

「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

(浜松ホトニクス株式会社筑波研究所 主任部員)

「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 という分子モーターに注目した。我々が知るかぎり、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。研究実施の成果の一つとして、これを実際に証明して見せたことはすでに報告済みである。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モーターシステムのモデルを提案したいと考えている。

2. 研究実施内容

一分子工学（浜松ホトニクス（株）筑波研究所内）グループにおいては、一分子レベルの分子モーターあるいは分子モーターシステムの観測・操作に適したチャンバーの開発、および、プローブの探索に主眼をおいている。平成 17 年度より、浜松ホトニクス（株）筑波研究所内に自前のチャンバー製作機を開発するべく、研究設備を立ち上げた。実験設備の導入もほぼ終了し、製作機の開発やプローブの探索に着手することができるようになった。他の研究グループにおいて行われている分子モーター操作・観測法の開発を支援するばかりでなく、新しい分子モーターの取り扱いにも着手していきたいと考えている。チ

ランバー材料の取り扱い方法、プローブである磁性ビーズの精製方法に関して新しい知見が得られ始めている。遠心フィルター、あるいは、セルソーターの利用などが、均一なプラスチックビーズを得るためには簡便で良い方法のようだが、どちらの方法にも一長一短がある。一分子生理学グループ（早稲田大理工木下研究室）においては、回転と活性部位における化学反応の連携を明らかにするため、(磁気)ビーズにより回転を観察ないし制御しながら、蛍光性 ATP アナログの結合・解離を観察している。回転子 γ の固定子にもぐり込んだ先端部分を大きく削除してもトルクが出るという、まったく予想外の結果が得られた。すでに報告済みの強制的な逆回転による ATP 合成実験の詳細を調べるために、ATP 合成の基質となる ADP 濃度、および、 P_i 濃度依存性、あるいは、合成の回転速度依存性の研究は継続している。また、分子モーターシステムとして、 F_1 -ATPase の回転子同士を向かい合わせて結合し、共同的に回転させるという「おもちゃ造り」も開始した。タンデム配置の F_1 -ATPase は、複雑な回転挙動を見せている。平成 17 年度よりプロジェクトに参加した分子操作応用実験グループ（中央大理工宗行研究室）においては、トルクの直接測定により、回転力を発生するポテンシャルを明らかにすることを目的とした研究システムを立ち上げ始めている。具体的には、誘電泳動回転電場により、回転の目印であるプラスチックビーズの回転方向に直接外力を印加して、その応答を計測しようとするものである。いまのところ、複雑な F_1 -ATPase の応答が解析を困難にしているが、モーターシステム自体がいわゆる「ソフト」なシステムであることを示唆しているのではないかと考え操作・計測システムの開発を継続している。

3. 研究実施体制

一分子工学研究グループ

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

一分子生理研究グループ

- ①研究分担グループ長：木下 一彦（早稲田大学 理工学部物理学科、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

分子操作応用実験グループ

- ①研究分担グループ長：宗行 英朗（中央大学理工学部物理学科、助教授）
- ②研究項目：回転分子モーターのポテンシャル分布計測

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Yoko Hirono-Hara, Koji Ishizuka, Kazuhiko Kinoshita, Jr., Masasuke Yoshida, and

Hiroyuki Noji

“Activation of pausing F_1 motor by external force”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 (2005) 4288-4293

- Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Kazuhiko Kinosita, Jr., and Masasuke Yoshida
“ATP-driven stepwise rotation of F_0F_1 -ATP synthase”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 (2005) 1333-1338.

- Shimabukuro K, Muneyuki E, Yoshida M.

“An Alternative Reaction Pathway of F_1 -ATPase Suggested by Rotation without $80^\circ / 40^\circ$ Substeps of a Sluggish Mutant at Low ATP.”

Biophys. J. 90 (3), 1028-1032, (2006)

- Bandyopadhyay, S., Muneyuki, E., Allison, W. S.

“The Characteristics of the $(\alpha V^{371}C)_3(\beta R^{337}C)_3\gamma$ Double Mutant Subcomplex of the TF_1 -ATPase Indicate that the Catalytic Site at the α_{TP} - β_{TP} Interface with Bound MgADP in Crystal Structures of MF_1 Represents a Catalytic Site Containing Inhibitory MgADP.”

Biochemistry 44 (7), 2441-2448, (2005)

- Sakaki N, Shimo-Kon R, Adachi K, Itoh H, Furuike S, Muneyuki E, Yoshida M, and Kinosita K. Jr.

“One Rotary Mechanism for F_1 -ATPase over ATP Concentrations from Millimolar down to Nanomolar.”

Biophys J. 88 (3), 2047-2058, (2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)