

## 回る酵素の観察

### Direct observation of the rotatory motion of $F_1$ -ATPase

昨年、筆者らはタンパク質1分子を見る技術によって、 $F_1$ -ATPaseが世界最小の回転モーターであることを証明した。今回は、同酵素の回転を1分子単位で観察する方法と、それによって初めて明らかとなった驚くべき性質について報告する。

CREST 野地博行

慶應義塾大学理工学部 安田涼平

慶應義塾大学理工学部 木下一彦

#### はじめに

タンパク質とタンパク質の間で生じる回転運動として知られている例は、まだ非常に少ない。それは、タンパク質の回転運動を証明するのが一筋縄ではいかないからである。回転を証明するためには「回転を直接見る」しかない。そして、活性を持ったタンパク質の動きを直接見るためには、いまのところ光学顕微鏡しか道具がない。しかし、たいていのタンパク質の動きは光学顕微鏡の分解能よりも小さく、さらに水溶液中での激しい回転ブラウン運動と真の回転運動を見分けるのは難しい。タンパク質の回転運動の代表例であるバクテリアのべん毛の回転運動でさえ、当時の研究者たちは証明するのに苦労したらしい。

結局、べん毛の回転運動は、べん毛を抗体でガラス基板に固定し、べん毛モーターの駆動力でバクテリア自体が回転運動するところを光学顕微鏡で観察することで証明された<sup>1)</sup>。その後しばらくして、ダイニンによって微小管が、ミオシンによってアクチン線維が、その軸の周りに回転運動することが証明された<sup>2)~4)</sup>。これらの回転運動は、1回転したらもとの状態に戻る回転ではなく、らせん状のレールを持つ微小管やアクチン線維を、そのレールに沿ってダイニンやミオシン

が動かす回転並進運動である。これらの証明も、やはり「直接見る」ことによってなされた。ここに挙げたすべての例で、回転を光学顕微鏡で見るための特別な目印をタンパク質に付け、回転ブラウン運動を抑えるために基盤上に固定化している。

筆者らが、 $F_1$ -ATPaseのサブユニットの回転運動を見たときにも、酵素をガラス表面に固定化し回転の目印を付けて、光学顕微鏡で観察した<sup>5)</sup>。 $F_1$ -ATPaseの回転運動の実証の後、回転を予言したP. D. Boyerと $F_1$ -ATPaseの結晶構造を解析したJ. Walkerの2人は、1997年にノーベル化学賞を受賞している。

#### 1. ATP合成酵素

$F_1$ -ATPaseは、それ自体で細胞内で機能を持つホロ酵素ではなく、生体膜に埋まっている $F_0$ 部分と結合して $F_0F_1$ -ATP合成酵素として機能している。 $F_1$ と $F_0$ それぞれのサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ,  $ab_2c_{9-12}$ である。この合成酵素は、バクテリアでは原形質膜、真核細胞ではミトコンドリアの内膜、植物ではチラコイド膜に存在する膜タンパク質である。そして、呼吸鎖や光化学系によって形成される膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャル差を利用して、プロトンの流れに共役したATP合成を行っている(図1)<sup>6)</sup>。

筆者紹介: のじ・ひろゆき(NOJI, Hiroyuki) 科学技術振興事業団戦略的基礎研究(CREST)生命活動のプログラムチーム13特別研究員 1997年東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了 理学博士 専門: 分子生物学, 生化学, 生物物理 連絡先: 〒216-0001 川崎市宮前区野川 帝京大学生物工学研究センター3F E-mail Noji@phys.keio.ac.jp(勤務先)  
やすだ・りょうへい(YASUDA, Ryohei) 慶應義塾大学理工学部(Faculty of Science and Technology, Keio University)理工学研究科博士課程在学中 1996年慶應義塾大学理工学部理工学研究科修士課程修了 修士(理学) 専門: 生物物理 連絡先: 〒223-0061 横浜市港北区日吉3-14-1(在学先) E-mail yasuda@phys.keio.ac.jp  
きのした・かずひこ(KINOSHITA, Kazuhiko) 慶應義塾大学理工学部(Faculty of Science and Technology, Keio University)物理学教授 1974年東京大学理学系大学院単位取得退学 専門: 生物物理 連絡先: 同上(勤務先)

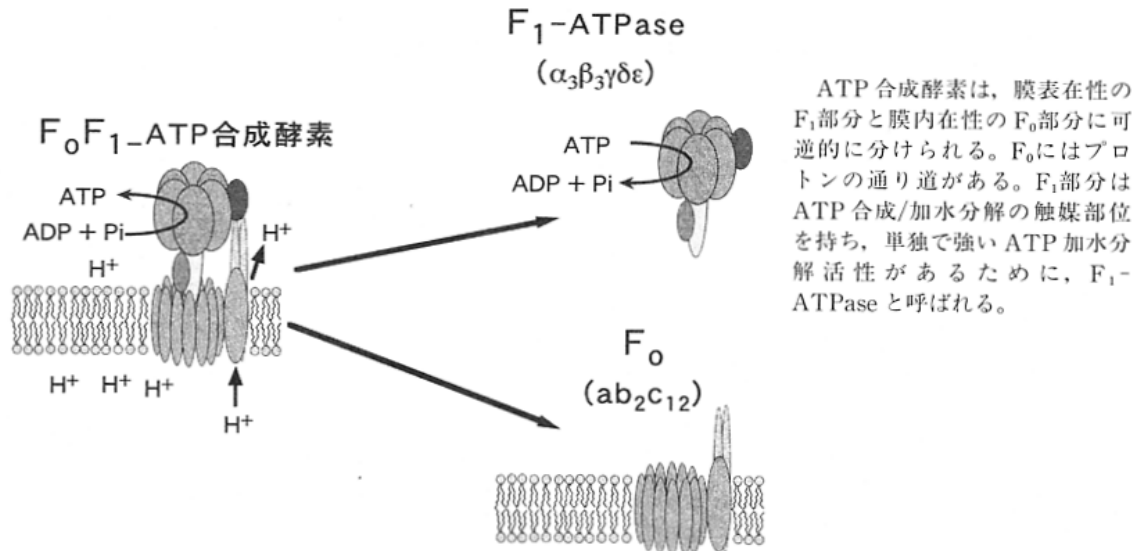


図1 ATP合成酵素のF<sub>0</sub>部分とF<sub>1</sub>-ATPase部分

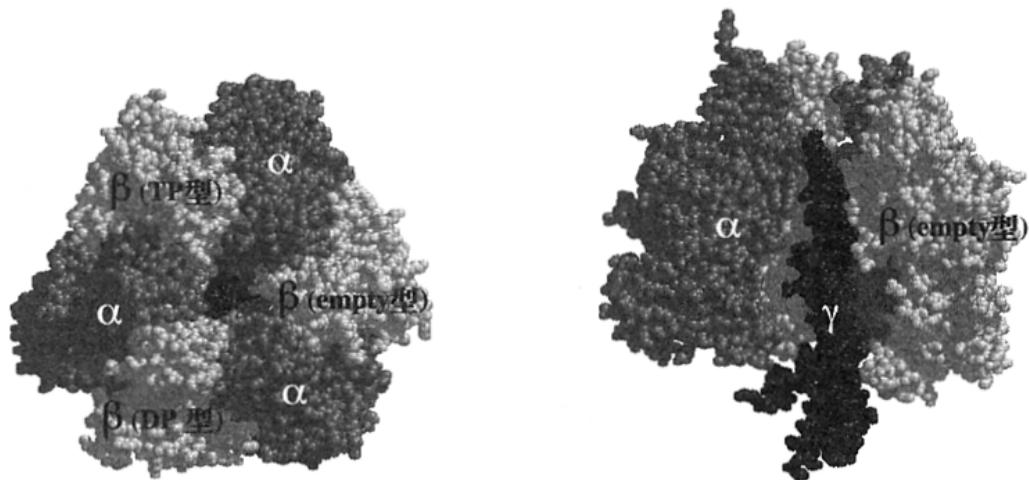


図2 ミトコンドリア由来 F<sub>1</sub>-ATPase の結晶構造

また、この酵素は逆反応である ATP の加水分解に伴ったプロトンの輸送も行うことができる。F<sub>0</sub>部分にはプロトンの通り道となっており、F<sub>1</sub>部分は ATP の合成/分解の触媒活性中心を持つ。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素を低イオン強度条件にさらすと、F<sub>1</sub>部分は F<sub>0</sub>からはずれてくる。そして、単独で強い ATP 加水分解活性を持つことから F<sub>1</sub>-ATPase と呼ばれている。この反応は F<sub>1</sub>部分での ATP 合成の逆反応であると考え

られている。同様の ATP 加水分解活性は、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体でも見られる<sup>7)</sup>。

電子顕微鏡による構造解析の結果によると<sup>8)</sup>、F<sub>0</sub>でのプロトンの輸送と、F<sub>1</sub>-ATPase での ATP 合成/加水分解反応は非常に離れて (4 nm 以上) 起こるために、その間を結ぶ  $\gamma$  サブユニットの構造変化が、二つの反応を共役させると予想されていた。

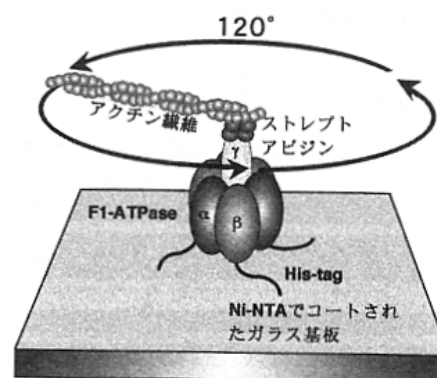
## 2. 回転仮説

Boyer らは、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の反応の速度論的解析などから、反応に伴って  $F_1$ -ATPase の分子中央にある  $\gamma$  サブユニットが回転するという回転仮説を提唱した<sup>9)</sup>。そして、 $\gamma$  サブユニットの回転運動が、 $F_1$ -ATPase の ATP 合成/加水分解と  $F_0$  のプロトンの移動を共役させると提唱した。発表当時は、この回転仮説はすぐには信じ難いものであったが、1994 年に Walker らが発表した  $F_1$ -ATPase の結晶構造は、まさに回転モーターにふさわしい構造であった<sup>10)</sup>(図 2)。

$F_1$ -ATPase の結晶構造中で、ATP 合成/分解の触媒部位を持つ三つの  $\beta$  サブユニットは、三つの  $\alpha$  サブユニットと交互に並んで外径 10 nm、内径 2 nm、高さ 8 nm のリング構造を形成している。そして、その中心を直径 2 nm、長さ 8 nm 以上の少し曲がった棒状の  $\gamma$  サブユニットが貫いて  $F_0$  側に突き出している。三つの  $\beta$  サブユニットは、それぞれ AMP-PNP (ATP のアナログ) を結合した構造 ( $\beta$  TP 型)、ADP を結合した構造 ( $\beta$  DP 型)、そして何も結合していない構造 ( $\beta$  empty 型) をとっていて、それぞれの構造は大きく異なっている。Boyer の回転仮説によれば、三つの  $\beta$  サブユニットで順番に起きる ATP の加水分解反応に伴い順番に  $\beta$  サブユニットの構造が変化し、 $\gamma$  サブユニットが回ることになる。つまり、Boyer は、 $F_1$ -ATPase は三つの  $\beta$  サブユニットが順番にトルクを発生するロータリーエンジンであると予言したのである。そして、 $\gamma$  サブユニットが回転することで、 $F_0$  がプロトンを輸送すると予想した。ATP を合成するときには、プロトンの流れが  $\gamma$  を逆向きに回し、 $\beta$  サブユニットの構造を変えて ATP を合成すると考えられている。

## 3. 回転の観察

$F_1$ -ATPase の構造発表の後、 $\gamma$  サブユニットの回転の証明が急務となり、幾つかの実験結果が報告された<sup>11),12)</sup>。しかし、いずれも間接的な結果であったため、筆者らはこの回転を証明するために、 $\gamma$  サブユニットの回転を蛍光顕微鏡で「直接観察する」ことにした。まず、 $F_1$ -ATPase として構造が安定で扱いやすい好熱菌由来の  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体を用意し、その  $\gamma$  サブユニット (直径 2 nm) に、回転の目印として蛍光色素で染めたアクチン線維 (~10  $\mu$ m) を結合させた。この蛍光

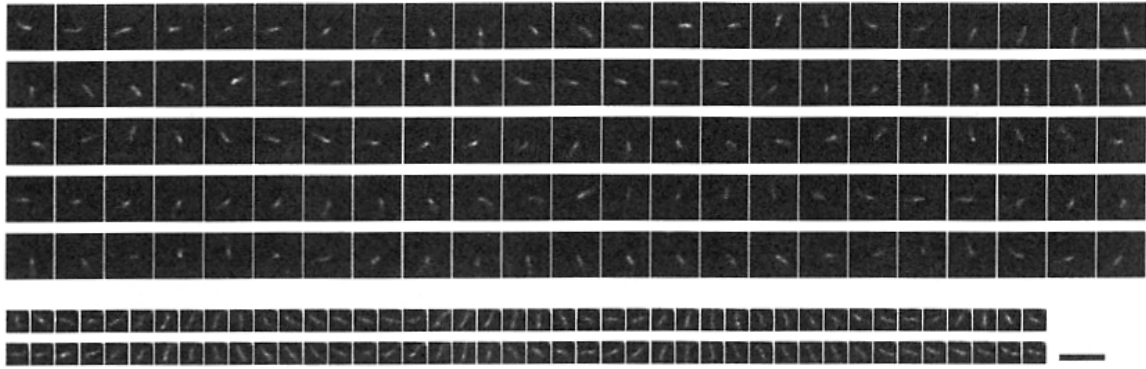


好熱菌由来  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体 ( $F_1$ -ATPase と同様の活性を持つ) の  $\beta$  サブユニットの N 末端には His-tag が導入され、 $\gamma$  サブユニットの  $F_0$  側に突き出している部分にビオチンが導入されている。 $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体は、Ni-NTA でコートされたガラス基板上に固定され、 $\gamma$  サブユニットには、ストレプトアビジンを通して、蛍光ラベルされたアクチン線維が結合されている。この結果、 $F_1$ -ATPase 分子は  $F_0$  側を上にして固定され (図 2 と上下が逆)、 $\gamma$  サブユニットの回転は、アクチン線維の回転運動として蛍光顕微鏡で観察される。

図 3  $\gamma$  サブユニットの回転の観察の系

性アクチン線維は十分に長いために、蛍光顕微鏡でその 1 本 1 本の動きを観察することができる。 $\gamma$  サブユニットとアクチン線維を結びつけるために、アクチン線維の Cys 残基と  $\gamma$  の  $F_0$  側に突き出している部分の Cys 残基をビオチン化し、その間をストレプトアビジンで結んだ。またさらに、アクチン線維が結合している部分とは逆側にある  $\beta$  サブユニットの N 末端に His-tag を導入した。この His-tag を用いて、Ni-NTA でコートされたガラス基盤上に  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体を固定化し、分子全体の回転ブラウン運動を抑えた。その結果、図 3 のように  $F_0$  側を上にして  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体をガラス表面に固定化し、 $\gamma$  の上に突き出た部分に蛍光性のアクチン線維を結合させることができた。

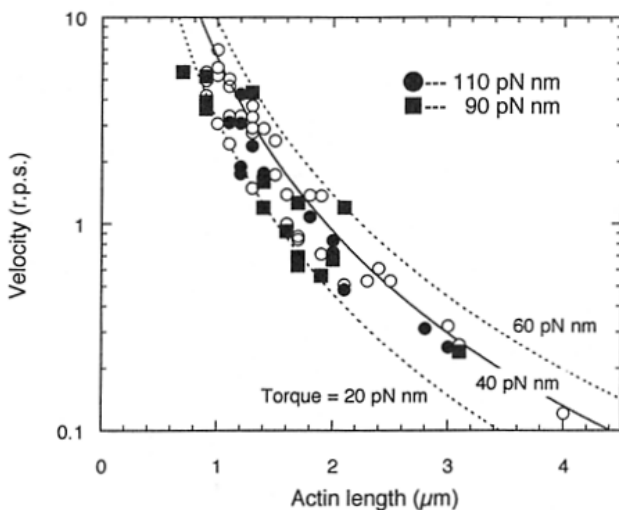
あとは、Mg-ATP を入れてアクチン線維の動きを実際に観察すればいい。2 mM ATP 存在下で蛍光顕微鏡で観察したアクチン線維のほとんどは、ガラス面に複数箇所固定化されて止まっていたが、その中のいくつかは一端を軸に、ぶらぶらとブラウン運動していた。そして、根気よくガラス表面のアクチン線維の観察を続けると、くるくると回転しているアクチン線維が確認された (図 4)。その回転速度は、長いアクチン線維ほど遅い傾向が見られた (図 5)。そして、観察



上) 長さ  $2.6 \mu\text{m}$  の長さのアクチン線維の回転: アクチン線維は一方の端で  $\gamma$  サブユニットに結合して回転している。ビデオで撮影された映像の 133 ミリ秒ごとのコマ撮り写真を示した。

下) 長さ  $2.4 \mu\text{m}$  の長さのアクチン線維の回転: アクチン線維はほぼ真ん中で  $\gamma$  サブユニットに接着しているの、プロペラのように回転している。33 ミリ秒ごとのコマ撮り写真。scale bar は  $5 \mu\text{m}$ 。これらの映像は、東京工業大学の吉田・久堀研究室のホームページで見ることができる (<http://www.res.titech.ac.jp/seibutu/nature/f1rotation.html>)。

図4 観察された  $F_1$ -ATPase の  $\gamma$  サブユニットの回転運動



高濃度 ATP 存在下で観察された、回転するアクチン線維の長さを、その平均回転速度に対してプロットした。○は  $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ , ●は  $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ ,  $[\text{ADP}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Pi}] = 0.1 \text{ mM}$  (ATP 1 分子当たりの自由エネルギー変化は  $110 \text{ pNnm}$ ), ■は  $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ ,  $[\text{ADP}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Pi}] = 10 \text{ mM}$  (1 分子当たりの自由エネルギー変化は  $90 \text{ pNnm}$ ) の条件で回転したアクチン線維を示している。また、実線は回転トルクが  $40 \text{ pNnm}$  で一定である場合の、アクチン線維の長さと同転速度の関係を示している。破線はそれぞれトルクが  $20$  または  $60 \text{ pNnm}$  で一定の場合の関係を示している。アクチン線維が長くなると回転が遅くなるが、○, ●, ■いずれのトルクの値も、 $40 \text{ pNnm}$  を中心に分布しているのが確認できる。

図5 アクチン線維の長さと同転速度の関係

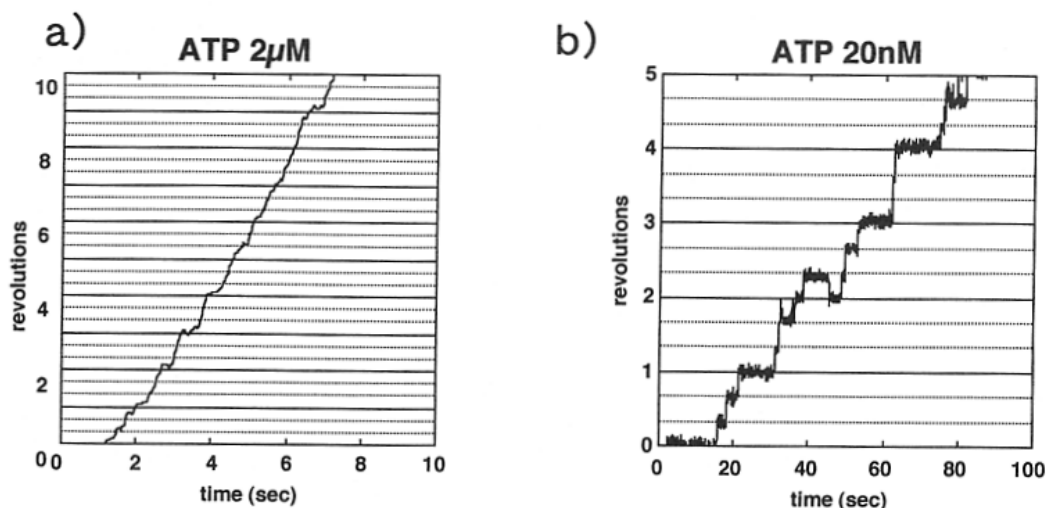
される回転運動は例外なく反時計回りであった。この回転方向は、Walker の発表した結晶構造から予想される方向と一致する。

さらに、ATP がない場合や、 $F_1$ -ATPase の阻害剤がある場合にはアクチン線維の回転運動が観察されなかったことから、この回転運動が  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体の ATP の加水分解反応によることが明らかとなった。 $\gamma$  サブユニットは回っている。これによって、Boyer の回転仮説は直接実証された<sup>5)</sup>。

#### 4. 回転の素過程(ステップ)

観察された回転運動は比較的スムーズで連続的であった。次に、ATP の結合が律速段階になるように、ATP の濃度を  $2 \text{ mM}$  から  $20 \text{ nM}$  まで下げて回転を観察してみた。ATP の濃度が  $2 \mu\text{M}$  までは回転運動にあまり変化は見られなかったが、さらに低い濃度では回転速度が遅くなってきた<sup>13)</sup>。アクチン線維は ATP が  $2 \mu\text{M}$  では途中で止まることもあるが、ほぼ連続的に回転する。それに対して、ATP が  $20 \text{ nM}$  では断続的に回転する様子が観察された(図6)。図から、このステップの回転幅が  $120$  度であることが分かる。そして、同じ長さのアクチン線維で比較すれば、このステップ自体の速さは ATP が高濃度の時と比較してほとんど変わらない。つまり、回転が遅くなった理由は、ステップと次のステップの間の待ち時間(ATP 結合の待ち時間)のためである。

また、この待ち時間の解析から、1 回の ATP の加水分解反応によって  $120$  度ステップが引き起こされることも分かった。結晶構造中でも、ATP 分解/合成の触媒中心が存在する  $\beta$  サブユニットは、 $\gamma$  を中心



a) ATPが $2\mu\text{M}$ の時のアクチン線維の回転運動を、横軸を時間とし、縦軸を反時計回り方向の回転数としてグラフにした。たまに止まったりするが、全体として連続的に回転する。  
 b) ATPが $20\text{ nM}$ の時のアクチン線維の回転の様子をa)と同様にグラフにした。ステップ状の回転が確率的に起こることが分かる。実線は1回転おきに、点線は $120$ 度おきに引いてある。回転のステップの幅がこの線の幅に一致することから、回転は $120$ 度ステップであることが分かる。

図6 回転の様子の解析

として $120$ 度おきに配置している。 $\beta$ サブユニットはATPの加水分解に伴ってその構造を変え、それによって $\gamma$ サブユニットの向きが $\beta$ から次の $\beta$ へと $120$ 度おきに回転するのであろう。

### 5. $F_1$ -ATPaseのエネルギー変換効率は非常に高い

アクチン線維は、水の粘性抵抗を受けながらほぼ一定の速度で回転することから、アクチン線維の回転摩擦係数(ほぼ長さの三乗に比例する)に回転速度をかけることで、その回転トルクを見積もることができる。その結果、トルクの値はアクチン線維の長さによらず、 $40\text{ pNm}$ で一定であることが分かった(図5)。この値は、ステップ状の回転をしている場合でもほとんど変わらなかった。したがって、回転トルクは負荷(アクチン線維の長さ)にも、ATP濃度にも依存しない。回転トルクの発生部位が、結晶構造から予想される回転中心軸から約 $1\text{ nm}$ 離れた場所であるとする、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体はこの回転運動のために $40\text{ pN}$ の力を出していることになる。この力はミオシン( $\sim 4\text{ pN}$ )やキネシン( $5\text{ pN}$ )と比較すると非常に大きな力である。

$\gamma$ サブユニットは1回のATPの加水分解で $120$ 度の回転をするため、1回のATPの加水分解で $40\text{ pNm} \times 2/3 \pi = 80\text{ pNm}$ の仕事をするようになる。この値は、細胞内で1分子のATPが加水分解される

際に放出される自由エネルギーの値と一致する。ここまでの測定では、ATPを添加するだけであったので、自由エネルギーの値を決めることができない。そこで、次にADP,  $\text{P}_i$ を加えることにより、1個のATPを加水分解する時の自由エネルギー変化が $110\text{ pNm}$ と $90\text{ pNm}$ となる条件で、回転を観察した。その結果、それまでと同様に1分子のATPの加水分解当たり $80\text{ pNm}$ の仕事を行うことが分かった。このことから、 $F_1$ -ATPaseは非常に効率よく( $\sim 100\%$ )ATPの加水分解のエネルギーを回転運動に変換することが明らかとなった。このような高いエネルギー効率は、他のATP駆動型のモータータンパク質では見られない。これは、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素が逆反応も行うために必要な性質なのであろう。

### おわりに

「 $F_1$ -ATPase 1分子を観察する」ことで、 $F_1$ -ATPaseが高いエネルギー効率で回るステッピングモーターであることが、初めて明らかになった。このほかに回転することが知られているタンパク質は少ないが、生きたタンパク質の動きを観察する技術の進歩に伴って、さらに多くのタンパク質の回転運動が明らかとされるであろう。

慶應大学の原田慶恵氏、CREST team 13の西坂崇之氏、足立健吾氏、東工大・資源研の久堀徹氏、宗行

英朗氏には貴重な意見をいただいた。これらの方々に感謝します。

#### ○参考文献

- 1) Silverman, M. and Simon, M. : *Nature*, 249, 73~74 (1974)
- 2) Vale, R. D. and Toyoshima, Y. Y. : *Cell*, 52, 459~469 (1989)
- 3) Nishizaka, T., Yagi, T. and Ishiwata, S. : *Nature*, 361, 269~271 (1993)
- 4) Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S. and Kinoshita, K., Jr. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5646~5650 (1997)
- 5) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinoshita, K., Jr. : *Nature*, 386, 299~302 (1997)
- 6) Mitchell, P. : *ibid.*, 191, 144~149 (1961)
- 7) Matsui, T., Muneyuki, E., Honda, M., Allison, W. S., Dou, C. and Yoshida, M. : *J. Biol. Chem.*, 272, 8215~8221 (1997)
- 8) Capaldi, R. A., Aggeler, R., Gogol, E. P. and Wilkens, S. : *J. Bioenerg. Biomenbr.*, 24, 435~439 (1992)
- 9) Boyer, P. D. and Kohlbrenner, W. E., "Energy Coupling in Photosynthesis", Selman, B. R. and Selman-Reimer, S. eds. (Amsterdam : Elsevier), p.231~240 (1981)
- 10) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. and Walker, J. E. : *Nature*, 370, 621~628 (1994)
- 11) Sabbert, D., Engelbrecht, S. and Junge, W. : *ibid.*, 381, 623~625 (1996)
- 12) Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L. and Cross, R. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 10964~10968 (1995)
- 13) Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr. and Yoshida, M. : *Cell*, 29, 1117~1124 (1998)

## ほん

### The 遺伝子 最新分子生物学の潮流

今本文男 著  
共立出版  
3600円(消費税別)

1990年から15か年計画で開始された約30億塩基対で構成されているヒトの染色体塩基配列の解析は順調に進行し、最近では予想より早い2002年には終了すると考えられている。もちろん、塩基配列が明らかになることとその染色体の保持する遺伝子、遺伝情報の産物並びにその機能が理解されることは必ずしも一致しないが、解析技術の発展に伴い近年重要な遺伝子とその役割がしだいに明らかになってきた。

本書は、「第1章 遺伝子の情報はどのように発現するのか・転写とその制御」、「第2章 細胞はどのようにシグナルを受けて生きるのか・シグナル伝達」、「第3章 細胞はなぜ自殺するのか・アポトーシス」、「第4章 細胞はどのような遺伝子の変化でがん化するのか・がんの遺伝子論」、「第5章 遺伝子病の医療はどのように行われているのか・遺伝子

治療」、「第6章 ヒトの遺伝子はどのように解析して役立てるのか・ヒトゲノム計画」の全6章から成り、現在明らかにされている遺伝子の構造、遺伝情報の発現、遺伝情報の産物であるタンパク質の機能並びに病態との関連等についての、最近のもっともホットな話題を中心に解説したものである。

それぞれのテーマについての総説を目にする機会が多いが、各テーマ間の関連を理解することは容易ではない。また、このようなテーマは通常各章を専門家が担当したものを編集して1冊の本とする例が多いように思う。本書に全体を通じた統一性が見られ、各章間にまたがる内容に程よいバランスが感じられるのは、一人の著者が全章を通してまとめたからであろう。2色刷りの解説は、各所でポイントとなる部分(赤印刷)とその背景あるいはより詳細な説明(黒印刷)とに分けられており読みやすい。また、豊富な図表に加えて、遺伝子の表示やタンパク質の略号、名称の由来等にも適切な解説がなされているのも理解を助けるものである。

できれば細胞周期、細胞分化、発生等に関する話題についてももう少し触れてほしかったと思うが、本書が副題の「最新分子生物学の潮流」を理解する上で好個の書であることは間違いなからう。

(東京工業大学生命理工学部 永井和夫)