

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26440082

研究課題名（和文）回転モーターF1の回転ポテンシャル全容の計測

研究課題名（英文）Measurement of the whole potential energy in the rotary motor F1

研究代表者

足立 健吾（Adachi, Kengo）

早稲田大学・理工学術院・主任研究員（研究院准教授）

研究者番号：60370128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：生体分子モーターは、基質となるヌクレオチドの加水分解エネルギーを利用して働いている。実際にATP駆動型の分子モーターについて言えば、活性部位でのATP、ADP・Pi、ADP、Piといったそれぞれの化学状態に応じた力を一連の化学サイクルに沿って順次発生することで一方向に動くと考えられている。そこで、力発生の設計図とでも言うべきポテンシャルエネルギーをヌクレオチドの化学状態ごとに直接1分子測定することを試みた。具体的には、回転分子モーターF1-ATPaseを用いて、結合するヌクレオチドを直接見ながら1分子回転操作し、ADP1個結合の回転トルクを測定し、その積分から回転ポテンシャルを決定した。

研究成果の概要（英文）：Molecular motors in living organisms work with the hydrolysis energy of nucleotide substrates. In fact, with regard to ATP-driven molecular motors, it is thought that they move by sequentially generating force according to each chemical state such as ATP, ADP・Pi, ADP, Pi. Here, I tried to measure at single-molecule level potential energies that are viewed as the design drawing of the force generation. Specifically, using a rotary molecular motor F1-ATPase, the rotation was manipulated with magnetic tweezers while directly observing the bound nucleotides. Torque in a chemical state of one ADP binding was measured and the potential energy was obtained from the integration of torque.

研究分野：生物物理学

キーワード：トルク計測 磁気ピンセット 回転分子モーター ポテンシャルエネルギー 磷酸解離

1. 研究開始当初の背景

本研究課題ではATP駆動型の生体分子モーターとして、ATP合成酵素の一部であるF<sub>1</sub>を研究対象とする。膜内在性部分であるF<sub>0</sub>から分離した可溶性F<sub>1</sub>は、ATP加水分解のみをおこなう最小の回転分子モーターF<sub>1</sub>-ATPaseとして知られている。加水分解や回転に必要な最小構成単位はF<sub>1</sub>部分の $\alpha_3\beta_3$ 部分複合体であり(以後、単にF<sub>1</sub>と言う)。3つのサブユニットにあるそれぞれの活性部位でATPの加水分解が順番に起こり、 $\alpha_3\beta_3$ サブユニットに囲まれた中心軸サブユニットが一方向に回転する(Noji et al. 1997, Nature)。

1997年に野地らによってこのF<sub>1</sub>の回転が直接1分子で観察されて以来、これまで数多くの1分子研究によってこの分子のATP加水分解によって回転する仕組みが明らかにされてきた。この分子は可逆モーターであり逆回しすればADPと燐酸からATPを合成する。ATP合成の機序についてはこれまでほとんど分かっていなかったが、ヌクレオチド親和性の全体像が明らかにされ(Adachi et al. 2012, Nat. Commun.)、ATP合成の仕組みについても説明が進んだ。

この20年間、1分子技術を駆使した先進的な研究によって次々とF<sub>1</sub>分子モーターのATP加水分解・合成の仕組みが解明されてきた。残す主要な課題の1つとして、このモーターの化学状態で決まるポテンシャルエネルギーの全容の解明が挙げられる。1分子回転観察が可能となって以来の積年の実験課題であり、生体分子モーター一般の作動原理を理解するためにも重要な実験であると思われる。

2. 研究の目的

生体分子モーターは、基質となるヌクレオチドの加水分解によって得られる化学的エネルギーを力学的仕事に変換することで働いている。実際に、ATP駆動型の回転分子モーターF<sub>1</sub>について言えば、活性部位でのATP、ADP・Pi、ADP、Piといった化学状態で決まる力(トルク)が一連の化学サイクルに沿って連続的に発生し、且つ、それぞれ3つが協同的に働くことでを一方向に回転させると考えられている。本研究課題では、このトルク発生の設計図とでも言うべき化学状態で決定される回転ポテンシャルエネルギーの全容を明らかにする。

これまでに、ブラウン運動によるポテンシャルエネルギーの見積もりや回転操作によるトルクの測定がいくつか試みられているが、ポテンシャルの一部だけであったり、見積もられたポテンシャルやトルクの化学状態の同定が曖昧であったりとどれも満足

の行く結果ではなかった。本研究では、ヌクレオチドが結合している部位や結合数などの化学状態を蛍光性ヌクレオチドの1分子イメージングで直接観察しながら、トルクの全容を1分子回転操作によって測定する。F<sub>1</sub>回転分子モーターの働く仕組みのみならず、ATP駆動型の分子モーター一般の作動原理について提示できるのではと期待している。

3. 研究の方法

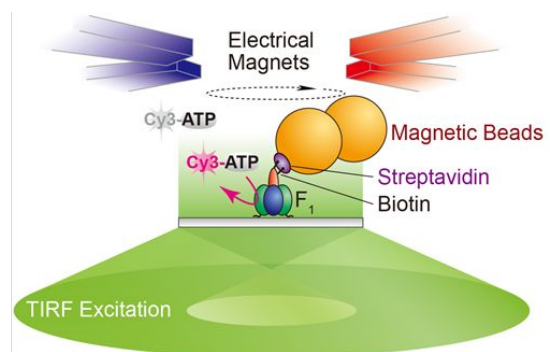
(1) F<sub>1</sub>の3つの活性部位(サイト)における特定の化学状態(X, Y, Z = ATP, ADPなど)におけるの回転(θ)のポテンシャルエネルギーをG<sup>XYZ</sup>(θ)とすると、化学状態XYZにおいて発生するのトルクτは、ポテンシャルG<sup>XYZ</sup>の勾配として、

$$\tau = - \frac{\partial G^{XYZ}}{\partial \theta} \dots [式 1]$$

と表される。また、特定のヌクレオチド(N)に対するサイト1の結合の自由エネルギー変化G<sup>0N</sup>はポテンシャルエネルギーG<sup>0</sup>と角度依存的親和性K<sub>a</sub><sup>N</sup>(θ)との間に次の、

$$\begin{aligned} G^{0N} &= G^{NYZ}(\theta) - G^{EYZ}(\theta) \\ &= -k_B T \ln K_a^N(\theta) - k_B T \ln [N] \end{aligned} \dots [式 2]$$

の関係が成り立つ。k<sub>B</sub>はボルツマン定数、Tは絶対温度、Eはヌクレオチド無しの化学状態、溶液中のNの濃度[N]とする。直接測定として、化学状態XYZにおけるトルクを決めれば[式1]によりポテンシャルエネルギーを決めることができる。第二の方法として、ヌクレオチド無しのポテンシャルG<sup>EYZ</sup>を決めれば、角度依存的親和性K<sub>a</sub><sup>N</sup>(θ)の値(Adachi et al. 2012, Nat. Commun.)を利用して[式2]から、ATP、ADP、ATP + Pi、ADP + PiなどのヌクレオチドNに対するポテンシャルG<sup>NYZ</sup>を見積もることができる。



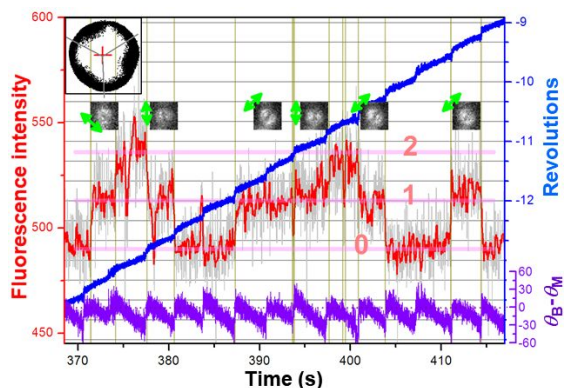
(2) 回転子に磁気ビーズを取り付けたF<sub>1</sub>をガラス基盤上に固定し、磁気ピンセットによる回転磁場で正逆両方向に一定速度で回転操作する。磁気ビーズの磁場からのズレがF<sub>1</sub>の発生するトルクτであり、ATP待ちの角度を基準に360度の回転角度θの関数としてトルク測定する。同時に、蛍光1分子イメー

ジングによって蛍光性 ATP/ADP の結合・解離を観察する。結合数、結合するサイトを偏光/デフォーカス蛍光イメージングによって同定し、ヌクレオチド化学状態 XYZ を決定する。化学状態ごとのトルクをまとめ、その積分からポテンシャルエネルギーを決定する。ヌクレオチド無しのポテンシャルを決定し、第二の方法から化学状態ごとのポテンシャルを決定する。

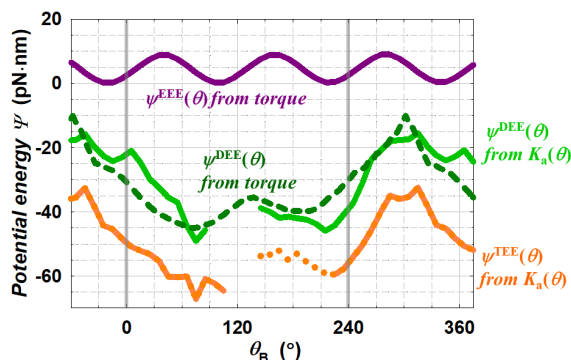
#### 4. 研究成果

##### (1) ポテンシャル測定

測定データの例を示す。回転子に取り付けた磁気ビーズを磁気ピンセットで回転させると同時に、Cy3-ADP のデフォーカス蛍光イメージングを行った。結合ヌクレオチドの数が 0, 1, 2 と変化しているが、1 個結合のときは像の形状から 3 つの触媒部位のどこに結合したかが分かる。2 個のときも前後から判別できる。0 個のときはヌクレオチドが  $F_1$  に結合していない状態である。磁気ビーズと磁場の向きとのズレ ( $\theta_B - \theta_M$ ) にはね常数を掛ければトルクとなる。この場合は燐酸無しの ADP 条件なので、加水分解方向と合成方向の回転をまとめて ADP (D) 化学状態とした。



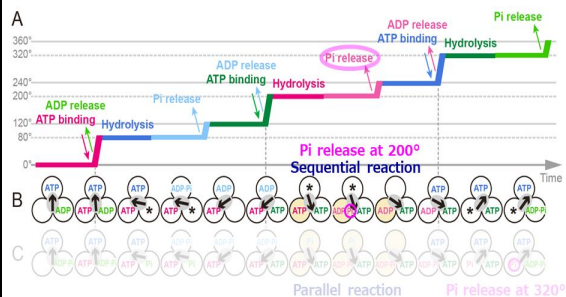
結合ヌクレオチド無しの状態 (EEE) と ADP を 1 個結合した化学状態 (DEE) のポテンシャルをトルク測定から決定した。結合ヌクレオチド無しのポテンシャルと親和性からもポテンシャルを決定した。例数がまだまだ不足しており、今後の課題は更に測定例、データ数を増やすことである。また、ADP 以外のヌクレオチドの化学状態の測定を進めることである。



##### (2) 化学-力学共役スキーム

$F_1$  の化学-力学共役スキームに関して我々の主張と矛盾する結果が他グループから報告された。燐酸解離のタイミングには未だ議論の余地があり、回転モデル完成のために検証実験を行った。今のところ化学状態の変化は蛍光 1 分子イメージングでは直接観察できないため、 $F_1$  の化学状態を判断するために化学-力学共役スキームが必要である。

ATP S の分解生成物であるチオ燐酸の解離が燐酸に比べて遅いことを利用して、ATP S のチオ燐酸解離が結合後 320 度で起こっているのかどうかを確認した。チオ燐酸と燐酸の解離速度の違いが有意であることを確認し、様々な温度条件において 320 度ではチオ燐酸解離が見られないことが分かった。最終的に好熱菌由来の  $F_1$  では加水分解が起こる角度と同じ 200 度で (チオ) 燐酸の解離が起こり 40 度回転を駆動しているという結論に至った。



##### <引用文献>

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K., Jr. "Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase." *Nature* **386**, 299-302 (1997)  
 Adachi, K., Oiwa, K., Yoshida, M., Nishizaka, T. & Kinosita, K., Jr. "Controlled rotation of the  $F_1$ -ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis." *Nat. Commun.* **3**, 1022 (2012)

##### 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2件)

Shoko Fujimura, Yuko Ito, Mitsunori Ikeguchi, Kengo Adachi, Junichiro Yajima, Takayuki Nishizaka "Dissection of the angle of single fluorophore attached to the nucleotide in corkscrewing microtubules." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**: 614-620 (2017) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.165

Ryohei Chiwata, Ayako Kohori, Tomonari Kawakami, Katsuyuki Shiroguchi, Shou Furuike, Kengo Adachi, Kazuo Sutoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita, Jr. "None of the rotor residues of  $F_1$ -ATPase are essential for torque generation." *Biophys. J.*, **106** 2166-2174 (2014) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bpj.2014.04.013

〔学会発表〕(計 8 件)

Kengo Adachi, Kazuhiro Oiwa, Masasuke Yoshida, Taro Q.P. Uyeda, Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Timing of phosphate release in the rotary motor thermophilic  $F_1$ " Biophysical Society 61th Annual Meeting, New Orleans USA. February 11-15, 2017

足立 健吾、大岩 和弘、吉田 賢右、上田 太郎、木下 一彦「好熱菌由来の回転モーター $F_1$ の燐酸解離のタイミング (Timing of Pi release in the rotary motor thermophilic  $F_1$  (TF<sub>1</sub>))」日本生物物理学会第 54 回年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 25-27 日

足立 健吾、大岩 和弘、吉田 賢右、木下 一彦「回転モーター好熱菌  $F_1$  の燐酸解離のタイミング」2016 年 生体運動研究合同班会議, キャンパスプラザ京都, 2016 年 1 月 8-10 日

足立 健吾、大岩 和弘、吉田 賢右、木下 一彦「好熱菌  $F_1$  のカップリングスキーム (Coupling scheme of thermophilic  $F_1$ )」日本生物物理学会第 53 回年会, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館, 2015 年 9 月 13-15 日

Kengo Adachi, Kazuhiro Oiwa, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Coupling scheme of the rotary motor thermophilic  $F_1$ " Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore USA. February 7-11, 2015

足立 健吾、大岩 和弘、吉田 賢右、木下 一彦「好熱菌  $F_1$  のカップリングスキーム」2015 年 生体運動合同班会議, 学習院大学, 2015 年 1 月 7-9 日

足立 健吾、大岩 和弘、吉田 賢右、木下 一彦「好熱菌  $F_1$  のカップリングスキーム (Coupling scheme of thermophilic  $F_1$ )」日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25-27 日

Kengo Adachi, Kazuhiro Oiwa, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinoshita, Jr. "Coupling scheme of the rotary motor thermophilic  $F_1$ " 18th the International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) Congress, Brisbane Australia, August 3-7, 2014

〔図書〕(計 1 件)

足立健吾「レーザー暗視野顕微鏡で 1 分子運動を捉える」DOJIN BIOSCIENCE SERIES 1 分子生物学, 原田慶恵・石渡信一 編, 化学同人, pp. 237-238 (2014).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 健吾 (ADACHI, Kengo)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 60370128

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし