

座談会に関連して

F₁-ATPase のステップ回転：ATP 駆動の分子機械が働く仕組み

木下一彦 足立健吾 伊藤博康

たんぱく質の分子は、たった1個だけでも立派に働くので、分子機械と呼ばれる。例えば、図1に示してあるのは1個の回転モーター分子で、中央上部に突き出ている黒っぽい棒状の部品(サブユニット)が、それを取り囲む六つの灰色の部品の中で回る。われわれの体の中には、この分子モーターがたくさんあり、くるくると回り続けている。原子が縦・横・奥行きそれぞれ数十個並んだ塊がたんぱく質の分子。こんなに小さな分子が、たった1個だけで働くのである。

この回転分子モーターは、F₁-ATPase ないし F₁(エフワン)と呼ばれている。体内では、回転により、生体内のエネルギー通貨である ATP を化学合成している。回転による化学合成とは、いったいどういう仕組みなのだろうか。反対方向に回るときには、ATP を分解して、そのエネルギーを使って文字通りモーターとして働くのだが、合成

の時と同じ仕組みを使うのだろうか。

体の中には、他にもいろいろな分子機械があって、栄養を運んだり、筋肉を縮ませたり、DNA を複製したり、さまざまな仕事をしている。分子機械を作るための分子機械もある。これらの分子機械が働く仕組みを探りたい。個々の分子機械の仕組みだけでなく、できたら共通原理、人間の作ったマクロの機械のものとはおそらく異なる原理を見出したいと考えている。

1. ATP 加水分解により働く分子機械

生理的条件下では、ATP が ADP と無機磷酸に加水分解されるとき、自由エネルギーが放出される(=反応が分解方向に進む)。たんぱく質(ないし RNA) でできた生体分子機械の多くが、このエネルギーを使って仕事をする。しかしその仕組みが、まだよくわかっていない。

一般に、ATP 駆動の分子機械は、三つの段階を経て働くと考えられる。すなわち、(1)ATP の活性部位への結合、(2)活性部位内での ATP の分解、(3)分解産物(ADP と磷酸)の活性部位からの解離、の3段階である。

F₁モーターは、体の外に取り出すと、もっぱら ATP を分解して、そのエネルギーにより回転する。すなわち ATP 駆動の回転モーターとして働く。われわれは、光学顕微鏡下の1分子観察(1分子生理学)により、少なくとも F₁モーターの場合には、第1の ATP 結合の過程で大部分の仕事が行われる(力が発生する)ことを見出した。残りの

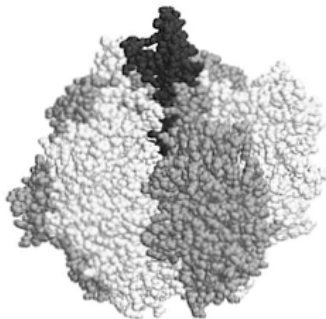


図1 F₁-ATPase の立体構造³⁾

中央の一番黒いのが γ 、白っぽい三つが α 、灰色の三つが β サブユニット。

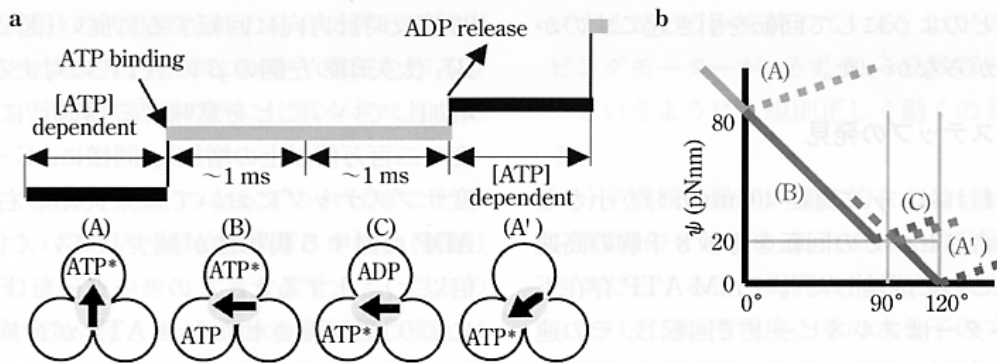


図 2 サブステップの解釈(a)とそれから推定される γ 回転のポテンシャルエネルギー (b)

ATP*はATPないしADP+燐酸を表し、ADPは燐酸ないしADP+燐酸かもしれない。(b)の各線は、(a)の下側の(A)-(A')の四つの化学状態に対応するポテンシャルエネルギー。この図では結合ヌクレオチドの数が1-2-1-2...と変化しながら回転することになるが(bi-site説)、2-3-2-3...かもしれない(tri-site説)。

仕事は、第3の分解産物解離の過程で行われる。活性部位内では、溶液中と違って、加水分解過程が可逆なため(合成反応も比較的容易に起こる)、第2の過程はたいした仕事をしない。

ATPの分解により得られるいわば「化学」エネルギーを、回転という「力学」エネルギーに変換するのに、分解反応のところだけでなく結合・解離過程を利用する、というところがみそである。他にも共通の原理で働くATP駆動分子機械が多いのではないかと推察している。

2. F₁モーター

F₁-ATPaseは、ATP合成酵素という大きなたんぱく質分子の一部分である。ATP合成酵素は、われわれの体の中ではミトコンドリアの内膜中に存在する。われわれが栄養をとり酸素を吸うのはミトコンドリアに供給するためで、ミトコンドリアは食物を酸素でゆっくりと燃やし(酸化し)、このとき得られるエネルギーを使って、ミトコンドリア内部から外側に水素イオン(プロトン)を運び出す。プロトンはいずれミトコンドリア内に戻ってくるが、その通り道になるのがATP合成酵素である。ATP合成酵素は、膜に埋まったF₀と呼ばれる部分と、外に飛びだしたF₁からなる。F₀部分をプロトンが流れると、F₁でATPが合成される。逆にF₁でATPを加水分解させた場合には、F₀がプロトンを逆向きに運ぶポンプとして働く。

プロトンの流れとATPの合成・分解という化学反応がどうして結びつくのか。ポイヤー¹⁾およ

び大沢ら²⁾は、F₀がプロトン駆動の回転モーター、F₁がATP駆動の回転モーターで、両者の回転軸が共通であると考えた。ただし両者の回転方向は逆で、生体内ではプロトンの駆動力が大きいいためF₀モーターの方が勝ち、F₁は無理矢理逆回転させられてATPを作ってしまうというわけである。

単離されたF₁は、 $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ というサブユニット構成を持ち、ATPの分解のみ行う(δ と ϵ はATP分解および回転には不要)。結晶構造³⁾を見ると、 $\alpha_3\beta_3$ の筒の中央に γ が突き刺さっている(図1)。ATP分解(および合成)の活性部位は、三つの β にそれぞれ一カ所ずつある。

われわれは1997年に、顕微鏡下で、F₁が確かに回転モーターであることを示した⁴⁾。 γ にアクチン線維を結合させ、その回転を直接目で見る事ができたのである。回転の向きは結晶構造から予想したように図1の上から見て反時計回りで、三つの β が順番にATPを分解することにより回転が生じることが示唆された。さらにわかったことは、(a)回転は120度おきのステップ状に起き、各ステップはATP1分子の分解により駆動される^{5,6)}、(b)各ステップにおいてなされる力学的仕事は一定で、約80-90 pN・nmという値であり、生体内でATP1分子を加水分解するとき得られる自由エネルギーにほぼ等しい⁵⁾、(c)このモーターのトルク(回転力)は回転角によらずほぼ一定で約40 pN・nm⁷⁾、などである。とくに(a)(b)は、このモーターのエネルギー変換効率が100%近くに達し得ることを示唆する。しかしながら、ATPの

加水分解がどのようにして回転を引き起こすのかは、よくわからなかった。

3. サブステップの発見

最近われわれは、 γ に直径 40 nm という小さな金粒子を結合させ、その回転を毎秒 8 千駒の高速で撮影することに成功した⁹⁾。2 mM ATP 存在下では F_1 モーターはフルスピードで回転し、その速度は毎分 8 千回転に達した。この速度でも回転は 120 度ステップに分かれ、ステップするときの瞬間速度は毎分 10 万回転を越えた。一方、ATP 濃度を下げて平均回転速度を落としてやると、120 度ステップが約 90 度と 30 度の二つのサブステップに分かれるのが見えてきた。詳しい解析の結果、図 2 a のようなスキームが示唆された。すなわち、90 度サブステップは ATP の結合により駆動され、30 度サブステップのほうは加水分解産物の解離に伴って起きるといえるものである。両者の間には二つの約 1 ミリ秒の反応があるが、これらは回転をほとんど伴わない。高濃度 ATP ではサブステップが見られないが、これは 30 度サブステップが終わったとたんに ATP が結合して 90 度サブステップが起きるから、というわけである。すなわち、30 度サブステップの直後には、モーターは次の ATP を受け取って新たな反応サイクルを開始する準備ができています。

ATP の結合が 90 度サブステップを駆動するという事は、作用反作用の法則に従えば、 γ が

90 度反時計方向に回転するに従い(図 2 a の A → B), 太矢印の左側の β の ATP に対する親和性が増加していくことを意味する(解析⁹⁾によれば 90 度で二百万倍以上の増加)。同様に、C → A' の 30 度サブステップにおいては太矢印の右側の β の ADP に対する親和性が減少していく(30 度で百倍以上)。とすると、このモーターを(F_0 モーターにより)逆回転させたとき ATP が合成される仕組みがわかってくる。すなわち、図の A' から始めて γ を力づくで時計回りに回転させると、まず太矢印の右側の β の ADP に対する親和性が高まるのでこの β が溶液中から ADP(と 燐酸)を結合し、さらに回転を続けると、今度は太矢印の左側の β に結合していた合成済みの ATP に対する親和性が低くなってこの ATP が放り出される、というわけである。

4. ATP の加水分解をいかに使うか

水溶液中で ADP と 燐酸を混ぜても ATP が自然に合成されることはないが、そこに F_1 があると、たんぱく質上では(活性部位内に)ATP が合成されてしまう。リニア分子モーターであるミオシンでも同様のことが起きることが知られている。ATP 駆動の分子機械の多くは、ヌクレオチドを強く結合することにより、活性部位内で ATP と ADP+燐酸の 2 状態の間に自由エネルギー差がほとんどない(両者が行き来する)状況を作り出すようである。だとすると、自由エネルギーの大

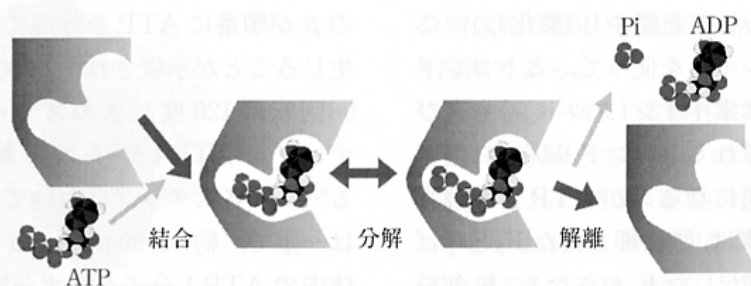


図 3 ATP 駆動の分子機械が働く仕組み

ATP 結合により放出される自由エネルギーによって構造変化を起こして仕事をする。ADP(ないし 燐酸¹⁰⁾)の解離の時にも仕事をさせられる。後者は ATP 結合の時と逆向きの構造変化だが、 F_1 のような「賢い」分子機械は、これも正しい方向への回転に利用するようである(たぶん三つの β サブユニットの構造変化が順に起きることによりうまく γ を回す)。図中の三つの太矢印は、ATP(+たんぱく質分子)の自由エネルギーが 3 段階に分かれて下がっていくことを示す(水中では同じだけ一気に下がる)。結合と解離の時の自由エネルギー減少を、仕事(力学的エネルギー)に転換するのである。

部分は、ATP の活性部位への結合に伴って放出されることになる⁷⁾。効率よい分子機械を作ろうと思ったら、ATP 結合の時に仕事をさせるのに限る。

たんぱく質分子の身になってみればまことにもつともで、空の活性部位に ATP が結合(解離)するときには自分の身に大きな変化(たくさんのボンドの生成)が起きるが、加水分解に伴う変化は比較的小さい。ATP 結合のとき自分の構造を大きく変え、それにより外部に仕事をするのがよい(図 3)。少なくとも F_1 の場合、この構造変化の仕掛けはたんぱく質側に内在するようで、ヌクレオチドは出来合いの仕掛けを駆動するだけらしい。すなわち、 F_1 は ATP だけでなく GTP や ITP でも回転させることができ、回転力は変わらない。しかし UTP や CTP は、回転機構を駆動できない。プリン環があれば、細部に多少の違いがあっても、回転に必要な構造変化を引き起こせるわけである⁹⁾。

それではなんのために加水分解するのかというと、90 度サブステップの後は ATP が強く結合され、そのままでは次の反応を起こすことができないので、二つに分解することによりそれぞれに対する親和性を下げ、解離を促すというわけである。

加水分解の役目は分子機械を初期状態にリセットするだけかということ、おそらくそうではない。加水分解により少しだけ回転が起きるように(分解と回転がカップルするように) F_1 がデザインされているとすると、正しい方向への回転が保証され、さらに ATP の分解・合成をそれぞれ効率よく行わせることができる⁷⁾。この点をうまく説明する F_1 モーターモデルを、今作っているところである。

5. 一分子生理学

分子 1 個を観察し、必要なら操作を加えることにより、分子機械の働く仕掛けに迫る一分子生理学。なぜ分子 1 個を相手にする必要があるのか。

F_1 -ATPase のステップ回転を見ると、ステップのタイミングは確率的で、次のステップがいつ起きるかを予想することができない。いわば、各瞬間にサイコロを振って、出た目に応じてステッ

プするかどうかを決めている。ヒトの作るステップモーターが、必ず 10 ミリ秒ごとに 1 ステップというように、規則正しく動くのと対照的である。

分子機械の動きが確率的なのは、熱運動(ブラウン運動)のせいである。たんぱく質分子がヒトの大きさだとすると、周囲の水分子は大きさ・重さともにパチンコ玉程度。その水分子のブラウン運動の平均速度は何と時速 1000 km、ジャンボジェットなみで、音速に近い。この激しいブラウン運動にさらされて、しかもそれをうまく利用しながら働く分子機械の動作は、必然的に不規則な、確率的なものとなる。したがって、二つ以上の分子機械の動作を同期させることは、原理的に不可能なのである。分子機械を本当に理解しようと思ったら、どうしても 1 個 1 個が働くところを見ないといけない。

F_1 モーターの回転軸に小さな磁石を付けることはすでにできている。だから、もしたくさんの F_1 モーターがタイミングを合わせて一斉に回ってくれるのなら、マクロの磁気測定により簡単に回転が検出できるはずである。実際には動きがバラバラだから、止まっていないで動いているらしいぞ、と推定するのがせいぜいである。一方向に回り続けるのかどうか、あるいはどちらに回るのか、の判定など至難であろう。1 個を見てしまえばその場で、 F_1 モーターは反時計回り⁴⁾、RNA 合成酵素による DNA の回転は右ねじの向き¹¹⁾、ミオシン V のアクチン線維の回りの回転は左ねじ¹²⁾、とわかる。ステップの詳細解析となったら、一分子観察以外にはまず考えられない。

一分子観察のもう一つの御利益は、分子の個性が見えてくること、つまり個々の分子の振舞いは多数の平均とは異なることがわかることである。しかし本来、分子は均一なものとして定義されている。見かけ上の個性は、その分子のおかれた微環境ないし履歴のせいである。一分子観察のために無理やりガラス表面に結合させられた分子達は、そのせいでやむを得ず個性を発揮してしまうことも多い。実際、われわれの実験系では、99% 以上の分子がガラス面上で死んでいることが多い。そのような実験系で得られた結果に意味があ

るのだろうか。

一分子生理学では、「生きた」分子から得られた結果だけが論文に載る。死んだ分子は無視され、死にかけを数えるかどうかは実験者に任される。したがって、ほとんどの分子が生きているという幸運な実験系でない限り、単純な統計処理は客観性を欠く。それでどうして科学たり得るのか。われわれの基本的立場は、同一の分子が何度も同じ動作(例えばステップ)を繰り返す例を選んで、同一分子の複数動作に関する統計を取ることである。例えば連続 15 ステップ以上が観察された分子だけにつき、ステップ幅やステップ間の時間間隔の解析を行う。長時間統計なら意味がある、アンサンブル統計は要注意、というわけである。

そもそも、「生きている」ことの定義すら実験者任せである。生体内と同じ振舞いをしているのかどうかと問われても、(われわれは)まず答えられない。われわれの採用する定義は、「面白い」かどうか。分子モーターが相手なら、面白いのは、速く動くもの、長い距離動くもの、何回も回転するもの、などである。生体内では、分子モーターはほとんどの時間寝ているかもしれない。しかしわれわれは、寝ているモーターよりは、活発に動くモーターに興味を持つ。顕微鏡下でその精妙な動きを見てしまったら、たとえそれが非生理的な動きであろうと、仕掛けをどうしても探りたくなる。

報告したくなる。

ほとんどが失敗に終わる一分子実験。それでも、目の前で演じられる分子劇に魅せられてみたい、そういう人の参加をお待ちします。

[<http://www.K2.ims.ac.jp> に動画あり]

文 献

- 1) Boyer PD : *Biochim Biophys Acta* **1140** : 215-250, 1993
- 2) Oosawa F, Hayashi S : *Adv Biophys* **22** : 151-183, 1986
- 3) Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE : *Nature* **370** : 621-628, 1994
- 4) Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K Jr : *Nature* **386** : 299-302, 1997
- 5) Yasuda R, Noji H, Kinosita K Jr, Yoshida M : *Cell* **93** : 1117-1124, 1998
- 6) Adachi K, Yasuda R, Noji H et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 7243-7247, 2000
- 7) Kinosita K Jr, Yasuda R, Noji H, Adachi K : *Phil Trans R Soc Lond B* **355** : 473-489, 2000
- 8) Yasuda R, Noji H, Yoshida M et al : *Nature* **410** : 898-904, 2001
- 9) Noji H, Bald D, Yasuda R et al : *J Biol Chem* **276** : 25480-25486, 2001
- 10) Masaike T, Muneyuki E, Noji H et al : *J Biol Chem* **277** : 21643-21649, 2002
- 11) Harada Y, Ohara O, Takatsuki A et al : *Nature* **409** : 113-115, 2001
- 12) Ali MY, Uemura S, Adachi K et al : *Nature Struct Biol* **9** : 464-467, 2002