トピックス
新進鋭
シリーズ

第50回 日本生物物理学会年会 若手招待講演

 F_0F_1 -ATP合成酵素のプロトン駆動力による
回転運動の直接観察

渡邊力也 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

1. はじめに

F_0F_1 -ATP 合成酵素 (F_0F_1) は、細胞膜の両側に形成される“プロトン駆動力”を利用して生理的に重要な ATP を合成する、タンパク質でできたエネルギー変換素子である¹⁾。 F_0F_1 は、その生理的な重要性だけでなく、電気・化学間のエネルギー変換の過程で、分子内の回転運動を伴うモータータンパク質であることから、長年、多くの研究者に注目されている。 F_0F_1 は 2 つの回転分子モーターから構成される。1 つは膜内在性の F_0 で、プロトンの輸送と共役して回転することが予想されており、もう 1 つは水溶性の F_1 で、ATP の加水分解 / 合成と共役して回転を行う。ここ 10 数年に渡り、 F_0F_1 のエネルギー変換機構における回転運動の役割を理解するため、筆者を含む日本のグループは、回転運動の 1 分子計測を行ってきた。取扱いのしやすさから 1 分子計測の中心は、 F_1 部分単独での回転運動に関するものであり、その作動原理は非常に理解が進んでいる^{2), 3)}。しかし、膜内在性の F_0 ならびに F_0F_1 複合体がプロトン駆動力によって回転する様子は、最先端の 1 分子計測法をもってしても観察できていない。すなわち、それらの作動原理の大部分は未解明であり、プロトン駆動力による回転運動の 1 分子計測の実現が、この研究分野の最大の課題であった。

2. プロトン駆動力の制御

プロトン駆動力による膜タンパク質の“動き”を観察するうえでの最大の技術障壁は、顕微鏡下でプロトン駆動力を安定的に発生できないことにある。従来、プロトン駆動力を発生する時は、酸性もしくはアルカリ性に大きく偏った緩衝液の溶液交換によって、脂質 2 重膜の両側にプロトン濃度差を形成していた⁴⁾。この手法では、溶液交換による流体力学的な作用によって膜が損傷を受けるだけでなく、元来存在する膜の欠陥箇所からプロトンが流入し、緩衝液の交換後、数秒

程度でプロトン駆動力が消滅してしまう。よって、プロトン駆動力を安定的に発生させることは非常に困難であった。そこで、筆者は F_0F_1 の回転運動を観察するため、顕微鏡下に脂質 2 重膜を展開し、膜を介したプロトン濃度差をその両側に安定的に形成する実験系を新規開発した⁵⁾。本実験系では、プロトン駆動力の安定的な形成のため、2 つの工夫を施した (図 1a)。

(i) K^+ チャンネル (KcsA) の膜への再構成(ii) Caged H^+ を利用したプロトンの供給

(i) に関しては、KcsA を F_0F_1 と共に膜へ再構成すると、膜の電気抵抗が増加することが明らかにされ、すなわち、KcsA の再構成によって膜の欠陥箇所は減少し、プロトン濃度差を安定的に形成することができた。また、(ii) に関しては、UV 光の照射によって Caged H^+ は分解しプロトンを放出する性質を持つため⁶⁾、溶液交換をせずとも光の ON-OFF でプロトン濃度差を瞬時に形成することが可能になった (図 1b)。

3. F_0F_1 のプロトン駆動回転

F_0F_1 のプロトン駆動回転の 1 分子計測のため、金ナノ粒子を回転プローブとした回転運動の高速度計測系⁷⁾

図 1 プロトン駆動回転の 1 分子計測系。(a) 計測システムの図、(b) pH 感受性蛍光色素 (pHrodo) を利用した膜の下側の pH 変化計測。酸性条件下で蛍光強度が増大する。

Direct Observation of Proton-driven Rotation of F_0F_1 -ATP Synthase
Rikiya WATANABE
Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo

※図 1, 図 2 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

と上述のプロトン駆動力の制御系を組み合わせた実験系を構築した (図 1a)⁵⁾. この実験系を利用して F₀F₁ の 1 分子観察を行ったところ, プロトン駆動力によって時計方向に数 10 回転する様子が確認され, それらは ATP 駆動回転とは逆方向の回転であった (図 2a). 次に, プロトン駆動力の大きさと回転速度の関係を調べた. ほぼ同じ大きさのプロトン駆動力を与えたにも関わらず, 回転速度には大きなばらつきが確認されたが, 最大の回転速度を示すものに関しては, プロトン駆動力の増加に伴い回転速度が加速することが示された (図 2b). ここで, 筆者が観察した F₀F₁ の回転運動と ATP の合成反応の共役関係について考察する. 先行研究によって, F₁ 部分を時計方向に強制回転させると 1 回転の間に 3 つの ATP を合成する可能性が示唆されている⁸⁾. つまり, 本研究で確認された回転運動が ATP の合成反応と強く共役しているのであれば, 回転速度を 3 倍したものが ATP 合成速度に相当する. ここで, 回転運動と ATP の合成反応が強く共役していると仮定し, 最大回転速度から F₀F₁ の ATP 合成速度の見積ったところ, 多分子計測で得られた ATP 合成速度の実測値⁴⁾ とほぼ一致することが判明した. よって, 本研究で観察された F₀F₁ の回転運動は, ATP の合成反応と強く共役していたと言える.

4. | ステップ回転

F₀F₁ の回転運動を詳細に解析すると, 120° 間隔の停止を伴いながら時計方向・反時計方向に確率的に回転しており, プロトン駆動力を与えると時計方向への 1 方向性が確認できる (図 2a, 挿入図). F₀F₁ は ATP の合成反応およびプロトンの輸送と回転運動が強く共役しているため, 回転運動の停止は合成反応およびプロトン輸送における中間体を意味する. F₁ には ATP 合

成のための触媒部位が 1 分子あたり 3 個存在し⁹⁾, F₀ にはプロトンの輸送部位が 10 個存在する¹⁰⁾. すなわち, 本研究で観察された 120° 間隔の停止を伴った回転は, F₀ の 10 回対称性ではなく F₁ の 3 回対称性を反映しているため, 回転運動の律速過程は ATP の合成反応であると言える. 次に停止時間の解析を行った. プロトン駆動力がない場合, 時計方向および反時計方向の回転直前の停止時間はほぼ同じであった. 一方, プロトン駆動力を与えると, 時計方向の回転前の停止時間は短くなり, 反時計方向の回転前の停止時間は長くなった. これは, プロトン駆動力を与えることで, 時計方向に存在するエネルギー障壁の高さが反時計方向に比べ低くなり非対称になったことを意味する. すなわち, このエネルギー障壁の非対称性が, 回転運動の 1 方向性 (時計方向の回転) に寄与していると考えられる.

5. | おわりに

筆者は, プロトン駆動力による F₀F₁ の回転運動の直接観察に成功した. 本研究で開発した技術は, 今後 F₀F₁ だけでなく, 他のイオン駆動力を利用した膜タンパク質などにも広く応用されていくことが期待される.

謝 辞

本稿で紹介した研究は, 東京大学の野地博行教授, 田端和仁博士, 飯野亮太博士, 福井大学の老木成稔教授, 岩本真幸博士, 中央大学の上野博史博士との共同研究です. 深く感謝いたします.

文 献

- 1) Junge, W. *et al.* (2009) *Nature* **459**, 364-370.
- 2) Noji, H. *et al.* (1997) *Nature* **386**, 299-302.
- 3) Watanabe, R. *et al.* (2010) *Nat. Chem. Biol.* **6**, 814-820.
- 4) Iino, R. *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 17457-17464.
- 5) Watanabe, R. *et al.* (2013) *Nat. Commun.* **4**, 1631.
- 6) Barth, A. *et al.* (2002) *Biophys. J.* **83**, 2864-2871.
- 7) Ueno, H. *et al.* (2010) *Biophys. J.* **98**, 2014-2023.
- 8) Rondelez, Y. *et al.* (2005) *Nature* **433**, 773-777.
- 9) Abrahams, J.P. *et al.* (1994) *Nature* **370**, 621-628.
- 10) Jiang, W. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4966-4971.

図 2 F₀F₁ のプロトン駆動回転. (a) 回転運動の経時変化, (b) 時計方向の回転速度とプロトン濃度差.

渡邊力也 (わたなべ りきや)
 東京大学大学院工学系研究科助教
 2009 年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了,
 博士 (工学)
 研究内容: 世界最小モーターの開発
 連絡先: 〒 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1
 工学部 1 号館 501 号室
 E-mail: wrikiya@nojilab.t.u-tokyo.ac.jp