

A03 F1-ATPase によるエネルギー変換と非平衡揺らぎ

中央大学理工学部物理学科 宗行英朗

F1-ATPase は FoF1-ATP 合成酵素の触媒部分で、ATP の加水分解・合成と、分子内部の γ サブユニットの回転を可逆的に共役させる分子モーターである (図 1)。

本研究期間中に最初に現 東北大学准教授の鳥谷部祥一氏との共同研究で、回転電場法を用いて合成方向の外部トルクを加える実験を行った。その結果、外部から回転プローブに加えた仕事からプローブから熱として散逸したエネルギーを差し引くと、残りが ATP 合成に必要な自由エネルギーに一致することがわかり、合成方向の回転においても自由エネルギーの変換効率がほぼ 100% であることがわかった(1)。

一方、ATPase 活性の落ちた変異体で回転の性質がどのように変化するかを検討すれば、化学反応と力学的な回転の共役に関する知見が得られることを期待して、 β E190D 変異体の回転について調べた。この変異体は加水分解反応に重要な、水からのプロトンの引き抜きに必須の役割を果たす β サブユニットの 190 番目のグルタミン酸(E)がアスパラギン酸(D)に置換されたもので、触媒活性が 1/100 に低下している。そのため ATP の加水分解待ちの 80° での回転の停止状態がビデオレートでも観察できる、F1-ATPase の変異体の中では最もよく調べられているものの一つである。しかしこの変異体に外部トルクをかけると実験ごとに大きくばらついた結果が得られ、ストールトルクも ATP の加水分解の自由エネルギー差から期待されるものより低くなっていた。この結果から β E190D 変異はモーターの機械的な安定性を低下させたものと考えられた。実際にこの変異体では熱安定性の低下が認められ、ゲル濾過を行ったところ、 γ サブユニットのない $\alpha_3\beta_3$ 複合体はこの変異によって不安定になることがわかった。現在、これらの結果は投稿準備中である。

以前、我々は、F1-ATPase の化学反応と力学反応の共役を、回転角度を横軸にとったポテンシャルが化学状態によってスイッチするという描像でとらえ、回転のトラジェクトリからそのポテンシャルを推定するという方法で解析した(2)。しかしこの方法では化学状態によるスイッチングを不可逆的に扱うためエネルギー論として不完全なところがあった。そこで新たに化学状態のスイッチングに可逆性を持たせ、計算アルゴリズムに expectation-maximization algorithm を用いたものを開発した。この方法では、シミュレーションで作ったトラジェクトリからのポテンシャル推定はうまくいっており、実際の実験データについても実験データのノイズなどによって収束性にやや問題を生じる場合があるものの、ほぼ良好な結果が得られている。これについても現在、投稿準備中である。

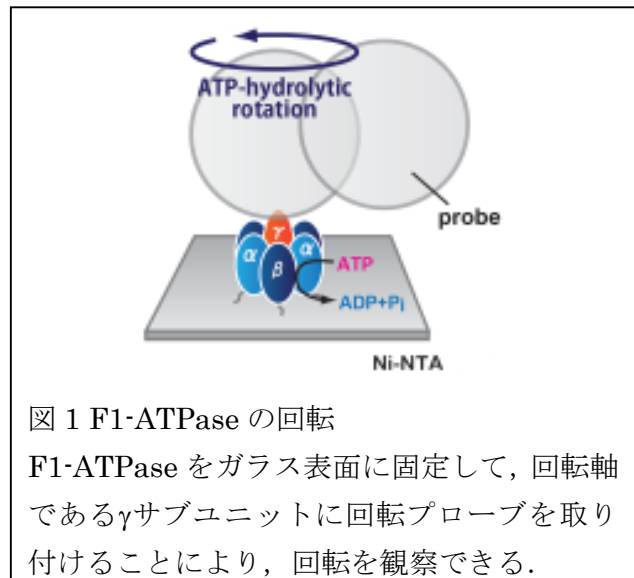


図 1 F1-ATPase の回転

F1-ATPase をガラス表面に固定して、回転軸である γ サブユニットに回転プローブを取り付けることにより、回転を観察できる。

一方、ポテンシャル推定に対する別のアプローチとして、川口、佐々、沙川による論文(3)の中で述べられている、有効ポテンシャルが見える条件での角度の時系列データに対し、詳細釣り合いを適用する方法も試みた。平成 28 年度の成果報告ではこの方法が良好な結果を与えると報告したが、その後、系統誤差が含まれることがわかり、それを補正した結果 120° の回転の間に低下するポテンシャルの大きさが ATP 一分子の加水分解の $\Delta\mu$ の大きさよりも小さくなるという結果になっている。そこで、力の積分で同様のポテンシャルを求めたが、これも詳細釣り合いによる計算結果と同じように ATP 一分子の加水分解の $\Delta\mu$ の大きさよりも小さくなった。これらの結果は計算の基礎となる Einstein 関係式の温度の見積りに起因する可能性があり、現在も検討を続けている。

そのほかに、研究期間内には FoF1 モーターと類似性のある *Enterococcus hirae* 由来の回転分子モーターである Eh VoV1 の回転観察を行い(4)、さらに、千葉大の村田博士と協力して、その V1 部分について ATP 結合に伴う構造変化を蛍光変化で追跡し、結晶構造に見られる構造変化と対応づけた(5)。

さらに分子動力学計算に用いる ATP の力場の改良を理化学研究所の杉田博士との共同研究で行った。従来の力場では様々な結晶構造中に見られる ATP のコンフォメーションを再現できなかった点が大きく改良され、今後のさらに詳細な理解に役立つものと期待している(6)。

また、実験技術面では温度変化などによる顕微鏡のピントの変動を抑えて長時間の観察を可能にするために、九州大学の水野先生のマイクロレオロジー観察に用いられている装置を見学させていただき、基準になる画像を決めること無く、ピントを維持する装置を作ることができた。水野先生にはこの場をお借りしてお礼申し上げたい。

そのほかに、分子モーターではないが、生体エネルギー変換系として、光駆動プロトンポンプであるプロテオロドプシンについての研究を松山大学の田母神氏とを行い、pH によってプロトンの取り込みと吐き出しの順番が変わること、さらに輸送方向も逆転することを示す非常に興味深い結果が得られた(7)。

参考文献：

- (1) S. Toyabe, E. Muneyuki, *New Journal of Physics* **17**, 015008 (2015).
- (2) S. Toyabe, H. Ueno, and E. Muneyuki, *EPL* **97**, 40004 (2012).
- (3) K. Kawaguchi, S-i. Sasa, and T. Sagawa, *Biophys. J.* **106**, 2450-2457 (2014).
- (4) H. Ueno, Y. Minagawa, M. Hara, S. Rahman, I. Yamato, E. Muneyuki, H. Noji, T. Murata, R. Iino, *J. Biol. Chem.* **289**, 31212-23 (2014).
- (5) K. Suzuki, K. Mizutani, S. Maruyama, K. Shimono, FL Imai, E. Muneyuki, Y. Kakinuma, Y. Ishizuka-Katsura, M. Shirouzu, S. Yokoyama, I. Yamato, T. Murata, *Nat Commun.* **7**, 13235 (2016).
- (6) Y. Komuro, S. Re, C. Kobayashi, E. Muneyuki, and Y. Sugita, *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4133-4142 (2014).
- (7) J. Tamogami, K. Sato, S. Kurokawa, T. Yamada, T. Nara, M. Demura, S. Miyauchi, T. Kikukawa, E. Muneyuki, and N. Kamo, *Biochemistry*, **55**, 1036-1048 (2016).