

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

伊藤 博康 (浜松ホトニクス(株)筑波研究所 主任部員)

主たる共同研究者

木下 一彦 (早稲田大学理工学術院 教授)

宗行 英郎 (中央大学理工学部 准教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体の研究内容

研究チーム全体の構想としては、まず F_1 -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証に力を注いだ。逆回転による ATP の合成が加水分解とは逆の通り道で起こるのならば、合成される ATP の数は1回転あたり高々3個と思われる。この少ない ATP をどのように検出するかが問題であった。操作法・検出法の開発といった技術的な問題の解決を浜松ホトニクスの技術者の協力を得て一分子工学グループ(浜松ホトニクス(株)筑波研究所)が担当した。同時にソフトナノマシンシステムの設計のための研究を行った。そもそも、 F_1 -ATPase を壊すことなくガラス基盤に固定した F_1 -ATPase を強制的に回転できるのか、あるいは合成のメカニズムの研究には一分子生理グループ(早稲田大学理工学部木下研究室)が取り組んだ。ATP 合成の実証とは別にメカニズムに関する幾つかの重要な成果がこのグループから生まれた。プロジェクトの前半で合成の実証は終えた。その後も合成のメカニズムの詳細を明らかにするための操作・観測法の精度向上に取り組んだ。トルク発生、ATP 合成のメカニズムに関する研究では自由エネルギー変換機械としての F_1 -ATPase の入出力の関係を明らかにすることが必要である。我々の開発した技術を用いてエナジェティクスに焦点をあてた研究が必要との領域運営上の判断から、分子操作応用実験グループ(中央大学理工学部宗行研究室)が平成17年4月から参加した。これにより回転電場法によるトルク制御が可能となり、入出力関係の計測が可能となった。参加して3年であり、実験系の整備にかかった時間を考慮すると時間的な制約があったが、基礎的な重要なデータがプロジェクト終了間際に発表できた。投入した研究費の少なさを考慮すると、終了時点での成果は大きい。また参加以前の ATP の自由エネルギー制御の手法なども用いて研究継続中である。この分野の中で特異な視点からの研究で今後の進展に大きな期待が持てる。

3 - 2. 各グループの研究成果

一分子工学グループ(浜松ホトニクス(株)筑波研究所)

F_1 -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証を目標とした。ATP 合成の検出にはルシフェリン-ルシフェラーゼの発光による ATP の検出法を用いた。微量の発光の検出のために二つの実験系を開発した。1つは、SH-シランコートしたガラス基盤に Ni-NTA 修飾部位を格子状に配置し、その上でシリコンゴムでチャンバーを製作しリキッドバラフィンを満たし、その中にマイクロピペットで反応液を注入し微小液滴チェンバーを作る方法を開発した。もう1つは3 μ m 厚の薄いチャンバーで多くの F_1 -ATPase による合成を計測する方法を開発した。そのうえで、浜松ホトニクス(株)の技術部門の協力により市販の10倍の感度の超高感度光検出器を開発して計測に用いた。 F_1 -ATPase へのトルク印加は、ガラス基盤に固定した F_1 -ATPase の回転子にあたるサブユニットに磁気ビーズをつけ、外部の回転磁場によった。ATP 分解で発生するトルクの向きと反対の

サブユニットの回転で ATP の合成が確認された。これにより、 F_1F_0 -ATPase の ATP 合成反応は力学的な仕事による事が証明された。この実験の為には分子操作、光検出、プローブの選別、微細加工技術などの困難な周辺技術の新規開発が必要であったが、これらの技術はこの課題の目標であるソフトナノマシンシステムの創製に不可欠であり、この仕事により大きく実現に近づいた。合成確認の発表後もナノメートルサイズの物体の、形状や物性によるソーティングシステムの開発、赤外フェムト秒パルスレーザーを用いた光硬化性樹脂を用いた微小チャンバーの製作技術をこのグループで開発している。

一分子生理グループ(早稲田大学理工学部木下研究室)

F_1 -ATPase による ATP 分解に共役して サブユニットが回転するが、ATP 合成同様、このメカニズムは分っていない。課題は有効なソフトナノマシンの創製であるが、 F_1F_0 -ATPase のメカニズムの研究をこのグループで行った。

これまでの研究では nM オーダーから μM までは、加水分解速度や回転速度は、ATP 濃度に比例し、 F_1 -ATPase には一定の結合定数で ATP が結合することが分かっていた。今回、 nM 以下の極低濃度 (ATP は 1 個しか結合しない濃度領域と考えられている) の ATP 濃度における回転アッセイにより、 F_1 -ATPase の加水分解および回転挙動は、極低濃度 (200 pM) から高濃度領域まで、1 つのメカニズムで行われていることが明らかになった。

ATP 分解の場合、サブユニットの角度に応じた ATP 結合サイトの化学的状態の対応を明らかにした。ATP 1 分子の加水分解で起こる 120° のステップは、 80° と 40° のサブステップに分解されて、最初の 80° のサブステップは、ATP の結合で、そして、続く 40° のサブステップは、ADP あるいは、 P_i の放出が関わっていると考えられていた。高速カメラを用いた回転アッセイ法による実験で、 40° のサブステップは、 P_i の放出で引き起こされることが明らかになった。 40° のサブステップは、活性部位の P_i の親和性を減少させるのである。また、蛍光性の ATP アナログである Cy3-ATP を用いた実験により、 0° で結合した Cy3-ATP は、 240° の間、活性部位にとどまって、Cy3-ADP となって放出されることを示した。回転により ADP の親和性が減少すること、即ち、ATP の結合と ADP の放出は回転の駆動力の一部であることを示したのである。これらの結果により、3 つの活性部位での ATP の加水分解と回転の関係をほぼ完璧に示すことができた。

F_1 -ATPase は 3×3 の作るリングに回転子の サブユニットが奥深く突き刺さっている。加水分解時には、3 つの サブユニット上の結合サイトで次々に起こる ATP の結合-分解-解離に対応した 3×3 の構造変化が サブユニットを回転させるというプッシュプルモデルが考えられている。しかし熱的に揺らいでいると考えられる 3×3 の構造変化で自由エネルギーの回転運動への高い効率での変換が可能であるかという疑問がある。そこでトルク発生に必要な サブユニットの領域を限定するため サブユニットの C 端、N 端を削除した種々のミュータントを作成して、加水分解能の計測および回転アッセイを行った。驚いたことに陥入部分の殆どがないものでも回転した。20 nM から 2 mM の ATP 濃度範囲で、溶液中での活性測定の減少は見られたが、トルクは、50%の減少、ATP の結合速度は 70%の減少を示した程度であり、ATP の加水分解活性、あるいは、それに伴う サブユニットの回転が観測されたのである。このことは、現在提案されているプッシュプルモデルに変わるメカニズムの提案を行う必要があることを示唆している。

分子操作応用実験グループ(中央大学理工学部宗行研究室)

F_1F_0 -ATPase は自由エネルギー変換の分子機械であり、変換前後の入出力関係を明らかにする事は重要な研究テーマである。この点、この分子機械の研究の分野が長く生化学の共役酵素としてであった経緯もありおろそかにされてきた。このグループをプロジェクトに加えたについてはその補強の意図があった。回転磁場による合成系ではトルク、すなわち投入した仕事についての議論はできないからである。このグループは参加以前から加水分解時、入力とみなされる ATP の自由エネルギーを基質濃度で制御した研究を行ってお

り、出力としてのトルクの制御ができれば入出力関係の議論が可能になる。そこでこのグループでは回転電場による誘起双極子モーメントの受ける力を用いたトルク印加のシステムを使い、入出力関係の研究を行った。その結果、 F_1 -ATPase がステップ回転するとき、トルクは

- 1) ATP 結合待ちの時間を指数関数的に変化させる。
- 2) ステップ運動時の角速度をほぼ直線的に変化させる。

という二点が明らかになった。1) から、ATP 結合からステップ回転の開始に至る遷移状態は ATP 結合をまっている位置から約 6.5° 加水分解方向に サブユニットが回転したところにあることが推定できる。また2) の結果から外部トルク依存性を直線外挿することによって最大トルクを見積もることができ、同時に F_1 -ATPase の内部摩擦に当たる値を見積もられるが、この値はかなり大きく、無負荷状態の F_1 -ATPase の回転速度を説明できない。おそらく、ポテンシャルの傾斜は一定ではなく、最大傾きの部分を実験結果は反映していると考えられる。また、野生型が容易に逆回転しないという事実は、この分子機械の化学反応過程(ATPase 反応)と力学過程(回転運動)が、タイトにカップルしていることを示しているが、GT 変異体では逆回転をしやすにも拘わらず、外部トルクがない条件では良く回転するという事実は、化学過程と力学過程のタイトなカップルは回転運動が起こることに必ずしも必要でないことを示しているものと考えられる。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

外部発表件数

論文発表		著作物		招待講演		口頭発表		ポスター発表		特許	
国内	国際	国内	国際	国内	海外	国内	海外	国内	国際	国内	国際
0	16	6	1	8	16	16	3	23	18	1	0

この課題の目標である ATP 合成の成果は2004年に Nature 誌に発表されたものである。これは合成の実証という学問上の成果として多くの新聞にも取り上げられ大きな反響があったが、その為に関与された分子操作、光検出、プローブの選別、微細加工の技術はこの分野の成果をナノテクノロジーとして生物機能を利用する上で必須のものである。代表者は浜松ホトニクス所属であり、この対象の工学的利用に重点をおいている。この研究分野は1997年にこの課題の共同研究者でもある木下一彦氏の研究で生物物理学として一分子計測の対象となった。このグループでは主に運動蛋白質としてのメカニズム解明を目指しており、多くの優れた成果を出している。この課題としての研究では、 F_1 -ATPase の ATP 加水分解過程と回転運動との対応を、ヌクレオチド結合と運動状態を一分子レベルでの同時計測により詳細に明らかにした(Cell 2007)。また、第50回米国生物物理学会(2006年2月)での National Recture をはじめ多くの学会からの招待講演が多数ある。最近、これまで考えられているトルク発生のメカニズムを覆す仕事がこのグループでなされた。現在投稿中である。平成 17 年 4 月から遅れて参加した分子操作応用実験グループ(中央大学理工学部宗行研究室)からは参加以前からのテーマであった ATP 加水分解の自由エネルギーを制御した研究は発表されている。これは運動蛋白質としての入力側にあたるものである。出力であるトルクの制御についての上述の成果は現在論文として投稿中である。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

F_1F_0 -ATPase の研究はもともこの課題の代表者、共同研究者達のグループで、1986年に ATP 加水分解に伴う酵素内の回転運動を直接映像として見せた事に始まる。その後この研究はこれらの日本のグループが世界をリードして成果を挙げている分野であり、ここで発表された上記の論文はどれも学問的には世界的に非常に高い水準にある。その中で、代表者は、将来人工の「ソフトナノマシン」を工業的に利用することを目指した基礎技術の開発のためのモデル系としてこの酵素の研究を行った。生物の分子機械はナノメートル、ピコニュートン

のスケールであり、医療においてもエネルギー問題においても応用が進みつつある生物機能を利用する基礎技術として、日本で培われた一分子計測、一分子工学が果たす役割は非常に大きい。この課題の成果は、学問的な問題に偏ったこの分野の研究のなかで特異な位置を占め、将来期待される技術への貢献は大きい。

4 - 3 . その他の特記事項

本課題の目標である、回転による ATP 合成の実証の発表ではその成果が日本経済新聞社のまとめたその年度の「技術トレンド調査」の一位に取り上げられるなど、多くの新聞に掲載され話題となった。