

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セルラーゼ，キチナーゼのエネルギー変換機構の解明
- b) 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) エキ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。カビ *Trichoderma reesei* 由来の *TrCel6A* は加水分解を行う触媒ドメイン (CD) と結合ドメイン (CBM) が糖鎖修飾されたリンカー領域で繋がった構造をしている。しかしそれぞれのドメインが分解反応においてどのような役割を担っているのか，詳細に解析した例はなかった。また，*TrCel6A* はセルロース上を直進運動しながら分解反応を行うと考えられていたが，実際に運動を観測した例はなかった。蛍光1分子観察により結合，運動，解離の反応時定数を解析した結果，リンカー領域でセルロースに結合し，結合ドメインで結合する結晶面の選択性を生み出している事が明らかとなった。また不活性型酵素と天然型酵素の運動を比較した結果，*TrCel6A* は 8.8 nm/sec の速度で直進運動し，一回の結合あたり 68 回加水分解反応を行っている事が明らかとなった。加えてドメイン構成の異なる細菌 *Cellulomonas fimi* 由来セルラーゼ *CfCel6B* と *TrCel6A* の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。その結果を基に，各ドメインを交換したキメラ酵素の創成に取り組んでいる。キチナーゼについては金ナノ粒子の修飾方法の改良と酵素への結合箇所の検討により 1.2 nm 間隔のステップ運動を検出する事に成功した。計測の精度をさらに上げる為，顕微鏡の改良を行っている。
- b) 腸内連鎖球菌由来 Na^+ 輸送性 V-ATPase (EhV_0V_1) は，ATP 加水分解反応のエネルギーで回転運動して Na^+ イオンを能動輸送する分子モーターであり，親水性部 EhV_1 を単離すると ATP を分解しながら回転する。 EhV_1 の化学力学共役機構を明らかにするため，ATP 加水分解反応に重要なアミノ酸残基アルギニンフィンガーに変異を導入し詳細な1分子解析を行った。その結果，反応生成物 ADP の解離に相当する素過程の同定に初めて成功した。

B-1) 学術論文

M. BABA, K. IWAMOTO, R. IINO, H. UENO, M. HARA, A. NAKANISHIA, J. KISHIKAWA, H. NOJI and K. YOKOYAMA, "Rotation of Artificial Rotor Axles in Rotary Molecular Motors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 11214–11219 (2016).

A. NAKAMURA, T. TASAKI, D. ISHIWATA, M. YAMAMOTO, Y. OKUNI, A. VISOOTSAT, M. MAXIMILIEN, H. NOJI, T. UCHIYAMA, M. SAMEJIMA, K. IGARASHI and R. IINO, "Single-Molecule Imaging Analysis of Binding, Processive Movement, and Dissociation of Cellobiohydrolase *Trichoderma reesei* Cel6A and Its Domains on Crystalline Cellulose," *J. Biol. Chem.* **291**, 22404–22413 (2016).

H. ISOJIMA, R. IINO, Y. NIITANI, H. NOJI and M. TOMISHIGE, “Direct Observation of Intermediate States During the Stepping Motion Of Kinesin-1,” *Nat. Chem. Biol.* **12**, 290–297 (2016).

Y. MATSUMOTO, S. SAKAKIHARA, A. GRUSHNIKOV, K. KIKUCHI, H. NOJI, A. YAMAGUCHI, R. IINO, Y. YAGI and K. NISHINO, “A Microfluidic Channel Method for Rapid Drug-Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa*,” *PLoS One* **11**, e0148797 (2016).

M. TACHIOKA, N. SUGIMOTO, A. NAKAMURA, N. SUNAGAWA, T. ISHIDA, T. UCHIYAMA, K. IGARASHI and M. SAMEJIMA, “Development of Simple Random Mutagenesis Protocol for the Protein Expression System in *Pichia pastoris*,” *Biotechnol. Biofuels* **9**, 199 (10 pages) (2016).

B-3) 総説, 著書

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. Mol. Biol.* **1333**, 101–109 (2016).

A. NAKAMURA, T. ISHIDA, M. SAMEJIMA and K. IGARASHI, “The use of neutron scattering to determine the functional structure of glycoside hydrolase,” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **40**, 54–61 (2016).

中村彰彦, 石田卓也, 日下勝弘, 田中伊知朗, 新村信雄, 鮫島正浩, 五十嵐圭日子, 「中性子/X線複合構造解析で酵素触媒反応におけるプロトンリレーを可視化する」, *生物物理* **56(3)**, 171–173 (2016).

中村彰彦, 石田卓也, 鮫島正浩, 五十嵐圭日子, 「中性子構造解析で明らかになった立体反転型セルラーゼのユニークな活性残基」, *バイオサイエンスとインダストリー* **74(3)**, 231–233 (2016).

中村彰彦, 石田卓也, 日下勝弘, 田中伊知朗, 新村信雄, 鮫島正浩, 五十嵐圭日子, 「中性子/X線結晶構造解析によって明らかとなった反転型セルロース加水分解酵素のプロトン伝達経路を含んだ反応機構」, *中性子科学会「波紋」* **26(3)**, 139–142, (2016).

B-4) 招待講演

R. IINO, “Watching dynamic motions of biological molecular machines,” 7th RIES-Hokudai International Symposium, Sapporo (Japan), December 2016.

R. IINO, “Intermediate states during the stepping motion of kinesin-1 revealed by high-speed single-molecule imaging with gold nanoprobe,” 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, Kanazawa (Japan), October 2016.

R. IINO, “Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1,” Biophysical Society Thematic Meeting: Engineering Approaches to Biomolecular Motors: From in vitro to in vivo, Vancouver (Canada), June 2016.

R. IINO, “Biomass decomposition by cellulase observed at the single-molecule level,” The symposium at Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok (Thailand), June 2016.

R. IINO, “Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1,” 8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, Okazaki (Japan), February 2016.

R. IINO, “Single-molecule analysis of new molecular motors hydrolyzing crystalline polysaccharides,” PACCON2016, Bangkok (Thailand), February 2016.

飯野亮太, 「金ナノプローブを用いた生体分子モーターの高速・高精度1分子計測」, 生理研研究会「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス〜限界を超えるための顕微鏡技術〜」, 岡崎, 2016年11月.

飯野亮太,「マイクロ・ナノデバイスを用いた1分子・1細胞ナノバイオ計測」,MNC2016技術セミナー「マイクロ・ナノバイオ技術の最前線」,京都,2016年11月.

飯野亮太,「金ナノプローブで生体分子の速いダイナミクスを観る」,第25回バイオイメージング学会学術集会シンポジウム「ナノバイオイメージング:1分子から細胞までの先端手法」,名古屋,2016年9月.

飯野亮太,「タンパク質分子機械を観る,操る,壊す,創る」,日本化学会生体機能関連化学部会若手の会第28回サマースクール,蒲郡,2016年7月.

飯野亮太,“Our approaches toward ‘real’ engineering of protein molecular machines,”分子研研究会「超機能分子の創成:合成,計測,数理が織りなす社会実装分子の戦略的設計と開発」,岡崎,2016年6月.

飯野亮太,「機動分子科学:趣旨説明」,日本化学会第96春季年会特別企画シンポジウム「機能を動きで実現する機動分子の科学」,京田辺,2016年3月.

飯野亮太,「金ナノプローブでタンパク質分子モーターのダイナミクスを観る」,新学術領域研究「柔らかな分子系」第15回ワークショップ『ダイナミクス観測からタンパク質の「柔らかさ」を観る』,大阪,2016年3月.

A. NAKAMURA, “Analysis of functional structure of cellulase by neutron crystallography,” 8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences, Okazaki (Japan), February 2016.

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別専門委員 (A-13. モータータンパク質) (2014).

日本生物物理学会分野別専門委員 (E-04. タンパク質工学) (2016).

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).

日本生物物理学会小中高校への講師派遣サポート事業講師 (2016.11–).

B-8) 大学での講義,客員

名古屋大学IGER,非常勤講師,「自然科学連携講義1」,2016年11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,「金ナノプローブ表面の電場増強を利用した生体分子モーターの動きと化学反応の複合1分子計測法の開発」,飯野亮太 (2016年).

科研費新学術領域研究「動的秩序と機能」(公募研究),「糖質加水分解サイボーグリア分子モーターの創生」,飯野亮太 (2016年–2017年).

科研費新学術領域研究「柔らかな分子系」(公募研究),「金属ナノプローブを用いた分子モーターの運動と構造変化の高速1分子計測」,飯野亮太(2016年-2017年).

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).

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-2016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).

C) 研究活動の課題と展望

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。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 ステップを可視化する事ができたが, 更なる解析の為に, 顕微鏡の改良を行うだけでなく観測データの解析方法の改良も試みる。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出す。回転分子モーター V-ATPase に関しては, ATP 加水分解駆動時の化学力学共役の完全な理解, および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。さらに, ATP 結合部位(触媒サイト)やイオン結合部位を改造し, 天然に存在しない新しい機能を持つ回転分子モーターを創り出す。