

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，分子モーター，分子機械，1 分子計測，構造解析，合理設計，網羅的変異導入，自動化

A-2) 研究課題：

- a) リニア分子モーターキチナーゼのエネルギー変換機構の解明
- b) 1 分子オングストローム計測法の開発とリニア分子モーターキネシンへの適用
- c) マルチカラー高速 1 分子計測法の開発
- d) 高速原子間力顕微鏡による脱凝集シャペロン ClpB の構造ダイナミクスの解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) プロセッシブキチナーゼ *SmChiA* 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。*SmChiA* を金ナノ粒子で標識し，全反射暗視野顕微鏡を用いて高い位置決定精度と時間分解能で 1 分子観測することで，キチン分解反応に伴う 1 nm 間隔のステップ運動を直接可視化することに初めて成功した。速度論的同位体効果を利用してキチンの分解に対応する時定数を決定し，運動中の反応素過程としては速く，律速段階ではないことを明らかにした。また，X 線結晶構造解析により運動中間体のキチン結合状態を明らかにし，さらに分子動力学シミュレーションを用いて *SmChiA* が直進運動する様子を解析した結果，キチンの脱結晶化が運動の律速段階であることを解明した。さらに，前進・後退の 1 nm ステップの割合と，反応時定数から計算される分解が起こる確率が同じであることから，*SmChiA* はレールであるキチンを切断し後退ステップのエネルギー障壁を上げることでブラウン運動（熱ゆらぎ）を前進に偏らせると結論づけた。言い換えると，*SmChiA* は Burnt-bridge 機構により一方向に運動するブラウニアンラチェットモーターであることを導き出した。
- b) 金ナノ粒子は，生体分子モーターが働く様子を，光学顕微鏡で 1 分子計測するためのプローブとして用いられている。光学顕微鏡による金ナノ粒子の観察における位置決定精度の原理的な限界を解明し，原子レベルの位置決定精度を達成することに成功した。また，金ナノ粒子からの信号光強度を高める輪帯照明型の全反射暗視野顕微鏡を構築し，マイクロ秒オーダーの時間分解能と原子レベルの位置決定精度を両立した。さらに開発した装置を用いて，生体内の長距離物質輸送を担うモータータンパク質キネシンの挙動を観察し，キネシンの足の動きを 10 マイクロ秒の時間分解能で詳細に追跡することに成功した。
- c) 金ナノ粒子，銀ナノ粒子，および金と銀の合金ナノ粒子をプローブとし，複数のレーザーと分光器を用いた多色同時散乱イメージング光学系を構築した。これにより，複数種の分子間の相互作用や分子内の構造変化を高速かつ高精度にイメージングできる 1 分子計測法を開発した。
- d) 高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を用い，凝集したタンパク質を再生する ClpB リングの構造変化を直接観察することに初めて成功した。ClpB リングの構造変化は，ネイティブ質量分析法，電子顕微鏡単粒子解析法，超遠心分析沈降速度法からも支持された。これらの結果より，ClpB のリングは ATP の結合・加水分解に応じて，円型・らせん型・ねじれた半らせん型と大きく構造変化することが明らかになった。また，変異型 ClpB を用いた解析により，これらの構造変化が脱凝集を引き起こす原動力となっていること，および ClpB が持つ 2 つの ATP 結合部位がそれぞれ固有の役割を担っていることを明らかにした。

B-1) 学術論文

- J. ANDO, A. NAKAMURA, A. VISOOTSAT, M. YAMAMOTO, C. SONG, K. MURATA and R. IINO**, “Single-Nanoparticle Tracking with Angstrom Localization Precision and Microsecond Time Resolution,” *Biophys. J.* **115**, 2413–2427 (2018). Doi: 10.1016/J.Bpj.2018.11.016
- K. FUJIMOTO, Y. MORITA, R. IINO, M. TOMISHIGE, H. SHINTAKU, H. KOTERA and R. YOKOKAWA**, “Simultaneous Observation of Kinesin-Driven Microtubule Motility and Binding of Adenosine Triphosphate Using Linear Zero-Mode Waveguides,” *ACS Nano* **12**, 11975–11985 (2018). Doi: 10.1021/Acsnano.8b03803
- J. TSUNODA, C. SONG, F. LICA IMAI, J. TAKAGI, H. UENO, T. MURATA, R. IINO and K. MURATA**, “Off-Axis Rotor in *Enterococcus Hirae* V-Atpase Visualized by Zernike Phase Plate Single-Particle Cryo-Electron Microscopy,” *Sci. Rep.* **8**, 15632 (10 pages) (2018). Doi: 10.1038/S41598-018-33977-9
- A. NAKAMURA, K. OKAZAKI, T. FURUTA, M. SAKURAI and R. IINO**, “Processive Chitinase is Brownian Monorail Operated by Fast Catalysis after Peeling Rail From Crystalline Chitin,” *Nat. Commun.* **9**, 3814 (12 pages) (2018). Doi: 10.1038/S41467-018-06362-3
- F. KAWAI, A. NAKAMURA, A. VISOOTSAT and R. IINO**, “Plasmid-Based One-Pot Saturation Mutagenesis and Robot-Based Automated Screening for Protein Engineering,” *ACS Omega* **3**, 7715–7726 (2018). Doi: 10.1021/Acsomega.8b00663
- T. UCHIHASHI, Y. H. WATANABE, Y. NAKAZAKI, Y. YAMASAKI, T. WATANABE, T. MARUO, S. UCHIYAMA, S. SONG, K. MURATA, R. IINO and T. ANDO**, “Dynamic Structural States of ClpB Involved in Its Disaggregation Function,” *Nat. Commun.* **9**, 2147 (12 pages) (2018). Doi: 10.1038/S41467-018-04587-W
- A. NAKAMURA, T. TASAKI, Y. OKUNI, C. SONG, K. MURATA, T. KOZAI, M. HARA, H. SUGIMOTO, K. SUZUKI, T. WATANABE, T. UCHIHASHI, H. NOJI and R. IINO**, “Rate Constants, Processivity, and Productive Binding Ratio of Chitinase A Revealed by Single-Molecule Analysis,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3010–3018 (2018). DOI: 10.1039/C7CP04606E

B-2) 国際会議のプロシーディングス

- K. FUJIMOTO, R. IINO, M. TOMISHIGE, H. SHINTAKU, H. KOTERA and R. YOKOKAWA**, “Fluorescent Observation of ATP Binding in Kinesin Driven Microtubule Gliding Using Nano-Slits,” *2018 IEEE Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 432–435 (2018).

B-3) 総説, 著書

- A. NAKAMURA and R. IINO**, “Visualization of Functional Structure And Kinetic Dynamics of Cellulases,” *Adv. Exp. Med. Biol.* **1104**, 201–217 (2018).
- R. IINO, S. SAKAKIHARA, Y. MATSUMOTO and K. NISHINO**, “Large-Scale Femtoliter Droplet Array for Single Cell Efflux Assay of Bacteria,” *Methods in Molecular Biology*, Springer, **1700**, 331–341 (2018).
- R. IINO, T. IIDA, A. NAKAMURA, E. SAITA, H. YOU and Y. SAKO**, “Single-Molecule Imaging and Manipulation of Biomolecular Machines and Systems,” *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1862**, 241–252 (2018).
- 飯野亮太, 「基礎講座：光学系構築・実践編 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) による1分子イメージング」, *応用物理* **87(7)**, 531–535 (2018).

飯野亮太,「基礎講座：光学系構築・実践編 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を作ってみよう」, 応用物理 **87**(6), 442–446 (2018).

B-4) 招待講演

R. IINO, “Operation and Design Principles of Protein Molecular Motors,” The 2nd IMS-Nanotec Joint Research Meeting, Okazaki (Japan), November 2018.

R. IINO, “Commonalities and Disparities in Mechanisms of Protein Molecular Motors Revealed by Single-Molecule Imaging Analyses with Plasmonic Nanoprobes,” 1st SNU Evolutionary Materials Workshop, Seoul (Korea), October 2018.

R. IINO, “Single-Molecular Videography of Protein Molecular Motors,” Telluride Workshop on “Molecular Videography,” Telluride, Co (U.S.A.), September 2018.

R. IINO, “Molecular Engines: An Introduction,” The 79th Okazaki Conference: Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, Okazaki (Japan), August 2018.

R. IINO, “Processive Chitinase is a Brownian Monorail Operated by Fast Catalysis after Peeling a Rail From Chitin Crystal,” Workshop on Molecules, Materials, Devices and Systems, Columbia University, New York (U.S.A.), May 2018.

R. IINO, “High-Speed Single-Molecule Imaging Analysis of Protein Molecular Motors with Plasmonic Nanoprobes,” Seminar in IBS Center for Molecular Spectroscopy and Dynamics, Korea University, Seoul (Korea), April 2018.

J. ANDO, “High-speed, high-precision, multi-color imaging of single biomolecules with plasmonic nanoprobes,” APC 2018, 10th Asian Photochemistry Conference, The 4th International Symposium on Frontiers in Bioimaging, Taipei (Taiwan), December 2018.

J. ANDO, “High-speed, high-precision, multi-color imaging of single biomolecules with plasmonic nanoprobes,” SENDAI 2018, An update on molecular motors: Open challenges and new perspectives, Sendai (Japan), November 2018.

J. ANDO, “High-speed, high-precision single-molecule imaging of dynein with plasmonic nanoprobes,” The 79th Okazaki Conference: Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, Okazaki (Japan), September 2018.

A. NAKAMURA, “Processive chitinase is Brownian ratchet moving unidirectionally by fast catalysis,” SENDAI 2018, An update on molecular motors: Open challenges and new perspectives, Sendai (Japan), November 2018.

A. NAKAMURA, “Direct observation of 1 nm steps of a “burnt-bridge” Brownian ratchet SmChiA on crystalline chitin with gold nanoprobe,” The 79th Okazaki Conference: Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines, Okazaki (Japan), August 2018.

A. NAKAMURA, “Resolving 1 nm steps of a Brownian-ratchet chitinase with gold nano particle,” International Symposium on Molecular Science—Physical Chemistry/Theoretical Chemistry, Chemoinformatics, Computational Chemistry—Cosponsored by Japan Society for Molecular Science, Funabashi (Japan), March 2018.

飯野亮太,「タンパク質分子モーターにとって協調性とは?」, 第7回発動分子科学セミナー, 東京工業大学, 横浜, 2018年11月.

飯野亮太,「バイオマス多糖を効率的に分解する生体分子モーターの作動原理」, 高分子討論会, 北海道大学, 札幌, 2018年9月.

飯野亮太,「プラズモニクナノプローブを用いた生体分子の時分割1分子イメージング」, 物理学会秋季大会, 同志社大, 京田辺, 2018年9月.

飯野亮太,「生体・人工分子マシンの共通原理の理解を目指して」, AMO 討論会, 東北大学, 仙台, 2018年6月.

飯野亮太,「タンパク質分子モーターの協調性とは?」, 情報通信研究機構未来ICT研究所, 未来ICT研究所, 神戸, 2018年4月.

飯野亮太,「タンパク質分子モーターの作動原理と設計原理の理解に向けて」,第4回生体分子科学シンポジウム,京都大学,京都,2018年2月.

中村彰彦,「キチン加水分解酵素はATPを使わずに運動するブラウニアンラチェットである」,分子モーター討論会,東京大学,東京,2018年11月.

中村彰彦,「キチン加水分解酵素は速い加水分解でブラウン運動を制御する」,多糖の未来フォーラム,京都大学,京都,2018年11月.

B-6) 受賞,表彰

中村彰彦,第32回セルラーゼ研究会ポスター賞(2018).

飯田龍也,日本生物物理学会中部支部講演会最優秀発表賞(2018).

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).

日本分光学会中部支部幹事(2017.10–). (安藤 潤)

日本生物物理学会分野別専門委員(E-04. タンパク質工学)(2018).

学会の組織委員等

第25回日本バイオイメーシ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–).

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

名古屋大学大学院理学研究科,客員教授,2018年–.

B-10) 競争的資金

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–2022年).

科研費基盤研究(B),「生体1分子オンゲストローム計測法の開発」, 飯野亮太 (2018年–2020年).

科研費新学術領域研究「レゾナンスバイオ」(公募研究),「プラズモニクナノ粒子を用いたマルチカラー1分子観察法の開発」, 飯野亮太 (2018年).

科研費基盤研究(B),「金属ナノ粒子によるタンパク質ドメインの高速高精度イメージング技術の開発」, 安藤潤 (2018年–2020年).
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,「独立に進化した動物・植物・微生物の糖質消化システムを分子機能構造から読み解く」, 中村彰彦 (2018年).

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ジ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分子イメージング法の開発」, 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ニ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。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。また, 先端的生体1分子計測法の開発として, 金・銀ナノ粒子を用いた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の位置決定精度と時間分解能の改善, 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。さらに, ロボットを用い, タンパク質分子モーター変異体の網羅的機能スクリーニングの自動化を行う。