

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 6日現在

機関番号：32641

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20118010

研究課題名（和文）F1-ATPaseモーターの機能における揺らぎと水和

研究課題名（英文）Effect of fluctuation and hydration on the function of F1-ATPase motor

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

研究成果の概要（和文）：

F1-ATPaseは、ATP一分子の加水分解・合成と内部の $\gamma$ サブユニットの回転を共役させる分子モーターである。我々はF1-ATPaseのトルクと釣り合う外部トルクの大きさを求め、その結果からATPの加水分解による自由エネルギー変化をほぼ100%の効率で回転のエネルギーに変換していることを示した。更に釣り合いから離れた条件での非平衡揺らぎの測定から、回転自由度へのエネルギーの散逸が非常に高効率で起こること、その性質が回転を駆動するポテンシャルの形と切り替えのタイミングで説明されることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

F1-ATPase is a rotary molecular motor which couples the hydrolysis/synthesis of ATP molecule with the rotation of internal  $\gamma$  subunit. We imposed an opposing external torque to find stall torque under various conditions. From the stall torque, we demonstrated that the F1-ATPase converts the free energy of ATP hydrolysis to the kinetic energy of the rotation at nearly 100 % efficiency. At far from equilibrium, by measuring the nonequilibrium fluctuation, we demonstrated that the F1-ATPase dissipates the free energy of ATP hydrolysis in the rotational degree of freedom at nearly 100 % efficiency. Furthermore, we found that these remarkable properties were well explained by the shape of driving potential and the timing of its switching.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2010年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2011年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2012年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
総計	47,500,000	14,250,000	61,750,000

研究分野：生物系・数物系科学

科研費の分科・細目：新学術領域研究（研究領域提案型）

キーワード：ATP, 水和, 分子モーター, F1-ATPase, 非平衡

1. 研究開始当初の背景

2007年に我々はATPの加水分解自由エネルギー差を変えても無負荷時の回転ステップの角速度がほとんど見られ無いことを見出

し (*Biophys. J.*, **92**(5), 1806-1812, (2007)), 従来の粘性抵抗に対して回転する速度からエネルギー論を論じることに疑問を持つようになっていた。実際に熱力学第二法則が定め

る熱エネルギーからその他の形のエネルギーへの変換効率の上限は、変換されるエネルギーが再利用可能な保存的なものである場合であり、粘性抵抗に対する散逸的な仕事には当てはまらない(ただし ATP の加水分解の自由エネルギーが一旦保存的な仕事として蓄えられてそれが粘性抵抗に対して散逸される場合は除く)。したがって正統なエネルギー論を展開するには一定の外部トルクを印可した条件下で実験する必要があった。そこで 2007 年の暮れには我々は回転電場法を用いて回転する F1-ATPase のプローブに対して制御可能な外力を印可することに成功していた (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**(4), 951-957, (2008) Epub 2007 Dec 18)。一方、新学術領域研究「水と ATP」では ATP の加水分解の自由エネルギー差を水の影響を考慮に入れつつ追及しようという姿勢で進められるもので、水を介した揺らぎの影響を見ることが重要であるという視点で一致するものがあり、本研究を進めるに至った。

## 2. 研究の目的

上記のような背景を元に本研究計画は F1-ATPase による ATP の加水分解自由エネルギーと回転運動の化学力学変換のメカニズムの理解をめざして、基質、蛋白、生成物の水との相互作用(水和状態)に注目し、水中で ATP を加水分解して働く分子機械特有のダイナミクスを理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究の方法は、F1-ATPase の一分子回転観察を中心にしたもので、それに (1) 回転電場法、(2) Harada-Sasa 等式を用いた非平衡統計力学による解析、(3) 回転トラジェクトリから最尤推定による回転ポテンシャルの推定、などを組み合わせたものを用いた。

(1) 回転電場法は Washizu らによって開発され (Washizu et al. *IEEE Trans. Industry Appl.* **29** (1993)286-294.) 我々が F1-ATPase に適用した (Watanabe-Nakayama *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**(4), 951-957, (2008)) もので、回転する F1-ATPase の周囲に 4 つの電極を配置して、それらに位相の  $90^\circ$  ずれた正弦波状の電圧をかけることにより回転する電場を作る。F1-ATPase に結合している回転プローブは誘電率を持っているためこの回転電場により双極子モーメントが誘起され、外部電場と誘起双極子モーメントの位相差によって回転トルクが発生する。このトルクの大きさは電場の大きさの二乗に比例して適切な方法で校正して制御することが出来る。

(2) 2005 年に発表された Harada-Sasa 等式は、Langevin 方程式に従う物体の特定の自由度の

動きについて、揺動散逸定理からのずれにより非平衡的に散逸するエネルギーを表す式である。この式を実験にあてはめるには系の応答関数を求めなければならないが、そのために回転電場法を用いて様々な周波数で変動する外部トルクを印可した。また、速度の時間相関関数は、トラジェクトリをフーリエ変換することで求めた。

(3) 回転運動のトラジェクトリを観察していると、回転は、あるポテンシャルの谷の底付近で揺らいているうちに突然  $120^\circ$  進んだ次のポテンシャルに乗り移るように見える。これは、ATPase 反応をしている F1-ATPase の化学状態を反映しているはずなので、トラジェクトリ上の各点での F1-ATPase の化学状態を、その化学状態とそれに対応するポテンシャルを同時に反復計算して最も高い確率を与えるものとして推定した。

## その他

その他の方法としては通常の生化学的な方法による蛋白質の精製、活性測定、遺伝子操作などを併用している。

## 4. 研究成果

実際の研究は、以下の (1), (2), (3) が (2), (1), (3) の順番で行われたが、結果の意義が伝わりやすいように順番を変えて記述する。

(1) 様々な条件下でのストールトルクの測定。

ATP の加水分解の自由エネルギーを様々な条件に固定して、上述の回転電場法により印可した逆向きトルクと F1-ATPase の発生するトルクが釣り合う条件をもとめた。その結果、外部トルクと F1-ATPase が発生するトルクが釣り合う条件では、F1-ATPase はステップ回転を出来ないのではなく、正方向にステップする頻度と逆方向にステップする頻度が等しくなることがわかった。これは、我々の以前の論文の結果 (*Biophys. J.*, **92**(5), 1806-1812, (2007)) と良く整合するものであった。

さらに ATP の加水分解の自由エネルギーを一定にした上で条件を変えてみると、無負荷状態の平均速度が等しくなくても ATP の加水分解の自由エネルギーが等しければストールトルクは等しく、そこから計算した最大仕事 ( $W_{\text{stall}}$ ) は ATP の加水分解の自由エネルギーにほぼ一致した。また、ATP の加水分解の自由エネルギーが異なる条件を比較すると、その場合には無負荷状態の平均速度が、ほぼ等しくてもストールトルクは異なっており、ストールトルクから計算した最大仕事 ( $W_{\text{stall}}$ ) は ATP の加水分解の自由エネルギーに再びほぼ一致した。以上の結果は、F1-ATPase がほぼ 100% の効率で ATP の加水

分解の自由エネルギーを回転の力学的仕事に変換することを示している。この結果は主な発表論文の②にして公表した。

(2) 以上の結果は、外部トルクと F1-ATPase の発生するトルクが釣り合った平衡状態のものであったが、定常的な回転が進んでいる非平衡状態でのエネルギーの流れについて検討するために Harada-Sasa 等式を用いた解析を行った。その結果、ATP 駆動の平均速度による摩擦熱と非平衡的な回転揺らぎによる摩擦熱、さらに外部トルクに対する仕事の和が ATP の加水分解の自由エネルギーによく一致することが分かり、非平衡条件下でも F1-ATPase は ATP の加水分解の自由エネルギーを回転自由度を通じて非常に高効率で散逸させていることがわかった。この結果はこの結果は主な発表論文の④にして公表した。

(3) 上記のように F1-ATPase は理論的な限界に迫る非常に高い効率で ATP の加水分解の自由エネルギーを回転運動のエネルギーに変換していることが明らかになったが、その性質の元となる回転運動を駆動するポテンシャルの推定を「研究の方法」に述べたように行った。その結果、回転を駆動するポテンシャルが推定できただけでなく、そのポテンシャルの切り替わる位置が、 $\gamma$ サブユニットの最安定点から正方向に少し進んだところにあること、それが切り替わる二つのポテンシャルの交点にあたるということが明らかになった。これらの性質から、「F1-ATPase は ATP の加水分解による自由エネルギーを回転自由度の運動だけで放出している。」という結果は非常によく説明することができ、高効率のエネルギー変換の鍵を明らかに出来た。この結果は主な発表論文の①にして公表した。

以上の研究成果は、従来論理的に不明瞭であった分子モーターのエネルギー論を最新の非平衡物理学の成果を取り入れて完成させたものと言え、非常に学問的価値の高いものであると言える。

#### 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 14 件)

① Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, and Eiro Muneyuki

Recovery of state-specific potential of molecular motor from single-molecule trajectory EPL 査読有 97, 2012, 40004

② Shoichi Toyabe, Takahiro Watanabe-Nakayama, Tetsuaki Okamoto, Seishi Kudo, and

Eiro Muneyuki

Thermodynamic efficiency and mechano-chemical coupling of F<sub>1</sub>-ATPase Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 査読有り 108(44), 2011, 17951-17956

③ Shoichi Toyabe, Takahiro Sagawa, Masahito Ueda, Eiro Muneyuki, Masaki Sano

Experimental demonstration of information-to-energy conversion and validation of the generalized Jarzynski equality Nature Physics 査読有 6, 2010, 988-992

④ Shoichi Toyabe, Tetsuaki Okamoto, Takahiro Watanabe-Nakayama, Hiroshi Taketani, Seishi Kudo, and Eiro Muneyuki

Nonequilibrium Energetics of a Single F<sub>1</sub>-ATPase Molecule Phys. Rev. Lett. 査読有 104, 2010, 198103

⑤ Shimo-Kon R, Muneyuki E, Sakai H, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K Jr.

Chemo-mechanical coupling in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis. Biophys J. 査読有, 8(7) 2010, 1227-36.

⑥ Muneyuki E, Sekimoto K.

Allosteric model of an ion pump. Phys. Rev. E 査読有, 81(1 Pt 1), 2010, 011137.

⑦ Yasuno, T., Muneyuki, E., Yoshida, M., and Kato-Yamada, Y.

Modulation of nucleotide binding to the catalytic sites of thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase by the  $\epsilon$  subunit: Implication for the role of the  $\epsilon$  subunit in ATP synthesis. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 390(2), 2009, 230-4

⑧ Furuike, S., Adachi, K., Sakaki, N., Shimo-Kon, R., Itoh, H., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kinoshita, K.

Temperature Dependence of the Rotation and Hydrolysis Activities of F<sub>1</sub>-ATPase. Biophys. J., 査読有, 95, 2008, 761-770

[学会発表] (計 39 件)

宗行英朗 分子モーター F<sub>1</sub>-ATPase によるエネルギー変換特性

第 26 回分子シミュレーション討論会

招待講演 2012 年 11 月 26 日

九州大学 西新プラザ

宗行英朗 F<sub>1</sub>-ATPase モーターの一分子エ

エネルギー論

第 50 回日本生物物理学会年会

シンポジウム 2012 年 9 月 23 日

名古屋大学東山キャンパス

6. 研究組織

(1) 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