

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
- c) 先端的生体1分子計測法の開発

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) キチナーゼは結晶性キチンを加水分解しながら直進運動するリニア分子モーターである。金ナノ粒子の修飾方法の改善と酵素への結合箇所の検討により一方向性の長い運動を観測する事に成功した。運動速度は蛍光標識したキチナーゼとはほぼ同等であり，運動への金ナノプローブの影響はないと結論した。二次元ガウス関数フィットで求めた座標の軌跡をメディアフィルター処理してノイズを除去し，運動ステップの検出を行った。これにより 1.1 nm の前進ステップ運動と 1.2 nm の後退ステップ運動を検出する事に成功した。1.1 nm の前進ステップ運動について，ステップ前の停止時間の分布を解析すると2つの時定数が得られた。重水環境中で同様の解析を行った結果，遅い反応の時定数は変化しなかったのに対し速い反応のそれは 3.8 倍遅くなり，大きな同位体効果が観測された。ステップ運動の間には加水分解と生成物解離，およびキチン分子鎖の 90° ツイストと結晶表面からの脱結晶化という2つの共同的な反応素過程が起こると考えられる。これらの素過程のうち，加水分解では水素，酸素原子間の結合の組み換えが起こるため，同位体効果が大きく出ると考えられる。よって，反応の律速段階はキチン分子鎖の 90° ツイストと結晶表面からの脱結晶化であると結論づけられた。また，後退ステップ運動と後退から復帰する前進ステップ運動の時定数はほぼ同じであった。即ち，2つの状態の自由エネルギーはほぼ等しいと推測された。ドッキングモデルにより活性中心の結合エネルギーを推定すると，ステップ運動後のミカエリスコンプレックスの結合エネルギーが非常に高く，これにより脱結晶化した後のキチン分子鎖を安定化していると考えられた。
- b) 腸内連鎖球菌由来 V₁-ATPase (EhV₁) の回転運動を詳細に解析した結果，3つの触媒部位に由来する 120° のステップが 40° と 80° のサブステップから構成されている事が明らかとなった。サブステップ前の持続時間の ATP と ADP への濃度依存性を調べた所，40° ステップは ATP 結合で起こることが明らかとなった。また，加水分解が遅くなる ATP_γS を基質に用い，加水分解は 40° ステップ前に起こることが明らかとなった。さらに，ATP_γS に ADP を混合すると，80° のバックステップをする事が明らかとなった。同様に，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た変異体を用いて ATP と ADP を混合して観測すると，80° のバックステップが観測された。80° バックステップ前の停止の持続時間は ADP 濃度に依存する事から，80° ステップは ADP の解離により起こると結論した。以上の解析により，EhV₁ の化学力学共役機構をほぼ完全に明らかにした。
- c) 金ナノ粒子をプローブに用いた生体1分子計測の位置決定精度，および時間分解能の改善に取り組んだ。金ナノ粒子の粒径，照明用レーザーの強度，画像のピクセルサイズ，輪帯照明光学系の導入により，100 μs の時間分解能で 3 Å の位置決定精度を達成した。また，金ナノ粒子と銀ナノ粒子の単粒子散乱スペクトルの取得，および金・銀ナノ粒子をプローブに用いた二色同時観察を達成した。

B-1) 学術論文

M. TACHIOKA, A. NAKAMURA, T. ISHIDA, K. IGARASHI and M. SAMEJIMA, “Crystal Structure of Family 6 Cellobiohydrolase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*,” *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **73**, 398–403 (2017).

B-2) 国際会議のプロシーディングス

K. FUJIMOTO, Y. MORITA, R. IINO, M. TOMISHIGE, H. SHINTAKU, H. KOTERA and R. YOKOKAWA, “Linear zero mode waveguides for the study of chemo-mechanical coupling mechanism of kinesin,” *2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 64–67 (2017).

J. ANDO, T. SEKIYA, DEN KA, H. YAMAKOSHI, K. DODO, M. SODEOKA, S. KAWATA and K. FUJITA, “Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles,” *SPIE BiOS 2017 Proceedings*, 1004606-1 (2017).

B-3) 総説, 著書

飯野亮太, 「分子モーターの1分子イメージング」, *生体の科学* [特集: 細胞多様性解明に資する光技術一見で, 動かす], **68**, 388–389 (2017).

立岡美夏子, 中村彰彦, 石田卓也, 高橋幸子, 巖 斌, 田仲広明, 古林直樹, 伊中浩治, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 「水素原子の可視化を目指したセルラーゼの大型結晶作製」, *宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性*, **34(1)**, 340108 (6 pages) (2017).

安藤 潤, 藤田克昌, 「ラマン分光顕微鏡とライフサイエンス応用」, *光アライアンス*, **28(6)**, 52–57 (2017).

飯野亮太, 安藤 潤, 中村彰彦, 「金ナノプローブでタンパク質分子モーターのダイナミックな動きを観る」, *JSMI Report* **11(1)**, 11–16 (2017).

B-4) 招待講演

R. IINO, “High-speed single-molecule imaging analysis of protein molecular motors probed by gold nanoparticles and nanorods,” DAC seminar on dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems, Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University, Hsinchu (Taiwan), November 2017.

R. IINO, “Chitinase A is 1-nm stepping Brownian motor decomposing crystalline polysaccharide,” NANOTEC-IMS joint research meeting, Pathum Thani (Thailand), October 2017.

R. IINO and A. NAKAMURA, “Stepping motion and chemo-mechanical coupling of chitinase resolved by single-molecule analysis,” IUPAB2017 “Molecular Machinery,” Edinburgh (U.K.), July 2017.

R. IINO, “High-speed single-molecule measurement of molecular motors with metallic nanoprobe,” KAKENHI International symposium on “Studying the function of soft molecular systems,” Sapporo (Japan), June 2017.

R. IINO, “Chemo-mechanical coupling mechanisms of linear and rotary molecular motors revealed by high-speed single-molecule imaging analysis,” Frontier bioorganization forum 2017: Dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems, Taipei (Taiwan), April 2017.

R. IINO, “Single-molecule dynamics of natural and engineered molecular motors,” The 5th international symposium on “Dynamical ordering & integrated functions,” Komaba, Tokyo (Japan), January 2017.

飯野亮太, 「高速1分子イメージング解析で明らかとなったタンパク質分子モーターの化学力学共役機構」, 高分子討論会シンポジウム「「柔らかな」生体および合成高分子系の解明と構築」, 愛媛大学, 松山, 2017年9月.

飯野亮太, “Chemo-mechanical coupling mechanisms of linear and rotary molecular motors revealed by high-speed single-molecule imaging analysis,” 第55回生物物理学会年会シンポジウム「Softness and functions of biological molecules under various environments」, 熊本大学, 熊本, 2017年9月.

飯野亮太, 「機動分子科学: 生体分子, 人工分子を超えて」, 第17回蛋白質科学学会年会ワークショップ「機動分子科学」, 仙台国際センター, 仙台, 2017年6月.

飯野亮太, 「金ナノプローブで生体分子モーターのダイナミックな動きを観る」, 分子イメージング学会学術集会シンポジウム「生命の神秘に迫る分子イメージング」, 横浜港大さん橋ホール, 横浜, 2017年5月.

飯野亮太, 「生体分子機械を観る, 操る, 壊す, 創る」, 海洋研究開発機構第13回新機能研究開拓研究グループセミナー, 海洋研究開発機構, 横須賀, 2017年5月.

飯野亮太, 「金ナノプローブでタンパク質1分子の動きはどこまで見えるか」, 研究会「分子観察による生命の階層横断的な理解」, 分子科学研究所, 岡崎, 2017年3月.

中村彰彦, 五十嵐圭日子, 「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」, 分子研研究会「触媒反応であるタンパク質反応を分子科学的観点から捉える」, 分子科学研究所, 岡崎, 2017年6月.

中村彰彦, 「1分子解析によりセルラーゼ/キチナーゼの何が見えるのか」, セルラーゼ研究会, 佐久平プラザ 21, 佐久, 2017年7月.

A. NAKAMURA and R. IINO, “Direct Observation of 1 nm Steps of Chitinase A Molecules with Gold Nano Probes,” Selected short talk in Gordon Research Conference Cellulases & Other Carbohydrate-Active Enzymes, Proctor Academy, Andover (U.S.A.), July 2017.

J. ANDO, M. SODEOKA and K. FUJITA, “Alkyne-tag Raman imaging and screening of small molecules in biological systems,” Biomedical Molecular Imaging 2017, Taipei (Taiwan), November 2017.

安藤 潤, 藤田克昌, 袖岡幹子, “Raman scattering microscopy and alkyne-tag for imaging and screening of bio-active small molecules,” 第55回生物物理学会年会シンポジウム「Softness and functions of biological molecules under various environments」, 熊本大学, 熊本, 2017年9月.

B-5) 特許出願

Application number: US15/351,522, “Kit for sealing beads and detecting target molecule,” H. NOJI, R. IINO and S. ARAKI (JST), Publication date: Apr 27, 2017, Filing date: Nov 15, 2016.

B-6) 受賞, 表彰

石渡大貴, 日本化学会東海支部長賞 (2017).

安藤 潤, 日本分光学会平成 29年度年次講演会若手講演賞 (2017).

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 (2014–2016).
- 日本生物物理学学会分野別専門委員 (A-13. モータータンパク質) (2014).
- 日本生物物理学学会分野別専門委員 (E-04. タンパク質工学) (2016).
- 日本分光学会中部支部幹事 (2017.10–). (安藤 潤)

学会の組織委員等

- 第 25 回日本バイオイメーキング学会学術集会副大会長 (2016).

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).
- 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).
- 日本生物物理学学会小中高校への講師派遣サポート事業講師 (2016.11–).
- 出前授業「温度と分子の状態」, 岩津中学校 (2017). (中村彰彦)

B-8) 大学での講義, 客員

- 京都大学大学院農学研究科, 非常勤講師, 「応用生命科学特論 IV」, 2017 年 7 月 6 日–7 日.
- 名古屋大学大学院理学研究科, 非常勤講師, 「物性生物物理学総合講義」, 2017 年 11 月 6 日.

B-10) 競争的資金

- 科研費挑戦的研究(萌芽), 「結晶性多糖表面を動きながら連続的に分解する酸化還元型酵素を創る」, 飯野亮太 (2017 年–2018 年).
- 自然科学研究機構新分野創成センターイメーキングサイエンス研究分野プロジェクト, 「プラズモニクナノ粒子による生体分子のマルチカラー 1 分子イメーキング法の開発」, 安藤 潤 (2017 年).
- 自然科学研究機構新分野創成センターイメーキ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).
- 科研費若手研究(B), 「高速高精度一分子観察による結晶性糖質分解機構の解明」, 中村彰彦 (2016 年–2017 年).
- 科研費新学術領域研究「動的構造生命」(公募研究), 「高時空間分解能一分子観察と理論解析を組み合わせた分子モーター運動解析法の開発」, 中村彰彦 (2016 年–2017 年).
- 自然科学研究機構新分野創成センターイメーキ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キ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 駆動サイボー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

セルラーゼ,キチナーゼは,運動方向が逆の分子を同時に作用させると結晶性多糖の分解活性が大きく上昇する「シナジー効果」が報告されている。*TrCel6A* と *TrCel7A*, および *SmChiA* と *SmChiB* の混合によるシナジー効果の機構を明らかにする。セルラーゼについてはさらに,各ドメインの役割が分かっている *TrCel6A* と *CfCel6B* をベースに用いてドメイン交換したキメラ酵素の作製を行う。キチナーゼについては *SmChiA* と運動方向が逆である *SmChiB* の運動機構の解明,および運動に必要な構造要素の解明を行う。解明した運動機構を基に *SmChiA* と *SmChiB* を組み合わせたハイブリッド酵素の作製を行う。回転分子モーター V-ATPase は, V_1 のサブステップのトルクの測定, および V_0V_1 複合体の1分子計測を行う。また,分子科学研究所古賀グループとの共同研究により, V_1 の A サブユニットにATP 結合能を付加した非天然型モーターの創成を行っている。1分子計測で回転速度, ATP, ADP の親和性, およびサブステップの角度等を野生型と比較する。先端的生体1分子計測法の開発については,位置決定精度と時間分解能の更なる改善,合金ナノ粒子を用いたマルチカラーイメージング,プラズモンカップリングを用いたプラズモンルーラーの開発に取り組む。