

アミノ酸レベルの構造が生体分子モーター：F<sub>1</sub>-ATPase のエネルギー論に与える影響  
Effect of single amino acid substitution on energetics of molecular motor : F<sub>1</sub>-ATPase

物理学専攻 田中 真奈

### 1. 要約

本研究では、一分子モーターたんぱく質であるF<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>) の回転機構を明らかにすることを目的としている。F<sub>1</sub>は、化学反応によって得られた化学自由エネルギーをほぼ100%、力学的な仕事へ変換できることが分かっているが、その詳細なメカニズムはまだ解明されていない。そこで、私たちはF<sub>1</sub>とその変異体F<sub>1</sub> (βE190D) に外部トルクをかけて一分子回転観察実験を行った。その結果、βE190D 変異体は野生型F<sub>1</sub>とは違った挙動が確認できた。さらに、その原因が変異体βE190Dのモーターの固定子部分の構造が変異によって緩くなっていることにあるということを示唆する結果が得られた。

### 2. 導入

#### 《ATP と FoF<sub>1</sub>-ATP 合成酵素》

私たちはご飯を食べて生きているが、食事から得られた糖などの栄養分はさらに分解され、生体内で取り出しやすいエネルギー源としてATPという分子に変換され、蓄えられている。ATPはADPと無機リン酸に分解されると共に化学自由エネルギーを生じる(ATP → ADP + Pi)。このATPの分解で発生するエネルギーでさまざまな細胞内の活動(運動やイオンの輸送、生合成など)が行われており、このしくみはあらゆる生物の中で共通するものである。

ATPは生命活動を営む上で必要不可欠なものであるが、このATPの合成のほとんどを賄っているのは、ATP合成酵素(FoF<sub>1</sub>)である。ATP合成酵素は膜に構造の一部(Fo部分)が貫通する形で存在しており、膜の内外的プロトンによって作られる電気化学ポテンシャル差によってF<sub>1</sub>部分でATPが合成される。

#### 《F<sub>1</sub>は世界最小分子モーター》

ATP合成酵素のFo部分とF<sub>1</sub>部分は、簡単に分けることができる。触媒部位を持つF<sub>1</sub>のみでは合成とは逆の反応であるATP加水分解反応が起こり、γが一方方向に回転するようになる。このことがF<sub>1</sub>-ATPaseと呼ばれ、世界最小分子モーターと呼ばれる所以である。さらに、α、βサブユニットの3回対称性である構造を反映して、1つのATPでγサブユニットが120°回転することが分かっている[1]。

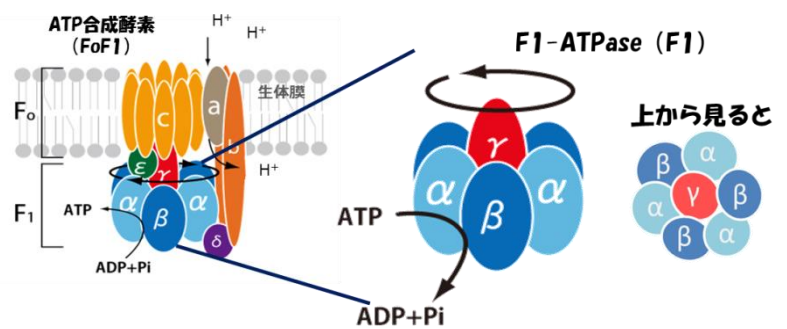


図1 ATP合成酵素とF<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>)

#### 《F<sub>1</sub>のエネルギー変換効率》

F<sub>1</sub>の回転の駆動力はATPの加水分解にて得られる化学自由エネルギーであるが、それはどのくらい力学的な仕事に変換されているのだろうか?この課題に対し、鳥谷部らはF<sub>1</sub>が1つのATPで得られる自由エネルギーに対してF<sub>1</sub>の出しうる最大仕事を、保存的な外力をかけることで調べた。回転電場法という方法を用い、F<sub>1</sub>(に付けたビーズ)の回転に逆方向の大きさ一定の外部トルクをかけ、F<sub>1</sub>の回転速度の変化を測定し、どのくらい大きさの外力があれば逆回転するのかを見積もる[2]。

平均回転速度が0となる点では、 $F_1$ の回転はほとんど止まっている（ストール）状態であり、外部トルクと釣り合っていると言える。これを、 $F_1$ が外力に対して出力できる最大トルク（ストールトルク）と定義し、これに  $120^\circ$  をかけることで最大仕事を計算した[3]。この最大仕事とATP1分子を加水分解したときに得られる自由エネルギー $\Delta\mu_{ATP}$ を比較すると、さまざまな $\Delta\mu$ 条件下において2つの値はほぼ一致することがわかった。これは、 $F_1$ の熱力学的なエネルギー変換効率が100%であることを示している。

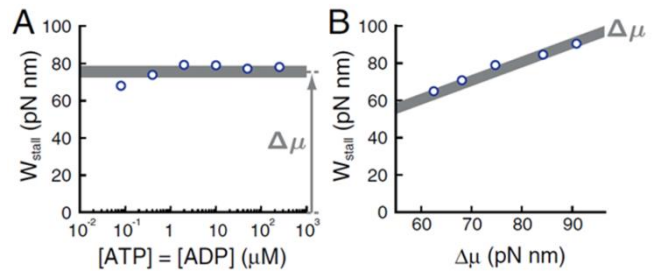


図2 鳥谷部による実験結果：野生型 $F_1$ のエネルギー変換効率

Toyabe S., et al., PNAS (2011)より改変

## 2. 目的

要約でも述べた通り、高効率エネルギー変換を実現する $F_1$ -ATPase ( $F_1$ )の回転機構を明らかにすることを目的としている。具体的には、触媒活性の低い $F_1$ として変異体 $\beta E190D$ を用い、「変異体 $\beta E190D$ のエネルギー変換効率を調べる」さらに、「野生型 $F_1$ の結果と比較し、その違いが何に由来するものなのかを調べる」ことを課題として研究を行った。

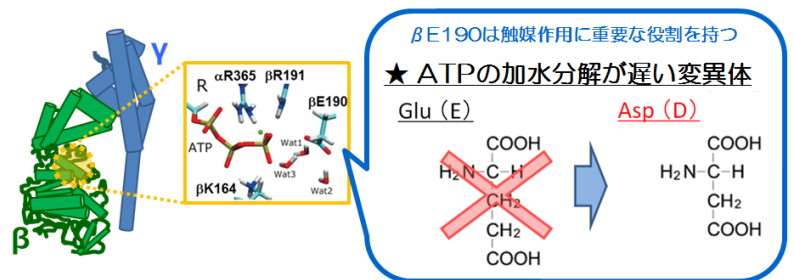


図3  $\beta E190D$ 変異体の変位部分詳細

## 3. 実験方法

〈 $F_1$ の一分子回転観察〉

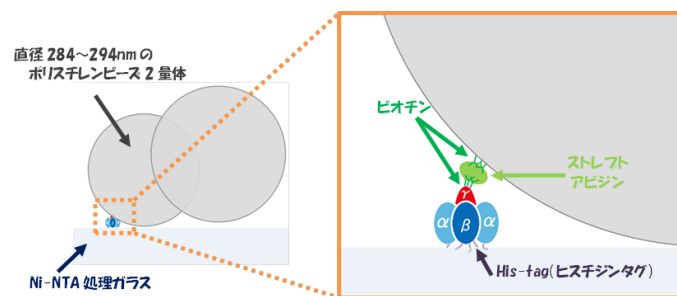


図4 一分子回転観察の実験系の模式図

$F_1$ の $\alpha_3\beta_3$ にヒスチジンタグを導入し、Ni-NTAで化学装飾したガラス表面上に結合させる。これにより、固定子部分である $\alpha_3\beta_3$ を外力に対してしっかりと固定ができる。回転子である $\gamma$ にはシステインを導入し、ビオチン-アビジン結合で回転の目印(プローブ)である、直径287~294nmのポリスチレンビーズ2量体を結合させる。このビーズの動きを $\gamma$ の動きとして解析する。

〈回転電場法〉

$F_1$ に一定の外部トルクをかける手段として、回転電場法を用いた。その原理は、次に示す通りである。4つの電極が蒸着されたスライドガラスを使い、4つの電極に $90^\circ$ ずつ位相が異なる交流電圧をかけると、その中心に回転する電場ができる。この回転する電場内に誘電体(ビーズ)を置くと双極子モーメントが誘起される。しかし、電場は常に回転しており、電場と双極子モーメントにずれが生じるため偶力が発生し、トルクがかかるという仕組みである。

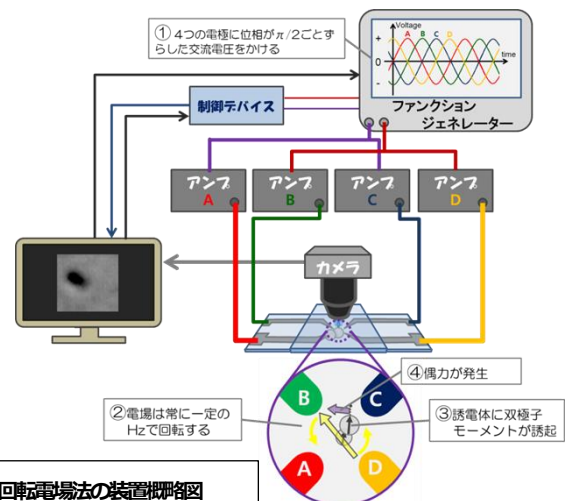


図5 回転電場法の装置概略図

#### 4. 結果

##### 《野生型 F1 の最大仕事と化学自由エネルギーの比較》

まずは、研究背景でも述べた、鳥谷部らの結果について追実験を行った。すなわち、野生型の F<sub>1</sub> に外部からのトルクをかけてストールトルクを見積もり、最大仕事を算出し、F<sub>1</sub> のエネルギー変換効率がほぼ 100%になるのかどうかを確かめた。

グラフより、「ATP1つで 120° 毎の最大仕事」が「1つの ATP 加水分解で得られる化学自由エネルギー」と等しくなっていることが分かる。また、溶液条件に寄らずほぼ 100% のエネルギー変換効率を発揮できていることが確認できた。

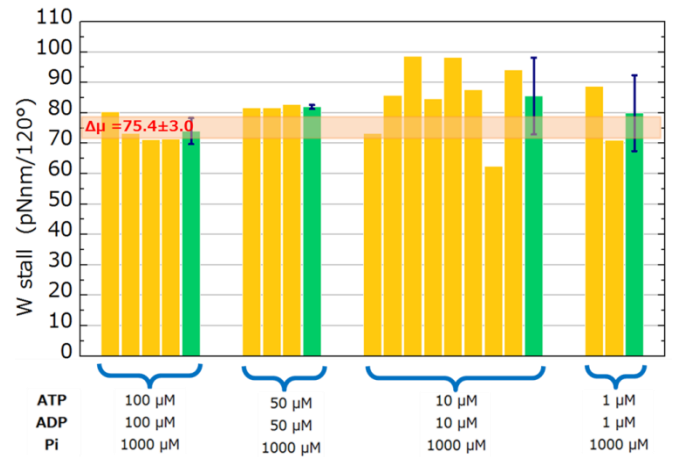


図6 野生型 F<sub>1</sub> のエネルギー変換効率

縦軸；ストールトルクから計算した 120° 回転による最大仕事 (pNm/120°)  
 横軸；条件ごとにブロックを分けておりそれぞれの溶液条件は下部に記載の通り。  
 黄色は分子の違いを示し、緑は各溶液条件での平均の最大仕事  
 (エラーバーはSD 標準誤差) を示す。ピンクのバーは溶液条件から式(1.2)より見積もった、ATP1つで得られる化学自由エネルギー。標準自由エネルギー  $\Delta\mu_0$  が文献によって値が異なるので帯で幅を持たせている。

##### 《変異体 F1 (βE190D) の最大仕事と化学自由エネルギーの比較》

野生型と同様に F1-βE190D が発揮できる最大仕事と化学自由エネルギーを比較した。

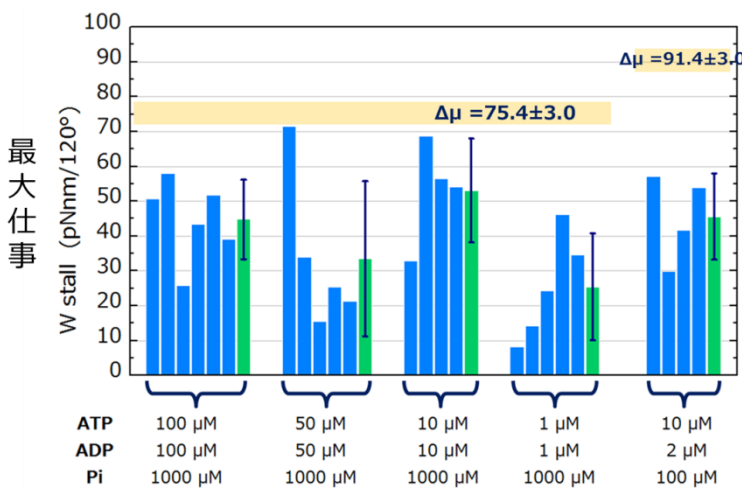


図7 変異体 F1 (βE190D) のエネルギー変換効率

縦軸；ストールトルクから計算した 120° 回転による最大仕事 (pNm/120°)  
 横軸；条件ごとにブロックを分けておりそれぞれの溶液条件は下部に記載の通り。  
 青は分子の違いを示し、緑は各溶液条件での平均の最大仕事  
 (エラーバーはSD 標準誤差) を示す。黄色のバーは溶液条件から式(1.2)より見積もった、ATP1つで得られる化学自由エネルギー。標準自由エネルギー  $\Delta\mu_0$  が文献によって値が異なるので帯で幅を持たせている。

どの溶液条件においても最大仕事は  $\Delta\mu$  に届いておらず、分子ごとにばらつきが大きいことが分かる。野生型 F1 と比較すると、エネルギー変換効率が低いことがわかる。

ATPにより得られる化学自由エネルギーとは、逆を言えば、ATP を合成するのに必要なエネルギーである。それよりも最大仕事が高いということは、最大仕事で回転しても ATP を合成できないということである。つまり、化学反応と  $\gamma$  の回転のカップリングが弱いと言える。

また、βE190D の最大仕事の値が溶液条件に寄らずばらつきが大きいということについて、私たちは固定子部分の構造が変異によって緩く保持されているのではないかと考えた。

そこで、次に固定子部分  $\alpha 3 \beta 3$  の構造の安定性を確かめる実験を行った。



## 《 $\alpha_3\beta_3$ 複合体を形成するか確認する》

固定子部分の構造の安定性を確かめるために、野生型 F<sub>1</sub> と変異体 F<sub>1</sub> ( $\beta$ E190D) で固定子部分のみを発現するように遺伝子操作をし、培養・精製を行い、 $\alpha_3\beta_3$  のみで複合体を形成するか実験した。

右図8はゲル濾過クロマトグラフィーという分子の大きさを精製・分離を行ったときの結果である。分子が大きいものほど最初に溶出される。

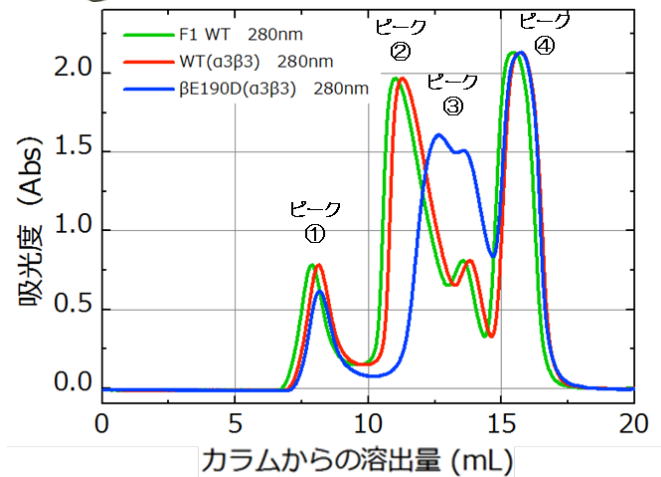


図8 F<sub>1</sub> と $\alpha_3\beta_3$ を精製：ゲル濾過クロマトグラフィーの結果

縦軸；波長 280nm の吸光度 (Abs) 横軸；溶出量 (mL)

緑・野生型 F<sub>1</sub> ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ )

赤・野生型 F<sub>1</sub> の $\alpha_3\beta_3$

青・変異体 F<sub>1</sub> ( $\beta$ E190D) の $\alpha_3\beta_3$

①のピークは void volume という、たんぱく質やゴミなどが癒着して塊となったものである。

②のピークは F<sub>1</sub> が溶出されるピークである。

この付近に野生型の $\alpha_3\beta_3$ のピークが来ていることから、野生型の $\alpha_3\beta_3$ は複合体を組んでいる。

また、 $\beta$ E190D の $\alpha_3\beta_3$ はこの部分がほとんど 0 であることから、複合体を形成していないと言える。

④のピークは $\alpha_3\beta_3$ が崩れてばらばらになった $\alpha$ と $\beta$ であり、3つのどのピークも一致している。

## 5. 考察 及び まとめ

F<sub>1</sub> の固定子部分のみを遺伝子操作で作成し精製した結果、野生型の $\alpha_3\beta_3$ は複合体を組み、 $\beta$ E190D の $\alpha_3\beta_3$ は複合体を形成しなかった。つまり、 $\beta$ E190D の変異によって $\alpha_3\beta_3$ の構造が不安定になっているのだと考えられる。一分子回転観察での $\beta$ E190D ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ ) は $\gamma$ サブユニットがあることで F<sub>1</sub> ( $\beta$ E190D) では構造の安定が取れている。しかし、外部から強いトルクがかかると不安定な $\beta$ E190D の固定子部分 ( $\alpha_3\beta_3$ ) は外力に耐え切れず、構造が不安定になる。よって、最大仕事を見積もった実験において「野生型 F<sub>1</sub> に比べてエネルギー変換効率が低くなり、分子によって値にばらつきが大きく出ている」という結果になったと推測できる。

また、 $\beta$ E190D は加水分解反応に影響のある残基であったが、今回の結果から構造の安定化にも影響を及ぼすということが考えられる。

触媒反応に重要な役割を持つ $\beta$ E190 残基は、 $\alpha_3\beta_3$  の構造の安定化にも寄与している。そして、この残基が分子モーターの固定子部分の構造を安定に保つことで、F<sub>1</sub> の高効率エネルギー変換効率に貢献している。F<sub>1</sub> の性質の要となる残基の 1 つだと言える。

## 参考文献

[1] Yasuda R, et al. (2001) *Nature* **410**, 898-904

[2] Watanabe-Nakayama T., et al. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 951-957.

[3] Toyabe S, et al. (2011) *PNAS*. **108**, 17951-17956