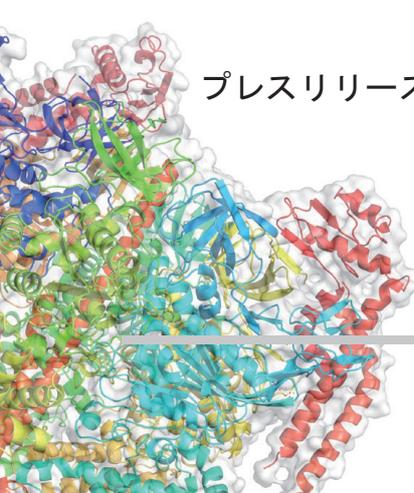


ISSN 2433-3387

年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2021
Institute for Protein Dynamics
Kyoto Sangyo University

巻頭言 (遠藤斗志也)	・ ・ ・	1
特別企画		
鼎談「リニアモーター (ミオシン) の場合」 (安藤敏夫・吉田賢右・遠藤斗志也)	・ ・ ・	3
鼎談「ロータリーモーター (V- and F-ATPアーゼ) の場合」 (横山謙・吉田賢右・遠藤斗志也)	・ ・ ・	15
研究会レポート「第15回小胞体ストレス研究会」	・ ・ ・	32
研究所の活動		
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	・ ・ ・	37
分子細胞生物学研究室 (潮田亮)	・ ・ ・	43
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	・ ・ ・	48
タンパク質構造生物学研究室 (津下英明)	・ ・ ・	51
膜エネルギー代謝研究室 (横山謙)	・ ・ ・	56
プレスリリース	・ ・ ・	60



2021年度

京都産業大学 タンパク質動態研究所

所員



遠藤 斗志也 (所長)



潮田 亮



千葉 志信



津下 英明



横山 謙

招聘教授



森 和俊
京都大学



嶋田 一夫
理化学研究所



Dr. Richard I.
Morimoto
Northwestern
University (USA)



Dr. F. Ulrich Hartl
Max Planck Institute
(GER)



Dr. Nikolaus
Pfanner
University of Freiburg
(GER)

巻頭言「化学の見方と物理の見方」

タンパク質動態研究所所長 遠藤斗志也

いまから半世紀近く前、学部4年で卒研のために研究室(宮沢辰雄教授)に配属されたとき、研究室はNMRの「ランタニドプローブ法」を使った生体分子の分子構造の研究に取り組んでいた。常磁性の3価ランタニドイオンが生体分子の特定部位(カルボキシル基やリン酸基)に配位すると、ランタニドイオンの常磁性によって周囲の核のNMRシグナル(緩和時間や化学シフト)が変化し、この変化はランタニドイオンと核との距離や方位角に依存するため、構造情報が引き出せる。問題は分子が1つのコンホメーションに固定されている場合は簡単だが、分子がフレキシブルな場合は話が複雑になることである。分子がフレキシブルな場合は、考えられる様々なコンホメーションについて、それらの存在率を仮定してNMRシグナルの緩和時間や化学シフトの変化を計算し、計算値が実測データによりよく合うように、存在率と分子構造のパラメータを逐次改善していくことになる。この場合、分子が1つのコンホメーションに固定されていると仮定して「平均構造」を求めてしまうと、現実の分子の構造のあり方を反映しない、意味のない構造が得られてしまう。こうした解析は回転異性体の発見者である東大理学部化学教室の水島三郎教授の流れを汲む宮沢研ではごく自然な流れであったが、世の中ではそうでもなく、オックスフォード大学の生体分子のNMR解析のパイオニアとも言えるべきグループでさえ、平均構造を求めようとする間違った解析をしてしまっていた。そんなわけで個人的には、学部生の頃から生体分子はフレキシブルであるのが当たり前であり、そうした揺らぎを考慮して構造を理解しなければならないという考えが、研究の基本的姿勢として身につけてしまった。これはタンパク質の様な巨大分子でも同じで、全体の大まかな構造はネイティブな構造として理解できるとしても細部の構造は揺らぎを考えないといけなわけである。

平均構造ではなくさまざまなコンホメーションの存在率を考えるというのは、分子がたくさん存在することを想定している。従来の分光学では集団の分子しか相手にできなかったから当然のことである。これはアボガドロ数の分子を取り扱う「化学的」な見方とすることができる。ところが1980年代くらいから1分子を見る1分子計測法が登場して、生命科学に大変革が起こった。多数の分子の平均値や存在率ではなく、1分子のふるまいを長時間にわたって高い時間分解能で追跡するこの計測法は、生体分子を「生物分子機械」として理解しようという、いわば「物理的」な見方を可能にした。しかし分子レベルで考えた場合、化学の世界でも従来の生化学でもあたりまえであった平衡定数のもとより、ギブスエネルギーやエントロピーといった熱力学的概念はどうなるのか・・・個人的には当惑することだらけだった。幸いネイティブ状態と変性状態の二状態転移を行うタンパク質

は、両者が同数存在する変性中間点(熱変性の変性温度など)では、一分子計測では時間とともにネイティブ構造と変性構造の間をジャンプする様子が観察され、従来の分光学で得られるタンパク質の集団平均は、一分子計測においては長時間の時間平均と同等と考えればよいことがわかって、つじつまが合うこととなった。当初の一分子計測は、実際には分子そのものを見るのではなく、分子につけた大きなプローブの観察を通して分子のふるまいを見るものであったが、やがて分子に結合した小さな蛍光色素を一分子レベルで観察したり、高速原子間力顕微鏡で分子のおよその形を観察する方法が開発され、生物分子機械が動く様子を高い時間分解能で追跡できるようになってきた。さらには細胞内の1分子蛍光顕微鏡観察やクライオ電子線トモグラフィにより、細胞内の1分子のふるまいの時間変化や1分子の構造状態を見ることも可能になりつつある。

今日では生化学的実験による分子集団の機能解析で得られた知見と1分子計測による分子のふるまいの知見を合わせて、生体分子が動き、働く様子を記述し、そのメカニズムを考えることができるようになってきた。こうした理解は、特に「動くこと」が仕事の分子モーターの研究分野で進んでいる。マクロの世界の機械と同様にタンパク質の構造変化と動きが共役する「パワーストローク」と、熱的な構造揺らぎの中から方向性をもった揺らぎだけを取り出すことで動くミクロの世界ならではの「ブラウニアンラatchet」、モーターを動かす原動力となるATP加水分解反応とモーターの仕事が1対1できちんと共役する「タイトカップリング」とそれらが共役せずに1分子の加水分解での動きの大きさがバラバラになる「ルースカップリング」といった、様々な対立する概念やメカニズムが議論されてきた。こうした議論は、タンパク質の膜透過(サイトゾルで作られたタンパク質がオルガネラ膜を通過してオルガネラ内に入るなど)やタンパク質をほどこいて分解する装置(プロテアソームなどのATP依存性プロテアーゼ)においても有効で、膜透過や分解装置におけるモーターの実体、基質の膜透過やアンフォールディングの原動力やメカニズムを考える際に、大いに参考になる。ただ、分子モーター分野のこれらの議論が、測定法の技術的進歩や研究の進展により、どのように進み、コンセンサスが形成されてきたのかは、分野外の人にはなかなかキャッチアップしにくかった。

そこで今回は直線的に動くリニアモータータンパク質を代表するミオシンと回転モータータンパク質を代表するATPシンターゼについて、それらが動いて働くメカニズムが現在どのように考えられているのか、高速原子間力顕微鏡のパイオニアである安藤敏夫さんとF1-ATPアーゼの回転を世界で最初に観察した吉田賢右さんをお招きして、2つの鼎談で詳しく伺うことにしまし

た。かなりマニアックな内容ではありますが、最新のモータータンパク質の作動機構の理解はどうなっているのか、他では見られない突っ込んだ議論をすることができたと思います。また、この2年間新型コロナウイルスの感染拡大により、動態研としてのイベント企画などができませんでしたが、今年に入ってから、「小胞体ストレス研究会記念大会」(本研究所の潮田准教授が大会長)を動態研として共催いたしました。2回の延期を経ての執念の開

催でした。本年報は2021年度の年報となりますが、充実した内容をホットなうちにご報告の方がよいと思い、今回の年報でその開催レポートを掲載することにしました。鼎談企画とともにお楽しみいただければと思います。

(2022.9.29)

リニアモーター（ミオシン）の場合

安藤敏夫・吉田賢右・遠藤斗志也

安藤 最初に用語の説明をします。図1を見て下さい。ブラウンアンラチェットとパワーstrokeという言葉(Kolomeisky, CRC Press 2015)。連続体のラチェットというのは、化学状態に依存してエネルギー地形図が変動する。例えば化学状態1と化学状態2があって、化学遷移とともにポテンシャルが動くと、変動したエネルギー地形図に沿って物が動く。これがいわゆるブラウンアンラチェットというもので、理論家によっては興味のある対象なんではしょけれど、実際にはこれで運動が起こることはない。というのは、理論的な解析から、負荷に弱いとか、エネルギー効率が悪いってことが知られているので(Wagoner & Dill, J. Phys. Chem. B 2016)、実際の生体分子モーターではこういうことは起こりません。

例えばももとのアイデアでは、横軸がアクチン線維の場合、モノマーごとの結合サイトが飛び飛びにあって、各々が図のようなポテンシャルを持っている。そしてポテンシャルに沿って、物が滑って動くということだけど、実際にはそういうことは成り立たなくて、滑って動くというよりは結合部位から結合部位に飛びってことですね。今は皆、そういうように考えているんじゃないかと思います。

もう一つのモデル(右)は、パワーstrokeモデルよりもちょっと上位に位置する概念なんですけど、結合サイトがとびとびにあって、そこに結合しているときに化学反応が進展する。化学反応の進展のどこかで飛びが起こるという考え方です。これがパワーstrokeモデルの上位モデルなんですけども、この化学状態のいずれかの遷移のどこかで物理的な変位が起こると。変位が構造変化によるとするのがパワーstrokeモデル。ただし上位の概念では、構造変化ではなく化学遷移(トランジション)という言い方をします。化学遷移によって物理的には変位が起こると。

次に、ルースカップリングとタイトカップリングという言葉で

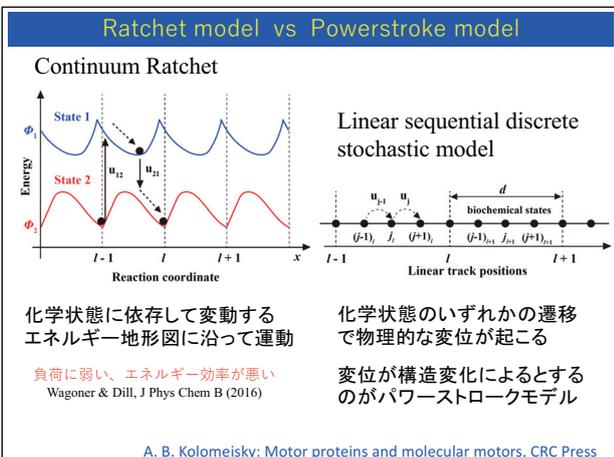
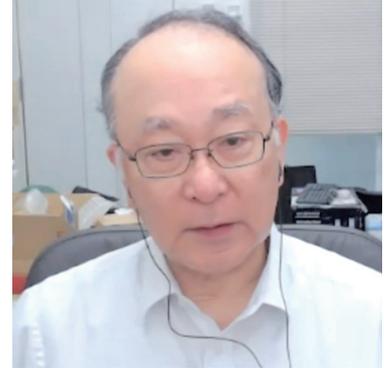


図1 ラチェットとパワーstroke

す(図2)。最近はまだあまり使われなくなっていますが、というアイデアかというところ、ルースカップリングではATPase反応と運動、もしくは変位が1対1に対応しない。ミオシンの場合で言えば、ATP1分子の分解ごとに運動する



安藤敏夫(金沢大)

ステップ数は1とは限らず、複数回ステップし得るとするのがルースカップリングモデルです。ももとは大澤文夫先生の発想ですけど(Oosawa & Hayashi, Adv. Biophys. 1986)、負荷なしの条件でも1ステップ動くのにATP1分子を消費するのはもったいない、無駄ではないかという発想からきているんだと思います。だから1ATPで何歩も動くことがあり得ると。筋肉では1ATPでミオシンが600nm動くという論文が、以前出ました。しかし私のところの学生だった坂本武史君が、蛍光ATPとミオシンVの両方を可視化して、ATP1分子の分解ごとに一歩歩いてることが証明された(T. Sakamoto et al., Nature 2008)ので、このアイデアは今では成り立たないと思います。

Loose Coupling Model

ATPase 反応と変位(運動)が1:1に対応しないとするモデル

例: Myosinの場合、ATP 1分子の分解毎に運動するステップ数は1とは限らず、複数回ステップし得る

Myosin Vの実験により完全に否定された

T. Sakamoto et al. Nature (2008)

Loose couplingのアイデアは、負荷なし条件下でも1ステップするのにATP 1分子を消費するのは無駄ではないか、という発想から来ている。

図2 ルースカップリングとタイトカップリング

そこで、パワーstrokeモデルです(図3)。パワーstrokeモデルも、狭義の定義と広義の定義があるんですけど、ここでは狭義の厳密な定義をします。構造変化そのものが前方への変位力発生であるとするのがパワーstrokeモデルだと定義すると、ミオシンVの場合はパワーstrokeモデルは厳密には成り立たないと言えるかと思いますが。以下、詳しく説明します。

生体分子モーターもしくは生体エネルギー変換ということ考えたときに、ATPないしはGTPの加水分解で供給されるエネ

Powerstroke Modelは完全に正しいか？

構造変化そのものが前方への変位（力発生）であるとするのがパワーstrokeモデルだと定義すると、

パワーstrokeモデルは、Myosin Vの場合、正確ではない（高速AFMによる観察結果から）

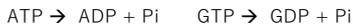
以下、詳しく説明する

図3 パワーstrokeは正しいか？

ルギーが仕事に変換されるというのが一般的な考え方ですよ。例えば ATP 分解反応ですと、反応サイクルが回っていて、各ステップでギブスエネルギー変換がある。そのうちのどれかが仕事に使われる、仕事に直接変換されるという考え方です（図4）。ですから、生体分子モーターの研究者の多くは、どの ΔG が直接仕事に使われているのだろうか、そういう問いかけをするわけです。

それに対してわれわれの問い方は、ATP、GTP 以外のエネルギー、つまり、ATPase、GTPase の反応サイクルの ΔG 以外の所から来るエネルギーが仕事に直接使われることもあり得るのではないか。ATP、GTP 分解酵素のモーターであっても、仕事に使われるエネルギーは加水分解反応のステップではなく、他の場所から来ている、他から来たエネルギーを使っていることもあり得るのではないか、というのがわれわれの問いです。

力学的仕事に変換される直接のエネルギー源は何か？



$\Delta G \approx -20 k_B T$

は 100% もしくはそれ以下が力学的仕事 (W) に使われる
100%より少ない場合、 ΔG は部分的に熱になるか他の形の自由エネルギーに変換される

ATPase/GTPase反応は複数のステップを経て進行する

- ・どの ΔG が直接Wに使われるのか？
- ・ATP/GTP駆動のモーターでATP/GTP以外のエネルギーがWに直接使われることはあり得るか？

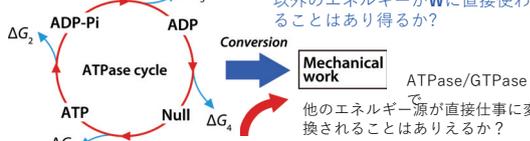


図4 力学的仕事に使われるエネルギーはATP/GTPから来るのか？

ご存じのように、ミオシン（図5はミオシンV）は筋肉の分野ですごく多くの人によって長く研究されてきており、そこでは広く受け入れられている説があります。それによれば、ATPの加水分解反応のATPがADP+Piに分解されるステップ（図6のA+M-ATPからA+M-ADP+Piになるステップ）で、足のモータードメイン（頭部）とネックの間の角度がぐんと変わる（リカバリーストローク）。この曲がった構造はブレパワーstroke構造といわれます。これがアクチン線維に結合してリン酸が外れるとパワーstrokeが起こる（図6のA-M-ADP+PiからA-M-ADPになるステップ）。つまり、リカバリーストロークで起こった構造変化が元に戻るという考え方です。リカバリーストロークのときはアクチンに結合していなかったので何もしないわけですけど、今回はアクチン結合しているので、アクチンを後にキックす

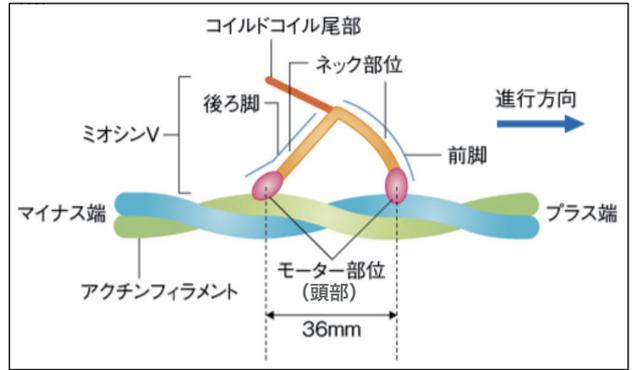


図5 ミオシンV

ることになります。アクチンをキックして、一步、動く。この考え方に従えば、リン酸で放出されるエネルギーが仕事に変換されると考えるわけです。図6下に $10 k_B T$ とか $2 k_B T$ 、 $8 k_B T$ って書いてありますが、これは測定の仕方によって多少変わってくるので必ずしも正確ではないですが、いずれにしても、このリン酸の放出で解放される ΔG が直接、仕事に使われているというふうに皆さん考えているわけです。そんなにおかしくはないですよ。おかしくはないんですけど、われわれは、これはおかしいというふうに言っているわけです。

筋収縮のエネルギー利用に関する一般的な考え方

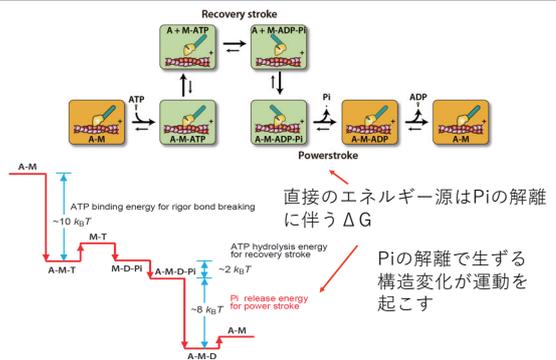


図6 ミオシン歩行におけるギブスエネルギー変化

というのは、この考え方に反すると思われる現象をわれわれは捉えてるからなんです。そのうちの一つが、ミオシンの足はそのままで尻尾（尾部）の半分を切ったフラグメント、よく HMM (heavy meromyosin) っていうんですけど、これをアクチンにADP存在下で結合させて、高速AFMで観察します（図7）。ここで一つ注目したいのは、ミオシンの二足歩行で前足と後足が同時にアクチンに結合するためには、前足にリカバリーストロークが起こっていないと行けない（図6）。ところが加水分解が起こらないADP存在下でも二足結合が起こるので、リカバリーストロークは熱的揺らぎでも起こるんじゃないかということが示唆されます。このAFM観察では、尻尾の部分のコイルドコイルがほどけて、その後前足がパワーstrokeのように回転してる（これをレバーアームスイングと言う）わけです（図7）。これはAFMの探針によるアーティファクトだ、分子を壊してるんじや

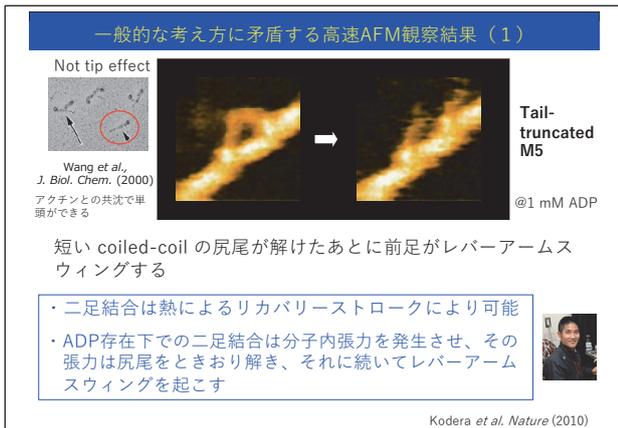


図7 ADP存在下でも尻尾がほどけて前に進む

ないか、ということも言われるんですけど、生化学的な証拠からも、こういう単頭ミオシンができるということが報告されています (Wang et al., JBC 2000)。いずれにしても短い coiled-coil の尻尾がほどけるほど、この二足結合しているミオシン分子には、分子内張力が発生するという事なんです。尻尾がほどけた後に前足がスウィングする、ということは、レバーアームスウィングのエネルギーは、二足結合だけで生じ得るということを示唆してるんだと言えます。

もう一つは、低濃度 ATP 存在下で観察される前足の足踏み (ストンピング) という現象があります (図8)。これは、一度前足がアクチンから解離して再着地して、その後一步前進するという現象です。これを断定はできないんですが、リン酸の放出はすごく速い。すなわち ADP リリースが律速で、リン酸リリースは律速ではないということが知られているので、ミオシン V がアクチンに結合をした直後には既にリン酸が放出されているはずで、前足にはリン酸が結合していない。しかし、それが再着地した後にレバーアームスウィングするということは、リン酸放出が起こらないヘッドでパワーstrookが起こるということです。これは従来説に矛盾するということになると思います。たとえば、リン酸の解離に伴う ΔG が構造歪みに使われたとしても、頭部がアクチンから解離すると構造歪みのエネルギーは素早く熱の形で散逸し

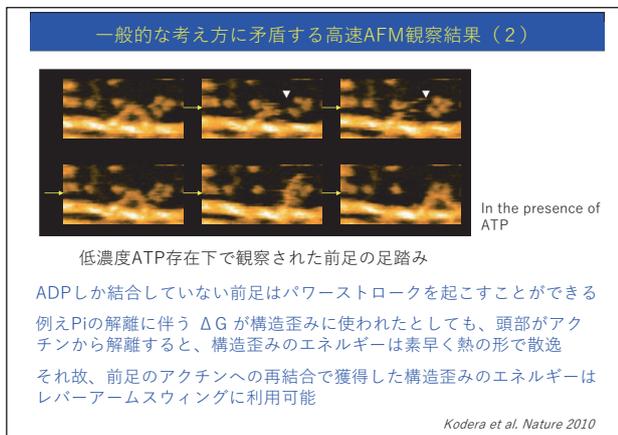


図8 リン酸放出後に前足が再結合してからでも、前に進む

てるわけで、足踏みした後の前足には、ATP 加水分解後のリン酸放出に伴うエネルギー、 ΔG はもうないはずで。しかしパワーstrookしているということになります。

以上、二つのことを考えると、前足のアクチンへの再結合、フットストンピングの場合は、前足のアクチンへの再結合で獲得した構造歪みのエネルギーは、レバーアームスウィングに利用可能であると。つまり ADP 型でも、アクチンに結合していると構造歪みが生じて、後ろ足が解離すれば、あるいは尻尾が切れてコイルドコイルがほどければ前足は回転する、レバーアームスウィングするわけです。つまりレバーアームスウィングの直接のエネルギーは、ATP 加水分解から来るのではなく、アクチンとミオシン間の強い結合エネルギー、大きな結合エネルギーから来ているということになります。例えば ADP 存在下の場合、この結合エネルギーの ΔG は $14 \sim 16 k_B T$ と、かなり大きいです。ここに構造歪みが生じると、図9で示すようにエネルギーが一部使われて、その分結合が弱くなる、つまり構造歪みがあるときの結合エネルギーは小さくなる。だから、レバーアームスウィングという力学的な仕事の直接のエネルギー源は、ATP 加水分解とは無関係に、アクチン-ミオシン間の強い結合であるというのがわれわれの説です。それでは ATP 加水分解のエネルギーはどこに使われるかというと、力学的な仕事ではなく、後ろ足のアクチンからの解離に主に使われていると考えられます。

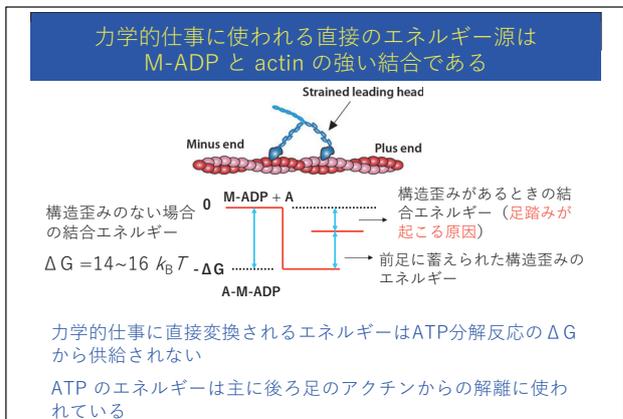


図9 前足の結合エネルギーは構造ひずみを生み出す

遠藤 すみません、力学的仕事というのは、前足の話をしてるんですか？でも、前進するのは後ろ足が前に来るから前進するのですよね？

安藤 そうです。だけど、それは前足が回転 (スウィング) するからです。前足が回転するから後ろ足は前に進めるわけです。前足のレバーアームスウィングによって一步前進する運動が力学的仕事になります。

遠藤 でも、そうするとストンピングをすると ATP の加水分解 1 回分の ΔG は、1 回のストンピングでも使われてしまうんです

よね。

安藤 そうです。

遠藤 それで結合しますよね。結合して張力が蓄えられて、またスイングするのにその結合エネルギーが使えるということだと、永久機関になってしまいませんか？エネルギーなしに何回も力学的仕事をするっていうのはおかしいですよね？

安藤 いや、使われてるのは図9の結合のエネルギーです。もともと結合エネルギーが大きいので、構造が歪んだとしても、結合してしまうわけです。それで歪んでフットストンピングします。そうすると歪みのエネルギーはなくなりますね。それでまた再結合すると歪みのエネルギーを獲得します。だからフットストンピングというのは一度エネルギーを獲得したけど、それを熱の形で放出してしまって、再結合によってまたエネルギーを獲得して、その再結合で獲得したエネルギーを仕事に変換してるわけです。だから一度獲得したエネルギーを何回も使ってるわけではないです。

遠藤 なるほど。ちなみにこれは、後ろ足の話とは別ですね。

安藤 そうです。後ろ足は前足を引きとめておくっていうか。後ろ足が結合してなかったら、前足は結合に際して歪まないわけです。

遠藤 だから、これがモーターとして進むのは、前足のスイングによって後ろ足が解離して回って進むわけで、そっちはATPのエネルギーが進むのに使われてると。前のほうがくっ付いたり離れたりするときに仕事をしてるのは、くっ付いた時に獲得したエネルギーが単に放出されているだけだと、そういう解釈ですか。

安藤 そうです。これ、卑近な例ですけど、弓を想定していただくと、弓矢っていうのは引くわけですよね。離すと飛んでくわけですけど、それと似たようなことで、図9でこういうふうに前足が弓なりになってエネルギーを蓄えて矢を飛ばす、後ろ足を前に出すと。

遠藤 でも、くっ付いた状態ってのは、かなり無理な状態でくっ付いてるんですよね。無理な状態でくっ付くのは、単に結合のエンタルピーで補償されてるってことですよね。

安藤 そうです。それで補償されてるわけです。だけど、歪んで結合するので、実際の結合エネルギーそのものは小さくなってしまっているわけです。

吉田 仕事に使われるATPのエネルギーは、加水分解とは違ったところから来ると言ってるけれども、結局これは物理的過程、つまりATPが結合して分解して、酵素上にADPが出現することが必要なわけで。ミオシンの上でATPが加水分解される過程だけを見るとエネルギーが生じてない、図6でATPとADP+Piは平衡状態にあって、そこではエネルギー差が生じていないということですよね。要するに、ATPが大事なのは、ADPを生じるためにATPは必要なんで、結局のところ、ADPやPiの解離かな、そのところで仕事に使われるエネルギーが出てくるということですよね。

安藤 はい。

吉田 だから、全体として見れば、ATPで加水分解がもちろん動いているんだけど、もっと微視的に見たら、ATPの加水分解のステップでは仕事に使われるエネルギーは出てないということですね。

安藤 ほんのわずかであると。

吉田 それは分かります。大体、近頃の酵素学では、例えば、別にモーターでなくても、ピルビン酸キナーゼとかヘキソキナーゼとか、ああいう酵素も、酵素上でATP加水分解のところではほとんど平衡状態で、結局結合のアフィニティのところ、使われるべきエネルギーが出てるんですよね。で、安藤さんの主張は、無機リン酸Piの解離から仕事を取り出ししてるのではなくて、ADPの解離のところから仕事のエネルギーを取り出ししてる、そういうお考えですね？

安藤 いや、違います。図6下のA-MからA-M-Tの $10k_B T$ というのは、アクチンとミオシンの強い結合を解離するのに使われてますよね。次にA-M-D-PiからA-M-Dの $8k_B T$ ですけど、これは確かに大きなエネルギードロップがあるんですけども、このエネルギーは力学的仕事には使われてないというのが私の考え方です。もちろんこのエネルギードロップは反応全体を1方向に進ませるには、絶対必要なんです。これが小さかったら反応が逆戻りしちゃうわけで。

ただ、ここで私が一番言いたいことは、A-M-ADP-Pi状態からA-M-ADP状態に行くところ(図6上)でパワーストロークという力学的仕事に使われる直接のエネルギー源は何かという問いです。私の答えは、Piの解離に伴う ΔG は、パワーストロークという力学的仕事の直接のエネルギー源ではありません。直接のエネルギー源はA-M-ADPからA-M-ADP with strainの状態(図9)に行くところの結合エネルギーであると。

吉田 そうするとPi解離のところから出る $8k_B T$ は反応を前に進

めるためのものであって、仕事ではなく熱になってしまっているということですか。そうするとエネルギー効率が悪い、6割とかになってしまうんですかね。

遠藤 そうすると Pi 解離の $8k_B T$ には、前に進むと言った生理的意味はないんですね。

安藤 そうです。フットストップは低濃度 ATP でしか観察されない現象なわけです。われわれの高速 AFM 以外の方法でもフットストップは観察されているわけですが、それによれば、ATP 濃度を上げていくとフットストップは起こらない。だからフットストップそのものは生理的に意味があるということじゃなくて、どういふふうにしてエネルギーが使われるか、もしくはどういふふうにして運動が起こるかということ、その仕組みを示唆することができるというだけで、生理的な条件下でフットストップが起こっていると言っているわけではありません。

遠藤 それから、これ ADP が過剰な状態で見てるから、ADP がくっつきっぱなしだって言ってますけれども、離れてまたくっついてもいいわけですよね。だから、前足が結合しているときは ADP 型だけど、前足が離れたら ADP 離して、また ADP が前足にくっ付いたら前足がアクチンに結合するって、そういう解釈でもいいような気がするんですけど、そこは違うんですか。

安藤 いや、いいじゃないですか。ただし、ADP が過剰な状態では見ていません。フットストップは低濃度 ATP 下で観察しています。

遠藤 そういうほうが理解しやすいような気がします。

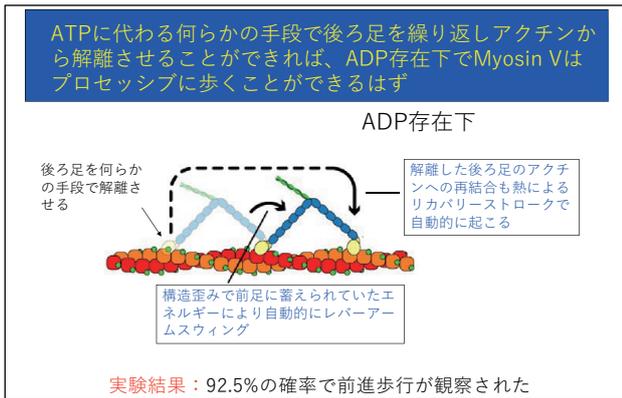


図 10 後ろ足を人為的に外せば、ADP 存在下でも前に進む

安藤 それでは先に進みます。図 9 の説が正しいかどうかというのが一番の問題で、これは、われわれの高速 AFM の観察結果から導き出した結論であって、証明はできてないんです。もし、われわれの説が正しければですけども、ADP 存在下で、後ろ足を ATP に代わる何らかの方法で離すことができれば、この分子

は絶対に一步進むはずであると (図 10)。なぜなら、この分子には既に分子内張力が蓄えられていて、後ろ足をアクチンから解離させれば、前足が自動的に回転するはずなわけです。前足が自動的に回転すると同時に、図 10 で「リカバリーストローク」がないとうまく結合できないわけですけども、ADP 存在下でも二足結合が起こっているということは、リカバリーストロークは熱エネルギーだけで起こり得るはずだと。

だから、われわれの説が正しければ、簡単に言えば、後ろ足をアクチンから解離させればこの分子は必ず一步前進するはずで、それを実験で示してあげればいいわけです。そこで、ここで AFM の探針で強くたたいて解離させるということ Interactive 高速 AFM でやればよいと考えました。これはミオシン V のために私が思い付いたアイデアなんですけど、実際にまだ論文にはなっていません (ただしこれを使った論文は既に出ています: Owa et al., Nat. Commun. 2019; Konno et al., J. Mol. Biol. 2018)。ユーザーが指定した場所に針を押し込むという、そういうアイデアで、技術的にはとても簡単なことなんですけど、それをこの ADP 存在下でやってみると、後ろ足をたたくと前に進んでいくのが観測されました。これを繰り返していくとミオシンはどんどん前に進んでいくので、分子が壊れてるんじゃないかと思う人もいると思うんですが、たたいた後に Caged ATP で ATP を放出させて、ATP で前進するかどうかを見ると、ちゃんと進む様子が観察できます。つまり、進んでいくミオシン分子は壊れていないというわけです。

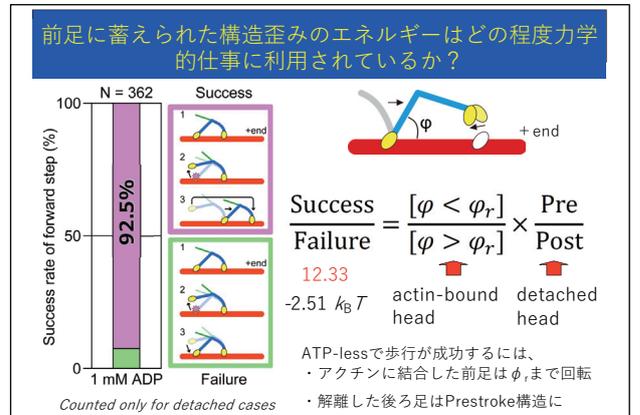


図 11 前足に蓄えられうる構造歪みエネルギーを見積もる

今の Interactive 高速 AFM の実験で、後ろ足をたたいて前に進むには何が起こらなければいけないかというと、図 11 でまずこの前足、ゆがんでいた前足が、ある程度以上、回転しなければいけないわけです。ある角度までスウィングするというプロセスと、解離した後ろ足が前の方に来たときに、リカバリーストロークのようにヘッドがプレ・ストローク・コンホメーションに変わらなければいけないわけです。そうして初めて、解離した後ろ足がこんどは前足となり得るわけです。この高速 AFM の実験を何回も繰り返して調べると、後ろ足をたたくとミオシンが前に進む成功率は 92.5%にも達します。それは、さっきの前足の回転がある角度以上起こること (図 11 の Success/Failure の式の右辺の角

度の項)と、リカバリーが起こること(同式右辺のPre/Postの項)、この二つの比の積になります。詳細は未発表データなので省略しますが、リカバリーストロークを起こすのに必要なエネルギー(図11の右辺のPre/Postの項)は $3.18 k_B T$ と求まります。ATPによるリカバリーストロークよりも効率悪いので遅いのですが、約 $3 k_B T$ という値から、熱的にもプレ・ストローク・コンホメーションに変わるためのリカバリーストロークが起こり得ると言えますし、実際ADP存在下でも二足結合が観察されるわけです。そうすると、今、前進の成功比($-2.51 k_B T$)と、熱的なリカバリーストロークのエネルギーが $+3.18 k_B T$ と求まったので、今度は前足のスイング、ある角度以上スイングするのに使われるエネルギー(図11の右辺の角度の項)がどのくらいかを計算できます。その結果は $-5.7 k_B T$ となります。従って、負荷なしの条件で行われる力学的仕事は、このぐらゐの構造歪みのエネルギーが必要であるという見積りを行うことができました。

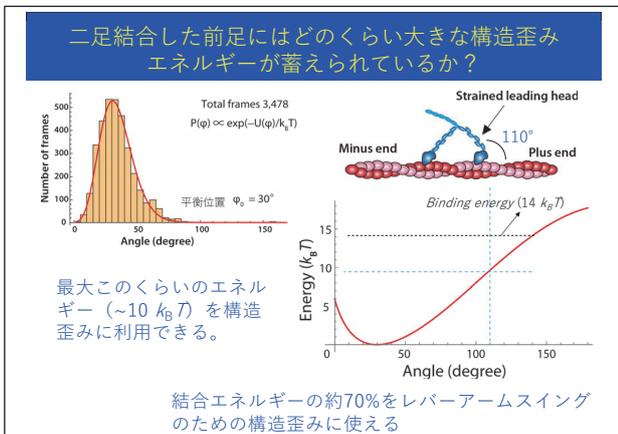


図12 実際に前足に蓄えられた構造歪みエネルギーは？

次に coiled-coil がほどけて単頭になったミオシンVとアクチンとの結合角度(ϕ)の角度分布を調べました(図12左上)。平衡のときの角度は 30° ですが、広く分布しています。この分布、平衡からずれたときの分布からバネ定数、もしくは平衡点からずれたときのエネルギーを計算することができます。ここでさっきの $-5.7 k_B T$ を使うと、角度 ϕ が 76° 以下になると結合できるということになります。 76° ってちょっと大きいんじゃないかと思われるかもしれないけれど、フレキシブルなので 60° 以上あっても結合することはできるということになります。

まとめると、力学的仕事に使われる直接のエネルギーは、ATPの加水分解からは来ておらず、アクチンとミオシン間の強い結合から来ているというのがわれわれの結論です。だから、生体エネルギー変換で、いつも力学的な仕事はATP、GTPから来ると言われてきましたが、必ずしもそうでなくていいということが証明されたと思います。あと、この構造歪みによってどのくらいの大さきまでの仕事ができるかって計算してみたんですけど、結合エネルギー $14 k_B T$ に対して前足は 110° まで歪んでるんですけども(図12右上)、このとき前足に蓄えられたエネルギーは $9.6 k_B T$ になります(図12右下)。したがって、結合エネルギー 14

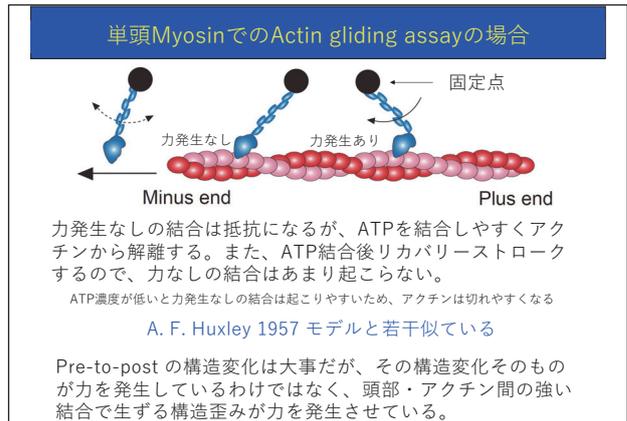


図13 単頭ミオシンが動く場合は？

$k_B T$ のうち約 $10 k_B T$ は構造歪みに使われている、つまりミオシンVができる仕事は結合エネルギーの70%、最大 $10 k_B T$ であるということを見積もることができました。

あと、これ前から言おうと思って、言う機会がなかったんですけど、双頭のミオシンVの歩行運動の他に、例えば単頭でもアクチン動くわけですよ(図13)。In vitro モテリリティアッセイみたいに尾部のところを固定しておいてアクチンを加えると、アクチンが1方向に進むわけです。その現象とわれわれの観察結果をどういふふうに結び付けることができるかという問題があります。例えば図13左のように単頭ミオシンは尾部を固定してもぶらぶらして、ある程度いろんな角度で結合できるわけですが、図13中央のような角度で結合すると何も力は発生しない。一方で、熱的に頭部のところがゆがんでプレパワーストローク構造になって図13右のような角度で結合すると、構造歪みのエネルギーを使ってアクチンを押し出すことができるというわけです。もちろん、力発生なしの結合(図13中央)が頻繁に起こると、抵抗になって動けなくなっちゃうわけですが、図13中央のような角度で付いた頭部にはATPが結合しやすいというか、ADPは解離するので、ATPはすぐ結合する。一方で、図13右のような角度で結合すると、構造がゆがむとADPの解離ができなくなり、新しいATPやってくれないというわけです。したがって、図13中央の状態にはATPが付くので、力の発生なしで結合しても大きな負荷にはならない。熱的に揺らいでいて、図13中央のような角度で付いたり、図13右のような角度で付いたりして、図13右のような角度で付いたときにのみ力が発生すると、そういう考え方なんです。

これは、1957年のA.F. Huxleyのモデルと若干、似ているわけです。彼がどんなことを考えたかっていうと、図14が有名だと思うんですけど、アクチンフィラメントがあって、上側がミオシンフィラメントで、アクチン上のミオシン結合部位が右側にある。ミオシンは中央で左右にぶらぶらして、右に動いたときにアクチンに結合できる。したがって、アクチンに結合すると、左側に力を発生させるわけです。彼が考えたのは右に動いたときには結合する確率があり、左に動いたときには結合しないで解離して

しまう。こうやって右側で結合して、左に動いてきたときに解離するわけです。結局、平衡点からずれて結合して、それでエネルギーを蓄えて、そのエネルギーを使って運動が起こるとというのが彼の考え方なんですけど、非常に本質を突いてるんじゃないかなと、われわれの結論（図 13）とよく似ているというふうに思います。以上です。

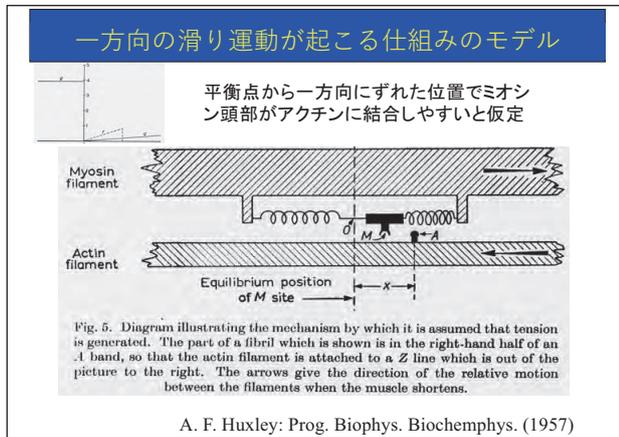


図 14 Huxley のモデルと似ている

吉田 図 13 の絵で見ると、何もエネルギーを与えなくても、ADP 結合したほうで動けば何もしないでも動いてしまうように見えるけども・・・そうか、ATP を加えてやらないと、「力発生なし」型の方が解離しないので動けなくなるということですかね。

安藤 そうです。

吉田 だから ATP が必要な理由というのは、「力発生なし」型のほうの抵抗になる部分を解除するために必要だったことなのですか？

安藤 そうです。力を発生して「力発生あり」型から「力発生なし」型に移りますよね。しかしそれで結合したままになると動けない。結局 ATP のエネルギーは解離させるため使われてるわけです。

遠藤 これはパワーstrokeのような、でもパワーstrokeとも違う。これ、何て呼ぶんですか？

安藤 名前がないです。従来のパワーstrokeモデルっていうのは、「力発生あり」型から「力発生なし」型へ構造変化すると。その構造変化そのものが変位を生み出す力であると言うわけです。それに対し、われわれのモデルでは、確かに構造変化は起こるけども、ATP は直接その構造変化、すなわち力学的な仕事もしくは力発生に使われていないということです。

遠藤 ATP は反応をマルチプルラウンドにするために使われて

るんですね。

安藤 そうです。

遠藤 だけど、さっきのストンピングのことを考えると、安藤さんの Nature 論文では、前足の方はストンピングしても動くということにはならないけど、後ろ足は 3 分の 1 くらいの頻度でストンピングするという話ですよ。

安藤 フットストップというのはアクチンから離れてまた再結合する、これが正確な意味でのフットストップです。それに対してアクチン上を滑るのはスライディングと言います。実はあの論文ではスライディングとフットストップをごちゃまぜにして書いてしまっていて、後ろ足がフットストップするって言うんですけど、あれは正確じゃなくて実はスライディングが起こってるんです。

遠藤 後ろ足は離れないで滑る。グルッと回らないんですか？

安藤 回らない。というのは、二足結合をしたときに、図 12 の右上の歩幅ですが、歩幅は少しばらつくわけです。少し遠い場合もあるし近い場合もあるわけです。でも一番安定な距離っていうのはあるんです。だから、大きめの歩幅でくっ付きちゃった場合は、後ろ足がズルッと動く、スライディングすると。

遠藤 でも、なんで離れないんですか。前足は離れるのに。

安藤 それは後ろ足が歪んでないからです。先ほどの話（図 9）に戻りますが、前足では歪みのエネルギーに結合エネルギーが使われるので、結合エネルギーは弱くなってしまいます。だから前足ではフットストップが起こるわけです。それに対して、後ろ足は歪みがないので、結合エネルギーが弱まることなく使われているので、離れることができないんです。滑ることはできるかもしれないけど。

遠藤 確率が 3 分の 1 くらいでも後ろ足が離れるんだったら、それでピュッと前に行ってしまうって、ADP だけでどんどん進んでしまうように思ったんですけど、それは起こらないんですね。つまり結合した足の歪みが結合、解離を支配してるんですね。

安藤 そうです。

遠藤 ただ、こういう話ってすべて ΔG で議論してますけど、本当はエネルギー障壁、活性化エネルギー (E_a) が支配するキネティクスで説明しなきゃいけないような気がするんですが、それは大丈夫なんですか。ある時間内に何が起こるかを考えるときには、

抵抗じゃなくてむしろ活性化エネルギーがどのくらいで起こるかを考えなければならぬのに、今回はそういう話が全然出てこないですね。活性化エネルギーが低いんですかね。

安藤 例えば図9の前足は、もともとゆがんで高エネルギー状態にあるわけですよね。それが右側に倒れるっていうのは、別にエネルギーの山を越える必要はないですよね。山を越えずに、ズルッと下るだけでいいわけですよね。

遠藤 全部、ギブスエネルギーだけで話が成り立つ世界なんですね。

安藤 はい。もちろん、後ろ足が離れるにはエネルギー障壁を越えなければいけないですけど、前足に関してはエネルギー障壁の山がないですね。

吉田 図9ですが、今のお話ですと、後ろ足のほうが結合が強そうなこと言われてましたけど、そうすると、後ろ足は離れることができないんですか。

安藤 後ろ足ではフットストンプは起こらないですね。

吉田 ATP が加水分解されると離れやすくなるということなんですか。

安藤 はい。実際、高速 AFM の観察結果によれば、後ろ足では本当にアクチンから解離するフットストンプという現象はめったに見えません。

吉田 そうすると、どうやって後ろ足が離れて前に出られるんでしょうか。

安藤 いまの話は ADP 存在下です。ADP 存在下では二足結合したミオシン V の後ろ足が、アクチンから離れるという現象はほとんどありません。フットストンプは唯一、前足でのみ起こる現象です。

吉田 ATP が来ると、ADP と ATP を交換して、それで後ろ足が離れるようになるんですか。

安藤 そうです。そこに ATP の結合エネルギーが使われるんです。

吉田 ADP の結合力はそんな強くないんですね、ATP と交換できるくらいだから。

安藤 そうです。ATP と ADP の親和性はかなり違いますよね。解離定数では nM のオーダーです。だから ATP のほうがはるかに強く後ろ足に結合する、ほとんど不可逆的に結合します。

吉田 そこで逆に言うと、後ろ足を離すというからには、ミオシンとアクチンの結合の状態、構造が変わっているわけですよ、わずかとはいえ。だから、そういう点では ATP の結合のエネルギーが後ろ足をアクチンから引き剥がすような、そういう構造変化に使われていると言ってもいいんじゃないんですか。



吉田賢右 (JT 生命誌研究館)

安藤 そうです。おっしゃるとおりです。

吉田 それで ATP が後ろ足に結合して、そうすると後ろ足がアクチンから離れるんだけど、離れてるあいだにその ATP を分解して ADP になって、前方のほうに着陸するということですね。

安藤 はい。ADP ではなく、ADP-Pi ですか。

吉田 ADP になるときに頭の角度が変わるといいますか、ぐっと曲がってしまう (図6のリカバリーストローク) ということですか。

安藤 いいえ、ATP が ADP-Pi になるときです。その方が効率がいいです。実際にわれわれの測定では、離れた後ろ足が前に着地するのがすごく遅いわけです。

吉田 そこが律速なんですか、全体の？

安藤 そうです。リカバリーストローク (図6) が熱的揺らぎだけで起こるには、ものすごく待たないといけないわけです。0.1秒ぐらいかな。ところが ATP があると、加水分解に伴ってほとんどミリ秒で進んでしまいます。だから ATP 加水分解のエネルギーは、一部効率を上げるために使われてるという言い方もできるかもしれません。

吉田 むしろ後ろ足を引き離すために ATP の結合が必要だったということですね。それで ATP の加水分解というのは、ATP の

縛りついていますか、それを打ち消すためにアクチンから離れている間に加水分解してしまうと。

安藤 はい。どんな ATP アーゼでも ATP 加水分解に伴う ΔG は非常にわずかであるってことは知られていると思うんですが。

吉田 それはそう。F₁F₀-ATP アーゼの世界でもそうなんですよ、酵素上での ATP、ADP の平衡（量比）ほとんど 1 対 1 に近いですものね。だからこの場合も結局、最初の ATP の結合で 10k_BT、次に無機リン酸 Pi の解離で 8k_BT。結局、結合解離の物理的過程で仕事をしてる、加水分解という化学的過程ではない。そこは F₁ とそっくりだと思うんだけど。これは無機リン酸 Pi が最初にはずれる、という順番になってるんですね？

安藤 そうです、それは間違いないです。

吉田 無機リン酸が外れたことによって、図 6 下の A-M-ADP-Pi と A-M-ADP の間の 8k_BT という大きな ΔG が出てくると。まだよく分からないのは、その ΔG が仕事に使われてないということなんです。

安藤 その ΔG は反応を後戻りできないようにしてるけど、力学的な仕事には使われていない。8k_BT という ΔG だと、図 6 下では深すぎて熱的には後戻りすることは不可能ですよ。

吉田 でもそれは溶液中の無機リン酸の濃度が低いからで、これ F₁ なんかで 100 mM くらい加えると後戻りするんです。

安藤 なるほど、 ΔG がぐっと浅くなってしまいうんですね。

吉田 ちなみに、図 6 上の最後の ADP を解離するところの前と後の構造、A-M-ADP と A-M ですが、これ本当に構造変化はないんですか？

安藤 図 6 下では、そのエネルギー差については、反応速度論とか熱測定から言われてる結果なんで、信じないわけにいかないかなと思うんですけど。

吉田 例えば、そこどころが、A-M-ADP-Pi と A-M-ADP の間には、実は大してエネルギー差がなくて、A-M-ADP から A-M に行くところで、大きな ΔG が出ると考えてもいいんじゃないですか。

安藤 考え方はいいと思う。図 6 下は実験結果に基づいて描いてる絵なんで、何とも言えないです。根拠となる反応速度論と熱測定の結果はほぼ同じで、だいたい合ってます。

遠藤 さっきのフットストンピングっていうのは、前足で Pi が外れた後、起こる現象なんですか？そうするとそのとき、歪んだ頭部の向きはどうなっているんですか？

安藤 図 6 でも Pi が外れると、本当は後ろ足が前にでることで、前足だった方の頭部は元の状態にもどりたいたいけど、二足結合なんで、後ろ足がそれを止めてしまってるんです。

遠藤 この実験で吉田さんが言われたみたいに、Pi 過剰にすると、どういところで止まりますか？

安藤 これ、なかなか前に進めないですよ、Pi 過剰だったら。

遠藤 そうするとフットストンブも起こらないんですか。

安藤 起こらないんじゃないですかね。

遠藤 そうすると、結論的に言うと、ATP 加水分解と前に進むという現象はタイトカップリングではあると。だけど、パワーstroークとは言えない。

安藤 そのとおり、おっしゃるとおりです。

遠藤 で、名前がまだないと。

安藤 ない。

吉田 そこで質問ですが、図 6 上の「一般的な考え方」では、パワーstroークと書いてある無機リン酸が外れるところ、A-M-ADP-Pi から A-M-ADP になるところでは頭の角度が変わってるわけですよね。このときにアクチンが動かされてるわけでしょう。

安藤 そこでパワーstroークという形でトランジションすればですね。

吉田 そう。それって仕事じゃないですか？熱ではなくて。

安藤 でもこれは動くというトランジションは起こらない。二足結合の場合は、後ろ足がアクチンにくっ付いてるから。

吉田 いや、動くときはミオシンの頭とミオシンの足の棒の部分（ネック）の角度が変わることによって仕事してるんだから、無機リン酸が抜けるときに、仕事してるんじゃないかと思う、熱ではなくて。

安藤 でもミオシンの頭とネックの部分の角度が変わるところのエネルギー差ってほんのわずかなんです。図 6 のリカバリーストロークのところでもわかるように $2k_B T$ くらいです。

吉田 熱揺らぎでもいっちゃうぐらいと。

安藤 おっしゃるとおりです。だから、それが仕事するとは考えられないんです。

吉田 だけど、無機リン酸が抜けるときに、 ΔG としては $8k_B T$ 出てるわけですね。

安藤 そうです、おっしゃるとおりです。

吉田 だからそれが、仕事に使われないか。ちょっと変だな。

安藤 力学的仕事にはなってないけど、反応サイクルを進めるためにエネルギーは使ってるわけです。

吉田 反応サイクルを前に進めるぐらいだったら、 ΔG はもっと小さくてもいいと思うんだけど。

安藤 いや、そんなことないです。 $2k_B T$ くらいだと、行ったり来たりしてしまいますよね。

吉田 そうですか。 ΔG で 4 倍か。

安藤 8 と 2 はかなり大きな差なんです。

遠藤 それから、安藤さんの Nature 論文を見ると、その他のいろいろなもの、「inchworm」的な動きとか、「biased diffusion」とか、そういうものはもう一切、起こらないということですね。

安藤 起こりません。

遠藤 あと、ルースカップリングのエビデンスというのはどうなんでしょうか？例えば ATP の加水分解が起こってだいたいぶたってから動いたりってというのは、ある意味これと似てるんですか。いや、でもあれは加水分解されてから、かなり後に動くから違うのかな。

安藤 かなり後だから、違いますね。ATP の加水分解と分子の動きを同時観察すると結局 1 対 1 だった言うことになっていると思います (Sanakamoto et al., *Nature* 2008)。

吉田 あと、柔らかい AFM のカンチレバーを使って、1 つの ATP の加水分解でも、かなり長い距離を走るという話もありました

が・・・。

安藤 うーん。

遠藤 それから、ルースカップリングのもう一つのエビデンスは、足の長さを短くしても長くても動く距離が同じだ、みたいな話があったと思いますが、それはどうなんですか。長さを変える実験はされてないんですか？

安藤 いや、されてます。足の長さを短くすれば歩幅は短くなります。坂本君も他の人もやっていますが、歩幅が足の長さによらず一定だっていう話は完全に否定されています。2008 年前後の論文で、大体みんな納得いく感じになったと思います。

遠藤 横山さんいかがですか、何かコメントあれば。

横山 どうも。興味深い話ありがとうございました。F1 なんかでは、ATP が ADP になると ADP がなかなか外れなくなるんですけども、この場合は ADP は勝手にはずれるんですか？

安藤 アクチンがないと解離しないですけど。アクチンと結合すると、(前足が前方回転して歪みが解消された場合ですが) ADP は勝手に解離します。

横山 図 6 でそのときの M-ADP から A-M-ADP のエネルギードロップで構造歪みが生じて、その構造ゆがみによって何か仕事が起こるということですね。

安藤 はい (フットストップした着地直後ですが)。

横山 そこだけ確認したかった。

吉田 安藤さんの図 6 の記述で、ATP の加水分解でエネルギーは使われてないという言い方をされてますが、M-ATP が M-ADP-Pi になるステップでは力学的仕事が行われてないということはそのとおりだと思うんですけど、反応サイクル全体として見れば明らかに ATP のエネルギーが駆動力として使われてるわけです。だからそういう点では、ATP、GTP の加水分解以外のところからエネルギーが来てるっていうのは、誤解を招くんじゃないかと思うんですが。

安藤 力学的に仕事するのはどこかっていうと、図 11 の前足の角度変化ですよ、レバーアームスイング。そこで力学的仕事してるわけです。この力学的仕事のももとのエネルギーはどこにあるのかっていうと、前足の頭部とネックのあいだの構造歪みにあるわけですよ。繰り返しになりますが、図 10 で紹介した

未発表の実験ですよ。これ、ADP 存在下での実験ですけど。既に構造歪みは生じてるわけです。けれども、それは力学的な仕事にはすぐには使えないわけです。なぜかという、後ろ足がアクチンから離れないから。後ろ足を離すのに ATP は本来必要なわけですよ。その代わりにここでは AFM の針でたたくということをやってる。だから、全体として見れば、ATP のエネルギーは後ろ足を離すのに必要なわけです。

吉田 それでいいんです。いいんだと思うんですけど・・・。

安藤 力学的な仕事を取り出すには ATP はどうしても必要だと。なので、取り出すには必要だけど、その取り出すエネルギーがどこにあるかっていうと、ATP ではなくて、構造歪みにあって、その構造歪みのエネルギーはどこから来てるかっていうと、アクチン、ミオシン間の強い結合エネルギーにあったわけです。

吉田 つまり、ATP の加水分解は反応サイクルを回すために使われてるんですよ。でもサイクルを回すことで力学的仕事をするわけなんです。

安藤 反応の個々のステップを見ずに、サイクル全体を見て、そこに ATP のエネルギーが使われてるって言われれば、それはそうです。

吉田 同じことを言ってるんですけどね、ATP の加水分解のステップとは共役しないっていうことになると、ATP、GTP 以外だったら何だろうってなりますよね。熱エネルギーから得てるわけじゃないし。

安藤 図 9 ですが、これは、構造歪みがなかったら絶対に動かないわけです。構造歪みにエネルギーが蓄えられているわけですよ。その構造歪みを起こしてる大本は何かっていうと、この強い結合エネルギーですよ。

吉田 それは F1 でも大事なんですけどね。要するに、強い結合エネルギーを、結局、構造の歪みに使ってトルクを生じてるんですけど。

安藤 ただ、確かにこういう、ゆがみエネルギーをこの ATP エネルギー以外からつくったとしても、それをどう利用するかというのが問題で、ATP 加水分解の反応サイクルが回らない限り利用できないわけですよ。だけど、ここで言いたいことは、構造歪みというもとの力学的仕事のエネルギー源は、ATP 加水分解から来てるわけではないですよ。

吉田 酵素上での ATP 加水分解から来てるわけではないと言え

ばいいんですよ。そういう断りがないから、天空からエネルギーが来たような感じに聞こえるわけです。

遠藤 蒸し返すようですが、図 9 で、構造歪みのエネルギーの見積もりはどうやって出してるんですって？

安藤 はい。左側の構造歪みがない場合の結合エネルギーは M-ADP とアクチンのアフィニティーから求められます。右側の構造歪みがある場合の結合エネルギーは、フットストンプの頻度から求められます。そうすると、前足に蓄えられる構造歪みエネルギーが求められます。

遠藤 なんとなく分かってきました。だいたいいいですか？吉田さん。

吉田 はい。ただ、反応を前に進めるためにあんなに大きなエネルギー必要なのかなって。ミオシンの場合、大きな負荷、でっかい荷物を付けると、前に進めるために必要な最後の $8k_B T$ でしたっけ、これを維持するためには ATP の濃度が高くないといけなくなるのかな。今のところの実験では、大きな負荷を付けてないんですよ。

安藤 負荷はかけてないです。でも、構造歪みのエネルギーって、結構大きくて、さっきも言ったように。図 12 で実測した頭部の角度分布から見積もると、約 $10k_B T$ あるんです。

吉田 なるほど熱的揺らぎの 10 倍ですよ。わかりました。

参考文献

- Kolomeisky. *Motor Proteins and Molecular Motor* (2015) CRC Press.
- Wagoner, Dill. *Molecular motors: Power strokes outperform Brownian ratchets* (2016) *J. Phys. Chem. B* 120, 6327–6336
- Oosawa, Hayashi. *The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells* (1986) *Adv. Biophys.* 22, 151-183.
- Kodera, Yamamoto, Ishikawa, Ando. *Video Imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy* (2010) *Nature* 468, 72-76.
- Sakamoto, Webb, Forgacs, White, Sellers. *Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement* (2008) *Nature* 455, 128-132.
- Wang, Chen, Arcucci, Harvey, Bowers, Xu, Hammer 3rd, Sellers. *Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4329–4335
- Owa, Uchihashi, Yanagisawa, Yamano, Iguchi, Fukuzawa,

Wakabayashi, Ando, Kikkawa. Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella (2019 Nat. Commun. 10, 1143 (2019))

Haruyama, Uchihashi, Yamada, Kodera, Ando, Konno. Negatively charged lipids are essential for functional and structural switch of human 2-Cys peroxiredoxin II (2018) J. Mol. Biol. 430, 602-610

安藤 敏夫 (あんどう としお)

金沢大学ナノ生命科学研究所特任教授

略歴 1951年東京に生まれる。80年早稲田大学大学院物理学専攻修了(理学博士)。80~86年カリフォルニア大学サンフランシスコ校心臓血管研究所ポスドク、助手。86年から現在まで金沢大学。2010~2015年バイオ AFM 先端研究センター長。2017年10月から現職。一貫してタンパク質の機能メカニズムに関する生

物物理学的研究を実施。現在の研究テーマ：高速走査型プローブ顕微鏡の開発とバイオ応用研究。

ウェブサイト：http://biophys.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_J.htm

吉田 賢右 (よしだ まさすけ)

JT 生命誌研究館 顧問

略歴 1944年群馬県に生まれる。66年東京大学理学部生物化学科卒業。72年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻課程博士課程修了。72年自治医科大学第一生化学助手。85年東京工業大学理学部天然物化学研究施設助教授。90年東京工業大学生命理工学部遺伝生化学教授。92年東京工業大学資源化学研究所生物資源部門教授。2009年京都産業大学工学部 教授。2010年京都産業大学総合生命科学部教授。2014年京都産業大学 シニアリサーチフェロー。2019年~ 現職。

ロータリーモーター (V- and F-ATPアーゼ) の場合

横山 謙・吉田賢右・遠藤斗志也

遠藤 それでは まず私から簡単にタンパク質のミトコンドリアの膜透過におけるモーターの話を紹介します。ミトコンドリアタンパク質は大部分がサイトゾルで前駆体として合成されてからミトコンドリア内に取り込まれます。たとえばミトコンドリア行きのシグナルであるプレ配列を N 端に持っているタンパク質前駆体は外膜と内膜の 2 つのインポートチャンネルを通過して、マトリクスに移ります (図 1)。そのとき、前駆体のサイトゾル側のフォールドしたドメインはアンフォールドされる。前駆体を引っ張ってアンフォールドするのが、マトリクスのシャペロン Hsp70 です。Hsp70 は前駆体のプレ配列および、ほどけたポリペプチド鎖に結合して引っ張るわけです。ここで、Hsp70 は一般に ADP 型でほどけた基質タンパク質に結合し、ATP 型で解離することが知られています。

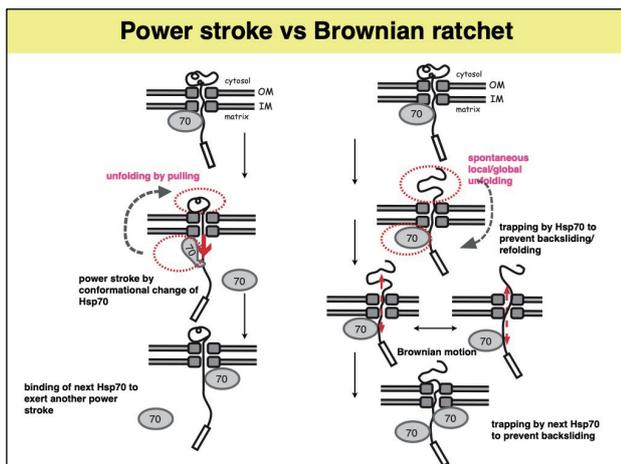


図 1 膜透過の 2 つのモデル

パワーストロークモデル (図 1 左) では、Hsp70 が内膜のインポートチャンネル、TIM23 複合体なんですが、これに結合してそこを足場として、コンホメーション変化が起こり、前駆体を引っ張る。具体的には TIM23 複合体に ADP 型で結合した Hsp70 が前駆体をしっかり捉えて、ATP 型へのヌクレオチド交換と共役したコンホメーション変化により前駆体を引っ張る。そうすると、前駆体のサイトゾル側のドメインがほどけて引き込まれる。引き込まれると Hsp70 は ATP 型にヌクレオチドがスイッチしたので TIM23 複合体との親和性が下がって、インポート出口から離れる。そうすると次の Hsp70 が TIM23 複合体にやってきて、前駆体に結合して逆戻りを防ぎ、また引っ張る、同じことが進むというのがパワーストロークです。だから、ハンドオーバーハンドで働くモーターということになります。

一方、ブラウニアンラチェットの 경우에는、Hsp70 は ATP 型

で TIM23 複合体に結合して、インポートチャンネルの出口で待ち構えてるんですが、この場合は前駆体はサイトゾル側で構造揺らぎで自発的にほどけます。サイトゾル側で構造が揺らいでほどけると、ブラウン運動で前駆体がマトリクスにはい



遠藤斗志也 (京産大)

ってくる、そうすると Hsp70 は ATP を加水分解して ADP 型となり、ほどけて入ってきた部分にしっかり結合します。このとき Hsp70 は ADP 型になるので、前駆体をつかんだまま TIM23 複合体の出口から外れます。さっきのパワーストロークモデルでは、ADP 型でしっかり足場の TIM23 複合体と前駆体に結合し、前駆体を引っ張ったら ATP 型になって離れていく。構造変化して前駆体を引っ張るためには、ADP 型で足場に結合していないとダメなわけですね。一方ブラウニアンラチェットの場合は、ATP 型で TIM23 複合体に結合して、ADP 型で前駆体をつかんだら外れる。はずれても前駆体はつかんだままです。そうすると、次の Hsp70 がやってきて逆戻りを防ぎと。そういうわけで、これもハンドオーバーハンドのモーターですが、自発的にほどけた前駆体を Hsp70 がトラップするというのがブラウニアンラチェットです。

吉田 左側の絵の真ん中の所。同じ Hsp70 が、グッと引っ張った後に、いっぺんポリペプチド鎖を離して、また前駆体をつかみ直して、もういっぺん引っ張ることはないんですか？

遠藤 ないですね。ADP 型で引っ張って ATP 型になったら、TIM23 複合体からはずれます。Hsp70 の TIM23 複合体への結合は ADP 型か ATP 型かで変わります。いろいろ論争はあったのですが、Craig らのグループは、TIM23 複合体に Hsp70 が結合するときのヌクレオチド型を調べたところ、ATP 型だということを示しました (図 2)。つまり ADP 型になると TIM23 複合体からはずれるというわけで、これはブラウニアンラチェットを支持します。

次に岡本浩二さん (現阪大) が Neupert 研でやったのは、Hsp70 が結合できない配列というのを探したんです (図 3)。そ

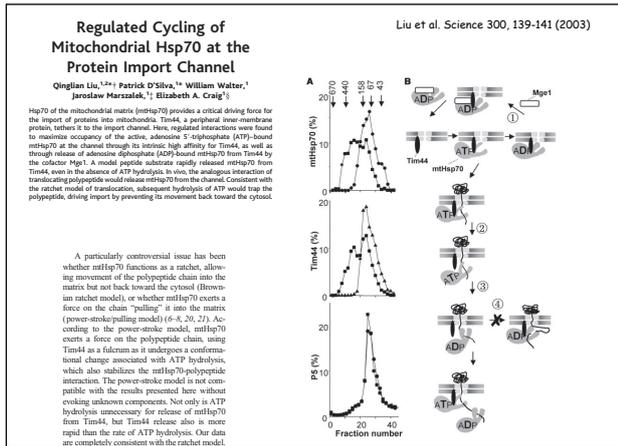


図2 Craigらの論文

うするとグリシンとか、グルタミン酸が並んだ配列っていうのは、Hsp70 に結合しにくいことがわかりました (図3の左 A~C)。そこで、グリシンが50個も並んで(G50)とか、グルタミン酸が50個も並んで(E50)といった配列を付けた前駆体を(図3の右 A)、in vitro で単離ミトコンドリアにインポートしたんです。そうすると、ちゃんとインポートされました(図3の右 B、C)。Hsp70 がいくらパワーstrokeで引っ張ったって構造変化の大きさには限度があるので、Hsp70 が結合できる次の配列がマトリクスまで来ないとハンドオーバーハンドでサイクルが回らないはず(図3の右 D)。In vitro インポートでG50でもE50の融合タンパク質でも全然問題なく、他の前駆体と遜色のない効率で引っ張れるということは、ブラウンラチェットを支持する、そういうことです。

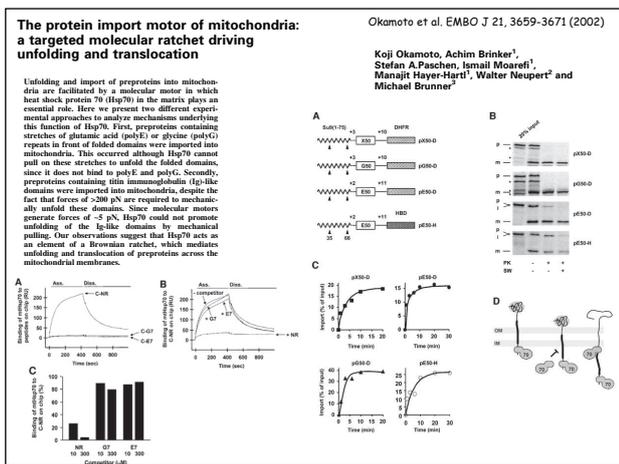


図3 岡本、Neupertらの論文

続いて、2008年に私たちがやったのは、岡本さんの発想をもうちょっと発展させて、つまり、私たちはHsp70がATP加水分解サイクル1回あたりに移動させられる前駆体の長さ、つまりHsp70と言うモーターのステップサイズを測ろうとしたんです(図4)。パワーstrokeだったら1回のATP加水分解サイクルで引っ張れる距離、ステップサイズは、Hsp70のコンフォメーション変化だけで決まるだろうと(図4左)。ところがブラ

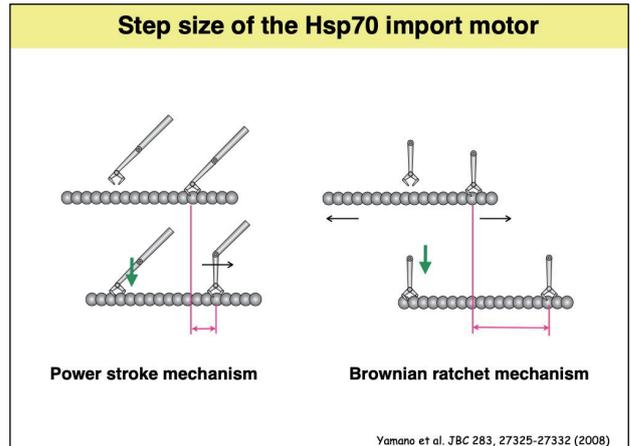


図4 膜透過のステップサイズを測る

ウンラチェットだったら、前駆体側が勝手にほどけて入ってくるのをトラップするだけだから、前駆体によって移動できる距離、ステップサイズはいろいろ変わり得るだろうと(図4右)。岡本さんが示したのは50残基とか、それが非常に大きくてもいいって話だったんですね。グリシンの配列の長さをいろいろと変えていくと、パワーstrokeならグリシンの配列がステップサイズよりも小さければ、次のHsp70がくっつけて、大きくなったらくっつけなくなるじゃないですか(図5)。だから、グリシンの配列の長さをいろいろ変えていったら、インポートの速度はここかの長さ、つまりステップサイズのところで遅くなってしま

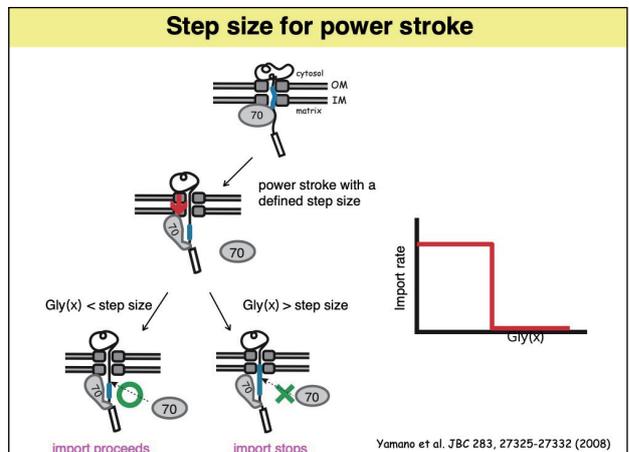


図5 パワーstrokeのステップサイズ

だろうと(図5右)。ブラウンラチェットだったらどうかというと、前駆体タンパク質によって、たとえばN端近くだけがほどけて入ってくるようなものと、ステップサイズは小さくなりますよね。だから、図6右の赤破線のような感じになります。ところが、グローバルアンフォールディングがメジャーな揺らぎだとしたら、ほどけるとときには全部ほどけるから、ステップサイズはものすごく大きくなりますよね(図6右の青破線)。というわけで、いろいろな前駆体についてステップサイズを測ったんです。測ると結局、図7のようになって、プレ配列につないだドメインがヘム結合ドメイン(HBD)の場合のステップサイズは10~20アミノ酸残基、バルナーゼの場合のステップサイズは20~30ア

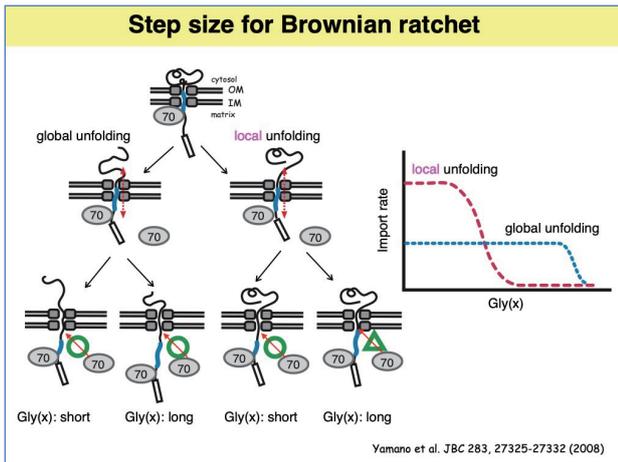


図6 ブラウニアンラチェットのステップサイズ

ミノ酸残基、DHFR の場合のステップサイズは 60 アミノ酸残基以上となりました。構造 (図 7) を見ると HBD は N 端 10 残基くらいは揺らぎそうですよね。バルナーゼはヘリックスのあたりが動くとき N 端 20 残基くらいがほどけそうです。ところが、DHFR は N 端が C 端と一緒に β シート構造を作っているから、ほどけるときのときはグローバルにほどけるしかないんですよ。なので、DHFR のステップサイズはものすごく大きくなります。ほどけるときのときはグローバルに一時的にほどけて、そのときに Hsp70 がほどけて中に入ってきた部分に結合してトラップするというのです。ステップサイズがタンパク質の種類によって違うというのは、ブラウニアンラチェットを支持していると、そういうことです。

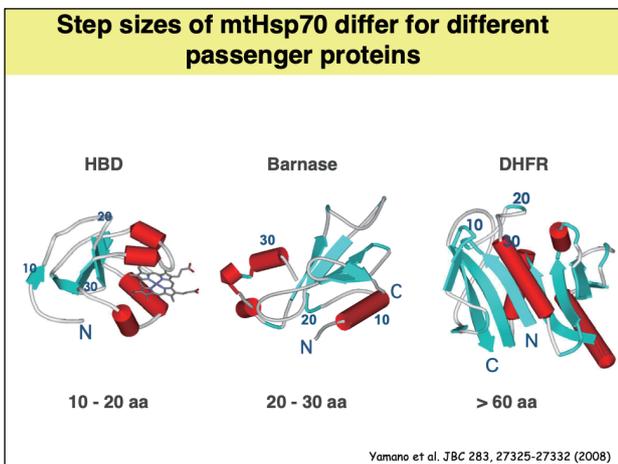


図7 前駆体によってステップサイズが異なる

ついでに言うと、ミトコンドリアへの膜透過というのは、Hsp70 による ATP の加水分解以外にミトコンドリア内膜の膜電位も必要なんですけども、膜電位 (外が正, 内が負) の役割は色々いわれてきました。その後のうちの研究で分かったのは、プレ配列はプラスの電荷を持っているので、膜電位があるとプレ配列が内膜のチャンネルにとどまる時間が長くなって、Hsp70 が結合しやすくなると (図 8)。だから、膜電位が基質タンパク質を内膜にとどめることで、プラスに荷電したプレ配列に Hsp70 は結合しやすくなります。これによって、ほどけた状態が安定化される効果

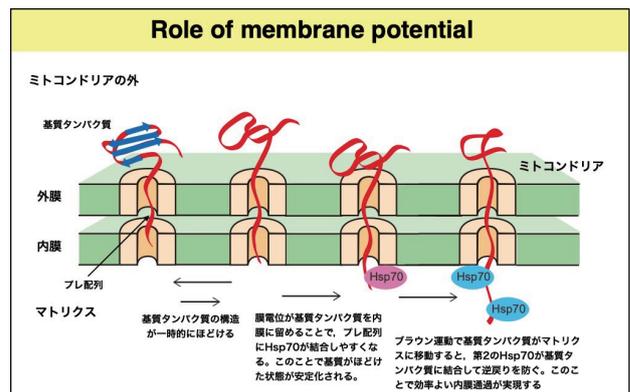


図8 膜透過における膜電位の役割

があるだろうと、そういうことも、分かってきたということです。

横山 結局、Hsp70 の構造変化を伴っていない場合はブラウニアンラチェットという定義付けでいいんでしょうか。

遠藤 ブラウン運動で入ってきた前駆体を単純に Hsp70 がトラップするだけですからね。

横山 そこに Hsp70 の構造変化は直接関係していないので、そういったものはブラウニアンラチェットだと。

遠藤 はい。トラップすることによって、ブラウン運動のうちの一方方向性の運動だけが取り出され、外から中への移動という仕事に寄与していると、そういうことですね。

横山 先ほど安藤さんのお話にもあったんですけど、パワーstroークの狭義の定義では、構造変化が直接、前方への移動と共役しているものを指すということからいくと、これはパワーstroークには相当しないと。しかし移動の一方方向性がある以上、原動力があって、それは ATP の加水分解なんでしょうけれども、ATP の加水分解はどこで一方方向性に関与すると考えればいいんでしょうか。

遠藤 2 番目の Hsp70 が次のトラップを行わなければいけないので、1 番目の Hsp70 はいったん膜透過チャンネルから離れるんですね。離れるときに ADP 型で離れます。次に ATP 型の Hsp70 が膜透過チャンネルにくっつく、そうやってハンドオーバーハンドでいくつもの Hsp70 が関与するために加水分解が必要ということです。

横山 Hsp70 が TIM23 複合体に付いたり離れたりすると、いつも ATP の加水分解が使われるということと、それに伴う基質前駆体への結合ですね。

遠藤 そうです。だから、安藤さんのミオシンの話と近いんですけども、こちらの場合には、前駆体がほどけるという自発的な揺らぎとブラウン運動でミトコンドリアの中に入ってくるので、全部自発的な熱揺らぎによる現象なんですね。安藤さんのミオシンの場合は、ミオシンのアクチンへの結合エネルギーによる分子内の歪みが駆動力になってると。だから、同じようなメカニズムなんですけれども、駆動力が違うという感じかなと思いました。

横山 安藤さんの話だと結局、ヌクレオチドの結合による構造変化が一方方向性運動に関与してるということであれば、すごくパワーストローク的な感じに思えるんですけどね。今のお話はHsp70側の構造変化が直接関係してないので、これは狭義のパワーストロークには該当しないだろうということですね。

遠藤 そうですね。だから、ミトコンドリアの膜透過の話は、すごいクリアでしょ。自発的アンフォールディングは別にブラウン運動じゃなくて、タンパク質の揺らぎなので、それをブラウンアンラチェットと言うことには少し問題があるかもしれないですけどね。

吉田 どっちみち熱揺らぎですよ。

遠藤 そう、熱揺らぎ。

吉田 同じタンパク質でも安定性を変えて非常に不安定にしちゃった変異体だと、Hsp70が長くつかんで長いステップサイズになるなんてことは？

遠藤 不安定じゃなくて、揺らぎの大きさ（アンプリチュード）ですよ。ほどけたものが一時的に入ってきたのをトラップするんで、ローカルなアンフォールディングなのか、グローバルなアンフォールディングなのか、構造揺らぎのサイズによって入ってくるポリペプチド鎖の長さが変わるんです。それによってステップサイズが変わる。

吉田 あの実験でいいと思うんだけど、グローバルなアンフォールディングの起こりやすさってというのは、変異で変えられますよね、同じタンパク質でも。

遠藤 変えられますね。

吉田 それでステップサイズが変わらない？

遠藤 揺らぎがグローバルなアンフォールディングなら、それが起こりやすくても起こりにくくても、ステップサイズは変わらないですね。インポート速度が変わるだけです。

吉田 速度か。

遠藤 トラッピングの効率が良くなるだけだから。

吉田 速度が変わるのか・・・分かりました。そこのところ、ちょっとややこしいね。

遠藤 ちなみに、ERのposttranslationalな膜透過も同様にBiPが関わるブラウンアンラチェットですが、葉緑体の外包膜と内包膜の通過は、ストロマで引っ張るモーターが違うのでパワーストロークかもしれません。よろしければ、横山さんの話に移りますか。お願いします。



横山 謙（京産大）

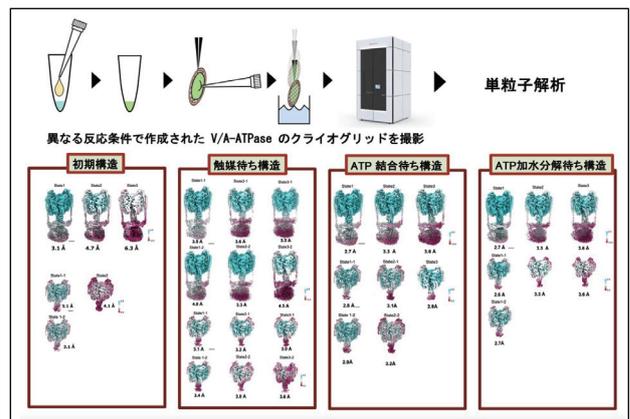


図9 V-ATPアーゼの単粒子解析

横山 今回、クライオ電顕を使って、V-ATPase (V-ATPアーゼ) について、様々な反応条件で、様々な反応過程に対応した構造を決定するという実験を行いました。図9に描いてある初期構造というのはヌクレオチドがない状態の構造で、触媒待ち構造というのはATP飽和条件で、ATP結合待ち構造というのは、ATP濃度が低くてATP結合待ちの状態の構造で、ATP加水分解待ち構造というのはATPγSを使って、ATP加水分解を待ってるであろう構造です。これらの構造をクライオ電顕の単粒子解析で出したというわけです。各構造状態にさらに構造がたくさんあるのは、軸に対する回転状態が120度ずつの違いによって数が3倍になるということです。

そしてここ（図10）から分かったことは、基本的には、回転状態は軸の角度に対応した3種類の構造があるんですが、各回転状態には構造が二つずつあって、それらは軸が全然動いていません。そして、軸が120度動くと次の回転状態になってほぼ同じ

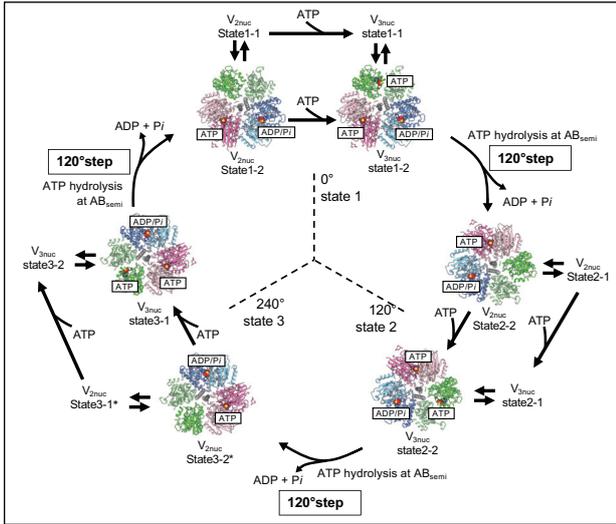


図 10 V-ATP アーゼの反応サイクルとクライオ EM 構造

構造が出てくるというかたちになっている。でも基本的に各構造状態で構造自体は変わらないんですね、どの条件でも。ですので、今回、対象にしている好熱菌の V-ATP アーゼの V_1 部分の構造変化はかなり離散的に起こる、言い換えると中間体構造がないということが出来ます。

そこで図 10 から、これらの構造を解釈すると、まず ATP 待ち条件で出した構造 (図 11 左) というのは、基本的な構造は三つの触媒ダイマーが開いているもの (AB 開) と、やや閉じているもの (AB 準閉) と、閉じているもの (AB 閉) となっていて、各々は F1 では、empty、TP、DP に対応します。ATP 待ち条件で出した構造は、ダイマー三つに対して、ヌクレオチドは 2 個付いていて、AB 開のところは空になっていますので、ここに次の ATP が付くだろうというのは自明ですね。実際、ATP 飽和条件にしてやると、予想どおり、図 11 中央の AB 開のところ ATP が付いた構造になって、ATP 2 個のものに ATP が付いて 3 個に

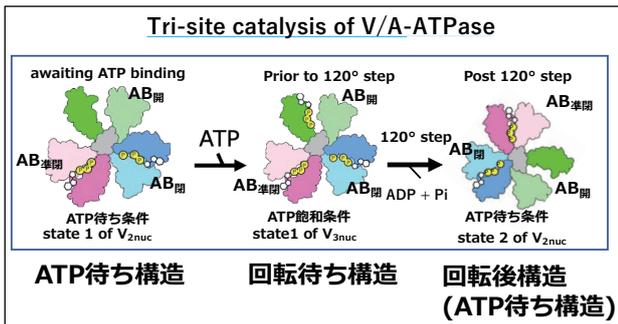


図 11 V-ATP アーゼの 3 つの構造状態

なりますね。これは、昔、言われていたトライサイトモデルというものです。この状態から軸が 120 度回転して (図 11 右)、state 1 といっている状態から state 2 の状態になると、構造変化が起きて、AB 閉のところにあった ADP と Pi が放出されて、そこが AB 開になる。こうしてヌクレオチドの結合数が 2、3、2、3 を繰り返しながら、定常状態では反応が進むということが示されています。ですので、従前から言われていたように、ATP

が結合してすぐ回転するわけではなくて、いったん回転を待つ、三つヌクレオチドが付いた状態になってから回転するということになります。

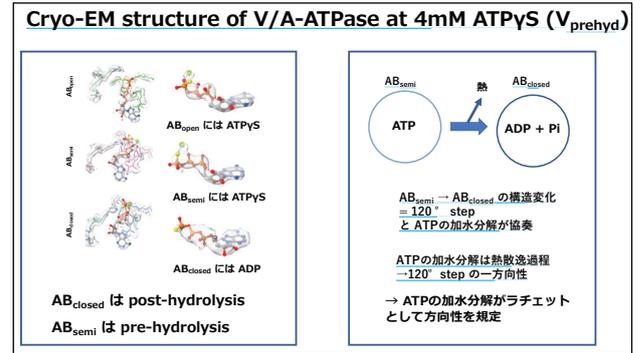


図 12 AB 準閉から AB 閉は熱散逸を伴うのではない

ここで、さっき問題になった ATP の加水分解が回転に直接寄与するかどうかという話なんですけれども、図 12 左で ATP γ S で構造を出してやると、AB 閉 (AB_{closed}) で加水分解が起こるんだから、ここは ATP 結合型、ATP γ S の状態で待っているだろうと思っていたわけです。ところがここには ADP が結合していたので、既に加水分解された状態になっているということがわかりました。これを解釈しますと、AB 準閉 (AB_{semi}) のところはどの構造を見ても全部、ATP が結合していますので、AB 準閉 (AB_{semi}) というのは ATP が結合した状態で、AB 閉 (AB_{closed}) は既に加水分解後の構造になっていると考えると、図 12 右のような解釈になります。すなわち AB 準閉 (AB_{semi}) のところに ATP が結合していて、これが構造変化すると AB 閉 (AB_{closed}) という加水分解後の構造になります。この二つの状態を比較してやると、この AB 準閉 (AB_{semi}) から AB 閉 (AB_{closed}) のステップでも熱散逸 (ギブスエネルギーの一部が熱として失われてしまう) があるんだから、当然ここで一方向性 (不可逆性) が生まれるだろう。この一方向性のステップは軸の回転を伴っているので、ATP の加水分解が逆戻りを防ぐという意味でラチェットの役割をしている、方向性を出しているだろうということで、ラチェットのということを Nature Communication 論文に書かせていただいた次第なんです。

(横山捕捉: 熱散逸が起こると、化学力学変換効率が下がるので、F1 で言われている 100% のエネルギー変換効率を説明しにくくなります。触媒部位に結合している ATP の状態が、加水分解されない ATP と、加水分解される ATP もしくは加水分解された ATP の間で、ポテンシャル差 (エントロピーの増大) があるので、構造間の遷移が自発的になると言った方が適切だったかもしれません。ちなみにエネルギー変換効率 100% を達成するには、系全体のエントロピー変化もゼロになる必要があり、ある過程で増大したエントロピー分だけ系の別の部分でエントロピーが減少しているはず。分子内の構造歪みかと思えます。)

遠藤 この AB 準閉 (AB_{semi}) から AB 閉 (AB_{closed}) のステップってエネルギーがすごい下がるんですか？

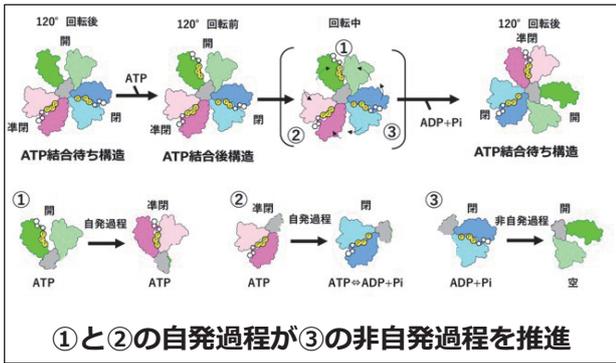


図 13 ①と②は自発過程であり、これらが③を駆動すると考える

横山 このところは、ギブスエネルギーはそんなに下がりません。ただ、もしここで熱散逸みたいなことが起こるんだとしたら、ここは一方方向性になるのでラチェットの働きはしません。これをまとめたのが、図 13 なんですけれども、結局、今回の Nature Communication 論文で分かったことは、今回の構造は V-ATP アーゼに 3 個のヌクレオチドが結合するトライサイトモデルであるということ、あと構造が各状態に 1 個しかなくて、しかも構造変化自体が離散的で中間状態がない。ですので、安藤さんがミオシンで言うような構造歪みのようなものは考える必要がないわけです。ATP が結合して ATP 結合後構造になると、三つの触媒サイトで、①、②、③とラベルしていますが、触媒反応が同時に起こりつつ回転が起こって、次の ATP 結合待ち構造になる、というモデルです。

図 13 下で、それぞれの触媒サイトで起こっていることを取り出してみると、①は AB 開の状態のものが AB 閉という閉じた状態になるというわけで、これは F1Fo-ATP アーゼで良く言っていたジッパーリング（開いたものがジッパーを閉めるように閉じていく）というものになります。ATP が結合することによってジッパーリングで閉じた構造になって、軸が回るだろうと。これは従前どおりの考え方です。

②は、先ほど議論になった件ですが、この構造だけ取り出して見てみると、ATP が結合した AB 準閉の構造が AB 閉になるので、ATP と ADP+Pi の平衡状態になるわけです。したがってここだけ見ると、ATP が分解されていますので自発過程ということで、②は自発過程になります。次に③ですが、これは AB 閉という閉じた構造に付いている ADP と Pi が、構造が開いてリリースされる。開いている構造が閉じて結合するのが自発過程なら、閉じた構造が開いて解離するというこれは自発過程とは考えにくい、むしろ非自発過程だと考えています。

結局、まとめると、①②③の三つの反応が V-ATP アーゼのそれぞれ異なる触媒サイトで同時並行的に起こるんですが、三つのうちの①②の二つが自発過程で、③の閉じてる構造にある ADP と Pi を無理やり引き剥がして放出するという非自発過程を①②が軸の回転を伴って駆動している、ということになります。

遠藤 今の言葉ですけど、自発過程と言ってるのはダウンヒル（下り坂、 ΔG が負）で、非自発過程というのはアップヒル（上り坂、 ΔG が正）ってことですね。

横山 そうですね。

遠藤 だけど、ADP のリリースは、それだけ見ればダウンヒルなんじゃないんですか？

横山 この場合、単に ADP がリリースされるだけでなく、閉から開への構造変化を伴っていることがポイントです。まずこの酵素の場合、閉のところに ADP がありますが、ほっておいたら、そのうち取れてなくなってしまいます。これは F1 でも同じなんですけど、長時間おいておくと Pi が取れて ADP だけの状態になることがあります。実際、ADP だけの状態が出てきて、そういう ADP だけの状態になると、閉のところが、ADP 阻害状態、なかなか前に進まなくなるんです。そういったこともあって、これは非自発過程じゃないかと考えています。

実際、吉田さんもお存じだと思うんですけど、F1 でも同じなんですけど、ATP 結合待ち構造の閉のところに ADP が 1 個付いた状態になると、にっちもさっちも動かなくなるという、ADP 阻害の状態になるんですね。この状態になってしまうと、開のところに ATP が結合しても動かないわけです。ですので、そういった現象から考えると、①の過程だけでは回転が起こらなくて、2 個の触媒サイトに ADP+Pi と ATP が付いている状態になって初めて①の状態と②の状態が共同して回転を起こせるんじゃないかという考え方です。

遠藤 さっきの安藤さんの話だと、Pi が抜けるところはすごいダウンヒルで、ADP が抜けるところはあまりギブスエネルギーは変わらないって、そういう話でしたよね。そうするとこの系は違うんですか？

横山 違いますね。例えば、F1 でも、ADP が付いている構造と付いてない構造を見てみると、ほとんど変わらないですね。あれで構造変化が起こって何かしようとするとは考えづらいと思います。

遠藤 だから、ATP アーゼの反応サイクルにおける各ステップの ΔG がどのくらいかというのは、ATP アーゼによって違う、ということですね。

横山 特に V-ATP アーゼは触媒サイトが三つあって、三つのサイトで別々の仕事をしているので、それが触媒サイトが 1 個しかないミオシンのような系との違いじゃないかと。

遠藤 だから、全体で見たとき、2 個ダウンヒルなら、アップヒル

ルが1個でも進むっていうのはいいんですけども、1個だけ取り上げて、そこでのギブズエネルギーの関係が、安藤さんの話とは違いますよね。

横山 そうですね。

吉田 図13下の②の所で、閉の構造ではATPとADP+Piが平衡になってるって言いましたよね。そうすると、平衡になってるところではエネルギーは出てこないんで、ATPの加水分解のエネルギーでラチェットがいくっていうことはどうかと。むしろADPになったときに、これが次の状態に行けるから回転が進んだと思いますが。

横山 ②のところでは確かに閉構造の上ではATPとADP+Piが同じように存在するので、両者の間の ΔG はゼロに近いでしょうけれど、そこには準閉構造のATP型は存在していないんですよ。だから②のステップの閉のATPから閉のADP+Piという反応は ΔG は負で良いと思います。

吉田 それから、あともう一つ、ADPと無機リン酸Piの解離っていうのは、これほっといても起きるんですよ。ADP阻害というのはまた別な形だし。横山さん、これはそもそもADP阻害が起きない変異体で調べてるんですよ、論文では。

横山 そうですね。

吉田 横山さんの実験はATPを低濃度にして、ATP結合待ちの構造を見た。もう一つ、ATP γ Sを使うことによってATP加水分解待ちの構造を見たということですね。ただし、ADP+Piの解離を抑えた状態の構造は見えてない。ということは、結局、120度回るためにはATPの結合とATPの加水分解と、ATP+Piの解離が全て起こらないと120度回らないんですよ、これはF1でもV1でもね。

横山 そうですね。

吉田 だから、横山さんの実験ではっきりしたのは、ATPの結合だけでは回らないらしくて、ATPの結合と、それからATPの加水分解と、そして恐らくはADP+Piの解離が全部そろわないと120度回りませんよということじゃないかと、思うんですよ。

横山 それはある意味、正しいです。

吉田 だから、ADPの解離っていうのを最後に付け加える理由はなく、要するに三つのことがすべて起こらないと回らないっていう、そういうことじゃないかと。

横山 それは論文にも書いてあります、同時に起こると。そこで駆動力はどれですかと言ったときの解釈を、私の場合は②は自発過程で、③は非自発過程と解釈したわけです。根拠は、閉のところにADPがあると、ADP阻害になりにくいとはいえ、ADPとプレインキュベーションすると、阻害状況に陥るんですよ。

(ADP阻害が起りやすい)野生型に比べると閉のところのADPとの親和性が低い関係で、だんだんとADPは取れていきますけれども、単独でADPが閉のところに結合していれば、なかなか取れないというのは受け入れてもいい事実だと思います。ADPとプレインキュベーションすると、1個だけでADP阻害状態になります。

吉田 横山さんの仕事のいいところは、ADP阻害のない変異体を使ったことで、触媒的過程だけが見られたことだと思います。この図もそういうのを前提にして描いてるんじゃないかと思うんだけど。実際にADP阻害があるといっても、V1は活性がなくなっちゃうかもしれないけど、普通のF1の場合、平気で1秒間に200個、300個のATPは加水分解するんですよ。だから、実際にターンオーバーしてる時の状態っていうのは、1サイクル回ったらADP阻害に必ず落ちこちちゃうっていうことじゃないと思うんですね。非自発過程というけど、ATPアーゼが発現してる限り、これは勝手にどんどん起きてることで、そうしなきゃターンオーバーしないからね。だから、ターンオーバーしてる状態で見てののなら、これは③のところもADP+Piが外れて、また①に戻ってるはずなんですよ。

横山 そうです。

遠藤 ただ、ギブズエネルギーの差をものすごいシンプルに説明するのなら、①のところがアップヒルだっていうのは、これは結合エネルギーですよ。結合エネルギーがあるのでダウンヒルになると。②のところは、そういう意味では結合エネルギーは同じなんだけれども、ATPとADP+Piのどちらが安定かという高エネルギーリン酸結合が切断される前と後の比較の話で、一応は結合は切れてるから電子の非局在化とか、負電荷の反発の減少とかで説明できると。そこに準閉から閉の構造変化が加わるとさらに結合エネルギーが ΔG を負にしてくれるかもしれない。③は、閉の状態のほうが結合エネルギーが大きいからアップヒルになるんだろうと、そういう解釈なんですよ。しかし③ではADP+Piという二分子の自由度、そのエントロピーまで考慮すると、③は本当にアップヒルなのかどうかは、分からないなっていう気もするんですけど。

横山 単純に①の対照として③があるから、普通に考えれば、く閉じたものが開いてくっついてるものが離れるんだから、アップヒル、つまり非自発過程だろうという考えなんですけど。

遠藤 でも、エントロピーは逆ですからね。①では左右（反応の前後）でエントロピーはかわらないけど、③は右（反応後）の方がエントロピーは高いですからね。

横山 そうですね。離れたほうがエントロピーが増えますね。ただ、①の前には ATP の結合というステップがあって、そこではエントロピーを減少させてますね。

吉田 ①のところでは、これは非常に結合力が強いと。結合することによってエネルギーを稼ぐということね。③のところでは逆に、ADP+Piが解離することによって、そこで使えるエネルギーをゲインするっていうかな。アップヒル、ダウンヒルって言い方をするとわかりにくい。

遠藤 でもそれ、ギブズエネルギーがどっちが高いか低いかで考えれば、③のところは、エンタルピー的にはエネルギーが高くなっちゃうけど、エントロピー的には低くなる、その差し引きで実際のところ ΔG はどうなってるかって、そういう話ですよ。

吉田 これは ADP+Pi が離れたときの系から、くっついてるときの系のギブズエネルギーを差し引けば、さっきの安藤さんのミオシンの話と同じように、エネルギーはぼこんと落ちてくるはずだと思う。

横山 それはどうなんですかね。

吉田 エネルギーが上がってれば、反応進まないですよ。

横山 いや、単独で③が進むかどうかではなくて、①と②が③を進めるといっていい考え方はいいですか？結局、①と②で軸が動きますから、強制回転で③が進むと。

吉田 それでいいと思うんですよ。だから、三つの β があって、共同作業でもって結局、 ΔG がマイナスになる。

横山 そういうことです。

吉田 だから進むわけだ。逆に言うと、三つのことが起こらないと回らないと言ってるんですからね。

横山 そういうことです、そのとおり。それは解釈の話ですね。

吉田 だから、上の図の ADP+Pi が、あたかも 120 度回る間に外れるように描いてあるけど、これはまだ良く分からない。

横山 リン酸は外れるんですね。長時間置いてある、例えば ATP 結合待ちの構造を見ると、リン酸がないから。リン酸は待ってる

間に熱揺らぎで外れるんです。

吉田 そうかもしれない。結局、ADP と無機リン酸が外れて、相手が開構造にならない限り、軸にあたる γ サブユニットはぶつかわっちゃって回れないから。だから、同時に三つのことが起きないと回らないというのが横山さんの酵素じゃないかなと思うんですよ。

横山 そうです。まさにそのとおりです。

遠藤 そもそも普通の ATP アーゼって、ちゃんとサイクル回るんだから、ADP だって外れるわけですよ。

吉田 もちろん外れますよ。

横山 外れます。そこで、さっきのミオシンなんかだと、触媒サイトが 1 個しかないんですね。そうすると他の触媒サイトの助けを借りれないので、自前で全部サイクル回さなきゃいけないので、そこで多分構造歪みのエネルギーみたいなものを分子内にため込んで、それを放出すると本来、外れにくかったヌクレオチドが外れてサイクルが完結するというふうには、私は解釈してるんですけど。ところが V-ATP アーゼは、触媒サイトが三つあって、三つの触媒サイトが軸の回転で完全に共役してますから、③のようにエネルギー的に足りないようなものも、①と②の助けで回って、結局、吉田さんがさっきおっしゃったように、三つの共同作業で軸が 120 度回る。それで結局、120 度回って ATP の加水分解サイクルが 1 回、回ると。それを回してるのは別々のサイトで同時に起こっているというふうには考えればいいんじゃないんですか。

吉田 だからこれ、図 13 の下のほうのほうでは 1 個の触媒サイトだけ取り上げてるけど、これだと論じにくいんだよね。3 つの触媒サイトをもった酵素全体として、反応が前に進むかどうかということが決まってくるので。

横山 そうです。

吉田 三つの触媒サイトの共同作業として進んでるわけだからね。

横山 そこでこの軸（DF サブユニット）を図 13 の絵に付けてあるわけなんですけれども。軸の向きがそれぞれ違うので、この軸がそれぞれの三つの触媒サイトにくっついてますから。この軸の向きによって、三つの触媒サイトが完全に共同できる、この考え方でいいんじゃないんですかね。

遠藤 3 つの触媒部位を 1 個つぶしたり 2 個つぶしたりできないんですか。

横山 昔、吉田先生も・・・。

吉田 やったけど。そうすると駄目ですよ。駄目というのは、一つでもつぶすと継続的な、定常的な ATP の加水分解できなくなっちゃうの。

遠藤 そうすると、このモデルはそれを説明するってことですね。

吉田 だから、三つが共役するから、一つの触媒サイトをつぶすと 2 個 ATP を加水分解するところで止まっちゃう。

遠藤 これはもともと 3 個あって成り立つ ATP アーゼの話なんですね。

吉田 そのとおり。

横山 なので、だいたいキネシンとかミオシンとは違うと思うんです。

吉田 ただ、これをラチェットというかどうかという、定義の問題もあって、僕はブラウニアンラチェットとは言えないんじゃないかなと思うんだけど。

横山 そこで言葉の問題があって、私がラチェットと使った意味は、②ですけどね。②のところを自発過程と考えるならば、そして②の過程が回転に寄与すると考えるならば、②の過程はほとんど構造変化しないんです。閉じてる構造が、さらにちょっとだけ閉じるという構造変化なので。だから②はパワーストロークとは言いにくい。①の過程は、これは大きな構造変化で軸を動かしますが、②の過程は構造変化なしに ATP の加水分解を伴うダウンヒル反応で軸の回転に寄与しているので、これをもってラチェットのだと。そういう意味です。

吉田 これは横山さん、ダウンヒルじゃないんだよ、②のところは。ATP と ADP+Pi は平衡になってるんだから、ダウンヒルじゃない。

横山 そのところなんですけどね。②は単なる ATP の加水分解ではなくて準閉から閉への構造変化を伴っているわけです。そうすると、②は本当に熱散逸ないんですかって話なんですけど。少なくとも、この酵素 V-ATP アーゼの場合、エネルギー効率で 100 パーセントじゃなくて 70 パーセントぐらいのトルクなので、熱散逸が起こってるみたいなんです。なので、この場合は、どこで熱散逸が起こってるんですかという、②の辺りかなと思うんです。F1 のようにエネルギー効率が非常に高ければ、熱散逸過程がないと考えられる。そうすると、吉田さんがおっしゃるように、

ATP の加水分解過程が駆動力になり得ないんですけども、もし、ここで熱散逸が起こってるのであれば、ダウンヒル、自発過程と考えてもいいんじゃないかと。

遠藤 そうすると、F1-ATP アーゼだと①はダウンヒルで、②はどちらでもなく、③がアップヒルって、そういう解釈なんですか。

横山 F1 の場合、サブステップがあって、120 度回り切らずに 80 度のところでいったんお休みするんです。そこで ATP の加水分解が起こるんですけども、その構造を見てやると、ATP の状態と ADP+Pi の状態が出てきまして、80 度のところで平衡になってるんですね。その後、40 度動くと ADP が最初に放り出されて、Pi が出るんですね。ちょっと話が飛んでしまいましたけれども、そう考えると、F1 の場合は、このモデルが当てはまらないかもしれないです。

(横山補足：FoF1 を同じ方法で解析すると、ほぼ V-ATPase と同じ解釈が成り立ちます。現在論文執筆中です。)

遠藤 でも、そうするとこの場合でも、①が駆動力のメインだとすれば、コンフォメーション変化を伴ってるんで、そのパワーストロークで全体が動いてるって考えたほうがいいんじゃないんですか。

横山 プラスアルファで②があるという考え方なんですけど。

吉田 仕事をしているのは①と③だと思いますよ。それは安藤さんの的には、③のところは、ADP+Pi の解離のところは熱になるだけだって、彼は言ってるけれども、 ΔG の大きな差があるのは①と③。②は ΔG の変化はほとんどない、安藤さんの場合でもね。

横山 そこなんですけど、③が自発過程であると考えられる根拠は何ですか。

吉田 ほっといても起きるしね。

横山 ただ、ADP 阻害状態になってる酵素は、一回付いた ADP は離れないですね。

吉田 ADP 阻害のことは、この際、考えなくてもいいと思う。どんどん、ぐるぐる回ってる、横山さんの場合でも ATP は 10 mM 加えればどんどん回ってるわけだから。

横山 ただ、ADP 阻害の構造も出てるんですけど、ほぼ同じなんです。構造自体。構造的な差異はないわけですね。

吉田 どこかで見間違ってる？

横山 それ見ましたけれども、ヌクレオチドが全くない状態の構造と、ADPが1個付いたADP阻害の状態を比較しているのです。

吉田 だって、それ、ヌクレオチドが全くない状態でも、ほとんど同じ構造でしょ、横山さんの場合もね。

横山 そうです。ADPが付いていても、付いていなくても、構造は変わらない。ところが、ADPが付いていると動かなくなるということは。

吉田 だからこそ、ADP阻害のない変異体使ってるわけでしょ。野地博行(東大)さんのところでも好熱菌(*Paracoccus*)のF1のクライオ電顕やって、回転方向も合わせて見るとね、44度のところで止まるっていう、そういう構造も出てるけど・・・80度、40度というのは初めは非常に大事な情報だと思ったけども、実際、大腸菌もそうなんだけど。ところが好熱菌のF1は120度なんですよ。ヒトのF1と比べてやったら、また全く違うようなステップが見えてきてね。だから、ステップというのは本当に微妙なところで決まってるようなところがあるね。ステップがあれば、反応の素過程を分析できる利点はあるけれども、本質的に120度ごとに回るやつと80度、40度、それからヒトの場合には何度だったか忘れちゃったけども、本質的なことは、ステップのところにあるのではないと思うんですよ。

横山 そうですね。ステップサイズさまざまです。

吉田 だから、横山さんの結果は、野地さんの結果と割と合いますよ。

横山 別にあれと対立するとか、そういうわけではないんですけど。ただ、③の解釈のところはもうちょっと考えてみたいと思いますけれども。

吉田 無機リン酸を100 mMぐらい加えてクライオ電顕を見ればいいんですよ。

横山 リン酸はあまり影響与えないです、この酵素に。

吉田 要するにADPと無機リン酸Piが離れてくれないと、βが開構造にならないので、γサブユニットは回れないんですよ。

横山 そうです、そのとおりです。

吉田 だから、三つのことが同時にそろわないと多分、回れないんだよね。

横山 そのとおりです。だけれども、吉田さんは③のところは、

これは定常状態でも起こっていることだから自発的に起こる過程だろう、と言われるわけですよ。

遠藤 ③の空になった状態からATPが結合する状態へのステップ、これはΔG的にはどうなんですか？それをやらないとサイクルが回らないですね。

横山 普通に考えれば開いてる構造が閉じるんだから、それって①と同じで・・・。

遠藤 開いたままATPがくっついてやつですね。だから、①の開構造に戻るところは、ダウンヒル、アップヒル、同じ？空の構造にただATPが結合するんだから、開で空の構造と開でATPが結合した構造を比べると、どちらがギブスエネルギーが低いんですか？開でATPが結合したほうが低いんですか。

横山 普通に考えれば、結合するということであれば結合エネルギーは消費しますから、開構造のところはATPが付けば、その反応はダウンヒルか、自発的といってもいいですけどね。

遠藤 だけど、そこだってエントロピー的には不利ですよ。

吉田 図13上でいくと開いたところにATPがくっついて、まだ開いてるけども、これはすぐに閉じちゃう。他のサイトの協力があっても知らんけども、そこは阿久津秀雄(阪大)さんがNMRでやってるんだけど、ATPがくっつくとリン酸基の負電荷が両方のドメインをくっつけちゃうんですよ。そう言う方向に働きたがる。ただし、それが本当に閉じるためには他の二つのサブユニットと、残りのサブユニットとの協力が多分あるんだろうけど、この結合は強いですよ。

遠藤 だから、これ、さっきの安藤さんみたいにエネルギーダイヤグラムがあって、それぞれ状態のギブスエネルギーがどのくらいなのかっていうのが見積もれると、相当分かりやすいんですね。

吉田 見積もれるよ、そりゃ。

横山 そうですね。

吉田 だって、 K_d が分かればΔGがでますから。

遠藤 その絵は描けないんですか、これに。そうすると分かりやすいんですけど。

横山 そうですね・・・。

吉田 クライオからは分からないけど、それはATPの結合の K_d

を測ればいいんだから。ただ3カ所あるから、ややこしいだけだね。

遠藤 ATPがくっついた後、閉じるというコンホメーション変化と共役してるから、そこをちゃんと分離するのは、そう簡単じゃないような気はしますけどね。

吉田 簡単じゃない。

遠藤 平衡だけじゃ出せないから。

吉田 K_m から推測できないんだよ、3カ所だから。3カ所の β が協同的に働いてるから、単純には K_m から計算できないですね。

遠藤 しかも分離できないから、コンフォーメーション変化と結合がね。

横山 数値データを出して議論するのは、現段階で難しいですよ。ですので、③が自発過程か非自発過程かの結論を出すのは、なかなか決定打がないということがありますね。

遠藤 そこが今、解釈がぶつかってる場所ですね。

横山 ②と③の解釈ですね。

吉田 ③が起きなければ、それは定常状態のATP加水分解は起きないから、それは起きてるんですよ、ちゃんと。

横山 いや、私の主張は、②が自発過程ということなんですけどね。

遠藤 そこですよ。

吉田 ②は平衡だから、平衡なところからは情報もエネルギーも引き出せないですよ。

横山 ②では準閉から閉への構造変化をともなっているから、どうなんですかね。あとATPが加水分解すれば、リン酸負電荷の静電的反発もあって、少なくとも分解されたADP+PiとATPがあれば、そこには確実にエネルギー差がありますよね。ですからここが全く平衡かと言われると、どうなんだろうと思うところはあります。

吉田 ATPとADP+Piはほとんど平衡なんですよ。加水分解産物のADPやリン酸が離れることによって初めてATP加水分解の意味が出てくるんですね。そのところでADPや無機リン酸の解離を阻害してしまったら、②というのは行ったり来たりするだけなんです。

横山 それはそうだと思うんですけど。ATPが加水分解されてPiができれば、Piは触媒サイトから勝手に離れていきますので、結局、平衡は加水分解方向に偏るはずなので。

吉田 それはもちろん、そのとおりですよ。

横山 正味で見てもやれば、②の過程というのは一方向性を持つんじゃないかと思うんですけど。

遠藤 それを言いたしたら、後ろの反応が前の反応を引っ張るっていうことになって、何を議論してるんだかわからなくなりますよ。いまは各ステップの ΔG の話をしてるんで。

吉田 それだけの話になっちゃう。

遠藤 ただ、確かにATP加水分解の前後の負電荷の静電反撥はADPとPiが解離して離れていかないと効果が少ないかもしれないけど、ATPがADP+Piになって共有結合が切れたら、電子の非局在化は変わるから、多少はマイナスの ΔG があると思いますよ。

吉田 少しはあるよ。

横山 あると思います。

遠藤 教科書的に言えばね。

吉田 少しはある、それは。安藤さんのデータもそうだし、もっと一般的に言えば、 $\text{glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucose-6P} + \text{ADP}$ を触媒するヘキソキナーゼみたいな普通の酵素でも酵素反応の ΔG は-10kcalくらいだけど、酵素(E)に結合した状態の $\text{E} \cdot \text{glu} \cdot \text{ATP} \rightarrow \text{E} \cdot \text{glu6P} \cdot \text{ADP}$ の ΔG はほとんどゼロだったと思う。ギブスエネルギーにしてみると、あんまり大きな差はない。

遠藤 だから、②は ΔG はマイナスではあるけれども、それがどのくらい大きかっていうところは議論があると、そういう感じじゃないですかね。

横山 吉田さんは、ほぼ平衡で関係ないという話。②じゃないとすれば、駆動するのは③だろうと。

吉田 ③だと思いますね。

横山 私は、その説には賛同しかねるところがあって、①が自発過程なら③は非自発過程だろうと。ただ、確かにリニアモーターなんかではリン酸とかADPが解離すると、次の反応が起こると

いう実験データがあるので、反応産物のリリースがきっかけになって、次のパワーストロークというか形状変化が起こると言うデータはあります。だから、そういう観点からいけば、そういうふうに見えなくはないんですけども。ただ、この分子モーターに限って言うと、閉じたところに、糊のようにしてヌクレオチドがくっついてるので、これを引き離すには外部からトルクを入れてやらないと起こらないんじゃないかと。

遠藤 これ MD (分子ダイナミクス計算) をやったらどうなんですか。

横山 どうでしたっけね。ヌクレオチドはまだ入れてないと思いますけど。

遠藤 ヌクレオチド入れたいですね。ただ、エントロピー的な効果は MD じゃ分からないかもしれないですけどね。

横山 粗視化モデルで MD やってらっしゃる先生もいるんですけども、ヌクレオチド使ってなくて、それこそダウンヒルの条件をつけた上で軸が動いたという、そんな MD ですね。

吉田 バルクで酵素反応のキネティクスを調べると、当然、 V_{max} は出てくるわけです。その V_{max} はどこで決まってるかという③じゃないんですよ、②なんです。②のところは結局、律速になってるわけ。それは溶液中の ATP 濃度に一切、左右されずに、どんなに ATP を増やしても、②の速度の限界を乗り越えられないから、結局最後には②が V_{max} を決めてるんです。

横山 それはそうですね。

吉田 ということは③は、かなりどんどん起きちゃってる、定常状態で回ってれば、起きちゃってるってことなんですよ。

横山 起きてるのは確かですね。

遠藤 そもそも、このモデルの ΔG のところの見積もりがはっきりしないと、どこがラチェットなのかっていう以前の問題になりますよね。

横山 ですので、②はラチェット的に見えるけど、そうじゃないということであれば、ラチェットのモーターとはいえないと。

遠藤 ①が駆動してればパワーストロークですよ。

横山 そうですね。構造変化を伴ってステップが起こるという。もともと①が関与してるのは確かなので、私の論文で言いたかったことは、従前の①の閉じるという反応、それにプラスアルファ

で②の過程も関与してるということです。①の過程が重要であるのはコンセンサスが取れてますので、少なくともパワーストローク的な要素を持った分子モーターであるのは確かです。プラス ATP の加水分解がラチェットの要素を加えていると。

遠藤 その辺が、すっきりしてなかったんで、お話しできてやっとわかってきました。そうすると横山さんの話はここまでということですか。

横山 はい。だいぶ時間、もらったと思うので。

吉田 それでは私の話をしましょうか。

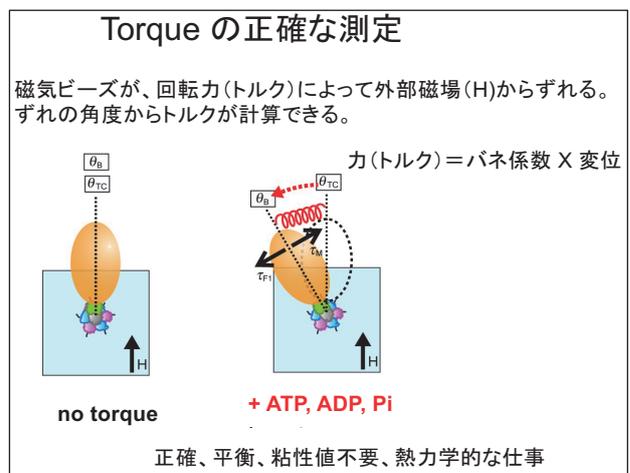


図 14 F1 モーターのトルクを測る

吉田 要するに、F1 モーターの回転のトルクを実測してしまうという話です (図 14)。F1 をガラス上に固定して、回転子のところに磁石、マイクロ磁気ビーズをくっつけて、外部磁場をかけると軸の γ サブユニットは強制的にある角度になっちゃうわけですね。そこところに ATP あるいは ADP、無機リン酸加えてやると、回転のトルクが生じて外部磁場の方向から回ろうとするんですよ。回ろうとするけども、磁場の力があるものだから、 θ_B で釣り合っちゃう。磁場による引き戻す力はフックの法則で決まるので、釣り合った角度を測ってやると、初めの角度におけるトルクが実測できてしまうわけです。この方法のいいところは、溶液内でぐるぐる回って動いてるのを見るんじゃないので正確な測定ができるし、水の粘性なんかを考える必要がないんです。

それからあと、これは磁気ビーズを引っ張って一定距離動かして支えているので熱力学的な定義により仕事をしているわけなんです。たとえば熱になってしまった仕事っていうのは仕事率にならないので、これは本当に仕事をしている。この系を使って、税田 (英一郎) 君という大学院生が 3 年間かけて、外部磁場の角度 θ_{TC} をちょっと変えては、釣り合う角度 θ_B を測ってということを繰り返してトルクを求めました。そして 360 度まわしていくと、トルクの外部磁場の角度依存性として図 15 のようなトルク

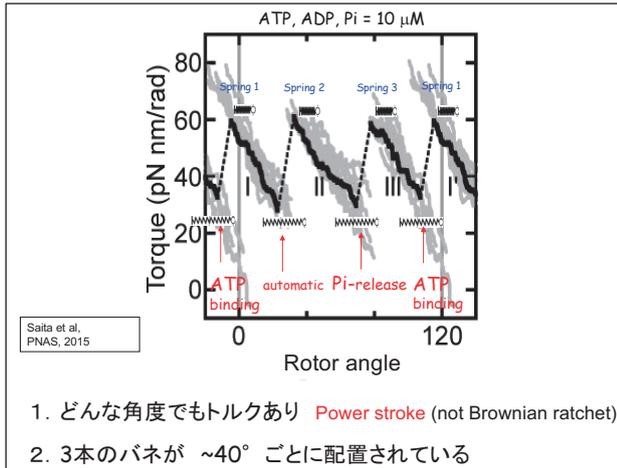


図 15 実測された F1 モーターのトルクパターン

クパターンが得られました。パターンは 120 度ずつの繰り返しで、面白いことに、トルクの値は真っ平らじゃなくて、外部磁場の角度によってのこぎり型に変化するんですね。外部磁場の角度を増やしていくと、トルクはいったん増大する(ジャンプする)。そして徐々に減っていく。360 度回る際にトルクは 3 回ジャンプすることになります。そしてこのトルクパターンの下側の面積、積分値は F1 が回っていくにつれて行う力学的仕事になります。

これから言えることは、ATP がある状態ではどの角度においてもトルクは正の値で、F1 は前に回りたがっているということです。これはトルクそのものを測ってるわけですが、どの角度においてもトルクは働いている。つまりこれはパワーストロークだということを示しています。もしも、これがブラウンラチェットだとすると、ブラウン運動で行ったり来たりするわけで、トルクなしのはずですよ。だから、どの角度においてもトルクがあるってことは、これはパワーストロークだと。

遠藤 でも、トルクが発生したらパワーストロークってことではないじゃないですか。

横山 ブラウンラチェットとしてもトルクは測れるわけですね。

吉田 力が働いていて、外部磁場を切り離すとぐるぐる回っちゃうんだよ、どんどん。本当にブラウンラチェットだったら、エネルギー図で言うと真っ平らなポテンシャルがあって、その先にポテンシャルの谷があって、ブラウン運動でふらふらしてうちに、そこへスコンと入ってしまう。スコンと入ったところでまた次の、階段と思ってもいいんだけど、次のポテンシャルのところまでふらふらして、次の谷があって落ちこちてしまう。これが一番純粋なブラウンラチェットによる動きだと思います。

遠藤 だけど、ポテンシャルが傾いてたっていいんですよ、傾いてるだけでも、ブラウンラチェットですよ。

吉田 ポテンシャル傾いても、結局、ふらふら動いて、ポテンシャルが途中で変化しなくちゃいけないよね。真っ平らなままじゃダメなんで。ただし微視的に見れば、ブラウンラチェットが働いている、という議論は可能かもしれない。図 15 で細かく見るとその小さな変化の部分にブラウンラチェットを考えることはできるかもしれない。でもバルクで見れば、いつでもトルクが働いている、だからパワーストロークだと。

遠藤 でも、トルクが発生してるからパワーストロークだっていうのは、おかしいように思いますが。

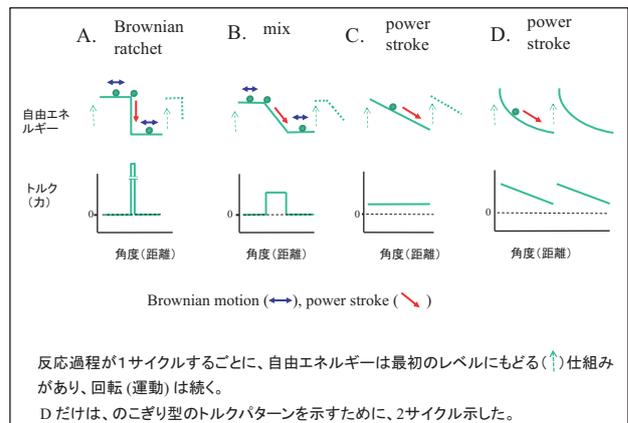


図 16 ブラウンラチェットとパワーストロークによるトルク

吉田 そうかな。

(吉田補足：これはある意味、お二人の言うとおりでした。言葉の定義としてトルクとは回す力だから、トルクなしの回転運動はありえない。ブラウンラチェットの場合でも反応過程のどこかでトルクが発生しなければ回転は起こりません。ブラウンラチェットとパワーストロークの違いは、1 サイクルの運動を一連の反応過程(ステップ)に分解してそこで何が起きているか解析して、始めてははっきりします。もっとも単純な例を考えると、トルクなしで回転子が熱ゆらぎでふらふらしているブラウン運動のステップとトルクによって一方向に回転するステップの組み合わせになっている機構(図 16 の A と B)と、いつでもトルクによって回転している機構(たとえば図 16 の C と D)が考えられる。図の A が典型的なブラウンラチェットで、ブラウン運動をしている動きの範囲ではトルクはゼロ、ラチェット装置(崖の落下)のところでも瞬間的にトルクが発生する。ちなみに安藤さんが鼎談のはじめに示した図 1 の Continuum Ratchet というのはブラウン運動のステップが無いので、ブラウンラチェットとは違います。図 16 の C が典型的なパワーストロークとなります。どの角度でもトルクが働いて前に回るようになっています。F1 のトルクの角度依存性は、傾きのあるノコギリ型であり(自由エネルギー地形は放物線の一部)(図 16 の D)、ブラウン運動だけのステップはありません。トルクがゼロとなる角度範囲はなかったのです。それゆえ F1 モーターはパワーストロークだと結論できる。私の鼎談での発言でいえば、「どんな角度でも」トルクが働いている、がパワーストロークと主張する決め手

でした。ただ、F1 についてはパワーストロークとブラウンアンラチェットとの区別よりも、平衡位置（トルクがゼロ）からの変位に比例して平衡位置に戻ろうとするトルクが大きくなる（フックの法則と同じ）バネが3本、分子の中に仕込まれている、という発見がうれしかったのです。）

遠藤 例えば、SecM で力が測れるっていうんですよ。SecM では、翻訳アレストされた新生鎖を引っ張ると翻訳アレストを解除できる。だから翻訳アレストの解除で引っ張り力を測定できるというわけです。しかし、あれだってブラウンアンラチェットで引っ張ったって翻訳は解除されるんですよ。これはフックの法則で測定方法が違うから、また全然違うのかもしれないけど、力が発生したらパワーストロークだっていうことはなくて、ブラウンアンラチェットだって力的なものは発生すると思います。

吉田 これ（図14）で言うとね。ここ（ θ_B ）で外部磁場による引き戻す力との釣り合いが維持されてるってことは、純粋に力が発生している。ブラウン運動に基づくメカニズムだったら釣り合いは維持されないですよ。

遠藤 そうかな・・・まあ測り方の原理が違いますからね。

吉田 実際、どうしても回りたがっているわけで、これで力（トルク）が働いてなかったら、本当にブラウン運動だけだったら、磁気粒子は外部磁場の方向（ θ_{TC} ）に向くはずで、ここ（ θ_B ）の位置まで動かない。

吉田 図15から話を先に進めると、これ、ATP、ADP、無機リン酸の濃度を色々変えてるんですよ。ATP濃度を変えるとどうなるかという、ATP濃度を10 μ Mから0.1 μ Mに下げると、図17の青線ですがトルクパターンの1番目のジャンプが角度変化に対して遅れるんです。そうするとトルクパターンの下の積分した面積、仕事量は減るわけですよ。横軸の長さ120度当たりのトルクパターンの面積はATP1分子がおこなった力学的仕事量（W）となります。実験ではいつも $\Delta G \sim W$ でエネルギー変換効率は100%に近かった。

遠藤 今の話、全然ついていけないです。

吉田 ATP濃度を変えたときに、トルクの外角度依存性、のこぎりの歯状のパターンがどうなるかを見るわけです。

遠藤 外部磁場の角度 θ_{TC} を変えていったときの釣り合いの角度 θ_B の変化ですね。

吉田 そうです。トルクの値ね。ATP濃度が低くなると、なかなか次の所へジャンプできないんですよ。図17の青い線ですが、そうするとジャンプが遅れて、結局トルクパターンの下の部分の

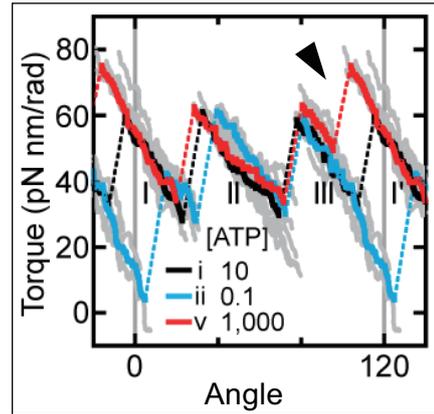


図17 ATP濃度を変えるとトルクパターンが変わる

面積が減ってしまって、仕事量が減ります。

遠藤 これはATPの加水分解を見るわけではないんですか？

吉田 モーターは回ってないから正味の加水分解はしていませんね。0.1 μ MってことはATPがF1に結合する頻度が減ってるだけです。

遠藤 F1のATP結合が飽和していないってことですか？

吉田 飽和してないと思う、0.1 μ Mではね。それでも、時間分解能的にいったら、非常に早い速度でATPは脱着してるからトルクが出てくるんだと思います。

遠藤 難しいな。

吉田 ATP濃度を1mMに上げると ΔG は増えるでしょう（図18の上の式）。そのときに何が起きるかという、ジャンプするタイミングが早くなって、のこぎりの歯が高くなり、赤く塗った面積分だけ仕事量が増えます。ADPや無機リン酸の濃度を上げると ΔG は減少しますが、ADPの場合は1番目のジャンプのタ

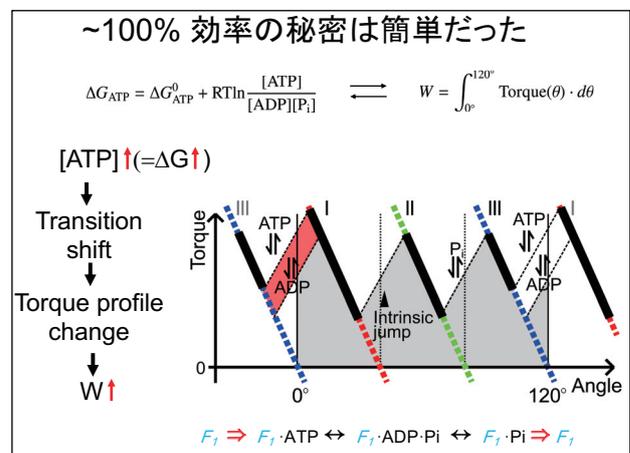


図18 トルクが行う仕事量と ΔG がうまく対応してくれる

イミングが、無機リン酸の場合は3番目のジャンプのタイミングが遅れて面積(仕事量)も減少します。というわけで、ATP,ADP,無機リン酸濃度がいろいろ変わっても、いつも100パーセント近い効率でトルクが発生する。これは、私として歯結構、満足してる仕事なんです。でもしトルクパターンが平らだったら、ATPが早い角度(小さい角度)のところで結合しても、遅い角度(大きい角度)のところで結合しても120度あたりの面積(仕事量)は変わらないんだけど、パターンがのこぎりの歯状の斜めになっているせいで、見事に変わるんですよ。

遠藤 これは外部磁場でどの角度まで回すかによってF1モーターが生み出す力が変わってくるってことなんですか。

吉田 そうです。

遠藤 それ何を反映してるんですか。つまり、120度の中で外部磁場の角度を変えてくと、最初のうちはすごく力が要るけど、最後のほうに近づく、弱いトルクであつという間に40度、80度、120度のところに行きやすくなる、そういうことを意味してるんですか。

吉田 そう、40度近くになると、だんだん回る力、トルクが減ってきちゃうわけ。ところが、次のフェーズがあって、再度トルクがジャンプして増大、そしてまた小さくなっていくところで、またぼんと飛び上がって……。トルクは結局、3回、こういうのこぎり型のジャンプのあるパターンを示すわけです。

遠藤 非常に面白いけれども、解釈が難しい。

エネルギー変換効率 ~100% は、生命にとって must だろう

トルク半分の ATP 合成酵素で生命を支えられるだろうか？

half-torque = loss of 50% energy

ATP 合成に使える $\Delta G = \sim 4$ kcal/mol

At equilibrium

{	ADP 0.5 mM	}	これでは、細胞は生きられない
	Pi 10 mM		
	ATP 0.2 μ M		

図19 ATPシンターゼの効率はなぜ100%でないといけなのか

吉田 そうすると具合がいいことに、トルクパターンのトランジションのタイミングが変わるだけで、 ΔG の増減と仕事量の増減の関連が保証できちゃったんです。

というわけでここに安藤さんがいたら聞きたかったんだけど、ATP合成酵素、特にATPシンターゼ(FoF1)、F1についてはほとんど100パーセントに近い効率で回ってるっていうのが、測定で分かってるんですよ。でも、これは単に機械の出来がいいっ

ていうんじゃないで、ミオシンとかと違って、100パーセントぐらいの効率がなくて、つまりエネルギーの半分をロスしちゃうようなATPシンターゼだとすると、ATPを十分に合成できないんじゃないか。 ΔG から合成可能なATPの量を計算すると、ADPが0.5 mM、無機リン酸Piが10 mMという生体内の条件で、使える ΔG は半分として4 kcal/molとすると、ATP濃度は0.2 μ Mになっちゃうんです。これではとても細胞生きられないです。だから、ATPシンターゼのエネルギー変換効率は100パーセント近くないと、5mM ATPが維持できない。つまり、ぜいたくなことをやってるわけじゃなくて、効率100パーセントじゃないと多分、困るんじゃないかと思うんです。この辺りの議論は安藤さんに聞きたかったんだけど、この議論でいいのか。もちろん、F1のトルクというのはATP加水分解の方向のエネルギー変換なので、逆反応のATPシンターゼで合成反応の効率に100%という効率が適用できるかどうかとか、問題があるのかもしれないけれど。

ついでですが、F1のモーターの軸を回す β サブユニットの出っ張りの部分(押し棒)、この出っ張りの部分を短くするとトルクが半分になるんですよ(図20)。F1の開構造、閉構造っていうのは、出っ張りの部分が上がったり下がったりしてできるんで、この出っ張りを短くしてしまうと、結局、トルクが減るわけです。つまり、回転子が入っている穴の格好にあった出っ張り部分で押したり引いたりして、回転子が回る。トルク半分の酵素でもATPを合成します。ただし、合成できる量、最終的に合成できるATP濃度は低くなります。

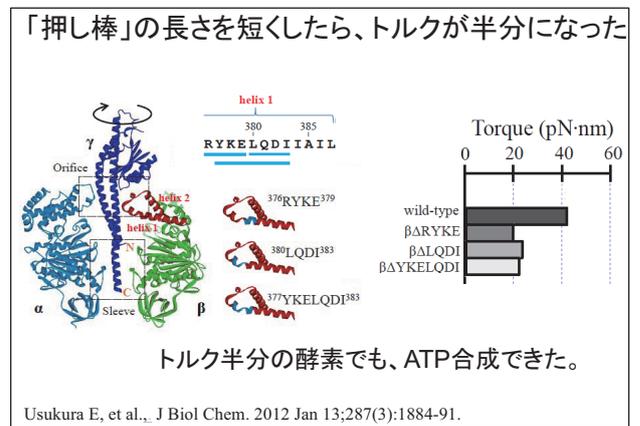


図20 F1-ATPシンターゼのトルクを半分にする

遠藤 今のトルクという話は、V-ATPアーゼだとどうなんですか？

横山 トルクはあまり変わらなくて4分の3ぐらいですかね。普通に測ればですが、V1の場合は、特に熱の散逸過程があるんですね。

吉田 トルク測るのは、実際はなかなか難しいですよ。以前はアクチンをF1の回転しにくくつけて、それが回るときの速度から

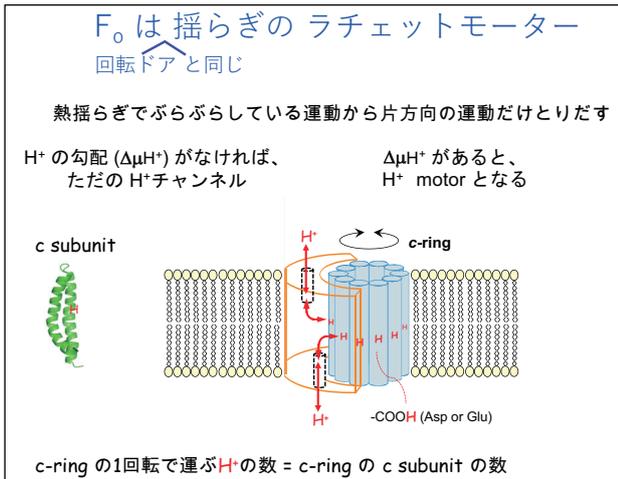


図 21 Fo-ATP アーゼはブラウンラチェット出回る

水分子の抵抗と回転速度とを計算して、効率はおおよそ 100 パーセントだなんて言うたけども、いろんな仮定が入ってるんで実は効率の見積もりは難しいと思います。

あともう一つ、これは典型的なブラウンラチェットだと思うんだけど、ATP シンターゼの膜に埋まっている部分で、プロトン (H⁺) が通る Fo 部分です (図 21)。皆が合意してるモデルでは、水素イオン、プロトンをくっつけてぐるぐる回る、そういうリング (c-リング) が膜の中にあって、これに溶液中からプロトンを供給する通り道が上と下と二つあります。そうすると上側にプロトンがたくさんあるときには、そちらからどんどんプロトンが供給されるので、c-リングにくっついた後、結果的に右回りに回って、下から出てくるプロトンの数が多くなる。従ってこのリングはいつも右回りに回る。逆に、下側にプロトンがたくさんある場合には、下からプロトンが供給されて c-リングにくっついて、結局 c-リングは左回りに回って上側の出口に到達、プロトンは上にでていく。c-リングの回転の原動力はブラウン運動で、それが一方向に回るというわけだから、一番きれいな分かりやすいブラウンラチェットの回転モーターでしょう。

遠藤 この場合は確か、静電的にペアになるものがあるんで、それが方向性を出してるんですよね。

吉田 c-リングの膜内の部分にカルボキシル基があるんですよ。それは COO⁻ の状態だと膜内の疎水性の脂質に接するので膜中に出ていけないんです。でも COO⁻ のところにプロトンが来てくっつくと COOH になって、そうすると初めて、疎水性の膜中に出ていける。たったそれだけの仕組みでプロトンの入り口と出口を区別できる。入り口と出口の間はショートしちゃいけないのでアルギニンがあって絶縁してる。こうしてそこを絶縁してやると、それだけでちゃんとプロトンモーターになっちゃうんですよね。

遠藤 これはだから、逆戻りを防ぐトラップがついたラチェット

ですよ。

吉田 完璧にラチェットです、分かりやすいラチェット。

遠藤 だけどこれ、構造の分解能が今、上がってないんですか、クライオ電顕構造とか。

吉田 横山さん、どうですか。これ、なかなか、目で見える 1 分子観察はできてないと思う。

横山 一応、うちの Vo モーター部分である程度分解能が出た構造があって、それを見ると c-リングはぐらぐらしてる感じじゃないです。結構、かっちりした構造しています。もちろんプロトン濃度勾配でカルボキシル基の脱プロトン化が起こって動くというのはいいんですけども、それをブラウンラチェットと言っているのいいのかっていう、また定義の話になってくるんですけども。

遠藤 でも、これは c-リングがブラウン運動でどっちにも回るのが、片方に回ったときだけトラップされるって、そういうモデルで説明できるんですよね。

横山 そういう考え方もできる。

吉田 ブラウン運動を、電気と言えば整流してるんです。だから、これはきれいなブラウンラチェット、定義そのものだと思う。ただし、この回転を Fo 部分だけ取り出して一分子観察するのは非常に難しいんで、なかなか直視できないと思うんですね。

遠藤 トルクの話は、勉強不足で議論を深められなかったんですが。横山さん、付け加えること、何かありますか。

横山 安藤さんのお話聞くと、いろいろ勉強になったんですけども。パワーストロークの定義がいろいろあって、一番単純なもの、構造変化でステップが起こるといって、そういう厳密な定義でいけば、V-ATP アーゼの場合でも遠藤さんなんかはとてもそれに賛成できないということになりますし、安藤さんが最初に説明されていた難しい方のブラウンラチェット、離散的な構造間のポテンシャル差によって一方向性が出るということであれば、V1 のように非常に離散的な構造間で構造変化が起こって回転している場合は、安藤さんの方の図 1 のリニアシークエンシャルモデルがそれに相当するのかなとは思いますが。

あと、V-ATP アーゼにおける ATP の役割、これに関しましてはまだコンセンサスが取れてないということで、よろしく願います。

参考文献

- Liu, D'Silva, Walter, Marszalek, Craig. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel (2013) *Science* 300, 139-141
- Okamoto, Brinker, Paschen, Moarefi, Hayer-Hartl, Neupert, Brunner. The protein import of mitochondria; a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation (2002) *EMBO J.* 21, 3659-3671.
- Yamano, Kuroyanagi-Hasegawa, Esaki, Yokota, Endo. Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation. *J. Biol. Chem.* 283, 27325-27332
- Sato, Kawano, Endo. Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. (2019) *Sci. Rep.* 9: 7637.
- Kishikawa, Nakanishi, Nakano, Saeki, Furuta, Kato, Mitsuoka, Yokoyama. Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases. (2022) *Nat. Commun.* 13/1213.
- Saita, Suzuki, Kinoshita, Jr., Yoshida. Simple mechanism whereby the F₁-ATPase motor rotates with near-perfect chemomechanical energy conversion. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 9626-9631.
- Usukura, uzuki, Furuike, Soga, Saita, Hisabori, Kinoshita, Jr., Yoshida. Torque generation and utilization in the motor enzyme F₀F₁-ATP synthase: half-torque F₁ with short-sized pushrod helix and reduced ATP synthesis by half-torque F₀F₁. (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 1884-1891.

研究会レポート「第15回小胞体ストレス研究会」

開催日時：2022年7月29日～31日、場所：むすびわざ館

第15回小胞体ストレス研究会大会長 潮田 亮

2022年7月29日（金）～31日（日）京都壬生にある京都むすびわざ館にて、京都産業大学タンパク質動態研究所との共催で第15回小胞体ストレス研究会記念大会を開催いたしました。小胞体ストレス研究会は2005年に設立されて以来、小胞体ストレス研究の基礎・応用研究の推進・発展を目指すことを目的に毎年開催されてきた研究会です。小胞体ストレスは、構造異常タンパク質の蓄積に起因するストレスであり、タンパク質動態研究は、小胞体ストレスの理解には欠かせないため、タンパク質動態研究所とは非常に繋がりのある研究領域であります。さらに第15回という節目にさらなる研究会の発展を期して、小胞体ストレスを研究対象としない幅広い研究者の方々にも集まって頂きました。

当初、開催は2020年に予定し、準備を行ってきましたが、新型コロナウイルス感染拡大の影響で2回の延期を経て、このたび3年ぶりに開催するに至りました。会場では感染対策を徹底し、オンラインでおおよそ100名もの参加者にお集まりいただき、開催することが出来ました。研究会本会の前日7月29日（金）には、若手の会を開催し、若手研究者や学生の研究発表の場を設けることが出来ました。論文公開前のデータを発表する若手研究者や学生は、コロナ禍のオンライン発表ではなかなか発表しづらい状況が続いたと思われるが、ここでは最新の研究成果を発表して頂きました（参加者には秘密保持契約書をサインして頂きました）。議論も大変、白熱し、有意義な若手の会であったと思います。今回、若手最優秀発表賞1件、若手優秀発表賞2件を投票で決め、若手最優秀発表賞には宮崎大学大学院医学系研究科の松尾直哉さん、若手優秀発表賞に徳島大学先端酵素研の松崎元紀さんと京都産業大学生命科学研究科の和田匠太さんが選出されました。

2日間の研究会本会では、3つの特別講演と1つのマイスターズレクチャーを企画することが出来ました。7月30日（土）、1日目最初の講演では、小胞体ストレス研究のフロンティアである京都大学の森和俊先生に、「小胞体ストレス研究の温故知新」というタイトルで小胞体ストレス研究の歴史とこれからの小胞体ストレス研究について、お話を頂きました。今回、小胞体ストレス研究を研究対象とされていない方々にも多く参加頂いたため、小胞体ストレス研究の歴史を詳細に、そしてエキサイティングに解説頂き、研究会をスタート出来たのは記念大会に相応しく、大変良かったです。この日の締めくくりには、京都産業大学タンパク質動態研究所所長であられる遠藤斗志也先生にご講演頂きました。遠藤先生はこれまでミトコンドリア研究で世界を牽引され

てこれ、生化学、分子生物学、構造生物学を駆使し、ミトコンドリアバイオジェネシスの解明に大きく貢献されてきました。近年、ミトコンドリア-小胞体コンタクトサイトが、それぞれのオルガネラ恒常性に重要な役割を果たすことが明らかになってきて、小胞体ストレス研究は小胞体というオルガネラだけでは完結しないことを痛感しました。7月31日（日）研究会2日目の午前には、京都大学大学院生命科学研究科の井垣達史先生にご講演いただきました。ご存知の通り、細胞競合の世界的なフロンティアであられ、学術変革A「多細胞生命自律性」の領域代表を務めるなど活躍されております。以前より、是非、お話を聞きたい！と密かに思っており、面識がなかったのですが、勇気を出して講演依頼させて頂きました。細胞競合というダイナミックな生命現象が細胞内外のシグナル伝達はもちろんのこと、タンパク質翻訳、オートファジーや細胞間接着などと密接に関連していることに驚きました。もちろん小胞体ストレスも関与することと、様々なイベントが複雑に絡み合う現象を、遺伝学を始めとする様々な手法を駆使し、力強く一つ一つ解明されており圧倒されました。研究会の締めくくりにはマイスターズレクチャーとして、京都産業大学タンパク質動態研究所の前所長であられ、現在、JT生命誌研究館の永田和宏館長に「分子シャペロンに助けられて」というタイトルで、これまでの研究や研究領域の歴史などをご講演いただきました。また、最近では学術変革Bや創発研究などで若手研究者が研究領域を模索する機会が増えており、数々の領域を立ち上げてきた永田先生にアドバイスを頂くなど若手研究者にも大変有意義な講演となりました。

一般演題はおおよそ20演題となり、発表が終わると質問するマイクの後ろには列が出来、タイムアップになるケースも多く、全ての演題に対して、活発な議論がなされたのが本研究会で最も印象に残るところでした。また、ポスター発表では、ポスター発表終了時間を大幅に超えても議論が尽きませんでした。オンライン研究会ではなかなか味わえない臨場感あふれるディスカッションは、オンラインでの研究会の醍醐味で、改めて3年ぶりにオンラインで開催されて良かったと思いました。また、新しい試みとしてコミュニケーションアプリ「slack」と研究会を連携させ、アプリ内でも情報交換やディスカッションが出来、好評でした。コロナ禍を経て、研究会のスタイルも変化する必要があるのかもしれませんが、今考えても残念だったのは、新型コロナウイルス感染第七波の最中でもあったことから、懇親会が出来なかったことです。小胞体ストレス研究会の懇親会は、さらに議論が白熱するところで、楽しみの一つでした。来年はさらに感染リスク

が減り、このような研究会がさらに制限なく開催されることを祈っております。次回は金沢です！



活発なディスカッション

遠藤研究室 小西雄大 (大学院生)

新型コロナウイルスの第7波の影響が危ぶまれる中、最大限の感染対策をしつつ、第15回小胞体ストレス研究会が無事開催された。第15回の開催を記念して異分野の研究者も募っていたので参加させて頂くことにしたが、筆者は小胞体ストレスに精通していない。この会は3日間開かれたが、全日ほとんどの登壇者が「みなさんご存知の小胞体ストレス応答ですが」というので、場違い感が否めなかった。しかし、小胞体ストレスの専門家による説明のおかげで、3日目には小胞体ストレスの専門家になった気分であった。

1日目は、若手の会が開かれた。小胞体ストレス研究会で若手の会を開くのは初めてという話であったが、盛んなディスカッションが行われた。筆者もセッションCのトップバッターとして発表した。筆者の研究内容は、小胞体ストレスからは少し離れた分野であったため、誰からも質問されないのではないかと不安を抱いていた。しかし意外にも、たくさんの質問をいただくことができた。それどころか、聴衆が小胞体ストレスの専門家であることから、普段とは異なる観点からの指摘を多く頂くことができたので、非常に有意義な時間を過ごすことができた。

若手の会では、2日目に表彰される優秀発表賞があった。優秀発表賞が2人、最優秀発表賞が1人である。残念ながら筆者は受賞することはできなかった(少し期待はしていた)が、受賞された3人には納得であった。やはり面白い発表をする人は、相応のデータがあり、エビデンスが揃っているのだということを感じた。受賞した3人の発表はそれぞれ面白い内容だった。潮田研の和田さんは、ATF6の活性化機構の解明。徳島大の松崎さんはIRE1のオリゴマー化について。そして最優秀発表賞、宮崎大の村尾さんはDerlin-1の海馬ニューロン新生への影響について。発表もさることながら、質疑応答の的確さ、端的な答え、堂々たる態度も含めて非常に参考になった。筆者も学会で賞を貰えるような面白い発表ができるようになりたいと思う。2日目というと、ポスター発表もこの日に開催され、そこでも筆者は発表した。ポスター発表をするのは今回が初めてだったので、気合を入れて望んだ。驚いたことに、全く人気がなかった。潮田研の方が気を遣って発表を聞きに来てくださった。初めて作った思い入れのあるポスターに申し訳なさを感じつつも、ピン留めされたポスターをボード

から外し、そっと鞆にしまった。次はもっと惹きつけられるようなポスター発表をしてやるぞ、とリベンジの気が湧いた。それはさておき、若手の会は非常に盛況であったと思う。来年以降も若手の会が開催されることを願う。

2日目と3日目は、世界的に活躍されている先生方による特別講演があった。2日目は、京大の森和俊先生の特別講演から始まった。森先生は、小胞体ストレス研究の歴史を、若手時代の出来事や現在の研究に至るまでの経緯を交えて語られた。質疑応答の時間、「小胞体ストレスの研究を始めたきっかけは何ですか?」と質問があがった。個人的にも非常に気になる質問であったが、森先生は「小胞体ストレスを研究しようと思って始めたわけではない。海外で受け入れ先がなくて、入った研究室がたまたま小胞体ストレスをやっていた。」と正直に答えてくださった。なんと、小胞体ストレスの知識もないまま留学されたそう。救われた気がした。今、どれだけ著名な先生であっても、最初のきっかけは些細なものであることを知れた。初めの状態が何であれ、その後の頑張り次第ではどうにかなるものだと思う。筆者もBIGな人間になれるよう頑張ろうと思う。

2日目の締めは、京産大の遠藤斗志也先生(筆者の指導教官)であった。遠藤先生は、タンパク質や脂質の生合成に関する最新の研究を発表された。冒頭、いろんなオルガネラの人がいるのだからオルガネラストレス研究会にしてもいいのではないかと、言っていたが、そんなことを言ってしまっているのかと内心冷や冷やした。質疑応答で、教育方針に関して質問があがった。遠藤先生は、「自分のペースでやって貰えば良い。その中で面白いと思えば続ければ良い。」と返答した。筆者が良いデータを中々出してこなくても怒られない理由がわかった気がした。怒られたいわけではないが、自分のペースでコツコツ頑張ろうと思う。普段、遠藤先生に教育について聞くことがないので、質問して下さった方には感謝である。

3日目は、京大の井垣達史先生の特別講演があった。井垣先生は専門とする細胞競合についてその歴史と最新の研究成果を発表された。「細胞競合」という言葉自体は古くからあったようだが、実験的に証明されたのは最近であることは驚きだった。また、細胞競合と小胞体ストレスとの関係についても非常に興味深かった。細胞競合にも小胞体ストレス応答にも明るくない筆者にとってはまさに異分野の話であったが、終始新情報ばかりで非常に新鮮で面白かった。

そして、小胞体ストレス研究会最後の講演は、永田和宏先生だ。永田先生は、これまでの研究成果と研究分野の発展の歴史を発表された。「研究分野は、その分野に相応しいキーワードと共に発展してきた」という話は非常に興味深かった。現在の研究のキーワードは何だろうか、それは研究分野が発展するほどのものかなど、改めて考えさせられた。また、永田先生は教育において重要視しているポイントを紹介して下さった。中でも筆者が感心したのは、「いくつか可能性があれば最も面白い可能性から選ぶ」という格言だ。例として挙げられていたのは、論文投稿の際には

まずリジェクトされるような Journal から扱ふことだ。筆者は、高校の恩師に「迷ったら重たい方の荷物を持って」と教えられ、それを教訓として生きてきたが、「重たい」を「面白い」と言い換えるだけで随分楽しそうに見える。筆者は、永田先生のこの言葉を新たな教訓として、High Journal を目指して研究に取り組みたいと思う。

初参加の小胞体ストレス研究会であったが、筆者にとって良い刺激になった。しかし、新型コロナウイルス感染症の対策として、懇親会が開かれなかったことは悔やまれる。来年こそは、コロナ感染の危惧なしに研究会が開催できることを願っている。



若手の会発表

板野研究室 寺西由紀子（大学院生）

2022年の暑い7月を締めくくる3日間に、京都産業大学むすびわが館で第15回小胞体ストレス研究会が開催された。京都産業大学の准教授である潮田先生がオーガナイザーを務められており、潮田研究室に所属する学生や研究員の方などがスタッフとして会場の運営をされていた。スタッフの方たちが円滑に参加者を案内・誘導している姿に、この小胞体ストレス研究会の開催に込める熱意が垣間見えた。受付で頂いた記念品のトートバッグは、小胞体ストレス研究会のポスターにも使われていた歌川国貞の「武蔵坊弁慶市川團十郎」の浮世絵がデザインされており、京都らしくとても気に入ったので今後も大切に使用したいと思った。第15回という節目の年を迎える小胞体ストレス研究会は、3日間にわたって開催される。まず初日には若手の会があり14人の院生や先生方による口頭発表、その後の2日間には19人の先生による口頭発表やポスター発表、さらには森和俊先生、遠藤斗志也先生、井垣達史先生、永田和宏先生らによる特別講演と、かなり盛り沢山なプログラムであった。私は小胞体ストレス研究会に参加するのは初めてで、これまでそのような研究会があることすら知らなかった。その理由には2年間延期されていたことがある。潮田先生のお話より、この小胞体ストレス研究会は2年前から計画されていたものの、新型コロナウイルス感染症の流行により延期を余儀なくされていたということを知った。さらにオンラインで開催される学会やシンポジウムが増えているが、完全対面で行え

て良かった、とのことだった。確かにこの2年間で日本の生活様式は大きく変わり、在宅勤務の普及、大学の授業、会議、学会やシンポジウムのオンライン化など、対面で合って人と話す機会が少なくなった。私も数ヶ月前に人生で初めての就職活動を経験したが、説明会から最終面接まで全てPC画面越しで行われる企業も少なくはなかった。そんな中で行われた今回の完全対面での小胞体ストレス研究会では、直前に新型コロナウイルス感染症の第7波が来たことにより一部プログラムが変更されたものの、対面でしか出にくいデータを用いた発表や、対面でしかできない熱いディスカッションが実現されていた。私はこれまで学会での発表はおろか参加したこともほとんどなかったが、指導教員の先生の勧めで参加を決めたことは、研究会が終わりこの文章を書いている今、とても良かったと感じている。

7月29日の若手の会では私自身も口頭発表を行った。プログラムがホームページにアップされ確認した時から、若手の会の面々が全然若手じゃないなと感じていた。そのため当日は朝から不安と緊張が解けずに、私より前に行われた発表については落ち着いて聞くことができなかった。しかし、これまで自分が行ってきた研究を、大学以外の研究者に聞いてもらえる貴重な機会を無駄にしたいと考え、できる限り自信を持って話し回答するように努めた。今回の経験で、卒業まであと半年ほどしかないが、さらに深く知識をつけ最後まで粘り強く研究に取り組まなければと強く感じた。7月30日、31日の小胞体ストレス研究会では、若手の会以上に参加者が多くソーシャルディスタンスを考えた席並びに少し手間取った(会場の感染対策は十分にされていた)。この2日間もストレスセンサータンパク質や小胞体関連分解の概念など小胞体ストレスに関することから、直接は関係のない研究まで、幅広い分野の研究発表、ディスカッションが行われた。特に4人の先生方による特別講演では、10分間の質疑応答の時間では到底足りず、観覧席に置かれた2本のマイクに多い時には4・5人の列ができていた。他の先生方のセッションでも質疑応答の時間にできなかった質問を、休憩時間に直接話すという場面が多くみられた。私は、座長といえば質問が出ない時に自ら質問をして場をつなぐことも大切な仕事だと思っていたが、座長の方の殆どが「次の方どうぞ」もしくは「最後にお一人、短めの質問をお願いします」という僅かな発言しかできないほど、どのセッションでも活発なディスカッションが繰り上げられた。3日間の様々な発表を聞いて感じたことは、一言に小胞体ストレスと言っても注目している遺伝子、現象、目的、実験方法は本当に人それぞれで、どの研究も目から鱗が落ちるような面白いものばかりだった。特に今まで知らなかった小胞体ストレス研究の歴史について詳しく知ることができたことは大きく、読みたい論文も多く見つけることができた。この3日間を通して得た経験や新しい知見は、どれも今後の研究活動に活かせるものばかりで、この夏に向けて私のやる気を駆り立てた。



特別講演

潮田研究室 和田匠太 (大学院生)

令和4年7月29日～31日に京都産業大学むすびわざ館で開催された、第15回小胞体ストレス研究会へ参加しました。本研究会は、小胞体ストレスに関する基礎研究の進歩発展を図り、将来的に臨床応用を目指すことを目的に2005年に設立されました。今回で15回の節目を迎えた小胞体ストレス研究会は、京都産業大学タンパク質動態研究所との共催で開催され、さらに日本の小胞体ストレス研究を牽引されてこられた先生や異分野の著名な先生など幅広い分野の先生方による3演題も特別講演が行われました。私はその貴重なご講演を拝聴するにあたり、1つでも有益な情報を持ち帰ろうと胸に誓い、研究会へ臨みました。

研究会の初日は若手の会が開催され、14名の助教授や研究員、大学院生による口頭発表が行われました。私は最初の発表者で、前日から緊張と不安でそわそわと心が落ち着かず、あまり熟睡することが出来ませんでした。当日、私はマイクを片手に聴衆の前に立つところで、緊張のピークを迎えました。しかし、これまでに積み重ねてきた練習が自信となり、スライドに合わせて言葉が出てきました。質疑応答では重箱の隅をつつくような質問をされた時は言葉が詰まりそうになりましたが、冷静に質問の意図を汲み取ることで、無事乗り越えることが出来ました。発表を終えると、座席に戻り、休む間もなく他の方の発表が始まりました。私はペンを片手に発表の内容をメモし、積極的に質問をしました。先生方の質問は要点が纏まっており、私も負けず劣らず質問が伝わるように努力しました。しかし、ある演題では質問が上手く伝わらず、座長に手助けしてもらった場面がありました。その時、私は自分の不甲斐なさを痛感しました。それからは相手に伝わる質問を意識し、挑戦を続けました。そうこうしている内に、若手の会は終了しました。

翌日、小胞体ストレス研究会の本体1日目が始まりました。その1日目は、私にとって待ち焦がれていた日と言っても過言ではありませんでした。その理由は、1つ目の特別講演である京都大

学の森和俊先生の発表があるからです。森先生は日本の小胞体ストレス研究の先駆者で、生命科学に大きく貢献されてきた方です。森先生のご講演では、小胞体ストレス研究の歴史的背景から未だ解決されていない研究課題について話されておられ、私は小胞体ストレス研究の深みを理解することが出来ました。さらに、私はその問題を1つでも解き明かし、研究の更なる発展に携わりたいと思いました。

この後も心惹かれるような演題発表が続き、私は小胞体ストレスの研究が幅広く、多面的に研究されていることを学びました。この日の最後の演題は、もう1つの特別講演であるタンパク質動態研究所の遠藤斗志也先生のご講演でした。私は遠藤先生のご講演で話されていたタンパク質フォールディングの斬新的な仮説に魅力を感じました。私も新規の事象を見出し、世界へ発信したいという研究意欲が掻き立てられました。

最後の演題が終了し、若手優秀発表賞の表彰式が行われ、私は優秀発表賞を受賞することが出来ました。その表彰式で受賞コメントを話す際、私は発表する時よりも緊張しました。この賞を受賞することが出来たのも研究室のみなさまのおかげだと考えており、私は今後ともより一層研究成果を残せるよう精進することを心に誓いました。表彰式の後のポスターセッションでは沢山の方と議論し、非常にヘビーな1日でしたが楽しかったです。

研究会の最終日は、早朝からの開幕でした。早起きが苦手な私にとってはかなり過酷でしたが、睡魔と闘いながらも時間通りに会場へ到着しました。その睡魔は研究会が始まると即座に吹き飛び、私は集中して発表を聴くことが出来ました。中でも、京都大学の井垣達史先生の特別講演は大変刺激的なものでありました。井垣先生は細胞脱落のプロフェッショナルであり、その細胞脱落の分子メカニズムの研究をされています。私は細胞脱落と聞いて感覚的には理解をしていました。井垣先生の発表は異分野の研究者にも研究内容が伝わるような話し方で、さらに細胞脱落と小胞体ストレスが密接に関わることを提案しており会場を沸かしました。私はその発表により細胞脱落について深く理解するとともに、多角的に研究を行うことの重要性を学びました。

それから、様々な発表を聴いている内に時間は過ぎ、小胞体ストレス研究会は終盤を迎えました。最後の発表は、JT生命誌研究館の永田和宏先生のご講演でした。私は永田先生の発表を何度も拝聴していますが、今回私が感じたことは、永田先生の研究人生がかなり濃密なもので、研究は年齢を問わず楽しめるということでした。私もそのような話が出来くくらいエキサイティングな研究人生を歩みたいと思いました。

今回の小胞体ストレス研究会に参加したことは、たくさんの学びと経験となりました。そして、私は自身の短所を発見する一方で、長所に関しても多くを見出しました。これからも、短所を長所にする努力や長所をさらに伸ばす努力を怠らず行い、自己成長を続け、研究に勤しみたいと思います。

研究所の活動

生物化学研究室（遠藤斗志也）

分子細胞生物学研究室（潮田亮）

タンパク質バイオジェネシス研究室（千葉志信）

タンパク質構造生物学研究室（津下英明）

膜エネルギー代謝研究室（横山謙）

生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph.D.

1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは de novo には作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成する 1000 種類を超えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

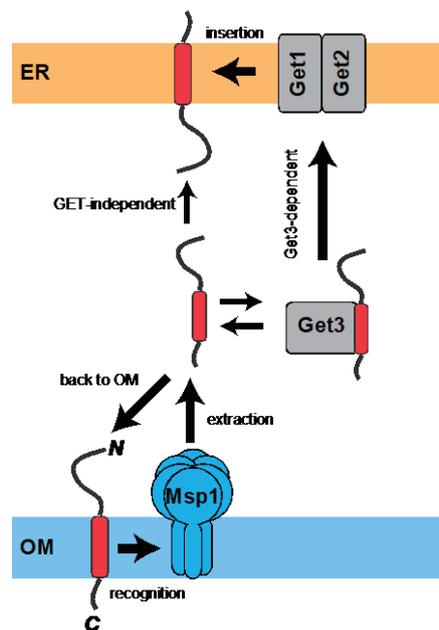
2. 本年度の研究成果

ミトコンドリアに誤配送された膜タンパク質の配送やり直しの分子機構

私たちは、タンパク質の配送にはやり直し（校正）機構が存在すること、すなわちミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送された膜タンパク質を検出して引き抜き、ER 膜に送り込んで分解するか配送をやり直すかが決まることを見出した。本研究では、Msp1 による配送校正の基質の範囲は何か、他のオルガネラでも校正が起こるのかどうか、オルガネラでの基質タンパク質の移動にオルガネラ間コンタクト部位やシャペロンなどの因子は関与するか、という問いに答えることで、校正の全体像を明らかにすることをめざしている。さらに、他の細胞内局在の校正因子や他に多重局在例の検索、解析への展開も視野にいれている。

これまでに、Msp1 によってミトコンドリア外膜から引き抜かれた誤配送テイルアンカー (TA) タンパク質が ER に移動することを、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察で検証することに成功した。すなわち、ペルオキシソームからミトコンドリアに誤配送されるモデル基質 Pex15 Δ 30 にケイ光タンパク質を融合させた mNG-Pex15 Δ 30 を薬剤 (β -estradiol) 誘導的に一時的に発現させ、その分解を Doa10 欠損により抑制した。次に、Pex15 Δ 30 の発現をオフにし、同時に Msp1 の発現をガラクトース誘導型プロモータ等でオンにしたときの基質の移動を、蛍光顕微鏡でモニターし、いったんミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 がミトコンドリアから ER に移動することを説得力ある形で示すことができた (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022)。

次に Msp1 によって引き抜かれた誤配送 TA タンパク質が、Msp1 以外のどのような因子に依存して ER に移行するかを検討した。新規合成された ER 行きの TA タンパク質はサイトゾルの TA タンパク質専用のシャペロン



Msp1により引き抜かれたTAタンパク質のERへの配送

Get3 とその ER 上の受容体 Get1/2 (合わせて GET システムと呼ぶ) によって ER への配送が行われる。そこでミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 もこれら GET システムに依存して ER に移行するかどうかを get3 Δ 株, get1 Δ get2 Δ 株を使って調べた。その結果, Msp1 によって引き抜かれた Pex15 Δ 30 のミトコンドリアから ER への移行は GET システムに依存することが明らかになった。しかし Msp1 を過剰発現すると, get3 Δ 株, get1 Δ get2 Δ 株でも Pex15 Δ 30 の一部は ER に移行するので, 効率は低いながら, GET システムに依存しないでミトコンドリアから ER に移行する経路があることがわかる (Matsumoto, Ono et al., JCB online published, 2022)。この経路がミトコンドリア-ER コンタクトを介するのか, は興味深い問題であるが, 今後の検討課題である。

ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体による β -バレル構造形成の分子機構

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するポリンや Tom40 などバレル型構造の膜タンパク質 (β バレル型膜タンパク質) が存在し, ミトコンドリアの機能に必須である。SAM 複合体はこれらのタンパク質の β バレル構造形成と外膜への組込みを担うトランスロケータである。私たちは, SAM 複合体の, 構成サブユニット (タンパク質) が異なる二つの複合体について, 高分解能立体構造を決定することに成功した (Takeda et al., Nature 2021)。そして, SAM 複合体がそのサブユニット (Sam50 と Mdm10) と基質の β バレルタンパク質を入れ替えながら, 基質のバレル構造形成を促し, 外膜に組み込む新規の仕組み (β バレルスイッチモデル) を明らかにした。今回 SAM 複合体と基質 (Tom40) の複合体 (β バレル形成中間体) のクライオ EM 構造を決定した (投稿準備中)。構造から示唆された SAM 複合体による基質タンパク質の β バレル構造形成のメカニズムは, 細菌の BAM 複合体によるメカニズムとは全く異なるものであり, そのようなメカニズムが進化的にどのように獲得されたか, などきわめて興味深い。

3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking.

We previously found that the cell has a mechanism to achieve proofreading or correction of the delivery of mistargeted tail-anchored (TA) proteins. Msp1, an AAA-ATPase in the mitochondrial outer membrane, detects and extracts TA membrane proteins mistargeted to mitochondria and transfers them to the ER for further delivery to downstream organelles along the secretory pathway or for cytosolic proteasomal degradation. In the current project, we are aiming at obtaining the entire picture of this re-transfer of mistargeted proteins by answering the questions of what the spectrum of the substrates for Msp1-mediated re-transfer is, whether such a re-transfer can operate in other organelles, and whether inter-organelle contact sites and chaperones are involved in the re-transfer of proteins. In addition, we are making efforts for the search and analysis of the factors for other subcellular re-localizations and other cases of multiple protein localizations.

In the present study, we have succeeded in showing the mitochondria-to-ER transfer of mistargeted proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1, using time-lapse fluorescent microscopy. mNG-Pex15 Δ 30, a model mitochondrially mistargeted peroxisomal protein, was transiently expressed by β -estradiol under Doa10-defective conditions to prevent its degradation. Then, expression of mNG-Pex15 Δ 30 was shut off and expression of Msp1 was induced by the galactose-inducible promoter. The fate of mNG-Pex15 Δ 30 was monitored by fluorescent microscopy, thereby convincingly demonstrating that Pex15 Δ 30, once mistargeted to mitochondria, is transferred from mitochondria to the ER (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022).

Next, we examined which factors other than Msp1 are involved in the transfer of mistargeted TA proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1 to the ER. Newly synthesized ER TA proteins are delivered to the ER by Get3, a chaperone dedicated to TA proteins in the cytosol, and its receptor Get1/2 on the ER (together called the GET system). Therefore, we examined if Pex15 Δ 30 mistargeted to mitochondria also depends on the GET system for its transfer to the ER using get3 Δ and get1 Δ get2 Δ strains. The results showed that the transfer of Msp1-extracted Pex15 Δ 30 from mitochondria to the ER was dependent on the GET system. However, when Msp1 was overexpressed, a fraction of mistargeted Pex15 Δ 30 could be transferred to the ER even in get3 Δ and get1 Δ get2 Δ cells, suggesting that there is a pathway for mitochondria-to-ER transfer independent of the GET system, albeit with low efficiency (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022). Whether this pathway requires the mitochondria-ER contact is an interesting question, and will be a subject of future studies.

Molecular mechanism of β -barrel protein folding by a mitochondrial outer membrane translocator, the SAM complex.

The mitochondrial outer membrane contains β -barrel membrane proteins such as porins and Tom40, which mediate the exchange of small molecules, ions, and proteins between the cytosol and mitochondria and are essential for mitochondrial functions. The SAM complex in the mitochondrial outer membrane is a translocator responsible for the formation of the β -barrel structure of these proteins and their incorporation into the outer membrane. We have previously determined the high-resolution structures of the two forms of the SAM complex, each of which contains different subunit proteins (Takeda et al., Nature 2021). We revealed a novel mechanism (β -barrel switch model) in which the SAM complex switches its subunits (Sam50 and Mdm10) with the β -barrel protein substrate to promote its formation of the β -barrel structure and its insertion into the outer membrane. In this study, we have determined the cryo-EM structure of the complex (β -barrel forming intermediate) of the SAM complex and a substrate Tom40 (in preparation). The mechanism of the SAM-mediated β -barrel folding is completely different from the one mediated by the bacterial BAM complex, and therefore, it is extremely interesting to know how this mechanism was acquired evolutionarily.

4. 論文, 著書など

原著論文

- H. Shiino, S. Furuta, R. Kojima, K. Kimura, T. Endo, and Y. Tamura, Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. FEBS J. May 288, 3285-3299 (2021).
- K. Kimura, F. Kawai, H. Kubota-Kawai, Y. Watanabe, K. Tomii, R. Kojima, K. Hirata, Y. Yamamori, T. Endo, Y. Tamura. Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium. J. Biochem.171, 429-441 (2022).
- S. Matsumoto, S. Ono, S. Shinoda, C. Kakuta, S. Okada, T. Ito, T. Numata, T. Endo. GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. J. Cell Biol. 221, e202104076 (accepted on March 14, 2022).

英文総説

- Y. Araiso, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. FEBS J. Sep;288, 5300-5310 (2021).
- Y. Araiso, K. Imai, T. Endo (Review), Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. Ann. Rev. Biochem., in press (2022, online published Feb 14, 2022).

日本語解説記事/著書

松本俊介, 遠藤斗志也 ミトコンドリア AAA-ATP アーゼ Msp1 による誤配送タンパク質の配送校正機構 (みにれびゅう) 生化学 93, 512-516 (2021)

竹田弘法, 荒磯裕平, 遠藤斗志也. ミトコンドリアへのタンパク質搬入口と膜組み込み装置の構造生物学~TOM 複合体と SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡構造 in 「ミトコンドリアダイナミクス~機能研究から疾患・老化まで」 (NTS, 全 458 頁) 第 1 編, 第 7 章, 第 1 節 pp197-202 (2021)

竹田弘法, 遠藤斗志也. SAM 複合体によるミトコンドリア β バレル膜タンパク質の膜組み込み (トピックス) 生物物理 61, 392-394 (2021)

5. 学会発表など

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリア外膜蛋白質挿入装置のクライオEM構造, 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会シンポジウム「クライオ電子顕微鏡による最新の成果」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.14-16, 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質膜挿入の構造基盤, 第21回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「高速分子動画: タンパク質の構造機能相関研究の最先端」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.16-18, 国内, 口頭

Toshiya Endo, (Plenary lecture) Protein machineries that make and maintain mitochondria 35th Annual Symposium of the Protein Society, オンライン, 2021.7.7-14, 国外, 口頭

遠藤斗志也, タンパク質の細胞内配送原理の再構築, 第94回日本生化学会大会 シンポジウム「マルチファセット・プロテインズ: 拡大し変容するタンパク質の世界」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, ミトコンドリアAAA-ATPアーゼMsp1による誤配送タンパク質の配送校正機構, 第94回日本生化学会大会シンポジウム「多面的ミトコンドリア機能による生命機能制御」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, Proofreading of protein mislocalization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「オルガネラ膜タンパク質の標的化と品質管理」横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

Yuhei Araiso, Akihisa Tsutsumi, Kenichiro Imai, Takuya Shiota, Hirotsu Imai, Kana Kuzasa, Noriyuki Kodera, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo, Structural analysis of the mitochondrial protein import gate by near-atomic resolution snapshot and nanoscale video imaging, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「多様なミトコンドリアの戦略: 強く健康なオルガネラ構築に向けて: Multifaceted strategies for keeping mitochondria strong and healthy」横浜+ハイブリッド 2021.12.1-3 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアにおける β バレルタンパク質膜挿入の構造基盤 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「生命科学の根幹に迫るミトコンドリアダイナミクスの世界」, 横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質の交通が解き明かすミトコンドリア生合成の仕組み 第20回 日本ミトコンドリア学会年会, 東京+ハイブリッド, 2021.12.9-10, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質と脂質の輸送から見えてきたミトコンドリア生合成と機能維持の仕組み AMED難治性疾患実用化研究事業「多様なミトコンドリア病の遺伝子型/表現型/自然歴等をガイドラインに反映させていくエビデンス創出研究」班(村山班・小坂分担班)集中TR会議, オンライン, 2022.2.19, 国内, 口頭

九笹 加菜, 今井 大達, 古寺 哲幸, 稲津 明広, 遠藤 斗志也, 荒磯 裕平, 高速原子間力顕微鏡を用いたミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の動的構造解析, 日本生化学会北陸支部 第39回大会, オンライン, 2021.6.5, 国内, 口頭

荒磯 裕平、包 明久、今井 賢一郎、塩田 拓也、吉川 雅英、遠藤 斗志也、クライオ電子顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造と機能、日本生化学会北陸支部 第39回大会、オンライン、2021.6.5、国内、口頭

小西雄大、遠藤 斗志也、阪上春花、竹田弘法、齊藤知加、酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼ Hfd1の細胞内二重局在の分子機構、第73回日本細胞生物学会大会、オンライン、2021.6.29-7.2、国内、口頭

阪上春花、遠藤 斗志也、小分子輸送体ポリリンによるタンパク質膜透過装置TOM複合体の機能制御の分子機構、第94回 日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5、国内、口頭+ポスター

Kana Kuzasa, Hirotsu Imai, Noriyuki Kodera, Akihiro Inazu, Toshiya Endo, Yuhei Arais, High-Speed atomic force microscopy analysis of the mitochondrial protein import gate TOM complex, 第44回日本分子生物学会年会、横浜+ハイブリッド、2021.12.1-3、国内、ポスター

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 (S)

課題名：ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの分子基盤

研究代表者：遠藤 斗志也、取得年度：2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・学術変革領域研究 (A)

課題名：細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

研究代表者：遠藤 斗志也、取得年度：2020-2024 年度 (5 年)

AMED・CREST

課題名：タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの構造生物学研究

研究代表者：遠藤 斗志也、取得年度：2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア外膜上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者：篠田沙緒里、取得年度：2019-2021 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア膜間部タンパク質の外膜透過における分子機構の解明

研究代表者：阪上春花、取得年度：2020-2022 年度 (3 年)

2) 学外活動

遠藤 斗志也：日本学術会議連携会員

遠藤 斗志也：日本蛋白質科学会役員

遠藤 斗志也：日本細胞生物学会代議員

遠藤 斗志也：日本細胞生物学会常任編集委員

遠藤 斗志也：JST/CREST「細胞内ダイナミクス」細胞内現象の時空間ダイナミクス 研究総括

3) アウトリーチ活動

遠藤 斗志也：日本学術会議連携会員

遠藤 斗志也：日本蛋白質科学会役員

遠藤 斗志也：日本細胞生物学会代議員

遠藤 斗志也：日本細胞生物学会常任編集委員

篠田沙緒里：【昭和女子大学 大学生向けラボツアー】

実施日時：2021 年 7 月 5 日 , 2022 年 11 月 10 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：昭和女子大学大学生 3 名(7 月), 2 名(11 月)に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアーを行った。研究プロジェクトの紹介をしつつ, 研究室内のさまざまな装置について詳細に説明行った。

篠田沙緒里：【未来館来館者向けラボツアー】

実施日時：2021 年 8 月 25 日 12:00-16:00

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：3 階ハブスペース解放に際し, 興味を持った来館者に別途遠藤研の外からの見学と, 普段話すことのない研究者との対談を行った。

篠田沙緒里：【仙台二校 高校生向けラボツアー】

実施日時：2021 年 12 月 24 日 11:20~12:00

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：仙台二校の高校生 5 名に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアー, 事前に受け付けた質問の回答を合わせた対談を行った。研究室ツアーではミトコンドリアを染色した生きた状態のヒト培養細胞を蛍光顕微鏡を使って実際に観察してもらった。

4) 受賞等

2021 年 7 月 2021 Hans Neurath Award (The Protein Society)

受賞事由 Contribution to the fields of intracellular protein sorting and mitochondrial biology



R1 年 9 月 研究室 (+ 関連研究者) のリトリート「オルガネラ研究会」(金沢)

分子細胞生物学研究室 Laboratory of Molecular and Cellular Biology

准教授 潮田 亮 Associate Prof. Ryo Ushioda, Ph.D.

1. 研究概要

分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、タンパク質の誕生から死までのメカニズムを中心に、中でも、特に「分子シャペロンによるフォールディングと細胞機能制御」および「タンパク質品質管理機構」に焦点をあてて研究を進めている。

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。また、いったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる<不良タンパク質>は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、「**タンパク質を正しく合成する productive folding**」と、「**ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構**」をとともども研究することは、「**タンパク質動態の恒常性**」、「**細胞レベルでの生命システムの恒常性の維持**」という観点からは、必須の研究領域である。

本研究室では、上記のコンセプトに従って、3つの主要なプロジェクトについて研究を推進してきた。すなわち、

- 1) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明
- 2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 3) タンパク質品質管理に関わる新規システイン修飾

以下、プロジェクト1) について、この1年3か月で得られた知見について紹介する。

小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

小胞体でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ逆輸送されてからユビキチンプロテアソーム系によって分解される (ERAD)。この過程で潮田らにより、2008年に ERdj5 という還元酵素が発見され、ミスフォールドタンパク質の品質管理機構において重要な役割を果たしていることをすでに報告してきた (Science 2008, Mol. Cell 2011 など)。さらに ERdj5 がカルシウムポンプの活性を制御することによって、小胞体内のカルシウム恒常性維持を担っていることを発見した (PNAS 2016)。そのような経過から、レドックス制御を介したタンパク質品質管理とカルシウム恒常性のクロストークに注目している。小胞体はよく知られるように酸化的環境下にあるが、この酸化的環境において ERdj5 が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を変えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本研究室では、従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

2. 本年度の研究成果

小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化的環境に維持されている。また、多くの酸化酵素が存在し、酸化的フォールディングを触媒している (図1-①)。

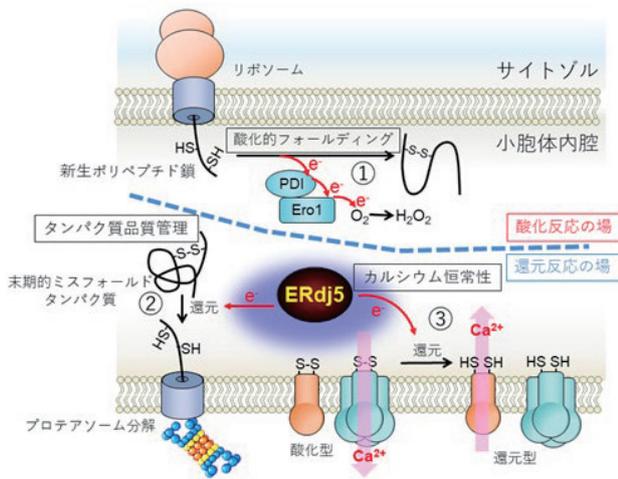


図 1. これまで小胞体は酸化的フォールディングを中心とした酸化反応の場として考えられてきた。一方、潮田らは小胞体内腔の還元反応の重要性を明らかにしてきた。

さらに ERdj5 の重要性を明らかにするため、ERdj5 ノックダウン/ノックアウトをした線虫、CRISPR/Cas9 を用いて樹立した ERdj5 欠損 HeLa 細胞、または MEF 細胞を用いて、ERdj5 欠損による細胞内異常を観察した。ERdj5 欠損細胞では、カルシウムイオン濃度依存的に活性化する Drp1 が活性化しており、Drp1 の GTPase 活性依存的にミトコンドリアのくびり切りが起こることを見出した。ERdj5 欠損によるミトコンドリア異常断裂はミトコンドリア機能の低下を引き起こし、細胞内での ROS を上昇させた。このことにより、細胞のアポトーシスを惹起させ、この細胞死は神経変性疾患などの疾患を悪化させる可能性も示唆される。また、線虫の ERdj5 欠損は線虫の寿命を低下させることも明らかにした。これらの知見は ERdj5 の制御に関し、その重要性を再認識する結果となった (R. Yamashita et al., Sci. Rep. 2021)。また、第一三共との共同研究で、CHO 細胞における抗体 (IgG) 産生について、Hspa5 プロモーターを利用した発現系を構築した。Hspa5 プロモーターを削ることで、これまでの発現系と比較しておよそ 2 倍の産生量を実現した (H. Tanemura et al., Sci. Rep. in press)。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanism for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have been devoted our activity on the following two major research projects:

Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca^{2+} flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the endoplasmic reticulum (ER). ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER by cleaving the disulfide bonds of misfolded proteins and facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda et al., Science 2008; M. Hagiwara et al. Mol. Cell 2011; R. Ushioda et al. Mol. Biol. Cell 2013).

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2b, a Ca^{2+} pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca^{2+} concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that the redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca^{2+} homeostasis

この酸化的環境で、我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化した還元酵素 ERdj5 を発見し、ERdj5 が小胞体のレクチンタンパク質 EDEM および分子シャペロン BiP と複合体を形成することを見出した。ERdj5 は小胞体でミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した (図 1-②、R. Ushioda et al., Science 2008; M. Hagiwara et al., Mol. Cell 2011; R. Ushioda et al., Mol. Biol. Cell 2013)。

さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2 のジスルフィド結合を自身の還元活性で開裂し、複合体を形成することで小胞体へのカルシウム流入を調節し、小胞体のカルシウム動態に影響を与えていることが明らかになった。さらにカルシウム制御として、小胞体局在のレドックス因子がカルシウムチャネル IP3 受容体の活性をレドックス依存的に制御することも見出し、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧みな制御機構を明らかにしつつある (図 1-③)。

in the ER (R. Ushioda et al., PNAS 2016). Furthermore, Inaba group (Tohoku Univ.) and we elucidated the structure of SERCA2b (Inoue et al. Cell Rep. 2019). This information may help to understand the activation mechanism of SERCA2b pump through ERdj5. On the other hand, we have revealed the mechanism of the electron transfer to ERdj5 from the nascent chain. Furthermore, we summarized our previous works as a review of the redox-dependent endoplasmic reticulum homeostatic mechanism.

Here, we focused on the control of the Ca^{2+} pump and channel by the redox regulation in the ER. Here, we obtained the structural information of SERCA2b for understanding how ERdj5 promotes the influx of Ca^{2+} by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the Ca^{2+} release activity of the IP3R. Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to Ca^{2+} homeostatic disruption. It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER. Then, we found that cytosolic calcium ions were constantly elevated in ERdj5-deficient cells. We also found that Drp1 is activated in a Ca^{2+} -dependent manner, and that the activated Drp1 ruptures mitochondria (R. Yamashita et al., Sci. Rep. 2021).

4. 論文, 著書など

原著論文

Riyuji Yamashita, Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata: Ca^{2+} imbalance caused by ERdj5 deletion affects mitochondrial fragmentation, *Sci. Rep.* 11, Article number: 20772 (2021)

Hiroki Tanemura, Kenji Masuda, Takeshi Okumura, Eri Takagi, Daisuke Kajihara, Koichi Nonaka, Ryo Ushioda: Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells, *Sci. Rep.* in press

著書

藤井唱平、潮田亮：タンパク質品質管理を支える小胞体レドックス環境と電子伝達、生化学 93(5)、651-659 (2021)

5. 学会発表など

潮田亮：タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割、学術変革 A「硫黄生物学」第 1 回領域会議、オンライン、2022.3.19-20

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーの感知機構の解明、超異分野学会 東京大会 2022、東京都、2022.3.4-5

堤智香、田原諒佑、永田和宏、潮田亮：小胞体レドックス環境を構築するグルタチオン供給機構の解明、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

潮田亮、上垣日育、山下龍志、永田和宏：ストレス応答としての小胞体レドックスシフトと恒常性維持、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

XIAOHAN CAI、伊藤翔悟、野井健太郎、井上道雄、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次：Mechanisms of ER-associated degradation pathway mediated by the cooperation of ERdj5 and BiP、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021.12.1-3

上垣日育、潮田亮：小胞体還元酵素 ERp18 の亜鉛イオン依存的な活性制御の解明、レドックス R&D 戦略委員会「第 1 回若手シンポジウム」、オンライン、2021.11.8 (優秀発表賞受賞)

和田 匠太、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサー-ATF6 の活性化機構の解明、レドックス R&D 戦略委員会「第 1 回若手シンポジウム」、オンライン、2021.11.8

和田匠太、潮田亮、永田和宏：新たな小胞体ストレスセンサー-ATF6 制御機構の解明、第 94 回日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5

潮田亮：ストレス応答としての小胞体レドックスシフト、第 94 回日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5

Ryo Ushioda：Maintenance of Endoplasmic Reticulum Homeostasis through Redox Regulation, Paris Redox 2021, オンライン、2021.10.13-15 (招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：小胞体における活性酸素除去に関わる新たな分子機構の解明

研究分担者：潮田亮，取得年度：2018-2021 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：新興硫黄生物学が拓く生命原理変革

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021-2025 年

AMED-CREST

課題名：プロテオスタシスにおけるタンパク質構造形成機構の包括的解明

研究分担者：潮田亮，取得年度：2021-2026 年

武田科学振興財団・特定研究助成 [I]

課題名：膜輸送を介したオルガネラ恒常性維持と細胞機能 制御

共同研究者：潮田亮（研究代表者：遠藤斗志也）

取得年度：2020-2021 年

資生堂

課題名：ジメチルピラゾリルジメチルピリミジン塩酸塩によるチロシナーゼタンパク分解のメカニズム解明に関する研究

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021 年

科研費再挑戦支援プログラム

課題名：小胞体レドックス環境の起源を紐解く

研究代表者：潮田亮，取得年度：2021 年

2) 学外活動

(1) 潮田亮：文部科学省 科学技術・学術政策研究所 専門調査委員

(2) 潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

(3) 潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

(4) 潮田亮：新学術領域「オルガネラゾーン」班友

3) アウトリーチ活動

(1) 潮田亮：日本・青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」に参加

(2) 潮田亮：日本学術振興会「ひらめき★ときめきサイエンス」実施

(3) 潮田亮：京都府立峰山高等学校 模擬授業「生命とは何かを追及する研究者」

研究室 HP：<https://ushioda-lab.com/>





写真1：2021年度 研究室メンバー集合写真



写真2：2021年度の大雪。Greiner製の板でスノーボードをしました。



写真3：2021年卒業式。田原君をはじめ、研究室メンバーが卒業しました。

タンパク質バイオジェネシス研究室 Laboratory of Protein Biogenesis

教授 千葉志信 Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

1. 研究概要

生命活動は主にタンパク質が触媒する生化学的反応の集合体と見なすことができるが、タンパク質をはじめとする生体分子やエネルギー源を人為的に混ぜただけでは生命は誕生しない。細胞内では、これらの因子の個々の働きが高次に連携することでひとつの生命体として組織化されている。このような生体分子の組織化を支える要素のひとつが、生体分子の合成と配置の時空間制御である。

当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスであり、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がる。加えて、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その合成量をリアルタイムに調整する役割を担っている。伊藤維昭元京産大教授らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したい。また、最近、翻訳の品質管理に関する新たな研究プロジェクトも始動し、成果が得られつつある。

2. 本年度の研究成果

(1) タンパク質ダイナミクスレポーターを用いた新生タンパク質の動的挙動の網羅的検出

当研究室で同定した枯草菌 MifM は、C 末端付近に存在するアレストモチーフを介してリボソーム成分と相互作用することで自身の翻訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、アレスト配列が N 末端側から引っ張られることで解除される。ここ数年で、この引っ張り力感受性に基づいた「タンパク質ダイナミクスレポーター」を構築してきた。さらに、それをトランスポゾンに導入した Transposable protein-dynamics reporter (TnDR) を構築し、様々なタンパク質の N 末端断片と融合したライブラリを作製した。その中から、アレストが解除されるものを選択することで、翻訳の途上で引っ張り力を伴う新生鎖を網羅的に探索することを試みてきた。(Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。最近、この TnDR と次世代 DNA シーケンス技術を組み合わせることで網羅性を大きく向上させた、第二世代の TnDR (TnDR-seq) の開発も進めてきており、それを用い、タンパク質の co-translational な動的挙動をゲノムワイドに検出できるようになった。

(2) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち 3 つ (SecM, MifM, VemP) は、タンパク質局在化装置をコードする遺伝子上流にコードされている。これらに共通の特徴を手がかりとし、前年度までに、400 種類以上の真正細菌ゲノムを網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子上流にコードされている翻訳アレスト因子を、さらに 3 つ見出し、それぞれ、ApcA, ApdA, ApdP と命名した (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。今回、そのサーチをさらに拡張し、30,000 種以上のバクテリアゲノムを対象にアレスト因子の探索を行った。その結果、新規アレスト因子をコードする可能性のある遺伝子が 10 種以上同定された。現在、これらがアレストを引き起こすか否かを検討中である。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of

the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis. As introduced above, our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities should ultimately lead to the development of a new research area that might be called “nascent chain biology”, which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

This year's accomplishments

1) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics using a transposable protein-dynamics reporter (TnDR)

The elongation arrest of MifM is force-sensitive and is canceled when the MifM nascent chain is pulled from the N-terminus. We took advantage of such a force-sensitivity to capture co-translational pulling force on nascent chains in a proteome-wide fashion. Using transposon, we constructed a gene-fusion library, in which the N-terminal regions of proteins were fused N-terminally to the arrest sequence of MifM and then screened proteins that canceled elongation arrest. We have recently identified hundreds of proteins that canceled the elongation arrest of the protein-dynamics reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally (Fujiwara et al., 2020. Cell Rep.). We currently developed a second generation of TnDR or TnDR-seq, which greatly improves coverage by combining the current version of TnDR with the next-generation DNA sequencing technology. This new method indeed allowed us to detect co-translational dynamics of nascent proteins in a genome-wide fashion.

2) Identification and characterization of novel translation arrest factors

Three of the translation arrest factors previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Using this and other information, we have previously searched more than 400 eubacterial genomes and found three more translation arrest factors encoded upstream of genes for the protein localization machinery, and named ApcA, ApdA, and ApdP, respectively (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021). We now continued our search across more than 30,000 eubacterial genomes and identified more than 10 candidate genes that may encode novel arrest peptides.

4. 論文, 著書など

原著論文

Takada H., Mandell Z., Yakhnin H., Glazyrina A., Chiba S., Kurata T., Wu K., Tresco B., Myers A., Atkinson G., Babitzke P., Hauryliuk V.; Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmIR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. Nucleic Acids Res. (2022) *in press*

日本語総説

千葉志信、茶谷悠平 (2021) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. 月刊細胞 53巻9号 (2021年8月号), 525-528.

5. 学会発表など

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉志信：フィブロネクチン結合因子ホモログが駆動する新規翻訳品質管理機構の解析：2021年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2021. 8. 30-31) オンライン

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉志信：細胞内における動態を活写することで明らかとなってきた新規微生物翻訳品質機構の全貌：第19回 微生物研究会 (2021. 10. 13) オンライン (招待講演)

高田啓、Gemma C. Atkinson、Vasili Haurlyliuk、千葉志信：微生物における新規翻訳品質機構 RQC の解析：2021年度ゲノム微生物学会 (2022. 3. 2-4) オンライン

千葉志信：タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の多様性と共通性：2021年度遺伝研研究会 (2022. 3. 8-9) 三島 (招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

科研費補助金・学術変革領域研究 (A) 計画研究

課題名：機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

研究代表者：千葉志信、取得年度：R2-R6年 (5年)

科研費補助金・基盤研究 (C)

課題名：非チャンネル型タンパク質膜組込装置 YidC の分子機構

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R5年 (3年)

発酵研究所一般研究助成

課題名：グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R4年 (2年)

科研費補助金・若手研究

課題名：次世代型 TnDR 法による新生鎖動的挙動の網羅的解析

研究代表者：藤原圭吾、取得年度：R3-R4年 (2年)

戦略的創造研究推進事業・ACT-X (環境とバイオテクノロジー)

課題名：温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解

研究代表者：高田啓、取得年度：R3-R5 (3年)

2) 学外活動

日本生化学会「生化学」誌・企画協力委員

3) アウトリーチ活動

模擬授業「私たちの生命活動を支えるタンパク質の世界」(三重県立上野高校) (2021/3/11)：Zoom オンライン会議

タンパク質構造生物学研究室 Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下 英明 Prof. Hideaki Tsuge Ph.D.

1. 研究概要

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。タンパク質複合体、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) 細菌タンパク質輸送装置の構造と機構の解明：*C.perfringens* が持つ二成分毒素はアクチンを ADP リボシル化する Ia とこれをエンドサイトーシスを経て細胞内へ輸送する装置 Ib からなる。この数年、クライオ電子顕微鏡により Ib の構造と機能に焦点を当てた研究を進めてきた。Ib 膜孔と Ia-Ib 膜孔複合体の構造を明らかにしている。これに引き続き、抗生物質耐性菌が問題となり、その強毒化が懸念されている、ディフィシル菌の二成分毒素 CDT のクライオ電子顕微鏡により明らかにして、論文化に向けて検討している。

(2) ADP リボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素 (ADPRT) を分泌して、宿主のタンパク質を修飾し、宿主のシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な ADP リボシル化毒素 (酵素) とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

2. 本年度の研究成果

(1) トキシン膜透過システムの構造基盤

C.perfringens が持つ 2 成分毒素イオタ毒素はアクチンを特異的 ADP リボシル化する毒素 Ia とこれを細胞内へ輸送する装置 Ib からなる。我々は以前より二成分毒素の研究を進めており、Ia 単体および基質アクチンとの複合体の構造を X 線結晶構造解析で明らかにし、構造と機能の解析を進めてきた。二成分毒素の毒性発現機構を理解するには、Ib の研究が欠かせない。2020 年、Ib 膜孔の解析をクライオ電子顕微鏡で進め、その構造を、C7 対称性を用いて 2.9 Å 分解能で得た。Ib 膜孔は 7 量体からなる。さらに Ia の結合する様子を捉えたいと考え、調整した Ib 膜孔に Ia を加えて、データを収集、C1 対称性を用いた解析を行った。クラス分けの段階でベータバレルが完全長のものと、膜挿入部がまだ組み立てられていない短いものを分けることができ、それぞれ解析を行い、2.9 Å と 2.8 Å 分解能での解析に成功した。この結果から、以下のことがわかってきた (1) Ia は 7 量体の Ib 膜孔の一つに結合する。(2) Ia は N 末端のドメインで結合し、アクチン ADP リボシル化活性を持つ C 末端ドメインは、その上に位置する。(3) Ia の N 末端はこの結合により末端の α ヘリックスが一部解ける。

(4) この Ia の N 末端の先は、Ib 膜孔の狭窄部位 (直径 6 Å) である ϕ クランプへと続いていた。このことから Ia の Ib 膜孔を介しての膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また (5) プレ膜孔から膜孔へは、ベータバレルが完全でない、短い short stem 型が中間体として存在し、おそらく、これから完全長 (long stem 型) になることで膜への完全挿入がなされる。明らかになっている異なるグループに属する 2 成分毒素、炭素菌毒素との比較から Ib 膜孔の新規の特徴的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、2020 年、3 月、Nature Structural & Molecular Biology 誌へ掲載した (京都産業大学、山田 (M2)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究)。

ほぼこれと同時に、ディフィシル菌の 2 成分毒素 CDT の構造が海外のグループにより報告された。ディフィシル菌は抗生物質耐性菌の感染が問題とされ、2 つの毒素 (TcdA, TcdB) の他にイオタ毒素と類似の 2 成分毒素を持ち、この 2 成分毒素が重症化に関わっているかが注目されている。2 つのグループが、この毒素の構造を独立に発表した。面白いのは、この 2 つともにダイヘプタマーの構造であることである。イオタ毒素は 7 量体であるが、CDTb はこれが、2 つ合わさったダイヘプタマーの 14 量体構造をとる。この構造だと、膜に孔を開けることができない、また CDTa の膜透過にも支障があると考えられる。現在、CDT でも生理的な 7 量体の

構造があるのではないと考え、その構造決定を進めてきた。界面活性剤 LMNG の存在下で、CDTa 結合した CDTb 膜孔を調製、電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めてきた。その結果、ダイヘプタマーの 14 量体とともにイオタ毒素と同様の 7 量体の CDTb 膜孔構造が存在していることがわかってきた。これに CDTa を加えて、クライオ電子顕微鏡での構造決定を行った。其の結果 CDTa 1 分子が CDTb 膜孔に結合した構造を明らかにした。この分解能は 2.6Å である。さらに漏斗型の狭窄部位のひとつである NSS-loop に二状態があることを見出し、これが CDTa との結合とタンパク質透過に重要であることを検証している。初期の論文はすでに Research square に掲載した。本論文もリバイスを経て準備中である。

<https://www.researchsquare.com/article/rs-1018941/v1>

我々は、2 成分毒素の構造だけでなく、細胞を対象にした in vivo アッセイおよび電気生理による膜孔測定すなわち in vitro アッセイの系を立ち上げて、機能を確認していこうとしている。さらに Ib を用いた膜孔タンパク質のデザインを目指している。nanopore を用いた DNA シーケンスはすでに実用化されている。同様に nanopore を用いたアミノ酸シーケンスは 20 種のアミノ酸を見分けることができるかどうか今後の課題であるが、それに適した膜孔タンパク質を用いることは重要であろう。これに向けて、Ib 膜孔は天然のタンパク質膜透過システムであり、これを用いた基礎と応用研究は重要であろう。

(2) 近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE) 欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は *Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPIL) と命名された。CPIL は CPIL-a, CPIL-b の 2 つのコンポーネントからなる 2 成分毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながら CPIL-b 膜孔調整と構造解析を始めた。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やディフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた ϕ クランプでできており、これがタンパク質膜透過に最も中であることはわかっている。一方、CPIL-b のクランプ最狭窄部位は Ser であり、狭窄部位の大きさも疎水・親水といった違いもあり、どのような影響をしているのか興味深い。ここに焦点を置きながら、これらクロストリジウム属の 2 成分毒素の、タンパク質の輸送機構、毒性発現機構の全体を明らかにする。また、これらの透過阻害剤にも注目して研究をすすめている。

(3) ADP リボシル化の基質特異性

ADP リボシル化の特異性：我々は ADP リボシル化毒素 (酵素) とその基質タンパク質の複合体の丸ごとの構造解析を進めてきた。Ia-アクチン複合体、C3-RhoA 複合体、ScARP-グアニン複合体を明らかにしてきたが、このような研究は世界でもほとんどない。これらの研究により、ADP リボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいは DNA の塩基であれ同じような認識機構で、基質を認識して ADP リボシル化するということが明らかにした。しかしながら、人 PARP (ポリ ADP リボシル化あるいはモノ ADP リボシル化) の認識機構はまだよくわかっていない。この解明のため、構造解析を進めている。

(4) スクミリンゴガイ二成分毒素の研究

スクミリンゴガイはアルゼンチン原産のリンゴガイ科の大型巻貝で、通称、ジャンボタニシと呼ばれる。日本では食用を目的として、持ち込まれたが、野生化した外来種で、稲を食害することから、防除対象となっている。田んぼで赤い卵塊を目にするが、この卵に 2 成分毒素が含まれており、1 つはレクチン、もう一つは膜孔毒素であることがわかっている。この卵塊から毒素を精製し、構造決定できないか検討を始めた。卵塊から毒素を精製した。98kDa のバンドは還元剤存在下で、68kDa と 31kDa の 2 成分に分かれる。質量分析 MALDI-TOF を用いた mascot 解析から、スクミリンゴガイ由来の毒素であることを確認した。さらに精製した毒素成分が、インビトロで膜孔成分を膜孔化できないか検証をしている。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our focus is macromolecular complexes, and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein. These basic researches were expected to find a novel drug in infectious disease.

This year's accomplishments

(1) The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E, is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in binding to the cell and translocation of Ia across the cell membrane. We reported the cryo-EM structures of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia. The high-resolution Ib-pore structure demonstrates a similar structural framework as observed for the catalytic ϕ -clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the Ia-bound Ib-pore structure showed a unique binding mode of Ia. One Ia binds to the Ib-pore, and the Ia N-terminal domain interacts with Ib via two other Ib-pore constriction sites via multiple weak interactions. Furthermore, Ib-binding induces Ia N-terminal α -helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the ϕ -clamp gate. This study reveals a novel mechanism of N-terminal unfolding that is crucial for protein translocation. The study was reported in *Nat Struct & Mol Biol* in 2020. Furthermore, we are currently trying to reveal the structure of *C.difficile* binary toxin (CDTa and CDTb) complex.

(2) Recently, outbreaks of food poisoning in Japan were reported in which *Clostridium perfringens* was strongly suspected to be the cause based on epidemiological information and fingerprinting of isolates. The isolated strains lack the typical *C. perfringens* enterotoxin (CPE) but secrete a new binary toxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILE-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPILE-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are trying to reveal the structure and functions of CPILE-b compared with Ib-pore.

(3) We are interested in the specificity of ADP-ribosyltransferase (ART). We have revealed the complex structures of Ia-actin, C3-RhoA and ScARP-guanine for the last ten years. From these structures, we understood they all use the ARTT-loop in common. Furthermore, we consider that this is a common substrate recognition mechanism for all ARTs, all protein/amino acid-target and DNA/base-target ARTs. However, it is still an open question of the specificity of human PARPs, which belongs to a different group of ART. Thus, we are trying to reveal the structures of PARP in order to understand the specificity.

(4) We are studying the two component toxin from *Pomacea canaliculata*. We purified the binary toxin from red egg of *Pomacea canaliculata* and ought to reveal the pore forming mechanism and function.

4. 論文, 著書など (2021.4~2022.3)

総説

1) 吉田徹、津下英明

生化学 第93巻,第6号,p862-866 (2021)

みにれびゅう

ADP リボシル化酵素がタンパク質や DNA を特異的に修飾する仕組み

2) 吉田徹、山田等仁、津下英明

日本結晶学会誌 v64(2),p69-76 (2022)

X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き

クライオ電子顕微鏡による二成分毒素の構造解析：トキシン膜透過システムの構造基盤（査読あり：総説）

5. 学会発表など (2021.4～2022.3)

1) 山田等仁 “クライオ電子顕微鏡による *Clostridium perfringens* が産生する二成分毒素の膜透過に伴うアンフォールディング機構の解析”

第 21 回日本タンパク質科学会（富山） 2021.6.7～9

2) Tomohito Yamada, Akihiro Kawamoto, Toru Yoshida, Hideaki Tsuge “Cryo-EM analysis revealed translocation unfolding in *C.perfringens* binary iota toxin”

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins 2021)（オンライン） 2021.6.28-31

3) 山田等仁、吉田徹、川本晃大、光岡薫、岩崎憲治、津下英明 “クライオ電子顕微鏡によって明らかにした二成分毒素の膜透過機構”

第 67 回トキシンシンポジウム（オンライン）2021.9.9～10

4) 川本晃大、山田等仁、吉田徹、加藤貴之、津下英明

“クライオ電子顕微鏡によるディフィシル菌由来の二成分毒素複合体の構造とそのタンパク質膜透過機構”

第 465 回ビタミン B 研究委員会（京都楽友会館） 2021.11.27

5) 津下英明

S11 細菌毒素研究の新たな展開を目指して

“ウェルシュ菌およびディフィシル菌由来の二成分毒素：クライオ電子顕微鏡による複合体構造とその膜透過機構” 第 95 回日本細菌学会（オンライン）2022.3.29～30（招待講演）

6. その他特記事項

(1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究（B）

課題名：クライオ電子顕微鏡によるタンパク質膜透過の動的構造解析 研究代表者：津下英明

取得年:2021～2023

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

ビタミン B 研究委員会 委員

日本生化学会 代議員（10月まで）

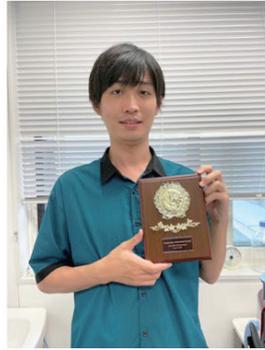
(3) 受賞等

D2 の山田等仁さんが、下記の 3 つの学会で受賞しました！

第 21 回日本タンパク質科学会 若手奨励賞優秀賞

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins 2021) Poster Prize

第 67 回トキシンシンポジウム 若手優秀賞



膜エネルギー代謝研究室 Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism

教授 横山 謙 Prof. Ken Yokoyama Ph.D.

1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要であり、生命がエネルギーを使いやすい形に変え、それを使う仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP は、主にミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素により作られる。作られた ATP は、生物が運動することや、生体分子の合成、分解、輸送などに使われる。たとえば、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。V-ATPase のように、ATP を使って基質を運ぶタンパク質は輸送体と呼ばれ、その仕組みは、それぞれの輸送体の構造を明らかにすることでだいぶわかってきたが、不明な点も残っている。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。この分子機械の仕組みを解明するには、その動きと形を見る必要があり、そのための手法として我々は、1 分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学を行ってきた。

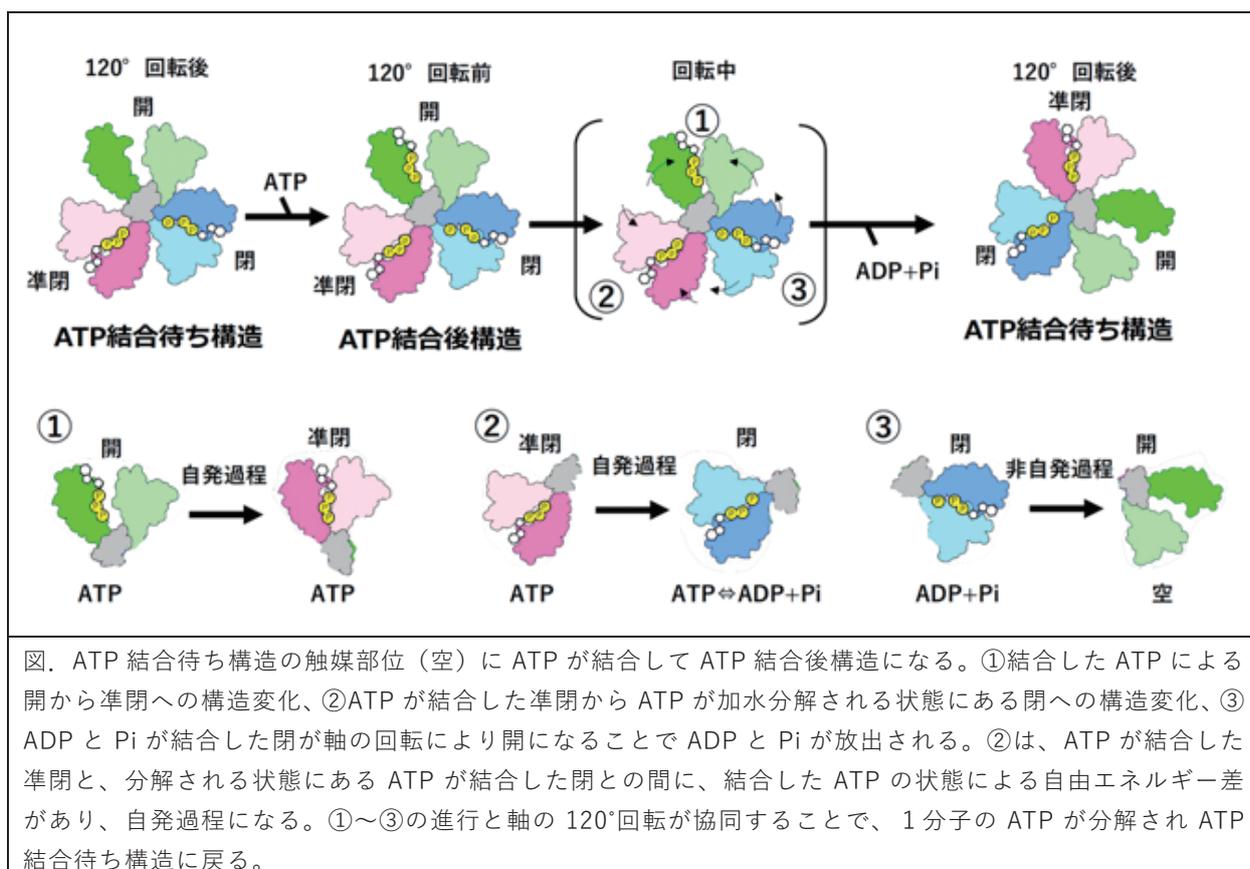
2. 本年度の研究成果

1) V/A-ATPase の動的構造解析

今回用いる変異体 V/A-ATPase (TSSA 変異体) は、活性中心にあるスレオニン残基をセリン残基に、セリン残基をアラニン残基に変えたもので、阻害に関わる ADP の触媒部位に対する親和性が低下している。この変異体酵素の ATP 合成活性や分解活性など、基本的な性質は野生型の V-ATPase とほぼ同じであり、野生型 V/A-ATPase と同等と考えて良い。精製した TSSA 変異体 V/A-ATPase を、EDTA を含むリン酸緩衝液で透析することで、結合している ADP をほぼ完全に除くことができる。ヌクレオチドを含まない状態の V/A-ATPase (V_{nucfree}) をナノディスクに再構成し、単粒子解析することで、すべての触媒サイトが空の状態の構造 (ATP 結合待ち構造) を得ることができる。次に に対して 触媒待ち条件、加水待ち条件、ATP 結合待ち条件になるように反応液を加え反応させた後、瞬間凍結してクライオグリッドを作成した (図 1)。それぞれの反応条件でのクライオグリッドを、Titan Krios で撮影し、単粒子解析することで立体構造を得た。

触媒部分である V_1 ドメインは、触媒部位を形成する 3 つの AB dimer が、回転軸サブユニットを取り囲んでいる。3 つの AB dimer は、ヌクレオチドの有りにしにかかわらず、開いた構造 (AB 開)、やや閉じた構造 (AB 準閉)、閉じた構造 (AB 閉) からなっていた。ATP 濃度が高い条件での構造では、すべての触媒部位に ATP もしくは、分解産物である ADP の密度が観察された ($V_{3\text{nuc}}$)。ATP 濃度が低く、ATP 結合が律速段階になる条件では、AB 準閉、AB 閉にはヌクレオチドの密度が観察されたが、AB 開にはヌクレオチドの密度がなかった。このことは、AB 開に ATP が結合して $V_{3\text{nuc}}$ 構造になることを示す。このことは、全ての触媒部位がヌクレオチドで占められてから、軸の回転が起こることを示す。ATP の加水分解が遅くなる ATP アナログを基質として用いた条件で得られた構造では、AB 閉には ADP が、AB 準閉には ATP が結合していた (V_{prehyd})。このことは AB 準閉の ATP の分解を待っている構造であることを示し、すなわち、AB 準閉の ATP が分解されるには AB 閉への構造変化が伴うことを示す。AB 準閉→AB 閉の構造変化は、軸の回転を伴うので、ATP の加水分解反応と軸の回転が共役していることを示唆する。ATP の加水分解反応は、熱散逸を伴う自発反応なので、軸の回転が触媒部位間の自由エネルギー差によって駆動されることを示唆する。

3 つの触媒部位で、ATP 加水分解の反応過程が別々かつ同時に起こり、それぞれの反応が軸タンパク質の回転と厳密に共役することで化学反応と軸の回転が共役していることがわかった (図 2)。今回の研究成果により、「2 つの触媒部位間での ATP 加水分解反応の自由エネルギー差が、軸タンパク質の回転を推進する。」ことが明らかになりました。このように精緻で巧みな仕組みで ATP 合成酵素が機能し、軸の回転により ATP が効率良く作りだされる自然の仕組みは、大変な驚異である。



3. Research projects and annual reports

Energy is necessary to sustain life. ATP, the energy currency of life, is produced mainly by ATP synthase in mitochondria. The ATP is used by living organisms for synthesis, degradation, and transport of biomolecules. For example, vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles and is responsible for various physiological phenomena through its acidification. How a molecular machine composed of tiny proteins, such as FoF1-ATP synthase and V-ATPase, converts the energy of ATP into transport and motion is a very interesting question and one of the life science problems to be solved. To elucidate the mechanism of this molecular machine, it is necessary to see its movement and shape, and we have been using single molecule observation and cryo-electron microscopy for structural biology to elucidate it.

We have obtained an important insight in molecular mechanism of rotary ATPase using cryoEM last year. The mutant V/A-ATPase (TSSA mutant) used in this study has changed the threonine residue in the active center to a serine residue and the serine residue to an alanine residue, resulting in reduced affinity for the catalytic site of ADP involved in inhibition. The basic properties of this mutant enzyme, such as ATP synthesis and hydrolysis activities, are almost the same as those of wild-type V-ATPase and can be considered equivalent to wild-type V/A-ATPase. Purified TSSA mutant V/A-ATPase can be dialyzed in phosphate buffer containing EDTA to almost completely remove bound ADP. The nucleotide-free state of the V/A-ATPase (V_{nucfree}) can then be reconstituted into nanodiscs and analyzed as single particles to obtain

a structure with all catalytic sites empty (ATP-binding waiting structure). Next, the cryogrids were prepared by adding the reaction solution to the cryogrid under the catalytic waiting, hydrolysis waiting, and ATP binding conditions, and then flash freezing the cryogrid (Fig. 1). The cryogrid under each reaction condition was subjected to data acquisition with a Titan Krios, and single-particle analysis was performed to obtain the three-dimensional structure. The V_1 domain, responsible for ATP hydrolysis, consists of three AB dimers that form the catalytic hexamer, surrounding the rotational axis subunit. three AB dimers, with and without nucleotides, consist of an open structure (AB_{open}), a slightly closed structure ($AB_{semi-closed}$), and a closed structure (AB_{closed}). In high ATP concentration, all catalytic sites were occupied with ATP or the degradation product ADP (V_{3nuc}). AB_{open} had no nucleotide density. This indicates that ATP binds to the AB_{open} to form the V_{3nuc} . This indicates that all catalytic sites are occupied by nucleotides before the rotation of the axis occurs. In the structure obtained under the condition of using ATP analogues as substrates, which slow down the hydrolysis of ATP, ADP was bound to the AB_{closed} and ATP to the $AB_{semi-closed}$ (V_{prehyd}). This indicates that the structure is waiting for the degradation of ATP in $AB_{semi-closed}$, i.e., the degradation of ATP in $AB_{semi-closed}$ is accompanied by a conformational change to AB_{closed} , suggesting a tight coupling of the ATP hydrolysis reaction with the axis rotation, since the conformational change from $AB_{semi-closed}$ to AB_{close} is accompanied by an axis rotation. The ATP hydrolysis is exergonic reaction, suggesting that the rotation is driven by the free energy difference between the catalytic sites. At the three catalytic sites, the reaction processes of ATP hydrolysis occur separately and simultaneously, and each reaction is strictly coupled with the rotation of the axis protein, indicating highly mechano-chemical energy conversion (Figure 2). This elaborate and ingenious mechanism by which ATP synthase functions and the natural mechanism by which ATP is efficiently produced by rotation of the axis is a tremendous marvel.

4. 論文, 著書など

1. **Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases.** Kishikawa J, Nakanishi A, Nakano A, Saeki S, Furuta A, Kato T, Mitsuoka K, and *Yokoyama K. *Nature Communications* volume 13, Article number: 1213 (2022)

5. 学会発表など

1. Structural intermediates in rotary V/A-ATPase from initial to steady state visualized by time-resolved cryo-electron microscopy. 中西温子、岸川淳一、西澤知宏、光岡薫、横山謙 第 59 回 日本生物物理学会 年会 オンライン開催 11/2021 オンライン発表
2. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素の回転機構の解明 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2021 年 第 94 回 日本生化学会大会オンライン開催 12/2021 ポスター発表
3. クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による ATP γ S 存在下 V/A-ATPase の中間体構造 佐伯詩織、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 94 回 日本生化学会大会 オンライン開催 12/2021 ポスター発表
4. 好熱菌 FoF1 の動的構造解析によって回転機構を明らかにする。 中野敦樹、中西温子、岸川淳一、横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 口頭発表
5. 構造スナップショットで解き明かす V 型 ATPase の回転機構 横山謙 2022 年 1/8 生体運動研究合同班会 名古屋大学 口頭発表

6. その他特記事項

1) 外部資金

1. 科学研究補助金 基盤研究 B

課題名：クライオ電子顕微鏡による V 型 ATPase の回転機構の解明 研究代表者：横山 謙 取得年度 R2-R4 (3 年)

2021年度プレスリリース

潮田 亮 Nature Communications volume 13, Article number: 1213 (2022)に関するプレスリリース 小胞体局在還元酵素ERdj 5の機能不全は細胞内のカルシウムイオンバランスの攪乱を招き、細胞老化の亢進、個体寿命の短縮を起こすことを 解明		
2021. 11. 03	新聞	京都新聞 朝刊
2021. 11. 22	新聞	朝日新聞 夕刊
2021. 11. 18	インターネット 記事	読売新聞オンライン、毎日新聞、SankeiBiz、AFP通信、沖縄タイムス ほか

京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2021年度号

【非売品】

令和4年11月15日 印刷

令和4年11月25日 発行

発行人 京都産業大学タンパク質動態研究所長
遠藤斗志也

発行所 京都産業大学タンパク質動態研究所
京都市北区上賀茂本山
TEL(075)705-1468

印刷所 株式会社プレスハウス
京都市東山区新宮川町通松原下ル

©京都産業大学タンパク質動態研究所

