作製、2) 基板支持膜への F_0F_1 -ATP 合成酵素の再構成、3) 再構成した ATP 合成酵素の ATP 加水分解駆動による 1 分子回転観察、4) 基板支持膜を電氣的にシールし膜電位をかけるための微小開口電極の作製、を行った。詳細を下記に示す。

- 1) 基板支持膜の形成には、基板に結合させた脂質膜小胞の乾燥および再水和を用いた。様々な種類および組成のリン脂質を試した。その結果 DOPE の添加により、面積数 $100\mu\text{m}^2$ にわたる大きな脂質二重膜を Ni-NTA 修飾ガラス基板上に再現性よく形成させることが可能になった。
- 2) ATP 合成酵素の再構成には、a) ATP 合成酵素を再構成した膜小胞を、あらかじめ形成させた基板支持膜に融合させる、b) 基板支持膜形成時にあらかじめ上記の ATP 合成酵素再構成膜小胞を加えておく、の 2 つの方法を試した。その結果、後者の方法で基板支持膜へ ATP 合成酵素を効率よく組み込むことが可能になった。
- 3) 再構成した ATP 合成酵素は、 F_0 -c サブユニットまたは F_1 - β サブユニットを介して Ni-NTA 修飾基板上に固定した。直径 200nm のラテックスビーズをプローブに用いて ATP 駆動による回転を 1 分子観察した結果、以前の水平平面膜法を用いた結果とは異なり、どちらの固定法でも ATP 飽和条件において、プローブの負荷にのみ依存した高い最高回転速度が得られた。この結果から、基板支持膜に再構成した ATP 合成酵素の活性は阻害されておらず機能を保持していることが明らかとなった。
- 4) 中央に円錐状構造を持つ金属板を鋳型にし、直径 20-30 μm 程度の開口を持つポリジメチルシロキサン (PDMS) シート

を作製した。これを用いて基板支持膜を電氣的にシールすることを試みたが、数メガオーム程度の抵抗値しか得られず、膜電位の定量的な印加は困難であった。

平成 20 年度

大腸菌由来 F_0F_1 (EF_0F_1) の ATP 合成活性を多分子計測により徹底的に調べ、回転子を構成する ϵ サブユニットが ATP 加水分解時のみでなく ATP 合成時においても、基質の結合と生成物の解離を抑制することを明らかにした。この成果は、酵素が触媒する化学反応の可逆性を考える上で重要な成果であり、かつ野生型よりも活性の高い (回転しやすい) F_0F_1 の作製に成功した点でも重要である。

さらに、基板支持人工脂質二重膜に再構成した EF_0F_1 の回転 (ATP 加水分解駆動) を直接可視化することに成功した。 F_0 モーターのプロトン輸送が低下した変異体を作製し、プロトン輸送律速の 36° ステップを直接観察することに世界で初めて成功した (図)。また、頻繁なバックステップも観察された。この結果は、1) ATP 合成酵素の EF_0 モーターの回転子は 10 回対称性を持つこと、および 2) F_0 モーターはブラウニアンラチェットで駆動することを支持する。特に後者は、 F_0 モーターの作動機構を一端を明らかにした成果で非常に重要であると自負している。

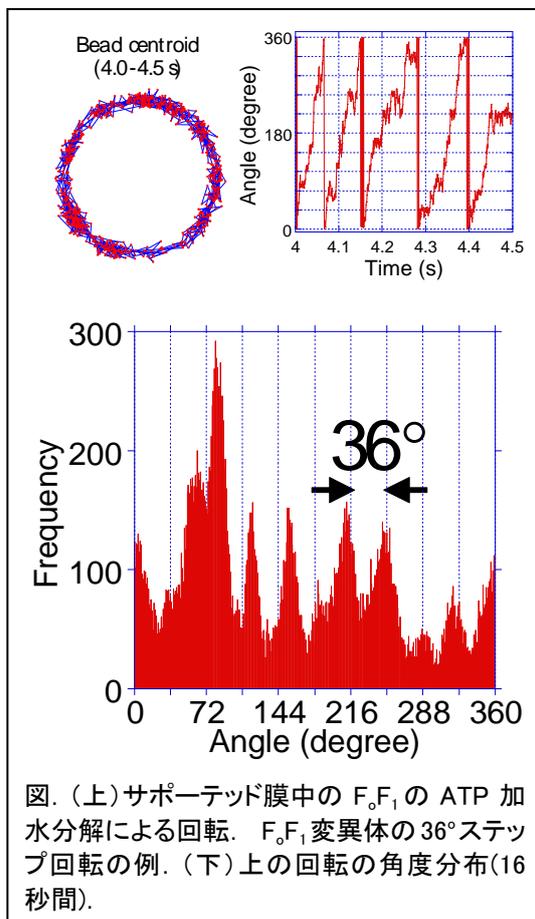


図. (上) サポート膜中の F_0F_1 の ATP 加水分解による回転。 F_0F_1 変異体の 36° ステップ回転の例。(下) 上の回転の角度分布 (16 秒間)。

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 8 件)

1. ***Iino R**, Hasegawa R, Tabata KV, *Noji H. Mechanism of inhibition by C-terminal α -helices of the ϵ subunit of *Escherichia coli* F_0F_1 -ATP synthase. *J. Biol. Chem.* published May 1, 2009 doi:10.1074/jbc.M109.003798, 有.
2. Okuno D, Fujisawa R, **Iino R**, Hirono-Hara Y, Imamura H, *Noji H. 2008. Correlation between the conformational states of F_1 -ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation. *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.* 105: 20722-20727, 有.
3. *Lam L, **Iino R**, Tabata KV, and *Noji H. 2008. Highly-sensitive Restriction Enzyme Assay and Analysis: A Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 39, 2423-2432, 有.
4. Watanabe R, **Iino R**, Shimabukuro K, Yoshida M, *Noji H. 2008. Temperature-sensitive reaction intermediate of F_1 -ATPase. *EMBO Rep.* 9: 84-90, 有.
5. **飯野亮太**, Liza Lam, *野地博行. 2007. 超微小反応チャンバーを用いた高感度バイオアッセイ. *未来材料*. 7: 14-20, 無.
6. Suzuki KGN, Fujiwara TK, Sanematsu F, **Iino R**, Edidin M, and *Kusumi A. 2007. GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G_α for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *J. Cell Biol.* 177: 717-730, 有.
7. **飯野亮太**, *野地博行. 2006. 超微小反応チャンバーで生体回転分子モーターの作動機構を探る. *未来材料*. 6: 32-38, 無.
8. **Iino R** and *Noji H. 2006. F_1 -ATPase: A highly coupled reversible rotary motor. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 993-996, 無.

[学会発表] (計 11 件)

1. ***Iino R**, Tham K.C, Tabata K.V., Ueno H., *Noji H. Single-molecule Imaging of ATP-driven Stepping Rotation of F_0F_1 -ATP Synthase Reconstituted into Supported Membrane. Biophysical Society 53rd Annual Meeting. March 1, 2009. Boston. USA
2. ***Iino R**, Tham K.C, Tabata K.V., Ueno H., *Noji H. ATP-driven rotation of F_0F_1 -ATP synthase rate-limited by F_0 sector. 日本生物物理学会第 46 回年会. 2008 年 12 月 5 日. 福岡

3. ***飯野亮太** 「超高感度バイオセンシング技術」. 産業科学研究協会 平成 20 年度第 3 回産研テクノサロン. 2008 年 10 月 30 日 大阪
4. ***Iino R.** “Single-molecule study on the rotation of F_0F_1 -ATPase”. 5th NSF-MEXT Young Researcher Exchange Program. October 12, 2008. Osaka. Japan.
5. ***Iino R.** “Single-molecule studies on the rotation of F_0F_1 -ATPase”. 4th HANDAI Nanoscience and Nanotechnology Symposium. September 30, 2008. Osaka. Japan.
6. ***Iino R.** “Correlation among mechanical steps in rotation, chemical reaction, and crystal structure of F_1 -ATPase unraveled by single-molecule studies”. The Fourth Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology Collaboration. September 18, 2008. Kobe. Japan.
7. ***Iino R.** Tabata K., Ueno H., *Noji H. ATP-driven rotation of F_0F_1 -ATP synthase reconstituted into supported membrane. 52nd Annual Meeting of Biophysical Society, Feb. 5, 2008. CA, USA.
8. **飯野亮太**, 田端和仁, 上野博史, 野地博行. 基板支持人工脂質二重膜に再構成した F_0F_1 -ATP 合成酵素の ATP 駆動による回転. 日本生物物理学会第 45 回年会. 2007 年 12 月 23 日. 横浜
9. ***Iino R.** “Highly sensitive measurement of biological reaction in femtoliter chamber array” SANKEN WORKSHOP on Nano-Bioscience at Berkeley. March 22, 2007. Berkley. CA. USA
10. *Noji H and **Iino R.** “Femtoliter reaction chamber array for highly sensitive measurement of biological reaction” UT Symposium on NanoBio Integration. NANOBIO-TOKYO 2006. December 5, 2006. Tokyo Japan.
11. ***Iino R.** “Micron-sized reaction chamber array for highly sensitive detection of biological reaction” SANKEN International Symposium on Nanoscience and Nanotechnology. September 19, 2006. Osaka. Japan.

[図書] (計 4 件)

1. ***飯野亮太**, 田端和仁, *野地博行. 2009. 生体膜超分子モーター—細胞の回転エネルギー変換装置: ATP合成酵素. 「超分子サイエンス」, 国武豊喜 監修. 第 4 章第 1 節第 1 項, NTS.
2. ***飯野亮太**, *野地博行. 2009. 単一分子計測. 「マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析」, 北森武彦 監

修. 第 5 編応用技術、第 15 章、技術教育出版

3. ***Iino R** and *Noji H. 2008. Two rotary motors in ATP-synthase. In “Single Molecule Dynamics in Life Science” edited by Yanagida T and Ishii Y. WILEY-VCH (Germany). 237-255.
4. ***飯野亮太** 2008. 2 本脚の生体分子モーターはどう歩く? MyosinV の歩きのメカニズム. 「最新分子マシン. ナノで働く“高度な機械”を目指して」 P.122-123 化学同人

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: アデノシン三リン酸測定のための蛍光標識タンパク質.
発明者: *今村博臣, 山田康之, **飯野亮太**, 野地博行.
権利者: 財団法人新産業創造研究機構, 国立大学法人大阪大学, 学校法人立教学院
種類: 公開特許
番号: 特願 2007-08256
出願年月日: 2007 年 3 月 27 日
国内外の別: 国内
2. 名称: 細胞検体の異物輩出活性検出法, およびその利用.
発明者: ***飯野亮太**, 西野邦彦, 仲田昌義, 榊原昇一, 山口明人, 野地博行.
権利者: 国立大学法人大阪大学
種類: 公開特許
番号: 特願 2006-294558
出願年月日: 2006 年 10 月 30 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

1. 名称: Polarized total internal reflection illumination optical system by rotary annulus light
発明者: Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki, Megumu Shio and ***Ryota Iino**
権利者: Japan Science and Technology Agency
種類: 特許
番号: US 7,486,440 B2
出願年月日: Feb. 3, 2009
国内外の別: 国外(USA)
2. 名称: 回転式輪帯全反射偏光照明光学系
発明者: 吉田賢右, 鈴木俊治, 塩育, ***飯野亮太**
権利者: 独立行政法人科学技術振興機構
種類: 公開特許
番号: 特許 4245914 号
出願年月日: 2009 年 1 月 16 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

受賞（計1件）

*飯野亮太 電気学会 2007 年度研究会 優秀論文発表賞（センサ・マイクロマシン部門）.

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯野 亮太(IINO RYOTA)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：70403003

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし