

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」
平成14年度採択研究代表者

伊藤 博康

(浜松ホトニクス(株)筑波研究所 専任部員)

「タンパク質分子モーターを利用したナノメカノケミカルマシンの創製」

1. 研究実施の概要

生体内では、化学的エネルギーを力学的エネルギーに直接変換する「仕掛け」がある。この「仕掛け」のうち特に高級なものは、状況に応じて、逆の反応（力学エネルギーを化学エネルギーに変換する）を行うという柔軟性も持っている信じられている。これらのエネルギー変換の仕掛けを作っているのが、タンパク質やRNAでできた分子機械である。タンパク質やRNA分子でできた分子機械に、力を加えて（力学的操作）化学合成を行わせる、あるいは力により化学反応を制御するというナノメカノケミカルマシンを創り出したい。これまで思いもよらなかった機能を実現することにより、ソフトナノマシンとしての分子機械のメカニズムの解明に資するだけでなく、バイオテクノロジーの新機軸の一つとなりうるのではないかと期待している。

本研究では、まず、 F_1 -ATPaseに注目する。我々が知る世界で一番小さな回転分子モーターである。生体内では主にATP合成酵素として働くこの分子機械は、生体から取り出すと、ATPのエネルギーを使って γ と呼ばれるサブユニットを回転させる。回転の目印を捕まえて逆方向（時計方向）に回転させれば、この酵素はATPを合成するだろうか。当該年度の研究実施の成果は、これを実際に証明して見せたことである。

ATPは高エネルギー化学物質であり、貯蔵も可能である。最終的には、生体のエネルギー代謝システムを利用した人工機関のモデルを提案したいと考えている。現在は、合成のメカニズムの詳細を探るために、現在の操作・計測システムの改良を始めた。

2. 研究実施内容

当該年度の主な研究成果は、 F_1 -ATPase (F_1) の強制的な逆回転によるATP合成の証明である。研究実施の具体的な内容は、①回転のローターである γ サブユニットを自在の方向に回転するために、回転アッセイ法—1つ1つの F_1 に大きな目印（蛍光性のアクチンフィラメント）を付けて顕微鏡下で観測する手法—の改良を行い、回転を誘導するための磁気ピンセットシステムの開発、②合成を確認するために用いたホタル由来のルシフェリン・ルシフェラーズシステムの化学発光キネティクスの検証、③化学発光を検出するための超高感度光検出システムの開発、④高感度に合成を捉えるための操作・検出システムの開発、

である。以下に、順に内容を説明する。

- ① 操作に用いた磁性ビーズのガラス基盤への非特異的な吸着をさげ、且つ、回転アッセイ時の回転するビーズの発見効率を高めるための改良、回転を目的とした磁気ピンセットシステムの開発を試みた。疎水的な基盤が、発見効率の向上に適していること、ビーズが従来のアクチンと比較して、観測を容易にすることを見いだした。現在、国内では、回転アッセイに広く利用されている。また、磁気ピンセット法は、一度に、視野内の多くの試料を取り扱えること、レーザーを利用した光ピンセットと比較して廉価であることなどの利点がある。世界中でも、まだ、2～3の研究室において利用されているだけだが、分子モーター関連の分野を中心として、広く利用して頂けるよう改良を進めていきたい。
- ② ルシフェリン・ルシフェラーゼの系は、極微量のATPの検出に広く利用されている系である。しかし、我々の合成系では、大量のADP、Piが必要であり、ルシフェラーゼの化学発光の代謝物であるADPとPiの存在は化学発光のキネティクスに影響を及ぼす。また、ADPには、不純物としてのATPが0.2～2%程度含まれており、これを高度に精製しても、合成の確認の計測を妨害する量になってしまう。また、このような持ち込みのATPの他に、ATP合成酵素の混入が計測の深刻な問題となっていることが分かった。この結果により、合成条件の最適化を図ることができた。
- ③ 合成による化学発光検出のために、単一光子計数型のカメラを試作した。イメージインテンシファイアーに、量子収率の高い光電面（GaAsP）を採用し、蛍光面の読み出しには、テーパー型のファイバーを用いることにより市販品の10倍程度の検出効率を実測した。さらに、全てを冷却ハウジングに納めることにより熱ノイズの低減を図った（室温；200cps→-17℃；15cps）。
- ④ ②で示したように、ADPに不純物として存在するATPによる発光が高いバックグラウンドとなり計測を妨害した。イオン交換カラムによる精製によりADP対ATPを 10^{-4} 程度に抑えることには成功したが、逆回転させたF1が、分解と同じメカニズムでATPを合成したとしても、高々3個である。そこで、F1当たりの溶液の量を減らす方針で、微小液滴を用いる方法、および、薄いチャンバー内に大量のF1を導入する方法などを試みた。微小液滴による方法は、非常に操作が難しく、数例、回転による合成を示すデータが得られたが、薄いチャンバーは、視野内のF1の数の見積もりに曖昧さは残したものの、連続して結果が得られた。計測後、試料チャンバーを反転させて再計測するなどの結果より、確かに、適切な方向の回転（時計方向）の時に、ATPを合成できることなどを示すことができた。

⑤ 上記しなかったが、チャンバーの厚さのコントロール、計測系のドリフト、磁性ビーズ特性の不均一さなどが、合成メカニズムの詳細の解明を探る上で重要な問題となることが分かっており、新年度に解決しなければならない課題として、現在の系の改良を図っている。

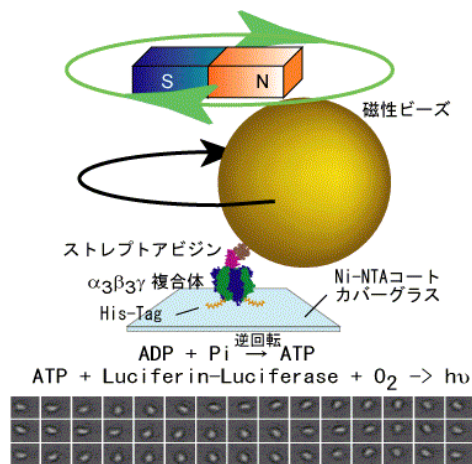


図1. 強制的な逆回転による合成証明のモデル図(上)と、ATP加水分解時に回転するビーズの連続画像(30Hz)(下)。

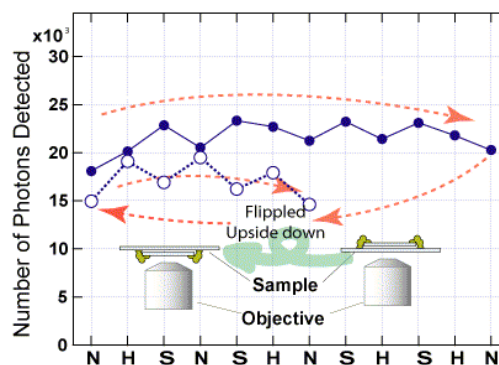


図2. 薄いチャンバーによる合成実験。実線(●)の計測の後、チャンバーの上下を反転(波線、○)。N、磁場無し、H、分解方向、S、合成方向に10Hzで回転。5分間積算。

3. 研究実施体制

一分子工学グループ

- ① 研究分担グループ長：伊藤 博康（浜松ホトニクス株式会社筑波研究所、専任部員）
- ② 研究項目：1分子操作・検出支援システムの開発

一分子生理グループ

- ① 研究分担グループ長：木下 一彦（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター教授）
- ② 研究項目：1分子操作に適した分子機械の改変と精製、分子機械の機能向上のための環境整備

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Ryohei Yasuda, Tomoko Masaïke, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Hiroyasu Itoh, and Kazuhiko Kinosita, Jr.

“The ATP-waiting conformation of rotating F_1 -ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 9314-9318. (2003)

○ Hiroyasu Itoh, Akira Takahashi, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda,
Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita, Jr.

“Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase”

Nature, **427**. 465-468 (2004)

(2) 特許出願

特になし