

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570187

研究課題名(和文) F1-ATPaseの効率はなぜ高いか

研究課題名(英文) Why the energy transduction efficiency of F1-ATPase so high?

研究代表者

宗行 英朗 (Muneyuki, Eiro)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：80219865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：F1-ATPaseは、非常に高効率な自由エネルギー変換をする分子モーターである。この高効率を達成するメカニズムを知るために、効率の低下した変異体との比較から手がかりを得ようと言うのが本研究の目的であった。まずADPによる阻害を受けにくく、回転トルクが低下した変異体 (G158A, T165S, Y341W) について、揺らぎによる熱の散逸の計測を行い、この変異体は回転自由度への熱の散逸も少なくなっていることが分かった。本研究では、生物の持つ分子モーターのエネルギー変換について従来にない定量的な評価をして、理論との比較が可能な結果を得られたので、エネルギー変換の理解に重要な意義があると自負している。

研究成果の概要(英文)：F1-ATPase is a highly efficient molecular motor. In order to understand the high efficiency, we compared the high efficient wild type motor with a low efficient mutant (beta G158A, T165S, Y341W), which is less sensitive to ADP inhibition and generates less torque. We found that this mutant motor dissipates "heat" in the rotational degree of freedom than wild type. We could achieve a quantitative measurement on the energy transduction by biological molecular motor which must be useful for understanding of energy transduction.

研究分野：生物物理学

キーワード：生体エネルギー変換 分子モーター F1-ATPase

1. 研究開始当初の背景

FoF1-ATP 合成酵素の一部である F1-ATPase は、分子内部の $\alpha_3\beta_3$ リングに囲まれた γ サブユニットの回転と ATP の加水分解、合成を可逆的に共役させる分子モーターである。そして生体内でエネルギー源として消費される ATP のほとんどを Fo 部分の発生したトルクによる γ サブユニットの回転で合成するという非常に重要な働きを担っている。一分子観察によって F1-ATPase が分子モーターであることが証明されて以来、非常に多くの研究により、その化学反応と回転運動の素過程の対応について詳細な知見が蓄積されてきた。しかし、エネルギー変換という観点での研究はそれほど進んでこなかった。初期の研究では回転プローブに対する粘性抵抗による摩擦力と平均回転速度から見積もった“仕事”が生理的な ATP の加水分解自由エネルギーにほぼ等しかったことから、エネルギー変換効率がほぼ 100%であることが唱えられた。しかし ATP の加水分解自由エネルギーを様々に変えた実験でもステップ回転速度から計算された“仕事”がその加水分解自由エネルギーと相関しなかったことから、この考え方に疑問が呈された (引用文献①)。申請者のグループは回転電場法によるトルク印可システムを採用し、外部トルクと回転速度の関係を最初に報告し (引用文献②)、さらに最近の非平衡熱力学の成果を生かして、今までの“仕事”を含めた回転自由度でのエネルギーの散逸が様々な条件で ATP の加水分解自由エネルギーとほぼ一致すること (引用文献③)、平均回転速度が 0 になる外部トルク (ストールトルク) が ATP の加水分解自由エネルギーから期待される最大トルクとよく一致することを示した (引用文献④)。さらに回転のトラジェクトリの解析から回転運動を駆動する有効ポテンシャルの推定が可能となり、その結果はエネルギー散逸やストールトルクの結果と良く整合するものであった (引用文献⑤)。

以上のように、熱力学的に正確な議論に沿って行われた申請者のグループでの実験結果から、F1-ATPase は極めて効率の高い分子モーターであることが実証されてきた。しかしどの様にして F1-ATPase がこのような高い効率を達成しているかが理解されたわけではなかった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究の大目標は、F1-ATPase の高効率エネルギー変換のメカニズムを明らかにすることとした。どの様にこの問題に手を付ければよいかは様々な考え方がありと思われるが、着実な方法の一つは、エネルギー変換を高効率で行えるものとそうでないものを比較検討すること、つまり野生型と変異型の F1-ATPase 比較である。そこで、既に特徴的な振る舞いが知られている変異体についてエネルギー変換特性を調べ、変

異部位の特徴とエネルギー変換特性の変化を結びつけることを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

本研究で扱う変異体としては、高濃度の ATP, ADP, リン酸共存下で回転の観察ができる ADP による阻害を受けにくい変異体で (β T165S, β G181A, β Y341W の三重変異体) 酵素上での ATP \rightarrow ADP+Pi への開裂反応が遅くなっている β E190D 変異体などを考え、以下の実験を計画した。

1) 回転電場法を用いて ATP 合成方向のトルクをかけるストールトルクの測定。

2) 回転自由度から散逸するエネルギーの Harada-Sasa 等式を用いた測定。

3) 回転のトラジェクトリの解析による回転を駆動する有効ポテンシャルの見積。

以上の実験の他に、野生型 F1-ATPase についての研究を更に進めること、以上の実験から考えられる問題についての実験を適宜行った。

4. 研究成果

ほぼ予定通り、ADP による阻害を受けにくく、ストールトルクが低下した変異体 (β G158A, T165S, Y341W) について、野生型と ATP 水解から合成の条件まで含めて非平衡的な揺らぎによる回転自由度への散逸の計測を行い、ストールトルクの低下した変異体は回転自由度への熱の散逸も低下していることが分かり、論文を投稿、出版することが出来た (New Journal of Physics 17 (2015) 015008,).

しかし、回転を駆動する有効ポテンシャルの測定は、この変異体の回転速度が観察中に変化しやすいことなどから、現在のところ予備的なデータの取得にとどまっている。また、 β E190D 変異体については、ストールトルクの測定を行い、野生型 F1-ATPase に比べて明らかにストールトルクが低く、ストール付近の回転の挙動から、タンパク質の構造がやや不安定になっている可能性が示唆された。そこで、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の熱に対する安定性や $\alpha_3\beta_3$ 複合体の安定性について検討したところ、明らかにこれらの安定性の低下が見られ、 β E190 残基は触媒作用に重要なだけでなく、構造の安定性にも寄与してエネルギー変換効率を高めていることが分かった。現在これらの結果については更にデータを積み重ねているところである。

研究がすべて計画通りに進んだわけではないが、生物の持つ分子モーターの自由エネルギー変換について、従来にない定量的な評価をすることが出来、理論との比較が可能な新たな一歩を踏み出したことは重要な意義があると自負している。

<引用文献>

① Single Molecule Energetics of F₁-ATPase Motor. Muneyuki, E., Watanabe-Nakayama, T., Suzuki, T., Yoshida, M., Nishizaka, T., Noji, H.

Biophys. J. **92**, 1806-1812, (2007)

② Effect of external torque on the ATP-driven rotation of F_1 -ATPase. Watanabe-Nakayama, T., Toyabe, S., Kudo, S., Sugiyama, S., Yoshida, M., Muneyuki, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 951-957, (2008)

③ Nonequilibrium Energetics of a Single F_1 -ATPase Molecule. Toyabe, S., Okamoto, T., Watanabe-Nakayama, T., Taketani, H., Kudo, S., Muneyuki, E. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 198103 (2010)

④ Thermodynamic efficiency and mechano-chemical coupling of F_1 -ATPase. Toyabe, S., Watanabe-Nakayama, T., Okamoto, T., Kudo S., Muneyuki, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 17951-17956 (2011)

⑤ Recovery of state-specific potential of molecular motor from single-molecule trajectory Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, and Eiro Muneyuki *EPL* **97**, 40004 (2012)

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 6 件)

① Komuro Y, Miyashita N, Mori T, Muneyuki E, Saitoh T, Kohda D, Sugita Y. Energetics of the presequence-binding poses in mitochondrial protein import through Tom20. *J Phys Chem B.* 査読あり 117(10), 2864-71 (2013) doi: 10.1021/jp400113e

② Minagawa, Y., Ueno, H., Hara, M., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamato, I., Muneyuki, E., Noji, H., Murata, T., Iino, R. Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 査読あり 288(45):32700-7 (2013) doi: 10.1074/jbc.M113.506329

③ Kikuchi, Y., Naka, Y., Osakabe, H., Okamoto, T., Masaike, T., Ueno, H., Toyabe, S., Muneyuki, E. Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric b subunit and the $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of F_1 -ATPase. *Biophys. J.* 査読あり 105(11):2541-8 (2013) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.018>

④ Ueno H, Minagawa Y, Hara M, Rahman S, Yamato I, Muneyuki E, Noji H, Murata T, Iino R. Torque Generation of *Enterococcus hirae* V_1 -ATPase. *J Biol Chem.* 査読あり 2014 Nov

7:289(45):31212-23. doi: 10.1074/jbc.M114.598177.

⑤ Yasuaki Komuro, Suyong Re, Chigusa Kobayashi, Eiro Muneyuki, and Yuji Sugita CHARMM Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca^{2+} -ATPase. *J. Chem. Theory Comput.* 査読あり (2014) 10:4133-4142. DOI: 10.1021/ct5004143

⑥ Shoichi Toyabe, Eiro Muneyuki, Single molecule thermodynamics of ATP synthesis by F_1 -ATPase. *New Journal of Physics* 査読あり 17 (2015) 015008, doi:10.1088/1367-2630/17/1/015008

[学会発表] (計 14 件)

① Solvay Workshop on THERMODYNAMICS OF SMALL SYSTEMS Université Libre de Bruxelles, 2 - 4 December 2013. Single molecule study of a molecular motor: from biochemistry to physics. Eiro Muneyuki, Invited.

② 2013 年 生体運動研究合同班会議 (広島大学 1 月 12 日~14 日) F_1 -ATPase β サブユニットへのヌクレオチド結合の解析 菊池 洋輔, 宗行 英朗

③ 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28-30 国立京都国際会館 ポスター発表 F_1 -ATPase の P-loop 変異体とリン酸解離の関係 The relationship between F_1 -ATPase P-loop mutants and P_i release Hikaru Yoshida, Ayumi Ito, Jotaro Ito, Tomoko Masaike, Takayuki Nishizaka, Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, Eiro Muneyuki

④ 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28-30 国立京都国際会館 ポスター発表 回転電場を用いた外力存在下での F_1 -ATPase の回転観察 Observation of the rotation of F_1 -ATPase Yohsuke Kikuchi, Takahiro Nakayama, Shoichi Toyabe, Eiroh Muneyuki

⑤ 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28-30 国立京都国際会館 ポスター発表 Sopped-Flow 法を用いた β サブユニット単体と F_1 -ATPase へのヌクレオチド結合の比較 Comparison of the nucleotide binding to the isolated β subunit and the F_1 -ATPase using the Sopped-Flow method Riku Nagano, Kiyoshi Obara, Tomoko Masaike, Hiroshi Ueno, Eiro Muneyuki

⑥ 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28-30 国立京都国際会館 ポスター発表
改良した ATP 分子力場を用いた筋小胞体カルシウムポンプの分子動力学計算

Molecular dynamics simulations of SR Ca²⁺-ATPase using improved ATP force field Yasuaki Komuro, Chigusa Kobayashi, Suyong Re, Eiro Muneyuki, Yuji Sugita

⑦ 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 28-30 国立京都国際会館 ポスター発表
レプリカ交換分子動力学計算による PA 化糖鎖の立体構造解析

Conformational analysis of PA-glycans by replica-exchange molecular dynamics simulations Shigehisa Watabe, Suyong Re, Eiro Muneyuki, Yuji Sugita

⑧ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 1P105

Molecular dynamics simulations of ATP/ADP bound forms of SR Ca²⁺-ATPase using CHARMM force field with modified polyphosphate parameters
改良した多リン酸力場を用いた ATP/ADP 結合状態の筋小胞体カルシウムポンプの分子動力学計算 小室 靖明, 李 秀榮, 小林 千草, 宗行 英朗, 杉田 有治

⑨ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 1P160

Inhibitory effect of Pi on F1-ATPase P-loop mutant TF1(β G158A)
F1-ATPase の P-loop 変異体 TF1(β G158A) に対するリン酸の阻害効果
星名 仁志, 吉田 光, 伊藤 亜由美, 伊藤 丈太郎, 鳥谷部 祥一, 上野 博史, 宗行 英朗

⑩ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 3P152

Nucleotide binding to TF1 β subunit in relation to the effect of Pi
長埜 陸, 小原 清志, 上野 博史, 宗行 英朗

⑪ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 3P154

Rotor-Stator Interactions in V1 and Vo from *Enterococcus hirae* V-ATPase 上野 博史, 皆川 慶嘉, 原 舞雪, 山登 一郎, 野地 博行, 村田 武士, 飯野 亮太, 宗行 英朗

⑫ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 1P161

Observation of the rotation of F1-ATPase

under the constant external torque

一定外力下での F1 の回転の観察
菊池 洋輔, 上野 博史, 中山 隆宏, 宗行 英朗, 鳥谷部 祥一

⑬ 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日 (木) ~27 日 (土)
演題番号 1P163

The response of TF1 β E190D mutant to the external torque
TF1 β E190D 変異体の外部トルク依存性 田中 真奈, 河上 知広, 鳥谷部 祥一, 上野 博史, 工藤 正史, 宗行 英朗

⑭ 2015 年 生体運動研究合同班会議 (学習院大学 1 月 7 日 ~9 日)
外力存在下の F1-ATPase の回転観察
菊池洋輔, 鳥谷部祥一, 上野博史, 宗行英朗

[図書] (計 3 件)

① 宗行英朗, 鳥谷部祥一 (新藤 斎 編著 中央大学出版部) 中央大学学術シンポジウム研究叢書 9 ナノスケール・ミクロスケールから見えるビックな世界 第一章 マクスウェルの悪魔の実現 —— ミクロの世界で情報を使って熱エネルギーを自由エネルギーに変換する —— 2013 年 p.1-19

② 鳥谷部祥一, 宗行英朗 (野地博行 編 化学同人) 化学フロンティアシリーズ 23 1 分子ナノバイオ計測査読無 第 10 章 分子モーターの 1 分子実験熱力学 2014 年 p. 131-138.

③ 上野博史, 鳥谷部祥一, 宗行英朗
DOJIN BIOSCIENCE SERIES 17 一分子生物学 (原田 慶恵 石渡 信一 編 化学同人) 査読無 第 7 章 F₀F₁ モーター 2014 年 p. 88-101.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phys.chuo-u.ac.jp/j/muneyuki/>

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗行英朗 (MUNYUKI Eiro)

中央大学工学部・物理学科・教授

研究者番号：80219865

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：