

## 飯野 亮 太 (教授) (2014年6月1日着任)

A-1) 専門領域：生物物理学，タンパク質科学，1分子計測

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
- b) リニア分子モーターセルラーゼのエネルギー変換機構の解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 腸内連鎖球菌由来 Na<sup>+</sup> 輸送性 V-ATPase (EhV<sub>0</sub>V<sub>1</sub>) は，ATP 加水分解反応のエネルギーで回転運動することで Na<sup>+</sup> イオンを能動輸送する分子モーターである。EhV<sub>0</sub>V<sub>1</sub> の大腸菌における発現系を初めて構築した。これにより，変異体作製や1分子計測に必要な固定用タグの導入の効率が大幅に改善された。この改変試料を用いて EhV<sub>0</sub>V<sub>1</sub> の1分子回転観察系を確立し，回転速度とトルクの計測に成功した。可溶性の単離 EhV<sub>1</sub> の回転速度やトルクと比較することで，EhV<sub>0</sub>V<sub>1</sub> では固定子と回転子の相互作用がペリフェラルストークにより安定化され回転が安定化し，単離 EhV<sub>1</sub> よりも高いトルクを発生することが明らかとなった。
- b) *Trichoderma reesei* 由来 cellobiohydrolase I (*TrCel7A*) は結晶性セルロースを加水分解しながら連続的に直進運動する分子モーターである。蛍光色素 Cy3 で標識した *TrCel7A* を調製して1分子蛍光観察を行った。これにより，結晶形の異なるセルロース I<sub>α</sub> とセルロース III<sub>1</sub> への *TrCel7A* の結合・解離速度定数を求めて比較することに成功した。さらに，高速 AFM 観察によるセルロース上での運動速度の比較にも成功した。これらの速度パラメーターを比較した結果，*TrCel7A* によるセルロース I<sub>α</sub> とセルロース III<sub>1</sub> の分解活性の大きな違いは化学反応素過程の速度定数の違いによるものではなく，セルロース上の加水分解可能なレーン数の違いや *TrCel7A* の「渋滞」の度合いの違いによるものであることが明らかとなった。

B-1) 学術論文

**H. UENO, Y. MINAGAWA, M. HARA, S. RAHMAN, I. YAMATO, E. MUNAYUKI, H. NOJI, T. MURATA and R. IINO**, "Torque generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase," *J. Biol. Chem.* **289**, 31212–31223 (2014).

**T. IKEDA, T. TSUKAHARA, R. IINO, M. TAKEUCHI and H. NOJI**, "Motion Capture and Manipulation of Single Synthetic Molecular Rotors by Optical Microscopy," *Angew. Chem., Int. Ed.* **53**, 10082–10085 (2014).

**T. IKEDA, R. IINO and H. NOJI**, "Real-Time Fluorescence Visualization of Slow Tautomerization of Single Free-Base Phthalocyanines under Ambient Conditions," *Chem. Commun.* **50**, 9443–9446 (2014).

**Y. SHIBAFUJI, A. NAKAMURA, T. UCHIHASHI, N. SUGIMOTO, S. FUKUDA, H. WATANABE, M. SAMEJIMA, T. ANDO, H. NOJI, A. KOIVULA, K. IGARASHI and R. IINO**, "Single-Molecule Imaging Analysis of Elementary Reaction Steps of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I (Cel7A) Hydrolyzing Crystalline Cellulose I<sub>α</sub> and III<sub>1</sub>," *J. Biol. Chem.* **289**, 14056–14065 (2014).

**H. TAKEHARA, K. MIYAZAWA, T. NODA, K. SASAGAWA, T. TOKUDA, S. H. KIM, R. IINO, H. NOJI and J. OHTA**, "A CMOS Image Sensor with Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 04EL02 (5 pages) (2014).

B-3) 総説, 著書

**R. IINO, Y. MINAGAWA, H. UENO, M. HARA and T. MURATA**, “Molecular structure and rotary dynamics of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase,” *IUBMB Life* **66**, 624–630 (2014).

飯野亮太, 中村彰彦, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 「1分子計測からわかるエクソ型セルラーゼの分子機構」*生物物理* **54**, 318–320 (2014).

内橋貴之, 飯野亮太, 安藤敏夫, 野地博行, 「高速AFMによるF<sub>1</sub>-ATPase分子回転の直接可視化」*生化学* **86**, 127–136 (2014).

飯野亮太, 「デジタルPCRとデジタルELISA」*化学フロンティア* **23** 1分子ナノバイオ計測: 分子から生命システムを探る革新的技術」*化学同人*, pp. 144–146 (2014).

B-4) 招待講演

**R. IINO**, “Single-molecule imaging analysis of molecular motors,” The 7<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences, Seoul (Korea), November 2014.

**R. IINO**, “Motions of individual biomolecular motors probed by gold nanoparticle and nanorod,” International Symposium on Small Particles and Inorganic Clusters (ISSPIC XVII), Fukuoka (Japan), September 2014.

**R. IINO**, “Watching and manipulating biomolecules one at a time,” PITTCOON 2014 PAI-NET Session: Ultrasensitive Analytical Technologies for Biology and Chemistry, Chicago (U.S.A.), March 2014.

飯野亮太, 「生体分子モーターを測る, 壊す, 創る」シンポジウム「細胞のメソスケール構造機能」京都, 2014年12月.

飯野亮太, 「金ナノ粒子, 金ナノロッドを用いた生体分子モーターのマイクロ秒1分子計測」新学術領域「柔らかな分子系」第7回ワークショップ, 岡崎, 2014年12月.

飯野亮太, 「目に見えないとでも小さなタンパク質機械の動きを見る」日本化学会東海支部「夢・化学 - 21 高校生のための化学講座: 見えないのを見る化学」浜松, 2014年11月.

飯野亮太, 「回るたんぱく質, 歩くたんぱく質の仕組みを探る」分子科学研究所市民公開講座第103回分子科学フォーラム, 岡崎, 2014年11月.

飯野亮太, 「生体分子モーターダイナミクスの1分子計測: 構造解析と理論予測との協奏を目指して」TCCI 第5回研究会, 岡崎, 2014年10月.

飯野亮太, “Importance of membrane pumps and channels: an introduction,” 第52回生物物理学会年会シンポジウム“Which is important for biophysicists, pump or channel?” 札幌, 2014年9月.

飯野亮太, 「1分子計測技術で生体分子マシン, 人工分子マシンの“動き”を調べる・考える」第63回高分子討論会S14 “動き”のある自己組織化材料: 動的応答・変化を示す材料の設計・機能・応用の最前線, 長崎, 2014年9月.

**R. IINO**, “Single-molecule high-speed imaging of rotary and linear molecular motors,” Andor Academy Kyoto, Kyoto, August 2014.

飯野亮太, 「細菌多剤排出ポンプ計測マイクロデバイス」第9回トランスポーター研究会年会シンポジウム「チャネル・トランスポーター研究の最前線2 (機能評価系・創薬)」名古屋, 2014年6月.

飯野亮太, 「DNAを巻き取る分子リール」第66回日本細胞生物学会大会シンポジウム「遺伝情報を司るDNAのふるまい」奈良, 2014年6月.

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. 札幌, 2014年1月.

B-6) 受賞, 表彰

R. IINO, Emerging Investigator. Lab on a Chip., The Royal Society of Chemistry, U.K. (2012).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学学会代議員 (2014.1.1–2015.6.31).

日本生物物理学学会分分野別専門委員( A-13. モータータンパク質 )(2014.1.1–2014.12.31).

学会誌編集委員

日本生物物理学学会学会誌「生物物理」編集委員 (2014–2015).

その他

公益財団法人新世代研究所バイオ単分子研究会委員 (2012.4.2–2015.3).

B-8) 大学での講義, 客員

東京大学大学院農学生命科学研究科, 非常勤講師「生体触媒分子論」2014年6月.

B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(B), 「リニアモータータンパク質糖質加水分解酵素の1ナノメートルステップの1分子計測」飯野亮太 (2012年–2014年).

科研費新学術領域研究「動的秩序と機能」(公募研究)「ATP 駆動サイボグ回転分子モーターの創生」飯野亮太 (2014年–2015年).

科研費新学術領域研究「柔らかな分子系」(公募研究)「金ナノロッドを用いた分子モーター構造ダイナミクスの高速1分子計測」飯野亮太 (2014年–2015年).

科研費挑戦的萌芽研究, 「生体・人工ハイブリッドナノモーターの創製」飯野亮太 (2012年–2013年).

科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」(公募研究)「分子モーターの構造揺らぎを調べる超高速配向イメージング法の開発」飯野亮太 (2011年–2012年).

科研費特定領域研究「高次系分子科学」(公募研究)「生細胞内1分子FRET 法による回転モータータンパク質のダイナミクス計測」飯野亮太 (2010年–2011年).

科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」(公募研究)「モータータンパク質の揺らぎと性能の相関を調べる超高速光学顕微鏡の開発」飯野亮太 (2009年–2010年).

科研費若手研究(B), 「プロトン駆動力で回転するATP 合成酵素を1分子技術とマイクロデバイスで可視化する」飯野亮太 (2009年–2010年).

科研費若手研究(B), 「プロトン駆動力で回転する生体分子モーター ATP 合成酵素の1分子計測」飯野亮太 (2006年–2008年).

日本学術振興会二国間交流事業共同研究, 「生細胞内で働くATP 合成酵素の回転速度を1分子技術で計測する」飯野亮太 (2010年–2011年).

大阪大学産業科学研究所リーダーシップ支援経費, 「1細菌培養・観察・回収用マイクロドロップレットアレイの開発」飯野亮太 (2009年).

大阪大学産業科学研究所原子力工学専攻21世紀COE 若手研究A,「マイクロ加工技術を駆使した異物排出遺伝子の網羅的スクリーニング」飯野亮太(2006年).

C) 研究活動の課題と展望

回転分子モーター V-ATPase に関しては, ATP 加水分解駆動時の  $\text{Na}^+$  輸送を伴う回転運動の詳細な解析が今後の課題である。また, 脂質膜を介する  $\text{Na}^+$  の電気化学ポテンシャル(濃度差と膜電位差)で一方向に回転できるのか, さらに回転できる場合, アップヒルな化学反応である ATP 合成を触媒できるのか, が今後検証すべき重要な課題である。界面活性剤で可溶化した試料の計測だけでなく, 人工脂質二重膜に埋め込んだ試料の1分子計測にも取り組む。またリニア分子モーターセルラーゼについては, 運動時の結合ドメインと触媒ドメイン間の協調機構の解明が重要な課題である。1分子 FRET 計測によりこれらのドメインの距離変化の計測を行うことで機構の解明に取り組む。さらに異種のセルラーゼを混合した際に結晶性セルロースの加水分解活性が大幅に上昇する現象,「シナジー効果」の機構解明が重要な課題である。今後は異種のセルラーゼを同時に1分子観察することによりシナジー効果の仕組みを明らかにする。