

研究の背景と目的

生体分子モーターF₁-ATPaseはFoF₁-ATP合成酵素の一部であり、その主な生理学的役割は、生体内におけるエネルギー通貨と言われるATP（アデノシン三リン酸）の合成である。単離されたF₁-ATPaseは、ATPをADP（アデノシン二リン酸）とPi（無機リン酸）に加水分解し、それに伴って放出される自由エネルギー $\Delta\mu$ （化学ポテンシャル差に等しい）を使って分子内の回転軸を回転させ、外部に仕事 W をする（図1）。このときのエネルギー変換効率 $W/\Delta\mu$ は、好熱菌*Bacillus* PS3由来のF₁-ATPase（以下TF₁）を用いた一分子観察実験によって調べられており、25℃でほぼ効率100%であると報告されている[1]。一方で、好熱菌*Bacillus* PS3の至適生育温度は65℃であり、そのような高温での一分子観察およびエネルギー変換効率の測定は実験上の困難からこれまで行われていなかった。そこで、本研究では、好熱菌の至適生育温度（65℃）でもTF₁は高いエネルギー変換効率を維持できるのかという問いの検証を目的として研究を行った。

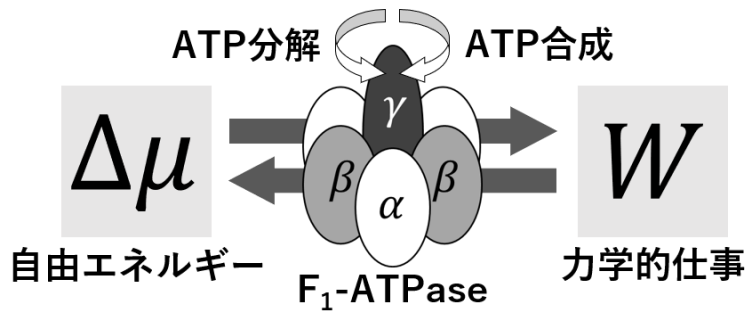


図1：F₁-ATPaseのエネルギー変換概要図。F₁-ATPaseは主に α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットからなり、ATP加水分解時には γ サブユニットが上から見て反時計回りに回転し外部に力学的な仕事をす。反対に、 γ サブユニットを時計回りに強制回転させるとATPを合成する。

研究方法

エネルギー変換効率 $W/\Delta\mu$ を調べるためには、TF₁が出力する仕事 W とATP加水分解自由エネルギー $\Delta\mu$ がわかればよい。まず、仕事 W については、先行研究[1]と同様に回転電場法と呼ばれる手法で測定することができる（図2左）。これは、TF₁周囲に配置された4つの電極に位相を90°ずつずらした交流電圧を印加することで回転する電場を生じさせ、その回転電場とTF₁の回転軸にとりつけた可視化プローブとの相互作用によってTF₁の回転軸にトルクを印加することができる手法である。この手法を用いてTF₁の回転を停止させるために必要な外部トルクの大きさを見積もり、そこから仕事 W を計算した。一方、ATP加水分解自由エネルギー $\Delta\mu$ は次式で表される。

$$\Delta\mu = \Delta\mu^\circ + k_B T \ln \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{Pi}]} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta\mu^\circ$ 、 k_B 、 T 、 $[\cdot]$ はそれぞれ、標準状態における自由エネルギー差、ボルツマン定数、温度、各基質濃度である。 $\Delta\mu^\circ$ は一般に温度 T に依存しているが、それが T のどのような関数になっているのかを熱力学から知る

ことはできない。そのため、65°Cにおける $\Delta\mu^\circ$ の実験値が必要となるが、その測定には大変な労力を要し、これまで37°Cでしか実測されていない[2,3]。そこで、本研究では $\Delta\mu$ の基質濃度依存性を利用することで、65°Cでの効率を議論する。TF₁の効率が65°Cで100%、すなわち $W = \Delta\mu$ のとき、式(1)より、

$$W = \Delta\mu^\circ + k_B T \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]} \quad (2)$$

が成り立つ。つまり、基質濃度に依らず効率が100%であるならば、ATP、ADP およびPiの濃度条件を変えて仕事 W を測定し、その結果を横軸に $k_B T \ln [ATP]/[ADP][Pi]$ をとってプロットしたとき、傾き1の直線になる(図2右)。また、この命題の対偶をとると、傾きが1でなければ、いずれかの実験条件で効率は100%でないことが言える。このようにして65°Cにおける効率を調べる。

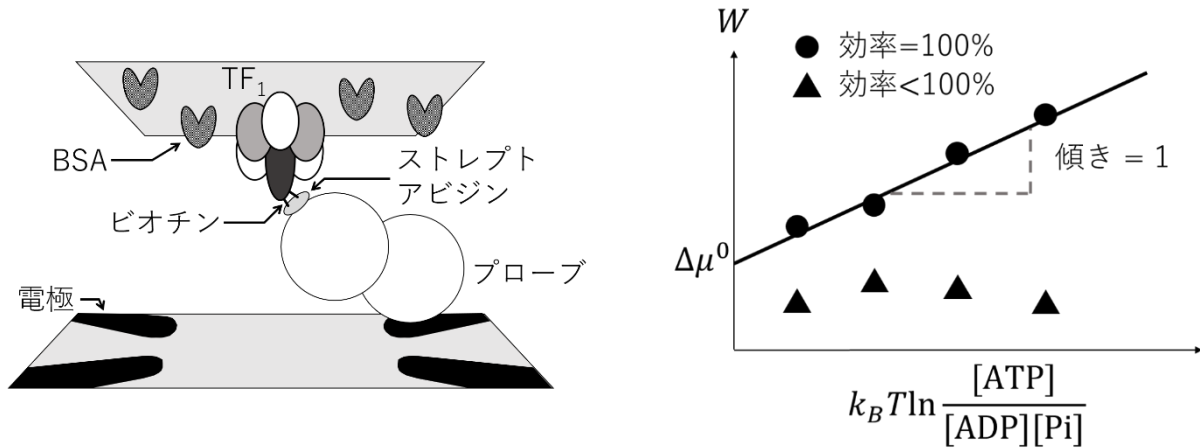


図2：(左) 一分子回転電場実験模式図。スライドガラスに蒸着された4つの電極に交流電圧を印加することで、カバーガラスに吸着させたTF₁に外部トルクをかける。その時のTF₁の回転の様子を顕微鏡で観察する。(右) $\Delta\mu$ の基質濃度依存性を利用した効率測定方法。温度 T は65°Cに固定し、様々な基質濃度で仕事 W を測定することで効率の議論を試みる。

結果

・37°Cにおけるエネルギー変換効率の測定

25°CにおけるTF₁の効率を測定した先行研究[1]では、37°Cでの $\Delta\mu^\circ$ の実測値[2,3]から外挿して計算した25°Cの $\Delta\mu^\circ$ の値を用いていたが、温度依存性は不明であるため、外挿して求められた25°Cにおける $\Delta\mu^\circ$ の値および25°Cでのエネルギー変換効率が正しい保証はない。そこで、65°Cでの実験を行う前に $\Delta\mu^\circ$ の実測値が存在する37°CでTF₁のエネルギー変換効率を調べた。まず、TF₁のATP加水分解時の回転を妨げる方向に外部トルクをかけ、それによる回転速度の変化を調べた(図3左)。これより、TF₁の回転を停止させるために要する外部トルクの大きさ、すなわちTF₁が出力するトルクと釣り合う外部トルクの大きさを見積もり、そこから仕事 W を算出した。 W と37°Cでの $\Delta\mu^\circ$ の文献値を使って求めた $\Delta\mu$ を比較したところ、誤差の範囲で W と $\Delta\mu$ は一致した(図3右)。これにより37°CではTF₁が極めて高い効率でエネルギーを変換することがわかった。

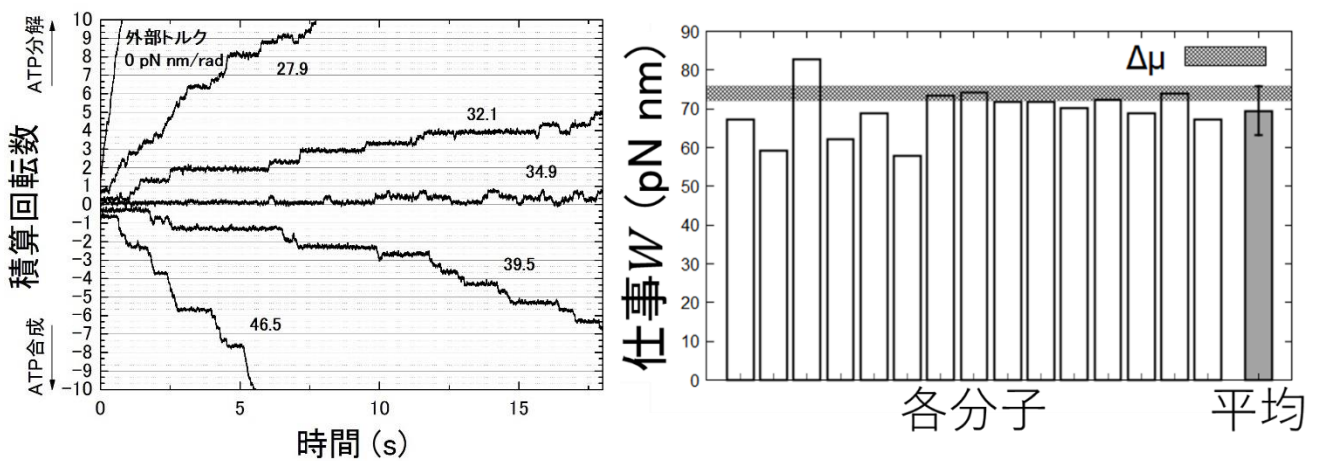


図3: (左) 外部トルクによる回転トラジェクトリの変化. ATP加水分解時の回転方向を正として積算回転数をプロットした. (右) 37°Cにおける W と $\Delta\mu$ の比較. $\Delta\mu$ の幅は文献値のばらつきを表している. 誤差棒はSD.

・65°Cでの一分子観察方法の確立

従来の一分子観察実験では、プローブがカバーガラス表面に吸着することを防ぐために BSA (ウシ血清アルブミン) が用いられていた (図2 左). しかし、同様の方法で一分子観察を行うと、65°Cではプローブがカバーガラス表面に引っ付いて動かなくなってしまう. TF₁ の熱安定性をバルクで測定したところ、TF₁ は 65°Cでもほとんど熱変性しない (図4) ため、65°Cでプローブが止まってしまう原因は BSA の熱変性にあると考えられる. そこで、変異を導入した TF₁ の β サブユニット (β E190Q) を BSA の代わりに用いることで、65°Cでの一分子観察実験を可能にした. また、65°Cではプローブが TF₁ から外れやすくなり、特に回転電場を印加するとプローブが短時間ではずれてしまうという難点があったが、以下で述べるように短時間で TF₁ の仕事 W が見積もれるよう実験を工夫することでその問題点を解決した.

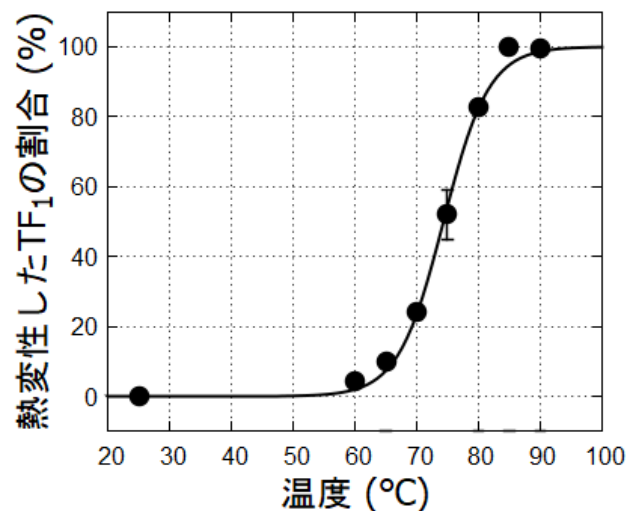


図4: TF₁ の熱安定性. 65°Cでも全体の10%程度しか熱変性していないことがわかる. 誤差棒はSD.

・65°Cでの力学的仕事 W の測定

TF₁ の ATP 加水分解時における回転方向と逆向きに外部トルクをかけ、その時の TF₁ の回転を観察した. 37°Cでの実験時とは異なり、連続的に外部トルクを変化させながら実験を行うことによって、より短時間で TF₁ の回転を停止させるためのトルクの大きさを見積もり、仕事 W を算出した.

4つの溶液条件で測定された W を $k_B T \ln[ATP]/[ADP][Pi]$ を横軸にとってプロットすると、ほぼ横ばいのふるまいを示しており、傾き1の直線に従っているとは言えない (図5 左). これは、65°Cにおける TF₁ のエネルギー変換効率は 100%を下回っていることを示している. さらに高温では外部トルクをかけていない場合でも TF₁ の

バックステップ等が見られることから、高温でのエネルギー変換効率低下の原因は回転軸である γ サブユニットがスリップしやすくなることにあると考えられる (図5右)。

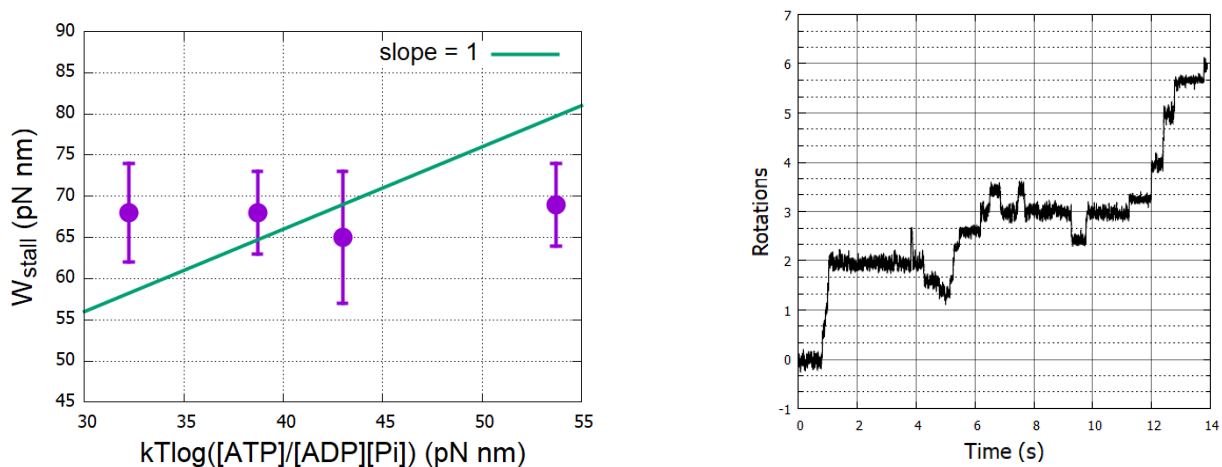


図6: (左) W の基質濃度依存性. 参考のために傾き1の直線を適当に引いた. 温度 T は65°Cに固定. 誤差棒はSE. (右) 外部トルクがない状態で観察されたTF₁のバックステップ. 61°C, [ATP] = 100 μ M, [ADP] = 10 μ M, [Pi] = 100 μ Mで実験した.

まとめ

本研究では、まず実測された $\Delta\mu^\circ$ と比較可能な条件でTF₁が出力する仕事 W を測定することでエネルギー変換効率をこれまでで最も正確に測定し、37°CでTF₁が極めて高い効率で動作することを確認した. 次に、好熱菌の至適生育温度である65°Cでの一分子回転電場実験手法の確立に成功し、65°CでTF₁の力学的な仕事を複数の基質濃度条件で測定した. その結果、好熱菌至適生育温度ではTF₁のエネルギー変換率が100%を下回っていることが明らかになった.

参考文献

- [1] S. Toyabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17951 (2011).
- [2] J. Rosing and E. C. Slater, *Biochem. Biophys. Acta.* **267**, 275 (1972).
- [3] R. W. Guynn and R. L. Veech, *J. Biol. Chem.* **248**, 6966 (1973).