

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770156

研究課題名（和文） 生体分子モーターの触媒部位における構造変化モニター

研究課題名（英文） Detection of the conformational changes at a catalytic site of molecular motor

研究代表者

足立 健吾（ADACHI KENGO）

早稲田大学・理工学術院・研究員

研究者番号：60370128

研究成果の概要（和文）：ヌクレオチド駆動型の生体分子モーターは、基質の結合・加水分解・生成物の解離といった化学反応を力学的仕事に変換することで作動しており、基本的に Koshland によって提唱された誘導適合(induced fit)とその逆の過程(induced 'unfit')によって機能していると考えられている。実際に、回転分子モーターF₁-ATPase が働いている際の触媒部位そのものの基質に対する適合・不適合(構造)変化を、蛍光性(Cy3)ATP をその構造変化検出のためのプローブとして用いて、1分子で直接検出した。

研究成果の概要（英文）：Nucleotide-driven molecular motor operates by the coupling between mechanical work and chemical reaction in the catalytic site: binding/release of nucleotides and ligand, and the hydrolysis. Induced fit, proposed by Daniel Koshland, and induced 'unfit' that is the reverse process are expected to underlie the operation mechanism. Here, by using fluorescently labeled (Cy3) ATP we have directly detected the conformational changes at the catalytic site on β subunit, which are induced by binding and release of nucleotide/ligand, while a single molecule of F₁-ATPase is rotating.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物物理学

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・分子モーター・構造変化・F₁-ATPase・触媒部位

1. 研究開始当初の背景

本研究では、ヌクレオチド駆動型の生体分子モーターとして、回転モーターである F₁-ATPase を研究対象とする。F₁-ATPase は ATP 合成酵素の可溶性部分であり、単離された F₁ は ATP 加水分解のみを行う。回転に必要な最小限の構成は、回転軸となる γ サブユ

ニットとそれを交互に囲む3つの α サブユニットと3つの β サブユニットである [Abrahams, J. *et al.* 1994 *Nature*, Noji, H. *et al.* 1997 *Nature*]. ATP を加水分解するための触媒部位は、3箇所の α - β サブユニット間にあり、大部分は β サブユニットが担っており、各 β サブユニットの協同的な大きな構

造変化によって回転が駆動されると考えられている。γサブユニットは、各触媒部位でのATPの結合・加水分解・解離に伴って80°と40°のサブステップから成る120°の回転をすることが明らかになっている[Yasuda, R. *et al.* 1998 *Cell*, Yasuda, R. *et al.* 2001 *Nature*]。また、この分子は完全な可逆モーターであり、γサブユニットを強制的に逆回転すると、ADPと無機リン酸からATPを合成することが証明されている[Itoh, H. *et al.* 2004 *Nature*, Rondelez, Y. *et al.* 2005 *Nature*]。化学反応と回転の共役モデル、すなわち、3つの触媒部位のどこで起きるかの化学反応(ATP結合、加水分解、リン酸やADPの解離)がそれぞれどのサブステップ(力学的仕事)を駆動しているのかは、申請者らによってほぼ明らかにすることができている[Adachi, K. *et al.* 2007 *Cell*] : ATPの結合が80°サブステップを駆動し、このとき同時にADPの解離も起こり共に80°サブステップを駆動している。ATP結合による駆動がいわゆるinduced fit(誘導適合)過程であり、ADPの解離がinduced 'unfit'過程であると考えている。また、リン酸解離によって40°サブステップが駆動されることを示した。これはinduced 'unfit'過程である。

2. 研究の目的

(1) γサブユニットの回転がβサブユニットの触媒部位における化学反応とそれに伴って起こるβサブユニットの構造変化との間でタイトにカップルしていると期待されており、その仮定のもと多く研究がγサブユニットの回転に着目してきた。化学反応と回転の共役モデルがほぼ理解できた現在、回転メカニズムの理解をさらにもう1歩進めるためにも化学反応とβサブユニットの構造変化、さらにはinduced fitやinduced 'unfit'の現場となっている触媒部位自体の構造変化に注目すべきであると考えた。βサブユニットの構造変化に着目した例として政池らの報告がある[Masaike, T. *et al.* 2008 *Nat. Struct. Mol. Biol.*]。βサブユニットのヒンジ上側部分がγの回転に伴って構造変化していることを明らかにしている。申請者は構造変化を起こす元になる触媒部位自体の構造変化を直接明らかにすることで回転の作動メカニズムに迫りたいと考えた。

(2) F₁-ATPaseは回転モーターという特徴から、駆動部分(βサブユニット)と被駆動部分(γサブユニット)が一体化しており、両者が決して離れ去ることはない。リニアモーターであるミオシンの場合は駆動部分(ミオシン)が被駆動部分(アクチンフィラメン

ト)から簡単に離れてしまい、これが測定を困難にしていた。近年、ミオシンVやキネシンと言った駆動部分が被駆動部分から離れにくいプロセス性なリニアモーターが研究対象として好まれるようになってきている。こういった意味でF₁-ATPaseはヌクレオチド駆動型の分子モーターとして格好の研究対象である。ただ逆に、一体型のモーターであるために駆動部分(βサブユニット)の動きがほとんど観察されてこなかったという側面もある。一体型の分子モーターという利点を生かし、回転のみならず駆動部分、更に触媒部位までの構造変化に踏み込むことで、タンパク質分子機械全般の作動原理の理解にも役立てたい。

3. 研究の方法

γサブユニットの先端に付けたビーズの回転と蛍光性ATPアナログ(Cy3-ATP)の結合・解離の1分子同時観察(図1)により、これまでにCy3-ATPが結合後120°と240°の回転角度でCy3-ATPの蛍光強度に違いがあることを見いだしていた(図2)。Cy3-ATPの蛍光強度がF₁への結合で約5倍に増加することから考えて、結合したCy3-ATPの周辺環境の変化、すなわち触媒部位自体の構造変化に由来していると予想された。結合したCy3-ATPの蛍光強度変化の測定に加え、デフォーカスイメージングによる蛍光色素の向きの変化の3次元測定を行うことで触媒部位自体の構造変化によって起こるCy3-ATPの向きの変化を検出し、回転角度に依存した触媒部位の構造変化を検出することを試みた。

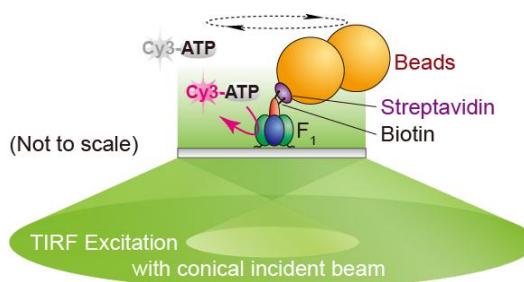


図1. 実験デザイン.

4. 研究成果

(1) 回転ステップと蛍光強度のさらに詳細な解析によりCy3-ATPの蛍光強度変化が200°から240°の回転の際に生じるようであることが分かった。政池らが観察したβサブユニットヒンジ上部の構造変化のタイミングと一致することが分かった。さらに、こ

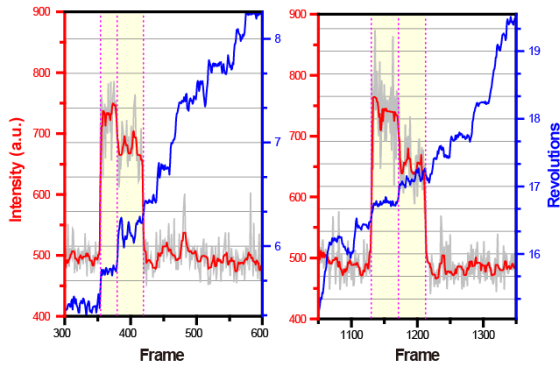


図2. 結合 Cy3-ATP の回転角度に依存した蛍光強度変化.

ここで測定された蛍光強度変化が触媒部位で起こる構造変化に由来する現象であるかを調べるために、結合 Cy3-ATP の色素の向きを蛍光色素一分子のデフォーカスイメージングによって3次元で測定した。デフォーカスイメージングを再現性良く安定して行うために、顕微鏡ステージのz位置をリアルタイムで精度良く検出・制御できる装置を開発した。結合 Cy3-ATP の向きはデフォーカス蛍光像のパターンから決定し、 120° ごとの回転角度に伴って変化することが分かった(図3)。結合後 120° のデフォーカス蛍光像のパターンは明瞭で3次元の向きを決定することができたが、 240° では像のパターンがぼやけて不明瞭になった。触媒部位が 120° の構造より広がり蛍光色素(Cy3-ATP)の向きの自由度が上がったためだと考えられ、蛍光強度変化の結果と矛盾しないことが示された。

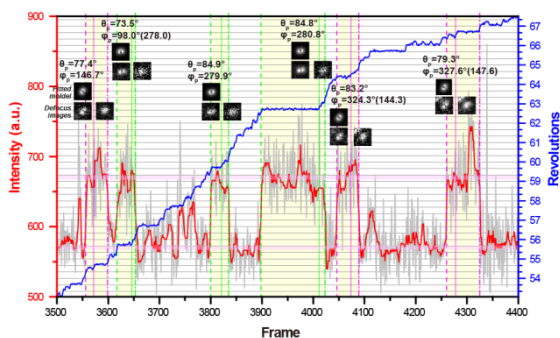


図3. 結合 Cy3-ATP のデフォーカスイメージングによる3次元向き測定. 下側像: それぞれの角度で測定されたデフォーカス像、上側像: 下側像をマッチングしたモデル像.

(2) 蛍光性ヌクレオチドアナログを検出のためのプローブとして用い、ヌクレオチド駆動型の分子モーターの触媒部位の構造変化を一分子計測した例はこれまでにない。テクニックとしても他の生体分子機械の研究に広く有効であると思われる。

(3) 今後、変異体や低温での観察により、さらに別の中間状態での測定を行いたい。また、磁気ピンセットを用いて強制的に回転角度を操作し様々な角度での測定をめざしたい。最終的に、ヌクレオチドの結合から解離までに起こる触媒部位の構造変化を明らかにしたい。

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 Ayako Kohori, Ryohei Chiwata, Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Katsuyuki Shiroguchi, Kengo Adachi, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Torque generation in F_1 -ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice." *Biophys. J.*, **101**, 188–195 (2011). 査読有
- ② Shou Furuike, Masahiro Nakano, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Kazuhiko Kinoshita, Jr., and Ken Yokoyama. "Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe." *Nat. Commun.*, **2** 233 (2011). 査読有
- ③ Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasuhiro Onoue, Kengo Adachi, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita Jr. "Stimulation of F_1 -ATPase activity by sodium dodecyl sulfate." *Biochim. Biophys. Acta. (Bioenergetics)*, **1797**, 435-442 (2010). 査読有
- ④ Rieko Shimo-Kon, Eiro Muneyuki, Hiroshi Sakai, Kengo Adachi, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita Jr. "Chemo-mechanical coupling in F_1 -ATPase revealed by catalytic site occupancy during active catalysis." *Biophys. J.*, **98**, 1227–1236 (2010). 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 足立健吾、大岩和弘、西坂崇之、吉田賢右、木下一彦 「回転モーター F_1 -ATPase の強制回転によるヌクレオチドアフィニティの操作(Manipulating the Nucleotides Affinity in Rotary Motor of F_1 -ATPase by Forced Rotation)」日本生物物理学会第49回年会、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス、2011年9月16-18日
- ② 足立健吾、政池知子、大岩和弘、西坂崇

之「回転分子モーターF₁-ATPaseの触媒部位へ結合した蛍光性ヌクレオチドの位置と向きの測定」第36回日本生体エネルギー研究会&特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム, 大阪大学銀杏会館, 2010年11月18-20日

③ 足立健吾, 政池知子, 大岩和弘, 西坂崇之「回転分子モーターF₁-ATPaseの触媒部位へ結合した蛍光性ヌクレオチドの位置と向きの測定 (Localization and Orientation of Single Fluorescent Nucleotides Bound to the Catalytic Sites in Rotary Motor F₁-ATPase)」日本生物物理学会第48回年会, 東北大学・川内キャンパス, 2010年9月20-22日

④ 足立健吾, 政池知子, 大岩和弘, 西坂崇之「回転分子モーターF₁-ATPaseの触媒部位へ結合したヌクレオチドの高精度位置検出」特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」第5回班会議, 学習院大学, 2010年6月24-25日

⑤ 足立健吾, 政池知子, 大岩和弘, 西坂崇之「回転分子モーターF₁-ATPaseの触媒部位へ結合したヌクレオチドの高精度位置検出 (High-Accuracy Localization of Single Nucleotides Bound to the Catalytic Sites in Rotary Motor F₁-ATPase)」日本生物物理学会第47回年会, 徳島文理大学・アステイとくしま, 2009年10月31-11月1日

[図書] (計2件)

① Kengo Adachi, Takayuki Nishizaka, and Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Rotational catalysis by F₁-ATPase" In: Comprehensive Biophysics, Vol. 8. "Bioenergetics" Stuart Ferguson, Ed, Academic Press (Elsevier), Oxford pp. 35-49 (2012).

② Kengo Adachi, Shou Furuike, Mohammad Delawar Hossain, Hiroyasu Itoh, Kazuhiko Kinoshita, Jr., Yasuhiro Onoue and Rieko Shimo-Kon "Chemo-Mechanical Coupling in the Rotary Molecular Motor F₁-ATPase." In: Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology, Gräslund A, Rigler R and Jerker Widengren (eds.), Berlin Heidelberg: Springer, Vol. 96, pp 271-285 (2010).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 健吾 (ADACHI KENGO)
早稲田大学・理工学術院・研究員
研究者番号: 60370128

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし