

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06164

研究課題名(和文) F1モーターが準静的に動作できる限界を探る。

研究課題名(英文) Exploring the limits of quasi-static operation of F1 motors

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FoF1-ATP合成酵素の一部であるF1モーターは、ATPの合成/水解の自由エネルギーと回転運動の力学的エネルギーをほぼ100%の効率で行うことが知られている。この高効率は、F1モーターが準静的に動作しているためであると考えられる。そこでF1モーターのエネルギー変換効率が低下するような準静的な動作が出来ないような極端な条件を調べ、高効率の条件、あるいはメカニズムを浮き彫りにすることを目的とした。結果として高温条件でエネルギー変換効率の低下が見られ、現在、投稿論文を執筆中である。また変異導入によりエネルギー変換効率の下がる変異体に関して解析し、論文を出版して議論することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子モーターは、化学反応と力学的な運動を共役するエネルギー変換装置であると言われることだが、実際に化学反応の自由エネルギー変化を制御した上で、保存力に対する仕事を計測している研究は極めて少ない。申請者のグループの研究はそのような点に配慮して実験をおこなっている非常に少ない例であり、本当に物理化学的な視点に立ったときに考えるべきデータを提供できるものである。今回得られた結果は、更に知見を加えないと突っ込んだ議論には踏み込めないが、将来に向けて貴重な知見を与えていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The F1 motor, which is part of the FoF1-ATP synthase, is known to perform the free energy transduction between ATP synthesis / hydrolysis and the mechanical rotation with almost 100% efficiency. This high efficiency is thought to be due to the quasi-static operation of the F1 motor. Therefore, we investigated extreme conditions that would prevent quasi-static operation to reduce the energy conversion efficiency of the F1 motor, aiming to highlight high-efficiency conditions or mechanisms. As a result, the energy conversion efficiency decreased under high temperature conditions, and a research paper is currently being written. In addition, we were able to analyze a mutant whose energy conversion efficiency decreases due to the introduction of a mutation, and published a paper for discussion.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター 自由エネルギー変換 熱力学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

FoF1-ATP 合成酵素の一部である F1 モーターは、ATP の合成/水解の自由エネルギーと回転運動の力学的エネルギーを相互変換する分子機械であり、研究開始当時に非常に高効率なエネルギー変換を行うことがわかっていた。特に、すでに調べられていた範囲では力学的仕事をしない非平衡条件下でも、回転自由度の非平衡熱の散逸を含めるとエネルギー収支がほぼ 100%になることがわかっていた。また、外部トルク存在下に正味の仕事を計測した結果でも、野生型の F1 モーターはほぼ 100%のエネルギー変換効率を示していた。これらの事実は、それまでに調べられた条件下で F1 モーターが、ほぼ準静的に働くことを示していた。しかし非平衡であるにもかかわらず、準静的とはどういうことだろうか？自由エネルギーを消費して正味の仕事をするときには自由エネルギーのエントロピー項に対応する熱の吸収があるはずだが、熱の吸収が追いつかなくなるような限界はないのだろうか、と言うような疑問があり、それが本研究の背景であった。このような問題意識を持つ研究者は申請者しかいなかった。

2. 研究の目的

上記のように、F1 モーターが非平衡条件下でも準静的に働くと言うことは、熱揺らぎを非常にうまく捉えていることを意味していると考えられる。そこで逆に、非平衡の程度がどこまで高くなると準静的に働くことができなくなる限界を見つけて、非平衡条件下でも準静的に働く条件を浮き彫りにしようというのが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

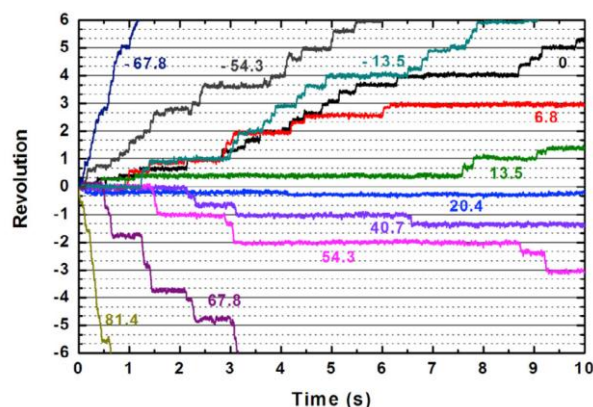
まず最初に考えたことは、ピルビン酸キナーゼを用いた ATP 再生系とリン酸モップを用いて ADP とリン酸の濃度を極端に低くして ATP 加水分解反応の化学ポテンシャル差を極力大きくして、その時のストールトルクを測定することであった。しかし実際に試薬を購入し予備実験を進めていたが、コロナ感染症の蔓延で実験室を閉じざるを得ず、この実験は具体的な結果を得るところまで進まなかった。

一方、研究機関の初期に行った F1 モーターの β サブユニットの 190 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異体を調べて、回転電場法により外部トルクを印加してストールトルクを測定する実験は、結果をまとめるところまでこぎ着けることが出来た。詳しくは結果の項に述べるが、この変異体ではストールトルクが野生型に比べて低下しており、エネルギー変換効率が下がっていることが確認された。また、顕微鏡を改造して 60°C 程度まで温度を上げた状態で、野生型の F1 モーターのストールトルクを測定してエネルギー変換効率が下がることを発見した。

4. 研究成果

まず、「3. 研究の方法」に述べた F1 モーターの β サブユニットの 190 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異体 (β E190D 変異体) の実験について説明する。この変異体では回転電場法を用いて外部トルクを加えると、図 1 に示すようにトルクの方によって回転が加速されたり減速されたりして約 20 pN nm rad⁻¹ の外部トルクで回転がほぼ抑えられた。

図 1



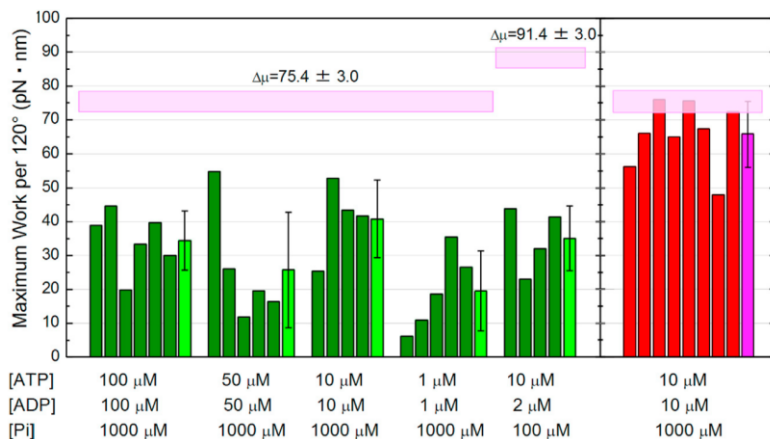
図の説明

回転電場法により外部トルクを印加した状態での β E190D 変異体 F1 の回転
溶液条件は、100 μ M ATP, 100 μ M ADP, 1000 mM Pi.

図中の数字は、変異体 F1 に加えた外部トルクの値。単位は pN nm.

図 1 のような実験を条件を変えて繰り返し、回転を抑える外部トルクを野生型 F1 と比較したのが図 2 で、赤い縦棒で示された野生型の F1 のストールトルクが、効率 100%を示すピンクの横棒のレベルに標準偏差の幅で達しているのに対し、 β E190D 変異体 F1 では効率 100%には全く届いていないことが分かる。

図 2

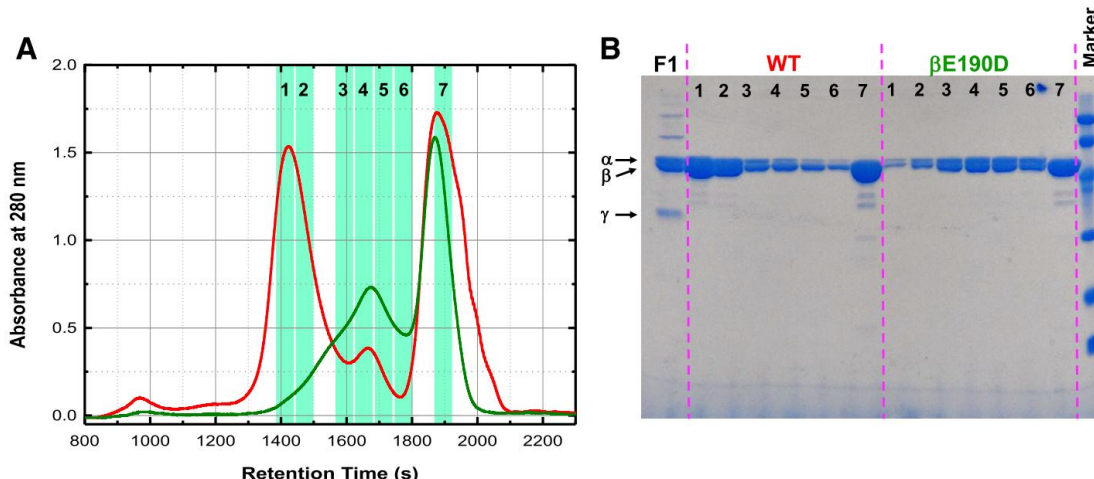


図の説明
 様々な溶液条件での β E190D 変異体 F1 (緑色の縦棒) と野生型 F1 (赤色の縦棒) の 120° あたりの最大仕事。

上記の結果は、 β E190D 変異体 F1 が野生型 F1 に比べて安定性が低いことを示唆しており、温度を変えて保温した後の残存活性を β E190D 変異体 F1 と野生型 F1 で調べたところ、確かに β E190D 変異体 F1 は野生型 F1 に比べて熱耐性が低いことが分かった。

さらに γ サブユニットを欠いた $\alpha_3\beta_3$ 複合体の安定性を β E190D 変異体と野生型でゲル濾過により調べたところ、図 3 に示されるように β E190D 変異体は $\alpha_3\beta_3$ 複合体を形成できないことが分かった。

図 3



図の説明 ゲル濾過による β E190D 変異体と野生型の $\alpha_3\beta_3$ 複合体の比較。
 A はゲル濾過の溶出プロファイル。赤線 野生型の $\alpha_3\beta_3$ 複合体、緑線 β E190D 変異体。1, 2 の番号に対応する $\alpha_3\beta_3$ 複合体の溶出位置に β E190D 変異体ではピークがない。
 B A の番号の付いたフラクションの SDS-PAGE。 β E190D 変異体では 1, 2 の番号に対応する部分にほとんど蛋白質がないことが確認できる。

以上より、高いエネルギー変換を支える要因として蛋白質の高い安定性が必要であることが浮き彫りになった。以上の結果は、Biophysical Journal 119, 48–54, July 7, 2020 に出版されている。

次に、野生型の F1 モーターを用いて高温条件下でのエネルギー変換効率の研究を行った。この研究については、投稿準備中であるが、次ページの図 4 のような恒温ジャケットを対物レンズにとり付け、更に試料ステージにも恒温循環水を回して温度を調節し、回転電場法を用いた外部トルク印加システムをあわせ、温度を変化させながらエネルギー変換効率を調べた。その結果、高温ではエネルギー変換効率は 100% に達し無いという結果が得られた。これは熱安定性の問題であることがその原因であり、やはり高いエネルギー変換効率を達成するためには蛋白質の安定性が重要委であることが示された。この結果は現在投稿準備中である。

当初の研究計画の問題意識であった ATP 加水分解における自由エネルギー変化のエントロピー項に対応する熱の吸収、と言う視点からは少しずれた観点からの知見となったが、以上の実験により、分子機械によるエネルギー変換居着いての貴重な結果が得られたと考えている。

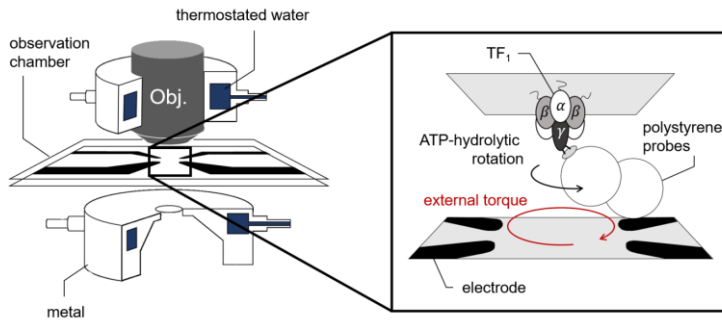


図 4
 恒温循環水による温度調節機構と、回転電場法による外部トルク印加機構を備えた実験系。
 右側の拡大図は電極を蒸着したスライドガラスの対面に載せたカバーガラスに、回転観察用プローブをとりつけた F1 が固定されている様子。

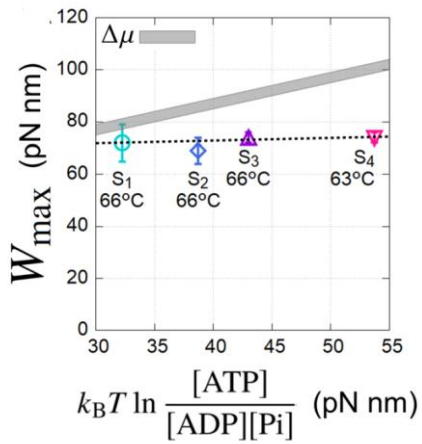


図 5
 横軸は、溶液条件から計算された ATP の加水分解の自由エネルギー差. 標準部分を除いた質量作用比のところだけを表示している。
 縦軸は、ストールトルクから求めた最大仕事. 右上がりの灰色の帯はエネルギー変換効率100%となる領域。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mana Tanaka, Tomohiro Kawakami, Tomoaki Okaniwa, Yohei Nakayama, Shoichi Toyabe, Hiroshi Ueno, Eiro Muneyuki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Tight Chemomechanical Coupling of the F1 Motor Relies on Structural Stability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.04.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡庭 有明, 中山 洋平, 寺原 直矢, 宗行 英朗
2. 発表標題 The Measurement of Mechanical Work of Thermophilic F1-ATPase at the Optimum Growth Temperature
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoaki Okaniwa, Yohei Nakayama, Eiro Muneyuki
2. 発表標題 Thermodynamic Efficiency of F1-ATPase at High Temperature
3. 学会等名 第 56 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiro Muneyuki
2. 発表標題 Energetics of Thermophilic F1 motor
3. 学会等名 Sendai Molecular Motor Workshop (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------