

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 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22247025

研究課題名（和文） 局所的 1 分子操作による F1-ATPase のトルク発生機構の解明

研究課題名（英文） Torque generation mechanism of F1-ATPase probed by site-specific and reaction-specific single-molecule manipulation

研究代表者

野地 博行 (NOJI HIROYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：00343111

研究成果の概要（和文）：1 分子操作によって F1-ATPase の反応速度定数と平衡定数を回転角度の関数として決定する事に成功し、ATP の結合過程において大きな力を発生する事を明らかにした。また、トルク発生部位である β サブユニットの構造変化を非常に高い時空間分解能で計測する手法を確立し、 β の構造変化がパワーストローク型である事を明らかにした。変異体解析で示唆されていた固定子リング内における 3 つの β サブユニット間の協同性を、高速原子間力顕微鏡を用いて実証した。

研究成果の概要（英文）：We determined the rate constants and equilibrium constants of catalytic reactions on F1-ATPase as a function of rotary angle by manipulating individual F1 molecules. The results show ATP-binding process is the major torque-generating step. A novel single-molecule imaging system using polarized scattering light from a gold nanorod that has high spatiotemporal resolution was established to visualize the conformational change of the β subunit, the torque-generating unit of F1. It was revealed that the β subunit makes a power-stroke type conformational change. High-speed AFM was applied to visualize the conformational change of the β subunit in the isolated stator ring with three β subunits. β subunits showed highly cooperative conformational transition, propagating the conformational state in the anticlockwise direction as the same as the rotor rotation. This finding means that the structural basis is programmed in the stator ring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2011 年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2012 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
年度			
年度			
総計	33,300,000	9,990,000	43,290,000

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 分子操作・1 分子計測・分子モーター

1. 研究開始当初の背景

F1-ATPase は、ATP 合成酵素の反応触媒ドメインであり、それ単独で ATP を

加水分解して分子内部の回転子を回転させる回転分子モーターである。回転 1 分子アッセイが確立後、我々を含む国内の非常に強力

な研究グループによってこのモーターの解析は飛躍的に進んでおり、各種分子モーターの中でも最も理解が進んでいる分子モーターの1つにあげられる。

本研究以前、我々は特定領域研究「膜超分子の革新的ナノバイオロジー」(2005-2010年度)においてF1-ATPaseの化学力学共役反応スキームのほぼ全容を解明した(*Nat. Chem. Bio.* 2009)。また、結晶構造で見られる状態が、1分子計測で見られる2つの安定構造のうち、catalytic dwellと呼ばれるATP加水分解前後の状態であることを示した(*PNAS* 2010)。このように、1分子計測と結晶構造の対応付けや、反応スキームなど、基本的知見は確立していた。

しかし、「ATP加水分解で放出される自由エネルギーがどのように力学的運動に変換されるのか?」に関して明確な答えは得られていない。これを理解するためには、単にモーターの運動を詳細に観測するだけでなく、ある特定の状態にあるF1-ATPaseを分子操作する事で「化学反応と構造状態の相関」を詳細に明らかにする事が必要である。

これに加えて、これまでの我々の計測では回転子 γ の回転運動を可視化してきたが、実際にトルクを発生している β の構造状態の計測は行ってこなかった。「化学反応と構造状態の相関」を理解するためには、トルクを発生している β の構造変化計測は必須である。最終的には、 β の構造状態を1分子操作し、その触媒反応状態との対応付けが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、主に以下の課題に取り組んだ。

① 回転に伴う反応変調の実測：ある特定の触媒化学状態にあるF1を1分子操作し、構造状態変化に伴う触媒反応の速度定数と平衡定数の変化量を実測した。これらの変化量は、それぞれ活性化エネルギーもしくは自由エネルギーの変化量に対応するため、その大きさから各反応にともなって放出されるエネルギーの値を定量することができる。また、この手法は、液胞型ATPase(V-ATPase)にも応用し、回転分子モーター間における一般性と違いの解明にも取り組んだ。

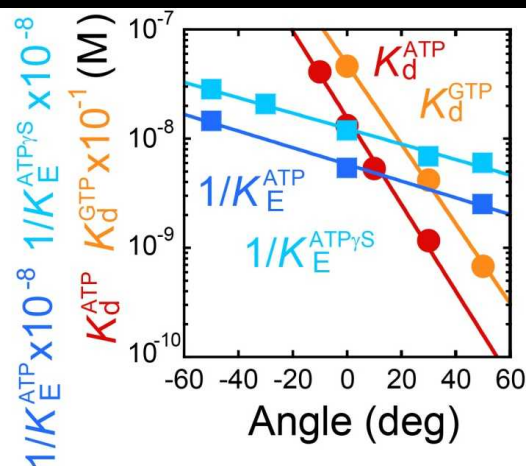
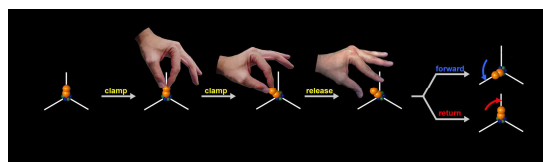
② β の構造変化実測とトルク伝達メカニズム：触媒能をもつ β の構造変化の実測と、 γ へのトルク伝達メカニズムの解明にも取り組んだ。前者に関してはナノロッドの異方性散乱を利用した新しい1分子計測技術の開発に取り組んだ。トルク伝達に関しては、 β と γ の接触点を非常に大域的に破壊した際の影響を見た。

③ 回転に伴う反応変調の実測：変異体解析と高速AFMを用いた解析によって固定子リング中における3つの β の協同性の構造的

基盤の解明に取り組んだ。

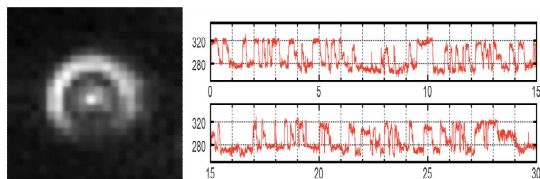
3. 研究の方法

① 回転に伴う反応変調の実測：下図にあるように、ある特定の反応の待ち状態で停止しているF1を1分子操作で特定の回転角度に固定し、一定時間後に手を離す。このとき、操作時間中に反応した場合、操作から解離された直後に次の停止角度までステップ回転する。この応答確率を求める事で、それぞれの停止角度における反応確率を求めた(*Nat. Chem. Bio.* 2012)。その結果、回転方向に向かってATP結合の平衡定数が劇的に上昇したのに対してATP加水分解反応の平衡定数は僅かしか上昇しなかった。この結果から、F1-ATPaseは主にATPの結合過程で大きなトルクを発生し、少なく見積もっても全出力の50%に達する事が分かった。また、この手法をV-ATPaseにも応用したところ、V-ATPaseのATP結合平衡定数も回転に伴って上昇する事が分かったが、F1-ATPaseほどは上昇しない事から、V-ATPaseは結合過程以外にトルク発生に重要な反応がある事が示唆された(*J. Biol. Chem.* 2012)。



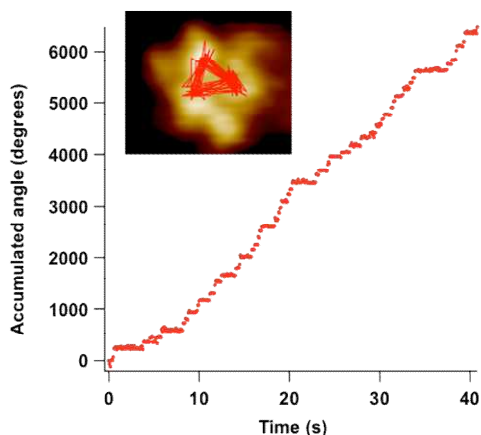
② β の構造変化実測とトルク伝達メカニズム： β の構造変化を実測するため、ナノロッドの異方性散乱イメージング法を利用した1分子イメージング法を開発した。これは、ナノロッドのレーザー暗視野イメージング時に意図的にdefocusした際、ナノロッドの長軸方向に偏光した散乱光による非等法的なイメージを利用したものである(下図)。このシステムによって、 β の時間分解能10マイクロ秒の超高速イメージングに成功し、新しい構造中間体の発見に加えて、 β の運動が非常に一方向性の高いパワーストローク型

である事が明らかとなった(未発表データ)。



トルク伝達に関しては、 β と γ の接触点に20個のグリシン残基を導入した変異体を作成し、トルクが約50%にまで減少することを明らかにした(*Biophysical J.* 2012)。

③ 回転に伴う反応変調の実測：上述の変異体解析を含め、ここ数年の研究結果は、F1の固定子リング中にある3つの β サブユニット間の協同性には、固定子である γ との相互作用は必ずしも必要ではない事を示唆していると解釈できる。そこで、 γ の無い単離された固定子リングだけの β の構造状態遷移を、高速AFMを用いて可視化した(金沢大学安藤研との共同研究)。その結果、これまでの予想に反して γ が無くても3つの β が順番に構造変化の様子が観察された



(*Science* 2011)。

4. 研究成果

①に関しては、外力を与える事で安定構造とは異なる構造状態に固定し、そのときの反応速度と平衡定数を決定するという前例の無い計測である。タンパク質の中間体構造の反応特性をここまでの精度でともめた例は他に無い。トップジャーナルには至らなかったが、タンパク質科学において非常に重要な知見を得たと考えている。この結果から、ATP結合過程の重要性を定量的に評価することができた。さらに、この手法をV-ATPaseに応用することで、F1-ATPaseとは異なる角度依存性を明らかとした。

②に関しては、当初目標の通り β の構造変化を非常に高い時間分解能で1分子計測することに成功し、 β の構造変化がパワーstroke型であることを見いだす事に成功した。これに関しては、さらに詳細な解析後に原著論文発表する予定である。また、 β

の γ との接触界面を大幅に柔らかくし、得意的な相互作用を全て破壊した変異体解析から、注目した接触界面を破壊すると、トルク伝達が約50%にまで下がる事が分かった。一方で、回転の方向性が失われていない事から、 β と γ の特異的な相互作用が無くても、すなわち γ を介さずに β は協同性を維持している事を見いだした。

③は、当初予定していなかった項目であるが、②の変異体解析結果を受けて急遽実施した実験である。予想以上に明解な結果を得ることができた。この固定子リング間でのアロステリック効果の発見は、F1のみならず他の6量体リングタンパク質(AAAタンパク質など)においても協同性を示し得る事を示唆する重要な成果であると考えられる。

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26件)

1. Watanabe R, Tabata KV, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H, Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force, (2013) Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms2631, 1-6.
2. Esma Tirtom N, Okuno D, Nakano M, Yokoyama K, Noji H, Mechanical Modulation of ATP-Binding Affinity of V1-ATPase, (2012) J Biol Chem, 288, 1, 619-623.
3. Muraoka T, Shima T, Hamada T, Morita M, Takagi M, Tabata K, Noji H, Kinbara, K, Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores, (2012) J Am Chem Soc, 134, 48, 19788-19794.
4. Enoki S, Iino R, Morone N, Kaihatsu K, Sakakihara S, Kato N, Noji H, Label-free single-particle imaging of the influenza virus by objective-type total internal reflection dark-field microscopy, (2012) PLoS ONE, 7, 11, e49208, 1-7.
5. Hatsugai N, Koldenkova VP, Imamura H, Noji H, Nagai T, Changes in Cytosolic ATP Levels and Intracellular Morphology during

- Bacteria-Induced Hypersensitive Cell Death as Revealed by Real-Time Fluorescence Microscopy Imaging, (2012) *Plant and Cell Physiology*, 53, 10, 1768-1775.
6. Kim SH, Iino R, Iwai S, Araki S, Sakakihara S, Noji H, Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules. (2012) *Lab on a Chip*, 12, 4986-4991.
 7. Mizue Tanigawara, Kazuhito V. Tabata, Yuko Ito, Jotaro Ito, Rikiya Watanabe, Hiroshi Ueno, Mitsunori Ikeguchi, and Hiroyuki Noji, Role of the DELSEED Loop in Torque Transmission of F1-ATPase. (2012) *Biophys J*, 103, 5, 970-978.
 8. Naciye Esmâ Uner, Yoshihiro Nishikawa, Daichi Okuno, Masahiro Nakano, Ken Yokoyama, and Hiroyuki Noji. Single-molecule analysis of inhibitory pausing states of V1-ATPase. (2012) *J Biol Chem*, 287, 34, 28327-28335.
 9. You H, Iino R, Watanabe R, Noji H. Winding single-molecule double-stranded DNA on a nanometer-sized reel. (2012) *Nucleic Acids Research*, Published online DOI: 10.1093/nar/gks651, 1-6
 10. Iino R, Hayama K, Amezawa H, Sakakihara S, Kim SH, Matsumono Y, Nishino K, Yamaguchi A, Noji H. A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter droplet array. (2012) *Lab on a Chip*, 12, 3923-3929.
 11. Hayashi S; Ueno H, Shaikh AR, Umemura M, Kamiya M, Ito Y, Ikeguchi M, Komoriya Y, Iino R, Noji H. Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations. (2012) *Journal of the American Chemical Society*, 134, 20, 8447-8454.
 12. Komoriya Y, Ariga T, Iino R, Noji H. Principal role of the arginine finger in rotary catalysis of F1-ATPase. (2012) *Journal of Biological Chemistry*, 287, 18, 15134-15142.
 13. Sasagawa K, Ando K, Kobayashi T, Noda T, Tokuda T, Kim SH, Iino R, Noji H, Ohta J. Complementary Metal–Oxide–Semiconductor Image Sensor with Microchamber Array for Fluorescent Bead Counting. (2012) *Japanese Journal of Applied Physics* 51. 02BL01 .
 14. Watanabe R, Okuno D, Sakakihara S, Shimabukuro K, Iino R, Yoshida M, Noji H, Mechanical modulation of catalytic power on F1-ATPase, (2012) *Nature Chemical Biology*, 8, 86-92.
 15. Kishikawa J, Fujikawa M, Imamura H, Yasuda K, Noji H, Ishii N, Mitani S, Yokoyama K., Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*, (2011) *Microscopy Research and Technique*, 75, 1, 15-19.
 16. Uchihashi T, Iino R, Ando T, Noji H, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase, (2011) *Science* 2011, 333, 755-758.
 17. Furuike S, Nakano M, Adachi K, Noji H, Kinoshita K Jr, Yokoyama K, Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H(+)-ATPase/synthase with an essentially drag-free probe, (2011) *Nature Communications* 2011, 2, 233.
 18. Nakano M, Imamura H, Nagai T, Noji H, Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level, (2011) *ACS Chemical Biology*, 6, 709-715.
 19. 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, (2011) *PLoS ONE*. 6, e18547.
 20. Sakakihara S, Araki S, Iino R, Noji H, A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array, (2010) *Lab on a Chip*, 10, 3355-3362.
 21. Watanabe R, Iino R, Noji H, Phosphate-release in F1-ATPase catalytic cycle follows ADP release, (2010) *Nat. Chem Biol.* 6, 814-820
 22. Okuno D, Iino R, and Noji H, Stiffness of γ

- subunit of F1-ATPase, (2010) Eur. Biophys. J, 39, 1589-1596.
23. Hayashi K, Ueno H, Iino R, and Noji H, Fluctuation theorem applied to F1-ATPase (2010) Phys. Rev. Lett. 104, 218103,1-4
 24. 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, (2010) Biophys. J., 98, 2014-2023
 25. Ide T, Takeuchi Y, Noji H and Tabata KV., Simultaneous Optical and Electrical Single Channel Recordings on a PEG Glass, (2010) Langmuir, 26, 8540-8543
 26. Kotera I, Iwasaki T, Imamura H, Noji H and Nagai T., Reversible dimerization of *Aequorea victoria* fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators, (2010) ACS Chemical Biology, 5, 215-222
- [総説] (計 12 件)
1. Iino R, Noji H, Intersubunit coordination and cooperativity in ring-shaped NTPases, (2013), Current Opinion in Structural Biology, 23:1-6.
 2. Iino R, Noji H, Operation mechanism of FoF1-ATP synthase revealed by its structure and dynamics (2013) IUBMB Life, 65, 238-246.
 3. 野地博行, 「バイオ分子の1分子デジタル計数法」, パリティ (2012) 27: 75-77.
 4. Iino R, Noji H, Rotary catalysis of the stator ring of F1-ATPase (2012), BBA - Bioenergetics 1817: 1732-1739.
 5. Iino R, Nishino K, Noji H, Yamaguchi A, Matsumoto Y, A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors, (2012) Frontiers in Microbiology, doi:10.3389/fmicb.2012.00040.
 6. 渡邊力也, 野地博行, 「F1-ATPaseにおける回転の角度に依存した触媒活性の制御機構」, ライフサイエンス 新着論文レビュー(2011年12月12日).
7. 飯野亮太, 内橋貴之, 安藤敏夫, 野地博行, 「回転子のない F1-ATPase が一方向に“回転”することを高速原子間力顕微鏡により解明」, ライフサイエンス 新着論文レビュー(2011年8月19日).
 8. Okuno D, Iino R, Noji H, Fundamental Properties and Structure of F1-ATPase, (2011), In “Encyclopedia of Biophysics” edited by Roberts G.C. Springer (India),
 9. Noji H, Okuno D, Ikeda T, Mechanochemistry of F1 motor protein, (2011), Chemical Science, 2,2086-2093.
 10. Okuno D, Iino R, Noji H, Rotation and Structure of FoF1-ATP synthase, (2011) Journal of Biochemistry(Tokyo), 149, 655-664.
 11. 渡邊力也, 野地博行, 「1分子操作技術に立脚した回転モータータンパク質 F1-ATPase の化学-力学共役機構の解明」, ライフサイエンス 新着論文レビュー (2010年10月26日).
 12. Okuno D, Ikeguchi M. Noji H, Measurement of the conformational state of F1-ATPase by single-molecule rotation, (2010) Methods in Enzymology, 475, 279-296.
- [学会発表] (計 14 件)
1. Mechanical modulation of catalytic power of F1-ATPase rotary motor protein.JSPS, 先端研究拠点事業「最先端マイクロ・ナノ化学国際研究拠点形成」JSPS 特別推進研究「拡張ナノ空間流体工学の創成」共催シンポジウム, 東京大学福武ホール, 2013/3/27.
 2. Design Principle of F1-ATPase Rotary Molecular Motor, France-Japan Seminar BioInspired Methods & Applications, Embassy of France in Japan, (Tokyo JAPAN), 2013/2/6.
 3. Single--Molecule Biophysics of ATP synthase: 15 years for Comprehensive Understanding of the Smart Molecular Motor, France-Japan Seminar BioInspired Methods & Applications, Embassy of France in Japan, (Tokyo JAPAN), 2013/2/4.

4. Single-molecule digital counting of proteins, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, Academia Sinica, (Taipei, Taiwan), 2012/10/17
5. Single-Molecule Digital Bioassay with a Million Droplets Array, International Conference Session 5, Chiba (Japan), 2012/9/7.
6. Mechanical Modulation of Catalytic Power of F1-ATPase, The 26th Annual Symposium of The Protein Society, Manchester Grand Hyatt (San Diego, USA), 2012/8/7
7. Rotation of the rotor-less molecular motor protein, FNANO12, Snowbird Cliff Lodge (Salt Lake City, USA), 2012/4/16.
8. Single-molecule biophysics of FoF1-ATP synthase, International Symposium on Surface Science, Tower Hall Funabori(Tokyo, JAPAN), 2011/12/15.
9. Rotation of F1 Without the Rotor, Gordon Research Conferences 2011, Proctor Academy(USA), 2011/6/26.
10. Femtoliter Chamber Array for Single Molecule Bioassay, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, Kyoto International Conference Center(Kyoto, JANAN), 2011/5/25.
11. Intrinsic cooperativity of isolated stator ring of F1-ATPase, Frontiers of Biophysics the 2nd Symposium, Seoul National University(Korea), 2011/5/8
12. Femto-liter Reactor Array for Single-molecule Bioanalysis, PITTCON2011, Georgia World Congress Center(USA), 2011/3/15.
13. Mechanochemistry of F1-ATPase Motor Protein, ISMSC2010, Nara(JAPAN), 2010/6/9.
14. Femtoliter Chamber Array for Single Molecular Bioassay, ISMM2010, Hong Kong University of Science and Technology (Hong Kong), 2010/5/29.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等
<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野地 博行 (NOJI HIROYUKI)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号 : 00343111

(2) 研究分担者

飯野 亮太 (IINO RYOTA)
東京大学・大学院工学系研究科・講師
研究者番号 : 70403003
田端 和仁 (TABATA KAZUHITO)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号 : 50403001

(3) 連携研究者

なし