

戦略的創造研究推進事業  
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の  
構築と利用」

研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

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)

## 1 研究実施の概要

### < 研究構想 >

我々の体の中には、RNA やタンパク質でできた機械がある。人が作った機械のように1個でも立派に働くので分子機械と呼ばれるのだが、人が作った機械とは働く仕組みが少しちがっている。ブラウン運動を積極的に利用しているようであるし、働きは確率的である。最近では、アミノ酸配列の相同性や構造から機能を予測するという試みもあるが、分子機械そのもの、あるいは、その働きは、生体内で働いているときに発見される。「サイエンス」の研究対象は、その働く仕組みを理解しようとするものであった。一方で、従来のモルオーダーのアンサンブルの計測ではなく、1個1個の分子機械の働いている現場を直接光学顕微鏡下で見て、操作することを研究手段とする分野(一分子生理学)が成果を出し始めた。操作の対象である分子機械1個1個が、顕微鏡下で出てきたのである。分子機械には、化学エネルギーを力学エネルギーに直接変換する「仕掛け」があって、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もっていると信じられてきた。一分子生理学の手法で見ることができるようになった分子機械に、直接、力を加えて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創製の可能性が現実のものとなりつつあるのではないかと期待している。アミノ酸や核酸の配列が、機能をもった構造物(ソフトナノマシン)を構築するのは、生物の進化のなかで取得した「知恵」である。我々は、生体分子の「知恵」を借りてちょっと「ずる」をしてナノデバイスを造ってみようと思った。分子機械に、「力づくで、しかも、自在に化学反応を逆行させる」ことを人工的に実現させ、我々の生活に役立つ道具として用いてみたいと思ったのである。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た。

我々の考えるナノデバイスを、そのまま、実用化、あるいは、工業化することを考えるのには現在の知識では無理があるかも知れないが、生命科学に限らず、化学、医療診断、検査、広い意味での分析や、場合によっては合成などにいたるまで、1個とはいわないまでも、勘定できる数の分子を扱う手法(一分子工学)が主役になるものと予想できる。おそらく、徐々にマクロなシステムを小さくするのではなく、文字通り一気に飛躍する可能性が高い。我々のプロジェクトは、近い将来の技術革新に備えた先行の技術による先導になると期待している。

本研究では、まず、 $F_1$ -ATPase(アデノシン三リン酸分解酵素)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ATP合成酵素の部品として働くこの分子機械は、生体から取り出すと、ATPの加水分解のエネルギーを使って と呼ばれるサブユニットを回転させる。 $F_1$ -ATPase が回転分子モーターであることは、 $F_1$ -ATPase の向きを揃えてガラス基盤に並べ、ローターと考えられていた サブユニットに大きな目印をつける光学顕微鏡観測技術の開発により、容易に確認できるようになった(回転アッセイ法)。生体内ではプロトンの濃度勾配を感じて  $F_1$ -ATPase に駆動力を伝える  $F_0$  という膜内在性のタンパク質と対になって存在している。 $F_1$ -ATPase の サブユニットは、 $F_0$  部分との共通のローターであり、 $F_0$  が サブユニットを逆回転させることにより ATP が合成されると信じられていた。これが事実だとすれば、先ほどの大きな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？これを証明して見せよう、実現させてやろう、というのが本研究が、まず最初に取り組んだ課題である。生体内でこのモーターを逆回転させるには(ヒトを含む動物の場合)、呼吸により得た酸素で食物を酸化して得られるエネルギーを使うが、これには細胞が必要である。本研究では、精製したモーターに直接回転力を加えて ATP の合成を試みた。ATP は高エネルギー化学物質であり、貯蔵も可能である。この研究で合成できる ATP が人類のエネルギー問題を解決すると言ったら飛躍しすぎだが、エネルギー創製や保存の新しい概念を提案できるのではないかと考えたのである。また、他のナノマシンと組み合わせ、力で駆動させる  $F_1$ -ATPase が産生する ATP をエネルギー源とする分子デバイスを駆動させるといった、ソフトナノマシンシステムの設計図ぐらい、このプロジェクトの成果として描いてみたいと考えたのである。

### < 研究の実施 >

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、ATPの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個である。この少ないATPをどのように検出するかが問題であった。操作法の開発・検出法の開発といった技術的な問題の解決を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。さらには、ソフトナノマシンシステムの設計のための研究を開始した。分子操作システム・光検出システムの開発には、浜松ホトニクスの技術者の協力もあった。そもそも、ガラス基盤に固定した(回転による方向を決定するために) $F_1$ -ATPaseを無理矢理に回転できるのか?この操作で $F_1$ -ATPaseが壊れることがないのかといった $F_1$ -ATPase側の問題、あるいは、合成のメカニズムに残された問題(実際には、回転のメカニズムの解明)の解決に、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。幸運にも、プロジェクトの前半で合成の実証ができてしまった。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。 $F_1$ -ATPaseの反応軸方向のポテンシャル計測をめざし、回転電場法という回転モーターの操作方法や解析方法の開発を目標として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月より参加した。

### < 研究の成果 >

一分子工学グループの最大の研究成果は、 $F_1$ -ATPaseの強制的な逆回転によるATPの合成を実証したことである。合成の場合も、加水分解同様に最小のサブユニット群は $\gamma_3\delta_3$ の7つであり、3Hzの回転で、 $F_1$ -ATPaseあたり、約6個のATPを合成したと見積もることができた。この数の見積もりは、分解による回転のメカニズムから予想される見積もりよりも少ない。溶液に添加したADP(アデノシン二リン酸)、あるいは、 $P_i$ (無機リン酸)の量が最適でなかった可能性もある。さらに、合成のメカニズムを明らかにするための測定精度の向上を図っている。具体的には、回転の取っ手となる磁性ビーズの精製法の開発、光検出器の感度向上に関わる研究開発である。合成実証実験を妨害したのは、素性のわからないATP合成酵素の混入であった。合成ATPの数の見積もりと同様の補正実験により、溶液中には常に1 nM程度のATPの混入が認められた。この条件では、 $F_1$ -ATPaseはむしろATPを分解して合成とは逆方向に回転したが方向に平衡は傾いていたのである。すなわち、文字通り力づくで、逆回転した結果、 $F_1$ -ATPaseはATPを合成したのである。一分子工学グループの研究支援に対する戦略は、合成のメカニズムの詳細を明らかにするために必要な、操作や観測の精度の向上に修正して継続することになった。成果が目に見えない地道な研究であるが、ポストドク、および、技術補助員が努力してくれた。磁性ビーズの大きさの分布の不確かさは、強制的な逆回転時に、 $F_1$ -ATPaseが合成するATPの数を見積もる際の深刻な問題であった。セルソーターの弁別能のうち、大きさに依存した前方散乱強度によるソーティングは、磁性分布までは検証できていないものの、分子操作にとって都合のよい磁性ビーズの精製に有効であった。しかし、市販の装置を用いている現状では、セルソーターの利用は現実的でないことが分かり改良を続ける予定である。磁性ビーズメーカーが、良質な試料を提供してくれれば問題がない話であることを前提としても、今後、分子機械の操作、あるいは、働きの目印となるような構造物の製作を行う場には必要な技術になると考えている。製作方法が、ボトムアップの方法であったとしても、サブ $\mu\text{m}$ オーダーの構造物の弁別法の開発は必要であり、この方法の利点、あるいは、欠点に対して有用な情報を得ることができた。フェムト秒レーザーを用いた微細加工技術の開発に関しては、MEMS(Micro Electro Mechanical System)による従来法と組み合わせる用いることが有効であり、一段飛躍して、我々が次のターゲットとして考えている膜タンパク質研究を目指した開発を継続させたい。

一分子生理グループの研究成果は、 $F_1$ -ATPaseは、広い濃度範囲のATPで、1つのメカニズムで回転することにより、加水分解時に何個の核酸が $F_1$ -ATPaseに結合しているのか?3個の活性部位(サブユニット)をもつ $F_1$ -ATPaseは、1回転あたり3個のATPを消費して回転するステップモーターであるが、すでに、ATPの結合を駆動力とする $80^\circ \sim 90^\circ$ のサブステップがあることが明

らかにされている。それでは、残りの  $40^\circ$  のサブステップは酵素内部のどのような反応が駆動力なのだろうか？また、サブユニットの遺伝子工学的な改変により、現在広く信じられているプッシュプルモデルが正しいのか？といった問題に疑問符を投げかけた。ATP の加水分解と回転のキネティクスにはほぼ終止符を打つための重要な課題である。

分子操作応用実験グループでは、回転分子モーターの回転軸方向のポテンシャル計測法の開発に取り組み、回転電場法の有効性を示した。ステップ運動の知見の蓄積された  $F_1$ -ATPase に印加される外部トルクを定量的に評価することにより、分子モーターの性質をより詳しく明らかに出来た。

## 2 研究構想及び実施体制

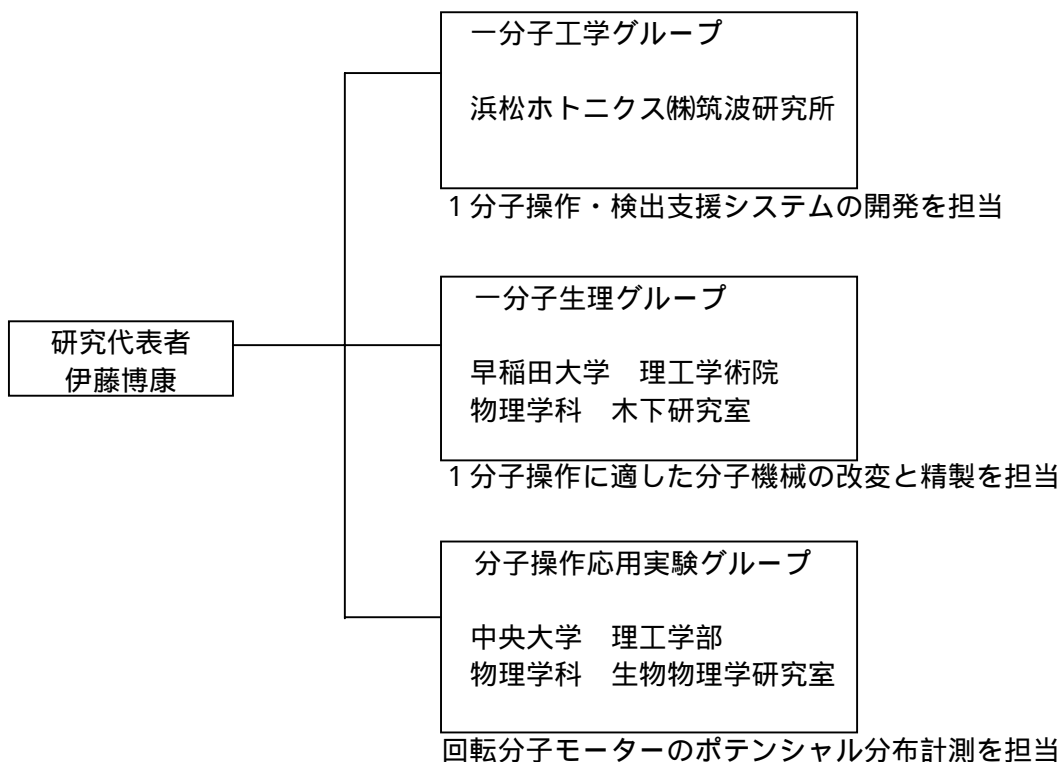
### (1) 研究構想

分子機械を利用したソフトナノマシンシステムを作り出したい、あるいは、プロジェクト期間中に達成が無理であったとしても、設計図ぐらいいは描いてみたいという希望があった。大量生産可能で、しかも、効率よく働く分子機械の働く現場を眺めていれば、分子機械の働くメカニズムの解明もさることながら、是非、実際に我々の生活に役に立つ道具として用いたいと思うのは自然の流れであると思う。問題は、分子機械の働きに確率的な面があることである。それが利用の際の欠点であれば、人為的な操作により働きを制御すれば問題の解決になるかもしれない。分子機械の制御には、人為的な操作による機能発現の実証が必要であり、ともかく、 $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証を第一課題とした。結果的には、プロジェクトの中盤で、幸運にも合成を実証できたのであるが、合成のメカニズムの詳細を明らかにするために、操作法、および、測定精度の向上を図るための改良、さらには、汎用化に向けて研究を継続する必要があることがわかり、光学的に磁性ビーズを選別する技術は、基本的な原理から改良が必要であることがわかり、ナノサイエンスの発展のためにも開発の必要性を認識した。研究室内で、オンデマンドに構造を構築出来る技術として、フェムト秒レーザーを基本とした微細加工技術の開発を進めた。おそらく一分子生理の分野は、分子機械の範疇を膜タンパク質にまで発展するものと考えている。膜タンパク質は、創薬研究の 50% のターゲットとなっており、近い将来の医療・創薬開発への貢献が期待大であると考えた。微細加工技術は、人工脂質膜の構築を目指す方向へと変更した。

$F_1$ -ATPase の働きは、ATP の加水分解機能でよく調べられている。 $F_1$ -ATPase 単独では ( $F_0$  が無い場合には)、合成実験が技術的に不可能であったこともあり、加水分解の挙動から得られた知見から、合成方向の働きは推定されていた。合成反応を、加水分解の逆反応と考えれば、合成を効率よく行うためには、加水分解挙動についてもよく理解しなければならない。人為的な分子機械の操作は、単に分子機械に摂動を与えるのではなく、分子機械の未知の機能も引き出す可能性もある。事実、一分子観測に操作技術を巧みに組み合わせた技術開発により、 $F_1$ -ATPase の加水分解と回転運動の挙動においては、リン酸放出が  $40^\circ$  サブステップの駆動力であることが明らかになった。 $80^\circ$  のサブステップが、ATP の結合と親和性の増加によるものという知見に加えて、加水分解と回転の挙動が明らかにされたわけであるが、合成方向の挙動に関しては今後の課題である。静電場による回転分子モーターの特性評価法の開発もこの研究の目標となった。ローターである

サブユニットの遺伝子工学的な改変は、提案されているトルク発生もでるに疑問符を投げかけることになった。おそらく研究の発展により、新しいモデルの提案、実証が可能になるものと考えている。

## (2)実施体制



## 3 研究実施内容及び成果

### 3.1 1分子操作・検出支援システムの開発(浜松ホトニクス(株)筑波研究所 一分子工学グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

一分子工学グループの目標は、分子機械に無理矢理力を加えて逆反応を行わせる、すなわち、人工的な「力学エネルギー→化学エネルギー」変換システム構築の可能性を実証することである。また、それと平行して、支援技術の整備・開発を行い、さらに、それらの技術を発展させて、将来のソフトナノマシンシステムの設計まで進みたいと考えていた。具体的には  $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証を試みた。この目標達成のために、グループメンバーの他、一分子生理グループ、および、浜松ホトニクス事業部の技術者の協力も得た。

$F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証  $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成実証のアイデアは単純である。野地・安田が開発した手法(回転アッセイ法: 1個1個の  $F_1$ -ATPase を向きをそろえてガラス基盤に固定し、ローターに大きな目印を取り付ける)を少し改変すればよいはずであった(図1)。目印(プローブ、この場合は蛍光性アクチンフィラメント)を操作のための取っ手(磁性ビーズ)に取り替え、外部から回転磁場を印加して、ATP の加水分解とは逆方向に回転させる。溶液中には、ATP の代わりに、ADP と Pi を加えておくのであるが、合成された ATP を検出するために、蛍(ほたる)由来のルシフェリン・ルシフェラーゼ化学発光システムもあらかじめ加えておく。ルシフェリン・ルシフェラーゼは、ATP1個を AMP まで分解し、光子を1個放出すると考えられているので、その光子を光検出器で検出すればよい。

1分子計測(一分子生理学)の分野の成功の秘訣は、まず、「見たい分子機械の動き」を上手に心に思い描くことである(もちろん、研究者に絵心があってもなくても、紙の上に絵を残しておくことは重要である)。「このように見えたらいいな、見たい!」という描画に従って、分子機械の固定法を設計し、目印を取り付けるのである。それでも、分子機械が、体の中にある時と同じように働くのは、ほとんど偶然であることも付け加えておかなければならない。その幸運に恵まれたものだけが、新しい分子機械の観測・操作に成功する。我々もこの方式に従ったのである。下絵は、回転アッセイ法でできあがっていた。しかし、そもそも、 $F_1$ -ATPase のローターである サブユニットをどのように捕まえて連続的に逆回転するか? 人為的に逆回転しても  $F_1$ -ATPase は壊れないのか? といった諸問題を、試行錯誤しながら解決しなければならなかった。合成実験の難しさは、合成が分解と同じメカニズム(分解の逆反応)で起こるとすれば、1回転あたり期待される ATP の数はたった 3 個であることにある。数少ない ATP をどのような方法で検出するのかといった難しい問題を解決しなければならなかった。

ATP 合成実験用の超高感度光検出器を開発(市販のもの 10 倍の感度)した他、回転磁気ピンセット(当時は様々な理由で報告がなかった)の開発(図2)、そして、固定用のガラス基盤を開発した。 $F_1$ -ATPase 側も、ストレプトアビジンコートした磁性ビーズがしっかりとサブユニットに取り付けることができるように、それまでの回転アッセイで用いられていたモノファンクションのものからバイファンクションのものに改変した(一分子生理学グループの協力による)。

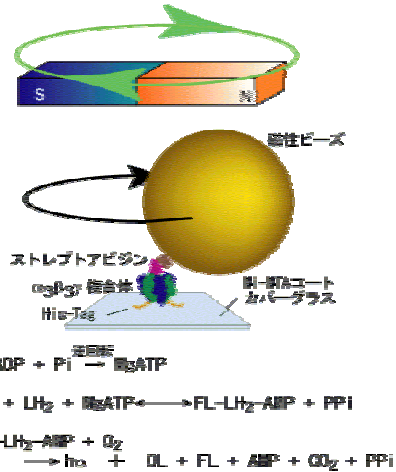


図 1  $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成実証の概略図。FL:ルシフェラーゼ。FL<sub>2</sub>:ルシフェリン。

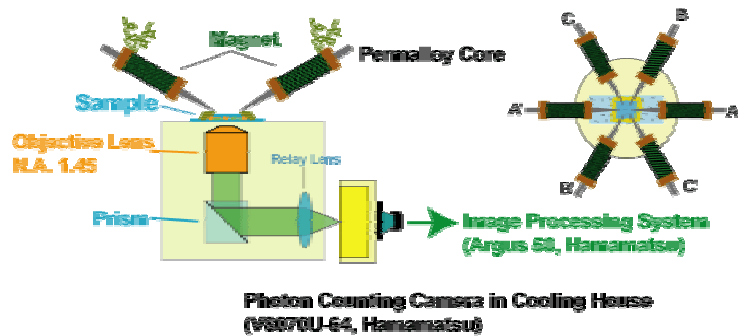


図 2 合成のための分子機械操作・計測装置の概略図(Itoh et al, Nature)。高 NA 対物レンズで、効率よくルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光光子を集め、縮小光学系を介して単一光子計数型カメラで検出する。光検出器部分は近接型のイメージングintensifier。可視光域での量子収率高い GaAsP 光電面を備えていて、光電子増倍部には、2枚の2段の MCP を設置し単一光子計数域の高ゲインが得られる。出力蛍光面と読み出し用の CCD カメラは、テーバー型のファイバーによりカップルし、変換効率を向上させている。右図は、回転磁気ピンセット装置。向かい合った対になったコイルに順次電流を印加して、回転磁場を発生させる。

蛍(ほたる)由来のルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光は、様々な分野で利用されている高感度の ATP 検出法である。ATP の定量化の際に、もっとも深刻な問題となったのは、素性の分からない  $F_1$ -ATPase 以外の ATP 合成酵素であった。合成実験の際に約 1nM 程度の ATP が常に試料溶液中に存在し、ルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光のバックグラウンドとなった。最初、アデニレートカイネースの混入を疑い、阻害剤と知られる Ap5A

を添加した。しかし、効果は見られなかった(むしろ、バックグラウンドは増加した)。この問題の克服のために、まず、 $F_1$ -ATPase 1個あたりのバックグラウンドを低減させる方法の検討を行った(図3)。つまり、 $F_1$ -ATPase あたりの溶液量を減らす方法である。まず、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た(各部位の直径は、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $4 \times 4$ )。さらに、このガラス基盤とシリコンゴムでチャンバーを製作しリキッドパラフィンを満たす。Ni-NTA 修飾は、サブユニットに伸長した His-TAG を利用して、 $F_1$ -ATPase の向きをそろえて吸着する目的もあるが、本来、シランコートにより疎水的な表面に改変されたガラス表面に形成された比較的親水的な領域は、微小液滴の操作と安定化に役立った。マイクロピペットを駆使して、 $F_1$ -ATPase 溶液、磁性ビーズ、ルシフェリン・ルシフェラーズの環流を行って、合成システムを製作する。実験結果の一例を図3に示す。

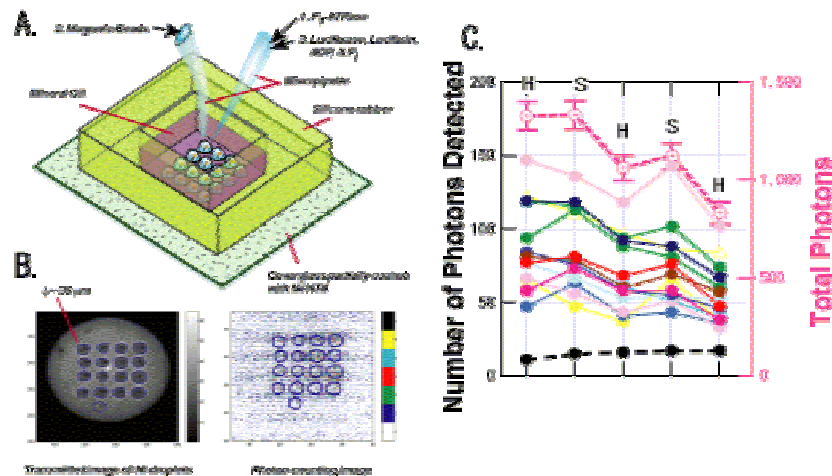


図3 微小液滴を用いた合成実験の模式図と結果。A:マイクロピペットによる微小液滴操作の概略。図に示された番号の順番で試料溶液を環流する。B:微小液滴の透過光像と、単一光子蓄積像。C:各微小液滴領域からの光子の積算画像。H:加水分解方向、S:合成方向に回転磁場を連続して印加して5分間積算。縦軸(左)は、各液滴からの光子数。右軸は、图中ピンクで示した各プロットの総和。は、液滴以外の領域からの光子数(光検出器のバックグラウンド)。あらかじめリキッドパラフィン、酸素と水を飽和させているが、時間とともに容積が減少していった。グラフが右下がりになっているのは、そのためと考えている。16個の液滴のうち14個が、合成を期待するパターン(H-S-H-S-Hの場合M型)を示しているが、偶然がこのパターンを作る確率は $2 \times 10^{-11}$ !

この実験は、困難を極める実験で、達成率も低かった。引き続き、溶液中の  $F_1$ -ATPase の数を増やすという方法に戦略を変換して実験を継続した。図4に、合成実験用に開発した薄いチャンバーの模式図を示す。スペーサーに  $3\ \mu\text{m}$  のビーズを用いている。視野 ( $1 \times 10^5\ \mu\text{m}^2$ ) に 500 個程度の  $F_1$ -ATPase が強制的な逆回転による ATP 合成に参加していたと考えている。高濃度の  $F_1$ -ATPase や磁性ビーズを用いたため、チャンバーの天井部分にも約 20% の  $F_1$ -ATPase が存在していることを確認した。天井の  $F_1$ -ATPase は、コントロール実験として底面のビーズを加水分解方向に回転させた場合には、合成していることになり、合成された ATP の数を見積もる際には補正する必要があった。

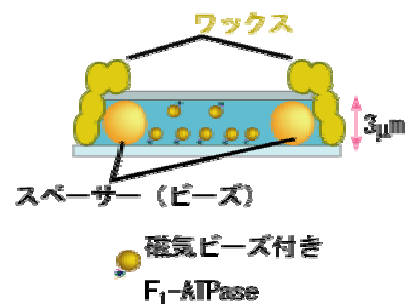


図4 合成実験用の薄いチャンバーの模式図。試料調整時には薄いフィルム(厚み $\sim 10\ \mu\text{m}$ )を使ってフローセルとし、計測時には引き抜いて、直径  $3\ \mu\text{m}$  のビーズをスペーサーとする。周囲はワックスで固定。

図5は、薄いチャンバーを用いた合成実験結果の全て(12試行)を示した。微小液滴の



実験時の試行に、磁場を印加しない(N)をタイムスケジュールに加えた。回転周波数は分解・合成方向ともに10Hzで、5分間連続して印加した。縦軸は、視野( $1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  領域)から得られた光子数である。全ての実験において、期待したパターン(HよりSの光子数が高い)が得られた。NよりもHの光子数が高いのは、天井の $F_1$ -ATPaseが、H方向の回転時にATPを合成してしまっているからである。また、試行の後半で光子数の増減の振幅が小さくなっているのは、ルシフェリン・ルシフェラーゼが、代謝物であるADPやPiの存在下でATPの分解時間を長くしてしまっているからである(〜3分)。図中青い波線で示したものは、青い実線の実験後にチャンバーの上下を逆転したものである。検出される光子数のパターンは全く逆になった。これらの実験結果は、確かに回転が、また、その回転方向がATP合成のために重要であることを示し、文字通り分子機械に連続的に力を加えて合成を実現したことを実証したのである。

この成果は、 $F_0$ がなくても、ローターであるサブユニットを外力で逆回転させるのではないかと、という基礎科学の疑問に、実験で「イエス」という答えをだした。タンパク質のある一点にある向きの力(トルク)をかけるだけで、そこから物理的に離れている触媒部位での反応を制御して、平衡状態からはるかに離れたところまで反応を駆動出来たことは、 $F_1$ -ATPaseという化学-力学エネルギー変換分子機械の中に、1カ所に力を加えるだけで完全に逆行可能となるような巧妙な仕掛けがあることを実験的に示した最初の例である。

合成実証を報告したのと同じ時期に、ドイツのグループがリポソームに取り込んだ $F_0F_1$ -ATP合成酵素のサブユニットが、ATPを加水分解するのとATPを合成するのは、回転の向きが逆であることをFCS(Fluorescence Correlation Spectroscopy)を用いた1分子計測で示した。 $F_0F_1$ -ATP合成酵素全てのシステムで、ATP合成の際にもサブユニットが回転することを示した最初の例であるが、計測法の制限により、観測された回転は数回である。試料の調整法の発展により、合成メカニズムの詳細が分かるかもしれない。また、その1年後に、日本のグループが、我々が微小液滴の実験系で示したのと同じような概念(合成されたATPを微小な空間に閉じこめる)により、サブユニットの逆回転によりATPが合成されることを示唆するデータを示した。微小な空間の中で強制的に逆回転し、回転を止めたあと、自分で合成したATPを加水分解して回転する $F_1$ -ATPaseの様子を観測するというものである。加水分解の際には必要なかったサブユニットの存在が、ATPの合成を促進するという興味深い結果も示している。定量性の問題の解決が望まれる他、本来、サブユニット上では、操作のために取り付けられたビーズとは共存できない位置に存在すると考えられていたサブユニットの新しい機能を提示出来るかもしれない。

#### 超高感度光検出器の開発

光検出器の開発は、浜松ホトニクスと技術者と共に、設計、および、開発を行った。GaAsPの光電面をもつイメージンシファイアを光子検出仕様にするために、増幅部であるマイクロチャンネルプレート(MCP)を2段および3段備えるものを試作した。GaAsPの光電面は、量子収率30~50%を達成するが、ダークノイズ(熱ノイズ:150~200cps)

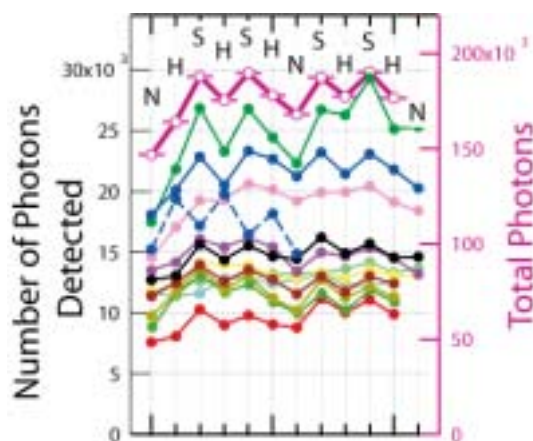


図5 薄いチャンバーによる合成実験結果。マジェンタは、全ての実験の総和(右軸)。バックグラウンドは、溶液に混入した素性のわからないATP合成酵素、ばらつきはチャンバーの厚みによるものと考えている。



が増加することが欠点であった。全体を-20~-40 まで冷却することにより、ダークノイズは 15cpsまで低下させることに成功し、実用に耐えるものになった。また、読み出し用のCCDカメラとの接続を従来のレンズカップルから、テーパファイバークップルに変更することにより、光子検出の効率を高めた。この光電面をもったイメージンシファイアーを光子検出が可能になるまでゲインを増加させると、ノイズが2次元方向に広がったイオンノイズが数秒に1回現れることが欠点であったが、2値化した画像の重心検出を行うことにより光子係数の定量化の向上を図ることができた。また、3枚MCPのものでは、長寿命化のために一般的に設置されるアルミ箔を取り除くことで、光子検出効率に効果を上げることに成功した。3枚MCPを備えるものは、2枚MCPのイメージンシファイアーと比較して、空間分解能は劣るものの、MCP間の増幅用の電位がそれほど高くても高ゲインが達成できる。そのため、イオンノイズの低減を図ることができると期待したが、イオンノイズ低減の定量的な評価は、まだ、終了していない。

企業としては、試作品の開発は計画的に行われるべきものである。この研究のためのみ、試作を快く引き受けてくださった弊社電子管事業部第43部門の諸氏にこの場を借りて感謝したい。

### 磁性ビーズの精製

ローター操作用に サブユニットに取り付けたのは、ストレプトアビジンコート磁性ビーズである。市販の1  $\mu$ mを超える大きなものは、比較的直径や磁性も揃っていて、使い勝手はよいのだが、経験的に、回転アッセイによる回転ビーズの発見確率は小さいビーズのほうが、はるかに成績がよい。しかし、直径が1  $\mu$ m以下になると、大きさの不揃いや、ゴミのようなビーズの存在が目立った(図1)。直径 0.7  $\mu$ m 程度の大きさのものを購入し、遠心により大きなビーズを取り除き、0.5  $\mu$ m以下の大きさのものを精製して用いた。合成実験時に問題になったのは、このような操作を行っても大きなビーズや、ビーズの凝集体が残り、合成実験に用いたような比較的弱い回転磁場の回転速度に追従しないビーズが数多く見られたことである。水の粘性抵抗のためと考えている。この問題の克服のために、市販のセルソーターの前方散乱による選別機能(細胞の大きさによる)を利用して、磁性ビーズの選別を試みた。

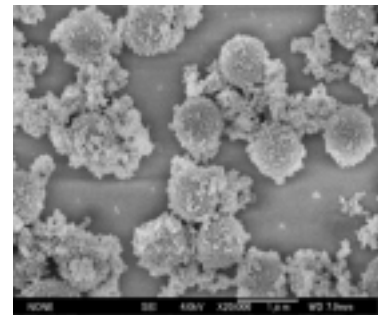


図6 S社ストレプトアビジンコート磁性ビーズ写真

図7に、セルソーターによる市販ビーズの弁別プロフィールを示した。図7左は、市販ビーズ(100mMMOPS にバッファーを置換)の前方散乱ヒストグラムである。横軸に前方散乱強度、縦軸に頻度を示してある。光学顕微鏡観測では、直径が 0.7  $\mu$ m を飛び抜けて超えるものは観測されないので、強度が高いピークは凝集体によるものと思われる。また、低強度領域の散乱は、図1に見られる直径の小さなビーズ片や、周囲の凝集物によるものと思われる。回転アッセイを行う場合には、このような小さなビーズ片や周囲の凝集物による回転が多く見られ、外部磁場にも反応するが、正体は分からなかった。図7右に示したのは磁性ビーズ弁別を行う際の Threshold プロフィールである。装置の性能上二種類の閾値を選択する必要があるので、図に示したように、前方散乱および側方散乱の適当な領域(白の四角の領域)を選んで弁別を行った。

この装置は、本来、分取する細胞の解析用のもので、1回に添加できる細胞溶液と、細胞の数は限られている。大量の試料の弁別には繰り返し操作が必要であった。試料は大量のシーズ液とともに回収されてしまう。そこで、ビーズの磁性を利用した簡便な回収方法を考案し試してみた(図8)。

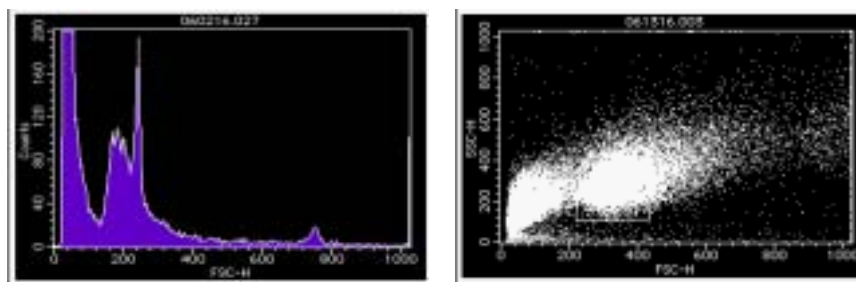


図 7: セルソーターによるストレプトアビジンコート磁性ビーズの側方散乱プロフィール (左: 240 付近に参照として加えた  $0.7\mu\text{m}$  ビーズの散乱ピークが現れている) と、Threshold ウィンドウ (右図、白い四角で囲んでいる)。

本来は、弁別した細胞の回収用に 50mL のディスポーザブル試験管を設置するが、回収用の流路を延長し、別途備えた三角フラスコ中に誘導した。ビーズは、フラスコ下に設置された磁石によりフラスコ底に集まり、上澄みは、上部設置されたドレインから廃棄される。回収したビーズの直径の実測値を図4に示した。実験に耐えうる直径の分布が得られているが、1昼夜装置を駆動し続けて、数回分の試料が得られるのみであった (1/1000 の回収率)。試料の添加が手作業になっていることが原因の1つである。現状では現実的な精製方法となっていない。しかし、今後、ソフトナノマシンの操作の精度向上のために、現状の形体ではなくとも、形状や、さまざまな物性によるソーティングシステムの開発は必要なものと考えている。

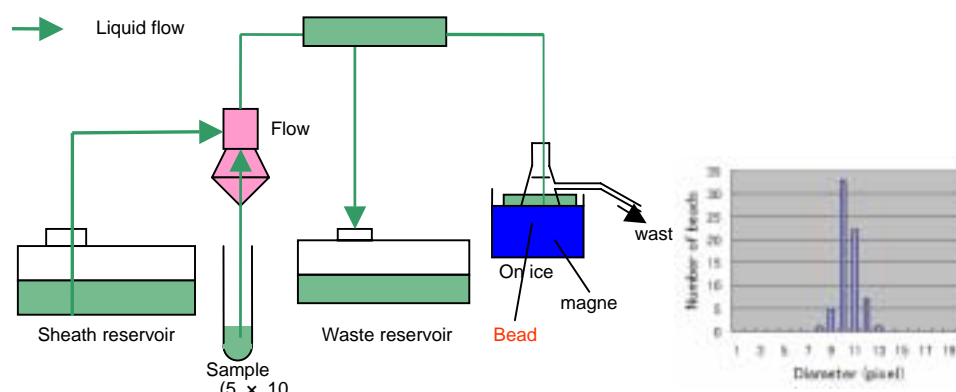


図 8. 回収方式を磁性ビーズ回収用に改良したセルソーターの概念図。ソーティング後、底面に磁石を設置した三角フラスコに流路は誘導される。グラフは、回収したビーズ直径をモニター上で実測した値 ( $10.5 \pm 0.8$  pixel)

### 光硬化性樹脂を用いた微小チャンバーの製作

$F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による合成実験の当初に直面した問題は、ルシフェリン・ルシフェラーゼシステムのバックグラウンド化学発光である。原因は、 $F_1$ -ATPase 以外の未知の ATP 合成酵素の混入によるものだと考えている。潜在的なバックグラウンドとなるので、合成 ATP の確認を妨害するものである。反応溶液の取り扱いに十分注意し、ADP の精製なども行ったが、素性の分からない ATP 合成酵素が常に反応系に存在し、これを取り除くことが出来なかった。ローターである サブユニット1回転あたりに期待される合成 ATP の数はたかだか3個である。また、ルシフェリン・ルシフェラーゼの化学発光の効率も 100% 進む分けではない。そこで、バックグラウンド化学発光から効率よく合成 ATP の化学発光を検

出すために、反応に用いる溶液の体積そのものを小さくする手法の開発を試みたことはすでに示した。濃度変化ではなく、合成された ATP の数の見積りなのである！マイクロピペットを利用する方法は、熟練と根気がいる実験系であり、再現性や精度の面からもっと簡便な方法の開発が求められていた。関係共同研究グループからの新しい操作・計測システム開発の期待もあった。

開発の目標は、 $F_1$ -ATPase あたりの溶液の量を極力少なくするような計測システムを製作することである。微小液滴の実験系の利点は、液滴内の試料の操作時以外(計測時)には、外界と独立させることができたことである。 $F_1$ -ATPase も向きをそろえて床に固定することができた。同様のイメージで、微小チャンバーを大量生産(少なくとも実験室レベルで)を行える方法として、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems)も候補として考えたが、設計・製作に時間がかかり、実験室内での微調整が簡単でないことから、チャンバー本体(流路等の製作)は、MEMS で実現し、心臓部の微細構造は、光硬化性樹脂で考えた。実験室レベルのオンデマンドチャンバー製作システムの開発を目指したのである。この方法では、かなり複雑な構造の構築も可能であるので、膜タンパク質の観測まで考慮して開発を行った。まず、微細構造の心臓部であるチャンバー部分の設計・製作から開始した。

光硬化性樹脂は紫外線の照射により重合する樹脂である。木型に変わり、部品形状の検討に使われるようになった手法で、パソコンのマウス、携帯電話などの、小さなものから、車のバンパーの大きさのものまで、試験製作に利用されている。また、近年は多種の樹脂が開発され、重合後は、ネジを立てられるほど硬質のものから、水に親和性をもつもの、ゴムとしての性質をもつものまでである。すでに、サブマイクロメートルの微細構造をもったマイクロメートルオーダーの構造体も報告されている。

樹脂重合状態の確認、洗浄方法、ガラスや他の機材との親和性を評価のために、簡単な実験を行った(図9)。紫外線の照射により重合した樹脂は、期待通りのパターンになった。洗浄は、エタノールが適している(プロパノールや、アセトンの場合には表面の変性が観測された。構造物の収縮が観測された)が、多少、収縮が観測された。このこと(収縮)が原因のようであるが、ガラス面との吸着はそれほど強くなく、安定化させるためには、ある程度接触面が必要ことがわかった。

実際の光硬化性樹脂の重合による微細構造の製作には、赤外域のフェムト秒パルスレーザーを光源(発振波長:780 nm、パルス幅:100 fs、繰り返し:100 MHz)として用いる。樹脂は、紫外域には、吸収を有するが、可視域から近赤外域には吸収はない。近赤外域のレーザーは、樹脂中を通過し、対物レンズで集光された極めて限られた領域にのみ非線形現象(二光子吸収)を生ずる。この作用を利用して、「原理的」には、樹脂中に波長以下の分解能で、随意に構造を形成できると期待されるからである。図10に、開発した微細構造製作システムの概略を示した。まず、3DCADで設計した立体構造から、ある平面内の輪郭構造を抽出する。輪郭構造から、ガルバノミラー操作用の2次元の座標を得て、3次元の立体構造を再構築する。この座標をもとに、ガルバノミラー操作用の出力信号、Z軸の操作信号をD/Aコンバーターを経て出力し、樹脂中でフェムト秒パルスレーザーを走査する。図11に示したのは、膜タンパク質の観測用にこのシステムで設計・製作した微小チャンバーの例である。先ほど、「原理的」と述べたのは、光硬化樹脂のこの空間分解能領域の重合評価の知見が少ない(重合に要する時間中に、光子によって励起された重合開始分子が拡散するかもしれないし、重合した樹脂と未重合の樹脂の間の力学的な関係もわからない。また、界面での光の屈折が、空間分解能にどのように影響するか?)。さらに、光学顕微鏡の分解能の指標である光学スポットの広がり、XY方向と比較して3倍程度と考えられている。いま、これらの問題の評価のために、実際の構造物の電子顕微鏡観測を検討している。

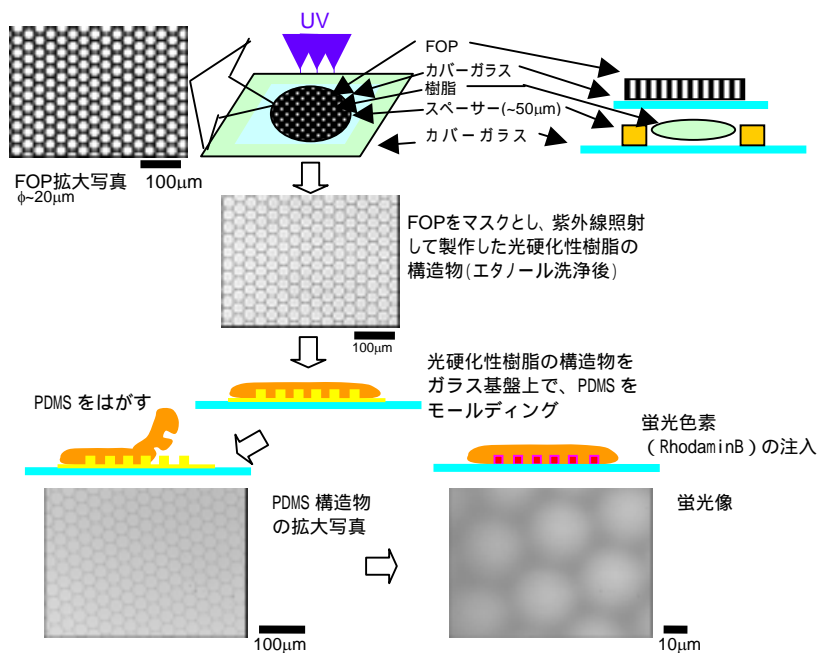


図9. 光硬化性樹脂の性能試験実験。樹脂に紫外照射する際のマスクはFOP（ファイバーオプティカルプレート。直径25mm、厚さ1mmのガラス基盤に直径20 $\mu$ mの穴が貫通しており、穴以外は黒く染められており紫外線を通させない）。紫外線を照射して重合したパターン（最上段）を型としてPDMSを重合させ（中段）、微小チャンパー（最下段左はPDMSの透過構造、右はPDMSとガラス基盤にサンドイッチした蛍光色素の蛍光像）を作った。

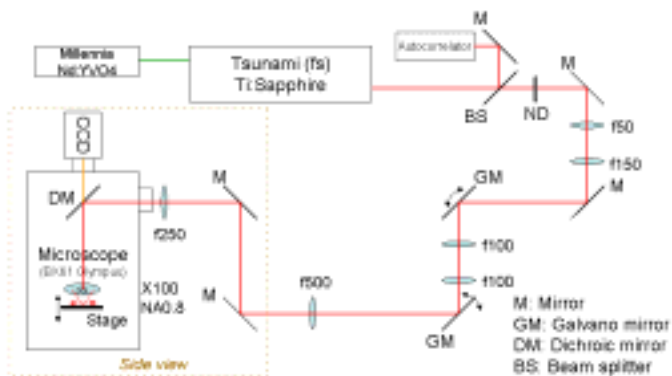


図10 赤外フェムト秒パルスレーザーを用いた光硬化樹脂の微細構造製作システム概略図

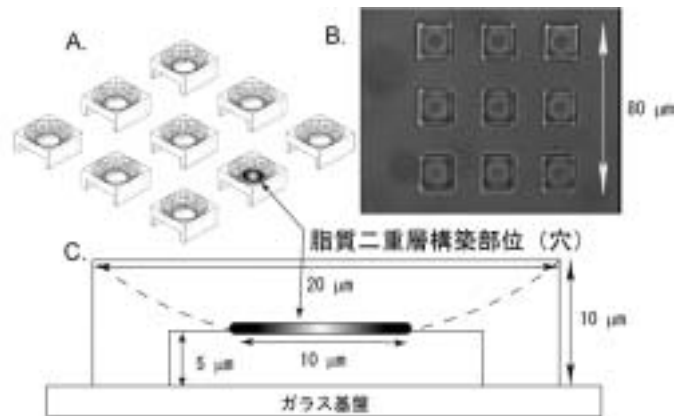


図 11 膜タンパク質操作用に設計・製作した微小構造の心臓部。A. ガルバノミラーのスキャン情報を構築するために製作した 3D 画像。B. 製作した光硬化性樹脂のパターン。C. 3D 設計の詳細。

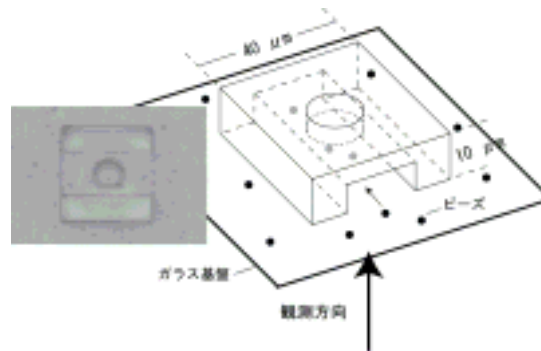


図 12 光硬化性樹脂により製作した微細構造にビーズを含んだ水溶液を添加。

できあがった微細構造物に、実際にビーズを含んだ水溶液を添加してみた(図 12)。空間分解能はともかく、構造ができていることは確かめられた。

この方法の特徴でもあり欠点でもあるのだが、大きな構造を作る場合には適してない。少なくとも、マスクパターンを用いたエッジング法や、紫外線の直接照射による重合法とこの方法を組み合わせて用いる方法が効果的であり、検討を行っている。

## (2)研究成果の今後期待される効果

$F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証は、基礎科学的な面では、この分子機械の働くメカニズムに、やはり回転が関わっていることを示した。近い将来、我々の生命科学の知識や技術が進み、分子機械(ソフトナノマシン)の設計を行うことができるようになったときに重要となる基本的な概念を示した。合成が、分解方向の逆の通り道を通ったとするならば、磁場による回転力は、ADP と Pi の化学反応による合成の段階でなく、ADP と Pi の活性部位への結合、および、ATP の解離に使われたと推定できる。また、分子操作や観測等の周辺技術の開発を行った。特に、光技術を中心とした光検出、プローブの選別、および、微細加工技術は、成果(論文や特許)を報告する段階にまで、まだ達していないが、ソフトナノマシンシステムを創製することを目的とするためには、重要な技術であり、汎用化も考慮した研究を継続する予定である。

## 3.2 1分子操作に適した分子機械の改変と精製(早稲田大学 一分子生理グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

一分子生理グループは、一分子工学グループが目標としている  $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成のメカニズムの解明するための支援技術の開発を目的として研究を進めた。具体的には、一分子レベルでの加水分解のメカニズムが明らかにできれば、逆反応と考えられる合成のメカニズムの解明にも大いに役に立つだろうという発想である。

$F_1$ -ATPase の機能である ATP の加水分解に伴う回転のメカニズムの解明には、重要であるが、まだ、解かれていない問題がある。加水分解(回転)時に、 $F_1$ -ATPase には、いくつの核酸が結合しているのだろうか？ 120° のステップ(90° あるいは 80° と、30° あるいは 40° のサブステップ)が、どのような駆動力により引き起こされるのか？ さらに、トルク発生のメカニズムは、タンパク質の構造変化と機能の発現を結びつける重要なテーマであるにも関わらず、手つかずにある現状がある。

### 核酸の数 (Site Occupancy)

$F_1$ -ATPase は、3 つの活性部位 (サブユニット) で、ATP を 1 つ加水分解する毎に 120° サブユニットを回転させる。重要であるが、まだ、解かれていない問題として、加水分解(回転)時には、いったい、いくつの核酸が サブユニットに結合しているのかという問題がある。これまでの研究では nM オーダーから  $\mu$ M (ひょっとしたら 6 mM) 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おける回転挙動の詳細な研究により、 $F_1$ -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。

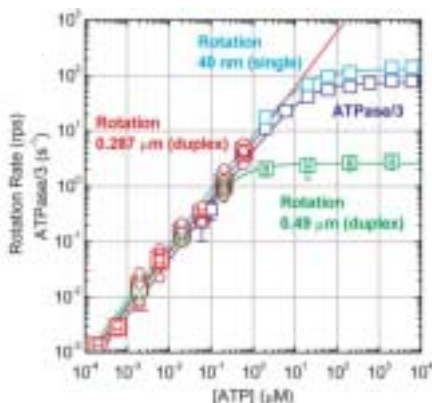


図 13 回転アッセイによる平均の回転速度と、ATP の加水分解速度の ATP 濃度依存性 (Sakaki, Biophys J)。赤は、直径 0.287  $\mu$ m、緑は 0.49  $\mu$ m (それぞれ duplex で、は個々のデータ、は平均値)。赤い線は、リニアフィッティングの結果 ( $V/[ATP] = (6.2 \pm 1.0) \times 10^6 \text{ revolutions M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )、緑の線は Michaelis-Menten フィッティング ( $V_{\text{max}} = 2.6 \pm 0.4 \text{ revolutions s}^{-1}$ ,  $K_m = 0.37 \pm 0.13 \mu\text{M}$ )。シアンのは 40nm の金粒子の回転アッセイの結果 (Yasuda et al, Nature)。青は、加水分解速度 (1/3)。

### サブステップの駆動力

$F_1$ -ATPase の働く仕組みを明らかにする上で、「3 つの活性部位での ATP の加水分解と回転がどのように関係しているか？」という重要な問題がまだ明らかにされていない。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。我々は、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を明らかにした。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 (図 14)。



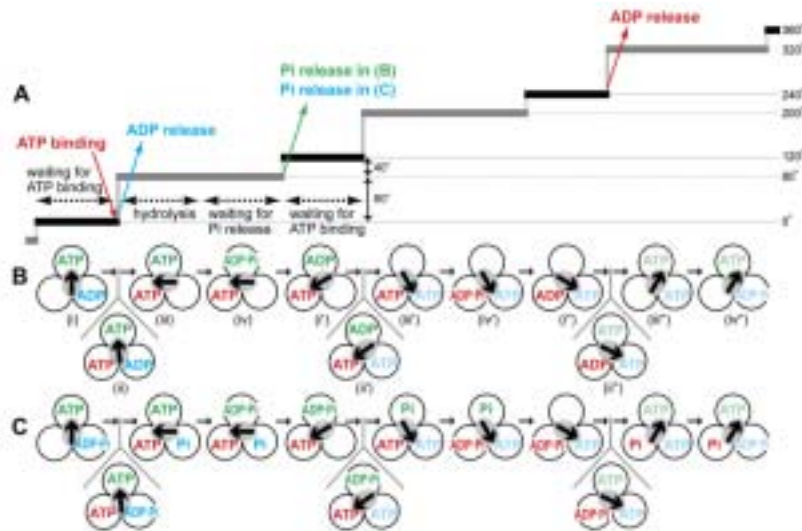


図14 加水分解と回転の関係図 (Adachi et al, Cell) (A)ステップ状の回転の概略図。縦軸は、サブユニットの角度、横軸は、時間をしめしている。文字の色は、(B)と(C)で示した結合部位での核酸とPiの色と対応させている。(B)は、3つの結合部位での、核酸の状態を示している。は活性部位をもつ3つのに対応させており、中央の灰色の楕円はサブユニット、楕円内の矢印は、サブユニットの向きである。12時方向が、(A)の0°に対応している。1個のATPの代謝物(ADPとPi)は、同じ色で示している。小さな矢印は主な反応経路の進行を示している。主たる反応経路の下に(ii), (ii'),および(ii'')で示した配置は、ATP結合直後の瞬間を示している(80°サブステップを開始する瞬間の配置)。(C)で示したのは、Piの放出が、ADPの放出後に起こるかもしれない可能性を考えたときの関係図。

### ATP加水分解とサブユニットの回転及びトルク発生のメカニズムへの疑問

AbrahamsとWalker(Nature, 1994年)により発表された牛ミトコンドリアのF<sub>1</sub>-ATPaseの結晶構造は、吉田(PNAS, 1977)の報告した高熱菌由来のF<sub>1</sub>-ATPaseの各サブユニットの量比よりヒントを得たBoyer(in Energy Coupling in Photosynthesis, 1981年)の予測、および、それとは、別途に、大沢と林(Adv. Biophys, 1986)らが、理論的な考察から予測した回転結合説を再現するものであった。結晶構造中のサブユニットは、ATPを各サブユニットで加水分解しながら回転しそうだったのである。F<sub>1</sub>-ATPaseがステッピング回転モーターであることが明らかにされた当時、結晶構造を基に、WangとOster(Nature, 1998年)により、理論的な回転のメカニズムの提案が行われた。図1Aに示したのは、牛ミトコンドリア由来のF<sub>1</sub>-ATPaseの結晶構造である。<sub>3</sub>シリンダーの奥深く突き刺さったサブユニットは、頂上の穴部分と、底部の構造により支えられている。底部で支えているのは疎水的な残基であり、ベアリングとして作用している。ATPあるいはADPを結合したの上部は内側に折れ込むように曲がっていて、サブユニットの上部を押している。一報、核酸を結合していないは、引っ込んでいてを引っ張っているようであった(Push-Pull回転メカニズム)。つまり、サブユニットがわずかに曲がっていて、歪んでいるために、核酸の結合・解離に対応するの構造変化が、サブユニットの回転方向を決めて回転させるのだというモデルである。このモデルでは、サブユニットの底部が回転トルク発生の基本となっている。我々は、このことを実証するために、サブユニットのシリンダー内部の構造を、順次削除した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。最終的に、シリンダー中の全ての残基を削除したミュータントにおいても、20 nMから2 mMのATP濃度範囲で、溶液中での活性があり、回転アッセイ計測においても、平均の回転時間は遅く、イレギュラーな挙動を示すこともあったが、トルクも発生した。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。

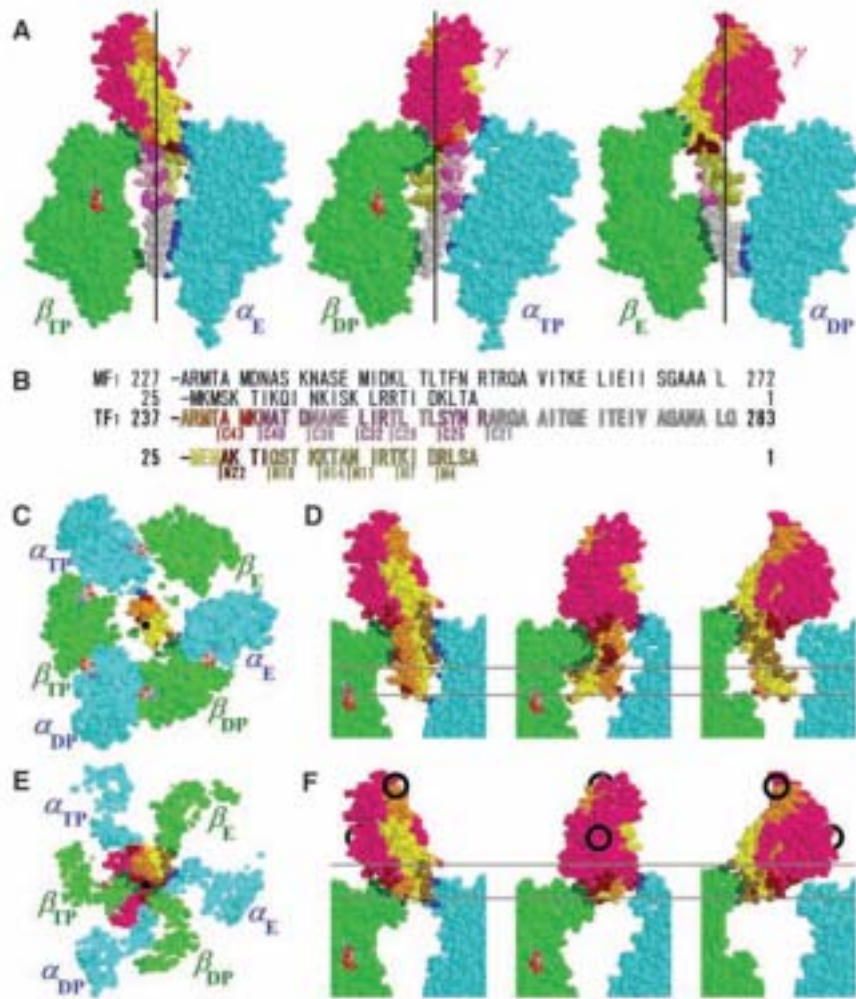


図 15 ミトコンドリア  $F_1$  の原子構造 (Abrahams & Walker, 1994)。(A) 中心のサブユニットとそれに向き合っている  $\gamma$  を側面から見ている。ATP 合成酵素の膜内在性の  $F_0$  は、図の上部 ( の上方) にある。サブユニットの切断した配列を (B) に色をつけて示した; N 端と C 端のヘリックスを、それぞれ、黄色とオレンジで示した。  $\gamma$  とサブユニットのうち、水素原子を除いたの原子から 0.5 nm 以内にある原子を、それぞれ、青と深緑で示した。核酸は、CPK 色で示している。黒く引いた線 ((C) と (E) では、黒のドット) で示した物は、回転軸が推定 (Wang & Oster, 1997) されているものを示した。(B) ミトコンドリア  $F_1$  ( $MF_1$ ) と、高熱菌  $F_1$  ( $TF_1$ ) の C 端と N 端のアミノ酸配列 (番号付けは、野生型ミュータントのタンパク質には存在しない Met-1 から始めている)。(C) から (F) - N4C25 (C と D) と、 - N22C43 (E と F)。(C) と (E) は、(D) と (F) における 2 本の灰色の線の間を底方向から眺めた構造。あるいはの原子から 0.5 nm 以内のの原子を、それぞれ、金色と茶色で示した ( - N22C43 の C 端のヘリックスは無い)。(F) の黒丸は、ピオチン化されたシステイン基のだいたいの位置。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

分子モーターの計測が、バルクなアンサンブルの計測だけでは不十分で、1 分子観測 (生きたままで、分子機械が働いている現場で、その挙動を観測・操作する: 一分子生理学) の必要性、あるいは、重要性を示すことができたと考えている。この分野の研究が始まった当初は、生化学の研究結果で、不明確な点、しかも、肉眼、あるいは、ビデオカメラ (30Hz) での観測能力の範囲に現象がかぎられていたが、光源としてのレーザーの導入、高速カメラの発展、操作技術の開発などによる周辺技術の進歩に加えて、積極的に新現

象を発見しようとする姿勢が示されている。研究成果により今後期待される効果としては、合成実験に関する基本的なアイデアの他は、以下の通りである。

これまでの、加水分解、あるいは、回転時の結合核酸の数は、bi-site(どのような活性状態でも  $F_1$ -ATPase 上に 3 個の核酸がつくことはない)や、tri-site(結合する ATP>2)を指示する研究者の間で議論が続けられている。現状では、tri-site 指示が優勢である。理由は、活性部位付近のアミノ酸を Trp に改変したミュータントによる実験で、 $F_1$ -ATPase には核酸が 2 個以上結合する能力があること、ATP が極低濃度になると、加水分解活性が著しく低下すること、蛍光性アナログである Cy3-ATP が、少なくとも 240 ° 結合しているという回転アッセイの結果、結晶構造解析により 3 つの活性部位全てに核酸があったことなどである。bi-site の支持者は、上記したミュータントや ATP アナログを用いた結果であることや、 $F_1$ -ATPase の不活性状態(Mg-ADP インヒビション)を疑っている。我々の低濃度 ATP による回転アッセイの結果は、活性を維持している  $F_1$ -ATPase だけの観測結果であり、200 pM という低濃度まで、平均の回転速度と ATP 濃度が比例することを示した。この回転を tri-site モデルで説明しようとする、この濃度域であっても核酸を強固に結合していることになり、解離定数が 1 nM 以下であることを示唆している。このように、1分子計測法により、バルクの計測では分からなかった分子機械の特徴を示すことに成功した。さらに、ATP の結合の挙動を考えると、本来、回転を駆動する場合と、加水分解されずに、そのまま、溶液中に解離されてしまう場合があるはずである。pM オーダーの回転アッセイでは、結合が、そのまま加水分解方向の化学反応や回転挙動を示さない場合が見られている。こちらのほうも、分子機械の働くメカニズム(確率的に働く)の解明のための先導研究となるであろう。

Pi の放出が、40 ° サブステップの駆動力となっているという報告は、 $F_1$ -ATPase ばかりでなく、他の分子モーターにおける運動のメカニズムの解明においても重要な知見を与えてくれた。仮定の 1 つとして予測はされていたが、実証が無かったからである。

低濃度 ATP の回転アッセイにより、 $F_1$ -ATPase がステップモーターであることが証明された当時、理論的な考察により、加水分解と回転の共同性に関する提案がなされた。活性部位をもつ サブユニットの構造変化と、 の回転を再現するモデルであったため(Push-Pull モデル)、広く受け入れられている。 サブユニットの C 端を削除したミュータントは、ATP の加水分解、および、平均速度の低下は見られたものの、C 端を削除しないワイルドと同じトルクを示した。このことは、モデルが、トルク発生のメカニズムを説明していないことになり、新たなモデルの提案が必要になったことを示している。我々は、さらに、 サブユニットの遺伝子工学的な改変を進めており、近い将来、加水分解と回転(特に、トルク発生)のモデルに対して、新しい提案ができると考えている。

### 3. 3 回転分子モーターのポテンシャル分布計測(中央大学 分子操作応用実験グループ) (1)研究実施内容及び成果

従来  $F_1$ -ATPase の力学的な出力は、粘性摩擦抵抗に対する回転プローブの運動から評価されてきた。しかし、我々は、粘性抵抗しかない条件では  $F_1$ -ATPase のステップ回転自体は、ATP の加水分解の自由エネルギー変化に(ほとんど)影響を受けず、このステップ回転によって力学的出力を定義することは、エネルギー論的に不相当であることを示した。実際に、エネルギー論として重要な知見を得るためには、時間・空間的に一定な外部トルク存在下でのこのモーターの動的性質を把握する必要がある。そこで本研究では、 $F_1$ -ATPase が回転運動をする際に反応座標に沿って変化するポテンシャルを計測することを目的として、回転分子モーターである  $F_1$ -ATPase の回転に対する外部トルクの影響を測定することが可能な操作・計測システムを導入し研究を開始した。

非常に微小な回転分子である  $F_1$ -ATPase に外部から力を加えて回転させる方法としては、磁気ピンセットによるものがあり、外部磁場で  $F_1$ -ATPase を強制回転させることにより、ATP の合成が既に示されている。さらに、ADP による特異的阻害の速度論的解析も詳細に行われているが、磁気ピンセットで加わる力は、回転トルクと言うよりは一方向に固定しよう

とする力であり、その固定方向を回転させて強制的に回転を起している。そのため  $F_1$ -ATPase が外部磁場の方向よりさらに先に進もうとする時には引き戻そうとする力を、遅れようとする時には先に進ませるような力を及ぼすこととなり、必ずしも一定のトルクを一方向に印加していることにはならない。そこで  $F_1$ -ATPase 本来の動的な性質を検討するには、真の外部トルクをかける必要があると考え、本研究では既にバクテリアのべん毛モーターに適用されている回転電場法を桐蔭横浜大学の工藤成史博士と食品総合研究所の杉山滋博士の指導の下に導入した。この方法では、微小ビーズをプローブとして回転している  $F_1$ -ATPase の周辺に4個の電極を配置し、その電極に位相を離れた交流電圧を加えることにより、回転電場を形成する。この回転電場によって微小ビーズには誘起双極子モーメントが発生するが、電場を非常に高速に ( $\sim 10\text{MHz}$ ) 回転させることにより、その誘起双極子モーメントと回転電場の間に位相差が生じ、一定のトルクを発生させることができる (図 16)。

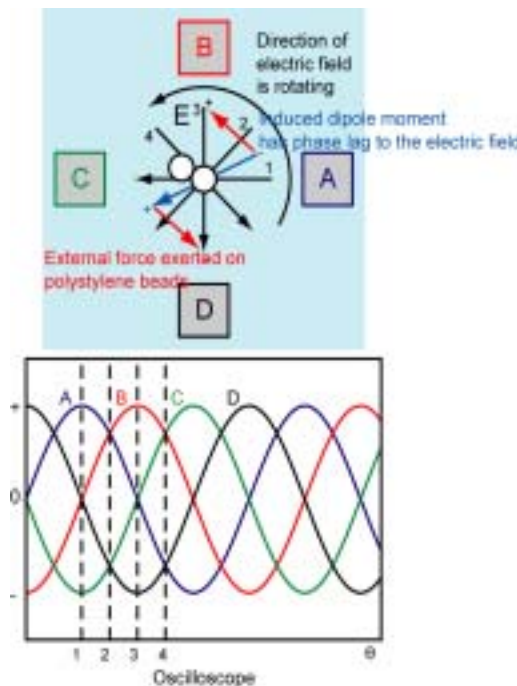


図 16 回転電場法による外部トルク印可機構の説明図。上図中央の二つの白円は、 $F_1$ -ATPase に結合して回転するビーズを表す。その周りに電極 A、B、C、D を配して下図にあるように  $90^\circ$  位相のずれた交流電圧をかけることによって回転電場を発生させる。この回転電場は、 $F_1$ -ATPase に結合しているビーズに双極子モーメントを誘起するが、僅かな時間遅れを生じるため、回転電場と誘起双極子モーメントの間には位相差が生じ、そのために外部トルクが発生する。

さらにべん毛モーターの場合には回転電場によるトルクの絶対値の推定が難しく、定性的な解析にとどまっていたが、本研究では非特異的に吸着しているビーズの回転拡散係数と、外部電場による回転速度を比較することにより、外部トルクの絶対値の校正を行い、定量的な評価を可能にした。その結果、回転電場による外部トルクは  $F_1$ -ATPase のステップ回転に対して、

- 1) ATP 結合待ちの時間を指数関数的に変化させる。
- 2) ステップ回転をするとき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。また、ADP とリン酸がないときには、ATP 加水分解時とは逆方向のトルクをかけたとき、野生型の  $F_1$  は容易に逆回転しないのに対して GT と呼ばれる変異体では比較的簡単に逆回転をすることが示された。

1)の結果は、ATP 結合の過程をアーレニウスの速度論に基づく関係式に当てはめて解析できることを示している。そこで、外部トルク比存在下での ATP 結合速度定数を

$$k_{on}(N) = k_{on}^0 \cdot \exp\left(\frac{N \cdot \Delta\theta}{k_B T}\right)$$



の式に当てはめて解析した。ここで、 $k_{on}(N)$ は外部トルク  $N$  存在下での ATP 結合速度定数、 $k_{on}^0$ は外部トルク非存在下での ATP 結合速度定数、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度、 $\Delta\theta$  はトルク  $N$  に沿った回転角度である。その結果、ATP 結合からステップ回転の開始に至る遷移状態は ATP 結合をまわっている位置から約  $6.5^\circ$  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た(図 17)。

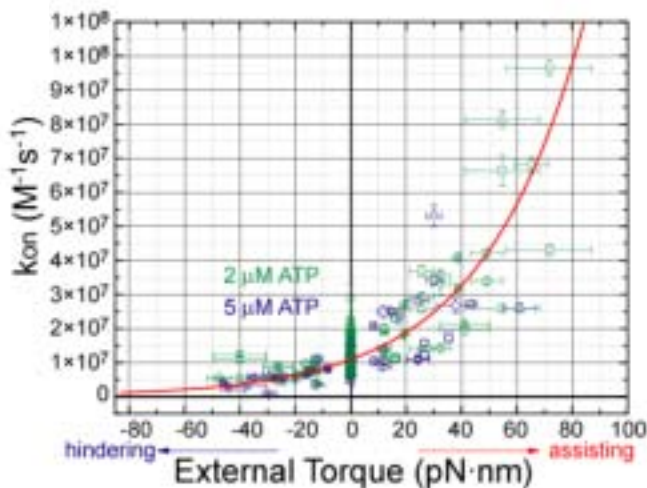


図 17 ATP 結合速度定数の外部トルク依存性。ステップ回転が観察できた  $2\ \mu\text{M}$  と  $5\ \mu\text{M}$  の二つの ATP 濃度でのデータを合わせてプロットした。赤線はアレーニウスの式によって解析した理論曲線。フィッティングパラメーターについては本文参照のこと。

2)のステップ回転をするときの角速度が外部トルクにほぼ直線的に依存するという結果(図 18)はステップ回転の運動は、ポテンシャルの坂を下りるような過程である事を示唆している。この外部トルク依存性を直線外挿することによって、回転が停止する所から最大トルクを見積もると、同時に  $F_1$ -ATPase の内部摩擦に当たる値が見積もられるが、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 変異体が逆回転しやすいにも拘わらず、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。

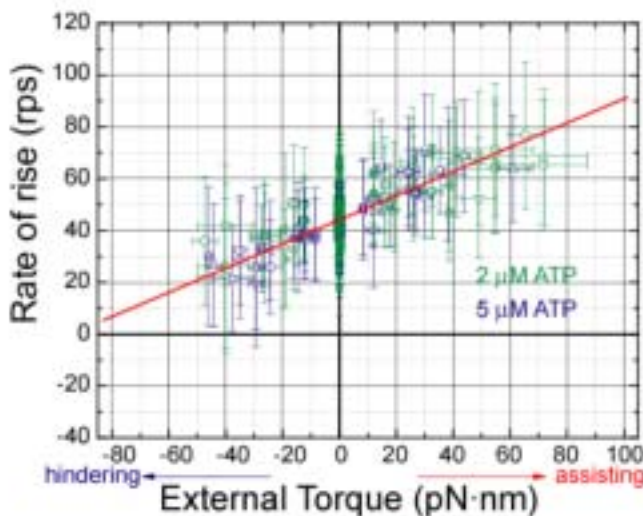


図 18 ステップ運動時の角速度の外部トルク依存性。ステップ回転が観察できた  $2\ \mu\text{M}$  と  $5\ \mu\text{M}$  の二つの ATP 濃度でのデータを合わせてプロットした。

以上を反応座標の形にまとめると、図 19 のようになる。横軸に反応座標として サブユニットの回転角度、縦軸に周りの溶媒まで含めた自由エネルギーをとる。ATP 結合待ちの角度を  $0^\circ$  とすると、ATP を結合してからステップ回転に至る遷移状態は、 $6.5^\circ$  くらい ATP 加水分解の回転方向側に進んだ所にある。この基底状態と遷移状態の間の活性化エネルギーは、縦軸の取り方から ATP に依存する形になる。そして遷移状態の頂点から  $120^\circ$  の地点までステップ運動に対応する自由エネルギーの減少する傾斜が続く。以前の ATP の加水分解自由エネルギーを制御してステップ回転を測定した結果から、この部分の傾斜は ATP、ADP、 $P_i$  の濃度には依存しない。

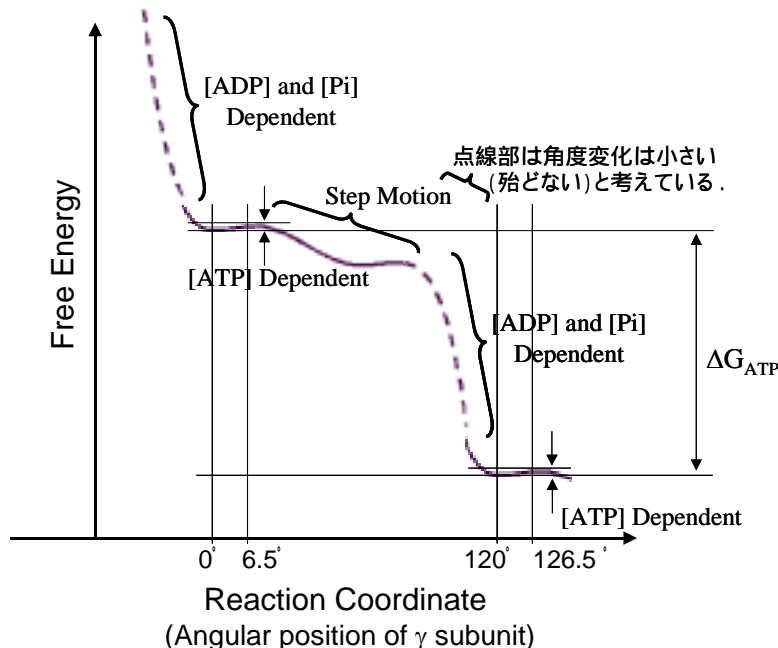


図 19 実験結果から考えられる反応座標。

また、今回の実験条件で  $F_1$ -ATPase が、逆方向の外部トルクがかかっても容易に逆回転しなかったという事実は、 $0^\circ$  の基底状態より左に高いポテンシャルバリアーがあることを示唆する(図 19 点線)。本研究の条件では ADP や  $P_i$  が入っていないことがその原因と考えられるので、このポテンシャルバリアーは、ADP と  $P_i$  の濃度に依存すると、とりあえず仮定しておく。図 19 ではこのポテンシャルバリアーの幅が広く描かれているが、実際にはこのバリアーを超える時に サブユニットの角度変化は小さく、回転としては検知できない程度のもので考えている。このポテンシャルは  $120^\circ$  ごとの周期を持つはずなので、ステップ運動に対応する傾斜の先にも同じ ADP と  $P_i$  の濃度に依存するポテンシャルバリアーがあり、 $120^\circ$  での ATP 待ち状態と、そこから  $6.5^\circ$  先の遷移状態が繰り返される(本研究では  $80^\circ$  と  $40^\circ$  のサブステップは時間分解能の関係から測定にかかってきていないので、図 19 では、これらはまとめて  $120^\circ$  のステップとして表現している。全体として、 $0^\circ$  の ATP 待ち状態と  $120^\circ$  での ATP 待ち状態の自由エネルギーの差が、外部トルクのない条件では、ATP の加水分解の自由エネルギーに一致する。外力のある場合は、図 20 に示すように、外力依存にこのポテンシャルの形が傾くことが予想される。すると、図 20 の  $\Delta G < 0$  に対応する曲線のようにステップ運動に対応する傾斜が右上がりになって、全体としての自由エネルギー変化が負であるために、ATP 加水分解方向に回転が起こる場合が考えられる。この場合はステップ回転の部分は、パワーstroke というよりはポテンシャルを上ってゆくようなランダムな拡散運動であり、 $120^\circ$  先のところで ADP と  $P_i$  依存のポテンシャルドロップにトラップされて固定される、というような運動をすることが予想される。実際に、逆向きの外部トルク存在下ではほとんど規則性がないように見える揺らぎがしばしば観察されており(図 21)、今後の解析に期待している。



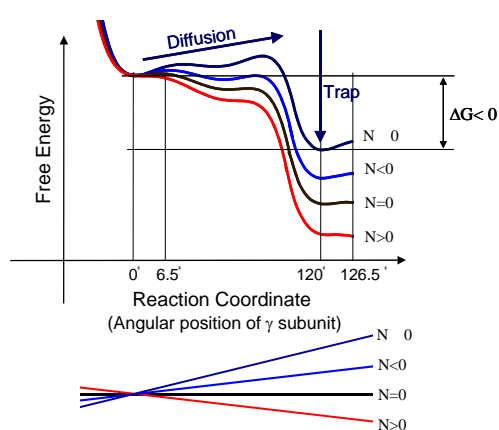


図 20 図 - 19 の反応座標に対する外力の影響。外力を  $N$  で表す。正の  $N$  は ATP 加水分解方向の回転を助ける方向、負の  $N$  は ATP 合成方向の回転を助ける方向。

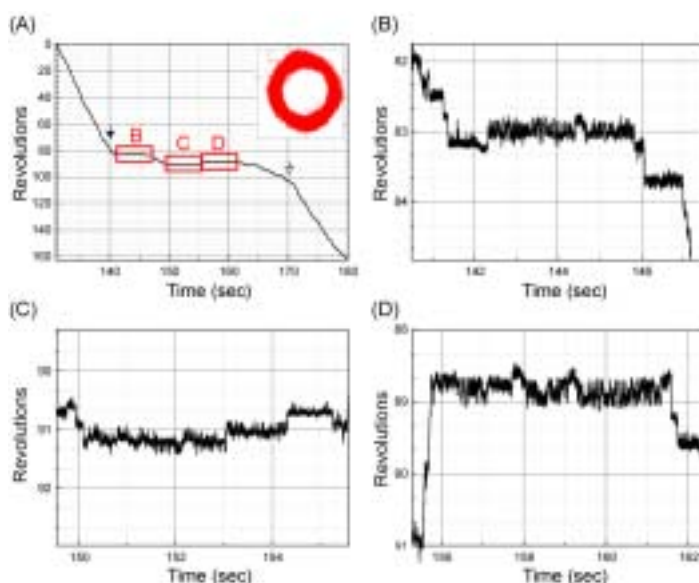


図 21 負の外部トルク存在下に見られる回転揺らぎ。外部トルクはこの場合、約  $-40$  pNm。

## (2)研究成果の今後期待される効果

基礎研究として本研究が展開すべき方向は極めてはっきりしている。すなわち ADP、 $P_i$  など、ATP 合成基質存在下での外部トルク依存性の検討であり、変異導入を行った蛋白質の動的性質の変化の検討である。本研究の手法では遷移状態での回転角が数字として出てくるため、将来的に分子動力学計算と組み合わせると回転過程を原子レベルで追跡する際の重要な指標となるであろう。また、本研究の手法では外部トルクを自由に操れるために、特定のパターンで外部トルクを変化させ、その時の応答を観測するような実験も可能になる。分子機械の過渡特性の測定である。これらの研究は、未だ十分な理解が出来ているとは言えない超微細な柔らかい分子機械の動作メカニズムを明らかにする上で不可欠なものである。

応用面では、蛋白質で出来た構造体に力を加える方法としての回転電場法の有効性が本研究で示されたといつて良いと考えている。回転電場法は、いままでバクテリアのべん毛モーターに適用されてきたが、本研究ではステップ運動の知見の蓄積された  $F_1$ -ATPase に、この方法を適用して外部トルクを定量的に評価することにより、分子モーターの性質をより詳しく明らかに出来たと考えている。直線的に運動する分子モーターでは、光ピンセットにフィードバックをかけることにより、運動の外力依存性が検討されているが、極めて安定性

の高い  $F_1$ -ATPase を用いた本研究では直線運動をする分子モーターにくらべて、質的に勝るとも劣らないデータがえられたと考えている。

現在のナノテクノロジー分野では微細な部品を作る技術と同時にその部品を操作する技術が重要になっている。微細な部品は実際に操作してみないとその性能が評価できないことを考えると、部品を操作する技術は、部品を作成する技術にくらべて劣ることのない重要性を持つ。本研究はその後者の技術として、回転電場法、あるいはもっと一般的に誘電泳動を基礎にしたナノレベルの操作技術として一層重要なものとなるであろう。

#### 4 研究参加者

伊藤グループ(1分子操作・検出支援システムの開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
伊藤 博康	浜松ホトニクス(株) 筑波研究所	主任部員	研究全体の統括と ATP の合成実証実験と 分子操作支援システム の開発	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
<del>高槻 玲</del>	<del>浜松ホトニクス(株) 筑波研究所</del>	<del>CREST 研 究員</del>	<del>分子操作支援システム の開発</del>	<del>平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 10 月</del>
篠原 明梨	早稲田大学理 工学術院物理 学科	CREST 技 術員	分子操作支援システム の開発	平成 19 年 2 月 ~ 平成 20 年 3 月
草 由香	浜松ホトニクス(株) 筑波研究所	研究補助 員	研究補助	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
<del>深津 美紀子</del>	<del>早稲田大学理 工学術院物理 学科</del>	<del>研究補助 員</del>	<del>研究補助</del>	<del>平成 15 年 1 月 ~ 平成 18 年 3 月</del>
弦牧 美和	早稲田大学理 工学術院物理 学科	研究補助 員	研究補助	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

木下グループ(1分子操作に適した分子機械の改変と精製)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
木下 一彦	早稲田大学理 工学部物理学 科	教授	分子機械改変と精製分 子操作支援システムの 開発	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
足立 健吾	早稲田大学理 工学部物理学 科	客員講師	分子機械改変と精製分 子操作支援システムの 開発	平成 15 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

岡本 哲明	早稲田大学理工学部物理学	客員講師	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成18年4月～平成19年9月
古池 晶	早稲田大学理工学部物理学	客員講師	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成18年4月～平成20年3月
昆 理恵子	早稲田大学理工学部物理学	客員助手	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成18年11月～平成20年3月
Md. Yusuf Ali	Shahjalal University of Science and Technology	助教授	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成15年4月～平成20年3月
伊藤 博康	早稲田大学理工学部物理学(兼任)	客員研究員	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成15年4月～平成20年3月
篠原 明梨	早稲田大学理工学術院物理学(兼任)	嘱託	分子機械改変と精製分子操作支援システムの開発	平成19年2月～平成20年3月
弦牧 美和	早稲田大学理工学術院物理学(兼任)	嘱託	研究補助	平成18年4月～平成20年3月

宗行グループ(回転分子モーターのポテンシャル分布計測)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
宗行 英朗	中央大学理工学部物理学	准教授	分子モーターの回転トルク直接計測	平成17年4月～平成20年3月
中山 隆宏	東京工業大学資源化学研究所	博士課程学生(D3)	分子モーターの回転トルク直接計測	平成17年4月～平成20年3月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Md. Yusuf Ali (Shahjalal University of Science and Technology 助教授)	ミオシンモーターに関する共同実験	岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター・分子生理(木下)研究室	平成15年10月～平成16年1月

6 成果発表等

**(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 17 件)**

1. Ryohei Yasuda, Tomoko Masaike, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Hiroyasu Itoh, and Kazuhiko Kinosita, Jr.  
“The ATP-waiting conformation of rotating F<sub>1</sub>-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2003
2. Hiroyasu Itoh, Akira Takahashi, Kengo Adachi, Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita, Jr.  
“Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase”  
*Nature*, 427, 2004
3. Naoyoshi Sakaki, Rieko Shimo-Kon, Kengo Adachi, Hiroyasu Itoh, Shou Furuike, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita, Jr.  
“One rotary mechanism for F<sub>1</sub>-ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar ”  
*Biophys. J.*, 88 ,2005
4. Kazuhiko Kinosita, Jr., Kengo Adachi, and Hiroyasu Itoh  
“Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: How an ATP-driven molecular machine may work”  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33 , 2004
5. M. Yusuf Ali, Kazuaki Homma, Atsuko Hikikoshi Iwane, Kengo Adachi, Hiroyasu Itoh, Kazuhiko Kinosita Jr., Toshio Yanagida, and Mitsuo Ikebe  
“Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors”  
*Biophys. J.*, 86 ,2004
6. Yoko Hirono-Hara, Koji Ishizuka, Kazuhiko Kinosita, Jr., Masasuke Yoshida, and Hiroyuki Noji  
“Activation of pausing F<sub>1</sub> motor by external force”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 ,2005
7. Hiroshi Ueno, Toshiharu Suzuki, Kazuhiko Kinosita, Jr., and Masasuke Yoshida  
“ATP-driven stepwise rotation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 , 2005
8. Katsuya Shimabukuro, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida  
“An Alternative Reaction Pathway of F<sub>1</sub>-ATPase Suggested by Rotation without 80°/40° Substeps of a Sluggish Mutant at Low ATP.”  
*Biophys. J.* 90 (3), 2006
9. Sanjay Bandyopadhyay, Eiro Muneyuki, William S. Allison  
“The Characteristics of the ( V<sup>371</sup>C)<sub>3</sub>( R<sup>337</sup>C)<sub>3</sub> Double Mutant Subcomplex of the TF<sub>1</sub>-ATPase Indicate that the Catalytic Site at the TP- TP Interface with Bound MgADP in Crystal Structures of MF<sub>1</sub> Represents a Catalytic Site Containing Inhibitory MgADP.”  
*Biochemistry*, 44 (7), 2005

10. Naoyoshi Sakaki, Rieko Shimo-Kon, Kengo Adachi, Hiroyasu Itoh, Shou Furuike, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita Jr.  
 "One Rotary Mechanism for F<sub>1</sub>-ATPase over ATP Concentrations from Millimolar down to Nanomolar."  
*Biophys J.* 88 (3), 2005
11. Mohammad Delawar Hossain, Shou Furuike, Yasushi Maki, Kengo Adachi, M. Yusuf Ali, Mominul Huq, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, and Kazuhiko Kinosita Jr.  
 "The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase is dispensable for torque generation"  
*Biophys J.*, 90 ,2006
12. Yukihiro Sugiyama, Yuji Inoue, Eiro Muneyuki, Hajime Haneda and Masayuki Fujimoto  
 "AFM and TEM observations of a helix to  $\beta$  sheet conformational change occurring on carbon nanotubes."  
*J. Electron Microsc.*, 55 ,2006
13. Yushi Matsumoto, Eiro Muneyuki, Daisuke Fujita, Kimitoshi Sakamoto, Hideto Miyoshi, Masasuke Yoshida, Tatsushi Mogi  
 "Kinetic mechanism of quinol oxidation by cytochrome *bd* studied with ubiquinone-2 analogs."  
*J. Biochem.*, 139 ,2006
14. Eiro Muneyuki, Takahiro Watanabe-Nakayama, Tetsuya Suzuki, Masasuke Yoshida, Takayuki Nishizaka, Hiroyuki Noji  
 "Single Molecule Energetics of F<sub>1</sub>-ATPase Motor."  
*Biophys J*, 92 ,2007
15. Kengo Adachi, Kazuhiro Oiwa, Takayuki Nishizaka, Shou Furuike, Hiroyuki Noji, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinosita Jr.  
 "Coupling of Rotation and Catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase Revealed by Single-Molecule Imagine and Manipulation"  
*Cell*, 130, 2007
16. Ariga Takayuki, Muneyuki Eiro, Yoshida Masasuke  
 "F<sub>1</sub>-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. "  
*Nat Struct Mol Biol.*, 14, 2007
17. Shou Furuike, Mohammad Delawar Hossain, Yasushi Maki, Kengo Adachi, Tsohiharu Suzuki, Ayako Kohori, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, Kazuhiko Kinosita Jr.  
 "Axle-less F<sub>1</sub>-ATPase Rotates in the Correct Direction "  
*Science*, 319, 2008
18. Takahiro Watanabe-Nakayama, Shoichi Toyabe, Seishi Kudo, Shigeru Sugiyama, Masasuke Yoshida ,Eiro Muneyuki  
 "Effect of external torque on the ATP-driven rotation of F<sub>1</sub>-ATPase "  
*Biochem Biophys Res Commun*, 366, 2008

## (2)その他の著作物 (総説、書籍など)

1. 伊藤博康  
“ATPase の機械的な逆回転による A T P の化学合成”  
化学と工業、57 ( 12 )、1288-1290、日本化学会、2004
2. 伊藤博康  
“F<sub>1</sub>-ATPase を働かせる：くるくる回して、A T P を合成する”  
生物物理 44 ( 4 )、184-187、日本生物物理会、2004
3. 伊藤博康  
“分子モーター ( F<sub>1</sub>-ATPase ) の逆回転による A T P 合成”  
日本物理学会誌、59 ( 7 )、464-467、日本物理学会、2004
4. 伊藤博康  
“F<sub>1</sub>-ATPase による A T P の力学的な合成”  
生化学、77 ( 1 )、42-45、生化学会、2005
5. 伊藤博康  
“ATP 合成装置を働かせる”  
パリティ、20 ( 01 )、62-66、日本生物物理会、2005
6. 伊藤博康  
“F<sub>1</sub>-ATPase を働かせる：強制的な逆回転による ATP の合成”  
生体の科学、56 ( 4 )、351-356、( 財 )金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院、  
2005
7. Kazuhiko Kinoshita, Jr., Katsuyuki Shiroguchi, M. Yusuf Ali, Kengo Adachi, and  
Hiroyasu Itoh  
“On the walking mechanism of linear molecular motors”  
*Adv. Exp. Med. Biol.*, 592 ,369-384, 2006

## (3)学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演 (国内会議 8 件、国際会議 16 件)

1. 伊藤博康 (浜松ホトニクス (株))  
“ATPase の機械的な逆回転による A T P の化学合成、一分子工学：どこまで、効  
率の見積もりにせまれるか”  
CREST「高度情報処理・通信の実現に向けたナノファクトリーとプロセス観測」、  
姫路、2004/04
2. Hiroyasu Itoh (Hamamatsu Photonics, )  
“Single molecule dynamics of F<sub>1</sub>-ATPase:Mechanical synthesis of ATP by  
F<sub>1</sub>-ATPase”  
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science、横浜、2004/04



3. 伊藤博康 (浜松ホトニクス (株))  
 “蛋白質分子モーターによるナノメカニカルマシンの創製”  
 第6回分子ダイナミック分光ワークショップ『生体複雑系への手掛かりを求めて』、  
 浜松、2004/07
4. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “How ATP Produces Force and How Force Produces ATP”  
 th European Symposium of The Protein Society, Barcelona, 2005/04-05
5. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “F<sub>1</sub>-ATPase : a rotary motor/generator.”  
 Nobel Symposium 131, Sweden ,2005/06
6. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “F<sub>1</sub>-ATPase: A Molecular Transducer of Chemical and Mechanical Energies”  
 Alfred Nobel Symposium, Sweden, 2005/06
7. 木下一彦 (早稲田大学)  
 “ブラウン運動と生物 (現代物理は生物をどう捉えているか)”  
 早稲田大学 21世紀 COE プログラム セミナー, 東京, 2005/08
8. 木下一彦 (早稲田大学)  
 “たんぱく質分子機械の働く仕組み”  
 第15回バイオ・高分子シンポジウム, 東京, 2005/08
9. 木下一彦 (早稲田大学)  
 “たんぱく質分子モーターが働く仕組み”  
 第4回ナノサイエンス・サマー道場「ナノバイオサイエンスの基礎と応用」, 長野,  
 2005/08
10. 木下一彦 (早稲田大学)  
 “分子モーター”  
 第2回インビトロジェンシンポジウム - バイオサイエンスの最先端 -, 神奈川,  
 2005/09
11. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “Mechanism of Chemo-Mechanical Coupling in Biological Molecular Motors”  
 Conference and Mid Term Review Meeting of the EU-Project BIOMACH ,  
 Switzerland, 2005/09
12. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “Chemomechanical Energy Transduction in Protein Machines”  
 The 20<sup>th</sup> Nishinomiya-Yukawa Memorial Symposium Self-Organized  
 Structures and Dynamics far from Equilibrium , Hyogo, 2005/10
13. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “How Two-Foot Molecular Motors May Walk”  
 The 33<sup>rd</sup> NIPS Confernce , Okazaki, 2005/10
14. 木下一彦 (早稲田大学)  
 “たんぱく質分子機械の働く仕組み”

応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会, 東京, 2005/11

15. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)  
“ナノバイオテクノロジー・分析から構築の科学へ：ソフトナノマシンシステムの創製”  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005/12
16. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“How Two-Foot Molecular Motors May Walk?”  
中央研究院物理研究所 Colloquium, 台湾, 2005/12
17. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Mechanism of Chemo-Mechanical Energy Transduction in a Rotary Molecular Motors Revealed by Single-Molecule Physiology”  
中央研究院物理研究所 Seminar, 台湾, 2005/12
18. 木下一彦 (早稲田大学)  
“Interconversion of Chemical and Mechanical Energies in Biological Motors”  
21<sup>st</sup> Century COE Program International Symposium (2006/01)・Osaka
19. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Probing Nature's Nanoscale Machines with Microscale Probes”  
National Lecture, 50th Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2006/02
20. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Chemo-Mechanical Energy Transduction in a rotary molecular motor F<sub>1</sub>-ATPase”  
Work, Dissipation, and Fluctuations in Nonequilibrium Physics, Bruxelles, 2006/03
21. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Single-Molecule Physiology on Protein Machines.”  
Chemical Biophysics Symposium, Canada, 2006/4
22. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Single-Molecule Physiology of Protein Motors”  
Nanobiophysics, Hungary, 2006/9
23. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Single-Molecule physiology of protein machines”  
Frontiers in Biophysics: Modeling and Experiment, Canada, 2006/10
24. Kazuhiko Kinosita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Probing motor dynamics with huge and small tags”  
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11

口頭発表 (国内会議 14件、国際会議 5件)

1. 伊藤 博康 (浜松ホトニクス株)  
“Mechanical synthesis of ATP”

第 7 回細胞膜研究フォーラム・細胞膜の 1 分子ナノテクノロジーに関する国際会議  
名古屋, 2003/08

2. Hiroyasu ITOH(Hamamatsu Photonics), Hiroyuki Noji(University of Tokyo), Masasuke Yoshida(Tokyo Institute of Technology), Kazuhiko Kinoshita, Jr.( Okazaki National Research Institute)  
“ATP Synthesis by Reverse Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase”  
47th Annual Meeting of The Biophysical Society, San Antonio, USA, 2003/3
3. 榊直由 (岡崎国立研究機構) 下理恵子 (岡崎国立研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 足立健吾 (岡崎国立研究機構) 古池晶 (岡崎国立研究機構) 宗行英朗 (東京工業大学) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (岡崎国立研究機構)  
“低 ATP 濃度における F<sub>1</sub>-ATPase の回転”  
2004 年生体運動研究合同班会議、東京、2004/01
4. 下理恵子 (岡崎国立研究機構) 宗行英朗 (東京工業大学) 榊直由 (岡崎国立研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 足立健吾 (岡崎国立研究機構) 古池晶 (岡崎国立研究機構) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (岡崎国立研究機構)  
“NC 変異体を用いた F<sub>1</sub>-ATPase の活性とヌクレオチド結合数の関係”  
2004 年生体運動研究合同班会議、東京、2004/01
5. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 木下一彦 (岡崎国立研究機構)  
“Mechanically-driven ATP synthesis”  
2004 年生体運動研究合同班会議、東京、2004/01
6. H. Itoh (Hamamatsu Photonics), K. Adachi (Okazaki Natl Res Inst), H. Noji (Univ Tokyo), M. Yoshida (Tokyo Inst Tech), K. Kinoshita, Jr. (Okazaki Natl Res Inst)  
“Efficiency of mechanical ATP synthesis by clockwise rotation of F<sub>1</sub>-ATPase”  
48th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, USA, 2004/02
7. H. Itoh (Hamamatsu Photonics)  
“Mechanically Driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase”(as selected paper)  
Gordon Research Conferences Molecular & Cellular Bioenergetics, USA, 2004/06
8. 古池晶 (自然科学研究機構) 榊直由 (自然科学研究機構) 足立健吾 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動の温度依存性”  
2005 年生体運動研究合同班会議、大阪、2005/01
9. 足立健吾 (自然科学研究機構) 西坂崇之 (学習院大学) 島袋勝弥 (ERATO ATP System) 野地博行 (東京大学) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 大岩和弘 (関西先端研究センター) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転と ATP 結合・解離のメカニズム”  
2005 年生体運動研究合同班会議、大阪、2005/01
10. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)

“F<sub>1</sub>-ATPase における共役の実証とその仕組み”  
分子研研究会 生体分光学と分子イメージングの最前線、岡崎、2005/01

11. 木下一彦 (早稲田大学)  
“二本足の分子モーターが『歩く』仕組み”  
日本生物物理学会第 43 回年会、札幌、2005/11
12. 宗行英朗 (中央大学)  
“ラチェットのな描像と F<sub>1</sub>-ATPase の 1 分子計測とエネルギー論”  
日本生物物理学会第 43 回年会、札幌、2005/11
13. 中山隆宏 (東京工業大学)、宗行英朗 (中央大学)、杉山滋 (食品総合研究所)、工藤成史 (桐蔭横浜大)、吉田賢右 (東京工業大学)  
“回転電場を使って F<sub>1</sub> モーターに回転力を加える”  
生体運動研究合同班会議、東京、2005/11
14. 城口克之 (早稲田大学)、木下一彦 (早稲田大学)  
“ミオシン V の ‘足’ の動き”  
生体運動研究合同班会議、東京、2006/01
15. Mohammad Delawar Hossain (Waseda Univ., Physics SUST, Physics BUET), Shou Furuike (Waseda Univ.), Yasushi Maki (Waseda Univ.), Kengo Adachi (Waseda Univ.), Md. Yusuf Ali (Physics SUST), Mominul Huq (Physics BUET), Kazuhiko Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“A Study on the  $\gamma_3\gamma_3$  complex of F<sub>1</sub>-ATPase with short subunit”  
生体運動研究合同班会議、東京、2006/01
16. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)  
“タンデム F<sub>1</sub>-ATPase の回転アッセイの試み”  
2005 年度べん毛交流会、群馬、2006/03
17. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の機械的な逆回転による ATP 合成”  
酵素工学会第 55 回講演会、京都、2006/4
18. 中山 (渡部) 隆宏 (東京工業大学)、宗行英朗 (中央大学)、杉山滋 (食品総合研究所)、工藤成史 (桐蔭横浜大学)、吉田賢右 (東京工業大学)  
“外部トルク存在下での F<sub>1</sub> モーターの回転”  
2007 年 生体運動研究合同班会議、金沢、2007 /1
19. 宗行英朗 (中央大学)、関本謙 (パリ第 7 大学)  
“二つのラチェットを連結した、自律的な自由エネルギー変換モデル”  
日本物理学会 2007 年春季大会、鹿児島、2007/3

ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 21 件)

1. Takayuki Nishizaka(Kansai Advanced Research Center), Kazuhiro Oiwa(Kansai Advanced Research Center), Hiroyuki Noji(Tokyo University), Shigeki

- Kimura(Kansai Advanced Research Center), Kazuhiko Kinosita, Jr.( Okazaki National Research Institutes)  
 “Observation Of Nucleotide Kinetics in F<sub>1</sub>-ATPase”  
 47th Annual Meeting of The Biophysical Society, San Antonio,USA,2003/3
2. Kengo Adachi(Okazaki Natl Res Inst), Takayuki Nishizaka(Okazaki Natl Res Inst), Hiroyuki Noji(Univ Tokyo), Hiroyasu Itoh(Hamamatsu Photonics), Kazuhiro Oiwa(Kansai Adv Res Ctr), Masasuke Yoshida(Tokyo Inst Tech), Kazuhiko Kinosita(Okazaki Natl Res Inst)  
 “Imaging Of Multisite Catalysis In F<sub>1</sub>-ATPase”  
 47th Annual Meeting of The Biophysical Society, San Antonio,USA,2003/3
  3. 野地博行(東京大学) 黒田綾(東京大学) 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 足立健吾(岡崎国立研究機構) 吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “F<sub>1</sub> モーターの回転ポテンシャルの実測”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  4. 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 足立健吾(岡崎国立研究機構) 野地博行(東京大学) 吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “ATP の力学的な合成”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  5. 下理恵子(岡崎国立研究機構) 宗行英朗(東京工業大学) 井合健太郎(東京工業大学) 榊直由(岡崎国立研究機構) 足立健吾(岡崎国立研究機構) 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 古池晶(岡崎国立研究機構) 牧泰史(岡崎国立研究機構) 吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “ NC 変異体を用いた F<sub>1</sub>-ATPase のヌクレオチド結合数と回転速度の測定”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  6. 足立健吾(岡崎国立研究機構) 西坂崇之(学習院大学) 野地博行(東京大学) 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 大岩和弘、吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “F<sub>1</sub>-ATPase の回転と multistite catalysis の 1 分子イメージング”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  7. 榊直由(岡崎国立研究機構) 下理恵子(岡崎国立研究機構) 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 足立健吾(岡崎国立研究機構) 古池晶(岡崎国立研究機構) 宗行英朗(東京工業大学) 吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “極低 ATP 濃度における F<sub>1</sub>-ATPase の回転”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  8. 古池晶(岡崎国立研究機構) 榊直由(岡崎国立研究機構) 足立健吾(岡崎国立研究機構) 伊藤博康(浜松ホトニクス株) 下理恵子(岡崎国立研究機構) 吉田賢右(東京工業大学) 木下一彦(岡崎国立研究機構)  
 “F<sub>1</sub>-ATPase 回転運動の温度依存性”  
 日本生物物理学会第 41 回年会、新潟、2003/09
  9. Kengo Adachi (Okazaki Natl Res Inst) ,T. Nishizaka (Gakushuin Univ), H. Noji (Univ Tokyo), H. Itoh (Hamamatsu Photonics), K. Oiwa (Kansai Adv Res Ctr), M. Yoshida (Tokyo Inst Tech), K. Kinosita, Jr. (Okazaki Natl Res Inst)

“Single-molecule Imaging of the rotation and multisite catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase”  
48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, USA, 2004/02

10. Shou Furuike (Okazaki Natl Res Inst), N. Sakaki (Okazaki Natl Res Inst), K. Adachi (Okazaki Natl Res Inst), H. Itoh (Hamamatsu Photonics), R. Shimo (Okazaki Natl Res Inst), M. Yoshida (Tokyo Inst Tech), K. Kinosita, Jr. (Okazaki Natl Res Inst)  
“Temperature Dependence of the Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase”  
48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, USA, 2004/02
11. Naoyoshi Sakaki (Okazaki Natl Res Inst), R. Shimo-Kon (Okazaki Natl Res Inst), H. Itoh (Hamamatsu Photonics), K. Adachi (Okazaki Natl Res Inst), S. Furuike (Okazaki Natl Res Inst), E. Muneyuki (Tokyo Inst Tech), M. Yoshida (Tokyo Inst Tech), K. Kinosita, Jr. (Okazaki Natl Res Inst)  
“Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase at Very Low ATP Concentrations”  
48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, USA, 2004/02
12. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)  
“一分子レベルでの観測による分子機械の新しい機能の発見と、その工学応用への夢”  
第2回ナノテクノロジー総合シンポジウム、東京、2004/03
13. H. Itoh (Hamamatsu Photonics), K. Adachi (National Institutes of Natural Sciences), H. Noji (Tokyo Univ), K. Kinosita, Jr. (National Institutes of Natural Sciences)  
“Mechanically Driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase”  
Shanghai International Conference on Physiological Biophysics, China, 2004/06
14. 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 宗行英朗 (東京工業大学) 井合健太郎 (東京工業大学) 榊直由 (自然科学研究機構) 足立健吾 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 古池晶 (自然科学研究機構) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“NC 変異体を用いた F<sub>1</sub>-ATPase のヌクレオチド結合数と回転速度”  
日本物理学会 2004 年秋期季大会、青森、2004/09
15. 足立健吾 (自然科学研究機構) 西坂崇之 (学習院大学) 島袋勝弥 (ERATO ATP System) 野地博行 (東京大学) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 大岩和弘、吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転と ATP 結合・解離の協同的なメカニズム”  
日本物理学会 2004 年秋期季大会、青森、2004/09
16. 古池晶 (自然科学研究機構) 榊直由 (自然科学研究機構) 足立健吾 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転機構の温度依存性”  
日本物理学会 2004 年秋期季大会、青森、2004/09
17. 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 宗行英朗 (東京工業大学) 榊直由 (自然科学研究機構) 足立健吾 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス株) 古池晶 (自然科学研究機構) 井合健太郎 (東京工業大学) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)



- “ NC 変異を導入した F<sub>1</sub>-ATPase のヌクレオチド結合数と ATPase 加水分解活性”  
日本生物物理学会第 4 2 回年会、京都、2004/12
18. 足立健吾 (自然科学研究機構) 西坂崇之 (学習院大学) 島袋勝弥 (ERATO ATP System) 野地博行 (東京大学) 伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 大岩和弘 (関西先端研究センター) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
「F<sub>1</sub>-ATPase の回転と ATP 結合・解離のメカニズム」  
日本生物物理学会第 4 2 回年会、京都、2004/12
19. 榊直由 (自然科学研究機構) 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 足立健吾 (自然科学研究機構) 古池晶 (自然科学研究機構) 宗行英朗 (東京工業大学) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“極低 ATP 濃度における F<sub>1</sub>-ATPase の回転とトルク”  
日本生物物理学会第 4 2 回年会、京都、2004/12
20. 古池晶 (自然科学研究機構) 榊直由 (自然科学研究機構) 足立健吾 (自然科学研究機構) 伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 下 - 昆理恵子 (自然科学研究機構) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (自然科学研究機構)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動の温度依存性(2)”  
日本生物物理学会第 4 2 回年会、京都、2004/12
21. Digambara Patra (JSPS)、伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 木下一彦 (早稲田大学)  
“Optimization of ADP and Pi concentrations during mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase”  
日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11
22. 足立健吾 (早稲田大学) 西坂崇之 (学習院大学) 野地博行 (大阪大学) 伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 大岩和弘 (関西先端研究センター) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (早稲田大学)  
“ヌクレオチドが結合・解離しやすい F<sub>1</sub>-ATPase の の角度”  
日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11
23. 古池 晶 (早稲田大学) 足立健吾 (早稲田大学) 榊 直由 (東京大学) 伊藤博康 (浜松ホトニクス(株)) 下 - 昆理恵子 (早稲田大学) 吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (早稲田大学)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動の温度依存性 ( 3 )”  
日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11
24. Mohammad Delawar Hossain (早稲田大学、Physics SUST, Physics BUET)、古池晶 (早稲田大学) 牧 泰史 (新潟大学) 足立健吾 (早稲田大学) Md. Yusuf Ali (Shahjalal Univ)、Mominul Huq (Bangladesh Univ)、吉田賢右 (東京工業大学) 木下一彦 (早稲田大学)  
“F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動における サブユニットの役割 C 未側 ヘリックスの長さとの関係”  
日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11
25. 城口克之 (JSPS) 木下一彦 (早稲田大学)  
“ミオシン の足の動きを見る”

日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11

26. 下 昆理恵子 (早稲田大学)、宗行英朗 (中央大学)、榊 直由 (東京大学)、足立健吾 (早稲田大学)、古池 晶 (早稲田大学)、酒井 坦 (静岡県立大学)、吉田賢右 (東京工業大学)、木下一彦 (早稲田大学)  
“NC 変異を導入した  $F_1$ -ATPase の ATP 加水分解機構”  
日本生物物理学会 第 43 回年会、札幌、2005/11
27. 中山 (渡部) 隆宏 (東京工業大学)、宗行英朗 (中央大学)、杉山滋 (食品総合研究所)、工藤成史 (桐蔭横浜大)、吉田賢右 (東京工業大学)  
“外部導入回転力に対する  $F_1$ -ATPase の挙動”  
日本生体エネルギー研究会 第 31 回討論会、名古屋、2005/12
28. Hiroyasu Itoh (Hamamatsu Photonics), K. Adachi (Waseda Univ.), R. Shimo-Kon (Waseda Univ.), S. Furuike (Waseda Univ.), R. Takatsuki (JST), Y. Kusa (JST), T. Suzuki (Tokyo University of Science), M. Yoshida (Tokyo Institute of Technology), K. Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Rotational Catalysis Examination of Tandem  $F_1$ -ATPase”  
50<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2006/02
29. Katsuyuki Shiroguchi (JSPS), K. Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Watching Leg Motion in Walking Myosin (2)”  
50<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2006/02
30. Rieko Shimo-Kon (Waseda Univ.), E. Muneyuki, (Chuo Univ.), K. Adachi (Waseda Univ.), S. Furuike (Waseda Univ.), M. Yoshida (Tokyo Institute of Technology), K. Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Catalytic Site Occupancy and Rotation of  $F_1$ -ATPase That Lacks Non-Catalytic Nucleotide Binding Site.”  
50<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2006/02
31. 伊藤博康 (浜松ホトニクス株)  
“ $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP の合成”  
科学技術振興機構 ナノテクノロジ分野別バーチャルラボ成果報告会(2006/7)・東京
32. Muneyuki, E. (Chuo Univ.), Watanabe-Nakayama, T. (Tokyo Tech.), Yoshida, M. (Tokyo Tech.), Sugiyama, S. (NFRI), and Kudo, S. (Chuo Univ.)  
“Application of External Torque to Rotating  $F_1$ -ATPase by Electrorotation”  
特定領域研究「生体ナノシステムの制御」松島国際会議、宮城、2006/9
33. Shou Furuike (Waseda Univ.), Kengo Adachi (Waseda Univ.), Megumu Shio (JST ERATO ATP System), Naoyoshi Sakaki (Univ. of Tokyo), Rieko Shimo-Kon (Waseda Univ.), Hiroyasu Itoh (Hamamatsu Photonics), Masasuke Yoshida (Tokyo Tech.), Kazuhiko Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Rotation rate of  $F_1$ -ATPase increase from 10 to 2000 over the temperature range of 5 -65 °C”  
Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
34. Kengo Adachi (Waseda Univ.), Takayuki Nishizaka (Gakushuin Univ.),

- Hiroyasuyuki Noji(Osaka Univ.), Hiroyasu Itoh(Hamamatsu Photonics & CREST), Kazuhiro Oiwa(Kansai Adv Res Ctr), Masasuke Yoshida(Tokyo Inst Tech & ERATO), Kazuhiko Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
 “Angle Dependent Affinity of Rotary F<sub>1</sub>-ATPase for Nucleotides”  
 Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
35. Mohammad D. Hossain(Waseda Univ., Shahjalal Univ. ,Bangladesh Univ.), Shou Furuike(Waseda Univ.), Yasushi Maki(Osaka Medical College), Kengo Adachi(Waseda Univ.), Yasuf M. Ali(Shahjalal Univ.), Mominul Huq (Bangladesh Univ.), Kazuhiko Kinoshita, Jr.(Waseda Univ.)  
 “F<sub>1</sub>-ATPase with a Truncated Rotor”  
 Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
36. Takahiro Nakayama-Watanabe(Tokyo Tech.), Eiro Muneyuki(Chuo Univ.), Seishi Kudo(Toin Univ. of Yokohama), Shigeru Sugiyama(NFRI), Masasuke Yoshida(Tokyo Tech.)  
 “The behavior of F<sub>1</sub> motor in the presense of the uniform external torque applied with electrorotation”  
 Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
37. Satoko Shibano(Gakushuin Univ.), Eiro Muneyuki(Chuo Univ.), Tomoko Masaike(Gakushuin Univ.), Kaoru Okada(Gakushuin Univ.), Masasuke Yoshida(Tokyo Institute of Technology), Takayuki Nishizaka(Gakushuin Univ. , PRESTO JST)  
 “Characterization of interaction between b- and g-subunit in F<sub>1</sub>-ATPase using twisted g mutant”  
 Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
38. Eiro Muneyuki(Chuo Univ.), Ken Sekimoto(Universite Paris)  
 “A model of reversible molecular machine for free energy transduction”  
 Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, 2006/11
39. 中山隆宏(東京工業大学)、宗行英朗(中央大学)、杉山滋(食品総合研究所)、  
 工藤成史(桐蔭横浜大学)、吉田賢右(東京工業大学)  
 “外部トルク存在下での F<sub>1</sub> モーターの挙動”  
 日本生体エネルギー研究会 第 32 回討論会「エネルギー変換の多様性」  
 東京、2006/12
40. Eiro Muneyuki(Chuo Univ.), Takahiro Watanabe-Nakayama(Tokyo Tech.), Masasuke Yoshida(Tokyo Tech.), Shigeru Sugiyama(NFRI), and Seishi Kudo(Toin Univ. of Yokohama)  
 “Effect of external torque on the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase motor”  
 第 4 回「水と生体分子」公開ワークショップ、京都、2006/12
41. Shou Furuike(Waseda Univ.),Kengo Adachi(Waseda Univ.),Megumu Shio (JST ERATO ATP System), Rieko Shimo-Kon (WasedaUniv.), Hiroyasu Itoh (Hamamatau Photonics,JST CREST), Masasuke Yoshida(Tokyo Institute of

Technology, JST ERATO), Kazuhiko Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“How Fast can F<sub>1</sub>-ATPase rotate”  
The 5<sup>th</sup> International Symposium on Nanotechnology JAPAN NANO 2007,  
Tokyo, Japan, 2007/2

42. Hiroyasu Itoh (Hamamatsu Photonics, JST CREST),  
“Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase”  
CREST Soft Nanomachine Project - Symposium on Biological Transport and  
Nanomachines, Japan, 2007/10
43. 伊藤博康(浜松ホトニクス株, JST CREST)  
“回転軸部分がなくても F<sub>1</sub>-ATP は回転する”  
ナノテクノロジー - 分野別パナチカルホ 成果報告会 ナノテ・未来への挑戦, 東京, 2008/1
44. Kengo Adachi (Waseda Univ.), Kazuhiro Oiwa (Kobe Advanced Research Center),  
Takayuki Nishizaka (Gakushuin Univ.), Hiroyuki Noji (Osaka Univ.), Hiroyasu  
Itoh (Hamamatsu Photonics KK, JST CREST), Masasuke Yoshida (Tokyo  
Institute of Technology, JST ICORP), Kazuhiko Kinoshita, Jr. (Waseda Univ.)  
“Angle Dependence of Nucleotides Affinity in Rotary Motor F<sub>1</sub>-ATPase”  
52<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2008/2
45. Shou Furuie (Waseda Univ.), Mohammad Delawar Hossain (Waseda Univ.,  
Shahjalal Univ. of Science and Technology), Yasushi Maki (Osaka Medical  
College), Kengo Adachi (Waseda Univ.), Toshiharu Suzuki (Tokyo Institute of  
Technology, JST ICORP), Ayako Kohori (Waseda Univ.), Hiroyasu  
Itoh (Hamamatsu Photonics KK, JST CREST), Masasuke Yoshida (Tokyo  
Institute of Technology, JST ICORP), Kazuhiko Kinoshita Jr. (Waseda Univ.)  
“F<sub>1</sub>-ATPase without a Rotary Shaft can Still Rotate in the Correct Direction”  
52<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, USA, 2008/2

#### (4) 特許出願

国内出願 (1 件)

1. “分子モーターを結合する方法”  
発明者: 伊藤博康  
出願人: 浜松ホトニクス株式会社  
出願日: 2005 年 12 月 7 日  
出願番号: 2005-0908  
公開日: 2007 年 6 月 21 日  
公開番号: 2007-151498

海外出願 ( 件)

- 1.
- 2.
- ...

#### (5) 受賞等

受賞

1. 木下 一彦  
 “光学顕微鏡を用いた1分子生理学の創成”  
 第38回(2006年度)内藤記念科学振興賞、財団法人 内藤記念科学振興財団

新聞報道等

1. 2005年ノーベル賞有力候補一覧 注目される科学者と研究成果を一挙紹介  
 Newton、2005/11、P80
2. 技術トレンド本社調査 最高点は東工大・浜松ホトニクス 生物のエネルギー合成  
 日本経済新聞、2004/12/27、19面
3. 力学 化学エネルギー変換など 最新の成果発表  
 科学新聞、2004/4/9、7面
4. 生物のエネルギー源 ATP合成法を実証  
 読売新聞、2004/2/3、33面
5. 生物のエネルギー合成 人工的に再現 東工大と浜松ホトニクス  
 日本経済新聞、2004/1/29、15面
6. 分子モーターのエネルギー変換機能「逆回転も可」を確認 浜松ホトなど5機関共同で  
 日本工業新聞、2004/1/29
7. 細胞が作るエネルギー『ATP』 人工合成に初成功 浜松ホトニクスなど  
 中日新聞、2004/1/29、33面
8. 生命活動のエネルギー源「アデノシン3リン酸」人工合成に成功浜松ホトニクス“分子の機械”へ応用期待  
 日刊工業新聞、2004/1/29
9. 「たんぱくモーター」制御ATP合成に成功 浜松ホトニクス  
 日経産業新聞、2004/1/29
10. 浜松ホトニクス研究者ら 生命エネルギー合成再現 英科学誌に発表 分子モーター回転で成功  
 静岡新聞、2004/1/29

その他

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要

--	--	--	--	--

## 8 研究成果の展開

### (1)他の研究事業への展開

特になし

### (2)実用化に向けた展開

特になし

## 9 他チーム、他領域との活動とその効果

### (1)領域内の活動とその効果

特になし

### (2)領域横断的活動とその効果

特になし

## 10 研究成果の今後の貢献について

### (1)科学技術の進歩が期待される成果

本研究では、 $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP の合成の実証を行った。基礎科学的な観点からは、分子機械を人為的に操作による力学的なエネルギーの化学エネルギーへの直接変換の最初の例である。いいかえると、 $F_1$  という化学 - 力学エネルギー変換分子機械の中に、一ヶ所に力を加えるだけで完全に逆行可能となるような巧妙な仕掛けがあることを、実験的に示すことができたのである。また、タンパク質機械のたった一点にある向きの力（トルク）をかけるだけで、そこから物理的に離れている触媒部位での反応を制御して、平衡状態からはるかに離れたところまで反応を駆動出来たということを示したことは、確かに、タンパク質の構造変化と機能の発現のメカニズムを直接説明したばかりでなく、分子機械の工業利用の可能性を示したことになる。

### (2)社会・経済の発展が期待される成果

研究は中途であるが、成果は、一分子工学という新しい学問分野の礎になったものと期待している。近い将来、分子機械を利用したセンサー、あるいは、他の分子機械の駆動エネルギー源として利用される日がくると期待している。また、光技術を基盤とした、プローブの選別や精製、あるいは、微細加工技術は、ナノテクノロジーの支援技術として発展するものと期待している。

## 11 結び

プロジェクトの第1の目標は、 $F_1$ -ATPase の強制的な逆回転による ATP 合成の実証であり、この部分は、完璧に達成できた。原論文での発表の後、国内雑誌への投稿依頼が予想を超えて多かったため（7報/年）、時間を多く費やしてしまい、本業（研究）に集中できなかったことが悔やまれる。米国の生物物理学会では、報告時の聴衆の多さに驚かされた。この研究成果への興味の高さや、評価につながっているのだと考えている。また、米国の細胞生物学の教科書には、すでに、この研究の意義が設問として加えられている。嬉しい限りである。メーカーの研究者として、この成果の工業利用も果たしたかったが、計画は中途である。研究の継続を望んでいるが、かなうだろうか。チームワーク研究に不慣れなため、プロジェクトに参加して下さった諸氏に、当初は、とまどいを覚えさせてしまったことが反省点である。多くは本意を理解し、それぞれの研究テーマに予想以上の成果をあげていただいた（技術開発面では、成果を形として表現しにくい面もある）。一部は、企業の研究所施設利用という制限のなかで、最大限の研究努力をして頂いたと思う。いろいろとご迷惑

を掛けてしまった。お詫び致します。研究推進に関しては、研究統括他、名古屋事務所の技術参事、事務参事、事務所秘書の理解と多大なるご協力が得られた。感謝しています。プロジェクト中途から契約形態が変わったことには大いにとまどった。個々の事情に沿った予算施行を検討してほしい。