

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 生体膜で働くプロトン駆動のナノマシン

### 2. 研究者氏名 野地 博行

### 3. 研究の狙い：

生体分子モーターは、1 分子で機能し、化学エネルギーを力学的な仕事に変換する天然のナノマシンである。本研究では、それぞれ回転分子モーターである F1 モーターと F<sub>0</sub> モーターからなる ATP 合成酵素に注目し、そのメカニズム解明を目指した。この分子モーターの最大の特徴は、生体膜に埋りプロトン流で駆動するモーターであること (F<sub>0</sub> モーター)、化学反応と回転運動が可逆的に共役していること (F1 モーター) の 2 点である。そこで、本研究では、ATP 合成酵素が生体膜に埋まってプロトン駆動で回転する実験系を構築する、F1 モーターの化学反応を制御するために 1 分子操作の実験系を構築する、の 2 テーマを中心に展開した。

### 4. 研究結果：

#### 生体膜中における ATP 合成酵素のプロトン駆動回転の 1 分子可視化

本研究項目では、まず ATP 合成酵素の変異体を約 30 種類作成し、界面活性剤中における ATP 駆動回転を指標に 1 分子観察に適したものを選び出した。次に、特殊な条件で培養した大腸菌内部に形成する直径 3 ~ 15 μm 液胞様膜構造 (Provacuole) の利用を試みた。Provacuole 上における ATP 合成酵素の機能的発現には成功したが、その表面が DNA とタンパク質からなる複合体で覆われているために、1 分子観察用のプローブの接続や基板固定ができなかった。その他、再構成リポソームをビーズ表面で作成する方法や、生体膜をマイクロ電極表面に貼り付ける方法を検討した。しかし、いずれも決定的な欠陥があった。そこで、最終年度から、顕微鏡ステージ上における人工の脂質平面膜を利用した 1 分子観察システムの開発に取り組んだ。これは、明らかに困難ではあるが、成功すれば最も信頼性の高い実験システムである。その結果、まだ最終目標には達していないが、平面膜に ATP 合成酵素を含んだ膜小胞を再構成することに成功している。現在、ATP 合成酵素を基板に固定化し、回転可視化のプローブを接続する条件検討を行っている。

#### F1 モーターの 1 分子操作

本研究は、F1 モーターのように可逆的なモーターは、1 分子操作によってその触媒化学反応の制御が可能であるという考えに基づいて、磁石を用いた 1 分子操作システムの開発から開始した。その結果、顕微鏡の対物レンズ付近でトルクのみを発生する独自のシステム開発に成功した。また、これと平行して行った実験で、F1 モーターは持続回転する活性型と停止する不活性型の 2 状態をもつことを明らかにした。そこで、この不活性型 F1 モーターを磁気ピンセットを用いて操作したところ、回転方向に押すと再現性良く活性化する現象を発見し、この分子メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、F1 モーターの ADP に対する親和性が、回転子の角度と連動していることを明らかにした。また、これは、F1 モーターを逆回転させて ATP 合成する際に、溶液から ADP を結合するメカニズムを説明できる。また、磁気ピンセットを用いて F1 モーターの静止トルクの精密測定にも成功し、平均 45pNm 程度であることも明らかにした。さらに、これを角度に対して積分するこ

とで、分子内部のポテンシャル実測にも成功しつつある。現在、ATP 結合型・ADP 結合型のポテンシャル地形が求まっている。

#### 5. 自己評価：

生体膜中における ATP 合成酵素のプロトン駆動回転の 1 分子可視化

目標が未達成であることは極めて残念であるが、やれる範囲のことは一通り試した点で満足はしている。ただ、一見難しそうであるが最もストレートである人工平面膜の系に、初めからしっかりと取り組むべきであったかもしれない。また、国内外における各有力グループもこぞって本課題に取り組んでいるが、どのグループも成功していないことを考えると、1 分子可視化を実現するためには、実験系の確立が最大の課題といえる。

F1 モーターの 1 分子操作

F1 モーターの 1 分子操作はまず、磁気ピンセットの開発自体を成果として挙げたい。この独自の装置の開発により、タンパク質の新しい現象や測定が可能となった。たとえば、不活性化した F1 モーターを押して活性化する現象は、「機械的操作による酵素の活性化」として初めてのものである。さらに、そこから基質親和性 (ADP) と構造変化 (回転) の直接的な共役関係を明らかにしたことも大きな成果であると考えている。また、分子内ポテンシャル測定は、本質的であるにも関わらずこれまで手付かずのテーマであった。まだ未完ではあるが、磁気ピンセットを利用することによって、これに踏み込むことが出来ている。今後も精力的に推進していきたい。さらに付け加えるならば、私はプログラミングやエレクトロニクスに関して詳しくなかったが、本研究において磁気ピンセットの開発に成功したことは大きな成果といえる。さきがけ研究システムのおかげで、的確なアドバイスを受け、実験システム確立に関する能力が向上したことは、今後の研究に大いに役立つものといえる。

#### 6. 研究総括の見解：

独自に磁気ピンセットを開発し、F1 モーターの回転の観察、制御、ポテンシャル・トルクの解析を行い、F1 モーターの機構を解明し、「非対称なポテンシャル形状」を示した。これらの知見が、たんぱく質機能のメカニズム解明に展開されることを期待したい。

F<sub>0</sub> モーターにおいては、いろんな工夫を行い、1 分子観察システムの開発に取り組んでいる。競争が激しい分野であるが、他より早く 1 分子観察を実現できるよう期待したい。

#### 7. 主な論文等：

1. Noji H, Bald D, Yasuda R, Itoh H, Yoshida M, Kinosita K Jr., Purine but not pyrimidine nucleotides support rotation of F1-ATPase. (2001) J Biol Chem. 276, 25480-6.
2. Bald D, Noji H, Yoshida M, Hirono-Hara Y, Hisabori T., Redox regulation of the rotation of F(1)-ATP synthase. (2001) J Biol Chem. 276, 39505-7.
3. Hirono-Hara Y, Noji H, Nishiura M, Muneyuki E, Hara KY, Yasuda R, Kinosita K Jr, Yoshida M., Pause and rotation of F1-ATPase during catalysis. (2001) Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 13649-54.
4. Masaike T, Muneyuki E, Noji H, Kinosita K Jr, Yoshida M., F1-ATPase changes its conformations upon phosphate release. (2002) J Biol Chem. 277, 21643-9
5. Ariga T, Masaike T, Noji H, Yoshida M., Stepping rotation of F1-ATPase with 1, 2, or 3 altered catalytic sites that bind ATP only slowly. (2002) J Biol Chem. 277, 24870-4

6. Hiromi Imamura, Masahiro Nakano, Hiroyuki Noji, Eiro Muneyuki, Shoji Ohkuma, Masasuke Yoshida, and Ken Yokoyama., Evidence for rotation of V1-ATPase. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 2312-5
7. Ryohie Yasuda, Tomoko Masaike, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Kazuhiko Kinosita Jr., The ATP-waiting conformation of rotating F1-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 9314-8.
8. Noji H., F1-motor of ATP synthase Molecular Motors, Edited by Manfred Schliwa, Wiley-VCH, 141- 151
9. 野地博行, F1 モーターはどうやって ATP のエネルギーをトルクに変換するのか? (2002) 蛋白質・核酸・酵素, 47, 1174-11181