

「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 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

生体内には、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、**F₁-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？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。**ATP** 合成は、**ATP** 加水分解の逆反応（あるいは一部）と考えられているが、それでは、実態はどうなのだろうか？両者を比較しながらこの分子モーターの働くメカニズムを明らかにしたいと考えている。3つの研究グループで、それぞれの得意分野で特徴を生かしながら連携し、研究を続けている。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。

伊藤 G（浜松ホトニクス（株）筑波研究所）では、合成検出の精度を向上させるためのシステムの改良を続けている。1分子モーターの操作・検出を目的としたチャンバーを製作するための微細加工装置を開発し、汎用性を図っている。また、人工モーターシステムのモデルを提案した。木下 G（早稲田大学理工）では、蛍光性 **ATP** の一分子観測と、回転のローターである γ サブユニットの操作により、分解と回転のキネティクスの詳細を明らかにしたほか、 γ とステーターの物理的な相互作用を制御し、トルク発生のメカニズムの

解明に迫りつつある。宗行 G（中央大理工）では、回転駆動力の自由エネルギーと負荷の同時制御システムの開発により、F₁-ATPase の回転メカニズムの解明をめざしている。

2. 研究実施内容

伊藤 G では、強制的な逆回転による ATP 合成の操作・観測システムの汎用化を図っている。分解方向の回転アッセイで推定していたこの分子モーターの働く仕組みの詳細を、両面からの解析により明らかにできるからである。合成実験成功の報告時には、計測の精度の見積もりが最大の問題であった。取っ手となる磁性ビーズの均一性（大きさ、磁性）、チャンバーの大きさの高精度の制御、系に混入する ATP（F₁-ATPase 以外の ATP 合成酵素かもしれない）の排除などであり、支援技術として開発を続けている。また、上記したチャンバー作成の精度の向上にも関連しているが、3次元 CAD データー（パソコン上で描写）を元にして、自在にチャンバーを構築（描写分解能：サブマイクロメートル）するために、微細加工システムの開発を行っている。フェムト秒パルスレーザーの二光子吸収を利用し、光硬化性樹脂中を 3次元走査することにより達成する。基本的なシステムは完成し、一見、3次元 CAD 通りの樹脂の硬化できるようになっている。構築物の精度、生体試料との親和性、耐久性の評価を開始したい。また、分子モーターシステムのモデルとして、 γ サブユニットの遺伝子改変部分を利用したタンデムシステム（ γ の先端同士をストレプトアビジンを介して接合）を製作し、回転アッセイ法によるこの分子の回転特性評価を開始した。これまでに開発された様々なミュータントを組み合わせることにより、新しい特性を発揮できると期待しているからである。

木下 G では、蛍光性 ATP の結合・解離の 1分子観測技術に加えて、外部からの磁場により γ サブユニットの角度を制御することにより、回転と ATP 分解のキネティクスの詳細を検討した。この研究では、サブステップの 1つである、ATP の結合（80~90°）に引き続く、40° の回転が、ATP の加水分解の代謝物であるリン酸の放出により駆動されることを世界ではじめて明らかにしたことは特筆される。また、これまで、 γ サブユニットのトルク発生のために必要であると考えられていた C サブユニット（ステーター部に深く突き刺さっている部分）を削除しても ATP の加水分解能力は 10%程度に低減するものの、トルクは 50%程度保持していることを明らかにした。トルク発生の新しい機構を提案できることを期待している。

宗行 G では、回転の駆動力である自由エネルギーと負荷の同時制御システムの開発により、F₁-ATPase の回転メカニズムの解明を目指している。これまでに、入力である自由エネルギーの制御により、ステップ動作の詳細を解析し、自由エネルギーの効果は、駆動される力学系の個々のステップ動作には影響せず、ステップ動作の頻度の増減として現れることを明らかにした。また、外部からの静電場（誘電泳動）により、 γ サブユニットに取り付けたプラスチックビーズに時間・空間的にほぼ均一な外部トルクをかけて、その応答を観察する研究を続行した。現在はステップ回転が観察できる条件下で外部トルクとステッ

プ時の角速度，ステップ間の dwell time の統計的な解析を行っている。

3. 研究実施体制

(1) 一分子工学グループ

①研究者名

伊藤 博康 (浜松ホトニクス(株)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

(2) 一分子生理グループ

①研究者名

木下 一彦 (早稲田大学理工学術院物理学科 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

(3) 分子操作応用実験グループ

①研究者名

宗行 英朗 (中央大学理工学部 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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasushi Maki, Kengo Adachi, M. Yusuf Ali, Mominul Huq, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinoshita Jr.
“The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F₁-ATPase is dispensable for torque generation”
Biophys J., 90 (2006) 4195-4203
- Yukihiro Sugiyama, Yuji Inoue, Eiro Muneyuki, Hajime Haneda and Masayuki Fujimoto
“AFM and TEM observations of a helix to β sheet conformational change occurring on carbon nanotubes.”
J. Electron Microsc., 55 (2006) 143-149
- Matsumoto Y, Muneyuki E, Fujita D, Sakamoto K, Miyoshi H, Yoshida M, Mogi T.
“Kinetic mechanism of quinol oxidation by cytochrome bd studied with

ubiquinone-2 analogs.”

J. Biochem., 139 (2006) 779-88

- Muneyuki E, Watanabe-Nakayama T, Suzuki T, Yoshida M, Nishizaka T, Noji H
“Single Molecule Energetics of F1-ATPase Motor.”
Biophys J, 92 (2007)1806-12

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:1 件)