

## 業績紹介：回転子のない $F_1$ モーターが“回転”することを高速原子間力顕微鏡による 1 分子観察で証明

飯野亮太（東大院工・公募研究代表者）

論文題目：“High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless  $F_1$ -ATPase”

著者：Takayuki Uchihashi, Ryota Iino, Toshio Ando, Hiroyuki Noji

雑誌巻号：Science 333, 755-758 (2011)

$F_1$ -ATPase ( $F_1$ ) は ATP 合成酵素の一部であり ATP を加水分解しながら回転する。 $F_1$  が回転モーターとして機能する最小単位は  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体で  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットが 3 つずつ交互に並んで作る  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングに回転子の  $\gamma$  サブユニットが突き刺さっている。ATP 加水分解反応の触媒部位は  $\alpha$ - $\beta$  界面 (図 1A の矢印) に存在し、ATP 結合に寄与するアミノ酸残基のほとんどは  $\beta$  サブユニットに存在する。結晶構造中の 3 つの  $\beta$  は結合しているヌクレオチド状態が異なり、ATP または ADP を結合した 2 つの  $\beta$  は“閉じた構造”、ヌクレオチドを結合していない 1 つの  $\beta$  は“開いた構造”をとっている。このため  $\beta$  は開いた状態と閉じた状態に大きく構造が変化し、この構造変化が  $\gamma$  の回転を駆動すると考えられている。それぞれの  $\beta$  は回転子  $\gamma$  が反時計回りに  $360^\circ$  回転すると 1 回の ATP 加水分解反応を完了してリセットされる。3 つの  $\beta$  の化学反応と構造変化のタイミングは巧みに制御されており、位相がお互いに  $120^\circ$  ずれている。 $\gamma$  が一方方向に回転するためには、このタイミングの制御が重要だと考えられる。

$F_1$  の結晶構造をみると、閉じた  $\beta$  は  $\gamma$  を押しているように見え、開いた  $\beta$  は  $\gamma$  に押されているように見える。この“押し引き”がタイミングの制御に重要である、というのがこれまで最も有力な説であった。このモデルでは一方方向への回転の実現には  $\gamma$  と  $\beta$  の相互作用が必須となり、非対称な形をした  $\gamma$  の回転角度が決まれば 3 つの  $\beta$  の状態は自動的に規定される。いわば  $\gamma$  が 3 つの  $\beta$  の化学反応と構造変化のタイミングを支配する、“独裁者”としての役割を果たす。しかしながら最近、 $\gamma$  を削って  $\beta$  との接触点を減らしても一方方向に回転するという報告がなされた。そこで我々は高速原子間力顕微鏡を用い、回転子のない  $F_1$  の  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングが一方方向に“回転”できるのかを直接検証した。

$\alpha_3\beta_3$  固定子リングの N 末端側をマイカ基板表面に共

有結合で固定し、大きく構造変化する C 末端側を 80 ミリ秒の時間分解能で観察した。ATP 存在下では 3 つの  $\beta$  のうち 1 つのみが開いた非対称な構造をみせ、 $\beta$  の開閉のダイナミックな構造変化が観察された。特筆すべきは、開いた  $\beta$  が閉じると反時計回り方向にある閉じた  $\beta$  が同時に開くという協動的な構造変化が見られた点で、時間経過とともに  $\beta$  の開閉が反時計回りに遷移していく様子が明確に観察された (図 1B)。

これまでの説とは異なり、 $F_1$  の一方方向性回転を支える構造的基盤は  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングに内蔵されていることが証明された。一方で  $\gamma$  なしの  $\alpha_3\beta_3$  リングの一方方向回転の効率や速度は、 $\gamma$  ありに比べ低下していることも確かであった。正確で速い回転触媒反応の実現には  $\alpha_3\beta_3$  リング間の相互作用だけでなく回転子  $\gamma$  と固定子の相互作用も“同等に”重要であると考えられた。

また今回の結果は、 $F_1$  に似た 6 量体リング構造を持つが回転子を持たない RecA ファミリーおよび AAA+ ファミリータンパク質もリングを形成するサブユニット同士が協動的に働くことを強く示唆する。今後はこれらのタンパク質ナノマシンを高速 AFM で観察し  $F_1$  との共通点や相違点を明らかにしたい。

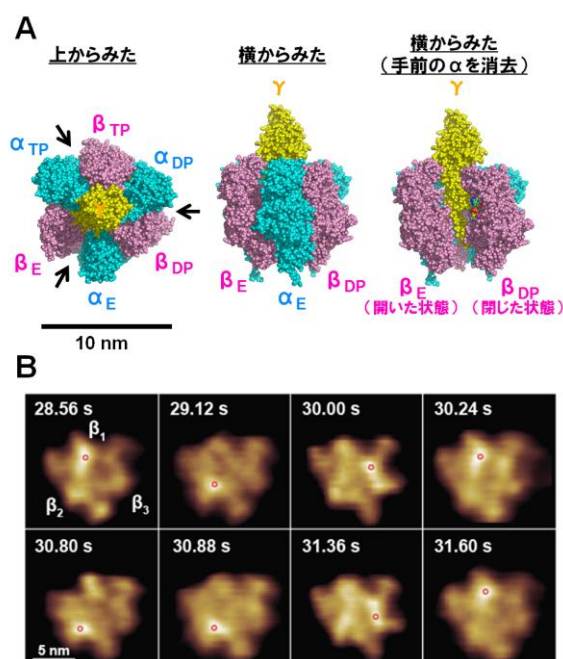


図 1.  $F_1$  モーターの結晶構造 (A) と回転子  $\gamma$  のない  $\alpha_3\beta_3$  固定子リングの“回転”の高速 AFM 像 (B)。

## 業績紹介：アドレナリン系列におけるカテコールアミンのコンフォメーション特異性

石内俊一 (東工大資源研・A01 計画研究分担者)  
藤井正明 (東工大資源研・A01 計画研究代表者)

論文題目: "Gas-Phase Spectroscopy of Synephrine by Laser Desorption Supersonic Jet Technique"

著者: Shun-ichi Ishiuchi, Toshiro Asakawa, Haruhiko Mitsuda, Mitsuhiro Miyazaki, Shamik Chakraborty and Masaaki Fujii

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. A*, **115**, 10363-9 (2011)

我々のチロシン、*m*-チロシン及びドーパの一連の気相分光研究から、カテコールアミン類であるドーパでは観測されるコンフォマーの数が特異的に少ない(1個)ことを明らかにした[1,2]。さらに、既に報告されているカテコールアミン(ノルアドレナリン[3]、アドレナリン[4])でもコンフォマーの数が少なく(1及び2)、カテコールアミンでは一般に観測されるコンフォマー数が少ないという一般則が成立する可能性がある。この一般性を検証すべく、アドレナリンからフェノールOH基を1つ取り除いたシネフリンに対してレーザー脱離超音速ジェット分光法を適用し、コンフォマー数が逆に増えるかを検証した。

図1にジェット冷却したシネフリンの共鳴多光子イオン化(REMPI)スペクトル及びUV-UVホールバーニング(HB)スペクトルを示す。REMPIスペクトルに観測されたA~Fのバンドにプローブレーザーの波長を固定してHBスペクトルを測定すると、それぞれ異なるスペクトルが観測された。REMPIスペクトルに観測された全てのバンドはこれら6本のHBスペクトルの

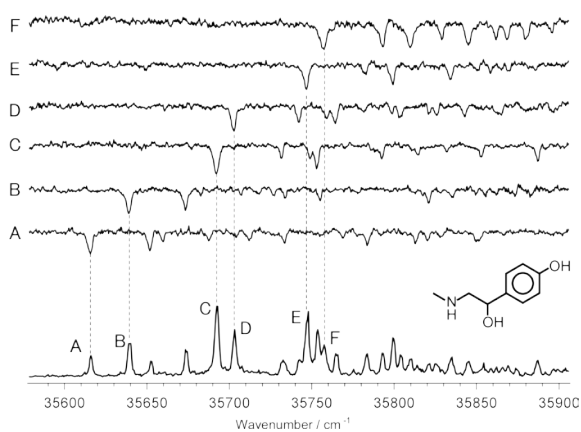


図1 シネフリンの REMPI スペクトル(下)と HB スペクトル(A~F)

いずれかに観測されているため、REMPI スペクトルには6個のコンフォマーが観測されていることが分かった。即ち、シネフリンで観測されるコンフォマー数は6であり、ベンゼン環がカテコールからフェノールになることによって予想通りコンフォマー数が増えることが確かめられた。これら6種類のコンフォマーの赤外スペクトルを測定し、量子化学計算との比較によりそれぞれの構造を決定したところ、アミン鎖の構造は3種類であり、それぞれがフェノールOH基の異なる2つの配向をもつことが分かった。

シネフリンからフェノールOH基を取り去った2-メチルアミノ-1-フェニルエタノール(MAPE)のコンフォマー数は3と報告されており、これはアミン鎖の構造が3種類存在することを示している。またそれらの構造は我々が決定したシネフリンの3種類のアミン鎖の構造と一致している。従って、MAPEからシネフリンへのコンフォマーの発展は規則的であり、フェノールOH基とアミン鎖の間の相互作用がほとんどないことを示している。同様の規則をアドレナリンにも適用すると、アドレナリンのコンフォマー数は12になるはずであるが(図2)、過去の報告では2であり、ドーパと同様に規則性が成立しないことが分かる。このことは、アミン鎖とカテコールOH基の間に相互作用が存在することを明確に示している。

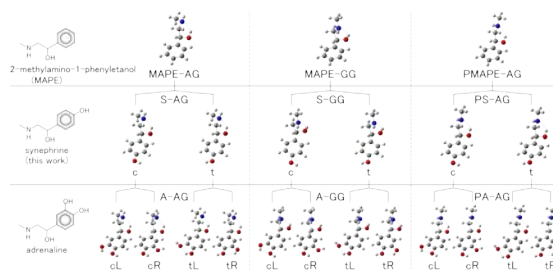


図2 MAPE→シネフリン→アドレナリンのコンフォメーション発展

- [1] H. Mitsuda, M. Miyazaki, I. B. Nielsen, P. Çarçabal, C. Dedonder, C. Jouvet, S. Ishiuchi, M. Fujii, *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 1130-1133 (2010).  
[2] S. Ishiuchi, H. Mitsuda, T. Asakawa, M. Miyazaki, M. Fujii, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 7812-7820 (2011).  
[3] L. C. Snoek, T. Van Mourik, P. Çarçabal, J. P. Simons, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5**, 4519-4526 (2003).  
[4] P. Çarçabal, L. C. Snoek, T. Van Mourik, *Mol. Phys.*, **103**, 1633-1639 (2005).

## 業績紹介：ESI 極低温 22 極子イオントラップ・レーザー分光を用いたアルカリイオン内包クラウンエーテルの振動・電子スペクトルの観測

井口佳哉, 江幡孝之 (広大院理・公募班 A01)  
論文題目: "UV and IR Spectroscopic Studies of Cold Alkali Metal-Ion-Crown Ether Complexes in the Gas Phase".

著者: Yoshiya Inokuchi\*, Oleg V. Boyarkin, Ryoji Kusaka, Takeharu Haino, Takayuki Ebata, Thomas R. Rizzo\*  
雑誌巻号: J. Am. Chem. Soc. 133, 12256-12263 (2011)

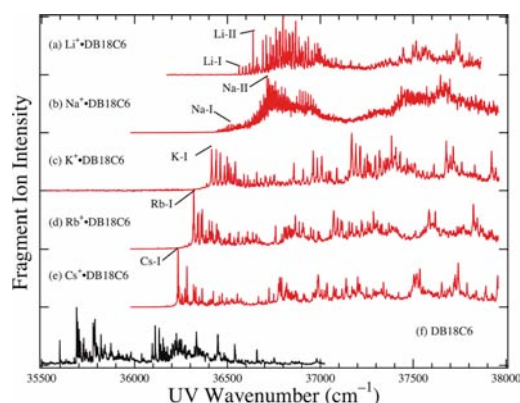


我々のグループでは、包接化合物で代表される機能性分子のゲスト種の包接構造や認識機構の解明を目指した研究を行っている。クラウンエーテルはイオンを自身の空孔に取り込んで水相から有機相へ移動できる相関移動触媒として用いられる包接化合物である。とくに、イオン取り込み時にサイズ認識をするためこれまで多くの研究がなされてきた。しかしながら、気相状態での結合エネルギー測定の結果からは、凝集相での認識を支持する結果は得られておらず、分子認識におよぼす溶媒効果の役割に興味を持たれている。

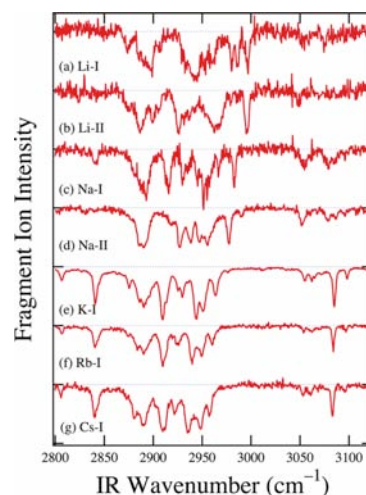
一方、クラウンエーテルはエーテル環がたわみやすく室温では様々なコンフォメーションの間を揺らいでいる為に構造決定に有効な電子スペクトルや振動スペクトルはブロードになり得られる情報は少ない。この問題を解決するには、イオン内包クラウンエーテルを極低温の条件下で生成してレーザー分光を行うことが最も有効である。そこで本研究では、ローザンヌ連邦工科大学(EPFL)の Tomas Rizzo 教授のグループと共同研究で、Li<sup>+</sup>から Cs<sup>+</sup>にわたるアルカリイオン(M<sup>+</sup>)を内包したジベンゾ-18-クラウン-6-エーテル(M<sup>+</sup>・DB18C6)の電子スペクトルと赤外スペクトルを、10Kの極低温条件下で観測することにはじめて成功した。

実験は、EPFLの保有するエレクトロスプレー・極低温 22 極子イオントラップ(ESI/ cold 22-pole ion trap)を用い、ESIで生成した M<sup>+</sup>・DB18C6を約 10Kに冷却した 22 極子イオントラップに導入し、紫外レーザー照射による紫外解離(UVPD)スペクトルや、赤外レーザーと紫外レーザーを同時照射した IR-UV 二重共鳴法(IR-UV DR)で赤外スペクトルを観測した。

観測された M<sup>+</sup>・DB18C6の電子スペクトルはすべて M<sup>+</sup>を包接しない DB18C6 よりもバンド原点が高波数 shift し、その大きさに M<sup>+</sup>の大きさとの相関が見られる。また、20 cm<sup>-1</sup>程度の低い振動のプログレッションが強く現れており、構造のたわみややすさを示している。



一方、IR-UV DRにより観測したクラウン環の CH 領域の赤外スペクトルを見ると、伸縮振動全体が M<sup>+</sup>のサイズとともに低波数側 shift している。これは電子スペクトルの高波数シフトとも対応している。



量子化学計算との対応から、M=Li, Na に対しては DB18C6 がクラウン環をゆがめて M<sup>+</sup>を包接するが、M=K, Rb, Cs の場合、クラウン環はボート型の開いた構造をとり、K ではクラウン環の真ん中、Rb, Cs はクラウン環の上に位置することが明らかになってきた。現在、研究は異なったサイズのクラウンエーテルにも進めており、今後サイズ認識におよぼす溶媒効果を解明するよう、共同研究を進めている。

## 業績紹介：イエロープロテインの発色団周辺水素結合ネットワーク変化

水野 操 (阪大院理・A03 計画研究分担者)  
上久保裕生 (奈良先端大・A03 公募研究代表者)  
片岡幹雄 (奈良先端大・班友)  
水谷泰久 (阪大院理・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Changes in the Hydrogen-Bond Network around the Chromophore of Photoactive Yellow Protein in the Ground and Excited States"

著者: Misao Mizuno, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, and Yasuhisa Mizutani

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B* **115**, 9306-9310 (2011).

イエロープロテインは、発色団である *p*-クマル酸 (pCA) が、ふたつのアミノ酸残基、Tyr42 および Glu46、と短距離水素結合を形成している。これらの水素結合は、pCA の光反応によりネットワーク構造が変化し、イエロープロテインの光センサー機構に重要な役割を果たしている。

本研究では、野生型および変異体イエロープロテインの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。共鳴ラマン効果により、タンパク質中の Tyr 残基の振動スペクトルを選択的に観測した。さらに変異体測定を組み合わせ、Tyr42 残基のスペクトルを算出した。Tyr42 残基のスペクトル変化から、基底 (pG) および励起 (pG\*) 状態にある pCA の周辺水素結合ネットワーク構造の Glu46 残基の置換による変化を議論した。

pG 状態において、野生型と E46Q 変異体 (Glu46 残基を Gln に置換)、それぞれにおける Tyr42 残基の紫外共鳴ラマンスペクトルを比較した。野生型における Tyr42 残基のバンド強度は、E46Q 変異体のものよりも大きかった。これは、Glu46 残基の置換が、pCA と Tyr42 残基との間の水素結合を強化する働きがあることを示している。このとき、pCA と 46 番目の残基との間の結合は、野生型では低障壁水素結合を形成している[1]が、E46Q 変異体では通常の水素結合距離に変化している。したがって、pG 状態では、pCA と Tyr42 および Glu46 残基の水素結合が互いに作用し合っていると考えられる。

pG\*状態では、以前に我々は、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法により、pCA の光励起に伴い、Tyr 残基の水素結合強度が強化されることを明らかにした[2]。今回、水素結合強度強化を示す Tyr 残基を同定す

るために、Tyr42 残基を Phe に置換した Y42F 変異体測定を行った。Y42F 変異体の時間分解ラマンスペクトルには、Tyr 残基の振動バンドにスペクトル変化が現れなかった。このことから、pG\*状態における Tyr 残基のスペクトル変化が、Tyr42 残基の水素結合強化であることが明らかになった。また、E46Q 変異体においても、pG\*状態で Tyr42 残基の水素結合強度が強化することがわかった。

さらに、pG\*状態における野生型および E46Q 変異体中の Tyr42 残基のスペクトルを比較した。この結果、Tyr42 残基のスペクトル形状が野生型、E46Q 変異体でよく似ていることがわかった。これより、pCA と Tyr42 残基間の水素結合強度が、野生型および E46Q 変異体では同等であることが示された。pG\*状態では、野生型および E46Q 変異体における pCA と 46 番目の残基との間の水素結合距離は、通常の結合距離であると報告されている。したがって、Glu46 残基の置換は、pG\*状態における水素結合ネットワーク構造に大きな影響を与えないと考えられる。

共鳴ラマンスペクトルに観測される水素結合ネットワーク構造の変化は、結合距離だけでなく、周辺アミノ酸残基との相互作用や水素結合に関与する原子の位置によっても変化する。今後は、特に水素原子の位置同定が可能な中性子結晶構造解析の結果とも合わせて、さらなる検討が望まれる。

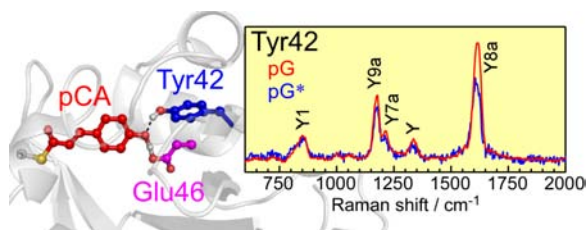


図. 野生型イエロープロテインの pCA 周辺構造と Tyr42 残基の紫外共鳴ラマンスペクトル. 変異体測定により、5 つある Tyr 残基のうち、Tyr42 残基のスペクトルのみを pG および pG\*状態について得ることに成功し、その構造変化について議論した。

### 引用文献

- [1] S. Yamaguchi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 440-444 (2009).
- [2] M. Mizuno, *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **111**, 6293-6296 (2007).