

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770127
 研究課題名 (和文) 回転分子モーター F₁-ATPase のヌクレオチドアフィニティ制御の解明
 研究課題名 (英文) Angle Dependence of the Affinity for Nucleotides in Rotary Motor F₁-ATPase
 研究代表者
 足立 健吾 (ADACHI KENGO)
 学習院大学・理学部・研究員
 研究者番号：60370128

研究成果の概要 (和文)：磁気ピンセットによる 1 分子回転操作と蛍光性ヌクレオチドの結合・解離の 1 分子同時観察により、回転分子モーター F₁-ATPase の回転角度に依存したヌクレオチドに対するアフィニティを調べることに成功した。蛍光性 ATP (Cy3-ATP) と蛍光性 ADP (Cy3-ADP) の結合・解離の角度を、非標識 ATP、非標識 ADP、燐酸存在下など様々なヌクレオチド条件で測定できた。本研究成果は、この分子機械の回転するまたは合成する仕掛けの理解に繋がると思われる。

研究成果の概要 (英文)：We measured the angle dependence of nucleotides affinity in the rotary molecular motor of F₁-ATPase by single-molecule manipulation with magnetic tweezers and simultaneously single-fluorophore imaging of fluorescent nucleotide analog. The binding/release angle of fluorescent ATP (Cy3-ATP) and fluorescent ADP (Cy3-ADP) were observed in the presence of unlabeled ATP, unlabeled ADP, and/or Pi. These results are expected to reveal the mechanism of hydrolysis rotation and ATP synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1 分子計測・1 分子操作・分子モーター・エネルギー変換

・ F₁-ATPase・蛍光性ヌクレオチドアナログ・アフィニティ

1. 研究開始当初の背景

(1) ATP 合成酵素の一部分である F₁-ATPase は ATP の加水分解によって回転することが 20 年ほど前に予想され [Boyer, P. D. 1993 *Biochim. Biophys. Acta.*, Oosawa, F. & Hayashi, S. 1986 *Adv. Biophys.*], 1 分子で回転する様子が 1997 年に顕微鏡下で直接観察された [Noji, H. *et al.* 1997 *Nature*]. そして、F₁-ATPase は世界最小の ATP 駆動型の回転分子モーターであることが分かった。以来、このモーターの回転機構の解明は 1 分子計測の技術によって飛躍的に進んできた。

(2) 回転に必要な最小限の構成は、回転軸となる γ サブユニットとそれを交互に囲む 3 つの α サブユニットと 3 つの β サブユニットである [Abrahams, J. *et al.* 1994 *Nature*, Noji, H. *et al.* 1997 *Nature*]. 3 つの β サブユニットにはそれぞれ ATP を加水分解するための触媒部位がある。 γ サブユニットは、各 β サブユニットでの ATP の結合・加水分解・解離に伴って 80° と 40° のサブステップから成る 120° の回転をすることが明らかになっている [Yasuda, R. *et al.* 1998 *Cell*, Yasuda, R. *et al.* 2001 *Nature*]. また、この分子機械は完全な可逆モーターであり、 γ サブユニットを逆回転すると、ADP と無機リン酸から ATP を合成することが証明されている [Itoh, H. *et al.* 2004 *Nature*, Rondelez, Y. *et al.* 2005 *Nature*].

2. 研究の目的

(1) この分子モーターの回転する仕掛けを明らかにするための重要な課題の 1 つとして、3 つの活性部位それぞれへの ATP の結合・加水分解・ADP やリン酸の解離が回転ステップとどのように共役して起こっているのかを突きとめることであった。これまでの生化学的研究からいくつかのモデルが提唱されてはいたが、決定的な結論には至っていなかった。申請者は 1 分子計測・操作の実験からこの問題を解き明かそうとした。磁気ピンセットシステムを用いて γ サブユニットに付けた磁性ビーズの向きを自在に操り、対物式全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡により蛍光性 ATP アナログ (Cy3-ATP) の結合・解離の 1 分子イメージングを行い、レーザー暗視野顕微鏡で金ナノ粒子を用いた高時間分解能の回転観察を行った。そしてこの程、3 つの活性部位のどこで起きるとの化学反応 (ATP 結合、加水分解、リン酸や ADP の解離) がそ

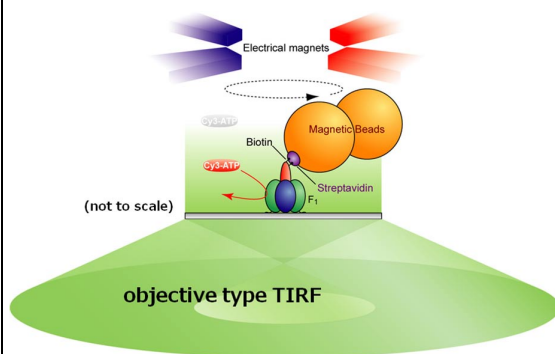
れぞれどのサブステップ (力学反応) を駆動しているのかを明らかにすることができた [Adachi, K. *et al.* 2007 *Cell*].

(2) 現在、申請者はこの回転分子機械を持つ根本的な仕掛けとして、 γ サブユニットの向く角度が各 β サブユニットのヌクレオチドの化学状態を完全に制御しているという γ ディクテーションモデルを考えている。F₁-ATPase が可逆モーターであることを踏まえると容易に想像できることであり、F₁ が回転モーターだと最初に予想した Boyer によって提唱された binding change メカニズムがまさにこれなのである。この程明らかにした加水分解方向の回転の共役モデルもこのメカニズムによって制御されているのであろうし、ATP の合成もこのメカニズムに従って行われていると考えている。ただ、未だ誰もこの binding change メカニズムの詳細を明らかにしてはしていない。生化学的な手法だけでは完璧に知ることは到底出来ない。1 分子計測・操作の技術が有ってはじめてこの課題に取り組みられると思われる。

(3) 本研究課題では、 γ サブユニットの向きで制御された各 β サブユニットにおけるヌクレオチドのアフィニティを 1 分子レベルで計測し、F₁-ATPase の本質的な仕掛けである binding change メカニズムの実像に迫る。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では好熱菌由来の F₁-ATPase を使い、加水分解と回転に最小限必要な構成である $\alpha_3\beta_3\gamma$ サブコンプレックスを使用した (以後、F₁ と呼ぶ)。 β サブユニットのアミノ末端にはヒスチジンタグが遺伝子導入されおり、Ni-NTA を修飾したガラス表面にヒスチジンと Ni-NTA との特異的結合を介して F₁ を固定した (図参照)。回転



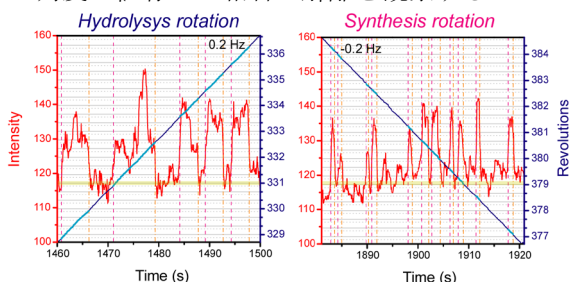
観察と1分子操作のための磁性ビーズ (<直径 $0.7\mu\text{m}$) は、 γ サブユニットの先端に遺伝子導入されたシステインをビオチン化し、ストレプトアビジン-ビオチン結合を介して結合させた。

(2) γ サブユニットに結合させた磁性ビーズは試料上方に取り付けた磁気ピンセットによって回転操作され、ビーズの回転は明視野像によって観察される。同時に、蛍光性ヌクレオチドアナログ (Cy3-ATP と Cy3-ADP) の F_1 への結合・解離は対物式全反射顕微鏡によって1分子蛍光イメージングされる。ATP 結合待ちの角度を基準として、ヌクレオチドがどの角度で結合しどの角度で解離するのかを測定した。

(3) 回転させる磁場の強度、回転の方向、回転速度といった様々な条件に加え、蛍光性 ATP または蛍光性 ADP、非標識 ATP または非標識 ADP 存在下、燐酸存在下など様々な溶液条件での測定を行った。

4. 研究成果

(1) 下図に、100 nM Cy3-ATP と 100 nM ATP 存在下での Cy3-ATP の結合・解離の時間経過のグラフを示す。赤線が Cy3-ATP の蛍光強度、青線が γ サブユニットの回転角度を表す。 F_1 に Cy3-ATP が1個結合すると1個分だけ蛍光強度が増加する。2個目が結合すると2個分の蛍光強度になる。逆に解離すると個数に応じて蛍光強度が下がる。加水分解方向と合成方向において γ サブユニットの角度に依存した結合・解離を観察すること



ができた。様々なヌクレオチド条件下で結合と解離の角度を測定することに成功している。

(2) 加水分解方向・合成方向どちらの回転方向においても ATP と ADP で結合する角度に違いがあることを見いだした。すなわち ATP と ADP の結合が回転角度でそれぞれ制御されていることを示している。さらに、燐酸の存在によって ADP 結合の角度は ATP 結合の角度とほぼ同じになることが分かった。これは合成過程で起こる結合の様子を実際

に見ていると考えている。さらに、結合・解離の統計から ATP と ADP それぞれの角度依存的な解離定数 (アフィニティ) を見積もることも出来ており、 F_1 -ATPase の3つの活性部位におけるヌクレオチドの化学反応が回転角度によって制御されるという交代結合 (binding change) メカニズムを直接証明するデータであると考えている。

(3) 本研究課題で得られた成果は、多くの ATP 駆動型分子機械の作動機構解明の嚆矢・模範となると思われる。また、タンパク質全般の基質結合・解離の原理を理解することにも繋がると期待している。

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 Rieko Shimo-Kon, Eiro Muneyuki, Hiroshi Sakai, Kengo Adachi, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita Jr. "Chemo-mechanical coupling in F_1 -ATPase revealed by catalytic site occupancy during active catalysis." *Biophys. J.*, **98**, 1227-1236 (2010). 査読有
- ② Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasuhiro Onoue, Kengo Adachi, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita Jr. "Stimulation of F_1 -ATPase activity by sodium dodecyl sulfate." *Biochim. Biophys. Acta. (Bioenergetics)*, **1797**, 435-442 (2010). 査読有
- ③ Masato Tsumuraya, Shou Furuike, Kengo Adachi, Kazuhiko Kinosita, Jr., and Masasuke Yoshida "Effect of epsilon subunit on the rotation of thermophilic *Bacillus* F_1 -ATPase" *FEBS Lett.*, **583**, 1121-1126 (2009). 査読有
- ④ Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasushi Maki, Kengo Adachi, Toshiharu Suzuki, Ayako Kohori, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita, Jr. "Neither helix in the coiled coil region of the axle of F_1 -ATPase plays a significant role in torque production" *Biophys. J.*, **95**, 4837-4844 (2008). 査読有
- ⑤ Shou Furuike, Kengo Adachi, Naoyoshi Sakaki, Rieko Shimo-Kon, Hiroyasu Itoh, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita, Jr. "Temperature dependence

of the rotation and hydrolysis activities of F₁-ATPase" *Biophys. J.*, **95**, 761-770 (2008). 査読有

- ⑥ Shou Furuike, Mohammad Delawar Hossain, Yasushi Maki, Kengo Adachi, Toshiharu Suzuki, Ayako Kohori, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Axle-less F₁-ATPase rotates in the correct direction" *Science*, **319**, 955-958 (2008). 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 足立健吾、政池知子、大岩和宏、西坂崇之「回転分子モーターF₁-ATPaseの触媒部位へ結合したヌクレオチドの高精度位置検出 (High-Accuracy Localization of Single Nucleotides Bound to the Catalytic Sites in Rotary Motor F₁-ATPase)」日本生物物理学会第47回年会, 徳島文理大学・アスティとくしま, 2009年10月31-11月1日
- ② 足立健吾、大岩和宏、西坂崇之、野地博行、伊藤博康、吉田賢右、木下一彦「F₁-ATPase 回転モーターの角度依存的ヌクレオチドアフィニティ (Angle Dependence of the Affinity for Nucleotides in Rotary Motor F₁-ATPase)」日本生物物理学会第46回年会, 福岡国際会議場, 2008年12月3-5日

[図書] (計1件)

- ① Kengo Adachi, Shou Furuike, Mohammad Delawar Hossain, Hiroyasu Itoh, Kazuhiko Kinoshita, Jr., Yasuhiro Onoue and Rieko Shimo-Kon "Chemo-Mechanical Coupling in the Rotary Molecular Motor F₁-ATPase." In: Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology, Gräslund A, Rigler R and JerkerWidengren (eds.), Berlin Heidelberg: Springer, Vol. 96, pp 271-285 (2010)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 健吾 (ADACHI KENGO)
学習院大学・理学部・研究員
研究者番号：60370128

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：