

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21770176
研究課題名(和文)	F <sub>1</sub> -ATPaseの回転に必要な不可欠な回転子領域の決定
研究課題名(英文)	Ascertaining the indispensable rotor region for the rotation of F <sub>1</sub> -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

研究成果の概要(和文)：ATP駆動の回転分子モーター、F<sub>1</sub>-ATPase(F<sub>1</sub>)の「回転に必要な不可欠な回転子領域の決定」を、回転軸部分を遺伝子操作で削除した「軸なしF<sub>1</sub>」が回転可能であることを踏まえて行った。「軸なしF<sub>1</sub>」とは対照的に回転軸だけを持つF<sub>1</sub>変異体が、予想に反して、100回転/秒以上の回転速度で回転したことから、回転子には回転に必要な不可欠な領域(必須のアミノ酸配列)がないという驚くべき方向に進んでいる。

研究成果の概要(英文)：F<sub>1</sub>-ATPase(F<sub>1</sub>) is an ATP-driven molecular rotary motor. The “axle-less F<sub>1</sub>” that the rotor portion in the stator cylinder is truncated, can rotate in the correct direction. Motivated by this finding, we tried to determine the indispensable rotor region(s) for the F<sub>1</sub> rotation. The contrast mutant with the axle-less F<sub>1</sub>, that has only the rotor portion in the stator cylinder, unexpectedly, rotated at >100 rotations/s. The rotor of F<sub>1</sub> may have no essential region (amino-acid sequence) to rotate itself.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、光学顕微鏡、回転分子モーター

## 1. 研究開始当初の背景

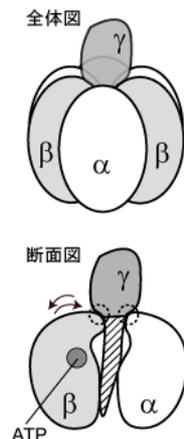
F<sub>1</sub>は、ATP合成酵素(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>)の可溶化部分として単離され、1994年のX線結晶構造解析により、その構造が明らかになった(3)。図のように、3個ずつの $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットが円筒( $\alpha_3\beta_3$ リング)を形成し、その中心にマッチ棒のような $\gamma$ サブユニットが深く突き刺さっていた。3年後、野地らは、蛍光標識したアクチンフィラメントを $\gamma$ に付けて、その回転の様子を顕微鏡下で観察することに成功した(4)。

この1分子観察の手法は、F<sub>1</sub>が回転モーターであることを証明しただけでなく、1個のATPで120°ずつのステップ回転をしている事を明らかにした。

Osterらは、これらの結果を元に、合理的な回転モデルを提唱した。それは、 $\beta$ の持つATP触媒部位における化学反応、すなわちATPの結合、加水分解、分解産物(ADP、Pi)リリースが、3つの $\beta$ で順次、共同的に行われ、その化学反応に伴う $\beta$ の大きな構造変化が駆動力となり、うまい具合に回転子 $\gamma$ を押し引きして回転を生み出すというものであった。このモデルは、回転子 $\gamma$ が剛体棒であることと、 $\beta$ の構造変化を $\gamma$ に伝えるための作用点と支点の存在を必要条件としている。また、回転子 $\gamma$ の角度が決まれば、3つの $\beta$ の化学状態が一義的に決定される(その逆も含む)という概念、 $\gamma$ -dictated modelを内包していたため、逆反応のATPの合成を考えるのに都合が良かった。事実、2003年には、伊藤らが $\gamma$ に磁気ビーズをつけ、磁石で強制的に $\gamma$ を逆回転させ、力学的にATP合成ができることを証明した(5)。また、足立らは、蛍光標識したATPやADPが、1分子のF<sub>1</sub>に付いたり離れたりする様子を、 $\gamma$ の角度と同時に観察する事で、 $\beta$ における化学状態と、 $\gamma$ の回転角度との対応付け(できる事)をほぼすべて決定した(1)。先のモデルは、これらの実験事実をうまく説明できるため、10年以上もの間、広く受け入れられてきた。

この状況の中、私たちは、遺伝子操作によって回転軸(断面図の斜線部)を削ったF<sub>1</sub>変異体を作成し、それが回転速度は遅くなるものの正しい方向へ回転できることを発見した(2)。この「軸なしF<sub>1</sub>」は、残りの回転子が $\alpha_3\beta_3$ リングの上縁に乗っているだけの状態だと考えられるが、それでも外れることなく回

F<sub>1</sub>-ATPaseの模式図



転できることは、全くの予想外だった。「軸なしF<sub>1</sub>」の回転子には、もはや剛体棒も、作用点も支点も存在せず、前述した既存の回転モデルでは説明ができない。すなわち、回転の動作原理に対する理解は、振り出しに戻った状況になり、新しい観点からの見直しが求められていた。

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

## 2. 研究の目的

回転の動作原理を理解するということは、どこでどのように駆動力が作りだされ、その駆動力がどこでどのようにして回転子(可動部)へ伝わるのか、を明らかにすることに他ならない。一般的な機械では、全体を見渡した上で、動作に本質的な部分を選択できるため、どこで何が起きているかを認識することは比較的たやすい。そしてどこかが分かれば、その場所を注視することで、どのようにしてのほうもおのずから分かることが多い。そのため、動作原理を理解するためには、どこが大事なところかを選び出す作業が、欠かせない重要な手順になる。

ところが、大きさ10 nm位の分子機械となると事情が異なる。1分子観察しなければ、回転という性質すら分からないわけだが、そのときどきの、分子のあらゆる動きまで同時に捉えることはできない。つまり、分子機械の仕組みが分かりにくい原因は、動いている部分全てを一遍には見られない制限のため、どこの動きが重要なのかを選択できないことにある。

逆に、動作領域を先に制限してから、機械本来の動きが損なわれないかを調べることができれば、どこの動きが重要なのかを消去法で選択できるはずである。いまの場合、駆動力を発生しているのは固定子側なので、回転子との接触領域のどこかに回転に必要な動作領域がある。その接触領域を制限しながら、回転可能かどうかを観察すればよい。その領域全てを細かく調べるのは大変だが、「軸なしF<sub>1</sub>」の回転子を対象にすることで、かなり狭い領域に絞って確かめれば済む。すなわち、固定子上縁との接触部分(断面図の破線で囲んだ部分)のどこかに、回転するための必要十分な領域が存在するはずである。その回転子側の接触領域をさらに小さく限定していくこと

で、回転に必要な最小限の領域をもつ回転子の決定を試みる。それは、駆動力を生み出している固定子側の接触領域を同定することと等価であり、固定子のどこで回転子のどこで駆動力が伝わるのか(動作領域の決定)という、回転の動作原理を考える上で欠かすことのできない情報である。

基本的には、その回転に必要な最小(接触)領域は、回転に必要な不可欠な(その領域がないと回転できない)領域だと予想している。しかし、回転できる複数の最小領域が見つかるかもしれないし、ある組み合わせでのみ意味を持つかもしれない(例えば、A,B,Cの領域があるとき、それぞれ単独では回転できないが、AB,BC,CAの組み合わせでは回転できるような場合)。それどころか、「軸なし F<sub>1</sub>」で削った回転軸部分(断面図の斜線部)でさえ、回転できる領域が残っていることを否定できていない。そのため、回転軸部分のみでも回転できるか調べる必要がある。そもそも回転にとって必要不可欠な領域など存在せず、回転子と固定子の接触領域ならどこでも回転できるといった信じがたい機構が明らかになるかもしれない。

### 3. 研究の方法

(試料調整) F<sub>1</sub>の回転に本質的な動作領域の決定を行うために、「軸なし F<sub>1</sub>」を対象にし、その回転子と固定子上縁の接触領域を少しずつ削り取った変異体を設計した。また、「軸なし F<sub>1</sub>」とは対照的な変異体、回転軸部分だけを残した変異体や、回転軸部分を縦にスライスした変異体なども遺伝子操作で作成した。いずれの変異体も、顕微鏡観察の際に必要なため、 $\gamma$ サブユニットには、2か所のピオチン化を、 $\beta$ あるいは $\alpha$ サブユニットには、His-tagを導入した。

変異体は、大腸菌で発現させ、破碎した後、Ni-NTA カラムとゲル濾過カラムを通して精製した。変異体によっては、ゲル濾過カラムに複数回通す必要があった。変異体は、構造的に不安定な場合が多く、精製から3日以内に使用した。

(1分子観察) 顕微鏡下で、回転運動を観察するために、ガラス表面をNi-NTA処理し、変異体に導入したHis-tagと結合できるようにした。ガラス表面に固定された変異体の回転子( $\gamma$ )に、回転観察の目印として、アビジン修飾した金粒子(直径40 nm)を結合させた。このサイズでは、溶液から受ける粘性抵

抗がほとんど無視できるため、変異体本来の回転速度を調べることができる。また、構造的に不安定な変異体に余計な負荷を与えないというメリットもある。

回転トルクを調べるときは、直径200 nm程度の大きな目印を用いて回転速度を測定し、目印と溶液の粘性抵抗から回転トルクを求めた。

光の波長より小さな40nmの金粒子の動きを可視化するために、レーザー暗視野顕微鏡を用いた。得られた像は、超高速カメラ(~8000 駒/秒)で撮影し、輝度重心を求めてその軌跡を解析した。

(光学系の改良) 現在使用しているこの顕微鏡では、撮影できる金粒子のサイズは40 nmが限界である。それは、レーザー光源が、観察像に干渉縞やスペckルを作り、背景光を上昇させてしまうからである。これらを取り除くことができれば、像のコントラストが向上し、さらに小さな粒子を観察することが可能だと考えた。原因の一つは、顕微鏡鏡体内部の余計なレンズやミラーにあるので、それらをできるだけ単純に組み換え直し、像の改良を狙った。その結果、30 nmの金粒子を用いて、観察が可能になった。

### 4. 研究成果

本研究の当初の目的は、「回転に必要な不可欠な回転子領域の決定」であった。それは、リング内の回転子領域(回転軸部分に相当)を遺伝子操作で削除した「軸なし F<sub>1</sub>」が回転可能であることを踏まえ、その僅かな接触領域のどこかに「回転に必要な不可欠な微小領域」があるという狙いに基づいていた。

しかし、最近の実験結果は、その予想に反し、 $\gamma$ には回転に必要な不可欠な領域がないという驚くべき方向に進んでいる。(1) 遺伝子操作で、 $\gamma$ の回転軸部分をC末の $\alpha$ -ヘリックス1本にスライスしてしまっても、野生型 F<sub>1</sub>の~20%の回転速度(~40 回転/秒)、~50%の回転トルク(~20 pN·nm)を示した。(2) 「軸なし F<sub>1</sub>」とは対照的に、回転軸だけを持つ変異体も、100 回転/秒以上の回転速度で回転した。この変異体と「軸なし F<sub>1</sub>」の回転子に共通なアミノ酸残基は、僅か~10 残基程度である。それらのアミノ酸残基も、固定子と接触しているとは考えにくい領域にあり、 $\gamma$ には、回転に必須の領域がないことが示唆された。 $\gamma$ に、回転に必須の領域がないことが確定すれば、

γのどの微小領域も回転に必要な能力を持つことに、あるいは、固定子自体が、棒状のミクロ構造物であれば、何でも回す能力を持っていることになりそうである。今後の研究で、速やかにはっきりとさせたい。

野生型の  $F_1$  では、ATP 結合の角度を  $0^\circ$  とすると、 $80^\circ$  で ATP 加水分解と無機リン酸のリリースが起き、 $120^\circ$  で次の ATP 結合と ADP のリリースが起きること(後はこの繰り返し)が知られている。このスキームは、回転運動に必要な不可欠なものなのか、変異体や種を超えて普遍的なものか?この問いに答えることは、回転運動の仕組みを考える上で重要である。今回、以下の知見が得られた。

液胞型 ATP 合成酵素 ( $V_0V_1$ ) の可溶化部分  $V_1$  が、ATP 駆動で回転する様子を、サブミリ秒の時間分解能で観察すると、 $120^\circ$  ごとに小停止した。その角度で ATP 結合・ATP 加水分解・分解物リリースの全てが行われているようである。既知の  $F_1$  の回転スキームは、回転運動についての普遍性がなかったことになる。また、 $V_0V_1$  の回転では、 $\sim 30^\circ$  ごとの小停止が観察された。 $V_0$  でのプロトン輸送に由来するものかもしれない。

$F_1$  では、MgADP 阻害が知られている。これは、MgADP が  $\beta$  の ATP 触媒部位に強く結合したまま、しばらくリリースしなくなり、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。回転観察の際、この現象は、観察対象の数を下げてしまうので、都合が悪い。通常は、変性剤として働くドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を、溶液中に 0.003% (臨界ミセル濃度以下) 加えると、ATP 加水分解速度が 1.4 倍に、顕微鏡観察での発見頻度が 3~4 倍に増加した。MgATP 阻害を僅かながらも緩和し、また、ガラス基板と目印との摩擦を減らす効果が得られたと考えている。顕微鏡観察実験の効率化が期待できる。

## 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 A. Kohori, R. Chiwata, M. D. Hossain, S. Furuike, K. Shiroguchi, K. Adachi, M. Yoshida, and K. 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" *Biochem. J.* [査読有] **101** (2011) *in press*.

- ② S. Furuike, M. Nakano, K. Adachi, H. Noji, K. Kinoshita, Jr., and K. Yokoyama "Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus*  $H^+$ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe" *Nat. Commun.* [査読有] **2** (2011) 233.
- ③ 古池晶、モハマッド・デラワール・ホセイン、木下一彦 「 $F_1$ -ATPase は回転軸がなくても回転する」 *生物物理*、[査読有] 50 巻、2010、120-121
- ④ M. D. Hossain, S. Furuike, Y. Onoue, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinoshita, Jr. "Stimulation of  $F_1$ -ATPase activity by sodium dodecyl sulfate" *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* [査読有] **1797** (2010) 435-442.
- ⑤ K. Adachi, S. Furuike, M. D. Hossain, H. Itoh, K. Kinoshita, Jr., Y. Onoue, and R. Shimo-Kon "Chemo-mechanical coupling in the rotary molecular motor  $F_1$ -ATPase" in Springer Series in Chemical Physics, Vol. 96. "Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology — Nobel Symposium" Astrid Gräslund, Rudolf Rigler, and Jerker Widengren, Eds, Springer, Heidelberg (2010) 271-285.
- ⑥ M. Tsumuraya, S. Furuike, K. Adachi, K. Kinoshita Jr., and M. Yoshida "Effect of  $\epsilon$  subunit on the rotation of thermophilic *Bacillus*  $F_1$ -ATPase" *FEBS Lett.* [査読有] **583** (2009) 1121-1126.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 千綿亮平 他 "F1-ATPase の回転軸変異体によるトルクの発生について" 2011 年 生体運動研究合同班会議 2011 年 1 月 7-9 日 大阪市立大学 杉本キャンパス
- ② T. Suzuki *et al.* "Single-molecule analysis of rotation of  $F_1$ -ATPase" 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会 合同大会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸ポートアイランド 神戸市
- ③ 古池晶 他 "無負荷回転プローブによる好熱菌  $V_0V_1 / V_1$  のステップ解析" 第 36 回生体エネルギー研究会 2010 年 11 月 18-20 日 大阪大学 銀杏会館
- ④ 鈴木俊治 他 "人の ATP 合成酵素はどのようなものか? 組み換えヒト由来  $F_1$ -ATPase の生化学的分析と回転一分子解析" 第 36 回生体エネルギー研究会 2010 年 11 月 18-20 日 大阪大学 銀杏会館

- ⑤ T. Ogawa *et. al.* “Temperature dependence of positive supercoiling by reverse gyrase” 第 48 回生物物理学会年会 2010 年 9 月 20-22 日 東北大学 河内北キャンパス
- ⑥ T. Suzuki *et. al.* “Single-molecule analysis of the rotation of human F<sub>1</sub>-ATPase” 東北大学 2010 年 9 月 20-22 日 河内北キャンパス
- ⑦ S. Furuike *et. al.* “Resolving stepping rotation of V-ATPase with an essentially drag-free probe” 16th European Bioenergetics Conference. 17-22 Jul. 2010, University of Warsaw, Warsaw, Poland.
- ⑧ T. Suzuki *et. al.* “Biochemical and single-molecule analyses of human F<sub>1</sub>-ATPase” 16th European Bioenergetics Conference. 17-22 Jul. 2010, University of Warsaw, Warsaw, Poland.
- ⑨ R. Chiwata *et. al.* “Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase with truncated  $\gamma$  - subunits” 第 47 回日本生物物理学会 アステイ徳島 徳島市 2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日
- ⑩ T. Ogawa *et. al.* “Temperature Dependence of Positive Supercoiling by Reverse Gyrase” 第 47 回日本生物物理学会 2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日 アステイ徳島 徳島市
- ⑪ M. D. Hossain *et. al.* “Studies of F<sub>1</sub>-ATPase in the presence of sodium dodecyl sulfate” 第 82 回日本生化学大会 神戸ポートアイランド 神戸市 2009 年 10 月 22-24 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・助教

研究者番号：60392875