

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770148

研究課題名(和文)プロトン駆動力によって回転するATP合成酵素の化学力学共役機構の解明

研究課題名(英文)Chemo-mechanical coupling mechanism of FoF1-ATP synthase

研究代表者

渡邊 力也(Watanabe, Rikiya)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30540108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、プロトン駆動力によるATP合成酵素(FoF1)の回転運動を可視化し、その作動機構を解明することを目的としていた。24年度、私はFoF1のプロトン駆動回転を直接可視化する計測系の開発をし、FoF1のプロトン駆動回転の作動原理の一部を解明することに成功した。本研究結果はNature Communications誌に掲載された。また、25年度、プロトン輸送の1分子計測技術を開発し、ATP加水分解時のFoF1のプロトン輸送速度を同定することに成功した。本成果に関する論文は投稿査読中である。本研究で開発された技術は、今後FoF1の作動機構を理解するうえで重要な技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, for understanding of the chemo-mechanical coupling mechanism of FoF1-ATP synthase, I attempted to visualize the rotary motion of FoF1 at single molecule level. In 2012, I succeeded to directly visualize the proton-driven rotation of FoF1 at single molecule level (Watanabe et al., Nat Commun 2013). In 2013, I developed the novel platform to detect the proton pump activity of FoF1 at single molecule level (Watanabe et al., submitted). For further understanding of FoF1, the method developed in this project is promising for the future.

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分子生物物理学 ATP合成酵素

### 1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素 (FoF1) はタンパク質でできた分子モーターの一種で、細胞膜に埋め込まれた Fo と水溶性の F1 の 2 つの回転モーターから構成される。これまでに FoF1 の回転触媒機構を理解するにあたり、1 分子生物物理研究が中心的な役割を担ってきたが、研究開始当初の FoF1 の 1 分子生物物理研究は、F1 モーターに関するものがほとんどであり、Fo ならびに FoF1 複合体の作動原理に関する情報が決定的に欠落していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、プロトン駆動力による ATP 合成酵素 (FoF1) の回転運動を可視化し、その作動機構を徹底的に解明することを目的とする。FoF1 は化学反応と力学運動が可逆的な共役関係にある稀有な性質を有しているだけでなく、生理的に重要な ATP の合成を担っていることから、その作動原理を解明することは強い関心を惹いている。この作動原理を解明するためには、生物物理学に立脚した詳細な解析だけでなく、画期的な実験系の開発が必要不可欠である。申請者は生物物理学・微細加工学・機械工学の多分野の研究背景があり、それらの経験を活用することで目的を完結できると確信している。また、本研究が成功した暁には、FoF1 だけでなくプロトン駆動力により機能化されている膜タンパク質全般にわたる普遍的な作動原理の解明にもつながると期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では大きく 2 つの技術を開発し、それらを組み合わせることによって FoF1 複合体のプロトン駆動回転を可視化した。

i) 基板支持人工脂質二重膜(サポーテッド膜)に再構成した状態で FoF1 の回転運動を可視化する技術の開発

ii) 紫外光の近接場照明を利用したイオン駆動力の制御システムの開発

### 4. 研究成果

本研究は、プロトン駆動力による ATP 合成酵素 (FoF1) の回転運動を可視化し、その作動機構を解明することを目的として

いた。24 年度、私は FoF1 のプロトン駆動回転を直接可視化する計測系の開発をし、FoF1 のプロトン駆動回転の作動原理の一部を解明することに成功した。本研究成果は Nature Communications 誌に掲載された。また、25 年度、プロトン輸送の 1 分子計測技術を開発し、ATP 加水分解時の FoF1 のプロトン輸送速度を同定することに成功した。本成果に関する論文は投稿査読中である。本研究で開発された技術は、今後 FoF1 の作動機構を理解するうえで重要な技術となることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 渡邊力也, 野地博行. 「F1 の化学反応スキームに関する新しい理解」生物物理(2012) 1, 14-17 (査読有り)
- ② Watanabe, R., Noji, H. “Chemomechanical coupling of F1-ATPase under hydrolysis condition” Biophysics (2012) 8, 73-78 (査読有り)
- ③ Watanabe, R., Tabata, KV., Iino, R., Ueno, H., Iwamoto, M., Oiki, S., & Noji, H. “Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force” Nature Communications (2013) 4, 1631 (査読有り)
- ④ Watanabe, R., Noji, H. “Chemomechanical coupling mechanism of F1-ATPase: Catalysis and torque generation” FEBS Letters (2013) 8, 1030-1035 (査読有り)
- ⑤ 渡邊力也. 「FoF1-ATP 合成酵素のプロトン駆動力による回転運動の直接観察」生物物理(2013) 4, 214-215 (査読有り)
- ⑥ Watanabe, R. “Rotary catalysis of FoF1-ATP synthase” Biophysics (2013) 9, 51-56 (査読有り)
- ⑦ Watanabe, R., Hayashi, K., Ueno,

H., & Noji, H.  
“Catalysis-enhancement via rotary fluctuation of F1-ATPase”  
Biophysical Journal (2013) 105, 2385-91 (査読有り)

- ⑧ Watanabe, R., & Noji, H. “Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein” Nature Communications (2014) 5, 3486 (査読有り)
- ⑨ Watanabe, R., & Noji, H. “Characterization of the temperature-sensitive reaction of F1-ATPase by using single-molecule manipulation” Scientific Reports (2014) 4, 4962 (査読有り)
- ⑩ Watanabe, R., Matsukage, Y., Yukawa, A., Tabata, KV., & Noji, H. “Robustness of the Rotary Catalysis Mechanism of F1-ATPase” Journal of Biological Chemistry (2014), published online (査読有り)
- ⑪ Arai, HC., Yukawa, A., Iwatate, RJ., Kamiya, M., Watanabe, R., Urano, Y., & Noji, H. “Torque generation mechanism of F1-ATPase upon NTP binding” Biophysical Journal (in press) (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Watanabe, R., & Noji, H. “Robustness of rotary catalysis mechanism of F1-ATPase” Annual meeting of Biophysical Society, 2014 年 2 月 16 日、サンフランシスコ、米国
- ② Watanabe, R., Soga, N., & Noji, H. “脂質膜アレイを利用した膜輸送体の物質輸送の 1 分子計測” 日本生体エネルギー研究会、2013 年 12 月 18 日、静岡、日本
- ③ Watanabe, R. “Single molecule

biophysics of FoF1-ATP synthase”  
Department Seminar. Max-Planck  
Institut für Biophysik, 2013 年  
10 月 30 日、フランクフルト、ドイツ

- ④ Watanabe, R., Fujita, D., Tabata, KV., Yamauchi, L., Soga, N., Kim, SH., Suga, H., & Noji, H. “High throughput formation of sub-million lipid membrane arrays for measuring membrane protein activities” 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2013)、2013 年 10 月 28 日、フライブルグ、ドイツ
- ⑤ Watanabe, R., & Noji, H. “Novel Platform to measure the proton pump activity by FoF1-ATP synthase using micro-fabricated lipid membrane arrays” Gordon Conference Bioenergetics, 2013 年 6 月 23 日、ニューハンプシャー、米国
- ⑥ Watanabe, R., Tabata, KV., Iino, R., & Noji, H. “Direct observation of the rotary motion of FoF1-ATP synthase in ATP synthesis condition” Annual meeting of Biophysical Society, 2013 年 2 月 2 日、フィラデルフィア、米国
- ⑦ Watanabe, R., Tabata, KV., Iino, R., & Noji, H. “FoF1-ATP 合成酵素のプロトン駆動力による回転運動の直接観察” 日本生体エネルギー研究会、2012 年 12 月 23 日、岡山、日本
- ⑧ Watanabe, R., & Noji, H. “Mechanical modulation of catalytic power of F1-ATPase” CECAM, 2012 年 11 月 29 日、ルガーノ、スイス
- ⑨ Watanabe, R., Tabata, KV., Iino, R., & Noji, H. “Direct

observation of H<sup>+</sup>-driven rotation of FoF1-ATP synthase” 日本生物物理学会年会、2012年9月22日、名古屋、日本

- ⑩ Watanabe, R., Tabata, KV., Iino, R., & Noji, H. “Direct observation of the rotation of FoF1-ATP synthase driven by the proton motive force” European Bioenergetics Conference、2012年9月15日、フライブルグ、ドイツ

〔図書〕(計2件)

- ① 渡邊力也、“化学フロンティア 231 分子ナノバイオ科学の新パラダイム” 化学同人(in press)
- ② 渡邊力也、野地博行 “CSJ10 巻ここまで進んだバイオセンシング・イメージング” 化学同人、2012年、209ページ

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者:

渡邊 力也 (WATANABE, Rikiya)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号 : 30540108