

生体膜で働くプロトン駆動のナノマシン

野地 博行

(東京大学・生産技術研究所)

1. 研究の狙い

ATP合成酵素は、直径・高さともに10~20nmの生体分子機械です。プロトン流で回転するFoモーターと、ATPで駆動するF1モーターが、互いの回転子と固定子同士で連結してできています。細胞内では、FoモーターがF1モーターを逆回転させ、F1モーターはその力学的なエネルギーを利用してADPとPiからATPを合成します。本研究では、ATP合成酵素のFoモーターがプロトン流で駆動して回転する様子の1分子観察を目指しました。また、これと平行して、F1モーターの回転子 γ を外力で回すことでその化学状態を制御できると考え、磁気ピンセットを用いた1分子操作システムの開発を行い、その機械的制御を試みました。これらの実験で、分子機械のダイナミクスを明らかにし、その設計原理の一端を明らかにできたと考えています。

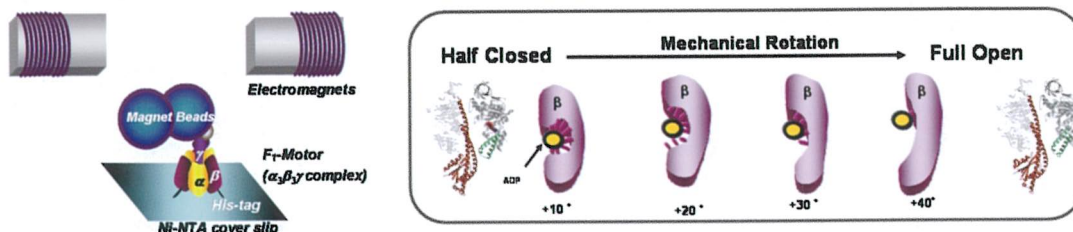
2. 研究成果と考察

(1) ATP合成酵素のプロトン駆動回転の1分子観察

この研究は、我々が1997年にF1モーターの単独回転の1分子観察に初めて成功して以来の最重要課題でしたが、残念ながら、未だに私達を含めどの研究グループも成功していません。それは、①ATP合成酵素を含んだ脂質二重膜を用意し100mV以上の膜電位を安定に与える、②膜中のATP合成酵素を基板の上に固定する、③さらに回転可視化プローブを接続する、以上の3点を同時に満たす実験系の構築がとても難しいからです。私たちは、当初、特殊な培養条件で巨大化した大腸菌の内部にできる直径3~15 μ m液胞様膜構造(Provacuole)を利用することを試みましたが、その膜表面がDNAやタンパク質からなる複合体で固く覆われているために、プローブ接続や基板固定ができませんでした。現在は、新たに顕微鏡の試料面に作成した人工脂質平面膜を利用する実験に取り組んでいます。これまでに、電気容量0.35 μ F/cm²の脂質二重膜作成に成功し、そこにATP合成酵素を再構成することも出来ました。今後は、このATP合成酵素を基板に固定化し、可視化プローブを結合させることで、そのプロトン駆動回転の1分子観察を目指します。

(2) 磁気ピンセットを用いたF1モーターの機械的活性化

この実験は、一言でいえば「さぼっている分子を揺り起こす」です。最近のタンパク質の1分子観察によって、タンパク質はたまに自然に止まったりすることがわかってきました。F1モーターが回転の最中にたまに不活性状態となり停止します。そこで、本プロジェクトで開発した磁気ピンセット(下図右)を用いて、停止しているF1モーターの回転子 γ サブユニットを前に回してみました。すると、驚いたことにF1モーターはただちに回転を再開しました。停止しているモーターは、ATP加水分解の後に解離するはずのADPを強く結合して停止しています。この分子の γ を回転方向に押すことで、ADPを結合している β サブユニットの構造が開き(下図左)、ADPが外れやすくなったのだと思われます。また、逆回転させたときは、溶液にADPとPiを添加したときのみ高い確率で回転の再開が起きました。この場合、逆方向とはATP合成方向で、ADPとPiはATP合成の基質であることを考えると、F1モーターはATP合成を行うことで活性化状態に復帰すると考えられます。以上の結果は、酵素として初めてF1モーターが機械的に活性化できることを示すだけでなく、ADPとの親和性やATPの合成反



応を、回転子の向きだけで機械制御できることを示すものと考えられます。このような性質が、F1モーターの化学エネルギーと力学エネルギーの効率的なエネルギー変換機構につながると考察しています。

(3) 磁気ピンセットを用いたF1モーターの回転ポテンシャル測定

分子モーターは、ATP加水分解やプロトン移動などの反応を利用して、分子間ポテンシャルの形状を変化させることで一方向に運動します。つまり、ポテンシャルの形状を知ることは、その駆動原理解明の基礎となります。そこで、上記の磁気ピンセットを用いて、F1モーターの回転子 γ サブユニットと、それを取り囲む固定子である $\alpha 3\beta 3$ リングの間に働く回転ポテンシャルを実測しました。これは、タンパク質間のポテンシャルの詳細な測定の初めての試みでもあります。これまでに、ATP加水分解反応中に出現する主な状態「ATP結合型」「ADP結合型」「カラ型」のうち、最初の2つに関して互いによく似た谷型ポテンシャルが求まりました。ポテンシャルの傾き（トルク）は40~50pNnmで、これまでの粘性抵抗から求めたトルクと一致しました。興味深いのは、両者ともに、左右非対称な形をとっている点です。 γ の向きによって化学反応の速度定数が変わることを考えると、ポテンシャルの非対称性によって、次の反応が起こる確率を制御しているのだと考えられます。今後、残った「カラ型」ポテンシャルを求めることで、最終的なトルク発生メカニズムを考察する予定です。

3. 主な論文（その他査読つき英語論文5報）

- ・ Noji H, et al. (2001) J Biol Chem. 276, 25480-6.
- ・ Hirano-Hara Y, Noji H, et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA. 98, 13649-54.
- ・ Noji H. (2002), Molecular Motors, Manfred S (ed.), Wiley-VCH, 141-151
- ・ 野地博行(2002) 蛋白質・核酸・酵素, 47, 1174-11181