



## F<sub>1</sub>-ATPase : 1分子でできた回転モーター

CREST "生命活動のプログラム"チーム13 安田涼平  
野地博行

F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>) is a part of the ATP synthase. We have shown that F<sub>1</sub> is a rotary motor by visualizing the rotation of a large marker attached to the putative rotator of this protein. Driven by three catalytic subunits, the rotator rotates with discrete 120° steps. Thermodynamic efficiency of F<sub>1</sub> is almost 100 %

molecular motor / fluorescence microscope / single molecule

### 1. はじめに

生物界において、回転モーターとして知られていたのは、鞭毛モーターだけであった。鞭毛モーターは、100程度の分子が集まってできた巨大な分子集団である。一方、ミオシン、キネシンなどのリニアモーターの多くは、たった1分子で働く。回転運動をするためには非常に複雑な構造が必要であることを想像させる。

ところが、Paul Boyerは20年ほど前に、たった1分子でできた回転モーターが存在するという仮説をたてていた<sup>1)2)</sup>。ATP合成酵素の一部分である、F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>; エフ・ワン) がそれである。タンパク質1分子という非常に小さな対象の回転を直接観察することは困難であったため、このことは長い間証明されなかった。私達は1つ1つのF<sub>1</sub>に巨大な目印をつけてその動きを観察するという手法を開発し、F<sub>1</sub>が回転するということを証明した<sup>3)</sup>。この手法では、単に回転を証明するだけでなく、1つの分子の回転の過程を直接追うことができた<sup>4)</sup>。

ここでは、まず初めにATP合成酵素の機能と構造、およびBoyerの仮説について述べた後、F<sub>1</sub>の回転メカニズムに関して、私達の研究を中心に紹介しよう。

### 2. ATP合成酵素の機能と構造

細胞においてタンパク質分子が仕事をするときのエネルギーは、多くの場合、ATPをADPとPiとに加水分解することによって作り出されている。逆にADPとPi

から、ATPを合成するのが、ATP合成酵素である。ATP合成酵素は、バクテリア、植物、動物などほとんどすべての生物にみられる。

ATP合成酵素は、F<sub>0</sub> (エフ・オー) と、F<sub>1</sub>の2つのユニットから構成されている (図1)。F<sub>0</sub>は膜の中にはまり込んでいる部分、F<sub>1</sub>は膜の外に突き出ている部分である。サブユニット構造はバクテリアの場合、F<sub>1</sub>は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 、F<sub>0</sub>は $ab_2c_9$ である。水素イオンがF<sub>0</sub>を通過するとき、F<sub>1</sub>の3つの $\beta$ サブユニットがATPを合成する<sup>5)</sup>。ATP合成酵素のこの反応は完全に可逆的であり、逆反応の際には、F<sub>0</sub>で $\beta$ がATPを分解すると、F<sub>0</sub>を通じて水素イオンがATP合成のときと反対側にくみ出される。

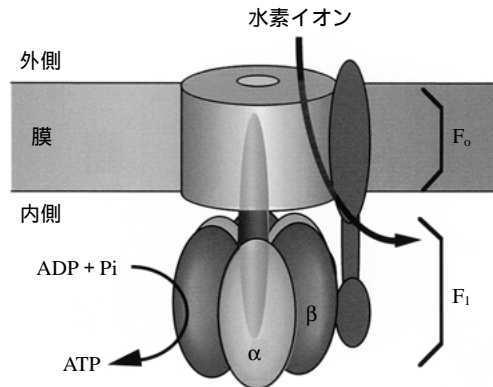


図1 ATP合成酵素 (模式図)

### F<sub>1</sub>-ATPase : A Rotary Motor Made of a Single Molecule

Ryohei YASUDA and Hiroyuki NOJI

CREST (Core Research for Evolutional Science and Technology) "Genetic Programming" Team 13

$F_1$ は、 $F_0$ から単離することもできる。 $F_1$ 単独ではATP分解のみをする。さらに $\delta\epsilon$ を除いた部分( $\alpha_3\beta_3\gamma$ )は、 $\delta\epsilon$ と一体であるときの $F_1$ と同様のATP加水分解活性があり、ATP加水分解の最小単位である<sup>6)</sup>。以降、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の事を $F_1$ と呼ぶ。

### 3. Boyerの回転説

今から20年程前、Boyerは $F_1$ によるATP加水分解反応を解析し、 $F_1$ の3つの $\beta$ によるATPの結合に強い共同性があるにもかかわらず、分解の反応の経路が1つしかないことを示した。そしてこれを説明するものとして、3つの $\beta$ が順番にATP加水分解/合成をし、構造を順次変化させて平等に役割を交代すること、それに伴い1つしかない $\gamma$ サブユニットは酵素の中で回転することを提唱した。これが回転説である。

Boyerの説では、 $\gamma$ の回転が $F_0$ での水素イオンの流れと、 $F_1$ でのATPの合成/加水分解を結び付けるという。つまり、 $F_0$ の内部を水素イオンが流れると $\gamma$ が回転し、その回転により $\beta$ でATPが合成される。逆反応では、 $F_1$ がATPを加水分解すると、それにより $\gamma$ が回転し、水素

イオンが逆向きに流れる。

この回転説を支持する証拠となったのが、1994年にWalkerらによって発表された $F_1$ ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ のみ)の結晶構造である<sup>7)</sup>。 $\alpha_3\beta_3$ が筒を作り、まん中の $\gamma$ を取り囲んだ、いかにも回転しそうな構造が明らかとなった(図2)この結晶構造は、3つの $\beta$ のうち1つはATP(実際にはそのアナログAMPPNP)、1つはADPを結合し、1つは何も結合していなかった。このことは、3つの $\beta$ が順番に構造を変えていく、というBoyerの仮説を裏付けていた。

### 4. 回転の証明

多分子を用いた系で分子の回転運動を検出することは、非常に難しい。いくつかのグループが、多分子を用いた実験により、 $\gamma$ の角度が大きく変化することを示す結果を発表したが、 $\gamma$ が連続的に一方向に回転することを証明するには至らなかった<sup>8)9)</sup>。私達は、 $F_1$ が回転モーターであることを証明するために、光学顕微鏡下で直接 $F_1$ 分子の回転を観察することを目指した。

光学顕微鏡は、水溶液中のものをリアルタイムで観察できる唯一の顕微鏡である。しかし、 $F_1$ の大きさは直

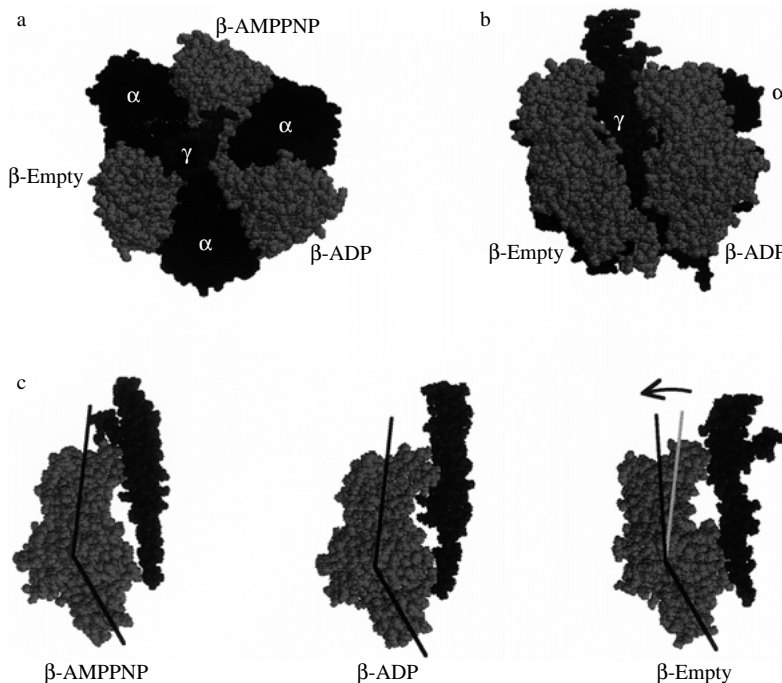


図2  $F_1(\alpha_3\beta_3\gamma)$ の構造<sup>7)</sup>

- $F_0$ 側(図1)から見た図。3つの $\beta$ のうち1つはAMPPNP(ATPのアナログ)、1つはADP、1つは何も結合していない(Empty)。
- 膜の側面(図1)から見た図。手前の $\alpha$ を1つはずしてある。
- 3つの $\beta$ の構造。 $\beta$ の屈曲角度の指標として黒線を書いた。灰色の線は、 $\beta$ -AMPPNPにおけるもの。

径10 nmしかなく、光学顕微鏡の分解能(～200 nm)ではその回転を直接観察することはできない。そこで、目印として蛍光標識したアクチンフィラメントを $\gamma$ に結合させ、その目印の動きによってF<sub>1</sub>の動きを観察することにした。

図3aに実験系を示す。水溶液中のF<sub>1</sub>は、ブラウン運動によりマイクロ秒程度で1回転してしまうため、F<sub>1</sub>をしっかりと、かつ変性させないように固定することが実験の1つのポイントである。このために、筒にあたる $\alpha_3\beta_3$ に10個のヒスチジンが連なったもの(His-tag)を遺伝子工学で取り付け、一方、ニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)で修飾したビーズをカバーガラス表面に結合させた。Ni-NTAとヒスチジンは強く結合するので、F<sub>1</sub>は図3aのようにガラス面上のビーズに固定された。また、 $\gamma$ とアクチンフィラメントは、ピオチン-ストレプトアビジンを介して結合させた。

こうしてできたカバーガラスを蛍光顕微鏡で観察すると、アクチンフィラメントがガラス面に結合している状況を観察することができた。溶液にATPを加えると、一部のアクチンフィラメントは回転を始めた(図3b)。回転方向はすべて図3aを上から観たときに反時計回りとなる方向であった。つまり、 $\gamma$ はF<sub>0</sub>側( $\gamma$ が突き出ている側)からみて反時計回りに回転することになる。

この回転方向は、結晶構造から予想される回転方向と一致する。F<sub>0</sub>側からみた結晶構造において(図2a)、仮に3つの $\beta$ に結合するヌクレオチドが通常の加水分解の経路に沿って、ATP → ADP → Emptyと変化すると考えると、ATP, ADP, Emptyの配列は反時計回りに移

っていく。 $\gamma$ は非対称なので、それに追従して反時計回りに回転すると思われる。

### 5. 120°ステップするモーターである

F<sub>1</sub>は、図2aのように3つの $\beta$ が3回対称な位置に配されている。このため、1回のATP加水分解で $\gamma$ の回転は120°進むことが予想される。私達は、このことを確かめるために、ATPの濃度を下げ、1回のATP加水分解に伴う $\gamma$ の回転を観察した。ATP濃度が高いときはアクチンフィラメントの回転は滑らかであるが、ATP濃度の低いときは、予想通り120°回転しては止まるようなステップ状の回転となった(図4a-c)。興味深いことに、たまに逆方向にステップする現象や、一度前進したのちにすぐに後退するような現象も観察された。

1回のステップが1回のATPの加水分解に対応していることは、次の2つの結果によって明らかになった。

1) ATP加水分解速度の1/3と回転速度の値が低濃度ATPにおいて一致する。

図5aに、顕微鏡で観察したアクチンフィラメント(長さ0.7-1.2  $\mu\text{m}$ )の回転速度と、キュベット中で測定したアクチンフィラメントの結合していないF<sub>1</sub>のATP加水分解速度の1/3を同時にプロットした。低濃度ATP(1  $\mu\text{M}$ 以下)において両者が一致することがわかる。少なくとも低濃度ATPでは、120°回転するごとに1回、ATPを加水分解する計算になる。高濃度ATPでアクチンフィラメントの回転速度とATP分解速度/3が一致しないのは、回転速度が大きくなるとそれに比例して粘性抵抗が大きくなるためと思われる。

2) ステップの待ち時間の分布が時間に対して指数関数となる。

図5bにステップとステップの間の時間間隔(図4cに説明)の分布を示した。もし1回のステップにおいてATPを1個しか使っていないのなら、この分布は指数関数になるはずである(図5b実線)<sup>10)</sup>。ATPを2個以上使っている場合は、図5bの破線のような、ピークを持つ分布となる。実験結果(プロット)は、指数関数とほぼ一致し、ATPを1個しか使っていないことを裏付けた。

### 6. F<sub>1</sub>の発生するトルクとエネルギー変換効率

アクチンフィラメントを回転させることは、F<sub>1</sub>にとって大きな負荷となる。高濃度のATPにおいて、アクチンフィラメントが長くなると、アクチンフィラメントにかかる粘性抵抗が増えるため、速度が遅くなった(図6、のプロット)。アクチンフィラメントを半径5 nmの円柱とみなし、アクチンフィラメントを粘性抵抗

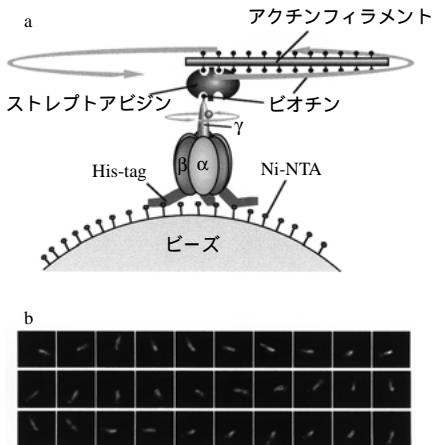


図3 回転観察系  
a 回転観察系の模式図  
b アクチンフィラメントの回転の様子。アクチンフィラメントの長さ = 2.6  $\mu\text{m}$ , 133 ms ごとに撮影したもの。

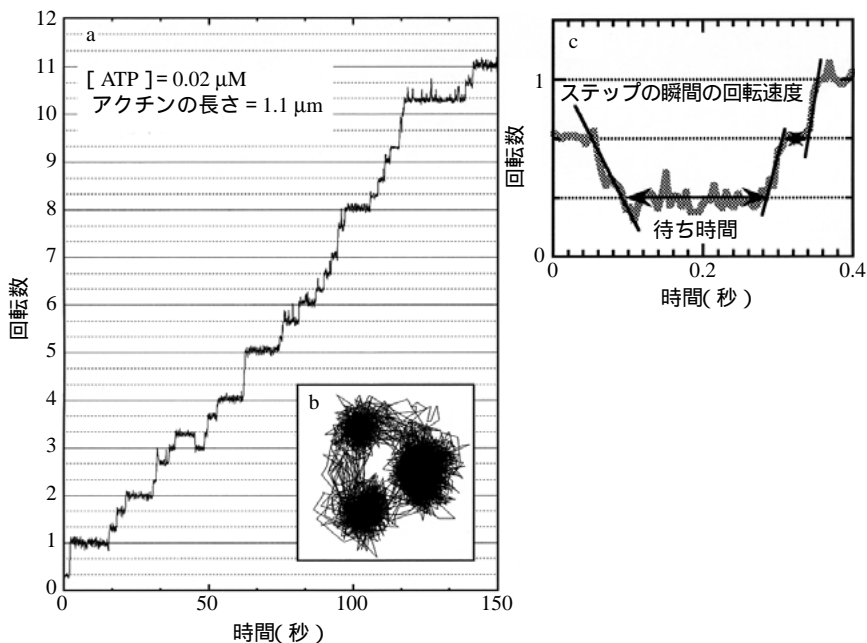


図4 ステップ状の回転

- a 縦軸は、アクチンフィラメントの回転を回転数で表したもので、通常のカメラ(時間分解能 = 33 ms)で測定した。[ATP] = 0.02 μM
- b aのアクチンフィラメントの輝度重心の軌跡。3つの角度で停留する。
- c ステップの拡大図。高速カメラ(時間分解能 = 5 ms)で測定した。[ATP] = 0.2 μM

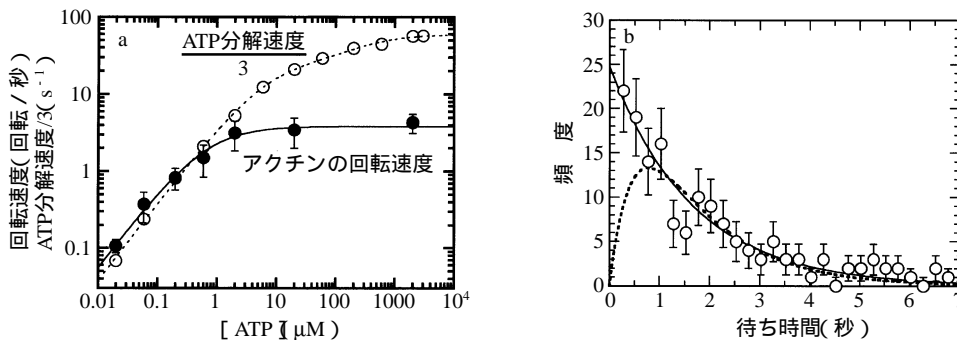


図5 1個のATPで120°進むことの証明

- a ATP分解速度の1/3とアクチンフィラメント(0.7-1.2 μm)の回転速度のATP濃度依存性。
- b ステップとステップの間の待ち時間の分布。実線は1回のステップに対して1つのATPを使っている場合を仮定した理論曲線。破線は2つのATPを使っている場合を仮定した理論曲線。

に対して回転させるために必要なトルクを計算した。図6にある曲線がそれである。この図から、 $F_1$ の発生するトルクがアクチンフィラメントの回転速度によらず、約40 pN・nmで一定であることがわかる。1回のATP加水分解においてする仕事は、 $40 \times (2\pi/3) \approx 80$  pN・nmとなる。この値は細胞内でのATPの加水分解エネルギーとほぼ等しい<sup>11)</sup>。

実験条件では、溶液中のADP、 $P_i$ の濃度が生体中よりも低いので、加水分解エネルギー  $\Delta G = \Delta G_0 + k_B T \cdot \{ [ATP] / [ADP][P_i] \}$  (ただし、 $\Delta G_0 \approx 12.6 k_B T$ ,  $k_B T$ は熱エネルギー) は生体中よりも高い。そこで、ADPと $P_i$ を加え、 $\Delta G \approx 90$  pN・nmとなるように $\Delta G$ を調節して、生体内に近い条件で同様の実験を行ったのが、図6のプロットである。 $\Delta G$ を変化させても、回転速度に変

化ははなことがわかる。このことから、生体中でも同様のトルクを発生することができると考えられる。つまり、F<sub>1</sub>はエネルギー効率100%の回転モーターということになる。

エネルギー効率をより直接測定するため、1つのATPを加水分解する瞬間、つまり1回のステップの間にする仕事を測定した。図6の のプロットは、ステップの瞬間のアクチンフィラメントの回転速度(図4cに説明)を測定したものである。この回転速度は、高濃度ATPにおけるスムーズな回転のときのものとはほぼ一致した。このことは、ステップ状の回転のときも、ステップの瞬間にする仕事は、細胞内のATP加水分解エネルギー(80 pN・nm)とほぼ等しいことを示す。

同じく回転モーターである鞭毛モーターも、100%のエネルギー効率で動作するとされる<sup>12)</sup>。生物界の回転モーターは、人工のモーターにくらべてはるかに高い効率で化学エネルギーを力学エネルギーに変換できるようなのである。一方、リニアモーターであるミオシン、キネシン、RNA合成酵素は最大15 - 50%程度である<sup>13)15)</sup>。

なお、図6の のプロットは、バックステップのものである。後退ステップのときも前進ステップとまったく同様のトルクを発生し、ATP加水分解エネルギーに近い仕事をする事がわかる。このことから、後退ステップにおいても少なくとも1つ、ATPを使っていることがわかった。リニアモーターであるキネシンでは、光ピンセ

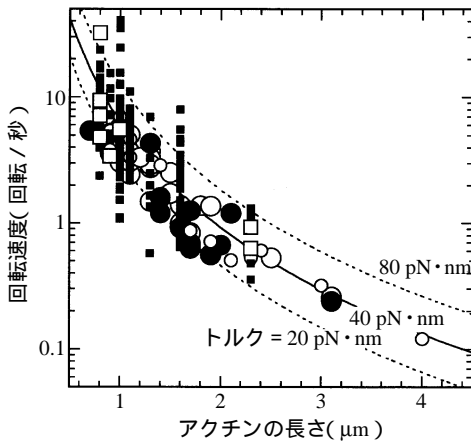


図6 アクチンフィラメントの回転速度と長さの関係  
 は高濃度ATP (2 mM) におけるアクチンフィラメントの回転速度を示す。ただし は、溶液に10 mM Piと0.1 mM ADPを加えて $\Delta G$ を90 pN・nmとしたもの。  
 は低濃度ATP (0.06-0.2  $\mu$ M) におけるステップの瞬間の速度(図4cに説明)を示す。ただし は前進ステップ、は後退ステップのもの。

ットで進行方向と逆方向に強く引っ張ったときのみバックステップがおこる<sup>16)</sup>。図5のように、エネルギーを使って後退することが観察されたのはF<sub>1</sub>のみである。

## 7. 回転のメカニズム

F<sub>0</sub>側からみたF<sub>1</sub>の結晶構造(図2a)では、3つの $\beta$ が結合するヌクレオチドは、時計回りにATP, ADP, Emptyという配列になっている。前に説明したように、1回ATPが加水分解されると、ヌクレオチドの配列は反時計回りに1個ずれることになる。3つの $\beta$ は、結合するヌクレオチドにより少しずつ構造が違う(図2c)ため、3つの $\beta$ は120°反時計回りに回転した構造となる。3つの構造の違う $\beta$ の内部で $\gamma$ が安定に存在できる角度は1つしかないとする、 $\gamma$ も120°回転することになる。

$\gamma$ が120°回転する際にATPの加水分解エネルギー(熱エネルギーの20倍程度)に近い仕事をする、ということから、 $\gamma$ は次の安定角まで力を加え続けられていなければならぬ。仮に安定角以外で $\gamma$ にまったく力が働いていないとしても、 $\beta$ の配列が変化した後 $\gamma$ がブラウン運動によって次の安定角を探すことにより120°回転することができるが、ATPの加水分解エネルギーに近い仕事をする事はできない。3つの $\beta$ が結合するヌクレオチドによって構造を変えることから(図2c)、この構造変化が、直接 $\gamma$ を回転させているものと思われる。

アクチンフィラメントが結合しているとき、 $\gamma$ は120°の間を数十ms~数sかけてゆっくりと回転し、その間トルクを発生し続けることから、 $\beta$ は柔らかいバネのような部分を持つと思われる。 $\beta$ の構造変化に伴いこのバネの部分が歪み、その歪みが緩和することによってアクチンフィラメントがついた $\gamma$ を回転させると考えるのである。この場合、アクチンフィラメントにかかるトルクは $\beta$ のバネの強さのみで決まるので、アクチンフィラメントの長さに依らず発生するトルクが一定となるという実験事実(図6)とよく一致する。

上で説明したような $\beta$ の柔らかい構造は、F<sub>0</sub>での $\gamma$ の回転とF<sub>1</sub>の $\gamma$ の回転というステップ数が違う2種の回転をカップルさせる働きがあるかもしれない<sup>17)</sup>。F<sub>0</sub> $\gamma$ の回転は、cが9-12個のリングを作っていることから、9-12ステップで1回転と思われる。これに対して、F<sub>1</sub>は3ステップで1回転である。この2つの回転をカップルさせるために、どこかに柔らかい構造が必要となるのである。

## 8. おわりに

回転運動は、直進運動と比べ観察しにくい運動であったため、F<sub>1</sub>が回転モーターであることの証明には長

い時間がかかった。しかし、回転する分子に大きな目印を付ける手法により、分子の動きを普通の顕微鏡で見ることができるようになった。このことは、1分子の運動解析をするために特殊な装置が必要なリアモーターと比べて<sup>(13) (15)</sup>、メカニズムを調べる上で有利なところである。

F<sub>1</sub>の立体構造は、ミオシンやキネシンなどのATPを加水分解して働くリアモーターとよく似ている<sup>(18)</sup>。このことは、F<sub>1</sub>とリアモーターの動作のメカニズムが共通であることを想像させる。今後F<sub>1</sub>の研究が、多くの分子モーターのなぞを解くことを期待したい。

### 文 献

- 1 . Boyer, P.D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 215-250.
- 2 . Boyer, P.D. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.
- 3 . Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinoshita, K., Jr. (1997) *Nature* **386**, 299-302.
- 4 . Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr. and Yoshida, M. (1998) *Cell* **93**, 1117-1124.
- 5 . Mitchell, P. (1979) *Science* **206**, 1148-1159.
- 6 . Kato, Y., Matsui, T., Tanaka, N., Muneyuki, E., Hisabori, T., and Yoshida, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24906-24912.
- 7 . Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. and Walker, J.E. (1994) *Nature* **370**, 621-628.
- 8 . Duncan, T.M., Bulygin, V.V., Zhou, Y., Hutcheon, M.L. and Cross, R.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8539-8544.
- 9 . Sabbert, D., Engelbrecht, S., and Junge, W. (1996) *Nature* **381**, 623-625.
- 10 . Higuchi, H., Muto, E., Inoue, Y. and Yanagida, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4395-4400.
- 11 . Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, Fourth Edition, 443-462, Freeman, New York.
- 12 . Meister, M., Lowe, G. and Gerg, H.C. (1987) *Cell* **49**, 643-650.
- 13 . Ishijima, A., Harada, Y., Kojima, H., Funatsu, T., Higuchi, H. and Yanagida, T. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1057-1063.
- 14 . Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J. and Block, S.M. (1993) *Nature* **365**, 721-727.
- 15 . Yin H., Wang, M.D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S.M. and Gelles, J. (1995) *Science* **270**, 1653-1657.
- 16 . Coppin, C.M., Pierce, D.W., Hsu, L and Vale, R.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8539-8544.
- 17 . Kagawa, Y. and Hamamoto, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 247-256.
- 18 . Noji, H., Amano, T. and Yoshida, M. (1996) *J. Bioenerg. Biomemb.* **28**, 451-457.