

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570199

研究課題名(和文)回転分子モーターF1(V1)-ATPaseの回転子を人工的に作る

研究課題名(英文)Constructing artificial rotors for rotary molecular motor F1(V1)-ATPase

研究代表者

古池 晶 (FURUIKE, Shou)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：60392875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：F1(V1)-ATPaseは、ATP駆動の回転分子モーターである。「どのような回転子なら回転運動が可能か」という視点から、回転子のどの領域が回転に寄与しているのかを調べた。回転軸と固定子の接触領域のうち、下部のわずかな部分だけを残した変異体が、回転速度、回転トルクともに野生型の半分程度を示した。これまでの結果と合わせると、回転子には回転に必要な不可欠なアミノ酸は存在しないことになる。回転子には棒状構造だけが必要なのか、回転子のどの部分もある程度回転に寄与できるか、のいずれかであろう。

研究成果の概要(英文)：F1(V1)-ATPase is an ATP-driven rotary molecular motor. In view of what designed rotor can rotate, we have investigated which specific regions in the rotor contribute for the rotation. The mutant, in which only the below slight portion was left within contact regions between rotor axle and stator, rotated at half speed and generated half rotational torque relative to wild-type. Together with previous studies, no residues in the rotor are essential for the rotation. An essential property of the rotor may be just the stick-like structure, or any regions (residues) of rotor may contribute for the rotation.

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分子観察 ATP合成酵素 回転トルク 回転分子モーター 光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生命活動には、使い勝手の良いエネルギー化合物、ATP (アデノシン三リン酸) が不可欠である。ATP 合成酵素は、生体中に普遍的に存在する膜蛋白質で、FoF1 や VoV1 が代表例である。可溶化部分として単離された F1 や V1 は、もっぱら逆反応の ATP 加水分解をするようになるため、F1-ATPase (F1)、V1-ATPase (V1) と呼ばれる。

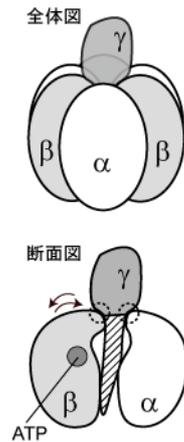
1994 年、X 線構造解析によって、F1 の構造が明らかになった(1)。右模式図のように、サブユニットが交互に並んで円筒 (3₃リング) を形成し、その中心の空隙部にマッチ棒のようなサブユニットが突き刺さっていた。1997 年、野地らは、その上端に、蛍光標識したアクチンフィラメントを付け、その回転の様子を光学顕微鏡で観察することに成功した(2)。この見ればわかる 1 分子観察の手法は、

を回転子として回転運動していることを明瞭に実証しただけでなく、1 つの ATP 加水分解で 120° 回転すること、回転トルクの大きさ、そしてその大きさが角度に依らず一定であることなど、マクロな系を対象にした測定法では得難い情報をもたらした。

その後、1 分子観察・操作の手法は国内外で発展し、F1 は測定対象として盛んに使用された。そのため、飛躍的にその動作原理への理解が深まった。例えば、2004 年に伊藤らは、を強制的に逆回転させると ATP を合成できることを証明し(3)、2007 年には、足立らが、ATP 触媒部位 (内) での化学状態 (ATP 結合、解離など) と、回転子の角度とを対応付けた(4)。これらの実験結果は、回転子の角度が ATP 触媒部位の化学状態を決定できることを示唆している。

この様な状況の中、2008 年、私たちは回転軸 (模式図：断面図の斜線部分) を遺伝子操作によって削った変異体を作成し、その「軸なし F1」が回転速度は野生型の 100 分の程度まで遅くなるものの正しい方向へ回転し続けることを発見した(5)。3₃リングから外れないだけでも不思議な状態で、の切れ端が回転できる事実は、全くの予想外の結果であり、10 数年来支持されてきた従来のモデル - の大きな構造変化 (ATP 結合・ADP 解離によるお辞儀のような動作：断面図の 2 本の矢印) が回転軸を押し引きしたりして回転力を産み出すモデル - では説明できない。なぜなら、回転棒を押し引きするために必要な剛体棒、作用点、支点がもはや存在しない変異体だからである。回転運動の動作原理は白紙状態に戻された。

F₁-ATPase の模式図



その後も、回転運動への回転子の寄与について研究を進めた。回転軸は N 末と C 末のヘリクスが逆平行コイルドコイルを形成してできている。2010 年、C 末のヘリクスをほとんど削り、N 末のヘリクス 1 本だけが回転軸になっている変異体を作成した。コイルドコイルと比較して、ヘリックス 1 本では構造的な固さ、3₃リングとの相互作用も大きく低下することが予想されるが、回転速度も回転トルクも野生型の半分程度にしか低下しないことが分かった。回転運動に対する回転子の本質的な役割について、ますます謎が深まった。

- 1) Abrahams, JP. *et al. Nature* **370**, 621-628. 1994
- 2) Noji, H. *et al. Nature* **386**, 299-302. 1997
- 3) Itoh, H. *et al. Nature* **427**, 465-468. 2004
- 4) Adachi, K. *et al. Cell* **130**, 309-321. 2007
- 5) Furuike, S. *et al. Science* **319**, 955-958. 2008
- 6) Hossain, MD. *et al. BBA*. **1797**, 435-442. 2010

2. 研究の目的

ATP 駆動の回転分子モーターの動作原理を解明するため、特に、回転運動に対する回転子の本質的な役割を明らかにしたい。

回転の動作原理とは、駆動力がどこでどのように発生するのか、その駆動力がどこでどのようにして回転棒に伝わるか、という問いに答えるものである。駆動力発生の源が、ATP 触媒部位を持つ 3 つのであること、そしてそれらの (あるいはを介して) と回転子の接触領域で回転力が伝達されていること、については疑う余地がない。

(1) 問題は、その接触領域の中でも、どの (限定的な) 領域で、回転に不可欠な 3 要素、1) 回転子の保持、2) 回転力の発生、3) 回転の 1 方向性の制御、がなされているかである。「軸なし F1」では、すでに回転子と固定子 (3₃リング) の接触領域は、僅かな領域に限定されている (模式図：断面図の点線囲い部)。そのさらに微小な領域のどこかが、この 3 要素に対応しているはずである。「軸なし F1」から、接触領域を少しずつ削っていき、それぞれの要素に対応する微小領域を決定する。

(2) 回転駆動力の源、3 つのが、それぞれ勝手に働くと、回転子は 1 方向に回転することはできない。互いの化学状態を接触という相互作用を通じて把握し、順序良く協同的に働いているはずである。もし、この指揮をとっているのがであり、その角度がの化学状態を決めているのであれば、回転 1 方向性と回転速度 (= ATP 加水分解速度) とに対するの協同性は、それぞれ回転子の同じ場所で制御されているのかという疑問が浮かぶ。あるいは、もともと固定子 (3₃リング) だけで 1 方向性の協同性があるのであれば、回

転速度だけが回転子のどこかの領域で制御されていることになる。回転の方向(質)と速度(量)は回転子によって制御されているのか、回転子によって制御されているなら、それぞれがどこの微小領域によってなのか、明らかにする。

前項(1)(2)の課題を達成するために、回転可能な人工回転子の作成を試みる。従来の接触領域を削除していく方法だけでは、作成したい構造自体が形成不能になる場合もあるし、微小領域といっても限界がある。

「どのような回転子なら回転可能なのか」という問題へ集約しなおし、全く新しい試みとして、候補になる微小領域を足す方法 微小領域だけを発現・精製したもの、または人工的に合成したペプチドを、金粒子や高分子鎖(DNA や糖鎖)などのミクロ構造物に修飾させる方法 を用いて、人工回転子の作成を試みる。また、固定子側として V1 のものを試し、回転子の汎用性について調べる。

人工回転子の作成は、常識外の力技であり、試行錯誤を要するが、回転の動作原理へ至る最短コースであり、実現したときのインパクトは大きい。なぜなら、回転が観察されたのと同時に、解くべき2つの課題 回転に不可欠な3要素と回転速度が、回転子のどの微小領域でそれぞれ制御されているのか(あるいは全く関与しないのか) の解が明瞭に得られるからである。

3. 研究の方法

〔試料調整〕

回転に必要不可欠だと考えられる領域だけを残した回転子を持つ変異体を設計した。例えば、「軸なし F1」からさらに軸を削った変異体、「軸なし F1」よりも回転軸が少しずつ長い変異体を数種、C 末の ヘリックスだけを残した変異体、「軸なし F1」とは対照的に、軸の下部だけを残した変異体(最小軸だけ変異体)などである。遺伝子操作でプラスミドを導入し、大腸菌で発現させた。

顕微鏡観察時に目印となるビーズを付けるために、どの変異体においても、回転子上部をビオチン化用に、Cys を2~3個導入した。「最小軸だけ F1」の場合、回転軸が短すぎて α_3 リングの上部まで貫かないため、異なる蛋白質の ヘリカルコイルドコイル(ターン部分を含む)のアミノ酸配列を6ピッチ程度加えた。また、精製を簡単にするために、どの変異体でも または に6~10x His を導入した。大腸菌を破碎した後、His-tag カラムとゲル濾過カラムで精製を行い、ビオチン化した後、もう一度ゲル濾過カラムで精製した。

〔1分子観察〕

Ni-NTA 修飾したガラス表面上に、F1(V1)及

びその変異体を、導入した His-tag を介して固定した。回転子には、アビジンと特異的に結合するビオチンが導入されている。回転を観るための目印をアビジンで修飾することで、目印を回転子に付けた。目的によって、目印の大きさを変えた。

変異体本来の回転速度を見るためには、直径40 nmの微小金粒子を使用した。粘性抵抗がほとんど無視できる大きさである。40 nmは、可視光線の波長より短いため、透過光での観察はできない。レーザー暗視野照明を使って可視化し、高速カメラ(1000~8000 駒/秒)で記録した。ビーズ像の輝度重心を求め、その軌跡を解析した。

変異体の回転トルクを測定するときには、0.3~0.5 マイクロメートルのポリスチレンビーズを使用した。回転トルクは、回転速度とビーズに掛かる粘性抵抗の積から求めた。

4. 研究成果

(はじめに)当初の目的では、回転子のどこが特定の微小領域が、回転に必要な3要素と回転速度を決定していることを前提にしていた。つまり、回転子と固定子の間に、(わずかではあるが)特異的な相互作用が必要だと考えていた。しかし、人工回転子を試みる前に、本研究の進捗状況、及び他の研究者からの報告によって、回転子には必要不可欠な領域がないという全く予想外の方向へ展開していった。

F1の回転子、N末側のヘリックスを50残基削ると、 α_3 リング上部との接触もなくなる。つまり、回転軸はC末ヘリックスのただ1本になる。野生型F1が、回転速度~200回転/秒、回転トルク~40 pN·nmであるのに対し、この変異体は、回転速度が~20%(~40回転/秒)、回転トルクが~50%(~20 pN·nm)に低下した。 α_3 リング上部の縁と回転軸とのパッキングによって生じる相互作用(模式図:断面図の点線囲い部)は、回転にとって重要と考えられるだけに、その部分の回転軸の太さが半分になっても、回転速度と回転トルクがある程度維持されることは意外な結果であった。

「軸なしF1」とは対照的に、回転軸の下部だけを残した変異体を作成した。この変異体は、N末から18残基、C末から36残基だけが野生型のアミノ酸配列をもち、その2本のヘリックスを別種の蛋白質からの48残基のヘリカルコイルドコイルでつないでいる。もはや、これまでに作成した(回転可能な)変異体と、重複するアミノ酸はひとつもない。この「最小軸だけ変異体」は、野生型F1と比較して、回転数が~25%(~50回転/秒)、回転トルクは~50%(~20 pN·nm)に低下した。

これまでに作成した(回転可能な)変異体と、重複するアミノ酸がひとつもないにもかかわらず、回転速度と回転トルクがある程度維持されるということは、回転子には、回転運動に必要な不可欠な領域、アミノ酸配列は存在しないということを示している。言い換えると、回転の3要素及び回転速度(間の協同性を高める)に対して、回転子のどの部分であってもある程度寄与している事になる。この結果をシンプルに説明するには、以下の2通りが考えられる。1) 回転子に必要なのは構造体の形体だけであり、 ϵ リング内の空隙にある程度ぴったり入る棒状のものならば何でもよく、アミノ酸でできていなくても良い。2) 回転子のどの領域も、回転の3要素及び回転速度に対して、ある程度特異的な相互作用を有している。今後の研究で明らかにしていきたい。

回転子を削って調べるだけでなく、回転子と接触している固定子(ϵ リング)側の構造を欠損させるとどうなるのかも調べた。 ϵ リング上部の縁と回転軸とのパッキングによって生じる相互作用(模式図:断面図の点線囲い部)がどの程度回転に寄与するのかを調べるために、 ϵ の上部から内側に突き出ているヘリカルコイルドコイルの長さを短くした変異体を作成した。これらの変異体の回転速度、回転トルクは野生型と比較して~50%を維持していた。一方、この変異体で作成したFOF1のATP合成活性は野生型の~20%まで落ち込んだ。高いATP合成能を達成するためには、野生型なみの回転トルクが必須のようである。

F1やV1では、MgADP阻害という現象が知られている。V1の固定子は、F1の ϵ リングに対応して、 A_3B_3 リングである。ATP触媒部位は3つのAサブユニットに存在している。このATP触媒部位にMgADPが強く結合したまま、しばらく解離しなくなり、その結果、回転もATP加水分解も止まってしまう可逆的な現象である。そのメカニズムはよくわかっていない。腸内細菌由来のV1は、MgADP阻害に掛かりにくいことがわかっている。好熱菌由来のV1を対象に、Aサブユニットのドメインを腸内細菌由来のものと交換して、その影響を調べた。特定のドメインを交換すると、無機リン酸の結合速度が増加し、MgADP阻害に掛かりにくくなることが分かった。

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 5件)

R. Chiwata, A. Kohori, T. Kawakami, K. Shiroguchi, S. Furuike, K. Adachi, K. Sutoh, Yoshida, K. Kinoshita Jr., "None of the Rotor

Residues of F1-ATPase Are Essential for Torque Generation." *Bioophys. J.*, [査読有] 106 (2014) pp. 2166-2174
doi: 10.1016/j.bpj.

J. Kishikawa, A. Nakanishi, S. Furuike, M. Tamakoshi, K. Yokoyama, "Molecular basis of ADP inhibition of vacuolar (V)-type ATPase/synthase." *J. Biol. Chem.*, [査読有] 289 (2014) pp. 403-412.
doi: 10.1074/jbc.M113.523498.

E. Usukura, T. Suzuki, S. Furuike, N. Soga, E. Saita, T. Hisabori, K. Kinoshita Jr, M. Yoshida, "Torque generation and utilization in motor enzyme FOF1-ATP synthase: half-torque F1 with short-sized pushrod helix and reduced ATP Synthesis by half-torque FOF1." *J. Biol. Chem.*, [査読有] 287 (2012) pp.1884-1891.
doi: 10.1074/jbc.M111.305938.

A. Kohori, R. Chiwata, M.D. Hossain, S. Furuike, K. Shiroguchi, K. Adachi, M. Yoshida, K. Kinoshita Jr., "Torque generation in F1-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice." *Bioophys. J.* [査読有] 101 (2011) pp. 188-195.
doi: 10.1016/j.bpj.

〔学会発表〕(計 28件)

J. Kishikawa *et. al.* "Analysis of the MgADP-inhibition mechanism of VoV1 by domain swapping approach." 日本生物物理学会 2013年10月30日 第51回年会 国立京都国際会館 京都市

T. Suzuki *et. al.* "Single molecule analyses of human F1-ATPase revealed distinct rotation scheme of mitochondrial F1 motor." 日本生物物理学会 2013年10月28日 第51回年会 国立京都国際会館 京都市

J. Kishikawa *et. al.* "Relationship between sensitivity to MgADP-inhibition and affinity for phosphate." 第86回日本生化学大会 2013年9月12日 パシフィコ横浜 横浜市

R. Chiwata *et. al.* "None of the rotor residues of F1-ATPase are essential for torque generation" 生物物理学会 第50回年会 2012年9月22-24日 名古屋大学・東山キャンパス

T. Suzuki *et. al.* "Single-molecule analyses of the rotation and regulation of human" F1-ATPase" 生物物理学会 第50回年会 2012年9月22-24日 名古屋大学・東山キャンパス

古池 晶 「ATP駆動の回転分子モーターを用いたATP加水分解の1分子熱力学」合同公開シンポジウム「揺らぎと生命機能」×「水とATP」ゆらぎと水 - 生命のエネルギーと機能の分子

機構を探る 2012年9月14-15日 大阪ガーデンパレス

S. Furuike *et. al.* "Stepping rotation in H⁺-ATPase/synthase has been revealed with an essentially drag-free probe." The 8th European Biophysics Congress. 24-17 Aug. 2011, Budapest, Hungary

Chiwata, R. *et. al.* "Rotation of F1-ATPase with a protrusion-less gamma rotor." The 8th European Biophysics Congress. 24-17 Aug. 2011, Budapest, Hungary

〔図書〕(計 1件)

横山 謙、古池 晶、岸川 淳一 「第22章 膜タンパク質の1分子観察」、岩田 想編、膜タンパク質構造研究、化学同人、2013、233(187-195)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古池 晶 (FURUIKE Shou)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：60392875

(2) 連携研究者

横山 謙 (YOKOYAMA Ken)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：70271377