

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651167

研究課題名(和文) 生体・人工ハイブリッド回転ナノモーターの創製

研究課題名(英文) Creation of biological-artificial hybrid rotary nanomotor

研究代表者

飯野 亮太 (Iino, Ryota)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70403003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：回転分子モーターF1-ATPaseの固定子である 3×3リングに回転子として二重鎖DNAを差し込んだハイブリッドモーターDNA-F1を作製した。DNA-F1はATP依存的に一方に大きくバイアスがかかったステップ回転運動をみせた。一方方向性回転の効率の改善や歩留まりの改善が課題として残ったが、ハイブリッド回転ナノモーター創製の足掛かりは達成できた。さらにハイブリッドモーターの新しい材料として腸球菌由来V1-ATPaseの1分子回転観察系を構築し、回転運動の基本特性を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：DNA-F1, a hybrid motor which has double stranded DNA as a rotor inserted into the stator ring of F1-ATPase was generated. Dependent on the energy of ATP, DNA-F1 showed stepping rotation highly biased to the one direction. Although the efficiency of the unidirectionality and the frequency of finding rotation are still low, we have achieved the first step creating hybrid rotary nanomotor. Furthermore, as a material of hybrid motor, we have constructed the single-molecule rotation assay of V1-ATPase from *Enterococcus hirae* and basic properties of rotary dynamics have been revealed.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学

キーワード：ナノマシン 分子モーター 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

F_1 -ATPase (F_1) は ATP 加水分解のエネルギーで回転する世界最小のナノモーターである。 F_1 の基本性能はこれまでに詳細に解析され、1) 水中で自分よりも 100 倍近く大きい物体を回転させることができる、2) 無負荷の状態では 1 分間に 10,000 回転以上の速度で回転する、3) 化学エネルギーと力学エネルギーの変換効率が 100% 近くしかも可逆である、といった驚くべき高い性能が明らかにされている。

さらに、 F_1 が一方向に回転する機構に関しても詳細な研究がなされてきた。 F_1 は α と β が 3 つずつ交互に並んだ固定子リングを形成し、そこに回転子 γ が突き刺さっている。 γ の回転力を発生するのは 3 つの β で、ATP 加水分解に伴い“閉じた”構造と“開いた”構造の間で大きく形を変える。3 つの β が順番を守って形を変えることが γ の一方向への回転運動に必須であり、これを達成するには β と γ の精密な相互作用が必須だとされていた。しかし我々が高速原子間力顕微鏡で検証した結果は異なり、 γ のない $\alpha_3\beta_3$ 固定子リング単独でも 3 つの β は順番を守って構造変化を行うことが明らかになった。この結果は、 F_1 の回転力発生の構造的基盤は $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングに内蔵されていることを意味し、回転子 γ との精密な相互作用は回転運動に必須でないことを示していた。

2. 研究の目的

F_1 の回転子 γ と同程度のナノサイズの物体を固定子 $\alpha_3\beta_3$ リングに差し込み、ATP で駆動するハイブリッド回転ナノモーターを創製して 1 分子計測で性能評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

好熱菌由来 F_1 を用い、 γ の代わりに回転子としては単層カーボンナノチューブ、および二重鎖 DNA を試した。

単層カーボンナノチューブとの複合化については、混合後に透析して界面活性剤を除去する、希釈後遠心分離で複合体のみを上澄みに回収する等の種々の方法を試みた。

DNA との複合化については、 F_1 の固定子リングの γ と相互作用する部位に正電荷を持つアミノ酸残基を多数導入した変異体を多種作製し、DNA の導入効率を紫外可視吸収スペクトル、電気泳動および高速 AFM 観察で評価した。また生化学アッセイにより DNA 導入 F_1 の ATP 加水分解活性を測定し、DNA 導入効率が高くかつ活性を保持している DNA- F_1 をスクリーニングした。得られた DNA- F_1 は、金ナノロッドを回転プローブに用いて 1 分子観察を行った。金ナノロッドを用いたのは、DNA が傾いているだけなのか、真に回転しているのかを区別するためである。

また、 F_1 に変わるハイブリッドモーター作製の材料として腸球菌由来 V_1 -ATPase (V_1)

の 1 分子回転観察系の構築を行った。

4. 研究成果

単層カーボンナノチューブについては、残念ながら F_1 の固定子リングとの複合体は得られなかった。カーボンナノチューブを水溶液中で分散させるために添加されている界面活性剤の影響が強く、固定子リングが解離してしまうためと考えられた。

他方、DNA との複合化は成功した。金ナノロッドによる 1 分子回転観察の結果、ATP 依存的に一方向に大きくバイアスがかかった回転運動を観察することが出来た。しかしながら、① 120° のバックステップが頻繁にみられる、② 回転発見頻度が非常に低い、といった問題があり、論文出版までは至っていない。現在、DNA の塩基配列や一重鎖部の長さ、およびクロスリンカーの種類を変えることでさらなる改善を試みている。

腸球菌由来 V_1 については、1 分子観察用の変異体を大腸菌で発現させ精製する系の構築に成功した。そして回転運動の基本特性を金コロイドをプローブとして用いた 1 分子回転観察で明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hayashi S, Ueno H, Shaikh AR, Uemura M, Kamiya M, Ito Y, Ikeguchi M, Komoriya Y, Iino R, Noji H. Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F_1 -ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations. *J. Am. Chem. Soc.* 2012. 134: 8447-8454. DOI:10.1021/ja211027m (査読有)
- ② Komoriya Y, Ariga T, Iino R, Imamura H, Okuno D, Noji H. Principle role of the arginine finger in rotary catalysis of F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2012. 287: 15134-15142. DOI: 10.1074/jbc.M111.328153 (査読有)
- ③ Watanabe R, Tabata KV, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H. Biased Brownian stepping rotation of F_0F_1 -ATP synthase driven by proton motive force. *Nat. Commun.* 2013 4: 1631. DOI:10.1038/ncomms2631 (査読有)
- ④ Minagawa Y, Ueno H, Hara M, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamato I, Muneyuki E, Noji H, Murata T, Iino R. Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus*

hirae V_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2013 288: 32700-32707. doi: 10.1074/jbc.M113.506329 (査読有)

- ⑤ Iino R, Noji H. Rotary catalysis of the stator ring of F_1 -ATPase. *BBA - Bioenergetics* 2012. 1817: 1732-1739. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.03.011 (査読有)
- ⑥ Iino R, Noji H. Operation mechanism of F_0F_1 -adenosine triphosphate synthase revealed by its structure and dynamics. *IUBMB Life*. 2013. 65: 238-246. DOI: 10.1002/iub.1120 (査読有)
- ⑦ Iino R, *Noji H. Intersubunit coordination and cooperativity in ring-shaped NTPases *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2013. 23: 229-234. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.01.004 (査読有)
- ⑧ *游 慧娟, 飯野亮太. DNA を巻き取る分子リール— F_1 -ATPase のおもちゃー. *生物物理*. 2013 53: 160-161 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ryota Iino. Rotary catalysis of the stator ring of F_1 -ATPase. The 17th European Bioenergetics Conference (EBEC 2012). September 16th, 2012. Freiburg, Germany. (招待講演)
- ② Ryota Iino. Rotary catalysis of the stator ring of F_1 -ATPase, a nanomotor made by protein. 1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN). October 23rd, 2012. Brisbane, Australia. (招待講演)
- ③ Ryota Iino. Operation mechanism of rotary molecular motor F_1 probed by single-molecule techniques. American Physical Society March Meeting 2013. Session G43: Focus Session: Motor dynamics - from Single Molecules to Cells II. March 19th, 2013. Baltimore, USA. (招待講演)
- ④ Ryota Iino. You can observe a lot just by watching motions of individual molecules. Japanese-German Frontiers of Science Symposium. November 1st, 2013. Kyoto, Japan (招待講演)
- ⑤ Ryota Iino. Molecular mechanism of biological nanomachines probed by single-molecule techniques. 12th International Conference on

Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-12). November 7th, 2013. Tsukuba, Japan. (招待講演)

- ⑥ Ryota Iino. Watching and manipulating biomolecules one at a time. PITTCON 2014. PAI-NET Session: Ultrasensitive Analytical Technologies for Biology and Chemistry. March 3rd, 2014. Chicago, USA (招待講演)
- ⑦ 飯野亮太. 生体分子モーターの揺らぎと機能. 高等研究所「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第 2 回研究会. 2013 年 8 月 9 日. 京都 (招待講演)
- ⑧ 飯野亮太. 型顕微鏡を用いたリアルタイム 1 分子イメージング: 蛍光法と暗視野法. 第 51 回生物物理学会年会 オリンパスランチョンセミナー. 2013 年 10 月 28 日. 京都 (招待講演)
- ⑨ 飯野亮太. 金プローブで観た生体分子モーターの動き. 公益財団法人 新世代研究所. 2013 年度第 1 回バイオ単分子研究会. 2013 年 11 月 10 日. 岩手 (招待講演)
- ⑩ 飯野亮太. 天然ナノモーターと人工ナノローターの 1 分子ダイナミクス. 第三回 次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る. 2014 年 1 月 10 日. 札幌 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- ① 飯野亮太 「モータータンパク質」DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「揺らぎ・ダイナミクスと生体機能—物理化学的視点からみた生体分子—」Part III 機能とダイナミクス 第 15 章 1 節 P233-242. 化学同人 2013 10 ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 回転分子モーターV1 の動きを1分子毎に観察：構造が類似する F1 とは異なるユニークな回転特性が明らかに
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/rotary-dynamics-of-molecular-motor-v1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 亮太 (IINO, Ryota)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：70403003

(2) 研究分担者

内橋 貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)

金沢大学・数物科学系・准教授

研究者番号：30326300

(3) 連携研究者

()

研究者番号：