

平成30年6月29日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440084

研究課題名(和文) ATP合成酵素VoV1内の2つの回転分子モーターの連動 - 駆動力伝達の仕組み -

研究課題名(英文) The interlocked rotation between two rotary molecular motors in ATP synthase VoV1 -The mechanism of intermolecular torque transmission-

研究代表者

古池 晶 (FURUIKE, Shou)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：60392875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP合成酵素VoV1(またはFoF1)は、ATP合成・分解を担うV1(F1)モーターと、プロトン透過・輸送を担うVo(Fo)モーターから成り立つ。両モーターが共通の回転棒で連結されているため、それぞれの回転角度と機能は連動しているはずである。その対応付けのため、モーター間の駆動力伝達に、回転棒の弾性がどの程度影響するのか、1分子観察で確かめた。回転棒の弾性を弱めたF1変異体の回転速度は、野生型と比較し、負荷有りでは7割程度、負荷無しでは同程度であった。

研究成果の概要(英文)：ATP synthase VoV1 (or FoF1) is composed of two rotary molecular motors. The V1 (Vo) motor synthesizes/hydrolyzes ATPs, and the Vo (Fo) motor transmits/transport protons. Because the two motors are connected together by a common rotary shaft, the rotational angles and the functions of two motors also should be tightly coupled each other. To elucidate the couplings, we examined by single molecule observation, how is the torque transmission between the two motors affected by a torsional/bending rigidity of the rotary shaft. We constructed F1 mutants in which the shafts would retain nearly genuine shape and have weak torsional/bending rigidity. The rotation rates with and without drag were ~70% and almost same of wild type, respectively.

研究分野：生物学

キーワード：ATP合成酵素 分子モーター 1分子観察

## 1. 研究開始当初の背景

ATP 合成酵素 (FoF1 や VoV1) は、2 種の回転モーターが共通の回転棒で連結した分子機械である。化学反応 (ATP → ADP + Pi) を行う化学的回転分子モーター (F1 や V1) と、プロトン流駆動の電気化学的回転分子モーター (Fo や Vo) とが、共通の回転棒によって連結している。このユニークな構造が、回転運動を介した「化学エネルギーと電気化学ポテンシャルの可逆的変換」を可能にしている。まるで、(マクロな機械の) 発電機のようなものであるが、ナノの世界では慣性力が働かないため、全く異なる仕組みで働いているはずである。その分子機械の仕組みを明らかにすることは意義深い。

1 分子観察は、F1 や V1 の理解を大いに進めたが、FoF1 や VoV1 はほとんど手付かずの状況である。水溶性部分の化学的回転分子モーター (F1 / V1) の仕組みについては、1997 年の野地らの 1 分子観察をきっかけに飛躍的に進歩した。この見れば分かる手法は、その回転運動を明快に証明しただけでなく、ひとつの ATP 加水分解で 120° 回転すること、回転トルクは角度によらず一定であることなど、その他の手法・測定では得難い情報をもたらした(1)。その後、F1 の回転棒を外力操作で強制的に逆回転させると ATP を合成できること(2)、回転棒の角度と ATP 触媒部位における化学状態との対応付け(3)や、触媒部位への ATP、ADP、Pi の親和性が決定されている(4)。一方、膜内在性の電気化学的回転分子モーター (Fo や Vo) および ATP 合成酵素全体については、多くの研究者の再三の試みにも関わらず、1 分子観察・操作の手法がほとんど通用していない。

そのような状況で、私たちは、界面活性剤で可溶化した ATP 合成酵素 VoV1 の ATP 駆動の回転をほぼ無負荷状態で観察し、1 回転あたり 12 個の小停止 (~30° ステップ) を発見した(5)。これは、プロトン輸送に関係する相互作用として初めて可視化された例である。

V1 の回転では、ATP 結合を待つための 120° おきの小停止が鮮明に観察された。しかし、不思議なことに、VoV1 の回転では、

低 ATP 濃度であっても V1 由来の小停止は不鮮明で見分けがつかず、Vo 由来の 12 個の小停止は楕円を描き、その長軸方向は回転するとともに変化した。

また、つい最近、固定子と回転子を支える 2 本の柱 (ヘリカルヘリックス構造) について結晶構造解析がなされた。単独ではいろいろな方向に曲がることが示され、回転時には分子全体がツイスト運動を伴うことが予想された(6)。このツイスト運動と、VoV1 で観察された ~ の現象は、VoV1 分子が回転する際に、分子内弾性によって分子全体がねじれたり戻ったりしていると考え、非常にシンプルに説明できる。

- 1) Noji, H. *et al. Nature* **386**, 299-302. 1997
- 2) Itoh, H. *et al. Nature* **427** 465-468. 2004
- 3) Adachi, K. *et al. Cell* **130**, 309-321. 2007
- 4) Adachi, K. *et al. Nat Commun.* **3**, 1022. 2012
- 5) Furuike, S. *et al. Nat Commun.* **2**, 233. 2011
- 6) Stewart AG. *et al. Nat Commun.* **3**, 687. 2011

## 2. 研究の目的

機械の仕組みがわかるとは、1) 駆動力の発生(入力)、2) その駆動力の(何段階かの)伝達の仕組み(伝達)、3) その伝達された駆動力が最終的にある機能を発生する仕組み(出力)、の 3 点がくまなく理解され、かつ 1 2 3 の運動を知ることである。

従来の研究は入力(ATP 加水分解による駆動力の発生)や入・出力(外力による ATP 合成)のみに注がれ、1 2 3 の運動については考えていない。特に、伝達の仕組みを知らなければ(例えば伝達に遅延回路が含まれば)、入力と出力だけを同時観察しても、(1 番知りたい)それらの対応付けは難しい。2 つのモーター間の運動を知るには、まず駆動力の伝達方式を明らかにする必要がある。

先に述べた理由以外にも、i) F1 や V1 で、回転トルクが角度に依らず一定であること、ii) ATP 濃度や回転速度によらず、逆回転などのミスがほとんど観察されていないこと、iii) 触媒部位への ATP、ADP、Pi の親和性(結合速度と解離速度)は、回転角度によって滑らかに変化する(結合や解離の角度はある程度の幅を持つ)こと、などの結果は分子内弾性の存在を認めれば、単純に説明することができる。(剛体モデルでは、分子内での複雑な制御が必要になる。)

これらの理由から、2 つの回転分子モーター間の駆動力の伝達方式を知るために、特に分子内弾性がどの程度駆動力伝達に寄与しているのかを以下の 3 つで明らかにすることを目的とした。

### (1) VoV1 分子のツイスト運動の実証

VoV1 分子内の 2 つの回転分子モーター間の駆動力の伝達方式を決定することを最終的な目標にした。実験の容易さ、先行実験の優位性を生かし、まずは ATP 駆動の条件でかつ無負荷の条件で 1 分子観察を行い VoV1 分子のツイスト運動を実証することで、分子内弾性の駆動力伝達への寄与を調べる。無負荷条件で分子全体のねじれと回転を同時観察できれば明快である。

### (2) F1 の回転棒を半分削除したときの回転

ツイスト運動の有無にかかわらず、もし 2 つの回転分子モーター間の駆動力伝達に分子内弾性が寄与しているなら、回転棒もまたねじれている必要がある。回転軸を途中で切断してしまえば、もはや回転軸の断片間に

駆動力の伝達は生じない。つまり、弾性すらない回転軸と見なすことができ、その回転運動を切断なしと比較することで、回転軸の弾性の影響を調べられると考えた。V1 と高い構造類似性を持ち、かつ詳細な回転メカニズムが分かっている F1 を対象にし、回転軸のどの部分が、ATP 触媒部位の化学イベントと関連しているのかを、回転軸がほぼ半分の長さに対応する F1 変異体を作製して調べる。

### (3) 弱い弾性の回転棒をもつ F1 の回転

回転軸を途中から削除した変異体〔(2) で作製した変異体〕に、削除した回転軸部分を戻した「回転軸を途中で切断した変異体」を作製すれば、この変異体は、野生型と比較して、構造はほぼ同じだが、回転軸が途中で自由連結していることになる。回転軸を途中から削除しただけの変異体では、分子内の協調性とトルク伝達の両方を欠如させてしまうが、この変異体では、回転棒の弾性だけを弱めることができる。回転軸の弾性の程度を変えることで、分子内弾性が回転速度や回転方向、トルク発生の制御にどの程度影響を与えるのかが分かりそうである。

予想に反して、分子内弾性の寄与は無視できるほど小さく、入出力の角度と時間のずれは実質上ないという結果が出るかもしれない。それも 2 つの回転モーター内の化学イベントの対応付けに際し、角度の補正が不要という重要な情報が得られるので、はっきりさせておく意義がある。

## 3. 研究の方法

### 〔顕微鏡観察用 VoV1 の調整〕

Vo のリング構造を形成している 12 個の c サブユニットに 3×His-Tag を、V1 に Avi-Tag を遺伝子操作で導入し、それぞれを Ni-NTA カラムや陰イオン交換カラムなどで精製してから VoV1 を再構成した。

### 〔顕微鏡観察用 F1 の調整〕

F1 の回転子、サブユニットの N 末、C 末は反平行ヘリカルヘリックス構造を形成し、回転軸として機能する。N 末から x 個、C 末から y 個のアミノ酸を削除した変異体（回転軸がほぼ半分の長さに相当）として、N4C25、N7C29、N11C32、N14C36 を遺伝子操作で作製した。

また、削除した回転軸部分を戻した「回転軸を途中で切断した変異体」を作製した。この変異体は、野生型と比較して、構造はほぼ同じだが、回転軸が途中で自由連結されている。回転軸のヘリックス 1 本だけに自由連結鎖を導入したものと、ヘリックス 2 本ともに自由連結鎖を導入したものを作製した。どの変異体も、サブユニットに 8×His を導入した。変異体を発現させた大腸菌を破

砕した後、His-tag カラムとゲル濾過カラムで精製を行い、上部の 2 つの Cys をピオチン化した後、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 または VoV1 の変異体を、遺伝子導入した His-tag を介して固定した。VoV1 の場合、常に 0.05% の n-Dodecyl-β-D-maltoside（界面活性剤）で可溶化した状態にした。回転を観るための目印を、ストレプト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や回転軌道を観察するためには、直径 40~60 nm の微小金粒子を使用した。この大きさでは、回転半径、回転速度から見積もると、水から受ける粘性抵抗をほとんど無視できる。40~60 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で金粒子から強い散乱光を生じさせ、高速カメラ（1000~8000 コマ/秒）でビーズ像を撮影し、その輝度重心を求め、その軌跡を解析した。

変異体の回転トルクや仕事率（時間当たりの仕事）を見積もるときには、0.3~0.5 マイクロメートルのポリスチレンビーズを目印に使用した。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

### (1) VoV1 分子のツイスト運動の実証

駆動力伝達に分子内弾性が寄与している可能性として、VoV1 分子全体がツイスト運動をしているか否かを、VoV1 に 40~60 nm の金粒子を付け、その軌跡を 1 分子観察した。先行実験と同様、真円の軌跡は得られなかった。観察された楕円運動だけでは、予想されているツイスト運動の実証にはならない。基板との固定がわずかにずれても、VoV1 が比較的大きいため、回転平面の傾きが強調され、楕円軌道が観察される可能性は否定できない。

楕円運動とツイスト運動（分子全体のねじれ）を関連付けるには、まず分子内の回転棒もねじれているのか（ツイスト運動の必要条件）、回転棒の弾性が回転運動に影響を与えるのか（分子内弾性の生理的効果）、という問いに答えるのが先決だと考えた。

また、より生理条件に近い状態での観察を目指し、VoV1 を膜骨格タンパク質（MSP）による直径~10 nm の脂質膜（ナノディスク）へ再構成することを試みた。再構成されている結果は得られたが、1 分子観察では発見確率が低く、回転速度も ATP 加水分解速度から予想されるものより桁違いに遅かった。ナノディスクを構成する脂質の組成を見直す必要がありそうである。

(2)F1 の回転棒を半分削除したときの回転  
回転軸がほぼ半分の長さに相当する F1 変異体、N4C25、N7C29、N11C32、N14C36 を作製した。ATP 飽和濃度 (2 mM) で、回転速度は野生型 (180 回転/秒) の ~5% に低下したが、すべての変異体が正しい方向に回転した。また、ATP 結合速度が野生型と同程度なのに、低濃度 ATP (200 nM) では、変異体によって、1 回転あたりに小停止する角度が、3 回、6 回、9 回のものであることが分かった。化学イベントと角度の対応付けが野生型からずれても正しい方向に回転できるという予想外の結果である。

(3)弱い弾性の回転棒をもつ F1 の回転  
回転棒の中央部分 (回転棒を包み込む円筒状のサブユニットと接触していない) に、ランダムコイルを形成するアミノ酸配列 (自由連結鎖) を導入した F1 変異体を作製した。回転棒の 2 本の ヘリックスのうち、1 本だけに自由連結鎖を導入したことになり、この回転棒は、野生型と比べ、回転及び曲げ弾性率が低いはずである。この弱い弾性の回転棒を持つ変異体の回転速度は野生型と比較して、負荷状態 (仕事率を反映) で ~70%、無負荷状態で ~100% であった。

弱い駆動力を伝達する場合は、ほぼ野生型並みの機能を果たすことができるが、強い駆動力を伝達する場合には、この回転棒では少しエネルギー損失が生じるのかもしれない。

## 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 2 件)

Ogawa T, Yogo K, Furuike S, Sutoh K, Kikuchi A, Kinoshita K Jr. "Direct observation of DNA overwinding by reverse gyrase" *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有 112 (2015) 7495-7500. doi: 10.1073/pnas.1422203112.

Chiwata R, Kohori A, Kawakami T, Shiroguchi K, Furuike S, Adachi K, Sutoh K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. "None of the rotor residues of F1-ATPase are essential for torque generation" *Biophys. J.*, 査読有 106 (2014) 2166-2174. doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.013.

[学会発表] (計 23 件)

古池 晶 他、「自由連結部位で繋がれた回転シャフトを持つ F1-ATPase の回転」、日本物理学会、第 73 回年次大会 (東京理科大学 野田キャンパス) 2018 年 3 月 22-25 日

Furuike, S. et al. "Single  $\alpha$ -helix alone in a shaft of F1-ATPase cannot fully transmit the torque but closely cooperate with the stator"

日本生物物理学会、第 55 回年会 (熊本大学 黒髪北地区) 2017 年 9 月 19-21 日

遠藤 愛子 (発表者: 古池 晶) 他、「回転軸の長さを半分にした F1-ATPase の回転と ATP 加水分解素過程との連動」、日本物理学会、第 71 回年次大会 (東北学院大学) 2016 年 3 月 19-22 日

Ogawa, T. *et al.* "Direct Observation of DNA Overwinding by Reverse Gyrase" Biophysical society 60th Annual Meeting (Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California) 2016 年 2 月 29 日

Baba, M. *et al.* "Torque generation mechanism in V1 motor" 日本生物物理学会、第 52 回年会 (札幌コンベンションセンター) 2014 年 9 月 25 日

Ogawa, T. *et al.* "Reverse gyrase likely biases thermal DNA strand passage toward overwinding" 日本生物物理学会、第 52 回年会 (札幌コンベンションセンター) 2014 年 9 月 27 日

Nakanishi, A. *et al.* "The ingenious structure of central rotor apparatus in VoV1; torque transmission mechanism in the central rotor of VoV1" 日本生物物理学会、第 52 回年会 (札幌コンベンションセンター) 2014 年 9 月 27 日

## 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・講師  
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