

## 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，分子機械，分子モーター，1分子計測，構造解析

A-2) 研究課題：

- a) リニア分子モーターキネシン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，キチナーゼのエネルギー変換機構の解明
- c) 回転分子モーター V-ATPase 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) キネシンは2本足で歩く生体分子モーターである。我々は直径40ナノメートルの金ナノ粒子をプローブとしてキネシンの片足に結合させ、足の動きの可視化に成功した (*Nature Chemical Biology* 印刷中)。微小管結合状態と非結合状態の足を明確に識別でき、浮いた足は進行方向に対し右側で大きく揺らぐ (ブラウン運動) することを明らかにした。この右側への偏りは、キネシンの両足を繋ぐ「脚」(ネックリンカー) の位置を考えると説明可能であり、微小管に結合した足の構造を反映していることが明らかとなった。また、浮いた状態の持続時間の ATP 濃度依存性から、片足が浮いた状態で起こる化学反応素過程 (微小管に結合した足への ATP の結合、結合した ATP の異性化または浮いた足からの ADP の解離) の速度定数を定量的に求めることができた。また、両足を繋ぐ脚を 1.5 倍 (7 アミノ酸残基) 長くするとまっすぐ歩けずに、後ずさりや左右にふらふらする酔っ払いのような千鳥足になった。さらに脚をアミノ酸残基 1 個分だけ短くすると、足が前になかなか着地できず浮いている時間が長くなり、鈍足になることが明らかとなった。この結果から、キネシンの2つの足にかかる張力の大きさが一方向に速く歩くために重要であることが示され、脚の長さは進化の過程で最適化されていることが示唆された。
- b) エクソ型セルラーゼやキチナーゼは結晶性多糖を加水分解しながら連続的に直進運動するリニア分子モーターである。しかしながら、キネシンやミオシン等の ATP 駆動のリニア分子モーターとは運動機構が全く異なる。我々はセルラーゼ、キチナーゼの作動機構の解明を目指し、1分子計測、構造解析、非天然分子創造という複合アプローチで研究を行っている。これまでに、細菌 *Cellulomonas fimi* 由来セルラーゼ CfCel6B の触媒ドメインの結晶構造を 1.3 Å の分解能で明らかにし、先行研究で構造が解かれているカビ *Trichoderma reesei* 由来の TrCel6A と比較することに成功した。さらに CfCel6B, TrCel6A の1分子蛍光観察により結晶性セルロース分解反応の素過程 (結合・分解・解離) の速度定数を全て明らかにすることにも成功し、構造と動態の相関解析に成功した (投稿準備中)。
- c) 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して Na<sup>+</sup> イオンを能動輸送する分子モーターであり、親水性部 EhV<sub>1</sub> を単離すると ATP を分解しながら回転する。EhV<sub>1</sub> の化学力学共役機構を明らかにするため、回転運動と蛍光性 ATP の結合解離との同時計測を行い、ATP が結合後、240–360 度の遷移 (ステップ) の過程で生成した ADP の解離が起こることを明らかにした。この結果は、EhV<sub>1</sub> の3つの触媒部位の1つの変異が入ったハイブリッド型 EhV<sub>1</sub> の回転計測からも支持された。

B-1) 学術論文

Y. OBAYASHI, R. IINO and H. NOJI, "A Single-Molecule Digital Enzyme Assay Using Alkaline Phosphatase with a Coumarin-Based Fluorogenic Substrate," *Analyst* **140**, 5065–5073 (2015).

S. ENOKI, R. IINO, Y. NIITANI, Y. MINAGAWA, M. TOMISHIGE and H. NOJI, “High-Speed Angle-Resolved Imaging of Single Gold Nanorod with Microsecond Temporal Resolution and One-Degree Angle Precision,” *Anal. Chem.* **87**, 2079–2086 (2015).

A. YUKAWA, R. IINO, R. WATANABE, S. HAYASHI and H. NOJI, “Key Chemical Factors of Arginine Finger Catalysis of F<sub>1</sub>-ATPase Clarified by an Unnatural Amino Acid Mutation,” *Biochemistry* **54**, 472–480 (2015).

A. NAKAMURA, T. ISHIDA, K. KUSAKA, T. YAMADA, S. FUSHINOBU, I. TANAKA, S. KANEKO, K. OHTA, H. TANAKA, K. INAKA, Y. HIGUCHI, N. NIIMURA, M. SAMEJIMA and K. IGARASHI, ““Newton’s Cradle” Proton Relay with Amide-Imidic Acid Tautomerization in Inverting Cellulase Visualized by Neutron Crystallography,” *Sci. Adv.* **1**, e1500263–e1500263 (2015).

B-3) 総説, 著書

R. IINO, H. UENO, Y. MINAGAWA, K. SUZUKI and T. MURATA, “Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses,” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31**, 49–56 (2015).

R. IINO, S. SAKAKIHARA, Y. MATSUMOTO and K. NISHINO, “Single-cell detection and collection of persister bacteria in a directly accessible femtoliter droplet array,” *Methods in Molecular Biology* **1333**, 101–109 (2015).

飯野亮太, 「薬剤排出トランスポーター活性のマイクロデバイスによる計測」*化学療法の領域* **31**, 440–448 (2015).

中村彰彦, 石田卓也, 鮫島正浩, 五十嵐圭日子, 「反転型セルラーゼの巨大結晶作製と中性子 / X線共構造解析」*日本結晶学会誌* **57**, 59–65 (2015).

B-4) 招待講演

R. IINO, “Dynamics of linear and rotary molecular motors revealed by gold nanopores,” Pacificchem 2015, Technical Symposia, Physical, Theoretical & Computational: Interplay between Chemistry and Dynamics in Biomolecular Machines, Honolulu (U.S.A.), December 2015.

R. IINO, “Single-molecule analysis of energy conversion mechanism of molecular motor,” IMS Workshop “Grand Design of Molecular Systems; Dynamic, Correlation and Harmony,” Okazaki (Japan), October 2015.

R. IINO, “High speed single-molecule measurement of conformational dynamics of molecular motors probed by gold nanorod,” KAKENHI International Symposium on “Studying the Function of Soft Molecular Systems,” Tokyo (Japan), July 2015.

R. IINO, “Dynamic motions of individual molecular motors,” IMS Asian International Symposium “Supramolecular Dynamics at the interface of Chemistry and Biology,” Okazaki (Japan), June 2015.

R. IINO, “Watching dynamic motions of individual molecular motors with gold nanopores,” PACCON2015, Bangkok (Thailand), January 2015.

R. IINO, “Single-molecule high-speed imaging analysis of ATP-driven molecular motors,” 第53回生物物理学会年会シンポジウム “Formation of spatiotemporal dynamic ordering mediated by ATP hydrolysis,” 金沢, 2015年9月.

飯野亮太, 「反転型ATPase によるイオンの輸送を考える」*分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」* 岡崎, 2015年4月.

飯野亮太, 「生体回転超分子モーターの作動メカニズム」*日本化学会第95春季年会特別企画シンポジウム*, 船橋, 2015年3月.

飯野亮太,「金ナノプローブで探る生体分子モーターのダイナミクス」日本化学会第95春季年会中長期企画シンポジウム, 船橋, 2015年3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

日本生物物理学会代議員 (2014–2016).

日本生物物理学会分野外専門委員( A-13. モータータンパク質 )(2014).

学会誌編集委員

日本生物物理学会学会誌「生物物理」編集委員 (2014–2015).

*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Associate Editor (2015.4.29–).

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 (2012.4.2–2018.3).

B-8) 大学での講義, 客員

名古屋工業大学大学院工学研究科, 非常勤講師,「未来材料創成工学特別講義II」2015年10月.

B-10) 競争的資金

自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト,「金ナノロッドの高速高精度光学イメージングによる生体分子モーターの複合1分子計測」飯野亮太 (2015年).

科研費基盤研究(B),「ナトリウムイオン輸送性 V-ATPase のエネルギー変換機構の解明」飯野亮太 (2015年–2017年).

科研費研究活動スタート支援,「セルロース分解酵素のモーター運動に寄与する構造要素の解明」中村彰彦 (2015年–2016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).

科研費特別研究員奨励費,「ダブルドメインセルラーゼの吸着バランス制御による結晶性多糖構造分解反応の促進」中村彰彦 (2013年–2014年).

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).

#### B-11) 産学連携

大幸財団自然科学研究助成「回虫精子アメーバ運動の完全再構成にむけたプロテオーム解析」飯野亮太(2015年).

ATI研究助成「省エネルギーリニアモーターの運動性を決める構造的要素の解明」中村彰彦(2015年–2016年).

#### C) 研究活動の課題と展望

リニア分子モーターキネシンについては、微小管に結合した足が結合したまま向きを変え、この向きの変化が2つの足の協調に重要であるという説がある。金ナノロッドをプローブに用い、微小管に結合した足の向きの変化の検出に取り組む。リニア分子モーターセルラーゼ、キチナーゼについては、運動素過程(ポーズとステップ)の可視化が重要な課題である。構造からステップサイズは1 nmと予測されている。高時間・高空間分解能1分子計測によりキチナーゼの1 nmステップを可視化してエネルギー変換機構を明らかにする。また、ドメイン交換した非天然セルラーゼを創造し、天然型の性能を凌駕する分子を創りだす。回転分子モーターV-ATPaseに関しては、ATP加水分解駆動時のNa<sup>+</sup>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Na<sup>+</sup>の電気化学ポテンシャル(濃度差と膜電位差)で一方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。