

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。

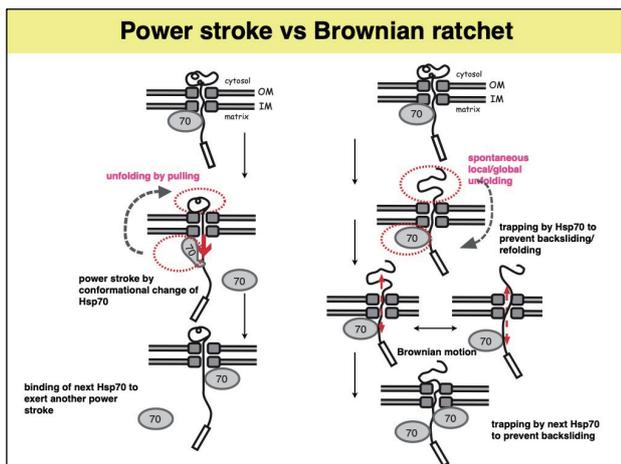


図 1 膜透過の 2 つのモデル

パワーstroke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stroke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場合には、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stroke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には、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せん。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 複合体からはずれないというわけで、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

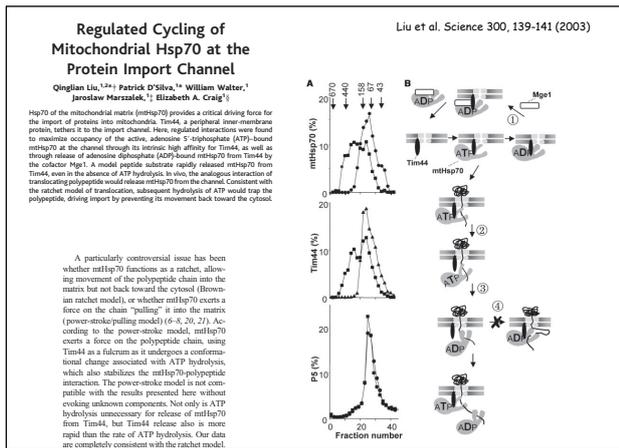


図2 Craig らの論文

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。

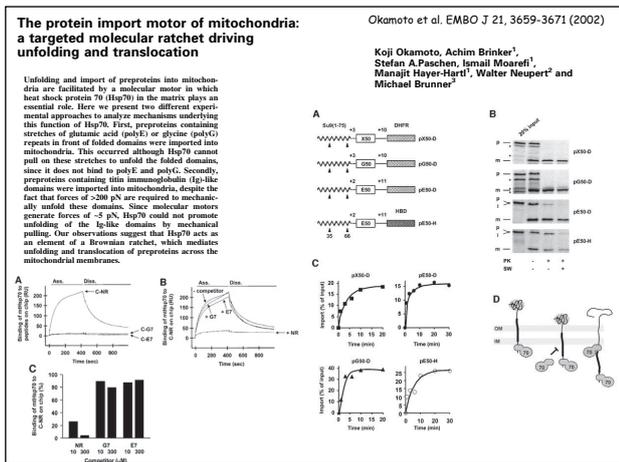


図3 岡本、Neupert らの論文

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 とい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

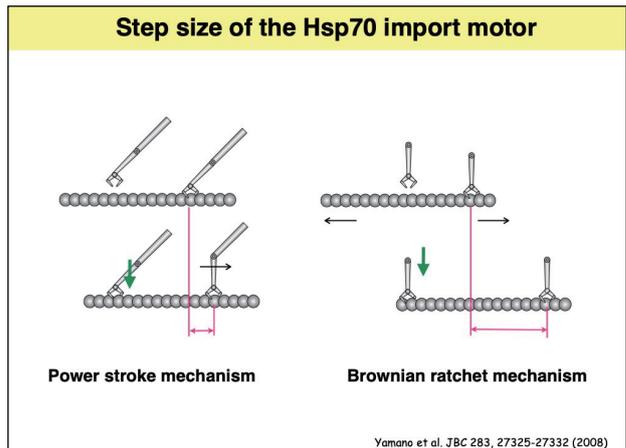


図4 膜透過のステップサイズを測る

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

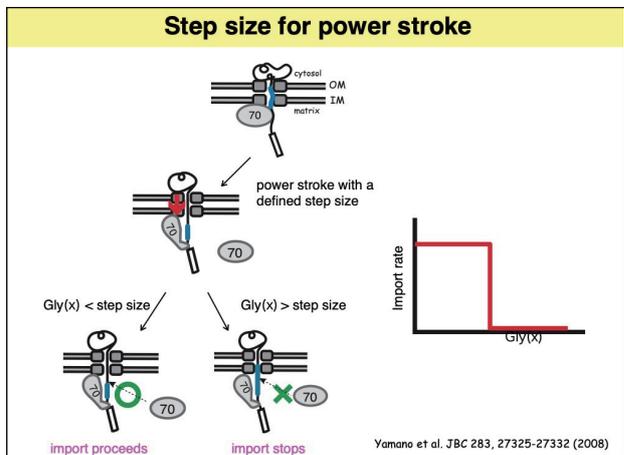


図5 パワーstrokeのステップサイズ

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

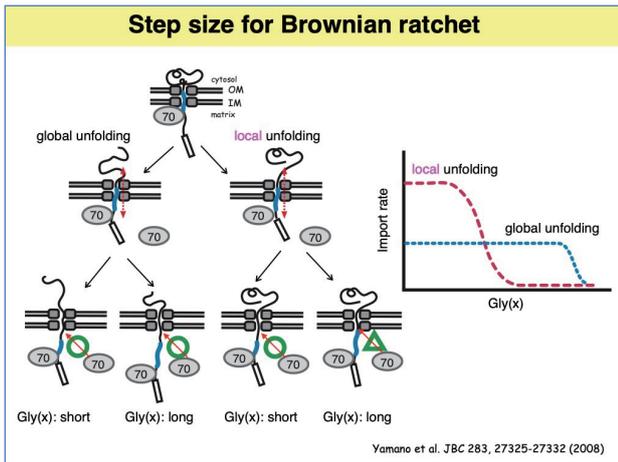


図6 ブラウニアンラチェットのステップサイズ

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わけです。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。

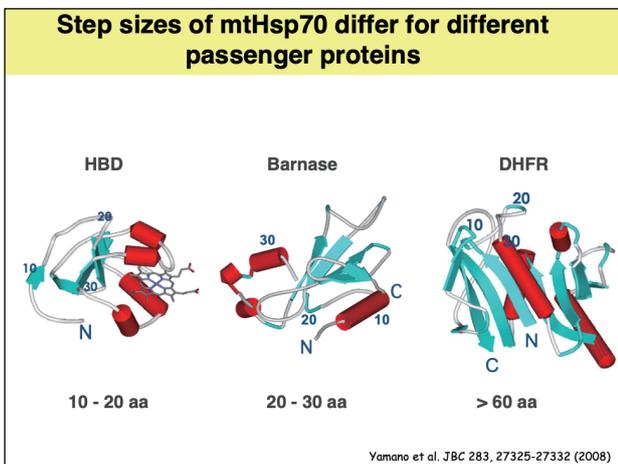


図7 前駆体によってステップサイズが異なる

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 は結合しやすくなると。これによって、ほどけた状態が安定化される効果

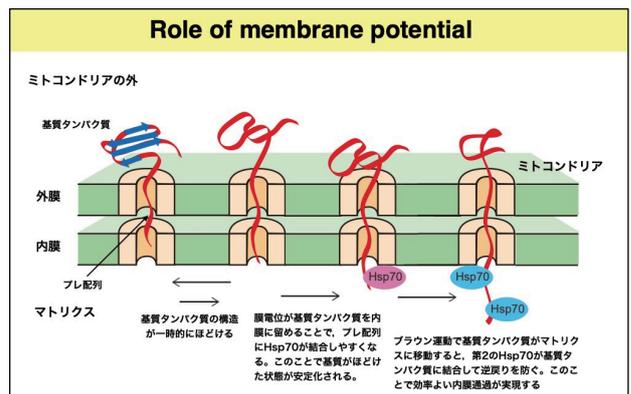


図8 膜透過における膜電位の役割

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、前駆体がほどけるって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stroke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stroke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stroke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)

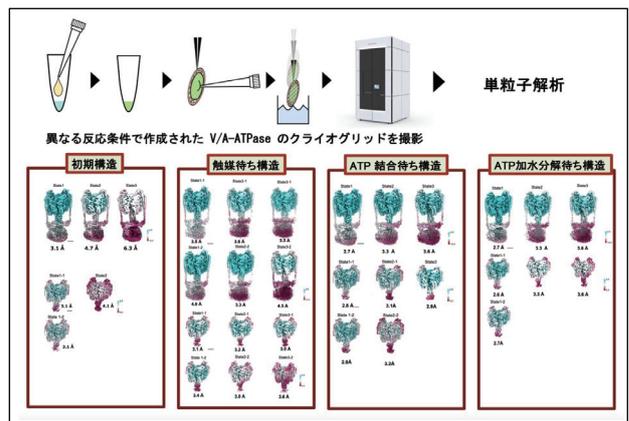


図9 V-ATPアーゼの単粒子解析

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

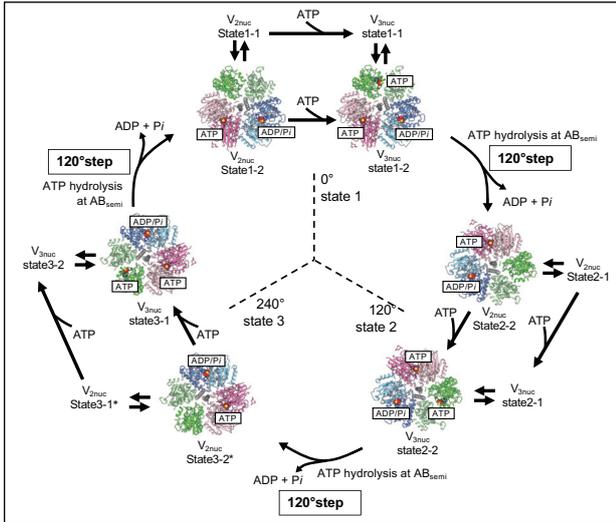


図 10 V-ATP アーゼの反応サイクルとクライオ EM 構造

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 V₁ 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

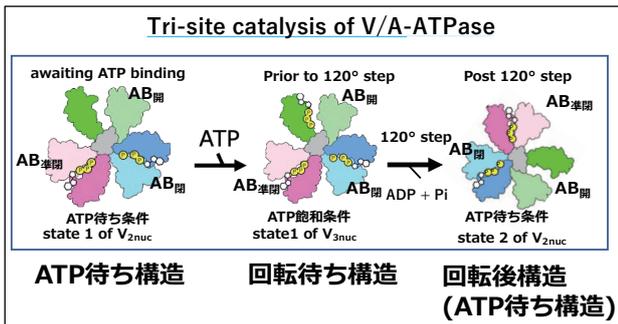


図 11 V-ATP アーゼの 3 つの構造状態

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。

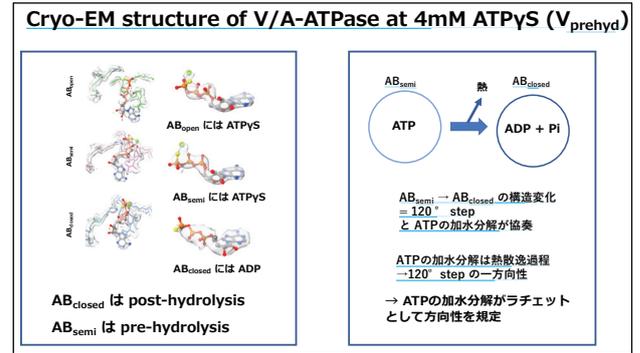


図 12 AB 準閉から AB 閉は熱散逸を伴うのではない

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だけです。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、ラチェットの役割を 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?

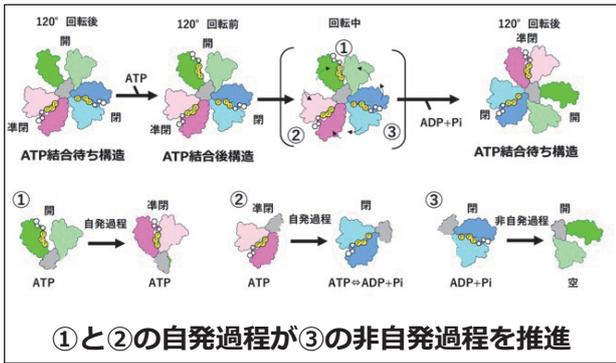


図 13 ①と②は自発過程であり、これらが③を駆動すると考える

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、ここは一方性になるのでラチェットの働かずです。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。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のところは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こと、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がね。

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。

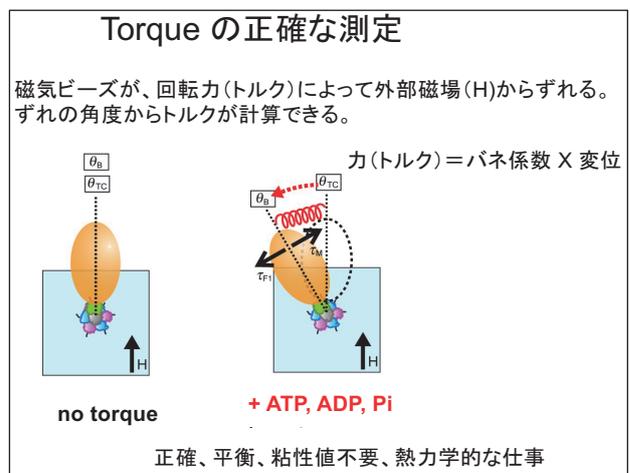


図 14 F1 モーターのトルクを測る

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

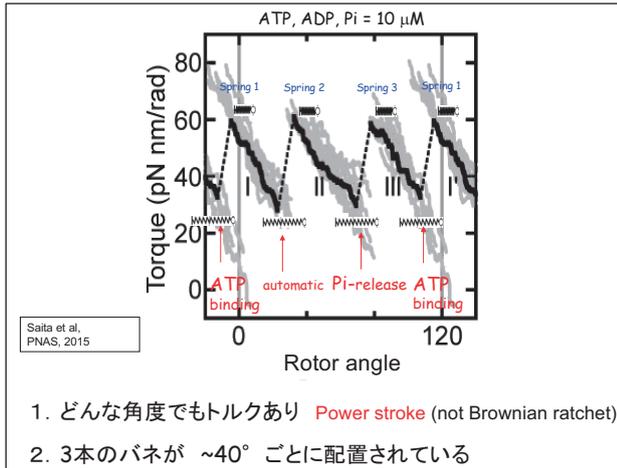


図 15 実測された F1 モーターのトルクパターン

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と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。

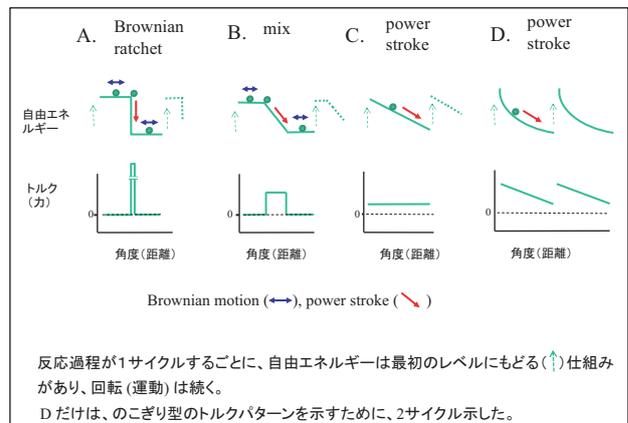


図 16 ブラウンラチェットとパワーストロークによるトルク

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ニ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、あれだってブラウニ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、ブラウニ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

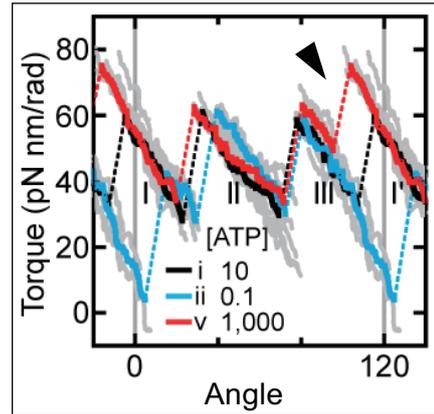


図17 ATP濃度を変えるとトルクパターンが変わる

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

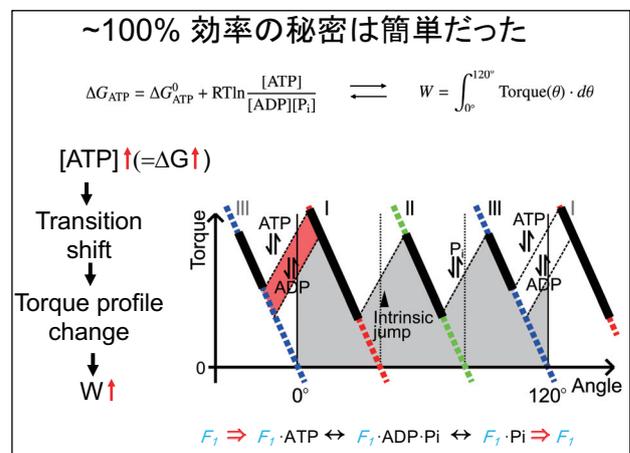


図18 トルクが行う仕事量と ΔG がうまく対応してくれる

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

ていうじゃなくて、ミオシンとかと違って、100パーセントぐらいの効率がないと、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。

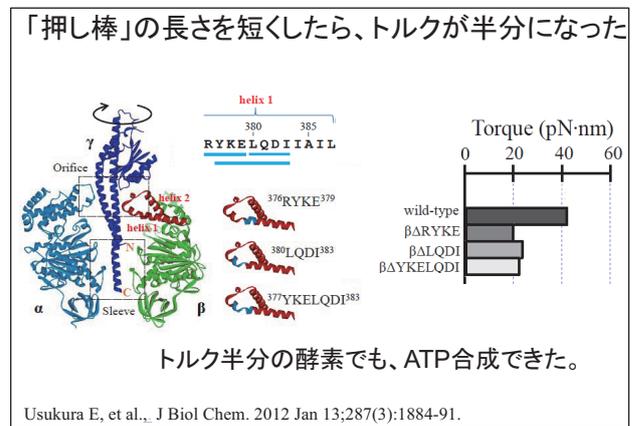


図20 F1-ATPシンターゼのトルクを半分にする

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

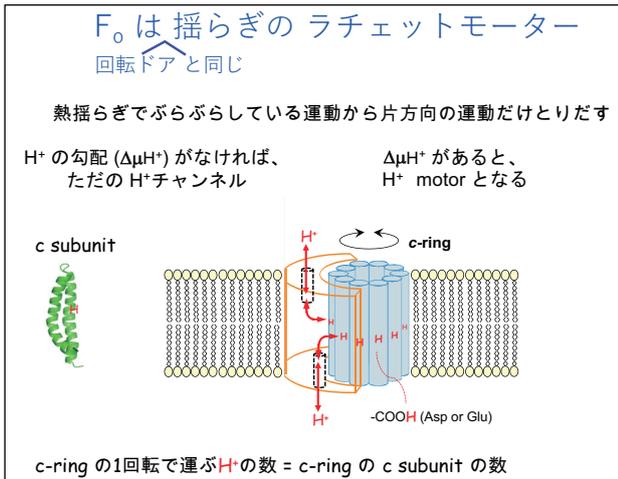


図 21 Fo-ATP アーゼはブラウンラチェット出回る

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増える。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

ですよね。

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stroke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っています。

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.