

## 飯野 亮太 (教授) (2014年6月1日着任)

大友 章裕 (助教)

原島 崇徳 (助教)

YU, Yan (学振外国人招へい研究者)

KEYA, Jakia Jannat (特任研究員)

松本 浩輔 (特任研究員)

GRAHAM, Rosie (特任研究員)

大国 泰子 (技術支援員)

今 弥生 (技術支援員)

中根 香織 (事務支援員)

A-1) 専門領域：生物物理学，分子モーター，分子機械，1分子計測，タンパク質工学

A-2) 研究課題：

- a) 回転分子モーター V-ATPase のエネルギー変換機構の解明，機能創成，特性解析
- b) リニア分子モーターキネシンの改変・ハイブリッド化による運動制御と特性解析
- c) 人工 DNA ナノ粒子モーターの高速化，運動制御と特性解析

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) V-ATPase ( $V_0V_1$ ) は，ATP の化学エネルギーを利用して細胞膜を介するイオンの能動輸送を行う分子ポンプであり，ATP 加水分解反応を触媒する  $V_1$  とイオン輸送を担う  $V_0$  の2つの回転分子モーターの複合体である。我々が研究対象としている腸球菌由来  $V_0V_1$  ( $EhV_0V_1$ ) はナトリウムイオン ( $Na^+$ ) を輸送する。我々は， $EhV_0V_1$  のイオン結合部位を改変することで，イオン選択性を  $Na^+$  からプロトン ( $H^+$ ) に変えることに成功した。
- b) 2本足で歩く分子モーターキネシン-1 は，後足が前足を常に追い越すいわゆるハンドオーバーハンド機構で，レールである微小管上を直進運動する。微小管上にはキネシン結合部位が前後左右に多数存在するにも関わらず，後足が前足を追い越して常に前方に結合する機構は不明である。我々は，人工分子ポリエチレングリコール (PEG) でキネシンの2つの足を繋いだ生体-人工ハイブリッドキネシンを創成し，高速高精度1分子計測でその運動素過程を解析した。その結果，柔らかい PEG リンカーで繋いだ場合にも，天然型と同様のハンドオーバーハンド機構で正確に直進運動し，2つの足を繋ぐリンカーの剛直性は不要であることを明らかにした (論文準備中)。
- c) タンパク質分子モーターに触発されて開発された DNA 人工分子モーターは設計の自由度が高く，DNA の塩基配列や長さを変えることで足場との結合の親和性や選択性を制御できる。しかし，先行研究で報告されている DNA 人工分子モーターの運動速度は数 nm/s 程度であり，10-1000 nm/s で動くタンパク質分子モーターに比べて大きく劣る。我々は，DNA 修飾金ナノ粒子，RNA 修飾足場，DNA 依存的 RNA 分解酵素で構成される DNA ナノ粒子モーターの律速過程を1粒子追跡とシミュレーションで特定・改善し，タンパク質分子モーターに匹敵する数 10 nm/s の運動速度を達成した。

B-1) 学術論文

**A. OTOMO, T. IIDA, Y. OKUNI, H. UENO, T. MURATA and R. IINO**, “Direct Observation of Stepping Rotation of V-ATPase Reveals Rigid Component in Coupling between  $V_0$  and  $V_1$  Motors,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119(42)**, e2210204119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2210204119

**A. OTOMO, M. MIZUNO, K. INOUE, H. KANDORI and Y. MIZUTANI**, “Protein Dynamics of a Light-Driven  $\text{Na}^+$  Pump Rhodopsin Probed Using a Tryptophan Residue near the Retinal Chromophore,” *Biophys. Physicobiol.* **20**, e201016 (2023). DOI: 10.2142/biophysico.bppb-v20.s016

**T. HARASHIMA, Y. EGAMI, K. HOMMA, Y. JONO, S. KANEKO, S. FUJII, T. ONO and T. NISHINO**, “Unique Electrical Signature of Phosphate for Specific Single-Molecule Detection of Peptide Phosphorylation,” *J. Am. Chem. Soc.* **144(38)**, 17449–17456 (2022). DOI: 10.1021/jacs.2c05787

B-3) 総説, 著書

**K. FUJIMOTO, R. IINO and R. YOKOKAWA**, “Linear-Zero Mode Waveguides for Single-Molecule Fluorescence Observation of Nucleotides in Kinesin-Microtubule Motility Assay,” *Methods in Molecular Biology*, **2430**, 121–131 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-1983-4\_8

**A. OTOMO and T. KOSUGI**, “Tackle ‘Molecular Engine’ by Early-Career Researchers,” *Biophys. Physicobiol.* **19**, e190039 (2022). DOI: 10.2142/biophysico.bppb-v19.0039

B-4) 招待講演

飯野亮太, 「リニア分子モーターキネシン1のエンジニアリング」, 第22回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「発動分子エンジニアリング: タンパク質分子機械をいじり倒して実現する新機能」, つくば, 2022年6月.

飯野亮太, 「結晶性高分子分解酵素の反応サイクルの1分子イメージング解析」, 第19回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 岐阜, 2022年11月.

飯野亮太, 「分子モーターの動きをみる, 動きをつくる」, 名古屋大学理学研究科談話会, 名古屋, 2022年11月.

飯野亮太, 「分子モーターの動きをみる, 動きをつくる」, 第36回分子シミュレーション討論会, 東京, 2022年12月.

飯野亮太, 「生体・人工ハイブリッド分子モーターの創出と特性解析」, 分子研研究会「生体分子材料を探る: 発動分子のさらなる理解と設計に向けて」, 岡崎, 2023年3月.

大友章裕, 「1分子計測と共鳴ラマン分光法を用いた細胞膜で働くタンパク質のダイナミクス研究」, 光科学若手研究会, オンライン開催, 2022年6月.

大友章裕, 「1分子計測・活性測定・タンパク質工学による回転型V-ATPaseの統合的研究」, 第60回日本生物物理学会年会, 函館市, 2022年9月.

大友章裕, 「1分子散乱イメージングによる回転分子モータータンパク質の構造ダイナミクス研究」, 物性研究所機能物性セミナー, 柏市, 2023年2月.

**R. IINO**, “Single-molecule analysis and engineering of molecular motor proteins,” Sendai 2022, An Update on Molecular Machines: Open Challenges and New Perspectives, Sendai, August 2022.

**R. IINO**, “Engineering rotary and linear molecular motor proteins,” The 3<sup>rd</sup> NINS-Princeton Joint Symposium, Princeton (USA), March 2023.

**A. OTOMO and R. IINO**, “Single-molecule analysis and engineering of Na<sup>+</sup>-pumping V-ATPase,” EASMB 2022 Symposium, Singapore, October 2022.

**R. IINO**, “Engineering linear motor protein kinesin-1,” EASMB 2022 Symposium, Singapore, October 2022.

**R. IINO**, “Single-molecule analysis and engineering of motor proteins,” iNANO-IMS-ExCELLS Interdisciplinary Nanoscience Joint Meeting, Okazaki (Japan), December 2022.

**R. IINO**, “Engineering linear molecular motor kinesin-1 (\*Canceled due to COVID-19 situation),” 2<sup>nd</sup> Workshop “Molecules, Materials, Devices and Systems,” New York (USA), June 2022.

#### B-5) 特許出願

US10809257B2, “Method for detecting target molecule,” H. NOJI, R. IINO and S. ARAKI (NINS), United States (Granted on October 20, 2020).

特願 2021-168388, 「タンパク質, ポリヌクレオチド, 組換えベクター, 形質転換体, ポリエチレンテレフタレート分解用組成物, 及びリサイクル品の製造方法」, 中村彰彦, 飯野亮太 (自然科学研究機構), 2021年.

#### B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会ウェブサイト編集委員長 (2021–2022).

日本生物物理学会理事 (2019.6–2023.6).

学会誌編集委員

米国生物物理学会誌 *Biophysical Journal*, Editorial Board Member (2020–2025).

#### B-8) 大学等での講義, 客員

静岡大学大学院総合科学技術研究科, 非常勤講師, 「応用生命科学特別講義I」, 2022年9月.

名古屋大学大学院理学研究科, 非常勤講師, 「分子物性学特別講義」, 2022年4月–2023年3月.

総合研究大学院大学物理科学研究科, 「機能生体分子科学」, 2022年4月.

#### B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(B), 「バクテリアべん毛モーター固定子複合体の「回転モデル」を1分子計測で実証する」, 飯野亮太 (2021年度–2023年度).

科研費新学術領域研究「発動分子科学」(計画研究), 「生体・人工発動分子によるエネルギー変換過程の1分子計測法の開発」, 飯野亮太 (2018年度–2022年度).

科研費若手研究, 「一分子計測法で明らかにする V-ATPase の機能と構造の相関」, 大友章裕 (2021年度–2023年度).

自然科学研究機構若手研究者による分野間連携研究プロジェクト, 「ボトムアップアプローチによる分子モータータンパク質の機能改変」, 大友章裕 (2022年度).

自然科学研究機構分野融合型共同研究事業, 「ハイブリッド微小管の創製・配列・制御」(代表; 内橋貴之), 飯野亮太 (研究分担者) (2022年度).

新分野創成センター先端光科学研究分野共同研究プロジェクト,「超局在赤外近接場分光による単一タンパク質内の振動分光」(代表:西田 純),大友章裕(研究分担者)(2022年度).

#### B-11) 産学連携

共同研究,キリンホールディングス(株),「PET分解酵素の開発」,飯野亮太(2022年).

#### C) 研究活動の課題と展望

生体分子モーター等のナノサイズの生体分子機械は,人間が作ったマクロなサイズの機械と比べてはるかに小さく,ブラウン運動の活用等,全く異なる作動原理で働く。今後も引き続き,天然の分子モーターを1分子計測して機構を調べるだけでなく,天然に存在しない分子モーターを積極的につくることで,その作動原理と設計原理をさらに深く理解し,機能向上や制御に繋げる。例えば,1回転で2倍のイオンを輸送するV-ATPaseをつくることで,ATP加水分解モーター $V_1$ とイオン輸送モーター $V_0$ のエネルギー変換の共役機構の理解を深めるだけでなく,イオン輸送速度や電気化学ポテンシャル形成能を制御する。また,創成した非天然型キネシンに我々が以前に開発した高速高精度マルチカラー1分子計測を適用し,2本の足の動きを同時に可視化してその歩行運動の機構をさらに深く理解するだけでなく,運動方向や速度の制御に繋げる。さらに,ヘテロな塩基配列を有するDNAナノ粒子モーターを二量体化して外部からのDNA添加で運動方向の制御を可能にし,センサー機能とアクチュエーター機能を兼ね備えた高速高制御人工分子モーターを創成する。