

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770168  
 研究課題名（和文） プロトン駆動力で回転する ATP 合成酵素を 1 分子技術とマイクロデバイスで可視化する  
 研究課題名（英文） Visualization of rotation of ATP synthase driven by proton motive force using single-molecule techniques and microdevices  
 研究代表者  
 飯野 亮太（IINO RYOTA）  
 大阪大学・産業科学研究所・助教  
 研究者番号：70403003

## 研究成果の概要（和文）：

基板支持脂質二重膜（サポータード膜）に再構成した回転分子モーターATP合成酵素のプロトン駆動力（脂質二重膜間のpH差と膜電位差）による回転の直接観察に取り組んだ。サポータード膜を支持する基板としてNTA-アガロースとNTA-ポリアクリルアミドを開発した。これを用い、ATP分解により回転するサポータード膜中のATP合成酵素の1分子観察に成功した。またNTA-ポリアクリルアミド基板上の脂質膜をガラスピペットでパッチすることによって、数10メガオーム程度の電氣的シールを実現した。ATP加水分解で回転するATP合成酵素を含むサポータード膜に電圧を印加した場合、回転速度が変化する例が観察された。今後は詳細なコントロール実験により、電圧応答が真にATP合成酵素の回転挙動を反映しているのかを慎重に検証する必要がある。

## 研究成果の概要（英文）：

We have tried to directly observe the rotation of ATP synthase driven by proton motive force. ATP synthase was reconstituted into the lipid bilayer membrane supported on the solid substrate such as NTA-agarose and NTA-acrylamide. Electric sealing of and voltage allocation to the supported membrane were examined using pipette made by glass or polydimethylsiloxane. Several tens of mega ohm resistance was achieved, and used to seal the membrane containing the rotating ATP synthase driven by ATP hydrolysis. Some of ATP synthase showed change in the rotation speed when voltage was applied. We need elaborate control experiments to confirm whether the change really reflects the behavior of the ATP synthase.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：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・操作、回転分子モーター

## 1. 研究開始当初の背景

ATP合成酵素は、水溶性の $F_1$ と細胞膜に埋め込まれた $F_0$ の2つの回転分子モーターの複合体である。 $F_1$ の回転はATP加水分解により

駆動され、 $F_0$ の回転は細胞膜の両側のプロトン濃度差（pH差）と膜電位差で形成される“プロトン駆動力”により駆動される。生体内では、 $F_0$ は $F_1$ よりも大きなトルク（回転力）

を発生し、 $F_0$  が  $F_1$  を強制的に逆回転させて ATP 加水分解の逆反応である ATP 合成を行うと考えられている。しかしながら、プロトン駆動力による ATP 合成酵素の回転の直接観察はいまだなされていなかった。

## 2. 研究の目的

ATP 合成酵素がプロトン駆動力により回転することを光学顕微鏡下で直接観察し証明することを目的とした。具体的には、1) プロトンが濃度差という統計的力によって流れる場合と、電位差という力学的力によって流れる場合で回転の挙動は同じなのか、2) ATP 合成反応の機構は ATP 加水分解と同じなのか (図 2)、に焦点を当てた。さらに  $F_0$  単独での回転観察も目的とし、回転が膜電位差およびプロトン濃度差にどう依存するか、特に  $F_0$  はプロトン駆動力が熱ゆらぎのエネルギーと同程度まで小さくなった場合にも一方向に滑らかに回転できるのかに焦点を当てた。

## 3. 研究の方法

### (1) サポート膜中の ATP 合成酵素の 1 分子回転観察

サポート膜を支持しかつ ATP 合成酵素を固定する基板として NTA-アガロースと NTA-ポリアクリルアミドを開発した。また、回転可視化プローブとしてポリスチレンビーズと磁気ビーズを使用した。

### (2) サポート膜の電氣的シールと電圧印加

数  $\mu\text{m}$  - 数  $10\mu\text{m}$  の開口を持つ PDMS シートまたはガラスピペットを用い、ATP 加水分解により回転している ATP 合成酵素を含むサポート膜のシールと電圧印加を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) サポート膜中の ATP 合成酵素の 1 分子回転観察

NTA-アガロースおよび NTA-ポリアクリルアミドを用い、ATP 分解により回転するサポート膜中の ATP 合成酵素の 1 分子回転観察に成功した。

### (2) サポート膜のシールと電圧印加

NTA-ポリアクリルアミド基板上的サポート膜をガラスピペットでパッチすることによって、数 10 メガオーム程度の電氣的シールを実現した。しかしながら、ガラスピペットを回転サンプルに押しつけた際に、ATP 合成酵素が回転を止めてしまうケースが非常に多いという問題点が明らかになった。また、ピペットが振動しているために、シールの安定性に悪影響がみられた。再現性や歩留まりを上げるには圧力や振動の精密な制御が必要であることが明らかとなった。ガラス

ピペットを押しつけても回転が止まらなかった ATP 合成酵素では、電圧に依存して回転速度が変化の様子が観察された。今後は詳細なコントロール実験を行い、電圧応答が真に ATP 合成酵素の回転挙動を反映しているのかを慎重に検証する。特に、電圧印加時のピペット内外での溶液のフローの影響や、回転プローブであるアミノ基修飾ポリスチレンビーズ表面の電荷の影響を検証する必要がある。

## 5. 代表的な研究成果

(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10件)

- ① \*Matsumoto Y, Hayama K, Sakakihara S, Nishino K, Noji H, \*Iino R, Yamaguchi A. Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. *PLoS ONE* 2011. in press. 査読有
- ② Saita E, Iino R, Suzuki T, Feniouk BA, Kinoshita K. Jr, \*Yoshida M. Activation and stiffness of the inhibited states of  $F_1$ -ATPase probed by single-molecule manipulation. *J Biol Chem.* 2010. 285: 11411-11417. 査読有
- ③ Ueno H, Nishikawa S, Iino R, Tabata KV, Sakakihara S, Yanagida T, \*Noji H. Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys. J.* 2010. 98: 2014-2023. 査読有
- ④ \*Hayashi K, Ueno H, Iino R, and \*Noji H. Fluctuation theorem applied to  $F_1$ -ATPase. *Phys. Rev. Lett.* 2010. 104: 218103-1-218103-4. 査読有
- ⑤ Watanabe R, Iino R, \*Noji H. Phosphate-release in  $F_1$ -ATPase catalytic cycle follows ADP release. *Nat. Chem. Biol.* 2010. 6: 814-820. 査

読有

- ⑥ Okuno D, Iino R, and \*Noji H. Stiffness of  $\gamma$  subunit of  $F_1$ -ATPase. *Eur. Biophys. J.* **2010**. 39:1589-1596. 査読有
- ⑦ Sakakihara S, Araki S, \*Iino R, \*Noji H. A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array. *Lab Chip*. **2010**. 10: 3355-3362. 査読有
- ⑧ \*Iino R, Hasegawa R, Tabata KV, \*Noji H. Mechanism of inhibition by C-terminal  $\alpha$ -helices of the  $\epsilon$  subunit of *Escherichia coli*  $F_0F_1$ -ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **2009**. 284:17457-17464. 査読有
- ⑨ Enoki S, Watanabe R, Iino R, and \*Noji H. Single-molecule study on the temperature-sensitive reaction of  $F_1$ -ATPase with a hybrid  $F_1$  carrying a single  $\beta$  (E190D). *J Biol Chem*. **2009**. 284: 23169-23176. 査読有
- ⑩ \*Imamura H, Huynh Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai, T, \*Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**. 106: 15651-15656. 査読有

[学会発表] (計12件)

- ① \*飯野亮太 「分子モーターの性質を調べる1分子計測技術」.(社)日本電気計測器工業会 関西支部 第29回戦略的基盤技術検討委員会. **2011年2月7日** (大阪) (招待講演)
- ② Seyfert K., Oosaka T., Yaginuma H., Ernst S., Noji H., \*Iino R., \*Börsch M.

Subunit rotation in a single  $F_0F_1$ -ATP synthase in a living bacterium monitored by FRET. SPIE Photonics West 2011. **January 22-27, 2011** (San Francisco, USA)

- ③ \*飯野亮太 「ATP合成酵素を1分子技術で見る・操る」. 光塾第2回研究会. **2010年12月11日** (大阪) (招待講演)
- ④ \*Ryota Iino. “Single-molecule studies on the fluctuation and function of a rotary motor protein ATP synthase”. The 4th International Symposium “Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions” **November 30, 2010**. (Shiga. Japan)
- ⑤ \*飯野亮太 「1分子技術で生体回転ナノモーターを見る・操る」. 特定領域研究「高次系分子科学」若手の会研究会. **2010年11月26日** (仙台) (招待講演)
- ⑥ \*飯野亮太 「中身を出し入れできる細胞サイズのうつわを創る」. 細胞を創る研究会3.0シンポジウム「器をつくる」. **2010年11月12日** (東京) (招待講演)
- ⑦ \*Iino R., Hayama K., Sakakihara S., and Noji H. Culture, detection, and recovery of the antibiotic-tolerant persister bacteria in the directly accessible microchamber array. 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$  TAS2010). **October 3-7, 2010**. (Groningen, Netherlands)
- ⑧ \*飯野亮太 「Fluctuation and function of a rotary motor protein」. 第48回日本生物物理学会年会シンポジウム「Fluctuation and Function of Biomolecules」. **2010年9月20日** (仙台)

(招待講演)

- ⑨ **Ryota Iino**, Khek-Chian Tham, Kazuhito V. Tabata, Hiroshi Ueno, \*Hiroyuki Noji. “Direct observation of steps in c-ring rotation of *Escherichia coli* F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase” (Selected for Oral Presentation). 16th European Bioenergetics Conference. **July 18, 2010.** (Warsaw. Poland)
- ⑩ \***Ryota Iino**, Khek-Chian Tham, Kazuhito V. Tabata, Hiroshi Ueno, \*Hiroyuki Noji. “Direct observation of steps in c-ring rotation of *Escherichia coli* F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase”. International Symposium: Watching Biomolecules in Action (WBMA’ 09). **December 15, 2009.** (Osaka. Japan)
- ⑪ \***Iino R.**, Sakakihara S., and Noji H. Preparation and biological application of water-in-oil microchamber array formed on hydrophobic/hydrophilic patterned surface. 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$  TAS2009). **November 1-5, 2009.** (Jeju, Korea)
- ⑫ \*Hiroyuki Noji and \***Ryota Iino**. “36-degree stepping rotation of F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase” International Symposium: Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembrane. **September 9, 2009.** (Kyoto. Japan) (招待講演)

[図書] (計2件)

- ① Okuno D, **Iino R**, and \*Noji H. Fundamental Properties and Structure

of F<sub>1</sub>-ATPase. In “Encyclopedia of Biophysics” edited by Roberts G.C. Springer (India). **2010.** In press.

- ② \*Noji H and **Iino R**. ATP synthase - Structure and dynamics of the smallest rotary motor proteins. In “Molecular Biology of Assemblies and Machines” edited by Baumeister W, Johnson L, Perham R, and Steven A. Garland (England). **2010.** In press.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ビーズ封入方法、ターゲット分子を検出する方法、アレイ、キット及びターゲット分子検出装置

発明者: \*野地博行, 新木卓, **飯野亮太**

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願2011-50629

出願年月日: 平成23年3月8日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 亮太 (IINO RYOTA)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号: 70403003

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし